

学位論文題名

高齢喫煙者の唾液中の抗酸化酵素に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

タバコの煙には多くの有害物質が含まれ、それらは口腔疾患の病因論におけるリスクファクターと考えられている。なかでも活性酸素(Reactive Oxygen, RO)は歯周疾患や口腔癌の発症や進行に関連する物質として、最近注目されている。一方、生体には抗酸化機構があり、口腔では唾液中の抗酸化酵素がROによる損傷から口腔組織を防御しているものと考えられている。しかし、喫煙が高齢者における唾液の抗酸化機構にどのような影響を及ぼしているかを科学的に評価した研究はない。そこで本研究では、喫煙が高齢者の唾液の抗酸化機構に及ぼす影響を明らかにする目的で、65歳以上の喫煙者と非喫煙者における唾液中の抗酸化酵素について生化学的に解析し、それらを比較検討した。

【対象と方法】

1) 被験者：喫煙者(喫煙者群：26名)、非喫煙者(非喫煙者群：37名)ともすべて男性で著者らの勤務する歯科医療機関の来院患者、あるいは老人保健施設に入所している65歳以上で慢性疾患に対する服薬をしていない健康な高齢者とし、喫煙者に対しては、1日あたりの喫煙本数、喫煙歴を問診により確認した。

2) 唾液の採取：20分間の安静時唾液を吐き出し法にて採取し、ただちに遠心分離(10,000rpm×10分)し、上清を唾液サンプルとして-30℃で凍結保存した。なお、採取にあたっては2時間前からの飲食ならびに喫煙を禁じ、直前に飲料水による十分な含嗽を行った。

3) 測定項目：総タンパク質量、喫煙の指標としてチオシアネート(thiocyanate:SCN)量、そして唾液中の抗酸化酵素であるペルオキシダーゼ(oxidase:POX)の比活性、およびCu/Znスーパーオキシドディスムターゼ(Cu/Zn superoxide dismutase: Cu/Zn-SOD)量、グルタチオンペルオキシダーゼ(glutathion peroxidase: GPx)量を測定した。

4) 測定方法：

- (1) 総タンパク質量の測定；標準法キット(Protein Assay, Bio-Rad, USA)
 - (2) SCNの定量；Buttsらの方法で定量
 - (3) Cu/Zn-SODの定量；human Cu/Zn-SOD ELISAキット
 - (4) POX比活性の測定；Pruittらの方法
 - (5) GPxの定量；BIOXYTECH pl・GPx-ELISA Assayキット
- 5) 統計学的解析方法：SPSS 11.0J for Windowsを用いた(Man-Whitney test、 $p < 0.05$)。

【結果】

1) 被験者：平均年齢は、非喫煙者群69.3歳(最高齢80歳)、喫煙者群71.1歳(最高齢91歳)であり、両群間の年齢分布に統計学的有意差は認められなかった。採取した唾液量

(平均値±標準偏差)は非喫煙者群 3.7 ± 2.6 (mg/20min)、喫煙者群 3.8 ± 2.1 (mg/20min) で両群に有意差を認めなかった。

2) 唾液中のタンパク質量：非喫煙者群 0.67 ± 0.36 (mg/ml)、喫煙者群 0.56 ± 0.29 (mg/ml) であり、両者間に統計学的有意差は認められなかった。

3) 唾液中の SCN⁻量：非喫煙者群 31.9 ± 21.8 (μ g/ml)、喫煙者群 67.5 ± 53.0 (μ g/ml) で、非喫煙者群に比べて喫煙者群の方が有意に高かった ($p < 0.01$)。

4) 唾液中の Cu/Zn-SOD 量：非喫煙者群 89.6 ± 140.7 (ng/mg 唾液タンパク質)、喫煙者群 192.5 ± 170.4 (ng/mg 唾液タンパク質) で、非喫煙者群に比べて喫煙者群の方が有意に高かった ($p < 0.01$)。また、SCN⁻量との間に正の相関 ($r=0.36$, $p < 0.001$) が認められた。

5) 唾液中の POX 比活性：非喫煙者群 0.07 ± 0.07 (U/mg 唾液タンパク質)、喫煙者群 0.06 ± 0.06 (U/mg 唾液タンパク質) で、両者間に有意差は認められなかった。

6) 唾液中の GPx 量：非喫煙者群 3.2 ± 2.6 (μ g/mg 唾液タンパク質)、喫煙者群 2.3 ± 1.3 (μ g/mg 唾液タンパク質) で、両者間に有意差は認められなかった。また、POX 比活性との間に正の相関 ($r=0.24$, $p < 0.05$) が認められた。

【考察】

喫煙によってシアン化水素やシアン化合物の体内取込み量が増加することから、喫煙者の唾液中 SCN⁻量は非喫煙者のそれに比べ有意に高くなる。今回の研究では、高齢者における唾液中の SCN⁻量は喫煙者が非喫煙者のほぼ2倍であり、唾液中の SCN⁻量は喫煙によるシアン化水素の曝露量の増加を示していると考えられた。また、高齢喫煙者においては唾液中の SCN⁻量だけでなく、Cu/Zn-SOD 量も非喫煙者に比し有意に高く、かつ SCN⁻量と Cu/Zn-SOD 量との間に正の相関を認めた。活性酸素消去を担う Cu/Zn-SOD 量の増加を酸化ストレスに対する生体の防御機構として捉えるなら、唾液中の SCN⁻量と Cu/Zn-SOD 量の両者を分析することにより、それぞれを喫煙による活性酸素の曝露量と酸化ストレスを把握する指標として利用できる可能性が示唆された。

