

平成 21 年 6 月 13 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007-2008

課題番号： 19592210

研究課題名 (和文) 抗酸化剤で口腔内好中球の細胞死の制御を図る研究

研究課題名 (英文) Study to manipulate the apoptosis of oral polymorphonuclear leukocytes by using anti-oxidants.

研究代表者

高橋 慶壮 (TAKAHASHI KEISO)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：70243475

研究成果の概要：

本研究では、抗酸化剤で口腔内好中球の細胞死を制御することを目的に、1) 細胞内活性酸素量および細胞内グルタチオン量、2) flow cytometry 解析および電子顕微鏡を用いた形態学的検討、シグナル伝達阻害剤および抗酸化剤による細胞死の遅延効果、アポトーシス関連分子の発現様態、カスパーゼ活性およびミトコンドリア膜電位を指標として評価した。さらに、抗酸化作用を有する天然素材のマスティックによる口腔内好中球の細胞死抑制作用を解析した。マスティックは、口腔内好中球の細胞死を抑制した。また、抗酸化作用を有していた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯周治療学

科研費の分科・細目：

キーワード：抗酸化剤、口腔内好中球、細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの医療は、細菌感染を「抑える」、炎症を「抑制する」といった「抗」医学が主流であった。しかし、慢性疾患である癌、高血圧、糖尿病および肥満などの生活習慣病では、宿主の免疫応答力を高め、自発的治癒力を高める医療の展開が求められる。

歯周治療では、口腔内細菌を除菌することに主眼が置かれているが、immune modulators (ビタミン類や抗酸化剤) を用いて生体の免疫応答性や治癒力を高めることができれば、臨床上、非常に有用であり、全身の健康増進にも寄与できる。

研究者はこれまでにマスティック含有のガムが唾液中の細菌増殖を抑制し、歯面へのプラーク形成を抑制することを報告した (Takahashi K et al. J. Periodontol, 501-505, 2003.)。このマスティック成分が宿主細胞にいかなる影響を及ぼすか、また歯周病の病態を考えた際に、歯周ポケットから遊走する多形核白血球の細胞死に及ぼす影響を解析する計画を立てた。

## 2. 研究の目的

天然素材のマスティックを用いて、生体応答への効果を細胞および分子レベルで解析し、これまでの細菌感染や炎症を抑制する「抗」医学ではなく、宿主免疫応答を高めることで歯周疾患の治療あるいは予防を促進するための基礎的研究を行うこと。

## 3. 研究の方法

口腔内好中球の回収および分離

細胞生物学的手法 (細胞増殖能、カスパーゼ活性測定、Western blotting 法)、電子顕微鏡的観察、ESR 法

## 4. 研究成果

口腔内好中球は、末梢血好中球に比較して以下の特徴を示した。① 約 2 倍の活性酸素を産生した。② 約 1/2 の細胞内グルタチオン量であった。③ 分離・調整後 2 時間で約 60%以上の細胞にアポトーシスおよびネクローシスが観察された。④ TEM 像から、2 時間後にクロマチンの凝縮および細胞質内に多数の空胞変性を認めた。⑤ SH 基を有する抗酸化剤である NAC および GSH は細胞死を有意に遅延した ( $p < 0.05$ )。

一方、caspase inhibitors、p38 MAPK inhibitor、および catalase と SOD による細胞死の遅延効果はみられなかった。⑥ カスパーゼ 3, 8 および 9 活性は全て有意に低かった ( $p < 0.05$ )。⑦ アポトーシス促進性 Bad および cytochrome-c の発現量が有意に高く、アポトーシス抑制性のリン酸化 Bad の発現量は有意に低く、Bax は同程度に発現しており、Bcl-2 は全く検出されなかった。⑧ ミトコンドリアの膜電位が有意に低下していた ( $p < 0.05$ )。⑨ マスティック含有成分は口腔内好中球の細胞死を有意に抑制した。

マスティック含有成分は、活性酸素を産生せず、HIV 活性を有しなかった。また、白血病細胞 HL-60 のアポトーシスを誘導した。

## 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 3 件)

Sakagami H, Kishino K, Kobayashi M, Hashimoto K, Iida S, Shimetani A, Nakamura Y, Takahashi K, Ikarashi T, Fukamachi H, Satoh K, Nakashima H, Shimizu T, Takeda K, Watanabe S, Nakamura W. Selective antibacterial and apoptosis-modulating activities of mastic in vivo 23: 215-223, 2009.

Zhou LI, Satoh K, Takahashi K, Watanabe S, Nakamura W, Maki J, Hatano H, TAKEKAWA F, Shimada C and Sakagami H. Re-evaluation of anti-inflammatory activity of mastic using activated macrophages. in vivo (in press).

Nakamura Y, Shimetani A, Fujii H, Amano O, Sakagami H, Takahashi K. Glutathione can efficiently prevent direct current-induced cytotoxicity. J Endodontics. 34: 693-697, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

Kishino K, Sakagami H, Takahashi K, et al. Biologic evaluation of mastic for the oral health J Dent Res, 2007.

佐藤 純 佐野しおり 高橋慶壮 ビスフォスフォネート投与中の骨粗鬆症および多発性骨髄腫罹患患者において抜歯後に下顎骨顎骨壊死を生じた症例 平成20年10

月19日

鈴木史彦、中山大輔、山口英久、池田祥恵、中島大誠、高橋慶壮 機能的ダイアグラムを用いたSPT患者のリスク評価縦断的研究 平成20年10月19日

山口英久、鈴木史彦、佐藤 純、高橋慶壮 慢性歯周炎患者の治療の成功は患者教育による 平成20年10月19日

高橋慶壮 リスク評価および組織再生を考慮した外科的歯内療法 第25回日本顎咬合学会学術大会 日本顎咬合学会 2007年6月

[図書] (計 2 件)

Papantonopoulos GH, Takahashi K. A non-linear approach to periodontal diseases susceptibility. Nova Biomedical, NY 2008.

高橋慶壮 歯内療法失敗回避のためのポイント47 -なぜ痛がるのか、なぜ治らないのか- 単著 クインテッセンス出版株式会社 2008年3月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高橋 慶壮 (TAKAHASHI KEISO)

奥羽大学・歯学部・教授

研究者番号：70243475

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし