高蔗糖飼料飼育によるラット歯周炎の発症と マクロファージの感染防御機能の変化との関連性

市村 光 佐藤 巖雄 曲 建香
下島 孝裕 藤橋 弘 池田 克巳

明海大学歯学部歯周病学講座

(主任：池田克巳教授)

(平成元年12月19日受付)

Relationship between Development of Periodontitis and Macrophage's Defensive Power against Infection in Rats Fed a High-Sucrose Diet

Koh ICHIMURA, Iwao SATO, Jianxiang QU,
Takahiro SHIMOJIMA, Hiroshi FUJIIHASHI and Katsumi IKEDA

Department of Periodontology, Meikai University School of Dentistry

1-1, Keyakidai, Sakado, 350-02, Saitama, JAPAN

(Chief : Prof. Katsumi IKEDA)

As mononuclear phagocytes have been implicated as important cellular elements in the process of bone resorption, we decided to study the relevancy of macrophage (M ϕ) activities to bone resorption.

In this study, we investigated the phagocytic activity and activities of lysosomal enzymes of peritoneal resident M ϕ from rats fed a high-sucrose diet (Diet 2000) to appreciate the effects of Diet 2000 on systemic and local factors. Minkin et al. have postulated that bone-derived chemotactic factors were released from foci undergoing resorption. And so, we examined the effects of the supernatant from alveolar bone cultures (Bone-sup) prepared from rats fed Diet 2000 on the activities of glycogen induced peritoneal M ϕ .

As a result we observed mild alveolar bone resorption with slight inflammation when the rats were fed Diet 2000 for six months. In the periodontal tissue, we found inflammatory cell infiltration, destruction

of the periodontal ligament, and lacunae in the alveolar bone due to resorption. The phagocytic activity of M ϕ treated with Bone-sup was suppressed before the periodontal tissue, which is inflammatory condition such as alveolar bone resorption. Furthermore the phagocytic activity of resident M ϕ taken from rats on the Diet 2000 was suppressed. After one month of the Diet 2000, the activity of acid phosphatase (AcP), a lysosomal enzyme of M ϕ , was suppressed, but by six months it was enhanced. The activity of β -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG), another lysosomal enzyme of M ϕ , was suppressed over the total period of Diet 2000 before the periodontal tissue was destroyed.

These findings suggest that the capacity for defense against infection by M ϕ is suppressed when periodontitis is initiated by Diet 2000 feeding and that M ϕ activities are influenced by some factors elaborated by cells in the alveolar bone.

Key words : Macrophage (M ϕ), Supernatant from alveolar bone cultures, Phagocytic activity, High-sucrose diet (Diet 2000), Periodontitis

要旨: 歯周疾患で起こる歯槽骨吸収に関与する骨由来因子を検討したいために、まずラットを高蔗糖含有飼料 (Diet 2000) により飼育し歯周炎を発症させ、その病理組織学的変化に伴うラット腹腔マクロファージ (M ϕ) 活性の動態について検討した。すなわち各実験期間飼育した後、ラットの歯槽骨を摘出し、これを培養、さらにその培養上清 (supernatant from alveolar bone cultures; Bone-sup) で M ϕ の食食活性への影響を調べた。一方 Diet 2000 飼育ラットの腹腔 M ϕ の食食活性およびその lysosome 内酵素活性について、これを歯周炎の進行度との関連で検討した。

その結果、Diet 2000 で6ヵ月間飼育したラットの歯間部歯周組織には炎症性変化とともに軽度な歯槽骨吸収が認められた。このときの Bone-sup 刺激による M ϕ 食食活性は、歯周組織に変化が現れる前から低下傾向を示し、また Diet 2000 飼育ラットの腹腔 M ϕ の食食活性は、歯周組織の炎症性変化の進行に伴って低下し、lysosome 内酵素活性、特に Acid Phosphatase は歯周組織の炎症の進行とともに上昇し、また β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase は歯周組織に変化が起こる前から低下の傾向が認められた。

以上より、高蔗糖飼料による歯周疾患の発症と進行には M ϕ の感染防御機能の低下が関与し、さらに歯周疾患をもつ歯槽骨およびその構成細胞によって M ϕ 活性が影響を受けることが示唆された。

索引用語: マクロファージ (M ϕ)、歯槽骨培養上清、食食活性、高蔗糖飼料 (Diet 2000)、歯周炎

緒 言

近年、骨吸収の機序を解明するうえで単球やマクロファージ (M ϕ) に対する骨由来の走化活性促進因子の検討がなされている。すなわち Minkin ら^{1,2)} は、newborn mouse calvaria から EDTA による脱灰によって抽出された物質が走化性を示すことを報告し、また Yagami³⁾ は骨組織に特異的に走化性を示す M ϕ のサブセットが存在することを示唆している。

