

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791623

研究課題名 (和文) 唾液中の酸化ストレスマーカーと歯周病原菌の相関

研究課題名 (英文) Relationship between the marker of oxidative stress and periodontal bacteria in saliva.

研究代表者

高根 正敏 (TAKANE MASATOSHI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：40349965

研究成果の概要：唾液検査は、検体の採取法が容易であり、無痛下での採取が可能で、生体への侵襲がないなど、特にスクリーニング検査に有用であると考えられる。以前我々は、唾液中の酸化ストレス濃度を測定したところ、歯周病患者では健常者に比べて濃度が高く、歯周病患者においては治療により臨床症状の改善と共に酸化ストレス濃度が低下すること、唾液中の歯周病原性細菌の割合と酸化ストレス濃度には相関が認められることを発見し、唾液は歯周病患者のスクリーニングに有用であることを報告した。本研究では、さらに唾液中の抗酸化力を測定し、唾液中の歯周病原菌と相関があることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：唾液検査・歯周病・酸化ストレス・活性酸素・抗酸化力・歯周病原菌

## 1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は罹患率の高い生活習慣病である。歯周病は、歯周病原菌と宿主の免疫応答が複雑に絡みあい、組織破壊を引き起こす炎症性の疾患であり、歯周組織破壊には、多形核白血球由来の活性酸素種 (ROS) が関与していることが示されている。活性酸素は体内で、脂質、蛋白質、糖、核酸などを酸化変性させ、細胞機能を障害する。活性酸素が過剰に生成されると、体内の酸化ストレスが増加して、動脈硬化、心筋梗塞、糖尿病、癌など、さまざまな病気が発症すると考えられている。活性酸素による組織障害マーカーの一つとして

8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine (以降 8-OHdG と表す) が知られている。8-OHdG はDNAの構成成分の一つである、デオキシグアノシン (dG) が活性酸素などにより酸化を受け生成する物質で最終的に血液や尿中に排出される。8-OHdG は生体内において安定した物質であり、ELISA 法にて簡便に測定することができることから医科領域では酸化ストレスによる組織障害のマーカーとして種々の疾患との相関が報告されている。

以前我々は、活性酸素による酸化ストレスが歯周病の病態に関与し、酸化ストレスマーカーである 8-OHdG が唾液中に検出さ

れ、健康者に比べ歯周病患者で高かったこと、歯周病患者においては初期治療により臨床症状の改善と共に 8-OHdG 濃度が低下することを報告した。また、歯周病患者でも予後不良歯がある方より高い値を示した。また、唾液中の総細菌数中の歯周病原菌の割合と 8-OHdG 濃度には相関が認められた。以上のことより、歯周病は活性酸素によって障害を受けた病態のひとつであり、唾液中の酸化ストレスマーカーを測定することにより、特に現状の組織破壊の程度を測定していることであると考えられた。

## 2. 研究の目的

生体内にはROSの有害な影響を打ち消すために、直接的あるいは間接的に働く酸化防衛機制が存在する。活性酸素の発生を最小限におさえたり消去したりして酸化を防ぐことを抗酸化といい、特にその作用をもつ物質を抗酸化物質という。抗酸化物質は酵素と非酵素性高分子あるいは低分子に大別され、後者は生体構成成分(天然植物性抗酸化物質、アルブミン、コエンザイムQなど)、ホルモン(エストロゲンなど)、代謝物質(尿酸、ビリルビンなど)、合成分子(和漢薬、合成薬物など)などからなる。また、抗酸化酵素は過酸化水素・脂質過酸化消去系酵素(カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、アスコルビン酸ペルオキシダーゼなど)と、スーパーオキシド消去系の酵素[スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)など]に分けられる。歯周病においては白血球が歯周病原菌を攻撃する際発生する、スーパーオキシドが( $O_2^-$ )その病態に関与していると考えられている。種々ある抗酸化物質の中で特に生体内で産生され、他の活性酸素の発生源になるスーパーオキシド( $O_2^-$ )を消去する酵素がSOD(superoxide dismutase)で、強力な抗酸化力を持っており、医科の領域では注目を浴びている。また、歯周病においても、唾液中の活性酸素量や臨床パラメータと相関があるとの報告もなされている。そこで本研究の目的は、歯周病患者の唾液中の抗酸化力(TAOC)を測定し、臨床パラメータ、歯周病原菌との関係を見出し、唾液検査での有用性を検討することである。

