

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09601

研究課題名(和文) 根尖に沈着したコレステロール結晶の骨吸収促進作用とシクロデキストリンによる抑制

研究課題名(英文) Bone absorbent promotion by cholesterol crystals deposited in the apex and inhibition by cyclodextrin

研究代表者

白石 千秋 (SHIRAIISHI, Chiaki)

長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号：30336177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Wistarラット(体重約160g)がこの実験に使用された。全ての外科的処置はマイクロスコープ観察下にて行われた。#1/2の歯科用切削器具を用い露髄、4週間そのまま放置した。露髄4週間後CTにて根尖性歯周炎の成立が確認できた。その後、屠殺を行い上顎第一臼歯を含む上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定、10%EDTA溶液にて脱灰後にパラフィン包埋を行い6 μ mの連続切片を作製した。HE染色後光学顕微鏡にて観察を行ったがこの期間ではコレステロール結晶の析出は観察できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根尖性歯周炎の18～44%にコレステロール結晶が観察されるとされ、*in vitro*の実験でコレステロール結晶がマクロファージのIL-1 β の産生を誘導することにより骨吸収が促進することが2002年に報告されている。しかしながら、IL-1 β よりも生細胞から積極的に放出されるIL-1 α が根尖に析出したコレステロール結晶により産生されることについての報告はない。2010年に根尖病変において結晶成分の認識に必要なNLRP3の発現が上昇していることが報告されており、根尖周囲のコレステロール結晶によりインフラマソームが活性化され、IL-1 α が産生されるという本研究の仮説と整合性が保たれる。

研究成果の概要(英文)：Wistar male rats (weight about 160g) were used for the present experiments. All surgical procedures were performed under microscopic observation. Periapical lesions were induced by exposing the pulp of maxillary first molars using #1/2 round bur and leaving the open to the oral environment for 4 weeks. At 4 weeks postoperatively, the formation of periapical lesions was examined with micro-CT scanning. The rats were sacrificed, and maxillary samples containing the first molars were dissected. The specimens were fixed in 4% paraformaldehyde, decalcified in 10% EDTA, and embedded in paraffin. Preparation of 6 μ m thick serial sections were stained with hematoxylin and eosin (HE), and observed under a light microscope. However, the cholesterol crystals were not observed for this operative periods.

研究分野：歯科保存学

キーワード：コレステロール結晶 シクロデキストリン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、歯内療法の領域において歯科用マイクロスコープ、コーンビーム CT、マイクロエクスカベータ等の最新機器・器材が導入され、従来の治療法では抜歯となっていた多くの症例でも保存可能になってきた。しかし、なかには適切な歯内療法が行われたにもかかわらず症状の改善がみられない症例があり、これらは難治性根尖性歯周炎と分類され治療が困難になっている。

難治性根尖性歯周炎の原因として代表的な歯根嚢胞の根尖病変部において、しばしばコレステロール結晶が観察され、その周囲には多くの炎症性細胞が浸潤し、IL-1 等の炎症性サイトカインが発現している。コレステロール結晶は変性、壊死に陥った赤血球や白血球、あるいは結晶中の脂質成分が蓄積して生じると考えられている。コレステロール結晶を動物の皮下に埋入した実験では、これらがマクロファージや異物巨細胞に取り囲まれた状態で長期間残存することが観察されており、根尖の歯周組織においても吸収されにくい異物として病変部に長期間存在する可能性が示唆されている。よって、コレステロール結晶が難治性根尖性歯周炎の病態形成に一定の役割を果たすとすれば、そのメカニズムを明らかにすることは大変意義深いと考えられる。

近年、アテローム性動脈硬化病変部において、マクロファージがコレステロール結晶を貪食すると NLRP3 インフラマソームと呼ばれる細胞内たんぱく複合体が形成され、IL-1 のプロセッシングに必須のカスペーゼ 1 を活性化して成熟 IL-1 産生を誘導することが報告された (Duell *et al.*, Nature, 2010)。我々は予備実験において野生型マウスマクロファージではコレステロール結晶により IL-1 が誘導されるが、NLRP3 欠損マウスマクロファージでは誘導されにくいことを示す結果を得ている。これらの報告から、我々は、根尖病変に浸潤したマクロファージにおいてもコレステロール結晶による刺激で NLRP3 インフラマソームが活性化しているのではないかと仮説を立てた。

