

学 位 論 文

歯周病は耐糖能異常非依存的に非アルコール性脂肪
肝疾患 (NAFLD) の増悪因子となりうる

田利 美沙子

広島大学大学院医歯薬保健学研究科
博士課程 医歯薬学専攻

修了年度 2020 年

主指導教員：河口 浩之 教授
(広島大学病院 歯科医学教育学)

謝辞

本研究につきまして、ご指導、ご高覧を賜りました広島大学病院歯科医学教育学
河口 浩之 教授に対し謹んで感謝の意を表します。また、研究の遂行ならびに本論
文作成においてご指導、ご鞭撻をいただきました本学大学院医系科学研究科歯随生物
学研究室 柴 秀樹教授、本学大学院医系科学研究科細菌学研究室 小松澤 均 教
授に深厚なる謝辞を表します。さらに、本研究の遂行、本論文の作成にあたり数多く
のご指導ならびにご高覧を賜りました本学大学院医系科学研究科歯周病態学研究室
加治屋 幹人 助教に深謝致します。加えて、数多くのご助言とご協力を頂きました
本学大学院医系科学研究科歯周病態学研究室の皆様にお礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与え常日頃より私の支えとなってくれた両親の晶、倫
子に対して心から感謝致します。

2021年1月

広島大学医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻

歯周病態学研究室

田利 美沙子

目次

第1章 緒論	5
第2章 肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルマウスの樹立	8
第1節 概要	8
第2節 材料と方法	8
第1項 実験動物	8
第2項 飼料	8
第3項 体重測定	9
第4項 経腹腔ブドウ糖負荷試験	9
第5項 経腹腔インスリン抵抗性試験	9
第6項 組織標本作成法	9
第7項 Hematoxylin-eosin(HE)染色法	10
第8項 統計解析	10
第3節 結果	10
第1項 高脂肪食、高炭水化物食摂取による体重の変化	10
第2項 高脂肪食、高炭水化物摂取による耐糖能、インスリン感受性の変化	10
第3項 高脂肪食、高炭水化物摂取による肝臓の肉眼的、組織学的変化	11
第4節 考察	11

第 3 章 高炭水化物摂取が肝臓の脂肪変性を惹起するポイントと歯周炎が高炭水化物	
摂取による肝臓の脂肪変性に及ぼす影響	14
第 1 節 概要.....	14
第 2 節 材料と方法.....	14
第 1 項 マウス歯周炎モデル.....	14
第 2 項 体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験.....	15
第 3 項 組織学的解析.....	15
第 4 項 遺伝子発現解析法.....	15
第 5 項 統計解析.....	16
第 3 節 結果.....	16
第 1 項 絹糸結紮による歯周炎が体重、耐糖能に与えた影響.....	16
第 2 項 肝臓の肉眼所見、組織学的所見.....	16
第 3 項 脂質合成酵素、TGFβ、炎症性サイトカインの発現	17
第 4 節 考察.....	17

第4章	歯周炎が高炭水化物摂取による肝臓の脂肪変性に及ぼす影響	18
第1節	概要	18
第2節	材料と方法	18
第1項	マウス歯周炎モデル	18
第2項	体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験、経腹腔インスリン抵抗性試験	18
第3項	組織学的解析	19
第4項	遺伝子発現解析法	19
第5項	マイクロCT解析法	19
第6項	統計解析	19
第3節	結果	19
第1項	絹糸結紮による歯周炎が体重、耐糖能に与えた影響	19
第2項	肝臓の肉眼所見、組織学的所見	20
第3項	脂質合成酵素、TGFβ、炎症性サイトカインの発現	21
第4項	歯槽骨吸収量	21
第4節	考察	21
第5章	総括	24
第6章	参考文献	26

第 1 章 緒論

歯周炎は、口腔内細菌感染の結果生じる炎症性組織破壊疾患である[1][2]。さらに、歯周炎は口腔局所に限らず、全身に対する細菌あるいは炎症性サイトカインの供給源となり、遠隔臓器に影響を及ぼすことが報告されており、心血管疾患、2型糖尿病、早産、リウマチなどの全身性疾患や健康に影響を及ぼすことが明らかになっている[3][4][5][6][7][8]。

その中でも 2012 年に歯周炎が非アルコール性脂肪肝疾患(NAFLD: non-alcoholic fatty liver disease)の増悪因子であることが報告されて以来、その分子メカニズムを明らかにするためのマウスを用いた研究が行われてきた[9]。NAFLD は常習的な飲酒歴とは無関係に肝臓に脂質の沈着をきたす疾患で、成人の約 30%と高い有病率を示し、その一部は肝硬変、肝癌まで進行して致死的な変化を引き起こす[10]。NAFLD は肥満、糖尿病など他のメタボリックシンドロームと相関関係にあることが報告されており[11][12]、NAFLD 患者の約 2 割が糖尿病、肥満を併発することが報告されている[13][14]。これまでの基礎研究では NAFLD の軽症段階である脂肪肝を発症させるために高脂肪食をマウスに与え、実験的歯周炎モデルを組み合わせることによって歯周炎の NAFLD に対する影響を調べてきた[9][15][16][17]。しかし、この高脂肪食は脂肪肝のみならず糖尿病や肥満を併発すること、さらに歯周炎は糖尿病の増悪因子であるため[18]、高脂肪食と歯周炎モデルの組み合わせから得られる NAFLD の重症化が、歯周炎が肝臓に直接影響を与えた結果であるか、あるいは歯周炎による糖尿病、肥満増悪の条件下でのみ起こりうるのかを判別することが困難だった。歯周炎による NAFLD 進展のメカニズムを明らかにすることは、NAFLD の予防、治療方法や予後を考える上で非常に重要であると考えられる。歯周炎が肥満、耐糖能異常を介さずに

NAFLD を進展させるか明らかにするには、肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルを樹立することが必要である。また、前述の通り NAFLD 患者のうち肥満、糖尿病を併発するものは約 2 割であることを踏まえても、肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルの樹立は、臨床に多く存在する NAFLD の予後に歯周炎がどの程度寄与するかを検討するうえで重要であると考えられる。高脂肪食は飽和脂肪酸などを大量に供給し、肝臓を含む様々な組織に有害な脂質蓄積を促すことで、脂肪肝や糖尿病を生じる。一方、食事から摂取された過剰な果糖やブドウ糖が肝臓に達すると、脂質合成経路を活性化し、脂肪肝を発症させることが知られているが[19]、カロリーは脂質と比較して約半分である。本研究では、マウスに高炭水化物食を与えることで、糖尿病、肥満を併発しない脂肪肝モデルマウスを樹立し、歯周炎が肥満、糖尿病を介さずに NAFLD に及ぼす影響を検証した。

これまで歯周炎が NAFLD に及ぼす影響を調べる歯周炎モデルとしては、*Porphyromonas gingivalis* (以下 *P.g.*) の歯性感染や静脈内投与、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (以下 *A.a.*) の口腔内塗布などの方法が用いられてきた[9][20][21]。*P.g.*は最も代表的な歯周病原細菌であり[22][23]、*A.a*は侵襲性歯周炎と関関係が高い細菌として知られているが[24]、SPF マウスの口腔内に *P.g.*を感染させると骨吸収をきたすものの無菌マウスに *P.g.*を感染させても骨吸収はみられないことから[25]、歯周炎の発症には口腔常在菌の共生バランスの破綻が大きく関与していることが指摘されている[26][27]。さらに、歯周病原細菌の口腔内への感染を用いた歯周炎モデルでは SPF 環境下においても骨吸収を生じるまで 2 か月以上かかり、骨吸収の程度も軽微であるという報告がある[28]。以上をふまえて、本研究では、より広い範囲の口腔内常在菌による歯周組織破壊の影響を調べるため、絹糸結紮による歯周炎モデ

ルを用いることとした。絹糸結紮による歯周炎モデルは、マウスの臼歯に絹糸を結紮することで1週間程度の短期間で顕著な歯槽骨吸収を生じる歯周炎モデルである[29]。また、抗菌薬の事前投与により骨吸収が抑制されることや、*A.a*と相同性が高い*N1060*が歯槽骨吸収の原因であることが報告されていることから、口腔内細菌依存的なモデルと考えられている[30][31]。

本研究では、高炭水化物食摂取による脂肪肝モデルを樹立し、絹糸結紮による歯周炎モデルを組み合わせることによって、口腔内細菌感染とそれによる歯周組織破壊が肥満、耐糖能異常非依存的にNAFLDの増悪における影響を検討した。

第2章 肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルマウスの樹立

第1節 概要

マウスに高脂肪食、高炭水化物食を6週間摂取させ、普通食群と比較して、肥満、耐糖能異常の発症、肝臓の脂肪変性の評価を行った。

第2節 材料と方法

第1項 実験動物

実験には、C57BL/6と比較して耐糖能異常をきたしにくいと報告されているBALB/cAJclマウス（雄、4-6週齢、日本クレア、東京）12匹を用いた[32]。マウスを無作為に3群に分け、それぞれ普通食、高脂肪食、高炭水化物食を自由摂取させた。実験動物は広島大学自然科学研究支援開発センター生命科学研究支援分野・ライフサイエンス教育研究支援部動物実験施設の実験指針に基づいて行った。マウスはSPF環境下で飼育した。

第2項 飼料

マウスに与える飼料は、普通食としてオリエンタル酵母工業のMF、高脂肪食として日本クレアのHigh Fat Diet32を用い、高炭水化物食はオリエンタル酵母に依頼して作成した。High Fat Diet32は507.6kcal/100gであり、飼料1kg中炭水化物を274.28g、脂質を358.8g含む。高炭水化物食は動脈硬化の研究などで用いられている飼料[33]を参考に、450kcal/100g、飼料1kg中炭水化物506.45g、脂質245gとなる

ように作成し、形状は普通食、高脂肪食と同様にペレット状とした。飼料の組成は表 1 に示す。

第 3 項 体重測定

1 週ごとにマウスの体重測定を行った。

第 4 項 経腹腔ブドウ糖負荷試験

マウスを 16 時間絶食後、10%グルコースを 2g/kg 体重の負荷量で腹腔内に投与した。非麻酔下で尾静脈より 0、15、30、60、90、120 分後に採血し血糖値を測定した。10%グルコースは D-グルコース 1mg あたり 10ml の生理食塩水に溶解して調整した。

第 5 項 経腹腔インスリン抵抗性試験

マウスを 6 時間絶食後、1 U/kg 体重の負荷量で速効型インスリン溶液を腹腔内に投与した。非麻酔下で尾静脈より 0、15、30、60、90 分、120 分後に採血し血糖値を測定した。インスリン溶液はヒューマリン R（日本イーライリリー株式会社）を生理食塩水に溶解して調整した。

第 6 項 組織学的解析

マウスを頸椎脱臼法により屠殺後、肝臓を摘出し、外側左葉を回収後に 4%パラホルムアルデヒドで浸漬固定した。固定した組織を 75%エタノール（和光）、100%エタノール（和光）の順で脱水し、キシレン（和光）にて脱脂した後にテッシュューテッ

