

O-93

マウス咬筋の成長発育期における tenomodulin の発現について

○佐藤 巖¹、三輪 容子¹、財前 知則¹、春原 正隆¹ (1日歯大 生命歯 解剖1)

【目的】筋線維の分化は胎生期にすでに起こり、生後には筋線維タイプに反映された発達・分化が進むと考えられている。このうち骨格筋は胎生期に分化するが咀嚼筋の筋タイプ分化は生後に食性の変化により起こるとされている。我々は以前、筋分化抑制因子であるミオスタチンに着目し、生後の骨格筋と咀嚼筋における発現量を比較しミオスタチンが骨格筋では生後直後から減少しているのに対し、咀嚼筋では5日程度遅れて生後10日から減少したことから咀嚼筋の分化遅延がミオスタチンによって制御されている可能性を報告してきた。しかし筋の発達に不可欠な血管網の増大や筋内部に含まれる細胞外マトリックスの関係についてはよく知られていない。【方法】本研究では血管新生と分化を抑制することで腱・靭帯の形成や再生に関与する新規マーカーであるII型の膜貫通型糖タンパク質 tenomodulin の発現に着目し、出生前後のマウスの骨格筋と咀嚼筋における発現動態を検討した。リアルタイムPCR法を用いてそれぞれの筋組織中の tenomodulin の mRNA レベル発現量を比較した。【結果と考察】咀嚼筋が他の骨格筋とは異なる発現パターンを示し、さらに血管新生マーカーである VEGF とは逆の発現傾向を示したことから、咀嚼筋の筋タンパクと血管供給の増大にはこの因子が関与する可能性を示唆した。

P1-1

新しい天然成分による口腔微生物発育抑制効果

○松生 理恵子¹、田村 宗明^{2,3}、落合 邦康^{2,3} (1日歯大 歯、2日歯大 歯 細菌、3日歯大 総歯研 生体防御)

【目的】日常的な口腔ケアの欠如は、口腔内の微生物バランスを崩し、様々な感染症を惹き起こす。常在微生物の増加と遷移は、口腔疾患の原因となるばかりでなく、様々な全身性疾患の一因となることが報告されている。近年、高齢者増加に伴い、正常な口腔衛生環境の維持は極めて重要な問題である。我々は、これまで口腔ケアを目的にカテキンジェルを開発し、臨床治験を含め、良好な抗菌効果を確認した。今回、より効果的な口腔ケア剤の開発を目的に新たな天然成分を検索し、その抗菌活性について検討した。【方法】被験菌は口腔微生物10株、抗菌活性が期待できる天然成分は15種類を供試した。発育阻止効果は改良型寒天拡散法で評価し、良好な抗菌効果を示した成分について高齢者ならびに義歯装着者から検出率が高い *Candida albicans* に対する発育および菌糸形変換抑制効果を検討した。また、菌糸形変換に関連する遺伝子発現への影響を Real Time PCR で測定した。【結果と考察】供試成分のうち、黄金エキスパウダーならびにアリルイソチオシアネートが良好な抗菌効果を示し、これらの成分はレジジン付着 *C. albicans* の発育を顕著に阻害した。低濃度で菌糸形変換を抑制するとともに、変換関与の特異的な遺伝子発現も抑制した。以上の結果から、これらの天然成分は口腔ケアに使用できる可能性が示唆された。(会員外協力者：一丸ファルコス株式会社・田中清隆)

P1-2

Dmu マウスにおける骨格筋及び運動ニューロンの変性

○藤田 雅俊¹、佐藤 匡¹、狩野 充浩¹、清水 良央²、金高 弘恭³、鈴木 敏彦¹、市川 博之¹ (1東北歯大 口腔器官構造、2東北歯大 口腔病理、3東北歯大 イノベーションリエゾンセ)

Degenerating Muscle Mouse (Scn8admu)は、生後11日から後肢の運動異常を示し、生後1カ月までに心筋の変性により死に至る。このマウスにおいては、Na channelの一つであるScn8aの遺伝子発現が低下していることが知られているが、その原因遺伝子は明らかではない。本研究では、まずdmuマウスにおける頭部と後肢の筋肉の変性について比較した。wild type及びdmuマウスの咬筋と腓腹筋にhematoxylin-eosin染色を行った結果、dmuマウスの腓腹筋においては、筋線維の萎縮に伴い、細胞核の密度の増加が観察された。一方、咬筋における細胞核の密度には変化がなかった。さらに脊髄における神経細胞の変性或いは細胞死を調べるためにc-Jun、calcitonin gene-related peptide (CGRP)、ATF-3、caspase-3及びアストロサイト応答を調べるためにglial fibrillary acidic proteinの分布を免疫組織学的に調べた。dmuマウスの脊髄前角においては、c-JunとCGRPを発現する運動ニューロンが増加していた。これらの運動ニューロンの周囲には、多くのアストロサイトが増加、集積していた。しかしながら、ATF-3やcaspase-3の分布には変化が認められなかった。以上の結果から、dmuマウスにおける頭部と後肢の筋では変性の程度に差があることが示唆された。また脊髄においては運動ニューロンに変性が生じ、その変性に対してアストロサイトが応答している可能性も示唆された。

P1-3

Hemokinin 1 は substance P の骨芽細胞骨形成促進作用を抑制する

○小早川 美輝¹、牧角 有華¹、小林 繁²、後藤 哲哉² (1九歯大 学生、2九歯大 頭頸部構造解析)

【目的】ヘモキニン1 (HK-1) は、TAC4によりコードされた新規タキキニンファミリー分子のひとつであり、ニューロキニン1 (NK-1) 受容体をサブスタンス (SP) と共有する。SPは骨芽細胞骨形成を促進するが、HK-1の骨代謝に対する役割はわかっていないため、HK-1の末梢における局在と骨芽細胞骨形成に対する役割を調べた。【方法】ラットの臼歯部に5日間矯正力を加えた後、歯周組織の免疫染色を行った。また、初代培養ラット骨芽細胞を用いてNK-1受容体とTAC4 mRNAの発現を調べるとともに、骨芽細胞の骨形成に対するHK-1の影響を調べた。【結果と考察】歯周組織においては神経線維、血管内皮細胞、および圧迫側の骨細胞でHK-1の局在が認められた。RT-PCR法により、ラット骨芽細胞がNK-1受容体とTAC4 mRNAを発現したことを認めた。また、培養液にHK-1を添加した結果、HK-1は濃度依存的に骨形成を抑制した。さらに、SPとHK-1を同時添加するとHK-1はSPの作用を競合的に抑制した。したがって、HK-1は末梢組織においてSPの骨芽細胞の骨形成促進作用に対する競合的な抑制作用を持つことが示唆された。

P1-4

歩行制限時のビタミン K 予防的投与は、制限解除後のリセドロネート投与を有効にする
 ○船山 祐太¹、田中 隆博²、寺中 敏夫²、高垣裕子¹ (¹神歯大 歯 生体機能 生化、²神歯大 歯 口腔治療保存修復)

【目的】 ビタミン K2 の投与後にリセドロネート (RIS) を投与することで、卵巣摘出 OVX マウスの骨強度は最大を示す 1)。今回我々は、入院加療中を想定し、歩行を制限したラット 2) に VK₂ を予め投与し、制限解除後に RIS を投与して効果を検討した。【方法】 卵巣摘除 (OVX) 処理した高齢ラットを 1) Sham、2) OVX 歩行制限→RIS、3) OVX 歩行→RIS、4) OVX 歩行制限 VK₂→RIS、5) OVX 歩行 VK₂→RIS の計 5 群に分けた。→は歩行制限期間 (21 週間) の終了を示す。その後 18 週間 RIS (週二回 0.44 mg/250g) を口腔内投与した後大腿骨を摘出し、骨幹部皮質骨を顕微レーザーラマン分光法により解析した。骨塩量 (pQCT)、骨硬度 (ナノインデンテーション法) 等の検討も行った。【結果及び考察】 Raman のミネラル・マトリック スパラメータは共に歩行制限群 (2) で低下し、RIS では改善されなかった。一方 4) 群では、全指標が最高値を示し、VK₂ の予防的投与が制限解除後の RIS 投与を有効にした結果歩行制限による骨質の劣化を改善した。皮質骨密度は全群で殆ど変化を示さなかった。予防的な VK₂ 投与は、硬化するが弾性率は低くなるという良い傾向をもたらした。3) 群が最も硬くて弾性率も高く、RIS が骨を硬く脆弱にすることを示した。1) Osteoporos.Int. 20:1863, 2009 2) J.Bone Miner.Metab.29:422, 2011

P1-5

V-ATPase 阻害剤 Concanamycin A による口腔扁平上皮癌の細胞死誘導について
 ○吉田 寿人¹、清島 保¹、永田 健吾¹、和田裕子¹、藤原 弘明¹、坂井 英隆¹ (¹九大 歯 口腔病理)

【目的】 V-ATPase は癌化学療法分子標的として注目され、V-ATPase 阻害剤は癌細胞の増殖抑制、細胞死誘導に関わるといふ。今回、V-ATPase 阻害剤 Concanamycin A を用い、ヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞死誘導機構について検討した。【方法】 ヒト口腔扁平上皮癌細胞株 MISK81-5、HSC-4 および SQUU-B を用い、Concanamycin A 処理 48 時間後の細胞増殖抑制効果を検索した。また、Concanamycin A 処理後の細胞死を蛍光染色、アポトーシス誘導因子の発現を real-time PCR、western blot にて解析した。【結果】 Concanamycin A 処理により MISK81-5 と HSC-4 には細胞増殖抑制が認められた。一方、cisplatin 抵抗性を有する SQUU-B では細胞増殖抑制がみられず、Concanamycin A 抵抗性を呈した。DAPI による核染色にて MISK81-5 と HSC-4 では、残存細胞にアポトーシス小体の発現を認め、アポトーシスの誘導が確認された。さらに、HSC-4 では Concanamycin A の濃度依存的に active caspase-3 の発現が増加した。また、Concanamycin A 感受性細胞と耐性細胞でアポトーシス抑制因子 Bcl-xL の mRNA 発現に差を認めた。【考察】 Concanamycin A による口腔扁平上皮癌細胞の細胞死誘導に caspase 経路が関与することが示唆された。

P1-6

歯の発生におけるスフィンゴ糖脂質の役割
 ○千葉 雄太¹、中村 卓史¹、成瀬 正啓¹、池内友子¹、新垣 真紀子¹、福本 敏¹ (¹東北大 歯 小児歯)

歯胚形成は、歯原性上皮細胞と間葉細胞の間で展開される相互作用が重要であり、この相互作用では様々な増殖因子が関与し、歯胚を構成する細胞の分化と増殖が調節されている。スフィンゴ糖脂質は、ユビキタスに発現している膜タンパク質で、増殖因子の活性調節を行い多くの細胞生理活性を制御している。しかし、歯の発生におけるスフィンゴ糖脂質の発現や機能は、未だ不明な点が多い。我々は、歯原性上皮細胞に発現する糖脂質を抽出解析し、酸性糖脂質では GM3、中性糖脂質では Gb4 および LacCer が強く発現していることを見出した。今回、ラット歯原性上皮細胞株 HAT7 を用い、歯原性上皮細胞の分化と増殖における Gb4 の役割、および歯の発生過程で発現する増殖因子の活性調節に Gb4 がどのように関与しているのかを解析した。その結果、Gb4 は、歯原性上皮細胞の増殖活性を抑制し、エナメル芽細胞の分化マーカー遺伝子発現を増強させることが明らかとなった。さらに、エナメル芽細胞への分化誘導因子である神経成長因子 NT-4 の分化誘導活性を Gb4 は相乗的に増強させた。これらの結果から、歯原性上皮細胞に発現している Gb4 は、歯原性上皮細胞の増殖調節とエナメル芽細胞分化において、重要な役割を發揮していることが示唆された。これらの知見は、エナメル芽細胞分化機構を深く理解する一助となり、さらには Gb4 を用いたエナメル芽細胞分化誘導法の開発に繋がることから、歯の再生への応用も期待される。

P1-7

細胞分裂期における DNA 複製抑制因子 Geminin のユビキチン分解制御機構とその新たな役割
 ○常松 貴明¹、工藤 保誠²、高田 隆¹ (¹広大院 歯 歯薬保 口腔顎顔面病理病態、²徳大院 HBS 口腔分子病態)

DNA 複製はすべての生物にとって根源的な現象であり、それ故に細胞周期進行に伴い、一度だけ生じるよう厳密に制御されている。DNA 複製を一度に規定する分子として複製起点のライセンス化を抑制する Geminin が知られている。S~G2 期において Geminin はライセンス化因子である Cdt1 に結合、抑制し、G1 期においては APC/C^{dh1} ユビキチンリガーゼによってユビキチン分解されるため、Cdt1 によるライセンス化が生じ、S 期にのみ適切に DNA 複製が起こると考えられている。しかし分裂期での制御機構はこれまでほとんど明らかにされていない。そこで本研究では分裂期の Geminin に着目し、詳細な検討を行った。その結果、Geminin は分裂期キナーゼ Aurora-A による 25 番目のスレオニンのリン酸化によって APC/C^{Cdc20} ユビキチンリガーゼや APC/C^{dh1} ユビキチンリガーゼ依存的なユビキチン分解を阻害されていることが明らかとなった。さらに Geminin の分裂期での安定化は Cdt1 に結合し、抑制するだけでなく、意外にも Cdt1 の SCF^{SKP2} ユビキチンリガーゼによるユビキチン分解を阻害し、G1 期でのライセンス化に必須であることが明らかとなった。以上より、DNA 複製は分裂期において Geminin のユビキチン分解制御を中心とした巧妙で厳密な機構によって保証されることが新たに明らかとなった。

