

総説

酸化ストレスと歯周病
生活習慣病・血管病としての歯周病

李 昌一

要約：生体分子の酸化，とくに生体膜の脂質過酸化反応による損傷，タンパク質および核酸の変性の原因となる活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) ・フリーラジカルによる酸化ストレス (oxidative stress) は糖尿病，動脈硬化，高血圧症などの生活習慣病だけではなく，脳梗塞，認知症に代表される神経変性疾患メカニズムの原因として知られている。ROSによる酸化ストレスが原因とされている疾患は抗酸化システムの能力が減弱し，除去できないROSの産生量増加による酸化作用が強くなるバランスが崩れた状態である。この酸化ストレスは様々な疾患の原因となり，とくに血管病であり，生活習慣病である動脈硬化，高血圧症，糖尿病を惹き起こす。同様に，生活習慣病の一つでもある歯周病の発症メカニズムに酸化ストレスが関与していると言われている。全身疾患と歯周病との新しい相関概念としてペリオドンタルメディスン (periodontal medicine) という考えが米国から提示された。ペリオドンタルメディスンは全身疾患が歯周病に影響を及ぼすという従来の概念のみならず，歯周病が全身の健康状態に強い影響を与えるという二方向性の有用な情報を蓄積する新しい歯周病の疾患概念である。歯周病に対するヒトやラットモデルの抗炎症作用を中心とした様々な抗酸化物質による治療的効果が報告されており，歯周病の主要な要因として酸化ストレスが関与していることが考えられる。しかしながら，臨床の現場あるいは，感染症であるとともに血管病あるいは酸化ストレスが惹き起こす炎症による疾患としての歯周病が認知されているとはいえない。今後，様々な実験モデル，抗酸化物質を用いた臨床応用や新しい歯周病検査開発の試みなどの研究が続けられ，歯周病の酸化ストレス病因論としてのメカニズム解明を

続ける必要がある。

1. はじめに

生体分子の酸化，とくに生体膜の脂質過酸化反応による損傷，タンパク質および核酸の変性の原因となる活性酸素種 (reactive oxygen species : ROS) ・フリーラジカルによる酸化ストレス (oxidative stress) は糖尿病，動脈硬化，高血圧症などの生活習慣病だけではなく，脳梗塞，認知症に代表される神経変性疾患メカニズムの原因として知られている (図1)(1)。同様に生活習慣病でもある歯周病の発症メカニズムに酸化ストレスが関与していると言われているが(2)，その酸化ストレスの面からの詳細な疾患メカニズムの解明や臨床応用の実現にまでは至っていない。21世紀に入って，全身疾患と歯周病との新しい相関概念としてペリオドンタルメディスン (periodontal medicine ; 歯周病医学) という考えが米国から提示された (図2)(3-5)。ペリオドンタルメディスンは全身疾患が歯周病に影響を及ぼすという従来の概念のみならず，歯周病が全身の健康状態に強い影響を与えるという二方向性の情報を蓄積する新しい歯周病の疾患概念である。糖尿病の一合併症と言われていた歯周病であるが(6)，歯周病になることで糖尿病などの全身疾患に罹患する可能性があるかもしれないということである。これまでの歯周病発症メカニズムは *Porphyromonas gingivalis* に代表される歯周病原細菌を主たる原因とした感染症であるという考え方が主流である。糖尿病および動脈硬化などの循環疾患において先に述べたように酸化ストレスが主要な原因であるけれども，近年全身疾患，とくに歯周病と心血管疾患とのこのペリオドンタルメディスンという相関性は否定された(7)。この場合の

