

原 著

重度歯周炎患者の血中サイトカインと歯周組織検査値との関係

堀 田 敬 史 金 山 圭 一 竹 内 浩 子 森 永 啓 嗣
向 井 景 祐 木 村 洋 子 長 谷 川 徹
北 後 光 信 小 足 周 平 佐 藤 匠
清 水 雄 太 伊 神 裕 高 澁 谷 俊 昭

Association between blood cytokine levels and periodontal clinical parameter
in patients with severe periodontitis

TAKAFUMI HOTTA, KEIICHI KANAYAMA, HIROKO TAKEUCHI, HIROTSUGU MORINAGA,
KEISUKE MUKAI, YOUKO KIMURA, TORU HASEGAWA, MITSUNOBU KITAGO, SHUHEI OTARI,
TAKUMI SATO, YUTA SHIMIZU, HIROTAKA IKAMI, TOSHIAKI SHIBUTANI

マイクロアレイで、数10から100数種類の血中サイトカインを同時に網羅的に測定することが可能になった。そこで今回、歯周組織破壊により全身に及ぼす影響を検討する一助として、重度歯周炎患者の臨床指標と血中サイトカインとの関連を調べた。

朝日大学病院歯周病科を受診し、研究の趣旨を理解したうえで同意書に署名捺印を行い完全なインフォームドコンセントの得られた患者を被験者とした。本研究は朝日大学歯学部倫理委員会の承認を受けている(承認番号20064)。被験者は男性16名、女性10名。口腔内診査を受けたのち、10枚法デンタルX線写真、歯周組織検査(Probing Pocket Depth, Bleeding on probing, 歯の動揺度)を行った。検査の結果、重度の慢性歯周炎あるいは侵襲性歯周炎と診断された18名、Perioグループ(平均年齢38.5歳 男性10名、女性8名)と健康な歯周組織と診断された8名、Healthyグループ(平均年齢29.5歳 男性6名、女性2名)の2グループに分けた。サイトカインはHuman Inflammation Antibody Array -Membraneを用いて検出した。

平均PPD(mm)と相関関係を認めたのはMIP-1 β , ICAM-1, IL-6sR, TIMP-2。

PPD7 mm以上部位の割合(%)と相関関係を認めたのはTIMP-2, IL-6sR, MIP-1 β , ICAM-1。BOP(%)と相関関係を認めたのはMIP-1 β であった。

今回、相関関係を認めたサイトカインは歯周病の重症診断の一助となる可能性が示唆された。中でもMIP-1 β は平均PPD, PPD7mm以上部位の割合, BOPと多くの歯周検査値との間に相関を認めた。MIP-1 β は歯周炎の重症度を示すマーカーとして期待される。

キーワード：血中サイトカイン、重度歯周炎、歯周組織検査値

Microarrays now enable the simultaneous, exhaustive measurement of the levels of several dozens to over 100 different blood cytokines. We investigated the association between clinical indicators and blood cytokine levels in patients with severe periodontitis.

The subjects were patients examined in the Periodontics Clinic of Asahi University Hospital who provided written informed consent to participate in the study. This study was approved by the Ethics Committee of Asahi University (approval number 20064). The subjects comprised 16 men and 10 women. After an oral examination, dental radiography (10 images) and periodontal examination [probing pocket depth (PPD), bleeding on probing (BOP), and tooth mobility] were performed. On the basis of these test results, the subjects were divided into two groups: the Perio group comprising 18 subjects with severe chronic periodontitis

or aggressive periodontitis (10 men and 8 women; mean age 38.5 years) and the Healthy group comprising 8 subjects with healthy periodontal tissue (6 men and 2 women; mean age 29.5 years). Cytokines were detected using the Human Inflammation Antibody Array – Membrane.

Macrophage inflammatory protein-1 β (MIP-1 β), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), interleukin-6 soluble receptor (IL-6sR), and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) were correlated with mean PPD (mm). TIMP-2, IL-6sR, MIP-1 β , and ICAM-1 were also correlated with the percentage of sites with PPD \geq 7 mm. MIP-1 β was correlated with BOP (%).