そこで、歯周疾患の進行とともに起こってくる骨吸収に関与する因子、特に骨由来因子について検討する手段としてラットを高蔗糖含有飼料により飼育し、歯周炎を発症させ、のちその歯槽骨を培養し、さらにその培養上清 (supernatant from alveolar bone cultures: Bone-sup) による M ϕ の食食活性への影響の違いについて検討した。さらに、高蔗糖飼料飼育による全身および局所への影響を調べる目的の一つとして、そのラットの腹腔 M ϕ の食食活性および lysosome 内酵素活性、特に Acid Phosphatase (AcP)、 β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase (NAG) 活性を指標に M ϕ 機能の一端を検討した。

材料および方法

1. 実験的歯周炎の発症法

1) 試験: Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラット (日

本クレア、東京) 生後8週齢で、総計24匹を用い、一般固型飼料 CA-1 (日本クレア、東京) で飼育した。

2) 実験群: 蔗糖56%を含む高蔗糖含有飼料 Diet 2000 (日本クレア、東京) で飼育し、各群はそれぞれ (1) 1ヵ月間、(2) 3ヵ月間、および (3) 6ヵ月間とした。また対照群は CA-1 でそれぞれ1ヵ月間、3ヵ月間および6ヵ月間飼育した (Fig. 1)。

3) 飼育: 本学実験動物センター内におけるクリーンラック (微生物コントロール飼育装置) で行った。

4) 歯周炎発症の確認: 歯周組織の (1) 肉眼的観察、(2) X線所見および (3) 病理組織学的検索で行った。

5) 病理組織標本の作製: まず上下顎骨を摘出し、10% 中性ホルマリンで固定、ついで10% EDTA にて脱灰、その後通法にしたがい脱水し、セロイジンで包埋した。上下顎臼歯部歯間乳頭部を含む厚さ 10~15 μ m の近遠心的連続切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色およびアザン染色を施し、光学顕微鏡 OPTIPHOT 日本光学、東京) で観察した。

2. 高蔗糖飼料飼育ラット腹腔 M ϕ の食食活性の測定

1) 腹腔 M ϕ の分離

Fig. 2 に示すように各実験期間飼育したラットをエーテル麻酔下で開腹し、生理食塩液にて腹腔内を洗浄して腹腔常在の細胞を無菌的に採取した。これを FicolI-Conray 溶液 (免疫生物研究所、群馬) による重層比重遠心法⁴⁾ で単核球層を回収し洗浄後、10% fetal bovin serum (GIBCO, New York, U.S.A.) を含む RPMI 1640

Fig. 1 Experimental design

Fig. 2 Preparation of rat peritoneal macrophages

培地（日水製薬，東京）を用い，96 well プレート（Becton Dickinson and Co. CA, U.S.A.）に各 well 200 μ l で細胞を浮遊させ，プラスチック付着法⁵⁾により 37°C 5% CO₂ 下で2時間培養した。その後同培地で洗浄し，非付着性細胞の除去を行い M ϕ 分画を得た（Fig. 2）。

なお，この付着細胞の生存率は 93%，また α -naphthyl asetate 法（Leder 法）⁶⁾ による細胞のびまん性陽性率は 80%，および naphthol AS-D chloroasetate 法（Moloney の Schwalzel 変法）^{7,8)} による陰性率は 84% であった。

2) 腹腔 M ϕ の食食能の測定

M ϕ 食食活性の測定は，宮澤らの方法⁹⁾に準じて行った。すなわち Fig. 3 に示すように各 well の分離 M ϕ (4 $\times$ 10⁴/well) に刺激物質として concanavalin A (Con

A; DIFCO, Michigan, U.S.A.) 15.6 μ g/ml, Muramyl-dipeptide (MDP) として N-acetyl-muramyl-L-alanyl-D-isoglutamine (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 0.001 μ g/ml および蛋白濃度 20 μ g/ml の *Bacteroides gingivalis* 381（サンスター株式会社オーラルケア事業本部研究部から供与）凍結乾燥菌体超音波破壊遠心上清（BG-sup）をそれぞれ用い，37°C 5% CO₂ 下で2時間インキュベートした。その後同培地にて洗浄し，peroxidase-anti-peroxidase soluble complex（PAP: Daco, Denmark）希釈液を各 well 100 μ l 添加し 37°C 下で1時間反応させた。

その後，4°C に冷却した Hanks' balanced salt solution (HBSS) で各 well を十分洗浄し，細胞外に残存する PAP を除去した。そこへ 1% Nonidet P-40 (Sigma,

