

平成 22 年 6 月 3 日現在

研究種目：若手研究 B
研究期間：平成 20 年度～平成 21 年度
課題番号：20791626
研究課題名（和文）閉経後女性における歯肉溝滲出液中のサイトカインプロファイル
研究課題名（英文） Profiling the cytokines in gingival crevicular fluid of postmenopausal woman.
研究代表者 山本 弦太 (YAMAMOTO GENTA) 愛知学院大学・歯学部・講師 研究者番号：30421241

研究成果の概要（和文）：女性ホルモン（エストロゲン）の欠乏が全身性の骨代謝疾患である閉経後骨粗鬆症に影響するだけでなく、歯周病局所である歯肉溝滲出液中の IL-1 や TNF- $\alpha$  などの様々な炎症性サイトカイン産生に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Increased IL-1 and TNF- $\alpha$  levels in post-menopausal woman group suggests that reduced estrogen at menopause does correlate with increased inflammation cytokines in GCF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周病，骨粗鬆症，閉経後女性，エストロゲン

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌感染による慢性炎症性疾患であり、歯周組織の破壊および病的な歯槽骨吸収を引き起こされる。歯周炎の進行は炎症性サイトカインが歯周組織において過剰に分泌されて歯槽骨吸収を亢進すると推測されており、歯周病の進行や活性度を表す際の一つの指標ともいえる歯肉溝滲出液（gingival crevicular fluid：GCF）は、以前からその量的および質的变化が歯周病変の動態を示す客観性の高い臨床的データとして

用いられている。GCF は、酵素、タンパク質、抗体、組織破壊産物や様々な炎症性メディエーターを含む血清成分が歯肉溝に滲出したものであり、個々の部位から簡単に採取できるため、歯周病の疾患活性度を診査するのに有用なサンプルである。GCF はその量的および質的变化が歯周病変の動態を示す一つの指標とされ、GCF 中に含まれる種々の液性因子と歯周炎の程度との関係について多くの研究がなされており、歯周病患者の GCF において IL-1、IL-2、IL-6、

IL-8、TNF- $\alpha$  など様々なサイトカインが高いレベルであると報告されている。

閉経後骨粗鬆症は、骨量の減少を特徴とする全身性の骨代謝性疾患であり、閉経による女性ホルモンの低下が発症に関与する。骨代謝に関与する骨芽細胞や破骨細胞はサイトカインにより autocrine、paracrine 機序のもと調節され、それぞれが重要な働きをしている。骨芽細胞や破骨細胞にはエストロゲンレセプターが証明されており、骨への直接作用によりエストロゲンは強力な骨吸収抑制作用を示す。閉経後はエストロゲンの低下により、末梢単球の IL-1 産生が亢進する。IL-1 は単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進し、骨吸収に働く。IL-6 は IL-1 や TNF の刺激で骨芽細胞や骨髄間質細胞から多量に産生されるが、エストロゲンにより産生は抑制されている。IL-6 産生亢進も、骨吸収亢進に大きく関与する。さらにエストロゲンは骨芽細胞からの TGF- $\beta$  産生を促進し、破骨細胞のアポトーシスを促進することで、骨吸収を抑制している。また骨形成作用として、骨芽細胞からの TGF- $\beta$  や IGF-1 の分泌を促進し骨形成に関与している。このようにエストロゲンは、骨吸収性サイトカイン産生の抑制と骨形成促進作用によって、骨代謝に強く関与している。閉経後骨粗鬆症はエストロゲン欠乏に伴い、カルシウム調節系と骨局所の両方が原因で、急激な骨吸収が引き起こり、骨代謝動態は高回転型を呈する。骨代謝上は骨吸収も骨形成も亢進するが、骨吸収が骨形成を上回り、骨量は減少することが知られている。

局所の歯槽骨吸収を伴う歯周炎と全身の骨代謝性疾患による骨量減少を特徴とする骨粗鬆症との関係を解明するため多くの研究が報告されているが、閉経によるエストロゲン低下と GCF 中サイトカインの動態との関係についての報告は、数少ない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は閉経後骨粗鬆症に起因する全身の骨量減少と歯周病に起因する局所の歯槽骨吸収の関連性を把握する一助として、サイトカインアレイを用いて GCF 中の炎症性サイトカインの動態に着目し、検討することにある。

