

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 竹口敦士
論文題目  実験的歯周炎モデルラットにおける $\beta 2$ -アドレナリン受容体遮断薬の効果	

## I. 緒言

近年、成人の歯列矯正患者の数が増えており、その多くが歯周病を患っている。そのような患者は、歯槽骨吸収を予防する必要性があるが、現在、実用的な予防方法がないため、歯周炎における歯槽骨吸収阻害剤の開発は、重要な研究課題である。

これまでに、交感神経が骨代謝に影響を及ぼすことは多く報告されている。また、低用量のプロプラノロール（非選択的 $\beta$ -アドレナリン受容体（ $\beta$ -AR）遮断薬）が、非選択的 $\beta$ -AR遮断薬の一般的作用の一つである血圧への作用を示さず、骨代謝制御作用のみを示すことが報告されている。さらに、降圧作用を示さないブトキサミン(BUT)（ $\beta$ 2-AR遮断薬）が高用量、低用量ともに骨減少を改善することが報告されている。これらの研究は、交感神経が骨代謝を制御し、 $\beta$ 2-AR遮断薬が骨量の減少を防ぐ可能性を示している。

今回実験に用いた高血圧自然発症ラット（SHR）は、長年にわたって本態性高血圧の遺伝的モデルとして研究されてきた。SHRの正常血圧対照であるWistar Kyotoラット（WKY）と比較してSHRは血圧の上昇、心拍数の上昇、血漿カテコールアミンレベルおよびドーパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼ活性の上昇、および副腎チロシンヒドロキシラーゼおよびドーパミン $\beta$ -ヒドロキシラーゼ活性の増加を特徴とする。つまりSHRは交感神経系が過剰に活性化されていることを示す。以前の研究では、交感神経が亢進したSHRが骨粗鬆症を示すことが報告されており、歯槽骨においても歯周病を誘発しやすい可能性がある。

歯周炎モデルの作製方法としては、これまでに様々な実験的歯周炎モデルが報告されており、LuanらとGoyaらとJinらは歯冠周囲に綿糸を配置し、Bakらはナイロン糸を配置し、Breivikらはシルク糸を配置している。しかし、糸を歯冠周囲に配置する従来の方法は、ラット臼歯の歯冠形態が漏斗形であることから、糸を巻く強さによっては歯肉への直接的な機械的損傷が生じ、歯槽骨の吸収の程度に影響を与えるという欠点がある。この欠点に対処するためにMizunoらは、マウスの上顎左側第一臼歯と第二臼歯の接触点に矯正用結紮線である0.1mm径ステンレススチールワイヤーを結紮することによってフードインパクションによる歯周炎を誘発した。今回この方法を一部改変して歯肉への直接的な機械的損傷を避ける歯周炎モデルを作製することとした。

実験的歯周炎を発症させたラットに対し、非選択的 $\beta$ -AR遮断薬を投与することにより歯周炎を予防できる可能性についての報告がいくつかある。実際に実験的歯周炎を発症させたラットに対し、非選択的 $\beta$ -AR遮断薬を投与するとTNF- $\alpha$ とIL-1 $\beta$ が減少したとの報告がある。しかしこれらは非選択的 $\beta$ -ARについての結果である。Togariらの報告によれば $\beta$ -ARのうち $\beta$ 2-ARのみが骨芽細胞と破骨細胞に発現していると述べられており、これらの効果は主に $\beta$ 2-ARを介したものである可能性が高い。

そこで本研究では、 $\beta$ 2-AR遮断薬を用いて交感神経の活動亢進が歯周炎の進行に影響するかどうかを検討し歯周炎モデルラットにおける $\beta$ 2-AR遮断薬の効果を検討することを目的とした。

## II. 実験材料および方法

### 1. 動物および試薬

7週齢の雄性ラット(SHR/Izm, WKY/Izm)(日本SLC、静岡)は、室温(23 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C)、湿度(50 $\pm$ 10%)、12:12時間の明暗サイクルを自動的に制御された環境下のケージ(3匹/ケージ)にて、自由に水道水と標準飼料を与えられた。全てのラットに対して、環境に慣れるための予備飼育を1週間行った。なお、実験動物の管理ならびに研究方法については、愛知学院大学歯学部動物実験委員

会の承認の下(承認番号 AGUD 363 号)、動物実験指針に従った。BUT は、Sigma(St. Louis, MO, USA)から購入した。SHR BUT 投与群(n=6)と WKY BUT 投与群(n=6)には、1 mg/kg の BUT を1日1回、胃ゾンデを用いて4週間、経口投与した。SHR control 群(n=6)と WKY control 群(n=6)には、薬物投与群と同量の生理食塩水(1 ml/kg)を投与した。実験終了時、上顎骨を摘出した。

