

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463146

研究課題名(和文) 歯肉溝滲出液中の潜血を探知する歯周病迅速診断キット開発と応用

研究課題名(英文) Development of Periodontal Disease Rapid Diagnostic System using Occult Blood in GCF

研究代表者

沼部 幸博 (Numabe, Yukihiro)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：90198557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉溝滲出液(GCF)中の潜血(ヘモグロビン)の探知可能な歯周病迅速診断システム開発のため、本学附属病院で歯肉の健常者、歯周病患者の協力を得て、次の事を行った。1)歯周組織の状態とヘモグロビン量との関連の検索、2)GCF中の潜血を探知する迅速診断キットの開発、3)その迅速診断キットの歯周病初期段階の診断への有用性検証と臨床応用のための指針作成。

具体的には医科の定期健康診断などで便潜血検査に用いられているイムノクロマトグラフィー法を応用したヘモグロビン検出キットを、GCF中の微細な炎症の存在を示す潜血探知に応用できるように改良し、使い勝手などを検討し、歯周病迅速診断システムの開発に成功した。

研究成果の概要(英文)：For the development of periodontal disease rapid diagnostic system, we focused on the occult bleeding (hemoglobin) in gingival crevicular fluid (GCF). We employed the gingival healthy person and the periodontal disease patient at our hospital and performed the following examination.

1) Investigate the association between quantity of hemoglobin in GCF and the condition of periodontal tissue, 2)Development of the rapid diagnostic kit which can detect a occult bleeding (hemoglobin) in GCF, 3) Making the guideline of periodontal disease rapid diagnostic kit for detect an initial stage of periodontal disease.

We improved the hemoglobin detection kit for fecal occult-blood in medical examinations which apply an immunochromatographic analysis method. We also examined a convenience and sensitivity of this kit, we succeeded in the development of the periodontal disease rapid diagnostic system.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯肉溝滲出液(GCF) 歯周組織検査 遊離ヘモグロビン(Hb) 炎症 イムノクロマト法 潜血

1. 研究開始当初の背景

歯周治療学の考え方では、日常臨床で用いられている従来の検査・診断・治療に加えて、より早期に歯周病の発症を探知する検査法を開発し、そのデータを基に、すみやかに患者に合わせた最適な治療を行う必要性が求められている。

しかし従来の歯周病のポケット検査やエックス線検査などは、歯周組織破壊の結果や明確に進行中の病態の状況把握にすぎず、より早い病態探知ができないという欠点がある。よって歯周病発症の比較的早期の兆候を探知可能な検査システム開発が急務である。

これまで我々は 1) 歯肉溝滲出液（以下GCF）は各歯の部位別病態を反映する多彩な情報を含み、簡便かつ無痛的に採取可能な検査試料であること、2) その客観的成分情報に基づき歯周病を診断する方法、3) それを一步進めた GCF中酵素の迅速診断キット開発とその有用性などを報告してきた（GCF中Elastase検査キットの研究¹⁾）。

しかし、上記の我々が関わった過去のキット開発研究では、結果はチェアーサイドで10分程度で得られるものの、キットで探知できるものはすでに進行している歯周疾患であり、従来の方法での歯周病の検査結果に勝る有用性はなく、それ以降の大規模な臨床研究もほとんど行われていない。つまり、これまでのGCFの検査キットは、歯周病の病態把握は可能であるが、歯周病の早期発見のために用いるには、その能力に限界があった。

一方、歯周病の検査の指標として古くから使用されているものに、プロービング後の出血、すなわち Bleeding on Probing (BOP) があり、これは現在でも歯周組織の炎症の存在、すなわち病変の活動性を示すマーカーとして初診時、再評価時、SPT（サポートィブペリオドンタルセラピー）またはメンテナンス時に積極的に用いられている。しかし、BOPは明らかに視認できる出血、言い換えるとそれだけ組織破壊が進行していないと炎症の存在を把握できず、また組織をプローブにより刺激する形で結果を得る検査であることから、時として患者の疼痛を伴うものである。

そこで本研究では、我々の長年蓄積してきたGCFを用いた歯周病検査の基礎・臨床研究の研究経験を生かし、新たな歯周病診断マーカーとしてGCF中の視認できない程度の出血、すなわち潜血に焦点を当て、潜血の有無を赤血球由来のヘモグロビン検出を利用して評価する歯周病迅速診断キットを開発し、歯周病早期発見・早期治療技術に応用することを試みた。この検査方法は試料採取が比較的簡便で、また痛みをほとんど伴わない

