

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論 文 提 出 者	松 下 至 宏
論 文 審 査 委 員	(主 査) 朝日大学歯学部教授 澁谷俊昭 (副 査) 朝日大学歯学部教授 永山元彦 (副 査) 朝日大学歯学部教授 住友伸一郎
論 文 題 目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> を口腔感染させたコラーゲン誘発関節炎モデルマウスの解析	
<p><u>論文審査の要旨</u></p> <p>【目的】 歯周病は歯周病原細菌の感染によって惹起される慢性炎症であり, 近年, 関節リウマチ (Rheumatoid Arthritis: RA) との関連が指摘されている. RA の病因は不明な点が多いが, 抗シトルリン化ペプチド抗体 (Anti-Citrullinated Peptide Antibody; ACPA) やリウマトイド因子 (Rheumatoid Factor; RF) などの自己抗体が産生され, さらに環境因子が作用することで RA 発症に至ると考えられている. 歯周病と RA の病因の共通点として喫煙, 感染症, 生活習慣, ストレスなどが報告されている. このシトルリン化タンパク (CP) に対する抗体である ACPA や RF が臨床マーカーとなっている. CP は内因性のペプチジルアルギニン・デイミナーゼ (Peptidylarginine Deiminase : PAD) だけでなく, <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P. g</i>) が産生する PAD によって生成されることによって, フィブリンなどの蛋白質をシトルリン化させることで, 自己抗体産生を促し, RA の発症や進行に関与していると考えられている. RA 患者における <i>P. g</i> 菌感染に関しては, 本菌の DNA が RA 患者の血清や滑液から高頻度に検出されたこと, また RA 患者では健常者と比べ <i>P. g</i> 菌に対する血清 IgG 抗体価が高いとする報告がある. しかしながらその詳細なメカニズムは明らかでなく, 歯周病と RA の関係を解明する上で重要である. そこで, 本研究では, <i>P. g</i> 菌感染が RA の増悪に与える影響について調べるため RA モデルマウスとしてコラーゲン誘導性関節炎モデルマウスを用いて検討した.</p> <p>【材料および方法】 RA モデルマウスとして DBA/J1 マウスの 8 週齢を用いた. 本マウスにエマルジョンとしてウシ II 型コラーゲンからなる抗原液とアジュバンドを調整後, 8 週齢時に 1 回目, 11 週齢時に 2 回目を感作させ関節炎を惹起させた. 実験群には <i>P. g</i> 菌 ATCC33277 株感染群 (n=12) ならびに対照群として CMC (Carboxy Methylcellulose) 投与群 (n=12) の 2 群を設定した. <i>P. g</i> 菌を 2.5% CMC に懸濁して 1 日おきにマウスの口腔内に直接 <math>1 \times 10^8</math> で 0.1ml 投与した. 対照群は 2.5% CMC を 1 日おきにマウスの口腔内に直接 0.1ml 投与した. 実験開始後から毎日関節炎臨床評価の経時的変化を Sarkar らの方法を用いて評価した. すなわち, Score0 は正常, Score1 は 1 指に腫脹もしくは変形を認める, Score2 は 2 指に腫脹もしくは変形を認めるが, 全指には認めない, Score3 は全指に腫脹もしくは変形を認める, Score4 は全指に腫脹もしくは変形を認め肢全体に腫脹を認めるとした. 手, 足ごとに計測し, 合計点を 1 匹の個体の指数として評価した. また 1 週毎に体重測定を行った. 44 日目に下顎骨, 四肢の関節および血清を採取し以下の項目について検討した.</p>	

*P. g* 菌の感染を確認するために *P. g* 菌に対する血清抗体価を ELISA にて確認した. また関節リウマチの臨床マーカーである MMP-3, ACPA 値を ELISA 法にて解析した. 下顎, 四肢の  $\mu$ CT, 軟 X 線および組織学的形態を評価した. 得られた値は, エクセルを用い統計処理を行った. 本研究における動物実験は朝日大学動物実験倫理委員会の承認(16-006)を得て行った.

【結果】*P. g* 投与群において *P. g* の血清抗体価は有意に増加し, 細菌感染を確認した.*P. g* 投与群は対照群と比較し四肢末端の高度な発赤腫脹を認め, 関節炎臨床評価の経時的変化では, 45 日後 *P. g* 投与群は 1.9 倍関節炎スコアの増加を認めた.  $\mu$ CT による解析では *P. g* 投与群において歯槽骨の骨吸収像を認め対照群と比較し有意に骨吸収の増加を認めた. *P. g* 投与群の四肢末端の骨は腫脹, 変形, 手根骨軟骨部の破壊, 膝関節表面は粗造, 膝蓋骨の粗造を呈した. また血清中 MMP-3 値は *P. g* 投与群では実験群と比較し有意に増加した. 血清中 ACPA 値は *P. g* 投与群では対象群と比較し有意に増加した. 膝関節組織は *P. g* 投与群では高度な炎症性細胞の浸潤, 骨破壊像, 骨びらんを認めた. また MMP-13 の免疫染色像において関節半月表面及び関節軟骨に MMP-13 陽性細胞を認めた. MMP-13 陽性細胞数は対照群と比較して有意に増加した.

【考察】RA の環境因子について以前は疫学的調査が中心であったが, 近年は疾患感受性遺伝子との相互作用や ACPA との関連などの研究が進み, RA の発症機序に関しての知見が蓄積されつつある. 近年の報告で Yamakawa らは, SKG マウスを用いて *P. g* 菌を腹腔内投与した場合においても関節炎の悪化が認めた. 本研究においても *P. g* 菌を口腔に投与し DBA/J1 マウスを使用したところ同様に関節炎の悪化を認めた. Terao らは関節痛患者の歯周病状態を評価し, それらの患者が 2 年間追跡調査した結果, 初診時に歯周病をもつ関節痛患者は歯周病をもたない患者と比較して, その後関節リウマチと診断されて, リウマチ治療を開始するリスクが 2.7 倍上昇することを報告した. また *P. g* 菌の保菌との相関を解析したところ保菌との相関はみられず, 臨床的に歯周病に罹患していることが重要であると報告した. また, shimada らは RA 群と正常群に分け, 歯周病治療の前後で ACPA, 抗- *P. g* PAD IgG, PAD4 について検討した結果, 2 ヶ月の歯周病治療後において歯周組織の状態, RA の病態は改善したものの, 血中 ACPA, 抗- *P. g* PAD IgG, PAD4 の値に変化は認められなかったと報告した. これらのヒトの臨床研究の結果から本研究により *P. g* 菌による口腔感染のコラーゲン誘発関節炎モデルマウスへの悪影響が示唆されたが, ヒトにおいて歯周病が RA の発症に影響を及ぼすメカニズムが ACPA だけでなくその他の因子による, あるいは, *P. g* 菌が特に関係しているか今後さらなる検討が必要と考えられる.

【結論】本研究の結果は *P. g* の口腔感染が血清中 ACPA, MMP-3 値を増加させ, 関節炎症状の悪化, 関節周囲の MMP-13 の発現を増加させ RA 病態の増悪することが示唆された.

したがって, 審査委員は rhPTH の局所的間歇投与が歯周組織再生の臨床応用の可能性を示したと高く評価し博士 (歯学) の学位を授与するに値するものと判定した.