

歯周病評価のための歯周病菌数量測定に基づく

新しい方法の開発

著者名：池内 康二¹⁾、高橋 礼¹⁾、池内 明菜¹⁾
志賀 弘明²⁾

所属：¹⁾池内興業合同会社 検査部

²⁾医療法人うらら会 しが歯科医院

要約

はじめに：

本研究では、新たな歯周病の進行判定基準を提案し、その有用性を評価しました。我々は特に歯周病と強く関連する細菌群、Red complex (P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌) の存在とその数の比率を重視しました。

方法：

具体的には、233名の歯科医院患者を対象に、Red complex の存在とその菌数の比率をデジタル PCR (dPCR) によって定量化しました。これらのデータを基に、歯周病の進行度と治療効果を評価しました。

結果：

我々が提案した判定基準が一定の有用性を示す結果を得ました。特に、歯周病の重症度と P.g 菌、T.f 菌、さらに Red complex 全体の数との間には、統計的に有意な相関が見られました。一方で、T.d 菌の数とは有意な関連性が確認できませんでした。

考察：

本研究で提案した判定基準は、客観的かつ定量的な評価を可能にするものであり、従来の主観的で再現性の課題があった視覚的評価を補完する可能性があります。しかし、本研究の限界も認識しており、特に提案した基準が一般の人口にどの程度適用可能なのか、さらには他の菌種との関連性についての詳細な検討が今後必要であることを指摘しております。

結論：

本研究で提案した判定基準は、歯周病の進行度や治療効果の評価において一定の有用性を示す可能性があります。これにより、より精度の高い治療戦略の策定が可能となります。しかし、より広範囲な人口への適用性や他の疾患状態での有用性については、今後さらなる研究による検証が必要となります。

1. はじめに

1.1 背景

歯周病は、全世界で広く存在する口腔疾患であり、その影響は口腔内に留まらず、全身の健康にまで影響を及ぼすことが示されています (Nazir, 2017)。歯周病は炎症性疾患であり、歯周組織の破壊を引き起こします。これにより、歯を支える組織が損傷し、最終的に歯損失の主な原因となります (Kassebaum et al., 2014)。また、過去の研究では、歯周病と糖尿病、心臓病、脳卒中、妊娠合併症などの全身的な健康問題との関連が報告されています (Preshaw et al., 2012)。

現在までの歯周病の進行と治療効果の評価は、主に歯科医師や歯科衛生士による視覚的な評価が中心であり、特に歯周ポケットの深さが主要な指標とされてきました (Ainamo et al., 1982)。しかし、これらの評価方法は主観的な要素を含むため、病状の本質的な理解と進行度の正確な評価には限界があります。特に、視覚的な評価は個々の歯科医師や歯科衛生士の経験やスキルに依存する部分が大きく、一貫性と再現性に課題を抱えています。

一方で、歯周病の主要な原因は歯周病菌による感染であると広く認識されています (Hajishengallis, 2014)。歯周病菌は歯周組織への炎症反応を引き起こし、組織の破壊と歯周病の進行を促進します (Hajishengallis et al., 2012)。これらの事実から明らかなように、歯周病菌の数量と種類を的確に測定することは、疾患の進行と治療効果の評価をより正確に理解するための重要な手段となり得ます。

1.2 目的

本研究の目的は、歯周病の進行状況を科学的に評価し、治療の効果を定量的に判断するための新しい方法を提案することです。具体的には、最新の技術を用いて歯周病菌の数量を測定し、そのデータを基に患者の口腔内および全身の健康状態をより正確に評価します。これにより、個別の治療戦略を科学的な根拠に基づいて適応および修正することが可能となり、効果的な歯周病治療の実現を目指します。

2. 方法

この研究は観察型の研究であり、STROBE 声明に基づき以下のように方法を詳細に記載します。

2.1 研究デザイン

本研究は横断面研究として設計されました。この設計は、歯周病の各ステージにおける歯周病菌の存在とその比率を直接評価するために選ばれました。歯周病の重症度は、参加者が最初に診療所を訪れた時に臨床的に評価されました。