Our results suggested that the cytokines found to be correlated with the periodontal examination score may contribute to the determination of periodontitis severity. In particular, MIP-1 β was correlated with several test values for periodontitis: mean PPD, the percentage of sites with PPD \geq 7 mm, and BOP. MIP-1 β may thus be a potential marker for periodontitis severity.

Key words : blood cytokine, severe periodontitis, periodontal examination score

緒 言

近年、歯周病が全身の健康に影響を及ぼしていることを示唆する報告が増加しており、この見解は世界的に広まっている。歯周病と全身の健康－ペリオドンタルメディスンとして蓄積された研究成果は医科分野からも注目され、糖尿病¹⁾、心疾患²⁾、脳血管疾患³⁾、肺炎⁴⁾、関節リウマチ⁵⁾、腎臓病⁶⁾などの全身の疾患に対する歯周病の影響に関する多くの有益な情報が、医療界全体に浸透している。

歯周病の炎症マーカーとしての血中サイトカイン量は、全身疾患との関わりで検討されることが多い。動脈硬化症への関与が報告されている腫瘍壊死因子 (TNF)、インターロイキン (IL-1, IL-6)⁷⁾といった炎症性サイトカインも歯周病の罹患により増加することが示唆されている。また、歯周治療によって腎機能が改善されるというシステムティックレビューの結果も報告されている⁸⁾。

歯周病の臨床指標として、Probing Pocket Depth (PPD)、アタッチメントロス、Bleeding on probing (BOP) などがある。歯周病を微細慢性炎症ととらえ、ペリオドンタルメディスン関連研究を進めるためには従来の臨床指標に加え、微細炎症を正確に示すバイオマーカーを歯周病の重症度基準に組み込む必要がある。このバイオマーカーには、歯科だけでなく医科にも共通して理解が可能なシンプルなマーカーが望ましい。

歯周炎に特異的な炎症マーカーではないが、高感度CRPは重度歯周炎患者で治療介入後に、値が低下することが示されている⁹⁾。過去から現在までの歯周組織破壊を推し量るバイオマーカーとして、高感度CRP以外にもいくつかのサイトカインが候補にあがっている^{7,10-12)}。

最新のマイクロアレイで、数10から100数種類の血

中サイトカインを同時に網羅的に測定することが可能になった。そこで今回、歯周組織破壊により全身に及ぼす影響を検討する一助として、重度歯周炎患者の臨床指標と血中サイトカインとの関連を調べた。

材料および方法

1. 被験者

朝日大学病院歯周病科を受診し、研究の趣旨を理解したうえで同意書に署名捺印を行い完全なインフォームドコンセントの得られた患者を被験者とした。被験者の選定基準は、1) 重篤な全身疾患を有しないこと、2) 本研究開始前3ヶ月以内に抗菌薬服用と歯周治療を受けていないこと、3) 妊娠中でないこととした。なお、本研究は朝日大学歯学部倫理委員会(承認番号20064)の承認を得て行われた。

2. 歯周検査

すべての被験者に対して、以下の歯周検査指標について歯科医師1名により検査を行った。1) PPD: 約25gの圧力でプローブを挿入して1mm単位で測定した。2) BOP: プロービングにより出血がみられた部位数を全被験部位数で割った部位陽性率(%)で示した。3) 動揺度: Millerの判定基準を参考に、歯の動揺度を0度から3度の4段階で測定した。

PPD・BOPは1歯6点を計測した。歯周炎の診断は、PPDが7mm以上、歯槽骨吸収が歯根長の1/2以上、根分岐部病変が2度以上の部位が1部位以上認められた被験者を重度歯周炎と診断した。全部位のPPDが3mm以下、歯槽骨吸収が歯根長の1/3未満の被験者を健常者と診断した。

