

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593174

研究課題名(和文) 歯周病の新しい視点からの生活習慣病としての位置づけ

研究課題名(英文) New concept of periodontal disease as a life-style related disease

研究代表者

野村 義明 (Nomura, Yoshiaki)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587

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)：人工的歯石形成の実験系を確立し酸化LDLの歯石形成への関与を検討した。その結果、走査型電子顕微鏡による観察では、メンブレンを水、LDL、酸化LDLに浸漬した場合と比較してHDLのみが異なった結晶構造を示した。透過型電子顕微鏡による観察では、LDL、酸化LDLを反応液に添加した場合、ハイドロオキシアパタイト様の結晶が観察された。電子線マイクロアナライザによるカルシウム、リンの比率の定量では反応液に酸化LDLを添加した場合が最もハイドロオキシアパタイトに近い結晶を生成していた。以上の結果により酸化LDLは歯石の主成分であるハイドロオキシアパタイトの形成を促進している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We established the artificial dental calculus formation system and investigated the effect of ox-LDL for the formation of dental calculus. By the SEM analysis, clearly distinguished crystals were observed when membrane was immersed in HDL. By the TEM analysis, Hydroxyapatite like crystals was observed when Ca solutions were mixed with LDL or ox-LDL. And Ca/P of the crystals with ox-LDL was highest when compared with LDL, HDL. These results indicated that ox-LDL promote the dental calculus formation.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：歯周病 生活習慣病 歯石

### 1. 研究開始当初の背景

ナノバクテリアは生体内での異所性石灰化に関与する生命体として発見された。しかし、実験結果の再現性が乏しく生命体であることは否定された。さらにナノバクテリアのモノクロナール抗体に反応するタンパク質が同定されたが、これらのタンパク質は生体に存在するアルブミンやファチュイン等であり、ナノバクテリアの存在自体が否定された。しかし、これらのタンパク質が何らかの形で生体内での異所性石灰化に関与している可能性が高いため、ナノバクテリアモノクロナール抗体に反応するタンパク質の精製、同定を試みた。その結果、ナノバクテリア抗体に反応するタンパク質が複合脂質である酸化 LDL の抗体に反応することが分かった。歯周病は喫煙習慣、肥満、糖尿病との関連から生活習慣病として位置づけられている。特に血清中の酸化 LDL はいわゆる悪玉コレステロールとして知られており、基礎的な検討から歯周病との関与も示唆されている。口腔内に出血がある場合、歯源性菌血症が起こりやすく、血中に侵入した菌が血管壁に付着すると炎症を惹起し、酸化 LDL (ox-LDL) を生成することが知られている。その一方で歯周病の主たる病因である歯石は現在でもその形成のメカニズムは明らかではない。このような観点から歯石形成と酸化 LDL の関連について検討を行った。

### 2. 研究の目的

本研究課題においては、ox-LDL の石灰化への影響を検討することを目的とした。特に我々の研究グループが確立していた人工的に歯石の主成分であるハイドロオキシapatite を生成する実験系は 10L 単位で生成を行う系であり、よりコンパクトにハイドロオキシapatite を生成する系の確立を目指した。その系を用いて ox-LDL の歯石形成への関与を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 流動的な人工的歯石形成方法

Flow cell を用いて Cell に膜を固定しカルシウム溶液として 13g/75ml の濃度の  $\text{Ca}(\text{NO}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  溶液を 24 時間流した。その後、24 時間蒸留水を流し洗浄した後リン酸溶液として 4.06g/l の濃度の  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  を 24 時間流した。この各溶液の濃度では Ca/P の比率が 2.31 となり理論上ではハイドロオキシapatite が生成する。膜にはコントロールとして蒸留水、HDL, LDL, ox-LDL の各溶液に浸漬したものをを用いた。膜上の結晶は走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察を行った。

#### 静的な人工歯石形成方法

$\text{Ca}(\text{NO}_2)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  500  $\mu\text{l}$  をエッペンチューブに入れ HDL, LDL, ox-LDL をそれぞれ 10  $\mu\text{g/ml}$  添加し室温で回転式のローテーターで 1 時間混和した。その後、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  を 500  $\mu\text{l}$  添加し同様に室温で回転式のローテーターで 1 時間混和したのち、遠心分離により上清を除

