

高脂肪食摂餌ラットの非アルコール性脂肪肝炎への進行における
実験的歯周炎惹起と *Porphyromonas gingivalis* 感染の
複合効果についての研究

倉治 竜太郎

The multiple effects of experimental periodontitis and *Porphyromonas
gingivalis* infection on progression to non-alcoholic steatohepatitis
in rats fed with high-fat diet

Ryutaro KURAJI

日本歯科大学大学院生命歯学研究科歯科臨床系専攻
(指導：沼部幸博 教授)

研究指導：伊藤 弘 准教授
(日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座)

The Nippon Dental University, Graduate School of Life Dentistry at Tokyo
(Chair person : Prof. Yukihiro NUMABE)

Conducted by
Associate prof. Hiroshi ITO
The Nippon Dental University, Graduate School of Life Dentistry at Tokyo
Department of Periodontology

(2016年11月)

この論文は、次の形式で発表する。

1) 受理

論文題名 : *Porphyromonas gingivalis* induced periodontitis exacerbates progression of non-alcoholic steatohepatitis in rats

機 関 名 : Wiley

雑 誌 名 : Clinical and Experimental Dental Research

著 者 名 : Kuraji Ryutaro, Ito Hiroshi, Fujita Miyako, Ishiguro Hitomi,
Hashimoto Shuichi, Numabe Yukihiro.

この論文を倉治竜太郎の博士（歯学）学位論文として提出することを承諾します。

伊藤 弘 ⑩

藤田 美也子 ⑩

石黒 一美 ⑩

橋本 修一 ⑩

沼部 幸博 ⑩

目 次

緒言	1
対象と方法	2
(1) 動物と実験群	
(2) 上顎臼歯歯頸部への絹糸結紮	
(3) <i>P.gingivalis</i> 懸濁液の調整と投与	
(4) マイクロフォーカスX線 computed tomography (μ CT)を用いた上顎の解析	
(5) 上顎の組織学的解析	
(6) 血清パラメーター解析	
(7) 肝臓の組織学的評価	
(8) 歯肉縁下プラーク, 血清および肝臓からの <i>P.gingivalis</i> の検出	
(9) 統計解析	
結果	8
実験 1 : 高脂肪食摂餌による血清パラメーターの変化と脂肪肝誘導	
実験 2 : 結紮糸留置による実験的歯周炎惹起	
実験 3 : 結紮により惹起した実験的歯周炎における <i>P.gingivalis</i> 感染の影響	
(1) 結紮糸留置と <i>P.gingivalis</i> 懸濁液塗布による実験的歯周炎惹起	
(2) 結紮糸留置と細菌塗布後のプラーク, 血清, 肝臓における <i>P.gingivalis</i> の検出	
(3) 高脂肪食摂餌と <i>P.gingivalis</i> 感染後の肝機能	
(4) 高脂肪食摂餌と <i>P.gingivalis</i> 感染後の肝組織像	
実験 4 : 高脂肪食摂餌および <i>P.gingivalis</i> 感染後の血清 endotoxin と CRP 値	
考察	17
謝辞	19
文献	20

緒 言

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD : non-alcoholic fatty liver disease) は予後良好な単純性脂肪肝 (NAFL) と予後不良とされる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH : non-alcoholic steatohepatitis) を含む広範囲の病理組織学的所見からなる疾患概念である^{1,2}。特に NASH は、メタボリックシンドロームにおける肝臓の表現型とされ、肥満や2型糖尿病など複数の重篤な生活習慣病と強く関連すること^{3,4}、さらには肝硬変や肝癌等の肝疾患の終末像へと進行することが報告されている^{5,6}。

NASH の発症・進展機序として 1998 年に提唱された Two-hit theory が現在広く支持されている^{7,8}。まず 1st-hit として肥満や糖尿病に起因する肝細胞への脂肪沈着が起こることで脂肪肝が形成され、そこに肝細胞への障害を引き起こす種々の因子が 2nd-hit として作用することで、肝臓の線維化や炎症などの病態が引き起こされる。また近年、腸内細菌に由来する endotoxin の作用が注目されており、肥満に伴う脂肪肝では lipopolysaccharide に対する感受性が亢進することが知られている^{9,10}。

一方、歯周炎の主要な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は^{11,12,13}、口腔内だけでなく、全身の様々な臓器から検出され、冠血管疾患、糖尿病、関節リウマチなどの全身疾患に対するリスクとなることが報告されている^{14,15,16}。また近年の疫学調査より、*P. gingivalis* が NAFLD/ NASH 患者の口腔内から高頻度で検出されることが報告され、歯周疾患との関連性が示唆されている¹⁷。Furusho ら (2013) は高脂肪食で脂肪肝誘導したマウス上顎臼歯の歯髄から *P.gingivalis* を感染させると、脂肪肝組織において炎症や線維化の促進が観察されたと報告している¹⁸。

以上のことから、*P.gingivalis* 感染もまた NASH 発症に関わる“2nd-hit”となる可能性が指摘されている。しかし、NASH に関係したこれまでの動物実験では、*P.gingivalis* を静脈や歯髄に直接投与する方法が主であった。従って、物理的および生物学的バリアである歯肉上皮に被覆された歯周組織に^{19,20}、*P.gingivalis* が感染し NASH 発症に関与しているか否かについては検証されていない。そこで我々は脂肪肝誘導したラットに、結紮による実験的歯周炎を惹起し、さらに *P.gingivalis* を 2nd-hit として感染させることにより、NASH への進行について検討した。

対象と方法

(1) 動物と実験群

本動物実験は日本歯科大学生命歯学部動物実験委員会により承認 (13-20, 14-07) され、規定に従って実施した。

本研究では、4つの実験を行うため、8週齢 Wistar 系 SPF 雄性ラット (Clea Japan, Osaka, Japan) 52 匹を以下の様に使用した (Fig.1)。

a) 実験 1: ラットの脂肪肝モデルを作製するため、各 5 匹のラットに高脂肪食 (high fat diet: HD; 粗脂肪率 60%, Research Diets No. D12492; Research Diets, New Brunswick, New Jersey), または普通食 (basal diet: BD; 粗脂肪率 10%, Research Diets No. D12450B) を 12 週間与えた。これら 2 群はそれぞれ HD 群および BD 群と定義し、その他の処置は行わなかった。

b) 実験 2: 実験的歯周炎ラットモデルを作成するため、実験 1 と同様に HD を摂餌させたラットを 4 週間飼養後、各 5 匹を ligature (Lig) 群およびコントロール (Cont) 群の 2 群に分けた。Lig 群のラットには、後述するように上顎右側第一臼歯の歯頸部に絹糸を結紮し、実験的歯周炎を誘導した。

c) 実験 3: この実験は HD 摂餌により脂肪肝を誘導、実験的歯周炎を惹起したラットにおいて、歯周組織から侵入した *P.gingivalis* の複合的影響を評価するために行った。BD または HD を摂餌したラットに実験 2 と同様の方法で結紮糸留置を行い、次に一群 6 匹で BD/Lig/Pg (-), BD/Lig/Pg (+), HD/Lig/Pg (-), HD/Lig/Pg (+) の 4 群に分けて実験した。後述するように、*P.gingivalis* を結紮糸周囲に塗布した実験群は Lig/Pg (+) 群と表記した。

d) 実験 4: HD 群における血清中の endotoxin 量と C-reactive protein (CRP) 量に対する *P.gingivalis* の影響を評価するため、実験 3 と同様、一群 4 匹のラットを HD/Lig/Pg (-) と HD/Lig/Pg (+) の 2 群に分けて比較した。

実験動物は、室温 23°C, 湿度 50%, 明暗 12 時間の環境下で飼養し、1 週間ごとに各ラットの体重を測定した。飼養開始 12 週後にラットを 16 時間断食させ、sodium pentobarbital (50 mg/kg) 腹腔内麻酔下で頸動脈より採血を行った。その後、ラットを安楽死させ、右側上顎および肝臓の尾状葉部を採取した。

