

氏名	粕山 健太
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4921号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Hydrogen-rich water attenuates experimental periodontitis in a rat model (ラット実験モデルにおける水素水摂取による歯周炎予防効果)
学位論文審査委員	高柴 正悟 教授 大原 直也 教授 森田 学 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周炎は、歯垢中の細菌が引き起こす、歯周組織の破壊を伴う慢性炎症性疾患である。歯周炎の進行に伴い生体防御反応として活性酸素種が産生される。しかし活性酸素種が過剰に産生されると歯周組織の破壊が進行することも明らかにされている。したがって、宿主の抗酸化力を高めることは、歯周炎の進行予防に効果があると推測される。

水素水とは水素分子が水に溶けた溶液である。近年、水素水には体内で発生した活性酸素種を消去する作用があることが証明されている。したがって、水素水の摂取は全身の抗酸化力を増加させる方法の一つとして着目される。しかし、水素水が歯周炎にどのような効果を示すのかは不明であった。そこで本研究では、ラット実験モデルを用いて、水素水摂取による歯周炎への影響を、組織学的、生化学的に検討した。

【方法】

8週齢Wistar系雄性ラット28匹を7匹ずつ、対照群(Control:C群)、水素水摂取群(Hydrogen-rich Water:HW群)、歯周炎群(Periodontitis:P群)、および歯周炎+水素水摂取群(Periodontitis+Hydrogen-rich Water:P+HW群)の4群に分けた。実験期間は4週間とした。C群に対しては通常飼育を行い蒸留水を与えた。P群、P+HW群では、上顎両側第二臼歯の歯頸部周囲に絹糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起させた。さらに、HW群、P+HW群には実験期間の間、水素水(800~1000 $\mu\text{g/L}$)を与えた。実験開始時、2週間経過時、実験終了時に採血を行い、血清中のreactive oxygen metabolites (ROM)値を測定した。

実験期間終了後、上顎右側歯周組織の組織標本を作製した。ヘマトキシリンエオジン(HE)染色を行い、歯肉結合組織中の多核好中球数とセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測した。また、8-hydroxydeoxyguanosine(8-OHdG)免疫染色、nitrotyrosine免疫染色、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)染色を行い、歯槽骨表面の8-OHdG陽性細胞数、nitrotyrosine陽性細胞数、およびTRAP陽性破骨細胞数を計測した。そして総細胞数に対する陽性細胞数の割合を陽性率として求めた。上顎左側歯肉からはタンパクを抽出した。ELISA法を用い、還元型グルタチオン(GSH)と酸化型グルタチオ

ン(GSSG)の比(GSH/GSSG)を求めた。また、ウエスタンブロット法を用いて、c-Jun N-terminal kinase(JNK)、p38、extracellular signal-regulated protein kinase 1/2(ERK1/2)、リン酸化 JNK(p-JNK)、リン酸化 p38(p-p38)およびリン酸化 ERK1/2(p-ERK1/2)の発現量を求めた。

血清ROM値、HE染色およびTRAP染色による組織学分析の群間比較には一元配置分散分析とTukey法を、そして8-OHdG陽性細胞率、nitrotyrosine陽性細胞率およびGSH/GSSGの群間比較にはt検定を用いた。

【結果】

P群の血清ROM値は経時的に上昇し、2週目と4週目においてはC群と比べて有意に高くなった。P+HW群もP群と同様に血清ROM値は経時的に上昇したが、4週目においてP群と比較すると有意に低い値を示した。

実験終了時におけるP群、P+HW群の歯周組織では、多核好中球数と破骨細胞数がC群、HW群よりも有意に多くなったが、P+HW群ではP群と比較して有意に少なかった。また、セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離はC群、C+HW群と比較してP群では有意に大きくなったが、P+HW群とC群との間では有意な差は認められなかった。

P群と比較して、P+HW群のGSH/GSSGは有意に高く、8-OHdG陽性細胞数率とnitrotyrosine陽性細胞率は有意に小さかった。さらに、P+HW群におけるp-JNK、p-p38、およびp-ERK1/2の発現量も、P群と比較して低かった。

【考察】

過去の研究では、ラット臼歯歯頸部に絹糸を結紮することで実験的歯周炎が惹起されることが示されている。本研究においてもP群、P+HW群の多核好中球数と破骨細胞はC群、C+HW群の値よりも多くなっており、実験的歯周炎が惹起されていることが確認された。

P群と比較し、P+HW群では多核好中球数、および破骨細胞数が有意に少なかった。C群、C+HW群と比較し歯槽骨吸収の指標となるセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離はP群で有意に高かったが、P+HW群では有意な差を認めなかった。これらの結果から水素水の摂取により歯周組織の破壊が抑制されたことが示唆される。