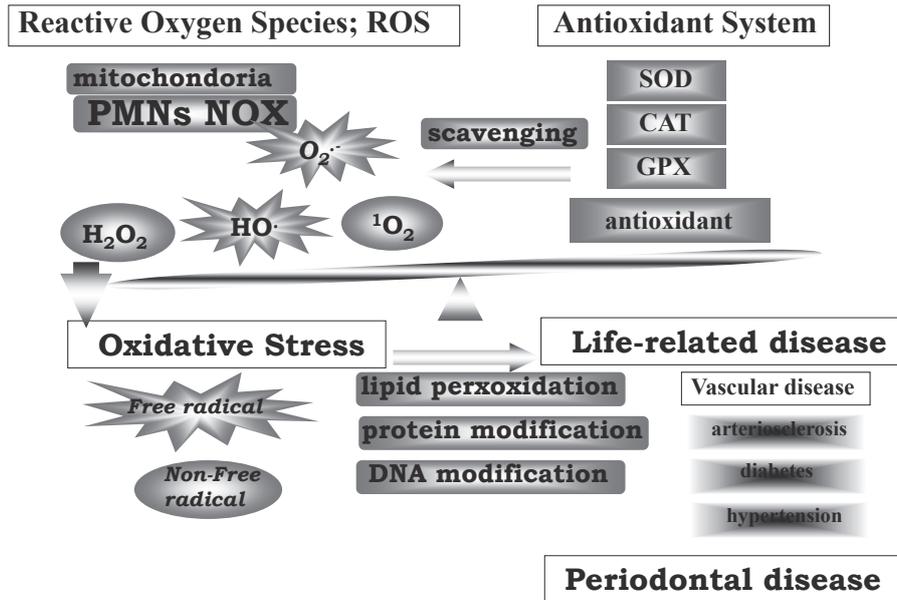


図1 酸化ストレス (oxidative stress) と抗酸化システム (antioxidant system) : 生活習慣病, 血管病としての歯周病への酸化ストレスの関与
 PMNs : polymorphonuclear leukocytes, NOX : nicotine adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, $O_2^{\cdot-}$: superoxide, 1O_2 : singlet oxygen, H_2O_2 : hydrogen peroxide, $HO\cdot$: hydroxyl radical, HOCl : hypochlorous acid, MPO : myeloperoxidase, SOD : superoxide dismutase, CAT : catalase, GPX : glutathione peroxidase, GSH : glutathione.

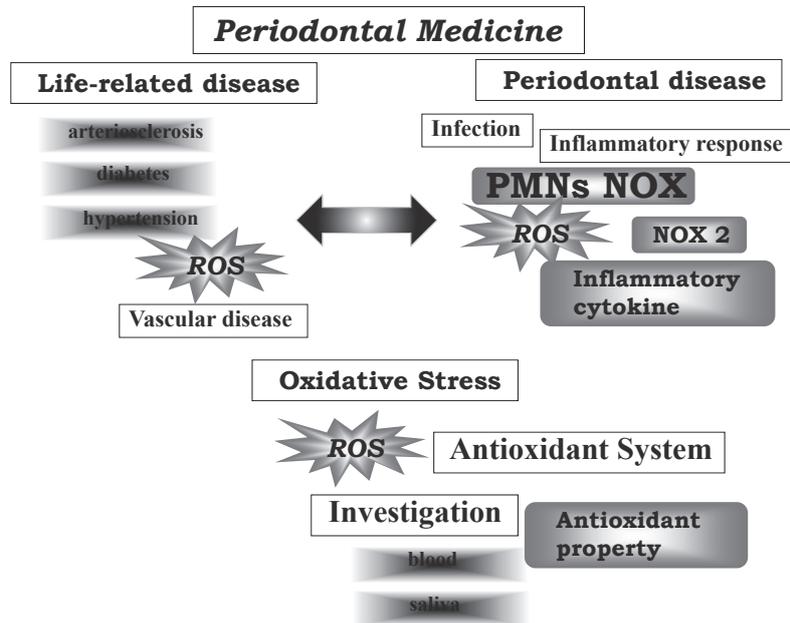


図2 ペリオドンタルメディスン (periodontal medicine : 歯周病医学)
 酸化ストレスが感染による炎症性疾患とされている歯周病に関与することで, 歯周病は血管病であり, 生活習慣病である動脈硬化, 高血圧症, 糖尿病などの全身疾患と双方に関連性がある。また, 抗酸化能評価による検査はこの疾患概念を確認できるかもしれない。
 PMNs : polymorphonuclear leukocytes, NOX : nicotine adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase, ROS : reactive oxygen species.