Fig. 3 Measurement of phagocytic activity of rat peritoneal macrophages

St. Louis, U.S.A.) Dulbecco's PBS (−) [NP-40 D'PBS (−)] を各 well 100 μ l 加え、十分細胞を溶解し均一化し、96 well 発色測定用プレート (Nunc, Denmark) の各 well に 50 μ l ずつ移し、ここへペルオキシダーゼ基質液 (この基質液は 0.2 mg/ml の 2, 2-azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline sulfonate] (ABTS : Sigma, St. Louis, U.S.A.) を含む 100 mM クエン酸リン酸緩衝液と 0.03% H_2O_2 とを等量混合したものを発色基質とし、これを各 well に 150 μ l ずつ加え遮光し室温 (20°C) で 60 分間反応 (放置) させた。その後脱泡し、ELISA Reader であるタイターテックマルチスキャンプラス (大日本製薬, 大阪) にて波長 405 nm の吸光度 (OD_{405}) と波長 510 nm の吸光度 (OD_{510}) を測定した (Fig. 3)。PAP による食食活性は、 OD_{405} と OD_{510} との差 $OD_{405-510}$ で示した¹⁰⁾。

3) *B. gingivalis* 超音波破壊上清 (BG-sup) の作製

BG-sup の作製は、Aerobic Brain Heart Infusion 培地 (Difco, Michigan, U.S.A.) で 3~5 日間嫌気培養した菌体を 8,000 rpm, 10 分間遠心して集菌した。その後生理食塩液にて洗浄、再び 8,000 rpm, 10 分間遠心

しデカンテーションを行い、これを 2 回繰り返し廃液の後、pH 7.2 の Hanks 液に浮遊させ 4°C 下にて超音波処理を行った。そして顕微鏡下で菌体の破壊を確認し、均質化した菌液を 12,000 rpm 30 分間遠心後、0.22 μ m のミリポアフィルターで濾過した上清を実験に供した。また、この上清中の蛋白量の定量はウシ血清 γ -globulin を標準とした Bradford の方法¹¹⁾ に準じた色素結合法 (dye-binding assay) によるプロテイン・アッセイ I (Bio-Rad, California, U.S.A.) のスタンダードアッセイ法にて定量した。

3. 高蔗糖飼料飼育ラット腹腔 $M\phi$ の lysosome 内酵素活性の測定

各実験期間飼育したラットから、上記 2. と同様にして得られた $M\phi$ 分画に対し佐々木らの方法¹²⁾ で AcP および NAG 活性を測定した。すなわち、96well 平底プレート (NUNC, Roskilde, Denmark) に得られた $M\phi$ (4×10^4 /well) は、ハanks液で十分洗浄の後、各 well 0.1% Polyoxyethlent (10) Octyphenyl Ether (Triton X-100 : 和光純薬, 大阪) 溶液を 10 μ l 加えて懸濁し、AcP の測定ではまず pH 調整のため 0.2 M 酢酸緩衝液 20 μ l を

Fig. 4 Micro-quantitative analysis of activities of lysosomal enzymes in macrophages

加える。これに基質として 24 mM p-nitrophenyl phosphate (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 溶液 20 μ l または, 24mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 溶液 50 μ l を加え, 37°C 下で 30 分間保温する。その後各 well に 0.2 M Na₂CO₃ 溶液を 200 μ l 加え発色させ ELISA Reader で波長 405 nm の吸光度 (OD₄₀₅) を測定した (Fig. 4)。

4. ラット歯槽骨培養上清 (Bone-sup) の作製

ラットの顎骨を無菌的に摘出し, 臼歯を抜去後付着軟組織を可及的に除去し, これを Dulbecco's PBS (-) にて十分洗浄の後, 歯槽突起部を眼科用バサミで 1 mm 角に細切した。Fig. 5 に示すようにこの骨片を multi-dish 4 well (NUNC, Roskilde, Denmark) に 3 piece/well ずつ入れ, stimulant として PTH (Human, 1-34 : ペプチド研究所, 大阪) を 10 μ g/ml 加えた 10% FBS 加 α -MEM (Flow Lab., Dublin, U.S.A.) 培地により 37°C 5% CO₂ 下で培養を開始した。24 時間後, 培養上清を採取しこれを A-sup とした。さらに骨片を培地にて洗浄し, 培養開始 72 時間後その培養上清を採取しこれを B-sup とした。さらに培養開始 96 時間後その培養上清を採取し

これを C-sup とした。なお B および C-sup は, 2~5% BSA (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 加 α -MEM にて培養した。一方, PTH 無添加の Bone-sup の作製も同様に行った¹³⁾ (Fig. 5)。