ク・パラフィンワックス II 60 (サクラ) に包埋し、作成したブロックをマイクロトーム (TU-213、大和光機工業) で厚さ 5 μ m に薄切してスライドガラス (松浪硝子工業) 上で伸展し、乾燥、接着した。

第 7 項 Hematoxylin-eosin (HE) 染色法

パラフィン切片をキシレンで脱パラフィン後、ヘマトキシリン (Merck、New jersey)、エオジン (ナカライテスク) を用いて HE 染色し、Mount Quick (大道産業) で封入した。標本は光学顕微鏡 (ECLIPSE E600W; ニコン) で観察した。

第 8 項 統計解析

Student の t 検定を用いて 2 群間の差の統計解析を行った。

第 3 節 結果

第 1 項 高脂肪食、高炭水化物食摂取による体重の変化

実験開始 6 週後、高脂肪食群の体重は、普通食群と比較して有意な ($P>0.05$) 高値を示した (図 1A)。一方、高炭水化物食群の体重は、実験開始から 6 週まで普通食群と比較して有意な差を認めなかった (図 2A)。

第 2 項 高脂肪食、高炭水化物摂取による耐糖能、インスリン感受性の変化

実験開始 6 週後、16 時間絶食とし、経腹腔グルコース負荷試験を行った。また、6 時間絶食後に経腹腔インスリン負荷試験を施行した。

高脂肪食群における経腹腔グルコース負荷試験では、16 時間絶食時、負荷後 15 分、

30分、60分、120分のすべてで普通食群と比較して血糖値の有意 ($P>0.05$) な上昇を認めた (図 1B)。一方、高炭水化物食群における経腹腔グルコース負荷試験においては、16時間絶食時、負荷後 15分、30分、60分、90分、120分のいずれの時点においても、普通食群と比較して有意な血糖値上昇は認めなかった (図 2B)。経腹腔インスリン負荷試験では、高脂肪食群、高炭水化物食群のいずれにおいても、すべての測定時点で普通食群との有意な血糖値の差を認めなかった (図 1C、図 2C)。

第 3 項 高脂肪食、高炭水化物摂取による肝臓の肉眼的、組織学的変化

高脂肪食、高炭水化物食摂取による肝臓の脂肪変性の評価を行うため、肝臓を肉眼的、組織学的に観察した。実験開始 6 週後、高脂肪食群の肝臓は普通食群と比較して肉眼所見で白色化が認められた。また、HE 染色像にて大滴性の脂肪変性が観察された。高炭水化物食群においても、高脂肪食群と同様に、普通食群と比較して肉眼所見での白色化、大滴性の脂肪変性を認めた (図 3A、B)。

第 4 節 考察

体重測定の結果、高脂肪食群では実験開始 6 週後に普通食群と比較して体重に有意な差を認めたが、高炭水化物食群では普通食群と比較して有意な体重の差を認めなかった。また、経腹腔ブドウ糖負荷試験の結果から、高脂肪食群では血糖値が普通食群と比較して有意に上昇しており耐糖能異常が惹起されている一方、高炭水化物食群では血糖値は普通食群と比較して有意な上昇を認めず、耐糖能異常未発症であることが示された。経腹腔インスリン抵抗性試験の結果から、耐糖能異常を認める高脂肪食群においても、耐糖能異常未発症の高炭水化物食群と同様インスリン抵抗性は未発症であることが示

された。

以上の結果から示されるように、高脂肪食群、高炭水化物食群では体重、耐糖能に与える影響には差があるものの、肝臓の肉眼所見、組織学的所見からは、いずれの飼料を与えた場合も肉眼での肝臓の白色化、大滴性の脂肪変性が観察され、肝臓は脂肪変性をきたしていることが示された。このことから、今回作成した高炭水化物食を BALB/cAJcl に 6 週間与えることで肥満、耐糖能異常を来さない脂肪肝モデルマウスが樹立できたとと言える。実験開始 6 週でマウスを屠殺したため、高炭水化物食を摂取させた場合に肥満、耐糖能異常を発症しない最長期間は不明であるが、今後さらに実験を行うことによって肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルマウスとしてより長期に飼育できる可能性がある。これまで報告されてきた NAFLD モデルマウスでも、肥満、耐糖能異常を併発しないモデルは存在しており、PtenKO マウスやメチオニン・コリン欠乏食を摂取させて NAFLD を誘導する系が挙げられる[34][35]。しかし、PtenKO マウスは遺伝子改変動物モデルであること、メチオニン・コリン欠乏食では肝臓の中性脂肪の排出に関与するアミノ酸を欠乏させることにより肝臓の脂肪蓄積を誘導する一方で筋肉量の減少など全身的な影響が強く、重篤な体重減少を示すことから[36]、いずれも臨床における NAFLD の病態とは乖離した表現型であると考えられる。今回樹立した高炭水化物摂取による脂肪肝モデルは、これらのモデルと比較して臨床的に多く存在する肥満、糖尿病未発症の脂肪肝患者により近い病態であると考えられる。

高炭水化物食群で肥満、耐糖能以上を来さないにも関わらず肝臓の脂肪変性が見られた理由として、肝臓が糖代謝において中心的な役割を担っていること[37]、過剰な糖の摂取が肝臓の脂質合成経路を活性化する[38]ことが原因として考えられる。炭水化物摂

取と脂肪摂取による耐糖能異常への影響については、糖尿病発症への影響はないとする報告があること[39]、脂肪酸の種類によっても肥満、耐糖能異常発症に違いがあることから[40]、飼料の詳しい組成や総カロリーによって大きく差が出るものと考えられる。

第3章 高炭水化物摂取が肝臓の脂肪変性を惹起するポイントと歯周炎が高炭水化物食摂取による肝臓の脂肪変性に及ぼす影響

第1節 概要

前章で高炭水化物摂取 6 週間で肥満、耐糖能異常を来さない脂肪肝モデルマウスが樹立されたことをふまえて、より短期（2 週間、4 週間）に高炭水化物摂取した場合でも肝臓の脂肪変性が誘発されるかを検討した。また、高炭水化物摂取と同時に絹糸結紮による歯周炎を惹起することによって、高炭水化物食摂取 2 週、4 週で肥満、耐糖能異常非依存的に肝臓の脂肪変性が進行するかについても検討した。歯周炎の惹起により肥満、耐糖能異常を発症する可能性があるため、体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験を行い、歯周炎が肝臓の脂肪化、炎症性変化に与える影響を組織学的に評価した。また、肝臓の脂質合成酵素である *Acc1*、グルコキナーゼ、炎症性サイトカインである *IL-1 β* 、*TNF- α* 、線維化の指標である *TGF β 3* の mRNA 発現を *real-time PCR* 法で解析した。

第2節 材料と方法

第1項 マウス歯周炎モデル

口腔内常在細菌依存的に骨吸収を生じる歯周炎モデルとして、2013 年に Abe らによってマウスの歯に絹糸を結紮する方法が確立されている[29]。本研究では、この絹糸結紮によるマウス歯周炎モデルを使用した。まず、マウスに 3 種混合麻酔薬を腹腔内投与し全身麻酔を行った。3 種混合麻酔薬はメデトミジン（ドミツール）1.875ml、ミダゾラム（ドルミカム）2ml、ブトルファノール（ベトルファール）2.5ml を混合し生理食塩水で 50ml にメスアップした溶液を体重 1g あたり 10 μ l 投与した。麻酔奏功後、マ

ウスを開口させ、実体顕微鏡（SZX10、オリンパス）下で上顎両側第二臼歯に 5-0 絹糸（白川）を結紮し、口蓋側に結び目を設けた。

第 2 項 体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験

体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験は第 1 章第 2 節第 3 項、第 4 項、第 5 項と同様の方法で行った。

第 3 項 組織学的解析

組織標本作製、HE 染色は第 1 章第 2 節第 6 項、第 7 項と同様の方法で行った。

第 4 項 遺伝子発現解析法

マウス肝臓の組織をRNAiso plus（タカラバイオ）を用いて全RNAを抽出した。1 μ gの全RNAをReverTra Ace^R qPCR RT Kit（TOYOBO）、サーマルサイクラー（T100TM Thermal Cycler、BIO RAD、CA）を用いて逆転写を行いcDNAを合成した。合成したcDNAをSYBR^RGreen（TOYOBO）、real-time PCR装置（STEP ONE PLUS-D、Applied Biosystems）を用いてRT-PCRを行い、遺伝子発現を解析した。PCR反応は熱変性を95 $^{\circ}$ C・20秒、アニーリング、伸長は1サイクルを60 $^{\circ}$ C、60秒として40サイクル行った。1サンプルあたり3ウェル解析を行い、ハウスキーピング遺伝子としてGapdhを用いて、 $\Delta\Delta$ Ct法により目的遺伝子の発現を相対値として算出した。使用したプライマーの塩基配列は表2に示す。

第 5 項 統計解析

2 群間の差の統計解析を Student の t 検定を用いて行った。

第 3 節 結果

第 1 項 絹糸結紮による歯周炎が体重、耐糖能に与えた影響

高炭水化物食摂取 2 週後、4 週後いずれの場合も絹糸結紮群は非結紮群と比較して体重の増加を認めなかった (図 4A、C)。経腹腔ブドウ糖負荷試験において、高炭水化物食摂取 2 週後、4 週後のいずれにおいても、絹糸結紮群は、非結紮群と比較して 16 時間絶食時、負荷後 15 分後、30 分後、60 分後、120 分後のどの時点でも血糖値の上昇を認めなかった (図 4B、D)。

第 2 項 肝臓の肉眼所見、組織学的所見

高炭水化物食摂取 2 週後、高炭水化物食群は普通食群と比較して白色化を認めたが (図 5A)、高炭水化物食群のうち絹糸結紮群は非結紮群と比較して肉眼で明らかな肝臓の色の変化を認めなかった (図 6A)。組織像では絹糸結紮群、非結紮群ともに細胞質が明るく抜けており小滴性の脂肪変性を認めたが、大滴性の脂肪変性はほとんど認めなかった (図 5B、図 6B)。高炭水化物食摂取 4 週後では、肉眼的に高炭水化物食群は普通食群と比較して白色化を認めたが (図 7A)、高炭水化物食群のうち絹糸結紮群、非結紮群間で明らかな色の変化を認めなかった (図 8A)。しかし、組織像においては、高炭水化物食群のうち、非結紮群では高炭水化物食摂取 2 週後で見られた変化と同様に小滴性の脂肪変性にとどまっており大滴性の脂肪変性を認めないのに対し (図 7B)、絹糸結紮群では大滴性の脂肪変性が認められた (図 8B)。

第3項 脂質合成酵素、TGF β 、炎症性サイトカインの発現

高炭水化物食摂取2週後、脂質合成酵素である Acc1、グルコキナーゼ、線維化の指標である TGF β 、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF α は、絹糸結紮群、非結紮群間でいずれも発現に差はなかった(図9)。高炭水化物食摂取4週後では、脂質合成酵素のうちグルコキナーゼの発現が絹糸結紮群で有意に上昇していた(図10)。Acc1、線維化の指標である TGF β 、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF α は、絹糸結紮群、非結紮群間でいずれも発現に差はなかった(図10)。

