

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11414

研究課題名(和文)酸化ストレス可視化モデルにおける歯周病による胎児発育への影響

研究課題名(英文) Influence of periodontal disease on fetal development in oxidative stress visualization model

研究代表者

片岡 広太 (Kataoka, Kota)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：80744185

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病の酸化ストレスによる胎児発育への影響について、酸化ストレス可視化マウスを用いて検討することとした。ルシフェラーゼ活性による腹部の単位面積当たりの発光を比較したところ、baselineでは歯周病群、対照群の間では有意な差は認められなかった。しかし、妊娠14日後では、歯周病群は対照群と比べ高い値を示した。採取された妊娠14日後の胎児のCrown rump lengthについてみると、歯周病群では対照群と比べ有意に低い値を示した。妊娠14日後の胎児の体重においても同様の傾向を示した。また、歯周病群では早産の傾向が認められた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effects of periodontitis on fetal growth using a mouse model for visualization of oxidative stress. At baseline, there was no significant difference between the periodontitis and control groups in the luminescence intensity per unit area of abdomen which reflect luciferase activity. However, the higher luminescence intensity was observed in periodontitis groups at 14days after pregnancy compared to the control group. The crown rump length of the fetus obtained at 14 days after gestation was significantly lower in the periodontitis group than in the control group. The same trend was shown in the weight of the fetus at 14 days after pregnancy. Furthermore, the tendency toward premature birth was observed in the periodontitis group.

研究分野：歯周病

キーワード：酸化ストレス 歯周病 妊娠 分子イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は日本国民の多くが罹患する生活習慣病であり、高齢者のQOLを確保するうえで重要視されている疾患のひとつである。近年、歯周病と全身との関連が注目を浴びており、歯周病の予防・治療がより重要な意義を持つようになってきている。

申請者は、歯周病による全身への影響に関する機序の解明に、世界に先駆けて酸化ストレスに注目してきた。酸化ストレスは、100種類以上の疾患と関連があり、分子生物学的アプローチには注目すべき指標と考える。

歯周病と関連あるものとして胎児発育への影響が挙げられる。動物実験モデルを使って歯周病が胎児発育に影響を与えるメカニズムを調べたいいくつかの研究があり、なかでも酸化ストレスの関与が指摘されている。すなわち、リポポリサッカライドを腹腔内投与すると、胎盤の酸化ストレスが上昇し、骨の発育遅延が起こる。しかし、リポポリサッカライドを腹腔内に直接投与することが、実際の歯周病が胎児に及ぼす病態を反映しているとは考えにくい。すなわち、歯周病そのものがどのような経路やダイナミクスで胎児発育や胎児の酸化ストレスに影響を与えるのかは不明である。また、妊娠期の抗酸化物質の効果的な投与方法は検討されていない。

酸化ストレスに限らず、歯周病の影響がどのような経路で、どのタイミングで全身へと広がっていくのか詳細なエビデンスは得られていない。なぜなら、今までの動物モデル研究では、ストレスによって引き起こされた結果のみの把握であり、途中の経路は血液検査で間接的にしか調べられなかったためである。

近年、酸化ストレス可視化マウス(Tg型OKD-Lucマウス)が発明され、酸化ストレスや薬剤の生体内での動態を生きたまま可視化できるようになった。そこで、これまでの研究を進展させ、酸化ストレス可視化マウスに歯周病を惹起して、リアルタイムで生体内での酸化ストレスの分布と経時的変化を把握することとした。その手法を用いれば、母体・胎児の酸化ストレスへの直接的な影響すなわち、経路・タイミング・今までわからなかった組織の変化などを詳細に検討できると期待される。さらに、その成果をもとに、効果的な妊娠期の抗酸化物質療法の開発・応用に寄与できるのではという着想に至った。

## 2. 研究目的

本研究では、歯周病の酸化ストレスによる胎児発育への影響について、酸化ストレス可視化マウスを用いて生きたままリアルタイムで検討することとした。

## 3. 研究方法

### 1)平成27年度

初年度の目標は妊娠中の酸化ストレスの計測及び、妊娠状態の経過の正確な把握とした。まず、動物実験を行う前に、研究内容について岡山大学動物実験施設の倫理委員会の承認を得た。

