

平成 30 年 5 月 26 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11395

研究課題名(和文)薬剤による歯周炎ならびにインプラント周囲炎の予防に関する実験病理学的研究

研究課題名(英文) Experimental pathological study on prevention of periodontitis and periimplantitis caused by drugs

研究代表者

原 宜興 (HARA, Yoshitaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：60159100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：カンゾウの薬効主成分であるグリチルリチン酸(GA)の歯肉溝への滴下投与は、ラットのLPS誘導性実験的歯周炎発症におけるアタッチメントロスと歯槽骨吸収を抑制することを確認した。それには、炎症性細胞浸潤の抑制および補体古典経路の抑制が関与していることが示唆された。GAは歯周発症の予防薬剤として有効と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Topical application of GA into the rat gingival sulcus inhibited attachment loss and alveolar bone resorption in LPS-induced experimental periodontitis. The study shows that GA can potentially prevent periodontitis in rats. However, further investigations using randomized clinical trials are required to prove this concept.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 アタッチメントロス

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は成人の大多数が罹患している慢性炎症性疾患であり、口腔内細菌感染(Williams RC, 1990)および歯周組織へ侵入した細菌に対する過剰な宿主の免疫反応により生じると考えられている(Genco RJ, 1984)。ブラッシングの重要性が認知されつつある一方で抗炎症剤を配合した歯磨剤や含嗽剤が開発されているが、attachment loss を効果的に予防するものは無く、予防効果のある薬剤の開発が望まれている。カンゾウはマメ科の多年生草本であり、その乾燥根に薬用成分が含まれ(Isbruckner, R. A. Regul Toxicol Pharmacol 2006)、肝機能改善、抗炎症、抗アレルギーなど多くの作用が知られている。Glycyrrhetic acid (GA) はカンゾウの生物学的活性を持つ主薬用成分である。GA はグルコシルコリチン受容体(GR)シグナリング活性化や補体古典経路抑制による抗炎症作用が報告されている(Kao, T. C. 2010 J Agric Food Chem, Kroes, B. H. Immunology 1997)。これらの報告より、GAが歯周炎を抑制することが期待されるが、attachment loss への影響を検討した報告はない。

2. 研究の目的

我々の過去の研究では attachment loss には免疫複合体形成が関与していること(Kuramoto, A. J Periodontal Res 2012)、さらにLPSで感作したラットの歯肉溝へLPSを投与して免疫複合体を局所で形成させると attachment loss および歯槽骨吸収を生じることを報告した(Yoshinaga, Y. J Periodontal Res 2012)。そこで本研究では、このラット実験的歯周炎モデルを使用してLPSおよびGAを歯肉溝へ滴下投与し、attachment loss へのGAの影響を病理組織学的に検討した。

3. 研究の方法

実験デザイン

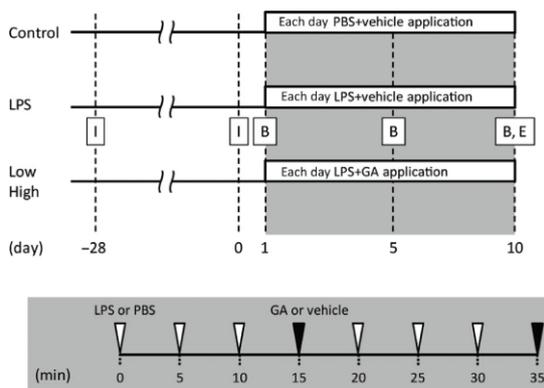
25匹の9週齢のLewis系雄性ラットの腹腔内にリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解した *Escherichia coli* (*E. coli*)LPS (OIII: B4; Sigma, St Louis, MO, USA) 150 µg を含有する complete Freund's adjuvant 300 µl を投与し、ブースターとして28日後に *E. coli* LPS を含有する incomplete Freund's adjuvant 300 µl を投与して免疫感作ラットを作製した。