第4節 考察

高炭水化物食摂取2週、4週でも高炭水化物摂取6週後で見られたような大滴性の脂肪変性は認めなかったものの、小滴性の脂肪変性を認めた。脂肪肝の定義として国際的な診断基準は確立されていないが、Jaqueらによると大脂肪滴の沈着が小葉の10%以上と定義されているため[41]、この基準に準拠した場合には、高炭水化物食摂取2週、4週で見られる肝臓の変化は、脂肪肝の発症ではなく肝臓の脂肪化にとどまる可能性がある。絹糸結紮による歯周炎は2週では高炭水化物食摂取による脂肪変性を進行させなかったものの、4週で絹糸結紮群に肝臓に大滴性の脂肪変性をみとめたことから、絹糸結紮4週で歯周炎が肝臓の脂肪変性を進行させたと考えられる。

第 4 章 歯周炎が高炭水化物摂取による肝臓の脂肪変性に及ぼす影響

第 1 節 概要

第 1 章で樹立された肥満、耐糖能異常を来さない脂肪肝モデルマウスを用い、絹糸結紮歯周炎モデルと組み合わせることによって、歯周炎が肥満、耐糖能異常非依存的に肝臓の脂肪変性に与える影響を明らかにする。第 3 章の結果から、高炭水化物食摂取、絹糸結紮後 4 週を歯周炎が肝臓の脂肪変性を進行させるポイントとして、普通食群、普通食・絹糸結紮群、高炭水化物食群、高炭水化物食・絹糸結紮群の 4 群で実験を行い、実験開始 4 週後に屠殺、解析を行った。歯周炎の惹起による肥満、耐糖能異常の発症がないことを確認するため、体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験、経腹腔インスリン抵抗性試験を行った。第 3 章で行った実験と同様に、歯周炎が肝臓の脂肪化、炎症性変化に与える影響を組織学的に評価し、肝臓の脂質合成酵素である *Acc1*、グルコキナーゼ、炎症性サイトカインである *IL-1 β* 、*TNF- α* 、線維化の指標である *TGF β* の mRNA 発現を real-time PCR 法で解析した。

第 2 節 材料と方法

第 1 項 マウス歯周炎モデル

絹糸結紮による歯周炎の誘発は、第 3 章の第 2 節、第 1 項と同様の方法で行った。

第 2 項 体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験、経腹腔インスリン抵抗性試験

体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験、経腹腔インスリン抵抗性試験は、第 1 章の第 2 節、第 3 項、第 4 項、第 5 項と同様の方法で行った

第 3 項 組織学的解析

組織標本作製、HE 染色は、第 1 章第 2 節第 6 項、第 7 項と同様の方法で行った。
脂質の沈着した面積の定量を ImageJ を用いて行った。

第 4 項 遺伝子発現解析

遺伝子発現の解析は、第 3 章の第 2 節、第 4 項と同様の方法で行った。

第 5 項 マイクロ CT 解析法

マウスを屠殺し、左側上顎骨を回収後に 4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定したサンプルを microCT (Skyscan 1176、Bruker、Billerica、MA、USA) で撮影した。撮影条件は、管電圧 50kV、管電流 0.5mA、ピクセルサイズ 8 μ m、露光時間 230ms で行った。CTVOL software 2.3.2.0 (64bit) (Bruker) を用いて画像再構成を行った。歯槽骨吸収の評価は先行研究を参考に[30]ImageJ を用いて頬側 9 点のセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を測定した (図 16B)。

第 6 項 統計解析

2 群間の差の統計解析は Student の t 検定を用いて行った。多重比較検定は Student の t 検定を行ったのち、優位確率 p 値を Bonferroni の補正によって修正した。歯槽骨吸収量の定量のみ Tukey-Kramer 法で検定を行った。

第 3 節 結果

第 1 項 絹糸結紮による歯周炎が体重、耐糖能に与えた影響

普通食群、普通食・絹糸結紮群、高炭水化物食群、高炭水化物・絹糸結紮群の4群間で実験開始から4週間までの間に体重の有意な差は認めなかった(図11A)。経腹腔ブドウ糖負荷試験において、高炭水化物食を4週間与えた場合でも6週間与えた場合と同様に、普通食群と比較して16時間絶食時、負荷後15分後、30分後、60分後、120分後のどの時点でも血糖値の有意な上昇を認めなかった(図11B)。また、高炭水化物食・絹糸結紮群でも、高炭水化物食群と比較して測定のどの時点でも血糖値の有意な上昇を認めなかった(図11B)。経腹腔インスリン負荷試験においても普通食群、高炭水化物食群の間、高炭水化物食、高炭水化物食・絹糸結紮群間で血糖値の有意な差を認めなかった(図11C)。

第2項 肝臓の肉眼所見、組織学的所見

実験開始4週間後、普通食・絹糸結紮群は、普通食群と比較して肉眼で肝臓の白色化は認めず、組織像においても細胞質がエオジンに濃染しており、脂肪変性を来していないことが示された(図12、図13)。高炭水化物食群では、普通食群と比較して肝臓の白色化を認め、組織像においても細胞質が明るく抜けており、脂肪変性を来していることが示された(図12、図13)。一方で、高脂肪食摂取6週で見られたような大滴性の脂肪変性は認めなかった(図13)。高炭水化物・絹糸結紮群では、高炭水化物食群と比較して肉眼所見では明らかな白色化の進行は認めなかったものの、組織像では、高炭水化物食群で認めなかったびまん性の大滴性脂肪変性を認めた(図12、図13)。組織像から脂肪変性を来している面積を定量した結果、高炭水化物食・絹糸結紮群では、高炭水化物食群と比較して脂質の沈着している面積が有意に大きいことが示された(図14)。高炭水化物食・絹糸結紮群では、高炭水化物食群と比較して明らかな炎症

性細胞の浸潤、広い範囲の線維化は認めなかった(図 14)。

第 3 項 脂質合成酵素、TGF β 、炎症性サイトカインの発現

高炭水化物食群、高炭水化物食・絹糸結紮群は、普通食群と比較して組織像では明らかな脂肪変性を来していたが、脂質合成酵素である Acc1、グルコキナーゼの mRNA 発現は優位な差を認めなかった。高炭水化物食群と高炭水化物食・絹糸結紮群間でもこれらの脂質合成酵素の発現に差を認めなかった。線維化の指標である TGF β 、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF α は、4 群間で発現に差を認めなかった(図 15)。

第 4 項 歯槽骨吸収量

普通食群、高炭水化物食群のいずれにおいても、絹糸結紮群での歯槽骨吸収が確認された(図 16)。骨吸収定量の結果、絹糸結紮群のうち普通食群・高炭水化物食群間で骨吸収の程度に差がないことが示された(図 16)。

第 4 節 考察

体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験、経腹腔インスリン抵抗性試験の結果から、絹糸結紮による歯周炎は実験開始 4 週後においても肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性を発症しないことが確認された。糖尿病が歯周炎の増悪因子であることを踏まえると[5]、この結果は、マイクロ CT 解析にて普通食群、高炭水化物食群間で歯槽骨吸収の程度に有意な差がないことと矛盾しない。一方、肝臓の組織学的評価から、絹糸結紮後 4 週で歯周炎が高炭水化物摂取による肝臓の脂肪変性を進行させることが示され

た。絹糸結紮群の組織像の一部には炎症性細胞の浸潤や線維化を認めたものの、いずれもごく限られた範囲での変化であり、脂肪肝炎でみられるような明らかな炎症性細胞の浸潤や広い範囲での線維化は認めなかった。また、組織像の結果と一致して、絹糸結紮群においても線維化の指標である TGF β 、炎症性サイトカインである IL-1 β 、TNF α の mRNA 発現は上昇を認めなかった。以上の結果から、歯周炎が NAFLD の増悪因子である肥満、耐糖能異常を介さず肝臓に直接的に作用して NAFLD を悪化させる可能性が示されたものの、実験開始 4 週の時点では単純性脂肪肝 (NAFL) の悪化にとどまり、脂肪肝炎 (NASH) までは進行していないと考えられる。より長期に絹糸結紮を行うことによって高炭水化物食群より早期に脂肪肝炎へと進行する可能性も考えられる。しかし、実験期間が長期にわたるといずれは肥満、耐糖能異常を発症すると考えられるため、歯周炎が肝臓に直接的に与える影響がどの程度肝臓での変化に寄与するかを評価するのは困難になると考えられる。

Real-time PCR の結果、絹糸結紮による歯周炎モデルは脂肪変性を進行させたにも関わらず、脂質合成酵素である Acc1、グルコキナーゼの mRNA 発現に変化を及ぼさなかった。絹糸結紮歯周炎モデルが肝臓の脂肪変性を進行させたメカニズムとして、SREBP1 など Acc1、グルコキナーゼ以外の脂質合成酵素が関与する可能性が考えられる。

絹糸結紮による歯周炎が肝臓に作用した経路としていくつかの可能性が考えられる。まず、絹糸結紮により歯周病原細菌が肝臓に到達影響を及ぼす可能性が挙げられる。絹糸結紮後 6 週で口腔内細菌が肝臓で検出されることが報告されており [42]、臨床的にも NASH 患者の肝臓で主な歯周病原細菌である *P.g.* 菌が検出されていることから [16]、体循環を介して肝臓に到達した口腔内細菌が肝臓の糖代謝、脂質合成に影響

を与える可能性がある。また、絹糸結紮菌周炎モデルが絹糸結紮後 1 週後から血清中の IL-6 を上昇させるという報告があることから[43][44]、血清中の IL-6 の上昇が体循環を介して肝臓に到達し、肝臓の脂肪変性に影響を及ぼす可能性が挙げられる。さらに、果糖の過剰摂取が腸管のバリア機能を破綻させて腸管透過性の亢進をきたし、腸内細菌や内毒素が門脈を通じて肝臓に達することで NAFLD の発症に関与することが報告されている[45]。口腔内細菌叢の変化が腸内細菌叢を変化させること[46]が報告されていることを踏まえると、絹糸結紮菌周炎モデルでの口腔内細菌叢の変化が腸内細菌叢を変化させ、糖の過剰摂取による腸管透過性の亢進を介して NAFLD を増悪させる可能性が考えられる。

第 5 章 総括

本研究では、歯周炎が肥満、耐糖能異常を介さずに NAFLD を増悪させうるかを明らかにすることを目的とした。マウスに高炭水化物食を摂取させることにより、肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルマウスを樹立し、絹糸結紮実験的歯周炎モデルを用いて歯周炎が NAFLD に与える影響について評価し、以下の結果を得た。

1. 高炭水化物食摂取による肥満、耐糖能異常を併発しない脂肪肝モデルマウスの樹立

マウスに高炭水化物食を摂取させることで、

- a. 高炭水化物食摂取 6 週で肥満、耐糖能異常を併発せず、肝臓に大滴性の脂肪変性を認める脂肪肝モデルマウスを樹立した。
- b. 高炭水化物食摂取 2 週、4 週では、肝臓に大滴性の脂肪変性を認めない軽度の脂肪化が確認された。