2.2 研究設定

本研究の参加者は、該当歯科医院に歯周病治療を受けるために訪れた患者で、合計 233 名がサンプル提供に同意しました。

2.3 参加者

歯周病の診断を受けた歯科医院の患者が本研究の参加者として選ばれました。患者の選択は、包括的で、年齢、性別、歯周病の重症度に関わらず、すべての患者が参加の機会を得ました。最終的に、233 名の患者が本研究に参加し、プラークサンプルの提供に同意しました。

2.5 データソースと測定方法

主要な研究変数は、プラークサンプル中の歯周病菌 ("Red complex") のコピー数と全菌数で、これらはデジタル PCR (dPCR) により測定されました。

本研究では、スギヤマゲン社製のオプティスワブトランスポート・システムを用いて歯間、歯周ポケット、及び歯表面からプラークサンプルを採取しました。このシステムは改良液相アミーズ培地を含み、採取したプラーク全体を用いて細菌 DNA の抽出・精製を行います。DNA の抽出・精製にはキアゲン社製の QIAcube connect と QIAamp DNA Mini Kit を用いました。その後、ThermoFisher SCIENTIFIC 社製の QuantStudio Absolute Q デジタル PCR システムと専用の dPCR 試薬により、DNA を定量化しました。

以下に、本研究で用いた変数とその詳細を記述します：

1. 肉眼的症状: 歯周病の視覚的診断結果を記録。歯周ポケットの深さや炎症の有無等、患者の口腔内の状態を示す重要な指標。
2. 重症度: 歯周病の病状を 1~3 の等級で評価。歯周病の進行状況を定量的に表す。
3. P.gingivalis, T.denticola, T.forsythia の測定値、NC 値、結果: 歯周病菌の菌数を直接測定し、それぞれの菌に対する標準化値 (NC 値) と結果を記録。歯周病の進行に影響を与える重要な指標。
4. オルコア: 口腔内全体の健康状態を示す指標。
5. 総菌量、総菌数 NC 値、総菌量結果: 口腔内全体の菌数を測定し、その標準化値 (NC 値) と結果を記録。歯周病菌と口腔内全体の菌数との関係性を評価。
6. Red complex: P.gingivalis, T.denticola, T.forsythia の総菌数を「Red complex」として集計し、その結果を判定基準として使用。基準値はデジタル PCR (dPCR) 方法により設定。
7. 判定、判定 2、判定 3: 判定基準に基づいた評価結果を記録。患者の歯周病の状態を具体的に評価し、必要なケアや治療を推奨。

これらの変数を用いて、歯周病の進行状況を詳細に評価し、科学的な歯周病治療の評価法を構築しました。さらに、南カリフォルニア大学 Oral Microbiology Testing Laboratory (OMTL)

と台湾高雄医科大学歯学部データのデータを参考にして、「歯周病菌 Red complex dPCR」判定基準を設定しました。「歯周病菌 Red complex dPCR」判定基準により、Red complex のレベルが 0.99%以下であれば「正常」(A)、1.00~4.99%であれば「軽症」(B または C)、5.00~9.99%であれば「中等症」(D または E)、10.00%以上であれば「重症」(F) と判定。P.gingivalis の菌数が 1000cp/ μ L 以上の場合は、「軽症」(B または D) または「中等症」(E) と判定されます。また、「軽症」(C)、「中等症」(E)、および「重症」(F) の総合判定がされた場合、検体採取時にプラーク量が多かった可能性があり、「口腔内ケアをしっかりと行う」などのアドバイスが必要となることが示されています。

以上の基準により、歯周病の治療効果の評価だけでなく、患者への具体的なアドバイスも可能となります。その結果、より効果的な予防と治療が可能となります。

2.5.1 検体採取と DNA 抽出・精製

患者からのプラーク採取には、スギヤマゲン株式会社製のオプティスワブトランスポート・システムを用いました。このシステムは、改良液相アミーズ培地を含み、採取したプラーク全体を用いて細菌 DNA の抽出・精製が可能です。

抽出・精製プロセスには、キアゲン株式会社製の QIAcube connect と QIAamp DNA Mini Kit を使用しました。QIAcube connect は、高度なオートメーションを提供し、効率的で再現性の高い DNA 抽出を可能にします。一方、QIAamp DNA Mini Kit は、その高品質と汎用性により、多様なサンプルタイプからの DNA 抽出に適しています。

