

## 論文要旨等報告書

氏	三部 俊博
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 8 5 1 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬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	Vitamin C intake inhibits serum lipid peroxidation and osteoclast differentiation on alveolar bone in rats fed on a high-cholesterol diet(ビタミンCの摂取は高コレステロール食によるラットの血清過酸化脂質の増加と歯槽骨における破骨細胞の分化を抑制する)
論文審査委員	教授 滝川 正春 准教授 池亀 美華 教授 森田 学

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

ラットに高コレステロール食を与えると歯槽骨表面の破骨細胞が増加し、セメント・エナメル境(CEJ)から歯槽骨頂までの距離が大きくなる。このことは、高コレステロール食が歯槽骨吸収を促すことを示唆している。しかし、高コレステロール食による歯槽骨吸収の機序には不明な点が多い。

高コレステロール食を与えたウサギでは、血清の過酸化脂質が増加する。また、破骨前駆細胞を用いた *in vitro* の研究では、過酸化脂質が receptor activator of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ligand (RANKL) の発現を高め、NF- $\kappa$ B を介した破骨細胞への分化を促進させることが報告されている。以上のことから、高コレステロール食の摂取に伴う過酸化脂質の増加は、歯周組織において RANKL と NF- $\kappa$ B の発現を高め、結果として歯槽骨吸収を起こすことが推測される。

ビタミンCは過酸化脂質を減少させる抗酸化物質である。したがって、ビタミンCの摂取は、高コレステロール食による血清過酸化脂質の増加を防ぎ、歯槽骨表面の RANKL と NF- $\kappa$ B の発現を低下させ、歯槽骨吸収を抑制するかもしれない。そこで本研究は、高コレステロール食を与えたラットにおいて、ビタミンCの摂取が血清過酸化脂質と歯槽骨表面の RANKL と NF- $\kappa$ B の発現に対してどのように影響するのかを検討した。

#### 【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 24 匹を用いた。

##### 2. 実験デザイン

ラットを4群に分けた。対照群には標準食と蒸留水を、他の3群[高コレステロール食群、ビタミンC (1 g/l) 群、ビタミンC (2 g/l) 群]には1%コレステロール配合食とビタミンCを0、1、もしくは2 g/l の濃度で添加した蒸留水をそれぞれ与えた。実験期間は12週間とした。

##### 3. 血清の分析

実験期間終了後、心臓から採血し、血清を遠心分離した。ELISA法を用いて、ヘキサノイルリジン濃度を測定し、過酸化脂質の指標とした。

#### 4.組織定量分析

実験期間終了後、全身麻酔下で屠殺した。顎骨を摘出し、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) を用いて一晚浸漬固定した。その後、10%エチレンジアミン4 酢酸塩溶液 (pH 7.3) を用いて4°Cで2週間脱灰した。

脱灰標本を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 μm厚の連続切片を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と以下の染色を行った。

RANKL、NF-κB、および osteoprotegerin (OPG) の免疫染色を、ヒストファインシンプルステイン MAX-PO<sup>®</sup> を用いて行った。まず抗 RANKL 抗体、抗 NF-κB 抗体、および抗 OPG 抗体の100倍希釈液を一次抗体として添加し、その後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) で発色させた。また、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) の活性をアゾ・ダイ法で検出し、破骨細胞を同定した。

HE 染色標本では、CEJ から歯槽骨頂までの距離を計測し、歯槽骨吸収の指標とした。続いて、免疫染色した標本を用い、歯槽骨表面の RANKL 陽性細胞、NF-κB 陽性細胞および OPG 陽性細胞を計数し、総細胞数に対する比率をそれぞれ算出した。さらに、TRAP 陽性破骨細胞も計数した。

#### 5.統計処理

群間の比較には、Kruskal-Wallis test と nonparametric Tukey 法による多重比較を用いた。

#### 【結果】

高コレステロール食群の血清過酸化脂質濃度は、対照群よりも35%有意に高かった。また、ビタミンC (1 g/l)群とビタミンC (2 g/l)群の血清過酸化脂質濃度は、高コレステロール食群と比べてそれぞれ19%と26%有意に低かった。

