

*Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS 局所投与が  
加齢マウスの歯周組織に及ぼす影響

もりなが ひろつぐ  
森 永 啓 嗣

本論文の要旨は，第 200 回朝日大学大学院歯学研究科発表会（2017 年 10 月 20 日，岐阜）において発表した．本論文の一部は，平成 28 年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会（2017 年 2 月 7 日，滋賀），12<sup>th</sup> Asian Pacific Society of Periodontology Meeting（2017 年 9 月 22 日，Seoul）および第 12 回日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会（2017 年 11 月 3 日，長野）において発表した．

## 緒 言

我が国において歯周炎は，中高年の約 8 割以上が罹患しているといわれており，生活習慣病として位置づけられている．歯周炎は歯周病原細菌が産生する内毒素（LPS）が大きく関与して引き起こされる炎症性疾患であり<sup>1)</sup>，炎症の拡大と慢性化に伴い歯槽骨を破壊する．骨破壊には骨吸収を引き起こす破骨細胞が重要な役割を担っている<sup>2,3)</sup>．歯槽骨破壊のメカニズムの一つとして歯周病原細菌由来因子の関与による破骨細胞形成のメカニズムが存在する<sup>4)</sup>．LPS は骨代謝を制御する骨芽細胞・破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞形成を促進する<sup>5)</sup>．また骨芽細胞において TLR4 を介して RANKL を誘導し破骨細胞形成を促進する<sup>6)</sup>．また LPS は単球や好中球などを活性化し，炎症性サイトカイン産生にも関与する<sup>7,8)</sup>．マウスに LPS を投与し歯周炎を惹起させ，宿主の生体防御・炎症のメカニズムを解析する研究が現在も広く行われている<sup>9,10)</sup>．

実験的歯周炎モデルとしてはマウスの歯頸部結紮<sup>11-16)</sup>や歯周病原細菌の経口投与<sup>17-23)</sup>によって歯周炎が惹起されてきた．しかし，結紮による外傷の影響や経口投与された細菌によって腸内細菌叢が変化するという問題点があることが知られている<sup>24,25)</sup>．また，若齢マウスをモデル動物として使用する従来の方法は，中年以降が多く罹患するヒト歯周炎の病態を再現して

いないと考えられる．ヒトとマウスにおける明確な年齢換算表は存在しないものの，加齢マウスを使った歯周炎モデルが必要と考える．さらに，過去の研究には歯周炎誘発直後に歯周ポケットの形成や骨吸収を認めるものの，その後治癒傾向に転じ炎症が慢性経過しないという問題を提起している報告もある<sup>26)</sup>．

本研究は，33Gのマイクロシリンジを使用する方法を参考にした<sup>27)</sup> LPSの反復，長期間局所投与により歯周炎を惹起させる方法でマウス歯周炎惹起モデルの可能性を検討した．また，LPS投与における加齢マウスと若齢マウスでの組織学的変化を比較，検討することを目的とした．

## 材料および方法

### 1 動物実験

本実験は朝日大学動物実験管理規定に従い朝日大学動物実験専門委員会の承認（承認番号 17-001）を得て実施した．実験動物には，8週齢の雄性 C57BL/6J マウス 20 匹（平均体重 30g）と 24 週齢の雄性 C57BL/6J マウス 20 匹（平均体重 30g）を用いた．8 週齢のマウスを Young 群，24 週齢のマウスを Old 群とし，それぞれのマウスに対して投与終了 1 週後に屠殺したもの（1w 群）と投与終了 4 週後に屠殺したもの（4w 群）に分け，さらに LPS を投与する LPS 群と生理食塩水（Saline）を投与する Saline 群とした．1w 群 Old の LPS 群（1w-Old-LPS 群），1w 群 Old の Saline 群（1w-Old-Saline 群），1w 群 Young の LPS 群（1w-Young-LPS 群），1w 群 Young の Saline 群（1w-Young-Saline 群），4w 群 Old の LPS 群（4w-Old-LPS 群），4w 群 Old の Saline 群（4w-Old-Saline 群），4w 群 Young の LPS 群（4w-Young-LPS 群）と 4w 群 Young の Saline 群（4w-Young-Saline 群）の合計 8 群に分けて実験を行った（図 1）．

