

モデルマウスの解離性大動脈瘤に及ぼす影響

TSL6-TG とマルファン症候群モデルマウス (MF マウス) と交配し (TSL6-TG/MF マウス)、同マウスの大動脈弓部を摘出し、HE 染色と EVG 染色で血管壁の崩壊に及ぼす影響を解析した。抗 fibrillin-1 抗体を用いた免疫染色で微細線維の再生能力を解析した。

(3) 微細線維形成量の解析

ADAMTSL6 β による微細線維の再生効果は、抗 fibrillin-1 抗体、抗 ADAMTSL6 β を用いた蛍光免疫染色で解析を行った。微細線維の再生の定量化は画像ソフト (Imaris : カールツァイス) で蛍光強度を解析した。

(倫理面への配慮)

本動物実験は、東京理科大学動物実験委員会の承認を得た上で行われた。

C. 研究結果

(1) TSL6-TG の大動脈の微細構造形成に及ぼす影響

TSL6-TG の大動脈を解析した結果、野性型マウスと比較して大動脈壁の弾性板の数の増加が見られた。また、ADAMTSL6 β の増加に伴い抗 fibrillin-1 抗体陽性の微細線維の増加が観察された。

(2) ADAMTSL6 β によるマルファンモデル動物の解離性大動脈瘤の改善効果

TSL6-TG/MF マウスの解離性大動脈瘤発症に及ぼす影響を解析した。MF マウスでは生後 3 ヶ月以降で、解離性大動脈瘤の特徴である大動脈の肥厚に伴い大動脈壁の肥厚化と弾性板の崩壊が観察された。

TSL6-TG/MF マウスにおいても MF マウスと同様の変化が観察された。しかし免疫染色において微細線維形成を観察した結果、TSL6-TG/MF マウスは MF マウスと比較して大動脈弓部における ADAMTSL6 の発現上昇に伴い、fibrillin-1 陽性の微細線維の形成亢進が観察された。

(3) 微細線維形成量の測定

TSL6-TG/MF マウスで誘導された微細線維形成量を Imaris で定量化した。MF マウスと比較して TSL6-TG/MF マウスでは、有意に fibrillin-1 陽性の微細線維形成量の増加が観察された。

DE. 考察・結論

ADAMTSL6 β によるマルファンモデル動物の解離性大動脈瘤発症の抑制効果は観察されなかったが、微細線維の再生効果を有する事が観察された。大動脈は歯根膜と異なり微細線維の他に、エラスチンからなる弾性線維の形成を必要とするため、これらの二つの線維形成を促進する技術開発が必要になる可能性が示された。以上の結果より、ADAMTSL6 β を補充する新たな治療技術が、早期発症型歯周炎の治療のみならずマルファン症候群における解離性大動脈瘤発症の予防技術として発展する可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

Hayano, S., Kurosaka, H., Yanagita, T., Kalus, I., Milz, F., Ishihara, Y., Nurul, Islam, M., Kawanabe, N., Saito, M., Kamioki, H., Adachi, T., Dierks, T. and Yamashiro, T.*: Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis. J Biol Chem 287(15): 12217-12229, 2012.

M. Arakaki, M. Ishikawa, T. Nakamura, T. Iwamoto, A. Yamada, E. Fukumoto, M. Saito, K. Otsu, H. Harada, Y. Yamada, and S. Fukumoto, Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. J Biol Chem;287(13):10590-10601 2012

Kanamura, N., Amemiya, T., Yamamoto, T., Mishima, K., Saito, M., Tsuji, T. and Nakamura, T.*: Dental Regenerative Therapy using Oral Tissues. **Anti-Aging Medicine 9 (1)**: 14-23, 2012.

M.Saito., and T. Tsuji: "Tooth regeneration therapy" as a next generation of regenerative medicine., Hiromasa Yoshie, At the forefront. Illustrated Topics in dental research and clinical practice, Quintessence Publishing Co, Inc., Hanover Park, 2012,39-42.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

〔 III 〕 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
村上伸也 野崎剛徳	CHAPTER 1 歯周病の発生 2. 歯周組織破壊へのロードマップ	天野敦雄 岡 賢二 村上伸也	ビジュアル歯周病を科学する	クインテッセンス出版株式会社	東京	2012	33-45
森崎裕子、 森崎隆幸、	大動脈疾患による遺伝子異常	山口徹 他	Annual Review 循環器 2012	中外医学社	東京	2012	240-246
森崎裕子	ロイス・ディーツ症候群	遠藤文夫	先天代謝異常症候群	日本臨床社	大阪	2012	731-735
山崎和久 多部田康一 中島貴子	CHAPTER 4 歯周病病因論・宿主因子 1. 宿主免疫と歯周組織破壊	天野敦雄 岡 賢二 村上伸也	ビジュアル歯周病を科学する	クインテッセンス出版株式会社	東京	2012	230-246
山崎和久 中島貴子	第13章 歯周組織の病理変化	吉江弘正 伊藤公一、 村上伸也 申基喆	臨床歯周病学 第2版2編ベリック編	医歯薬出版	東京	2013	146-155
山崎和久 中島貴子		藤本篤士、 武井典子、 片倉 朗、 大野友久、 糸田昌隆、 杉山 勝、 吉江弘正、 小林芳友	5疾病の口腔ケア 急性心筋梗塞と口腔	医歯薬出版	東京	2013	146-147
M.Saito, and T. Tsuji	“Tooth regeneration therapy” as a next generation of regenerative medicine.	Hiromasa Yoshie	At the forefront. Illustrated Topics in dental research and clinical practice	Quintessence Publishing Corporation	Hanover Park	2012,	39-42

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hou J, Yamada S, Kajikawa T, Ozaki N, Awata T, Yamaba S, Murakami S	Role of ferritin in the cytodifferentiation of periodontal ligament cells.	Biochem Biophys Res Commun	426(4)	643-648	2012
Kudo C, Naruishi K, Maeda H, Abiko Y, Hino T, Iwata W, Mitsuhashi C, Murakami S, Nagasawa T, Nagata T, Yoneda S, Nomura Y, Noguchi T, Numabe Y, Ogata Y, Sato T, Shimauchi H, Yamazaki K, Yoshimura A, Takashiba S	Assessment of use of plasma/serum IgG test to screen for periodontitis	J Dent Res	91	1190-1195	2012
Kashiwagi Y, Yanagita M, Kojima Y, Shimabukuro Y, Murakami S	Nicotine upregulates IL-8 secretion in human gingival epithelial cells following stimulation with IL-1 or P. gingivalis lipopolysaccharide via a nicotinic acetylcholine receptor signaling,	Arch. Oral Biol	57	483-490	2012
Yanagita M, Mori K, Kobayashi R, Kojima Y, Kubota M, Miki K, Yamada S, Kitamura M, Murakami S	Immunomodulation of dendritic cells differentiated in the presence of nicotine with lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis	Eur J of Oral Sci	120	408-414	2012
Yanagita M, Kobayashi R, Kojima Y, Mori K, Murakami S	Nicotine modulates the immunological function of dendritic cells through peroxisome proliferator-activated receptor- γ upregulation,	Cellular Immunology	274(1-2)	26-33	2012