唾液の生体防御機構において POX は主要な役割を果たしている。喫煙が唾液中の POX 活性を低下させることは、すでに報告されている。しかし、本研究においては、唾液中の POX 活性には喫煙者群と非喫煙者群との間に差が認められなかったことから、喫煙から2時間以上経過した安静時唾液中の POX 活性に喫煙の影響はないものと考えられた。また、GPx は、CAT や Cu/Zn-SOD とともに細胞内外に広く分布し、活性酸素の毒性から生体を保護しているとされている。しかし、この酵素の唾液における抗酸化酵素としての働きはほとんど研究されていない。本研究では、GPx 量が POX 比活性と正の相関関係を示すことから、GPx は POX 同様に唾液腺から分泌され、唾液腺組織や唾液中において抗酸化酵素として生体防御に働いている可能性が示唆された。

以上のことから、喫煙は高齢者の唾液中の抗酸化機構に影響を及ぼしていることが明らかになった。また、喫煙により口腔に取り込まれた RO に対する生体防御に唾液中の抗酸化酵素が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 井 上 農 夫 男

副 査 教 授 森 田 学

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

高齢喫煙者の唾液中の抗酸化酵素に関する研究

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者より提出論文の概要が説明され、その後、申請者に対し提出論文とそれに関連した学科目について口頭試問が行われた。以下に、論文の要旨と審査の内容を述べる。

たばこ煙に含まれる活性酸素 (Reactive Oxygen, RO) は、歯周疾患や口腔癌など口腔疾患のリスクファクターとされている。一方、生体には抗酸化機構があり、口腔では唾液中の抗酸化酵素が RO による損傷から口腔組織を防御していると考えられている。しかし、高齢者における唾液の抗酸化機構、ならびに喫煙が抗酸化酵素へ及ぼす影響を科学的に評価した研究はない。そこで本研究では、喫煙が高齢者の唾液中の抗酸化酵素へ及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

健康な 65 歳以上の喫煙者 (喫煙者群、26 名) および非喫煙者 (非喫煙者群、37 名) から、安静時全唾液を吐き出し法にて採取し、唾液中の抗酸化酵素について生化学的に解析し、それらを比較検討した。なお、喫煙者においては喫煙後 2 時間以上経過した後に採取した。喫煙の指標として唾液中のチオシアネート (thiocyanate: SCN^-) 量、そして唾液中の抗酸化酵素活性の指標としてペルオキシダーゼ (peroxidase: POX) 比活性と Cu/Zn スーパーオキシドディスムターゼ (Cu/Zn superoxide dismutase: Cu/Zn-SOD) 量、細胞外グルタチオンペルオキシダーゼ (extracellular glutathion peroxidase: eGPx) 量を測定した。各測定項目について喫煙者群と非喫煙者群の群間および各測定項目間でそれらを比較検討した。

喫煙によってシアン化水素やシアン化合物の体内取込み量が増加することから、喫煙者の唾液中 SCN^- 量は非喫煙者のそれに比べ有意に高くなることが知られている。本研究では、高齢者における唾液中の SCN^- 量は喫煙者が非喫煙者のほぼ 2 倍であった。また、高齢喫煙者においては唾液中の SCN^- 量だけでなく、Cu/Zn-SOD 量も非喫煙者に比し有意に高く、かつ SCN^- 量と Cu/Zn-SOD 量の間には正の相関を認めた。唾液中 SCN^- 量が高値を示す場合は、 SCN^- 量と喫煙量との相関性が高いとされている。また、酸化ストレスがヒト Cu/Zn-SOD の遺伝子発現を誘導することが知られており、喫煙者における Cu/Zn-SOD 量の増加は喫煙による酸化ストレスが唾液腺細胞に遺伝子発現を誘導し Cu/Zn-SOD 量が増加したものと推察している。

喫煙直後には唾液中の POX 活性は半減するが、30 分後にはその活性は回復することが報告されている。本研究においては、喫煙者における唾液中の POX 活性は非喫煙者と有意差が無く、喫煙後 2 時間以上経過した唾液では喫煙の影響はないものと考えた。また、eGpx は細胞外分泌型の抗酸化酵素として、血液中において活性酸素の毒性から生体を保護している。しかし、この酵素の唾液における抗酸化酵素としての働きはほとんど解明されていない。今回の研究で、eGpx 量は POX 比活性と正の相関関係を示すことから、POX 同様に唾液腺から分泌され、抗酸化酵素として生体防御に働いているのではないかと考えている。

以上のことから、本研究では高齢者における唾液中の POX 活性や eGpx 量に喫煙の影響はみられなかったが、Cu/Zn-SOD 量には有意な増加がみられ、喫煙が唾液の抗酸化酵素に影響を及ぼすことが明らかになった。また、Cu/Zn-SOD 量の増加から、喫煙により口腔に発生した RO に対する生体防御に唾液中の抗酸化酵素が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

論文について概要が説明された後、各審査員より、本研究の背景、方法、結果、考察および関連の研究について質問がなされた。論文提出者はいずれの質問に対しても明確で的確な回答し、さらに今後の研究についても発展的な将来展望を示した。

試問の結果、本論文は高齢喫煙者における唾液中の抗酸化酵素、Cu/Zn-SOD が増加していることをはじめて明らかにした点において新規性が高く、今後の歯科医学の発展にも大きく貢献するものと評価した。さらに、学位申請者は、本研究を中心とした専門分野はもとより、関連分野についても十分な学識を有していることを審査員一同が認めた。

よって、学位申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。