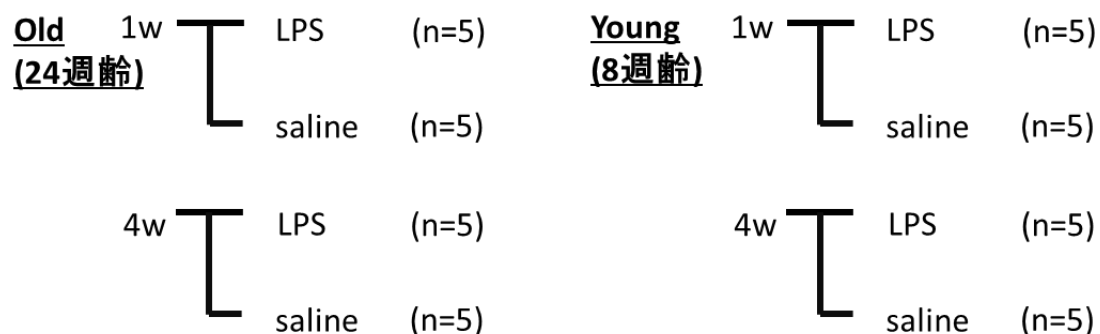


図 1 各マウス群と LPS 投与との組み合わせ

実験は小動物用麻酔器（Forane Forawick vaporizer, ムラコメディカル, 東京）を用いてイソフルラン（フォーレン, アボットジャパン, 東京）を吸入させ鎮静下にて行った. *Porphyromonas gingivalis* 由来 LPS（LPS-PG, ナカライテスク, 京都）を上顎左側臼歯部口蓋歯肉（第一臼歯と第二臼歯の歯間部）に週 2 回, 6 週間かけて合計 12 回注射した. LPS の投与はマウスの口腔内への侵襲を最小限に抑えるために 33G のハミルトンマイクロシリンジ（Hamilton Company, Reno, USA）を使用した. LPS 投与量は過去の報告を参考に  $5 \times 10^3 \mu\text{g} / \mu\text{L}$  に調整し, 1 回に  $4 \mu\text{L}$  を注射した<sup>28)</sup>. Saline 群には生理食塩水（大塚生食注, 大塚製薬, 東京）を  $4 \mu\text{L}$  注射した.

マウスは実験期間中に固形飼料および蒸留水を自由摂取させた。実験終了後に炭酸ガスにて安楽死させた。上顎を摘出し4%パラホルムアルデヒド溶液で固定を行った。

## 2 口腔内画像観察

各群のマウスの軟組織を観察するため、屠殺直後の上顎に対してデジタルカメラ（D5500, NIKON, 東京）を使用して撮影を行った。

## 3 マイクロCT画像観察

試料は固定後にマイクロCT装置（Scanmate-RB090SS150, Comscan, 横浜）を使用して管電圧80.0kV, 管電流85.0 $\mu$ A, 倍率4.7倍の設定で断層撮影を行った。TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング, 東京）を用いて上顎骨の形態を三次元的に観察した。

## 4 マイクロCT画像計測

歯軸を基準にしてセメント-エナメル境（CEJ）から歯槽骨頂までの距離（CEJ-ABC distance）を画像処理ソフトウェア（Image J, National Institutes of Health, MD, USA）を用いて計測した<sup>29,30)</sup>。第一臼歯の近心口蓋根, 遠心頬側根の2か所を計測ポイントとして測定し平均値±標準偏差で表した。

## 5 組織標本作製

試料は固定後に，10% EDTA (PH7.4) 溶液で脱灰した．通法に従いパラフィン包埋し矢状方向に厚さ 5  $\mu\text{m}$  の組織標本作製した．切片は投与部位付近を選んで組織化学染色を行った．組織化学染色はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った．1 個体での分析切片は 3 とした．

## 6 組織観察および計測

各群の HE 染色と TRAP 染色後の標本はシステム生物顕微鏡 (BX53, Olympus, 東京) を用いて観察した．また組織内の歯槽骨表層における TRAP 陽性細胞の数 (TRAP-positive cell number) を計測した．第一臼歯と第二臼歯の間を範囲として設定した．残存する歯槽骨表面の長さ ( $\mu\text{m}$ ) を測定して骨表面上の TRAP 陽性細胞の数を計測した<sup>31)</sup>．TRAP-陽性細胞数を測定し平均値  $\pm$  標準偏差で表した．

## 7 統計学的分析

測定値は平均値  $\pm$  標準偏差で，Student-*t* 検定を用いて統計処理を行い， $p < 0.05$  の場合を有意差ありとした．



## 結 果

### 1 口 腔 内 画 像 観 察

デジタルカメラ画像上で，肉眼的には投与部位において周囲の組織に顕著な発赤や腫脹，退縮などの炎症性変化は観察されなかった．軟組織の変化に LPS 群と Saline 群，1w 群と 4w 群，Young 群と Old 群との間も明確な差は認められなかった（図 3）．

