

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09926

研究課題名(和文)酸化脂質を用いた新しい根面齲蝕の予防方法の開発とフッ化物併用療法への応用

研究課題名(英文) Development of a new preventive method for root caries using lipid oxide and its application to fluoride combination therapy

研究代表者

花田 信弘 (Hanada, Nobuhiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉炎により歯肉溝のLDLが酸化LDL(oxLDL)に変化することに着目し、oxLDLの石灰化能を検証した。本研究では糖質、脂質、タンパク質についてカルシウム沈着能力の変化をモニタリングした。その結果、各種糖質、タンパク質について、濃度と分子量を変えてもカルシウム沈着の促進は見られなかった。しかし、酸化LDL(oxLDL)を加えた実験系では、添加したoxLDLの濃度依存的にカルシウム沈着の促進が認められた。電子顕微鏡によるカルシウム沈着の所見でもoxLDLのカルシウム沈着能力が証明できた。このことから、oxLDLがフッ化物とは異なる機序の抗齲蝕剤として機能する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により酸化LDL(oxLDL)のカルシウム沈着能力が示された。歯肉溝のLDLが慢性炎症によりoxLDLに変化することで、脱灰歯面の再石灰化が促進される。このことは、oxLDLがフッ化物とは異なる機序の抗齲蝕剤として機能する可能性を意味している。しかし、同時に歯肉溝においてoxLDLの働きで歯石が形成される可能性がある。従来から、歯周病と糖尿病や内臓脂肪症候群の関連性が示唆されている。本研究により歯科診療所で糖尿病や内臓脂肪症候群を積極的に予防し、血液や歯肉溝のLDLやoxLDLの濃度を常時抑えることが歯周病の予防戦略として必要であることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Focusing on the oxidation of LDL in the gingival crevicular fluid due to gingivitis, we hypothesized that oxidized LDL (oxLDL) deposits supersaturated calcium on the tooth surface.

In this study, change in calcium deposition level were monitored for carbohydrates, lipids, and proteins. As a result, no promotion of calcium deposition was observed even when the concentration and molecular weight of various carbohydrates and proteins were changed. However, in the experimental system to which oxLDL was added, the promotion of calcium deposition was observed depending on the concentration of the added oxLDL. Electron microscopic findings also demonstrated the calcification ability of oxLDL. These data suggest that oxLDL may function as an anti-cariogenic preparation by a different mechanism from that of fluoride.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：酸化脂質 LDL HDL 齲蝕 根面齲蝕 酸化LDL 石灰化 歯石

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

超高齢社会で高齢者が増加し、8020推進運動(80歳で20本の歯を残す運動)が実施されると高齢者の歯周病とその合併症である根面齲蝕が大きな問題になる。歯周病で露出する根面は、脱灰pHが中性に近いpH6.2~6.7であり、象牙細管が露出し容易に脱灰する環境に晒されている。それにもかかわらず、齲蝕は慢性化しやすい。その理由の一つとして何らかの抗齲蝕性物質が周囲環境に存在することが予想される。その候補物質として石灰化ナノ粒子(CNPs)と酸化脂質に着目した。1997年にフィンランドの研究グループが石灰化ナノ粒子(Calcification Nano Particle: CNPs)をヒト血清、ウシ胎児血清から分離し、抗体を作製した。当初はナノバクテリアと呼ばれ(謎の)生命体だと考えられていた。RatにCNPsを静注すると、腎結石を形成したことから、生体内での異所性の石灰化に関与すると考えられている。その後の世界各地の研究で、CNPsによる疾患として腎結石、動脈硬化、尿道結石をはじめ23の疾患に関連することが明らかになった。しかし、2011年に公文らがCNPsは非生命体で、その本態は酸化脂質であることを明らかにした(Kumon et al. 2011)。

### 2. 研究の目的

根面に接触する歯肉溝滲出液には酸化脂質である酸化LDL(oxLDL)が存在している。oxLDLは、LDLが歯肉の炎症反応により酸化されたものである。oxLDLが象牙細管に侵入しCNPsとして機能すれば細菌侵入口が封鎖される。oxLDLなどの酸化脂質は線照射で人工的に作製できるのでさまざまな脂質を酸化脂質に変え、石灰化能の高い酸化脂質を選定することができる。本研究の目的は、酸化脂質を根面齲蝕の予防に応用することである。

