高血圧自然発症ラット (SHR) を用いた ニフェジピン歯肉増殖症の発症機序に関する研究

吉岡 奈保^{*1} 佐藤 聡^{*1} 河村 博^{*2} 鴨井 久一^{*1}

^{*1}日本歯科大学歯学部歯周病学講座, ^{*2}内科学講座
(2003 年 7 月 5 日受理)

A Study on the Critical Mechanism of Nifedipine-Induced Gingival Overgrowth in Spontaneously Hypertensive Rats

Naho Yoshioka^{*1}, Soh Sato^{*1}, Hiroshi Kawamura^{*2} and Kyuichi Kamoi^{*1}

^{*1}Department of Periodontology and ^{*2}Department of Internal Medicine,
School of Dentistry at Tokyo, Nippon Dental University
Accepted for publication 5 July 2003

Nifedipine (NF), a calcium channel blocker commonly used for treating essential hypertension, has been reported in many studies to cause gingival hyperplasia. To clarify the mechanism of NF-induced gingival overgrowth in animals, we examined angiotensin II levels in gingiva and the expression of transforming growth factor (TGF)- β protein in relation to the tissue renin-angiotensin (RA) system in spontaneously hypertensive rats (SHRs) and Wistar Kyoto rats (WKYs) with normal blood pressure. We also studied the inhibitory effect of captopril, an angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitor, on NF-induced gingival overgrowth in both hypertensive and normotensive animals.

- 1) Ang II levels in gingiva were significantly higher in the SHR group than in the WKY group.
- 2) Although hyperplasia of the gingival endothelium and connective tissue was enhanced in both groups receiving NF (SHR NF and WKY NF) compared to that in animals not receiving it (SHR and WKY controls), gingival hyperplasia tended to be more marked in the SHR NF group than in the WKY NF group.
- 3) TGF- β protein expression was higher in the SHR control group than in the WKY control group. The expression of this protein was significantly higher in both groups receiving NF than in control groups (SHR and WKY).
- 4) No tendency toward gingival overgrowth was observed in animals receiving NF plus CP or CP alone in either the SHR or WKY group. In both groups, TGF- β protein expression was inhibited more significantly in animals receiving NF plus CP than in those receiving NF alone.

These findings suggest that the tissue RA system may result from overexpression of the TGF- β protein due to an increase in tissue Ang II, and thus also in the pathogenesis of gingival overgrowth in SHRs receiving NF. J Jpn Soc Periodontol 45 : 289~299, 2003.

Key words : spontaneously hypertensive rat (SHR), transforming growth factor (TGF) - β , tissue renin-angiotensin (RA) system, nifedipine, gingival overgrowth

要旨 : Ca拮抗薬ニフェジピン (NF) は、本態性高血圧症の治療に際し使用頻度が高く、副作用として歯肉増殖を発症するという多数の臨床報告がある。

本研究では、NFの歯肉増殖発症機序におけるアンジオテンシン (Ang) IIとTGF- β の関与を解明する目的で、高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat, SHR) と正常血圧 Wistar 京都ラット (Wistar Kyoto Rat, WKY) とを用いて、歯肉組織での Ang IIの変化、歯肉中の組織レニン・アンジオテンシン

(RA) 系による TGF- β タンパク発現を検討した。さらにアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬カプトプリル (CP) による歯肉増殖の抑制について検討を行い、以下の結論を得た。

1. WKY と比較して SHR において歯肉 Ang II の産生亢進が有意に認められた。
2. NF 投与群では SHR と WKY 両群とも対照群に比較して口腔歯肉上皮および結合組織に歯肉増殖が強くなり、特に SHR NF 投与群では WKY NF 投与群に比較し歯肉増殖傾向が強かった。
3. TGF- β タンパク発現は対照群において WKY に比較して SHR でより強く亢進していた。NF 投与群では、SHR と WKY とともに対照群に比較して、有意な増加を示した。
4. NF+CP 投与群ならびに CP 投与群では SHR と WKY とともに歯肉増殖傾向は認められず、TGF- β タンパク発現量は NF 投与群と比較して SHR と WKY とともに有意に抑制されていた。

以上の結果より、SHR の NF 歯肉増殖の病因として、組織 Ang II の亢進に伴う TGF- β 発現の増加に起因した組織 RA 系の関与が示唆された。

索引用語: SHR (Spontaneously Hypertensive Rat; 高血圧自然発症ラット), TGF- β , 組織レニン・アンジオテンシン (RA) 系, ニフェジピン, 歯肉増殖症