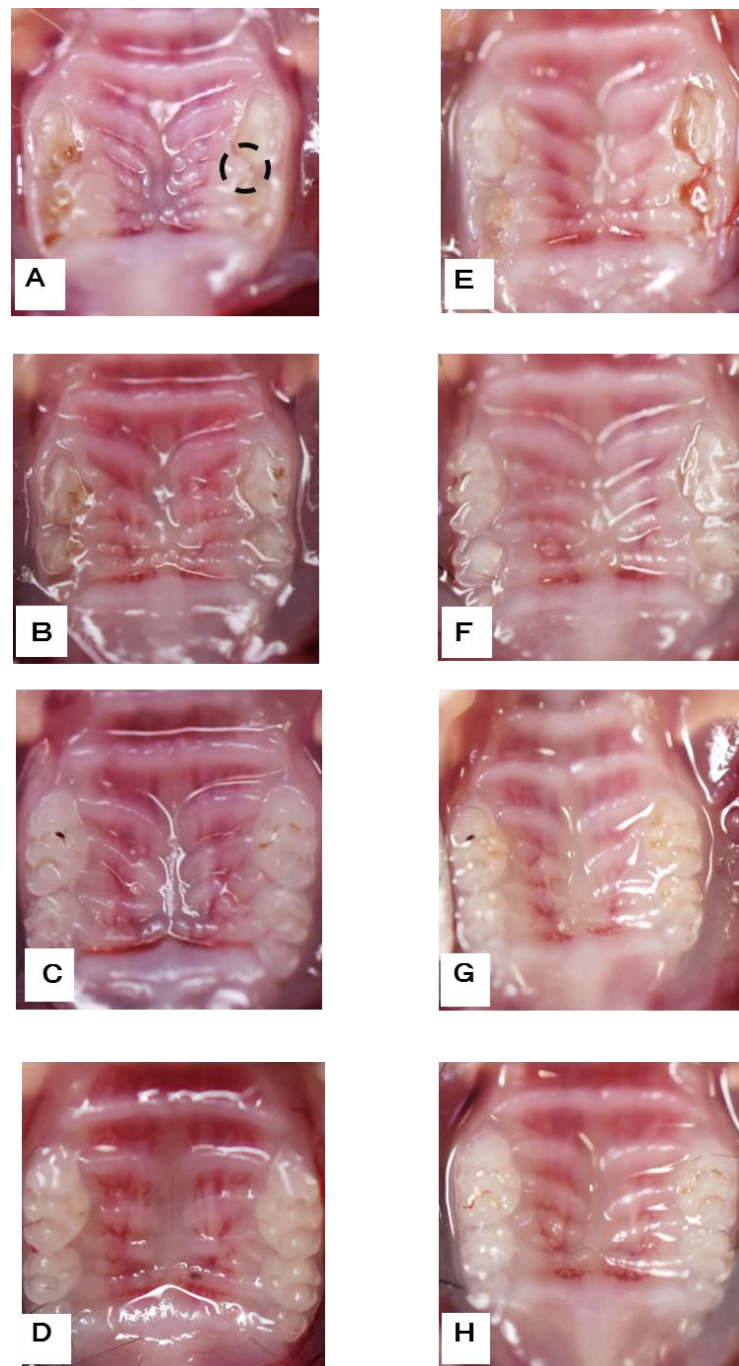


図 3 口腔内画像

A:1w-Old-LPS 群 B:1w-Old-Saline 群 C:1w-Young-LPS 群

D:1w-Young-Saline 群 E:4w-Old-LPS 群 F:4w-Old-Saline 群

G:4w-Young-LPS 群 H:4w-Young-Saline 群

投与部位を黒点線で示す。

## 2 マイクロ CT 画像観察

投与部位周囲の第一臼歯と第二臼歯の歯間部を観察した．1w-Old-Saline 群と 1w-Young-Saline 群を比べると Old では LPS の影響がなくても骨吸収が存在していた．また，1w-Old-LPS 群と 1w-Old-Saline 群，1w-Young-LPS 群と 1w-Young-Saline 群を比べ，Old，Young とともに LPS 群は多くの骨吸収が観察された．4w 群でも 4w-Old-LPS 群 4w-Old-Saline 群，4w-Young-LPS 群と 4w-Young-Saline 群を比べると LPS 群では，投与部位周囲に骨吸収量が多かった（図 4）．