2. 歯周炎が肥満、耐糖能異常を介さずに NAFLD に与える影響

マウスに高炭水化物食摂取、絹糸結紮を 4 週間行うことで、

- a. 絹糸結紮による歯周炎が肥満、耐糖能異常を介さずに肝臓の脂肪変性を進行させることが示された。
- b. 絹糸結紮 4 週での肝臓の変化は脂肪変性にとどまり、脂肪肝炎（NASH）でみられるような広範囲での線維化、炎症性細胞の浸潤、炎症性サイトカインの発現上昇は認めなかった。

本研究の結果から、臨床的に肥満、糖尿病未発症の NAFLD 患者においても、歯周炎

が NAFLD の増悪因子となる可能性があることが示された。

第 6 章 参考文献

1. Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S. & Johnson, N. W. Periodontal diseases. *Lancet* 366, 1809–1820 (2005).
2. Nassar, H., Kantarci, A. & van Dyke, T. E. Diabetic periodontitis: a model for activated innate immunity and impaired resolution of inflammation. *Periodontol 2000* 43, 233–244 (2007).
3. O'Reilly, P.G. & Claffey, N.M. A history of oral sepsis as a cause of disease. *Periodontol 2000* 23, 13-18 (2000).
4. Hajishengallis, G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* 15, 30-44 (2015).
5. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(Suppl 4):3–10.
6. Pizzo G, Guiglia R, Russo LL, Campisi G. Dentistry and internal medicine: from the focal infection theory to the periodontal medicine concept. *Europ J Intern Med.* 2011;21:496–502.
7. Wada K, Kamisaki Y. Roles of oral bacteria in cardiovascular diseases—from molecular mechanisms to clinical cases: involvement of *Porphyromonas gingivalis* in the development of human aortic aneurysm. *J Pharmacol Sci.* 2010;113:115–9.
8. Figuero E, Sanchez-Beltran M, Cuesta-Frechoso S, Tejerina JM, del Castro JA, Gutierrez JM, et al. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaques by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol.* 2011;82(10):1469–77.
9. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, et al. Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol.* 2012;12(1):16. [Epub ahead of print].
10. Sanyal AJ. NASH: a global health problem. *Hepatol Res.* 2011;41:670–4.
11. Malaguarnera M, Rosa MD, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med.* 2009;87:679–95.
12. Leite NC, Villela-Nogueira CA, Pannain VLN, Bottino AC, Resende GFM,

- Cardoso CRL, et al. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease: prevalences and correlated factors. *Liver Int.* 2011;31(5)
13. Williams CD, Stengel J, Asike MI, et al. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis among a largely middle-aged population utilizing ultrasound and liver biopsy: a prospective study. *Gastroenterology* 2011;140:124-131
 14. Shida T, et al. Clinical and anthropometric characteristics of non-obese non-alcoholic fatty liver disease subjects in Japan. *Hepatol Res.* 2020 Sep;50(9):1032-1046.
 15. Sasaki N, et al. Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Injection Aggravates Non-alcoholic Fatty Liver Disease, Disrupts Glucose/Lipid Metabolism, and Alters Gut Microbiota in Mice. *Front Microbiol.* 2018 Oct 24;9:2470.
 16. Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H, Inubushi T, et al. Dental infection of Porphyromonas gingivalis exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol.* 2013 Nov;48(11):1259-70.
 17. Furusho H, et al. Porphyromonas gingivalis induced periodontitis exacerbates progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats. *Gastroenterol.* 2013 Nov;48(11):1259-70.
 18. Grossi SG, Skrepcinski FB, DeCaro T, Robertson DC, Ho AW, Dunford RG, Genco RJ : Treatment of periodontal disease in diabetics reduces glycated hemoglobin. *J Periodontol* 68:713 -719,197.
 19. Vos MB, et al. Sugar, Sugar . . . Not So Sweet for the Liver. *Gastroenterology* . 2017 Sep;153(3):642-645.
 20. Nagasaki A, Sakamoto S, Chea C, Ishida E, Furusho H, Fujii M, Takata T, Miyauchi M. Odontogenic infection by Porphyromonas gingivalis exacerbates fibrosis in NASH via hepatic stellate cell activation. *Sci Rep.* 2020 Mar 5;10(1):4134.
 21. Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Watanabe K, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y. Periodontal pathogenic bacteria, Aggregatibacter actinomycetemcomitans affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. *Sci Rep.* 2017 Oct 24;7(1):13950.

22. Pihlstrom, B.L., Michalowicz, B.S. & Johnson, N.W. Periodontal diseases. *Lancet* ,2005.366, 1809-1820 (2005).
23. Rosier, B.T., De Jager, M., Zaura, E. & Krom, B.P. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol* ,2014.4, 92 .
24. Mandell RL, Socransky SS. A selective medium for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and the incidence of the organism in juvenile periodontitis. *J Periodontol*. 1981;52:593–598.
25. Hajishengallis, G. et al. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 10, 2011.497-506.
26. Rosier, B.T., De Jager, M., Zaura, E. & Krom, B.P. Historical and contemporary hypotheses on the development of oral diseases: are we there yet? *Front Cell Infect Microbiol*, 2014. 4, 92.
27. Hajishengallis, G., Darveau, R.P. & Curtis, M.A. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 10, 2012, 717-725.
28. Graves, D.T., Fine, D., Teng, Y.T., Van Dyke, T.E. & Hajishengallis, G. The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. *J Clin Periodontol*,2008. 35, 89-105.
29. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods*,2013. 394,49-54.
30. Jiao Y,Darzi Y, Tawaratsumida K, Marchesan JT, Hasegawa M, Moon H. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell Host Microbe*,2013. 13,595-601
31. Rovin, S., Costich, E.R. & Gordon, H.A. The influence of bacteria and irritation in the initiation of periodontal disease in germfree and conventional rats. *J Periodontal Res* 1,1966. 193- 204
32. Montgomery MK, Hallahan NL, Brown SH, Liu M, Mitchell TW, Cooney GJ, Turner N. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*. 2013 May;56(5):1129-39.
33. Plump, A.S., et al., Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES

- cells. *Cell*, 1992. 71(2): p. 343-53.
34. Stiles B, Wang Y, Stahl A, Bassilian S, Lee WP, Kim YJ, Sherwin R, Devaskar S, Lesche R, Magnuson MA, Wu H. Liver-specific deletion of negative regulator Pten results in fatty liver and insulin hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Feb 17;101(7):2082-7.
 35. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 2006 Feb;87(1):1-16.
 36. Matsumoto M, Hada N, Sakamaki Y, Uno A, Shiga T, Tanaka C, Ito T, Katsume A, Sudoh M. An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol*. 2013 Apr;94(2):93-103.
 37. DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes* 1988; 37: 667–687
 38. Sun S, Hanzawa F, Kim D, Umeki M, Nakajima S, Sakai K, Ikeda S, Mochizuki S, Oda H. Circadian rhythm-dependent induction of hepatic lipogenic gene expression in rats fed a high-sucrose diet. *J Biol Chem*. 2019 Oct 18;294(42):15206-15217.
 39. Hung T, Sievenpiper JL, Marchie A, Kendall CW, Jenkins DJ. Fat versus carbohydrate in insulin resistance, obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2003 Mar;6(2):165-76.
 40. Kurotani K, Kochi T, Nanri A, Tsuruoka H, Kuwahara K, Pham NM, Kabe I, Mizoue T. Plant oils were associated with low prevalence of impaired glucose metabolism in Japanese workers. 2013. *PLoS ONE* 8(5): e64758.
 41. Jaque NE et al, The incidence of portal cirrhosis and fatty metamorphosis in patients dying with diabetes mellitus. *New Engl J Med* 1953: 249: 442 -445
 42. Tsukasaki M, Komatsu N, Nagashima K, Nitta T, Pluemsakunthai W, Shukunami C, Iwakura Y, Nakashima T, Okamoto K, Takayanagi H. Host defense against oral microbiota by bone-damaging T cells. *Nat Commun*. 2018 Feb 16;9(1):701.
 43. Furutama D, Matsuda S, Yamawaki Y, Hatano S, Okanobu A, Memida T, Oue H, Fujita T, Ouhara K, Kajiya M, Mizuno N, Kanematsu T, Tsuga K, Kurihara H. IL-6 Induced by Periodontal Inflammation Causes Neuroinflammation and Disrupts the Blood-Brain Barrier. *Brain Sci*. 2020 Sep 27;10(10):679.
 44. Matsuda Y, Kato T, Takahashi N, Nakajima M, Arimatsu K, Minagawa T, Sato

- K, Ohno H, Yamazaki K. Ligature-induced periodontitis in mice induces elevated levels of circulating interleukin-6 but shows only weak effects on adipose and liver tissues. *J Periodontal Res.* 2016 Oct;51(5):639-46.
45. Cho YE, Kim DK, Seo W, Gao B, Yoo SH, Song BJ. Fructose Promotes Leaky Gut, Endotoxemia, and Liver Fibrosis Through Ethanol-Inducible Cytochrome P450-2E1-Mediated Oxidative and Nitrative Stress. *Hepatology.* 2019 Apr 8;10.1002/hep.30652.
46. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H, Minagawa T, Nakajima M, Ryder MI, Gotoh K, Motooka D, Nakamura S, Iida T, Yamazaki K. Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep.* 2014 May 6;4:4828.

表 1. 高炭水化物食 (HCD) ・ HFD32 組成

HCD		HFD32	
Formula(g/Kg)			
Sucrose	341.45	Crystalline Cellulose	55
Corn Starch	115	Maltodextrin	82.5
Cellose	50	Lactose	69.28
Unsalted butter	245	Sucrose	67.5
Cholesterol	1.5	Powdered beef tallow	158.8
Casein	195	Safflower oil(high oleic acid)	200
DL-Methionine	3	Milk casein	245
Mineral Mix,AIN-96	35	Egg white	50
Calcium Carbonate	4	L-cystein	4.3
Vitamin Mix,AIN-93	10	AIN93 vitamin mix	14
Tertiary butylhydroquinone	0.05	AIN93G mineral mix	50
		Choline bitartrate	3.6
		Tertiary butylhydroquinone	0.02
Energy(kcal/100g)			
	450		507.6