2.5.2 デジタル PCR (dPCR)測定

抽出・精製した DNA は、ThermoFisher SCIENTIFIC 社製の QuantStudio Absolute Q デジタル PCR システムと専用の dPCR 試薬で定量化されました。このシステムは、高度な精度と感度を兼ね備え、各サンプル中の特定の遺伝子の絶対量を直接定量する能力を有しています。

ThermoFisher SCIENTIFIC 社製の Red complex 3 菌種 MultiAssay (歯周病菌 3 菌種) と TaqMan Microbe Detection Assay (総菌数) を使用しました。これらの試薬は、各菌種の特徴的な遺伝子領域を特異的に認識し、精度高く定量することが可能です。これにより、歯周病に関与する主要な菌種 (P.gingivalis、T.denticola、T.forsythia) と口腔内全体の菌数を同時に定量し、その比率を明らかにすることができました。

2.6 バイアスの制御

本研究では、バイアスの影響を最小限に抑えるための複数の手段を講じています。まず、全てのプラークサンプルは一貫したプロトコルに基づいて採取・処理されました。これにより、サンプル間での取扱いの差異による影響を制御しました。

解析者は患者の特定情報について無知の状態で行いました。これにより、解析者の

主観や事前の知識が結果に影響を及ぼす可能性を排除しました。

これらの手法により、我々は可能な限り客観的で信頼性の高い結果を得ることを目指しました。しかし、全てのバイアスを完全に排除することは困難であるため、結果の解釈には引き続き注意が必要です。

2.7 研究の規模と対象者

本研究では、口腔内のプラークサンプルを合計 233 名の歯周病患者から収集した。選定された参加者は、歯周病の症状を示す患者や歯周病リスクを有する患者で、年齢、性別、ライフスタイルといった属性が幅広くカバーされている。この横断的な標本収集は、歯周病菌の分布と全菌数に対する比率を初期に評価するにあたり、十分なサンプルサイズと判断された。

サンプル収集のプロセスは、各患者からプラークサンプルを採取し、それぞれのプラーク中の歯周病菌および全菌数を分析することで行われた。これらのデータにより、口腔内に存在する歯周病菌の分布とその全菌数に対する比率が明らかにされ、それが歯周病の病態理解に資するとともに、治療介入の評価方法に対する新たな指針を示すことが期待される。

このような広範なサンプル集合により、我々の研究は歯周病菌の動態をより包括的に把握し、その結果をもとにした歯周病治療の効果評価法の標準化に寄与することを目指す。

2.8 統計的方法

デジタル PCR (dPCR) 測定により、Red complex (P.g 菌、T.f 菌、T.d 菌) の個々の菌種のコピー数とその合計コピー数、および総菌コピー数を算出しました。dPCR は、サンプル内の DNA の絶対量を測定する手法で、高い精度と感度を持つことが知られています (Sykes et al., 1992)。

Red complex の総コピー数と総菌コピー数から、Red complex の総菌数に対する比率 (%) を算出しました。この比率は、サンプル量や患者間でのプラークサンプルのバリエーションの影響を最小限に抑え、比較的一定の解析データを提供すると考えられます (Kuboniwa et al., 2016)。

自社で開発した判定基準に基づき、この比率を用いて各サンプルの歯周病のリスクを評価しました。判定基準は、医歯薬出版社の「歯周基本治療のコンセプト」の細菌検査のリスクの判定基準に基づいて考案されました。

統計的な比較は、独立した t 検定を用いて行われました。全ての解析は、統計ソフトウェアを用いて実行され、 $p < 0.05$ を統計的に有意としました (Altman, 1991)。解析の結果は、平均値 ± 標準偏差で表されました (Bland, 2015)。

2.9 倫理的承認

本研究は、関連する倫理委員会から承認を得ており、すべての参加者からは、明示的な同

意を得ています。個々のプラークサンプルは、患者の特定が不可能な形でコード化され、患者のプライバシーが厳重に保護されました。

3. 結果

3.1 参加者の特性

研究には合計 233 人の患者が参加しました。

参加者の特性は、平均年齢は 68.5 歳であり、男性 116 人 (49.8%)、女性 117 人 (50.2%) が含まれていました。

肉眼的症状の分類では、軽症が 87 人 (37.4%)、中等症が 99 人 (42.5%)、重症が 47 人 (20.2%) でした。各変数の要約統計量 (平均値、標準偏差) は表 1 に示した。