5. ラット歯槽骨培養上清添加時の M ϕ 食食活性の測定

グリコーゲンで誘導したラットの腹腔浸出細胞¹⁴⁾から分離した M ϕ を使用した。すなわち, 8 週齢 SD 系雄性ラット腹腔内に 2.5% Oyster glycogen Type II (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) 生理食塩液 20 ml を注射し, 72 時間後エーテル麻酔下で開腹し, 生理食塩液にて腹腔内を洗浄し, 腹腔浸出細胞を無菌的に採取した。これを上記 2. と同様にして, M ϕ 分画を得た (Fig. 2)。

なお, この付着細胞の生存率は 93%, また α -naphthyl asetat 法⁶⁾ による細胞のびまん性陽性率は 92%, および naphthol AS-D chloroasetate 法^{7,8)} による陰性率は 94% であった。

M ϕ 食食活性の測定は, 分離 M ϕ (4 $\times$ 10⁴/well) に試験物質として, 上記 4. の Bone-sup を 25% (v/v) となるよう 10% FBS 加 RPMI 1640 にて調整して添加し,

Fig. 5 Preparation of supernatants from rat alveolar bone cultures (Bone-sup)

37°C, CO₂ 下で2時間インキュベートした後, 上記2. に示した方法にて行った (Fig. 3)。

6. 統計学的検討

M ϕ 活性における実験群と対照群との比較は, Student の t 検定により行った。

実験結果

1. ラットの成長曲線

実験開始8週目から, 固型飼料 (CA-1) で飼育した対照群に比べ, 高蔗糖含有飼育 (Diet 2000) で飼育した実験群は24週まで体重の低下傾向を示したが, 実験期間中では両群とも体重増加傾向にほとんど差は認められなかった (Fig. 6)。

2. 歯周組織の肉眼的所見

実験開始1, 3および6ヵ月における歯周組織の肉眼的変化は実験群, 対照群ともに歯面への多量の沈着物 (プラークや歯石など) や歯肉に発赤, 腫脹などの著しい炎症性変化は認められなかった (Fig. 7)。

3. 病理組織学的所見

実験開始1および3ヵ月飼育ラットでは, 実験群およ

び対照群ともに著しい歯周組織変化は認められなかったが, 6ヵ月飼育ラット実験群においては歯間部歯周組織, 特に辺縁歯肉部から歯槽骨頂に相当する局所での歯肉結合繊維および歯根膜繊維に走行の乱れや断裂, また当該分布血管に拡張または充血を認め, 炎症性細胞浸潤が観察され, さらに歯槽骨頂付近での軽度の窩状骨吸収像が認められた。一方, 6ヵ月飼育ラット対照群においては著明な変化は認められなかった (Fig. 8)。

4. 高蔗糖飼料飼育ラット腹腔 M ϕ の食食活性

実験開始1ヵ月後では, Table 1. に示すように実験群は対照群に比べ無刺激および Con A, MDP, BG-sup いずれの刺激物質を添加しても, 有意な差は認められなかった。しかし, 3ヵ月後では BG-sup で刺激した系の実験群はいずれも対照群と比べ食食活性は有意 ($P < 0.05$) に低下し, さらに6ヵ月後には, 無刺激, Con A 刺激および BG-sup 刺激のいずれの系においても対照群に比べ有意 ($P < 0.01$) にその活性が低下した (Table 1)。

5. 高蔗糖飼料飼育ラット腹腔 M ϕ の lysosome 内酵素活性

1) acid phosphatase (AcP) 活性

Table 2. に示すように実験開始1ヵ月後では, 実験群

Fig. 6 Body weight of rat (Growth curve)

The rats were fed a general solid diet (○) or high-sucrose diet (●) during the course of the experiment. Each point and bar represent the mean $\pm$ S.D.

Fig. 7 Clinical appearance of the gingiva following 6 months of the diets

A : Maxilla of Diet 2000-fed rat. B : Mandible of Diet 2000-fed rat. C : Maxilla of general solid diet-fed rat. D : Mandible of general solid diet-fed rat. Original magnification : $\times 3$.

Fig. 8 Pathological appearance of the coronal interproximal area between maxillary molars following 6 months of the diets.
A : Control (solid diet) specimen, H. & E. stain. B : Control specimen, Azan stain. C : Experimental (Diet 2000) specimen, H. & E. stain. D : Experimental specimen, Azan stain. Original magnification : $\times 25$.

Table 1 Effects of high-sucrose diet on phagocytic activity of rat resident macrophage

Period of diet		control	Stimulant		
			ConA	MDP	BG-sup
1 M	solid diet	0.049±0.007	0.051±0.008	0.045±0.001	0.062±0.005
	Diet 2000	0.050±0.000	0.049±0.001	0.047±0.003	0.063±0.002
3 M	solid diet	0.065±0.010	0.111±0.008	0.060±0.009	0.088±0.002
	Diet 2000	0.066±0.003	0.111±0.010	0.056±0.004	0.072±0.009
6 M	solid diet	0.063±0.002	0.122±0.004	0.065±0.002	0.108±0.005
	Diet 2000	0.042±0.000	0.086±0.003	0.058±0.006	0.080±0.001

Each value shows the mean OD₄₀₅₋₅₁₀±S.D.

