

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 500 号	論文提出者 村松 隆二郎
論文題目 歯周炎モデルラットにおける Guanabenz の 歯槽骨吸収抑制効果	

I. 緒言

近年、成人矯正歯科治療患者の数が増えており、その中で歯周病を患っている人も多くいる。そのような患者は、歯周管理が重要となり歯槽骨吸収の予防が必要であるが、現在、実用的な予防方法はなく、歯周炎における歯槽骨吸収予防薬の開発は重要な研究課題である。

高血圧症と歯周炎の関係は以前から知られている^{1,2)}。歯周炎が高血圧を引き起こすことが報告されており^{3,4)}、そのメカニズムも徐々に解明されてきている⁴⁻⁷⁾。さらに、高血圧予備軍と歯周炎の患者を対象としたランダム化比較試験では、歯周炎の治療により血圧が低下することが示されている。一方で、高血圧を伴う歯周炎に対する降圧剤の効果についてはほとんど知られていない。

交感神経の活動が亢進すると、破骨細胞の形成が活性化され、骨吸収が促進することが知られている。例えば、ラットに guanethidine を投与して交感神経系を遮断すると、破骨細胞の形成が抑制され、骨吸収が阻害される⁸⁾。

本研究で使用した高血圧自然発症ラット (SHR) は、交感神経活性が亢進していることが知られている⁹⁻¹¹⁾。SHR では、心拍数、血圧、血漿中のカテコールアミン濃度、ドーパミンβ-水酸化酵素、副腎チロシン水酸化酵素 (TH) の活性上昇を特徴とする⁹⁻¹¹⁾。TH は、ドーパミン、アドレナリン、ノルアドレナリンなどのカテコールアミン系神経伝達物質を合成する際の制限酵素であり、交感神経活性の代表的なマーカーとなっている¹²⁻¹⁴⁾。また SHR は、骨代謝回転が速く、皮質骨量および海綿骨量の減少を示すことから^{15,16)}、交感神経活性の亢進を伴う骨粗鬆症の動物モデルとして用いられている。さらに、SHR の上顎第一大臼歯 (M1) と第二大臼歯 (M2) の接点にリガチャーワイヤーを装着して歯周炎を起こす実験モデルについても報告されている¹⁸⁾。これらのことから、SHR は交感神経の亢進を伴う歯周炎の動物モデルとして多く用いられている。

本研究では、歯周炎を発症した SHR を用いて、交感神経活動を減少させる選択的 $\alpha 2$ アドレナリン受容体 ($\alpha 2$ -AR) 作動薬である guanabenz (GUA) が、交感神経活動が亢進している SHR の歯周炎を抑制するかどうか検討することを目的とした。歯周炎に対する guanabenz の抑制効果を検討するため、歯周組織の歯槽骨量とアタッチメントレベルの割合を評価した。

さらに、TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase) 染色を用いて、骨表面あたりの破骨細胞数 (Oc. N/BS) と骨表面あたりの破骨細胞表面 (Oc. S/BS) を測定した。また、炎症性サイトカインに対する GUA の抑制効果を評価するため、免疫組織染色を用いて歯根膜における TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の陽性細胞数とスコアを測定した。

II. 実験材料および方法

1. 動物および試薬

SHR/Izm および Wistar Kyoto ラット(WKY)/Izm の 7 週齢の雄ラット(Japan SLC Inc Shizuoka, Japan)は、自動制御された一定の環境(温度 23±1℃、湿度 50±10%)、12 時間の明暗サイクルのもと、ケージに 3 匹ずつ収容し、水道水と標準的な実験室用の餌を自由に摂取させた。すべてのラットは 1 週間かけて飼育環境に順応させた。なお、実験動物の管理ならびに研究方法については、愛知学院大学歯学部動物実験委員会の承認の下(承認番号 AGUD 417 号)、動物実験指針に従った。GUA は、Sigma-Aldrich 社(St.Louis,MO,USA)から購入した。SHR GUA 群および WKY GUA 群には、GUA を 0.4mg/kg、2.0mg/kg、10mg/kg で 1 日 1 回、皮下注射にて 8 週間および 12 週間投与し、歯槽骨の骨量構造解析(8 週間;n=6、12 週間;n=6)、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色(8 週間;n=6、12 週間;n=6)、TRAP 染色(8 週間;n=4、12 週間;n=4)、および TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 の免疫染色(8 週間;n=4、12 週間;n=4)を行った。SHR 対照群および WKY 対照群には、治療群と同量の生理食塩液を投与した。

2. 実験的歯周炎モデルラットの作製

ラットは、塩酸メドミジン(Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan)、ミダゾラム(Astellas Pharma Inc., Tokyo, Japan)、酒石酸ブトルフェノール(Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Tokyo, Japan)の 3 種類の麻酔薬の混合物を腹腔内に投与し麻酔をかけた状態で、Takeguchi ら¹⁸⁾の方法に従い、直径 0.2mm のステンレス製リガチャーワイヤー(Tomy International Inc., Tokyo, Japan)を左上顎第一大臼歯(M1)と第二大臼歯(M2)の接触点に結紮した(図 1-A,B)