高コレステロール食群の歯周組織では、CEJ から歯槽骨頂までの距離が対照群よりも25%大きく有意差があった。ビタミンCを与えた2群では、いずれも高コレステロール食群よりも15%有意に低い値を示した。同様に、高コレステロール食群の TRAP 陽性破骨細胞数は対照群よりも有意に多く、ビタミンCを与えた2群の値は高コレステロール食群と比べて有意に少なかった。

歯槽骨表面において、高コレステロール食群の RANKL 陽性細胞率と NF-κB 陽性細胞率は、対照群よりも2倍以上高く、その違いは有意であった。ビタミンCを与えた2群では、高コレステロール食群と比べて、RANKL 陽性細胞率では約50%また NF-κB 陽性細胞率では約60%にまでそれぞれ有意に減少した。また、ビタミンCを与えた2群と対照群との間に有意な差は認められなかった。

一方、歯槽骨表面の総細胞数と OPG 陽性細胞率は、群間で有意な差はみられなかった。

#### 【考察】

ビタミンCの摂取は、RANKLのおとりレセプターである OPG 発現に影響はなかった。また、ビタミンCは抗酸化物質であり、高コレステロール食による血清過酸化脂質の上昇を抑制した。本研究の結果は、OPG 発現による破骨細胞分化の抑制とは独立した経路、すなわち血清過酸化脂質の上昇と歯槽骨表面における RANKL と NF-κB の発現を抑制することにより、破骨細胞や CEJ から歯槽骨頂までの距離の増加も低下させた。これらのことにより、歯槽骨表面における破骨細胞の分化も抑えられたことを示唆している。以上のことから、ビタミンCは高コレステロール食による歯槽骨吸収を予防するのに効果的であると考えられる。

#### 【結論】

高コレステロール食を与えたラットモデルにおいて、ビタミンCの摂取は血清の過酸化脂質濃度を低下させ、歯槽骨表面における RANKL と NF-κB の発現および破骨細胞の分化を抑制した。

## 論文審査結果の要旨

高コレステロール食摂取により血清過酸化脂質は増加し、過酸化脂質が receptor activator of nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) ligand (RANKL)の発現を高め、NF- $\kappa$ Bを介した破骨細胞への分化を促進させると報告されている。したがって、抗酸化物質であるビタミンCは、高コレステロール食による血清過酸化脂質の増加を防ぎ、歯槽骨吸収を抑制する可能性が考えられる。本研究は、高コレステロール食を与えたラットにおいて、ビタミンC摂取が血清過酸化脂質と歯槽骨表面のRANKLとNF- $\kappa$ Bの発現に対してどのように影響するのかを検討した。

8週齢のラットを4群に分け、対照群には標準食と蒸留水を、他の3群[高コレステロール食群、ビタミンC(1g/l)群、ビタミンC(2g/l)群]には1%コレステロール配合食とビタミンCを0、1、もしくは2g/lの濃度で添加した蒸留水をそれぞれ用い12週間飼育した。その結果、血清過酸化脂質濃度は、高コレステロール食群で対照群よりも高く、ビタミンC群では高コレステロール食群と比べ低かった。セメント-エナメル境から歯槽骨頂までの距離は、高コレステロール食群で対照群よりも長く、ビタミンC群では高コレステロール食群よりいずれも短かった。歯槽骨表面において、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)陽性破骨細胞数、RANKLおよびNF- $\kappa$ Bの陽性細胞率は、高コレステロール食群で対照群よりも高く、ビタミンC群では、高コレステロール食群と比べ、いずれも低かった。なお、総細胞数とosteoprotegrin陽性細胞率は、群間で有意な差はみられなかった。

本論文は、高コレステロール食摂取によるRANKLやNF- $\kappa$ Bを介した歯周炎の進行の機序およびそれに対するビタミンCの有効性を解明する上での重要な知見である。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。