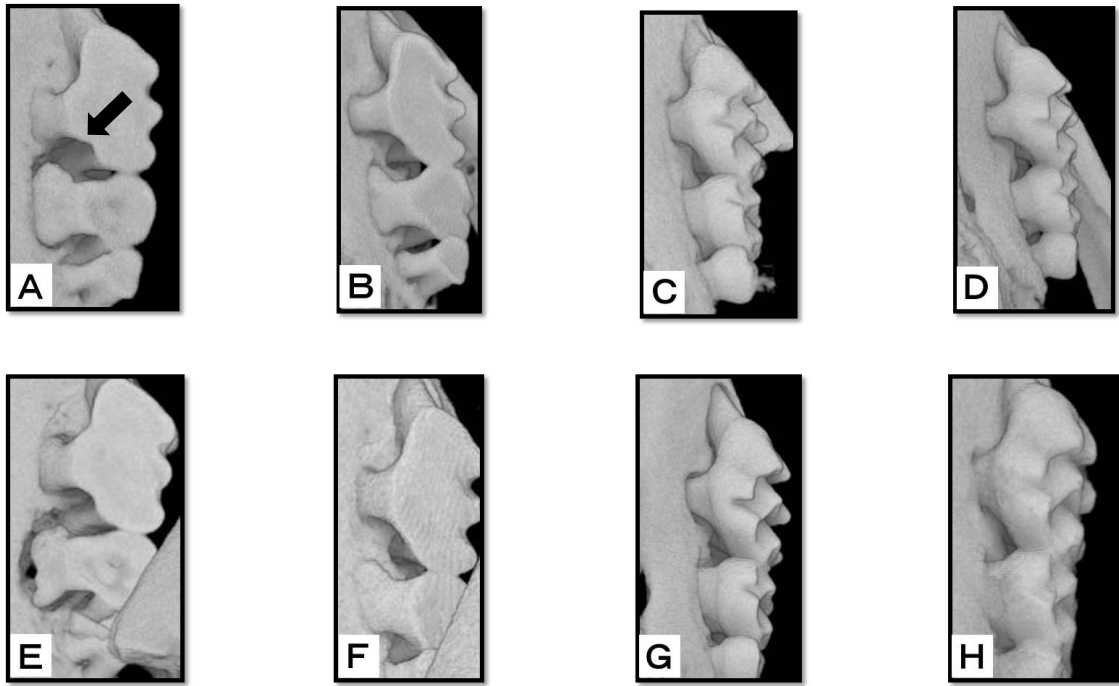


図 4 上顎臼歯部のマイクロ CT 画像

A:1w-Old-LPS 群 B:1w-Old-Saline 群 C:1w-Young-LPS 群

D:1w-Young-Saline 群 E:4w-Old-LPS 群 F:4w-Old-Saline 群

G:4w-Young-LPS 群 H:4w-Young-Saline 群

矢印は歯槽骨吸収部位を示す。

### 3 マイクロ CT 画像計測

CEJ から 歯 槽 骨 頂 の 長 さ を 計 測 し て 平 均 値  $\pm$  標 準 偏 差 で 表 し , 各 グ ル ー プ を 比 較 し た . 1w-Old-LPS 群 は  $28.6 \pm 13.2 \mu\text{m}$  , 4w-Old-LPS 群 は  $34.0 \pm 8.2 \mu\text{m}$  , 1w-Old-Saline 群 は  $15.9 \pm 4.5 \mu\text{m}$  , 4w-Old-Saline 群 は  $13.8 \pm 6.7 \mu\text{m}$  , 1w-Young-LPS 群 は  $9.9 \pm 0.9 \mu\text{m}$  , 4w-Young-LPS 群 は  $8.9 \pm 1.3 \mu\text{m}$  , 1w-Young-Saline 群 は  $7.4 \pm 1.7 \mu\text{m}$  , 4w-Young-Saline 群 は  $5.4 \pm 1.4 \mu\text{m}$  だ っ た . Old では , LPS 群 は Saline 群 と 比 較 し て 有 意 に 高 い 骨 吸 収 量 を 示 し た ( $p < 0.05$ ) (図 5) . 1 週 と 4 週 と の 比 較 で は 骨 吸 収 量 の 変 化 に 有 意 差 を 認 め な か っ た . Young では , LPS 群 は Saline 群 と 比 較 し て 有 意 に 高 い 骨 吸 収 量 を 示 し た ( $p < 0.05$ ) (図 5) . 1 週 と 4 週 と の 比 較 で は 骨 吸 収 量 の 変 化 に 有 意 差 を 認 め な か っ た . Old と Young の 比 較 で は , Old は Young と 比 較 し て 有 意 に 高 い 骨 吸 収 量 を 示 し た ( $p < 0.05$ ) .



図 5 CEJ-ABC distance (  $\mu\text{m}$  )

マイクロ CT 画像計測により CEJ から歯槽骨頂の長さ CEJ-ABC distance (  $\mu\text{m}$  ) を計測した。\* : 有意差あり

## 4 組織学的観察

### ( 1 ) HE 染色

Old の LPS 群では 1 週よりも 4 週で歯周炎が進行していた。また 4w-Old-LPS 群の組織像から、主に LPS 投与部周囲の第一臼歯と第二臼歯歯間部に炎症性細胞の浸潤が認められ組織内での炎症が続いていた(図 6)。