雌のTg型OKD-Lucマウスを歯周病群と対照群の2群に分けた。歯周病群には全身麻酔下でマウスの下顎臼歯に絹糸を巻き、歯周病を惹起させた。対照群には歯周病群と同様に麻酔のみをかけた。歯周病が確立して骨吸収が進行した7日後に交配を開始した。毎日交配したマウスの妊娠の有無を調べ、膣栓が確認された日を妊娠1日後とした。

絹糸を結紮した直後、結紮から1週間後、膣栓を確認してから7日後、14日後にそれぞれ酸化ストレスの分布を記録した。ルシフェリン(15mg/mL, 0.01mL/g)を腹腔内に注射した。10分以内にLumazineFA(日本ローパー,東京)を用いて、発光状態を撮影した。Luminescence imageを作成して、単位面積あたりの発光量を計算した。

### 2)平成28年度

胎児の発育状態の評価方法を検討することを目的とした。Tg型OKD-Lucマウスを歯周病群と対照群の2群に分けた。歯周病群には全身麻酔下でマウスの下顎臼歯に絹糸を巻き、歯周病を惹起させた。対照群には歯周病群と同様に麻酔のみをかけた。歯周病を惹起から10日後、マウスの雌雄をメイトイングし、毎日妊娠の有無を調べ、膣栓が確認された日を妊娠0.5日とした。メイトイング直前をbaselineとし、膣栓を確認してから7日後、14日後にそれぞれ酸化ストレスの分布を撮影した。撮影時にはルシフェリン(15mg/mL, 0.01mL/g)を腹腔内に注射した。10分以内にLumazineFA(日本ローパー,東京)を用いて、発光状態を撮影した。Luminescence imageを作成して、単位面積あたりの発光量を計算した。また、19日後に母体を屠殺し、胎児を抽出した。胎児発育の指標として、胎児のcrown-rump length (CRL)を計測した。

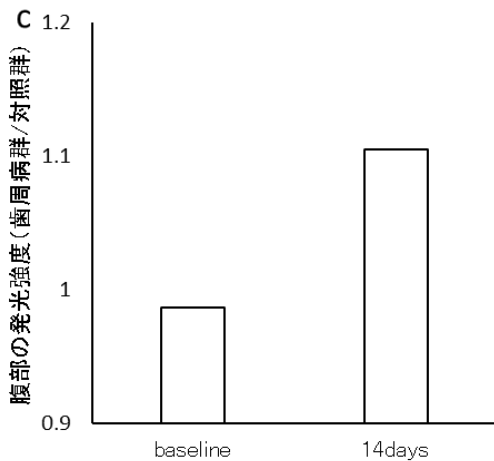
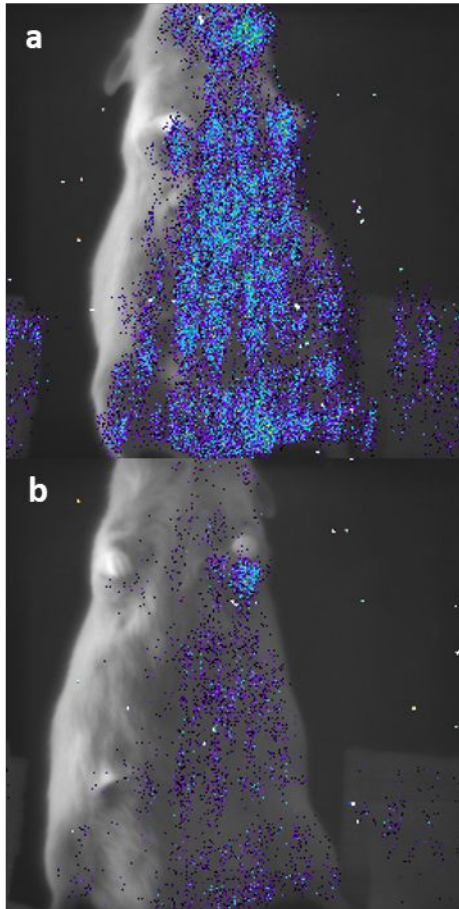
### 3)平成29年度

