

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11996

研究課題名(和文) 発症前診断に有効かつ世界基準を凌駕する次世代歯周病検査による有病率8割への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to 80 percents of prevalence by next-generation periodontal examination to be effective for precritical diagnosis and far superior to global standard

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病発症前診断の条件は、健康な状況下での微弱な変化のキャッチである。歯周組織検査において、出血の有無を確認するbleeding on probing (BOP) 検査が陰性の場合、病状安定を示し、逆にBOP陽性の場合、何らかの歯周治療の介入が必要となる。我々は、BOP陰性の場合、immuno-chromatography (IC) 法を駆使して、出血の証拠となるヘモグロビン(Hb)の存在を、歯肉溝滲出液中に見出し、視認できない出血の存在を確認した。さらに、Hbのカットオフ値から、BOP陰性の場合においても、組織損傷を示す生化学的マーカーの上昇を認め、歯周病発症前診断の可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現行の歯周組織検査は、歯周病による組織損傷の検証である。次世代に求められる歯周組織検査は、歯周病発症前診断を具備することが条件となる。一方、日本のみならず世界規模で対応すべきプロジェクトとして、健康寿命の延伸があり、歯もしくは補綴物による機能保全が、唯一効果が認められていると報告されている。現在、主な歯の喪失原因は歯周病であり、高い歯周病罹患率を鑑みると、如何に歯周病の重症化を阻止する早期発見・早期治療の戦略の構築が極めて重要となる。

本研究の達成は、歯周病の発症前診断に加え、歯の保全による健康寿命の延伸、さらには医療費の軽減に寄与し、学術的意義と社会的意義が大きいと確信する。

研究成果の概要(英文)：The condition for pre-symptomatic state of periodontal disease is to catch weak changes under healthy periodontal conditions. In the periodontal tissue examination, if the bleeding on probing (BOP) examination, which confirms the presence or absence of bleeding, is negative, periodontal tissue condition is shown stable. On the other hand, if BOP is positive, some intervention of periodontal treatment is required. When BOP was negative, we used immuno-chromatography (IC) method to detect the presence of hemoglobin (Hb) in the gingival crevicular fluid as evidence of bleeding, and confirmed the presence of invisible bleeding. Furthermore, from the Hb cut-off value, even when BOP was negative, an increase in biochemical markers indicating tissue destruction was observed, and the possibility of the pre-symptomatic state of periodontal disease was found.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周組織検査 歯肉溝滲出液 ヘモグロビン 歯周病 発症前診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本における各医療機関では、歯周病治療の積極的な介入が行われている。しかしながら、直近の歯科疾患実態調査から、成人の8割に歯周病が罹患している現状もある。この現状は、歯周病検査の規格再現性に対するハードル、もしくは歯周治療の限界を極めて強く意味するものである。このような背景のもと、歯周病検査に特化し、早期に歯周病を探知できる検査項目の確立は、医療経済学的見地から見て極めて重要な項目と認識している。

(2) 日本のみならず世界的見地から俯瞰しても、超高齢社会となり同時に健康寿命延伸が大きな課題となっている。しかしながら、効果的な創薬の開発や治療法は遅々としている中、歯周病予防による歯の保存と咀嚼機能の改善・維持が認知症予防の唯一の戦略でもある。現在、歯の主な喪失原因が歯周病である現状を鑑みると、歯周病予防は極めて重要な課題であり、特に重症化を防ぐための、歯周病の発症前診断が強く求められている。

(3) 我々は、本研究の遂行のために、従来の歯周組織検査の限界の検証、その限界を補完する候補試料の擁立を解明し以下の結果を得た。なお、以下の ~ の結果は、本研究開始の下地として *Odontology*, 2014, *J Periodontology*, 2016 公表しに世界に発信した。

従来の歯周組織検査と歯肉溝滲出液 (gingival crevicular fluid; GCF) における生化学的検査を併用し、統計学的、さらにはカットオフ値の設定から、現在極めて重要と考えられている bleeding on probing (BOP) 検査の限界を見出した。

病状安定と診断されている BOP 検査が陰性の場合に探知できるマーカーとして、視認できない出血の存在を GCF に滲出している仮説を立て、出血の証拠となる hemoglobin (Hb) の検証を行った。