## 2. 実験的歯周炎モデルラットの作製

実験的歯周炎モデルラットの作製は、三種混合麻酔薬である塩酸メドミジン (Meiji Seika Pharma CO., Ltd., Tokyo, Japan)、ミダゾラム (Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan)、酒石酸ブトルファノール (Meiji Seika Pharma CO., Ltd.) を腹腔内投与し麻酔した状態で、上顎左側第一臼歯、第二臼歯間のコンタクトポイントを囲むように 0.2mm の矯正用結紮線(TOMY INTERNATIONAL INC., Tokyo, Japan)を結紮することでフードインパクションを引き起こし、実験的歯周炎の作製を行った。

## 3. 歯槽骨骨構造解析

結紮線装着4週間後に上顎骨を採取し、マイクロCT (Rigaku, Tokyo, Japan)にて撮影を行った。撮影条件として、管電圧 90kV、感電流 150 $\mu$ A、撮影時間 2分、画素サイズは、20 $\times$ 20 $\times$ 20 $\mu$ mで行った。その後、歯槽骨残存量の計測と解析は、ソフト TRI/3 D-BON (RATOC SYSTEM ENGINEERING CO, LTD, Tokyo, Japan)にて行った。歯槽骨残存量を計測するにあたり、Parkらの方法を一部改変し、左側の第一臼歯と第二臼歯間のセメントエナメルジャンクション (CEJ) から根尖までの歯槽骨残存量を計測し、同部位の全体積に占める割合を歯槽骨残存率とした。

## 4. 病理組織学的観察(H.E.染色(アタッチメントレベルの割合)、TRAP染色、免疫染色 (TH, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6))

上顎骨を結紮線装着日から4週間後に摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。次に、10%EDTA (pH7.2)で約4週間、4 $^{\circ}$ Cの条件下で脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行い、5 $\mu$ mの近遠心方向の連続組織切片を作製した。組織観察部位は臼歯部の根が全て観察可能な部位とした。その後、ヘマトキシリン-エオジン染色 (HE染色)を行い、第一臼歯遠心面のCEJから根尖までの距離に対するCEJから歯肉溝底部までの距離の割合を、アタッチメントレベルの割合として計測した。またTRAP染色(酒石酸耐性酸ホスファターゼ染色)をACID PHOSPHATASE、LEUKOCYTE KIT (SIGMA Diagnostic, St. Louis, MO, USA)を用いて行い、破骨細胞数計測に関しては、第一臼歯と第二臼歯間の歯槽中隔部の歯槽突起部表面の破骨細胞数 (Oc.N/BS)と破骨細胞面 (Oc.S/BS)を計測した。さらにTH (Tyrosine Hydroxylase (交感神経繊維マーカー))、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6による免疫染色を施行した。免疫染色はヒストファインシンプルステインラット MAX-PO (R) (Nichirei Bioscience Inc., Tokyo, Japan)と、ヒストファインシンプルステイン DAB 溶液 (Nichirei Bioscience Inc.)を用いて行い、TH抗体は、Tyrosine Hydroxylase Rabbit anti-Rat Polyclonal Antibody (LS-B3443, TH:1/1000, LifeSpan BioSciences, Japan)、TNF- $\alpha$ 抗体は Anti-TNF alpha antibody (ab6671, TNF- $\alpha$ :1/200, Abcam Inc., Tokyo, Japan)、IL-1 $\beta$ 抗体は ANTI IL-1 $\beta$  (H-153)、HUMAN, RABBIT POLY (SC-7884, IL-1 $\beta$ :1/150, SCB Santa Cruz Biotechnology, Inc. California, USA)を用い、IL-6抗体は Anti-IL6 antibody (ab83339, IL-6:1/250, Abcam Inc.)を用いた。免疫染

色における染色強度の判定は Rogers らの方法に準じ、第一臼歯、第二臼歯間の歯槽中隔の染色された部位を 0~20%、21~40%、41~60%、61%~の 4 グループに分類し、それぞれ 1~4 のスコアを割り付け、各群スコアによって比較を行った。

#### 5. 統計的処理

得られた実験データは平均値±標準誤差で示し、統計的な有意差の検定には、一元配置分散分析(Tukey's multiple comparison test)、t-test を用いた。全ての統計解析は、GraphPad Prism vol.9(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)を用いて行った。p<0.05 を統計的有意差ありと判定した。

### III. 結果

#### 1. マイクロ CT 画像における歯槽骨残存率の比較

##### 1) 結紮線の有無による影響

結紮側の歯槽骨残存率は、結紮線留置後 4 週間で、非結紮側と比較して、WKY および SHR の両方において有意に低い値を示した。SHR の結紮側の歯槽骨残存率は WKY の結紮側よりも有意に低い値を示し、有意な歯槽骨吸収を示した。