Iwayama T, Yanagita M, Mori K, Sawada K, Ozasa M, Kubota M, Miki K, Kojima Y, Takedachi M, Kitamura M, Shimabukuro Y, Hashikawa T, Murakami S.	Adiponectin regulates functions of gingival fibroblasts and periodontal ligament cells.	<i>J Periodont Res</i>	47	In press	2012
Takedachi M, Oohara H, Smith BJ, Iyama M, Kobashi M, Maeda K, Long CL, Humphrey MB, Stoecker BJ, Toyosawa S, Thompson LF, Murakami S	CD73-generated adenosine promotes osteoblast differentiation,	<i>J. Cell. Physiology</i>	227	2622-2631	2012
Tsutsumi K, Fujikawa H, Kajikawa T, Takedachi M, Yamamoto T, Murakami S:	Effects of L-ascorbic acid 2-phosphate magnesium salt on properties of human gingival fibroblasts	<i>J Periodont Res</i>	47	263-271	2012
Fujita T, Yumoto H, Shiba H, Ouhara K, Miyanaga T, Nagahara T, Matsuda S, Kawaguchi S, Matsuo T, Murakami S, Kurihara H	Irsogladine maleate regulates epithelial barrier function in tumor necrosis factor-alpha-stimulated human gingival epithelial cells	<i>J Periodont Res</i>	47	55-61	2012
北村正博ら	歯周炎罹患歯に対するFGF-2投与の長期的効果および安全性の検討	日歯周誌	54(1)	38-45	2012
山羽聡子、北村正博ら	歯の保存に対するSupportive Periodontal Therapyの長期的効果	保存学会誌	56(1)	40-47	2013

Morisaki H, Yamanaka I, Iwai N, Miyamoto Y, Kokubo Y, Okamura T, Okayama A, and Morisaki T	CDH13 gene coding T-cadherin influences variations in plasma adiponectin levels in the Japanese population	Hum Mutat.	33(2)	402-410	2012
Kawazu Y, Inamura N, Kayatani F, Okamoto N, and Morisaki H	Prenatal complex congenital heart disease with Loeys-Dietz syndrome.	Cardiol Young	22(1)	116-119	2012
Iba Y, Minatoya K, Matsuda H, Sasaki H, Tanaka H, Morisaki H, Morisaki T, Kobayashi J, and Ogino H	Surgical experience with aggressive aortic pathologic process in Loeys-Dietz syndrome	Ann Thorac Surg.	94(5)	1413-1417	2012
森崎裕子、吉田晶子、森崎隆幸	稀少遺伝性循環器疾患に対する包括的医療体制 -「結合織病外来」・臨床遺伝専門医および認定遺伝カウンセラーの役割	日本遺伝カウンセリング学会誌	33(1)	77-81	2012
森崎裕子、平田恭信、森崎隆幸	第4回遺伝カウンセリングアドバンスセミナー マルファン症候群	日本遺伝カウンセリング学会誌	33(4)	209-212	2012
森崎裕子	エーラス・ダンロス症候群	臨床雑誌内科	109(6)	1049-1051	2012
Takahashi Y, Fujii K, Yoshida A, Morisaki H, Kohno Y, and Morisaki T,	Artery tortuosity syndrome exhibiting early-onset emphysema with novel compound heterozygous SLC2A10 mutations	Am J Med Genet A	12(10)	35776	2013
JCS Joint Working Group	Guidelines for Diagnosis and Treatment of Aortic Aneurysm and Aortic Dissection (JCS 2011)	Circ J	77(3)	789-828	2013
Katsuragi S, Neki N, Yoshimatsu J, Ikeda T, Morisaki H, Morisaki T	Acute aortic dissection (Stanford type B) during pregnancy	J Perinatol	in press		2013

Miyazawa H et al.	Increased serum PCSK9 concentrations are associated with periodontal infection but do not correlate with LDL cholesterol concentration	Clinica Chimica Acta	413	154-159	2012
Miyauchi S et al.	Oral infection with <i>Porphyromonas gingivalis</i> and systemic cytokine profile in C57BL/6.KOR-ApoE ^{shl} mice.	Journal of Periodontal Research	47(3)	402-408	2012
Miyazawa H et al.	Effect of <i>Porphyromonas gingivalis</i> infection on post-transcriptional regulation of the low-density lipoprotein receptor in mice.	Lipids in Health and Disease	11	121	2012
M. Arakaki et al	Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation.	J Biol Chem	287(13)	10590-10601	2012
Hayano, S et al	Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis.	J Biol Chem	287(15):	12217-12229	2012
Kanamura, N et al	Dental Regenerative Therapy using Oral Tissues.	Anti-Aging Medicine	9 (1)	14-23	2012

[IV] 研究成果の刊行物・別刷り

口腔内の生体防御機構と バイオフィーム

歯周病とバイオフィームの関係

歯周病の原因がデンタルプラーク（細菌性バイオフィーム）であることは、直接的あるいは間接的な証拠により示されている。すなわち、

①歯周病の罹患状況が口腔衛生状態に相関して増悪すること、②口腔清掃の停止によって実験的歯肉炎が誘発され、清掃の再開によって回復すること、③動物を用いた実験において抗生物質や消毒剤の使用によって歯肉炎が抑制されること、④歯肉縁下に装置を付けて多量のプラークを蓄積させると、歯周組織に炎症が惹起されて組織破壊が進行すること、などが根拠として示されている。

一方、バイオフィームから歯周組織を守るために、宿

主・生体防御機構が重要な役割を担っていることも事実である。これは、Chédiak-Higashi 症候群や Leukocyte adhesion deficiency (LAD) 症候群などの先天性免疫不全症患者、あるいは後天的免疫不全症 (AIDS) 患者、糖尿病などの易感染性患者において、重篤な歯周病が見られることから明らかである。現代の歯周病因論は、歯周組織の免疫応答がバイオフィームに対抗し、歯周組織の恒常性維持と歯周病の発症抑制を担っていることを明確に示している。それゆえ、歯周病を知るためには生体防御機構の理解が欠かせない。

口腔の生体防御基盤とは

歯根は生体内に位置しセメント質と歯根膜を介して歯槽骨と結合しているが、一方、歯冠は口腔という生体外に露出した状態で機能している。すなわち歯は、上皮性ならびに結合織性の付着を介して歯周組織と接合しながら粘膜を貫通するという、他の組織には見られない解剖学的特徴を有している。このように生体の内外の境界にあつて硬組織と軟組織の接合を形成している歯と歯周組織の境界部は、全身の中でも特に細菌の侵襲を受けやすい部位の一つと考えられる。

口腔は細菌からの侵襲に対する生体防御基盤として、さまざまな防御機構を備えている。口腔粘膜を覆う唾液は、リゾチームやラクトフェリン、ペルオキシダーゼなどの抗菌性タンパクや分泌型 IgA を含んでおり、口腔細菌の定着を阻止することに役立っている。また唾液はその緩衝作用によって、細菌の生育に不利な中性の pH 環境の維持に努めている。さらに口腔粘膜の表層に位置する上皮は、最表層の上皮細胞が生理的に剝離・脱落を繰り返すことで粘膜表層への細菌の定着を物理的に阻止し