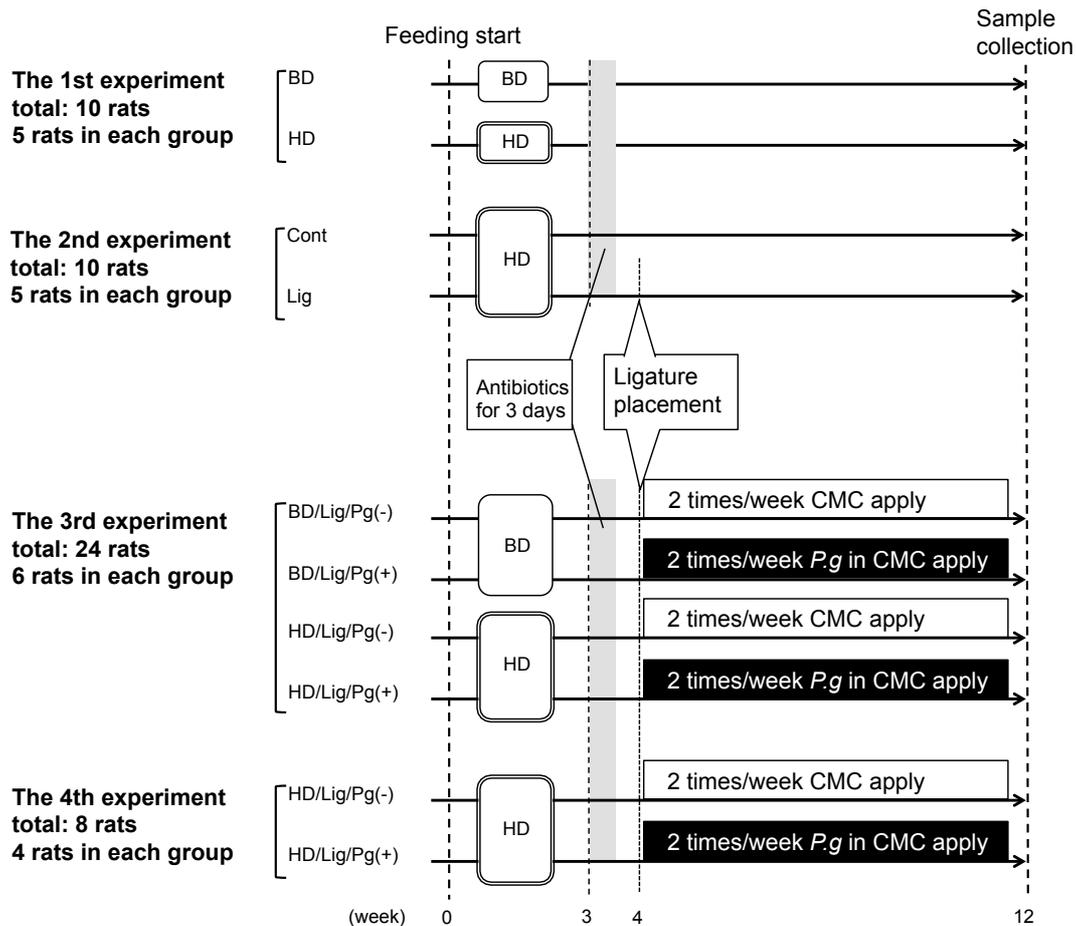


Figure 1. 研究デザイン

BD: basal diet, HD: high-fat diet, Cont: control, Lig: ligature
P.g: *Porphyromonas gingivalis*, CMC: sodium carboxymethyl cellulose.

(2) 上顎臼歯歯頸部への絹糸結紮

摂餌開始から3週後、実験的歯周炎惹起および*P.gingivalis*塗布の前に口腔常在菌数を減少させるため、実験1~4の全てのラットに対し抗菌作用のある sulfamethoxazole (1 mg/mL) および trimethoprim (200 µg/mL) 含有滅菌水を3日間自由摂取させた。その後3日間は体内の薬物排泄のため通常の濾過水を与えた²¹。

実験1の過程で、4週間のHD摂餌により脂肪肝が誘導されたことから、実験2のLig群および実験3と4の全てのラットに対し、摂餌開始から4週後に、以下に示したように結紮による実験的歯周炎惹起の処置を行った。ペントバルビタールナトリウム (Kyoritsu Seiyaku, Tokyo) による全身麻酔下で、橋本式開口器^{22,23} (Nonaka Rikaki, Tokyo) で開口した口腔内の上顎右側第一臼歯 (M1) 歯頸部に3-0絹糸を結紮し、絹糸の結び目をコンポジットレジンで固定した (Fig.2)。

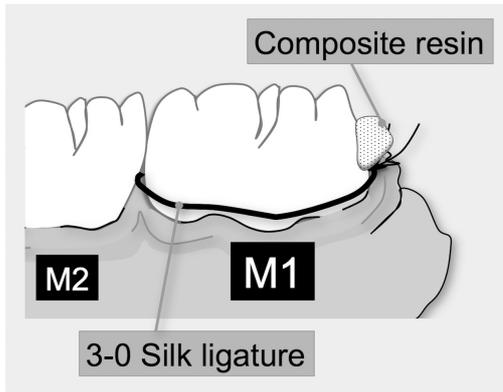


Figure 2. 上顎第一臼歯歯頸部への結紮糸留置

実験的歯周炎を誘導するため、上顎右側 M1 歯頸部に 3-0 絹糸を結紮した。その後、結紮糸の結び目と M1 の近心歯面を、コンポジットレジンを用いて固定した。

(3) *P.gingivalis* 懸濁液の調整と投与

P.gingivalis W83 株を hemin (5 mg/mL) と menadione (0.5 μg/mL) 添加 10%馬脱繊維血液 Brain Heart Infusion 寒天培地 (Becton Dickinson, New Jersey) 上で嫌氣的条件下 (AnearoPack system ; Mitsubishi Gas Chemical, Tokyo, Japan) において 37°Cで 7 日間培養し、その後コロニーを hemin と menadione 添加 Brain Heart Infusion 液体培地中で 37°C, 48 時間培養した。菌懸濁液は、細菌数を分光光度計 (600nm 波長) により O.D.値 0.8 となるよう phosphate buffered saline (PBS) を用いて希釈し、8% sodium carboxymethyl cellulose (CMC; Wako Pure Chemical Industries, Tokyo) と等量混和して使用した²⁴。

実験 3 と 4 において、Lig/Pg (+) 群には結紮から安楽死までの 8 週間、週に 2 回、上述の菌懸濁液 100 μl を M1 の結紮糸周囲に塗布した。対照群である Lig/Pg (-) 群には *P.gingivalis* 未混入の CMC 懸濁液を塗布した。

(4) マイクロフォーカス X 線 CT (μCT) を用いた上顎の解析

採取した右側上顎は 3% para-formaldehyde 液中で pH7.4, 4°C, 48 時間固定し、以下の解析を行った。

ラット右側上顎を μCT system (ELESCAN II; Nittetsu Elex, Tokyo) を用いて撮影した。撮影部位は水平断面を上顎臼歯咬合平面と平行に、矢状断面を臼歯列と平行に、前頭断面を歯軸と平行に位置づけ、M1 と第二臼歯との隣接面接触点を中心として撮影した。撮影条件は、管電圧 80 kV, 管電流 44 mA, 解像度 512×512 ピクセル, スライス厚 30.7 μm, 積算回数 32 とした。撮影後、再校正ソフト (TRI/3D-BON Version7.0; Ratoc System Engineering, Tokyo) を用いて立体構築した 3 次元画像上において、Tokunaga ら (2011) の方法に従い歯槽骨吸収レベルを評価した²⁵。M1 の口蓋側近心部、中央部、遠心部のセメントエナメル境 (cement-enamel junction : CEJ) から歯槽骨頂 (alveolar bone crest : ABC) までの距離を計測し、これら 3 ヶ所の平均値を各ラットの代表測定値とした。

(5) 上顎の組織学的解析

μCT撮影が終了した右側上顎骨を、10% ethylenediaminetetra-acetic acid 液で pH7.2, 4°C, 28 日間脱灰処理し、パラフィン包埋を行った。μCT撮影による 3 次元画像と比較するため M1 遠心口蓋根と第二臼歯近心口蓋根を含む平面と並行に位置付け、マイクロトーム (RM2145; Leica, Hessen, Germany) を用いて口蓋側より矢状断で厚さ 6 μm の連続切片を作製した。標本は通方に従い Haematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行い、観察・撮影には光学顕微鏡 (MICROPHOT-FX; Nikon, Tokyo) を用いた。

(6) 血清パラメーター解析

採取血液を 4°C, 10,000×g, 60 分間の条件で遠心分離し血清を分離後、各測定まで -80°C で保存した。

インスリン抵抗性を評価するため、血清中の空腹時血糖値 (FBG) を HK-G6PDH 法 (Quick-auto neo GLU-HK; Shino-test, Kanagawa, Japan), インスリンを ELISA 法 (ultra-sensitive rat insulin-measuring kit, Morinaga, Tokyo) により測定した。インスリン抵抗性は homeostasis model assessment of insulin resistance (HOMA-IR: $\text{Insulin} \times \text{Glucose} / 405$) を用いて計算した²⁶。

