

## 論文の内容の要旨

氏名：望 月 小枝加

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*Porphyromonas gingivalis* 感染がもたらす全身への影響

—マウス口腔内感染モデルでの検討—

糖尿病による慢性高血糖状態の持続は、過剰な炎症反応あるいは創傷治癒遅延を惹き起こし、ひいては歯周組織破壊をもたらすと考えられている。歯周病は、持続的な炎症疾患であることから、歯周組織局所で産生される炎症性サイトカインは血流を介して全身に波及し、インスリン抵抗性を惹起するとされている。糖尿病と歯周病との関連性の解明を目的とした動物実験での検討も行われており、西原らは糖尿病マウスを用いて頭頂部への *Porphyromonas gingivalis* (以後、*P. gingivalis*) 感染が血糖値および血清レベルでの TNF- $\alpha$  および IL-6 の上昇をもたらすことを示している。一方、細菌由来の LPS が肝臓への脂肪沈着を助長するとの報告があり、歯周病が肥満に影響を与える可能性も示唆されている。そこで本研究では、両疾患の発症とその関連性における炎症性サイトカインおよび脂質代謝遺伝子の役割を明らかにするために、歯周病原細菌感染モデル（以後、歯周病モデル）を 2 型糖尿病マウスを用いて作製し、検討を加えた。

実験には、糖尿病マウスとして KK-Ay/Ta マウス 20 匹およびコントロールマウスとして C57BL/6 マウス 20 匹、合計 40 匹（雄性 6 週齢）を用いた。マウスは、恒温恒湿で 12 時間明暗サイクルの飼育室において 1 週間順化させた。なお、飼育期間中は飼料と水道水を自由に摂取させた。*P. gingivalis* FDC 381 を 1% パラホルムアルデヒドで固定し、その  $2.5 \times 10^8$  個/50  $\mu$ l をマウス背部皮下に 1 週間毎 3 回接種し、感作を行った。感作開始から 4 週目に、*P. gingivalis* の生菌 ( $2.0 \times 10^8$  個/ml) を含む培養液に絹糸を浸漬し、KK-Ay/Ta と C57BL/6 マウスの上顎右側第 2 臼歯の歯肉溝に結紮した。歯肉溝への結紮から 0, 1, 5, 7 および 10 日目において体重および血糖値の測定を行った。各群 5 匹ずつ、結紮から 0, 5, 7 および 10 日後に予備麻酔として 5% イソフルラン麻酔を吸入させた後、三種混合麻酔（塩酸メドミジン 0.3 mg/kg, ミダゾラム 4 mg/kg, 酒石酸ブトルファノール 5 mg/kg）を腹腔内注射し、全身麻酔を施し、1/80,000 エピネフリン含有 2% キシロカインで腹部切開部位に局所麻酔を行った。その後、還流固定に準じた方法によって採血および脱血を行い、10% 中性緩衝ホルマリン液を用いて全身固定して、上顎骨および肝臓を切除し、試料とした。

上顎骨は、実験動物用 3D マイクロ CT を用いて、口蓋骨が基準平面（水平面）と平行で、正中口蓋縫合が基準平面（垂直面）に平行となるように試料方向を調整し、接種後 0, 5, 7 および 10 日目に上顎右側第 2 臼歯の撮影を行った。撮影条件は voxel size  $20 \times 20 \times 20 \mu$ m, 管電圧 90 kV, 管電流 100  $\mu$ A および照射時間 17 秒とした。得られたデータは、i-VIEW を用いて解析し、矢状方向 (X) の断層像を観察した。上顎右側第 3 臼歯近心と第 2 臼歯遠心のセメント-エナメル境を結び、この基準線から垂直に歯槽骨頂部までの距離を測定し、その距離を歯槽骨吸収量とした。血清 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) および interleukin-6 (IL-6) タンパク量は ELISA kit を用いて測定し、リアルタイム PCR 法を用いて肝臓中の TNF- $\alpha$ , IL-6, adiponectin receptor 2 (Adipo R2), sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c) および insulin receptor substrate-2 (IRS-2) の遺伝子発現を測定した。

灌流後の各マウスから結紮を行った第二臼歯を含む領域を切除し、組織切片作製のために 4% パラホルムアルデヒド液中に 12 時間浸漬することで固定し、0.5 M EDTA にて脱灰させた後、通法に従ってパラフィンに包埋した。上顎右側第 2 臼歯を中心に矢状方向に 5  $\mu$ m の厚さで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後、光学顕微鏡を用いて観察を行った。

コントロールマウスと糖尿病マウス間の有意差の検定には、Mann-Whitney の *U* 検定を用い、同一マウス群間における 0 日に対する有意差の検定には、Wilcoxon の符号付順位和検定を用いた。また、いずれの検定においてもその危険率を 5% とした。

糖尿病マウスおよびコントロールマウスともに、実験期間中における有意な血糖値および体重の変化は

認められなかった。マイクロ CT 画像による歯槽骨の解析では、糖尿病マウスにおいて根尖付近に及ぶ歯槽骨吸収が観察された。歯槽骨吸収量は、10 日目の糖尿病マウスにおいてコントロールマウスと比較して、有意な増加が認められた。糖尿病マウスでは 5 日目から、コントロールマウスでは 7 日目から、0 日目と比較して有意な歯槽骨吸収量の増加が認められた。組織学的所見からは、10 日目の糖尿病マウスでコントロールマウスと比較して著明な炎症性細胞の浸潤と歯槽骨吸収が認められた。

血清中の TNF- $\alpha$  および IL-6 タンパク量は、糖尿病マウスおよびコントロールマウスのいずれにおいても、実験期間中で変化は認められなかった。肝臓中 TNF- $\alpha$  遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて 0 日目で、コントロールマウスと比較して有意に高かった。経時的には、両群とも 5 日目に 0 日目と比較して有意な上昇が認められた。IL-6 遺伝子の発現は、コントロールマウスにおいて 5 日目で糖尿病マウスと比較して、有意に高かった。経日的には、コントロールマウスで 0 日目と比較し 5 日目において有意な上昇が認められた。Adipo R2 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて 10 日目でコントロールマウスと比較して有意に低下した。SREBP-1c 遺伝子の発現は、糖尿病マウスで 5 および 7 日目においてコントロールマウスに比べ有意に高くなった。IRS-2 遺伝子の発現は、糖尿病マウスにおいて 5 日目以降でコントロールマウスと比較して有意に低下した。経日的にはコントロールマウスで 0 日目と比較して 5 日目に有意に上昇した。一方、糖尿病マウスでは 0 日目と比較して 7 日目以降で有意な低下が見られた。

本研究で用いた歯周病モデルでは、糖尿病マウスにおいてコントロールマウスと比較して明らかな歯槽骨吸収が認められたことから、歯周病と糖尿病の相互関係を検討するために用いることが可能と考えられた。この実験モデルを用いて行った本実験の結果から、歯周組織局所に *P. gingivalis* を接種したことによって、血糖値および血清中 TNF- $\alpha$ , IL-6 タンパク量に有意な変化は認められなかった。しかし、肝臓においては TNF- $\alpha$  遺伝子発現は 5 日目に上昇した。このことは、インスリンの標的器官である肝臓の正常な糖代謝を阻害し、糖尿病の発症や進展に少なからず関与していることを示すものと考えられた。さらに、肝臓での SREBP-1c 遺伝子発現において、糖尿病マウスでは 5 および 7 日目でコントロールマウスに比べ有意に高かった。一方、IRS-2 は糖尿病マウスにおいて 0 日目と比較して、結紮期間を追うごとに有意に減少した。これは、インスリン作用の障害を惹起し、その結果インスリン抵抗性につながる可能性を示すものである。一方、コントロールマウスでは 0 日目と比較して 5 日目で IRS-2 の上昇が認められた。IRS-2 は、IL-6 によってその発現が誘導され、細菌の接種によって誘導された IL-6 が IRS-2 を上昇させ、肝臓での恒常性を保つ機能が作用した可能性がある。

本研究の結果における Adipo R2 発現の変動は、実験期間中のインスリンレベルの変化によってもたらされた可能性が考えられた。Adipo R2 は、糖尿病マウスにおいて 10 日目でコントロールマウスと比較してその発現が有意に低下し、これによってアディポネクチンの作用不全が生じてインスリン抵抗性を示したものと推測される。このような代謝関連遺伝子の発現の変動は、肝臓での脂肪合成の増加やインスリン作用の障害をもたらす、歯周病を有する糖尿病患者の脂質代謝異常、脂肪肝の形成あるいは糖尿病の症状の悪化の一因になる可能性が示唆された。本実験に用いた歯周病モデルでは、全身レベルとしての変化は認められなかったが、肝臓における遺伝子発現レベルの変化が持続することによって、肝臓疾患、糖尿病あるいは脂質代謝異常など全身への影響を及ぼす可能性が考えられた。

以上のように、糖尿病を有するマウス歯周病モデルを用いた本研究の結果から、歯周組織局所の *P. gingivalis* 接種は肝臓の遺伝子発現に影響を及ぼすことが示された。