

氏	東 哲 司
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 1 1 9 号
学位授与の日付	平成 1 8 年 3 月 2 4 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科社会環境生命科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	ラット歯周炎におけるIL-1 β 、TNF- α の発現に及ぼす高コレステロール食の影響
論文審査委員	教授 福井 一博 助教授 西村 英紀教授 渡邊 達夫

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周炎と高コレステロール食摂取との間に正の相関関係がある。一方、歯周炎と炎症性サイトカインとの関連はすでに認められている。しかし、高コレステロール食摂取が炎症性サイトカインにどのような影響を与えるかは不明である。そこで、本研究では、ラット歯周炎における IL-1 β と TNF- α の発現に及ぼす高コレステロール食の影響を免疫組織化学的に評価することを目的とした。

【材料および方法】

1. 実験動物

実験動物として、8週齢の Wistar 系雄性ラット 32 匹を用いた。

2. 実験デザイン

ラットをまず 2 群に分け、標準食または 1%コレステロール添加食 (0.5%コール酸含有) を与えた。実験開始から 4 週間後、ラットをさらに 2 群に分け、歯周炎誘発因子または LPS フリーの蒸留水を両側の上顎第一大臼歯口蓋側歯肉溝にマイクロピペットを用いて 1 日 1 回、4 週間塗布した。歯周病誘発因子は 25 μ g/ μ l *Escherichia coli* 由来 LPS と 2.25U/ μ l *Streptomyces griseus* 由来プロテアーゼを用いた。処置はペントバルビタールナトリウムを 0.5ml/kg 体重の割合で腹腔内に注入し、全身麻酔下で行った。

3. 血清脂質の分析

実験期間終了後、心臓より採血し、血清を遠心分離した。酵素法を用いて、総コレステロール、HDL コレステロール、およびトリグリセライドを測定した。

4. 組織定量分析

実験期間終了後、4%パラホルムアルデヒド含有の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて還流固定を行い屠殺した。顎骨摘出後、同溶液で一晩浸漬固定した。その後、10%エチレンジアミン 4 酢酸塩溶液 (pH 7.3) で 2 週間脱灰した。

アルコール系列による脱水後、パラフィン包埋を行い、頬舌的に 4 μ m 厚の連続切片を製作した。その後、組織学的観察のためにヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と以下に述べる免疫染色を行った。

IL-1 β 、TNF- α 、および 8-OHdG は、ヒストファインシンプリステイン MAX PO (M) \circledast を用いて検出した。一次抗体として、抗 IL-1 β 抗体、抗 TNF- α 抗体、および抗 8-OHdG 抗体の 200 倍希釈液を用い、3,3'-ジアミノベンチジン 4 塩素酸塩含有 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.6) で発色させ、マイヤーのヘマトキシリンで後染色を行った。

5. 組織定量分析

セメント-エナメル境 (CEJ) から、接合上皮最根尖側部、歯槽骨頂、およびコラーゲン破壊の最根尖側部までの距離を計測した。接合上皮直下結合組織と歯根膜において、IL-1 β 陽性細胞数、TNF- α 陽性細胞数、および 8-OHdG 陽性細胞数を計数した。接合上皮直下結合組織中の好中球数と血管腔数も計数した。

論文内容の要旨 (2000 字程度)

6.統計処理

すべての測定値を 1 匹ごとに平均値を求め、Tukey 法を用いて各群間の比較を行った。

【結果】

コレステロール食を摂取させた 2 群の血中総コレステロール濃度は、対照群と歯周炎誘発群よりも高かった。また、コレステロール食を摂取させた 2 群の血中 HDL コレステロール濃度は、対照群よりも低かった。

高コレステロール食群、歯周炎誘発群、複合群の歯周組織では、接合上皮の根尖側移動が観察された。高コレステロール食群と複合群では、歯槽骨吸収がみられた。歯周炎誘発群と複合群においては、コラーゲン破壊距離、好中球数の増加もみられた。

歯根膜において、IL-1 β 陽性細胞と TNF- α 陽性細胞は、歯周炎誘発群と複合群で増加し、なかでも複合群の増加は歯周炎誘発群よりも大きかった。また、歯肉結合組織において、複合群の IL-1 β 陽性細胞と TNF- α 陽性細胞は、他の 3 群よりも有意に増加していた。

高コレステロール食群、歯周炎誘発群、および複合群の 8-OHdG 陽性細胞は、対照群と比べて有意に増加していた。さらに、複合群の 8-OHdG 陽性細胞は、高コレステロール食群および歯周炎誘発群よりも高かった。