緒 言

薬剤の副作用による歯肉増殖は、抗てんかん薬のフェニトイン¹⁾、免疫抑制剤のサイクロスポリン A²⁾、また Ca 拮抗薬では、ジヒドロピリジン系のニフェジピン³⁻⁵⁾、アムロジピン⁶⁾などで発症するという多数の臨床報告がある。ニフェジピンは、本態性高血圧症の治療に際し使用頻度が高く、中高年の患者に多く用いられており、高齢化社会の進む今日においては、本剤によって誘発される歯肉増殖の増加が予測される。

ニフェジピン歯肉増殖の発症機序については、*in vivo* および *in vitro* において、薬物の血中濃度、投与量と投与期間^{7,8)}および線維性歯肉増殖⁹⁻¹⁴⁾についてこれまで多数検討がなされているが、いまだに一定の見解は得られていない。

本態性高血圧症では、高血圧および血管増殖 (血管壁の肥厚および血管内皮細胞の増殖) を伴う血管障害による脳血管障害、虚血性心疾患、腎硬化症などの合併症がみられることが多く、発症にはレニン・アンジオテンシン (以下 RA) 系が関与していると考えられている¹⁵⁾。RA 系は、循環 RA 系と、循環 RA 系とは独立した組織 RA 系の存在が報告されており、組織 RA 系は、脳、心臓、腎臓、血管壁^{16,17)}中に存在し、血圧上昇および血管増殖に関与すること、さらに組織アンジオテンシン (以下 Ang) II は、TGF- β ¹⁸⁾、bFGF¹⁹⁾、PDGF²⁰⁾ などの成長因子の発現を刺激することが知られている。

薬剤性歯肉増殖では、これまで線維芽細胞の増殖、細胞外マトリックス産生の亢進、コラゲナーゼ産生の低下による細胞外マトリックスの蓄積⁹⁻¹²⁾など、細胞レベルでの報告がなされてきたが、TGF- β ^{21,22)}、

bFGF^{22,23)}、PDGF²⁴⁾ などの細胞増殖因子の歯周組織中の増加が報告されている。中でも TGF- β の増加にともなう線維芽細胞の増殖²⁵⁾、細胞外マトリックスの蓄積^{26,27)}、血管新生²⁸⁾などは、薬剤性歯肉増殖の発症機序を解明する上で、重要な因子の一つと考えられている。

ニフェジピン歯肉増殖の発症機序のメカニズムを検討するためには、*in vivo* における本態性高血圧症に対する遺伝モデル動物の使用が有効と考えられる。高血圧自然発症ラット (Spontaneously Hypertensive Rat, 以下 SHR) は、正常血圧 Wistar 京都ラット (Wistar Kyoto Rat, 以下 WKY) をオリジナル系統とする本態性高血圧症のモデル動物である²⁹⁾。SHR は加齢に伴って高血圧が自然に発症することが知られており、現在まで高血圧症のモデルとして、各臓器ごとに数多くの研究報告がある³⁰⁻³²⁾。SHR 由来培養血管平滑筋細胞 (以下 VSMC) では、WKY 由来培養 VSMC に比較して過剰な増殖を示し³⁰⁾、Ang II によって TGF- β 1, bFGF, PDGF の発現が亢進していることが認められている³¹⁾。

一方、Ca 拮抗薬と同様に高血圧治療に使用される ACE 阻害薬は、RA 系の中で Ang I から Ang II への変換を阻害し、生体内の Ang II の産生を減少させることで降圧効果があり、高血圧症によって血管増殖が生じる心臓、腎臓、脳などに対して臓器保護作用を有する³³⁾。カプトプリルは ACE 阻害薬の中で最初に開発された薬剤であり³³⁾、Ca 拮抗薬による歯肉増殖の症状を軽減させる効果が報告されている³⁴⁾。

本研究では、本態性高血圧症におけるニフェジピン歯肉増殖の発症機序を解明する目的で、SHR を用いて、いまだに解明されていない口腔領域での組織 Ang II の変化、さらに歯肉中の組織 RA 系による TGF- β タンパク発現の検討、ACE 阻害薬であるカ

プトプリルによる歯肉増殖抑制について検討を行った。

材料および方法

1. 歯肉 Ang II の検索

1) 実験動物

実験動物には、8週齢の雄性の SHR 5匹と WKY 5匹 (SHR 等疾患モデル共同研究会船橋農場, 千葉) を使用した。実験動物の飼育, 実験および屠殺は, 日本歯科大学歯学部共同利用研究所, 動物実験施設の規定に基づいて実施した。これらの動物は, 予備飼育期間を通じて固形飼料 MF (オリエンタル酵母, 東京) と水道水との自由摂取にて飼育した。