Con A : Concanavalin A

MDP : Muramyldipeptide

BG-sup : *B. gingivalis* sonicated supernatant

Each symbol indicates a significant difference between general solid diet and Diet 2000.

(† : P<0.05, ‡ : P<0.01)

Table 2 Effects of high-sucrose diet on activities of lisosomal enzymes of rat resident macrophages

period of diet		Acid Phosphatase	β -N-Acetyl-D-Glucosaminidase
1 M	solid diet	0.415±0.020	0.338±0.079
	Diet 2000	0.239±0.039	0.224±0.049
3 M	solid diet	0.316±0.012	0.411±0.042
	Diet 2000	0.325±0.018	0.261±0.030
6 M	solid diet	0.269±0.015	0.193±0.021
	Diet 2000	0.355±0.035	0.166±0.029

Each value show the mean OD₄₀₅±S.D.

Each symbol indicates a significant difference between general solid

diet and Diet 2000. († : P<0.05, ‡ : P<0.01)

が対照群に比べ Mφ の AcP 活性は有意 (P<0.01) に低下した。さらに 3 ヶ月後では差がみられなかったのに対し、6 ヶ月では実験群が対照群に比べ有意 (P<0.01) に上昇を示した (Table 2)。

2) β -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) 活性

NAG 活性は実験開始 1, 3 および 6 ヶ月後で、いずれも実験群が対照群に比較して有意 (P<0.05) に低下した (Table 2)。

6. Mφ 食食活性におよぼすラット歯槽骨 培養上清 (Bone-sup) の影響

実験結果 2. および 3. の所見を持つ歯槽骨を用いて作製した Bone-sup の Mφ 食食活性への影響について検討した。その結果、ラット歯槽骨は培養の経過とともに Fig. 9 でわかるように、骨片周囲から骨由来の細胞の活

発な増殖 (培養 96 時間後) が認められた。

1) Bone A-sup の影響

前処理として無刺激の場合、実験群 Bone-sup と対照群 Bone-sup との間には Mφ 食食活性の差は認められなかったが、PTH で前処理すると、実験開始 1 ヶ月後の実験群 Bone-sup は対照群 Bone-sup に比べ有意 (P<0.01) に低い食食活性を示した (Fig. 10)。

2) Bone B-sup の影響

前処理として無刺激の場合、実験群 Bone-sup と対照群 Bone-sup との間には Mφ 食食活性の差は認められなかったが、PTH で前処理し刺激した場合、実験開始 1 および 3 ヶ月後の実験群 Bone-sup が対照群 Bone-sup に比べ有意 (P<0.05) に低い食食活性が認められた (Fig. 11)。

3) Bone C-sup の影響

前処理として無刺激の場合、Bone A-sup および B-sup と同様に実験群 Bone-sup と対照群 Bone-sup との間にM ϕ 食食活性の差は認められなかったが、PTH で前処理すると、実験群 Bone-sup は対照群 Bone-sup に比べ実験開始1ヵ月後ではM ϕ 食食活性を有意 ($P<0.01$) に低下させ、3ヵ月後では逆に有意 ($P<0.05$) に上昇させた (Fig. 12)。

考 察

今回の実験の目的の一つは高蔗糖含有飼料 Diet 2000 でラットに歯周病変を起こさせることにあった。この高蔗糖含有飼料による実験的歯周炎の発症については、すでに Keyes と Jordan¹⁵⁾ が、ゴールデンハムスターを Diet 2000 で約6週間飼育すると、カリエスの発生のほかに歯へのプラークの付着、歯肉の炎症性腫脹や発赤、歯槽骨の破壊などの起こることを報告し、さらに King¹⁶⁾、Miller ら¹⁷⁾、Mitchell¹⁸⁾ および Keyes と Likins¹⁹⁾ らも高蔗糖含有飼料ではほぼ同様の結果が得られたという。しかし一方、小倉²⁰⁾ はウイスター系正常ラットを Diet 2000 で9週間飼育したが、肉眼的にも病理組織学的にも臼歯部のプラークの付着やカリエスは認められず、歯間部歯周組織にも歯周病変の発症を認めなかったと述べている。

ところで著者らが行った本実験では、実験開始3ヵ月目までは肉眼的にも、病理組織学的にも臼歯部歯間部歯周組織には、ほとんど変化は認められなかった。しかし、6ヵ月後には肉眼的に著明なプラークの形成や明らかな歯肉の炎症像は認められなかったが、病理組織学的には炎症性細胞の浸潤や歯根膜線維に走行の乱れ、さらに歯槽骨頂付近では軽度な窩状の骨吸収像が認められた。