ため、初診時はもとより、SPTやメンテナンスなどの定期検査時の歯周組織検査にも有用と考えられた。

2. 研究の目的

歯周病は口腔内だけでなく、全身疾患に繋がる問題である。しかし未だに日本国民の成人の70～80%以上が罹患し、歯の最大の喪失原因であることから、現在の歯周病検査と診断、それを治療に繋げる技術が充分ではないことは明白である。その原因には、歯周病発症の早期探知ができていないこと、治療計画立案が画一的検査結果に基づき行われていることが考えられる。

そこで本研究では、歯の部位ごとの微細な歯周組織の病態変化が把握可能で、客観的検査結果が得られる歯肉溝滲出液（GCF）に焦点を当て、GCF中成分変化の探知、とくに炎症の存在を反映する潜血の証拠であるヘモグロビン探知を応用した歯周病の迅速診断キットを開発した。さらに、それを歯周病の早期発見、早期治療へと臨床応用する方法論を確立した。

3. 研究の方法

GCF中の潜血の存在が歯周組織のどの程度の病的変化を表しているかを検証するために、我々の過去の研究成果からGCF中の歯周病診断マーカーとして有用性が示された2種類の炎症マーカー（アルカリホスファターゼ（以下ALP）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（以下AST））、単位時間当たりのGCFの総量、それに加えてGCF中全タンパク質量、潜血（Hb量：ヘモグロビン量）ルミノール量などと、従来からの歯周病の臨床パラメーターとの関連を検討した。

このことにより、歯周病初期の病変を探知するための潜血の存在、すなわちHb量測定の意義を見出すことができた。そしてその結果を基に、歯周病初期の状態を反映する潜血反応を検出する歯周病迅速診断キットの仕様を決定した。診断キット作成にはすでに便潜血の検査キットを販売している「株式会社わかもと」に技術協力を求めた。

その後、この開発した試作キットの臨床での検証を行い、この検査方法を歯周治療へ応用する際の指針を検討した。

以上の全研究過程では、「臨床研究に関する倫理指針」を遵守した。

具体的には、SPTに移行した64名の歯周病患者（平均年齢59.0歳）の103部位からペリオパ

ーパー30 秒間挿入で GCF 採取後、上記試作キットで Hb の反応を検査し、その後直ちに Hb 反応のラインをデンシトメーターで定量化した。

また採取した GCF は、液量および ALP、AST 活性、蛋白質量、ルミノールなどの測定も行った。歯周病の臨床パラメータは PII(Plaque Index)、GI(Gingival Index)、CAL(Clinical Attachment Level)、PPD(Probing Pocket Depth)、BOP(Bleeding on Probing)を評価し、GCF 検索結果との関連を解析した(本研究は本学倫理委員会の承認を受けた(承認番号 2111))。

4. 研究成果

まず開発した診断キットの原理と使用方法を図に示す。これは株式会社わかもとが開発、製造、販売している便潜血の検査キットを、感度、使用方法を検討し、GCF 中の潜血(Hb)を検知できるように改良したものである。

このように、まず GCF 中の潜血(Hb: ヘモグロビン)を約 5 分でチェアサイドで探知可能な迅速診断キットの開発に成功した。

このキットを用いて行った、臨床研究の基礎的データの結果を表に示す。この表では、従来の歯周組織の炎症の存在を示す代表的歯周病の臨床パラメータである BOP 測定において、BOP が陰性(-)で炎症の兆候が探知できなかったにもかかわらず、キット使用での Hb 陽性(+)を示した部位の GCF 量、生化学マーカーの ALP と AST 活性、さらに蛋白質量などが、Hb 陰性(-)部位と比べて高値で、統計学的に有意であったことを示している。

また、PPD など従来の臨床パラメータが高値で、さらに BOP 陽性(+)を示す部位では、高い%で Hb 陽性(+)を示していた。

これらのことから、Hb 検査は BOP と同等の歯周病検査における性能を示すと共に、それに加えて従来の歯周組織検査では探知できない組織破壊の徴候をも探知する事が可能で、今後の歯周病の診断指標の一つとなる可能性が示された。

また、本キットの歯周病の治療指針における新たな位置づけを考える場合、このキットを歯周病患者の初診時に多くの部位に対して用いるのは現実的ではないと考えられた。よって、歯周治療の最後のステージの SPT 時などの要監視部位の数カ所に限り、炎症再発の探知に用いることが本キットの特徴を引き出す有効な使用方法と考えられた。またプロービングと異なり、無痛下で最小限の侵襲で検査を行うこともでき、患者の苦痛を軽減するメリットも考えられた。

このように本研究では当初の計画通り、1)歯周

組織の状態とヘモグロビン(Hb)量との関連の検索、2)GCF 中の潜血(Hb)を探知する迅速診断キットの開発、3)その迅速診断キットの歯周病診断への有用性検証と臨床応用のための指針の提案を行うことができた。

