

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21792125

研究課題名 (和文) 歯周ポケット形成を伴ったラット歯周炎モデルを確立し、接合上皮破壊機序を解明する

研究課題名 (英文) Establishment of Rat Periodontitis Model With Periodontal Pocket Formation and Elucidation of the Junctional Epithelium Destruction Mechanism

研究代表者

吉永 泰周 (YOSHINAGA YASUNORI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60452869

研究成果の概要 (和文)：

LPS による感作ラットの歯肉溝へ LPS を 24 時間ごとに投与していくと、10 日目からアタッチメントロスが生じ、20、30 日とその程度は強くなっていった。さらに 10 日以降では歯槽骨頂部の吸収も見られていた。反対に非感作ラットでは、10 日目まではアタッチメントロスおよび歯槽骨の吸収は認められず、20 日以降では有意な増加が認められたが感作ラットと比べてその変化は少なかった。感作ラットを用いて歯周ポケット形成を伴うラット歯周炎モデルを確立した。

研究成果の概要 (英文)：

LPS was introduced daily into the palatal gingival sulcus of first molars in LPS-sensitized (sensitized group) or non-sensitized rats (non-sensitized group). There was a significantly increase in apical migration of JE, pocket formation, bone resorption, the number of RANKL-bearing cells in the sensitized group than in the non-sensitized group. We could clearly demonstrate pocket formation and bone resorption in LPS-sensitized rats on day 30.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：歯周治療系歯学

科研費の分科・細目：歯周治療系歯学

キーワード：歯周ポケット形成

1. 研究開始当初の背景

疾患の発症や進行のメカニズムを調べる上で、動物モデルを用いた実験は重要な情報を与える。歯周炎においてもこれまでに様々な動物を用いてモデルの確立が試みられてきた。しかし明確に歯周ポケット形成を伴った歯周炎モデルはなく、歯周炎の発症や進行において不可欠と考えられる歯周

ポケット形成のメカニズムについてはよくわかっていない。歯周炎への免疫系の関与について異論の余地はなく、これまで局所の免疫反応もしくは炎症反応の関与が研究報告されている。しかしながら、全身的な免疫感作の関与についてはほとんど調べられていない。

2. 研究の目的

本研究では高濃度 LPS 滴下による歯周炎モデル（局所の免疫反応誘導）を用いて、全身的な免疫感作添加による歯周ポケット形成を伴った歯周炎モデルの確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 免疫感作ラットの作製

9 週齢のルイス系雄性ラットにフロイントのコンプリートアジュバンドと混合した *E. coli* LPS 溶液を腹腔内投与し免疫感作を行う。28 日後にフロイントのインコンプリートアジュバンドと混合した LPS 溶液を腹腔内投与し、免疫系の活性化を行い（感作群）、24 時間後より以下の方法により歯肉溝へ LPS 滴下による炎症の誘導を行う。LPS 溶液の代わりに PBS を腹腔内投与したラットを非感作群として用いる。

2) LPS 滴下による歯周組織の炎症の誘導

1) の方法で免疫感作を行ったラットと非感作ラットを用いて、*E. coli* LPS をルイス系雄性ラット上顎両側第一臼歯口蓋側歯肉溝内に毎日 30 分間滴下し、0, 5, 10, 20, 30 回滴下から 24 時間後に屠殺し上顎骨を採取する。採取した両側上顎骨を AMEx 法に準じてパラフィン包埋により連続切片を作製し、H.E. 染色、TRAP 染色、RANKL 検出のために RANKL に対する抗体を用いた免疫染色を行う。

3) 血清 IgG 抗体価の測定

LPS 滴下 0, 5, 10, 20, 30 回目から 24 時間後に各ラットの眼窩下静脈より血液を採取、血清を分離する。その血清を用いて ELISA 法により *E. coli* LPS に対する IgG 抗体価を測定する。

