

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293427

研究課題名(和文) 歯周病による全身の酸化ストレスのダイナミクスと抗酸化物質の効果

研究課題名(英文) Dynamics of systemic oxidative stress by periodontal disease and effects of antioxidants

研究代表者

江國 大輔 (Ekuni, Daisuke)

岡山大学・大学院・講師

研究者番号：70346443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、本研究の目的は、歯周病の酸化ストレスによる全身への影響について、酸化ストレス可視化マウス(OKDマウス)を用いて、生体内での動態をリアルタイムで検討することであった。8週齢のOKDマウスを歯周病群、水素水群、対照群の3群に分けた。歯周病群には下顎臼歯にリガチャーを巻き、歯周病を惹起した。水素水群には、リガチャーを巻くとともに、水素水を飲ませた。ルミノメーターを用いて、酸化ストレスに対するルシフェラーゼ活性を記録した。歯周病群では、7日後に、下顎付近、胸部及び腹部でルシフェラーゼ活性が対照群に比べて増加した。歯槽骨吸収は1週間後までに急速に進行して、28日まで緩徐に進んだ。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate how periodontitis progression induced systemic oxidative stress in real time using the transgenic type Keep1-dependent oxidative stress detector (OKD) mice. Male OKD mice (age; 8 weeks) were divided into three groups: periodontitis (P) group, hydrogen-rich water (HW) group and control (C) group. In the P group, a 5/0 cotton ligature was placed in a submarginal position on mandibular first molars to induced periodontitis. In the HW group, mice drunk HW under ligation. Luciferase activity, which indicated signals upon oxidative stress, was detected using a luminometer. In the P group, the luminescence activities in the mandibular, chest, and ventral areas were greater than those in the control group at 7 days. In the HW group, the luminescence activities in the areas were lower than those in the P group at 7 days. Alveolar bone resorption was rapidly induced in the P group during 7 days and gradually progressed until 28 days.

研究分野：社会歯学

キーワード：歯周病 酸化ストレス 抗酸化物質 マウス

1. 研究開始当初の背景

歯周病は日本国民の多くが罹患する生活習慣病であり、高齢者のQOLを確保するうえで重要視されている疾患のひとつである。近年、歯周病と全身との関連が注目を浴びており、歯周病の予防・治療がより重要な意義を持つようになってきている。歯周病が全身へ及ぼす影響についての報告は徐々に増加しているにも関わらず、全身への影響に関して、酸化ストレスの観点から評価した研究は国内外を通じて少ない。酸化ストレスは、100種類以上の疾患と関連があり、分子生物学的アプローチには注目すべき指標と考える。

申請者らは、歯周病による全身への影響に関する機序の解明に、酸化ストレスに注目してきた。臨床研究・動物実験などを通じて、歯周病が歯周局所および全身の酸化ストレスを増加させていることを報告した。しかし、歯周病がどのタイミングで全身の酸化ストレスに影響を与えるのかという詳細なエビデンスは得られていない。すなわち、今までモデル研究では酸化ストレスによって引き起こされた結果（組織の酸化損傷）のみの把握であり、途中の経路は血液検査で間接的にしか調べられないのが欠点であった。また、抗酸化物質の効果は動物モデルで報告しているが、その効率的・効果的な投与方法（至適濃度・頻度など）は検討されていない。

近年、酸化ストレス可視化マウス（Tg型OKD-Lucマウス）が発明され、酸化ストレスや薬剤の生体内での動態を生きたまま可視化できるようになってきている。そこで、これまでの研究を発展させ、酸化ストレス可視化マウスに歯周病を惹起して、リアルタイムで生体内での酸化ストレスの分布と経時変化を把握できるモデルを着想した。それによって、全身の酸化ストレスへの直接的な影響、すなわち経路・タイミング・今までわからなかった組織の変化などを詳細に検討でき、それが解明されれば、より効果的な抗酸化物質療法の開発・応用に寄与できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病の酸化ストレスによる全身への影響について、酸化ストレス可視化マウスを用いて、生体内での動態をリアルタイムで（生きたまま）検討すること、および歯周病治療に効果的な抗酸化物質投与方法を検討することにある。

