

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 山下万美子(神奈川県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第512号
学位授与年月日 令和3年3月14日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 Oxidized Low-Density Lipoprotein Promotes *In Vitro* Calcification
(*In vitro*での酸化LDLによる石灰化の促進)
Materials 2020, 第13巻, 第22号, 5120 令和2年11月13日発行
論文審査委員 主査 教授 五味 一博
副査 教授 山越 康雄 副査 教授 花田 信弘

内容の要旨

【緒言】

生体の骨や歯は、有機基質、リン酸カルシウム、および生理活性物質の関与で構成されている。一方、異所性の石灰化病変は、腎臓、動脈、口腔、関節をはじめ、さまざまな部位で生じる。Kumonらは腎臓結石からNLP(nanobacteria-like particles, NLP)を分離抽出し、その成分として酸化脂質を報告している(International Journal of Urology, 2011)。動脈硬化では、血清中のLDLコレステロール(low-density lipoprotein cholesterol)が酸化し酸化LDL(oxidized low-density lipoprotein)となってマクロファージにより貪食され蓄積して、動脈硬化が発症することが知られている。また、歯周疾患罹患者の歯肉溝滲出液(gingival crevicular fluid, GCF)の酸化LDL/LDL比は、血漿のそれより17倍高い酸化LDLが含まれているという報告もされている(Sakiyama Y et al., Journal of Periodontal Research, 2010)。

これまでの異所性石灰化病変に関する報告では、酸化LDLが異所性の石灰化に関与する可能性があることが示唆されているが、骨や歯などの生体の石灰化部位においては、LDLやHDL(high-density lipoprotein, HDL)、アルブミン、糖質なども有機質として同時に存在しており、酸化LDLとこれらの有機質が石灰化物の析出にどのように関与するのかについては不明である。

本研究は、ウシの歯の石灰化現象に対する酸化LDLの関与について、*in vitro*および*in situ*の系で確認することを目的とした。

【材料および方法】

酸化LDLとCaおよびPイオンによるリン酸カルシウム析出物の関係について*in vitro*で明らかにする目的で、10種類の有機質を比較対象として用い、析出する濁度を分光光度計(UV-1200, SHIMADZU, Kyoto)により波長650nmで定量した。

滴下するカルシウムイオン溶液は732.6mMのCa(NO₃)₂·4H₂O、リン酸イオン溶液は408.2mMの(NH₄)₂HPO₄を用いた。0.025%有機質を含む各溶液800μlに、1回の滴下につき2.67μlずつのCa(NO₃)₂·4H₂O溶液と(NH₄)₂HPO₄溶液同量を滴下し、直ちに攪拌した後、波長650nmで吸光度を測定した。統計分析は、生体材料の効果と吸光度の時間に二元配置分散分析を適用し、SPSSを用いておこなった。

脱灰ウシ象牙質を用い、コントロール溶液(D.W.)800μl、および0.025%酸化LDL溶液800μlに歯片を浸漬したのち、Ca=32.7mMおよびP=18.22mMを加えた溶液で37°C、24時間インキュベーションを行った。析出物は、透過型電子顕微鏡(TEM)、走査型電子顕微鏡(SEM)により形態分析、および電子線マイクロアナライザー(EPMA)により元素分析をおこなった。

【結 果】

0.025% 酸化 LDL 溶液, コントロール溶液およびデキストラン硫酸溶液に浸漬した脱灰ウシ象牙質表面に析出する石灰化物について, 低濃度溶液 (Ca=4.86 mM, P=2.71 mM) および高濃度溶液 (Ca=23.66 mM, P=13.18 mM) からの析出物を SEM 画像で比較したところ, 酸化 LDL 溶液に浸漬した象牙質では, 他と比較して大きさ直径約 50 ~ 150 nm の多量の球形顆粒状析出物が認められた. この析出物の析出量は濃度依存的であり, また, EPMA による元素分析から求めた析出物の Ca/P 比は 1.28 であった.

酸化 LDL をはじめとする各種有機質存在下で, Ca および P イオンの濃度を变化させた場合の吸光度曲線は, 酸化 LDL, LDL, HDL 溶液では低濃度 (Ca=4.86 mM, P=2.71 mM) からシグモイド曲線を描いて急激な吸光度の増加が観察された. 次いでアルブミン, EPA, DHA 溶液の吸光度は酸化 LDL に比べてやや低く, さらに, *E. coli* および *P. gingivalis* 由来の LPS とデキストラン硫酸溶液はコントロール溶液と類似した吸光度曲線を描いた. 吸光度曲線の増加が最も小さかったのは, ポリエチレンイミン溶液であった.

酸化 LDL 溶液を用いた実験で示された吸光度は, コントロール溶液の 4.2 倍を示した.

有機質の濃度を 0.025% から 0.1% へ濃度を上げると, 酸化 LDL の吸光度は上方にシフトしたが, アルブミン溶液とデキストラン硫酸溶液については, 逆にシグモイド曲線は下方にシフトした.

TEM による析出物の所見では, いずれの有機質においてもその析出物は球形または卵円形を呈し, 電子線回折で非晶質に典型的なハローパターンを呈した. また, 析出物はイオン濃度依存的かつ経時的に, 初期の球形または卵円形から薄膜状または針状へと変化することが確認された.

