

平成23年5月31日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792149

研究課題名 (和文) 揮発性硫黄化合物が歯槽骨吸収に及ぼすメカニズムの解明

研究課題名 (英文) Effects of Hydrogen Sulphide on Osteoclast Differentiation in Rats

研究代表者

入江 浩一郎 (IRIE KOUICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：50509594

研究成果の概要 (和文)：

口臭起因物質である揮発性硫黄化合物が、歯周組織に影響を及ぼすことが報告されている。本研究では、揮発性硫黄化合物を用い、ラット歯槽骨における影響を検討した。その結果、揮発性硫黄化合物は RANKL 発現を介して破骨細胞の分化を引き起こした。また歯周炎患者における歯肉溝浸出液の同程度の濃度においても、歯槽骨に影響を及ぼすことがわかった。また歯周炎誘発物質の Lipopolysaccharide (LPS) を同時に塗布することで、相互作用があることが判明し、また TLR4 を介して歯槽骨に影響を及ぼすことがわかった。これらの結果は、歯周炎を増悪させる一因になっていることを示唆しており、また新たな治療方法の開発になることが期待される。

研究成果の概要 (英文)：

Oral malodor is mainly attributed to volatile sulphur compounds (VSCs) such as hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S). VSC accelerate periodontal soft tissue destruction. However, there is little information about the potential role of H<sub>2</sub>S in alveolar bone loss. The purpose of this animal study was to examine the effects of H<sub>2</sub>S on osteoclast differentiation in rat periodontal tissue. H<sub>2</sub>S application caused a transient increase of osteoclast differentiation with up-regulation of RANKL expression in osteoblasts. H<sub>2</sub>S, which is primarily responsible for halitosis, may also contribute to alveolar bone resorption through RANKL expression. H<sub>2</sub>S and LPS had the additive effects on osteoclast differentiation through activation of TLR4 pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：予防歯科学分野

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口臭 揮発性化合物 ラット

### 1. 研究開始当初の背景

口臭物質・揮発性硫黄化合物 (VSC) は、歯肉線維芽細胞・歯肉上皮細胞に障害を引き起こすことで歯周病原性に関与する。具体的には、リポポリサッカライドやプロスタグランジンの歯肉への透過性を亢進させ、歯肉線維芽細胞におけるインターロイキンやプロスタグランジン E<sub>2</sub> の産生能の亢進・マトリックスメタロプロテアーゼの活性化・コラーゲン産生の抑制・アポトーシスの誘導を引き起こし、歯肉上皮細胞を増殖させることなどが報告されている。ほとんどの研究が歯周軟組織への効果に焦点を当てており、歯槽骨への直接作用に関する報告は皆無に等しい。また、VSC が歯周炎の進行に対して与える影響については不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

VSC 塗布による歯槽骨への直接作用 (破壊作用) また LPS による相互作用を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 実験デザイン

4 群 [実験群と対照群] に分け、実験群の両側上顎第一臼歯口蓋側歯肉溝に、H<sub>2</sub>S のドナードラッグである NaHS 溶液をそれぞれの濃度 (0.1mM、1mM、10mM) に分け、0.5 $\mu$ l ずつ 5 分間隔で 6 回塗布した。また対照群は無処置とした。過去の研究から塗布 1 日後が、最も歯周組織に影響を及ぼすことから、塗布 1 日後に屠殺を行いその結果から、歯周組織に最も影響を与える NaHS 濃度を見つける。

次にその濃度で、LPS を混合塗布し相互作用の比較検討を行った。

- 1) 対照群 ; ラットを通常飼育
- 2) NaHS 塗布群 ; NaHS 溶液を第 1 臼歯歯肉に塗布
- 3) LPS 塗布群 ; LPS 溶液を同様に塗布
- 4) NaHS+LPS 投与群 ; NaHS 溶液と LPS 溶液を塗布

#### (2) 歯周組織の組織定量分析

実験期間終了後、歯周組織の組織標本作製する。形態分析を行うため、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また RANKL 抗体と酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) による二重染色および TNF- $\alpha$  抗体による染色を行った。