いた後 70% エタノールで 2 回洗浄したものをサンプルとした。これらのサンプルは透過型電子顕微鏡 (TEM) により結晶構造を観察した。また、各結晶のカルシウム、リンを電子線マイクロアナライザーで定量を行った。

### 4. 研究成果

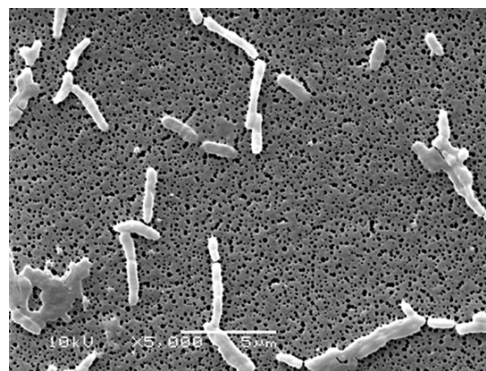
流動的な人工的歯石形成方法による結晶構造の観察と HDL, LDL, ox-LDL の影響

一般的に生体内の様々な物質は石灰化に対して抑制的に働くことが知られている。

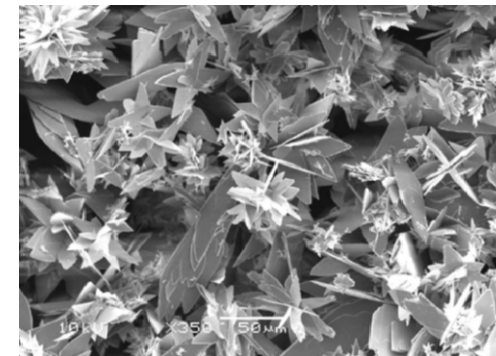
今回の SEM による結晶構造の観察では、膜を HDL に浸漬した場合のみ特異的な結晶構造が観察された (図 1 (B))。この構造は様々なイオンの影響によるものであり、ハイドロオキシapatite とは異なる構造である。

図 1 流動的な人工的歯石形成方法による結晶構造

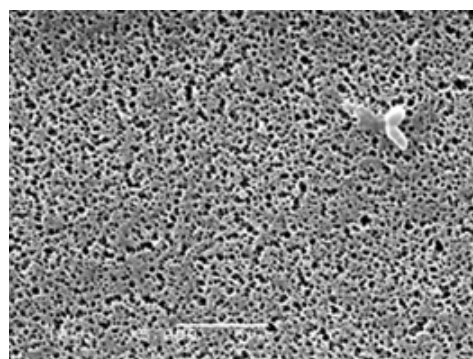
(A) コントロール ( $\text{H}_2\text{O}$ )