2) 実験方法

1週間の予備飼育後, SHR と WKY とを屠殺し, No. 15c の歯科用替刃メスおよび歯科用探針にて上顎口蓋部および頬側歯肉を摘出した。摘出歯肉は, リン酸緩衝生理食塩液 (以下 PBS) で洗浄し, 各試料に組織溶解緩衝液 lysis buffer (50 mM/l Tris HCl pH 8.0, 150 mM/l NaCl, 0.02% sodium azide, 100 mg/ml PMSF, 1 mg/ml aprotinin, 1% Triton X) を加えてホモジネートおよび超音波粉碎した後, 遠心分離し, その上清のみを 4°C にて保存し, 定量に用いた。

試料の上清は, Sep-Pak C18 カートリッジ (Waters Associates, Milford, MA, USA) を用いて, メタノール水トリフルオロ酢酸 (80:19.9:0.1, v/v) で溶解した。溶解液は, 真空遠心乾燥機で乾燥させ, Ang II を逆相液体クロマトグラフィーにより分離した。その後, 試料を Shodex column (OPD-50, 昭和電工, 東京) で負荷させ, 0.05% トリフルオロアセトニトリル加 20~50% (v/v) アセトニトリルを 1 ml/min の流出速度で溶出した。溶出液 0.5 ml を回収し, 真空遠心乾燥機で乾燥後, 残留物を 0.1 M Tris-HCl (pH 7.4) でろ過し, これを Ang II に対するラジオイムノアッセイの検体とした。ラジオイムノアッセイは, Satoh ら³¹⁾の方法に従って, 行った。

2. 薬剤による歯肉増殖モデルの検討

1) 実験動物

11週齢の雄性 SHR と WKY とを各 32 匹, 計 64 匹を使用した。2週間の順応予備飼育および実験期間を通じて固形飼料と水道水との自由摂取にて飼育した。

2) 実験方法

(1) 薬剤の投与方法および試料の作製

薬剤投与による歯肉中の TGF- β タンパク発現につ

いては, 以下の 8 群, 8 匹ずつ検討した。

- ① 滅菌蒸留水群 WKY (WKY 対照群)
- ② 滅菌蒸留水群 SHR (SHR 対照群)
- ③ ニフェジピン群 WKY (WKY NF 投与群)
- ④ ニフェジピン群 SHR (SHR NF 投与群)
- ⑤ ニフェジピンとカプトプリル群 WKY (WKY NF+CP 投与群)
- ⑥ ニフェジピンとカプトプリル群 SHR (SHR NF+CP 投与群)
- ⑦ カプトプリル群 WKY (WKY CP 投与群)
- ⑧ カプトプリル群 SHR (SHR CP 投与群)

対照群は滅菌蒸留水を, NF 投与群はニフェジピン原末 (バイエル薬品, 大阪) をジメチルスルホキシド (DMSO, 和光純薬, 大阪) に溶解した液を 50 mg/kg/day, CP 投与群はカプトプリル原末 (三共, 東京) を滅菌蒸留水に溶解した液を 30 mg/kg/day, NF+CP 投与群は上記のニフェジピン溶解液を 50 mg/kg/day, カプトプリル溶解液を 30 mg/kg/day をそれぞれ, 経口ゾンデを用いて 1 日 1 回 6 週連続で強制投与した。薬剤投与開始から 7 週目にペントバルビタール・ナトリウム (ネンブタール注射液®, 大日本製薬, 大阪) の腹腔内過量投与にて屠殺後, 上顎を摘出した。摘出した上顎のうち, 各群 3 匹は病理組織学的検索に, 残りの各群 5 匹はウエスタンブロッティングによる TGF- β タンパク発現量の定量に用いた。

(2) 病理組織標本作製

上顎を摘出後, 10% 中性緩衝ホルマリンにて 1 週間固定し, エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) にて 2 週間脱灰後, 通法に従ってパラフィン包埋した。上顎臼歯部は厚さ 3 μ m の前頭断による連続切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン (H-E) 染色を施し, 光学顕微鏡にて観察した。

(3) ウエスタンブロッティングによる TGF- β タンパク発現量の検索

上顎歯肉は No. 15c の歯科用替刃メスおよび歯科用探針にて採取し, 各試料 (湿重量約 30~50 mg) に組織溶解緩衝液 lysis buffer (500 μ l) を加えて十分にホモジネートした。メタノールとクロロホルムによる精製を行い, PBS を加えて超音波粉碎して溶解した後, 上清を回収し, タンパクを抽出した。吸光光度計を用いて Lowry らの方法³⁵⁾によるタンパク濃度の測定を行い, 全ての試料が均一な濃度になるよう PBS の量により調整し, これをウエスタンブロッティングに用いる組織抽出液とした。組織抽出液 10 μ l はタンパク濃度を 40 μ g/ml としてサンプルバッファー (63 mM/l Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 5% 2-mercaptoethanol) 20 μ l に溶解し