ているのみならず、 β -defensin などの抗菌性ペプチドを恒常的に産生することで、口腔細菌に抵抗している。

一方、歯の表面にはこのような防御機構が機能しないため、粘膜面に比べて細菌の定着が生じやすい。歯面に定着した細菌は増殖してバイオフィームを形成し、菌体外多糖に包まれ保護される。前項で述べたように、バイオフィームはその粘着性によって他の口腔内細菌の定着をさらに容易にするのみならず、定着した複数の細菌種が互いに代謝系を共有する生態学的共同体を形成するうえで好都合な微小環境を提供するため、水素イオン濃度 (pH) や酸素分圧、栄養要求性が異なる多様な細菌の生息を可能にする。そのため、細菌定着の初期の段階ではグラム陽性好気性球菌が細菌叢の主体をなしているが、細菌叢の成熟とともにグラム陽性桿菌が主体となって、歯頸部に沿って帯状に厚い層状のバイオフィームを形成するようになり、近接した部位の歯肉を非特異的に刺激して、歯肉組織の炎症性変化を引き起こすことになる。

バイオフィルムと 歯周組織における免疫応答

歯周病進行と免疫応答の変遷

歯肉に近接する歯面にバイオフィルムが形成されると、この中に細菌の菌体構成成分、細胞壁ムコペプチド、脂肪酸および有機酸、硫化水素、アンモニア、インドール、アミン類、ロイコトキシン（☞用語解説）、さらには細菌が放出する酵素類などの、生体に対して潜在的な病原性（ビルレンス）を有する物質が蓄積し、歯周病原性を発揮するようになる。この細菌由来物質による刺激によって歯周組織の炎症性変化が始まり、宿主の生体応答が惹起される。

歯周組織の炎症性変化の進行にともなってバイオフィルムの病原性も高まっていく（第1章4項参照）。歯周組織の炎症性変化の進行過程を、PageとSchröderは主として動物実験によって得られた病理組織学的所見の特徴に基づいて①開始期、②早期、③確立期、④進行期の4期に分類している。ここではこの分類に基づいて、それぞれの病期において生じている病理組織学的所見と免疫応答を解説し、歯周病が進行する様子を述べる（図1）。

①開始期病変 (図 1a)

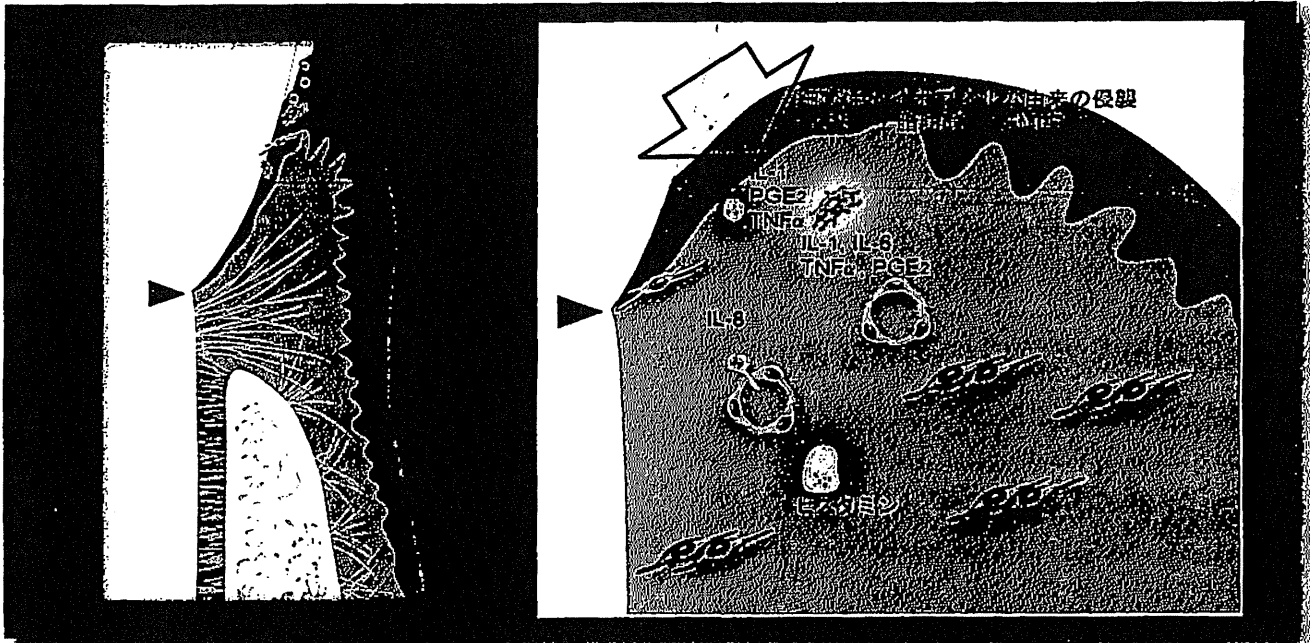


図 1a 歯周病における炎症の進行と免疫応答の変遷。

臨床的に正常と診断される歯肉でも、病理組織学的には炎症性変化が生じていることが多い。歯周組織が細菌性刺激を受けると、組織常在性白血球の活性化によりヒスタミンなどの放出が起こり、炎症反応が開始される。歯肉溝上皮直下には細菌の FMLP や、上皮細胞・ランゲルハンス細胞などが産生するケモカインに導かれた好中球の遊走がみられる。

臨床的に正常と診断される歯肉でも、その内部では病理組織学的な炎症性変化が生じており、いわゆる開始期病変に相当する場合が多いとされる。

バイオフィルムに直接的に対峙する接合上皮は、非角化上皮で細胞層が薄い。また細胞間の結合機構であるデスマゾームの数が他の口腔粘膜上皮と比較して 1/4 と少ないために細胞間隙が広く、バイオフィルムに由来するビルレンス因子や抗原の侵入をゆるしやすい。しかし、この組織学的特徴は、食細胞機能によって細胞性免疫を担う好中球が、歯肉溝滲出液の流れに乗って歯肉溝内に遊走するためには都合が良い構造であるともいえる。

肉眼的には異常を認めない炎症発生のごく初期においても、歯肉上皮直下には少数の好中球が観察される。バイオフィルムからの細菌性刺激がさらに継続すると、細菌由来の走化性因子である FMLP (☞用語解説) や、上皮細胞・線維芽細胞が産生するインターロイキン (IL) -8 などのケモカイン (☞用語解説)、好中球が産生するロイコトリエン B4、さらには補体 C5a などの走化性因子 (☞用語解説) に導かれて、多数の好中球が歯肉上皮直下に遊走・集積し、貪食による生体防御を行う。また好中球に少し遅れて単球・マクロファージも、血管内皮細胞や線維芽細胞が産生するケモカインである MCP-1 (☞用語解説) に導かれて遊走し、上皮直下に観察されるようになる。すなわち、この時期における生体防御の主体は自然免疫である。

組織内に侵入したバイオフィルム由来の有害な物質を認識し、自然免疫系を活性化する機構においては、微生物の菌体成分に由来する脂質や核酸などを認識する受容体 (Toll 様受容体) が重要な役割を演じている。ヒトには 11 種の TLR があり、それぞれ認識する対象 (リガンド) が異なるが、リボ

蛋白やペプチドグリカン、*P.gingivalis* 線毛を認識する TLR 2 と、多くの細菌由来のリポ多糖 (LPS) を認識する TLR 4 が、歯周組織の免疫応答に深く関与すると考えられている。上皮直下に常在する樹状細胞 (☞用語解説) (ランゲルハンス細胞) や局所に遊走したマクロファージなどの免疫担当細胞のみならず、歯周組織を構成する歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞も、その細胞表面に TLR を発現している。

