

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2014

課題番号：24890169

研究課題名(和文)口腔内細菌菌体破砕物及び外傷性咬合の歯周ポケット形成への関与の検討

研究課題名(英文) Examination of the participation in periodontal pocket formation of oral bacteria and the occlusal trauma

## 研究代表者

高森 明子(藏本明子)(KURAMOTO, Akiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：30631478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ラット歯周炎モデルに外傷性咬合を付与した実験を行った。屠殺後、上顎第一臼歯周囲の歯周組織の病理組織学的検討を行い、外傷性咬合の歯周組織破壊への関与を検討した。また、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A. a.)および*Streptococcus aureus* (S. a.)による歯周炎誘導実験を行った。組織標本作製して、病理組織学的検討を行い、口腔内細菌と歯周組織破壊の関係を検討した。

研究成果の概要(英文)：Both trauma and periodontal inflammation were simultaneously induced in rats. All rats were killed and their maxillary first molars with surrounding tissues were observed histopathologically. We examined participation in periodontal destruction of the occlusal trauma. Furthermore, we induced periodontitis in rats by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* or *Streptococcus aureus*. Periodontal tissues were observed histopathologically. We examined participation in periodontal destruction of the oral bacteria.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯周炎 外傷性咬合 口腔内細菌 アタッチメントロス

### 1. 研究開始当初の背景

歯周炎患者の特徴の一つである歯槽骨吸収は破骨細胞により生じる。この破骨細胞形成には receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) が重要な役割を果たす (Udagawa *et al.* *Bone* 1999)。RANKL のレセプターである RANK は破骨細胞前駆細胞や成熟破骨細胞表面に存在し、破骨細胞前駆細胞の RANK は骨芽細胞上に発現する RANKL を介した細胞間接触により活性化する (Hofbauer *et al.* *J Bone Miner Res* 2000)。一方で細菌やグラム陰性細菌の構成要素である lipopolysaccharide (LPS) は T 細胞の RANKL 発現を誘導し、破骨細胞形成を誘導する (Jiang *et al.* *Infect Immun* 2002)。一般的に、外傷性咬合存在下では歯周組織破壊が進行するが、外傷性咬合単独では可逆的な歯槽骨吸収を誘導するものの歯周炎自体は引き起こさない (Glickman *et al.* *J Periodontol* 1962)。当講座の過去の報告では、LPS をラット歯肉へ局所投与して炎症を惹起し、さらに第一臼歯咬合面に過高な gold inlay を装着することで外傷性咬合を与えた。その結果、外傷性咬合を与えた群では 10 日間持続して RANKL 発現細胞および破骨細胞を認めたが、外傷性咬合を負荷しなかった群では、5 日目に RANKL 発現細胞および破骨細胞を認めたものの、10 日目には減少した。この実験結果より外傷性咬合が破骨細胞の増加や維持に関与することが明らかになった (Yoshinaga *et al.* *J Periodontal Res* 2007)。このように、外傷性咬合が歯槽骨吸収を含む歯周組織の炎症の持続に関与することが示唆されるが、歯周ポケット形成に与える影響は未だに明らかでない。

一方、歯周炎患者では歯周病原性細菌に対する血清抗体価が上昇していること (Taubman *et al.* *J Periodontal Res* 1992) が報告されている。そこで我々はこれまで、免疫感作による特異抗体レベルの上昇が歯周炎の発症および進行に関与していると考え、以下の実験を行ってきた。ラットの腹腔に *Escherichia coli* (*E. coli*) LPS を投与して免疫系を活性化した感作ラットを作製、感作ラットの心血を採取して血清を分離、IgG を精製し、これを抗 LPS IgG 抗体とした。また、ovalbumin (OVA) についても同様の手法にて抗 OVA IgG 抗体を精製した。そして LPS と抗 LPS IgG、あるいは OVA と抗 OVA IgG をラット歯肉溝へ交互に滴下し、歯肉溝で免疫複合体を形成させると、両実験群で明確な歯周ポケットを形成し、LPS を抗原とした方が、OVA よりも歯周ポケットの形成量は有意に大きかった。このことから、局所での免疫複合体形成が歯周ポケット形成に関与すること、さらに抗原の生物学的活性が組織破壊の程度に関係することを報告した (Kuramoto *et al.* *J Periodontal Res* in press)。本来歯肉溝へ滲出する IgG は内因性のものであり血清に由来

