

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463243

研究課題名(和文) 口腔組織に対する水素水の抗加齢作用の検討

研究課題名(英文) Effects of hydrogen-rich water on aging periodontal tissues

研究代表者

東 哲司 (AZUMA, TETSUJI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：80432649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレスは老化に関与する。抗酸化物質である水素水は、老化による酸化ストレスの増加を抑制するかもしれない。我々は、老化ラットの歯周組織に対する水素水の効果を調べた。4ヵ月齢雄性ラットを水素水を与える実験群と蒸留水を与える対照群の2群に分けた。12ヵ月の実験期間終了後、実験群は対照群より歯周組織の酸化ストレスが低かった。

IL-1 蛋白の発現に違いはみられなかったが、インフラソーム関連遺伝子は、対照群よりも実験群の方が、むしろ発現した。水素水の摂取は、健康なラットにおいては炎症性反応はなく、老化による歯周組織の酸化ストレスの抑制に影響があるのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Oxidative stress is involved in age-related reactions. The anti-oxidative effects of hydrogen-rich water suppress oxidative stress, which may aid in inhibiting age-related reactions. We investigated the effects of drinking hydrogen-rich water on aging periodontal tissues in healthy rats. Four-month-old male rats were divided into two groups: the experimental group (hydrogen-rich water treatment) and the control group (distilled water treatment). The experimental group exhibited lower periodontal oxidative stress at 16 months of age than the control group. Although protein expression of interleukin-1b did not differ, gene expression of Nod-like receptor protein 3 inflammasomes was activated in periodontal tissues from the experimental group as compared with the control group. Drinking hydrogen-rich water is proposed to have anti-aging effects on periodontal oxidative stress, but not on inflammatory reactions in healthy rats.

研究分野：予防歯科学分野

キーワード：抗加齢 水素水 ラット

1. 研究開始当初の背景

生体の老化メカニズムは、いくつか提唱されているが、特に酸化ストレスにより細胞老化、ひいては生体の老化が引き起こされると考えられている。そのため、酸化ストレスを消去する抗酸化物質の抗加齢作用を検証した国内外の研究が、医科の領域では多くなされている。しかし、歯科の領域では、抗酸化物質の抗加齢作用を対象にした研究が少ない。

近年、水素水に体内で発生した酸化ストレスを消去する作用があることが発見され、抗酸化物質の一つとして着目されている。

しかし、水素水の摂取が、口腔の老化に伴う酸化ストレスの増大にどのように作用するのかはまだ分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ラットに抗酸化物質である水素水を摂取させ、老化による口腔組織の変化や酸化ストレスの増加にどのような影響を及ぼすのかを検討した。

3. 研究の方法

4ヶ月齢の雄性 Fischer 344 ラット 18 匹を 6 匹ずつ、ベースライン群、対照群、および実験群の 3 群に分けた。対照群と実験群には、蒸留水もしくは水素水（水素濃度： $>400 \mu\text{g/L}$ ）をそれぞれ与えた。ベースライン群は実験開始直後、そして他の 2 群は実験を開始してから 12 ヶ月後に全身麻酔下で屠殺し、採血と歯周組織の摘出を行った。また、対照群と実験群においては、実験開始後 3 ヶ月目と 6 ヶ月目に尾静脈からの採血も行った。

酸化ストレスの指標として、血清中の 8-hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG) 濃度を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法を用いて評価した。歯周組織中の 8-OHdG 濃度も、ミトコンドリア DNA を抽出してから ELISA 法で測定した。また、歯周組織の標本を作製し、炎症性サイトカイン [Interleukin (IL)-1 蛋白] と破骨細胞

[tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)陽性細胞]の発現を免疫染色下で計数した。さらに、歯周組織におけるインフラマソーム関連遺伝子 [Nod-like receptor protein (NLRP)3、caspase-1、apoptosis-associated speck-like protein (ASC)、Nuclear factor (NF)- κ B、IL-1]の発現を、逆転写 PCR 法を用いて評価した。統計分析には、一元配置分散分析と Tukey 法、もしくは t 検定を用いた。

4. 研究成果

ベースライン群、対照群、および実験群の体重(g)の平均値は、それぞれ 286、324、346 だった。実験期間中、対照群と実験群との間に、体重、食餌量、および飲水量の大きな違いはなかった。

歯周組織の 8-OHdG 濃度について、対照群の値はベースライン群よりも有意に大きな値を示した($p < 0.05$)。また、実験群の 8-OHdG 濃度は、対照群よりも小さかった($p < 0.05$)。一方、対照群の血清 8-OHdG 濃度は、加齢と共に増加していた。実験群の血清 8-OHdG 濃度では、加齢の影響は小さかった。実験開始後 3 ヶ月目と 6 ヶ月目において、対照群と実験群との間に血清 8-OHdG 濃度の有意差が認められた($p < 0.05$)。

セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離について、対照群の値は実験群よりも大きかった。TRAP 陽性細胞数も、対照群の方が実験群よりも多かった。また、IL-1 β 蛋白は、対照群と実験群双方ともに発現が小さく、群間で大きな違いはなかった。

歯周組織における NLRP、caspase-1、ASC、および IL-1 β の遺伝子発現は、対照群よりも実験群の方が大きかった($p < 0.05$)。一方、NF- κ B の遺伝子発現は、対照群よりも実験群の方が小さくなった($p < 0.05$)。

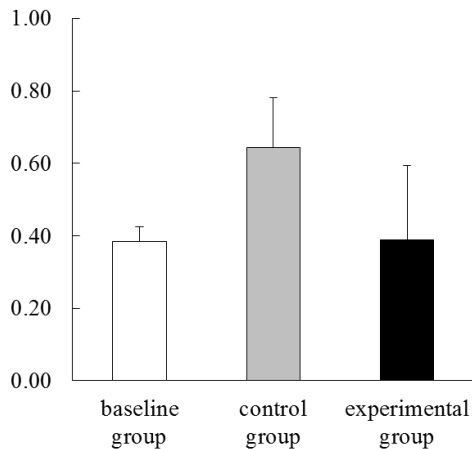


図1. 歯周組織 8-OHdG 濃度(ng/mg mtDNA)

baseline group:ベースライン群、control group: 対照群、experimental group: 実験群

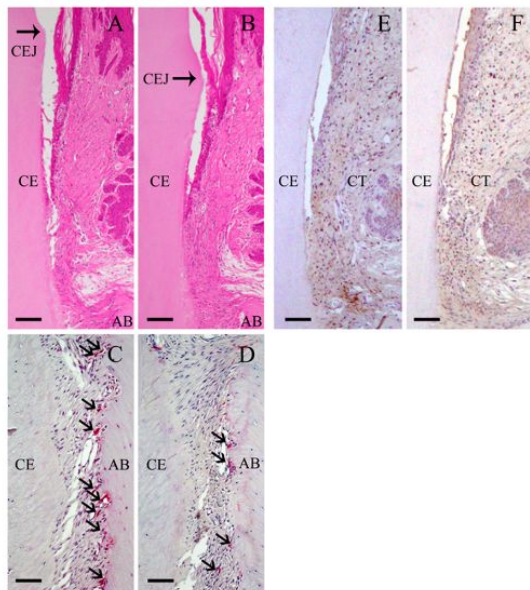


図2. ラット歯周組織の HE 染色像 (A、B)

TRAP 染色像 (C、D)、および IL-1 蛋白染色像 (E、F)

A、C、E は対照群、B、D、F は実験群。

Bar の長さは 100 μ m (A、B) もしくは 40 μ m (C-F)。

AB: 歯槽骨、CE: セメント質、CEJ: セメントエナメル境。

分子状水素には抗酸化作用があることが報告されている。対照群において、歯周組織と血清の酸化ストレスは、加齢により大きくなった。一方、実験群の酸化ストレスは対照群よりも小さくなった。これらの結果は、水

素水の抗酸化作用が加齢に伴う酸化ストレスを抑制したことを示唆している。

酸化ストレスは、破骨細胞の分化と関連する。本研究では、対照群の TRAP 陽性細胞数は実験群よりも多かった。また、セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離も対照群の方が実験群よりも大きくなった。水素水の摂取による酸化ストレスの抑制は、結果として加齢に伴う骨吸収に影響を与えるのかもしれない。

一方、歯周組織における IL-1 β 蛋白の発現は、対照群と実験群との間で大きな違いはなかった。また、インフラマソーム関連遺伝子は、NF- κ B を除いて、対照群よりも実験群の方が、発現がむしろ大きくなっていった。水素水の摂取により炎症性反応は抑えられておらず、過去の研究報告と矛盾する。この点については、さらなる検討が必要である。

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 1 件)

Tomofuji T, Kawabata Y, Kasuyama K, Endo Y, Yoneda T, Yamane M, Azuma T, Ekuni D, Morita M.

Effects of hydrogen-rich water on aging periodontal tissues in rats.

Scientific Reports. 4, 5534, 2014. (査読有)

DOI: 10.1038/srep05534

〔学会発表〕(計 1 件)

Tomofuji T, Kunitomo M, Irie K, Azuma T, Machida T, Yoneda T, Yamane M, Miyai H, Ekuni D, Morita M.

Effects of obesity on periodontal microRNAs Expression in rat. 94th Annual Meeting of the Internatinal Association for Dental Research (IADR), Seoul, 2016.6.22-25

6. 研究組織

(1)研究代表者

東 哲司 (AZUMA, Tetsuji)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：80432649

(2)研究分担者

森田 学 (MORITA, Manabu)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40157904

友藤 孝明 (TOMOFUJI, Takaaki)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：80335629

遠藤 康正 (ENDO Yasumasa)
岡山大学病院・医員
研究者番号：50580213