【考察】

高コレステロール食は歯周組織の 8-OHdG の発現を上昇させた。複合群において、歯周炎誘発群よりも有意に IL-1 β 陽性細胞と TNF- α 陽性細胞が増大した。8-OHdG でみられた酸化ストレスの増加は、nuclear factor κ B を活性化し、炎症性サイトカインの産生を刺激する。本研究の結果は、高コレステロール食の摂取による酸化ストレスの増加が、歯周炎誘発因子による線維芽細胞からの IL-1 β と TNF- α の産生を高めた可能性を示唆している。

歯周炎誘発因子の塗布は、歯根膜において IL-1 β 陽性細胞と TNF- α 陽性細胞を増加させた。さらに、歯周炎誘発因子の塗布に高コレステロール食の摂取を組み合わせさせた場合、歯周炎誘発因子の塗布のみよりも多い IL-1 β 陽性細胞と TNF- α 陽性細胞が観察された。IL-1 β と TNF- α は、歯周組織において結合組織の破壊や骨吸収を直接引き起こす。したがって、高コレステロール食の摂取によって増加した IL-1 β と TNF- α は、歯周炎をさらに悪化させると考えられる。

【結論】

ラットに高コレステロール食を摂取させると、LPS とプロテアーゼ刺激による歯周組織線維芽細胞の IL-1 β と TNF- α 産生が増加する。これらの変化には、高コレステロール食の摂取による酸化ストレスの上昇が関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

近年、高コレステロール食の摂取と歯周炎との関連性が指摘されている。しかし、その因果関係は十分解明されておらず、また高コレステロール食の摂取が歯周炎を増悪させるメカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、ラット歯周炎モデルに及ぼす高コレステロール食の影響を、歯周炎の進展に関与するサイトカインの IL-1 β と TNF- α 、および酸化ストレスマーカーの 8-OHdG について、免疫組織化学的に検討した。

8 週齢の Wistar 系雄性ラット 32 匹を 4 群に分けた。すなわち、標準食を与えて歯周炎の誘発をしない対照群、高コレステロール食を与えて歯周炎誘発を行わない高コレステロール食群、標準食を与えて歯周炎を誘発する歯周炎群、そして高コレステロール食を与えて歯周炎誘発を行う複合群とした。高コレステロール食には、標準食に 1%コレステロールおよび 0.5% コール酸を添加したものを用いた。実験開始 4 週間後、歯周炎群と複合群の歯肉溝に歯周炎誘発因子として *Escherichia coli* 由来の lipopolysaccharide (LPS) と *Streptomyces griseus* 由来のプロテアーゼを塗布し、残りの 2 群には LPS フリーの蒸留水を塗布した。塗布は 1 日 1 回、4 週間とした。血液採取後に屠殺し、歯と歯周組織を固定、脱灰、パラフィン包埋の後、薄切し、免疫染色を行った。そして、標本を組織定量分析した。

高コレステロール食を摂取させた 2 群の血中総コレステロール濃度は、対照群と歯周炎誘発群よりも高い値を示し、血中 HDL コレステロール濃度は対照群よりも低かった。高コレステロール食群、歯周炎誘発群、および複合群の歯周組織では、接合上皮の根尖側移動が観察され、複合群では、高コレステロール食群や歯周炎誘発群よりも著明であった。高コレステロール食群と複合群では、歯槽骨吸収がみられた。歯周炎誘発群と複合群においては、コラーゲン破壊、好中球数の増加もみられ、炎症性破壊の様相を呈していた。

歯根膜において、IL-1 β 陽性線維芽細胞数と TNF- α 陽性線維芽細胞数は、歯周炎誘発群と複合群で増加し、複合群の増加は歯周炎誘発群よりも有意に大きかった。また、歯肉結合組織において、複合群の IL-1 β 陽性線維芽細胞数と TNF- α 陽性線維芽細胞数は、他の 3 群よりも有意に増加していた。

高コレステロール食群、歯周炎誘発群、および複合群の 8-OHdG 陽性歯肉線維芽細胞数と 8-OHdG 陽性歯根膜線維芽細胞数は、ともに対照群と比べて有意に増加していた。さらに、複合群の 8-OHdG 陽性歯肉線維芽細胞数と 8-OHdG 陽性歯根膜線維芽細胞数は、高コレステロール食群および歯周炎誘発群よりも高く、酸化ストレスの上昇が示された。

本研究は、ラットに高コレステロール食を摂取させると、LPS とプロテアーゼの刺激によって起こる歯周組織線維芽細胞の IL-1 β と TNF- α 産生をさらに増加させることを示した。また、これらのサイトカインの産生や歯周組織の炎症の進行に酸化ストレスが関与している可能性を示唆している。この結果は、高コレステロールの摂取によって、歯周組織における酸化ストレスや炎症性サイトカイン産生が促進され、その結果として歯周炎の増悪が起こるメカニズムを解明した重要な知見である。したがって、本論文は博士（歯学）の学位を授与する価値があるものと認めた。