

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

論 文 提 出 者	森永 啓嗣
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 (外部審査) 名古屋女子大学家政学部 教授 久保 金弥
論 文 題 目	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 由来 LPS 局所投与が加齢マウスの歯周組織に及ぼす影響
<p><u>論文審査の要旨</u></p> <p>【目的】</p> <p>実験的歯周炎マウスモデルとしては歯頸部結紮や歯周病原細菌の経口投与 によって歯周炎を惹起させてきた。しかし、結紮による外傷の影響や経口投与による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。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、実験的歯周炎マウスでは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。</p> <p>本研究は 33G のマイクロシリンジを使用した LPS の反復、長期間の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、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。</p> <p>【方法】</p> <p>8 週齢の C57BL/6J マウス (Young), 24 週齢の C57BL/6J マウス (Old) を使用した。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 (LPS-PG, ナカライテスク, 京都) 投与群と Saline 投与群の合計 8 群に分けて実験を行った。使用したマウスは各 5 匹、合計 40 匹のマウスを使用した。</p> <p>マウスの左側上顎第一臼歯と第二臼歯の歯間部歯肉に、LPS と生理食塩水を各 12 回 (週 2 回 ; 6 週間) 注射した。投与にはハミルトンマイクロシリンジ (33G) を用いて行い、LPS 投与量は $5 \times 10^3 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整し、1 回に合計 $4 \mu\text{L}$ を注射した。</p> <p>最終投与から 1 週後と 4 週後に屠殺を行った。上顎骨を摘出して上顎軟組織の口腔内画像、上顎骨のマイクロ CT 画像、上顎組織切片を作製し、各種染色 (HE 染色, TRAP 染色) を行い歯周組織の形態を画像、組織学的に観察した。</p>	

【結果】

1. 口腔内画像では、肉眼的にマイクロシリンジによる LPS の投与で生じた軟組織の変化（腫脹，発赤，退縮）は認められなかった。
2. マイクロ CT 画像では，LPS 群は Saline 群と比較して骨吸収を多く認めた．Young の LPS 群に比べて Old の LPS 群は，LPS 投与終了 1 週から 4 週にかけて骨吸収が継続的に進行していた。
3. HE 染色では，Old の LPS 群では 1 週から 4 週にかけては骨組織の吸収が進行し，Old の LPS 群の中でも特に 4w 群で多数の炎症性細胞の浸潤を認め，上皮結合組織内の炎症が継続していた。
4. TRAP 染色では，LPS 群は Saline 群と比較して TRAP 陽性細胞を多く認めた．Old の LPS 群は 1 週より 4 週で TRAP 陽性細胞を多く認めた。

【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．

実験結果より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．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や基礎的な低レベルの炎症状態の活性化があげられる．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 のような刺激を受けたことで生じていると考えられる．LPS 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．今回のモデルは LPS の反復，長期間の局所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．