HD 摂餌による全身の血清パラメーターへの影響を評価するため、脂質パラメーターとして、total cholesterol を酵素法 (L-type wako CHO-H; Wako), low-density lipoprotein (LDL) と high-density lipoprotein (HDL) cholesterol を直接法 (Cholestest® LDL/Cholestest® HDL; Sekisui Medical, Tokyo) を用いて測定した。組織損傷マーカーとして lactate dehydrogenase (LDH) と alkaline phosphatase (ALP) を JSCC 標準化対応法 (L-type wako LDH-J/L-type wako ALP-J; Wako) を用いて評価した。また腎機能パラメーターとして creatinine (CRE) と blood urea nitrogen (BUN) 値をそれぞれ酵素法 (L-type wako CRE-M; Wako) と Urease-GLDH 法 (Seiken UN-S; Denka seiken, Tokyo) により測定した。さらに尿酸値は酵素法 (L-type wako UA-M; Wako) により解析した。加えて、全身の炎症評価として Albumin/Globulin (A/G) 比が決定された。Globulin 値は総蛋白質量より Albumin 値を差し引いた値として計算された (Total protein HR-II/Albumin II-HA test wako; Wako)。一般的に、A/G 比は炎症反応に伴い低下することが知られている²⁷。

NASH の病態の一部として肝障害を評価するため、血清 aspartate aminotransferase (AST) と alanine aminotransaminase (ALT) 活性を JSCC 標準化対応法 (L-type wako GOT-J2/L-type wako GPT-J2; Wako) により測定した。

さらに実験 4 の HD 摂餌ラットにおいて、HD/Lig/Pg (-) 群および HD/Lig/Pg (+) 群の血清中の endotoxin を Endospecy ES-50M Set (SEIKAGAKU Corporation, Tokyo) を用いて

測定し, CRP を Rat CRP ELISA Kit (Immunology Consultants Laboratory, Portland, Oregon) を用いて測定した。

(7) 肝臓の組織学的評価

肝臓は 3% para-formaldehyde 液中において pH7.4, 4°C, 24 時間の組織固定後にパラフィン包埋および凍結包埋を行った。その後, 厚さ 5 μm パラフィン切片を H-E 染色と線維染色 (Azan-mallory; Muto Pure Chemicals, Tokyo), またクライオスタット (CM3050S; Leica, Hessen, Germany) を用いて作成した肝臓の 8 μm 凍結切片を脂肪染色 (Sudan III; Muto Pure Chemicals) した。脂肪染色像では, 中心静脈を中心とした各サンプルの任意の部位 3 カ所 (200 倍視野, 346×260 μm) において, オレンジ色に染色された脂肪沈着部の面積を画像解析ソフトウェア Image J を用いて測定した²⁸。さらに肝臓の病理学的評価のため, H-E 染色および Sudan 染色像において, NAFLD activity score (NAS) を Kleiner et al. (2005) の定義に従い評点した²⁹。NAS は肝臓における steatosis, lobular inflammation および cell injury (ballooning) の 3 項目からなる各スコアの合計値 (total NAS) を各ラットで算出した。NAS は実験群内の平均値と標準偏差で表した (n = 6)。

(8) 歯肉縁下プラーク, 血清および肝臓からの *P.gingivalis* の検出

細菌学的評価のため, 実験開始と安楽死の時点で歯肉縁下プラークを採取した。1 部位あたり 1 本のペーパーポイントを用いて M1 口蓋側歯肉溝内に 3 回挿入し, 10 秒間保持した後, PBS 300 μl を分注したマイクロチューブに回収した。

歯肉縁下プラーク, 血清, 肝組織における *P.gingivalis* の分布を確認するため, 各サンプルから QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて DNA を抽出した。続いて 16S ribosomal RNA 上の配列に対応した Taqman MGB probes and primers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts; Table 1.) を用いて real-time polymerase chain reaction (PCR) を行い, *P.gingivalis* および総細菌数を測定した。増幅反応は, 抽出 DNA, プライマーとプローブを混合した Taqman® Fast Advanced Master Mix (Thermo) 中で, StepOnePlus™ Real Time PCR system (Thermo) を用いて以下の条件で行った: Holding 後 (95°C, 20 分間), 40 サイクル (95°C, 1 分間; 60°C, 20 分間)。データは, StepOne™ software ver.2.1 (Thermo) を使用して解析した。*P.gingivalis* と総細菌数の絶対定量を行うため, 既知濃度の各 DNA を 10 倍ずつ連続希釈し標準曲線を作成した。細菌の検出限界は 100 cell/sample であり, *P.gingivalis* と総細菌数の Cycle threshold 値間の変動係数は, それぞれ平均 1.4% (ranged from 0.9 to 2.0%) と 1.4% (ranged from 0.6 to 3.2%) であった。

Table 1. Taqman probe and primer

Target		Sequence (5'-3')
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		
	Forward primer	CTTGACTTCAGTGGCGGCAG
	Reverse primer	TCAGTCGCAGTATGGCAAGCT
	probe	TGAAATGCATAGATATCACG
Universal (total bacteria)		
	Forward primer	TGCGGGACTTAACCCAACA
	Reverse primer	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
	probe	CACGAGCTGACGACARC*

* "R" indicates mixed sequence of A and G bases.

(9) 統計解析

実験3と同様の実験手順で行った予備実験のデータを基に、解析ソフトウェア G*Power 3 を用いて検定力分析を行った。サンプルサイズの計算には、CEJ-ABC 間距離と血清 ALT 値に対する 4 群間の平均値および標準偏差を用い³⁰、2 つの変数に対する効果量は、それぞれ 1.05 と 1.24 であった。サンプルサイズは、 α エラー 0.05 で検定力 0.8 を得るために正規分布を仮定して計算し、一元配置分散分析を用いたときに、各群最小 4 匹のラットを必要とした。

各測定データにおける分布の正規性を Kolmogorov-Smirnov 検定により確認した。その後、4 群間の比較については一元配置分散分析と Tukey test による多重比較検定を、2 群間比較には student's t-test 検定を用いた。また NAFLD activity score は非正規分布を示すデータとして、Kruskal-wallis *H*-test と Mann-Whitney *U*-test with Bonferroni correction を用いた。全ての統計処理は解析ソフトウェア (SPSSver.15.0 j.; IBM, Chicago, Illinois) を用いて行い、有意水準 5%未満の場合を有意差ありとした。結果は mean \pm SD で示す。

結 果

実験 1：HD 摂餌による血清パラメーターの変化と脂肪肝誘導

HD 摂餌開始から 7 週目以降, BD 群に比べ, HD 群では体重の有意な増加が認められた (Fig. 3A)。摂餌開始 12 週後, HD ラットの体重は, BD ラットに比べ約 7% 増加した ($P < 0.05$; $n = 5$: t -test)。

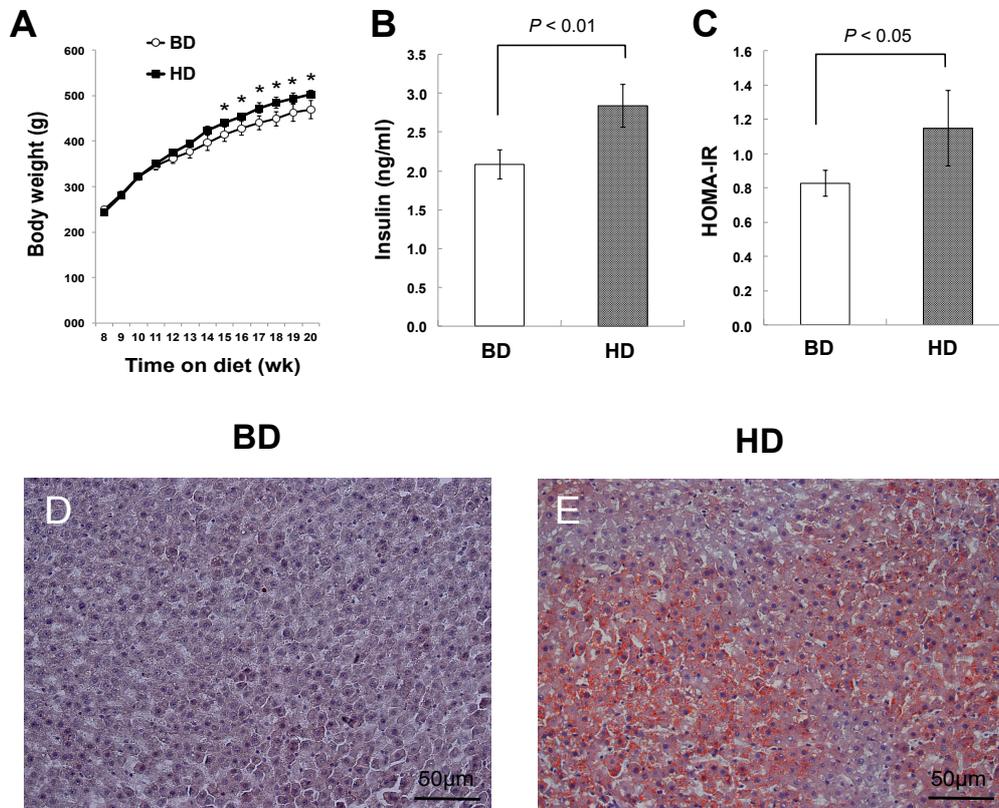


Figure 3. HD 摂餌後の体重, インスリン抵抗性と脂肪肝誘導

HD 摂餌の影響を評価するため, ラットに HD (60% fat, 20% carbohydrate, 20% protein) を 12 週間摂餌させた; HD 群。一方, コントロール飼料 (10% fat, 70% carbohydrate, 20% protein) を摂餌したラットは BD 群と定義した。HD の評価として, (A) 体重 ($* p < 0.05$) と (B) 血清の空腹時インスリン値, および (C) HOMA-IR (Insulin \times Glucose/405) が計測された。また, (D, E) Sudan III 染色による肝小葉内の脂肪染色像を観察した。

