

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 21日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792120

研究課題名（和文） 水素水を用いた歯周病対策の検討

研究課題名（英文） Preventive effects of hydrogen-rich water on periodontitis

研究代表者

友藤 孝明（TOMOFUJI TAKAAKI）

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：80335629

研究成果の概要（和文）：活性酸素は、歯周炎の進行に関与する。分子状水素は活性酸素を除去できることが知られている。そこで本研究では、ラット歯周炎モデルに対する水素水の影響を検討した。歯周炎は、上顎臼歯に4週間絹糸を巻いて惹起させた。そして、実験開始と併せて、ラットには純水もしくは水素水が与えられた。歯周炎を惹起させた群では、経時的な血清 reactive oxygen metabolites (ROM) 値（活性酸素濃度の指標）の上昇とともに、歯周組織における炎症性細胞数の増加と歯槽骨吸収が観察された。一方、水素水の摂取は、歯周炎に伴う血清 ROM 値の上昇を抑え、さらに歯周組織における炎症性細胞数を減少させた。また、炎症に関連した細胞内シグナル伝達因子である mitogen-activated protein kinases のリン酸化も、水素水の摂取によって抑制されていた。以上のことから、水素水の摂取は、活性酸素を減少させることにより歯周炎の進行を抑える効果があることが推測される。

研究成果の概要（英文）： Reactive oxygen species (ROS) contribute to the development of periodontitis. As molecular hydrogen can act as a scavenger of ROS, we examined the effects of treatment with hydrogen-rich water on a rat periodontitis model. A ligature was placed around the maxillary molars for 4 weeks to induce periodontitis, and the animals were given drinking water with or without hydrogen-rich water. The rats with periodontitis which were treated with pure water showed a time-dependent increase in serum reactive oxygen metabolites (ROM) level. Compared to the rats without periodontitis, the periodontitis-induced rats which were given pure water also showed polymorphonuclear leukocyte infiltration and alveolar bone loss at 4 weeks. Hydrogen-rich water intake inhibited an increase in serum ROM level at 4 weeks. Such conditions prevented polymorphonuclear leukocyte infiltration and osteoclast differentiation following periodontitis progression. Furthermore, inflammatory signaling pathways, such as mitogen-activated protein kinases, were less activated in periodontal lesions from hydrogen-rich water-treated rats as compared with pure water-treated rats. Consuming hydrogen-rich water might be beneficial in suppressing periodontitis progression by decreasing ROS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：歯学、栄養、トランスレーショナルリサーチ

## 1. 研究開始当初の背景

近年の研究から、歯周病の進行に酸化ストレスの関与が明らかにされている。したがって、宿主の抗酸化力を高めることは、歯周病の予防に効果があると考えられる。事実、全身の抗酸化力と歯周病の重症度との間に負の相関があることは、国内・国外の疫学研究から多く指摘されている。

全身の抗酸化力を増加させる方法の一つに水素水の摂取が挙げられる。水素水による歯肉酸化ストレスの改善は、歯周状態に対してもよい効果が期待される。しかし、歯周状態に対する水素水摂取の効果を検討した研究はほとんど行われていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、水素水摂取による歯周病の予防効果を組織学的・生化学的に検証することである。平成22年度では、実験的に炎症を惹起させたラット歯周組織の変化を、水素水摂取の有無で比較検討した。平成23年度では、平成22年度で凍結保存したサンプルを用いて、歯周組織内の炎症関連因子が水素水の摂取でどのように変化するかを、遺伝子レベル・蛋白レベルで解析した。また、水素水に抗酸化作用があることから、歯周組織の酸化ストレスの変化についても検討を加えた。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験デザイン

8週齢のWistar雄性ラットを以下の4群に分けた。

①対照群：純水を与え、通常飼育した。

②水素水摂取群：水素水を与え、通常飼育した。

③歯周病群：実験的歯周病を惹起し、さらに

純水を与えた。

④歯周病+水素水摂取群：実験的歯周病を惹起し、さらに水素水を与えた。

実験期間は8週間とし、歯周病は下顎臼歯に絹糸を巻いて惹起させる。水素水は、市販のものを購入した。そして、常に0.4mM以上の水素イオン濃度が保たれていることを、デジタル溶存水素濃度計を用いて確認した。

