

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862054

研究課題名(和文) 就業高齢者の生活支援施策に活用可能な歯周炎罹患度を測定する簡便な検査装置の開発

研究課題名(英文) Development of a simple and easy tester measuring the periodontitis affection degree that can conjugate for the life support measure of the operation elderly person

研究代表者

花谷 智哉 (Hanatani, Tomoya)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60649250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病の検査は費用と日数を必要とするため、簡単に歯周病の状態を測定できる検査装置の開発が切望されている。歯周病は全身疾患と関連があるため、歯周病の早期発見は、高齢者の健康増進に寄与する。そこで我々は、FT-IR(フーリエ交換赤外分光光度計)を用いて、唾液や歯周病原細菌を解析することにより歯周病罹患度を簡単に測定できる検査装置開発のための基礎データを得ることとした。歯周病患者の唾液と健康な人の唾液を採取し、FT-IRを用いて解析したところ、歯周病の判別が可能であった。これにより、本装置は歯周病罹患度の検査の一つとなることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：As for the inspection of periodontal disease, the development of the tester which can easily measure a state of periodontal disease is desired earnestly to need an expense and the days. As for periodontal disease, the early detection of periodontal disease contributes to the healthy increase of the elderly person from head to foot to be related to a disease. Therefore we decided to get basics data for the tester development that could easily measure a periodontal disease affection degree by analyzing saliva and periodontal disease original bacteria using FT-IR (Fourier exchange red outside spectrophotometer). After gathering saliva of the periodontal disease patient and saliva of a healthy person, and analyzing it using FT-IR, distinction of periodontal disease was possible. It was in this way thought that this device became one of the inspection of the periodontal disease affection degree.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病体・診断学

### 1. 研究開始当初の背景

平成 23 年厚生労働省の歯科疾患実態調査によると、約 80%の国民に何らかの病的歯肉所見がみられており、歯周病への罹患が示唆されている。歯周病はデンタルプラーク中の歯周病原細菌(グラム陰性細菌)によって引き起こされる慢性炎症疾患で、歯と歯肉の付着の喪失や歯槽骨の吸収を特徴とする。近年、歯周病と全身疾患の関連性を示す疫学研究が数多く報告され、歯周医学(ペリオドンタルメディシン)という概念が確立された。すなわち、歯周病を歯周病原細菌による慢性炎症巣として考え、炎症と菌体が全身に悪影響を与えている可能性が示唆されている。

しかしながら、臨床の現場では歯周病の診断は口腔内所見、エックス線写真、歯周組織検査により行われ、これら検査は術者である歯科医師の熟練度によって左右されるのが現状である。また、歯周病の原因となる歯周病原細菌の検査もほとんど行われていない。全身の健康維持のために、口腔ケア(歯周病の管理)の重要性が叫ばれている今、歯科医師不在でも行う事ができる歯周炎罹患度を測定できる簡便な検査法の開発が切望されている。

日本は平成 19 年に「超」高齢化社会(65 歳以上が全人口の 21%以上)となり、その割合は年々高くなってきている。平成 23 年厚生労働省の歯科疾患実態調査によれば、8020 運動の浸透により、20 本以上の歯を有する者の割合は各年齢層で増加するという良好な結果を得ている。その一方で、4mm以上のポケットをもつ歯周病に罹患している者の割合も 60 歳以上の群で増加している。すなわち、歯周病に罹患した歯の本数も年々増加しているのである。

この未曾有の高齢化社会において、高齢者は貴重な労働力として、さらには、日本のものづくりの知識・経験・技術を伝える伝道者として、期待されている。このような社会環境で歯周病の早期発見は高齢者の健康増進に寄与し、日本の国力高揚にもつながると考えられるが、歯科医師不在の健康診断などで使用できるような歯周病の簡便な検査法は存在しない。

FT-IR (Fourier Transform Infrared spectrometer: フーリエ変換赤外分光光度計)とはフーリエ変換を利用して赤外光の各波長における強度分布を調べることでできる装置である。赤外線を照射する事により、分子を振動・回転運動させ、それを特定波長域の光エネルギー吸収としてとらえる事が出来る。この原理を利用すると、化合物を構成する元素の種類と結合状態およびその量を計測可能となる。すなわち、FT-IR によって、物質の定性・定量分析が出来るのである。

近年、この FT-IR を用いて *Staphyrococcus*

のようなグラム陽性菌を中心とした細菌や *Candida* 菌などが同定されてきた。しかしながら、FT-IR による歯周病原細菌の同定は、未だ行われていない。また、口腔内細菌の存在するような唾液がどのようなスペクトルを示すのかは知られていない。

我々は九州工業大学との歯工学連携のなかで、歯周病患者と健常者の唾液を FT-IR を用いて解析した。その結果、歯周病患者群のスペクトルと健常者のスペクトルには明らかな相違が観察された。本結果より、FT-IR が歯周炎罹患度の簡便の検査の 1 つとなる可能性が示唆された。

### 2. 研究の目的

FT-IR (フーリエ変換赤外分光光度計)を用いて、唾液並びに歯周病原細菌を解析することにより、歯周炎罹患度を簡便に測定できる検査装置の開発のための基礎データを得ることである。