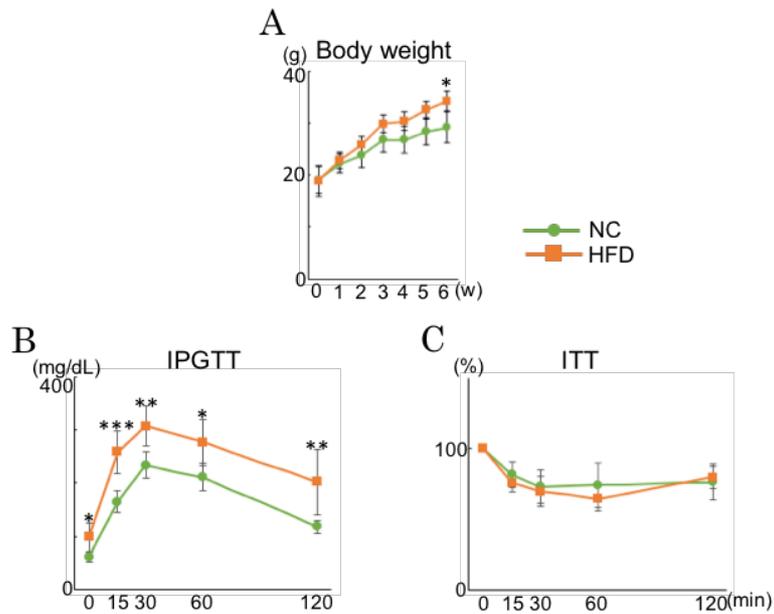


図 1. 高脂肪食摂取による肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性の評価

NC:普通食群、HFD:高脂肪食群

A. 普通食 (緑)、高脂肪食 (橙) 摂取による体重の変化。

縦軸は体重、横軸は高脂肪食摂取後の週数を示す。n=4

B. 経腹腔ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)

縦軸は血糖値 (mg/dL)、横軸は経過時間 (分) を示す。n=4

:p<0.05、:0.01、***:0.001

C. 経腹腔インスリン抵抗性試験 (ITT)

縦軸は絶食後血糖値に対する血糖値の割合 (%)。横軸は経過時間 (分) を示す。n=4

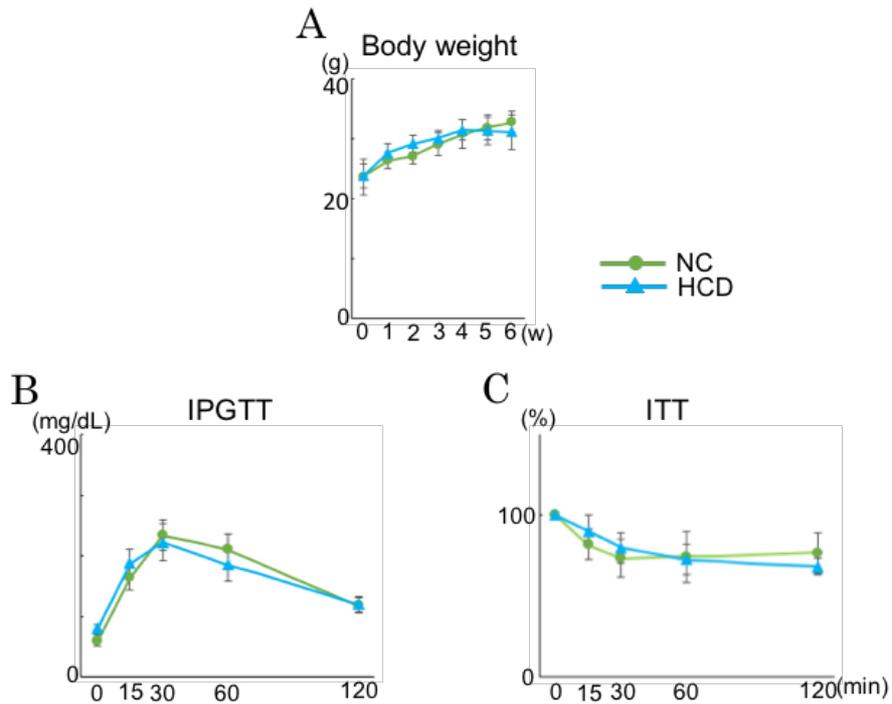


図 2. 高炭水化物食摂取による肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性の評価

NC:普通食群、HCD:高炭水化物食群

A. 普通食 (緑)、高炭水化物 (青) 摂取による体重の変化。

縦軸は体重、横軸は高脂肪食摂取後の週数を示す。n=4

B. 経腹腔ブドウ糖負荷試験の結果。(IPGTT)

縦軸は血糖値 (mg/dL)、横軸は経過時間 (分) を示す。n=4

C. 経腹腔インスリン抵抗性試験 (ITT)

縦軸は絶食後血糖値に対する血糖値の割合 (%)。横軸は経過時間 (分) を示す。n=4

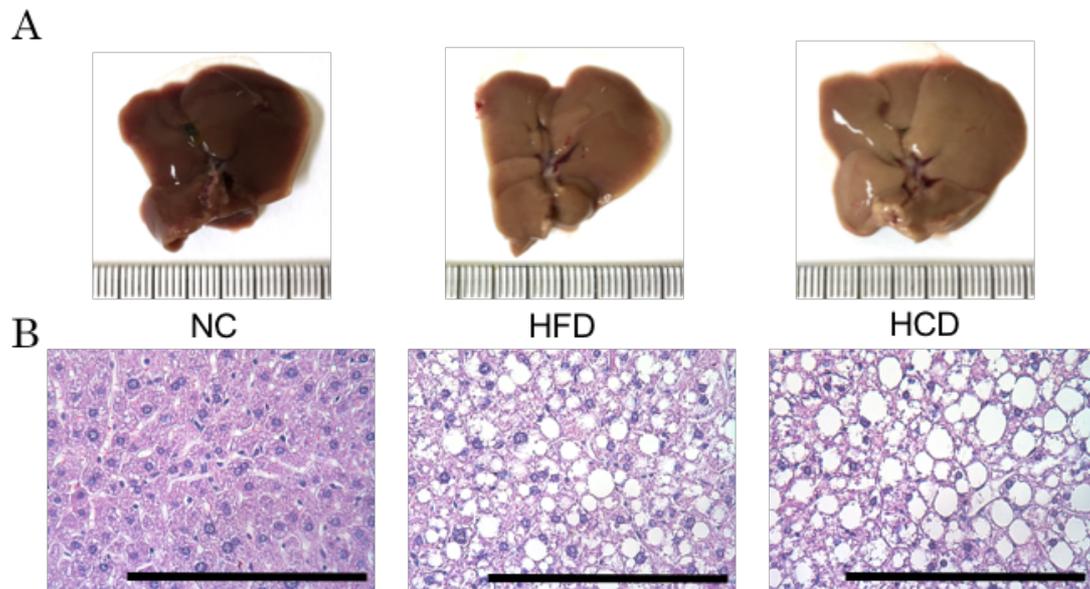


図 3. 普通食、高脂肪食、高炭水化物食摂取での肝臓の肉眼所見、組織学的変化

NC: 普通食群、HFD: 高脂肪食群、HCD: 高炭水化物食群

A. 肉眼所見

B. HE 染色像

倍率は×400、スケールバーは 100μm を示す。

表 2. Real-Time PCR プライマー

Gapdh	F:CCTGGAGAAACCTGCCAAGTATG
	R:TGTTGCTGTAGCCGTATTCATTGT
Acc1	F:ACACCATGTTGGGAGTTGTG
	R:GCTGTTCCCTCAGGCTCACAT
GlcK	F:TATGAAGACCGCCAATGTGA
	R:TTTCCGCCAATGATCTTTTC
TGF β	F:GACCGCAACAACGCCATCTAT
	R:CGAAAGCCCTGTATTCCGTCTC
IL-1 β	F:CCTTGTGCAAGTGTCTGAAGC
	R:TCATCTTTTGGGGTCCGTCAAC
TNF- α	F:CTATGTCTCAGCCTCTTCTC
	R:CATTTGGGAAGTTCTCATCC