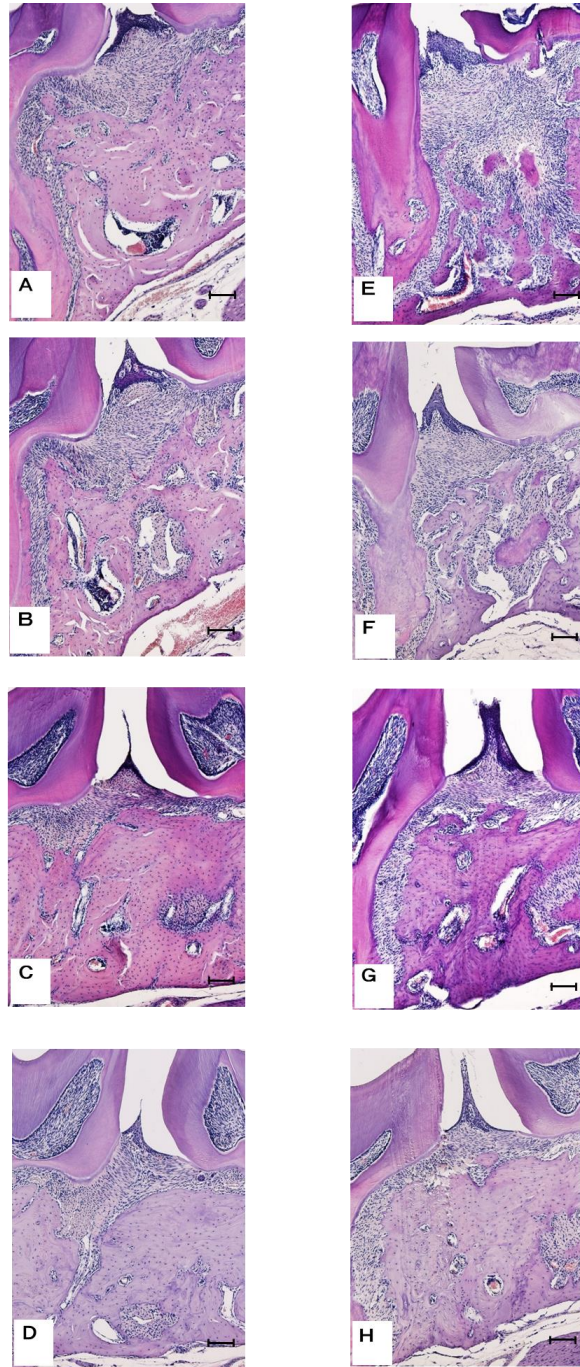


图 6 HE 染色像

A: 1w-Old-LPS 群 B: 1w-Old-Saline 群 C: 1w-Young-LPS 群

D: 1w-Young-Saline 群 E: 4w-Old-LPS 群 F: 4w-Old-Saline 群

G: 4w-Young-LPS 群 H: 4w-Young-Saline 群

— : 100  $\mu$ m



## ( 2 ) TRAP 染色

TRAP 陽性細胞の数は Saline 群に比べて LPS 投与群で多く観察された。1w 群と 4w 群を比較すると，1w-Old-LPS 群に比べ 4w-Old-LPS 群に多数の TRAP 陽性細胞が認められた。一方，Saline 群では TRAP 陽性細胞自体が少なく，TRAP 陽性細胞はほとんど観察されなかった（図 7）。