た。90°Cで5分間熱処理した後、10% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を2時間50 mA 定電流で行い、ニトロセルロースメンブレン (BIORAD Laboratories, Richmond, CA, U.S.A) に3時間30 V 定電圧で転写した。転写後、メンブレンをスキムミルク (ブロックエース®, 大日本製薬, 大阪) にて4°Cで一晩ブロッキングした。その後、一次抗体として、ウサギ抗 TGF- β 抗体 (R & D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A) を0.05% Tween 20 加 PBS (以下 PBST) にて500倍希釈、また内部標準としてマウス抗モノクローナル α -tubulin 抗体 (Sigma BioScience, St. Louis, MO, U.S.A) を PBST にて500倍希釈し、室温にて3時間反応させた。PBST にて洗浄後、二次抗体として TGF- β に対しては HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (BIORAD) を PBST にて2,000倍希釈、 α -tubulin に対しては HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (BIORAD) を PBST にて2,000倍希釈し、室温にて1時間反応させた。PBST にて洗浄後、ECL™ ウェスタンブロッティング検出試薬 (Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, U.K.) にて化学発光させ、エックス線フィルム上にタンパクを検出した。

検出されたバンドはコンピューターにて NIH Image V 1.57 を用いて画像解析した。すなわち TGF- β タンパク発現量は、各試料を3回測定し、その平均値を代表値とした。さらにタンパク量の比較では、内部標準として用いた α -tubulin タンパクの発現量に対する各試料の代表値の比を求め、この絶対値に対する比較検討を行った。

(4) 統計学的検索

統計学的検索は、Ang II の定量については Student's t-test を、ウェスタンブロッティングによる TGF- β タンパク発現量の定量については Two-factor factorial ANOVA を用いた。

結 果

1. 歯肉 Ang II 量

SHR および WKY の歯肉中の総タンパクに対する組織 Ang II 量は、SHR で 62.20 ± 10.29 pg/mg に対して WKY では 34.37 ± 10.93 pg/mg で有意に多かった ($p < 0.05$) (図1)。

2. 病理組織学的観察

SHR と WKY とともに対照群では、口腔歯肉上皮の肥厚や長い上皮脚の結合組織への突出は認められなかった (図2a, b)。しかし、歯肉溝上皮および接合上皮では、WKY に比較して SHR において顕著な増

図1 8週齢における歯肉組織 Ang II の比較

殖が認められた (図2b)。

NF 投与群では SHR と WKY とともに対照群と比較して、外縁上皮において有棘層の肥厚および上皮脚の結合組織への突出が見られ、さらに結合組織にコラーゲン線維の不規則な走行、太い線維束の形成が認められた (図2c, d)。さらに SHR NF 投与群では、WKY NF 投与群と比較して、長い上皮脚の結合組織への突出が顕著に認められた (図2d)。

NF+CP 投与群ならびに CP 投与群では SHR と WKY とともに歯肉上皮の肥厚、長い上皮脚の結合組織への突出、炎症性細胞の浸潤、コラーゲン線維の不規則な走行や太い線維束の形成は、ほとんど認められなかった (図2e, f, g, h)。一方、SHR では NF+CP 投与群ならびに CP 投与群において対照群と比較して外縁上皮の顕著な増殖は認められなかった (図2f, h)。

3. ウェスタンブロッティングによる TGF- β タンパク発現量の検索

ウェスタンブロッティングによる典型的な TGF- β タンパク発現量 (全8群) を図3a に示した。

SHR の TGF- β タンパク発現量は、対照群で 3.59 ± 0.69 , NF 投与群で 6.29 ± 2.52 , NF+CP 投与群で 2.94 ± 1.02 , CP 投与群で 2.08 ± 0.54 を示した ($n=5$) (図3b)。WKY に比較して、CP 投与群を除く全ての群において、統計学的に有意な増加が認められた ($p < 0.05$) (表1~4)。

一方、WKY の TGF- β タンパク発現量では、対照群で 2.34 ± 0.39 , NF 投与群で 3.64 ± 0.1 , NF+CP 投与群で 2.34 ± 0.47 , CP 投与群で 2.42 ± 0.71 を示した ($n=5$) (図3b)。