## 3. 研究の方法

歯周基本治療により辺縁歯肉の炎症がコントロールされ、本研究の主旨に同意の得ら

れた者で、骨密度 (bone mineral density, BMD) に影響を及ぼす疾患をもたない閉経後女性 12 名と閉経前女性 12 名を研究対象とした。

### ① 血液サンプルの採取

被験者の前腕肘正中皮静脈より術後感染等起こさぬよう細心の注意を払い、約 10ml を採取し一般血液検査、血中エストロゲン濃度および骨代謝マーカー測定を行った。

### ② 口腔内診査および GCF の採取

上顎前歯 6 歯、各群 120 歯を被験歯とし各被験歯の唇側 3 部位の gingival index (GI)、probing depth (PD)、clinical attachment level (CAL)、bleeding on probing (BOP) を評価した。また被験部位を簡易防湿し完全に唾液の混入を防いだ後、綿球にて歯肉縁上プラークを可及的に除去し、エアースリッジにてエアで歯肉溝内を一旦乾燥させた後、ペリオペーパーを歯肉溝の歯肉縁下約 1 mm まで挿入し 10 秒間静置し吸湿採取した。ペリオペーパーに、0.5% 牛血清アルブミン入りの生理食塩水 100  $\mu$ l を加え、10 分間連続的に震盪しペリオペーパーに含まれる GCF を十分に PBS に溶出させてから可及的に GCF を含む PBS を回収し、10 分間 3,500rpm にて遠心処理をした後その上清のみを GCF サンプルとした。

### ③ GCF 中の炎症性サイトカインの動態

GCF サンプル中の炎症性サイトカインの解析には、cytokine antibody array を用いた。また、IL-1 においては ELISA 法を用いての定量を行った。

統計解析には、統計用ソフト SPSS (SPSS 11.0J for windows) を用いた。

## 4. 研究成果

被験者は愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、歯周基本治療により急性炎症がコントロールされ、骨密度に影響を及ぼす疾患を持たないもので、閉経後女性 12 名と閉経前女性 12 名とした。(表 1)

表 1 患者背景

	閉経前女性群 (n = 12)	閉経後女性群 (n = 12)
年齢 (歳)	44.2 $\pm$ 2.2	57.8 $\pm$ 1.3
閉経年齢 (歳)	-	50.7 $\pm$ 1.3
閉経後年数 (年)	-	7.1 $\pm$ 1.0

平均  $\pm$  標準偏差

血液検査より閉経後女性では血中のエストロゲン量は検出限界以下であった。(表 2

閉経に伴う女性ホルモンの欠乏が確認された。

表2 閉経後女性群における血液検査結果

FSH (mIU/ml)	53.3±23.8
E2 (pg/ml)	検出限界以下
血清NTx	14.0±3.4
骨型ALP (U/l)	21.1±8.3

平均 ± 標準偏差

一方、骨代謝マーカーであるN端テロペプチド（血清NTx）や骨型アルカリフォスファターゼ（骨型ALP）については正常範囲内であった。全身状態においては閉経後女性では閉経前女性と比較してエストロゲン量は有意に減少していたが、骨代謝マーカーであるN端テロペプチドや骨型アルカリフォスファターゼには有意な差が認められなかった。また、骨粗鬆症治療薬であるビスフォスフォネート製剤の全身的な骨代謝マーカーへの影響についても検討を行ったが有意な差は認められなかった。

歯周病の局所所見としては、初診時のPD、CAL、BOP率および歯周基本治療後のPD、CAL、BOP率は、閉経後女性群、閉経前女性群ほぼ同一であった。両群ともに歯周基本治療後PDは、初診時と比較し減少し、辺縁歯肉の炎症がコントロールされていることがわかる。（表3）また、GI 1以上、動揺度 1以上の比率においても、両群間に有意な差は認められなかった。