これらの細胞は TLR を介して細菌性刺激を検知すると、転写因子 NF- κ B (☞用語解説) の経路を通じて IL-8 や MCP-1 などのケモカインを産生し、好中球や単球/マクロファージを局所に呼び寄せて生体を防御するとともに、TNF- α や IL-1、IL-6、インターフェロン (IFN) などの炎症性サイトカイン産生を通じて、歯周組織における免疫応答を活性化する。

これらの細胞は TLR を介して細菌性刺激を検知すると、転写因子 NF- κ B (☞用語解説) の経路を通じて IL-8 や MCP-1 などのケモカインを産生し、好中球や単球/マクロファージを局所に呼び寄せて生体を防御するとともに、TNF- α や IL-1、IL-6、インターフェロン (IFN) などの炎症性サイトカイン産生を通じて、歯周組織における免疫応答を活性化する。

②早期病変 (図 1b)

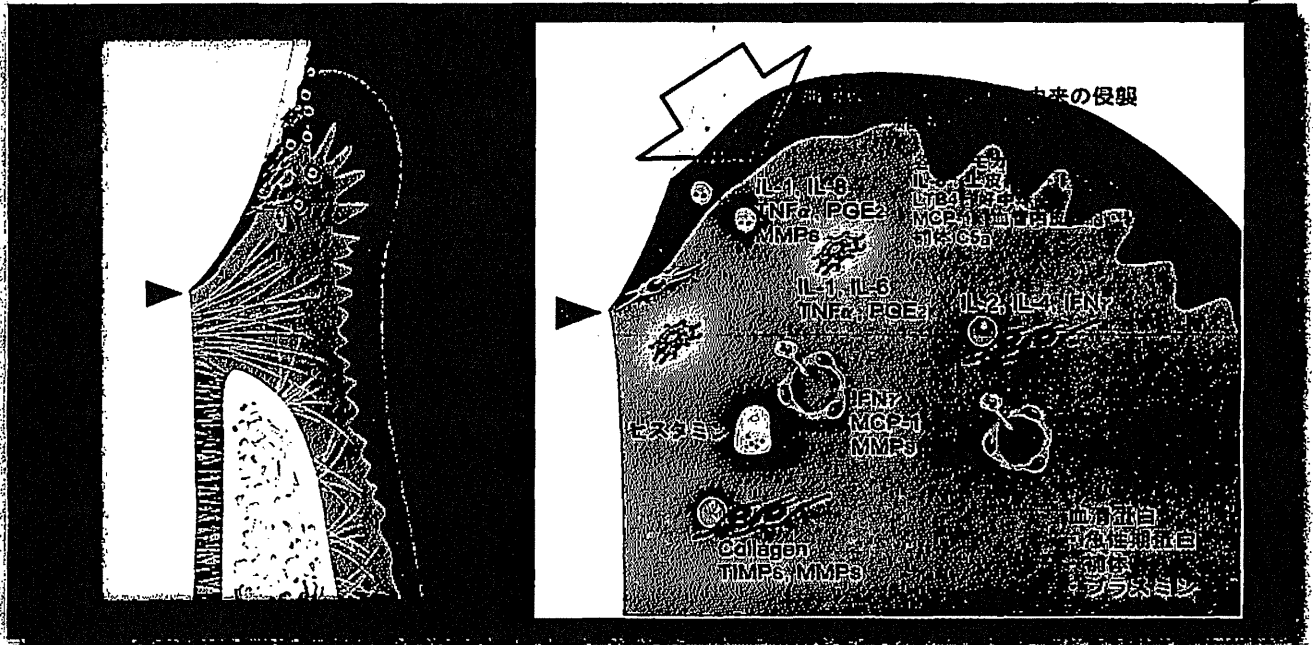


図 1b 歯周病における炎症の進行と免疫応答の変遷。

毛細血管の数の増加とさらなる血管透過性の亢進が生じ、滲出性炎症の所見が顕著になる。歯肉溝上皮直下の好中球・マクロファージの増加に加えて、Tリンパ球の浸潤が認められる。また好中球から放出された酵素による、結合織中の線維構造の破壊が観察されるようになる。

バイオフィームが歯肉縁下にも蓄積して歯周組織への細菌性刺激が増大すると、上皮直下に遊走した好中球やマクロファージが産生するIL-1やTNF- α などのサイトカインやプロスタグランジンE₂ (PGE₂)などの炎症性メディエーターの影響によって、毛細血管数の増加とさらなる血管透過性の亢進が生じ、滲出性炎症の所見が顕著になる。この段階が、臨床的には歯周病の発症時期であり、歯肉の発赤と浮腫性の腫脹や、歯肉溝滲出液量の増加が観察されるようになる。

早期病変では上皮直下の好中球やマクロファージの数の増加に加えて、Tリンパ球 (T細胞) の浸潤が認められるようになり (リンパ球の動員機構は、

2-3. 「歯周免疫応答の遷延化」の項 (次項) で詳述)、生体防御の主体はしだいに自然免疫から獲得免疫へと移行していく。

ランゲルハンス細胞やマクロファージからの抗原提示を受けて局所に動員されるT細胞は、これらの細胞が産生するIL-1やIFN- γ などのサイトカイン刺激によって活性化し、IL-2、IFN- γ などの炎症性サイトカインを盛んに産生する。そして、そのサイトカインによって自らが活性化する (オートクライン) とともに、近傍のマクロファージや血管内皮細胞、歯肉線維芽細胞なども活性化する (パラクライン) ことになる。

好中球は上皮直下や歯肉溝内に遊走

し、バイオフィーム由来のビルレンス因子を貪食するが、その結果として多くの好中球が死滅し、ライソゾーム酵素を周囲に放出する。そのため結合織を構築するコラーゲン線維の分解が生じ、組織内では線維構造の破壊が観察されるようになる。

一方、局所に動員されたリンパ球は、好中球のように歯肉溝に向けて遊走することはなく、細胞接着分子 (用語解説) を介して歯肉線維芽細胞やその細胞間に存在する細胞外基質と接着して炎症巣局所に定着し、歯周組織における免疫応答を慢性化・遷延化することになる。

③確立期病変 (図 1c)

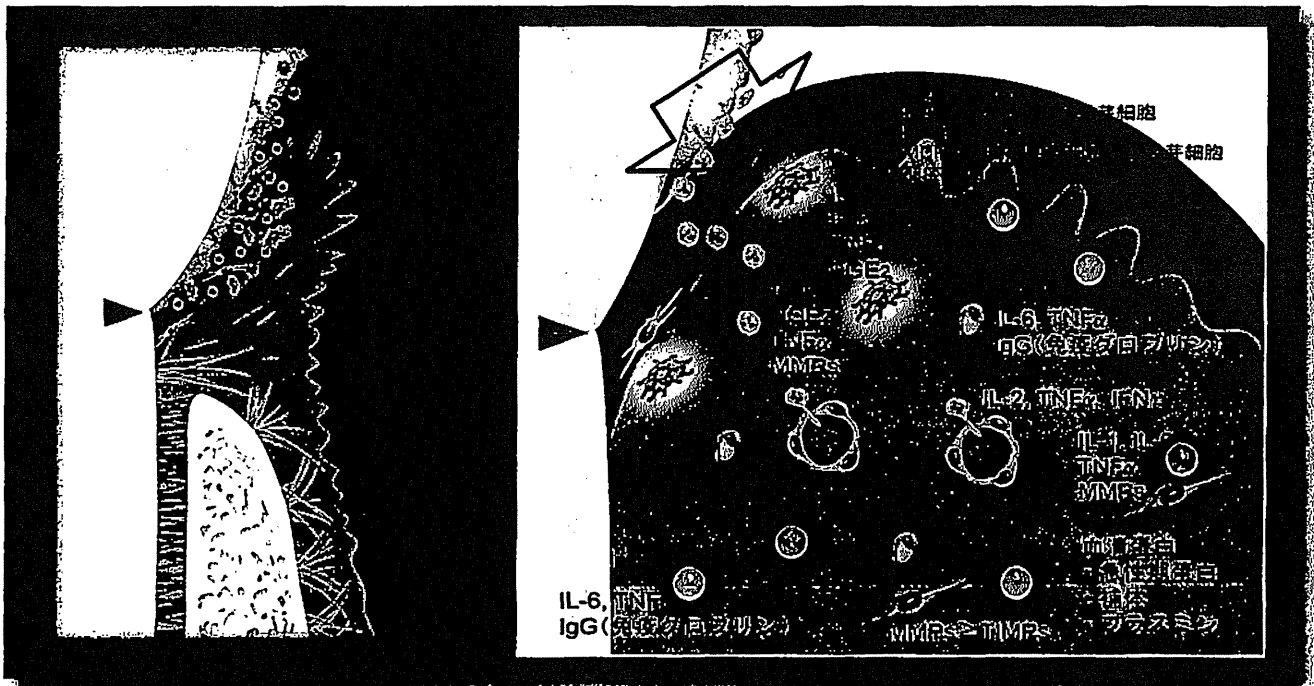


図 1c 歯周病における炎症の進行と免疫応答の変遷。

歯肉は腫脹し、臨床的に仮性ポケットの形成が認められるようになる。好中球の歯肉溝への遊出が著明に増加し、結合織内では線維構造の消失がみられる。接合上皮の根尖側方向への増殖が見られるが、まだ剥離・断裂はみられない。歯肉結合織内の炎症性細胞浸潤の範囲はさらに根尖側方向に拡大して、高度なリンパ球浸潤が認められる。

炎症の進行にともなって歯肉はさらに強く腫脹し、臨床的に仮性ポケットの形成が認められるようになる。このポケットの深化にともないバイオフィーム内の嫌気度が上昇し、細菌叢に占めるグラム陰性の運動性桿菌やスピロヘータなどの歯周病原性をもつ微生物群の比率が増加する。

組織学的には、滲出性炎症の進行にともなって好中球の歯肉溝への遊出が著明に増加し、結合織内ではコラーゲン線維のさらなる消失と線維芽細胞数の減少が観察される。また接合上皮の基底細胞層（上皮稜）には根尖側方向への著明な増殖が見られるようになるが、まだ接合上皮内の剥離・断裂はみられない。一方、歯肉結合織内の炎症性細胞浸潤の範囲はさらに根尖側方向に拡大して、高度なリンパ球浸潤が認められるようになる。

確立期においては、病変部に浸潤するリンパ球の主体が、T細胞から抗体産生を担うB細胞/形質細胞（抗体産生細胞）へと移行していく。これはB細胞が、LPS刺激により非特異的に活性化されるのみならず、バイオフィームに由来する抗原による特異的な活性化と、T細胞から産生されるIL-4やIL-6などのサイトカイン刺激を受けることによって増殖・分化し、浸潤細胞の多数を占めるようになるためである。その結果として組織像はいわゆるB細胞病変を示し、病変部では大量の抗体が産生されるようになる。

このB細胞によって産生される抗体（免疫グロブリン：Ig）のクラスは初期にはIgMであり、補体とともに働いて強い溶菌作用を示す。そしてB細胞が形質細胞に分化する過程で起こる遺伝子再構成（クラススイッチ）を

経て、バイオフィーム由来の抗原に特異的で親和性の高いIgGが大量に産生されるようになり、抗原の凝集やオプソニン化による好中球・マクロファージの貪食が効率的に行われるようにシフトしていく。このように歯周病原性細菌に特異的な抗体産生が誘導されることは、歯周病患者の血清中に高レベルの抗-*P. gingivalis*抗体が検出されることから明らかである。

確立期の病変においては、浸潤細胞のうち形質細胞が占める割合が10～30%であるが、進行期にはこの割合が増加する。このことから、確立期はバイオフィーム由来の非特異的な刺激に対する炎症反応から始まった生体応答が、歯周病原性細菌由来の特異抗原に対する体液性応答に変化していく過程に相当すると考えられている。

④進行期病変 (図 1d)

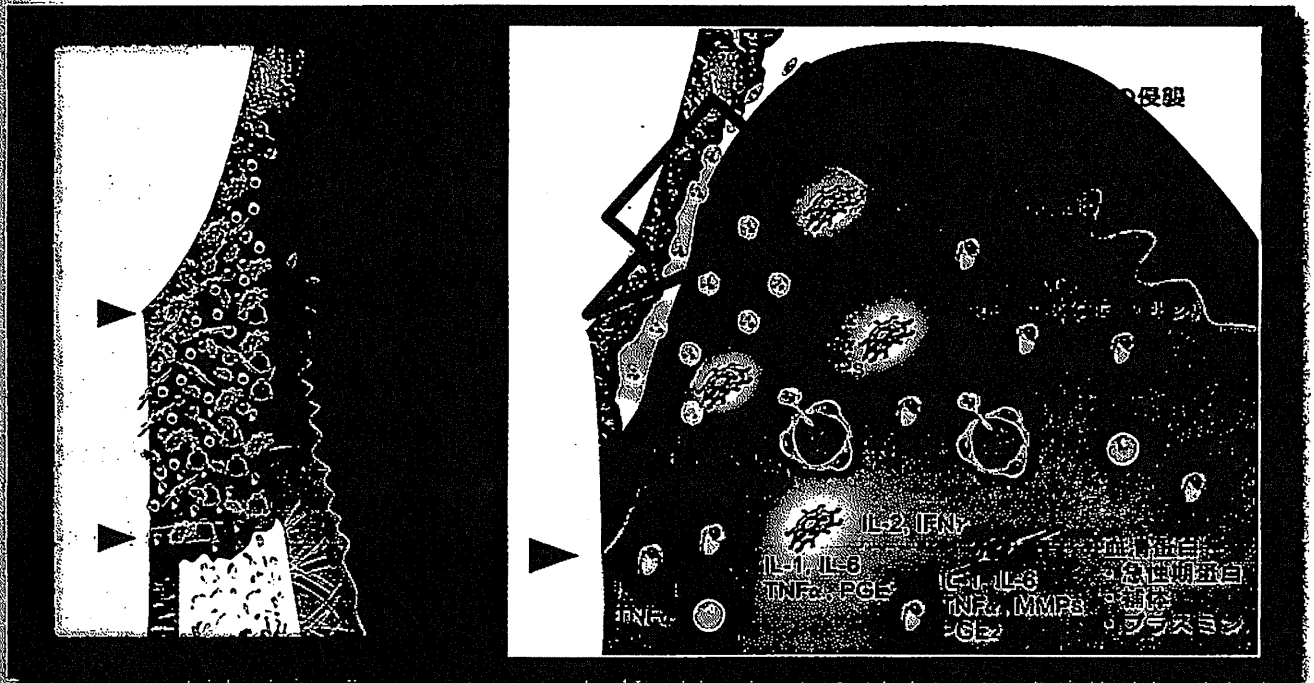


図 1d 歯周病における炎症の進行と免疫応答の変遷。

接合上皮の破壊と根尖方向への下方伸長が生じて真性ポケットが形成され、歯肉炎は歯周炎へと移行する。形質細胞を主体とした高度な炎症性細胞浸潤が根尖方向に波及することでポケットの深化が生じ、結合組織の破壊と歯槽骨吸収が進行する。