NF 投与による TGF- β タンパク発現量は、SHR と WKY とともに対照群に比較して、有意な増加を示

a : WKY 対照群

b : SHR 対照群

c : WKY NF 投与群

d : SHR NF 投与群

図 2 上顎臼歯頬側歯肉の H-E 染色像 (×200)

e : WKY NF+CP 投与群

f : SHR NF+CP 投与群

g : WKY CP 投与群

h : SHR CP 投与群

図 2 上顎臼歯頬側歯肉の H-E 染色像 (×200)

a. ウェスタンブロッティングによる典型的な歯肉中の TGF- β タンパク発現量

1: WKY 対照群, 2: SHR 対照群, 3: WKY NF 投与群, 4: SHR NF 投与群, 5: WKY NF+CP 投与群, 6: SHR NF+CP 投与群, 7: WKY CP 投与群, 8: SHR CP 投与群

b. α -tubulin タンパク発現量に対する TGF- β タンパク発現量の比 (平均±標準偏差)図 3 ウェスタンブロッティングによる歯肉中の TGF- β タンパク発現表 1 NF 投与による TGF- β タンパク発現量

	WKY	SHR
対象群	2.34±0.39	3.59±0.69 #
NF 投与群	3.64±0.1*	6.29±2.52*#

#p<0.05: WKY との比較

*p<0.05: 対象群との比較 (n=5)

表 2 CP 投与による TGF- β タンパク発現量 (対照群との比較)

	WKY	SHR
対照群	2.34±0.39	3.59±0.69
CP 投与群	2.42±0.71*	2.08±0.54*

*p<0.05: 対照群との比較 (n=5)

表 3 CP 投与による TGF- β タンパク発現量 (NF 投与群との比較)

	WKY	SHR
NF 投与群	3.64±0.1	6.29±2.52
CP 投与群	2.42±0.71 †	2.08±0.54 †

†p<0.05: NF 投与群との比較 (n=5)

した ($p<0.05$)。また, SHR NF 投与群では, WKY NF 投与群に比較して, 発現量の増加を認めた (表 1)。

CP 投与による TGF- β タンパク発現量は, 対照群に比較して SHR で, NF 投与群に比較して SHR, WKY ともに統計学的に有意に抑制された ($p<0.05$) (表 2, 3)。

表 4 NF と CP の併用による TGF- β タンパク発現量 (NF 投与群との比較)

	WKY	SHR
NF 投与群	3.64 $\pm$ 0.1	6.29 $\pm$ 2.52 #
NF+CP 投与群	2.34 $\pm$ 0.47 †	2.94 $\pm$ 1.02 †#

p<0.05: WKY との比較

† p<0.05: NF 投与群との比較 (n=5)

NF と CP の併用投与による TGF- β タンパク発現量は、NF 投与群と比較して、SHR, WKY とともに統計学的に有意な抑制が認められた (p<0.05) (表 4)。

考 察

高血圧症の成因は、腎臓の傍糸球体細胞で産生されるタンパク分解酵素であるレニンと、肝臓で産生され血中に放出されるタンパクであるアンジオテンシノーゲンとが関与する RA 系が重要な役割を果たしている。RA 系の働きでレニンは、血中のアンジオテンシノーゲンに作用し、アンジオテンシン (以下 Ang) I を産生する。Ang I は、アンジオテンシン変換酵素 (以下 ACE) により、Ang II に変換され、変換された Ang II が血管平滑筋の収縮や副腎皮質の他に心臓、腎臓、中枢神経系、交感神経系に作用し、体液量や総末梢抵抗、心拍出量を増加させ、高血圧症を発症させることが知られている³⁶⁾。

従来 Ang II は、循環 RA 系として循環血を介して各組織に作用すると考えられていたが、その後、脳、心臓、腎臓、血管壁など局所にも独立した組織 RA 系の存在が報告された^{16,17)}。これにより、組織 Ang II の蓄積が、血圧上昇や血管増殖を伴う血管障害による脳血管障害、虚血性心疾患、腎硬化症などの高血圧症の合併症へ関与しているものと考えられている¹⁵⁾。組織 Ang II は、Ang II サブタイプ 1 (AT1) 受容体を刺激し、心筋細胞や血管平滑筋細胞により TGF- β , bFGF, PDGF などの発現を亢進し、血管増殖を起こすと考えられる¹⁸⁻²⁰⁾。

一方、本研究に用いた SHR は、本態性高血圧症のモデルとして、高血圧を示す雄、雌を連続的に選択交配することによって 1963 年、岡本・青木²⁹⁾によって確立された実験動物である。SHR に関しては、RA 系と高血圧症との関連性についての報告³⁰⁻³²⁾もみられる。

