

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293442

研究課題名(和文) 生体反応の化学的測定に基づく客観的な新規歯周病診断システムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel diagnosis system for periodontal disease by objective biochemical laboratory tests for salivary biomarkers.

研究代表者

伊藤 博夫 (IT0, Hiro-0)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号：40213079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：成人の80%以上という高い有病者率を示す歯周病への対策として、青少年期からの歯肉炎への対策が必要であるが、歯肉炎の診断は歯科医師の主観に委ねられ、客観的な診断基準がない。

本研究は、生化学的パラメーターの機器測定によって歯肉の炎症度を客観的に判定する検診システムの開発することを目的に、3大学の共同研究体制で行われた。唾液検体を遠隔地の研究室に輸送し、客観的な機器測定で検診を行うシステムを構築し、実用化に向けて前進した。

研究成果の概要(英文)：To take measures against periodontal disease which shows a high prevalence rate of >80% of adults, it is important to suppress gingivitis in younger generations. Diagnosis of gingivitis is currently given subjectively by dentists, and no objective diagnostic criteria; this situation prohibit proposal of specific measures against this disease. This study was conducted by collaboration of 3 independent laboratories in different universities and a health examination system by objective biochemical laboratory tests for salivary biomarkers was developed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：予防歯科学 歯周予防学 唾液検査 歯科口腔保健 歯肉炎

1. 研究開始当初の背景

口腔の健康の保持・増進は、糖尿病などの生活習慣病を予防し、健康で質の高い生活を営む上で基礎的で重要な役割を果たしているという国民的合意が形成され、平成 23 年 8 月に歯科口腔保健の推進に関する法律が制定された。

齲蝕の予防に成功しつつある現在の我が国で、30 歳以上の 80%以上、15~20 歳でも 50%以上が歯肉炎を含む歯周疾患に罹患していると報告されており(平成 23 年度歯科疾患実態調査)、今後の歯の喪失予防のために、ポピュレーションアプローチによる歯周病対策が求められている。それには、中高年の進行した歯周炎への対応に加えて、有病率の高い青少年の歯肉炎に対する対策が必要であり、歯科口腔保健推進法の基本的事項(平成 24 年)や健康日本 21(第 2 次、平成 24 年)の目標値にもこれが掲げられている。

しかしながら、それら目標値の基となる現行の歯肉炎の診断基準は、歯科医師の肉眼所見、あるいは歯周ポケットプロービング検査に依存するものであり、主観性が高く検査者間の再現性が低い。また、被験者一人当たり長時間を必要とする高コストの検査法である。あるいはさらに主観性の高い、被験者の自己申告データの数値までが歯肉炎の疫学指標として混然と使用されており、客観的な診断基準は存在しない。このことが疫学調査による罹患状況の実態の把握を困難なものとし、公衆衛生学的施策の推進を妨げる要因となっている。

さらに、比較的客観性の高い歯周ポケットプロービング検査は、歯周ポケット中の細菌を血流中に押し込むことによる菌血症誘発のリスクを伴うことが指摘されている。本来、歯周炎症の活動部位でのプロービング検査は慎重に行われなければならないが、集団検診フィールドで使用する検査法としては適切な方法とは言い難い。

このように問題の多い古典的な歯周ポケットプロービング法から脱却し、病院・診療所内のみならず公衆衛生学的フィールドでも利用可能な簡便性と再現性と客観性を確保した、生化学的測定によって歯肉組織の炎症状態を評価する、新しい検査システムの確立が必要とされている。

2. 研究の目的

現在の日本で成人の 80%以上という有病者率を示す歯周疾患への対策として、ポピュレーションアプローチが必要である。そのために、青少年期の歯肉炎への対策が求められているが、歯肉炎の客観的な診断基準がなく、信頼できる疫学指標も存在しないのが実情である。

そこで、従来の理学的な検査に依存しない、生化学的パラメーターの機器測定による、客観的な歯肉の炎症状態や抵抗力を判定する検査システムの確立を目的として本研究を

遂行する。病院や診療所の臨床現場だけでなく、地域・職域保健のフィールドでも共用できる高い簡便性と再現性を備えた検査システムの開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 唾液検査を含む集団検診体制の構築