歯周病原細菌に対する特異的な抗体産生を行うことで、生体はより効果的な病因因子の排除を行おうと試みるが、病因の本体である細菌は生体外に位置しており、またバイオフィルムによって保護されていることから防御機構は十分に機能せず、結果として免疫応答はさらに遷延化して進行期へと至る。

進行期には、ついに接合上皮の破壊と根尖方向への下方伸長、すなわち真性ポケットの形成という、臨床的に重要な変化が生じる。上皮の下方伸長にともなって結合組織内の炎症性細胞浸潤はさらに根尖方向に波及し、広範なコラーゲン線維の損傷と歯槽骨吸収を

きたすこととなり、その結果としてポケット（真性ポケット）の深化が生じる。すなわち歯肉に限局していた病変が歯根膜、歯槽骨、セメント質からなる辺縁部歯周組織全体に及ぶこととなり、歯肉炎から歯周炎に移行するのである。通常われわれが歯周炎と診断する病変はこの段階である。

進行期の病変部には、広範な結合組織構造の消失と同部への高度な炎症性細胞浸潤・幼弱な新生血管の侵入所見、すなわち炎症性肉芽組織の形成が認められる。この炎症性肉芽組織で見られる浸潤細胞は確立期と同じく B 細胞優位であるが、形質細胞の割合は進行期よりも高い。

ポケットの深化にともなってバイオフィルムがエナメル-セメント境を越えて根尖側に伸長すると、バイオフィルム内の酸素分圧が低下して、より病原性の高い嫌気性細菌が優位に増殖する環境が形成される。その結果、生体に対する病的刺激がさらに強まると、生体には時として過剰な生体応答が惹起され、さらなる組織破壊をまねくこととなる。すなわち、長期間にわたり組織破壊が進行しない静止期と、破壊が急速に進行する活動期を繰り返しながら歯周病は進行し、最終的には歯の喪失をきたすのである。

歯周免疫応答の遷延化

歯周病における免疫応答の特殊性

一般に、感染症は病原性をもつ微生物が生体内に侵入・定着し、さらに増殖することによって発症する。生体はこの微生物の侵襲に対して、局所的・全身的な炎症反応と自然免疫・獲得免疫の活性化によって対抗し、病因因子を中和、もしくは排除して生体を防御する。また病因因子が排除された後には、炎症の進行の結果として破壊された組織を治癒機転によって修復し、生体恒常性を維持する。

歯周病における主たる病因は、歯肉溝に形成されたバイオフィームに生息する歯周病原性細菌である。これらの細菌が産生する病原性（ビルレンス）因子に対し、生体は通常の感染症と同様の炎症反応と免疫応答を惹起し

て、病因因子の排除を行おうとする。しかしながら一般の感染症の場合とは異なり、歯周病原性細菌が生体外に位置していること、バイオフィームが宿主の生体防御に対して抵抗性を示すことから、免疫系による病因因子の排除機構は十分に機能しえない状況にある。そのためバイオフィームによる歯周組織への刺激が継続することとなり、歯周組織の免疫応答は遷延化を余儀なくされ、慢性化した炎症反応が継続することとなる。すなわち、歯周病においては、宿主の生体防御機構が、単独ではバイオフィームに由来する病原性因子を完全に除去できないという特殊性が存在する。

歯周組織へのリンパ球の動員・集積による炎症の遷延化

前述のように、歯周病の早期病変ではT細胞を主体とした、また確立期以降の病変ではB細胞を主体とした炎症細胞浸潤（☞用語解説）が認められる。これらの免疫担当細胞の炎症局所への遊走・定着は、細胞間の直接的接觸を媒介する細胞接着分子（cell adhesion molecule）と呼ばれる分子群のはたらきによって制御されている。この細胞接着分子は、ある細胞と他の細胞の細胞間接着、もしくはある細胞と細胞外基質との接着を介在する機能をもった糖タンパク分子群で、種々の細胞の細胞表面上に発現して細胞間接着を行いやすくする機能をもつだけでなく、さらに接着した細胞間でシグナルを伝達し合う機能も備えている。

炎症巣の血管内皮細胞はIL-1やTNF- α などの炎症性サイトカイン刺激を受けて、血管内腔側に細胞接着分子を発現する。この細胞接着分子が白血球の表面に存在する細胞接着分子と結合することで、白血球は流速を落として血管内の移動を止める。その後、白血球は炎症巣で産生されているIL-8などの走化性因子に導かれて血管

内皮細胞間を通過し、能動的に血管外への遊出を果たす。

このようにして炎症歯周組織に動員されたリンパ球は局所に留まって集積することになるが、このリンパ球の集積にも細胞接着分子が関与している。リンパ球と歯肉線維芽細胞は少なくとも β 1インテグリン（☞用語解説）、CD44/ヒアルロン酸（☞用語解説）、LFA-1/ICAM-1（☞用語解説）の3経路の接着分子間の結合を介して細胞接着を行いうることが明らかになっている（図2）。すなわち、血管外へ遊走を果たしたリンパ球は、これらの接着分子を介して歯周組織構成細胞や細胞外マトリックスに繋留されることで、炎症歯周組織に永く定着・集積していると考えられる。

さらに、この歯肉線維芽細胞とリンパ球間の異種細胞間接着は、単なる集積機構として働くのみならず、両細胞を相互に活性化する機構としても機能している。それゆえ歯周病をはじめとした結合組織における慢性炎症の成立機序において、このような異種細胞間接着がきわめて重要な役割を演じていると考えられている。