ラットをLPS及びGAの組み合わせにより、LPS+vehicle (LPS)群、LPS+0.01% GA (Low)群、LPS+0.03% GA (Medium)群、LPS+0.3% GA (High)群、PBS+vehicle (control)群に分けた。GAの抗炎症作用をvehicle (propylene glycol: ethyl alcohol: PBS=8:1:1)に溶解したGAを歯肉溝へ滴下して調べた。

全てのラットに対し、イソフルランによる全身麻酔下で滴下投与実験を行った。low群では、50 µg/µlのLPSと0.01%GAを投与した。上顎第一臼歯口蓋側歯肉溝にLPSを3回滴下投与した後、0.01%GAを1回滴下した。滴下投与の間隔は5分とした。これを2回繰り返した。これを1クールとして、24時間毎に10日間行った。同様のスケジュールでLPSあるいはPBSとGAあるいはvehicleを滴下した。全て10回目の滴下の1時間後に屠殺した。ラットはCharles River Japan (Tokyo, Japan)より購入し、specific pathogen-free状態でthe Biomedical Research Center, Center for Frontier Life Sciences (Nagasaki University, Nagasaki, Japan)にて飼育した。動物の飼育と実験行程は、the Guidelines for Animal Experimentation of Nagasaki Universityに従い、the Institutional Animal Care and Use Committeeの認証を得て行った。

血清抗LPS IgG抗体レベル確認のための indirect ELISA 法

滴下開始前(ベースライン)、滴下5日目、10回目の直後にそれぞれ、全てのラットの眼窩下静脈層より採血して血清を分離した。血清中の抗LPS IgG抗体レベルをindirect ELISA法で確認した。0.05M炭酸バッファーに溶解した2.5 µg/mlのLPS溶液を96穴ウェルに4℃16時間固相化し、0.05% Tween 20/PBSにてwashした後、0.1% bovine albumin serum/PBSにて室温、1時間 blockingした。0.05% Tween 20/PBSにてwashした後、0.1% bovine serum albumin/PBSを室温1時間反応させた。0.05% Tween 20/PBSにてwashした後、1000倍希釈した100 µlの血清を加え、室温1時間反応させた。0.05% Tween 20/PBSにてwashした後、4000倍希釈したHRP標識 goat anti-rat IgG (Invitrogen, Tokyo, Japan)で室温1時間反応させた。0.05% Tween 20/PBSにてwashした後、substrate reagent pack (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)を添加して室温で反応させ、直ちに1M H₂SO₄で反応を停止し、波長450nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダーで測定した。

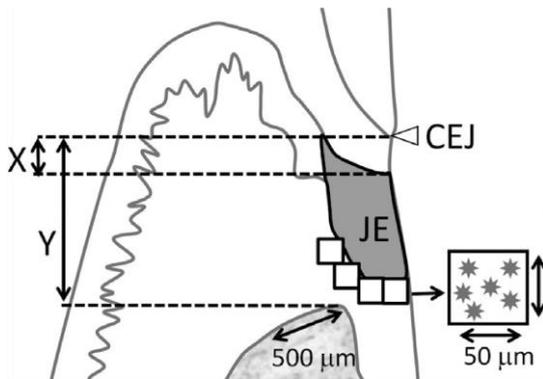


組織標本作製

安楽死させた後、上顎骨を採取し、採取した上顎骨を4% paraformaldehyde/PBSにて4°C、10時間固定した。その後10% EDTA/PBSにて4°C、3週間脱灰し、AMeX法(Sato et al. 1986)にてパラフィン包埋した。アセトンで脱水した後、安息香酸メチル及びキシレンに浸漬し、58~60°Cのパラフィンを浸透させた。このようにして作製したパラフィンブロック中の上顎第一臼歯を central roots level で頬口蓋的に4μmの厚さに薄切し、パラフィン切片を連続的に作製した。