3. 血清サイトカインの測定

すべての被験者から末梢静脈血液を採取し、遠心分

離にて血清を調整した。40種類の血清中サイトカインを ab134003-Human Inflammation Antibody Array - Membrane (abcam, Cambridge, UK) を用いて検出した。検出後のメンブレンはスキャナー (GT-X970, エプソン, 長野) にて画像として取り込み, 画像処理ソフトウェア (Image J, National Institutes of Health, MD, USA) を用いてスポットの濃度を測定した。各 array 間のハイブリダイゼーション効率の差を補正するため, positive control を基準として normalization を行った。Array には各サイトカインに対し2つのスポットが用意されているため, 各サイトカイン量は2つのスポットの平均値とした。

4. 統計処理法

2群間の歯周検査結果の比較には t 検定を使用し

た。各サイトカインの値と歯周検査値の相関については Pearson の相関係数を用いて検討した。いずれも, 危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) を有意差ありとした。

結 果

1. 被験者の概要

被験者26名のうち, 重度歯周炎は18名 (Perio 群), 健常者は8名 (Healthy 群) であった。各群の被験者の平均年齢・性別・残存歯数を表1に示す。

2. 歯周検査結果

各群の歯周検査結果を表2に示す。PPD・BOP・動揺度の各平均値は, Healthy 群と比べて Perio 群において有意に高い値を認めた ($p < 0.05$)。

表1 各群の被験者の年齢, 性別, 歯数

Parameters	Healthy group	Perio group
Age (years; average)	29.5 ± 3.04	38.5 ± 12.38*
Sex (number)		
Male	6	10
Female	2	8
Number of teeth present (mean±SD)	27.78 ± 2.44	26.44 ± 4.46

* : significantly different between the groups ($P < 0.05$)

表2 各群の被験者の歯周検査結果

Parameters	Healthy group (n=8)	Perio group (n=18)
PPD (mm)	2.44±0.56	4.24±1.06*
BOP (%)	9.06±1.05	74.86±23.05*
Tooth mobility	0.28 ± 0.24	0.85±0.48*

* : significantly different between the groups ($P < 0.05$)

3. 血清中の各サイトカイン

Healthy 群の血清中における各サイトカインの濃度の平均値 ± 2SD までを正常範囲とみなし, これを超える値を高値とした。Human Inflammation Antibody

Array-Membrane で同定できる40種類のサイトカインの表と, Perio 群の一被験者のメンブレンを図1に示す。また, Perio 群で検出されたサイトカインの一覧と各群の値を表3に示す。

Pos	Pos	Neg	Neg	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
Pos	Pos	Neg	Neg	EOTAXIN	EOTAXIN-2	GCSF	GM-CSF	ICAM-1	IFN- γ	I-309	IL-1 α
IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12p40	IL-12p70
IL-1b	IL-2	IL-3	IL-4	IL-6	IL-6sR	IL-7	IL-8	IL-10	IL-11	IL-12p40	IL-12p70
IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
IL-13	IL-15	IL-16	IL-17	IP-10	MCP-1	MCP-2	M-CSF	MIG	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 δ
RANTES	TNF- β	TNF- α	TNF- β	sTNF RI	sTNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	Neg	Pos
RANTES	TNF- β	TNF- α	TNF- β	sTNF RI	sTNF RII	PDGF-BB	TIMP-2	BLANK	BLANK	Neg	Pos

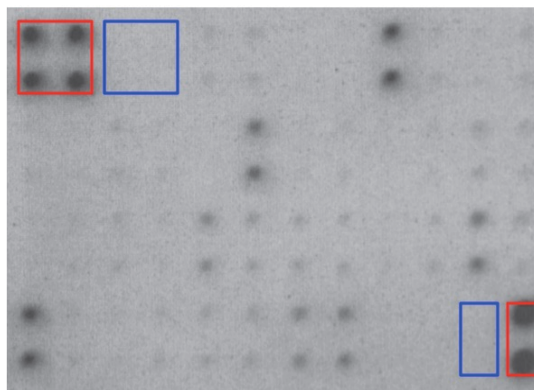


図1 Antibody array上のスポット画像
Pos: positive control, Neg: negative control

表3 Perio群で高値であったサイトカイン

Parameters	Healthy group (n=8)	Perio group (n=18)
RANTES (RDM)	37.06±55.4	143.04±35.8*
PDGF-BB (RDM)	25.76±18.3	83.40±12.6*
TIMP-2 (RDM)	31.69±21.8	68.90±14.2*
MIP-1 β (RDM)	27.89±19.5	75.67±14.3*
MIP-1 δ (RDM)	0	39.38±21.3
IL-6sR (RDM)	46.72±8.2	75.97±16.4
ICAM-1 (RDM)	73.25±19.7	115.29±16.0*
MCP-2 (RDM)	0	59.97±5.16