研究機関の初年度~2 年目に、3 大学がそれぞれに保有するフィールドにおけるこれまでの健診システムに加えて、新たに唾液検査項目を追加するための検査項目の選定、検体採取方法の選択、検体保存輸送法の調整等を含む健診システムの構築を行った。最終年度の 3 年目に、3 大学で統一された内容の健診システムを稼働させた。

(2) 被験者

徳島大学、九州歯科大学、新潟大学の研究分担者が、従来より歯科健診事業等で協力しているフィールドにおいて、参加者の同意を得た上で、検体(唾液、歯肉溝液)の採取と、歯科所見の取得を実施した。研究の実施は、各研究分担者が所属する大学の倫理委員会承認の下で行われた。

(3) 唾液等の炎症バイオマーカー物質の測定

遊離ヘモグロビン(F-Hb)と乳酸脱水素酵素(LDH)は、アルフレッサファーマ社製検査キットを用いて、株式会社四国中検(高松市)に輸送して測定した。歯肉溝貯留液中をペリオキャッチャーシステムで毛細管現象を利用して採取し、検体液中のアンチトリプシン(AT)とラクトフェリン(Lf)を株式会社保健科学研究所(京都市)に輸送して測定した。

各種サイトカイン(サイトカイン種名は、結果の図表中に示す)の測定は、マルチプレックス・サスペンションアレイシステム(BioRad 社製)を用いて、多項目同時測定を行った。毎回の測定ごとに既知濃度サイトカインの内部標準を置いて測定精度を管理した。

唾液中の抗酸化力は、電子スピン共鳴法を用いて、活性化酸素種とヒドロキシラジカルのそれぞれに特異的に測定した。

(4) 市販の濾紙試験紙唾液潜血検査のデンシトメトリーによる定量化

市販の濾紙試験紙を用いた簡易唾液潜血検査キット(ペリオスクリーン®, サンスター)は、ヒトヘモグロビン特異的モノクローナル抗体による免疫クロマトグラムの金コロイド反応を目視で陽性が陰性かの判定を行う簡易検査キットである。この試験紙上の色素反応を規格化されたデンシトメトリーにより読み取ることで定量化、機器判定による准自動化を試みた。

(5) 唾液を検体とした新しい口臭検査法の開発

汎用アミノ酸分析法の一つであるオルトフタルアルデヒド法 (OPA 法) を基盤とし、分析対象であるアミノ酸をメルカプタン類に置き換えることで、チオールレベルを測定することを目的とした OPA 変法を立案する。OPA 法および OPA 変法においては、生成するイソインドールが蛍光を発するため、高感度分析が可能となるが、イソインドールが不安定なことが集団口臭検査法として使用するための大きな障害となっている。そこで、反応系に用いるアミンの高さを高めることで立体効果、OPA への置換基導入による電子効果、電子系拡張による電子効果について検討を行い、反応生成物質の安定化を実用レベルに高めることを試みた。

3. 研究成果

(1) 唾液検査を含む集団検診体制の構築

研究機関の初年度~2 年目に、3 大学がそれぞれに保有するフィールドにおけるこれまでの健診システムに加えて、新たに唾液検査項目を追加するための検査項目の選定、検体採取方法の選択、検体保存輸送法の調整等を含む健診システムの構築を行った。最終年度の3 年目に、3 大学で統一された内容の健診システムを稼働させた。

すなわち、唾液検体の採取は洗口吐出法を用い、統一検査項目として出血マーカーの遊離ヘモグロビン (F-Hb) とアンチトリプシン (AT)、炎症による組織破壊マーカーである乳酸脱水素酵素 (LDH)、炎症性好中球マーカーであるラクトフェリン (Lf) を、臨床検査会社に検体を輸送して定量測定した。同時に健診現場において洗口吐出液中の F-Hb のペリオスクリーン®濾紙試験紙による測定を行い、反応済み試験紙を徳島大学に送付してデンシトメトリーで定量化した。歯科医師の視診による歯肉炎症所見として、上下顎犬歯間の唇側辺縁歯肉の発赤の有無と圧迫出血の有無を記録した。