組織学的計測

各ブロックで、10枚×5の連続切片を作製した。最初の一枚ずつは、組織学的計測のために hematoxylin and eosin(HE)染色を行った後、画像解析ソフトの Image J(U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を使用して、以下のような組織学的計測を行った。cement-enamel junction (CEJ)から根面に接した接合上皮の歯冠側端までの距離を attachment loss として計測した。CEJから歯槽骨頂部までを歯槽骨レベルとして計測した。また、接合上皮に接した結合組織内の4つのユニット(50μm X 50μm)中の炎症性細胞数及び接合上皮内の炎症性細胞数を光学顕微鏡下(X400)で計測した。次の一枚ずつは、破骨細胞同定のため、tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)染色(Katayama et al. 1972)を行い、歯槽骨頂部から500μmの骨面上に存在する多核のTRAP陽性細胞を、破骨細胞として計測した。



免疫複合体の組織学的検出

我々が過去に報告した手法に従い、免疫複合体を検出するために、免疫複合体に結合する最初の補体C1の構成成分であるC1qの免疫組織化学的染色を行った。脱パラフィン後に、内因性ペルオキシダーゼ不活化のためにH₂O₂/methanolで30分処理した。その後ヤギ正常血清にて室温30分 blockingした。次に rabbit anti-C1qB antibody (1:250, AVIVA Systems Biology, San Diego, CA, USA)を4°C16時間反応させた。その後 biotinylated goat anti-rabbit immunoglobulins (1:200, Dako, Glostrup,

Denmark)にて30分反応させた。これらの切片を peroxidase-conjugated streptavidin(Dako, Glostrup, Denmark)にて30分反応させ、次に metal enhanced DAB substrate kit(Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa, Japan)にて反応させ、hematoxylinにて2重染色した。

LPSの組織学的検出

4番目の切片に対し、抗原であるLPSを検出するために免疫組織化学的染色を行った。脱パラフィン後に、内因性ペルオキシダーゼ不活化のためにH₂O₂/methanolで30分処理した。その後ヤギ正常血清にて室温30分 blockingした。次に mouse anti-LPS antibody (1:100, Abcam plc, Cambridge, UK)を4°C16時間反応させた。その後 biotinylated goat anti-mouse immunoglobulins (1:200, Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan)にて30分反応させた。これらの切片を peroxidase-conjugated streptavidin(Dako, Glostrup, Denmark)にて30分反応させ、次に metal enhanced DAB substrate kit(Thermo Fisher Scientific K.K., Kanagawa, Japan)にて反応させ、hematoxylinにて2重染色した。

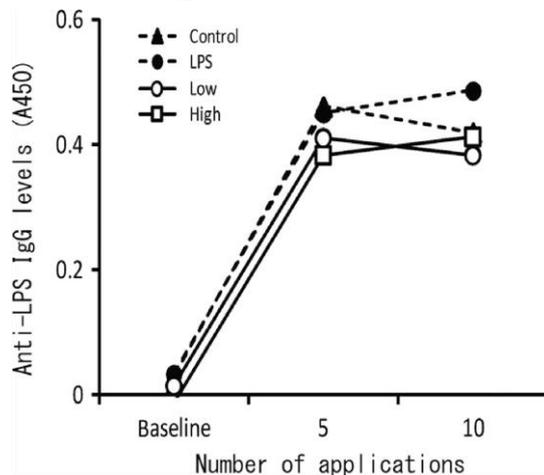
統計学的解析

統計学的解析は StatMate III を用いて行った。各群間の差は one-factor ANOVA および Tukey's test にて検定した。p<0.05を有意差ありとみなした。値は平均値±SDで示した。