することから、我々は前述の結果をより詳細に検討するため、LPS で感作したラット歯肉溝へ高濃度 LPS を滴下して同様の現象が起こることを確認し、ラット歯周炎モデルを確立した (Yoshinaga *et al.* *J Periodontal Res* in press)。このモデルでは免疫感作したラットで 10 日目に明確な歯周ポケットが認められると同時に、抗 LPS 血清 IgG 抗体レベルも上昇しており、歯周炎の発症には特異的抗体レベルの上昇が関与することが示唆された。実際の歯周ポケット形成および歯槽骨吸収などの歯周組織破壊は、口腔内プラークにより引き起こされる。したがって本研究では前述の知見を基に、グラム陽性細菌の *Streptococcus aureus* (*S. a.*) あるいは歯周病原性細菌の一つとされるグラム陰性細菌の *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. a.*) の菌体破砕物にて免疫感作したラット歯肉溝へ各々の菌体破砕物を滴下し、同時に外傷性咬合を加えることで、外傷性咬合が歯周ポケット形成の程度や時期に与える影響を検討する。また、歯周炎の重要な所見の一つである歯槽骨破壊の程度の変化についても検討する予定である。

### 2. 研究の目的

歯周炎患者に見られる重要な臨床所見は、歯周ポケット形成および歯槽骨吸収を特徴とする歯周組織破壊である。一般的に歯周炎の発症および進行には、細菌感染とそれに対する宿主免疫反応のアンバランスが関与すると言われている。申請者はその一端を解明することに成功し、免疫複合体形成が歯周ポケット形成を含む歯周組織破壊を誘導することを報告した (Kuramoto *et al.* *J Periodontal Res* in press, Yoshinaga *et al.* *J Periodontal Res* in press)。一方で、過剰な咬合力 (外傷性咬合) は可逆的な歯槽骨吸収を引き起こすとされているが、歯周ポケット形成への関与の有無は明らかでない。実際の歯周炎患者の口腔内では細菌感染と外傷性咬合が同時に生じることも多く、これらは歯周炎の発症および進行において相乗的に作用すると考えられる。したがって、細菌感染と外傷性咬合の相乗的作用による歯周組織破壊への関与のメカニズムを解明することは非常に有意義と考えられる。

本研究では、当講座でこれまでに報告した歯周ポケットを形成する実験系を用いて、歯周ポケット形成と同時に外傷性咬合を加えることで、外傷性咬合が歯周ポケット形成の程度や時期に与える影響を検討することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### 1) LPS による歯周炎誘発と咬合性外傷誘発

Lewis 系雄性ラットに Complete Freund's adjuvant で乳化した *Escherichia coli* (*E. coli*)

LPS(O111: B4; Sigma, St Louis, MO, USA) 150 µg を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS) 0.3 ml を腹腔内投与する。28 日後に Incomplete Freund's adjuvant で乳化した LPS 150 µg を含む PBS 0.3 ml を腹腔内投与する。

次に、ラットを歯周炎の誘発と外傷性咬合の組み合わせにより、咬合性外傷誘導群(T群)、炎症誘導群(I群)、咬合性外傷+炎症誘導群(T+I群)および対照群(Cont群)に分類する。LPS の booster 投与の 1 日後、T 群および T+I 群には上顎右側第 1 臼歯に咬合性外傷を誘導するために、ペントバルビタールナトリウム(0.5 ml/kg of body weight) 麻酔下で下顎右側第 1 臼歯の咬合面に 1 mm 径の inlay を接着性レジン(Super-Bond C & B; Sun Medical, Shiga, Japan)にて装着する。また LPS の booster 投与の 1 日後、I 群および T+I 群にはイソフルラン麻酔下で上顎右側第 1 臼歯口蓋側歯肉溝にマイクロピペットを用いて LPS (50 µg/µl)を懸濁した PBS を滴下投与する。LPS を懸濁した PBS 合計 18 µl (3 µl × 6 回)を 1 日当たり 30 分間滴下し、各滴下の間隔は 5 分間とする。Cont 群および T 群には PBS を同様に滴下する。5 回目および 10 回目の滴下の 1 時間後に各群のラットを屠殺する。屠殺後直ちに右側の上顎骨を摘出し 4%パラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液(pH7.4)にて 4 で 10 時間固定する。10% EDTA-2Na (pH7.4)にて 4 で 3 週間脱灰したのち、AMeX 法(Sato *et al. Am J Pathol* 1986)にてパラフィン包埋し、上顎右側第一臼歯の頬舌的な連続切片(厚さ 4 µm)を作製する。病理組織学的観察のため、各群の切片をヘマトキシリン・エオジン染色(H.E.染色)し、組織学的計測を行う。H.E.染色切片を光学顕微鏡下で撮影し、画像解析処理ソフト ImageJ を用いて、セメントエナメル境(CEJ)から接合上皮の根面に接した歯冠側端までの距離を attachment loss として計測する。また、破骨細胞の同定のため、各群の切片を用いて TRAP 染色(Katayama *et al. Cancer* 1972)を行った切片にて、歯槽骨頂部から 500 µm 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する。