ペリオドンタルメディスンという概念を考えるには, 感染症だけではなく, 歯周病は酸化ストレスも関与する疾患であるという議論が先の報告(7)でも欠けている。歯周病が歯周病原細菌による感染症だけではなく, 糖尿病, 動脈硬化同様の酸化ストレスによる「血管病」

としての認識が, 今後歯周病治療の臨床応用に重要になることを期して, 酸化ストレスの歯周病への関与について概説したい。

2. 酸化ストレスと抗酸化システム

ヒトは呼吸をすることで「酸素」を取り入れ、効率よくミトコンドリアでエネルギーを獲得する。このミトコンドリア電子伝達系から漏れて、数パーセントの割合で産生するのがROSである。後に述べるが、生体における産生系は必ずしもミトコンドリアだけではない。一般にROSは不安定で寿命が短く、反応性に富む酸素由来の分子種である(1, 2, 8)。ROSは構成される電子の最外殻軌道に電子にならない不対電子を有しているスーパーオキシドアニオンラジカル(一般にスーパーオキシドといわれる; $O_2^{\bullet-}$)やヒドロキシルラジカル(HO^{\bullet})のようにフリーラジカルの性質を有するものと過酸化水素(H_2O_2)や一重項酸素(1O_2)のように不対電子を有さないフリーラジカルに含まれないものがある(図1)。ROSの生体に対する作用の中で最も問題になるのが、細胞の細胞膜における脂質を酸化する作用で、この反応は連鎖的に続くもので脂質過酸化反応と言われる。ROSは主としてこの脂質過酸化反応によって、細胞膜を変性させて細胞に障害を与えることで様々な病態を惹き起こす原因となる(図1)(1, 2, 8)。

ROSによる脂質過酸化作用を含めた生体の酸化作用に対して、生体はROSを消去する機能を有するスーパーオキシドジスムターゼ(superoxide dismutase: SOD)、カタラーゼ(catalase: CAT)、グルタチオンペルオキシダーゼ(glutathione peroxidase: GPX)などの抗酸化酵素やタンパク質(アルブミン、グロブリン)や尿酸等の生体内抗酸化物質によりROSによる細胞の酸化を防御するシステムを有しており、このシステムを抗酸化システムという(図1)(1, 2, 8, 9)。これら生体内抗酸化酵素・抗酸化物質に加え、生体外から主として食品として取り入れる抗酸化物質も抗酸化システムにおいては重要である(1, 2, 8, 9)。例えば、抗酸化ビタミンであるビタミンC、Eあるいはカロテノイドなどがあり、これらの物質はROSを直接消去する能力を有している(1, 2, 8, 9)。とくに脂溶性であるビタミンEはROSによる連鎖的な脂質過酸化反応を止める重要な抗酸化物質である(図1)(1, 2, 8, 9)。

一般に若年者や健康である場合はROS産生と抗酸化システムの生体内バランスは問題にならないが、例えばROSによる酸化ストレスが原因とされている疾患(歯周病を含めた生活習慣病)においては抗酸化システムの能力が減弱し、バランスが崩れ、消去できないROSの増加による酸化作用が強くなる。「酸化ストレス」とは、この両者のバランスにおいて「ROS産

生」側に傾き、バランスが崩れた状態をいうと定義される(図1)(1, 2, 8-10)。この「酸化ストレス」は様々な疾患の原因となり、とくに血管病であり、生活習慣病である動脈硬化、高血圧症、糖尿病を惹き起こす(図1)。SOD、CAT、GPxなどの抗酸化酵素、ビタミンC、E、カロテノイドなどの抗酸化物質はみなこれまで述べてきたようにROSを直接消去する能力を有している(図1)。従って、抗酸化能の本質は抗酸化システムにおける役割から理解されるように酸化ストレスを惹き起こす「ROSを消去・無毒化する能力」により、酸化ストレスを減弱させることである。この「ROSを消去・無毒化する能力」である抗酸化能を利用した薬剤・食品の臨床応用についても後ほど述べる。

