

平成23年3月18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：21792148

研究課題名(和文) 歯周病による動脈硬化初期病変に対するビタミン類の抑制効果

研究課題名(英文) Effects of vitamin C on experimental atherosclerosis induced by periodontitis

研究代表者

江國 大輔 (EKUNI DAISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70346443

研究成果の概要(和文)：歯周病(歯茎が腫れる病気)による動脈硬化モデルラット、ビタミンC投与ラットおよび対照ラットとの間にアテローム性動脈硬化(血管のつまる病気)の病変に差があるかどうかを検討した。大動脈では、動脈硬化群において、動脈内膜に脂質の沈着がみられ、酸化ダメージを受けた場合に作られる物質が対照群に比べて増加していた。ビタミンC投与群では脂質の沈着が減少し、これらの物質が少なくなっていた。さらに動脈硬化群に比べてビタミンC投与群では、酸化ストレス関連の2遺伝子とアテローム性動脈硬化関連の8遺伝子が2倍以上変化していた。

研究成果の概要(英文)：In the periodontitis group, there was lipid deposition in the descending aorta and significant increases of oxidative damages compared to the control group. Vitamin C intake significantly decreased oxidative damages and changed oxidative stress-and atherosclerosis-related gene expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周病・動脈硬化・ビタミンC・酸化ストレス・ラットモデル

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化と歯周病との関連性を示唆する国内・国外の疫学研究は多く認められる。そのメカニズムの一つとして、歯周病菌およびそれらが作り出すリポポリサッカライドの作用（炎症性サイトカインの産生やマクロファージの泡沫化）が考えられている。しかし、因果関係の詳細はまだ不明な点が多い。

近年の研究では、動脈硬化が進行する場合に、酸化ストレス（生体内で生成する活性酸素群の酸化損傷力と生体内の抗酸化システムの抗酸化力との差）が上昇することが報告されている。また、申請者らの研究から酸化ストレスが歯周病由来のアテローム性動脈硬化の初期病変に関係していることが分かってきた。

一方、ビタミンCにより、動脈硬化の抑制効果が報告されているが、動脈硬化の予防には効果がないという報告もあり、一定の見解が得られていない。

以上のことから、ビタミンCが抗酸化物質として歯周病による動脈硬化の初期病変に対して抑制効果を発揮するのではないかとこの着想に至る。

## 2. 研究の目的

歯周病によるアテローム性動脈硬化初期病変モデルラットを用いて、ビタミンCによる歯周病由来の動脈硬化初期病変の抑制機序を、酸化ストレスの観点から解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

8週齢のWistar系雄性ラット18匹（1群あたり6匹）を対照群、動脈硬化群、3) ビタミンC

投与群の3群に分けた。対照群には通常飼育を行った。動脈硬化群には、下顎臼歯に絹糸

(3-0) を4週間巻き、歯周病およびアテローム性動脈硬化を惹起させ、その後蒸留水を2週間飲ませた。ビタミンC投与群には、動脈硬化群と同様に下顎臼歯に絹糸(3-0) を4週間巻き、歯周病および動脈硬化を惹起させ、ビタミンC1g/Lを2週間投与した。

実験期間終了後、全身麻酔下で屠殺し、歯周組織と大動脈の組織標本を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。歯周組織では組織形態学的に評価して、歯周炎の病態を把握した。大動脈サンプルでは、脂肪染色を行い、脂肪沈着の評価を行った。また、酸化ダメージを調べるために、

hexanoyl-lysine (HEL) (脂肪の酸化損傷マーカー)、nitrotyrosine (タンパク質の酸化損傷マーカー) および 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) (DNAの酸化損傷マーカー) を定量した。

大動脈の凍結標本からカラム式のRNA抽出キットを用いてRNAを抽出した。得られたRNAの質を調べたところ、260/280の比が1.8を超えていたので、次のステップに耐えうると判断した。このRNAを用いて、酸化ストレス関連のPCRアレイにより網羅的に遺伝子解析を行った。

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。ビタミンC、glutathione比およびHELの濃度を定量した。

## 4. 研究成果

歯周組織では、動脈硬化群で歯周炎が誘発されていることを確認した。対照群と比べて、

動脈硬化群で好中球を主体とした炎症性細胞浸潤が有意に増加していた。また、歯槽骨吸収（セメント・エナメル境から歯槽骨頂までの距離）が動脈硬化群で有意に増大していた。歯周組織におけるHELの発現も有意に増加していた。このことから、歯周組織に酸化ダメージが加わっていることを確認した。

一方、ビタミンC投与群では、歯周組織の炎症が軽減していた。動脈硬化群と比べて、ビタミンC投与群で好中球を主体とした炎症性細胞浸潤が有意に減少していた。歯周組織におけるHELの発現も有意に減少していた。しかし、歯槽骨吸収はビタミンC投与群で有意に減少しなかった。

大動脈では、動脈硬化群において、動脈内膜に脂質の沈着がみられ、HEL、8-OHdGおよびnitrotyrosineの値が対照群に比べて有意に高くなっていた。これらのことから、動脈に酸化ダメージが起こっていることが確認できた。

一方、ビタミンC投与群では動脈の脂質の沈着が減少し、HEL、8-OHdGおよびnitrotyrosineの値が動脈硬化群に比べて有意に低くなっていた。これらのことから、ビタミンC投与によって動脈の酸化ダメージが減少していることが確認できた。

酸化ストレス関連のPCRアレイにより網羅的に遺伝子解析から、動脈硬化群に比べてビタミンC投与群では、84遺伝子中22遺伝子が4倍以上増加しており、1遺伝子が4倍減少していた。変化した遺伝子群には、酸化ストレス関連としてnitric oxide synthases 2と3、アテローム性動脈硬化関連としてIntegrin beta 3・integrin alpha 5・integrin alpha V・procollagen type XVIII alpha 1・bcl2-like 1・annexin A5・transforming growth factor beta 1・platelet/endothelial cell adhesion moleculeが含まれていた。これらのことから、

遺伝子レベルにおいても、ビタミンCによる酸化ストレスの軽減およびアテローム硬化症への影響があったことが伺える。

以上より、歯周病によるアテローム性動脈硬化初期病変モデルラットを用いて、ビタミンCによる歯周病由来の動脈硬化初期病変の抑制機序を検討した結果、ビタミンCによる歯周病由来の動脈硬化初期病変の改善が認められ、そのメカニズムには酸化ストレスの抑制が関与していたことがわかった。

## 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2件）

① Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Kasuyama K, Umakoshi M, Azuma T, Tamaki N, Sanbe T, Endo Y, Yamamoto T, Nishida T, Morita M. Effects of periodontitis on aortic insulin resistance in an obese rat model. Lab Invest. 査読有、2010、90、348-359.

② Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeguchi S, Yamamoto T. Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. Arch Oral Biol. 査読有、2009、54、495-502.

〔学会発表〕（計1件）

① 江國 大輔、肥満モデルラットにおける動脈のインスリン抵抗性に対する歯周炎の影響、口腔衛生学会総会、2009年10月9-11日、岐阜

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.dent.okayama-u.ac.jp/yobou/in dex\\_sc\\_j.html](http://www.dent.okayama-u.ac.jp/yobou/in dex_sc_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江國 大輔 (EKUNI DAISUKE)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70346443