最終年度は今まで得られたデータをもとに、最適化した条件で妊娠中の酸化ストレスの計測、胎児の発育について検討することとした。次年度と同様に実験を行った。

歯周病惹起してから10日後をbaselineとし、膣栓が確認された日を0.5日とし、7日後、14日後に発光を計測した。また14日後に屠殺した際に、胎児を採取した。胎児の発育の指標として、Crown rump length (CRL)、体重を計測した。

## 4. 研究成果

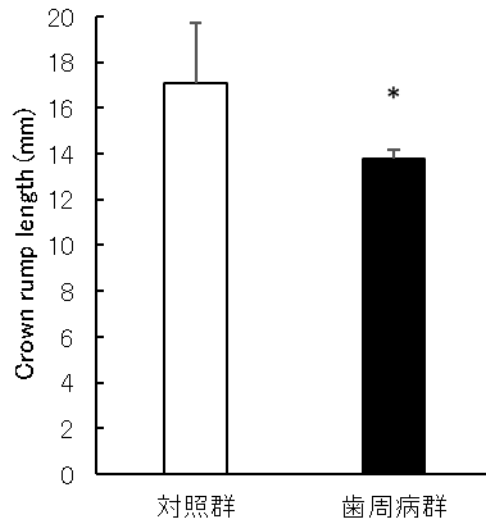
ルシフェラーゼ活性による腹部の単位面積当たりの発光を比較したところ、baselineでは歯周病群と対照群の間では有意な差は認められなかった。一方、妊娠 14 日後では歯周病群では、対照群と比べて高い値を示した。(図 1)。



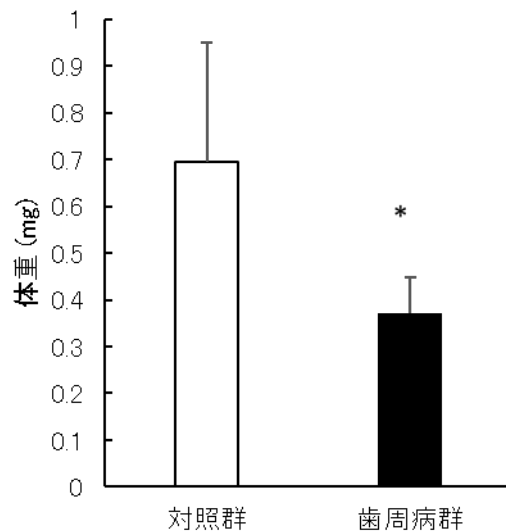
**図 1 . 歯周炎群と対照群における発光の違い**  
 (a) 歯周病群の発光イメージ (14 日目)  
 (b) 対照群の発光イメージ (14 日目)  
 (c) 対照群に対する歯周病群の腹部の発光強度の変化

採取された妊娠 14 日後の胎児の CRL は歯周病群では、対照群と比べ有意に低い値を示

した (図 2)。妊娠 14 日後の胎児の体重においても同様の傾向を示した (図 3)。



**図 2 . 妊娠 14 日後の胎児 CRL の比較 .**



**図 3 . 妊娠 14 日後の胎児体重の比較 .**

さらに歯周病群では、妊娠を継続したマウスで早産の傾向が認められた。

## 5 . 主な発表論文等

特になし

## 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 広太 (KATAOKA, Kota)  
 岡山大学病院・予防歯科・助教  
 研究者番号: 80744185

(2) 研究分担者

森田 学 (MORITA, Manabu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：40157904

友藤 孝明 (TOMOFUJI, Takaaki)  
朝日大学・歯学部・教授  
研究者番号：80335629

江國 大輔 (EKUNI, Daisuke)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：70346443

東 哲司 (AZUMA, Tetsuji)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：80432649