3. 歯周病と酸化ストレス

歯周病は歯の支持組織である歯槽骨の吸収を主たる臨床的特徴とする炎症性疾患として知られている。循環系における多形核白血球(polymorphonuclear leukocytes: PMNs)等の炎症性細胞は感染における第一次の防衛因子である。口腔における細菌のプラークの蓄積と慢性炎症の進展に続いて、歯肉縁下歯石に対するPMNsの増加につながっていく。PMNsの病態生理学的な防御的役割は、重症の歯周病患者で起こるPMNsの低下あるいは傷害が見られるエビデンスにより支持されているが、歯周病早期にあるいは著しく進行した歯周病ではしばしば、相対的にPMNsの関与がみられないことも示されている。さらに、多くの研究では非合併症としての様々な程度の慢性歯周病においては、成人におけるPMNsの減少は観察されていない(11)。

血管平滑筋細胞、炎症性細胞からROSは産生され、 $O_2^{\bullet-}$ の主要な生成系としてnicotine adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase (NOX)があげられる。NOXには様々なサブタイプがあり、細胞内の異なる場所に局在している。NOXの触媒サブユニットは血漿外にもあり、 $O_2^{\bullet-}$ は細胞内外で産生している(12-14)。細胞外に産生された $O_2^{\bullet-}$ はchloride ion channel-3を介して細胞内に入るか、細胞外スーパーオキシドジスムターゼ(extracellular SOD: ECSOD)により不均化され H_2O_2 になる(15)。様々なサブタイプの中でNOX2が歯周組織における活性酸素生成の主たる生成源であるといわれている(16)。歯周病における活性酸素生成の亢進は一般に遺伝的な原因か、口腔内病的因子によるNOX機能の亢進のためと考えられる(16)。

PMNs凝集の増加はinterleukin (IL)-8, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, IL-1 β , そしてtumor necrosis factor (TNF)- α の発現の上昇と関連する。歯肉におけるIL-8, IL-1 β , TNF- α 産生源としてmacrophageとPMNsもしくは上皮細胞は重要である(17)。歯肉上皮細胞はPMNsによるROSに著しく感受性が高い(18)。歯周病原因子であるf-met-leu-phe (FMLP)や内毒素としてのlipopolysaccharide (LPS)に刺激されたPMNsによるヒト歯周組織線維芽細胞の傷害が確認されている(19)。化学的走化因子, 内毒素, サイトカインもしくは接着因子により活性化したPMNsは酸化ストレスを亢進させ, 歯周病における細胞傷害の原因となるかもしれない。また, PMNsのO₂^{•-}生成はROSだけではなく, 一酸化窒素(NO[•])とO₂^{•-}と反応して生成されるペルオキシナイトライト(ONOO⁻)によりフィードバック調節されるので(20), この領域の歯周病との関連性については今後の研究課題として残されている。

歯周病における歯周組織の酸化ストレスによる脂質過酸化反応の亢進が障害に関与している(21)。これまで歯周病の酸化ストレスマーカーとして唾液の8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG)とisoprostanes (IPs)が報告されている(22, 23)。リガチャー(結紮型)歯周病ラットモデルにおいて, 血漿中の脂質過酸化物の増加, 肝臓のGSH/GSSGの割合の減少, 肝臓におけるエタノール誘導脂質過酸化の増加が報告されている(24)。さらに, 同ラットモデルにおいて歯周組織と同様に血漿と大動脈における脂質過酸化は亢進し, 大動脈において動脈硬化関連遺伝子の発現, 組織的変化および脂質過酸化の亢進が確認された(25)。我々の研究においても, ラット糖尿病もしくはLPS惹起歯周病モデルでは歯肉循環系の血管内皮機能は酸化ストレス亢進により減弱したことを報告している(26)。これらのエビデンスは血管病(例えば全身疾患では動脈硬化, 糖尿病)としての歯周病を示唆し, さらに酸化ストレスがこれら疾患と同様に歯周病に関与していることを示唆している。先にも述べたが循環疾患と歯周病との新しい相関概念であるペリオドンタルメディスンが近年否定された論議(7)では, 歯周病を感染症だけではなく, 感染症と酸化ストレスによる血管病として考えることが欠けている。全身同様, 歯周組織で酸化ストレス亢進による病変が起きていれば, 糖尿病にみられる全身の微小循環系の破綻が歯周組織微小循環系にも起きている可能性があり, その疾患メカニズムからの相関性, 即ちペリオドンタルメディスンは成り立つと思われる(図2)。しかしながら, この観点からの