またP群と比較し、P+HW群ではGSH/GSSGは有意に高く、8-OHdG陽性細胞率、nitrotyrosine陽性細胞率は有意に低かった。過去の研究からGSH/GSSGは抗酸化力、そして8-OHdGとnitrotyrosineは酸化ダメージの指標となることがそれぞれ報告されている。本研究の結果は水素水の摂取によって歯肉の抗酸化力が向上するとともに、歯肉の酸化ダメージが減少したことを示唆している。

P群、P+HW群ではC群、HW群と比較し経時的に血清ROM値が上昇したが、P+HW群はP群と比較すると血清ROM値は有意に小さくなっていった。過去の研究から、水素分子に、活性酸素種を消去する作用があることが分かっている。したがって歯周炎進行に伴い産生される活性酸素種の増加が水素水によって抑えられたと考えられる。

P群と比較し、P+HW群ではmitogen-activated protein kinase(MAPK; JNK, p-38, ERK1/2)のリン酸化が抑制されていた。MAPKは細胞内伝達経路の1つであり、細胞が酸化ダメージを受けるとリン酸化が起こり、炎症性の組織破壊が促進されることが知られている。これらのことから水素水による歯肉組織の破壊の抑制にMAPKのリン酸化抑制が関与していることが推測される。

過去の研究からカテキンなどの抗酸化物質には、歯周病原細菌に対する殺菌作用を有するものがあると報告されている。本研究では、水素水による抗酸化作用による歯周炎抑制作用は示されたが歯周病

病原細菌への影響は確認していない。今後は水素水による歯周病病原細菌への影響も検討する必要があるだろう。

【結論】

ラット実験モデルにおいて、水素水の摂取には、活性酸素種の消去とともに炎症の伝達経路を不活性化し、歯周炎の進行を抑制する効果があることが示唆された。

学位論文審査結果の要旨

炎症性組織破壊性疾患である歯周炎の進行には活性酸素種が関与することが、1997年の研究 (Chapple *et al.*) から次々と明らかにされている。したがって、宿主の抗酸化力を高めることは、歯周炎の予防に繋がると考えた。近年、高濃度 (1600 μ g/L) に水素を含む水 (水素水) には体内で発生した活性酸素種を消去する作用があると報告された (Ohsawa *et al.* 2007) ことから、水素水の摂取が全身の抗酸化力を増加させる方法の一つとして着目されてきた。しかし、水素水の歯周炎に対する効果は不明であった。本研究では、ラット実験モデルの歯周炎において水素水摂取が及ぼす影響を、組織学的そして生化学的に検討した。

8週齢のWistar系雄性ラット28匹を、7匹ずつの対照群 (Control:C群)、水素水摂取群 (Hydrogen-rich Water:HW群)、歯周炎群 (Periodontitis:P群)、および歯周炎+水素水摂取群 (Periodontitis + Hydrogen-rich Water:P+HW群) の4群に分けた。飼育期間は4週間とした。この間、C群とP群には蒸留水を与えた。HW群とP+HW群には水素水 (800~1000 μ g/L) を与えた。なお、P群とP+HW群では、上顎両側第二臼歯の歯頸部周囲に結紮した絹糸を実験期間中に保持して、実験的歯周炎を惹起させた。実験開始時、および2週間経過時に麻酔下で尾静脈から採血を行い、飼育期間終了時にはジエチルエーテルによる吸入麻酔で屠殺して、心臓から直接採血を行った。また、歯周組織をホルマリン固定して、組織切片を作製した。

その結果、P群の血清活性酸素代謝物 (reactive oxygen metabolites, ROM) 値は経時的に上昇し、2週目と4週目においてはC群と比べて有意に高くなった。P+HW群もP群と同様に血清ROM値は経時的に上昇したが、4週目においてP群と比較すると有意に低い値を示した。歯周組織切片中の多核白血球数と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 陽性細胞数は、P群とP+HW群ではC群とHW群よりも有意に多かったが、P+HW群ではP群と比較して有意に少なかった。また、セメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離は、P群ではC群あるいはC+HW群と比較して有意に大きかったが、P+HW群とC群との間での差は有意ではなかった。さらに、P+HW群ではP群と比較して、歯周組織内の還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) の比 (GSH/GSSG) が有意に高く、一方で8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) 陽性細胞数率とニトロチロシン (nitrotyrosine) 陽性細胞率は有意に小さかった。同様に、リン酸化c-Jun N-terminal kinase (p-JNK)、リン酸化p38 (p-p38)、およびリン酸化extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (p-ERK1/2) の量も、少ない傾向にあった。

以上のことから、ラットの実験的歯周炎モデルにおいて、水素水の摂取には、活性酸素種を消去するとともに炎症の伝達経路を不活性化し、歯周炎の進行を抑制する効果があることが示唆された。本論文は、2年前に発表されたものであるので現在の研究進度からみると作用メカニズムの検討が浅いものであるが、水素水摂取による歯周炎の進行抑制効果の有効性を解明する上で重要な知見である。よって、論文審査担当者は一致して、本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。