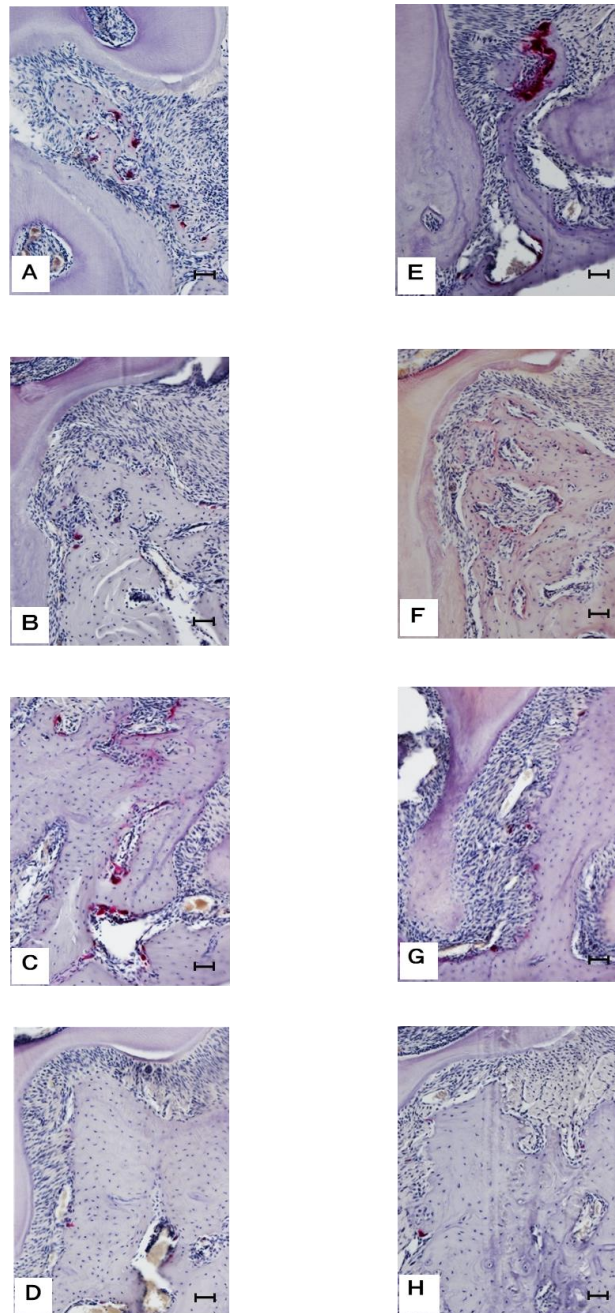


図 7 TRAP 染色像

A:1w-Old-LPS 群 B:1w-Old-Saline 群 C:1w-Young-LPS 群

D:1w-Young-Saline 群 E:4w-Old-LPS 群 F:4w-Old-Saline 群

G:4w-Young-LPS 群 H:4w-Young-Saline 群

赤く染まっているのが TRAP 陽性細胞

— : 50  $\mu$ m

## 5 組織計測

歯槽骨表面の長さを測定して骨表面上の  $1\text{ }\mu\text{m}$  あたりの TRAP 陽性細胞の数を計測し平均値  $\pm$  標準偏差とした。1w-Old-LPS 群は  $1.8 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  ,  
4w-Old-LPS 群は  $2.2 \times 10^{-3} \pm 0.9 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  ,  
1w-Old-Saline 群は  $1.0 \times 10^{-3} \pm 0.6 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  ,  
4w-Old-Saline 群は  $0.7 \times 10^{-3} \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  ,  
1w-Young-LPS 群は  $1.6 \times 10^{-3} \pm 0.4 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  ,  
4w-Young-LPS 群は  $1.6 \times 10^{-3} \pm 0.5 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  ,  
1w-Young-Saline 群は  $0 \pm 0 \text{ cell}/\mu\text{m}$  (TRAP 陽性細胞は存在せず), 4w-Young-Saline 群は  $0.5 \times 10^{-3} \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ cell}/\mu\text{m}$  だった。Old では, LPS 群は Saline 群と比較して有意に TRAP 陽性細胞が多く存在した ( $p < 0.05$ ) (図 8)。1 週と 4 週との比較では骨吸収量の変化に有意差を認めなかった。Young では, LPS 群は Saline 群と比較して有意に TRAP 陽性細胞が多く存在した ( $p < 0.05$ ) (図 8)。1 週と 4 週との比較では骨吸収量の変化に有意差を認めなかった。また, Old と Young の比較では骨吸収量の変化に有意差を認めなかった。

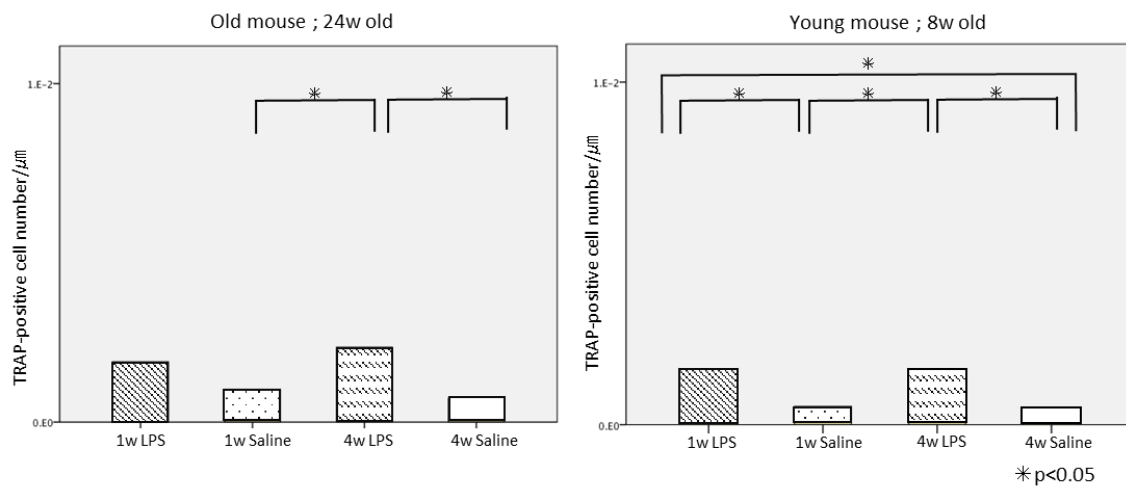


図 8 TRAP-positive cell number/μm

TRAP 染色画像より歯槽骨表面の長さを測定して骨表面上の TRAP 陽性細胞数 TRAP-positive cell number/μm を計測した。

\* : 有意差あり

## 考 察

LPS の投与を 33G のマイクロシリンジで行ったことで，口腔内画像から軟組織の裂傷や歯肉退縮は肉眼的に観察されず LPS 投与が行えた．またマイクロ CT 画像や各種組織染色の結果から若齢マウス・加齢マウスともに LPS の投与で骨吸収が生じ，TRAP 陽性細胞が多く出現したことから今回のマウスモデルにおいても従来の方法と同様に歯周炎を惹起させることができたと考えられる．また，実験動物に雄性マウスを使用することで雌性マウスを使用した場合に危惧されるエストロゲンによる骨吸収の発現要素を除外した．さらに既製の LPS を使用することで安定した結果を得ることができたと考える<sup>32)</sup>．

CT 画像では加齢マウスの 1 週と 4 週に骨吸収の有意差は認められなかったものの組織画像では歯槽骨の密度が明らかに疎であることから，加齢マウスでは骨吸収は LPS 投与終了から 4 週が経過しても経時的に進行することが示唆された．若齢マウスでは，加齢マウスと比較して程度は低いものの治癒傾向を示すことなく骨吸収が継続していると考えられる．加齢は，アポトーシスや老化細胞の蓄積により組織レベルの老化が生じ，加齢関連疾患の増加を引き起こす<sup>33)</sup>．慢性歯周炎のメカニズムで注目されているのが加齢に伴う炎症であり，加齢に伴う炎症の原因として免疫老化<sup>34)</sup>