β-シクロデキストリンはその内側の空洞に他の分子を取り込む包接という能力により、幅広い用途がある。内部空洞に取り込まれた分子を紫外線や熱、酸化、加水分解などから守る「安定化」作用や、臭い、苦味成分などを包接する「マスキング」効果などが知られている。しかしながら、β-シクロデキストリンは未修飾のままでは水への溶解度が低いため、β-シクロデキストリンの水酸基をヒドロキシプロピル化したヒドロキシプロピル化 β-シクロデキストリンは水溶性が向上し、難溶性の物質を「可溶化」とともに、「保湿」作用も発揮する。近年、β-シクロデキストリンの治療薬として応用に向けた研究が進んでいる。ヒドロキシプロピル化 β-シクロデキストリンはコレステロールと結合する性質があり、ニーマン・ピック病 C 型マウスの線維芽細胞のリソソームに貯留したコレステロールを減少させることが知られている。これまでに

β-シクロデキストリンが根尖歯周組織の炎症反応を抑制したことを示す方向はない。また「安定化」や「可溶化」、「保湿」を目的に消毒薬、抗菌薬と混合して根管貼薬に用いた報告もない。

本研究において、ラットを用いた実験動物モデルで β-シクロデキストリンの根尖組織の炎症反応抑制効果が確認できれば、学術的独自性の高い化学的エビデンスであり、将来の根管貼薬剤としての応用が期待できる。

2. 研究の目的

根尖性歯周炎を治癒に導くために病因の解明や薬剤による病態制御などが検討されてきたが薬剤をヒトへ応用するためには、まず実験動物モデルの確立が必要になってくる。根尖性歯周炎においては小動物を用いた病態モデルは多数存在するが、治療薬や治療法の開発に係わる実験モデルは報告されてこなかった。これは、小動物の歯が極めて小さく、臼歯でさえも感染根管治療の実験モデルとして不適切であったためである。しかし、近年、歯内療法において歯科用マイクロスコープやマイクロエクスカベータの導入等、治療機器に技術革新が生じ、これらを動物実験に応用することで微小環境においても精密な根管処置が可能となり、ラットのような小動物でも臼歯を用いた感染根管治療が可能になってきた。また、高解像度実験動物用 3D マイクロ CT の利用で小動物の根尖病変の三次元的解析が可能となり病態の推移、治療後の評価制度もはるかに向上した。そこで根尖病変成立の推移を 3D マイクロ CT で確認を行いコレステロール結晶が根尖性歯周炎の病変部にどのような影響を与えるかについてラットを用いた動物実験モデルで解析する。

一方、コレステロール結晶による組織傷害の治療薬として β-シクロデキストリンが注目されている。β-シクロデキストリンはその内側の空洞に他の分子を取り込む包接という能力により、幅広い用途があるが、未修飾のままでは水への溶解度が低い。β-シクロデキストリンの水酸基をヒドロキシプロピル化したヒドロキシプロピル化 β-シクロデキストリンは水溶性が向上した上にコレステロールと結合する性質があり、ニーマン・ピック病 C 型マウスの線維芽細胞のリソソームに貯留したコレステロールを減少させる (Rosenbaum *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. Transl. Med., 2010)。また、高カロリー食マウスのコレステロール値を減少させ (Zimmer *et al.*, Sci. Transl. Med., 2016)、コレステロール結晶により誘導された補体を介する炎症反応を抑制することが示された (Bakke *et al.*, J. Immunol., 2017)。これらの β-シクロデキストリンがコレステロール代謝を制御し、コレステロール結晶による炎症反応を抑制する作用

を有することが報告されたが、これまでに β -シクロデキストリンが根尖の歯周組織の炎症反応を抑制したことを示す報告はない。今回行うラットを用いた実験動物モデルで根尖病変成立におけるコレステロール結晶の影響及び β -シクロデキストリンの根尖歯周組織の炎症反応抑制効果について検討していく。

3. 研究の方法

6 週齢 Wistar ラットに 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与した後、ラバーダム防湿下にて、先端の直径が 0.5mm の滅菌済み歯科用切削器具を用いて顕微鏡観察下にて上顎第一大臼歯を両側とも露髄・髓室開拓を行い、マイクロエキスカで歯冠部歯髄を除去した後、4 根管すべてを根管口にて断髄を行う。近心根以外の 3 根の根管口は断髄後、光重合型ガラスイオノマーセメントにて封鎖を行い近心根の根管口のみ開放状態にする。なお実験に用いる上顎第一大臼歯の実験期間中での破折を防ぐために対合歯となる下顎第一大臼歯の抜去を行う。露髄後 1 週間おきに同様の 3 種混合麻酔薬を投与後、CT にて上顎第一大臼歯を含む上顎骨の撮影を行い根尖性歯周炎の成立過程を観察していく。根尖性歯周炎の成立が確認出来たら 3 種混合麻酔薬の過剰投与により屠殺を行い上顎第一大臼歯を含む上顎骨をできるだけ小さく摘出する。軟組織を除去した後、通法に従い 4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定、10%EDTA 溶液にて脱灰後パラフィン包埋を行い、厚さ 6 μ m の連続切片を作製する。HE 染色標本作製後、光学顕微鏡にて上顎第一大臼歯近心根及びその周囲組織を観察しコレステロール結晶の析出の有無を調べる。