P1-8

Porphyromonas gingivalis の LPS の歯肉内投与が同部位の細胞外液中の IL-6 と TNF- α 量に及ぼす効果—全身麻酔下のラットを用いた検討—
○青野 悠里¹、三枝 禎¹、田口 寛子²、浅野 正岳³、越川 憲明¹ (1日大 歯 薬理、2日大 歯 歯科矯正、3日大 歯 病理)

歯槽骨吸収モデル動物作成のため、LPS は歯肉へ局所注入される。しかし、この LPS 局所投与が同部位のサイトカイン量に与える影響は明らかでない。そこで、*Porphyromonas gingivalis* (*P. g*) の LPS の実験動物の歯肉への投与が同部位の細胞外液中の IL-6 と TNF- α 量へ及ぼす効果について *in vivo* 微小透析法で検討した。

Urethan (1.5 g/kg i.p.) 全身麻酔下の SD 系雄性ラット (約 300 g) の上顎前歯肉内へ挿入した半透膜 (直径 0.44 mm、長さ 2 mm、1000 kDa カットオフ) に改良リンゲル液を灌流して得た細胞外液を試料として 1 時間毎に回収した。回収開始 2 時間後、半透膜近傍に据え付けた注入針から *P. g* の LPS を 1 μ g 含む溶液 1 μ l、または溶媒 1 μ l を投与した。試料中の IL-6 と TNF- α は ELISA で定量した。

試料中の IL-6 は約 200 pg/ml であったが、TNF- α は検出限界 (5 pg/ml) 以下だった。*P. g* の LPS (1 μ g) の局所投与の結果、IL-6 量には著しい変化はなかったが、同処置後 2 時間の時点で TNF- α 量は対照群と比べ有意に増加した。

以上の結果から urethan 麻酔下のラットの歯肉内への *P. g* の LPS の投与は、同部位の IL-6 量には影響を与えないが、TNF- α 量は一過性に増大させることが示された。

P1-10

ケラチノサイトにおける抗細菌性ペプチド β ディフェンシン 2 強発現による遺伝子発現の網羅的解析

○山崎 真美¹、西村 学子¹、佐藤 惇¹、佐藤 英樹¹、高井 理衣¹、Bhawal Ujjal²、齊藤 正人³、安彦 宜光²、安彦 善裕¹ (1北医大 歯 臨床口腔病理、2日大 松戸歯 生化・分子生物、3北医大 歯 小児歯)

【目的】 β ディフェンシン 2 (hBD-2) は上皮細胞で広く発現する抗細菌性ペプチドであり、炎症性刺激やケラチノサイトの分化により発現が上昇すると言われている。hBD-2 の発現上昇によるケラチノサイトの動態の変化については不明である。本研究では、ケラチノサイトに hBD-2 を強発現させ、DNA マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に解析し、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) にてネットワーク解析を行った。

【方法】細胞はヒト正常皮膚ケラチノサイト HaCaT を用いた。Flp-InTM System (Invitrogen 社) にて hBD-2 強発現細胞を作成し、コントロールには Empty pcDNA/FRT-CAT プラスミドを遺伝子導入した HaCaT を用いた。各細胞から RNA を抽出後、マイクロアレイ (アジレント社) にて遺伝子発現を、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) にてネットワークを解析した。

【結果と考察】マイクロアレイでは、hBD-2 強発現細胞での発現がコントロールの 10 倍以上の遺伝子が 158 個で、S100 タンパク質ファミリーや細胞接着因子、ケラチノサイト分化マーカー等が含まれていた。IPA でも物質代謝因子や炎症関連因子等に関する遺伝子ネットワークが形成され、hBD-2 の発現上昇が炎症反応やケラチノサイトの分化と関連していることが示唆された。

P1-9

口腔癌細胞は MALT1 によりケラチンの発現と増殖能を変動する
○川本 幸寛¹、大山 嘉人¹、千葉 忠成²、坂下 英明¹、今井 一志² (1明海大 歯 口外 II、2日歯大 歯 生化)

Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) は正常口腔上皮の基底細胞に発現し、予後が不良な口腔癌では発現を停止する。しかし、MALT1 が癌細胞の表現型におよぼす作用は不明である。本研究では、口底部由来の口腔癌細胞 (HSC2 細胞) を用いて MALT1 の有無により発現量が変動するタンパクを質量分析法 (MALDI-TOF MS) で解析し、10 種類のタンパクを同定した。それらの中の 4 種類がケラチンであり、MALT1 存在下では K8 と K18 が増加し、非存在下では K5 と K14 が増加した。これらの変化は MALT1 依存性であり、多種類の口腔癌細胞に共通する現象であることが確認された。免疫染色で口底粘膜上皮の基底細胞は K8/18 陽性であったが、K5/14 陽性細胞は認められなかった。また、MALT1 の発現は HSC2 細胞の増殖能とサイクリン D1 発現を著しく抑制した。逆に、ドミナントネガティブ型 MALT1 は増殖能とサイクリン D1 発現を上昇させた。siRNA を用いた解析から、サイクリン D1 の発現変化は MALT1 依存性であることが確認された。以上より、MALT1 の発現停止は口腔癌細胞におけるケラチンの分子種を変化させるとともに、増殖能を上昇させることが明らかになった。これらの変化が MALT1 の口腔癌進展抑制作用に大きく関与する可能性が示唆される。本研究は所属機関倫理委員会の承認のもとに行った。

P1-11

歯根嚢胞における E-cadherin と COX-2 のエピジェネティックな変化

○佐藤 英樹¹、山崎 真美¹、高井 理衣¹、佐藤 惇¹、西村 学子¹、齊藤 正人²、荒川 俊哉³、田隈 泰信³、安彦 善裕¹ (1北医大 歯 臨床口腔病理、2北医大 歯 小児歯、3北医大 歯 口腔生化)

【目的】エピジェネティクスは、DNA 配列の変化を伴わず遺伝子発現が変化する現象で、主に組織発生過程や環境因子による表現系の変化である。細菌感染による炎症性変化でもみられることがあるが、口腔領域の炎症性病変でのエピジェネティックな変化についての報告はほとんどない。最近、他の炎症性疾患でのエピジェネティックな変化として E-cadherin と COX-2 のプロモーター領域での高メチル化が報告された。本研究では、歯根嚢胞における E-cadherin と Cox-2 のプロモーター領域でのメチル化について解析を行った。【方法】歯根嚢胞 30 検体と、コントロールとして非炎症性の歯肉を用いた。パラフィン切片から DNA を抽出し、Bisulfite 処理後、メチル化特異的 PCR (MSP) 法及び ABI PRISM 310 Genetic Analyzed を用いた Bisulfite Sequence 法を行なった。E-cadherin 及び COX-2 プロモーター領域 0~1000 までに存在する CpG 部位のメチル化を検索し、directly sequence 法により DNA の遺伝子多型の有無を確認した。【結果と考察】MSP 法及び Bisulfite Sequence 法により、コントロールと比較して歯根嚢胞では、E-cadherin および COX-2 の複数の転写因子にかかわる部位の CpG 部位で高メチル化が認められた。これらの結果から歯根嚢胞の発生や炎症性変化に E-cadherin および COX-2 の高メチル化が関与している可能性が示唆された。

P1-12

CCN3は骨再生抑制因子か？

○松下 祐樹^{1,2,3}、坂本 啓¹、勝部 憲一¹、原田 清²、山口 朗^{1,3} (1東医歯大 口腔病理、2東医歯大 顎顔面外科、3東医歯大 GCOE)

CCN3はCCNファミリー(CYR61、CTGF、NOVの頭文字由来する)に属する分泌性タンパク質である。我々は、CCN3が骨芽細胞の分化を抑制することを報告してきたが、CCN3の骨再生における役割については未だ不明な点が多い。そのため、本研究は骨再生過程におけるCCN3の役割を明らかにすることを目的とする。まず、8週齢雄性マウスの大腿骨骨幹部に円形骨欠損を作成し、骨再生過程初期における遺伝子発現の変動をマイクロアレイで解析したところ、*Ccn3*の発現が上昇していた。野生型マウスの骨再生過程の初期で*Ccn3*の発現が上昇することはRT-PCR法でも確認できた。CCN3 knockout mice (CCN3 KO)マウスの骨組織は骨形態計測法で野生型と差がみられなかったが、骨再生過程ではCCN3 KOマウスの骨再生が野生型マウスより促進していた。さらに、CCN3 KOマウスの骨再生過程では、野生型マウスに比べて*Runx2*、*osteocalcin*などの骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現が骨再生初期で有意に上昇していた。一方、2.3 kb *Coll1a1* promoterを用いたCCN3 transgenic miceの骨再生過程に関しては野生型マウスと差がみられなかった。以上のことから、CCN3は骨再生の初期に発現が上昇し、骨の再生を抑制している因子である可能性が示唆された。

P1-14

マウス金属アレルギーへのヒスタミンの関与

○金原 正敏^{1,2,3}、黒石 智誠¹、山本 照子²、菅原 俊二¹、遠藤 康男¹ (1東北大院歯 口腔分子制御、2東北大院歯 顎口腔矯正、3東北大院歯 歯学イノベーションリエゾンセ)

【背景と目的】私達はLPSをアジュバントとするマウスNiアレルギー(Ni-A)モデル作製に成功し、Ni-Aはマスト細胞欠損マウス(W/W^v)でも発症するが、ヒスタミン(H)合成酵素(HDC)欠損マウスでは極めて弱いことを報告した。本研究ではHの関与について更に検討した。【方法】1 mM NiCl₂と1 μg/ml LPSの等量混合液を腹腔内注射し(感作)、10日後、1 mM NiCl₂を耳介に皮内注射(challenge)した。薬物は感作またはchallenge 1 h前に静脈内投与した。細胞移入実験では、移入24 h後1 mM NiCl₂をchallengeした。【結果】Wild type (WT) C57BL/6マウスでは、感作の有無に関わらず、1 mM NiCl₂自体が投与直後に一過性炎症(TI)を誘導した。H1受容体拮抗薬とマスト細胞膜安定化薬は、このTIを抑制し、以後のNi-Aも抑制した。TIへのマスト細胞の関与は組織学的にも示されたが、W/W^vでもTIの発症を確認した。HDC-KO・H1受容体-KO・WTマウス間の細胞移入実験で、感作・惹起の両過程へのHの関与が示されたが、5 mM NiCl₂のchallengeでは結果は不安定であった。【考察】(i) W/W^vとは異なり、WTではNiCl₂自体が、マスト細胞Hが関与するTIを誘導し、以後のNi-AはこのTIに依存する。(ii) 高濃度NiCl₂のchallengeは実験条件によってはNi-Aの判定ミスを起こし得る。

P1-13

マウス咬筋の持続的活動におけるIL-1の役割

○千葉 航¹、土谷 昌広¹、米田 博行²、菅原 俊二³、遠藤 康男³ (1東北大院歯 加齢歯科、2東北大院歯 口腔システム補綴、3東北大院歯 口腔分子制御)

【背景と目的】筋活動に伴いIL-1βやIL-6が産生され、IL-6は筋肉のグルコース恒常性を支えるとの報告がある。しかし、咬筋活動時のIL-1βに関する研究は少ない。本研究は5-7週齢のIL-1欠損マウス(IL-1-KO)と野生型(WT)マウス(いずれもBalb/c)を用いて、この点について検討した。【方法】マウスを細い筒に閉じ込め(R: restraint)出口をプラスチック板で閉じると、マウスは脱走用の隙間を作るため、この板を長時間咬み砕き続ける(G: gnawing)(この実験系をR+G+と呼称)。R+G+でのプラスチック板の減少量は咬筋活動量を示す。R+G+前後の咬筋組織について、IL-1β、IL-6、および糖代謝関連分子(Glut4など)の発現、組織内グリコーゲン量について検討した。【結果】IL-1-KOマウスでの咬筋活動量はWTに比べ有意の低値を示した。WTでは30分間のR+G+に伴い、咬筋組織でのIL-1β mRNAは5倍、IL-6 mRNAは3倍に上昇した。しかし、IL-1-KOではIL-6 mRNA発現の遅延が観察された。IL-1-KOマウスでは、咬筋組織のIL-6タンパクの上昇も有意に低く、R+G+後の組織グリコーゲン量の回復も有意に低値を示した。【考察】持続的咬筋活動により発現するIL-1はIL-6を介して咬筋の糖代謝を賦活化し、その機能維持に関与することが示唆された。

P1-15

レジンモノマー重合防止剤ヒドロキノンによるマウスでのアレルギー

○坂東 加南^{1,2}、田中 志典^{2,3}、山本 照子¹、菅原 俊二²、遠藤 康男² (1東北大院歯 顎口腔矯正、2東北大院歯 口腔分子制御、3東北大院歯 歯学イノベーションリエゾンセ)