(2) 若年層における唾液バイオマーカー (F-Hb, LDH) のレベル (分布状態の比較)

3 大学がそれぞれに保有する集団健診フィールドにおいて、小学生、高校生、専門学校生の集団からデータを取得し、分布状態を比較した (図 1)。F-Hb については、年齢が上がるにつれて高値を示す者の割合が増加する傾向が見られたのに対して、LDH に関して同様の傾向は顕著ではなかった。

(3) 唾液バイオマーカーの値と歯科医師の視診・触診による臨床所見との関連性

唾液バイオマーカー検査値と歯科医師が従来の方法により判定する歯肉炎症所見との関連について検討を行った (図 2)。歯肉の発赤の有無を視診により判定してスコア化

した PM スコアと唾液の F-Hb、および LDH 濃度との間に統計学的に優れた相関関係が示された。一方で、歯肉を 20 g 重程度の弱い力で圧迫して出血が誘発されるかどうかを見る BOP は、視診よりも比較的客観性があると思われる既存の歯肉炎症の判断基準であるが、BOP と唾液検査結果との間に有意な関連性は見いだされなかった。BOP の歯肉炎症の指標としての正当性に疑問が示唆される結果となった。

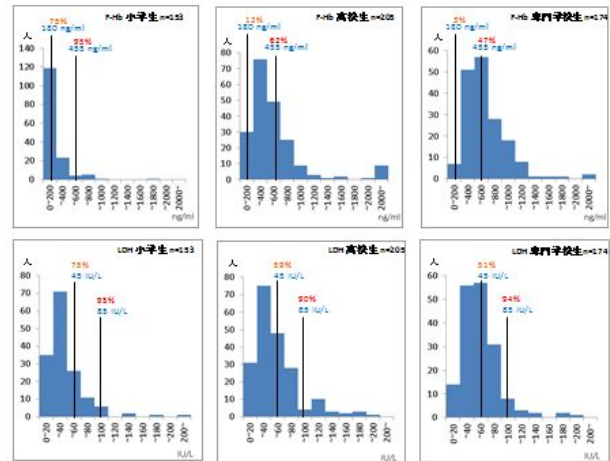


図 1 若年層における唾液バイオマーカーのレベル (F-Hb, LDH)

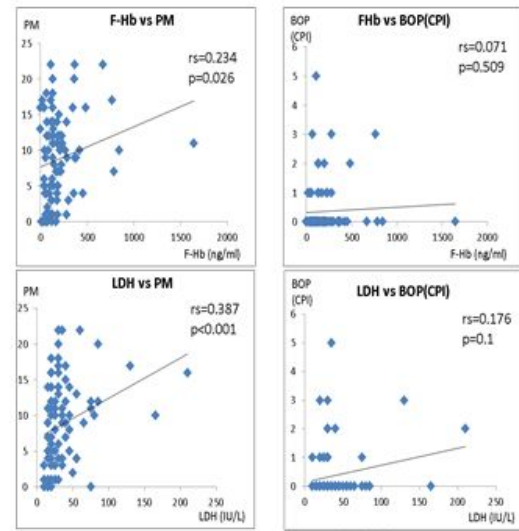


図 2 歯科医師による臨床所見 (PM index, BOP) と唾液バイオマーカーの関連性

Rs: Spearman の順位相関係数

(4) 市販の濾紙試験紙唾液潜血検査キットの判定のデンシトメトリーによる定量化の開発

市販の濾紙試験紙を用いた簡易唾液潜血検査キット (ペリオスクリーン®, サンスター) は、ヒトヘモグロビン特異的モノクローナル抗体による免疫クロマトグラムの金コロイド反応を目視により陽性が陰性かの判定を行う簡易検査キットである。この試験紙上の色素反応を規格化されたデンシトメトリーにより読み取り、定量化する手法を確立

した(図3)