### 3. 研究の方法

[FT-IR による歯周病患者唾液と健常者唾液の比較]

歯周病患者・健常者 30 名ずつより唾液を採取し、FT-IR 解析を行う。

得られたスペクトルについて、スペクトルの波形、並びにスペクトルの強度について検証する。

[FT-IR による培養歯周病原細菌の定性]

代表的な歯周病原細菌株である *Porphyromonas gingivalis* (P.g.菌)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a.菌)、*Tannerella forsythia* (T.f.菌)、*Treponema denticola* (T.d.菌)の 4 菌種に加え、常在菌である *Streptococcus sanguinis* (S.s.菌)を培養し、FT-IR による定性解析を行う。それぞれの菌種について特徴的なスペクトルが存在するか検討する。

使用する細菌株は P.g.菌: ATCC33277、A.a.菌: ATCC 29522、T. f.菌: ATCC 43037、T.d.菌: ATCC 35405、S.s.菌: ATCC10556 である。

[線形結合による唾液中の歯周病原細菌混合比率の推定]

線形結合の概念を利用し、唾液中の歯周病原細菌混合比率を測定する。

\* 総細菌数における歯周病原細菌の割合が高いほど、歯周病の疾患活動度が高い事が報告されている。検査装置のオプションの 1 つに歯周病疾患活動をくわえるために、本実験を行う。

\* 唾液中には細菌以外の物質も混和しており、それらの影響でうまく計算ができない可能性が考えられる。その際にはまず、歯周病原性細菌株のみを混和した溶液で理想的な多変量解析を行った後、混合比率の推定を行う。

〔歯周病患者の条件〕

6mm以上の歯周ポケットを1歯以上有する者。

〔健常者の条件〕

4mm以上の歯周ポケットを有さないもの。

それぞれ患者に説明、同意を得た上で、唾液を採取する。

#### 4. 研究成果

歯周病患者唾液と健常者唾液を採取し、歯周病患者と健常者のIRスペクトルをFT-IRを用いて比較したところ、RAW IRスペクトルでは、吸光度の大きさが健常者の唾液サンプルと歯周病患者の唾液サンプルで異なっていた。また、ノーマライズを行った二次微分スペクトルでは、生体分子に由来するシグナルを示す領域において、健常者と歯周病患者の唾液サンプルではスペクトルの形状が異なっていた。これらの違いは、歯周病患者サンプルと健常者サンプルで、生体分子の量比の特徴が異なっていることを示唆している。

RAWスペクトルの1600-1700 $\text{cm}^{-1}$ 間の最高値から1700-1900 $\text{cm}^{-1}$ 間の最小値を引いた値をシグナル値として、サンプルごとにまとめると、サンプル内平均値は、歯周病患者の唾液サンプルのものを健常者のものと比較したところ、大きかった。一方、測定値ごとの一点のシグナル値で見た場合、同一サンプル内でも大きくばらついていた。このシグナル値の唾液サンプル内の平均値を判別基準として、シグナル値 $>0.022$ のものを歯周病と判別すると、accuracyが95.5%という高い精度で判別が可能であった。

PLSによるLatent vector 1-3のスコアプロットを行ったところ、歯周病患者の唾液サンプルと健常者の唾液サンプルそれぞれが、ほぼ完全に分かれた2つのクラスターを作るようにプロットされていた。Latent vector 1-3のローディングでは、どのLatent vectorについても1700-1600 $\text{cm}^{-1}$ のアミド由来のスペクトルの寄与が大きく現れていた。これにより、歯周病患者と健常者の唾液中に含まれる細菌に含まれるタンパク質や口腔内に分泌されるタンパク質の量の違いにおける影響が、分離に大きく寄与していると考えられる。

このPLSによるLatent vector 1-6を使った回帰モデルにより得られた予測値を、歯周病患者の唾液サンプルごとにプロットした結果、歯周病患者の唾液サンプルと健常者の唾液サンプルで明らかな予測値の違いが現れた。また、シグナル値のときと違い唾液サンプル内での分散が小さく、歯周病患者と健常さではほとんど重なりはみられていない。したがって、このNormalized2次微分スペクトルをPLS回帰した予測値による判別では、1サンプルにつき1点の測定でも十分に予測が可能であると考えられた。予測値 $\geq 0.5$ を

thresholdとしてそれ以上の値を示したものを歯周病と判別すると、Leave one cut Cross-validationによるAccuracyが93.0%と非常に精度よく判別が可能であった。1点測定するだけでも高精度で分類可能であるため、非常に有効な手段であると考えられる。ただし、この分類は教師付き分類による分類手法であるため、トレーニングデータに依存してしまう。そのため、中間症状など判断が曖昧のものも確実にどちらかに分類されます。それゆえ、今後さらにサンプルを収集し、様々な症状にも対応できるような分類器を作成する必要がある。以上より、FR-IRは歯周病の判別が可能であることが示唆され、歯周病罹患度の検査の一つとなりうることを示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

花谷智哉 (HANATANI, Tomoya)  
九州歯科大学・歯学部・歯学科・助教  
研究者番号：60649250

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：