ところで、M ϕ は骨髄に由来する単核食食細胞系^{21~23)}の細胞で、周知のように生体防御機構の一つとして炎症過程や免疫反応に重要な役割を持つ免疫担当細胞の一つである。ところがこれらの細胞に遊走、食食および殺菌などの機能異常がある場合には、内因感染症の一つと考えられている歯周疾患^{24,25)}においても、その発症や進行を促進しやすいものと考えられる²⁶⁾。

そこで本研究では、高蔗糖飼育によるラットの歯周炎発症の前後において、M ϕ の感染防御能の変化をとらえるため、そのラットの腹腔 M ϕ の食食活性および lysosome 内酵素活性について検討した。その結果、食食活性については採取した M ϕ に対し無刺激、あるいは

Fig. 9 Photomicrograph of rat alveolar bone culture maintained in α -MEM for 96 hours after removal of C-sup.

Con A にて刺激した場合の変化は、実験開始6ヵ月後の実験群において対照群と比べ、その食食活性が有意に低下していた。これは歯周組織における内因感染に伴うM ϕ の機能、特に食食能の低下～生体防御能の低下などを招き、これがつまり歯周組織での炎症性変化を修飾する一つの因子として働いたのではないかと考えられる。また、BG-sup にて刺激した場合には、実験開始3ヵ月目から対照群と比べ実験群で有意に食食活性の低下が認められたのは、歯周病原性細菌に対してM ϕ は早期に細菌由来の抗原物質を認識し、影響を受けることを示唆している。

一方、M ϕ の殺菌作用に関与する lysosome 内酵素の活性については、対照群と比べ実験群で実験開始早期より lysosome 中の水解酵素 (AcP および NAG) の活性が有意に変化を示した。このことより、歯周組織に病理組織学的変化のみられる以前から、高蔗糖飼料飼育によりM ϕ の酸素に依存しない phagolysosome 中で生じる水解酵素による殺菌作用が変化することが示唆された。

ところで Minkin ら^{1,2)} は、骨吸収機序解明の一端として、骨由来の走化性因子を新生児マウス頭蓋冠を用いて

Fig. 10 Effects of Bone A-sup on phagocytic activity of induced peritoneal macrophages ($M\phi$). After each period of diet, each A-sup was made from alveolar bone cultured for 24hr with stimulant PTH ($10 \mu\text{g/ml}$) or without stimulant. The phagocytic activity of $M\phi$ treated with A-sup was compared between alveolar bones from rats on the general solid diet (▨) and Diet 2000 (▤). Each column shows the mean $OD_{405-510} \pm \text{S.D.}$ Each asterisk indicates a significant difference between general solid diet and Diet 2000. (**: $p < 0.01$).

骨由来の $M\phi$ 走化活性因子について調べ、特にその4 M塩酸グアニジン抽出物には、マウス腹腔 $M\phi$ のchemotaxisとchemokinesisの両者がともに増加することが認められ、また脱灰のみによる抽出物には4 M塩酸グアニジン抽出物よりも高いchemotaxisを示したことを報告し、そのbone-derived chemotactic factorは分子量14,000~67,000ダルトンの蛋白性の物質であろうと推測している。また、Yagami³⁾はラットの長管骨骨幹部からbone powderさらにbone matrixを抽出、精製しこれらを用いて $M\phi$ 遊走能の検討をしたところ、骨組織に特異的にchemotaxisを示す $M\phi$ のサブセットが存在することを示唆している。

そこで、著者らは高蔗糖飼料飼育による歯周疾患発症過程での歯槽骨培養上清の $M\phi$ 機能、特に食食活性への影響を検討した。高蔗糖飼料飼育群のBone-sup(実験群)

と一般固型飼育群のBone-sup(対照群)による $M\phi$ 食食活性への影響を比較すると、本実験での骨培養系ではじめにstimulantとして用いたPTHを添加して作製したBone-sup(PTH treated Bone-sup)で有意な差が認められた。これは、stimulant無添加のBone-sup(non stimulant Bone-sup)に比較し、PTHが骨吸収促進作用^{27,28)}として働き、歯槽骨から遊出した細胞および骨構成細胞の活性化に影響を及ぼしたものと考えられる。このように骨由来の細胞は、高蔗糖飼育により病理組織学的に歯周組織に変化を及ぼす以前から、 $M\phi$ 食食活性の低下傾向を促すことが示唆された。