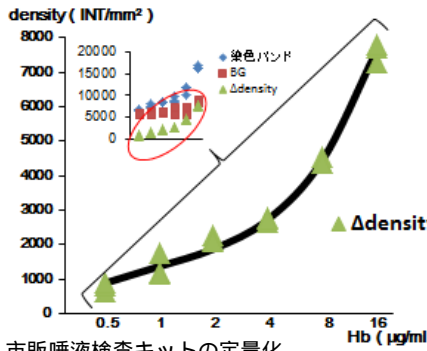


図3 市販唾液検査キットの定量化
既知濃度の人Hb標品をペリオスクリーン®試験紙と反応し、画像解析により濃度依存性の検量曲線が作成できた。

徳島, 北九州, 新潟の3都市で濾紙試験紙による唾液潜血検査を行い, その結果を定量的に比較することが可能になった(図4)。しかしながら得られた観察結果は, 臨床検査ラボでの測定結果(図1上段)の傾向とは必ずしも一致せず, 年齢の上昇による潜血レベルの上昇傾向は観察されなかった。この違いの理由の可能性の一つとして, 濾紙試験紙キットの免疫クロマトグラフィの感度が低めに設定されている(かなり高濃度のF-Hbの存在で陽性になる)ことが考えられるが, 詳細についての検討が今後必要である。

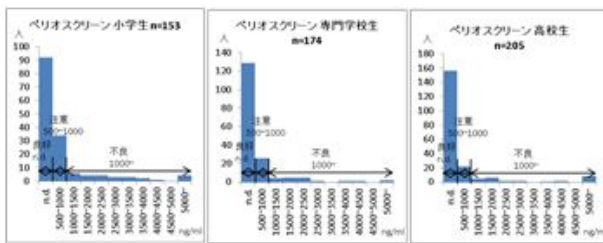


図4 簡易ろ紙唾液潜血検査キットの定量測定結果の分布(小学生, 高校生, 専門学校生)
既知濃度の

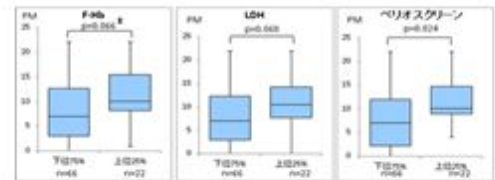
(5) 客観的な唾液バイオマーカー検査結果(F-Hb, LDH)と歯科医師の視診による判定との関連性

唾液バイオマーカー測定値を濃度順に4分割し, 上位の25%と会75%の集団に2群化して, 歯科医師による歯肉炎症所見(PMスコア)との関連性を分析したところ(図5), 統計学的には有意とは言えないものもあるが, 九州地区の小学生では全てのバイオマーカー検査の結果において, 検査値の悪いものが視診の結果も悪いという傾向が見られた。新潟の小学生ではF-Hb検査において同様の傾向が認められた。

(6) 歯肉溝液のバイオマーカー検査について

歯肉溝に貯留している生体液にも, 唾液と同様に歯肉の炎症を反映するバイオマーカー

小学生(九州)



小学生(新潟)

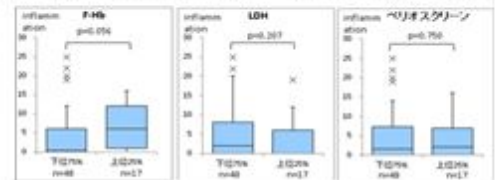


図5 唾液バイオマーカー測定値を4分割し, 上位1/4と下3/4の2群間で比較を行った

物質が存在する。歯肉溝液を規定の小筆で毛細管現象を利用して採取し, バイオマーカーを測定する検査キットが既に市販されている。この検査キットでは, 歯肉の炎症指標として, 出血のマーカーにアンチトリプシン(AT), 炎症の進行に連れて増加する白血球(好中球)のマーカーとしてラクトフェリン(Lf)が測定される。

歯肉溝液の方が唾液よりも, より特定歯肉局所の状態を反映する測定ができる利点があるが, 今回の研究では個人単位の評価を行うことが必要であるので, 一口腔内の特定部位から採取するのではなく, できるだけ広い範囲, 多数の歯の周りから検体を採取するように心掛けた。唾液中のF-Hb, LDHと同様に, 歯肉溝液AT, Lfも歯肉炎症のマーカーとして有用であることが示唆された(図6)。