や基礎的な低レベルの炎症状態の活性化<sup>35)</sup>があげられる。今回、加齢マウスで骨吸収が進行した原因として加齢に伴う炎症反応の増加あるいは免疫能力の低下が考えられる。本研究では投与していない右側の上顎組織において、多数の炎症性細胞の浸潤や TRAP 陽性細胞は認められなかった。この結果より細胞の老化や免疫老化は全ての細胞・組織で生じているわけではなく LPS のような局所刺激を受けた組織でのみ生じていると考えられる。

また、LPS を投与した加齢マウスの 1 週と 4 週では、マイクロ CT 画像での骨吸収量も TRAP 染色での TRAP 陽性細胞数の変化も同様に継続して発現されていた。このように LPS 投与 4 週が経過しても骨吸収が持続していた要因の一つとして破骨細胞が長期にわたって組織内に存在していたことが考えられる。培養破骨細胞を使用した実験では、LPS は破骨細胞のアポトーシスを阻害して延命を強力に促進するという報告もある<sup>3)</sup>。今回のモデルは LPS の複数回、長期間投与で歯周組織局所に存在する破骨細胞の細胞数が増加して骨吸収にはたらく期間も長くなった可能性がある。

## 結 論

マイクロシリンジによる歯肉への LPS 投与は，マウス実験的歯周炎モデルとしての可能性が示唆された．

加齢マウスでは若齢マウスと比較して歯槽骨吸収の増加を認め，LPS 投与後も長期にわたって骨吸収が進むことが示された．

## 引用文献

- 1) Ozaki Y, Ukai T, Yamaguchi M, Yokoyama M, Haro ER, Yoshimoto M, Kaneko T, Yoshinaga M, Nakamura H, Shiraishi C and Hara Y. Locally administered T cells from mice immunized with lipopolysaccharide(LPS) accelerate LPS-induced bone resorption. *Bone*. 2009; 44: 1169-1176.
- 2) Dank L and Takayanagi H. Immunology and bone. *J Bio-chem*. 2013; 154: 29-39.
- 3) Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, Takaoka A, Yokochi T, Oda H, Tanaka K, Nakamura K and Taniguchi T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature*. 2000; 408: 600-605.
- 4) 臼井通彦, 花谷智哉, 森谷友貴, 佐野孝太郎, 有吉渉, 西原達次, 中島啓介. 歯周炎における骨破壊メカニズム～破骨細胞を形成・活性化する因子～. *日歯周誌*. 57; 2015: 120-125.
- 5) Kikuchi T, Matsuguchi T, Tsuboi N, Mitani A, Tanaka S, Matsuoka M, Yamamoto G, Hishikawa T, Noguchi T and Yoshikai Y. Gene expression is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*. 2001; 166:



3574-3579.

- 6) Yamamoto M, Sato S, Mori K, Hoshino K, Takeuchi O, Takeda K and Akira S. Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol.* 2002; 169: 6668-6672.
- 7) Barton GM and Medzhitov R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14: 380-383.
- 8) Iwakura Y and Ishigame H. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1218-1222.
- 9) Kuramoto A, Yoshinaga Y, Kaneko T, Ukai T, Shiraishi C, Oshino K, Ichimura I and Hara H. The formation of immune complexes is involved in the acute phase of periodontal destruction in rats. *J Periodont Res.* 2012; 47: 455-462.
- 10) Nakatsu S, Yoshinaga Y, Kuramoto A, Nagano F, Ichimura I, Oshino K, Yoshimura A, Yano Y and Hara Y. Occulusal trauma accelerates attachment loss at the onset of experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2014; 49: 314-322.
- 11) Saadi-Thiers K, Huck O, Simonis P, Tilly P, Fabre JE, Tenenbaum H and Davideau JL. Periodontal, and systemic responses in various mice models of

- experimental periodontitis: respective roles of inflammation duration and *porphyromonas gingivalis* infection. *J Periodontol.* 2013; 84: 396-406.
- 12) Breivik T, Opstad PK, Gjermo P and Thrane PS. Effects of hypothalamamic pituitary adrenal axis reactivity on periodontal tissue destruction in rats. *J Oral Sci.* 2000; 108: 115-122.
- 13) Niikura K, Takeshita N and Chida N. A novel inhibitor of vacuolar ATPase, FR202126, prevents alveolar bone destruction in experimental periodontitis in rats. *J Toxicol Sci.* 2005; 30: 297-304.
- 14) Tomofuji T, Ekuni D, Irie K, Azuma T, Endo Y, Tamaki N, Sanbe T, Murakami J, Yamamoto T and Morita M. Preventive effects of a cocoa enriched diet on gingival oxidative stress in experimental periodontitis. *J Periodontal.* 2009; 80: 1799-1808.
- 15) Liu YF, Wu LA, Wang J, Wen LY and Wang XJ. Microcomputerized tomography analysis of alveolar bone loss in ligature and nicotine induced experimental periodontitis in rats. *J Periodont Res.* 2010; 45: 714-719.
- 16) Xie R, Kujipers-Jagtman AM and Maltha JC. Inflammatory responses in two commonly used rat models for experimental tooth movement.