摂餌開始12週後、血清インスリン値 (Fig. 3B) と HOMA-IR (Fig. 3C) は、BD群に比べ HD群で有意に高かった。また HD群の血清 ALT 値 ($P<0.01$) は、BD群に比べて有意に高かった (Table 2)。ALT は肝臓に特異的に存在する酵素であり、肝細胞の変性や壊死により血液中に流出するため、一般に肝障害マーカーとして用いられる。他の生化学パラメーターについては、HD群で A/G 比 ($P<0.05$) が有意に減少したが、空腹時血糖値やコレステロール値などに有意な変化は認められなかった。

肝臓の脂肪染色像 (Sudan III) においては、Fig. 3D と E に示す様に、HD群の肝組織で肝細胞への顕著な脂肪沈着が観察された。

Table 2. The effect of High-fat diet on serum biochemical parameters

		BD	HD
FBG	(mg / dL)	162.4 ± 13.2	166.2 ± 18.8
T-CHO	(mg / dL)	76.2 ± 6.5	72.6 ± 10.1
LDL	(mg / dL)	6.60 ± 0.89	7.60 ± 2.41
HDL	(mg / dL)	19.2 ± 0.84	20.2 ± 2.77
LDH	(IU / L)	294.2 ± 88.1	291.2 ± 72.8
ALP	(IU / L)	238.0 ± 43.1	396.8 ± 181.2
AST	(IU / L)	72.4 ± 6.7	78.2 ± 7.3
ALT	(IU / L)	27.2 ± 3.8	40.2 ± 7.0 ¶
CRE	(mg / dL)	0.49 ± 0.06	0.43 ± 0.06
BUN	(mg / dL)	19.5 ± 3.7	18.10 ± 5.0
UA	(mg/dL)	1.54 ± 0.43	1.36 ± 0.66
A/G ratio		2.70 ± 0.12	2.35 ± 0.27 †

FBG: fasting blood glucose,
LDL: low-density lipoprotein,
LDH: lactate dehydrogenase,
AST: aspartate aminotransferase,
CRE: creatinine,
UA: Uric Acid,

T-CHO: total cholesterol,
HDL; high-density lipoprotein,
ALP: alkaline phosphatase
ALT: alanine aminotransferase,
BUN: Blood urea nitrogen,
A/G ratio: Arbumin/Globurin ratio

¶ $p < 0.01$; significant difference compared with Lean-group.

† $p < 0.05$; significant difference compared with Lean-group.

実験 2：結紮糸留置による実験的歯周炎惹起

実験的歯周炎処置から 8 週後の μ CT 画像における、CEJ-ABC 間距離の測定結果を示す (Fig.4A, B, C)。Lig 群において、上顎右側 M1 への絹糸結紮により、明らかな歯槽骨の破壊が認められた (Fig.4D)。Lig 群の CEJ-ABC 間距離は Cont 群に比べ 1.9 倍有意に増加した (Cont 群: 572.2 ± 26.7 versus Lig 群: $1098.0 \pm 58.9 \mu\text{m}$; $P < 0.001$, t-test; $n = 5$)。

歯周組織への実験的歯周炎の影響を観察するため、上顎の組織学的解析を行った。Lig 群では Cont 群と比較して、CEJ-接合上皮間距離が延長し、アタッチメントロスが生じた (Fig. 4F)。また、Lig 群では上皮の肥厚と上皮下炎症細胞浸潤が観察されたが、Cont 群では同様の所見は認められなかった (Fig. 4E)。

実験 3：結紮により惹起した実験的歯周炎における *P.gingivalis* 感染の影響

(1) 結紮糸留置と *P.gingivalis* 懸濁液塗布による実験的歯周炎惹起

BD または HD を摂餌させたラットの M1 結紮糸周囲に、*P.gingivalis* 懸濁液を週 2 回塗布した。

Fig. 5 A, B に示す口腔内写真は、実験的歯周炎処置から 8 週後に観察した HD 群の代表的な所見である。HD/Lig/Pg (+) 群では HD/Lig/Pg (-) 群に比べ、辺縁歯肉においてより重度な発赤と腫脹が認められた。

Fig.5C, D に右側上顎の μ CT 画像を示し、CEJ-ABC 間距離をグラフで Fig. E に示した。*P.gingivalis* 懸濁液の塗布は、BD と HD の両群において明らかに歯槽骨の吸収を増悪させた。BD/Lig/Pg (+) 群は BD/Lig/Pg (-) 群に比べ 15.7% ($P < 0.01$, Tukey test; $n = 6$)、HD/Lig/Pg (+) 群では HD/Lig/Pg (-) 群に比べ 20.9% ($P < 0.001$) 有意に歯槽骨の吸収量が増加した。さらに、HD/Lig/Pg (+) 群は BD/Lig/Pg (+) 群に比べ 12.0% ($P < 0.05$) 有意な骨吸収の亢進が認められた。

M1 に結紮糸を留置した歯周組織への、*P.gingivalis* 懸濁液塗布の影響を組織学的に観察した。BD 群と HD 群のいずれにおいても、Lig/Pg (+) 群では Lig/Pg (-) 群と比較して、CEJ-接合上皮間距離が延長し、より大きなアタッチメントロスが生じていた (Fig.5F, G)。また、Lig/Pg (+) 群では Lig/Pg (-) 群に比べ、より強い上皮の肥厚、上皮下炎症細胞浸潤、コラーゲン線維走行の乱れと、破骨細胞による歯槽骨吸収像が観察された (Fig. 5H, I)。

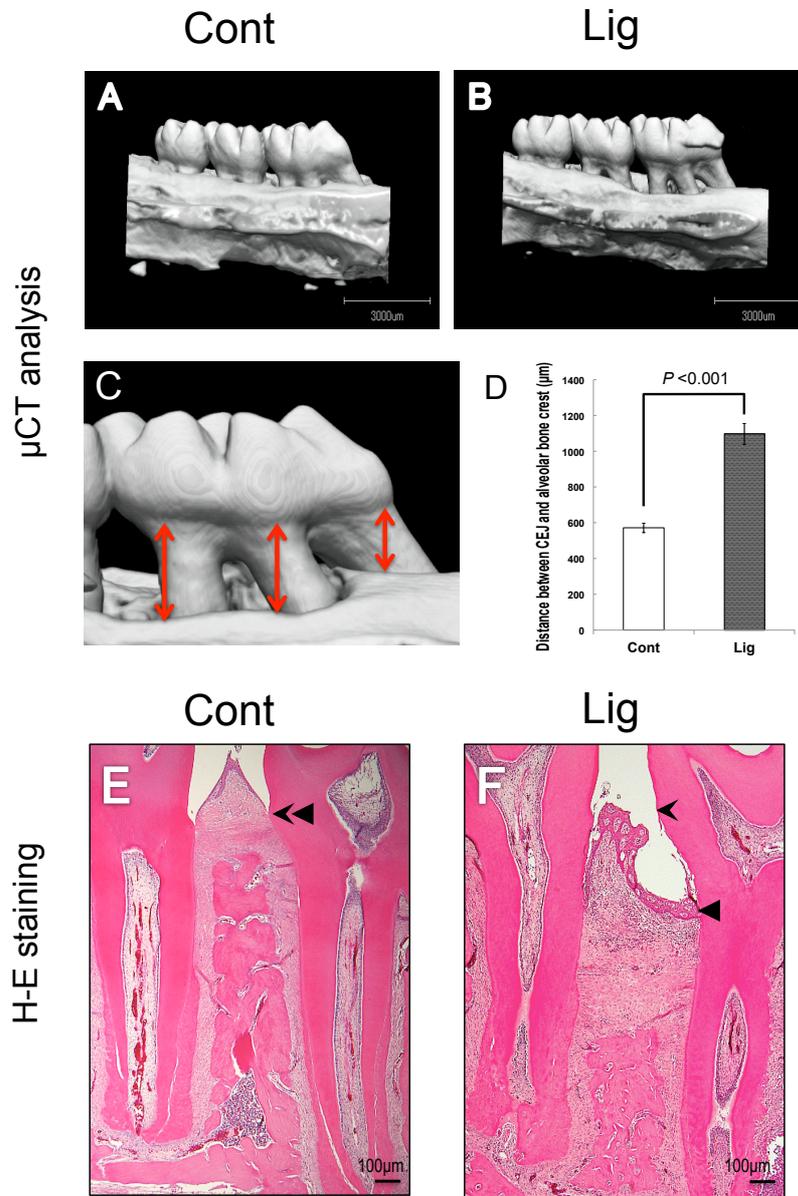


Figure 4. 結紮による実験的歯周炎の惹起

事前にHDを4週間摂餌させたラットの上顎右側M1に3-0絹糸を結紮した; Lig群。Cont群には麻酔処置のみを行った。μCT撮影より得られた(A, B)3D画像上で、(C)M1口蓋側の3点(近心, 中央部, 遠心)における(D)CEJ-ABC間距離の平均値を定量的に計測した。データはMean±SDで表した(n=6)。上顎右側臼歯列のH-E染色像を観察すると、(E)Cont群と比較して、(F)Lig群では、アタッチメントロスが生じ、上皮下炎症細胞浸潤が認められた(forked arrowhead: CEJ, triangle arrowhead: epithelial junction)。

