

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593129

研究課題名(和文) GCFプロファイリングによる治療反応性評価法の開発

研究課題名(英文) Healing response to initial periodontal therapy based on GCF profiling

## 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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯肉溝滲出液(GCF)について多種のサイトカイン量を同時に定量し、治療反応性と関連するGCFプロファイルを明らかにすることを目的とした。慢性歯周炎患者10名を被験者とし、プロービング深さが4 mm以上の部位を1部位選択しGCFを採取した。浸潤麻酔下でSRPを行い、1週間後に再度、GCFを採取した。採取したGCFは抗体アレイメンブレンと反応させ、生じた化学発光を画像解析しGCF中のサイトカイン量を決定した。SRP前後で測定キットで測定可能な40種のうち主に5種類(IL-1, IL-8, IL-16, RANTES, TNF- $\alpha$ )のサイトカイン量が変化していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to clarify profiles of gingival crevicular fluid (GCF) associated with the healing response to initial periodontal therapy. Ten patients with chronic periodontitis were recruited. A periodontal pocket with the probing depth of 4 mm or greater was selected for each patient and GCF sample was obtained from the pocket. Scaling and root planing (SRP) was performed under local anesthesia. GCF sample was obtained again one week after SRP. The chemiluminescence was detected to measure the levels of cytokines after samples were incubated with an antibody array membrane. This study elucidated that SRP leads to mainly change the level of five cytokines in GCF, IL-1 $\alpha$ , IL-8, IL-16, RANTES and TNF- $\alpha$ .

研究分野：歯周病学

キーワード：慢性歯周炎 歯周治療 サイトカイン 歯肉溝滲出液

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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、一般の臨床では歯周ポケット内をプロービング深さ (PPD) 3 mm 以下の良好な環境にすることを目標としている。歯周基本治療後の再評価でプロービング深さ 4 mm 以上の部位に対してはスケーリング・ルートプレーニング (SRP) を中心とした歯周基本治療を繰り返すか、歯周外科手術を行う。システマティックレビュー (Heitz-Mayfield LJ et al. "A systematic review of the effect of surgical debridement vs non-surgical debridement for the treatment of chronic periodontitis." J Clin Periodontol 29 Suppl 3: 92-102; discussion 160-2, 2002.) では、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 SRP を、プロービング深さの減少を重視する場合は歯周外科手術を行うべきだと報告されている。しかし、患者の創傷治癒能力の違いは考慮されていないため、報告に従い歯周外科手術を行っても良好な治癒が得られない場合もある。

(2) 現在、創傷治癒能力を客観的に評価する指標は無いが、これまで我々は歯周基本治療によるプロービング深さの減少量が大きい部位ほどメンテナンス期にプロービング深さが増加する確率が低いことが明らかにした。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、患者から一度に採取できる GCF 量が 1 µl と極少量のため、測定するサイトカインの種類を限定せざるを得なかった。共同研究者の大島らが 2006 年に発表した論文では、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。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 種類のサイトカインが明らかになった。

## 2. 研究の目的

(1) 我々は長年、歯周基本治療によるプロービング深さの減少を阻害する因子を臨床的な測定値の中から探索してきた。その結果、過剰な咬合ストレスによって生じる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ている。GCF 中のサイトカインを網羅的に測定すること (GCF プロファイリング) により、治療に対する反応性 (プロービング深さ減少量) と密接に関連する GCF プロファイルを明らかにすることができるのではと考えた。このような GCF プロファイルが明らかになれば、治療に対する反応性を客観的に評価できる測定チップの開発が可能になり、プロービング深さの減少量が十分でない部位に対して SRP を行うべきか、抗菌薬の処方を行うべきか、歯周外科手術を行うべきか、といった治療方針の決定に有用なツールとなる可能性がある。本研究の目的は、SRP

の前後で GCF を採取しそのプロファイルと比較することで、治療反応性と深く関連したプロファイルを探索することである。

## 3. 研究の方法

### (1) 被験者の選択

九州歯科大学附属病院歯周病科を受診した限局型慢性歯周炎患者のうち、以下の条件に該当する患者 10 名程度を被験者とした。

5 年以内に歯周治療を受けていない。

口腔内にプロービング深さが異なる部位が複数、存在している。

義歯の装着が必要となる多数歯欠損が存在していない。

重篤な全身疾患 (重度の糖尿病等) に罹患していない。

被験者に対しては研究内容を十分に説明し、書面による承諾が得られることを本研究課題へ参加条件とした。なお、本研究の研究プロトコルは九州歯科大学倫理委員会 (承認番号:12-10) にて承認された。

### (2) 被験歯の選択

初診時の歯周組織検査にて 4 mm 以上の PPD を有する前歯あるいは小臼歯を被験歯として選択した。選択した歯の深い歯周ポケットから GCF を採取することにした。その後、従来の歯周基本治療の流れに沿って口腔清掃指導および歯肉縁上スケーリング (SC) を行った。

### (3) GCF の採取

SC 完了後に歯周組織検査を行い、深い歯周ポケットに対して歯肉縁下 SRP を行うことにした。歯面を気銃にて軽く乾燥させた後、コットンロールを頬舌側に置き簡易防湿を行った。滅菌綿球にて歯肉縁上プラークを除去した後、根管治療用のペーパーポイント (#40) を静かに深い歯周ポケットに挿入し 30 秒間静置した。その後、ペーパーポイントを取り出し、リン酸緩衝食塩水 (120 µl) が入ったマイクロチューブに移し直ちに -80 °C で冷凍保存した。