#### (3) 歯周組織の遺伝子発現

Biopsy した歯肉から RNA を抽出し Real time PCR で遺伝子発現 (RANKL・TNF- $\alpha$ ・TLR2,4) を確認した。

### 4. 研究成果

実験結果から、NaHS 投与ラットの破骨細胞の活性化がみられ、歯槽骨吸収が促進されることが示唆された。またそのメカニズムの一端を解明することができた。そして歯周炎患者の同程度の揮発性硫黄化合物濃度でも歯槽骨に影響を与えることがわかった。

歯周炎モデルとして使われる LPS を塗布した状態では、NaHS と相互作用が認められた。臨床研究では、揮発性硫黄化合物濃度と

歯槽骨レベルの相関がみられることが示唆されている。以上のことから、口臭治療によって揮発性硫黄化合物濃度の減少に伴い、歯槽骨への影響が軽減されるかもしれない。

本研究から、口臭動物モデルの開発を通じて、硫化水素が歯槽骨に直接作用を及ぼすこと、およびそのメカニズムが明確になった。歯科医師による口臭治療が新たに歯槽骨にも影響を与えるという重要な情報を提供する可能性があり、その社会的意義は大きい。

## 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7件)

① Irie K, Ekuni D, Tomofuji T, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, Morita M: Occlusal disharmony induces BDNF level in rat submandibular gland. Arch Oral Biol. 56:35-40, 2011. (査読有)

② Endo Y, Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M: Experimental periodontitis induces gene expression of proinflammatory cytokines in liver and white adipose tissues in obesity. J Periodontol, 81, 520-526.2010. (査読有)

③ Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Kasuyama K, Umakosi M, Azuma T, Tamaki N, Sanbe T, Endo Y, Yamamoto T: Effects of periodontitis on aortic insulin resistance in an obese rat model. Lab Invest, 90, 348-359. 2010. (査読有)

④ Ekuni D, Endo Y, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Tomofuji T, Morita M:

Imbalance of oxidative/anti-oxidative status induced by periodontitis is involved in apoptosis of rat submandibular glands. Arch Oral Biol, 55, 170-176. 2010. (査読有)

⑤ Furuta M, Ekuni D, Yamamoto T, Irie K, Koyama R, Sanbe T, Yamanaka R, Morita M, Kuroki K, Tobe K. Relationship between periodontitis and hepatic abnormalities in young adults. Acta Odontol Scand, 68, 27-33. 2010.

(査読有)

⑥ Irie K, Ekuni D, Yamamoto T, Morita M, Yaegaki K, Ii H, Imai T : A single application of hydrogen sulphide induces a transient osteoclast differentiation with RANKL expression in the rat model Arch Oral Biol, 54, 723-729, 2009. (査読有)

⑦ Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T, Morita M: Preventive effects of a cocoa-enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. J Periodontol, 80, 1799-1808. 2009. (査読有)

[学会発表] (計4件)

① K. IRIE, D. EKUNI, T. TOMOFUJI, Y. ENDO, K. KASUYAMA, M. MORITA, K. YAEGAKI, H. II, T. IMAI: Combined Effects of Hydrogen Sulphide and Lipopolysaccharide in Rat Periodontium. The 89th International Association for Dental Research, Barcelona March 16-19, 2011.

② K. IRIE, D. EKUNI, T. TOMOFUJI, Y. ENDO, K. KASUYAMA, M. MORITA, K. YAEGAKI, H. II, T. IMAI: Combined Effects of Hydrogen Sulphide and Lipopolysaccharide in

Rat Periodontium. The 9th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, Kuala Lumpur, November 21-24, 2010.

③ Irie K, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Tamaki N, Endo Y, Sanbe T, Yamamoto T, Morita M: Cocoa-enriched diet decreases gingival oxidative stress in rat periodontitis: SFRR, Roma, Italy, August 22-25, 2009.

④ Ekuni D, Irie K, Yamamoto T, Morita M, Yaegaki K, Ii H, Imai T : Hydrogen Sulfide Application Induces a Transient Osteoclast Differentiation with RANKL Expression in the Rat Model: The 8th congress of International Society for Breath Odor Research, Dortmund, April 26-30, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

入江 浩一郎 (IRIE KOUICHIRO)  
岡山大学・岡山大学病院・医員  
研究者番号：50509594