本研究で歯肉 Ang II が WKY に比較して SHR で産生が亢進しているのが認められた。これは本態性高

血圧症患者の歯肉のような末梢組織の循環器系においても心血管系臓器と同様に、高血圧症の成因である組織 RA 系が作用していることを確認するものと考えられる。したがって、高血圧症患者には歯肉増殖が起きる可能性も考えられ、これは今後の検討課題でもある。

TGF- β は分子量 25 kDa の 2 量体タンパクであり、*in vitro* の研究では細胞密度により、線維芽細胞の増殖および抑制に関与することが知られている²⁵⁾。さらに TGF- β は、線維芽細胞に対して、コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスの産生を促進する作用と、コラゲナーゼなどの細胞外マトリックス分解酵素産生を抑制する作用に関与し、細胞外マトリックスを蓄積させるといわれ、肺など他臓器での線維性疾患においても重要であると考えられている²⁷⁾。

口腔内における薬剤性歯肉増殖と TGF- β との関係の報告では、Saito ら²¹⁾がヒトフェニトインおよびニフェジピン歯肉増殖の歯肉結合組織において TGF- β の局在が正常歯肉組織と比較して顕著に多いこと、また歯肉上皮では TGF- β がほとんど局在しないことを報告した。さらに、James ら²²⁾は、サイクロスポリン歯肉増殖においても TGF- β 発現が亢進していることを報告している。

本研究における TGF- β 発現は、ニフェジピン投与によって SHR と WKY とともに増加が認められ、これまでのニフェジピン歯肉増殖で TGF- β 発現が亢進する報告²¹⁾と一致した結果が得られた。さらに SHR では、薬剤の投与に関わらず WKY に比較して、ニフェジピン投与群では、WKY に比較して SHR において歯肉増殖が増強していた。これらの結果より、ニフェジピン歯肉増殖は、歯肉 Ang II の増加により亢進するであろう TGF- β が、歯肉の線維芽細胞に働きかけ、細胞外マトリックスを蓄積させ、線維性増殖を起こすという発症機序が考えられた。しかしながら、今回の実験では、TGF- β タンパク発現量と並行して Ang II の定量を行わなかったため、歯肉増殖症群において Ang II の増加が TGF- β の増加を誘導するという直接的なデータを得るには至らなかった。これについては今後検討する必要がある。

一方、本研究で使用した ACE 阻害薬のカプトプリルは、RA 系の亢進に伴う高血圧症の心血管合併症に対する臓器保護作用をもつことが広く知られており、高血圧症による心肥大での心筋線維化に対する抑制効果³³⁾やヒト肺由来線維芽細胞に対する細胞増殖抑制作用³⁷⁾が報告されている。SHR を用いた研究においても、ACE 阻害薬の投与により、大動脈で血管増殖が

抑制されたという報告もみられる³²⁾。本研究では、SHR および WKY とともに、ニフェジピン投与時に比較して、カプトプリル投与で TGF- β タンパク発現が抑制された。特に、ニフェジピンとカプトプリルの併用投与に比較して、カプトプリル単独投与では、TGF- β タンパク発現はより抑制された。これらの結果より、ACE 阻害薬による Ang II の産生の減少が、TGF- β の発現を抑制し、その結果、歯肉の線維性増殖が抑制されたものと考えられる。

薬剤性歯肉増殖では、無歯顎や歯の喪失部での発症がまれであること³⁸⁾から、口腔清掃不良による細菌性プラークの蓄積と細菌の増加に依存した炎症反応が増悪因子の一つとして考えられてきた⁹⁾。本研究に使用した Ca 拮抗薬による歯肉増殖では、フェニトイン歯肉増殖が線維性結合組織の増殖が主体であるのに対して、増殖した結合組織中に血管の数的増加や拡張を認め、血管系の関与を示唆した報告³⁹⁾がみられる。また、Ca 拮抗薬投与により増加の認められた TGF- β は、血管内皮細胞の増殖を抑制し、血管新生作用を示す²⁸⁾といった報告もある。このことは、口腔衛生状態が不良な高血圧症患者の場合、正常歯肉に比較して高い割合で存在する TGF- β 量が局所の炎症性サイトカインと相乗的に作用し、血管系を中心に重度の歯肉増殖を発症させるためと考えられる。

本研究では、薬物性歯肉増殖の中でもニフェジピン歯肉増殖で高血圧症の血管増殖に深く関与する組織 Ang II が重要な因子であることを確認した。さらに薬物性歯肉増殖では、組織 Ang II による TGF- β 発現の増加が成因の一つであり、高血圧症の成因である RA 系の関与が考えられた。また薬物性歯肉増殖程度は、患者の口腔衛生状態に左右されることが知られており、Ca 拮抗薬性歯肉増殖では、プラーク除去により予防可能であり治癒するという報告もみられる⁴⁰⁾。これらの結果より、高血圧症患者に対しては、降圧剤処方に対する内科医との話し合い、ならびに徹底した口腔清掃の必要性があると考えられた。