3. 研究の方法

(1) 予備実験

8週齢の酸化ストレス可視化マウス（Tg型OKD-Lucマウス）を歯周病群（4匹）と対照群（4匹）の2群に分けた。対照群は無処置

とした。歯周病群には全身麻酔下でマウスの上顎臼歯に絹糸を巻き、歯周病を惹起した。両群とも0, 1, 2, 7, 14, 21, 28日後に全身の酸化ストレスの分布を記録した。ルシフェリン（15mg/mL, 0.01mL/g）を腹腔内に注射後10分以内にLumazoneFA（日本ローパー、東京）を用いて、発光状態を撮影した。Luminescence imageを作成して、単位面積あたりの発光量を計算した。

4週間後、心臓から採血を行った。血清を分離して、酸化ストレスの程度を調べた。a free radical evaluator (Diacron International, Grosseto, Italy)を用いて、reactive oxygen metabolites (ROM)の値を計測した。

また、マウスを屠殺して、両群の歯周組織、心臓および肝臓を採取した。採取した標本を通常法に従ってパラフィン包埋した後、切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。さらに、顎骨標本を用いて歯槽骨吸収の量を計測した。

(2) 本実験

8週齢の酸化ストレス可視化マウス（Tg型OKD-Lucマウス）をベースライン（4匹）、歯周病群（6匹）および対照群（6匹）の3群に分けた。対照群は無処置とした。歯周病群には全身麻酔下でマウスの上顎臼歯に絹糸を巻き、歯周病を惹起した。この2群では0, 1, 2, 7日後に全身の酸化ストレスの分布を記録した。ルシフェリン（15mg/mL, 0.01mL/g）を腹腔内に注射後10分以内にLumazoneFA（日本ローパー、東京）を用いて、発光状態を撮影した。Luminescence imageを作成して、単位面積あたりの発光量を計算した。なお、ベースライン群では、発光量を計測後すぐに屠殺を行った。

7日後、対照群と歯周炎群のマウスを屠殺して、両群の歯周組織、心臓および肝臓を採取した。採取した標本を通常法に従ってパラフィン包埋した後、切片を作製して、ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。また、歯周組織の酸化ダメージを調べるためMalondialdehyde (MDA)を1次抗体(ab6463, Abcam, MA, USA) (500倍希釈)として免疫染色を行った。

(3) 抗酸化物質投与方法

8週齢の酸化ストレス可視化マウス（Tg型OKD-Lucマウス）を歯周病+水素水同時投与群（3匹）および歯周病+水素水事前投与群（3匹）の2群に分けた。歯周病+水素水同時投与群には全身麻酔下でマウスの上顎臼歯に絹糸を巻き、歯周病を惹起したのと同時に水素水（約3ppm, SEEMS Bionics Inc., Suwon, Korea）を自由に飲ませた。歯周病+水素水事前投与群には、歯周病を惹起する1週間前から水素水を飲ませた。0, 1, 2, 7日後に全

身の酸化ストレスの分布を記録した。ルシフェリン (15mg/mL, 0.01mL/g) を腹腔内に注射後 10 分以内に LumazineFA (日本ローパー, 東京) を用いて, 発光状態を撮影した。Luminescence image を作成して, 単位面積あたりの発光量を計算した。