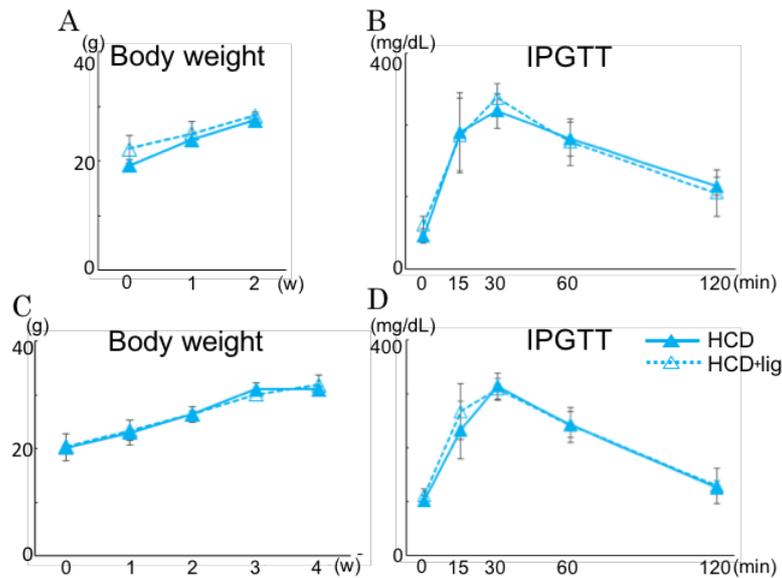


図 4. 絹糸結紮による体重測定、経腹腔ブドウ糖負荷試験の結果

HCD：高炭水化物食群、HCD+lig：高炭水化物・絹糸結紮群

A. 高炭水化物食群（実線）、高炭水化物食・絹糸結紮群（破線）における体重の変化
（2 週間）

縦軸は体重、横軸は高脂肪食摂取後の週数を示す。n=4

B. 高炭水化物食摂取 2 週後の高炭水化物食群・高炭水化物食・絹糸結紮群の経腹腔
ブドウ糖負荷試験（IPGTT）

縦軸は血糖値（mg/dL）、横軸は経過時間（分）を示す。n=4

C. 炭水化物食群、高炭水化物食・絹糸結紮群における体重の変化（4 週間）

縦軸は絶食後血糖値に対する血糖値の割合（%）。横軸は経過時間（分）を示す。

n=4

D. 高炭水化物食摂取 4 週後の高炭水化物食群、高炭水化物食・絹糸結紮群の経腹腔
ブドウ糖負荷試験（IPGTT）

縦軸は血糖値（mg/dL）、横軸は経過時間（分）を示す。n=4

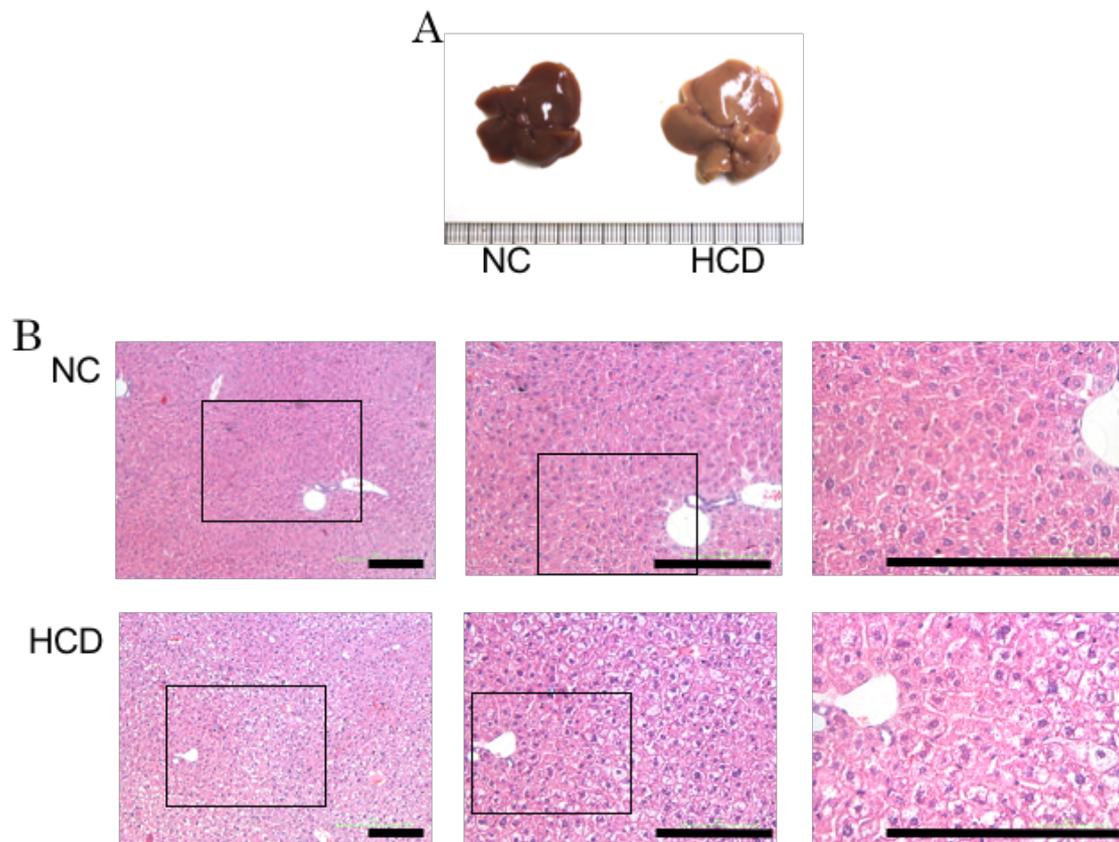


図 5. 高炭水化物食 2 週後の肝臓の脂肪変性

NC: 普通食群、HCD: 高炭水化物食群

A. 肉眼所見

B. HE 染色像

スケールバーは 100 μ m を示す。

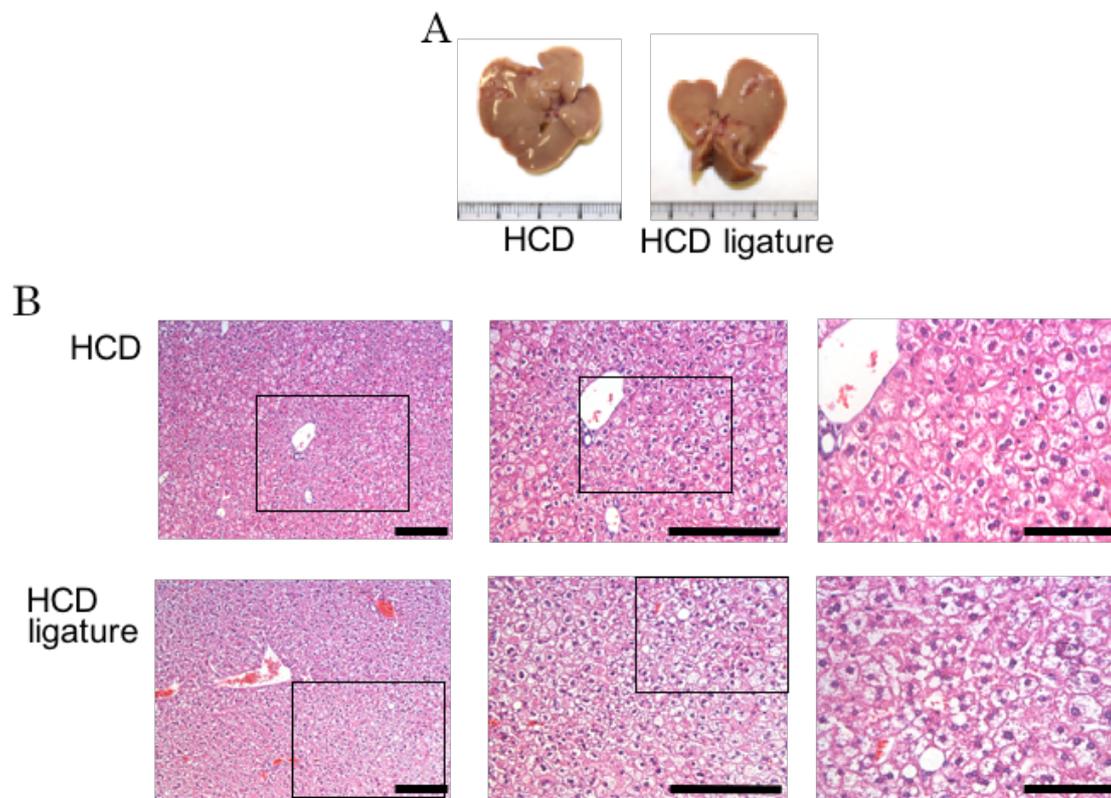


図 6. 高炭水化物食 2 週後の肝臓の脂肪変性

HCD : 高炭水化物食群、HCD+lig : 高炭水化物・絹糸結紮群

A. 肉眼所見

B. HE 染色像

スケールバーは 100 μ m を示す。

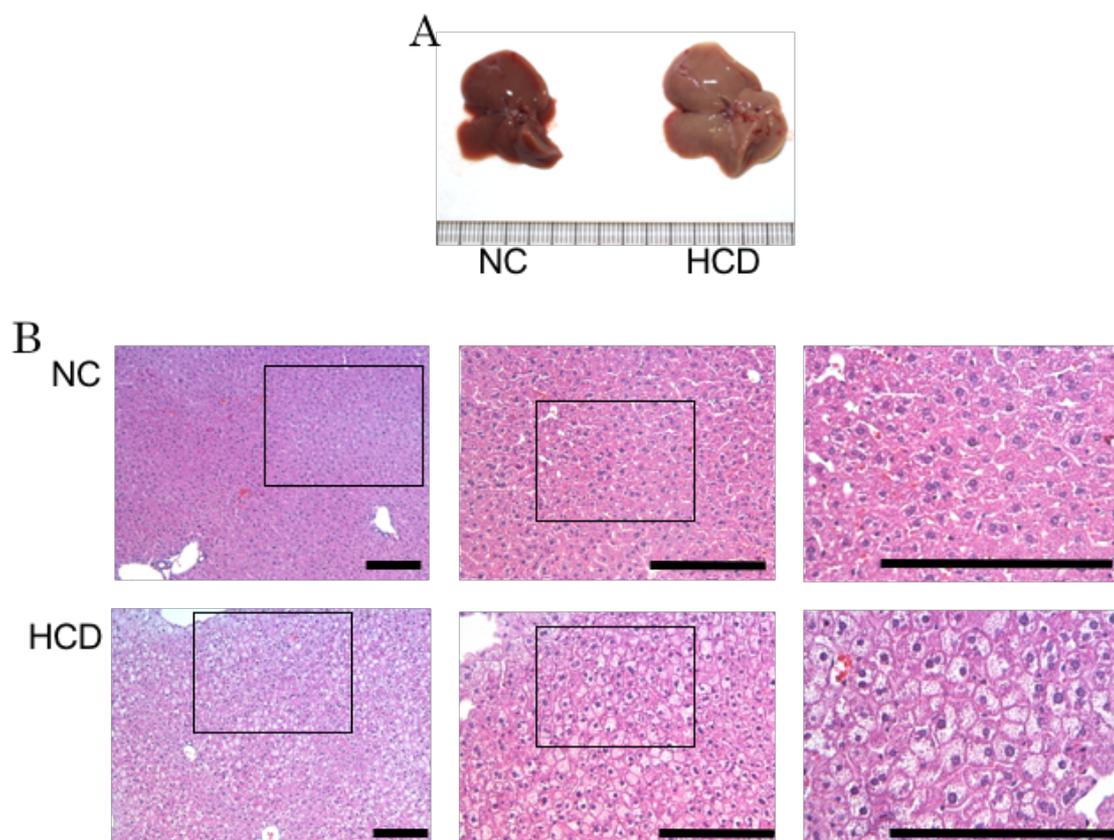


図 7. 高炭水化物食 4 週後の肝臓の脂肪変性

NC: 普通食群、HCD : 高炭水化物食群

A. 肉眼所見

B. HE 染色像

スケールバーは 100 μ m を示す。

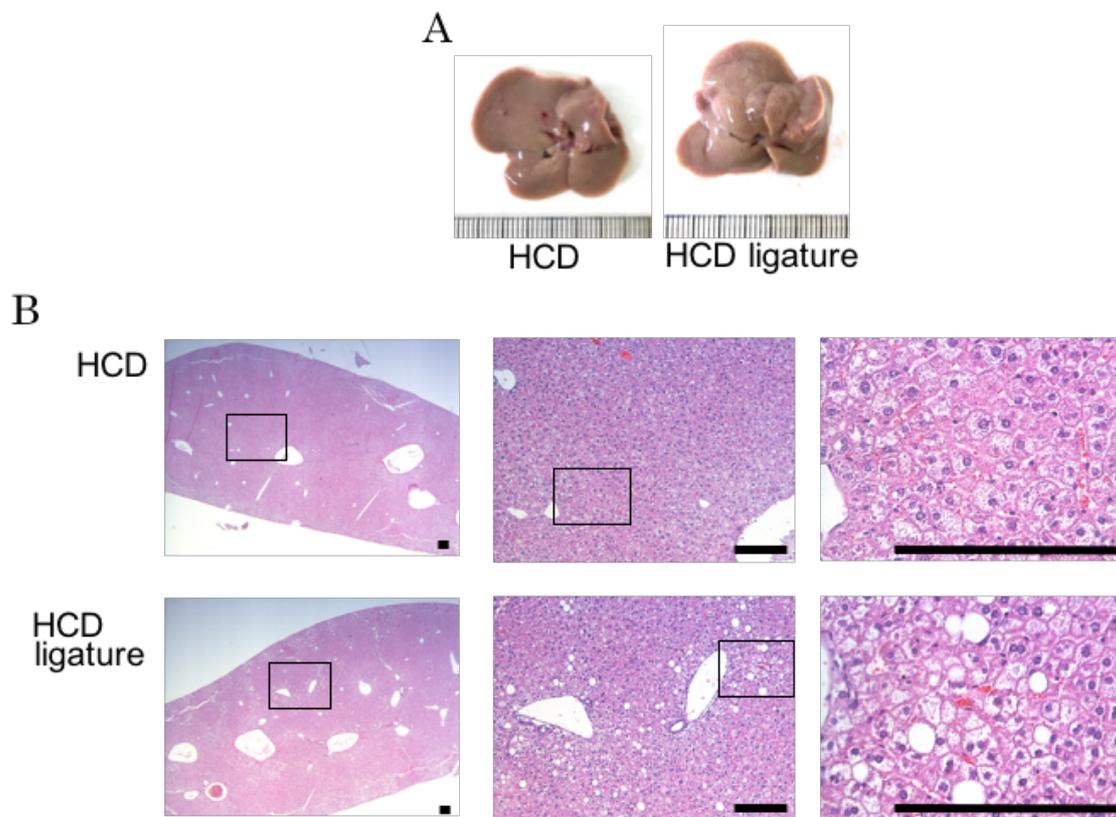


図 8. 高炭水化物食 4 週後の肝臓の脂肪変性

HCD : 高炭水化物食群、HCD+lig : 高炭水化物・絹糸結紮群

A. 肉眼所見

B. HE 染色像

スケールバーは 100 μ m を示す。n=3~4.