### (2) 血液サンプルの分析

実験開始時を含めて2週間毎に尾静脈（実験終了時は心臓）から採血を行った。血液から血清を分離し、酸化ストレスに関連する指標としてReactive Oxidative Metabolites (ROM; 酸化ストレス度)の変化を分析した。

### (3) 歯周組織の組織定量分析

実験期間終了後、ラットを麻酔下で屠殺し、歯周組織の組織標本作製した。ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、セメント・エナメル境から接合上皮最根尖側までの距離、セメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離と結合組織中の好中球数を測定した。

### (4) 歯周組織におけるmitogen-actiated protein kinase (MAPK) のリン酸化の検出

歯肉サンプルから蛋白を抽出し、ウェスタンブロット法を用いて、MAPKの総量とリン酸化したMAPKの総量を測定した。

### (5) 統計分析

一元配置分散分析とTukey法を用いた。対照群と歯周病群の比較より、炎症による歯周組織の悪化の程度を評価した。また、歯周病群と歯周病+水素水摂取群の比較から、歯周病

を予防する効果としての水素水摂取の影響をみた。

#### 4. 研究成果

本研究では、実験的に炎症を惹起させたラット歯周組織の変化を、水素水摂取の有無で比較検討した。また、尾静脈から血液を経時的に採取し、**Reactive Oxidative Metabolites (ROM; 酸化ストレス度)**の変化を分析した。

実験期間は8週間とし、歯周炎は下顎臼歯に絹糸を巻いて惹起させた。その結果、実験開始後8週目の歯周組織において、付着上皮直下結合組織における炎症性細胞浸潤とセメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離（歯槽骨吸収の程度）の増加が観察された。また同時に、経時的な血清**ROM**レベルの上昇も認められた。

一方、歯周炎を惹起させながら水素水を与えた群では、実験開始後8週目の歯周組織において、付着上皮直下結合組織における炎症性細胞浸潤の低下とセメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離（歯槽骨吸収の程度）の減少がみられた。また、実験的歯周炎に伴う経時的な血清**ROM**レベルの上昇も抑えられていた。さらに、炎症に関連した細胞内シグナル伝達因子である **mitogen-activated protein kinases** のリン酸化も、水素水の摂取によって抑制されていた。

近年の研究から、歯周病の進行に酸化ストレスが関与していることが分かってきている。また、分子状水素には酸化ストレスの原因となる活性酸素種を除去する能力があることが知られており、水素水の摂取は、全身の組織に分子状水素を供給させるのに効果的な方法の一つである。本研究の結果は、水素水の摂取が、炎症に伴う酸化ストレスを緩和し、結果として歯周炎を予防するのに効果的であることを示唆している。

#### 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）

〔雑誌論文〕（計19件）

①Ekuni D, Tomofuji T, Takeuchi N, Morita M: Gum chewing modulates heart rate variability under noise stress. *Acta Odontol Scand*, in press. (査読あり)

②Ekuni D, Furuta M, Tomofuji T, Irie K, Azuma T, Iwasaki Y, Morita M: Effects of eating behaviors on being overweight in Japanese university students: A cross-sectional survey at the Okayama University. *Asia Pac J Public Health*, in press. (査読あり)

③Maruyama T, Yamanaka R, Yokoi A, Ekuni D, Tomofuji T, Mizukawa N, Onoda T, Eguchi M, Morita M: Relationship between serum albumin concentration and periodontal condition in head and neck cancer patients. *J Periodontol*, in press. (査読あり)

④Ekuni D, Furuta M, Takeuchi N, Tomofuji T, Morita M: Objective and subjective assessment of eating quickly in young people. *Arch Oral Biol*, in press. (査読あり)

⑤Ekuni D, Tomofuji T, Endo Y, Kasuyama K, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Mizutani S, Kojima A, Morita M: Hydrogen-rich water prevents lipid deposition in the descending aorta in a rat periodontitis model. *Arch Oral Biol*, in press. (査読あり)

⑥Kasuyama K, Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Irie K, Endo Y, Morita M: Effects of topical application of inorganic polyphosphate on tissue remodeling in rat inflamed gingiva. J Periodont Res, 47, 159-164, 2012. (査読あり)