### 3. 研究の方法

実験 : それぞれの溶液を透明の容器であるキュベットに800 $\mu$ L入れ、カルシウム溶液とリン酸溶液を滴下し、溶液の吸光度を測定した。

実験 : の実験と同じ手順で溶液を作り、その際生じた析出物を透過型電子顕微鏡で観察した。

実験 : 溶液に小さく切ったウシの歯を浸漬して、生じた析出物を走査型電子顕微鏡で観察した。

本研究では、石灰化実験の測定対象物質として、タンパク質、糖質、脂質の3つに分類した。タンパク質にはアルブミン、糖質にはデキストラン40,000と200,000、デキストラン硫酸、脂質には、ポリエチレンイミン、エイコサペンタエン酸、大腸菌のLPS、*P. g*菌のLPS、酸化LDL、酸化されていない通常のLDL、HDL、ドコサヘキサエン酸を用いた。

石灰化試薬にはリン酸水素二アンモニウム、硝酸カルシウム四水和物、溶媒に、蒸留水を用いた。測定装置は、吸光度計 型式は島津製作所 UV-1200、透過型電子顕微鏡と走査型電子顕微鏡を使用した。石灰化実験試料は、牛の歯の前歯部を使用した。

### 4. 研究成果

カルシウム溶液とリン酸溶液の濃度を変えた滴下実験において、酸化LDLはタンパク質、糖質、脂質の3つの中で最もカルシウム様析出物が多かった(図1)。吸光度の高い順に並べると、酸化LDL、酸化されていない通常のLDL、HDL、次いでアルブミン、EPA、DHAの順であった。特に、酸化LDL、酸化されていない通常のLDLは、カルシウム濃度が低濃度的时候からシグモイド曲線を描いて急激な吸光度の増加が観察された。大腸菌および歯周病菌 *P. gingivalis* 由来のLPS、デキストラン硫酸溶液の3つはコントロールの蒸留水と類似した吸光度曲線を描いた。ポリエチレンイミンはコントロールの蒸留水より吸光度が低く、吸光度曲線の増加が最も小さかった。本実験より、酸化LDL溶液の析出物が最も多く、カルシウムが低濃度の時にはデキストラン硫酸とポリエチレンイミン溶液が析出物の生成を抑制していた(図1)。

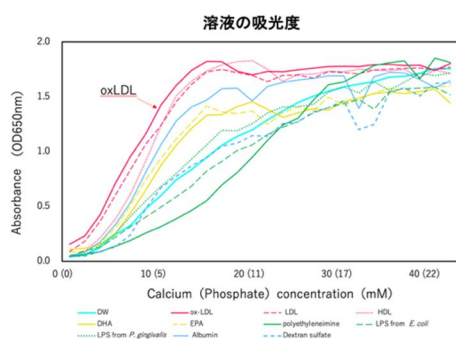


図1 カルシウム溶液とリン酸溶液を滴下したときの吸光度の推移。

カルシウム溶液とリン酸溶液の濃度を生理的な条件に合わせた際に酸化 LDL はコントロールの蒸留水に比べて約 4.2 倍吸光度が高く、他の溶液に比べて、最も多くのリン酸カルシウム様析出物を認めた ( 図 2 )

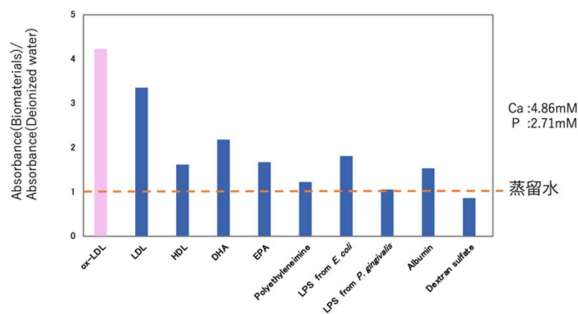


図 2 蒸留水を 1 としたときの析出量の比較。

次に 0.025% の酸化 LDL 溶液中の析出物の経時的変化を透過型電子顕微鏡で観察した。反応開始から、5 分、30 分、24 時間後に観察した。5 分間の反応では、球形または卵円形の析出物が観察され、30 分間の反応では、球形または卵円形の析出物の間に薄い膜状の析出物が現れた。24 時間の反応では、薄い膜状と針状の析出物の凝集が観察された。これらの実験から、析出物の球形または卵円形から薄い膜状および針状への形態変化は、時間的経過により生じた ( 図 3 )

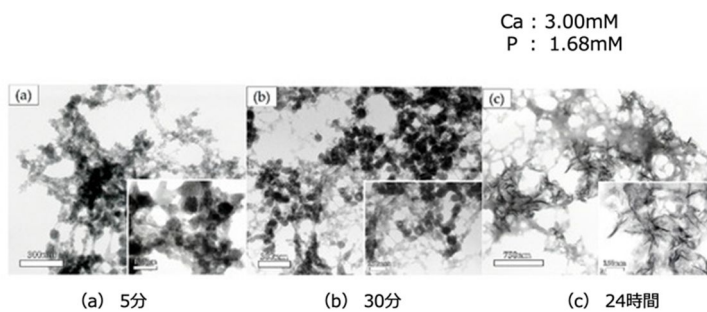


図 3 酸化 LDL 溶液 ( 0.025% ) における経時的分析による析出物の透過型電子顕微鏡 ( TEM )

さらに析出物の電子線回折 ( Electron Diffraction ) を行った。電子線回折は、電子線を試料に照射することで得られた回折パターンから結晶構造を調べる手法である。結晶質では、回折パターン ( 簡単な言葉で言うと、繰り返し模様 ) を示す。Ca/P 比が既知のヒドロキシアパタイトの結晶から得られた回折パターンをコントロールにすると、本実験で得られた析出物ではヒドロキシアパタイトのような明瞭な回折パターンは示されなかった ( 図 4 )

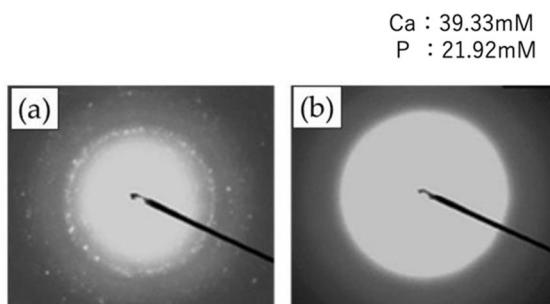


図 4 電子線回折

以上のことから酸化 LDL は、非晶質リン酸カルシウム ( ACP ) の生成を促進し、異所性石灰化の初期段階に関与する可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 14件）

1. 著者名 Yamashita M, Nomura Y, Ishikawa M, Shimoda S, Hanada N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxidized Low-Density Lipoprotein Promotes In Vitro Calcification	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 5120-5132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13225120.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita M, Nomura Y, Ishikawa M, Shimoda S, Hanada N.	4. 巻 13
2. 論文標題 Oxidized Low-Density Lipoprotein Promotes In Vitro Calcification.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Materials (Basel)	6. 最初と最後の頁 5120-5132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ma13225120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 岡田彩子、村田貴俊、大塚良子、曾我部薫、有吉芽生、マティン カイルール、花田信弘	4. 巻 71
2. 論文標題 Dental Drug Delivery System を導入した 保健指導プロトコルの有効性を検討する：予備的臨床試験	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 口腔衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yuko Inai , Yoshiaki Nomura , Tohru Takarada , Nobuhiro Hanada , Naohisa Wada	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Risk factors for postoperative pneumonia according to examination findings before surgery under general anesthesia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical oral investigations	6. 最初と最後の頁 Feb 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00784-020-03230-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y , Fujita Y , Ishihara Y , Kakuta E , Okada A , Maki K , Hanada N	4. 巻 13
2. 論文標題 Effects of cariogenic bacteria and sealant evaluated by International Caries Detection Assessment System	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The open dentistry journal	6. 最初と最後の頁 512-519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874210601913010512	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y , Matsuyama T , Fukai K , Okada A , Ida M , Yamauchi N , Hanamura H , Yabuki Y , Watanabe K , Sugawara M , Imanishi Y , Koizumi N , Murano Y , Nishiyama A , Fukukawa Y , Otsuka R , Hanada N	4. 巻 61
2. 論文標題 Precede-Proceed model based questionnaire and saliva tests for oral health checkup in adult.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of oral science	6. 最初と最後の頁 544-548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.18-0288	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hanioka T , Morita M , Yamamoto T , Inagaki K , Wang PL , Ito H , Morozumi T , Takeshita T , Suzuki N , Shigeishi H , Sugiyama M , Ohta K , Nagao T , Hanada N , Ojima M , Ogawa H	4. 巻 55
2. 論文標題 Smoking and periodontal microorganisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Japanese dental science review	6. 最初と最後の頁 88-94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2019.03.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata T , Yamashita M , Ishikawa M , Shibuya K , Hanada N	4. 巻 151
2. 論文標題 Purification of a High Molecular Mass Protein in Streptococcus mutans.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of visualized experiments : JoVE	6. 最初と最後の頁 JoVE
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3791/59804	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y , Okada A , Kakuta E , Otsuka R , Sogabe K , Yamane K , Yamamoto T , Shigeta Y , Shigemoto S , Ogawa T , Hanada N	4. 巻 19
2. 論文標題 Consistency of supplied food and dentition status of the elderly in residential care homes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Oral Health	6. 最初と最後の頁 74
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12903-019-0770-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takeuchi Hiroaki , Terada Mika , Kobayashi Kazuko , Uruguchi Masahide , Nomura Yoshiaki , Hanada Nobuhiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Influences of Masticatory Function Recovery Combined with Health Guidance on Body Composition and Metabolic Parameters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 OPEN DENTISTRY JOURNAL	6. 最初と最後の頁 124-136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1874210601913010124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y , Maung K , Kay Khine EM , Sint KM , Lin MP , Win Myint MK , Aung T , Sogabe K , Otsuka R , Okada A , Kakuta E , Wint WY , Uruguchi M , Hasegawa R , Hanada N	4. 巻 2019
2. 論文標題 Prevalence of Dental Caries in 5- and 6-Year-Old Myanmar Children.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of dentistry	6. 最初と最後の頁 5948379
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/5948379	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Y , Maung K , Kay Khine EM , Myo Sint K , Phyo Lin M , Win Myint MK , Aung T , Sogabe K , Otsuka R , Okada A , Kakuta E , Yee Wint W , Uruguchi M , Hasegawa R , Hanada N	4. 巻 2019
2. 論文標題 Corrigendum to "Prevalence of Dental Caries in 5- and 6-Year-Old Myanmar Children".	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International journal of dentistry	6. 最初と最後の頁 6986412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/6986412	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okada A, Nomura Y, Miyanohara M, Uraguchi M, Tadokoro H, Nagai T, Fujii Y, Miura M, Kawachi R, Matsui T, Takayanagi K, Yamamoto M, Yamamoto T, Hanada N	4. 巻 April-2019
2. 論文標題 Feasibility Controlling Hemoglobin A1c by Oral Hygiene Improvement: A Pilot Study.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Online Journal of Dentistry & Oral Health (OJD0H)	6. 最初と最後の頁 8-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.36811/ojdoh.2019.110003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Murata T, Ishikawa M, Shibuya K, Hanada N.	4. 巻 155
2. 論文標題 Method for functional analysis of a gene of interest in Streptococcus mutans: gene disruption followed by purification of a polyhistidine-tagged gene product.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Microbiol Methods.	6. 最初と最後の頁 49-54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2018.11.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suma S1,2, Naito M1,3, Wakai K, Naito T, Kojima M, Umemura O, Yokota M, Hanada N, Kawamura T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Tooth loss and pneumonia mortality: A cohort study of Japanese dentists.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0195813
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0195813	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件(うち招待講演 1件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 花田 信弘, 野村 義明, 村田 貴俊, 岡本 公彰
2. 発表標題 【腸内フローラとディスバイオーシス(バランス失調)】口腔微生物叢と歯のケアが腸内微生物叢に及ぼす影響
3. 学会等名 (公財)ヤクルト・バイオサイエンス研究財団: 腸内フローラシンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Murata T, Hanada N
2. 発表標題 Essential Role of S. mutans gtfC on Adherence to Glass Surface
3. 学会等名 96th General Session of the International Association for Dental Research (IADR) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 花田信弘、萩原芳幸、北川昇	4. 発行年 2018年
2. 出版社 一般財団法人 口腔保健協会	5. 総ページ数 148
3. 書名 臨床歯科栄養学～歯科に求められる栄養の基礎知識～	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 貴俊  (Murata Takatoshi)  (10313529)	鶴見大学・歯学部・講師   (32710)	
研究分担者	下田 信治  (Shimoda Shinji)  (30139620)	鶴見大学・歯学部・教授   (32710)	
研究分担者	岡田 彩子  (Okada Ayako)  (60515584)	鶴見大学・歯学部・助教   (32710)	



6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	広田 一男  (Hirota Kazuo)  (60563848)	鶴見大学・歯学部・非常勤講師    (32710)	
研究分担者	野村 義明  (Nomura Yoshiaki)  (90350587)	鶴見大学・歯学部・学内教授    (32710)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関