

論 文 要 旨

歯周炎はアテローム性動脈硬化症の発症に影響し、

ナタマメエキスはそれを抑制する：

-アテローム性動脈硬化症モデルマウス及び in vitro での研究-

令和 2 年 度
北海道医療大学大学院歯学研究科

柳 瀬 舜 佑

要旨

【緒言】

近年、様々な研究で歯周炎（PD）とアテローム性動脈硬化症（AS）の関連が報告されている。PD と AS はともに炎症性疾患である点から、炎症を生じることが両疾患に重要な役割を与えると考えられる。

一方で、ナタマメは膿取り豆として古くから民間療法の一つとして用いられている。これまでに我々は、ナタマメエキス（Sward Bean Extract : SBE）が抗菌作用を有し、ナタマメエキスを歯周炎ラットに経口投与した実験において PD による顎骨吸収が抑制されること (Nakatsuka *et al.*2014), LPS 刺激 THP-1 細胞から産生される TNF- α と IL-1 β を有意に抑制することを報告した。

今回の研究では、PD, AS に対する SBE の効果を検討するため動物実験において、1. PD と AS の関連性について検討すること、2. SBE を投与することで AS, PD によって促進される AS に対する SBE の効果を検討すること、3. 培養細胞を用いた実験においてマクロファージの炎症性サイトカイン遺伝子発現における SBE の効果を検討することとした。

【材料と方法】

1. 動物実験

〈動物〉

AS モデルマウスとして ApoE 欠損マウスを使用した。6 週齢の雄性 ApoE 欠損マウス（三共ラボサービス，北海道，日本）を飼育し，実験に供した。条件は，Group1 : Control (Con) 群，Group2 : *P. gingivalis* 投与 (*P. g*) 群，Group3 : 歯牙結紮 (Lig)群，Group4 : SBE 群，Group5 : *P. g* + SBE 群，Group6 : Lig + SBE 群とした。各群 6 匹とし，全てのマウスは 7 週齢より高脂肪食（HFD）を与え，SBE 群では水の代わりに SBE を自由飲水させた

〈SBE の調整〉

ナタマメのエタノール抽出液を凍結乾燥し粉末状にした後，滅菌蒸留水に溶解し，2 mg/mL の SBE 溶液として実験に使用した。

〈*P. gingivalis* の調整，投与〉

P. gingivalis ATCC33277 株を培養し，PBS と 5% Carboxymethyl cellulose 溶液で調整した *P. gingivalis* の菌液（ 1×10^9 cell/mL）0.2 mL を，8 週齢から 3 週に渡り，3 日に 1 回の間隔で経口投与した。

〈歯牙結紮法〉

8 週齢時に Somnopentyl[®]による麻酔下で，5-0 絹糸を上顎両側第二臼歯に結紮した。結紮糸は，屠殺時まで 9 週間保持した。

〈上顎骨の形態学的評価〉

歯槽骨吸収の評価は、上顎骨の乾燥標本を作製し、上顎第二大臼歯のセメントエナメル境から歯槽骨頂間の範囲を骨欠損面積として、画像解析ソフト ImageJ 1.53a を用いて解析した。

〈歯周組織の組織学的評価〉

採取した上顎骨の切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン（H-E）染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

〈大動脈におけるアテローム性プラークの評価〉

マウスの大動脈について、起始部から総腸骨動脈までの範囲で単離し、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて 24 時間固定した。得られた標本を Oil Red O にて染色し、アテローム性プラークの評価に用いた。病変部は広がりの評価として縦断面からアテローム性プラーク表面積割合を算出し、さらに厚さの評価も目的とした横断面からアテローム性プラーク断面積を算出し検討した。

〈炎症性サイトカインと iNOS の mRNA 発現の検討〉

採取した心臓から Total RNA を分離し、逆転写後、cDNA を生成した。RT-PCR 法を行い、IL-6, TNF- α , iNOS の mRNA 発現について評価を行った。

2. 培養細胞を用いた実験

〈細胞培養〉

マウスマクロファージ細胞（RAW264.7）を用い、10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン／ストレプトマイシン含有 DMEM 培地で 37℃、5% CO₂ の条件下で 24 時間培養した。条件は、N=3 として以下の通りである。Group1 : Control 群 (Con), Group2 : LPS 投与群 (LPS), Group3 : SBE 投与群 (SBE), Group4 : LPS + SBE として、24 時間培養した。

〈SBE 調整〉

ナタマメのエタノール抽出液を凍結乾燥し粉末状にした後、DMEM 培地で 1 mg/mL に溶解したものを SBE として使用した。

〈mRNA 発現の検討方法〉

6well プレートにマウスマクロファージ細胞を 3.0×10^5 cell/well となるように調整した。24 時間培養後、細胞から mRNA を抽出し、RT-PCR 法によって IL-6, TNF- α 及び iNOS の mRNA 発現を検討した。

〈NO 産生量の検討〉

96well プレートにマウスマクロファージ細胞を 2.0×10^5 cell/well となるように調整した。細胞培養上清 50 μ L に Griess 試薬 50 μ L を添加し、NO 産生量を測定した。

〈統計解析〉

すべてのデータは、一元配置分析を用い、Tukey-Kramer 検定を用いて補正を行った。有意水準 0.05 以下を有意差ありと判断した。

【結果】

1. 動物実験

〈歯槽骨吸収量〉

*P. g*群の歯槽骨吸収量は、Con群と比較して有意に高値を示した (図2B). また、Lig群の歯槽骨吸収量は、Con群と比較して有意に高値を示した. Lig群の歯槽骨吸収量は、*P. g*群と比較して有意に高値を示した. 一方、*P. g* + SBE群の歯槽骨吸収量は、*P. g*群と比較して低値を示し、Lig + SBE群の歯槽骨吸収量は、Lig群と比較して有意に低値を示した.