表3 歯周病所見

	閉経前女性群 (n = 12)		閉経後女性群 (n = 12)	
	初診時	歯周基本治療後 (GCF採取時)	初診時	歯周基本治療後 (GCF採取時)
プロービングポケット深さ (PD)(mm)	2.3 ± 0.1	2.1 ± 0.1	2.5 ± 0.1	2.1 ± 0.1
クリニカルアタッチメントレベル (CAL)(mm)	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1
プロービング時の歯肉出血率 (BOP) (%)	14.8 ± 5.0	10.7 ± 3.4	20.4 ± 6.3	15.7 ± 5.0
歯肉炎症指数 (GI) 1以上の比率 (%)		19.9 ± 4.0		17.1 ± 5.1
歯の動揺度 1以上の比率 (%)		0		0

一方、歯肉溝滲出液中のサイトカインについて検討を行った。

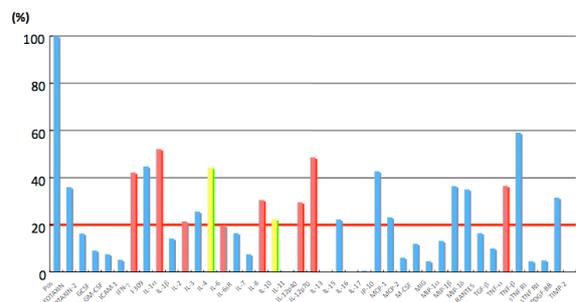
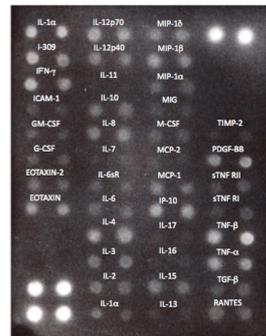
解析方法は

(Sample - Negative control) / (Positive control - Negative control) \* 100という式のようにサンプルの発現およびポジティブコントロールの発現からバックグラウンドとしてネガティブコントロールを引き、ポジティブコントロールに対する比率にて評価し、発現が20%を超えるサイトカインを有意な発現とした。

発現の高かったサイトカインをグラフにて赤色で炎症性、黄色で抗炎症性サイトカインに分けて示した。炎症性サイトカインで

あるIL-1α、TNF-αなどの産生が閉経後女性で高い結果であった。（図1）炎症性サイトカインに比べ、抗炎症性サイトカインの産生は低い結果であった。

図1 GCF中のサイトカインプロファイル  
歯周局所においてIL-1α、TNF-αなどの各種炎症性サイトカインの産生が認められた。



そこで、cytokine antibody arrayにおいて発現の高かった炎症性サイトカインとしてIL-1αおよびIL-1βの定量をELISA法を用いて行った。（図2）

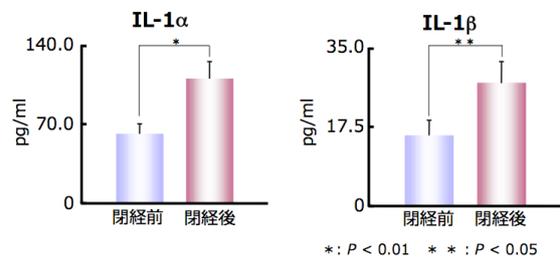


図2 GCF中のIL-1産生量  
閉経後女性においてIL-1α,βともに産生亢進が認められた

閉経前女性に比べて閉経後女性においてIL-1αおよびIL-1βの産生亢進が歯周局所でも認められた。

本研究の結果より、閉経後女性において女性ホルモンの欠乏が歯周局所のIL-1やTNF-αなどの様々な炎症性サイトカイン産生に影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、サイトカインプロファイルの検討としては特徴的な傾向は認められなかった。また、閉経後女性においては骨粗鬆症の治療介入の有無および治療方法（投薬されている薬剤の種類など）など条件に差があるため、今後さらに症例を増やし検討す

る必要性があると思われる。

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)

坂野雅洋, 稲垣幸司, 山本弦太, 野田貴弘,  
野口俊英, 森田一三, 中垣晴男, 井澤浩之,  
蜂谷裕道, 細井延行, 三木隆己: 閉経後女性  
の歯周病と骨粗鬆症所見の関係および骨  
密度評価継続者の歯周病所見の変化.

Osteoporosis Jpn, 17(3):563-569, 2009

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

( )

研究者番号:

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: