

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593155

研究課題名(和文) ESR法による活性酸素種測定と歯周病との相互関係の解明および抗酸化物の効果

研究課題名(英文) Relationship between periodontitis and salivary antioxidant activity by ESR

研究代表者

玉木 直文(TAMAKI, Naofumi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20335615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：電子スピン共鳴(ESR)法によって、唾液中の特異的な酸化ストレス(スーパーオキシドとヒドロキシルラジカル)の消去能を直接測定する方法を確立した。また、市民健診参加者における血清中の酸化ストレス度と歯周病関連性細菌に対する血清抗体価を測定し、その相関関係を検討した。その結果、血清酸化ストレス度とPorphyromonas gingivalis, Prevotella intermediaとEikenella corrodensとの間に正の相関関係が認められた。

研究成果の概要(英文)：The aim of present study was to measure the direct salivary antioxidant activity toward superoxide and hydroxyl radical. Moreover, we clarified the relationship between serum reactive oxygen metabolite (ROM) level and levels of immunoglobulin G antibody to periodontal pathogens. As a result, serum ROM levels were positively correlated with antibody titers to Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Eikenella corrodens.

研究分野：予防歯科学

キーワード：歯周病 酸化ストレス 抗酸化力

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯肉縁下歯垢中の細菌によって引き起こされる慢性炎症である。近年、歯周病と全身疾患との関連が注目されている。これは、細菌の出す病原因子(リポポリサッカライド、酵素等)に長期間さらされるためではないかと考えられている。歯周病が影響をおよぼす全身疾患としては、虚血性心疾患、糖尿病、早期低体重児出産、誤嚥性肺炎などが報告されている。しかし、歯周炎がこれらの疾患とどのように関連があるかについてのメカニズムは未だ不明である。

近年、活性酸素種 (Reactive Oxygen Species; ROS)が体内の酸化ストレスを増加させ、全身疾患の発症に関与することが明らかになってきた。活性酸素種は、主に宿主防御反応として炎症性細胞から産生されるが、過剰に産生された場合、宿主組織のタンパク質・DNA や脂質にもダメージを与えることが報告されている。また、歯周病が進行することにより歯周組織における活性酸素種の産生が増加することも分っている。これらのことは、歯周病が活性酸素種の過度な産生を介して、全身の臓器に影響を及ぼす可能性を示唆している。

申請者らのグループでは、これまで歯周病と酸化ストレスとの関連性についてさまざまな研究を行ってきた。動物実験モデル(ラット)においては、歯肉溝に継続的にリポポリサッカライドと酵素を投与することで実験的に歯周炎を起こさせたラットモデルを確立し、歯周組織に酸化ストレス(特にDNAダメージ)が起きていることを報告した。さらに、その血液中において活性酸素種濃度が上昇していることを発見し、このモデルラットでは肝臓の脂肪変性が起こっていた。また、全身臓器(脳、心臓、肝臓、腎臓)においても歯周炎ラットでは酸化ストレス濃度が上昇していることが分

かった。

これらの結果は、歯周病が起こることにより全身性(血液中)の活性酸素種濃度が上昇し、歯周病が全身の臓器に影響を及ぼしていることを示唆している。活性酸素種は主に宿主防御反応の一つである好中球から放出されるが、タンパク質・DNA や脂質に直接ダメージを与えることが可能とされている。

しかし現在のところ、ヒトにおける歯周病と活性酸素種との関連はほとんど知られていない。

2. 研究の目的

(1) 今までの酸化ストレスの測定には、活性酸素種の代謝産物 (Reactive Oxygen Metabolites; ROM) やDNA 損傷の結果である 8-Hydroxy-deoxy-guanosine (8-OHdG)、タンパク質への影響はカルボニルなどを指標として測定を行ってきた。これらは酸化損傷を受けたレベルを測定するものであり、直接的に活性酸素種を評価したものではなかった。

近年、電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance; ESR) の発展により直接的に活性酸素種を測定できるような方法が確立してきた。ESR 法は不対電子(電子スピン)を特異的に検出する方法であることから、直接的に不対電子を有する原子、分子である活性酸素種を検出可能な唯一の方法である。よって今回、まずは神奈川歯科大学薬理学分野・ESR センターの協力の元、ESR 法による特異的な活性酸素種(スーパーオキシドとヒドロキシルラジカル)を打ち消す活性の測定方法の確立を行うことを目的とした。

(2) 市民健診によって得られた歯周組織検査の結果と血液・唾液サンプルを用いて、酸化ストレス度と歯周病関連の細菌に対する血清抗体価やスーパーオキシドやヒドロキシルラジカルの消去能を測定し、比較検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ESR 法の確立:

神奈川歯科大学 ESR センターの協力のもと、ヒトの唾液における特異的な活性酸素種(スーパーオキシドとヒドロキシルラジカル)を消去する活性を、ESR を用いて測定する方法を確立する。

(2) サンプル採取:

市民健診を受診した対象者から各サンプルを採取する。歯周病検査として1歯2点による probing pocket depth (PPD)、clinical attachment level (CAL)、bleeding on probing (BOP) を測定した。また、血清中の酸化ストレス度 (d-ROMs) をフリーラジカル評価装置 (Diacron, Grosseto, Italy) を用いて測定した。さらに、歯周病関連の細菌 (*Porphyromonas gingivalis* (Pg)、*Prevotella intermedia* (Pi)、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) と *Eikenella corrodens* (Ec)) に対する血清抗体価を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)法によって測定した。

4. 研究成果

(1) ESR 法による活性酸素消去能測定方法の確立:

ヒトの唾液によるスーパーオキシド (a, b) とヒドロキシルラジカル (c, d) の消去能の測定方法を確立した。図 1 の a) と c) はコント

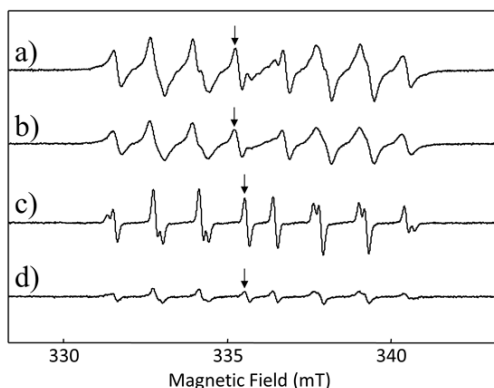


図 1 . ESR 法による測定結果

ロールとなる生理食塩水、b)と d)がヒトの唾液の場合で、それぞれの波形を示す。黒矢印のところではシグナルの強度に変化が見られるが、これが消去能を示している。また、コントロールに対する割合でそれぞれの消去能を計算した。

(2) 市民健診の結果:

健診参加者 (200 名) を対象とした結果、平均年齢は 67 歳で、男性 113 名、女性 97 名だった。そのうち、中等度の歯周病者は 77 名、重度の歯周病者は 29 名であった。

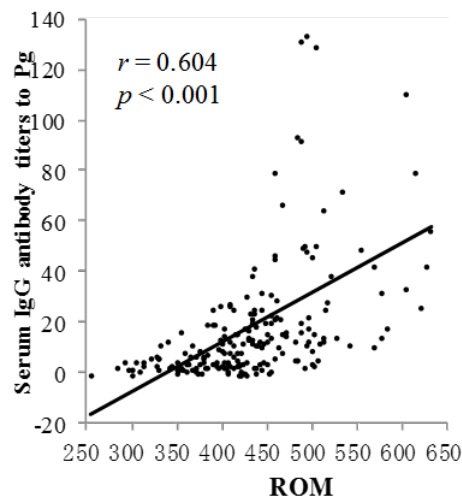


図 2 . ROM と Pg の相関図

さらに、血清における酸化ストレス度 (ROM) の結果と各菌に対する血清抗体価との相関関係を検討した。その結果、血清酸化ストレス度と Pg に対する血清抗体価は有意に正の相関関係であった ($r=0.604, p<0.001$) (図 2)。

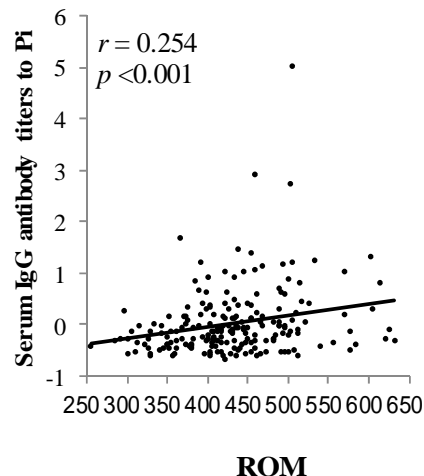


図 3 . ROM と Pi の相関図

また、血清酸化ストレス度と Pi ($r=0.254$, $p<0.001$), Ec ($r=0.226$, $p=0.001$) に対する血清抗体価もまた有意に正の相関関係であった(図3, 4)。

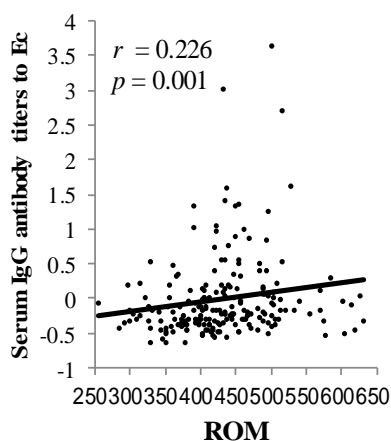


図4 . ROM と Ec の相関図

しかし、血清酸化ストレス度と Aa に対する血清抗体価との間には相関関係が認められなかった ($r=0.131$, $p=0.064$) (図5)。

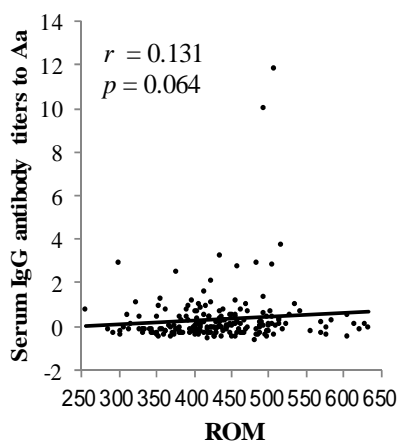


図5 . ROM と Aa の相関図

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)

Tamaki N、Cristina Orihuela-Campos R、Inagaki Y、Fukui M、Nagata T、Ito HO、Resveratrol improves

oxidative stress and prevents the progression of periodontitis via the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model、Free Radical Biology and Medicine、査読有、Vol. 75、2014、222-229、doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.034.

Tamaki N、Hayashida H、Fukui M、Kitamura M、Kawasaki K、Nakazato M、Maeda T、Saito T、Ito H-O、Oxidative stress and antibody levels to periodontal bacteria in adults: Nagasaki Island Study、Oral Diseases、査読有、Vol. 20、No.3、2014、49-56、doi: 10.1111/odi.12127.

〔学会発表〕(計 7 件)

玉木直文、歯肉溝浸出液中バイオマーカーと腎機能・糖尿病指標との関連、第7回日本口腔検査学会総会・学術大会、2014年9月6~7日、岡山大学50周年記念会館(岡山県・岡山市)。

玉木直文、水素水摂取による口蓋創傷の治癒促進効果、第63回口腔衛生学会総会、2014年5月29-31日、キッセイ文化会館(熊本県・熊本市)。

玉木直文、口腔の健康増進を目指した酸化ストレス制御、第44回四国歯学会基礎系教育講演、2014年3月20日、徳島大学(徳島県・徳島市)。

玉木直文、口蓋創傷治癒モデルにおける水素水摂取の効果、第4回分子状水素医学シンポジウム、2014年2月1-2日、きゅりあん品川(東京・品川区)。

Tamaki N、Levels of Serum Markers

of Oxidative Stress and Antibodies against Periodontal Pathogens in Community-dwelling Adults with and without Periodontitis: Goto Study、First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species、2013年8月27-28、長崎大学龍神ホール(長崎県・長崎市)。

Tamaki N、Salivary Antioxidant Activity、Cytokines and Periodontitis : The Nagasaki Island Study、2nd IADR-APR (asia pacific region) 2013年8月21-23日、Bangkok (Thailand)。

Tamaki N、Relationship between plasma reactive oxygen species and progression of periodontitis. 10th International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry、2012年9月14-16、Ulaanbaatar (Mongolia)。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://preventdent-tokushima-u.jp/result.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

玉木 直文 (TAMAKI, Naofumi)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授

研究者番号：20335615

(2)研究分担者

伊藤 博夫 (ITO, Hiro-o)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・教授

研究者番号：40213079

吉野 文彦 (YOSHINO, Fumihiko)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・
准教授

研究者番号：20308307