

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

宮島 真一

論文題目 動脈硬化初期病変に対する歯周炎の関与

## I. 緒言

歯周病は、歯周ポケット内に存在する細菌の感染が中心となって歯周組織が破壊される慢性炎症性疾患である。う蝕とともに歯科における2大疾患とされる歯周病は、歯周病関連細菌や、その代謝産物の作用により、炎症反応が亢進する結果、歯肉の炎症や歯槽骨の吸収が進行する。症状が重篤化すると歯は動揺し、支持を失った歯は脱落する。

動脈硬化は血管壁の機能障害および炎症を基盤とした複雑な病理過程により形成される進行性の病態である。血管の内皮機能障害に始まり、白血球（単球、リンパ球）の血管壁への接着および内膜浸潤が生じ、単球由来のマクロファージおよび平滑筋細胞の泡沫化が進み、その結果形成される粥腫（プラーク）は血管内腔の狭小化をもたらす。白血球の接着および浸潤には内皮細胞における vascular cell adhesion molecule type-1 (VCAM-1)、intercellular adhesion molecule type-1 (ICAM-1) 等の接着分子発現が重要な役割を果たす。炎症性細胞から放出される interleukin (IL)-1、tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 等の炎症性サイトカインはプラークの脆弱性や血栓形成に関与し、動脈硬化の病態形成において重要な役割を果たしている。さらに、これらサイトカインの刺激により誘導される monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) 等のケモカインは白血球の遊走に重要な役割を果たす。

近年、歯周炎が動脈硬化の進展に関与する可能性が報告されているが、その機序については、未だ一定の見解が得られていない。今回、歯周炎モデルラットを用いてその機序について検討を行った結果、歯周組織において産生される炎症性サイトカインが、大動脈において接着分子発現を亢進させること等を明らかにした。こうした事実は、動脈硬化の初期病変において歯周炎が重要な役割を担っている可能性を示唆している。

## II. 実験材料および方法

### 1. 実験動物および実験方法

実験動物には7週齢雄性、Sprague-Dawley (SD) ラットを用いた。

### 2. 実験的歯周炎の誘導

歯周炎を惹起させる目的で、ジエチルエーテル全身麻酔下において、上顎両側第二臼歯の歯頸部に縫合用ナイロン糸を全周に巻いて結紮し、歯周炎群とした。また、無処置のラットを対照群とした。

### 3. 組織採取

実験的歯周炎作成4週間後に、正常ラット、歯周炎誘導ラットともにペントバルビタール投与により屠殺した。遺伝子解析用に上顎両側第二臼歯の頬側歯肉および胸部大動脈を採取し、液体窒素で凍結させ、 $-80^{\circ}\text{C}$ に保った。また胸部大動脈は免疫組織染色のために4%パラホルムアルデヒドを用いて固定した。歯槽骨のmicro CT計測を行うため、上顎を採取し10%ホルマリン溶液を用いて固定した。

#### 4. Micro CT による歯槽骨の撮影

Micro Computer Tomography を使用し、実験的歯周炎による歯槽骨の形態学的変化を確認した。撮影条件は管電流 88mA、管電圧 90kV、撮影時間は 2 分間とし、上顎右側第二臼歯について 50  $\mu$ m の幅で断層撮影を行った。画像再構成ソフトには、i-view タイプ R を使用した。得られたデータは ATLAS volume tiff converter を用いて CT 値を校正した。校正は air が -1000HU、使用したテフロン棒の CT 値が 20HU であることから、この 2 点を基準とした。撮影した画像を画像解析ソフト を用い、コンピューター上で三次元構築し、上顎右側第二臼歯近心根における矢状断像を作成し、セメントエナメル境から近心頬側根における歯槽骨頂までの距離を計測した。

#### 5. 歯肉および大動脈における遺伝子発現解析

頬側歯肉および胸部大動脈の total RNA は、RNeasy を用い、抽出した。Total RNA より、Superscript III RNase H-Reverse Transcriptase を用いて cDNA を合成した後、real-time PCR 法にて解析した。TaqMan Gene Expression Master Mix および TaqMan probe を用い、95°C 1 分、52°C 1 分、72°C 30 秒、40 サイクルの反応を、ABI Prism 7000 にて行った。データ解析は Ct 値の差から相対定量を行う  $\Delta\Delta$ Ct 法により施行した。内在性コントロールとして  $\beta$ 2 microglobulin 特異的プローブを用い、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、ICAM-1 および VCAM-1 遺伝子発現について検討した。

#### 6. 歯肉および大動脈における病理組織学的解析

上顎を川本法(未脱灰凍結切片作成法)に従い専用の包埋剤 (SCEM) で包埋し、切片支持用粘着フィルム (Cryofilm type I)、専用封入剤 (SCMM-R2) を使用し、上顎両側第二臼歯を頬舌方向に、厚さ  $5 \mu\text{m}$  で連続組織切片を作製した。組織切片はヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し、炎症性細胞を観察した。

また大動脈を切り開き、VCAM-1 抗体および Alexa Fluor Dyes を用いて動脈表層の免疫組織染色を行った後に、専用封入剤を使用し顕微鏡にて観察した。

## 7. 統計学的解析

全ての値は、平均値±標準誤差で表し、統計学的解析は Student's *t*-test を用いて統計学的に検討し、危険率は  $p < 0.05$  をもって有意とした。

## III. 結果

### 1. 体重

歯周炎群と対照群の間に有意な差を認めなかった。

### 2. 実験的歯周炎による歯槽骨吸収

歯周炎群はナイロン糸を留置した部位を中心として著明な歯槽骨の吸収を認めた。また、セメントエナメル境 (CEJ) から歯槽骨頂までの距離を計測した結果、歯周炎群では対照群と比較して有意な歯槽骨の吸収がみられた。

### 3. 歯肉における病理組織学的所見

歯肉切片の H-E 染色により炎症性細胞浸潤の評価をした。対照群ラット歯周組織では、炎症性細胞浸潤は認められないが、歯周炎の惹起により炎症性細胞浸潤が増加していた。

#### 4. 歯肉における TNF- $\alpha$ および MCP-1 遺伝子発現

歯周炎群ラット歯肉は、対照群と比較して有意な TNF- $\alpha$  および MCP-1 遺伝子発現の増加を認めた。

#### 5. 大動脈における TNF- $\alpha$ 、ICAM-1 および VCAM-1 遺伝子発現

歯周炎群ラット大動脈は対照群ラットと比較して、有意な TNF- $\alpha$  遺伝子発現の増加を認めた ( $p < 0.05$ )。また歯周炎群ラット大動脈は、ICAM-1 および VCAM-1 遺伝子発現の有意な増加を認めた ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ )。

#### 6. 大動脈における接着分子発現

大動脈における VCAM-1 の発現を免疫組織染色にて検討したところ、歯周炎群ラットは対照群ラットと比較し大動脈表層に著明な VCAM-1 発現の増加を認めた。

### IV. 考察

本研究により、歯周炎誘導ラットにおいて歯周組織における炎症反応が亢進した結果、大動脈においても炎症性サイトカインおよび接着分子発現の増加が観察された。すなわち歯周炎に伴い、炎症反応メディエーターの遺伝子発現が著増することにより、循環血液を介して大動脈に影響を及ぼすことが示唆された。

歯周病と動脈硬化の関係について多くの研究が実施され、歯周病は冠動脈疾患の独立したリスク因子であるという報告が散見される。これらの研究より、歯周病と動脈硬化の関係が示唆されるが、その詳細なメカニズムについては未だ明らかになっていない。

今回用いたナイロン糸を留置する方法は、プラークの停滞により歯周炎を発症する、人の歯周炎の病態に近い動物モデルである。

細菌やウイルスなどの刺激によりマクロファージ等免疫細胞によって産生される炎症性サイトカインは、歯周炎および動脈硬化の病態形成においても密接に関わっている。TNF- $\alpha$  は、細胞膜表面に存在する受容体に結合し、転写因子を活性化させることによって免疫・炎症反応において誘導される分子の発現調整に関与する。今回の実験において、TNF- $\alpha$  遺伝子発現が、歯周炎誘導ラットの歯肉において増加し、大動脈においても TNF- $\alpha$  遺伝子発現の増加が観察されたことは、大動脈に炎症反応が誘導されていることを示唆する。VCAM-1 は、障害を受けた血管内皮細胞表面に発現し、白血球の内皮細胞への接着に関係することにより、動脈硬化初期病変の誘導に重要な役割を果たす。接着した白血球は、血管内皮下へと浸潤し、泡沫細胞となり炎症性サイトカインを放出することによって動脈硬化病変の形成に関与する。

本研究の大動脈における解析において、歯周炎群はVCAM-1 発現が有意に増加した。歯周炎によって産生された炎症性サイトカインが、血行性に大

動脈の血管内皮細胞に作用した結果、VCAM-1 発現が増加したと推察される。

本研究は、歯周炎が大動脈に炎症を引き起こし、動脈硬化初期病変に関与することを明らかにした。これらの結果より、歯周炎が動脈硬化のリスク因子となる可能性が実験的に検証された。

#### V. まとめ

本研究では、歯周炎を惹起させることにより歯周組織のみでなく大動脈においても炎症性サイトカインの増加が確認され、歯周組織における局所の炎症が大動脈に影響を与える可能性が示された。これらの現象は歯周炎が動脈硬化初期病変の誘導に関与しており、さらに動脈硬化のリスク因子となる可能性を示唆している。