⑦ Irie K, Ekuni D, Tomofuji T, Endo Y, Kasuyama K, Yaegaki K, Morita M: Combined effects of hydrogen sulphide and lipopolysaccharide on osteoclast differentiation in rats. J Periodontol, 83, 522-527, 2012. (査読あり)

⑧Tomofuji T, Ekuni D, Azuma T, Irie K, Endo Y, Yamamoto T, Ishikado A, Sato T, Harada K, Suido H, Morita M: Supplementation of broccoli or Bifidobacterium longum-fermented broccoli suppresses serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone surface in rats fed a high-cholesterol diet. Nutr Res, 32, 301-307, 2012. (査読あり)

⑨Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, Irie K, Ekuni D, Azuma T, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M: Supplementation of green tea catechins in dentifrices improves gingival oxidative stress and periodontal inflammation. Arch Oral Biol, 56, 48-53, 2011. (査読あり)

⑩Irie 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. (査読あり)

⑪Furuta M, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tomofuji T, Ogura T, Morita M: Sex difference in gingivitis relates to interaction of oral health behaviors in young people. J Periodontol, 82, 558-565, 2011. (査読あり)

⑫Azuma T, Tomofuji T, Endo Y, Tamaki N, Ekuni D, Irie K, Kasuyama K, Kato T, Morita M: Effects of exercise training on gingival oxidative stress in obese rats. Arch Oral Biol, 56, 768-774, 2011. (査読あり)

⑬Ekuni D, Takeuchi N, Furuta M, Tomofuji T, Morita M: Relationships between malocclusion and heart rate variability indices in healthy young adults: A pilot study. Method Inform Med, 50, 358-363, 2011. (査読あり)

⑭Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, Morita M: Occlusal disharmony increases amyloid- $\beta$  in the rat hippocampus. Neuromol Med, 13, 197-203, 2011. (査読あり)

⑮Tamaki N, Takaki A, Tomofuji T, Endo Y, Kasuyama K, Ekuni D, Yasunaka T, Yamamoto K, Morita M: Stage of hepatocellular carcinoma is associated with periodontitis. J Clin Periodontol, 38, 1015-1020, 2011. (査読あり)

⑯Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Tamaki N, Maruyama T, Yamamoto T, Watanabe T, Morita M: Relationships between

periodontal inflammation, lipid peroxide and oxidative damage of multiple organs in rats. Biomed Res, 32, 343-349, 2011. (査読あり)

⑰Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Morita M: Non-surgical periodontal treatment decreases plasma level of oxidized low-density lipoprotein and oxidative stress. Clin Oral Invest, 15, 953-958, 2011. (査読あり)

⑱Kasuyama K, Tomofuji T, Ekuni D, Tamaki N, Azuma T, Endo Y, Morita M: Hydrogen-rich water attenuates experimental periodontitis in a rat model. J Clin Periodontol, 38, 1085-1090, 2011. (査読あり)

⑲Tomofuji T, Furuta M, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Ogura T, Morita M: Relationships between eating habits and periodontal condition in university students. J Periodontol, 82, 1642-1649, 2011. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

①友藤孝明, 粕山健太, 江國大輔, 入江浩一郎, 遠藤康正, 東 哲司, 玉木直文, 森田 学. 実験的歯周炎に対する水素水摂取の予防効果の検証. 第2回分子状水素医学シンポジウム, 東京, 2月11日, 2012年

②友藤孝明. 歯周病と全身の酸化ストレスとの関連性. 第64回日本酸化ストレス学会学術集会, 北海道, 7月2-3日, 2011年

③友藤孝明. 生涯自分の歯で食べ続けるために. 平成23年度井笠愛育委員連合会・栄養改善協議会合同研修会, 岡山, 10月6日, 2011年

④友藤孝明. 抗酸化物を用いた歯周組織の健康の保持・増進を目指して-LIONAWARD受賞講演. 第60回日本口腔衛生学会・総会, 千葉, 10月9日, 2011年

[その他]

ホームページ等

<http://seika.nii.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

友藤 孝明 (TOMOFUJI TAKAAKI)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号: 80335629

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者