3. 歯槽骨骨構造解析

結紮後 8 週間および 12 週間経過後に上顎を採取し、マイクロコンピュータ断層撮影装置(μ CT)(Rigaku,Tokyo,Japan)を用いて、管電圧 90kV、管電流 150 μ A、撮影時間 2 分、画素サイズ 20×20×20 μ m で 3 次元構造解析を行った。歯槽骨残存量は、Takeguchi ら¹⁸⁾の方法を参考に、左側上顎第一大臼歯と第二大臼歯のセメント-エナメル接合部(CEJ)から根尖までの残存歯槽骨量を計測し、同部位の全体積に占める割合を歯槽骨残存率として定義した(図 1-C,D)。

4. 血圧測定

ラットの血圧は、ラットおよびマウス用の非侵襲的な自動血圧測定装置(BP-98A-L, Natsume,Japan)を用いてテールカフ法で測定した(図 1-E)。保温器を 39℃に設定し、保温 5 分後の安定した状態で尾の近位側と中央部の間にカフを設置した。脈動が安定した時点で測定を開始し、3 回測定した平均値を用いた。午前 10 時に血圧を測定し、測定直後に GUA を投与した。

5. 病理組織学的観察(H.E.染色(アタッチメントレベルの割合)、TRAP 染色、免疫染色 (TH,TNF- α ,IL-1 β ,IL-6))

歯槽骨組織標本は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、10%EDTA(pH7.2)で4週間脱灰した。試料はパラフィン包埋し、厚さ5 μ mで近遠心方向の連続組織切片を作成した。組織観察部位は大白歯の根が全て観察できる位置に設定し、H.E.染色を行った。第一大臼歯の遠位面のCEJから歯肉溝底までの距離と、CEJから根尖までの距離の割合をアタッチメントレベルの割合として算出した(図1-F,G)。また、骨表面あたりの破骨細胞数(Oc.N/BS)と骨表面あたりの破骨細胞表面(Oc.S/BS)を測定するために、TRAP染色キット(FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, St. Osaka, Japan)を用いてTRAP染色を行った。TRAP染色されたスライドは、左上顎の第一大臼歯と第二大臼歯の間、歯槽堤下200 μ mの選択された領域(1.0mm \times 0.8mm)内で分析を行った。次に、TH、TNF- α 、IL-1 β 、およびIL-6の免疫染色を行った。免疫染色は、ヒストファインシンプルステインラットMAX-PO(Nichirei Bioscience Inc.Tokyo,Japan)およびヒストファインシンプルステインDAB溶液(Nichirei Bioscience Inc.Tokyo,Japan)を用いた。Th抗体はanti-Tyrosine hydroxylase antibody (ab75875,TH:1/200,AbcamInc,Waltham,MA,USA)、TNF α 抗体はanti-TNF alpha antibody (GTX110520,TNF- α :1/100,GeneTex.LosAngeles,USA)、IL-1 β 抗体はanti-IL-1 β antibody (ab205924,IL-1 β :1/500,AbcamInc.)、IL-6抗体はanti-IL6 antibody (GTX110527,TNF- α :1/100,GeneTex.LosAngeles,USA)を用いた。Rogersら¹⁹⁾の方法に準じ、第一臼歯、第二臼歯間の歯槽中隔の染色された切片を染色度によって、0~20%、21~40%、41~60%、61%~の4グループに分類し、それぞれ1~4のスコアを割り付け、各群スコアによって比較を行った。また歯根膜におけるTNF- α 、IL-1 β 、IL-6の陽性細胞数を計測した。

6. 統計的処理

実験データは、平均値 \pm 標準偏差(S.D.)で表し、統計的に有意な差(p<0.05)がある場合は、一元配置分散分析(Tukey's multiple comparison test)、t-testを用いて分析した。全ての統計解析はGraphPad Prism v.6(Graph Pad Software Inc)を用いて行った。

IV. 考察

本研究では、 α 2-AR作動薬GUAの投与により、交感神経活動が低下し、ラットの歯周炎が抑制されることを明らかにした。SHRの歯槽骨残存量はWKYに比べて減少し、

SHR に GUA を投与すると、歯槽骨残存量の減少とアタッチメントレベルの割合の抑制、破骨細胞数が減少した。さらには、歯周組織における炎症性サイトカインも減少した。降圧剤は歯周炎を減弱させることが実験動物レベルで報告されている^{20,21)}。非選択的 β -アドレナリン受容体(β -AR)遮断薬である propranolol を低用量投与すると、歯周病ラットの歯槽骨吸収が抑制される事が報告されている²¹⁾。しかし、低用量の propranolol は血圧に影響を与えなかったことから、以下の理由により、歯槽骨に発現している β -AR に propranolol が作用することで、骨吸収が抑制されたと考えられる。

