



Title	マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの影響
Author(s)	久保田, 実木子
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52346
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 久 保 田 実 木 子 ）	
論文題名	マウス実験的歯周炎モデルにおけるタバコ煙濃縮物およびニコチンの影響
論文内容の要旨 【研究目的】 歯周病は歯周病原性細菌により歯周組織の破壊が引き起こされる慢性炎症性疾患である。歯周病の発症・進行に関与する因子としては、原因としての細菌因子に加え宿主因子および環境因子といったリスク因子があげられる。とりわけ、喫煙は歯周病の進行に大きな影響を及ぼす環境因子の一つであると考えられている。喫煙者は非喫煙者と比較して歯周病の罹患率が高く、歯槽骨の吸収がより進行していくことが知られている。さらに、喫煙者に対する歯周治療の効果は非喫煙者と比較して低く、歯周組織の再生に対しても負の影響を及ぼすことが疫学研究等で明らかになっている。喫煙が歯周組織の破壊や修復に影響を及ぼす一因として、タバコ煙成分を曝露させると歯周組織構成細胞の機能が変化することが挙げられる。しかしながら、喫煙により体内に吸収されるタバコ煙成分が歯周組織の破壊にどのように関与するのかの詳細はいまだ十分には明らかになっていない。本研究ではマウス実験的歯周炎モデルを作製し、タバコの煙成分であるタバコ煙濃縮物（以下CSCと記す）およびニコチン（以下Nicotineと記す）の全身投与が歯槽骨の破壊をはじめとする歯周組織やその所属リンパ節にどのような影響を及ぼすかを解析することにより、喫煙の歯周病病態形成への関与について解析した。 【材料および方法】 1. 実験動物 実験動物には雄性5週齢C57BL/6マウスを用いた。同マウスを、対照群としてPhosphate buffered saline（以下、PBSと記す）を投与する群、実験群としてマウス体重20 gあたりタバコ煙濃縮物を720 μg、あるいはNicotineを16 μg、それぞれ腹腔内投与する2群の計3群に分けた。CSCはタバコ煙を専用機器で捕集しDimethyl sulfoxideに溶媒転換しているものを用いた。マウスへのCSCおよびNicotineの投与量はヒト成人が1日に10本喫煙し体内に摂取する量に相当させた。上記物質を各群マウスに1日1回3日連続で腹腔内投与後、全身麻酔下で上顎左側第二臼歯歯頸部に絹糸で結紮を行い結紮側とし、結紮した状態で7日間経過させることで、マウス実験的歯周炎モデルとした。上顎右側第二臼歯は処置せず非結紮側とした。 2. μCT解析 上顎左側第二臼歯歯頸部への絹糸結紮後7日目に全ての群のマウスを屠殺し、μCTを用いて結紮側および非結紮側の上顎第二臼歯周辺の歯槽骨の状態を観察すると共に、歯槽骨の吸収量を計測した。 3. 組織学的解析 μCT撮影後に上記歯周組織をParaformaldehyde phosphate buffer solutionにて固定し、EDTAにて脱灰し、その後パラフィンにて包埋した。ミクロトームを用いて矢状断で厚さ5 μmの薄切標本作製した。薄切標本はHematoxylin-eosin染色（以下HE染色と記す）を行い、光学顕微鏡にて形態学的観察を行った。また、染色した薄切標本を画像解析ソフトウェアに取り込み、結紮側および非結紮側の上顎第二臼歯周辺の歯周組織における炎症細胞の浸潤範囲を定量化した。さらに、破骨細胞のマーカー酵素として知られるTartrate-resistant acid phosphatase（以下TRAPと記す）で薄切標本を染色し、絹糸結紮側および非結紮側の上顎第二臼歯周辺のTRAP陽性細胞数を算定した。 4. RAW264.7細胞の破骨細胞への分化誘導 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand（以下RANKLと記す）存在下で破骨細胞へと分化するRAW264.7細胞を用いて次の実験を行った。すなわちRAW264.7細胞をCSC 15 μg/mlおよびNicotine 10⁻⁵ M存在・非存在下にてRANKL含有培地を用いて6日間培養することにより、タバコ煙成分が破骨細胞の分化誘導に及ぼす影響について検討した。破骨細胞への分化度はTRAP染色陽性細胞数を算定することで評価した。 5. Real-Time PCR解析 材料および方法1.と同様に、雄性5週齢C57BL/6マウスを対照群としてPBSを投与する群、実験群としてマウス	