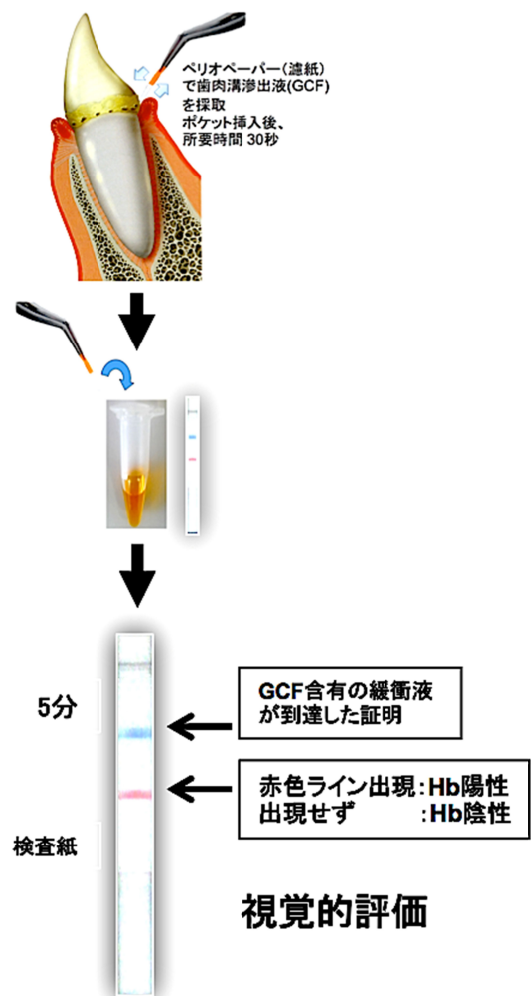
今後は本キットのさらなる性能の検討と、歯周治療での有用な使用方法について検討する予定である。

<引用文献> (研究開始当初の背景に該当箇所あり)

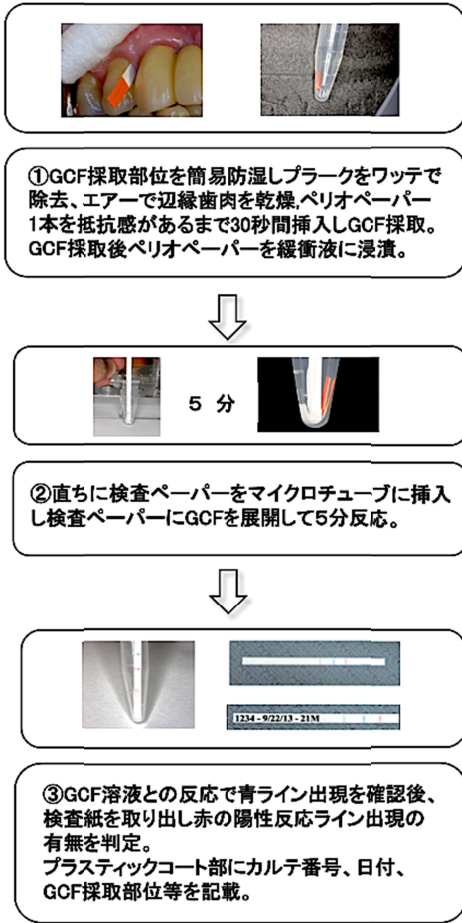
Armitage GC, Jeffcoat MK, Chadwick DE, Taggart EJ Jr, Numabe Y, Landis JR, Weaver SL and Sharp TJ, J Periodontol, vol.65, 1994, 120-128, DOI: 10.1902/jop.1994.65.2.120

【本キットの原理】

ヒトHbをヒトモノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィー(IC)法で検出



【本キットの使用方法】



【表】

BOP(-)の部位をキットでHb(-)およびHb(+)部位に分けた場合の各測定値

		年齢	PII	GI	PPD	CAL
BOP(-) Hb(-)	mean	55.64	0.19	0.48	2.12	2.43
	SD	15.78	0.47	0.71	0.97	1.53
	p value	0.04	0.12	0.17	0.24	0.74
significant		p<0.05	NS	NS	NS	NS
BOP(-) Hb(+)	mean	66.36	0.55	0.82	2.55	2.50
	SD	9.05	0.69	0.75	1.21	1.16