4) 組織形態計測による分析

HE 染色切片を用いて

①結合組織内の炎症：接合上皮結合組織 50 μ m 平方部の炎症性細胞数を 4ヶ所計測し、平均値を算出する。

②接合上皮内の炎症：接合上皮内の炎症性細胞数と接合上皮の面積を計測し、面積あたりの炎症性細胞数を算出する。

③接合上皮の根尖側移動：CEJ から接合上皮の根面に接している部位の歯根側端までの距離を計測する。

④歯周ポケット形成量：CEJ から接合上皮の根面に接している部位の歯冠側端までの距離を計測する。

⑤歯槽骨吸収量：CEJ から歯槽骨頂部まで

の距離を計測する。

以上を光学顕微鏡下もしくはデジタルカメラにて撮影した写真を用いて image analysis software (Image J) により解析する。

5) 歯周ポケット形成の確認

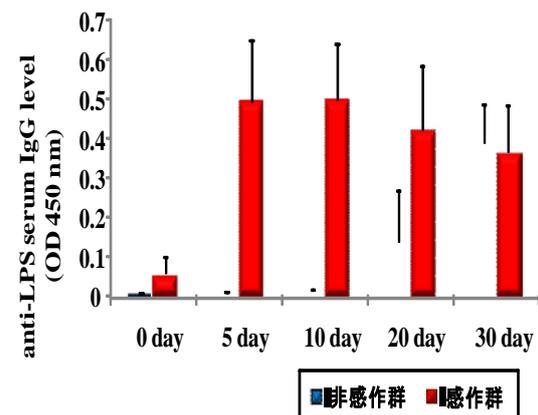
CEJ より接合上皮歯冠側端が根尖側にある場合にその距離を歯周ポケットとして測定した。ただし、切片作成時のアーチファクトが考えられるため、顎骨摘出時に歯肉溝へ墨汁を滴下し、1) で示した方法でパラフィン切片を作成、HE 染色を行い、墨汁の上皮表面への付着の様子を観察する。

4. 研究成果

1) 血清 IgG 抗体レベルの測定

感作群では、実験 5 日目より結成抗体レベルの上昇がみられ、30 日まで維持した。

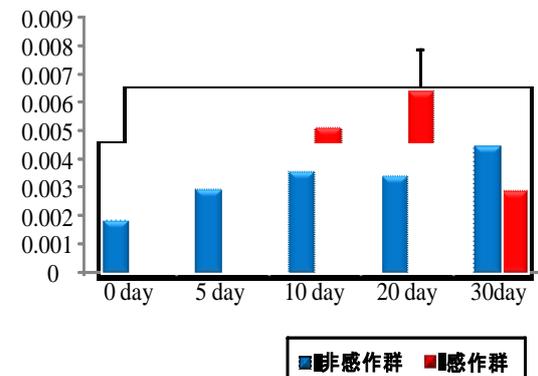
非感作群では実験 20 日よりわずかに上昇し、30 日ではさらに増加していた。



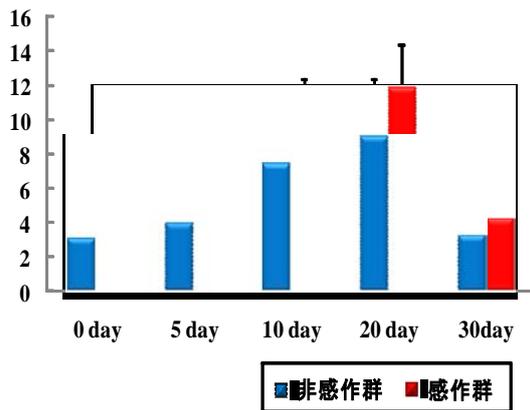
2) JE 内および JE 下結合組織内の炎症

感作群では JE 内および JE 下結合組織内にも好中球主体の炎症性細胞の浸潤が 5 日目より認められ、経時的に増加していた。また非感作群と比べて、増加傾向を示した。

JE 内炎症性細胞数

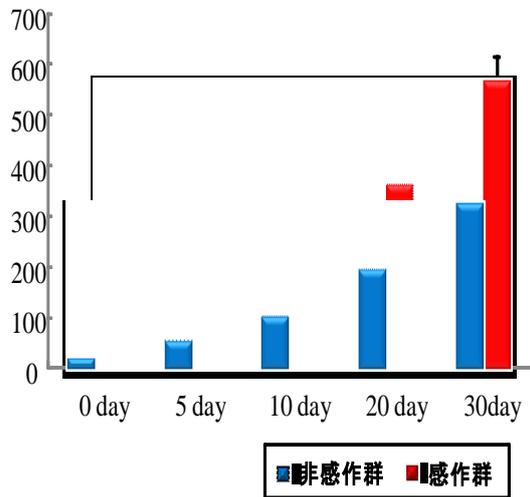


JE下結合組織炎症性細胞数



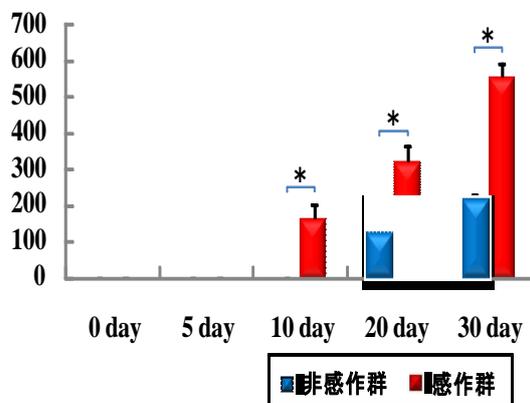
3) JE の根尖側移動

感作群では、10 日目より経時的に増加し、非感作群と比べても 10 日以降、有意に増加していた。



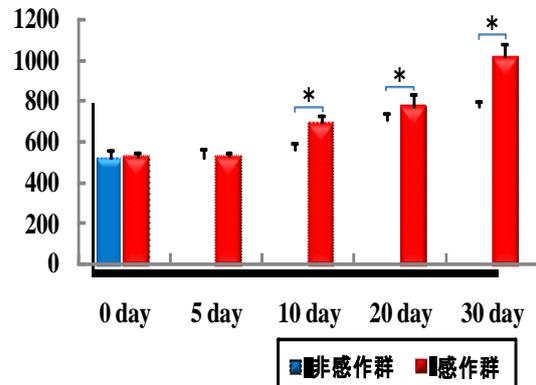
4) アタッチメントロス

感作群では 10 日目より観察され、20、30 日とその程度は増加した。非感作群では 20 日以降にわずかに観察された。



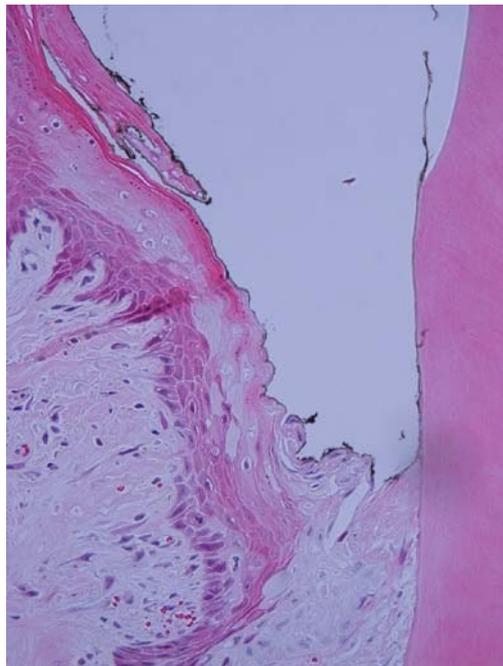
5) 歯槽骨吸収量

感作群では 10 日目より歯槽骨の吸収が認められ、非感作群と比べて有意に増加していた。



6) アタッチメントロスの確認

JE 内側面に墨汁の付着が認められたため、切片作成時のアーチファクトではなく、組織切片作成前に CEJ よりも根尖側に付着喪失が認められたと考えられる。



【まとめ】

今回の実験では、免疫感作と LPS の歯肉溝内滴下によりアタッチメントロスを伴う歯周炎モデルの作製に成功した。さらに今回の結果から、歯周病の発症や進行において全身的な免疫感作の関与が強く示唆された。しかしながらその詳細なメカニズムについては明らかにできていない。そこで今後は歯周ポケット形成および歯槽骨吸収への免疫感作関与のメカニズムについて詳しく調べることが必要である。

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0件)

[学会発表] (計2件)

① 吉永泰周, 蔵本明子, 原宜興; 歯周炎発症メカニズム研究—実験的歯周炎モデルの確立—、第130回日本歯科保存学会2009年度春季春季学術大会、2009年6月、札幌

② Y. YOSHINAGA : An Experimental Model of Periodontitis in LPS-Immunized Rat, 88th General Session & Exhibition of the IADR, Barcelona, Spain, 2010

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉永 泰周 (Yoshinaga Yasunori)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 60452869

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者
無し