##### 2) BUT 投与が及ぼす影響について

結紮線留置後 4 週間の WKY BUT は WKY control と比較し歯槽骨残存率が有意に高い値を示した。SHR BUT は、SHR control に比較し歯槽骨残存率が有意に高い値を示した。

#### 2. H.E 染色画像におけるアタッチメントレベルの割合

##### 1) 結紮線の有無による影響

結紮線留置後 4 週間の結紮側のアタッチメントレベルの割合は、WKY および SHR ともに非結紮側と比較して有意に高い値を示した。SHR の結紮側のアタッチメントレベルの割合は WKY の結紮側よりも高かった。

##### 2) BUT 投与が及ぼす影響について

結紮線留置後 4 週間の WKY BUT は WKY control と比較しアタッチメントレベルの割合が有意に小さい値を示した。SHR BUT は、SHR control に比較しアタッチメントレベルの割合が有意に小さい値を示した。

#### 3. 破骨細胞数および破骨細胞面の計測

結紮線留置後 4 週間の SHR control は WKY control に比較して、有意な差をもって破骨細胞数および破骨細胞面が大きい値を示した。WKY BUT は、WKY control に比較して破骨細胞面が有意に小さい値を示し、破骨細胞数は有意な差は認められないが同様の傾向を認めた。SHR BUT は、SHR control に比較し破骨細胞数および破骨細胞面が有意に小さい値を示した。

#### 4. 免疫染色におけるスコアの比較

##### 1) TH におけるスコアの比較

結紮線留置後 4 週間の SHR control は WKY control と比較して有意な差をもって染色スコアが高い値を示した。WKY BUT は WKY control と比較して有意な差をもってスコアが低い値を示した。また、SHR BUT は SHR control と比較して有意な差をもってスコアが低い値を示した。

##### 2) TNF- $\alpha$ におけるスコアの比較

結紮線留置後 4 週間の SHR control は WKY control と比較して有意な差をもって染色スコアが高い値を示した。WKY BUT は WKY control と比較して有意な差をもってスコアが低い

値を示した。また、SHR BUT は SHR control と比較して有意な差をもってスコアが低い値を示した。

### 3) IL-1 $\beta$ におけるスコアの比較

結紮線留置後4週間の SHR control は WKY control と比較して有意な差をもって染色スコアが高い値を示した。WKY BUT は WKY control と比較して有意な差をもってスコアが低い値を示した。また、SHR BUT は SHR control と比較して有意な差をもってスコアが低い値を示した。

### 4) IL-6におけるスコアの比較

結紮線留置後4週間の SHR control は WKY control と比較して有意な差をもって染色スコアが高い値を示した。SHR BUT は SHR control と比較して有意な差をもってスコアが低い値を示した。また、WKY BUT は WKY control と比較して染色スコアが低い傾向が認められたが有意な差は認められなかった。

## IV. 考察

### 1. 交感神経の亢進が歯周炎の進行に及ぼす影響について

これまでに、交感神経の亢進は、骨吸収を促進するという報告がある。今回の実験では、SHR は WKY と比較して歯槽骨残存率が低い値を示し、アタッチメントレベルの割合、破骨細胞数および割合が大きい値を示し、免疫染色における交感神経マーカー (TH) および炎症性サイトカインのスコアが高い値であった。本実験により、交感神経の亢進は歯周炎の進行を促進する可能性が示唆された。

また、交感神経の亢進は高血圧症を引き起こす。高血圧と骨粗鬆症の関連性について因果関係を解明するためにさまざまな検討がなされてきており、Li らと Masugata らは、高血圧症は骨密度を低下させると報告している。しかし、Groen らと Ward らは両者に関連性がないと報告し、Genco らは年齢、性差、人種差、喫煙、ホルモンなどの要因を考慮する必要があると報告しているが、明確なコンセンサスは得られていない。今回 SHR に認められた歯周炎の悪化は、交感神経の亢進によって引き起こされた効果、もしくは交感神経の亢進に伴う高血圧によって引き起こされた効果であるか不明である。血圧の測定を行うなど、今後の検討が必要であると考えられる。

### 2. $\beta$ 2-AR 遮断薬の実験的歯周炎に対する効果について

結紮線留置後4週目において WKY BUT と SHR BUT は、ともに WKY control と SHR control に比較し歯槽骨残存率が有意に大きい値を示した。また、アタッチメントレベルの割合が有意に小さい値を示し、破骨細胞数および破骨細胞面が小さい値を示した。よって BUT の経口投与により、歯槽骨吸収を抑制し歯周炎の重症化を軽減できたと考えられる。免疫染色による炎症性サイトカインのスコアの比較では、TNF- $\alpha$  および IL-1 $\beta$  において、BUT の経口投与により有意な差を持って染色スコアが低い値を示し、IL-6 においては、有意な差は認められなかったが染色スコアが低い傾向が認められ、局所において炎症が抑制されたものと考えられた。また、TH においても BUT の経口投与により有意な差を持って染色スコアが低い値を示した。

これらの結果より、 $\beta$ 2-AR 遮断薬を投与することによって歯根膜の交感神経が抑制され、歯周炎を抑制できる可能性が示唆された。

また、WKY においても同様に歯周炎が抑制された結果が示されたことは、高血圧および骨粗

鬆症患者のみならず健常者の歯周病予防にも有効である可能性が示唆された。

交感神経の亢進は $\beta 2$ -AR を介して、骨芽細胞では破骨細胞分化因子(RANKL)や炎症性サイトカインを産生し、RANK-RANKL 系を介して破骨細胞前駆細胞から破骨細胞の形成を促進する。さらに、交感神経の亢進は、破骨細胞において骨吸収活性を促進し、 $\beta 2$ -AR を介した骨吸収の促進と骨形成の抑制により、骨量が低下する。今回の実験結果は、これまでの研究により示されている、交感神経が骨芽細胞に与える効果と、破骨細胞に与える効果の知見と一致している。

これまでの交感神経が骨代謝に与える影響を調べた研究においては、非選択的 $\beta$ -AR 遮断薬を用いたものが多く、歯槽骨代謝において、 $\beta 2$ -AR がどのような役割を果たすか調べたものはほとんどなく、歯周炎に関しては存在しない。本実験より、実験的歯周炎モデルにおいて、 $\beta 2$ -AR 遮断薬が歯槽骨代謝を調節し、歯周炎を予防することがはじめて示された。

また本実験では、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  と IL-1 $\beta$  と IL-6 の発現が抑制されることが分かった。ただし、マクロファージやその他の炎症性サイトカイン産生細胞(単球、血管内皮細胞等)に $\beta$ -AR があるかどうかは分かっていない。そのため $\beta 2$ -AR 遮断薬が直接、マクロファージやその他の炎症性サイトカイン産生細胞を抑制するかは不明である。今後の課題として、炎症性サイトカイン産生細胞と $\beta 2$ -AR の関係性を解明する必要があると考える。また本実験により、交感神経の亢進が歯周炎を進行させることが示されたので、反対に、歯周炎が交感神経を亢進させ、全身への影響を与える可能性があるのかどうか、研究を行なっていく必要もあると考える。

本研究では、 $\beta 2$ -AR 遮断薬の歯周炎に対する効果を検討した結果、 $\beta 2$ -AR 遮断薬は歯根膜の交感神経繊維および炎症性サイトカインを抑制した。さらに、破骨細胞を抑制することによって歯槽骨量およびアタッチメントレベルを維持し、歯周炎を予防する可能性が示された。

#### V. まとめ

本研究は、交感神経が亢進している SHR および WKY(対照ラット)に実験的歯周炎を発症させ $\beta 2$ -AR 遮断薬を経口投与することにより、1. 交感神経の亢進が歯周炎の進行に及ぼす影響 2. 実験的歯周炎モデルラットにおける $\beta 2$ -AR 遮断薬の効果を検討し、以下の結果を得た。

##### 1. 交感神経の亢進が歯周炎の進行に及ぼす影響について

交感神経が亢進している SHR は、WKY と比較してアタッチメントレベルの割合が大きい値を示し、歯槽骨残存率が小さい値を示した。

##### 2. $\beta 2$ -AR 遮断薬の実験的歯周炎に対する効果について

WKY、SHR とともに BUT 投与群は、歯槽骨残存率が高い値を示し、アタッチメントレベルの割合、破骨細胞数および破骨細胞面が小さい値を示し、免疫染色における交感神経繊維マーカー (TH) および炎症性サイトカインのスコアが低い値であった。

以上の結果より、交感神経の亢進が歯周炎を促進する可能性が示唆された。また、 $\beta 2$ -AR 遮断薬は歯根膜の交感神経繊維および炎症性サイトカインを抑制した。さらに、破骨細胞を抑制することによって歯槽骨量およびアタッチメントレベルを維持し、歯周炎を予防する可能性が示された。また、WKY においても歯周炎が抑制された結果が示されたことは、高血圧および骨粗鬆症患者のみならず健常者の歯周病予防にも有効である可能性が示唆された。