今後、ニフェジピン歯肉増殖の研究において、ヒト歯肉線維芽細胞を用いて、組織 Ang II による TGF- β 以外の発現亢進の報告されている成長因子^{21,23,24,41,42)}に関する検討も必要であると考えられた。

本研究の一部は平成 11 年度文部省科学研究費補助金(課題番号 11771367) の補助を受けて行った。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の遂行に際し適切なご助言とご支援を頂きました、本学歯周病学講座ならびに内科学

講座の講座員各位に、深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第 44 回秋季日本歯周病学会(2001 年 10 月 19 日)において発表した。

文 献

- 1) Kimball OP: The treatment of epilepsy with sodiumdiphenylhydantoin. J Am Med Assoc, 112: 1244-1245, 1939.
- 2) Rateitschak-Plüss EM, Hefti, A, Lörtscher, R, Thiel G: Initial observation that cyclosporine-A induces gingival enlargement in man. J Clin Periodontol, 10: 237-246, 1983.
- 3) Ramon Y, Behar, S, Kishon Y, Engelberg IS: Gingival hyperplasia caused by nifedipine-a preliminary report. Int J Cardiol 5: 195-204, 1984.
- 4) Lederman D, Lumerman H, Reuben S, Freedman PD: Gingival hyperplasia associated with nifedipine therapy. Report of a case. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 57: 620-622, 1984.
- 5) Van der Wall EE, Tuinzing DB, Hes J: Gingival hyperplasia induced by nifedipine, an arterial vasodilating drug. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 60: 38-40, 1985.
- 6) Ellis JS, Seymour RA, Thomason JM, Monkman SC, Idle JR: Gingival sequestration of amlodipine and amlodipine-induced gingival overgrowth. Lancet, 341: 1102-1103, 1993.
- 7) Ishida H, Kondoh T, Kataoka M, Nishikawa S, Nakagawa T, Morisaki I, Kido J, Oka T, Nagata T: Factors influencing nifedipine-induced gingival overgrowth in rats. J Periodontol, 66: 345-350, 1995.
- 8) Nishikawa S, Nagata T, Morisaki I, Oka T, Ishida H: Pathogenesis of drug-induced gingival overgrowth. A review of studies in the rat model. J Periodontol, 67: 463-471, 1996.
- 9) Seymour RA, Thomason JM, Ellis JS: The pathogenesis of drug-induced gingival hyperplasia. J Oral Pathol Med, 23: 165-175, 1996.
- 10) Shikata H, Utsumi N, Shimojima T, Oda Y, Okada Y: Increased expression of type VI collagen genes in drug-induced gingival enlargement. FEBS, 334: 65-68, 1993.
- 11) Tipton DA, Fry HR, Dabbous MK: Altered collagen metabolism in nifedipine-induced gingival overgrowth. J Periodont Res, 29: 401-409, 1994.
- 12) 尾崎幸生, 國松和司, 田尻公一, 原 宜興, 加藤伊八: ヒトニフェジピン歯肉増殖症における抗 PCNA 抗体を用いた線維芽細胞の増殖に関する研究. 日歯周誌, 39: 217-225, 1997.