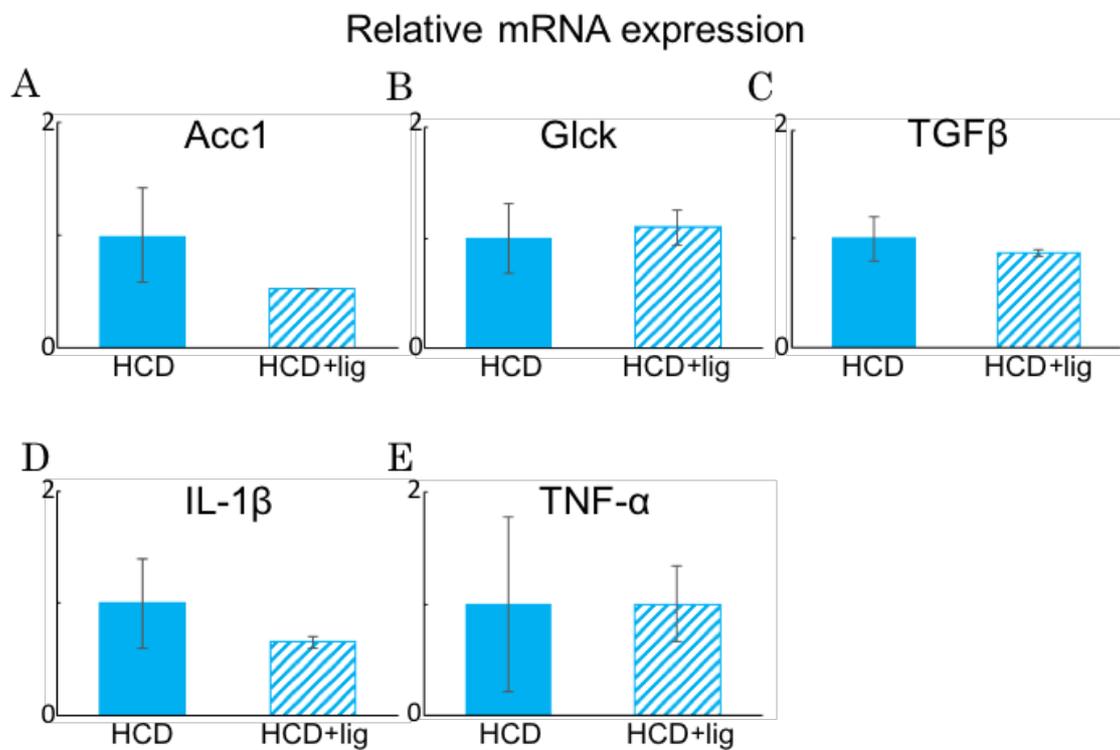


図 9. 高炭水化物食 2 週後の絹糸結紮群、非結紮群の mRNA 発現

HCD : 高炭水化物食群、HCD+lig : 高炭水化物・絹糸結紮群

縦軸は目的遺伝子の mRNA 発現を GAPDHmRNA 発現に対する比で示す。

n=3~4

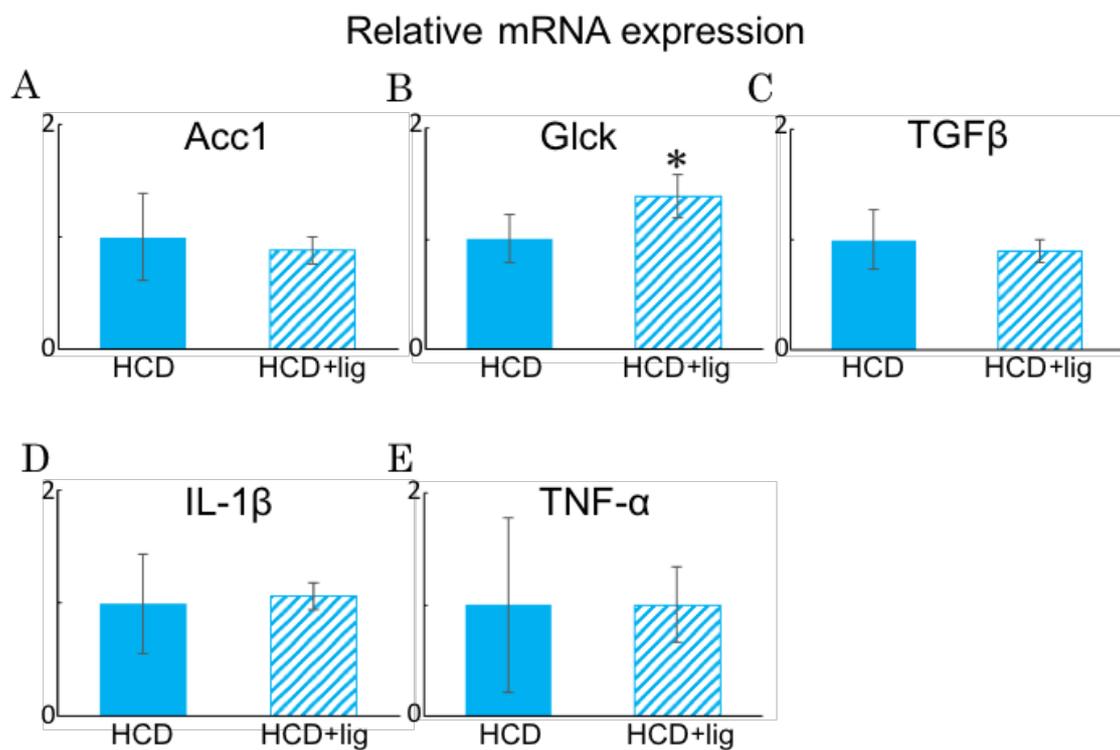


図 10. 高炭水化物食 4 週後の絹糸結紮群、非結紮群の mRNA 発現

HCD : 高炭水化物食群、HCD+lig : 高炭水化物・絹糸結紮群

縦軸は目的遺伝子の mRNA 発現を GAPDHmRNA 発現に対する比で示す。

n=3~4

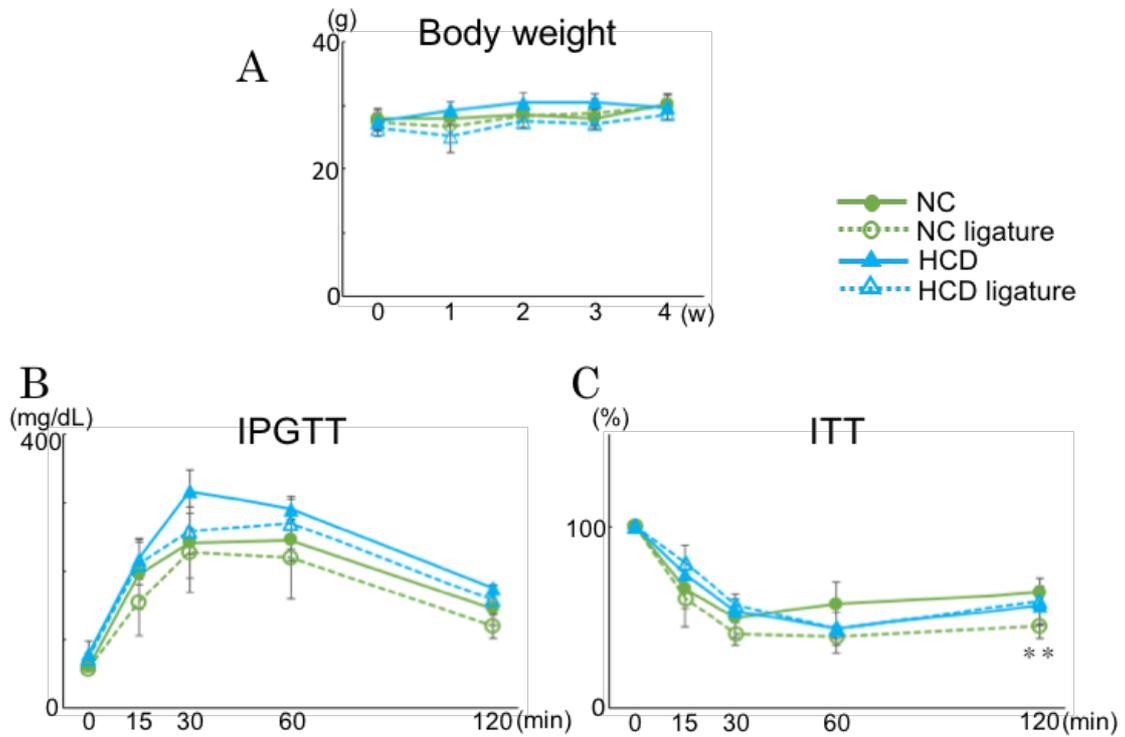


図 11. 高炭水化物食摂取、絹糸結紮による肥満、耐糖能異常、インスリン抵抗性の評価

NC : 普通食、NC ligature : 普通食・絹糸結紮群

HCD : 高炭水化物食群、HCD ligature : 高炭水化物・絹糸結紮群

A. 普通食、高炭水化物摂取による体重の変化

縦軸は体重、横軸は高脂肪食摂取後の週数を示す。n=4

B. 経腹腔ブドウ糖負荷試験 (IPGTT)

縦軸は血糖値 (mg/dL)、横軸は経過時間 (分) を示す。n=4

C. 経腹腔インスリン抵抗性試験 (ITT)

縦軸は絶食後血糖値に対する血糖値の割合 (%)。横軸は経過時間 (分) を示す。n=4

** : p>0.01、NCvsNCligature

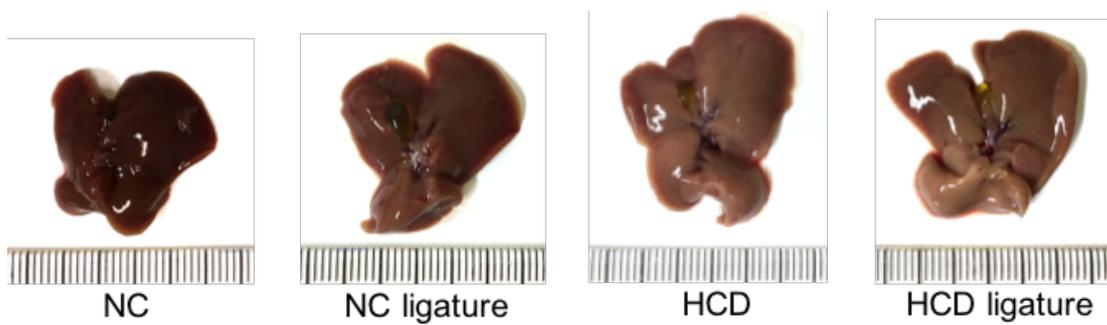


図 12. 高炭水化物食摂取、絹糸結紮による肝臓の肉眼所見での変化

NC : 普通食、NC ligature : 普通食・絹糸結紮群

HCD : 高炭水化物食群、HCD ligature : 高炭水化物・絹糸結紮群

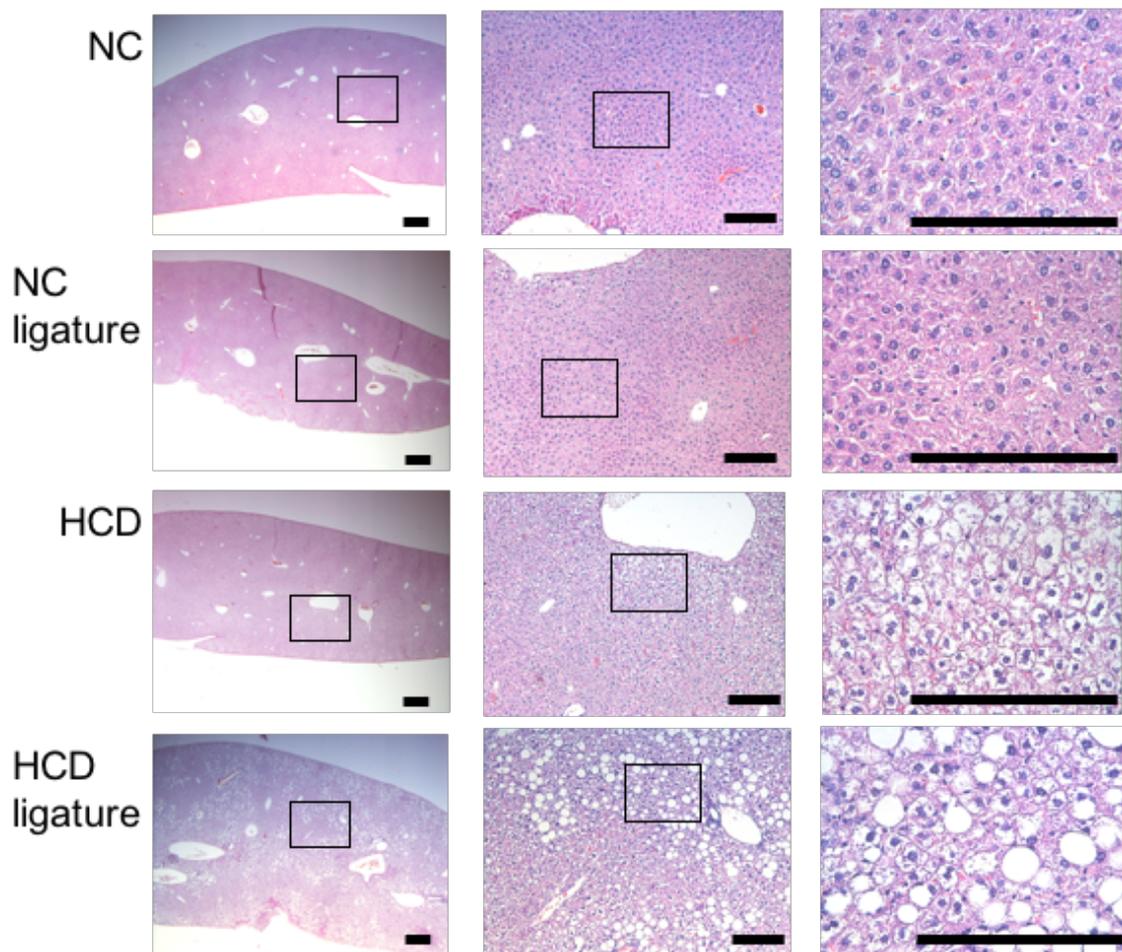