		GCF (μ l)	ALP (μ U)	AST (μ U)	全蛋白質量 (μ g/0.5ml)	Hb (ng/0.5ml)	ルミノール (ng/0.5ml)
BOP(-) Hb(-)	mean	0.38	13.17	337.14	10.14	1.36	43.12
	SD	0.32	21.55	626.77	11.97	2.63	74.50
	p value	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
significant		p<0.01	p<0.01	p<0.05	p<0.01	p<0.01	p<0.01
BOP(-) Hb(+)	mean	0.67	27.71	433.64	26.38	84.04	147.14
	SD	0.23	15.78	230.51	8.81	55.43	83.21

5. 主な発表論文など

[雑誌論文] (計 3 件)

Ito H, Numabe Y, Hashimoto S, Sekino S, Murakashi E, Ishiguro H, Sasaki D, Yaegashi T, Takai H, Mezawa M, Ogata Y, Watanabe H, Hagiwara S, Izumi Y, Hiroshima Y, Kido J, Nagata T, Kunimatsu K, Correlation Between Gingival Crevicular Fluid Hemoglobin Content and Periodontal Clinical Parameters. J Periodontol, 査読有, vol.87, 2016, 1314-1319. DOI: 10.1902/jop.2016.160092

沼部幸博、GCF で探知する歯周病 -新たな検査の登場-、歯学 (秋季特集号)、査読有、102 巻、2014、30-34、DOI:なし

沼部幸博、「喫煙 糖尿病 歯周病」健康長寿を狙うもの、日歯医師会誌、査読有、67 巻、2014、6-16、DOI:なし

[学会発表] (計 8 件)

沼部幸博、歯肉溝滲出液 (GCF) を使用した歯周病迅速診断キットの応用、第 23 回日本歯科医学会総会、2016 年 10 月 23 日、福岡国際会議場 (福岡県博多市)

伊藤弘、沼部幸博、上原直、橋本修一、BOP 検査に歯肉溝滲出液成分解析を加えた新規歯周組織検査、第 23 回日本歯科医学会総会、2016 年 10 月 23 日、福岡国際会議場 (福岡県博多市)

伊藤弘、上原直、沼部幸博、橋本修一、歯肉溝滲出液におけるヘモグロビン量と臨床パラメータとの相関について、第 59 回秋季日本歯周病学会学術大会、2016 年 10 月 7 日、朱鷺メッセ (新潟県新潟市)

上原直、伊藤弘、沼部幸博、橋本修一、歯肉溝滲出液 (GCF) 中のヘモグロビン解析による歯周病検査の有用性、第 9 回日本口腔検査学会学術大会、2016 年 10 月 2 日、奥羽大学講堂 (福島県郡山市)

沼部幸博、歯周病の検査・診断・治療計画の指針にそった臨床医のための歯周治療、平成 28 年度特定非営利活動法人日本歯周病学会・第 2 回関東地区臨床研修会、2016 年 4

月 10 日、栃木県歯科医師会館（栃木県宇都宮市）

伊藤弘、沼部幸博、橋本修一、歯周病検査における歯肉溝滲出液・唾液成分解析の有用性、第 8 回日本口腔検査学会学術大会、2015 年 10 月 3 日、神奈川歯科大学講堂（神奈川県横須賀市）

沼部幸博、伊藤弘、上原直、橋本修一、歯肉溝滲出液(GCF)中 Hemoglobin(Hb)検出を応用した歯周病迅速診断キットの開発、第 8 回日本口腔検査学会学術大会、2015 年 10 月 3 日、神奈川歯科大学講堂（神奈川県横須賀市）

伊藤弘、沼部幸博、関野 愉、村瀬悦子、石黒一美、小川智久、戸円智幸、橋本修一、GCF 中 Hb 検出における IC 法とルミノール法との相関について、2014 年度秋季学術大会（第 141 回）、2014 年 10 月 31 日、山形テルサ（山形県山形市）

[図 書] (計 3 件)

沼部幸博（単著）、学建書院、歯周病学サイトリーダー第 5 版、2016 年、総ページ数 152 ページ

沼部幸博（単著）、東京法規出版、歯周病検診で健康づくり、2015 年、総ページ数 11 ページ

沼部幸博（単著）、東京法規出版、歯と口からはじめる健康づくり、ライフステージ別歯と口のヘルスケアガイドブック、2015 年、総ページ数 35 ページ

[産業財産権]

○出願状況（計 1 件）

名称：歯周病を検出する方法及び迅速診断キット

発明者：沼部 幸博 伊藤 弘 橋本 修一

権利者：同上

種類：G01N 33/53 免疫分析；生物学的特異的結合分析；そのための物質

番号：特許願 2013-101760

出願年月日：平成 25 年 12 月 26 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼部 幸博 (Numabe Yukihiro)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：901985557

(2) 研究分担者

伊藤 弘 (Ito Hiroshi)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：30184683