RDM : relative densitometric measurement. Values represent the mean±SD.

* : significantly different between the groups (P<0.05)

4. 各サイトカインの値と歯周検査値との相関

Perio群の被験者の各サイトカイン値と平均PPD(mm), PPDのうち7mm以上部位の割合(%), BOP(%)および動揺度との相関を検討した。このうち、有意な相関がみられたものを以下に示した。

① MIP-1 β

血清中のMIP-1 β と平均PPD(mm), PPD7mm以上部位の割合(%)とBOP(%)との間にそれぞれ有意な正の相関が認められた ($r=0.915, p<0.01$; $r=0.785, p<0.01$; $r=0.757, p<0.01$)。

② ICAM-1

血清中のICAM-1と平均PPD(mm), PPD7mm以上部位の割合(%)との間にそれぞれ有意な正の相関が認められた ($r=0.886, p<0.01$; $r=0.568, p<0.01$)。

③ IL-6sR

血清中のIL-6sRと平均PPD(mm), PPD7mm以上部位の割合(%)との間にそれぞれ有意な正の相関

が認められた ($r=0.824, p<0.01$; $r=0.818, p<0.01$)。

④ TIMP-2

血清中のTIMP-2と平均PPD(mm), PPD7mm以上部位の割合(%)との間にそれぞれ有意な正の相関が認められた ($r=0.676, p<0.01$; $r=0.833, p<0.01$)。

考 察

今回の検討では、重度歯周炎患者の血清中のMIP-1 β , ICAM-1, IL-6sR, TIMP-2が健常者よりも高値を示した。また、これらの値とPPDやBOPなどの歯周炎の指標との間に有意な正の相関が認められた。

MIP-1 β は主にマクロファージから産生されるケモカインで、生体内ではCCR5と結合することで作用する¹³⁾。慢性炎症性疾患下のTh1細胞, CD8⁺T細胞, 樹状細胞, 単球などでCCR5が発現している¹⁴⁾。MIP-1 β は骨髄腫で、主要な骨吸収促進因子として知られている¹⁵⁾。歯周炎との関連では、慢性歯周炎患者から採血し、末梢血単核球を分離・培養しその上清中のサイトカインを測定したところMIP-1 β やIL-1, 6, 8などがコントロールの健常者のものと比べ高かったという報告がある¹⁶⁾。今回の検討では、MIP-1 β は平均PPD, PPD7mm以上部位の割合, BOPと相関が示された。歯周炎による骨吸収の結果のポケットの深化, ポケット内上皮の炎症も反映していると考えられる。

ICAM-1は、好中球を細胞に接着させる因子で血管内皮や気道上皮に発現している¹⁷⁾。ラットの歯肉炎モデルで、歯肉接合上皮のICAM-1の発現が減少すると好中球の浸潤も抑制され、炎症が制御されたことが示されている¹⁸⁾。ICAM-1は平均PPD, PPD7mm以上部位の割合と相関が示された。付着破壊によるポケット形成・進展を反映していると考えられる。

IL-6の生物活性は、他のサイトカインと異なり膜結合型 IL-6レセプター (IL-6R)・可溶性 IL-6レセプター (IL-6sR) と複合体を形成し、標的細胞のシグナル伝達鎖 gp130に結合することで発現する¹⁹⁾。IL-6sR は尿や血清に存在する分泌型の受容体である²⁰⁾。IL-6R の発現の低い歯周組織では IL-6の生物活性は IL-6sR の局所動態に大きく影響される²¹⁾。また歯周組織の主要な構成細胞である歯肉線維芽細胞は、IL-6R を発現しないものの、gp130を発現することが明らかになっている²²⁾。IL-6は、リンパ球などが炎症巣に浸潤するような慢性炎症期において、IL-6sR を介して gp130を発現する歯肉線維芽細胞にダメージを与えていることが考えられる。今回、IL-6sR は平均 PPD、PPD7mm 以上部位の割合と相関が示された。IL-6sR はポケットの深化への関与も考えられる。