【背景と目的】レジンモノマー(RM)が原因とされる接触過敏症がしばしば報告されている。歯科医療従事者では、皮膚疾患の64%はRMが原因だったとの報告もある。しかしRMのアレルゲンとしての強さは弱く、マウスモデルの報告はない。私達は市販歯科材料methylmethacrylates(MMA)を用いて、一時は成功したかに見えたが(2008年歯科基礎医学会)、試薬MMAでは再現できなかった。私達は試行錯誤の中で、RMがNiアレルギーに対するアジュバント効果を持つ事を昨年の本学会で報告した。しかし、市販歯科材料に含まれる“RM以外の物質”が実際のアレルゲンになる可能性もある。本研究ではRM重合防止剤のhydroquinone(HQ)について検討した。【方法】感作処理としてHQをacetone/olive oil 4/1混合液に種々の濃度で溶解し、マウス剃毛脇腹に塗布した。コントロールとしてHQを含まない上記混合液を塗布した。一週間後、同溶液を耳介に塗布し(challenge)、経時的に耳介腫脹を測定した。【結果】Challenge 12時間以内に、HQ自体も腫脹をもたらしたが、感作処理マウスでは、コントロールに比べ有意に大きな腫脹が観察された。【考察】市販歯科RMでは、RMが他のアレルギーのアジュバントになるのみならず、HQがアレルゲンとなる可能性もある。

P1-16

ヒスタミンによる腫瘍免疫抑制機構

○田中 志典^{1,2}、黒石 智誠¹、遠藤 康男¹、菅原 俊二¹ (東北大 院歯 口腔分子制御、²東北大 院歯 歯学イノベーションリエゾンセ)

【目的】 NKG2D は NK 細胞の細胞傷害活性を制御する主要な活性化型受容体である。ヒスタミンは炎症メディエーターとしてよく知られるが、Th バランスを調節するなど免疫反応でも活躍する。興味深いことに、乳癌などのヒト腫瘍組織では正常組織と比べヒスタミン濃度が上昇する。ヒスタミンは腫瘍細胞や周囲の肥満細胞により産生され、腫瘍発達を促進すると考えられるが、そのメカニズムは不明である。我々は、ヒスタミンがヒト単球系白血病細胞株 THP-1 の NKG2D リガンド (MICA/B および ULBP1) 発現を抑制することを見出し、この現象をさらに詳しく調べた。【方法】 THP-1 細胞をヒスタミン (100 μM) 刺激し (8 時間以上)、NKG2D リガンドの発現抑制をフローサイトメトリーにより評価する。【結果と考察】 ヒスタミンによる NKG2D リガンドの発現抑制は、プロテアソーム阻害薬により抑制された。また、免疫沈降法により、ヒスタミン刺激が MICA/B のユビキチン化を促進することが確認された。さらに、ヒト NK 細胞との共培養実験において、ヒスタミン前処理された THP-1 細胞は、NK 細胞の細胞傷害活性に対する感受性が低下することが示された。以上の結果は、ヒスタミン刺激がユビキチン-プロテアソーム経路を活性化し、NKG2D リガンドの分解を促進することで NKG2D 発現を抑制し、腫瘍免疫抑制に寄与することを示唆する。

P1-18

マウス唾液腺における V-ATPase の局在

○堀江 沙和^{1,2}、大宮 麻美^{2,3}、小田島 悠人^{2,3}、中西 (松井) 真弓³、佐原 資謹² (岩医大 医歯薬総合 腫瘍生物、²岩医大 生理 病態生理、³岩医大 薬 機能生化学)

液胞等の細胞膜に存在する V 型 ATPase (V-ATPase) は、リソソーム、ゴルジ体、シナプス小胞などの細胞内膜に存在し、内膜の内側に H⁺ を輸送し、オルガネラの酸性化や細胞外の酸性化に関与する事が知られている。これまでに、V-ATPase は A~H サブユニットからなる細胞質側の V₁ドメインと、a, c, c', c'', d のサブユニットからなる膜内の V₀ドメインとが合体して機能することが明らかにされ、ラットの精巣上体やマウスの腎臓、ホルモン分泌細胞等ではそのサブユニットの分布や役割が報告されている。しかしながら、外分泌腺である唾液腺においては未だ不明である。そこで今回、唾液腺において V-ATPase の存在を確かめ、その機能を明らかにすることを試みた。V-ATPase のサブユニットの発現を RT-PCR 法で検索したところ、大唾液腺では B2、C1、E2 サブユニット・アイソフォームの発現が共通して見られた。さらに、V-ATPase の B2 サブユニット・アイソフォームの抗体を用いて免疫組織化学法を行った結果、各唾液腺の導管に強い陽性反応が見られたが、導管の構成細胞における細胞内局在は各唾液腺で異なっていた。また、腺房細胞では陰性であった。これらの結果から、唾液腺における V-ATPase は、唾液の分泌そのものよりも、分泌された唾液の pH 調節に関与する可能性が考えられる。

P1-17

マウス歯根形成期における頭部エックス線照射による障害歯根の形態およびヘルトヴィッヒ上皮鞘と周囲間葉の細胞動態の観察

○井出 吉昭^{1,2}、中原 貴^{1,2}、那須 優則³、富永 徳子^{1,2}、田巻 友一^{1,2}、石川 博² (日歯大 生命歯 発生・再生、²日歯大 生命歯 生命科学、³日歯大 生命歯 共同研)

【目的】 歯の発育中の外的刺激による歯の形成障害の 1 つとして、放射線治療などの放射線被曝による影響があげられる。本研究は、放射線が歯根形成障害を引き起こすメカニズムを解明するためマウス頭部に放射線を照射し、障害歯根の形態解析とヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) およびその周囲間葉組織の細胞動態の解析を行った。

【材料と方法】 本実験に C57BL/6 マウスを使用した。頭部照射 (0, 10, 20Gy) を行うため鉛板で頭部以外を遮蔽し、歯根形成開始時期である生後 5 日齢 (P5) にエックス線照射装置 (MBR-1520R-3、日立) を使用し、直後に BrdU を腹腔内に投与した。解析は下顎第 1 臼歯を対象に行い、マイクロ CT 解析、HE 染色、抗サイトケラチン抗体と抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色、TUNEL 染色を行った。

【結果と考察】 本検討により、以下のことが明らかになった。(1) 10Gy 照射により P15 から、20Gy 照射により P11 から根尖部の組織学的形態異常がみられた。(2) 照射群 (20Gy) において HERS 細胞の動態に異常がみられた。(3) 照射量が増えるにつれ根尖付近の歯髓内の BrdU 陽性細胞の数が少なくなる傾向が見られた。(4) 根尖付近の歯髓細胞において照射による TUNEL 陽性細胞の顕著な増加は見られなかった。

P1-19

ラット軟口蓋、喉頭蓋及び咽頭における TRPM8 の分布

○佐藤 匡¹、藤田 雅俊¹、狩野 充浩¹、鈴木 敏彦¹、市川 博之¹ (東北大 歯 口腔器管構造)

一部の transient receptor potential (TRP) ionchannel は温度刺激に反応するセンサーとして、脊髄神経や三叉神経における一次感覚ニューロンに含まれている。その一つである TRPM8 は 8~28℃ の冷刺激により活性化し、冷覚や痛覚をもたらすと考えられている。免疫組織化学的手法により TRPM8 を含む神経線維が皮膚や舌に存在することが知られている。しかしながら、咽頭やその周囲組織における TRPM8 の分布は明らかではない。本研究では、ラット咽頭・軟口蓋及び喉頭における TRPM8 を免疫染色により調べた。TRPM8 を含む神経線維は、咽頭と口腔との境界領域に豊富に観察された。これらの神経線維は粘膜上皮下で神経網を形成し、それらの一部は上皮内に侵入していた。一方、軟口蓋の前部・喉頭蓋・喉頭の粘膜には TRPM8 陽性神経線維はまれであった。また軟口蓋における小唾液腺導管・喉頭蓋の喉頭側粘膜及び喉頭粘膜における上皮細胞に、TRPM8 の発現が認められた。さらに軟口蓋や咽頭における味蕾にも TRPM8 を含む細胞が観察された。以上の結果から、TRPM8 が咽頭及びその周囲組織における冷覚や冷痛覚に関与している可能性が示唆された。なお、本研究は会員外の京都大学・細川浩先生と九州保健福祉大学・近藤照義先生との共同研究である。

P1-20

Alteration of peripheral neuronal system in phenytoin-induced gingival hyperplasia
 ○松田 哲史¹、上田 甲寅¹、岩井 康智¹ (大歯大 歯 口腔解剖)

It is known that continuous administration of phenytoin (PHT), an antiepileptic agent, induces gingival hyperplasia. Pathologically, this hyperplasia is an uninfammatory tissue proliferation. However, the morphological property of the proliferated gingiva may become a risk factor for periodontal disease. Many researches concerning PHT-induced gingival hyperplasia have been carried out, but details of the peripheral nerve in hyperplastic gingiva are still unclear. In this study, we performed immunohistochemistry for neuronal markers (PGP 9.5, NFP and S-100) in gingiva obtained from patients with serious gingival overgrowth (experimental) or without PHT medication and gingival hyperplasia (control). We observed immunoreaction (IR) s for either PGP 9.5 or NFP in the mesenchyme beneath gingival epithelium of the control. In contrast, we could find the IRs in the deeper mesenchyme of the experimental. In addition, there was no S-100-IR of finger-like structure of Ruffini endings in the hypertrophic gingiva, while the IRs were distinctly observed in the control. These results suggest that PHT-induced gingival overgrowth may bring some alterations in mechanosenses in the oral cavity.

P1-21

RANKL により誘導される破骨細胞分化における IRF4 の役割
 ○中島 義基¹、森本 景之²、羽地 達次¹ (徳大院 HBS 口腔組織、²産業医大 医 解剖)

[目的] RANKL は PKR を介して NF- κ B を活性化させ破骨細胞の分化を誘導する。我々はこの経路に転写因子 IRF4 が NFATc1 と共にシグナル伝達の下流で働くとは定めた。PKR ノックダウン前破骨細胞 (RAW) と PKR 阻害 (2AP) 処理 RAW 細胞では RANKL 刺激後、NFAT1c の合成は促進されるが破骨細胞への分化は誘導されない。我々はこの原因として PKR 活性阻害細胞では IRF4 の転写活性が抑制されていると考えた。[方法] PKR ノックダウン細胞、2AP 処理細胞を用い RANKL 刺激後 4 日間での NFATc1、IRF4、NF- κ B、および破骨細胞分化マーカー (TRAP, Cathepsin K) の発現をリアルタイム PCR とウエスタンブロット法にて調べた。また RANKL 刺激後 5 日目における破骨細胞への分化を TRAP 染色にて調べた。さらに RNAi 法にて IRF4 発現を抑制した RAW 細胞を用い RANKL 処理により破骨細胞への分化誘導を検討した。[結果と考察] PKR ノックダウン細胞と 2AP 処理細胞では RANKL 刺激後の IRF4 mRNA とタンパク質発現量は変化しなかったが、野生型細胞に比べ有意な低下が認められた。PKR ノックダウン細胞、2AP 処理細胞、および IRF4 抑制細胞においては破骨細胞の分化は抑制された。IRF4 は NFATc1 と共に破骨細胞の分化に重要な役割をはたすと考えられる。

P1-22

赤核刺激による侵害受容性開口反射の減弱
 ○矢島 絵理子¹、佐藤 義英²、石塚 健一²、岩崎 信一²、寺田 員人¹ (大歯大 新潟生命歯矯正、²日歯大 新潟生命歯 生理)

[目的] 赤核は大細胞部(RMC)と小細胞部(RPC)に分類されている。我々は非侵害性刺激により誘発された開口反射が、赤核刺激により促進されることを報告した。しかしながら、侵害性刺激により誘発される開口反射に対する赤核刺激の効果は不明である。そこで、赤核の電気および化学刺激が侵害性刺激誘発性開口反射に及ぼす効果について検索を行った。【試料および方法】 ウレタン・クロラロース麻酔下ラットを用いて、下顎切歯歯髓の電気刺激により開口反射を誘発させ、両側顎二腹筋前腹から筋電図を記録した。RMC または RPC の電気刺激を条件刺激として、条件刺激と試験刺激の間隔時間を変化させ、反射性筋電図活動の振幅を比較、検討した。次に RMC または RPC へのグルタミン酸ナトリウム微量注入を行い、注入前後での反射性筋電図活動の振幅を比較、検討した。【結果および考察】 開口反射は RMC または RPC の条件刺激により、条件-試験刺激間隔 20-60 ms で両側に減弱した。さらに、RMC または RPC へのグルタミン酸ナトリウム注入後 5-40 分で両側に減弱した。開口反射の減弱効果は RMC の方が RPC より有意に大きかった。RMC は RPC より、三叉神経前運動ニューロンが存在する三叉神経脊髄路核に神経線維を多く送っているためだと考えられた。そして赤核が三叉神経脊髄路核に影響を与えている可能性が示唆された。

P1-23

上喉頭神経および皮質誘発嚙下に対する皮質咀嚼野刺激の変調効果
 ○辻村 恭憲¹、辻 光順¹、岩田 幸一²、井上 誠¹ (新大院医歯 摂食嚙下リハ、²日大 歯 生理)