## 3. 研究の方法

### 患者選択

対象は日本大学歯学部附属歯科病院に来院し、十分にインフォームドコンセント

を行った後に同意を得られた26から65歳の患者22名(男性10名、女性12名、平均年齢47.5歳)とした。歯周病の臨床基準は、4ミリ以上のポケットを2箇所以上有していることを条件とした。すべての患者は全身的に健康で、過去3ヵ月以内に抗生剤を使用したものは除外した。なお、本研究のプロトコールは日本大学歯学部倫理委員会の承認を受けており、対象者には書面にてインフォームドコンセントを実施した。

### 臨床パラメータの測定

初診時におけるポケット深さ(PD)、歯肉出血歯数(BOP)、臨床的アタッチメントレベル(CAL)の測定を行った。PDとCALは歯周プローブ(CP11; Hu-Friedy社製)を用い、1歯につき6点(近心頬側、頬側中央、遠心頬側、近心口蓋側、口蓋側中央、遠心口蓋側)を1mm単位で測定した。BOPは患者ごとに出血部位の割合で測定した。

### 唾液サンプルの採取

健康質問表を記入後、咀嚼唾液を採取した。唾液の採取は、パラフィンガムを5分間咀嚼し、その間の唾液を採取した。採取した唾液は直ちに冷蔵後、 $-80$ 度にて保存した。

### 唾液中の抗酸化力(TAOC)の測定

唾液サンプルを、 $10,000\times g$ で10分間遠心分離を行い、上澄みを第一鉄によって誘発されたルミノール化学発光測定(ラジカルキャッチ、ALOKA社)を用い測定を行った。TAOCは、発光の量に反比例し、発光の量は、luminometer(AccuFLEX Lumi、ALOKA社)で測定されました。測定手順は単純で、1サンプルにつき7分程度で完了する。

### リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応(PCR)

唾液サンプルを10分間沸騰し、その後 $10,000\times g$ で5分間遠心分離を行った。そして、上澄みの $5\mu l$ をPCRのサンプルとして使用した。リアルタイムPCRは、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System(ABI、Foster City)を使用した。測定は唾液中3種類の歯周病原菌(*Actinobacillus actinomycetemcomitans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Bacteroides forsythus*、*Treponema denticola*)および細菌リボゾームを対象として検出し定量をこない、唾液中に含まれる総細菌数に対する歯周病原菌の占める割合を算出した。

### データ解析

測定された抗酸化力(TAOC)をそれぞれ臨床パラメータ(PD、BOP、CAL)、唾液中

の総細菌数に対する歯周病原菌 (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*) の占める割合、唾液中の歯周病原菌数、および喫煙本数を Spearman's rank correlation test を用いて評価を行った。

#### 4. 研究成果

##### 【結果】

今回の対象患者の初診時における臨床パラメータ (PD、BOP、CAL)、唾液中の総細菌数に対する歯周病原菌 (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*) の占める割合、対象患者における歯周病原菌の検出率、抗酸化力 (TAOC)、および喫煙本数の平均値と95%信頼区間を表1に示す。

喫煙者は22名中6名で、平均本数は4.55 ± 0.44本。臨床パラメータはPDが3.36 ± 0.04mm、CALが3.84 ± 0.05mm、BOPは43.8 ± 1.00%であった。また、細菌学的評価では、総細菌数が8.86 ± 0.73 × 10<sup>8</sup>、総細菌数に対する各細菌の割合は、*A. actinomycetemcomitans* が 0.010 ± 0.001% (検出率31.8%)、*P. gingivalis* 0.100 ± 0.013% (検出率77.3%)、*T. forsythia* は 0.064 ± 0.004% (検出率90.9%)であった。