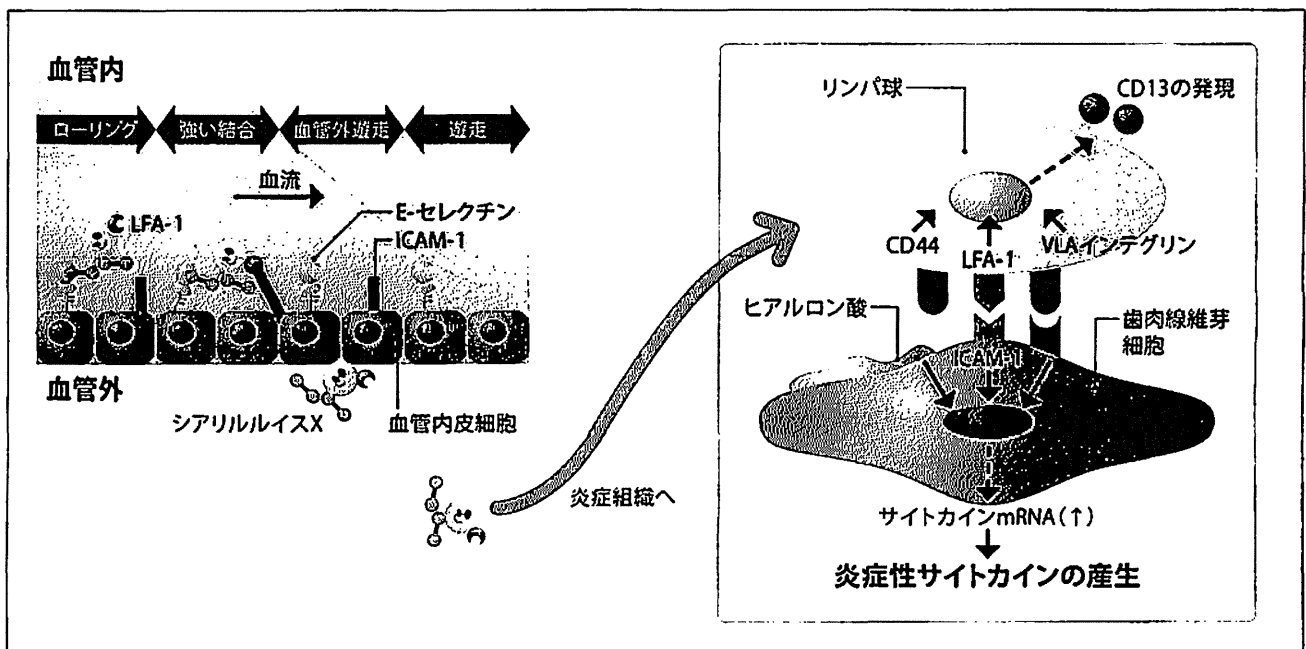


図2 歯周組織へのリンパ球の動員・集積と細胞接着分子。

血液循環に乗って炎症部位へと移動したリンパ球は、毛細血管内腔側に発現している細胞接着分子の一つであるセレクチンとゆるやかに結合し、流速を落とす。さらにICAM-1 (CD54) と、白血球上のLFA-1 (CD11a) の強い結合によって移動を止める。その後、リンパ球は走化性因子に導かれて血管内皮細胞間を通過し、炎症局所に動員される。

また、歯肉線維芽細胞とリンパ球間の異種細胞間接着は、単なる炎症局所への集積機構として働くのみならず、両細胞を相互に活性化する機構としても機能しており、歯肉線維芽細胞ではIL-1やIL-6などの炎症性サイトカインの産生が誘導される一方、Tリンパ球も活性化される。さらに、線維芽細胞によるIFN- β などのサイトカイン産生によってリンパ球が延命を果たすことが、炎症反応の遷延化に寄与しているとのモデルも提唱されている。

歯周ポケット形成と歯槽骨吸収

歯肉炎といわれる状態は長期間続くことがあり、場合によっては数年以上にわたることがある。この歯肉炎の状態から歯周炎への移行が、どのような時に、何をきっかけとして生じるのかは、まだ十分には明らかになっていない。しかしながら歯周炎への移行によって、それまで歯肉組織に限局していた組織破壊はさらに根尖側へと進行し、歯根膜、歯槽骨とセメント質からなる歯の支持機構（線維性付着）にも破壊が及ぶようになる。

この歯周組織破壊は必ずしも一定の速度で進行するわけではなく、組織破壊が短期間のうちに急速に進行する活動期と、長期間にわたり破壊がほとんど生じない静止期を繰り返しながら進行することや、その活動期の生じ

る頻度が各個人によって、また一個人の中でも各歯・各歯面によってさまざまであること（ランダムパーセントオリー）が知られている（図3）。このような歯周組織破壊の進行速度の多様性には、細菌の種や組成の違いによる病原性の差異、細菌に対する宿主の反応性の差異を規定する全体的要因（遺伝的要因を含む）、プラーク停滞因子や咬合といった局所的要因、さらには喫煙などの環境要因が、相互に関与していると考えられている。

このように、原因であるバイオフィルムだけではなく、多種多様な因子が歯周病の病態に関与しているということが、病気への理解や対処を困難なものにしている。

結合組織の破壊

歯周組織は硬組織と軟組織から成るが、そのうち軟組織は上皮細胞、線維芽細胞を主とした細胞成分に加え、線維芽細胞が産生するコラーゲン、エラスチンなどの線維構造と、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ヒアルロン酸やラミニンなどの細胞外基質によって構築される。歯周病原性細菌の中には、この線維構造や細胞外基質を分解する酵素を産生することで、宿主の組織破壊に直接的に関与するものがある。たとえば *P.gingivalis* が産生するプロテアーゼの一種（ジンジパイン）は、広範な生体タンパク質を分解・不活性化する酵素活性をもつのみならず、宿主防御機能からの回避や体液性免疫応答の誘導にも関与していることが知られている。また他の多くの歯周病原性細菌も、コラゲナーゼやトリプシン様酵素、ケラチナーゼなどの多様な酵素を産生し、歯周組織の破壊に直接的に関与していると考えられている。

一方で、バイオフィルムからのさまざまな刺激を受けることにより、歯周組織には炎症反応と免疫応答が引き起こされる。その結果として産生される宿主由来の生理活性物質は、細菌由来の酵素よりもさらに大きく歯周組

織破壊に関与していると考えられる。炎症局所にみられる多数の炎症性浸潤細胞のうち、好中球は炎症反応の初期から局所に集積して異物排除にはたらいっており、外来性の異物を貪食して細胞内に取り込み、活性酸素や次亜塩素酸のはたらきによって酸素依存的に、またリゾチームやカテプシン G、ティフェンシンなどはたらきによって酸素非依存的に、取り込んだ異物を殺菌・無毒化する。そして貪食を終えると死滅し、マクロファージにより処理されるか「膿」として排出されるが、その際にカテプシン G などのセリンプロテアーゼやエラスターゼなどの酵素が不活化されることなく生体内に放出されると、生体自身の構成成分もこれらの酵素により分解されてしまうため、歯周組織の破壊を引き起こす（図4）。宿主免疫がもろ刃の剣といわれるゆえんである。また好中球やマクロファージなどの炎症性細胞のみならず、歯肉線維芽細胞や上皮細胞などの宿主細胞が産生するマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）も、歯周組織破壊に深く関与している。MMPs は細胞外基質の構成成分であるコラーゲンやプロテオグリカンの分解、生理活

性ペプチドの活性化に際して機能する金属イオン要求性のタンパク分解酵素で、酵素前駆体として産生された後、アミノ基側の一部が酵素によって除去されることで活性化され、酵素活性を示すようになる。これまでに、炎症組織において産生されるTNF- α やIL-1、IL-6などの炎症性サイトカインがMMPsの産生を転写レベルで増強すること、また炎症組織に存在するプラスミンや生体由来・細菌由来のセリンプロテアーゼ、活性型MMPs、活性酸素などが、産生されたMMPs前駆体を

活性化することが知られている(図4)。また、MMPsの酵素活性は、4種の内因性阻害因子(tissue inhibitor of metalloproteinases : TIMPs)によっても調節されている。正常な細胞外基質代謝が営まれている組織においては、骨芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞などが産生する特異的なTIMPsが、MMPsと1 : 1の比率で結合している。しかしながら炎症歯周組織においては両者の比率に変化が生じることから、軟組織に破壊や線維化が生じると考えられている。