体重20 gあたりCSCを720 µg、あるいはNicotineを16 µgそれぞれ腹腔内投与する2群の計3群に分けた。上記物質を1日1回3日連続で腹腔内投与後、全身麻酔下で上顎左側第二臼歯歯頸部に絹糸で結紮を行い結紮側とし、上顎右側第二臼歯は処置せず非結紮側とした。絹糸結紮後7日目に全ての群のマウスを屠殺し、非結紮側（右側）および結紮側（左側）の顎下リンパ節を採取し、*Rankl*の遺伝子発現をReal-Time PCR法にて解析した。

【結果】

絹糸結紮後7日目のマウス実験的歯周炎モデルにおいて非結紮側・結紮側の歯周組織をµCTを用いて解析した。非結紮側においてPBSを前投与した対照群とCSCあるいはNicotineを前投与した実験群ともに、歯槽骨吸収はほとんど認められなかった。PBSを前投与した対照群において結紮側で歯槽骨吸収が惹起された。さらに、PBSを前投与した対照群の結紮側で認められた歯槽骨吸収はCSCまたはNicotineを前投与した実験群ではより進行し、対照群と比較して有意に増加した。組織学的解析では、非結紮側においてはいずれの群においても歯周組織に炎症細胞の浸潤を認めなかったのに対して、結紮側においては全ての群で炎症細胞の浸潤を認め、骨吸収部位には破骨細胞様細胞が観察された。また、いずれの群でも非結紮側の上顎右側第二臼歯周辺にTRAP陽性細胞を認めなかったのに対して、全ての群で結紮側の上顎左側第二臼歯周辺の歯槽骨表面にTRAP陽性細胞の存在が認められた。また、対照群と比較して実験群ではTRAP陽性細胞数の有意な増加を認めた。RAW264.7細胞はRANKL存在下で破骨細胞へ分化し、全ての群でTRAP陽性細胞が認められた。CSCまたはNicotine存在下でRAW264.7細胞を分化誘導すると、TRAP陽性細胞数はCSCおよびNicotine非添加群と比し有意に増加した。顎下リンパ節中における*Rankl*遺伝子発現は、実験群においてのみ非結紮側の顎下リンパ節と比較して結紮側の顎下リンパ節において有意に増強した。各群の結紮側の顎下リンパ節を比較した場合、対照群と比較して実験群では*Rankl*遺伝子発現が有意に上昇した。

【考察】

本研究において、タバコ煙成分の全身投与のみでは歯槽骨吸収を惹起しないが、絹糸周囲のブラークと結紮によるメカニカルストレスの存在下では、タバコ煙成分は歯槽骨吸収をさらに促進することが明らかとなった。また、絹糸結紮側では全ての群で歯槽骨周囲に破骨細胞の存在を認め、CSCまたはNicotineを前投与した実験群で有意に破骨細胞数が増加した。このことから、マウス実験的歯周炎モデルにおいて破骨細胞が誘導されること、破骨細胞数はCSCまたはNicotineを前投与することで増加することが示唆された。さらに、絹糸を結紮することにより、PBSを前投与した対照群と比較してCSCあるいはNicotineを前投与した実験群では顎下リンパ節における*Rankl*遺伝子発現が有意に上昇した。本研究においては、細菌感染・メカニカルストレスに起因する歯周組織での炎症の惹起、さらにその局所情報を抗原提示細胞が感知し、所属リンパ節に遊走することによりその情報を伝達し、顎下リンパ節における*Rankl*遺伝子発現を上昇させ、その*Rankl*遺伝子発現の増強により結紮側での破骨細胞の分化を誘導したものと考えられる。これまで喫煙が歯周組織に及ぼす影響としては末梢循環の障害、歯周組織のコラーゲン産生量の低下、好中球の機能障害等が報告されており、これらが歯周病の病態を修飾していると考えられてきた。本研究ではこれらの影響に加えて生体内で吸収されたタバコ煙成分が*Rankl*遺伝子発現を亢進させることにより、絹糸結紮周囲の歯槽骨表面での破骨細胞への分化誘導を促進している可能性が示唆され、喫煙者に認められる歯周組織破壊においても同様のメカニズムが関与している可能性が考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (久 保 田 実 木 子)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	村上 伸也
	副 査	教授	森崎 市治郎
	副 査	准教授	永田 英樹
	副 査	講師	佐藤 淳

論文審査の結果の要旨

本研究は、タバコ煙成分（タバコ煙濃縮物および **N**cotine）が歯周組織の破壊に及ぼす影響について検討を行ったものである。

その結果、絹糸結紮を行ったマウス実験的歯周炎モデルにタバコ煙成分を前投与することにより、同マウスの歯槽骨破壊が亢進すること、歯槽骨表面での破骨細胞数が増加すること、所属リンパ節である顎下リンパ節での *Rankl* 発現が増強することが明らかとなった。

以上の知見は、歯周病の病態形成の過程における喫煙の関与を明らかにするうえで極めて有益な情報を提供するものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。