第一に、 β 2-AR は破骨細胞や前破骨細胞に発現しており^{22,23)}、 β 2-AR 作動薬はヒト前破骨細胞の分化を促進する²²⁾。第二に、 β 2-AR 作動薬は、成熟破骨細胞の骨吸収活性を高める²⁴⁾。第三に、骨芽細胞に発現した β 2-AR は、RANKL の産生を増加させることで破骨細胞の形成を促進する²⁵⁾。さらに、SHR において、血圧に影響を与えない β 2-AR 遮断薬である butoxamine を投与すると、歯周炎が改善することを報告しています¹⁸⁾。この改善効果は、歯槽骨に発現した β 2-AR に butoxamine が作用し、骨吸収が抑制されたことによるものと考えられる。本研究では、高血圧を伴う歯周炎の治療に、 α 2-AR 作動薬である Guanabenz を用いた。GUA は、シナプス前膜の α 2-AR に結合し、交感神経からのノルアドレナリン分泌を抑制するとの報告²⁶⁾から、GUA は交感神経の活動を抑制し、その結果、血圧を低下させることができ、さらには、GUA による交感神経活動の抑制は、破骨細胞の形成を減少させる可能性が示された。

これまでの報告として、SHR にカルシウム拮抗薬である lercanidipine を投与し、歯周炎への影響を調べた研究があります²⁷⁾。前述の研究では、歯周炎を発症した SHR に lercanidipine を投与しても歯槽骨吸収の改善は見られなかった。本研究と先行研究の大きな違いは、交感神経活動の抑制の有無であると考えられる。カルシウム拮抗薬である lercanidipine を投与すると血圧が低下するが、交感神経活動に変化はなかった。一方、 α 2-AR 作動薬の GUA を投与すると、血圧だけでなく交感神経の活動も低下した。これらの結果から、SHR の歯周炎の抑制には、血圧の抑制ではなく、交感神経活動の抑制が重要な役割を果たしていることが示唆された。

歯周炎は、小胞体ストレスによって悪化することが知られており、小胞体ストレスは歯槽骨の吸収を引き起こし、免疫反応にも関与している^{28, 29)}。GUA は、真核生物翻訳開始因子 2 α (eIF2 α) の脱リン酸化を阻害することにより、小胞体ストレスを軽減することが報告されている³⁰⁾。eIF2 α を介したシグナル伝達は破骨細胞形成に関与することが知られており、GUA は NuclearFactorOfActivatedTcell1 (NFATc1) の抑制を介して破骨細胞形成を減少させる^{31,32)}。さらに、GUA は、炎症反応を抑制することが報告されている³³⁾。また、GUA は、マクロファージや T 細胞の活性化により誘導される炎症性サイトカインを抑制することが報告されている^{23,34)}。 α 2-AR の選択的な作動薬である GUA は、NFATc1、TRAP、カテプシン K など³⁵⁾ の破骨細胞形成マーカーを抑制し、破骨細胞の形成を減少させることが³⁶⁾ 報告されている³⁴⁾。今回の研究は、GUA が破骨

細胞数と炎症性サイトカインを減少させたというこれらの先行研究と一致している。

以上、本研究では、 $\alpha 2$ -AR 作動薬である GUA の投与が、歯槽骨吸収、アタッチメントレベルの低下、炎症性サイトカインの抑制を通じて、歯周炎を軽減することを示した。GUA による交感神経活動の抑制は、歯周炎の改善に寄与すると考えられる。また、GUA は、小胞体ストレスの軽減と前破骨細胞に発現する $\alpha 2$ -AR の作用により、歯槽骨吸収を抑制すると考えられる。

これまでに動物実験において高血圧が歯周炎を悪化させることが報告されている³⁵⁾。

ヒトにおいても高血圧が歯周炎を悪化させる可能性がある。また成人矯正患者の増加に伴い高血圧などの生活習慣病に罹患した患者も増加してきている。このような患者に対して GUA は歯周炎予防薬として有用な可能性がある。しかし、臨床応用にあたっては、GUA による交感神経活動の抑制と eIF2 α の脱リン酸化阻害の二つの作用のうち、どちらの作用が歯周炎抑制効果をより強く示すのか、また、歯周炎予防に向けた投与方法の検討など、今後の研究が必要と考える。

V. まとめ

本研究では、 $\alpha 2$ -AR 作動薬である GUA の投与により歯根膜の交感神経繊維および炎症性サイトカインが抑制された。さらに、破骨細胞を抑制することによって歯槽骨量およびアタッチメントレベルの割合が維持され、歯周炎が軽減した。GUA による交感神経活動の抑制は、歯周炎の改善に寄与すると考えられる。また、GUA は、小胞体ストレスの軽減と前破骨細胞に発現する $\alpha 2$ -AR の作用により、歯槽骨吸収を抑制すると考えられ

る。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なご指導と御校閲を賜りました歯科矯正学講座、恩師後藤滋巳教授ならびに宮澤健特殊診療科教授に深く感謝の意を示すと共に、日頃から格別なご指導と御校閲を賜りました本学薬理学講座、恩師戸苧彰史教授に深謝いたします。また、本研究に際し御指導、御協力を頂きました本学歯科矯正学講座、佐藤琢麻講師ならびに本学薬理学講座、濱村和紀准教授に謹んで感謝の意を表します。加えて、本研究にあたりご協力を頂きました本学歯科矯正学講座の皆様、ならびに薬理学講座の皆様に御礼を申し上げます。