TIMP-2は、マトリックス金属プロテアーゼ (MMPs) の内因性インヒビターの1種で MMPs/TIMPs のバランスが崩れると炎症の進展や組織の線維化が進むことが分かっている²³⁾。また TIMP-2は破骨細胞形成を促進することも報告されている²⁴⁾。歯周炎との関連では、歯肉溝滲出液中の TIMP-2は歯周治療により減少する²⁵⁾。TIMP-2は平均 PPD、PPD7mm 以上部位の割合と相関が示された。歯周炎による骨吸収とポケットの深化を反映していると考えられる。

臨床指標と相関を認めたサイトカインは、歯槽骨破壊の促進因子や歯周組織への炎症性細胞の浸潤を促すものであった。これらは、付着の破壊と歯槽骨吸収を主体とする歯周炎の病態と合致している。しかし、歯周炎の病態の多様性に対応させるには、サンプルサイズの増加や歯周治療前後でのサイトカイン量の変化、全身疾患を持った患者との比較が必要である。

結 論

相関を認めたサイトカインは Perio 群の全被験者から検出されなかったが、MIP-1 β は平均 PPD、PPD7mm 以上部位の割合、BOP と多くの歯周検査値との間に相関を認めた。MIP-1 β は歯周炎の重症度を示すマーカーとして期待される。

今回、相関関係を認めたサイトカインは歯周病の重症診断の一助となる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費15K20572の助成を受けて行った。

利益相反 (COI)

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

- 1) Demmar RT, Squillaro AS, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR and Devarieux M. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care*. 2012; 35: 2235-2242.
- 2) Lockhart PB, Bolger AF, Papapanou PN, Osinbowale O, Trevisan M, Levison ME, Taubert KA, Newburger JW, Gornik HL, Gewitz MH, Wilson WR, Smith SC Jr and Baddour LM. Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 125: 2520-2544.
- 3) Lafon A, Pereira B, Dufour T, Rigouby V, Giround M, Béjot Y and Tubert-Jeannin S. Periodontal disease and stroke: a meta-analysis of cohort studies. *Eur J Neurol*. 2014; 21: 1151-1161.
- 4) Amano A, Ansai T, Takata Y, Soh I, Akifusa S, Hamasaki T, Yoshida A, Sonosaki K, Fujisawa K and Takehara T. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res*. 2008; 87: 334-339.
- 5) Kaur S, White S and Bartold PM. Periodontal disease and rheumatoid arthritis: A systematic review. *J Dent Res*. 2009; 92: 399-408.
- 6) Iwasaki M, Taylor GW, Nesse W, Vissink A, Yoshihara A and Miyazaki H. Periodontal disease and decrease kidney function in Japanese elderly. *Am J Kidney Dis*. 2012; 59: 202-209.
- 7) Chen YW, Umeda M, Nagasawa T, Takeuchi Y, Huang Y, Inoue Y, Iwai T, Izumi Y and Ishikawa I. Periodontitis may increase the risk of peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2008; 35: 153-158.
- 8) Chambrone L, Foz AM, Guglielmetti MR, Pannuti CM, Artese HP, Feres M and Romito GA. Periodontitis and chronic kidney disease: a systemic review of the association of diseases and the effect of periodontal treatment on estimated glomerular filtration rate. *J Clin Periodontol Res*. 2013; 40: 443-456.
- 9) Nishimura F, Taniguchi A, Iwamoto Y, Soga Y, Fukushima M, Nagasaka S, Nakai Y and Murayama Y. *Porphyromonas gingivalis* infection is associated with elevated C-reactive protein in nonobese Japanese type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*. 2002; 25: 1888.
- 10) Pirkko J P, Susanna P, Päivi M and Timo S. Serum microbial- and host-derived markers of periodontal