4. 研究成果

血清抗LPS IgG抗体レベル

血清中の抗LPS IgG抗体レベルは、全ての群で、実験期間中を通して上昇していた。



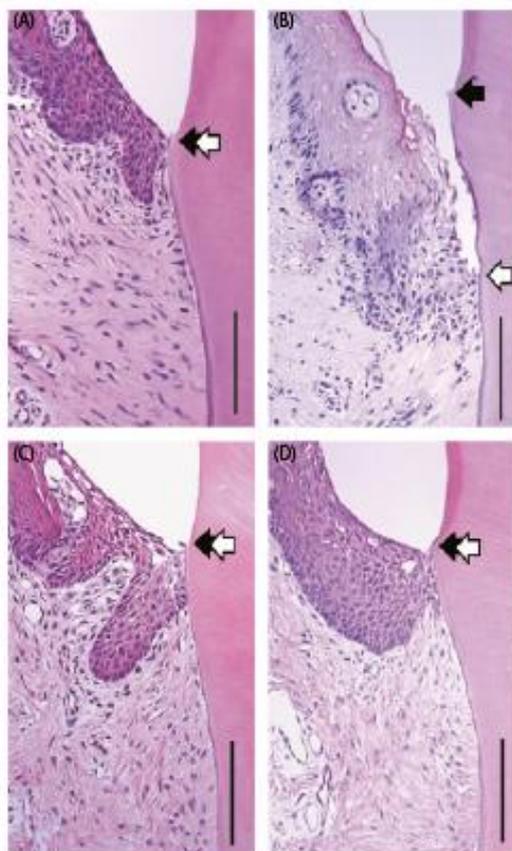
病理組織学的所見

Control group では、根面に接した部分の接合上皮歯冠側端はセメントエナメル境に一致していた。接合上皮内と接合上皮下の結合組織では炎症性細胞が少し存在した。

LPS group では、LPSを滴下した口蓋側の接合上皮歯冠側端はセメントエナメル境より下方に移動し、歯周ポケットを形成した。接合上皮は深部に増殖しており、細胞間隙は拡大し、細胞同士が解離しているものもあった。接合上皮内の

細胞間隙には多くの炎症性細胞が存在した。炎症性細胞の大部分は多型核球を持つ好中球が占めていた。上皮と結合組織の境界は曖昧になり、上皮下結合組織にも多くの炎症性細胞が存在した。一部の上皮細胞は膨潤し、ネクロシスしていた。

Low 群では、上皮に多くの炎症性細胞を認めた。attachment loss は 3/5 ブロックに認めた。一方、Medium 群, High 群では接合上皮内および結合組織の炎症性細胞は少なく、attachment loss は全く認めなかった。



炎症性細胞数の計測

接合上皮内および周囲の結合組織中の炎症性細胞数を計測することで炎症を評価した。接合上皮内炎症性細胞数は control 群と比較して LPS 群で有意に増加していた。Medium 群, High 群では LPS 群および Low 群と比較して有意に減少した。結合組織中の炎症性細胞数は 1 ユニットあたりの平均数を示している。control 群と比較して LPS 群で有意に増加しており、Low 群, Medium 群, High 群では LPS 群と比較して有意に減少した。

Attachment loss の計測

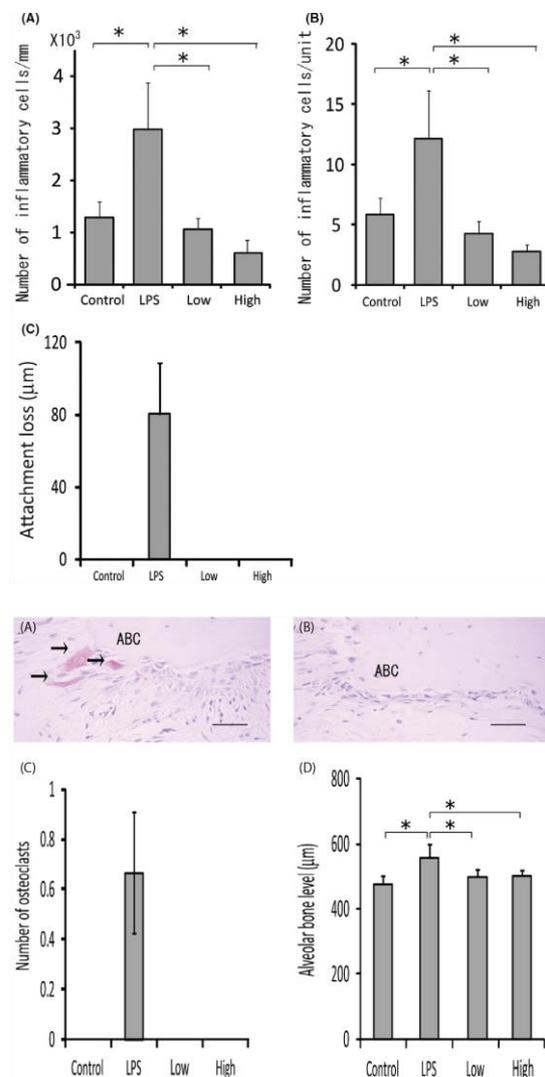
cement-enamel junction (CEJ) から根面に接した接合上皮の歯冠側端までの距離を loss of attachment として計測した。Control 群では loss of attachment を全く認めなかったが、LPS 群で

