

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2006～2008

課題番号：18500637

研究課題名 (和文) 食事性ポリフェノールは歯周病を予防する

研究課題名 (英文) Prevention of periodontal disease by polyphenol in foods

研究代表者

廣田 幸子 (HIROTA SACHIKO)

九州女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：00312140

研究成果の概要：歯周病の原因と考えられる NO_2 、 N_2O_3 および NO SCN の生成は、口腔内が酸性になった場合に大きくなった。また、これらの化合物は口腔内に存在するアスコルビン酸、グルタチオンや食品に含まれているポリフェノール類によって消去された。以上のことから、歯周病予防には口腔内 pH の低下の抑制と抗酸化物質の摂取が重要であることが分かった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,600,000	0	2,600,000
2007年度	400,000	0	400,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	180,000	3,780,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：生活科学・食生活学

キーワード：健康と食生活

1. 研究開始当初の背景

(1) 小児の歯肉炎と食生活の関連性

口は食べ物が入る出発点であり、口腔が健康でなければ食事の摂取に困難をきたす。そのため口腔内の健康維持は、全身の健康に影響を及ぼす可能性がある。歯周病は、歯を支えている周囲組織の病気であり、口腔内の代表的な疾患である。また、歯周病は、生活習慣病のひとつであるとされており、その原因のひとつとして食生活の乱れが考えられる。2000年4月「健康日本21」の施策で「歯の健康」が明確に位置づけられ、80歳で20本の歯を維持する8020運動が展開さ

れている。歯周病は主に成人の疾患であると考えられていたが、子供でも歯周病のひとつである「歯肉炎」の罹患率が高くなってきている。歯肉炎がその進行によって歯槽骨の破壊が始まると治療によって元の健康な歯周組織に戻すことが困難となり、永久歯の萌芽に重大な影響を与える。このようなことから子供の歯肉炎を予防することは大変重要なことである。

(2) ヒト唾液での活性窒素の生成とポリフェノールの影響

野菜や加工食品に含まれる硝酸塩は通常、

経口的に摂取すると唾液成分として分泌される。この分泌された硝酸塩は口腔内細菌によって亜硝酸塩に還元され、さらに一酸化窒素（NO）に還元される。口腔内で生成されたNOは酸素分子と反応して有害な活性窒素（NO₂とN₂O₃）に変化する。また亜硝酸塩は唾液ペルオキシターゼによってNO₂に酸化される。我々は唾液細菌画分を用いての亜硝酸が活性窒素に変化することを確認した。細菌画分での活性窒素生成は、過酸化水素で促進し、チオシアン酸塩またはカタラーゼによって阻害されたことから、唾液ペルオキシターゼが亜硝酸依存の活性窒素生成に関与していることを明らかにしてきた。

また、機能性成分のひとつであるポリフェノールは、野菜や果物に普遍的に含まれている。このポリフェノールは抗酸化作用、抗炎症作用や抗菌作用を持っていることが一般的に知られている。我々はタマネギをスープとして摂取した場合、タマネギに含まれるケルセチン配糖体が口腔内で抗酸化能の高いケルセチンに加水分解され、口腔組織に結合すると同時に唾液ペルオキシターゼで酸化されることを明らかにしてきた。口腔内細菌によって生成する活性酸素が歯周病と関連する可能性は、1990年代から議論され続けており、最近では歯周病に伴う唾液中の抗酸化能の低下や口腔内細菌による活性酸素の生成促進が議論されている。

2. 研究の目的

(1) 小児の歯肉炎と食生活の関連性

1989年厚生労働省は、健康増進の1つとして80歳で20本の歯を保つことを目標として「8020運動」を提唱し、以来この運動は健康増進推進事業の一環として現在に至っている。平成17年度の歯科疾患実態調査での「8020」達成者は24.1%であり、80歳以上の1人平均現在歯数の推定値は9.8本と報告されている。成人における最大の歯の喪失原因は、生活習慣病としての歯周病である。

また、小児の代表的な歯科疾患である「う蝕」の罹患率は年々減少傾向にあるが、う蝕の予防には歯磨きなどの生活習慣と食事摂

取状況に関連があることが報告されている。近年、小児でも歯周病のひとつである「歯肉炎」の罹患率が高くなっている。平成17年度の歯科疾患実態調査の結果では、年齢階級10歳以上より約半数の者に歯肉の所見があり、高齢になるにつれて増加していることが報告された。そこで、歯周疾患と食生活の関連を見出すために①小児の食生活を歯肉炎罹患の有無により比較し、②小児と成人との間での唾液成分を検討した。

(2) ヒト唾液での活性窒素の生成とポリフェノールの影響

口腔内では口腔内細菌によって硝酸塩が亜硝酸塩を経て一酸化窒素（NO）へ還元される。口腔内でのNOと亜硝酸イオンは酸化によってNO₂やN₂O₃に変化する。そのNO₂は酸化剤であると同時にニトロ化剤であり、N₂O₃はニトロソ化剤であることが知られている。

口腔内では口腔内細菌によって酸が生成され弱酸性になることがある。口腔内のpHは通常、pH5.0～8.0の範囲内で変化するが、pH5.0付近では亜硝酸イオンの一部は亜硝酸（pKa=3.3）となり、亜硝酸は自己分解によりN₂O₃へ変化する。そこで、pH7.0とpH5.2に調整した唾液を用いて、唾液中での活性窒素の生成を測定した。さらに活性窒素の生成に対するチオシアン酸イオンの影響と、抗酸化物質の影響も調べた。

3. 研究の方法

(1) 小児の歯肉炎と食生活の関連性

北九州市内の某歯科医院に通院する小児（6—12歳：平均年齢8.8±1.5歳）47名を対象とした。食事生活調査は、保護者に記入を依頼し、土日を除く連続した3日間の食事内容を記録法と写真法により行った。食事摂取状況より栄養素摂取量と食品群別摂取量、食事形態を調べた。生活状況はアンケートにより身体状況、歯磨き状況、食事状況、間食状況を調べた。歯周炎所見は、歯周患者スクリーニング法の口腔評価指数ORI（Oral Rating Index）を用いた。ORI評価点の-2、-1を歯肉

炎有り群（以下、歯肉炎群、28名）とし、評価点0、+1、+2を歯肉炎無し群（以下、非歯肉炎群、25名）を対象者とした。唾液の採取は、OR I判定の際に行った。

小児と成人の唾液成分を比較するために、北九州市内の某歯科医院に通院する成人（21-84歳、男性47名、女性26名）73名の唾液を採取した。唾液中の分析は、亜硝酸塩、チオシアン酸塩、HPA（4-hydroxyphenylacetic acid）を行った。HPAはフェニルアラニンやチロシンの最終代謝産物であり亜硝酸によりNO₂HPA（4-hydroxy-3-nitrophenylacetic acid）にニトロ化される。唾液成分のニトロ化反応が進行すると、口腔内の組織細胞のたんぱく質のニトロ化反応も進行すると考えられる。

(2) ヒト唾液での活性窒素の生成とポリフェノールの影響

唾液はボランティアより朝9-10時の間でパラフィルムを噛む事によって混合唾液（10ml）を採取した。その唾液をナイロンメッシュ（380μm）に2回ろ過し、白血球やその他の細胞を取り除いた。そのろ過唾液は、20000×gで5分間、遠心分離し、沈殿物に50mMリン酸緩衝液（pH 5.2と7.0）に懸濁した。

活性窒素の生成は、DAF-FM（diaminofluorescein-FM）を用いた。DAF-FMはN₂O₃あるいは類似の化合物と反応して蛍光性のトリアゾール体のDAF-FMTに変化する。このDAF-FMTへの変換を活性窒素の検出に用いた。

4. 研究成果

(1) 小児の歯肉炎と食生活の関連性

小児の身体状況は、身長131.1±10.6cm、体重28.1±7.0kg、ならびにローレル指数は123.8±15.4であり、非歯肉炎群と歯肉炎群の両者での差はなく、肥満の子供は1名（8歳、女子、ローレル指数167.6）であった。食事調査による栄養素摂取状況の結果、エネルギー摂取量

は、非歯肉炎群では1733±311kcal、歯肉炎群では1878±361kcal、たんぱく質摂取量は、非歯肉炎群では62.9±13.3g、歯肉炎群では67.3±14.5g、脂質摂取量は、非歯肉炎群では55.8±15.6g、歯肉炎群では61.8±19.5g、炭水化物摂取量は、非歯肉炎群では236.7±57.7g、歯肉炎群では255.7±54.1gと非歯肉炎群より歯肉炎群の摂取量が高い傾向にあったが両群間での明らかな差は見られなかった。食品群別摂取状況の結果は、果物類では非歯肉炎群は53±49g、歯肉炎群は90±78g（p>0.1）と歯肉炎群で高く、きのこ類では非歯肉炎群7±9g、歯肉炎群3±7g（p>0.1）、卵類では非歯肉炎群61±46g、歯肉炎群41±27g（p>0.1）と非歯肉炎群で高かった。非歯肉炎群と歯肉炎群で栄養素摂取量と食品群別摂取量を比較したが、この度の結果から歯肉に関わる特異的な栄養素や食品群を見出すことは出来なかった。

食生活習慣アンケートの結果は、生活習慣状況では両群間で差は見られなかった。食習慣状況のなかの食事摂取頻度を点数化し比較した結果、「ジャムや蜂蜜」「乳酸菌飲料や果汁飲料、ジュース」「砂糖やみりんを使った料理」などの項目において非歯肉炎群より歯肉炎群の点数が高く、歯肉炎群の方が甘い物を好む傾向が見られた。また、間食の量や間食の時間に対する保護者の関与において歯肉炎群より非歯肉炎群の保護者の方が子供の間食に対する意識が高かった。このことは保護者の食意識が、小児の歯肉炎罹患に影響している可能性があった。

OR I判定を行った際に、採取した唾液成分を両群間で比較した結果、pH、亜硝酸塩、尿酸、グルコース濃度の差は認められなかった。HPA濃度は、非歯肉炎群では3.9±3.3μM、歯肉炎群では4.7±3.8μMであり、非歯肉炎群より歯肉炎群において高い傾向が見られた。また、チオシアン酸塩の濃度は、歯肉炎群は0.58±0.43mMと非歯肉炎群は0.39±0.24mMであった。両群間には有意差が認められた（p>0.05）。

また、小児の特徴を知るために歯周病の罹患率の高い成人の唾液成分と比較した結果、HPAの濃度は、小児は $4.1 \pm 3.3 \mu\text{M}$ であり成人は $14.8 \pm 20.1 \mu\text{M}$ であった。HPAは、亜硝酸依存の唾液ペルオキシターゼ/過酸化水素でニトロ化されることが知られている。唾液中の亜硝酸塩濃度は、小児では $0.13 \pm 0.09 \text{mM}$ 、成人では $0.26 \pm 0.21 \text{mM}$ であった。口腔内細菌は亜硝酸塩をNOに還元でき、NOは酸素と反応して NO_2 や N_2O_3 に変化する。これらの活性窒素は口腔内組織のニトロ化がニトロソ化に関与できることが予想される。唾液ペルオキシターゼの基質となり唾液ペルオキシターゼ/亜硝酸系でのHPAのニトロ化を抑制できるチオシアン酸塩の唾液中の濃度は、小児で $0.48 \pm 0.34 \text{mM}$ そして成人では $0.57 \pm 0.40 \text{mM}$ であった。

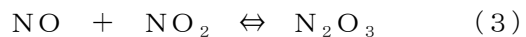
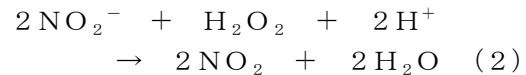
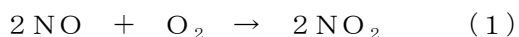
(2) ヒト唾液での活性窒素の生成とポリフェノールの影響

① pHの影響

活性窒素生成に対するpHの影響を調べるためにDAF-FMの減少速度を観察した。pH7.0とpH5.2に調整した緩衝液と唾液バクテリア画分との比較を行った。pH7.0の緩衝液中ではDAF-FMの減少は見られなかったが、唾液バクテリア画分の減少速度は $2.6 \pm 0.5 \text{nM}/\text{min}$ であった。これにチオシアン酸塩を加えるとDAF-FMの濃度は $0.60 \pm 0.04 \text{nM}/\text{min}$ と減少速度は抑制された。このチオシアン酸の抑制は、唾液ペルオキシターゼによる活性窒素生成が阻害されたためだと予想される。pH5.2緩衝液中では $8.0 \pm 0.9 \text{nM}/\text{min}$ であるのに対し、唾液バクテリア画分では $31.6 \pm 9.4 \text{nM}/\text{min}$ であった。チオシアン酸はその減少速度を、緩衝液中でも唾液バクテリア画分でも促進した。

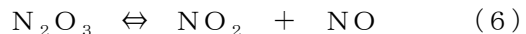
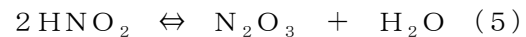
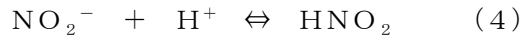
唾液pH7では次に示す反応によって活性窒素が生成される。

唾液pH7



唾液pH5付近ではpH7.0の反応に加えて次に示す反応によって活性窒素が生成される。

唾液pH5付近



また、チオシアン酸イオンは亜硝酸と反応してNOSCNができることが考えられる。チオシアン酸塩によるpH5.2での促進は、NOSCN生成のためである事が予想された。そこでNO⁺供与体である N_2O_3 やNOSCNを消去できるアジドによる影響を調べた結果、アジドはpH7.0ではDAF-FMT形成に対して影響を与えなかったが、pH5.2では抑制した。この結果からDAF-FMT形成に N_2O_3 が関与していることが示唆された。以上の結果からpH5.2ではDAF-FMT形成には N_2O_3 やNOSCNが関与していると推定した。

②抗酸化物質の影響

亜硝酸依存によるDAF-FMT形成に対する抗酸化物質の影響を調べた。唾液に含まれる抗酸化物質であるアスコルビン酸、グルタチオン、尿酸の影響は、両者のpHでDAF-FMTの形成を抑制したが、尿酸(100 μM)の抑制度は、pH7.0では57%、pH5.2では0%と酸性領域での N_2O_3 やNOSCNを消去しにくい事が分かった。このことは、アスコルビン酸とグルタチオンは酸性領域で生成される N_2O_3 やNOSCNを消去できることが分かった。

また、食品に含まれるフェノール性物質(10 μM)の影響は、pH5.2よりもpH7.0の方でDAF-FMT形成を大きく抑制した。その効果は、没食子酸>ケルセチン>カフェ酸>カテキン=クロロゲン酸>フェルラ酸の順であった。

これらの結果から、口腔内のpHが低下すると N_2O_3 やNOSCNそのものや、これら

由来の活性窒素による障害を受けやすくなることが予想できる。そして、唾液弱酸性領域では、唾液中に含まれる抗酸化物質による活性窒素生成の抑制効果があり、中性領域では食品由来のフェノール性物質の効果があることが示唆された。

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8件)

- ① Takahama Umeo, Hirota Sachiko, Oniki Takayuki. Quercetin-dependent scavenging of reactive nitrogen species derived from nitric oxide and nitrite in the human oral cavity: Interaction of quercetin with salivary redox components. Archives of Oral Biology, 51, 629-639, 2006, 査読有り
- ② Takahama Umeo, Hirota Sachiko, Oniki Takayuki. Thiocyanate cannot inhibit the formation of reactive nitrogen species in the human oral cavity in the presence of high concentration of nitrite: Detection of reactive nitrogen species with 4,5-Diaminofluorescein. Chemical Research in Toxicology, 19, 1066-1073, 2006, 査読有り
- ③ Takahama Umeo, Tanaka Mariko, Oniki Takayuki, Hirota Sachiko. Reaction of thiocyanate in the mixture of nitrite and hydrogen peroxide under acidic condition: Investigation of the reactions simulating the mixture of saliva and gastric juice. Free Radical Research, 41, 627-637, 2007, 査読有り
- ④ Takahama Umeo, Ryu Kanako, Oniki Takayuki, Hirota Sachiko. Dual-function of thiocyanate on nitrite-induced formation of reactive nitrogen oxide species in human oral cavity: Inhibition under neutral and enhancement under acidic conditions. Free Radical Research, 41, 1289-1300, 2007, 査読有り
- ⑤ Takahama Umeo, Ryu Kanako, Hirota Sachiko. Chlorogenic acid in coffee can prevent the formation of dinitrogen trioxide by scavenging nitrogen dioxide generated in the human oral cavity. Agricultural and food chemistry, 55, 9251-9258, 2007, 査読有り
- ⑥ Takahama Umeo, Hirota Sachiko. Reduction of nitrous acid to nitric oxide by coffee melanoidins and

enhancement of the reduction by thiocyanate: Possibility of its occurrence in the stomach. Agricultural and food chemistry, 56, 4736-4744, 2008, 査読有り

- ⑦ Takahama Umeo, Tanaka Mariko, Hirota Sachiko. Interaction between ascorbic acid and chlorogenic acid during the formation of nitric oxide in acidified saliva. Agricultural and food chemistry, 56, 10406-10413, 2008, 査読有り
- ⑧ Takahama Umeo, Hirota Sachiko, Kawagishi Shigenori. Effects of pH on nitrite-induced formation of reactive nitrogen oxide species and their scavenging by phenolic antioxidants in human. Free Radical Research, 43, 250-261, 2009. 査読有り

[学会発表] (計5件)

- ① 高濱有明夫、ヒト口腔内での亜硝酸依存の活性窒素生成に対するチオシアン酸の影響、第61回日本栄養・食糧学会、平成19年5月19日、国立京都国際会議場
- ② 高濱有明夫、ヒト口腔内での活性窒素生成機構に対する水素イオン濃度の影響、第54回日本食品科学工学会、平成19年9月8日、中村学園大学
- ③ 廣田幸子、ヒト口腔内の弱酸性化に伴う亜硝酸依存の活性窒素生成とそれに対するコーヒーの影響、第54回日本食品科学工学会、平成19年9月8日、中村学園大学
- ④ 廣田幸子、ヒト唾液での活性窒素生成に対するpHおよび抗酸化物質の影響、第62回日本栄養・食糧学会、平成20年5月4日、女子栄養大学
- ⑤ Takahama Umeo, Effects of pH nitrite-induced transformation of a diaminofluorescein to its triazole form in bacterial fraction of human saliva. Fifth International Conference Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide. 24-28 August, 2008. Bregenz, Austria.

[図書] (計1件)

- ① Takahama Umeo, Hirota sachiko, Oniki Takayuki, ELSEVIER, Methods in Enzymology, Volum 440 Nitric Oxide, Part F, 2008, 15.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 幸子 (HIROTA SACHIKO)
九州女子大学・家政学部・准教授
研究者番号：00312140

(2) 連携研究者

高濱 有明夫 (TAKAHAMA UMEO)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：30106273

(3) 研究協力者

空田 安博 (SORATA YASUHIRO)
そらだ小児歯科医院・歯科医師
今村 均 (IMAMURA HITOSHI)
今村歯科医院・歯科医師