[目的] 皮質咀嚼野刺激による嚙下の変調機構を明らかにする。【方法】 ウレタン麻酔した SD 系雄性ラットの左側咬筋・顎二腹筋および甲状舌骨筋に留置したワイヤー電極より筋活動電位を導出した。上喉頭神経または大脳皮質の連続電気刺激(上喉頭神経: 200 μ s pulse duration, 30 Hz; 大脳皮質: 500 μ s pulse duration, 10 Hz) により誘発される甲状舌骨筋の筋放電と喉頭拳上の視覚的観察から嚙下を同定した。また、皮質咀嚼野 (A-または P-area) の電気刺激(500 μ s pulse duration, 30 Hz) により誘発される咬筋および顎二腹筋活動を記録し、咀嚼様運動を同定した。誘発嚙下に対する咀嚼野刺激の変調効果を嚙下回数、潜時および嚙下間隔時間により評価した。【結果】 A-area 刺激時により、末梢神経および大脳皮質誘発性嚙下の回数は減少し、潜時および嚙下間隔時間は延長した。一方、P-area 刺激時では明らかな変調効果は確認されなかった。【考察】 以上の結果から、A-area からの下行性経路は嚙下を抑制しているのに対し、P-area は嚙下への関与が少ない可能性が示された。

P1-24

ラット上喉頭神経誘発嚥下の応答特性
 ○辻 光順¹、辻村 恭憲¹、井上 誠¹ (新大 院
 医歯 摂食・嚥下リハ)

【目的】上喉頭神経 (SLN) の電気刺激により嚥下が誘発されることが知られ、この方法を用いて嚥下運動に関わる神経機構解明を目指した様々な報告がなされている。本研究では、SLN への連続電気刺激がもたらす嚥下反射誘発回数の変動について検討した。【方法】ウレタン麻酔下の SD 系雄性ラットを用いた。甲状舌骨筋および顎二腹筋から筋電図を導出し嚥下の指標とした。また、左右 SLN に刺激用双極電極を留置した。10 秒間の刺激で嚥下が 1 回誘発される刺激強度を 1T とし、1.1T 刺激を 10 秒間与えた際の嚥下回数を計測した。これを 1 セッションとして、5 セッションの記録を行った際の嚥下回数の変化を記録した。【結果と考察】1 セッションにおける嚥下回数の変化は、セッション間隔の長さ依存して減少した。また、セッション間隔を 10 秒として、この間を安静にした場合と反対側の刺激を継続した場合では、同側の SLN 刺激により誘発される嚥下回数には差がみられなかった。SLN に持続的な刺激を加えることによる嚥下誘発回数の減少は、嚥下中枢内の神経活動の疲労によるものではないことが示唆された。

P1-25

歯周炎と唾液分泌低下
 ○木山 茉莉子^{1,2}、小野 堅太郎²、人見 涼露²、
 松尾 拓³、稲永 清敏² (1九歯大 歯 歯周病、
 2九歯大 歯 生理、3九歯大 歯 口腔病理)

唾液は口腔内の健康を担う上で重要な働きをしており、唾液分泌量の低下は歯蝕や歯周病といった口腔内疾患を引き起こすとされている。歯周病患者における唾液分泌量低下が示されているものの、もともと唾液分泌量が低いために歯周病になったのか、歯周病になることにより唾液分泌量が低下したのかは明らかではない。本研究では、歯周病患者ならびに歯周炎モデルラットにおける唾液分泌能について検討した。15 名の歯周病患者に対し歯周病治療を行ったところ、歯肉炎症の改善に伴って唾液分泌能が初診時よりも有意に増加した。次に、6 週齢雌性ウイスターラットの片側臼歯部歯頸部に絹糸を結紮し、歯周炎を惹起させた。結紮 4 週間後において、レントゲン画像から、結紮側の歯槽骨の有意な吸収が認められた。この歯周炎モデルにおいて、ピロカルピン (10 nmol/kg, i.p.) で誘発される唾液分泌量は有意に低下した。加えて、唾液腺重量は両側性に減少しており、顎下腺には空腔化がみられた。Ca²⁺イメージングにより、耳下腺腺房細胞におけるムスカリン誘発細胞内 Ca²⁺濃度上昇に有意差は認められなかった。これらの結果より、歯周炎により唾液分泌量低下が引き起こされる可能性が示唆された。さらに動物実験の結果より、唾液腺腺房細胞の機能変化ではなく、唾液腺が萎縮することが原因であることが示唆された。

P1-26

咀嚼によるストレス緩和は不整脈の発生を防ぐ
 ○小泉 創¹、三宅 真次郎¹、山田 健太郎²、笹
 栗 健一¹ (1神歯大 歯 矯正、2神歯大 歯 生理)

咀嚼の抗ストレス効果がストレス性致死性不整脈に与える影響の解明する為に、10 週齢雄性 SD ラットを、拘束ストレスを負荷した Stress 群 (ST 群)、拘束ストレスの間、木の棒を咬ませた Stress chewing 群 (SC 群)、拘束ストレスを与えない Control 群 (CT 群) に分けて心電図を測定した。得られた心電図からストレス性の不整脈 (心室性期外収縮) のイベント数と、質的計測として QT 間隔、QRS 間隔、不整脈の Q 波と一つ前の洞調律の R 波の間隔 (RQ' 間隔) を計測した。更にモノクオタリンを腹腔内投与することにより致死性不整脈を高頻度にする肺高血圧性心疾患モデルラットを作成し、仰臥位拘束ストレス 30 分を、週 2 回、3 週間の計 6 回負荷することでストレス負荷に対する心不全モデルラットの生存期間を観察した。咀嚼刺激は拘束ストレスにより増加する心室性期外収縮の発生を有意に抑制 (ST 群: 12.6 ± 1.8 回, n = 14; SC 群: 6.1 ± 1.3 回, n = 10; CT 群: 4.7 ± 1.3 回, n = 10; p < 0.05) した。QRS 間隔と RQ' 間隔は ST 群と SC 群との間に有意差はなかったが、ST 群に比べ SC 群で優位に QT 間隔が小さかった (ST 群: 85.0 ± 2.6 ms, n = 12; SC 群: 72.7 ± 4.0 ms, n = 8; p < 0.05)。心疾患モデルラットを使ったストレス後の生存率はストレス負荷により減少し、咀嚼刺激により高まる傾向があった。以上の結果から、咀嚼刺激は心室性期外収縮の発生数や質を改善し、ストレス性致死性不整脈を防ぐ可能性が示唆された。

P1-27

ラット大脳皮質の電気刺激で誘発されるリズムカ
 ルな顎運動と唾液分泌の関連
 ○前田 直人¹、兒玉 直紀²、美甘 真²、美藤
 純弘¹、小橋 基¹、皆木 省吾²、松尾 龍二¹ (1岡
 大 院医歯薬 口腔生理、2岡大 院医歯薬 咬
 合・有床義歯補綴)

【目的】大脳皮質咀嚼野の電気刺激で誘発されるリズムカ
 ルな顎運動は唾液分泌を伴うと言われている。しかし両者の関連は
 未だ検討されていない。本研究では、ラットの大脳皮質を電気
 刺激したときの顎運動と唾液分泌を調べた。【方法】成熟雄
 Wistar ラットを用い、ウレタンとペントバルビタールによ
 って麻酔した。大脳皮質の A-area と P-area (Sasamoto et al.
 1990) を中心に単極金属電極で電気刺激を行った (5~50 Hz,
 0.25 mA, 0.2 ms, 20 s)。顎運動はマグネットの動きを磁気セ
 ンサーで描記し、筋活動は咬筋、顎二腹筋から導出した。唾液
 分泌は顎下腺の分泌圧を計測した。【結果と考察】1) 電気刺激
 によって、A-area では約 5 Hz の速くて小さな顎運動が、P-
 area では約 3 Hz の大きく複雑な顎運動が誘発された。2) P-
 area の電気刺激では顎運動と同時に唾液分泌が誘発されたが、
 A-area の刺激では唾液分泌は生じなかった。3) P-area にお
 いて刺激頻度を変化させると、顎運動の頻度と唾液分泌はとも
 に 20 Hz で最大値を示した。4) P-area において電気刺激後に
 自発的な顎運動が発生するとき、唾液分泌は観察されなかった。
 以上の結果より、唾液分泌は顎運動に伴う口腔感覚により二次
 的に生じたものではなく、上位中枢によってコントロールされ
 たものである可能性が示唆された。

P1-28

ラット新生仔期にはNMDA投与によってリズム形成する舌下神経運動ニューロンが存在する
 ○佐久間 英伸¹、片倉 伸郎²、平場 勝成² (愛院大 歯 顎顔面外科、²愛院大 歯 生理)

【目的】NMDA投与でラット摘出脳幹標本では舌下神経束に、脳幹スライス標本では舌下神経運動ニューロン(XIIIm)にリズム活動(NMDA-induced rhythm: NIR)が観察される。このようなりズム活動はcentral pattern generator(CPG)で形成されると考えられているが、一方で、TTX存在下でXIIImにNIRが観察されることからNMDA投与でリズム形成能を発現するXIIImが存在する可能性が考えられる。そこで本研究では、新生仔期にリズム形成能を発現するXIIImが存在するか否かを検証することとした。【方法】実験には、0~6日齢のWistar系ラットを用い、舌下神経核を含む脳幹スライス標本(冠状断、厚さ300μm)を作成し、whole-cell patch clamp法でXIIIm活動を記録した。NIRはNMDA(25μM)を灌流液中に投与して誘発し、NIR周期が通電による膜電位変動でどのように変化するかを検証した。【結果】NMDA投与でXIIImに周期0.3~0.4HzのNIRが誘発された。通電により膜電位を低下させると、NIRの周期が延長するニューロンと一定で変化しないニューロンの2群があった。【結論】膜電位低下で周期の延長を認められた群は、リズム形成能が発現していると考えられる。よって、新生仔期では、リズム形成能を有するXIIImが存在すると推察される。

P1-29

離乳時からの軟食は精神疾患の発症リスクを高める可能性がある
 ○野瀬 佳奈¹、綿引 淳一¹、山本 剛²、市川 雄大¹、前川 素子³、榎本 明子¹、南保 友樹¹、美島 健二²、吉川 武男³、横 宏太郎¹ (昭大 歯 歯科矯正、²昭大 歯 口腔病理、³理研 BSI 分子精神)

【目的】離乳以降の咀嚼獲得期は脳機能が成熟する重要な時期と重なる。我々は離乳後の軟食が脳機能に与える影響を明らかにする目的で、網羅的行動解析、海馬神経新生の解析、海馬と前頭葉皮質での各種遺伝子発現解析を用いて検討を行った。【飼料および方法】実験動物はC57BL/6J雄マウスを用いた。実験群は1)3週齢から4週間硬食を与えた群(HD)、軟食を与えた群(SD)、軟食後、硬食に変更した群(SHD)3群にて網羅的行動解析を行った。2)3週齢から4週間硬食を与えた群(HD7W)、4週間軟食を与えた群(SD7W)、11週間硬食を与えた群(HD14W)、11週間軟食を与えた群(SD14W)、軟食を与えた後、硬食に変更した群(SHD14W)5群にて海馬神経新生の比較を行った。3)HD14W、SD14Wについて海馬、前頭葉皮質でBdnf等の精神疾患関連遺伝子の発現量を比較した。【結果および考察】行動解析においてSD群がHD群に比較し有意に、日常的な活動量の低下、新規環境での自発活動量の増加、PPIの低下が認められ、情動性と関係する行動に影響が認められた。HD14Wに比較しSD14Wで有意に神経新生の低下が認められた。神経栄養因子bdnf発現量がHD14Wに比較し有意にSD14Wで低下した。離乳時から軟食は統合失調症を含めた精神疾患発症リスクに影響を与える可能性が示唆された。

P1-30

口内炎モデルラットにおける機械および味刺激によるアロディニア発現
 ○人見 涼露¹、小野 堅太郎¹、稲永 清敏¹ (九歯大 生命科学)

口内炎が発症すると、食事等の物理的な接触や味刺激などにより激痛が生じる。口内炎発症は、抗がん剤治療や放射線治療による副作用の一つでもあり、臨床においてその疼痛の除去が早急に求められている。しかし、これまで口内炎による疼痛メカニズムに関する研究はほとんど行われていない。本研究では、口内炎による疼痛発症特性を調べることを目的として、ラットの下顎粘膜(口腔前庭部)に酢酸を用いて口内炎を発症させ、炎症部位の組織変化と機械および味刺激に対する疼痛関連行動について検討した。覚醒下における安定した下顎粘膜露出のために、オトガイ部皮膚に磁性を持つリングを装着して下方へ牽引して、下顎粘膜への機械刺激を行った。von Frey filamentsによる機械的逃避閾値は、口内炎発症2日目以降において有意に低下した。この機械的アロディニアは、下顎粘膜へのキシロカイン塗布によって抑制された。さらに、炎症部位へ味溶液(甘、塩、旨、酸)を滴下したところ、酸味溶液においてのみ有意に疼痛関連行動が増加した。また、下顎粘膜深部組織へのfluoro gold (FG)浸透性および三叉神経節でのFG陽性細胞数は、健常粘膜と比較して口内炎では増加していた。以上より、口内炎によって機械的および酸味アロディニアが発症することが示された。おそらく、酸味アロディニアの発症は、炎症部位の組織浸透性が増加し、酸刺激が直接侵害受容ニューロンを刺激するためかもしれない。

P1-31

トレッドミルによる運動が味覚嫌悪学習の保持に与える影響
 ○坪井 寿典¹、平井 喜幸¹、井上 農夫男²、船橋 誠¹ (北大 歯 口腔生理学、²北大 歯 高齢者歯)