- diseases: A review. *Curr. Med. Chem.* 2007; 14: 2402-2412.
- 11) Adnan A A, Norbert C, José A C, Fabien D, Delphine S C, Catherine G and Andrea M. Effect of periodontal treatment on peak serum levels of inflammatory markers. *Clin Oral Invest.* 2014; 18: 2113-2121.
 - 12) Elisabeth A B, Elin K, Rima S, Py P, Mirjam M, Cecilia K H, Stephanie Z, Reuben C, Sebastian Ö, Ingegerd J, Ulf H. L and Pernilla L. Increased eotaxin and MCP-1 levels in serum from individuals with periodontitis and in human gingival fibroblast exposed to pro-inflammatory cytokines. *Plos One.* 2015; 10: e0134608.
 - 13) Abe M, Hiura K, Ozaki S, Kido S and Matsumoto T. Vicious cycle between myeloma cell binding to bone marrow stromal cell via VLA-4-VCAM-1 adhesion and macrophage inflammatory protein-1 α and MIP-1 β production. *J Bone Miner Metab.* 2009; 27: 16-23.
 - 14) Yoshie O. Chemokine receptors as therapeutic targets. *Jpn. J. Clin. Immunol.* 2013; 36: 189-196.
 - 15) Abe M, Hiura K, Wilde J, Moriyama K, Hashimoto T, Ozaki S, Wakatsuki S, Kosaka M, Kido S, Inoue D and Matsumoto T. Role of macrophage inflammatory protein (MIP) -1 α and MIP-1 β in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *Blood.* 2002; 100: 2195-2202.
 - 16) Herrera BS, Bastos AS, Coimbra LS, Teixeira SA, Rossa C Jr, Van Dyke TE, Muscara MN and Spolidorio SC. Peripheral blood mononuclear phagocytes from patients with chronic periodontitis are primed for osteoclast formation. *JPeriodontol.* 2014; 85: e72-81.
 - 17) Darveau RP, Tanner A and Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997; 14: 12-32.
 - 18) Miyagawa T, Fujita T, Ouhara K, Matsuda S, Kajiya M, Hayashida K, Imai H, Yoshimoto T, Iwata T, Shiba H, Abiko Y and Kurihara H. Irsogladine maleates regulates the inflammatory related genes in human gingival epithelial cells stimulated by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Int Immunopharmacol.* 2013; 15: 340-347.
 - 19) Naruishi K, takashiba S, Chou HH, Arai H, Nishimura F and Murayama Y. Role of soluble interleukine-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblast. *J periodontal Res.* 1999; 34: 296-300.
 - 20) Jones SA and Rose-John S. The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1592: 251-263.
 - 21) 高柴正悟. 歯周病のオーダーメイド治療に向けた単球機能の分子生物学的研究. *日歯周誌.* 2002; 44: 254-260.
 - 22) Naruishi K, Takashiba S, Nishimura F, Chou HH, Arai H, Yamada H and Murayama Y. Impairment of gingival fibroblast adherence by IL-6/sIL-6R. *J Dent Res.* 2001; 80: 1421-1424.
 - 23) Visse R and Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92: 827-839.
 - 24) 祖父江尊範, 大口雅代, 田中繁寿, 小出雅則, 石原裕一, 山下京子, 早川祐久, 早川太郎, 野口俊英. TIMP-1 および TIMP-2は破骨細胞形成を促進する. *日歯周誌.* 2005; 47: 297-307.
 - 25) Marcaccini AM, Meschiari CA, Zuardi LR, de Sousa TS, Taba M, Teofilo JM, Jacob-Ferreira ALB, Tanus-Santos JE, Novaes AB and Gerlach RF. Gingival crevicular fluid levels of MMP-8, MMP-9, TIMP-2, and MPO decrease after periodontal therapy. *J Clin Periodontol.* 2010; 37: 180-190.