一方、実験開始6ヵ月後ではBone A-sup, B-supおよびC-supにおいても、実験群と対照群との間に有意な差がみられなかったのは、6ヵ月後の実験群にみられる歯周組織の炎症性変化、特に歯槽骨からの種々の細胞

Fig. 11 Effects of Bone B-sup on phagocytic activity of induced peritoneal macrophages ($M\phi$). Same as Fig. 10 except the B-sup (see Fig. 5) was examined. Each asterisk indicates a significant difference between general solid diet and Diet 2000. (*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

性因子による影響が考えられる。

以上のことから、高蔗糖飼料飼育によるラットの歯周疾患発症に $M\phi$ の感染防御機能の変化が関連し、歯周局所においても $M\phi$ の機能が歯槽骨構成細胞により影響を受けることが示唆された。

今後、これらの歯槽骨構成細胞の動態、および歯槽骨培養上清による $M\phi$ 活性への変化をより詳細に検討することが必要と考えられる。今後さらに検討するうえで、特にこの Bone-sup の characterization や $M\phi$ の遊走能についても検討を加えたいと考えている。

結 論

高蔗糖飼料 (Diet 2000) 飼育によりラットの歯周組織に炎症性変化を起こさせ、その前後におけるラットの腹腔マクロファージ ($M\phi$) の食食活性、lysosome 内酵素活性、特に β -N-acetyl-D-glucosaminidase (NAG) および acid phosphatase (AcP) 活性について検討を行った。またラットの歯槽骨培養上清 (Bone-sup) の $M\phi$

食食活性への影響についても検討し、以下に示す結果を得た。

1. 歯周組織は、Diet 2000 で1および3ヵ月間飼育しても炎症性変化を示さない。しかし、飼育6ヵ月ごろからは病理組織学的には歯間乳頭部に局限して著しい歯周組織の炎症性変化や、その直下の歯槽骨骨頂付近で軽度な骨吸収像が認められた。

2. Diet 2000 で1ヵ月間飼育してもラットの腹腔 $M\phi$ の食食活性は、対照群と比べて変化は認められなかった。しかし、3ヵ月間飼育の腹腔 $M\phi$ を *B. gingivalis* 超音波破壊上清 (BG-sup) で刺激すると食食活性の低下が認められた。また6ヵ月間飼育では無刺激および Con A 刺激それに BG-sup 刺激のいずれでも食食活性の低下が認められた。

3. Diet 2000 飼育ラットの腹腔 $M\phi$ の lysosome 内酵素活性、特に AcP 活性は1ヵ月間飼育ラットで低下、6ヵ月間飼育ラットで上昇した。また NAG 活性については1、3および6ヵ月間飼育ラットでいずれも低下した。

Fig. 12 Effects of Bone C-sup on phagocytic activity of induced peritoneal macrophages (Mφ). Same as Fig. 11 except the C-sup (see Fig. 5) was examined.

4. Diet 2000 飼育ラットの Bone-sup 刺激による Mφ 食生活性は、歯槽骨を PTH で前処理した系においては、すなわち Bone A-sup では 1 カ月間飼育のもので低下、また Bone B-sup では 1 および 3 カ月間飼育のもので低下、Bone C-sup では 1 カ月間飼育のもので低下し 3 カ月間飼育のもので上昇した。しかし、歯槽骨を前処理しない系においては、どの Bone-sup にも対照群と実験群との間には有意な差は認められなかった。

以上の結果から、高蔗糖飼料飼育によるラットの歯周炎の発症に Mφ の感染防御機能低下が関連のあることが示唆され、さらに歯周局所における Mφ 活性が歯槽骨構成細胞を含む骨組織により影響を受ける可能性が示唆された。

文 献

- 1) Minkin, C., Posek, R. and Newbrey, J. : Mononuclear phagocytes and bone resorption : I. Identification and preliminary characterization of a bone-derived macrophage chemotactic factor. *Metab. Bone Dis. & Rel. Res.*, 2 : 363-369, 1981.
- 2) Minkin, C., Bannon, Jr. D.J. and Pokress, S. : Bone-derived macrophage chemotactic factor : Methods of extraction and further characterization. *Calcif. Tissue Int.*, 37 : 63-72, 1985.
- 3) Yagami, K. : Chemotaxis of rat peritoneal macrophages induced by rat bone powder. *J.B. M.M.*, 6 : 32-37, 1988.
- 4) Böyum, A. : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 21 (Suppl. 97) : 77-89, 1968.
- 5) Kumagai, K., Itoh, K., Hinuma, S. and Tada, M. : Pretreatment of plastic petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J. Immunol. Methods*, 29 : 17-25, 1979.
- 6) Leder, L.D. : *Der Blutmonocyt.*, Springer, Berlin-Heidelberg-New York, 1967, 223-229.
- 7) Molony, W.B., McPherson, K. and Fliegelman, I.

