

平成 30 年 9 月 3 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11399

研究課題名(和文)慢性歯周炎による組織破壊に外傷性咬合が与える影響の解明

研究課題名(英文)Effects of traumatic occlusion on periodontal destruction in patients with chronic periodontitis

研究代表者

中島 啓介 (NAKASHIMA, Keisuke)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80227785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：咬合調整前後でGCF中サイトカイン量を測定することで、外傷性咬合が歯周ポケット内の炎症に与える影響を明らかにすることを研究目的とした。1)歯周基本治療開始時、2)歯肉縁上スケーリング終了時、3)咬合調整後、4)被験歯SRP終了後、において慢性歯周炎患者の18被検歯からGCFを採取しサイトカイン量を測定した。その結果、咬合調整前後での臨床データの変化量と特定のサイトカイン量(GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-13, IL-15, IL-16, IP-10, RANTES, TNF- α , TNF- β , sTNF-R1, sTNF-R2, PDGF-BB)の変化量の間に関連が認められた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this investigation was to clarify the effects of traumatic occlusion on inflammation inside periodontal pockets by measuring cytokine levels in gingival crevicular fluid (GCF) before and after occlusal adjustment. Cytokine levels in GCF obtained from 18 periodontally involved teeth at the four treatment stages (Before periodontal initial therapy, after supragingival scaling, after occlusal treatment, after scaling and root planing) were measured. Clinical parameters (PPD, PESA and PISA) were significantly improved during periodontal initial therapy. Significant correlations were also observed between changes in clinical parameters (PPD and PESA) and changes in some cytokine levels (GM-CSF, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-13, IL-15, IL-16, IP-10, RANTES, TNF- α , TNF- β , sTNF-R1, sTNF-R2, PDGF-BB).

研究分野：歯周病学

キーワード：外傷性咬合 慢性歯周炎 歯肉溝滲出液 サイトカイン

1. 研究開始当初の背景

歯周治療の最終目標は失われた結合組織性付着を回復させることである。しかし、多くの症例では歯周ポケットをプロービング深さ (PPD) 3 mm 以下の好気的な環境にすることを目指している。PPD 4-6 mm の部位に対しては、付着の獲得を重視する場合はスケーリング・ルートプレーニング (SRP) が推奨されている。しかし、同じ PPD 4-6 mm の部位に対して SRP を行っても、患者によって PPD の減少量は異なる。減少量の違いは創傷治癒能力の違いによると考えられるが、SRP によって除去されない外傷性咬合などの他の原因が影響している可能性も否定できない。

研究代表者らは慢性歯周炎患者を対象として、歯周基本治療による PPD の減少を阻害する因子を臨床的な測定項目の中から探索した結果、歯の動揺がこのような因子の 1 つであることを明らかにした。慢性歯周炎患者に認められる歯の動揺が早期接触による外傷性咬合から生じることを考慮すると、外傷性咬合は歯周基本治療における歯周ポケットの創傷治癒を遅延させている可能性がある。

歯肉溝滲出液 (GCF) は患者に苦痛を与えずに比較的、容易に採取できるサンプルである。しかし、一度に採取できる GCF 量は 1 μ L 程度と極微量のため、測定可能なサイトカインの種類は数種に限定される。Sakai らは健常者 7 名と歯周炎患者 7 名から採取した GCF について、抗体アレイにより一度に 79 種類のサイトカインを測定している (引用文献 1)。その結果、健常者に特徴的な 10 種類、歯周炎患者に特徴的な 36 種類を明らかにしている。

2. 研究の目的

研究代表者らは慢性歯周炎患者から SRP の前後に GCF を採取し、Sakai らと同じ抗体アレイを使ってサンプル中の多種のサイトカイン濃度を測定してきた。その結果、歯周ポケットの治癒は GCF 中 IL-1 量と ICAM-1 量の SRP 後 1 週間までの減少率と関連していることを明らかにした (引用文献 2)。

本研究では、咬合調整 (外傷性咬合の除去) による GCF 中のサイトカイン量の変化を調べることにより、外傷性咬合が歯周ポケット内の炎症に対して何らかの影響を与えるか否か、与える場合はその機序を明らかにすることを研究目的とした。歯周ポケット内の炎症に対する外傷性咬合の影響を明らかにできれば、日常臨床で経験に基づいて行われている咬合調整という処置に科学的な根拠を提供できるだけでなく、難症例に関する治療指針を決定するツールにもなる。