さらなる研究の推進が必要であることはいうまでもない。すなわち, 動脈硬化, 高血圧症, 糖尿病などと同様に歯周病が血管病であるという可能性から, 同様の生活習慣病であるという根拠となる研究の推進がさらに必要である(図1)。

4. 歯周病と抗酸化システム

慢性歯周病においてはSOD活性は歯肉組織で亢進したが, 歯肉溝浸出液では亢進がみられなかった(27)。興味あることに, ラットとヒトにおいて歯周病の罹患度と唾液のO₂^{•-}消去活性とSOD活性に有意な相関がみられる(28)。全身と局所において過酸化脂質のマーカーであるmalondialdehyde (MDA)は歯周病患者で, 喫煙者である場合に増加した。歯周病患者では局所のSOD, GSH-PxとCAT活性は減少し, 喫煙により上昇する(29)。血漿のビタミンCレベルは相対的に低いが, 個々の年長者の歯周病患者において統計的に有意な相関がみられ(30), ラット歯周病モデルにおいてはビタミンCの全身投与では動脈硬化, 8-OHdGレベル, GSH/GSSGの割合において歯周病による酸化ストレスを減少させる結果が報告されている。ビタミンCは臨床的に炎症性遺伝子の発現を抑えることにより歯周病の酸化ストレスを減少させる臨床的応用の可能性が示唆された(24, 31)。抗酸化ビタミンで脂質過酸化反応を止めることが可能であるビタミンEは様々な報告で歯周病の効果が確認されていないが, 他の報告では効果が確認されたデータも報告されている(32)。最近, ビタミンEとSODを併用して投与することで歯周病の治療が進んだと報告された(33)。しかしながら, リガチャー(結紮型)歯周病ラットモデルではビタミンEは歯槽骨吸収も不安反応も防げなかったとの報告もある(34)。

様々な報告で抗酸化物質が歯周病の酸化的傷害に関与していることが示唆されている(32)。緑茶の成分であるカテキンはグラム陰性嫌気性桿菌に抗菌作用を有し, 機械的清掃治療と徐放局所デリバリーシステムでカテキン投与を併用すると歯周病に効果的であった(35)。細胞膜を通過可能なROSのスカベンジャーであるtempol(4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl)はラット歯周病モデルにおける炎症性パラメーターを全て減少させた(36)。N-acetylcysteine (NAC)は強力な抗酸化物質GSHの前駆体で, LPS刺激歯肉線維芽細胞への抗炎症作用を発揮し, 少なくともmitogen-activated protein kinase (MAPK)経路のダウンレギュレーションが一部関与しているかもしれない(37)。Quercetinもフラボノイ

下の一つで、抗酸化作用を有し、同様にリガチャー（結紮型）歯周病ラットモデルにおいて亢進した炎症反応と歯槽骨吸収を減少させた(38)。これらの結果から、将来的に抗酸化物質の臨床応用の有用性を証明するための研究を現在我々は進めている。

5. 歯周病検査における抗酸化能評価の意義

これまで述べたように、様々な抗酸化物質による歯周病に対するヒトやラットモデルの抗炎症作用を中心とした治療的効果が報告されていることから、歯周病の主要な要因として酸化ストレスが関与していることが理解される。しかしながら、先に述べたように炎症による血管病あるいは酸化ストレスが惹き起こす疾患としての歯周病は未だ臨床の現場でも認知されているとは言いがたい。また、本稿で何度も述べている全身疾患、とくに循環疾患と歯周病との新しい相関概念であるペリオドンタルメディスンが近年否定された(7)という論議の背景には、従来の歯周病検査ではない、口腔における歯周内科的検査と抗酸化能検査が開発されていない現状があると思われる。歯周病において、抗酸化酵素活性(27-29)や、MDA, 8-OHdG レベル(22, 24, 25, 29, 39)などの酸化ストレスバイオマーカーによる酸化ストレス評価法がこれまで行われてきた。しかしながら、現在主流となっている抗酸化能評価法に利用されている酸化ストレスマーカーはROSによる酸化ストレスによって起こる抗酸化システムの変動、酸化生成物の増加である。これらはROSによる生体の適応性と二次的な反応生成物を評価したものであり、酸化ストレスを惹き起こすROSを直接評価していない。実際、測定対象であるROSの寿命が短く、in vivo 測定、とくにヒトにおける測定は困難である。