- L. : Esterase activity in leukocytes demonstrated by the use of naphthol AS-D chloroacetate substrate. *J. Histochem. and Cytochem.*, 8 : 200, 1960.
- 8) 山本きよみ, 米原ヤス子, 三輪史朗 : エステラーゼ染色, 月刊 Medical Technology 編, 染色法のすべて, 医歯薬出版, 東京, 1986, 134-138.
 - 9) 宮澤正顕, 能勢真人, 高極方久 : マイクロプレート比色計を用いたマクロファージの免疫複合体取り込み能の微量定量法, 日本免疫学会編, 免疫実験操作法XⅢ, 金沢, 1984, 4353-4367.
 - 10) 市村 光, 佐藤巖雄, 下島孝裕, 岩川良伸, 保母清彦, 池田克巳 : 歯周病原性細菌構築成分によるラット腹腔マクロファージの貪食活性への影響—ELISA法を用いた検討—. *日歯周誌*, 31 : 156-165, 1989.
 - 11) Bradford, M.M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72 : 248-254, 1976.
 - 12) 佐々木淳子, 立脇 紀, 能勢真人, 京極方久 : マクロファージ胞体内酵素活性の微量定量法—マイクロプレート比色計を用いて—. 日本免疫学会編, 免疫実験操作法XⅢ, 金沢, 1984, 4369-4375.
 - 13) 佐藤巖雄, 辰巳順一, 岩川吉伸, 藤橋 弘, 池田克巳 : ラット歯槽骨培養上清 (Bone-sup) のラット腹腔マクロファージ走化活性におよぼす影響. *日歯周誌*, 30 : 157-163, 1988.
 - 14) Conrad, R.E., Yang, L.C. and Herscowitz, H.B. : Mononuclear phagocytic cells in peritoneal exudates of rabbits : A Comparison of inducing agents. *J. Reticuloendothelial Soc.*, 21 : 103-107, 1977.
 - 15) Keyes, P.H. and Jordan, H.V. : Periodontal lesions in the syrian hamster—Ⅲ Findings related to an infectious and transmissible component. *Arch. Oral Biol.*, 9 : 377-400, 1964.
 - 16) King, J.D. : Some recent experimental investigations. *Brit. Dent. J.*, 21 : 86-91, 1951.
 - 17) Miller, W.A. and Ripley, J.F. : Early periodontal disease in the Syrian hamster. *J. Periodontol.*, 46 : 368-374, 1975.
 - 18) Mitchell, D.F. : Introductory observations of the periodontium of the Syrian hamster. *J. Dent. Res.*, 27 : 330-335, 1948.
 - 19) Keyes, P.H. and Linkins, R.C. : Plaque formation, periodontal disease, and dental caries in Syrian hamsters. *J. Dent. Res.*, 25 : 166, 1946.
 - 20) 小倉延重 : ラットの糞食による実験的辺縁性歯周炎. *日歯周誌*, 23 : 1-19, 1981.
 - 21) van Furth, R. : The origin and turnover of promonocytes, monocytes and macrophages in normal mice. van Furth, R., *Mononuclear phagocytes*, Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh, 1970, 151.
 - 22) van Furth, R. : Cell of the mononuclear phagocyte system. Nomenclature in terms of sites and conditions. van Furth, R., *Mononuclear Phagocytes. Functional Aspects*, Martinus Nijhoff Publishers bu, The Hague, 1980, 1-30.
 - 23) 稲葉カヨ : マクロファージの分化と機能発現. *臨床免疫*, 18 (3) : 234-245, 1986.
 - 24) 佐川寛典 : 3. 口腔微生物叢, I. 概説, 岩田和夫, 堀川高大, 並河 勇, 医学歯学微生物学, 医歯薬出版, 東京, 1984, 387-390.
 - 25) 村上洋二 : 4. 口腔感染症, IV. 歯周疾患, 岩田和夫, 堀川高大, 並河 勇, 医学歯学微生物学, 医歯薬出版, 東京, 1984, 408-413.
 - 26) Wahl, S.M. : Mononuclear cell-mediated alterations in connective tissue., Genco, R.J. and Mergenhagen, S.E., *Host-parasite interaction in periodontal diseases.*, American Society for Microbiology., Washington, D.C., 1982, 225-234, 318-342.
 - 27) 須田立雄 : 血清カルシウムの恒常性とその調節機構, 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明, 骨の科学, 医歯薬出版, 東京, 1987, 155-179.
 - 28) Wong, G.L. : Skeletal effects of parathyroid hormone. *Bone and Mineral Research*, 4 : 103-129, 1986.

連絡先 :

明海大学歯学部歯周病学講座

〒 350-02 埼玉県坂戸市けやき台 1-1