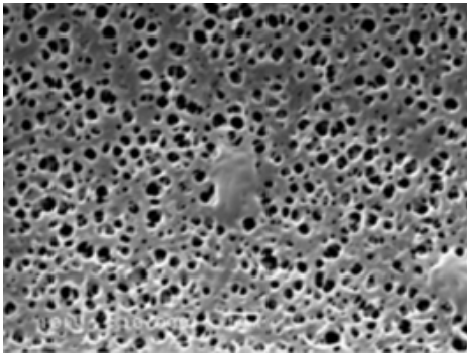
(B) HDL



(C) LDL



(D) ox-LDL

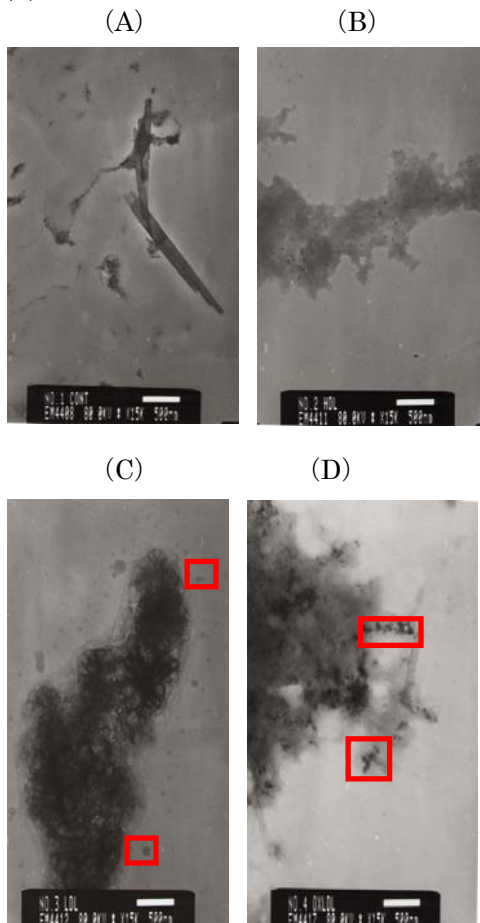


これに対してメンブレンを LDL、ox-LDL に浸漬した場合はコントロールに近い像を観察することができた (図 1 (A), (C), (D))。

静的な人工歯石形成系による結晶構造の透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察

研究の方法に記載した方法により作成した結晶を TEM により観察した像を図 2 に示す。

図 2



(A) コントロール (添加物なし)  
 (B) HDL  
 (C) LDL  
 (D) ox-LDL

図 2 (A) のコントロールでは比較的大きな hidrookshapatite 様の結晶構造が多く観察された。これと比較して LDL、ox-LDL 添加では大きな結晶構造は観察されなかったが四角で囲んだ像のようなアパタイト様の結晶構造が多く観察された。これと比較して (B) の HDL 添加ではこのような構造は観察されなかった。

電子線マイクロアナライザーによる結晶成分の分析

電子線マイクロアナライザーによる結晶成分カルシウム、リンの測定結果とカルシウムとリンの比率 (Ca/P) を表 1 に示す。

表 1 電子線マイクロアナライザーによる結晶のカルシウム、リンの測定結果とその比率

	Ca	P	Ca/P
HDL	1039.316	2093.193	0.50
LDL	1076.095	1922.785	0.56
ox-LDL	1458.702	1916.728	0.76
コントロール	1334.532	2234.949	0.60

hidrookshapatite を人工的に形成する場合、完全な hidrookshapatite のみの結晶は形成されず多くは第 3 リン酸カルシウム、オクタカルシウムホスフェート、テトラカルシウムホスフェートの混合物が形成される。

これらの結晶のなかで Ca/P は hidrookshapatite の Ca/P が最も大きいため Ca/P が大きい程、hidrookshapatite の含有率が高い事を示す。今回の測定結果ではコントロール(添加物なし)と比較して HDL 添加で Ca/P 比が最も低く、LDL 添加ではコントロールより低い値を示した。これに対して ox-LDL 添加ではコントロールより高い値を示した。

以上の結果により HDL は hidrookshapatite 形成への関与は少なく、他の結晶の形成を促進し LDL、特に酸化 LDL は hidrookshapatite の結晶形成を促進している可能性が示唆された。

### 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)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Periostin of human periodontal ligament fibroblasts promotes migration of human mesenchymal stem cell through the  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  integrin/FAK/PI3K/Akt pathway.

- Matsuzawa M, Arai C, Nomura Y, Murata T, Yamakoshi Y, Oida S, Hanada N, Nakamura Y. J Periodontal Res. 2015 Apr 20. doi: 10.1111/jre.12277. (査読あり)
- ② Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation. Otsuka R, Imai S, Murata T, Nomura Y, Okamoto M, Tsumori H, Kakuta E, Hanada N, Momoi Y. Microbiol Immunol. 2015 Jan;59(1):28-36. doi: 10.1111/1348-0421.12214. (査読あり)
- ③ Cranial-base morphology in adults with skeletal Class III malocclusion. Sanggarnjanavanich S, Sekiya T, Nomura Y, Nakayama T, Hanada N, Nakamura Y. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 2014 Jul;146(1):82-91. doi: 10.1016/j.ajodo.2014.04.014. (査読あり)
- ④ Function of chemokine (CXC motif) ligand 12 in periodontal ligament fibroblasts. Yashiro Y, Nomura Y, Kanazashi M, Noda K, Hanada N, Nakamura Y. PLoS One. 2014 May 7;9(5):e95676. doi: 10.1371/journal.pone.0095676. eCollection 2014. (査読あり)
- ⑤ Correlation between health-care costs and salivary tests. Kakuta E, Nomura Y, Naono Y, Koresawa K, Shimizu K, Hanada N. Int Dent J. 2013 Oct;63(5):249-53. doi: 10.1111/idj.12040. Epub 2013 May 17. (査読あり)
- ⑥ Distribution of Streptococcus troglodytae and Streptococcus dentirosetti in chimpanzee oral cavities. Miyanohara M, Imai S, Okamoto M, Saito W, Nomura Y, Momoi Y, Tomonaga M, Hanada N. Microbiol Immunol. 2013 May;57(5):359-65. doi: 10.1111/1348-0421.12047. (査読あり)
- ⑦ Mandibular lingual canals distribute to the dental crypts in prenatal stage. Shiozaki K, Fukami K, Kuribayashi A, Shimoda S, Kobayashi K. Surg Radiol Anat. 2014 Jul;36(5):447-53. doi: 10.1007/s00276-013-1201-6. Epub 2013 Sep 12. (査読あり)
- ⑧ A method for the staining of intrasosseous nerve fibers using Sihler's staining technique. Shiozaki K, Miida K, Tanaka R, Shimoda S. Biotech Histochem. 2013 Aug;88(6):290-4. doi: 10.3109/10520295.2013.773379. (査読あり)
- [学会発表] (計 8 件)
- ① リン酸カルシウム系ペーストの歯質ケア材としての有用性(第 1 報) ミネラル成分のヒト抜去歯脱灰歯質への移行について 千葉 敏江, 林 応き, 下田 信治, 桃井 保子 第 141 回日本歯科保存学会 学術大会 山形テルサ 山形県山形市 平成 26 年 10 月 30 日-31 日
- ② 石灰化培地におけるヒト歯根膜線維芽細胞の遺伝子発現について探索 石川 美佐緒, 野村 義明, 粕谷 佳菜子, 花田 信弘, 中村 芳樹 73 回日本矯正歯科学会 大会 幕張メッセ 千葉県千葉市 平成 26 年 10 月 20 日-22 日
- ③ 口腔の健康に関するエンドポイントの再考 歯周病菌由来歯原性菌血症と歯周病検査の意義と Vascular Disease との関係 野村 義明 第 63 回口腔衛生学会 総会 熊本市市民会館 熊本県熊本市 平成 26 年 5 月 29 日-30 日
- ④ 骨形成不全症 II 型の乳歯象牙質の形態学的観察 伊平 弥生, 宗正 隆明, 薄場 れい子, 下田 信治, 朝田 芳信 第 52 回日本小児歯科学会大会 きゅりあん 東京都品川区 平成 26 年 5 月 16 日-17 日

- ⑤ 歯周ポケット内細菌検査および血漿抗体価検査による SPT 期進行の予知判定  
野村 義明 第 56 回日本歯周病学会学術大会 前橋市市民会館 群馬県前橋市 平成 25 年 9 月 22 日
- ⑥ 天然アパタイトの生体応用の可能性 見明 康雄, 三島 弘幸, 下田 信治 第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会 岡山コンベンションセンター 岡山県岡山市 平成 25 年 9 月 20 日-22 日
- ⑦ 歯根象牙質の形成過程における亜鉛トランスポーター Zip13 の役割について 宗正 隆明, 伊平 弥生, 下田 信治, 朝田 芳信 第 51 回日本小児歯科学会大会 長良川国際会議場 岐阜県岐阜市 平成 25 年 5 月 23 日-24 日
- ⑧ 口腔の健康に関する微生物学的エンドポイントの再考 武内 博朗, 村田 貴俊, 角田 衣理加, 野村 義明, 泉福 英信, 花田 信弘 第 62 回口腔衛生学会総会 キッセイ文化ホール 長野県松本市 平成 25 年 5 月 15 日-17 日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

野村 義明 (Nomura Yoshiaki)  
鶴見大学・歯学部・准教授  
研究者番号：90350587

### (2)研究分担者

花田 信弘 (Hanada Nobuhiro)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：70180916

下田 信治 (Shimoda Shinji)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号：30139620