GCF に観察される Hb の検出方法を、簡易かつ定量化の可能性を求め、Immuno-chromatography (IC) 法と densitometer による定量化を採用し検討した。

2. 研究の目的

本研究の目的は以下の通りである。

- (1) 既存の歯周組織検査を補完し、より精度の高い検査体制の確立
- (2) 病状安定の場合に探知できる候補試料とマーカーの確立
- (3) 簡便・安価・迅速の条件を揃えた簡易検査キット開発への布石
- (4) 新規歯周病検査の検証

3. 研究の方法

歯周組織検査において BOP 検査が陰性の場合には病状安定である。よって、既存の歯周組織検査を凌駕しより精度の高い検査の条件として、BOP 検査が陰性の場合に探知できるマーカーの擁立とその有効性の検証、さらには簡易検査キットの開発に向けた戦略を立案した。

(1) 被験者

日本歯科大学附属病院に通院中で、歯周治療を終了し Supportive periodontal therapy (SPT) を受診している慢性歯周炎患者 76 名 (平均年齢 63.4 ± 10.8 歳、男性 39 名、女性 37 名) を対象とした。選択基準は、12 歯以上残存し、全身的に健康である非喫煙者とした。除外基準は、以下の ~ の項目とした。

内分泌代謝疾患、悪性腫瘍、免疫疾患、肝疾患、腎不全、心臓疾患、骨代謝疾患を有する患者

妊婦もしくは避妊薬服用者

1 か月以内に歯周治療を受けた患者

3 か月以内に抗菌薬の投与を受けた患者

本研究の参加に同意が得られない患者

本研究開始前に被験者は、研究の説明を受け署名による同意を行った。また、ヘルシンキ宣言に基づき日本歯科大学倫理審査委員会、日本歯科大学臨床倫理委員会の承認を得て遂行された (承認番号 NDU-T2 2017-12、NDUH-RINRI2018-07)。

(2) 候補試料

GCF を候補試料とし、採取部位は、健常部位として probing depth (PD) 4mm 以下 BOP 陰性(-)、歯周炎罹患部位として PD4mm 以上 BOP 陽性(+)と設定した。すなわち、被験者に対し健常部位と歯周炎罹患部位から GCF を採取する。Power calculation から採取部位は、32 と算出したが、ドロップアウト等の事態に対し 50 名以上を選定し、採取部位の合計は 50 名 x 2 部位=100 部位以上と設定した。

(3) 検索項目

臨床検査項目：各被験部位に対し以下の項目を記録する。

1) PD

2) BOP

- 3) Gingival Index; GI (Löe; 1967)
- 4) Plaque Index; PII (Silness & Löe; 1964)
- 5) Clinical Attachment Level; CAL
- 6) GCF 量 (Periotron® 8000 値)
- 7) 歯槽骨吸収率

特に、6) GCF 量は以下の方法で行った。

GCF の採取方法は、PII 測定後、ロールワッテによる簡易防湿下にてエアで乾燥後、歯肉辺縁に触れないように歯肉縁上プラークを鋭匙型スクレーパー (Hu-Friedy Inc., IL, USA) を用いて可及的に除去した。その後、滅菌された濾紙 (PerioPaper®) をポケットに抵抗を感じるまで挿入し、30 秒間静置し GCF を採取・回収した。採取した GCF 量は、GCF 測定器 (Periotron® 8000) により数値化された。なお、GCF の採取はこの作業を 3 回繰り返した。PerioPaper® に出血が認められた場合、その試料は除外した。PerioPaper® は、直ちに 350 µl phosphate-buffered saline の入った 1.5 ml 滅菌マイクロチューブに PerioPaper® を 3 本浸漬し、5 分間 Automatic Mixer にて攪拌後 5 分間 10,000 rpm で遠心分離を行った。遠心分離後得られた上清は、-80 にて解析するまで保管した。