電子スピン共鳴 (electron spin resonance : ESR) 法は不対電子 (電子スピン) を有する ROS を特異的に検出する唯一の方法である(1, 7, 39, 40)。この ESR 法の生物医学的応用を我々もこれまで進めてきた結果(8, 40)、酸化ストレスを惹き起こす ROS の直接的な定性、定量、そして実際に生体系 (小動物) で ROS が産生している証拠である酸化ストレスを含めた酸化還元 (redox) 反応を情報として与えることが可能である(1, 8, 40)。

ESR法による食品因子を中心とした抗酸化物質の抗酸化能評価について、抗酸化能の本質的な意義である直接的な ROS 消去能と生体内酸化ストレス評価を in vitro ESR法と in vivo ESR法により既に報告した(8, 40)。アメリカ合衆国農務省 (USDA) は 2012 年にこれまで食品の抗酸化能評価法において最も認知されて

いた酸素ラジカル吸収能 (oxygen radical absorbance capacity : ORAC) 法による ORAC データベースを撤回すると発表した。ESR法による抗酸化能評価では評価を行う抗酸化物質がいかなる ROS に対して消去活性があるのか (定性)、どれくらい消去活性を有しているのか (定量) という直接的な ROS に対する抗酸化能評価をすることが可能である(8, 40)。さらに、唾液、血漿などのヒトの体液を使用することも可能である(27, 41-43)。近年本章でも触れた $O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} , 1O_2 などの主要 ROS 消去能だけではなく、これら ROS から生成する脂質由来ラジカルを含めた、ヒト血漿サンプルでの抗酸化能評価や ORAC法で用いられているラジカルを使用した ESR法による ORAC法等が報告されている(41-43)。私どもの教室でも ESR法による生体サンプルとして非侵襲的で簡易に採取できるヒト唾液を用いた抗酸化能評価を、現在抗酸化食品因子において行っている(27)。

さらに、ヒト血漿サンプルで実際産生している脂質ラジカルをスピントラップした方法も開発され応用されている(41-43)。定量的な比較は ORAC法で従来行われたことであるが、ESR法による抗酸化能評価も可能で、さらに定性的な評価も可能であり、この章で述べた通り小動物、そして具体的な紹介はできなかったが、ヒト生体試料でも抗酸化能評価法が開発・応用されている(28, 40-43)。現在 ESR法による抗酸化能評価と歯周病との相関についても研究対象者の母集団を増やして研究を進めており、炎症性マーカーとの相関も評価可能となるエビデンスを得ている (未発表データ)。これらの研究は、今までの歯周病検査に臨床応用されていない非侵襲的で簡便に採取可能な唾液の抗酸化能評価による新しい口腔検査法につながると考えている。この検査法はペリオドンタルメディスンの考え方からすれば、歯周病だけではなく、他の血管病の糖尿病、動脈硬化などの生活習慣病の検査にもつながるものであるし、この概念を証明する検査になるかもしれない (図 2)。

6. おわりに

45歳以上で40%以上 (「平成17年度歯科疾患実態調査：一人平均喪失歯数の年次推移, 5歳以上, 永久歯」2005 厚生労働省) という高い罹患率を示す歯周病は国民病ともいえる。歯周病原細菌の感染防御に対する免疫反応により歯周ポケットから遊走した PMNs は、本稿で述べたように感染における第一次の防衛因子として常に ROS を産生している。また古くから、歯科臨床においては ROS である次亜塩素酸と過酸化水素の

抗菌作用と酸化作用を利用してROS自身が根管消毒剤、漂白剤として使用されていることなど、歯科疾患や歯科臨床とROSによる酸化ストレスとは密接に関わっている。しかしながら、これまでの酸化ストレスという切り口から、う蝕、歯周病の歯科2大疾患への臨床研究を含めたアプローチは必ずしも十分とはいえなかった。本稿で述べたように、今様々な実験モデルへの酸化ストレスの関与、抗酸化物質を用いた臨床応用、そして新しい内科的な歯周病検査開発の試みなどは、ようやく口火が切られた状況にある。このような研究が続けられ、歯周病の感染症だけではなく、病因論のメカニズムへの酸化ストレス関与のより詳細な解明が今後必要であるだろう。近い将来、この分野の研究成果により臨床応用が可能になれば、高い有病者率である歯周病の予防と治療に貢献できる研究分野となることを願うものである。

著者の利益相反：開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Halliwell B, et al. *Br J Pharmacol*. 2004;142:707-722.
- 2) Lee M-C. *Studies on Gingivitis and Periodontal Disease*. Springer; 2014. p. 3-14.
- 3) Nibali L, et al. *Curr Pharm Des*. 2013;19:2687-2697.
- 4) Bullon P, et al. *J Dent Res*. 2009;88:503-518.
- 5) Genco RJ, et al. *Compend Contin Educ Dent*. 2001;22:21-23.
- 6) Taylor GW, et al. *Ann Periodontol*. 2001;6:99-112.
- 7) Lockhart PB, et al. *Circulation*. 2012;125:2520-2544.
- 8) Lee MC. *Yakugaku Zasshi*. 2008;128:753-763.
- 9) Niki E. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:503-515.
- 10) Sies H. *Exp Physiol*. 1997;82:291-295.
- 11) Seymour GJ, et al. *J Oral Pathol*. 1986;15:125-131.
- 12) Serrander L, et al. *Biochimie*. 2007;89. 1159-1167.
- 13) Frey RS, et al. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:791-810.
- 14) Gongora MC, et al. *Hypertension*. 2006;48:473-481.
- 15) Hawkins BJ, et al. *Mol Biol Cell*. 2007;18:2002-2012.
- 16) Giannopoulou C, et al. *Semin Immunopathol*. 2008;30:273-278.
- 17) Liu RK, et al. *J Periodontol*. 2001;72:1545-1553.
- 18) Altman LC, et al. *J Periodontal Res*. 1992;27:70-79.
- 19) Deguchi S, et al. *J Periodontal Res*. 1990;25:293-299.
- 20) Lee C, et al. *J Biol Chem*. 2000;275:38965-38972.
- 21) Tsai CC, et al. *J Periodontal Res*. 2005;40:378-384.
- 22) Sawamoto Y, et al. *Oral Microbiol Immunol*. 2005;20:216-220.
- 23) Wolfram RM, et al. *Biofactors*. 2006;28:21-31.
- 24) Tomofuji T, et al. *Free Radi Biol Medi*. 2009;46:163-168.
- 25) Ekuni D, et al. *J Periodontal Res*. 2009;44:434-442.
- 26) Sugiyama S, et al. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;51:108-113.
- 27) Akalin FA, et al. *J Clin Periodontol*. 2005;32:238-243.
- 28) Yoshino F, et al. *Arch Oral Biol*. 2012;57:654-662.
- 29) Tonguc MO, et al. *J Periodontol*. 2011;82:1320-1328.
- 30) Amarasena N, et al. *J Clin Periodontol*. 2005;32:93-97.
- 31) Ekuni D, et al. *Arch Oral Biol*. 2009;54:495-502.
- 32) Battino M, et al. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1999;10:458-476.
- 33) Singh N, et al. *J periodontol*. 2013;85:242-249.
- 34) Carvalho Rde S, et al. *Arch Oral Biol*. 2013;58:50-58.
- 35) Hirasawa M, et al. *J Periodontal Res*. 2002;37:433-438.
- 36) Di Paola R, et al. *J Clin Periodontol*. 2005;32:1062-1068.
- 37) Kim DY, et al. *Arch Pharm Res*. 2007;30:1283-1292.
- 38) Cheng WC, et al. *J Periodontal Res*. 2010;45:788-795.
- 39) Komatsu T, et al. *Arch Oral Biol*. 2013;58:1246-1250.
- 40) Lee M-C. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;52:1-8.
- 41) Oowada S, et al. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;51:117-121.
- 42) Sato K, et al. *Biol Pharm Bull*. 2008;31:1855-1859.
- 43) Nakajima A, et al. *Anal Bioanal Chem*. 2012;403:1961-1970.