【目的】運動により脳内の神経幹細胞数が増加することや、学習能力が向上することがラットを用いた研究により明らかにされている(Itou et al., 2010; Griffin et al., 2009)。しかし、全身運動と口腔機能との連関については不明な点が多く、味覚との関係もよくわかっていない。そこで本研究では、運動が味覚の記憶に及ぼす影響を明らかにするために、トレッドミルによる強制運動が味覚嫌悪学習の獲得に及ぼす影響を調べた。【方法】6週齢のSD系雄性ラットを用い、4日間の飲水トレーニング(20分飲水→40分絶水→3時間飲水→20時間絶水)を行った。実験開始日にサッカリンを20分間飲水させ、直後にLiClを腹腔内投与し、40分間絶水の後、3時間飲水させた。2日後、絶水時間終了後に、20分間1ボトルサッカリン飲水テストを行った。ラットは、実験開始当日に運動する群、その2日後に運動する群、3日後に運動する群(各1回30分)に分けた。また、運動を行わせない群をコントロール群とした。【結果と考察】実験開始2日後に運動させた群において、コントロール群と比較して翌日のサッカリン飲水量が有意に減少した。実験開始当日に運動させた群、実験開始3日後に運動させた群ではサッカリン飲水量に有意差は認めなかった。このことから、特定の時期に1回の運動を行わせることにより、味覚嫌悪学習の持続時間が延長することが示唆された。

P1-32

口腔上皮における TRPV3 チャンネルは温度を感じし創傷治癒を促進する

○合島 怜央^{1,2,3}、王 冰¹、畠山 純子¹、大崎 康吉¹、張 旌旗¹、城戸 瑞穂¹(¹九大 院歯 分子口腔解剖、²佐賀大 医 歯科口腔外科、³佐賀大 医 組織・神経解剖)

【目的】口腔は身体他の部位よりも圧倒的に強く、多様な刺激に曝されており、故に損傷が生じることも多い。その一方で口腔上皮は高い再生力を備えており、皮膚よりも速やかに治癒し癒痕も生じにくい。本研究では皮膚と口腔の「温度環境の違い」に着目し、32℃以上の温かい温度で活性化する TRPV3 チャンネル (V3) の創傷治癒における役割について検討を行なった。【方法】野生型マウス (WT) と V3 遺伝子欠損マウス (V3KO) の口腔上皮細胞を単離しカルシウムイメージング法およびホールセルパッチクランプ法にて V3 の agonist 刺激、さらに温度刺激に対する応答の変化を調べた。さらに、創傷治癒への影響を検討するために、培養口腔上皮細胞を用い V3 の増殖に対する影響、上顎第一臼歯抜歯後の治癒に対する V3 の影響を検討した。【結果と考察】口腔上皮では皮膚上皮と比較し V3 の mRNA 発現が5倍以上高く、さらに基底細胞層で高い局在を認めた。急性単離した口腔上皮細胞では生理学的に V3 の agonist 刺激や V3 を介した温度刺激に対する応答が確認された。また V3 活性化により細胞の増殖が促進され、さらには V3KO マウスでは抜歯後の治癒が WT より遅延していた。以上より、口腔上皮が V3 を介して温度を感じし、粘膜の創傷治癒を促進していることが示唆された。会員外共同研究者 生理学研究所：富永 真琴・三原 弘・加塩麻紀子、九大学：高尾知佳

P1-33

咬合高径低下モデル動物の作成ならびに装置撤去後の咬合高径と顎運動の変化

○的場 寛¹、金山 隼人¹、山田 一尋¹、増田 裕次²(¹松歯大 歯科矯正、²松歯大 院 顎口腔機能制御)

【目的】本研究では、常生菌をもつモルモットに顎間ゴムを装着して咬合高径低下モデル動物を作成し、顎間ゴム撤去後の咬合高径と咀嚼中の顎運動の変化を明らかにすることを目的とした。【方法】実験には Hartley 系雄性モルモットを用い、頭蓋骨と下顎骨に装着した矯正用ワイヤーで製作した可撤式のフックに顎間ゴムを装着して咬合高径低下モデル動物を作成した。顎間ゴムを装着した-10日目から、顎間ゴムを撤去した0、1、4、7、11日目に、咬合高径の経日的変化を3次元エックス線マイクロCT撮影により計測し、咀嚼中の顎運動を記録した。同様の記録を行った対照群との比較・検討を行った。【結果と考察】対照群の咬合高径は-10日目から0日目で平均0.35mm増加した。これは成長による変化であった。実験群の咬合高径は、顎間ゴム撤去後で平均0.56mm減少し、対照群に比べ有意な減少を示した。咬合高径は1日で急激に増加したが、その後、11日目までに対照群と同様の咬合高径に回復はしなかった。咀嚼中の顎運動の最小開口位は、咬合高径の低下により、上方に変化したにもかかわらず、最大開口位に変化は認められなかった。常生菌を持つモルモットでは顎間ゴムの使用により咬合高径が低下すること、顎間ゴムを撤去しても対照群と同様の咬合高径にまで回復しないことが明らかとなった。また、咬合高径低下時の咀嚼中の顎運動は、最大開口位が変化しないように調節されていることが示唆された。

P1-34

三叉神経運動核周囲領域からの三叉神経運動ニューロンに対する収束性入力

○野中 睦美¹、松田 啓資^{2,3}、中村 史朗²、中山 希世美²、望月 文子²、横山 敦郎³、飯島 毅彦¹、井上 富雄²(¹昭大 歯 歯科麻酔、²昭大 歯 口腔生理、³北大 院歯 口腔機能 口腔機能補綴)

【目的】三叉神経運動核周囲網様体には三叉神経運動ニューロンに運動指令を送るプレモーターニューロンが豊富に存在しているが、プレモーターニューロンからの単一運動ニューロンへの入力特性については未だ不明である。そこで本研究では、プレモーターニューロンの様々な存在領域にレーザー光誘発性化学刺激を行い、単一咬筋 (MMN) および顎二腹筋運動ニューロン (DMN) に誘発されたシナプス応答様式を解析した。【方法】実験には生後1~5日齢ラットの前頭断脳幹スライス標本を用いた。ケージドグルタミン酸を灌流投与した状態で三叉神経上核 (SupV)、三叉神経主感覚核 (PrV)、三叉神経間領域 (IntV) および PrV 背側網様体 (dRt) を含む範囲に凹型に設定した59-73個の格子の各部位にレーザー光を照射し、誘発された電流応答をパッチクランプ法にて記録した。【結果と考察】SupV、PrV、IntV および dRt のうちで2か所以上の刺激に対して、74%のMMN (14/19) および69%のDMN (18/26) でシナプス後電流が誘発された。また、GABA_A およびグリシン受容体拮抗薬存在下でも同様の誘発割合を示した。さらにMMNではSupV外側部の刺激によりバースト状のシナプス後電流がDMNよりも高い割合で誘発された。このような三叉神経運動ニューロンへの収束性入力は、多様な顎運動パターンの遂行に役立っている可能性がある。

P1-35

マウス顎下腺の自律的概日リズム

○内田 仁司^{1,2}、阪井 丘芳²、中村 渉¹(¹阪大院歯 口腔時間生物、²阪大院歯 顎治)

唾液腺機能には、安静時唾液の分泌量、速度や構成成分などに日内リズムが認められる。哺乳類において、生理機能の概日リズムを制御する体内時計中枢は視床下部視交叉上核 (SCN) に存在する。SCNには時計遺伝子 *Period (Per)*、*Cryptochrom (Cry)* が発現しており、それらの転写-翻訳フィードバックループによって概日リズムが発振すると考えられている。また、SCN以外の脳部位や唾液腺等の末梢組織にも時計遺伝子が発現していることが明らかになりSCNはそれらの概日リズムを駆動するペースメーカーとして機能している。我々は、唾液腺にみられる機能的日内リズムがSCNに依存する制御を受けているのか、唾液腺固有の自律的機能なのかを検証した。実験には *Per2::luc* knock-in mouse を用い、マウス顎下腺の生物発光時間変動を *ex vivo* で記録した。SCNのPER2:LUC活性には、振幅の安定した概日リズムが継続して観察されたが、顎下腺では、概日リズムが観察されたものの、リズム振幅の減衰が認められた。次に、*Cry* 欠損マウスの顎下腺リズムを測定したところ、*Cry1* KOマウスでは概日周期の有意な短縮が、*Cry2* KOマウスでは周期の延長が認められた。これらの結果から、顎下腺組織には自律的概日リズム発振機能が内在しており、*Cry* はその周期の調節に関与していることが明らかになった。唾液腺の概日生理機能リズムは自律的リズム制御をうけ、さらにSCNによって調律される階層構造をとることが示唆された。

P1-36

L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制と最後野神経活動の連関

○奥舎 有加¹、平井 喜幸¹、船橋 誠¹ (北大 院歯 口腔生理、²北大 院歯 高齢者歯)

【目的】 L-ヒスチジンのラット腹腔内投与により脳内ヒスタミン量が増加し、ラットの摂食量が減少することが明らかにされている (Yoshimatsu et al., 2002)。延髄最後野は摂食調節に関与し、ヒスタミン応答ニューロンの存在も明らかにされているが、同部の神経活動の変化と摂食抑制との関連は不明である。そこで以下の実験を行った。【方法】 SD系ラット (7~20 週齢) を用い L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制作用を確認した。同じ動物を用いて味覚嫌悪学習を指標とした行動実験と免疫組織化学的解析を行った。全てのラットに対して 23.5 時間の絶水とそれに続く 30 分間の飲水トレーニングを 7 日間繰り返し行った。実験開始日にサッカリンを 30 分飲水させ、直後に L-ヒスチジンを腹腔内投与し、その後の 23.5 時間は絶水させた。絶水時間終了後に 2 ボトル飲水テスト (サッカリン・脱イオン水) を行った。また最後野神経活動を調べるために *c-fos* 発現を免疫組織化学的に可視化した。【結果と考察】 L-ヒスチジン腹腔内投与により摂食量の有意な減少を認めた。また味覚嫌悪学習の獲得は認められず、延髄最後野及び孤束核における *c-fos* 陽性細胞数の増加が認められた。以上より L-ヒスチジン腹腔内投与により摂食抑制が生じる際に最後野神経活動が上昇するものの、悪心誘発は生じないことが明らかとなった。

P1-37

狭心症に伴う顎口腔系の疼痛は心臓迷走神経によって伝えられる

○林 文祥¹、前田 昌子¹、玉置 潤一郎¹、鶴岡 正吉¹、井上 富雄¹ (昭大 院歯 口腔生理)

【目的】 狭心症の関連痛が顎口腔系に現れることはよく知られている。前回我々は、心臓への発痛物質投与によって三叉神経脊髄路核尾側亜核に *c-Fos* が発現することを報告し、尾側亜核に心臓からの痛覚信号が入力されることを示した。今回は、心臓から尾側亜核に入力する痛覚信号を伝える末梢神経について検討した。【方法】 ウレタンで麻酔した雄性 Wistar ラットを用いた。両側性に心臓迷走神経を切断した後、左側胸腔に小穴を開け、シリコンチューブを心膜内側に挿入した。発痛物質 (アデニン、ブラジキニン、プロスタグランジン E₂ およびセロトニンの混合液) と生理食塩水とをシリコンチューブを介して交互に 3 分間隔で灌流し、この操作を約 1 時間継続した。さらに 2 時間経過後に脳と脊髄を取り出し、常法に従って Fos 免疫化学染色を行った。【結果】 心臓迷走神経切断群では、脊髄 (C1-C2) で Fos 免疫陽性細胞数の有意な増加が観察された。脊髄における Fos 免疫陽性細胞数の増加は対照群 (心臓迷走神経が無傷) と比べて有意差は認められなかった。一方、尾側亜核では対照群に比して切断群に Fos 免疫陽性細胞数の有意な増加が観察されなかった。【考察】 上記の結果は、心臓からの痛覚信号は心臓迷走神経を介して尾側亜核に入力されることを示唆している。

P1-38

IL-6 はマウス咬筋の激しい活動におけるグルコース維持に関与する

○木山 朋美^{1,2}、土谷 昌広³、佐々木 啓一²、菅原 俊二¹、遠藤 康男¹ (東北大 院歯 口腔分子制御、²東北大 院歯 口腔システム補綴、³東北大 院歯 加齢歯科)

【背景と目的】 IL-6 は活動筋肉から遊離され筋肉のグルコース恒常性を支えると報告されている。しかし、咬筋での働きは不明である。本研究ではこの点について検討した。【方法】 マウスを細い筒に閉じ込め (R: restraint) 出口をプラスチック板で閉じると、マウスは脱走用の隙間を作るため、この板を長時間咬み砕き続ける (G: gnawing) (この実験系を R + G + と呼称)。R + G + でのプラスチック板の減少量は咬筋活動量を示す。本実験系を用いて IL-6 の効果を検討した。【結果】 R + G + は咬筋での IL-6 と glucose transporter 4 (Glut4) の mRNA および血清 IL-6 蛋白を増加した。IL-6KO マウスでは、WT マウスに比べ、R + G + での咬筋活動量は有意に低く、咬筋へのグルコース供給は乏しく、咬筋 Glut4 mRNA の増加は無かった。トレーニング (R + G + の繰り返し) WT マウスでは、咬筋活動量は顕著に増加したが、R + G + 後の咬筋 mRNA の増加は無かった。離乳後 3 週間を粉末飼料飼育した WT マウスに固形飼料を与えると、咬筋 IL-6 は増加するが、固形飼料飼育マウスへの固形飼料投与では IL-6 の増加は無かった。【考察】 IL-6 は日常的な咬筋活動には関与しないが、非日常的な激しい咬筋活動でのグルコース恒常性の維持に関与するものと思われる。