歯肉溝液のバイオマーカー検査の結果と歯科医師による視診・触診の所見との関連を分析したところ, 唾液マーカーと同様に, 視診によるPMスコアと一定の正の相関が示唆されたが, BOPとの間には相関性は認められなかった(図7)。さらに, 歯肉溝液中のAT, Lfレベルと洗口吐出法により採取した唾液中のAT, Lfレベルを同時に測定し, 比較したところ, 正の相関性を保ちながら, 唾液中の方でより高いレベルで検出されることが明らかになったことから, 個人単位の検査を目的とする場合は, 洗口吐出法による唾液を検体として採取することが。手間およびコストの観点から推奨されることが明らかになった。

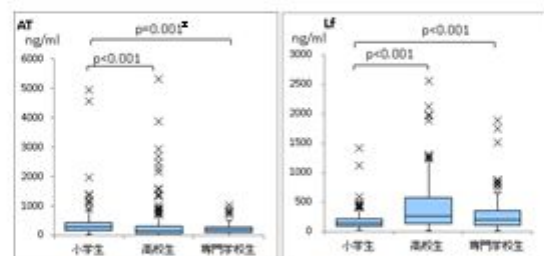


図6 GCFバイオマーカー(AT, Lf)の分布と群間比較

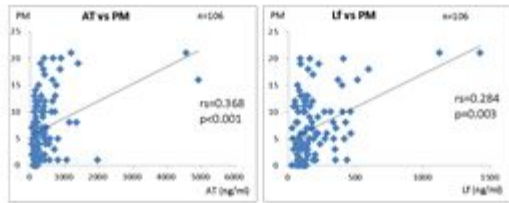


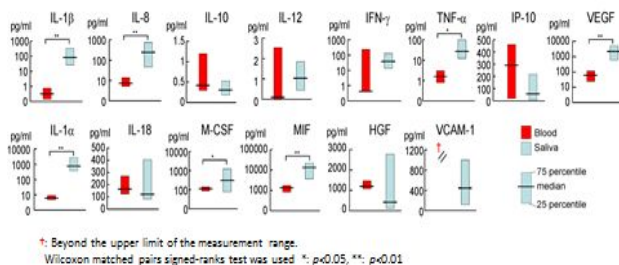
図 7. GCF バイオマーカー (AT, Lf) と歯肉臨床所見との相関

rs : Spearman 順位相関係数

(7) 唾液中サイトカインレベルの測定

予備的実験において、血中で存在が報告されているサイトカインのほとんどの種類が、唾液中にもかなりの高濃度で存在することが明らかにされた (data not shown)。そこで、IL-1, IL-8, IL-10, IL-12, IFN- γ , IP-10, TNF- α , VEGF, IL-1Ra, IL-18, HGF, M-CSF, MIF, VCAM-1 の 14 種類のサイトカインについて、同一個人から同時に採取した血液中と唾液中のサイトカインレベルを比較し、相関を検討した。調べたサイトカイン種のうち半数のものでは、唾液中の方が血中よりも有意に高濃度で存在し (図 8)、唾液中レベルと血中レベルには、相関性は全くないことが明らかになった。すなわち、唾液中のサイトカインは、血中から漏出してきて受動的に存在するようなものではなく、血中とは異なるメカニズムによって制御されて存在するものであると考えられた。

Comparison of levels of cytokines between in saliva and in blood



†: Beyond the upper limit of the measurement range. Wilcoxon matched pairs signed-ranks test was used. *: p<0.05, **: p<0.01

図 8. 唾液中と血中のサイトカイン濃度の比較

(8) 健康な成人における唾液中サイトカインレベルの範囲

一般定期健康診断において、全検査項目が正常範囲にあり、全身的に完全に健康と判断される教職員の協力を得て、口腔内の歯科健康診断を行った。歯科健診の結果でも歯肉炎・歯周炎を含め、疾病の所見が全く認められなかった、全身的にも歯科的にも完全に健康な人々の唾液中のサイトカインレベルを測定することができた。検討した 16 のサイトカイン種についての健常範囲を図に示す (図 9, 10)。図 9 のサイトカインは全ての被験者から検出限界レベル以上で測定されたものであるが、図 10 のサイトカイン種は測定下限値のラインよりも上に示すシンボルの数だけが測定可能であったものである。