3. 研究の方法

(1) 研究プロトコール

本研究は、九州歯科大学倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号: 15-1-通常)。2016 年から 2018 年に九州歯科大学附属病院を受診した患者の中から被験者として、1) 5 年以

内に継続的な歯周治療を受けていない、2) 重篤な全身疾患を有しない、という基準を満たす患者 12 名を選択した。本研究では、これら 12 名の被験者口腔内から、前歯部あるいは小臼歯部で歯の動揺がありデンタルエックス線写真上で垂直性歯槽骨吸収像を認める 18 歯 (同一被験者から複数歯を選択した場合もあり) を選択し被験歯とした (表 1)。

初診時に、全顎の歯周組織検査および 10 枚法デンタルエックス線写真撮影を行った。研究の趣旨を説明後、インフォームドコンセントを得られた患者の被験歯から GCF を採取した。その後、ペリオプローブ (#2; YDM, Tokyo, Japan) を使って被験歯の PPD およびプロービング時出血 (BOP), Miller の分類による動揺度を測定した。本研究では、歯肉縁上スケーリングによって口腔清掃状態を一定にした後、SRP の前に咬合調整を行った。

(2) GCF の採取

歯周基本治療開始時、歯肉縁上スケーリング終了時、咬合調整後、被験歯 SRP 終了後の部分的再評価時に GCF を採取した。

被験歯周囲の歯肉縁上プラークを除去しエアーによる乾燥後、ロールワッテ (Hakuzo, Tokyo, Japan) にて簡易防湿を施した。被験歯の測定部位にペリオペーパー® (YOSHIDA, Tokyo, Japan) を挿入し 30 秒間放置した。GCF 採取後、PERIOTRON®8000 (Oral flow, Hewlett, NY, USA) を使ってペリオトロン値を測定後、120 μ L のリン酸緩衝液 (PBS) が入ったチューブ (VIOLAMO, Osaka, Japan) に入れ -80 にて保存した。解析の際は室温で解凍し、30 秒間攪拌後に 800 \times g で 60 秒間遠心分離してその上清を使用した。

(3) GCF 中サイトカイン量の測定

サイトカイン量は Human Inflammation Antibody Array C3 キット (RayBiotech, Atlanta, GA, USA) を使って測定した。メンブレンを 2 mL のキットに付属の緩衝液中で 24、30 分間ブロッキングした後に、1 mL に希釈した GCF サンプルを加え 4 で一晩、インキュベートした。インキュベート後、メンブレンを 2 mL の洗浄緩衝液 で 3 回、洗浄緩衝液 で 2 回洗浄し、1:250 に希釈したビオチン化抗体を加え、4 で一晩、インキュベートした。メンブレンを前述のように洗浄後、1:1000 に希釈したペロオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを加え、4 で一晩インキュベートした。洗浄後、検出溶液を加え、24 で 2 分間インキュベートした。その後、メンブレン上の化学発光シグナルを ChemiDoc XRS+ System® (Bio-Rad, San Francisco, CA, USA) を使って画像として検出した。さらに、Image J (NIH, Baltimore, MD, USA) を使って得られた画像上での各サイトカインのスポット強度を測定し、RayBio® Antibody Array Analysis Tool (RayBiotech, Inc.) によりサイトカイン量を半定量的に算出した。

(4) 骨欠損率の算出

デンタルエックス線上にて、セメント-エナ

メル境 (CEJ) から根尖までの距離 (A) および CEJ から骨欠損底部までの距離 (B) をそれぞれ計測し、骨欠損率 ($B/A \times 100\%$) を算出した。

(5) 歯肉内縁上皮面積 (PESA), 炎症内縁上皮面積 (PISA) の算出

歯肉内縁上皮面積 (PESA), 炎症内縁上皮面積 (PISA) は、歯周組織状態を把握するパラメータとして有用である (引用文献 3)。ウェブサイト (www.parsprototo.info) より入手したスプレッドシートに被験歯の PPD, BOP の値を入力し、PESA, PISA を算出した。

(6) 統計学的解析

1) GCF 採取部位の PPD, 2) 被験歯の PESA, PISA および動揺度, 3) 40 種のサイトカイン量, 4) GCF 量 (ペリオトロン値), をデータ解析に使用した。統計解析には、JMP (SAS Institute, Cary, NY, USA) ソフトウェアを用い、有意水準を 0.05% 未満とした。