歯槽骨の破壊

歯周病の病変部に動員された免疫担当細胞や歯肉線維芽細胞などの歯周組織構成細胞は、歯周病菌由来の刺激を受けて、また自らや周囲の細胞が産生する生理活性物質の刺激を受けて、炎症性メディエーターやサイトカインを盛んに産生する。これらの生理活性物質は宿主細胞間の相互連携を担っており、各細胞が互いに炎症反応や免疫応答を調節して、ヒルレンス因子の効率的な排除と生体の恒常性維持を行ううえで有用にはたらく。しかしながら、その産生が慢性化した場合には、歯周組織破壊の進行に深く関与することとなる。つまり歯槽骨破壊においても、宿主免疫はもろ刃の剣としてはたらいているのである。

骨は生きた組織であり、生理的な状態では破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による添加がバランスよく行われることで、つねに一定の骨量・形態が保たれている。しかしながら、歯周組織に炎症が生じて炎症性メディエーターやサイトカインが過剰に産生されると、そのバランスが崩れ、歯槽骨破壊が進行すると考えられている。たとえば、活性化されたマクロファージやリンパ球はTNF- α やIL-1などの炎症性サイトカインを産生するが、これらのサイトカインは破骨細胞分化因子(RANKL : receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)の発現促進を通じて、破骨細胞分化を促進する。また、プロスタグランジン(PG)合成酵素の1つであるシクロオキシゲナーゼ(COX)-2の発現を誘導するため、

強い骨吸収作用をもつPGE₂の産生が上昇することとなり、骨破壊を促進する。一方、単球/マクロファージやリンパ球、線維芽細胞から産生されるIL-6は多様な生理活性を示すサイトカインであるが、間葉系細胞のRANKL発現誘導を介して破骨細胞の分化を促進することや、骨芽細胞による骨形成を抑制すること、またRANKLの誘導作用を有するL-17を産生するT細胞の分化を誘導することで、骨破壊を促進する可能性が示されている(図4)。

前述のように、歯周組織破壊の活動性は個人間、また各歯・部位間でも多様であり、また時々刻々と変化する。現在の歯周病の臨床診断においては、ポケット深さや歯槽骨吸収量、肉眼的炎症所見などを臨床的指標として用いているが、いずれの指標も過去に生じた歯周組織破壊の履歴を表すものではあるが、今後生じるであろう歯周病の疾病活動性の変化を予見させるものではない。

一方で、これまでに述べた各種生理活性物質(炎症性メディエーターやサイトカイン)の発現量、酵素活性などは、その時々組織の状態を反映して変化し、その発現プロファイルを変動させるものと想定される。将来的に病態の違いを診断したり、近未来に起こるであろう歯周組織の破壊、歯周治療に対する反応性の高低を予測診断するためには、このような生体由来分子の発現プロファイルのモニタリングが有用であろうと考えられる。

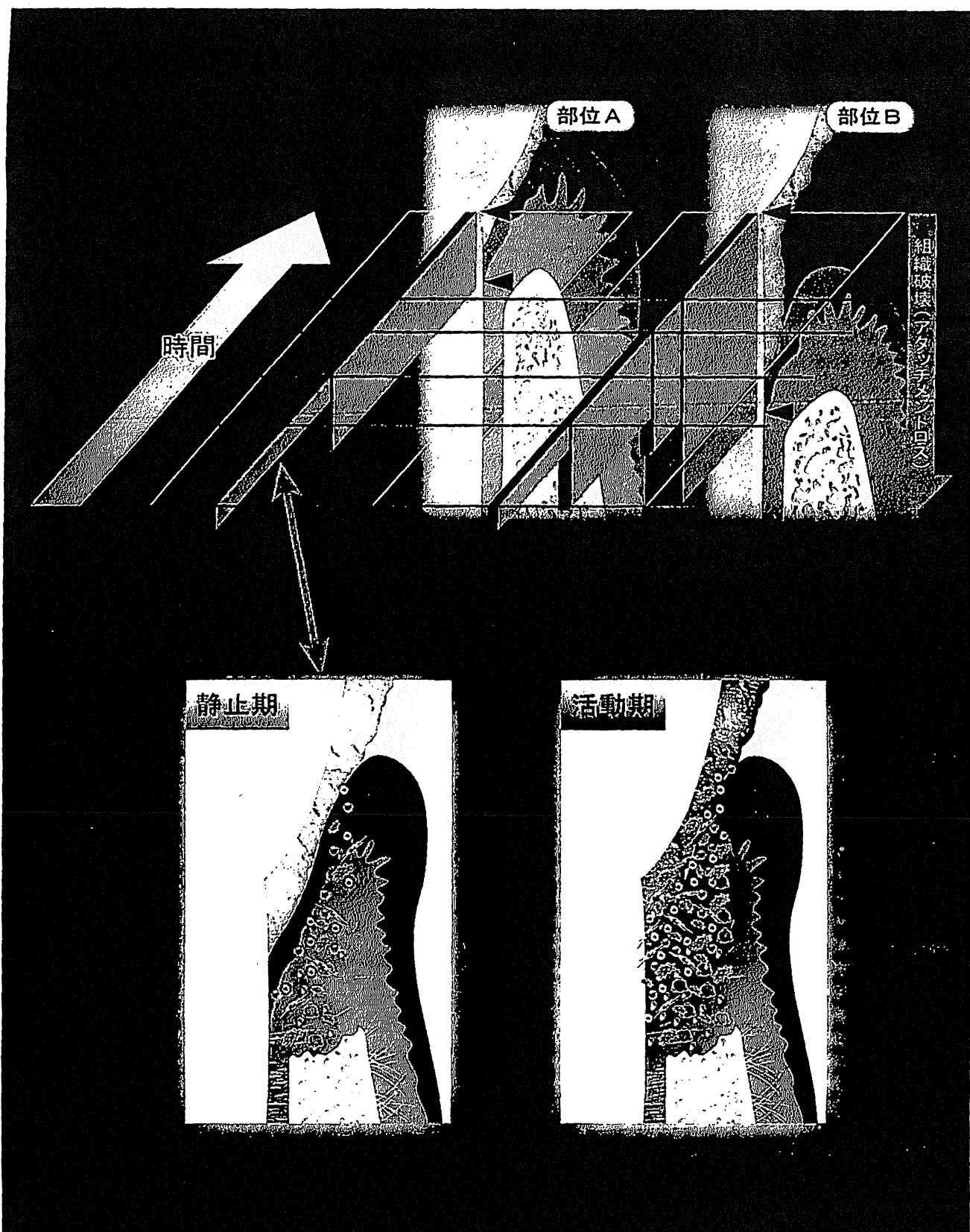


図3 歯周病の疾病活動性と歯周組織破壊の進行速度。

歯周病による組織破壊が時速的に進行することはほとんどなく、組織破壊が急速に進行する活動期と、破壊がほとんど生じない静止期を繰り返しながら進行することが知られている。この活動期が生じる頻度は、バイオフィルムの病原性や宿主の全身的要因をはじめとした多因子の影響を受けるため、各個人・各歯・各歯面によってさまざま、この頻度が歯周組織破壊の進行速度を左右すると考えられている。