【考 察】

In vitro および脱灰象牙質基質において, 酸化 LDL を含む溶液は石灰化を促進する効果のあることが確認された.

これまでの *in vitro* および生体中の初期石灰化に関する研究では, 非晶質リン酸カルシウム (amorphous calcium phosphate, ACP) は, すべてのリン酸カルシウム結晶の生成の起点となることが明らかにされており, 本実験溶液中から得られた析出物は, (1) SEM および TEM による観察で球形または卵円形を呈し, (2) 析出物の Ca/P 比は Ca/P=1.28 を示し, (3) 電子線回折では非晶質に典型的なハローパターンを示した. これらの所見は, 結晶質の特徴よりもむしろ ACP の特徴に一致していると考えられた.

析出物の球形または卵円形から薄膜状への形態変化は, リン酸カルシウムの濃度の上昇, または, 時間的経過によって生じた. 球形または卵円形から薄膜状の析出物への形態変化は, 原子の不規則な配列から規則的配列への変化を示すと考えられ, 言い換えると原子の長距離秩序の獲得による繰り返し配列を示すもので, 非晶質から結晶質への相転移が生じたことを示している. また, 本研究で用いた酸化 LDL 以外の有機質の所見は, 結晶質の出現に続く結晶成長に関する報告, すなわち, 生体内の多くの高分子有機質は石灰化阻害因子として機能し, やがて有機基質の低分子化とともに結晶成長が促される, という報告 (Fukae M, Enamel Formation-Biochemical Aspect-, Journal of Oral Biosciences, 2009) を裏付ける所見が *in vitro* で得られた.

生体内への影響において粥状動脈硬化の成立機序に関して, 生体内では局所の炎症によって LDL が酸化され, 酸化 LDL が生じ, 生じた酸化 LDL はマクロファージにより貪食されることにより細胞の泡沫化を生じ, その堆積物が粥状動脈硬化の原因となることが知られている. しかし, 本研究により細胞とは無関係に, 酸化 LDL が ACP の析出を促進することが明らかとなった. また, 歯周疾患罹患患者の歯肉溝滲出液には多量の酸化 LDL が含まれていることが知られており, 酸化 LDL が縁下歯石の形成に関連する可能性が示唆された.

【結 論】

酸化 LDL は, 他の有機質に比べて, 多量の ACP を析出する核となり得ることが示された. また, *in situ* の所見から, 歯肉溝滲出液, あるいは組織液中に多量の酸化 LDL が存在する場合には, 酸化 LDL が核となって ACP の析出を亢進させることが示された.

審査の結果の要旨

これまでの異所性石灰化病変に関する報告では, 酸化 LDL (oxidized low-density lipoprotein) が異所性の石灰化に関与する可能性があることが示唆されている. しかし, 酸化 LDL やその他の有機質が石灰化物の形成にどのように関与するのかについての研究は十分になされていない. そこで本研究では, 酸化 LDL および種々の有機質を用いて石灰化物の析出状

態と性状を評価することを目的とした。

酸化 LDL, LDL, HDL, アルブミン, EPA, DHA, *E. coli* 由来 LPS, *P. gingivalis* 由来 LPS, デキストラン硫酸溶液およびポリエチレンイミンの 10 種類の有機質を試料として用い, リン酸カルシウム析出量の違いを評価した。732.6 mM カルシウムイオン溶液と 408.2 mM リン酸イオン溶液を用い, 10 種類の 0.025% 有機質溶液 800 μ l に, 1 回の滴下につき 2.67 μ l ずつカルシウムイオン溶液とリン酸イオン溶液を滴下し, 直ちに攪拌した後, 波長 650 nm で吸光度を測定した。その結果, 酸化 LDL で最も吸光度が高く析出物が多く認められ, コントロール溶液 (D.W.) の 4.2 倍を示した。次いで, コントロール溶液および 0.025% の各有機質溶液 800 μ l に脱灰ウシ象牙質片を浸漬したのち, 低濃度溶液 (Ca=4.86 mM, P=2.71 mM) および高濃度溶液 (Ca=23.66 mM, P=13.18 mM) 中で 37 $^{\circ}$ C, 24 時間インキュベーションを行った。象牙質片上に形成された析出物を, 走査型電子顕微鏡 (SEM), 透過型電子顕微鏡 (TEM) により形態分析, および電子線マイクロアナライザー (EPMA) により元素分析を行った。その結果, SEM 観察では, 酸化 LDL 溶液に浸漬した象牙質片において, 直径約 50 ~ 150 nm の多量の球形顆粒状析出物が認められた。この析出物の析出量はカルシウム濃度依存的であり, また, EPMA による元素分析から求めた Ca/P 比は 1.28 であった。TEM による析出物の所見においても析出物は球形または卵円形を呈していた。電子線回折では非晶質に典型的なハローパターンを呈した。本実験から得られた析出物は, ① SEM および TEM による観察で球形または卵円形を示したこと, ② 析出物の Ca/P 比が Ca/P=1.28 であること, ③ 電子線回折では非晶質に典型的なハローパターンを示したことから, 得られた析出物は非晶質リン酸カルシウム (amorphous calcium phosphate, ACP) であると考えられた。

以上より, 酸化 LDL は他の有機質に比べて ACP の生成を促進し石灰化の初期段階に関与することで石灰化を亢進させることが示された。よって, 本論文は博士 (歯学) の学位論文として十分な価値を有するものと判断した。