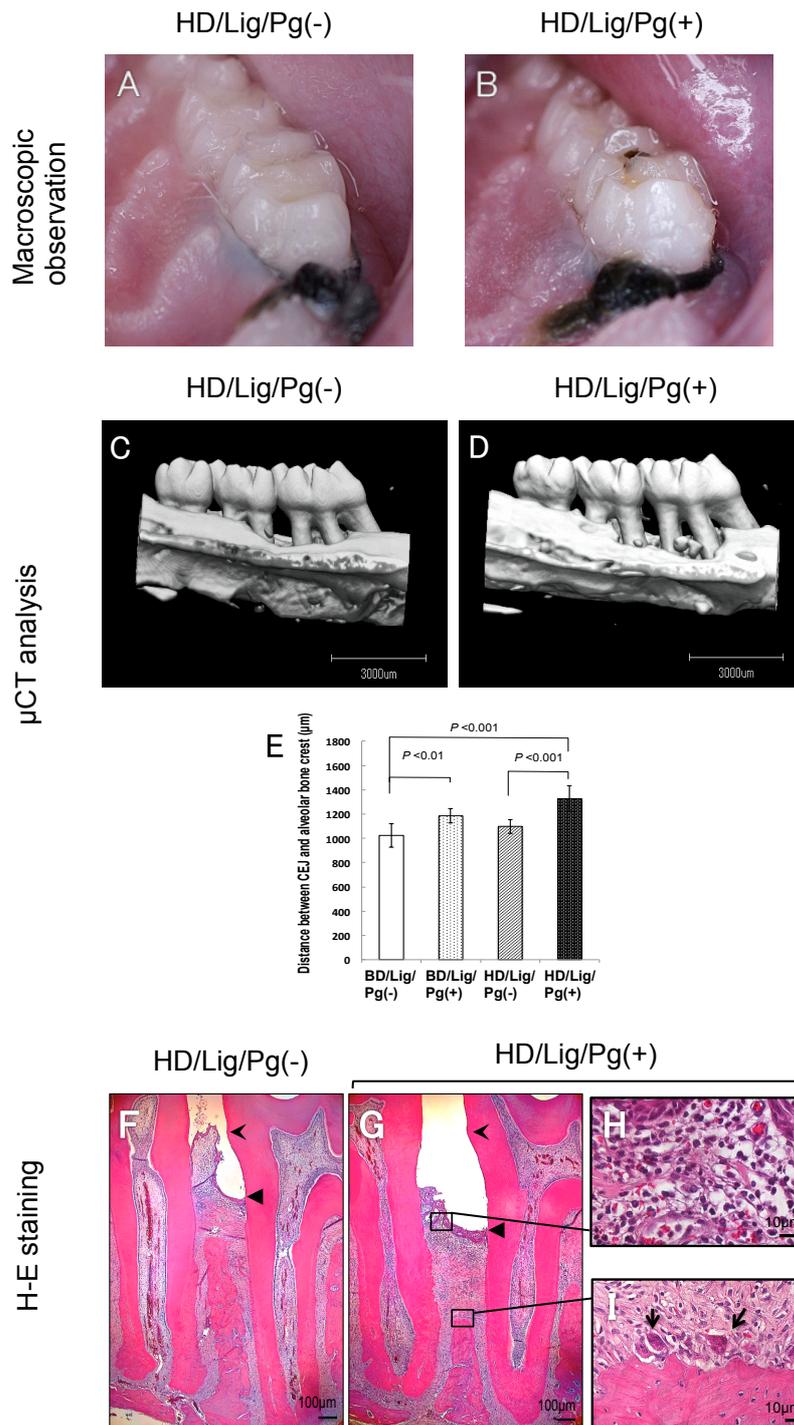


Figure 5. 結紮により惹起した実験的歯周炎への *P.gingivalis* 感染

飼育開始 12 週後、上顎右側臼歯列を写真撮影 (A; Lig/Pg (-) 群, B; Lig/Pg (+) 群) し、μCT 解析から得た 3D 画像上 (C; Lig/Pg (-) 群, D; Lig/Pg (+) 群) で、M1 口蓋側の (E) CEJ-ABC 間距離を定量的に計測した。データは Mean ± SD で表した (n = 6)。上顎右側臼歯列の H-E 染色像を観察すると、(F) Lig/Pg (-) 群と比較して、(G) Lig/Pg (+) 群では、より大きなアタッチメントロスと上皮下炎症細胞浸潤の亢進、歯肉線維の破壊が認められた (forked arrowhead: CEJ, triangle arrowhead: epithelial junction)。Lig/Pg (+) 群の黒枠部を拡大すると、(H) リンパ球を主とした炎症細胞浸潤および (I) 歯槽骨頂部での破骨細胞 (round-tipped arrow) の出現が認められた。

(2) 結紮糸留置と細菌塗布後のプラーク、血清、肝臓における *P.gingivalis* の検出

M1 の結紮糸周囲に塗布した *P.gingivalis* の体内分布を検索するため、プラーク、血清、肝臓より抽出した DNA を real-time PCR を用いて解析した (n = 6)。結果は総細菌数に対する *P.gingivalis* の割合として表した。細菌塗布前には、ラットのプラーク中に *P.gingivalis* は検出されなかったが、処置開始から 8 週後のプラーク中には $17.0 \pm 13.3\%$ の *P.gingivalis* が検出された。一方、血清および肝臓からは検出されなかった (検出閾値 : 5 cells/ μ l of serum, 40 cells/g of liver, data not shown)。これらの結果は、塗布した *P.gingivalis* が M1 周囲のプラークに定着したことを明らかにしたが、本法では血中、肝臓への分布は確認できなかった。

(3) HD 摂餌と *P.gingivalis* 感染後の肝機能

細菌塗布により歯周組織の病態が進行したことから、*P.gingivalis* 感染した HD ラットの肝機能検査を実施した。

結紮糸留置と *P.gingivalis* の塗布開始から 8 週後に、血清の ALT と AST 活性値を計測した (Fig. 6)。HD/Lig/Pg (-) 群と HD/Lig/Pg (+) 群の血清 ALT 値は ($P < 0.05$, Tukey test; n = 6), BD/Lig/Pg (-) 群に比べて 35.5% と 48.1% それぞれ有意に高かった (Fig. 6A)。また BD/Lig/Pg (+) 群および HD/Lig/Pg (+) 群の ALT 値は、BD/Lig/Pg (-) 群および HD/Lig/Pg (-) 群と比べてそれぞれ高い値を示したが、有意差はなかった。一方で、血清 AST 値にはこれら群間における有意差は認められなかった。しかし student's t-test を用いてこれを解析すると、HD/Lig/Pg (+) 群の AST 値は HD/Lig/Pg (-) 群に比べ、20% 有意に高くなる傾向が認められた (Fig. 6B)。

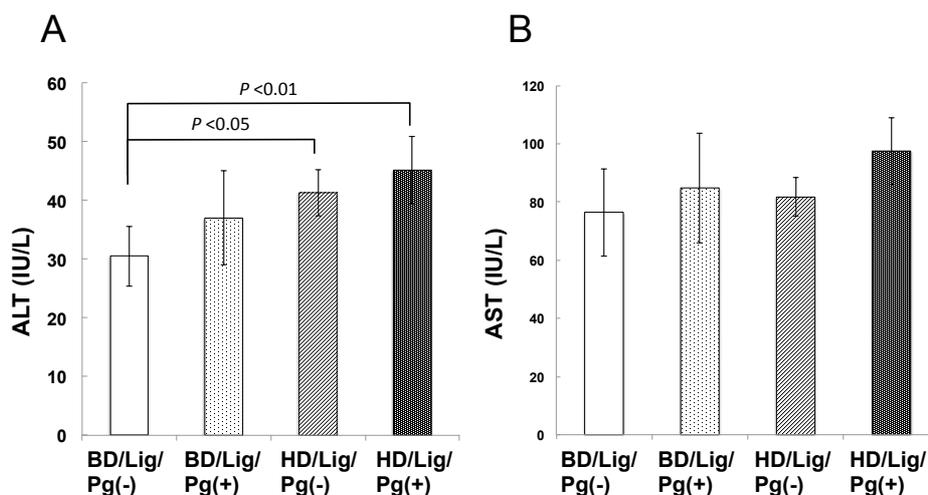


Figure 6. HD 摂餌と *P.gingivalis* 感染後の血清肝機能パラメーター

BD または HD の摂餌開始から 12 週後、血清中の (A) ALT, (B) AST を酵素活性測定法により計測した。データは Mean \pm SD で表した (n = 6)。

(4) HD 摂餌および *P.gingivalis* 感染後の肝組織像

NASH の診断を行うため、肝組織の H-E 染色像における中心静脈周囲の炎症と脂肪沈着を観察した (Fig.7)。HD/Lig/Pg (-) 群では中心静脈周囲に軽度の脂肪沈着、小滴性脂肪と少数の好中球浸潤が観察された (Fig. 7A)。これに対し、HD/Lig/Pg (+) 群においては、中心静脈周囲に中等度の脂肪沈着と多数の大滴性脂肪形成、そして好中球浸潤を伴う 2 から 4 箇所の巣状肝細胞壊死を認めた (Fig. 7B)。さらに、HD/Lig/Pg (+) 群の小葉間部の拡大像 ($\times 400$) では、Mallory 小体を含む多数の肝細胞風船様変性が認められた (Fig. 7C, D, E)。HD/Lig/Pg (+) 群で観察されたこれらの所見は、HD 摂餌と *P.gingivalis* 感染によりラット肝臓が、NASH へと進行したことを示唆している。

脂肪変性および脂肪滴の程度を評価するため、凍結切片の SusanIII 染色を行った。HD/Lig/Pg (+) 群の肝組織像では、HD/Lig/Pg (-) 群に比べ中心静脈周囲における多数の大滴性脂肪形成が明瞭に観察された (Fig. 8A, B)。さらに Image J を用いた脂肪沈着の染色領域を解析すると、HD/Lig/Pg (+) 群では、肝臓の脂肪沈着が 48% ($P < 0.001$, Tukey test; $n = 6$) 有意に増加することが明らかになった (Fig. 8C)。

また、肝線維化を評価するため、Azan-mallory 染色像を観察したが、HD/Lig/Pg (-) 群と HD/Lig/Pg (+) 群のいずれにおいても、中心静脈周囲および肝細胞周囲の線維化は観察されなかった (Fig. 8D, E)。

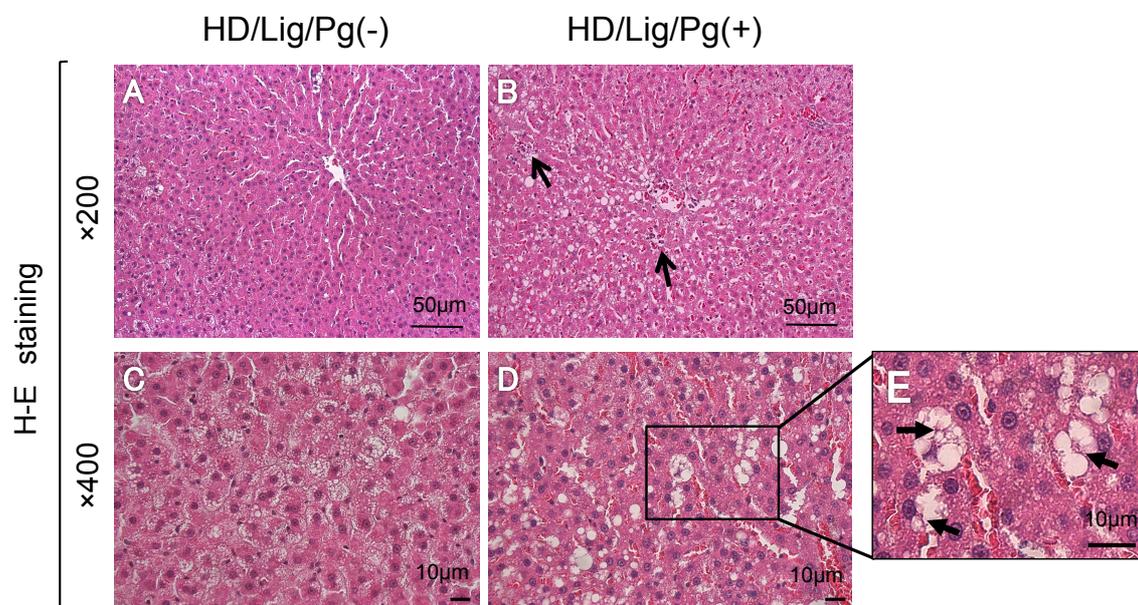


Figure 7. HD 摂餌と *P.gingivalis* 感染後の肝組織における肝組織の H-E 像

HD/Lig/Pg (-) 群 (A; $\times 200$, C; $\times 400$) と HD/Lig/Pg (+) 群 (B; $\times 200$, D; $\times 400$) の肝臓を採取し、肝臓中心静脈周囲の H-E 染色像を観察した。(B) HD/Lig/Pg (+) 群では巣状肝細胞壊死 (arrow) が認められ、(E) 小葉間部の拡大像に、マロリー小体 (arrow) を含む孤立性の肝細胞風船様変性が観察された。

各群における NAFLD activity score (NAS) の度数分布は, HD 摂餌と実験的歯周炎惹起組織への *P.gingivalis* 塗布が脂肪肝から NASH への進行を促進させることを示した (Table 3.)。また, HD/Lig/Pg (+) 群の total NAS は HD/Lig/Pg (-) 群に比べ, 有意に高かった (HD/Lig/Pg (-) 群: 2.17 ± 0.75 versus HD/Lig/Pg (+) 群: 4.83 ± 1.47 ; $P < 0.01$, Tukey test; $n=6$)。一般に人の診断において, total NAS が 5 以上の個体は NASH と診断しうることが示されている (Kleiner ら 2005)²⁹。本研究では total NAS が 5 以上のラットは, HD/Lig/Pg (+) 群のみに存在した。

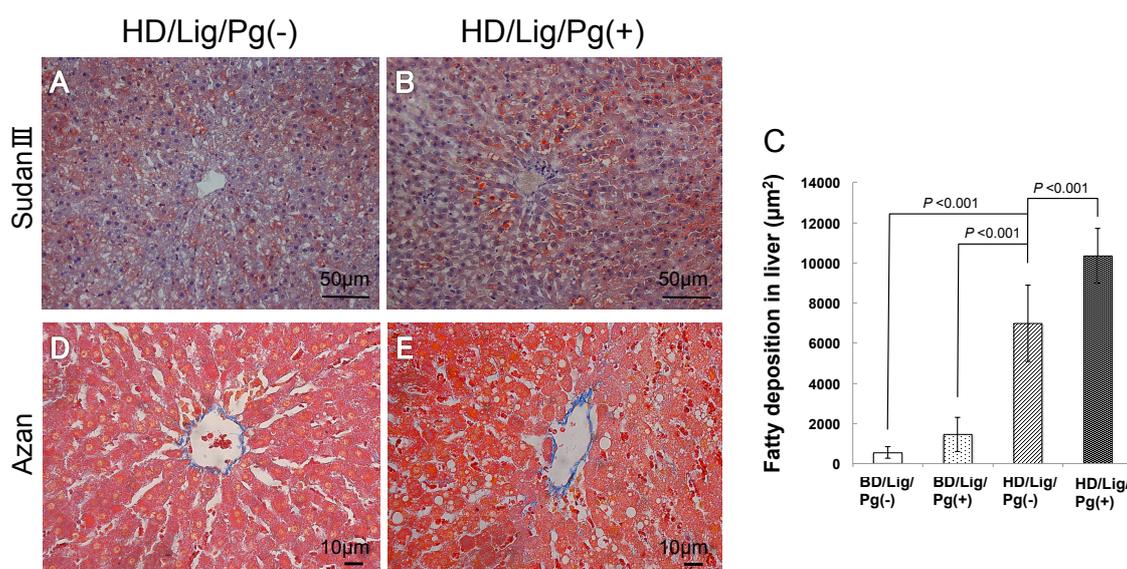


Figure 8. HD 摂餌と *P.gingivalis* 感染後の肝組織における脂肪および線維染色像

SudanIII 染色による脂肪染色像 (A; HD/Lig/Pg (-) 群, B; HD/Lig/Pg (+) 群) が観察された。またランダムに選択した 3 カ所において, (C) オレンジ色に染色された部分の面積を Image J を用いて定量的に計測した。データは Mean \pm SD で表した ($n=6$)。Azan-mallory 染色像 (D; HD/Lig/Pg (-) 群, E; HD/Lig/Pg (+) 群) を観察した。

Table 3. The frequency distribution of NAFLD activity score (NAS) in rat liver

Histological finding (Score)	BD/Lig/Pg(-) (n=6)	BD/Lig/Pg(+) (n=6)	HD/Lig/Pg(-) (n=6)	HD/Lig/Pg(+) (n=6)
Steatosis				
<5%	(0) 6	3	0	0
5-33%	(1) 0	3	6	3
33-66%	(2) 0	0	0	3
>66%	(3) 0	0	0	0
Lobular Inflammation				
NO foci	(0) 6	1	1	0
<2 foci per 200 field	(1) 0	4	5	3
2-4 foci per 200 field	(2) 0	1	0	2
>4 foci per 200 field	(3) 0	0	0	1
Cell injury - Ballooning				
None	(0) 6	5	4	0
Few balloon cells	(1) 0	1	2	4
>4 balloon cells	(2) 0	0	0	2

NAFLD activity score (NAS) was scored according to the criteria of Kleiner et al. (2005).

実験 4 : HD 摂餌および *P.gingivalis* 感染後の血清 endotoxin と CRP 値

血清の endotoxin 量は HD/Lig/Pg (+) 群において, HD/Lig/Pg (-) 群と比べて, 2.4 倍 ($P<0.01$, t-test ;n = 4) 有意に高い値を示した (Fig. 9A)。

また, HD/Lig/Pg (+) 群の CRP は, HD/Lig/Pg (-) 群より 17% ($P<0.01$) 有意に増加することが認められた (Fig. 9B)。CRP は, tumor necrosis factor- α や interleukin 6 の刺激を受けた肝細胞によって生成されるバイオマーカーである。

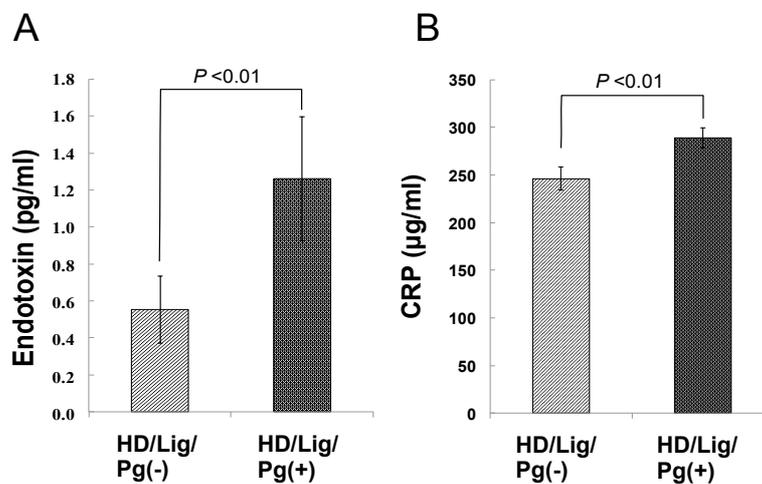


Figure 9. HD 摂餌と *P.gingivalis* 感染後の血清 endotoxin と CRP 値の解析

HD の摂餌開始から 12 週後, HD/Lig/Pg (-), HD/Lig/Pg (+) 群における血清の (A) endotoxin と (B) CRP をそれぞれ酵素比色法と ELISA により測定した。データは Mean \pm SD で示した (n=4)。

考 察

過去の研究で報告されたように、高脂肪食を摂餌させた多くの齧歯類モデルでは、体重増加や^{31,32}、血中インスリン値の増加およびインスリン抵抗性を容易に誘導することができる^{26,33}。本研究の高脂肪食摂餌による HD 群においても、BD 群のラットと比べて、体重増加と血中インスリン値および HOMA-IR の有意な上昇が観察された (Fig.3A, B, C)。また、高脂肪食を 12 週間摂餌させたラットでは、軽度な脂肪肝形成が観察され (Fig. 3D)、この結果は Anstee ら (2006) の報告と一致していた³²。

一方、酸化ストレス、インスリン抵抗性、アディポカインなど種々の因子が NASH の病態に関連することが報告されている^{3,34}。しかし、一般的には NASH の発症や進行にどのような因子が中心的役割を果たしているかは明確にされていない。それゆえ、NASH の発症メカニズムを解明することは、その予防と治療戦略を立案する上で有用となる。

慢性歯周炎において *P.gingivalis* は、少量でもその進行に関与する key stone と呼ばれる細菌グループの 1 つであり^{12,13}、本菌の有する LPS や様々なタンパク分解酵素は、歯周病原因子としてだけでなく、種々の全身疾患に関与することが知られている^{14,35}。近年 Yoneda ら (2012) は、NASH 患者から採取した唾液中に、健常者に比べより高頻度に *P.gingivalis* が検出されること、そして *P.gingivalis* 感染が NASH に対するリスクファクターであることを報告している¹⁷。過去の動物実験においても、高脂肪食を与えた齧歯類モデルへの *P.gingivalis* の静脈注射¹⁷や歯髄への直接投与¹⁸により、脂肪性肝炎が増悪したことが報告されている。しかし、これらの実験系は、*P.gingivalis* 感染により惹起された歯周疾患モデルを再現し、検証したものではない。

健全な歯周組織の歯肉上皮は血管を含めた結合組織を覆っており、歯根面に付着したバイオフィルムの侵入を阻んでいる^{19,20}。また、病的な歯周組織では、歯肉上皮における組織透過性の増加と微小潰瘍形成により、細菌学的産物の侵入が容易になる^{36,37}。多くの報告が、*P.gingivalis* を含む口腔内細菌は健全な歯周組織を介して、持続的に循環系へ流入する手段を持たないことを示唆している^{38,39}。それゆえ、我々は本研究において、上顎臼歯歯頸部への絹糸結紮により惹起した実験的歯周炎に *P.gingivalis* を感染させる方法を選択した。塗布した *P.gingivalis* は HD/Lig/Pg (+) 群のプラーク中に残存していたが、血液および肝組織中からは検出されなかった。

臼歯周囲歯肉溝への結紮糸留置は、齧歯類モデルにおいて、実験的歯周炎を惹起するために従来から用いられてきた手法である⁴⁰。また、結紮に加えて *P.gingivalis* や他のグラム陰性細菌に感染した齧歯類モデルでは、より重度な水平性骨吸収を生じるといいう、明確なエビデンスも存在している^{41,42}。本研究においても同様に、M1 への結紮は、

未処置のラットに比べて重度の歯槽骨吸収を引き起こした (Fig.4)。さらに、臼歯への結紮と *P.gingivalis* 塗布の複合は、*P.gingivalis* を伴わない結紮単独に比べて、歯周組織の炎症と骨吸収を明らかに増悪させた (Fig.5)。細菌塗布によるこれら病態の進行は、歯周組織に *P.gingivalis* 感染が生じたことを示唆している。

P.gingivalis 感染による NASH への進行は、HD 群で確認されたが、BD 群では変化は認められなかった (data not shown)。この結果は、HD 誘導脂肪肝と歯周炎を介した *P.gingivalis* 感染が協同的に NASH の発症リスクを増加させたことを示す。

2012 年、Yoneda らは HD を摂餌させたマウスへの *P.gingivalis* 頸静脈投与が、血中の ALT 値を増加させ、肝臓における脂肪沈着を亢進させたと報告している¹⁷。さらに、Furusho ら (2013) は、HD 誘導による脂肪肝モデルマウスの歯髓腔より *P.gingivalis* の生菌を投与した時、*P.gingivalis* 感染のない Control と比べて、肝細胞への脂肪沈着と限局的線維化が亢進したことを報告している¹⁸。これらの所見は、実験的歯周炎モデルを用いた本研究の結果と、組織学的・生化学的に一致している。しかし、我々の動物モデルでは肝臓に線維化までは生じなかった。線維化は診断の必須所見ではないが、NASH の病期を規定する因子である。この線維化の有無は *P.gingivalis* を直接投与した場合と局所から感染させた場合との、体内における細菌の量的な差異を反映したものと推察される。

一方で、普通食を摂餌したマウスへの *P.gingivalis* 経口投与が、歯周疾患の発症なしに、肝臓の脂肪沈着とトリグリセリド量を増加させたとの報告もある⁴³。しかし本研究では、普通食はもとより高脂肪食を摂餌し M1 に結紮していないラットの歯周組織に *P.gingivalis* の投与を行っても、歯周炎は発症せず、血中の ALT および AST の増加も観察されなかった (CEJ-ABC 間距離: $621.5 \pm 29.9 \mu\text{m}$, ALT: $34.3 \pm 4.8 \text{ IU/L}$, AST: $69.8 \pm 13.9 \text{ IU/L}$)。さらに、肝臓組織像においても、脂肪沈着や炎症細胞浸潤をほとんど認めなかった (NAS: 2.33 ± 1.51)。これら本研究の結果は少なくとも NASH への進行においては歯周炎と *P.gingivalis* 感染の両者が重要な因子となっていることを強く示唆している。