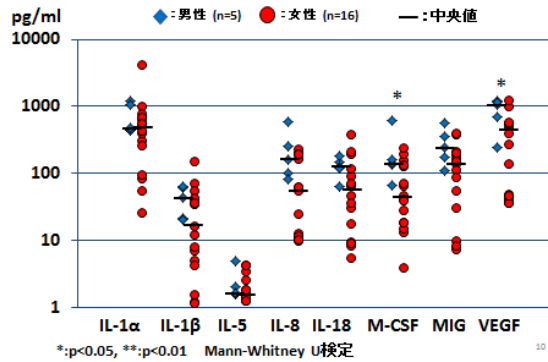


図 9. 全身的にも口腔的にも健康な者の唾液中サイトカインレベル (全被験者から検出可能であったサイトカイン種)

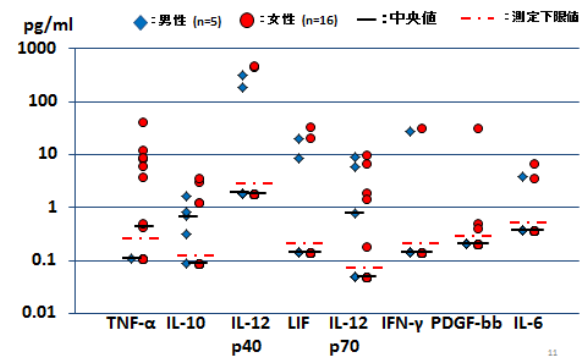


図 10. 全身的にも口腔的にも健康な者の唾液中サイトカインレベル (一部の被験者から検出可能であったサイトカイン種)

(9) 地域住民の唾液中のサイトカインレベル、抗酸化力、歯周病罹患状況

住民の一般健康診断において協力を得て、唾液サンプルを採取し、サイトカインレベル、抗酸化力を測定するとともに、口腔内診査を行い、歯周病の状態を判定した。これらの間の関連性を分析したところ、歯周病が重度であるほど、IL-1, IL-6, IL-8 のレベルが高くなるという関連が見られた。他のサイトカインではそのような関連は見られなかった。また、歯周病が重度であるほど唾液中の抗酸化力が上昇しているという有意な関連性が認められた。歯周病の重症化に伴う酸化ストレスの増大に拮抗するために、唾液中の抗酸化力が反応性に高くなっていると考えられる。

(10) 唾液を検体とした、新しい口臭検査法の開発に関する研究

集団検査への適用が可能で、多検体を短時間で処理することができる新しい口臭検査法の開発を目指して、唾液を検体とした口臭指標物質の測定法の開発に取り組んだ。汎用アミノ酸分析法の一つであるオルトフタルアルデヒド法 (OPA 法) を基盤とした新しい口臭検査法の開発を目的に、分析対象であるアミノ酸をメルカプタン類に置き換えた OPA 変法を立案した。OPA 法および OPA 変法にお

いては、生成するイソインドールが蛍光を発するため、高感度分析が可能となる。しかしながら、イソインドールの不安定性ゆえに、反応後はできるだけ速やかに測定を行う必要があり、口臭検査法として実用化するための大きな障害となっていた。そこで、立体保護効果によるイソインドールの安定性向上を検討した結果、OPA 変法のアミン成分としてトリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン由来の嵩高いアミンを用いると、イソインドールの安定性は単離精製が可能なまでに向上することが明らかとなった(図 11)。

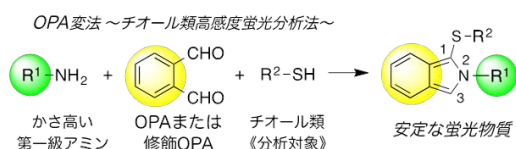


図 11. OPA 法を基盤とした口臭物質測定法の開発

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4件)