〈組織学的評価〉

歯周組織では、Lig群、Lig + SBE群で上皮層の肥厚と歯槽骨吸収を認めた (図3).

〈大動脈に関する評価〉

1. 大動脈縦断面の評価

*P. g*群のアテローム性プラーク表面積割合は、Con群と比較して有意に高値を示した (図 4B). また、Lig群のアテローム性プラーク表面積割合は、Con群と比較して有意に高値を示した. 一方、*P. g* + SBE群のアテローム性プラーク断面面積は、*P. g*群と比較して低値を示した.

2. 大動脈横断面の評価

*P. g*群のアテローム性プラーク断面面積は、Con群と比較して有意に高値を示した. Lig群のアテローム性プラーク断面面積は、Con群と比較して有意に高値を示した (図 5C). 一方、*P. g* + SBE群のアテローム性プラーク断面面積は、*P. g*群と比較して有意に低値を示した. また、Lig + SBE群のアテローム性プラーク断面面積は、Lig群と比較して有意に低値を示した (図 5C).

〈心臓のmRNA発現評価〉

P. g + SBE群におけるTNF- α のmRNA発現は、*P. g*群と比較して有意に低値を示した (図 6B). *P. g* + SBE群におけるiNOSのmRNA発現は、*P. g*群と比較して有意に低値を示した (図 6C).

2. 培養細胞を用いた評価

〈mRNA発現の検討〉

LPS群におけるIL-6のmRNA発現は、Con群と比較して有意に高値を示した. 一方、LPS + SBE群におけるIL-6のmRNA発現は、LPS群と比較して有意に低値を示した (図 7A).

LPS群におけるTNF- α のmRNA発現は、Con群と比較して有意に高値を示した. 一方、LPS + SBE群におけるTNF- α のmRNA発現は、LPS群と比較して有

意に低値を示した (図 7B).

LPS 群における iNOS の mRNA 発現は, Con 群と比較して有意に高値を示した. 一方, LPS + SBE 群における iNOS の mRNA 発現は, LPS 群と比較して有意に低値を示した (図 7C).

〈NO産生量の検討〉

LPS 群における NO 産生量は, Con 群と比較して有意に高値を示した. LPS + SBE 群における NO 産生量は, LPS 群と比較して有意に低値を示した (図 7D).

【考察】

本研究では, ASモデルであるApoE欠損マウスを用い実験的にPDを誘導することで, 大動脈起始部を含む心臓において炎症性サイトカインであるIL-6やTNF- α の遺伝子発現が上昇することを示し, さらに大動脈においてASが促進されることを明らかにした. ApoE欠損マウスにおいても, wild-typeと同様に歯牙結紮が*P. gingivalis*経口投与より進行したPDを誘導することが示された.

*P. g*群ではLig群に比較し歯槽骨吸収量の変化は及ばないものの, 炎症性サイトカインの発現レベルやアテローム性動脈硬化病変の程度は同等であった. この理由として, 結紮系によって炎症が惹起されたLig群と比較して, *P. g*群では*P. gingivalis*が炎症状態にある歯周組織から血管内に侵入し, 全身での炎症を引き起こす経路と, *P. gingivalis*が大動脈壁へ直接作用する経路を介する両者が相まって, 全身の炎症状態を悪化させたためと考えられる.

SBEは, *P. gingivalis*や結紮系周囲の細菌に対する抗菌効果が期待でき, ジンジパイン活性を抑制することで, 歯周組織や全身での抗炎症効果を発揮し, 歯槽骨吸収量や心臓におけるIL-6, TNF- α 及びiNOSのmRNA発現やアテローム性プラークの形成に対して抑制的な作用が生じたと考えられる. またSBEは, マクロファージにおけるIL-6, TNF- α 及びiNOSのmRNA発現を抑制することで, PDによるASの発症・進展を抑制した可能性が考えられる.

【結論】

本研究結果から, *P. gingivalis* の経口投与と歯牙結紮を行うことにより, PD の誘導を行ったところ, *P. gingivalis* によるマクロファージを介した全身における炎症状態の高まりとともに, AS を促進させることが示された. さらに, この実験モデルに対して, SBE を飲水させることで, PD による歯槽骨吸収量は抑制され, また, マクロファージの IL-6, TNF- α 及び iNOS の mRNA 発現は抑制され, さらに AS の進行を抑制できることが明らかとなった. これらのことから, SBE は PD による AS の発症・進展を抑制することが示された.