パラフィン切片上で免疫複合体を検出するには、抗原と補体の免疫染色を通常は行うが、我々が行った過去の実験で LPS と抗 LPS IgG を滴下した際に、抗原である LPS は広範囲に検出されたため、本研究では免疫複合体検出のために、免疫複合体に最初に結合する補体成分である C1 の免疫組織化学的染色を行い、その局在部位を観察する。

2)血清抗 LPS IgG 抗体レベル測定(ELISA 法)

眼窩下静脈叢から血液サンプルを得る。血清中の抗 LPS IgG 抗体レベルは各々の血

清サンプルを用いて ELISA 法により測定する。

3)細菌培養

*S. a.*培養:-80 にて保存した菌を解凍後、プレートに播種してコロニーを形成させ、Brain Heart Infusion broth (BD211059)にて 37 で嫌氣的に24時間培養する。

*A. a.*培養:-80 にて保存した菌を解凍後、プレートに播種してコロニーを形成させ、Todd-Hewitt Broth supplemented with 0.3% yeast extract (BD249240, BD212750)にて 37 で嫌氣的に24時間培養する。

前述の方法で培養した *S. a.* および *A. a.* を遠心分離し、得られた菌塊を -80 にて保管する。翌日凍結乾燥を行い、乾燥菌体を集菌する。

4) *S. a.* および *A. a.* による歯周炎誘導と咬合性外傷誘導

乾燥菌体を感じたらびに滴下に使用する。腹腔内感作:乾燥菌体 5 mg/ml を超音波で 1 分間破碎後、10 分間加熱する。

滴下:乾燥菌体 25 mg/ml を超音波で 1 分間破碎後、10 分間加熱する。

Lewis 系雄性ラットに、Complete Freund's adjuvant で乳化した *S. a.* あるいは *A. a.* の破碎物 500 µl を含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS) 1 ml を腹腔内投与する。28 日後に Incomplete Freund's adjuvant で乳化した *S. a.* あるいは *A. a.* の破碎物 500 µl を含む 1 ml を腹腔内投与する。次にラットを、歯周炎を誘導させた菌種と外傷性咬合の組み合わせにより、咬合性外傷誘導群(T群)、炎症誘導 *S. a.* 群(IS群)、炎症誘導 *A. a.* 群(IA群)、咬合性外傷+炎症誘導 *S. a.* 群(T+IS群)、咬合性外傷+炎症誘導 *A. a.* 群(T+IA群)および対照群(Cont群)に分類する。T群、T+IS群および T+IA群には咬合性外傷を誘導する。また IS群および T+IS群には細菌の booster 投与の 1 日後、イソフルラン麻酔下で上顎右側第 1 臼歯口蓋側歯肉溝にマイクロピペットを用いて *S. a.* (25 µg/µl) を懸濁した PBS を滴下投与する。IA群および T+IA群には *A. a.* (25 µg/µl) を懸濁した PBS を滴下投与する。Cont群および T群には PBS を同様に滴下する。5 回目および 10 回目の滴下の 1 時間後に各群のラットを屠殺する。病理組織学的観察と計測を行う。

5)血清抗 *S. a.* IgG 抗体レベルおよび血清抗 *A. a.* IgG 抗体レベル測定(ELISA 法)

ベースライン、5 回目および 10 回目の滴下後に眼窩下静脈叢から血液サンプルを得る。血清中の抗 *S. a.* IgG 抗体レベルおよび抗 *A. a.* IgG 抗体レベルは各々の血清サンプルを用いて ELISA 法により測定する。