図 13. 高炭水化物食摂取、絹糸結紮 4 週後の肝臓の HE 染色像

NC : 普通食、NC ligature : 普通食・絹糸結紮群

HCD : 高炭水化物食群、HCD ligature : 高炭水化物・絹糸結紮群

スケールバーは 100 μ m を示す。n=4

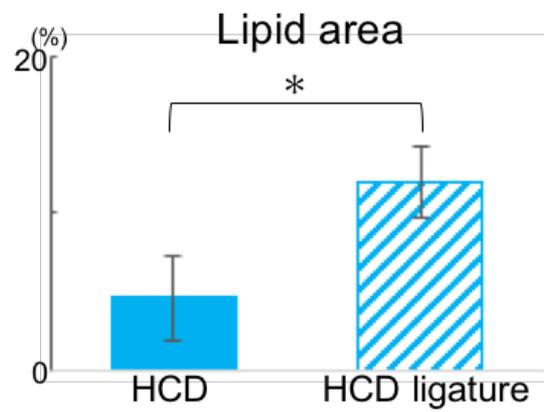
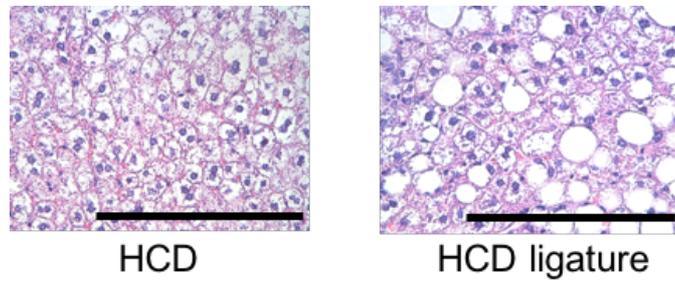


図 14. HE 染色像における脂質沈着部分の面積の定量

HCD : 高炭水化物食群、HCD ligature : 高炭水化物・絹糸結紮群

スケールバーは 100 μ m を示す。n=4

* : p<0.05

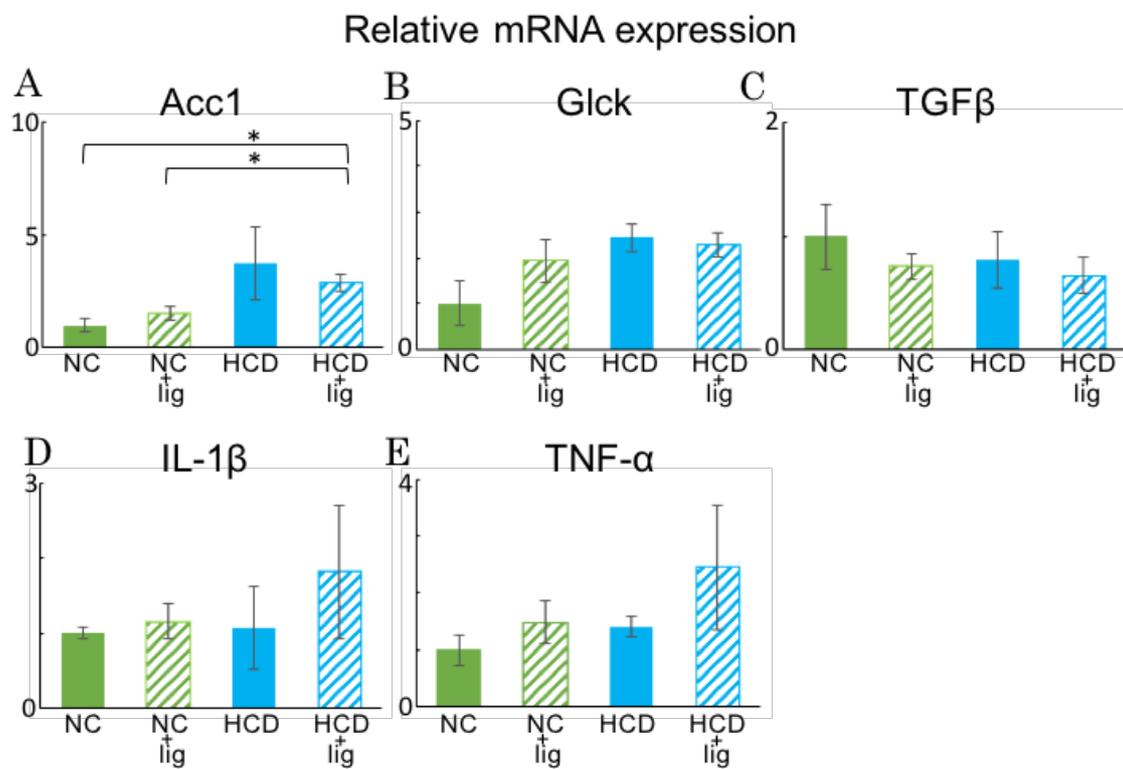


図 15. 高炭水化物食摂取、絹糸結紮による肝臓の mRNA 発現への影響

NC : 普通食、NC+lig : 普通食・絹糸結紮群

HCD : 高炭水化物食群、HCD+lig : 高炭水化物・絹糸結紮群

縦軸は目的遺伝子の mRNA 発現を GAPDHmRNA 発現に対する比で示す。

n=4

* : p<0.05

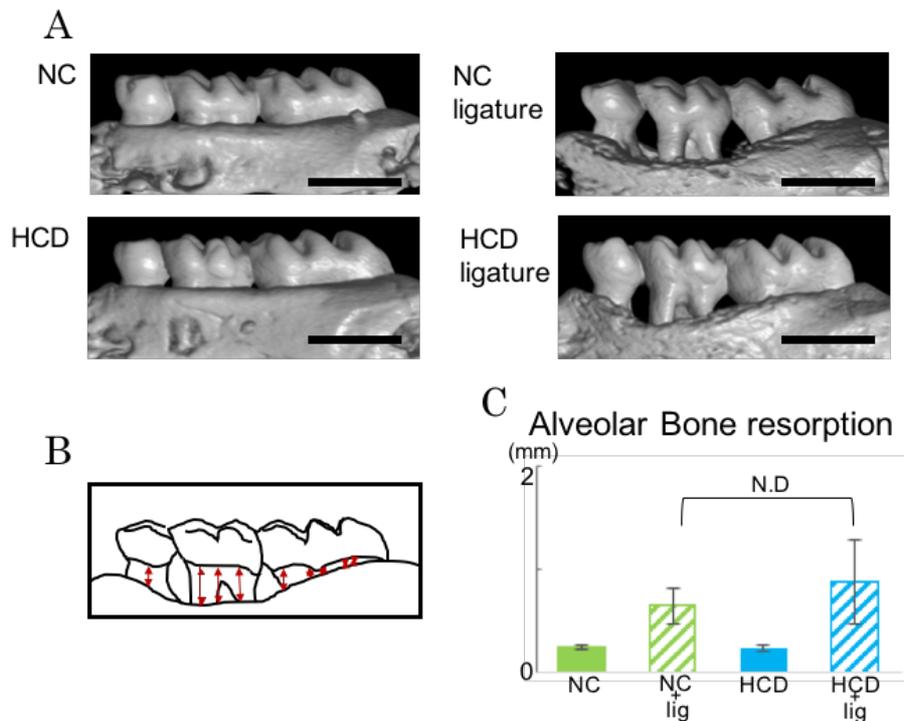


図 16. 絹糸結紮による歯槽骨吸収量

NC : 普通食、NC ligature : 普通食・絹糸結紮群

HCD : 高炭水化物食群、HCD ligature : 高炭水化物・絹糸結紮群

A. 歯周組織 CT 像 (頰側)

スケールバーは 1mm を示す。n=4

B. 歯槽骨吸収量の計測部意を示す。第 3 臼歯頰側咬頭頂部、第 2 臼歯頰側遠心および近心咬頭頂、第 2 臼歯頰側裂溝、第 1 臼歯頰側遠心および近心咬頭頂、第 1 臼歯頰側裂溝の 9 点を基準としてセメントエナメル境から歯槽骨頂までの距離を計測した。

C. 歯槽骨吸収量定量の結果

縦軸の単位は mm。 n=4