3.2 歯周病菌の測定結果

P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌の測定結果は以下の通りです：

- P.g 菌の測定値の平均±標準偏差は 2061.227 ± 3290.411 、NC 値は 0.040 ± 0.075 、結果は 2061.187 ± 3290.416 でした。
- T.d 菌の測定値の平均±標準偏差は 148.240 ± 324.881 、NC 値は 4.956 ± 1.594 、結果は 144.207 ± 324.563 でした。
- T.f 菌の測定値の平均±標準偏差は 231.247 ± 451.961 、NC 値は 0.147 ± 0.164 、結果は 231.110 ± 451.951 でした。

3.3 オルコアスコア

参加者のオルコアスコアの測定値の平均±標準偏差は 2293.944 ± 1788.056 でした。

3.4 Red complex と判定結果

P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌の総菌数を集計し、Red complex として判定しました。

判定結果は以下の通りです：

- A : 34 人 (14.6%)
- B : 71 人 (30.4%)
- C : 24 人 (10.3%)
- D : 17 人 (7.3%)
- E : 38 人 (16.3%)
- F : 49 人 (21.0%)

3.5 重症度と P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌の比較

重症度と P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌の平均値の比較の為、t 検定を実施した。

- P.g 菌において、重症度 3 と重症度 1 の平均値の差は 2.340 ± 1.100 (P 値=0.0345)、

重症度 3 と重症度 2 の平均値の差は 2.114 ± 0.879 (P 値=0.0170) となり、統計学的な有意差が認められた (図 1 参照)。

- T.d 菌においては統計学的な有意差は認められなかった (図 2 参照)。
- T.f 菌において、重症度 3 と重症度 1 の平均値の差は 0.424 ± 0.189 (P 値=0.0259)、重症度 3 と重症度 2 の平均値の差は 0.350 ± 0.151 (P 値=0.0212) となり、統計学的な有意差が認められた (図 3 参照)。

3.5 重症度と Red complex の比較

重症度と Red complex の平均値の比較の為、t 検定を実施した。

- Red complex において、重症度 3 と重症度 1 の平均値の差は 2.887 ± 0.0127 (P 値=0.0243)、重症度 3 と重症度 2 の平均値の差は 2.562 ± 0.0102 (P 値=0.0124) となり、統計学的な有意差が認められた (図 4 参照)。

以上の結果により、参加者の肉眼的症状、歯周病菌の測定結果、オルコアスコア、および Red complex の判定結果を把握しました。

4. 考察

本研究では、歯周病患者 233 人について、肉眼的症状の重症度、歯周病菌 (P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌) の測定値、オルコアスコア、Red complex の判定結果について調査した。

重症度による症状の分類から、患者の約 37.4%が軽症、42.5%が中等症、20.2%が重症であったことが明らかとなった。これは、症状の重症度が広範に分布していることを示している。今後の研究で、これらの症状の重症度が疾患進行や治療成果にどのように影響するかを詳細に調査することが有益であると考えられる。

歯周病菌については、P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌の菌数を調査した。その結果、P.g 菌と T.f 菌の菌数は重症度と有意に相関していた (P.g 菌 : $p < 0.05$ 、T.f 菌 : $p < 0.05$)。これは、P.g 菌と T.f 菌が歯周病の重症度に影響を与える可能性を示唆している。一方で、T.d 菌の菌数は重症度と有意に関連していなかった。これは、T.d 菌が歯周病の重症度に対して直接的な影響を及ぼさない可能性を示しているが、さらなる研究が必要である。

オルコアスコアは、平均値が 2293.944 であり、全体的に高い値を示した。これは、参加者が一般的に高度な口腔ケアを受けていない可能性を示している。今後の研究では、オルコアスコアと歯周病の重症度や治療結果との関連性を調査することが重要である。

