

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09877

研究課題名(和文)酸化ストレス可視化マウスにおける二次・三次喫煙による歯周病と全身への影響

研究課題名(英文) Effects of secondary and third-hand smoke on periodontal disease and the whole body in Keap 1-dependent oxidative stress detector-luciferase mice

研究代表者

福原 大樹 (Fukuhara, Daiki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10779721

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は生活習慣病の一つであり、その予防はQOLを確保するうえで重要視されている。喫煙は歯周病の代表的リスク因子であり、肺がんなどの全身疾患に対するリスク因子であることが知られている。しかし、二次・三次喫煙による全身へ影響についてはデータが不足している。本研究では、酸化ストレス可視化マウスを用いて歯周病とともに二次・三次喫煙による酸化ストレスの動態をリアルタイムに可視化し、全身への影響を探索することを目的とした。同マウスを二次喫煙群、歯周病(P)+二次喫煙群、三次喫煙群、P+三次喫煙群、コントロール群の5群に分けた。可視化酸化ストレス発光量と血清中酸化ストレスはともに受動喫煙群で大きかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果において、「酸化ストレス」の観点から二次・三次喫煙が全身にどのような増悪作用をもたらすのかを明らかにした。すなわち、二次喫煙だけでなく、三次喫煙が歯周病とともに、全身の酸化ストレスを引き起こした。本研究結果は、望まれない受動喫煙を避けることに新たな事実を追加するとともに、三次喫煙と歯周病が、全身に悪影響を及ぼす機序の一端を解明した。これらは、たばこに対する認識やたばこフリーを意識した環境づくりに寄与する可能性があり、社会的な意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Periodontal disease is one of the lifestyle-related diseases and its prevention is important for QOL. The prevention requires the control of risk factors. Although smoking is a typical risk factor for periodontal disease, but there are insufficient data on the effects of secondary and third-hand smoke on periodontal disease. The purpose of this study was to investigate the dynamics of oxidative stress caused by second-hand smoke using oxidative stress visualization mice and to explore the relationship between periodontal disease and systemic condition. The mice were divided into 5 groups; secondary smoke group, periodontal disease (P) + secondary smoke group, third-hand smoke group, P + third-hand smoke group, and control group. Visualized oxidative stress luminescence and serum oxidative stress were higher in the smoke groups.

研究分野：口腔衛生

キーワード：酸化ストレス 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病は日本国民の多くが罹患する生活習慣病であり、その予防は QOL を確保するうえで重要視されている。また、歯周病は歯を失う主な原因になるだけでなく、全身に悪影響を及ぼすため、歯周病の予防・治療がより重要な意義を持つ。また、喫煙は歯周病の代表的リスク因子である。日本はたばこの規制に関する世界保健機関枠組条約の締約国であり、たばこ対策の強力な推進が求められている。2016 年 8 月に公開された喫煙の健康影響に関する検討会報告書(厚生労働省)によれば、喫煙者本人への影響に関するエビデンスレベルは十分である。しかしながら、二次喫煙・三次喫煙)による影響についてはデータが不足している。

(2) 生体内における活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)・フリーラジカルと抗酸化システムとのバランスが崩れ、酸化に傾くことを「酸化ストレス」という。酸化ストレスは糖尿病、動脈硬化、高血圧症などの生活習慣病だけではなく、脳梗塞、認知症に代表される神経変性疾患メカニズムの原因として知られている。同様に生活習慣病の歯周病の発症メカニズムや喫煙にも酸化ストレス関与しているといわれている。ROS は、生体に対する影響のなかで細胞の細胞膜における脂質を酸化する作用があり、これにより細胞を障害する。過去の研究で、歯周病患者および喫煙者において、過酸化脂質のマーカである malondialdehyde (MDA) が増加したと報告され、歯周病と喫煙の両方とも、全身への影響として酸化ストレスに陥っていることが示唆されている。

(3) 以上のように、歯周病と喫煙とがともに「酸化ストレス」に関連することが分かっている。しかし、二次・三次喫煙が歯周病とともに、「酸化ストレス」の観点から全身にどのような増悪作用をもたらすのかいまだわかっていない。二次喫煙と三次喫煙が全身へ与える影響差を明確にすることにより、たばこに対する認識やたばこフリーを意識した環境づくりに貢献できると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では、酸化ストレス可視化マウスを用いて歯周病とともに、二次・三次喫煙による酸化ストレスの動態をリアルタイムに可視化して、全身への影響を探索することを目的とした。

## 3. 研究の方法

酸化ストレス可視化マウス(Tg 型 OKD-Luc マウス、トランスジェニック社)を用いた。ルシフェリン(15mg/mL, 0.01mL/g)を腹腔内に注射した。その後、生体内での酸化ストレスの分布と経時的変化を分子イメージングシステム(Lumazone、日本ローパー)を使用して調べた。