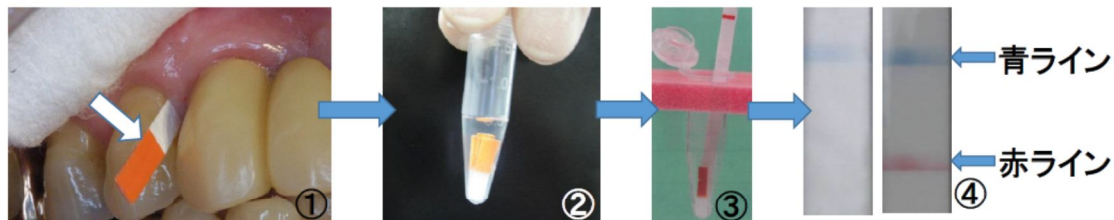
生化学的検査項目：採取した GCF に対し以下の生化学的解析を行う。

- 1) 酵素活性および酵素量・タンパク質量の測定
- 2) 抗体を応用した血液成分の解析

Immune-chromatography (IC) 法

GCF 中の Hb を、IC 法にて鑑別し、さらにその定量化を densitometer を用いて計測する。

以下のシェーマは、本研究で採用した IC 法の流れである (図 1)。



- ① 歯肉溝にペーパーstriップス(矢印)を挿入
- ② 挿入後緩衝液に10分間浸漬
- ③ IC法の施行
- ④ 青ライン発生後出血の存在により赤ライン発生

図 1 IC 法の流れ

4. 研究成果

研究に参加した被験者群は、SPT のために来院している 76 名 (39 名男性, 37 名女性; 63.4 ± 10.8 歳) とした。これらの被験者に対し、研究方法に則った検索を行い、以下の成果を得た。

- (1) 健常部位 (PD:4mm以下、BOP(-)) と疾患部位 (PD:4mm以上、BOP(+)) との比較では、臨床・生化学的検査との間で、統計学的有意に疾患部位の結果が大きかった。
- (2) Hb 量と臨床・生化学的検査との間では、相関関係が認められた。
- (3) ROC curve と Youden index で作成した Hb のカットオフ値から、臨床的に健常部位にも拘らず、組織損傷を示す生化学的検査項目の上昇が認められた。

以上、(1)~(3) の結果から、GCF に観察される Hb 量の測定から、臨床的に健常な状態を示す場合においても、組織損傷の上昇を示し、歯周病は少前診断の可能性を強く示唆する結果となった。なお、歯周病は感染症であり、病原因子の特定は効果的であるものの、迅速なチェアサイドでの応用は困難であることが改めて認識され、IC 法による応用は効果的であると結論付けた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takashi Hanioka, Manabu Morita, Tatsuo Yamamoto, Koji Inagaki, Pao-Li Wang, Hiroshi Ito, Toshiya Morozumi, Toru Takeshita, Nao Suzuki, Hideo Shigeishi, Masaru Sugiyama, Kouji Ohta, Toru Nagao, Nobuhiro Hanada, Miki Ojima, Hiroshi Ogawa	4. 巻 55
2. 論文標題 Smoking and periodontal microorganisms	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 apanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1016/j.jdsr.2019.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Satoshi Sekino, Tomohisa Ogawa, Etsuko Murakashi, Hiroshi Ito, Yukihiro Numabe	4. 巻 -
2. 論文標題 Clinical and microbiological effect of frequent subgingival air polishing on periodontal conditions: a split-mouth randomized controlled trial	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi.org/10.1007/s10266-020-00493-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤 弘, 沼部 幸博, 上原 直, 呉 亜欣, 小川 智久
2. 発表標題 歯周組織検査と併用したGCF成分解析の有用性
3. 学会等名 第62回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 伊藤 弘, 沼部幸博, 石黒一美, 小川智久
2. 発表標題 ブローピング精度向上のためのトレーニングデバイスの開発
3. 学会等名 第38回日本歯科医学教育学会総会および学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤仁志, 伊藤 弘, 沼部幸博, 小川智久, 上原 直, 小玉美也子
2. 発表標題 歯周病発症前診断に対するGCFヘモグロビン測定の有用性
3. 学会等名 第62回秋季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	小川 智久 (Ogawa Tomohisa) (20307961)	日本歯科大学・生命歯学部・准教授 (32667)	
研究分担者	沼部 幸博 (Numabe Yukihiro) (90198557)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	