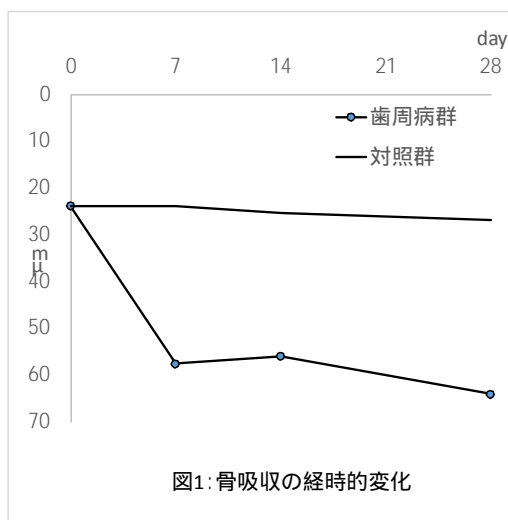
4. 研究成果

(1) 予備実験

歯周病群と対照群の発光量の比では, 結紮直後から 1 週間の間に, 下顎付近, 胸部及び腹部でピークに達した。その後, 各部発光量は徐々に低下したが, 4 週間後付近から再度上昇する傾向を示した。血液中の酸化ストレスは, 歯周病群では, 対照群よりも高い傾向を示した。

対照群における歯周組織の病理組織標本では病変は認められなかった。歯周病群では, 好中球を中心とした炎症性細胞浸潤・接合上皮の剥離や根尖側移動・歯槽骨吸収が観察された。肝臓の標本では, 空胞変性や炎症性細胞浸潤が観察された。心臓の標本では明らかな病変は認められなかった。

顎骨標本を用いた歯槽骨吸収の計測の結果, 最初の 1 週間で急激な骨吸収が観察された。その後は緩徐ではあるが, 4 週目まで骨吸収は増大していった (図 1)。



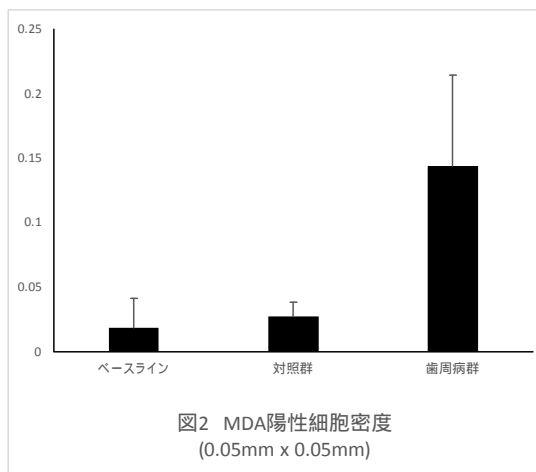
(2) 本実験

ベースライン時と対照群では, 発光量に大きな差がみられなかった。歯周病群の発光量は, 1, 2, 7 日後と徐々に増加する傾向が認められた。7 日目における対照群に対する歯周病群の発光量の比は約 1.4 倍であった。

7 日後, 対照群における歯周組織の病理組織標本では病変は認められなかった。歯周病

群では, 好中球を中心とした炎症性細胞浸潤・接合上皮の剥離や根尖側移動・歯槽骨吸収が観察された。

MDA の免疫染色の結果, MDA 陽性細胞密度 (0.05mm x 0.05mm) は, 歯周病群において有意に高かった ($P < 0.05$) (図 2)。



(3) 抗酸化物質投与実験

歯周病群に対する歯周病 + 水素水同時投与群の発光量の比は, 下顎付近では結紮して 1 日後にやや高くなり, 7 日目には減少する傾向を示した。胸部と腹部の発光量の比はほぼ同じ値を示す傾向であった。一方, 歯周病群に対する歯周病 + 水素水事前投与群の発光量の比は, 下顎付近では結紮直後に高い傾向を示したが, その後は減少していた。胸部と腹部の発光量の比も下顎付近と同様の傾向であった。

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)

[学会発表](計 1 件)

Kota Kataoka, Daisuke Ekuni, Yuuya Kawabata, Toshiki yoneda, Mayu Yamane, Muneyoshi Kunitomo, Takaaki Tomofuji, Manabu Morita.

Influence of periodontitis on systemic oxidative stress in a bioluminescent transgenic mouse model.

Europeo8, London, 2015.6.3-6.6.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江國 大輔 (EKUNI, Daisuke)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：70346443

(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

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

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