は全ての rat に loss of attachment を認め、平均 $80.5 \pm 28.3 \mu\text{m}$ であった。Low group では loss of attachment が $41.6 \pm 48.6 \mu\text{m}$ まで減少し、medium group, high group では完全に抑制された。

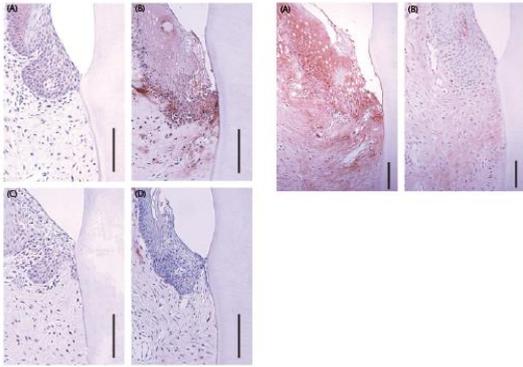
このことより、GA が炎症性細胞浸潤及び attachment loss を抑制することが示唆された。

TRAP 染色所見及び歯槽骨レベルの計測。

Control 群の歯槽骨頂部は滑らかであり、破骨細胞は全く認めなかった。一方、LPS 群では歯槽骨頂部の形態は不整であり、全ての block に破骨細胞を認めた。GA 投与群では破骨細胞を全く認めなかった。CEJ から歯槽骨頂部までを歯槽骨レベルとして計測した。LPS 群では control 群と比較して有意に骨吸収が進行していた。GA 投与群と control 群の歯槽骨レベルは同程度であった。



C1qB 免疫組織学的染色所見



免疫複合体の形成を、免疫複合体に最初に結合する補体 C1 の構成成分 C1q の免疫組織学的染色を行うことで確認した Low 群のうち attachment loss を認めたものや LPS 群では C1q の集積を、炎症性細胞が浸潤していた接合上皮および上皮結合組織に認めた。一方で、Attachment loss を認めなかった control 群、Low 群の一部及び Medium 群、High 群では C1q の局所への集積は認めなかった。

LPS 免疫組織学的染色所見

LPS 群では、上皮および上皮結合組織への LPS の浸透を認めた。GA 投与により attachment loss が抑制された Medium 群、High 群でも LPS の浸透は認めたが、LPS 群と比較して弱かった。また、GA の濃度が高くなると、LPS の染色は弱くなった。このことより、GA が抗原の侵入を阻害する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Topical application of glycyrrhetic acid in the gingival sulcus inhibits attachment loss in lipopolysaccharide-induced experimental periodontitis in rats.

Takamori A, Yoshinaga Y, Ukai T, Nakamura H, Takamori Y, Izumi S, Shiraishi C, Hara Y. J Periodont Res. 2018 Jun;53(3):422-429. (査読有)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.2hozon.nagasaki.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 宜興 (HARA, Yoshitaka)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・教授

研究者番号: 60159100

(2) 研究分担者

鵜飼 孝 (UKAI, Takashi)

長崎大学・病院 (歯学系)・講師

研究者番号: 20295091

吉村 篤利 (YOSHIMURA, Atutoshi)

長崎大学・病院 (歯学系)・准教授

研究者番号: 70253680

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()