- 13) Salo T, Oikarinen KS, Oikarinen AI : Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in normal human gingival fibroblast. *J Oral Pathol Med*, 19 : 404-407, 1990.
- 14) Hassel TM, Hefti AF : Drug-induced gingival overgrowth : old problem, new problem. *Crit Rev Oral Biol Med*, 2 : 103-137, 1991.
- 15) Paul M, Ganten D : The molecular basis of cardiovascular hypertrophy : the role of the renin-angiotensin system. *J Cardiovasc Pharmacol* 19(Supple 5) : S 51-58, 1992.
- 16) Dzau VJ, Brody T, Ellison KE : Tissue specific regulation of renin expression in the mouse. *Hypertension*, 9 : II I -36, 1987.
- 17) Campbell DJ, Habener JF : Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of the rat. *J Clin Invest*, 78 : 31-39, 1986.
- 18) Gibbons GH, Pratt RE and Dzau VJ : Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia : autocrine transforming growth factor β 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest*, 90 : 456-461, 1992.
- 19) Peifley KA, Winkles JA : Angiotensin II and endothelin-1 increase fibroblast growth factor-2 mRNA expression in vascular smooth muscle cell. *Biochem Biophys Res Commun*, 242 : 202-208, 1998.
- 20) Parker SB, Wade SS, Prewitt RL : Pressure mediates angiotensin II-induced arterial hypertrophy and PDGF-A expression. *Hypertension*, 32 : 452-458, 1998.
- 21) Saito K, Mori S, Iwakura M, Sakamoto S : Immunohistochemical localization of transforming growth factor β , basic fibroblast growth factor and heparan sulphate glycosaminoglycan in gingival hyperplasia induced by nifedipine and phenytoin. *J Periodont Res*, 31 : 545-555, 1996.
- 22) James JA, Irwin CR, Linden GJ : Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor β 1. *J Periodont Res*, 33 : 40-48, 1998.
- 23) Sasaki T, Maita E : Increased bFGF level in the serum of patients with phenytoin-induced gingival overgrowth. *J Clin Periodontol*, 25 : 42-47, 1998.
- 24) Nares S, Ng MG, Dill RE, Iapino AM : Cyclosporin A upregulates platelet-derived growth factor B chain in human hyperplastic gingiva. *J Periodontol*, 67 : 271-278, 1996.
- 25) Postlethwaite AE, Keski-Oja J, Moses HL, Kang AH : Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor β . *J Exp Med*, 165 : 251-256, 1987.
- 26) Kovacs EJ, DiPietro LA : Fibrogenic cytokines and connective tissue production. *FASEB J*, 8 : 854-861, 1994.
- 27) 山口 祐 : TGF- β の作用と細胞外マトリックス. *実験医学*, 10 : 1859-1864, 1992.
- 28) Phillips GD, Whitehead RA, Stone AM, Rubel MW, Goodkin ML, Knighton DR : Transforming growth factor beta (TGF- β) stimulation of angiogenesis : an electron microscopic study. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 25 : 149-155, 1993.
- 29) Okamoto K, Aoki K : Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 27 : 282-293, 1963.
- 30) Hadrava V, Tremblay J, Hamet P : Abnormalities in growth characteristics of aortic smooth muscle cells in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 13 : 589-597, 1989.
- 31) Satoh C, Fukuda N, Hu W, Nakayama M, Kishioaka H, Kanmatsuse K : Role of endogenous angiotensin II in the increased expression of growth factors in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 37 : 108-118, 2001.
- 32) Owens GK : Influence of blood pressure on development of aortic medial smooth muscle hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 9 : 178-187, 1987.
- 33) 安東克之, 藤田敏郎 : ACE 阻害薬. *臨床と研究*, 78 : 34-38, 2000.
- 34) Harel-Raviv M, Eckler M, Lalani K, Raviv E, Gornitsky M : Nifedipine-induced gingival hyperplasia. A comprehensive review and analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 79 : 715-722, 1995.
- 35) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall J : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 : 265-275, 1951.
- 36) 田村功一, 梅村 敏, 石井當男 : レニン, アンジオテンシノーゲン, 藤田敏郎, *実験医学別冊 メディカル用語ライブラリー 高血圧 分子メカニズムから病態・診断・治療まで*, 羊土社, 東京, 1995, 20-21.
- 37) Nguyen L, Ward WF, Ts'ao CH, Molteni A : Captopril inhibits proliferation of human lung fibroblasts in culture : a potential antifibrotic mechanism. *Proc Soc Exp Biol Med* 205 : 80-84, 1994.
- 38) Dreyer P, Thomas CJ : Diphenylhydantoinate-induced hyperplasia of the masticatory mucosa in an edentulous epileptic patient. *Oral Surg Oral*

- Med Oral Pathol, 45 : 701-706, 1978.
- 39) 成松雄治, 佐野和生, 吉田眞一, 釜崎勢大, 井口次夫 : カルシウム拮抗剤およびフェニトインによる歯肉増殖症の免疫組織化学的検討—Bromodeoxyuridine, α -smooth muscle actin 染色を中心に—. 口科誌, 44 : 652-657, 1995.
- 40) Hancock RH, Swan RH : Nifedipine-induced gingival overgrowth. : report of a case treated by controlling plaque. J Clin Periodontol, 19 : 12-14, 1992.
- 41) Uzel MI, Kantarci A, Hong H, Uygur C, Sheff MC, Firatli E, Trackman PC : Connective tissue growth factor in drug-induced gingival overgrowth. J Periodontol 72 : 921-931, 1995.
- 42) Das SJ, Olsen I : Keratinocyte growth factor is upregulated by the hyperplasia-inducing drug nifedipine. : Cytokine 12 : 1566-1569, 2000.

連絡先 :

日本歯科大学歯学部歯周病学講座
〒102-8158 千代田区富士見 2-3-16