表1 各パラメータの平均値

variable	Mean ± SE	95% CI confidence interval
No. of subjects	22	
Age	47.5 ± 0.58	46.3 - 48.6
smoking	4.55 ± 0.44	5.40 - 3.69
PD (mm)	3.36 ± 0.04	3.29 - 3.43
CAL (mm)	3.84 ± 0.05	3.73 - 3.95
BOP (%)	43.8 ± 1.00	41.8 - 45.7
TAOC (%)	63.8 ± 1.62	60.7 - 67.0
No. of total bacteria/ml	8.86 ± 0.73 × 10 <sup>8</sup>	7.43 × 10 <sup>8</sup> - 1.03 × 10 <sup>9</sup>
No. of <i>A. actinomycetemcomitans</i> /ml	8.53 ± 1.50 × 10 <sup>4</sup>	5.58 × 10 <sup>4</sup> - 1.15 × 10 <sup>5</sup>
No. of <i>P. gingivalis</i> /ml	6.30 ± 0.63 × 10 <sup>5</sup>	5.06 × 10 <sup>5</sup> - 7.55 × 10 <sup>5</sup>
No. of <i>T. forsythia</i> /ml	4.48 ± 0.95 × 10 <sup>8</sup>	2.61 × 10 <sup>8</sup> - 6.35 × 10 <sup>8</sup>
<i>A. actinomycetemcomitans</i> level (%)	0.010 ± 0.001	0.008 - 0.012
<i>A. actinomycetemcomitans</i> -positive subject (%)	31.8	
<i>P. gingivalis</i> level (%)	0.100 ± 0.013	0.125 - 0.073
<i>P. gingivalis</i> -positive subject (%)	77.3	
<i>T. forsythia</i> level (%)	0.064 ± 0.004	0.056 - 0.073
<i>T. forsythia</i> positive subject (%)	90.9	

また、抗酸化力 (TAOC)、それぞれ臨床パラメータ (PD、BOP、CAL)、唾液中の総細菌数に対する歯周病原菌 (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*) の占める割合、唾液中の歯周病原菌数のそれぞれの相関係数を表2に示す。PDとCAL (r=0.862, P<0.01)、PDとBOP (r=0.613, P<0.01)、PDと*A. actinomycetemcomitans* の総細菌数に対する割合 (r=0.538, P<0.01)、*P. gingivalis* と *T. forsythia* の総細菌数に対

する割合で正の相関を認めた。また、唾液中の抗酸化力 (TAOC) と唾液中の *P. gingivalis* 数に負の相関を認めた。

表2 臨床パラメータと細菌の相関

Parameter	Smoking	Tf level (%)	P.g level (%)	A.a level (%)	No. of Tf	No. of P.g	No. of A.a	TAOC	Age	BOP	CAL	PD
PD	-0.021	-0.239	-0.203	0.538*	0.211	0.085	-0.135	-0.177	-0.036	0.613*	0.862*	
CAL	-0.093	-0.214	-0.216	0.373	0.326	0.126	-0.169	-0.301	0.037	0.412		
BOP	-0.072	-0.022	0.109	0.381	-0.283	0.138	0.182	0.081	-0.162			
Age	0.127	-0.293	-0.352	-0.168	-0.158	-0.153	-0.134	0.109				
TAOC	0.122	0.021	-0.249	-0.101	-0.282	-0.496*	0.148					
No. of A.a	-0.139	0.192	-0.012	0.326	-0.058	-0.013						
No. of P.g	-0.181	0.231	0.603*	0.061	-0.105							
No. of Tf	-0.115	-0.067	-0.081	0.072								
A.a level (%)	-0.052	0.159	0.263									
P.g level (%)	-0.106	0.619*										
Tf level (%)	0.362											
Smoking												

##### 【考察】

結果をまとめると (1) 唾液中の抗酸化力は *P. gingivalis* の細菌数と相関が認められた (r = -0.50, P > 0.05)、(2) 唾液中の抗酸化力は臨床パラメータや *P. gingivalis* 以外の歯周病原菌 (*A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia*) とは相関が認められなかった。

唾液中の抗酸化力は *P. gingivalis* の細菌数と相関が認められたことから、唾液中の抗酸化力測定は、歯周病患者の唾液検査項目として利用できる可能性があると考え

えられる。

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)

[学会発表] (計1件)

①高根正敏、Total Antioxidant Capacity of saliva in periodontitis patients、2008 AAP Annual Meeting、2008年9月6—8日、Seattle、Washington

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高根 正敏 (TAKANE MASATOSHI)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：40349965

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：