まず、二次喫煙と三次喫煙の曝露方法の確立を目標として実験を行った。たばこ煙吸入実験装置を作製し、たばこ煙の曝露時間および量、そして曝露期間を検討した。その結果、二次喫煙および三次喫煙をたばこ 3 本/時間で 2 時間曝露させることとした。

また、先行研究により、リガチャー結紮による実験的歯周炎誘発されたマウスにおいて、酸化ストレス発光量が増加したことを確認した。それに従い、各歯周病群において、酸化ストレス可視化マウスの下顎第一臼歯にリガチャー結紮を行い、実験的歯周炎を誘発した。

最終年度に、酸化ストレス可視化マウスをコントロール群、二次喫煙群、歯周病+二次喫煙群、三次喫煙群、歯周病+三次喫煙群の 5 群に分けた。各群において、ベースライン時と 2 週間後に酸化ストレス発光測定を行った後、と殺し血液を採取した。

### (1) 動物

酸化ストレス可視化マウス：8 週齢、♂、20 匹

以下の 5 グループに分けた。

i) コントロール群 (C 群) (n=4)

ii) 二次喫煙群 (二次群) (n=4)

iii) 歯周病 + 二次喫煙群 (P + 二次群) (n=4)

iv) 三次喫煙群 (三次群) (n=4)

v) 歯周病 + 三次喫煙群 (P+三次群) (n=4)

#### (2) 酸化ストレス発光測定

各群において、ベースライン時と 2 週間後とで肺における酸化ストレス発光を測定し、増加量を算出した。その後、5 群間で比較した。

#### (3) 血清中酸化ストレス評価

各群において、と殺後に全血採取し血清を抽出した。その後、血清における酸化ストレスを評価するため、d-ROMs テスト、OXY 吸着テストを行った。また、d-ROMs テストと OXY 吸着テスト結果から、酸化ストレスインデックスを算出し、5 群間で比較した。

### 4. 研究成果

#### (1) 酸化ストレス発光について

肺の酸化ストレス発光の増加量 ( $\Delta$  発光量) は C 群 (0) 群と比較して、P + 二次群 (943.1 $\pm$ 182.0)、P + 三次群 (655.3 $\pm$ 96.7)、三次群 (578.0 $\pm$ 163.5)、二次群 (57.5 $\pm$ 1023.5) の順に大きい傾向にあったが、有意な差は認められなかった。

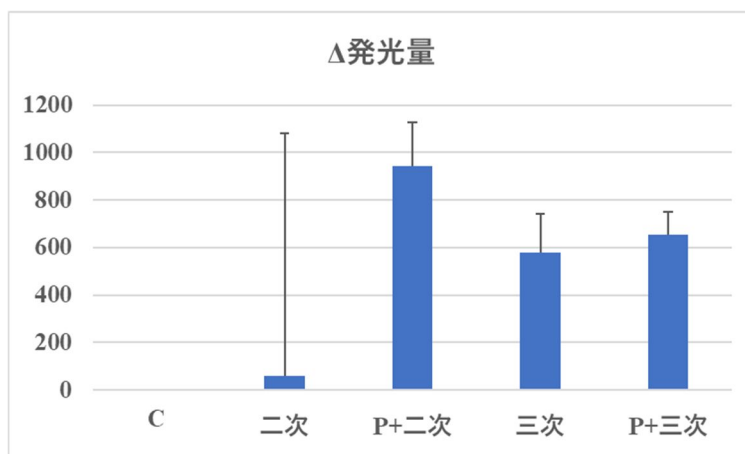


図 1. 各群における肺での酸化ストレス発光の増加量。C 群の  $\Delta$  発光量は  $\Delta 0$ 。

#### (2) 血清中酸化ストレス評価について

血清中における d-ROMs テスト (U.CARR) と OXY 吸着テスト ( $\mu\text{mol/ml}$ ) において、ともに有意な差を認めなかった。d-ROMs テストにおいて、C 群 (73.0 $\pm$ 3.1) と比較し、P+三次群 (98.2 $\pm$ 10.0)、三次群 (85.8 $\pm$ 6.4)、二次群 (85.2 $\pm$ 7.6)、P + 二次群 (84.0 $\pm$ 5.1) の順に高い傾向にあった。

一方、OXY 吸着テストにおいて、C 群 (356.9 $\pm$ 23.8) と比較し、P + 二次群 (415.5 $\pm$ 36.9)、P+三次群 (407.0 $\pm$ 27.9)、二次群 (393.2 $\pm$ 43.6)、三次群 (367.6 $\pm$ 19.9) の順に高い傾向にあった。

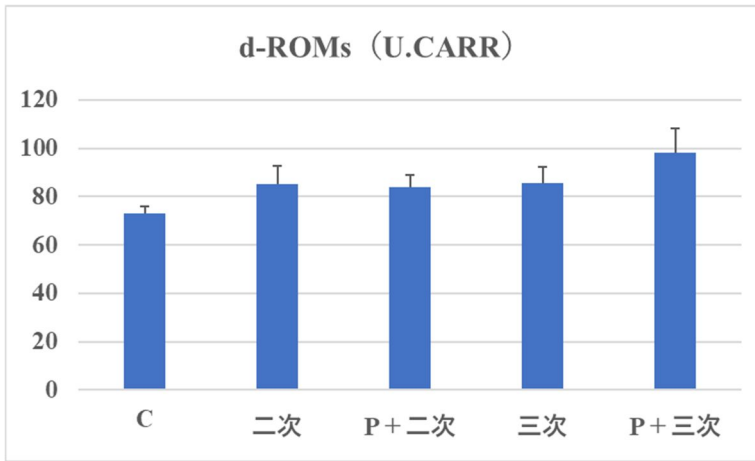


図 2 . 各群における d-ROMs テスト

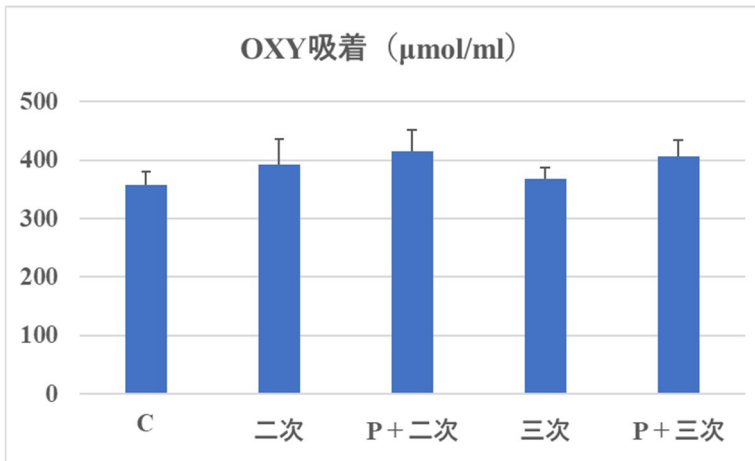


図 3 . 各群における OXY 吸着テスト

また、d-ROMs テストと OXY 吸着テスト結果から、酸化ストレスインデックスを算出したところ、有意な差は認められなかったが、C 群と比較し、三次群および P+三次群において高い傾向にあった。

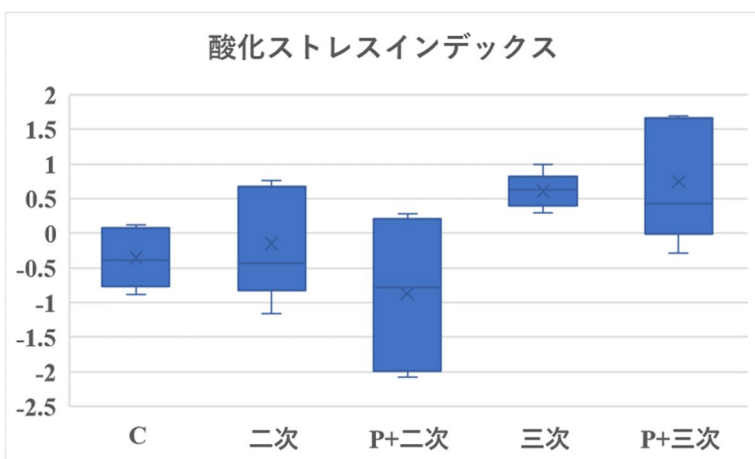


図 4 . 各群における酸化ストレスインデックス

### (3) 酸化ストレス発光と血清中酸化ストレスとの比較について

本研究において、酸化ストレス可視化マウスを用いた肺における酸化ストレス発光測定結果は、血清中における酸化ストレスインデックスと同様にコントロール群と比較して各受動喫煙群で上昇傾向を示した。侵襲を伴う血液解析だけでなく、非侵襲性の分子イメージ

ングによっても、二次・三次喫煙による生体内での酸化ストレス状態が観察されたことがわかった。

肺における酸化ストレス発光の増加量において、三次喫煙群よりも二次喫煙群が増加傾向にあったが、血清中の酸化ストレスインデックスは二次喫煙群よりも三次喫煙群が高い傾向にあった。これは、二次・三次喫煙の肺への局所的影響と全身への影響との差を反映している可能性がある。2週間の受動喫煙曝露においては、二次喫煙と比較して三次喫煙のほうが全身の酸化ストレス状態をさらに増悪させる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	森田 学  (Morita Manabu)  (40157904)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授   (15301)	
研究分担者	江國 大輔  (Ekuni Daisuke)  (70346443)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授   (15301)	
研究分担者	片岡 広太  (Kataoka Kota)  (80744185)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教   (15301)	
研究分担者	内田 瑶子  (Utida Yoko)  (60779742)	岡山大学・大学病院・医員   (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関