Comparison with ligature induced periodontitis.

*Arch Oral Biol.* 2011; 56: 159-167.

- 17) de Molon RS, de Avila ED, Boas Nogueira AV, Chaves de Souza JA, Avila-Compos MJ, de Andrade CR and Cirelli JA. Evaluation of the host response in various models of induced periodontal disease in mice. *J Periodontol.* 2014; 85: 465-477.
- 18) Nakajima K, Hamada N, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Uemoto T and Sato S. Restraint stress enhances alveolar bone loss in an experimental model. *J Periodont Res.* 2006; 41: 527-534.
- 19) Kesavalu L, Sathishkumar S, Bakthavatchalu V, Matthews C, Dawson D, Steffen M, and Ebersole J. Rat model of polymicrobial infection, immunity and alveolar bone resorption in periodontal disease. *Infect Immun.* 2007; 75: 1704-1712.
- 20) Kim Y, Hamada M, Takahashi Y, Sasaguri K, Tsukinoki K, Onozuka M and Sato S. Cervical sympathectomy causes alveolar bone loss in an experimental rat model. *J Periodont Res.* 2009; 44: 695-703.
- 21) Polak D, Wilnesky A, Shapira L, Halabi A, Goldstein D, Weiss EI and Houry-Haddad Y. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Polphyromonas gingivalis*/ *Fusobacterium nucleatum*

- infection:bone loss and host response. *J Clin Periodontol*. 2009; 36: 406-410.
- 22) Novak EA, Shao H, Daep CA and Demuth DR. Autoinducer2 and QseC control biofilm formation and in vivo virulence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Infect Immun*. 2010; 78: 2919-2926.
- 23) Cantley MD, Haynes DR, Marino V and Bartold PM. Preexisting periodontitis exacerbates experimental arthritis in a mouse model. *J Clin Periodontol*. 2011; 38: 532-541.
- 24) Nakajima M, Arimatsu K, Kato T, Matsuda Y, Minagawa T, Takahashi N, Ohno H and Yamazaki K. Oral Administration of *P.gingivalis* induces dysbiosis of gut microbiota and impaired barrier function leading to dissemination of enterobacteria to the liver. *PLos One*. 2015 Jul 28; 10: e0134234.
- 25) Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Mark IR, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T and Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep*. 2014; 4: 4828.
- 26) Yamamoto H, Yokoyama M, Tamura H, Okumura S, Kawada E and Kuboyama N. Studies on the effects of

- protamine reduced peptide for the experimental periodontitis analyzed by microcomputerized tomography. *J Hard Tissue Biol.* 2012; 21: 51-56.
- 27) Taguchi H, Aono Y, Kawata T, Asano M, Shimizu N and Saigusa T. Intragingival injection of *Porphyromonas gingivalis* derived lipopolysaccharide induces a transient increase in gingival tumour necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, in anaesthetized rats. *J Oral Sci.* 2015; 7: 155-160.
- 28) Hiyari S, Atti E, Camargo PM, Eskin E, Lusi AJ, Tetradis S and Pirih FQ. Heritability of periodontal bone loss in mice. *J Periodont Res.* 2015; 50: 730-736.
- 29) Jin Baek K, Choi YS, Kanq CK and Choi Y. The proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* is critical in a murine model of periodontitis. *J Periodontol.* 2017; 88: 218-224.
- 30) 山本 仁. 歯周炎実験モデル作製の試み: Novel experimental model for periodontitis. 歯科学報. 2014; 114: 104-107.
- 31) Gross C, Weber M, Creutzburg K, Mobius P, Preidl R, Amann K and Wehrhan F. Osteoclast profile of medication related osteonecrosis of the jaw secondary to bisphosphonate therapy: a comparison

- with osteoradionecrosis and osteomyelitis. *J Transl Med*. 2017; 15: 128-141.
- 32) Liu Y, Fang S, Li X, Feng J, Du J, Guo L, Su Y, Zhou J, Ding G, Bai Y, Wang S, Wang H, Liu Y. Aspirin inhibits LPS induced macrophage activation via the NF-kB pathway. *Sci Rep*. 2017;7:11549
- 33) 真鍋 一郎 . 慢性炎症と加齢関連疾患 . 日老医誌 2015; 54: 120-125.
- 34) Wu Y, Dong G, Xiao W, Miao F, Syverson A, Missaghian N, Vafa R, Cabrera-Ortega AA, Rossa C and Graves GT. Effect of aging on periodontal inflammation, microbial colonization and disease susceptibility. *J Dent Res*. 2016; 95: 460-466.
- 35) Shaw AC, Goldstein DR and Montgomery RR. Age dependent dysregulation of innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13: 875-887.
- 36) Suda K, Woo JT, Takami M, Sexton PM and Nagai K. Lipopolysaccharide supports survival and fusion of preosteoclasts independent of TNF- $\alpha$ , IL-1, and RANKL. *J Cell Physiol*. 2002; 190: 101-108.