4. 研究成果

(1) 歯周基本治療における臨床データの変化

各 GCF 採取時における被験歯の臨床データを比較した (表 2)。GCF 採取部位の PPD, 被験歯の PESA, PISA, 動揺度, GCF 量について、対応のある t 検定にて分析した。歯肉縁上スケーリング後 () では歯周基本治療開始時 () と比較し、PPD, PESA, PISA が有意に減少した。その後、咬合調整 () を行ったが、と比較し PESA のみが有意に変化した。その後、SRP () を行ったところ、と比較し PPD, PESA, PISA が有意に変化した。動揺度に関しては治療の進行に伴い平均値は減少していたが、各時期において有意差は認められなかった。GCF 量についても減少する傾向は認められたが、有意差は認められなかった。

(2) 歯周基本治療における GCF 中サイトカイン量の変化

各 GCF 採取時の GCF 中サイトカイン量 (40 種類) を比較した。サイトカイン量の変化については Steel-Dwass 法にて多重比較検定を行った。その結果、間、間、間でいずれのサイトカイン量も有意な変化を認めなかった。

(3) 臨床データの変化とサイトカイン量の変化の相関

各 GCF 採取時 (間、間、間) における臨床データ変化量と GCF 中サイトカインの変化量の相関を Spearman の順位相関係数によって分析した (表 3)。間において、GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-13, IL-15, IL-16, IP-10, RANTES, TNF-, TNF-, sTNF-R1, sTNF-R2 の 13 種のサイトカイン変化量が PPD の変化量と、sTNF-R1, sTNF-R2, PDGF-BB の変化量が PESA の変化量とそれぞれ有意に相関していた。

本研究において、歯周基本治療により被験歯の歯周組織状態は有意に改善しているが、間、間、間でいずれの GCF サイトカイン量も有意な変化を認めなかった。し

かし、各 GCF 採取時 (間、間、間) における臨床データ変化量と GCF 中サイトカインの変化量の相関を調べると、咬合調整の前後のみで 2 つの変化量の相関が認められた。つまり、炎症性サイトカインに分類される GM-CSF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-16, IP-10, RANTES, TNF-, TNF-, sTNF-R1, sTNF-R2, 炎症反応の抑制・調節に関わるサイトカインといわれる IL-13, IL-15, PDGF-BB に有意な相関が認められた。これらの結果から、咬合調整により生じる臨床データの改善は特定のサイトカインの GCF 中の量の変化と関連していることが示唆された。しかし、本研究では歯肉縁上スケーリング後に十分な治療期間を設けてから咬合調整を行っている訳ではないので、咬合調整後も歯肉縁上スケーリングによる歯周組織の治癒効果が継続している可能性がある。過去の報告では、歯周基本治療終了から 1 ヶ月後と 3 ヶ月後の GCF 中サイトカイン量を比較した場合、3 ヶ月後の方が炎症性サイトカインの有意な変化が認められている (引用文献 4)。この点については、今後の研究で治療期間を十分、考慮した研究スケジュールを立案する必要が考えられた。

< 引用文献 >

- 1) Sakai, A., Ohshima, M., Sugano, N., Otsuka, K. and Ito, K. (2006) Profiling the Cytokines in Gingival Crevicular Fluid Using a Cytokine Antibody Array. *Journal of Periodontology*, 77, 856-864.
- 2) Hieda, Y., Usui, M., Nakamura, T., Morishita, M., Hanatani, T., Moritani, Y., Koga, Y., Kasai, S., Inoue, M., Nakashima, K. (2017) Decreased Ratios of Interleukin-1 and Intercellular Adhesion Molecule 1 in Gingival Crevicular Fluid after Scaling and Root Planing Associated with Periodontal Pocket Healing. *Open Journal of Stomatology*, 7, 361-376.
- 3) Nesse, W., Abbas, F., van der Ploeg, I., Spijkervet, F.K., Dijkstra, P.U. and Vissink, A. (2008) Periodontal Inflamed Surface Area: Quantifying Inflammatory Burden. *Journal of Clinical Periodontology*, 35, 668-673.
- 4) Zekeridou, A., Giannopoulou, C., Cancela, J., Courvoisier, D., Mombelli, A. (2017) Effect of Initial Periodontal Therapy on Gingival Crevicular Fluid Cytokine Profile in Subjects with Chronic Periodontitis. *Clinical and Experimental Dental Research*, 3(2), 62-68.

表1 被験歯のプロフィール

番号	歯種	部位	PPD	PESA	PISA	動揺度	GCF量	骨欠損率
1	21	DB	5	92	62	2	182	52
2	24	MB	6	120	100	2	98	16
3	23	MB	3	65	43	2	29	27
4	33	MB	3	62	10	2	82	17
5	22	MB	3	37	0	2	63	52
6	31	MB	1	26	4	1	66	50
7	13	MB	10	151	126	2	87	49
8	21	DB	7	109	73	1	78	46
9	22	MB	5	104	87	1	30	71
10	23	DB	10	151	101	2	22	63
11	14	MB	4	109	73	1	65	57
12	11	MB	5	68	11	1	52	70
13	12	MB	6	53	18	1	24	49
14	23	MB	3	62	21	2	42	40
15	32	MB	4	39	13	1	78	45
16	21	DB	3	54	18	1	59	22
17	13	DB	3	62	0	1	41	30
18	41	MB	2	26	4	1	26	23

PPDはmm, PESA・PISAはmm², GCF量はペリオトロン値で示している。

表2 臨床データの変化

PPD (mm)	4.6	3.9*	3.7	3.2*
PESA (mm ²)	77.2	66.4*	62.3*	53.9*
PISA (mm ²)	42.4	25.6*	22	12.9*
動揺度	1.4	1.3	1.2	1.1
GCF量	62.4	54.1	58.8	49.4

数値は平均値で,*は直前の採取時との間に有意差が認められたものを示している。

表3 GCF 中サイトカイン変化量と臨床データ変化量の相関

サイトカイン	臨床データ	間	間	間
GM-CSF	PPD	0.02	-0.52*	-0.22
	PESA	0.02	-0.21	-0.04
	PISA	-0.02	0.04	0.20
IL-1	PPD	-0.20	-0.49*	0.06

	PESA	-0.10	-0.04	0.15
	PISA	0.24	0.05	0.39
IL-2	PPD	-0.27	-0.59*	-0.39
	PESA	-0.29	-0.26	-0.14
	PISA	-0.24	0.16	-0.12
IL-3	PPD	-0.24	-0.51*	-0.36
	PESA	-0.23	-0.31	-0.02
	PISA	-0.13	0.10	-0.09
IL-13	PPD	0.11	-0.68*	-0.46
	PESA	0.25	-0.33	0.05
	PISA	0.34	0.18	0.00
IL-15	PPD	-0.16	-0.52*	-0.35
	PESA	-0.21	-0.36	-0.15
	PISA	-0.10	-0.03	-0.11
IL-16	PPD	-0.18	-0.60*	-0.23
	PESA	-0.15	-0.36	-0.12
	PISA	-0.12	-0.04	-0.03
IP-10	PPD	-0.29	-0.61*	0.01
	PESA	-0.31	-0.45	0.18
	PISA	-0.27	0.15	-0.09
RANTES	PPD	-0.02	-0.68*	-0.05
	PESA	0.01	-0.31	-0.18
	PISA	0.04	0.26	-0.24
TNF-	PPD	0.17	-0.57*	-0.04
	PESA	0.03	-0.26	-0.09
	PISA	-0.08	0.01	-0.10
TNF-	PPD	0.25	-0.56*	0.00
	PESA	0.10	-0.42	-0.04
	PISA	-0.01	0.15	-0.29
sTNF-R1	PPD	0.20	-0.52*	-0.08
	PESA	0.02	-0.52*	-0.20
	PISA	-0.05	0.00	-0.14
sTNF-R2	PPD	0.04	-0.49*	0.07
	PESA	-0.13	-0.60*	-0.32
	PISA	-0.14	0.03	-0.05
PDGF-BB	PPD	-0.14	-0.40	-0.07
	PESA	-0.29	-0.53*	-0.03
	PISA	-0.18	0.03	-0.29

数値は相関係数で,*は有意な相関が認められたものを示している。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者および連携研究者
には下線)

〔雑誌論文〕(計 1件)

1. Hieda, Y., Usui, M., Nakamura, T.,
Morishita, M., Hanatani, T., Moritani,
Y., Koga, Y., Kasai, S., Inoue, M.,
Nakashima, K. (2017) Decreased Ratios
of Interleukin-1 and Intercellular
Adhesion Molecule 1 in Gingival
Crevicular Fluid after Scaling and
Root Planing Associated with
Periodontal Pocket Healing. Open
Journal of Stomatology, 7, 361-376.

〔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：
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
中島 啓介 (NAKASHIMA, Keisuke)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：80227785

(2)研究分担者
臼井 通彦 (USUI, Michihiko)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：10453630

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()