4. 研究成果

露髄 2 週間経過すると根尖部にエックス線透過像が確認できるようになった。露髄 4 週間経過するとマイクロ CT にて根尖性歯周炎の成立が確認でき、その後は透過像の大きさはさほど変化がないことも確認できた。これらの実験結果から根尖性歯周炎の成立には露髄 4 週間が適切な期間だと判断することとなった (図 1)。そこで、露髄 4 週間経過後に 3 種混合麻酔薬の腹腔内への過剰投与により屠殺を行い上顎第一大臼歯を含む上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定、10%EDTA にて脱灰後にパラフィン包埋を行い、厚さ 6 μ m の連続切片を作製した。HA 染色標本作製後、光学顕微鏡にて上顎第一大臼歯近心根及びその周囲組織の観察を行い、慢性根尖性歯周炎に特有の炎症性細胞の浸潤が観察されたため、ラットを用いた感染根管治療モデルが、今後の根管貼薬剤の開発を進める上で最適であることがわかった。ただ、コレステロール結晶の析出は確認できなかったためもっと実験期間を長くするか、事前に根管内にコレステロール結晶を注入するなどの工夫が必要なことが示唆された (図 2)。

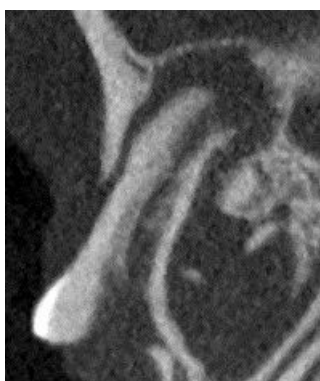


図 1：露髄 4 週間後のラット上顎第一大臼歯近心根根尖部の CT 撮影

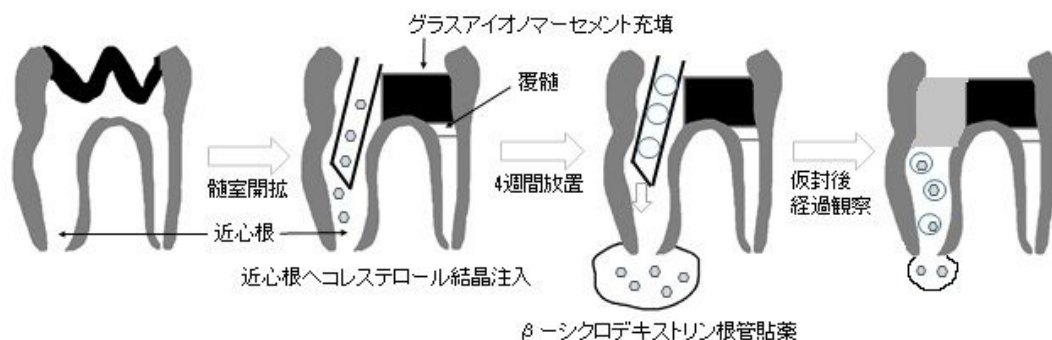


図 2：ラット実験的根尖性歯周炎モデル成立までの過程

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 尾崎幸生, 山下恭徳, 前めぐみ, 大平真之, Ziauddin SM, Alam ZM, 樋口賀奈子, 金子高士, 吉村篤利
2. 発表標題 ペプチドグリカンおよびリポ多糖投与マウス歯槽骨面上の破骨細胞形成におけるIL-10の役割
3. 学会等名 日本歯科保存学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鵜飼 孝 (UKAI Takashi) (20295091)	長崎大学・病院(歯学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	尾崎 幸生 (OZAKI Yukio) (60204187)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究分担者	吉村 篤利 (YOSHIMURA Atsutoshi) (70253680)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	
研究分担者	柳口 嘉治郎 (YANAGIGUCHI Kajiro) (50264255)	長崎大学・病院(歯学系)・講師 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------