Tamaki N, Orihuela-Campos RC, Fukui M, Ito HO. Hydrogen-rich water intake accelerates oral palatal wound healing via activation of the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat model. *Oxid Med Cell Longev*. 2016:5679040, 2016 (査読有)

玉木直文, 松尾亮, 水野昭彦, 正本文浩, 中川 徹, 鈴木雅博, 福井誠, 谷口隆司, 三宅達郎, 伊藤博夫. 歯肉溝液中の炎症関連バイオマーカーと糖尿病・腎機能マーカーとの関連性. *口腔衛生会誌* 66(3): 316-321, 2016 (査読有)

Orihuela-Campos RC, Tamaki N, Mukai R, Fukui M, Miki K, Terao J, Ito HO. Biological impacts of resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine on oxidative stress in human gingival fibroblasts. *J Clin Biochem Nutr* 56(3): 220-227, 2015. (査読有)

Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M, Iwasaki T, Furugen R, Kawasaki K, Nakazato M, Maeda T, Kokeguchi S, Yamamoto T, Lee MC, Ito HO, Saito T. Relationship among salivary antioxidant activity, cytokines, and periodontitis: the Nagasaki Island study. *J Clin Periodontol*. 42: 711-718, 2015 (査読有)

[学会発表](計6件)

福井誠, 三木かなめ, リタ・オリウエラ, 玉木直文, 伊藤博夫. 唾液潜血検査の判定を妨害する因子の検索. 第27回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会 大阪大学同窓会記念会館(大阪府・吹田市)2016年10月2日

鈴木雅博, 水野昭彦, 松尾亮, 玉木直文, 福井誠, 伊藤博夫. 糖尿病教育入院患者における歯肉溝液中の炎症関連バイオマーカーの経時的変化. 第26回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会 山口県歯科医師会館(山口県・山口市)2015年9月27日

角田聡子, 岩崎正則, 邵仁浩, 秋山理加,

片岡正太, 茂山博代, 鶴田実穂, 平山綾, 廣島屋貴俊, 横田誠, 牛島直文, 安細敏弘. 歯肉炎バイオマーカーとしての洗口吐出液の有用性に関する検討. 九州口腔衛生学会福岡県歯科医師会館(福岡県・福岡市)2016年9月4日

Orihuela R, Tamaki N, Fukui M, Ito HO. Polyphenol reduce collateral damage of HGFs induced by oxidative stress. 第44回日本免疫学会学術集会 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)2015年11月20日

角田聡子, 岩崎正則, 邵仁浩, 鶴田実穂, 平山綾, 片岡正太, 茂山博代, 横田誠, 牛島直文, 安細敏弘. 学童期における歯肉炎評価のための GCF の応用. 九州口腔衛生学会, 長崎県歯科医師会館(長崎県・長崎市)2015年9月6日

松尾亮, 水野昭彦, 鈴木雅博, 玉木直文, 福井誠, 三木かなめ, 伊藤博夫. 歯肉溝液浸出液バイオマーカーと血液データの比較検討. 第49回日本成人病(生活習慣病)学会日本都市センター(東京都・千代田区)2015年1月10日

[図書](計1件)

伊藤博夫. 第2編, 第2章 歯周病予防, 口腔保健・予防歯科学 第1版, 安井利一ほか編, 医歯薬出版社, 東京, 2017, 301 (p.142-147, 分担執筆)

6. 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 博夫 (ITO, Hiro-0)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 40213079

(2)研究分担者

佐野 茂樹 (SANO, Shiheki)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 20226038

葭原 明弘 (YOSHIHARA, Akihiro)

新潟大学・大学院医歯薬学系・教授

研究者番号: 50201033

安細 敏弘 (ANSAI, Toshihiro)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 80244789

(3)連携研究者

玉木 直文 (TAMAKI, Naofumi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号: 20335615

福井 誠 (FUKUI, Makoto)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・助教

研究者番号: 50325289

山下 喜久 (YAMASHITA, Yoshihisa)

九州大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号: 20192403