NASH 進行のメカニズムを考える上で、血液と肝臓より *P.gingivalis* が有意な量検出されなかったことから、*P.gingivalis* に由来する他の病原因子 (炎症性 cytokine, protease, endotoxin など) も介在している可能性が示唆された。従来から腸内細菌由来の endotoxin 血症が NASH の病態に関与することが指摘されている^{9,10}。さらに Imajo ら (2012) は高脂肪食誘導下脂肪肝では、レプチン-STAT3 シグナルを介した CD14 の発現増加により、微量 LPS に対する感受性が亢進していると報告している⁴⁴。この endotoxin 血症は腸管細菌に由来するだけでなく、ブラッシングの中断によるバイオフィルムの蓄積と歯肉炎によっても、endotoxin 血症を惹起することが知られている⁴⁵。本研究では、*P.gingivalis* 感染により、血中 endotoxin 量と CRP 量が増加した (Fig. 9)。

我々の研究で用いた臼歯への結紮糸留置はそれ自体が基本的な実験的歯周炎モデルである。しかし、この結紮糸留置に付加した *P.gingivalis* 感染は、歯周組織はもとより全身への総合的な負荷を引き起こしている。それゆえに、本研究で実施した結紮と *P.gingivalis* による炎症惹起は、それぞれの因子が個別に肝臓に影響を与えるのではなく、相互に作用し合って複合的に脂肪肝から NASH への進行を促進していると考えられる。

結論として、実験的歯周炎惹起組織を介した *P.gingivalis* 感染が、高脂肪食誘導脂肪肝ラットにおける NASH への進行を促進させることを、本研究は明らかにした。さらに我々はまた、*P.gingivalis* 感染後の endotoxin 血症が、歯周炎と NASH の関係性における潜在的な因子となる可能性も示唆した。

謝 辞

本研究の遂行について多大な御指導、御鞭撻を賜りました、日本歯科大学生命歯学部歯周病学講座 沼部幸博教授をはじめ講座員の先生方、ならびに日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター 戸円智幸講師、深田哲也助教に感謝の意を表します。

すべての著者は本論文の著者および出版について、開示すべき利益相反関係にありません。

文 献

1. Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB, Oh BJ. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin Proc* 1980;**55**:434-438.
2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;**16**:1221-1231.
3. Sanyal AJ. NASH: a global health problem. *Hepatol Res* 2011;**41**:670-674.
4. Leite NC, Villela-Nogueira CA, Pannain VLN *et al*. Histopathological stages of nonalcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes: prevalences and correlated factors. *Liver Int* 2011;**31**:700-706.
5. Liou I, Kowdley KV. Natural history of nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Gastroenterol* 2006;**40**:11-16.
6. Abdelmalek MF, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease as a complication of insulin resistance. *Med Clin North Am* 2007;**91**:1125-1149.
7. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two “hits”? *Gastroenterology* 1998;**114**:842-845.
8. Day CP. Pathogenesis of steatohepatitis. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2002;**16**:663-678.
9. Wigg AJ, Roberts-Thomson IC, Dymock RB, McCarthy PJ, Grose RH, Cummins AG. The role of small intestinal bacterial overgrowth, intestinal permeability, endotoxemia, and tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of nonalcoholic steato-hepatitis. *Gut* 2001;**48**:206-211.
10. Farhadi A, Gundlapalli S, Shaikh M *et al*. Susceptibility to gut leakiness: a possible mechanism for endotoxaemia in non- alcoholic steatohepatitis. *Liver Int* 2008;**28**:1026-1033.
11. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. Microbial complexes in subgingival plaque. *J Clin Periodontol* 1998;**25**:134-144.
12. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012;**10**:717-725.
13. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA *et al*. Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host Microbe* 2011;**10**:497-506.
14. Seymour GJ, Ford PJ, Cullinan MP, Leishman S, Yamazaki K. Relationship between periodontal infections and systemic disease. *Clin Microbiol Infect* 2007;**13**:3-10.
15. 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.
16. Figuero E, Sanchez-Beltran M, Cuesta-Frechoso *et al*. Detection of periodontal bacteria in atheromatous plaques by nested polymerase chain reaction. *J Periodontol* 2011;**82**: 1469-1477.

17. Yoneda M, Naka S, Nakano K *et al.* Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *BMC Gastroenterol* 2012;**12**:16.
18. Furusho H, Miyauchi M, Hyogo H *et al.* Dental infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates high fat diet-induced steatohepatitis in mice. *J Gastroenterol* 2013;**48**:1259-1270.
19. Tonetti MS, Imboden MA, Gerber L, Lang NP, Laissue J, Mueller C. Localized expression of mRNA for phagocyte-specific chemotactic cytokines in human periodontal infections. *Infect Immun* 1994;**62**:4005-4014.
20. Dale BA, Kimball JR, Krisanaprakornkit S *et al.* Localized antimicrobial peptide expression in human gingiva. *J Periodontal Res* 2001;**36**:285-294.
21. Nakada T, Kato T, Numabe Y. Effects of fatigue from sleep deprivation on experimental periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 2015;**50**:131-137.
22. 安田佑理, 橋本修一, 倉治竜太郎, 村田奈保子, 篠原健一郎, 砂田勝久.
ラット口腔内実験に用いる開口器の開発. *日歯麻誌* 2016;**44**:147-149.
23. 倉治竜太郎, 橋本修一, 伊藤弘, 沼部幸博.
マウス口腔内実験に用いる開口器の開発と使用例. *日歯周誌* 2016; **58**: 受理.
24. Jain A, Batista EL Jr., Serhan C, Stahl GL, Van Dyke TE. Role for periodontitis in the progression of lipid deposition in an animal model. *Infect Immun* 2003;**71**:6012-6018.
25. Tokunaga K, Seto H, Ohba H *et al.* Topical and intermittent application of parathyroid hormone recovers alveolar bone loss in rat experimental periodontitis. *J Periodontal Res* 2011;**46**:655-662.
26. Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM *et al.* Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring)* 2011;**19**:1109-17.
27. Gaddale R, Mudda JA, Karthikeyan I, Desai SR, Shinde H, Deshpande P. Changes in cellular and molecular components of peripheral blood in patients with generalized aggressive periodontitis. *J Investig Clin Dent* 2016;**7**:59-64.
28. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 2012;**9**:671-675.
29. Kleiner DE, Brunt EM, Van Natta M *et al.* Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2005;**41**:1313-1321.
30. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007 May;**39**:175-91.

31. Takahashi M, Ikemoto S, Ezaki O. Effect of the fat/carbohydrate ratio in the diet on obesity and oral glucose tolerance in C57BL/6J mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1999;**45**:583-93.
32. Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol* 2006;**87**:1-16.
33. Watanabe K, Petro BJ, Shlimon AE, Unterman TG. Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol.* 2008;**79**:1208-16.
34. Malaguarnera M, Rosa MD, Nicoletti F, Malaguarnera L. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression. *J Mol Med* 2009;**87**:679-695.
35. Mikuls TR. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* (*P.gingivalis*) in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int Immunopharmacol* 2009;**9**:38-42.
36. Müller-Glauser W, Schroeder HE. The pocket epithelium: a light- and electronmicro- scopic study. *J Periodontol* 1982;**53**:133-144.
37. Hujoel PP, White BA, García RI, Listgarten MA. The dentogingival epithelial surface area revisited. *J Periodontal Res* 2001;**36**:48-55.
38. Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontal* 2006;**33**:401-407.
39. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation* 2008;**117**:3118-3125.
40. Oz HS, Puleo DA. Animal models for periodontal disease. *J Biomed Biotechnol* 2011. **Vol. 2011**:1-8.
41. Samejima Y, Ebisu S, Okada H. Effect of infection with *Eikenella corrodens* on the progression of ligature-induced periodontitis in rats. *J Periodontal Res* 1990;Sep;**25**:308-15.
42. Amar S, Zhou Q, Shaik-Dasthagirisahab Y, Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune responses and bone loss manifested by bacterial challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;**104**:20466-20471.
43. Arimatsu K, Yamada H, Miyazawa H *et al.* Oral pathobiont induces systemic inflammation and metabolic changes associated with alteration of gut microbiota. *Sci Rep* 2014;**4**:4828.
44. Imajo K, Fujita K, Yoneda M *et al.* Hyperresponsivity to low-dose endotoxin during progression to nonalcoholic steatohepatitis is regulated by leptin-mediated signaling. *Cell Metab* 2012;**16**:44-54.
45. Wahaidi VY, Kowolik MJ, Eckert GJ, Galli DM. Endotoxemia and the host systemic response during experimental gingivitis. *J Clin Periodontol* 2011;**38**:412-7.