4. 研究成果

LPS を用いたラット歯周炎モデルに外傷性咬合を付与した実験を行った。LPS で免疫

感作後、LPS を歯肉溝へ滴下し、同時に臼歯部咬合面に過高な inlay を装着することで外傷性咬合を与えた。その後屠殺し、組織標本を作製して病理組織学的観察のため、各群の切片をヘマトキシリン・エオジン染色(H.E.染色)し、組織学的計測を行った。H.E.染色切片を光学顕微鏡下で撮影し、画像解析処理ソフト ImageJ を用いて、セメントエナメル境(CEJ)から接合上皮の根面に接した歯冠側端までの距離を attachment loss として計測した。また、破骨細胞の同定のため、各群の切片を用いて TRAP 染色を行った切片にて、歯槽骨頂部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。免疫複合体検出のために、C1q の免疫組織化学的染色を行い、その局在部位を観察した。血清中の抗 LPS IgG 抗体レベルは各々の血清サンプルを用いて ELISA 法により測定した。また、*S. a.* および *A. a.* による歯周炎誘導実験を行った。*S. a.* は 37 で嫌氣的に 24 時間培養した。*A. a.* も 37 で嫌氣的に 24 時間培養した。*S. a.* および *A. a.* の菌体破砕物で免疫感作後、*S. a.* および *A. a.* を歯肉溝へ滴下し、歯周炎を誘発した。組織標本を作製して attachment loss を計測した。血清中の抗 *S. a.* および *A. a.* IgG 抗体レベルは各々の血清サンプルを用いて ELISA 法により測定した。

#### 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 2 件)

1. Nakatsu S, Yoshinaga Y, Kuramoto A, Nagano F, Ichimura I, Oshino K, Yoshimura A, Yano Y, Hara Y.

Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats. : J Periodontal Res, 49(3), 314-322, 2013 査読あり  
10.1111/jre.12021 [doi]

2. F. Nagano, T. Kaneko, Y. Yoshinaga, T. Ukai, A. Kuramoto, S. Nakatsu, K. Oshino, I. Ichimura, Y. Hara  
Gram-positive bacteria as an antigen topically applied into gingival sulcus of immunized rat accelerates periodontal destruction: J Periodontal Res, 48(7), 420-7, 2013 査読あり  
10.1111/jre.12109 [doi]

[学会発表](計 5 件)

1. S. Nakatsu, Y. Yoshinaga, A. Kuramoto, F. Nagano, T. Ukai, I. Ichimura, K. Oshino, A. Yoshimura, Y. Yano, Y. Hara  
Occlusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats

10h asian Pacific Society of Periodontology Meeting, Nara Prefectural New Public Hall (Nara-city, Nara, Japan), September 3 -4, 2013

2. 長野 史子、金子 高士、吉永 泰周、鶴飼 孝、藏本 明子、高森 雄三、野口 恵司、原 宜興

ラットにおけるグラム陽性細菌の感作および歯肉溝内滴下は歯周組織破壊を促進する  
第 5 回「口腔環境制御研究」カテゴリー集会、長崎大学医学部ポンペイ会館(長崎県長崎市)、2013 年 2 月 1 日

3. 中津 晋、吉永 泰周、藏本 明子、長野 史子、市村 育久、押野 一志、矢納 義高、原 宜興

咬合性外傷は実験的歯周炎の開始期におけるアタッチメントロスを誘導する  
平成 24 年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部 合同研修会、アクロス福岡(福岡県福岡市)、2012 年 10 月 28 日

4. 長野 史子、吉永 泰周、金子 高士、藏本 明子、中津 晋、高森 雄三、野口 恵司、岸本隆明、原 宜興

菌体破砕物による感作とその歯肉溝内滴下は歯周ポケットの形成を誘導する  
第 55 回日本歯周病学会春季学術大会、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)、2012 年 5 月 17 日 ~ 19 日

5. 長野 史子、吉永 泰周、金子 高士、藏本 明子、中津 晋、高森 雄三、野口 恵司、岸本隆明、原 宜興

菌体破砕物による感作とその歯肉溝内滴下は歯周ポケットの形成を誘導する  
平成 23 年度日本歯周病学会九州五大学日本臨床歯周病学会九州支部 合同研修会、長崎県歯科医師会館(長崎県長崎市)、2011 年 11 月 20 日

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藏本 明子 (KURAMOTO, Akiko)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教  
研究者番号: 30631478

##### (2) 研究分担者

(無し)

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

(無し)

研究者番号: