

論文の内容の要旨

氏名：齊藤 幸治

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*Porphyromonas gingivalis* 由来のリポ多糖の作用の生化学的および行動学的特徴

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) は、歯周疾患の発症へ関与すると考えられているグラム陰性桿菌のひとつである。グラム陰性細菌の細胞壁の構成要素のリポ多糖 (Lipopolysaccharide: LPS) で *Pg* 由来の *Pg*-LPS は、歯周疾患の進行において重要な役割を果たすことが示唆されている。

歯周疾患の全身への影響には、この疾患に関わる微生物または微生物由来の生理活性物質の血流を介した移行が関与することが考えられる。これまで全身麻酔下のラットを用いた *in vivo* の研究から、*Pg*-LPS は歯肉に局所投与すると同部位の細胞外液中の TNF- α 量を一過性に増大させることが示されている。しかし、歯肉へ局所投与された *Pg*-LPS が血中の TNF- α 量に及ぼす影響については明らかでなかった。また、マウスの行動実験から、代表的なグラム陰性桿菌の *Escherichia coli* (*Ec*) 由来の LPS である *Ec*-LPS の全身投与は、うつ様行動のモデルのひとつとして知られる強制水泳試験 (forced swimming test: FST) において水中で浮いたままとなる行動である不動の時間を延長させるとの報告はあったものの、*Pg*-LPS の全身投与が FST の不動を促進するか否かについては明らかでなかった。

そこで本研究の第 1 章では、urethane 麻酔下のラットから回収した血液を試料とし *Pg*-LPS の歯肉への投与が試料中の TNF- α 量に及ぼす影響について生化学的に検討した。また第 2 章では、FST におけるマウスの不動時間へ *Pg*-LPS の全身投与が及ぼす影響について行動学的に検討した。いずれの実験も *Pg*-LPS の作用は *Ec*-LPS と比較して検討した。

第 1 章では、実験時の体重が 300~350g の Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを用いた。Urethane (1.5 g/kg) の腹腔内投与による全身麻酔を施した後、実験 1 として右上切歯に固定した歯肉実質への薬物注入用微小ニードルを介して、マイクロシリンジにより *Pg*-LPS (1 μ g /1.0 μ l) および *Ec*-LPS (1 μ g/1.0 μ l) を 30 秒かけて局所投与した。対照群には 1.0 μ l の溶媒の滅菌精製水を同様に投与した。さらに実験 2 として歯肉に投与したのと同じ 1 μ g の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS、溶媒の生理食塩液を左外頸静脈に留置したカテーテルを介した投与のほか、比較のため高用量 (5 mg/kg) の *Ec*-LPS の投与実験も行った。これらの薬液と溶媒の投与量は体重 100g あたり 0.1 ml とした。実験 1、2 ともあらかじめ左外頸静脈に挿入したカテーテルを介して血液を試料として回収し、実験 1 では ELISA 法、実験 2 ではビーズ法を用いて TNF- α と IL-6 の定量に取組んだ。

実験 1 の結果、溶媒の歯肉への投与では、試料中の TNF- α は検出限界以下であったが、*Pg*-LPS (1 μ g) の歯肉内への投与で増加した。*Ec*-LPS (1 μ g) の歯肉内への投与では TNF- α に有意な変化が認められなかった。溶媒、*Pg*-LPS および *Ec*-LPS (1 μ g) は試料中の IL-6 量に有意な影響は及ぼさなかった。実験 2 の結果、溶媒の静脈内投与では、試料中の TNF- α は検出限界以下であったが、高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与は TNF- α 量を著しく増加させた。一方、歯肉内投与に用いた用量の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 μ g) 静脈内投与は試料中の TNF- α 量に有意な影響を及ぼさなかった。また、溶媒の静脈内投与後、試料中の IL-6 量に有意な変化は認められなかったが、高用量の *Ec*-LPS (5 mg/kg) の静脈内投与は IL-6 量を増加させた。歯肉内投与に用いた用量の *Pg*-LPS または *Ec*-LPS (1 μ g) の静脈内投与は IL-6 量に顕著な影響は及ぼさなかった。以上の第 1 章の研究から、歯肉内に投与された *Pg*-LPS が血中 TNF- α 量を増加させることが *in vivo* の条件下で示された。また、歯肉内に投与された *Pg*-LPS が歯肉組織にある細胞で LPS が結合する Toll-like receptor (TLR) への結合を介して血中 TNF- α 量を増加させることが示唆された。この TNF- α の増加は、TNF- α の歯肉の細胞間隙から血行への移行を介して起きた可能性が推察された。

第 2 章では、実験時の体重が約 20 g の ddY 系雄性マウスを用いた。FST は、マウスを水道水を注いだガラス製の円筒型水槽 (直径 12 cm, 高さ 27 cm) に静かに入れ行き、360 秒間の測定期間中に水中での移動を止めて浮いたままになった時間をストップウォッチで測定した。薬液または溶媒は腹腔投与し、体重当たりの投与量は 0.1 ml/10 g とした。はじめに実験条件の確認のため、抗うつ薬の desipramine または paroxetine

の投与実験を行った。FST は抗うつ薬投与の 30 分後、*Ec*-または *Pg*-LPS 投与の 4 時間後にそれぞれ行った。対照には desipramine と LPS の溶媒の saline または paroxetine の溶媒の 10% DMSO をわずかに含む saline を投与した。その結果、マウスの不動時間は desipramine (40 mg/kg) により有意に減少したが、paroxetine (5 mg/kg) の影響はほとんどなかった。この不動時間は *Ec*-LPS の (100, 500, 840 μ g/kg) による顕著な影響も受けなかった。また *Pg*-LPS (100, 500 μ g/kg) で不動時間はやや減少する傾向だったが、この効果は統計学的には有意ではなかった。以上の第 2 章の研究から、本研究でマウスを用いて行った FST の不動時間は、desipramine により減少するが、paroxetine の影響は受けないことが示された。この FST の不動時間は、*Ec*-LPS だけでなく *Pg*-LPS の投与の影響もほとんど受けないことが示された。これらのことからマウスの移所行動を抑制することが知られている *Ec*-LPS による TLR の選択的な活性化は、FST の不動の発現には目立った役割を果たさないことが推察された。また、脳内の炎症性サイトカイン産生の促進はうつ様症状を誘発することが動物実験から示されているが、本研究のマウスに行った *Ec*-または *Pg*-LPS 処置は FST の不動を促進する炎症性サイトカインの産生を誘発し難いことが考えられた。

以上の第 1 章と第 2 章の実験動物を用いた生化学的および行動学的研究から *Pg*-LPS は、全身投与ではなく歯肉への局所投与により血中の TNF- α 量を増大させることと、全身投与ではうつ様の行動に対しては目立った影響を及ぼさないことが示された。