Red complex については、A から F までの 6 つのグループに分類され、その分布は全体的に均等であった。この結果から、Red complex の構成が個々の患者により大きく異なる可能性が示唆される。これは、個々の患者に対する個別化された治療戦略の重要性を強調している。

本研究にはいくつかのリミテーションが存在します。

第一に、本研究の設計は横断的であり、時間経過に伴う変化を捉えることができませんでした。歯周病は進行性の疾患であり、その進行速度や症状の変化は個々の患者により異なります。したがって、症状の重症度や歯周病菌の変化を時間経過とともに追跡することが重要です。

第二に、参加者のサンプルは比較的小さく、その結果、統計的な検討が限定的であった可能性があります。より大規模なサンプルを用いた追加研究が必要です。

第三に、本研究では、特定の口腔細菌（P.g 菌、T.d 菌、T.f 菌）についてのみ調査を行いました。口腔内は多数の異なる細菌種で構成されており、これらの他の種も歯周病の進行に影響を与える可能性があります。この点を詳細に調査することが必要です。

最後に、口腔ケアの詳細な歴史や患者の一般的な健康状態、ライフスタイル要因（飲酒、喫煙、食事）など、他の可能な影響要因については調査していません。これらの要因は歯周病の発症と進行に影響を及ぼす可能性があります。

以上の結果は、歯周病の診断と治療における複数の要素の関連性を示しており、歯周病の理解と管理におけるこれらの要素の重要性を強調している。しかし、これらの結果はあくまで初期の観察であり、さらなる研究が必要である。特に、これらの要素が時間とともにどのように変化するか、またこれらの要素が治療結果にどのように影響を与えるかについての詳細な調査が求められる。

5. 結論

本研究では、233名の患者を対象に、dPCR データ解析と歯科医師・歯科衛生士の目視判断、他社の P.g 菌数を比較対象として、弊社独自の判定基準を提案しました。その結果、弊社判定基準が一定の有用性を示していることが確認されました。

本研究では、dPCR を用いて Red complex の存在や総菌数を測定し、それを基に弊社判定基準に従って歯周病の進行度と治療効果を評価しました。この方法は、従来の目視判断や他社の菌数データと比較しても、一定の信頼性と有用性を示していることが分かりました。

弊社判定基準は、歯周病の進行度や治療効果の定量的な評価を可能にし、個別の治療戦略の適応や修正に役立つことが期待されます。また、本研究の結果は、歯科医療現場において患者の口腔内および全身の健康状態をより正確に評価するための指標として活用されることが可能です。

しかしながら、本研究にはいくつかのリミテーションが存在します。特定の歯科医院の患者を対象にしたため、一般集団への適用性や他の疾患状態における有用性については検証が必要です。また、判定基準の詳細な検討や他の菌種や指標との関連性についてもさらなる研究が必要です。

結果として、弊社判定基準は歯周病の進行度の評価と治療効果の判断において一定の有用性があります。今後の研究では、さらなる検証と改善を行い、より確固たる科学的根拠に基づいた判定基準の構築を目指すべきです。これにより、より正確な歯周病治療の評価と効

果的な治療戦略の確立が可能となります。

参考文献

1. Ainamo, J., et al. (1982). "Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN)." *International dental journal* 32(3): 281-291.
2. Hajishengallis, G. (2014). "Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: keystones, pathobionts, and host response." *Trends in immunology* 35(1): 3-11.
3. Hajishengallis, G., et al. (2012). "Porphyromonas gingivalis-host interactions: open war or intelligent guerilla tactics?" *Microbes and infection* 14(9): 637-645.
4. Kassebaum, N. J., et al. (2014). "Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: a systematic review and meta-regression." *Journal of dental research* 93(11): 1045-1053.
5. Nazir, M. A. (2017). "Prevalence of periodontal disease, its association with systemic diseases and prevention." *International journal of health sciences* 11(2): 72.
6. Preshaw, P. M., et al. (2012). "Periodontitis and diabetes: a two-way relationship." *Diabetologia* 55(1): 21-31. Sykes, P. J., Neoh, S. H., Brisco, M. J., Hughes, E., Condon, J., & Morley, A. A. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*, 13(3), 444-449.
7. Kuboniwa, M., Lamont, R. J. (2016). Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000. 52, 38-52.
8. Altman, D. G. (1991). *Practical statistics for medical research*. London: Chapman and Hall.
9. Bland, J. M. (2015). Standard deviations. *BMJ*, 350, h292.

表 1. データの要約統計量

変数	平均	標準偏差
P.g菌 \times 定値	2061.227	\pm 3290.411
P.g菌 \times C値	0.040	\pm 0.075
P.g菌 \times 果	2061.187	\pm 3290.416
T.d菌 \times 定値	148.240	\pm 324.881
T.d菌 \times C値	4.956	\pm 1.594
T.d菌 \times 果	144.207	\pm 324.563
T.f菌 \times 定値	231.247	\pm 451.961
T.f菌 \times C値	0.147	\pm 0.164
T.f菌 \times 果	231.110	\pm 451.951
オルコア	2293.944	\pm 1788.056
総菌量 \times (測定値)	405.552	\pm 497.036
総菌数NC値	2.399	\pm 1.678
総菌量 \times 果	40315.292	\pm 49664.694
P.g菌	0.054	\pm 0.060
T.d菌	0.005	\pm 0.011
T.f菌	0.006	\pm 0.010
その他	0.934	\pm 0.070
レッドコンプレックス	0.066	\pm 0.070

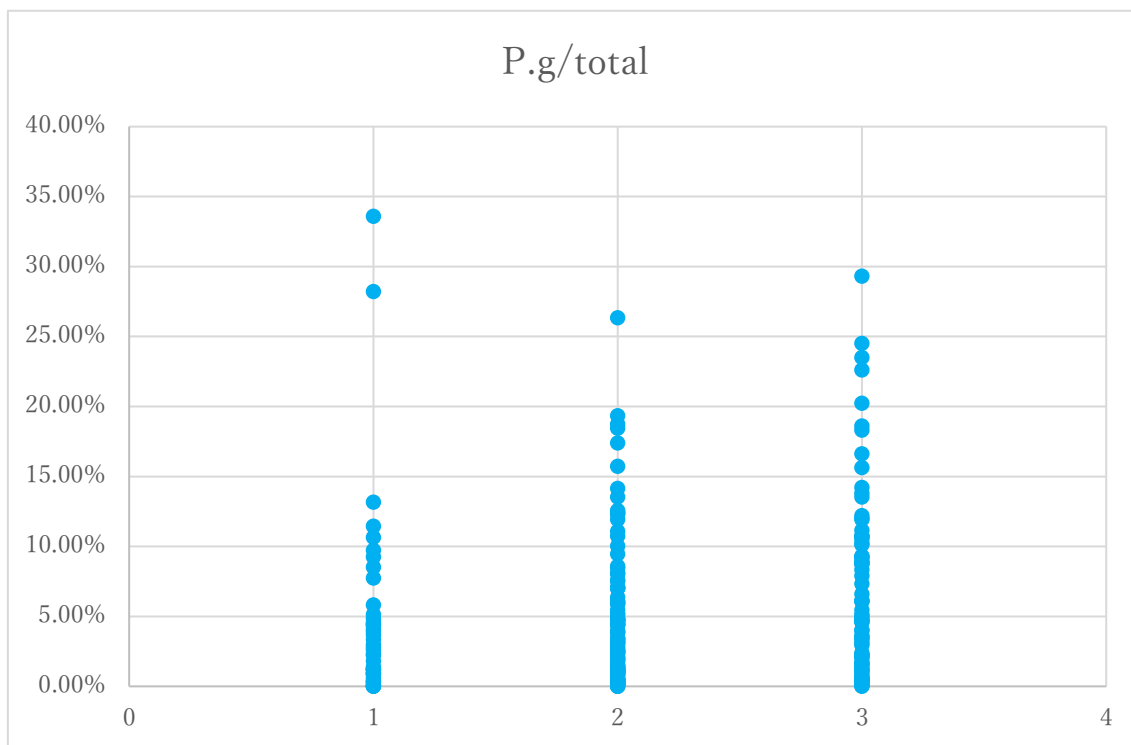


図1：重症度と P.g 菌の平均値の比較

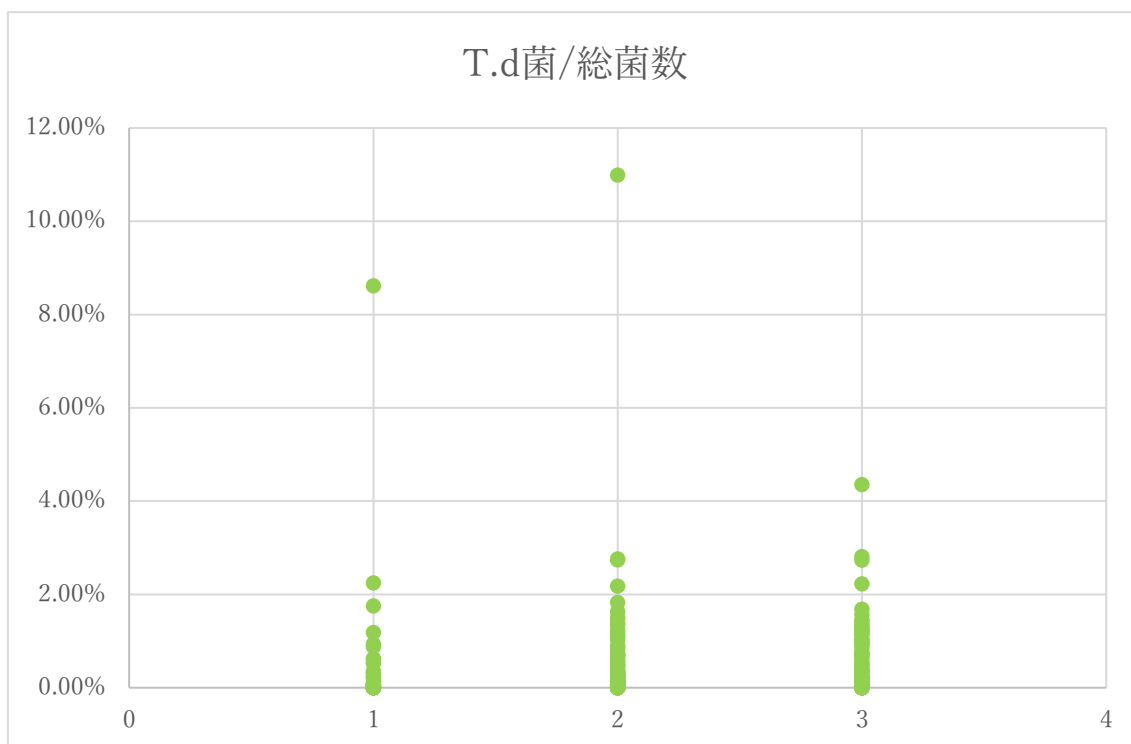


図2：重症度と T.d 菌の平均値の比較

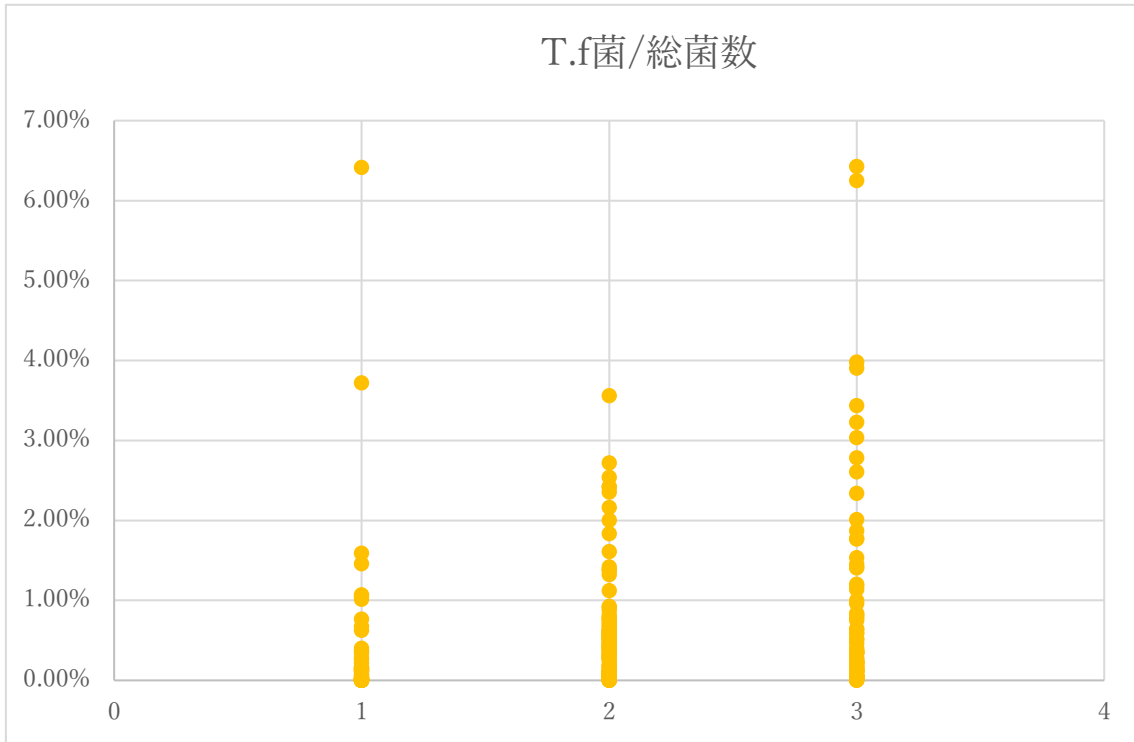


図3：重症度と T.f 菌の平均値の比較

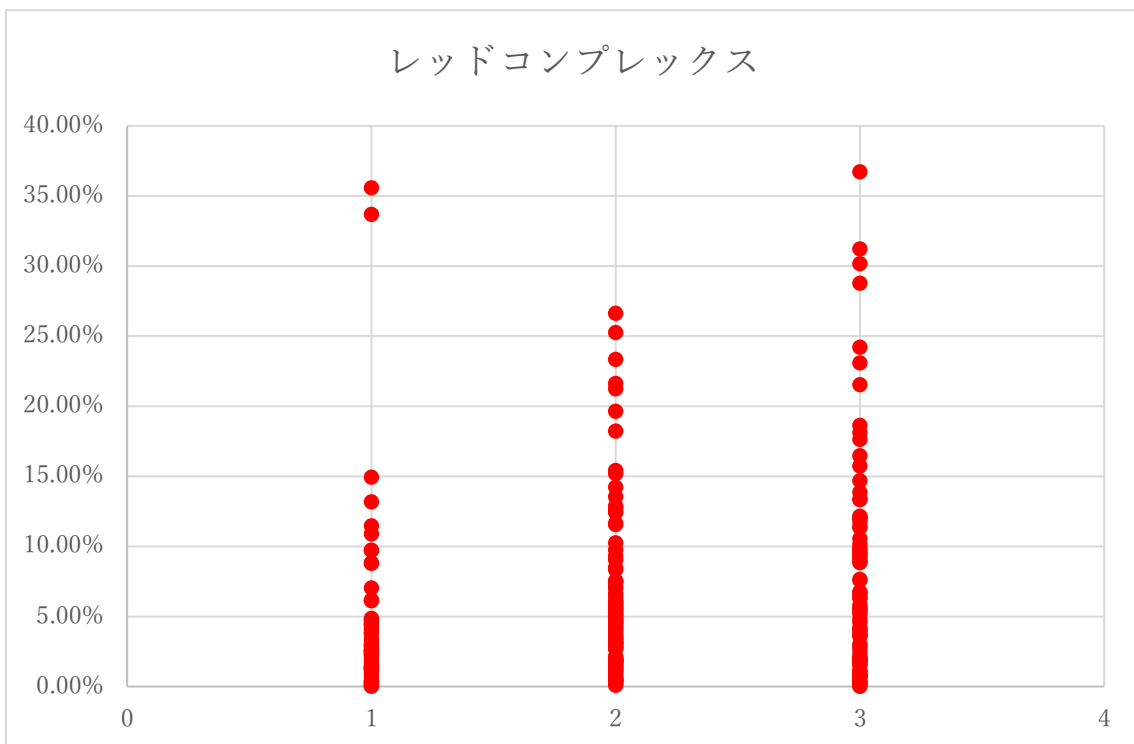


図4：重症度とレッドコンプレックスの平均値の比較