### (4) サイトカインの検出

サイトカインの検出はヒト炎症性サイトカイン抗体アレイ C3 キット (RayBio®社) を使った。非特異的結合部位をブロッキングバッファーによってブロックした (室温 30 分間) メンブレンに、1 ml に希釈した GCF サンプルを加え 4 °C で一晩、インキュベートした。2 ml の洗浄用バッファー で 3 回洗った後 2 ml 洗浄用バッファー で 2 回洗浄した。その後、250 倍に希釈したビオチン結合一次抗体を加え、4 °C で一晩、インキュベートした。再度、洗浄後、1000 倍に希釈した西洋わさびペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンを加えて、4 °C で一晩、インキュベートした。250 µl の検知液 C および D を混液しメンブレンに加え、室温にて 2 分間インキュベートした。メンブレン上の化学発光量を測定機器 (Bio-Rad 社製 ChemiDoc XRS Plus システム) によって画像として保存した。機器に

付属する画像解析ソフトウェアによって、化学発光を数値化し、最終的にヒト炎症性サイトカインアレイ 3 分析ツール(RayBio®社)によって定量した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 被験者と被検部位

選択基準に従って被験者として本研究に参加したのは男性 6 名、女性 4 名で、年齢の平均±標準偏差は 62±6.84 であった(表 1)。初診時の PPD は 4-6 mm であった。歯肉縁上 SC 後の歯周組織検査では、これらの PPD は変化しなかったが(被験者 3, 6, 7, 8, 9, 10)、一部で減少(被験者 5)あるいは増加していた(被験者 1, 2, 4)。さらに、SRP を行うと PPD は全て減少し、その減少量の平均±標準偏差は 2.4±0.8 であった。

表 1 被験者と被検部位の PPD (mm)

	年 齢	性 別	部位	初 診	SC 後	SRP 後
1	51	M	32BD	5	6	3
2	59	M	32LD	5	7	4
3	67	M	25BD	5	5	4
4	64	M	21BM	5	7	3
5	58	M	13BM	6	5	3
6	51	F	45LD	5	5	3
7	71	M	14BD	6	6	4
8	65	F	24BD	4	4	2
9	71	F	32BM	5	5	2
10	63	F	15BD	4	4	2

##### (2) SRP によるサイトカイン量の変化

SRP を行う直前の状態から、1 週間後までの間に变化したサイトカインについて探索した(表 2)。IL- は 9 名の被験者で減少していた(被験者 3 のみ増加)。IL-8 は 5 名で減少、4 名で増加していた。IL-16 は 8 名で減少、1 名で増加していた。RANTES は 6 名で減少、3 名で増加していた。TNF- は 7 名で減少、2 名で増加していた。

##### (3) まとめ

SRP を行ったところ、治癒過程で抗体アレイメンブレンにて測定可能な 40 種のうち主に 5 種類(IL-1, IL-8, IL-16, RANTES, TNF-)のサイトカイン量が変化していることが明らかになった。今回の結果は半定量的な測定結果であるため、今後は変化が認められた主要なサイトカインを定量的に測定し、SRP による歯周ポケット深さの減少との関連について詳細に検討する予定である。

表 2 SRP による発現量の変化(被験歯 1-5)

	1	2	3	4	5
Eotaxin			+	-	
Eotaxin-2				-	-
G-CSF				-	
GM-CSF			+	-	-
ICAM-1			+	-	
IFN-			+	-	-
I-309			+	-	
IL-1	-	-	+	-	-
IL-1		-		-	
IL-2				-	
IL-3	-	-	+	-	-
IL-4				-	
IL-6				-	
IL-6 sR				-	
IL-7					
IL-8	+	+	+	+	-
IL-10					-
IL-11				-	
IL12-p40			+	-	
IL12-p70			+	-	
IL-13	-			-	
IL-15	-			-	
IL-16	-	-	+	-	-
IL-17	-			-	
IP-10		-		-	
MCP-1	+	-		-	-
MCP-2			+	-	
M-CSF	-	-	+	-	-
MIG					
MIP-1-					
MIP-1-	-	-		+	-
MIP-1-		-			
RANTES	-	-	+	-	-
TGF- 1	-	-			-
TNF-	-	-			-
TNF-	+	-	-	-	-
sTNF-RI					

sTNF RII					
PDGF-BB					
TIMP-2	-				

表2 SRPによる発現量の変化(被験歯6-10)

	6	7	8	9	10
Eotaxin	-	+			
Eotaxin-2	-				-
G-CSF					
GM-CSF	-			-	
ICAM-1		-			
IFN-		-			
I-309		-			
IL-1	-	-	-	-	-
IL-1					
IL-2					
IL-3	-		-		-
IL-4	-				
IL-6	-				
IL-6 sR	-				
IL-7					
IL-8	-	-	-	-	-
IL-10	-			-	
IL-11					
IL12-p40					-
IL12-p70	+				-
IL-13					
IL-15		-			
IL-16	-	-	-	-	-
IL-17					
IP-10		-	-		-
MCP-1	-		-		-
MCP-2					-
M-CSF	-				-
MIG					
MIP-1-					
MIP-1-			-	-	-
MIP-1-					
RANTES	-	-	-	+	+
TGF- 1	-	-			

TNF-					
TNF-	-	-	-		+
sTNF-R1	+	-			
sTNF RII	+	-			
PDGF-BB					
TIMP-2					

### 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 1件)

稗田祐理子, 古賀由貴子, 林晃一郎, 花谷智哉, 中村太志, 村岡宏祐, 臼井通彦, 中島啓介, 歯周基本治療による GCF 中サイトカイン量の変化, 第 58 回春季日本歯周病学会学術大会, 2015 年 5 月 15 日, 16 日, 幕張メッセ (千葉県千葉市)

〔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

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

大島 光宏 (OHSHIMA, Mitsuhiro)

奥羽大学・薬学部・教授  
研究者番号：30194145

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：