P1-39

不正咬合が扁桃体のダイノルフィン神経系を介して学習・記憶機能に及ぼす影響

○山田 健太郎¹、小泉 創²、山本 利春³ (神歯大 院歯 生理、²神歯大 院歯 矯正、³神歯大 院歯 生物)

【目的】 咬合状態が悪くなったときに反応するオピオイド神経系に着目し、咬合不全時のこれら神経系の動態を神経解剖学的・行動生理学的に解明することを目的とした。【方法】 不正咬合モデルマウスは歯科用レジンで臼歯部を挙上することで作製した。咬合挙上後 1、2、3、5、7 日目に、扁桃体及び海馬においてオピオイドの一種であるダイノルフィンの変動を免疫組織化学的、生化学的に分析・定量した。また咬合挙上が学習・記憶に及ぼす影響をモリスの水迷路によって査定し、ダイノルフィン神経系の関与を検証した。【結果及び考察】 免疫染色法による形態学的検索並びに ELISA 法による定量の結果、扁桃体においては、咬合挙上後 1、2、3 日後にダイノルフィンの上昇が認められたが、海馬においては著名な変化は見られなかった。行動生理学的実験により、ダイノルフィンのアンタゴニストである nor-BNI 投与が、咬合挙上群にみられる学習・記憶機能の低下を軽減することが明らかになった。これらの結果は、咬合挙上による学習・記憶機能の低下が、ダイノルフィン神経系に関与すること、並びにそれに関わる神経系は海馬ではなく、扁桃体のダイノルフィン神経系に起因することを示唆する。従って、扁桃体のダイノルフィン神経系が不正咬合による不快感を軽減することを示唆する。

P1-40

ワイヤー法による *Streptococcus-Veillonella* 属菌種のバイオフィルム形成とその定量

○眞島 いづみ¹、鎌口 有秀¹、宮川 博史¹、藤田 真理¹、中澤 太¹ (¹北医大 歯 微生物)

【背景】口腔 *Veillonella* 属は口腔バイオフィルムを構成する主たる早期定着菌として形成初期から多く存在し、現在、*V. atypica*、*V. denticariosi*、*V. dispar*、*V. parvula*、*V. rogosae*、*V. tobetsuensis* の6菌種が分離同定されている。しかし、口腔 *Veillonella* 属菌種レベルのバイオフィルム形成能の詳細は未だに明らかになっていない。【目的】*Streptococcus gordonii*、*S. mutans*、*S. salivarius* と口腔 *Veillonella* 6菌種のバイオフィルム形成能を解析する。【材料と方法】上記口腔 *Veillonella* 属6菌種と *S. gordonii*、*S. mutans*、*S. salivarius* の代表的菌株を、人口唾液により処理した直径0.9 mmのワイヤーを挿入した試験管に各1菌種のみ、2菌種の全ての組み合わせで菌液を播種し、37℃、嫌気条件下で培養した。バイオフィルムの形成を確認後、全DNAを抽出し、定量的 real-time PCRによりワイヤー表面に形成されたバイオフィルムの構成菌種を定量した。【結果と考察】*Streptococcus* 属単独よりも、各口腔 *Veillonella* 属細菌と共培養することにより、バイオフィルム形成量は明らかに増加した。またそのバイオフィルム形成量も *Veillonella* 属細菌種により大きく異なった。これらの結果より、口腔バイオフィルム形成初期段階において、口腔 *Veillonella* 属は菌種レベルでその役割が異なる可能性が示唆された。

P1-42

口腔細菌が形成するバイオフィルムにおける cyclic-di-GMP の影響

○金野 弘靖¹、吉田 康夫²、中村 好徳¹、田中 貴信¹、吉村 文信² (¹愛院大 歯 有床義歯、²愛院大 歯 微生物)

【目的】cyclic-di-GMP は細菌に対して、運動性、付着能、病原性、細胞サイクルなどに関与している事が報告されており、微生物におけるセカンドメッセンジャーとして近年衆目を集めている分子である。本研究では、口腔内レンサ球菌に対する cyclic-di-GMP のバイオフィルム形成抑制効果について検討した。【方法】口腔内レンサ球菌の *S. gordonii*、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. oralis*、*S. anginosus*、*S. sanguinis* を 96 well flat-bottom plate にて BHI 培地中に 37℃ 48 時間嫌気培養した。それらの培養液に、cyclic-AMP、cyclic-GMP、および cyclic-di-GMP を添加した。培養後、上清を取り、PBS にて洗浄乾燥後 0.1% Crystal violet 染色した。その後、PBS にて水洗乾燥後、99% メタノール抽出し、マイクロプレートリーダーにて OD₅₉₅ で測定した。【結果】*S. mutans*、*S. oralis*、*S. anginosus* において 400 μM の cyclic-di-GMP の存在下で、バイオフィルム形成が有意に抑制された。また、それらの菌において、バイオフィルム抑制効果は、cyclic-di-GMP の濃度依存的であった。一方、cyclic AMP と cyclic GMP は同濃度にて添加しても、バイオフィルム形成における影響は認められなかった。また、*S. gordonii*、*S. sanguinis*、*S. sobrinus* は、400 μM の cyclic-di-GMP 存在下においても、バイオフィルム形成の差は認められなかった。会員外共同研究者 早川芳宏 (愛知工業大学)

P1-41

Fusobacterium nucleatum と *Streptococcus mutans* との共凝集におけるクオラムセンシングの関与について

○竜 佑宗¹、三上 正人²、葛城 啓彰²、下村-黒木 淳子¹ (¹日歯大 新潟生命歯 小児歯、²日歯大 新潟生命歯 微生物)

【目的】歯周病原性細菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィルムへの参入には、すでに付着定着されている菌との共凝集による結合が必要であることが知られている。本研究では、共凝集によるバイオフィルムへの影響を探索するため、齲蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* を共凝集させグルカン合成に関与する *gtf* 遺伝子と *dex* 遺伝子、クオラムセンシングに関与すると考えられている *luxS* 遺伝子の発現について検討した。【方法】*F. nucleatum* 25586 株に対し *S. mutans* MT6R 株、および MT5091 株を Cisar らの方法に準じ、好気条件および嫌気条件下にて共凝集試験を行った。その後、凝集した菌体から RNA を調整し cDNA を合成した。*gtf B*、*gtf C*、*gtf D*、*dex A*、*lux S* について、定量的 real-time PCR (qRT-PCR) にて遺伝子発現量を比較した。【結果】*S. mutans* MT6R 株および MT5091 株は *F. nucleatum* との共凝集が認められた。*S. mutans* の遺伝子発現は、*F. nucleatum* と共凝集した場合の方が、単独の場合に比較して高かった。また嫌気条件下の方が好気条件下よりも共凝集時の遺伝子発現が高かった。【考察】*S. mutans* と *F. nucleatum* の間において異種菌間シグナル分子の存在が示唆された。口腔内のプラークにおいても、*F. nucleatum* の存在が *S. mutans* のグルカン合成に影響を及ぼすものと考えられる。

P1-43

歯周病原細菌および齲蝕病原性細菌に対する漢方薬の殺菌効果

○武田 織英¹、佐藤 武則²、渡辺 清子²、笹栗 健一¹、浜田 信城² (¹神歯大 矯正、²神歯大 感染制御)

【目的】漢方薬は、植物や動物、鉱物などの自然界に存在する天然物である生薬を数種類組み合わせたものであり、多くの有効成分を含んでいることから複雑多様な症状に効果を示す事が知られている。歯周病は、細菌感染に加えて局所的・全身的なリスクファクターが関与していることから、漢方薬による改善効果が期待できると考えている。そこで本研究では、まず口腔内細菌に対する殺菌効果について検討を行った。【方法】供試菌株は、*Escherichia coli* HB101、*Staphylococcus aureus* ATCC 12260、*Streptococcus mutans* Ingbritt、*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277、*Candida albicans* ATCC 10231 の5菌株を用いた。殺菌効果の判定は、黄連解毒湯、十全大補湯、補中益気湯、排膿散及湯、大柴胡湯 (ツムラ) の5種類を用いて各漢方薬を 1 mg/ml、10 mg/ml、100 mg/ml 濃度に調整後、供試菌に対してディスク拡散法で検討した。また、漢方薬溶液に菌液を 1/100 量加えて経時的に生菌数を算定した。【結果と考察】供試した漢方薬のすべてが歯周病原細菌である *P. gingivalis* に対して、殺菌効果を有することが確認された。特に、それぞれ 100 mg/ml 濃度の黄連解毒湯と大柴胡湯溶液に 15 分間作用させることにより *P. gingivalis* 生菌は確認されなかった。以上の結果から黄連解毒湯と大柴胡湯は、歯周病の予防や治療に有効な漢方薬であることが示唆された。

P1-44

ラット歯周炎モデルにおける低濃度フッ化物の歯槽骨吸収抑制作用

○何 大唯¹、Bhawal Ujjal^{1,2}、佐藤 武則³、遠山 歳三³、川股 亮太⁴、荒川 勇喜¹、安孫子 宜光²、浜田 信城³、荒川 浩久¹ (¹神歯大 口腔保健、²日大 松戸歯 生化・分子生物、³神歯大 微生物、⁴神歯大 放射線)

The surface of oral mucosa can be served as a long-term fluoride reservoir following topical fluoride application. In this study, we investigated the effect of systemic fluoride application on alveolar bone loss induced by *Porphyromonas gingivalis* infection. Sprague-Dawley Rats were orally challenged with *P. gingivalis* suspended in 5% carboxymethylcellulose at 48h interval. All animals were sacrificed under anesthesia. Tissue blocks containing all three maxillary molars, and surrounding soft tissues were removed from the right side of the maxilla. The left side of the maxilla was used as a dry specimen for measurement of horizontal alveolar bone loss. All three mandibular molars were evaluated by micro CT analysis. Horizontal alveolar bone loss was evaluated by measuring the distance between the cemento-enamel junction and the alveolar bone crest. Specimens from periodontal tissue were evaluated by staining with hematoxylin-eosin and tartrate-resistant acid phosphatase. These results suggest that low level fluoride prevents the progression of *P. gingivalis*-challenged periodontitis.

P1-46

Prevotella oris が産生する溶血素の溶血機序

○佐藤 寿哉¹、鎌口 有秀¹、藤田 真理¹、宮川 博史¹、中澤 太¹ (¹北医大 歯 微生物)

【目的】 *Prevotella oris* は口腔顎顔面領域の化膿性炎から高い頻度で分離される偏性嫌気性グラム陰性桿菌である。我々はこれまでに *P. oris* が産生する溶血素を精製し、その性状について報告した。しかし、口腔内細菌が産生する溶血素の溶血機序はほとんど明らかにされていない。今回は *P. oris* の溶血素が赤血球の膜タンパクに与える影響について検討した。

【方法】 溶血素による赤血球の破壊と膜タンパクとの関連を検討する為に、各種プロテアーゼで処理した赤血球を用いて溶血活性を測定した。活性は遊離したヘモグロビンを 540 nm における吸光度を測定し評価した。さらに、溶血素で処理した赤血球膜を SDS-PAGE 分析し、膜タンパクに与える影響を検討した。影響を認めた膜タンパクについては、N 末端アミノ酸配列解析から同定した。

【結果と考察】 赤血球を各種プロテアーゼで処理した結果、本溶血素の活性は抑制された。これは赤血球の膜タンパクが溶血に深く関与していることを示している。溶血素で処理した赤血球の膜タンパクの電気泳動パターンを比較検討した結果、38 kDa のバンドの消失が認められた。N 末端アミノ酸配列解析から、そのタンパクは GAPDH と同定された。以上の結果から、本溶血素による溶血過程に、GAPDH が深く関与していると推察された。

P1-45

Effects of polyamines on single species biofilms of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*

○Alghamdi Samar¹、久保庭 雅恵¹、橋野 恵衣¹、富尾 紋子²、馬場 健史²、福崎 英一郎²、天野 敦雄¹ (¹阪大 歯 予防、²阪大 工 生命先端)

Background: Imbalance in homeostasis of polyamine was reported to have a role on altered level of virulence in several bacterial species. Here, we investigated effects of polyamines on single species biofilms of *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. **Materials and methods:** *P. gingivalis* ATCC33277 and *S. gordonii* DL1 were used. Bacterial cells in modified CDM were inoculated into saliva-coated CultureWell system. Resulting biofilms were further incubated with PBS containing each polyamine for 24hours, respectively. Structural and quantitative analyses of biofilms were accomplished by confocal laser scanning microscopy and IMARIS software. **Results:** In *P. gingivalis*, spermidine stimulated biofilms to detach from a solid surface and form floating clumps, while putrescine significantly accelerated the biofilm growth and increased planktonic cells in a dose dependant manner. Besides biovolume-suppressive effect of 10 mM spermidine, *S. gordonii* biofilms were not significantly affected by polyamine treatment. **Conclusion:** Each polyamine showed different effect on biofilm microstructure and detachment.

P1-47

歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の同定

○井貝 亮太¹、出水川 雅司¹、長谷川 義明²、川端 淳司¹、北井 則行¹、村上 幸孝² (¹朝日大 歯 矯正歯科、²朝日大 歯 口腔微生物)

【目的】 蛋白質のリン酸化修飾はさまざまな生命現象を支える翻訳後修飾である。近年、原核生物においてもリン酸化蛋白質の研究が進められているが、*P. gingivalis* においてはよく分かっていない。本研究では、*P. gingivalis* の菌体に存在する主なリン酸化蛋白質を検出するとともに、その同定を試みた。

【方法】 *P. gingivalis* W83 株を嫌気培養し、菌体成分を調製した。膜画分を電気泳動で展開した後、Pro-Q Diamond を用いた特異的染色により、リン酸化蛋白質の検出を行った。電気泳動後のゲルから染色されたリン酸化蛋白質バンドを切り出し、トリプシン消化を行った後、質量分析による同定を行った。

【結果と考察】 膜画分の Pro-Q Diamond 染色を行うと約 55 kDa のバンドが強く染色された。質量分析の結果、このバンドが主要外膜蛋白質の RagB であることが明らかになった。さらに、W83 株を親株とした *ragB* 欠失変異株を用いて検討を行ったところ、Pro-Q Diamond 染色で検出されるバンドが消失していることが確認できた。現在、RagB におけるリン酸化修飾の様式や修飾部位の検討を進めている。

P1-48

Rab タンパク質による A 群レンサ球菌感染誘導オートファジーの制御機構

○野澤 孝志¹、相川 知宏¹、渡辺 孝康¹、丸山 史人¹、中川 一路¹ (東医歯大 院医歯 細菌感染制御)

非貪食細胞に取り込まれた A 群レンサ球菌(GAS)は、オートファゴソームに取り込まれ、リソソームと融合して分解される。この細菌分解時のオートファゴソームサイズは一般的なものの数十倍以上にも達することなどから、細菌分解時特異的なオートファジー誘導メカニズムが存在すると考えられている。そこで、本研究では細胞内の小胞輸送制御を担う Rab ファミリータンパク質の網羅的な解析により、GAS 感染により誘導されるオートファジーに重要な Rab タンパク質を同定し、その機能を明らかにすることを目的とした。

これまでにタンパク質分解機構としてのオートファゴソームに局在が報告されている Rab5、11、24、33B とその他 6 つの Rab タンパク質 (Rab4A、9A、9B、10、13、23) の細胞内局在を調べた結果、Rab9A と Rab23 が GAS 感染に対するオートファゴソームに局在していた。これら 2 つの Rab タンパク質はタンパク質分解時のオートファゴソームには局在が認められなかった。また、各 Rab タンパク質のノックダウン細胞を用いて解析を行った結果、Rab9A はオートファゴソーム同士の融合による拡大とその後のリソソームとの融合に、Rab23 はオートファゴソームの形成、特に菌のターゲティング関与していることが示唆された。以上の結果から、細菌感染に対しては、タンパク質分解時とは異なる Rab タンパク質を用いることで、細菌分解に適したオートファジー制御が行われていることが示唆された。

P1-50

骨欠損修復における骨基質の石灰化に関する検討

○大方 広志^{1,2}、中村 恵²、逸見 晶子²、島内 英俊¹、笹野 泰之² (東北大 院歯 歯内歯周治療、²東北大 院歯 顎口腔形態創建)

【目的】骨修復過程における石灰化については知見が乏しい。本研究では、ラット頭頂骨規格化骨欠損実験系を用いて、修復骨の骨密度と構成元素の分布および濃度を解析し、修復骨基質の石灰化を検討することを目的とした。【方法】全身麻酔下に、生後 12 週齢ラットの頭頂骨に直径 3.8 mm の規格化骨欠損を作製した。術後 1 週、2 週、4 週および 8 週の段階でラットを 4%パラホルムアルデヒドで灌流固定後、頭蓋骨を摘出し、規格化骨欠損部に形成された修復骨の骨密度をマイクロ CT で定量解析した。さらに試料を非脱灰で凍結包埋して修復骨中央の切片を作製し、組織学的に検討した。また、切片を得た凍結包埋試料を凍結乾燥し、修復骨中央断面を対象に分析走査電子顕微鏡 (SEM-EDX) を用いて構成元素 (Ca, P, C) の分布と相対的な濃度を解析した。なお、生後 12 週齢ラットの頭頂骨をコントロールとし、同様に解析した。【結果】マイクロ CT 画像と組織像との検討で、術後 1 週で修復骨が認められた。修復骨の骨密度は術後週齢が増すに伴い上昇した。SEM-EDX による分析では、修復骨における Ca と P の元素分布はほぼ対応し、C の元素分布とは相補的であった。また、修復骨形成過程で、骨基質における Ca および P の相対的濃度は上昇したが、C の元素濃度は低下した。【結論】修復骨の形成過程では、経時的に石灰化が進行する一方で、有機質が減少する。

P1-49

インプラント周囲骨細胞の免疫組織化学的検索

○羽下-辻村 麻衣子¹、網塚 憲生²、前田 健康³、吉江 紀夫¹ (日歯大 新潟生命歯 解剖 2、²北大 院歯 硬組織発生生物、³新大 院医歯 口腔解剖)

【目的】骨細胞の機能は骨改造に関与するといわれている。我々はこれまでに、ラット上顎骨に植立したインプラント周囲骨が骨改造により緻密骨へ置換され、骨細胞の配列や機能が変化することを報告した。本研究では骨改造中のインプラント周囲骨の骨細胞に着目し、免疫組織化学的検索を行った。

【材料と方法】4 週齢雄性 Wistar 系ラットの顎臼歯を抜歯し、治癒後にチタンインプラントを植立した。インプラント周囲骨組織を経時的に固定し、dentin matrix protein 1 (DMP1)、bone matrix proteins (BMPs)、matrix metalloproteinases (MMPs)、tissue inhibitors of metalloproteinase 1 (TIMP1) の免疫染色を施し観察した。

【結果と考察】DMP1 免疫蛍光染色により、インプラント植立後早期の周囲骨に骨細胞の消失した骨小腔が存在することが 3 次的に確認され、窩洞形成が周囲骨細胞に影響を与えることが示唆された。一方、インプラント治癒過程の周囲骨において BMPs、MMPs および TIMP1 陽性骨細胞が観察されたことより、インプラント周囲の骨細胞は骨基質の合成や分解に関わり、骨改造を局所的に調整していることが推察された。以上より、インプラント周囲骨細胞はインプラント成功に関わる重要な因子であると推測された。

P1-51

血小板由来増殖因子が C2C12 培養筋芽細胞およびマウス舌筋細胞の増殖、分化に及ぼす影響

○千見寺 亮吉¹、山根 明²、安藤 準²、五味 一博¹ (鶴見大 歯 歯周病、²鶴見大 歯 物理)

【目的】本研究の目的は、C2C12 培養筋芽細胞およびマウス舌筋細胞の増殖、分化における血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) の役割を明らかにすることである。【材料および方法】C2C12 培養筋芽細胞を 5%馬血清含有分化培養液中で、胎齢 12 日のマウス舌を無血清、化学合成培養液中で 4 日間培養した。そして、培養液にリコンビナント PDGF-BB を添加して C2C12 培養筋芽細胞およびマウス舌筋細胞の増殖、分化に及ぼす影響について調べた。【結果】PDGF-BB で処理した C2C12 においてはコントロールの C2C12 と比較して増殖マーカーである cyclin D1 の mRNA 発現量は統計学的に有意に増加したが (p<0.01)、筋の分化マーカーの mRNA 発現量は抑制される傾向にあった。PDGF-BB で処理した舌筋細胞においてはコントロールの舌筋細胞と比較して筋の分化マーカー、特に myogenin などの後期分化マーカーの mRNA 発現量は統計学的に有意に減少していたが (p<0.05~0.01)、cyclin D1 などの増殖マーカー、myf5 などの初期分化マーカーの mRNA 発現量には顕著な影響を及ぼさなかった。【結論】以上の結果より、PDGF-BB は C2C12 においては増殖を促進、分化を抑制しており、また舌筋細胞においては分化を抑制している可能性が示唆された。

P1-52

成犬頭蓋冠臨界骨欠損における OCP 含有率の異なる OCP/Col の骨再生能

○小林 司史^{1,2}、松井 桂子¹、川井 忠¹、枝松 洋¹、神田 直典^{1,2}、鈴木 治²、鎌倉 慎治³、越後 成志¹、高橋 哲¹ (¹東北大学 歯 顎顔面・口腔外科、²東北大学 歯 顎口腔機能創建、³東北大学 骨再生医工)

【目的】リン酸オクタカルシウム (OCP) は、ラットやマウスの臨界骨欠損部への埋入実験で優れた骨再生能が確認されており、OCP と Collagen を複合させた OCP/Col では骨再生能が向上した。ラットを使用したわれわれの研究で OCP/Col 中の OCP 含有率依存的に、骨再生能の向上が確認されている。そこで今回 OCP 含有率の異なる 2 種類の OCP/Col を作製し、イヌ頭蓋冠臨界骨欠損における骨再生能を比較検討した。【方法と材料】粒子径 100-200 μ m の合成 OCP とブタ皮膚由来アテロコラーゲンから OCP83% 含有の OCP83/Col と OCP77% 含有の OCP77/Col 2 種のディスクを作製した。イヌ頭蓋冠両側に直径 20 mm の臨界骨欠損を作製し、OCP/Col を各々 10 枚ずつ埋入した。埋入実験から 3 か月ないし 6 か月観察後に標本摘出し、X 線学的・組織学的・組織定量的評価を行った。【結果】X 線学的評価では OCP83/Col は OCP77/Col よりも高度な X 線不透過性を呈した。またそれぞれの埋入群において、経時的に 3 か月観察した群に比べて 6 か月観察した群は不透過性の亢進を認めた。組織学的および組織形態学的評価において 6 か月観察した群では OCP83/Col 埋入群の欠損部の新生骨量が有意に増加した。【結論】口腔外科臨床に匹敵するサイズの骨欠損モデルとしてのイヌ頭蓋冠臨界骨欠損部において OCP/Col 中の OCP 含有率を高めることによりさらに骨再生能は向上することが示唆された。

P1-54

オキシタラン線維は線維芽細胞長軸に直交し走行する

○中島 一記¹、山内 由宣¹、藤田 隆寛¹、敦賀 英知²、沢 禎彦²、石川 博之¹ (¹福歯大 矯正歯科、²福歯大 機能構造)

【目的】歯根膜におけるオキシタラン線維は、歯根膜を縦走し歯根膜組織の機能維持に寄与していると考えられている。これまで我々は、細胞伸展装置を用いたヒト歯根膜線維芽細胞の細胞培養実験で、オキシタラン線維束が凝集し生体のオキシタラン線維の直径に近似する条件を確立した。しかし細胞長軸とオキシタラン線維との位置関係の詳細は不明である。そこで今回、オキシタラン線維の走行と線維芽細胞との関係を検討した。【資料および方法】ヒト歯根膜線維芽細胞を培養し、細胞伸展装置にて伸展刺激を細胞に付与 (対照群: 伸展率 0%、実験群: 伸展率 5%) し、細胞骨格アクチンとオキシタラン線維の二重蛍光免疫染色を行った。その後、画像解析ソフトウェアを用いて、細胞長軸とオキシタラン線維の走行との平均的角度の解析を行った。【結果および考察】二重蛍光免疫染色により、対照群では、オキシタラン線維は細胞長軸と直行する傾向がみられ、実験群では、細胞が再配列し、凝集したオキシタラン線維束でも細胞長軸と直行する傾向がみられた。画像解析ソフトウェアを用いたアングル解析からも、オキシタラン線維は細胞長軸とほぼ直行することが明らかとなった。以上のことから、オキシタラン線維が伸展刺激により線維束が凝集するだけではなく、ある方向性をもって凝集することが示唆された。【結論】オキシタラン線維は歯根膜線維芽細胞長軸にほぼ直交し走行することが明らかとなった。

P1-53

犬におけるリン酸オクタカルシウムコラーゲン複合体 (OCP/Col) を介した歯の萌出の解析

○神田 直典^{1,2}、松井 桂子¹、川井 忠¹、枝松 洋¹、小林 司史^{1,2}、鈴木 治²、鎌倉 慎治³、越後 成志¹、高橋 哲¹ (¹東北大学 歯 顎顔面・口腔外科、²東北大学 歯 顎口腔機能創建、³東北大学 骨再生医工)

【目的】リン酸オクタカルシウム (OCP) は生体内埋入後に優れた骨再生能および生体内吸収性を発揮する。さらに OCP とコラーゲンを複合化した OCP/Collagen 複合体 (OCP/Col) は、OCP 単独より優れた骨再生能を有する。顎裂部への自家骨移植の代替に骨再生材料を適用するには、未萌出後続永久歯が再生骨内に自然萌出することが要求される。本研究の目的は骨再生材料によって形成された骨組織の性状と後続永久歯の萌出状態を確認し、永久歯萌出前の顎裂部自家骨移植の代替に OCP/Col が適用可能か検討することである。【材料および方法】人工合成 OCP とブタ皮膚由来コラーゲン溶液を複合化し OCP/Col を作製した。対照試料は市販 β -リン酸三カルシウム (β -TCP) とした。側頭第 2・3 乳臼歯の抜歯窩骨欠損部に對し OCP/Col 埋入、 β -TCP 埋入、および抜歯単独の 3 群を作製した。未萌出の後続永久歯萌出確認のため X 線写真を撮影し術後 17 週で経過観察終了とした。【結果】OCP/Col 群において後続永久歯の萌出障害は認められず、 β -TCP 群の一部に後続永久歯の埋伏と萌出遅延がみられた。また OCP/Col 群の周囲歯槽骨は β -TCP 群、抜歯単独群に比べ高く保たれていた。【結論】OCP/Col は顎裂部自家骨移植の代替治療に骨再生材料として適用可能であることが示唆された。

P1-55

生体用 β 型 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 合金の基礎的研究

○枝松 洋¹、鎌倉 慎治²、神田 直典¹、小林 司史¹、松井 桂子¹、越後 成志¹、高橋 哲¹ (¹東北大学 歯 顎顔面・口腔外科、²東北大学 骨再生医工)

【緒言】チタン合金は強度が高く、耐食性に優れ、高い骨親和性を有しているため、Commercially Pure Titanium (CP-Ti) と Ti-6Al-4V 合金 (Ti64) が歯科用インプラント材料として使用されている。しかし CP-Ti は歯科用インプラント材料としての強度が不十分であり、Ti64 は合金組成に神経毒性や細胞毒性を有する Al, V を含む。さらに CP-Ti や Ti64 の弾性率は顎骨と比較して高いため応力遮蔽を生じる原因となる。そこで無毒性および非アレルギー性元素により構成され、低弾性率である生体用 β 型 Ti-29Nb-13Ta-4.6Zr 合金 (TNTZ) が開発された。本研究は TNTZ の歯科用インプラント材料としての適用を目的とし、骨結合能および骨親和性に関して検討した。【材料・方法】 $\phi 1.7$ mm \times 8.0 mm の丸棒で表面を鏡面仕上げした TNTZ、CP-Ti、Ti64 を埋入試料とした。イヌ下顎骨の第 2、第 3 前臼歯抜歯窩に類舌的に各試料を埋入した。埋入後 3 か月ないし 6 か月で標本摘出し、X 線学的、生体力学的、組織学的、組織定量的に評価した。【結果】打ち抜き試験において TNTZ は Ti64 と比較して高値を示した。TNTZ の骨接触率は CP-Ti、Ti64 と比較して高値を示した。TNTZ の骨面積率は CP-Ti、Ti64 と比較して高値を示した。【結論】TNTZ の優れた骨結合能と骨親和性が確認された。以上より TNTZ は歯科用インプラント材料として適用の可能性が示唆された。

P1-56

Bone regeneration using stem cells from long-term cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth

○馬 蘭¹、山座 孝義²、牧野 友祐^{2,3}、山座 治義¹、星野 慶弘¹、増田 啓太郎¹、久木田 敏夫²、野中 和明¹ (¹九大 院歯 小児歯、²九大 院歯 分子口腔解剖、³九大 院歯 クラウンブリッジ、⁴九大 病院 口腔総合診療)

Stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) have been proved as a potent candidate for regenerative medicine. Recently we reported that SHED from the cryopreserved deciduous pulp tissues over 2 years (SHED-Cryo) exhibited similar stem cell properties and immunomodulatory effects with SHED from fresh tissues (SHED-Fresh). This study aims to assess that SHED-Cryo could be suitable for bone regeneration. SHED-Cryo transplantation was capable of rescuing a remarkable osteoporotic bone-loss in long bones of MRL/lpr mice by micro-CT analysis. Serum levels of sRANKL and C-terminal telopeptides of type I collagen were significantly reduced and serum osteocalcin was increased in SHED-Cryo-received group. Bone marrow cells isolated from SHED-Cryo transplanted MRL/lpr mice exhibited the reduced osteoclastogenesis and increased osteoblastogenesis in ex vivo culture experiments. These data suggest that SHED-Cryo provide a new sight for skeletal disorder and can be a desirable choice for regenerative therapy.

P1-58

歯面上に生成した沈着物に対するフィチン酸の作用に関する検討

○中内 元¹、筒井 生¹、江下 義之¹ (¹花王 パーソナルヘルスケア研)

これまでに我々は、歯のツヤに影響を与える歯面上に生成した沈着物は、唾液由来と考えられる有機物と無機物（エナメル質を構成しているヒドロキシアパタイト（HA）よりも結晶性が低いHAや非晶のリン酸カルシウム）で構成され、これらを除去する素材としてフィチン酸が有効であることを報告してきた。本検討では、これら沈着物に対するフィチン酸の作用について、モデル物質を用いて検討を行ったので報告する。

沈着物中の無機物のモデルとして結晶性の低いHA粉末（L-HA）、エナメル質のモデルとして結晶性の高いHA粉末（H-HA）を用い、それぞれに様々な酸を作用させた時のカルシウム（Ca）溶出量を測定した。その結果、L-HAとH-HAからのCa溶出挙動は作用させる酸によって異なり、特にフィチン酸の作用には結晶性による選択溶解性が存在することが示された。また、あらかじめフィチン酸処理を施したH-HAに酸を作用させた結果、未処理のH-HAと比較してCa溶出量が抑制されたことから、フィチン酸は結晶性の高いHAに対しては、その表面に吸着するなどの作用によって溶解性を制御しているものと考えられた。

以上のことから、フィチン酸の作用にはHAの結晶性の違いによる選択溶解性が存在し、歯面上に生成した沈着物をはじめとする結晶性の低いHAに対しては除去するものの、エナメル質のような結晶性の高いHAは除去しないと考えられた。

P1-57

歯間部ワイヤー結紮除去後の根尖部歯槽骨吸収の解析

○窪野 美乃^{1,2}、馬谷原 光織³、大塚 裕忠²、片岡 竜太³、井上 美津子¹、中村 雅典² (²昭大 歯 小児歯、³昭大 歯 口腔解剖、³昭大 歯 スペシャルニーズ口腔医)

根尖部歯槽骨吸収は、通常歯髄炎からの波及により生じる根尖性歯周炎が一般的であるが、化学的刺激、外傷性咬合による物理的刺激により誘導される場合もある。ラットにおいては、臼歯を露髄開放させることにより根尖性歯周炎を誘発させる方法が一般に採用されているが、非感染性に根尖部位の骨吸収を誘導する系は報告されていない。今回、歯間離開に伴う根尖部骨吸収誘導の結果を得たので報告する。8週齢Wister系ラットの上顎第一・二臼歯間を歯科矯正用ワイヤーで結紮し、2週間留置した。ワイヤー除去後、2週および4週における根尖部歯周組織の変化を、マイクロCTによる骨組織定量的ならびに組織学的に解析を行った。対象群として露髄開放させたものを使用した。マイクロCTによる解析で、ワイヤー除去後2週および4週で、第一臼歯遠心頬側根尖孔付近に骨吸収像が認められ、4週の方が2週よりも有意に骨吸収が進行していた。組織学的解析で、露髄開放群では炎症所見および多数の破骨細胞が認められたが、ワイヤー除去後の根尖部歯周組織では、骨吸収が進行しているものの炎症所見や細菌の存在は認められなかった。また、2週および4週における骨吸収部位に破骨細胞は存在するものの、その数の増加は認められなかった。以上の結果から、細菌感染を伴わない根尖部歯槽骨吸収を誘導することが出来た。その骨吸収機構については更に詳細な組織学的検索が必要である。

P1-59

Runx シグナリングは唾液腺組織内の上皮系幹細胞の維持に関与する

○柳田 剛志¹、山城 隆² (¹岡大 病院 矯正歯科、²岡大 院医歯薬 歯科矯正)

唾液腺は生涯を通じて唾液を分泌するが、このためには唾液腺に存在する組織幹細胞の恒常性が維持されなければならない。一方、毛髪や切歯においてRunx遺伝子が上皮系幹細胞の維持に関与していることが明らかにされており、また我々の研究グループではRunx遺伝子が唾液腺の上皮で発現していることを見出している。そこで今回我々は、Runx分子が唾液腺由来幹細胞の維持に関与しているのではないかと考え、Runx分子群の共役因子として知られるCbfbのコンディショナルノックアウトマウスを作製し唾液腺の観察を行った。唾液腺の組織観察は、免疫染色法とin situ hybridization法を用いて行った。また、遺伝子発現様態の変化はマイクロアレイとリアルタイムRT-PCR法を用いて行った。その結果、Cbfbコンディショナルノックアウトマウスでは、唾液腺組織の縮小、唾液腺量の低下が見られた。マイクロアレイではFGF9遺伝子発現の低下が見られ、免疫染色ではリン酸化STAT3の発現低下が見られた。これらのことから、RunxシグナルがStatシグナルを介して唾液腺細胞の増殖に関与していることが示唆された。今後はこれらの分子間のより詳細な関連と、Runx遺伝子群の唾液腺への役割を解明する予定である。

P1-60

FACSにより予期的に分離されたマウス Sca-1、PDGFR α 陽性歯髄幹細胞は同一の表面免疫特性を持つ骨髄由来間葉系幹細胞とは異なる幹細胞特性を有する

○中塚 隆介¹、植村 靖史²、藪田 精昭¹ (1)関西医大 医 幹細胞生物、²愛知県がんセンター 腫瘍免疫)

歯髄には骨髄間葉系幹細胞 (BM-MSC) に類似した歯髄幹細胞 (DPSC) が存在することが知られている。今回、BM-MSC マーカー (Sca-1、PDGFR α) を用いた FACS 解析により、マウス下顎切歯歯髄から高い増殖能と骨、軟骨、脂肪への分化能を有する Sca-1、PDGFR α 陽性 DPSC を予期的に分離した。また、この DPSC の切歯形成端における局在を明らかにした。次に、DPSC と BM-MSC の幹細胞特性の違いについて比較検討した。DPSC は、BM-MSC と一部表面マーカーの発現が異なり、BM-MSC よりも高い繊維芽細胞様コロニー形成能と高い Alkaline phosphatase 活性を示した。興味あることに、DPSC は BM-MSC よりも高いサイトカイン産生能を示し、造血細胞支持に関連する遺伝子も DPSC で高く発現されていた。そこで、非造血組織由来の DPSC が造血組織由来である BM-MSC と同様に、ヒト臍帯血由来 CD34⁺造血幹細胞 (HSC) を *in vitro* で支持するか検討した。その結果、DPSC と CD34⁺HSC との共培養実験では、DPSC による CD34⁺HSC 支持能は BM-MSC に比べて有意に低下していた。以上より、DPSC は BM-MSC とは異なる幹細胞特性を有しており、その HSC 支持能は BM-MSC よりも低いことが示唆された。

P1-62

蛍光 3 次元イメージング形態計測による Sclerostin の時空間的発現変化と生後骨発達における役割

○渡辺 高¹、山口 朗^{1,2}、飯村 忠浩^{1,2} (1)東医歯大 口腔病理、²東医歯大 グローバル COE、³東医歯大 顎顔面外科)

【目的】Wnt/ β -catenin シグナルは骨芽細胞の分化増殖に必須である。Sclerostin は Wnt の共受容体である LRP5/6 に結合しこの経路を抑制する。Sclerostin 遺伝子の機能低下型変異は Sclerosteosis を生じるが、胎生期では影響が見られず成人になって発症が顕在化する。しかし、その理由は明らかではない。本研究は、生後の骨発達過程に Sclerostin や Wnt/ β -catenin シグナルが時間的・空間的にどのように関わっているのか、網羅的かつ細胞下レベルでの高解像度の蛍光イメージング法を駆使して解析した。【方法】3日、2、4、16 週齢のラット大腿骨を固定・脱灰後にパラフィン切片を作成し、抗 Osterix、 β -catenin、Sclerostin 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡によるタイリング画像を取得、さらに 3 次元画像解析形態計測を行った。培養骨芽細胞を用いてこれらの観察結果を解析した。【結果・考察】Sclerostin は、主に骨幹部皮質骨の骨細胞で産生され、成長とともに発現量が増大することを計測した。近接する骨表面での β -catenin と Osterix 陽性細胞数はこれに逆の相関であった。培養骨芽細胞での β -catenin 安定化は Osterix の核内移行を刺激し、初期分化を刺激したが、成熟過程を抑制した。以上のことから、骨幹部の骨細胞での Sclerostin 産生は成熟に伴って発現増加し、この部位での新たな骨芽細胞分化の抑制と骨膜上の骨芽細胞の成熟に関与し、骨の成熟に関与していると考えられた。

P1-61

マウス切歯のエナメル質形成過程における *Msx2* 遺伝子の機能

○中富 満城¹、依田 浩子¹、大島 勇人¹ (1)新大院医歯 硬組織形態)

【背景】*Msx2* 遺伝子はホメオボックス型の転写因子をコードし、ヒトの *MSX2* 変異において頭蓋冠や歯の形成異常が生じる例が報告されている。*Msx2*^{-/-}マウスではエナメル器の形成異常に起因するエナメル芽細胞の壊死によりエナメル質形成不全が生じると従来考えられてきたが、*Msx2* がエナメル芽細胞分化維持機構に果たす役割については不明である為今回解析を試みた。【材料と方法】胎生期及び生後の野生型マウスと *Msx2*^{-/-}マウスの切歯を用いて組織学的解析を行い、*in situ* hybridization 法により *Ameloblastin*、*Shh*、*Dspp* の発現を検出した。【結果と考察】エナメル芽細胞は重層扁平上皮である口腔上皮の一部が特殊化した歯胚上皮に由来し、マウス切歯のエナメル芽細胞分化過程は増殖期・分化期・形成期・移行期・成熟期に大別される。*Msx2*^{-/-}の形成期エナメル芽細胞において *Ameloblastin* や *Shh* の発現および細胞の極性化は比較的正常に認められ、*Dspp* の発現や象牙質形成も正常であった。一方移行期から成熟期にかけてエナメル芽細胞は極性を喪失して角化重層扁平上皮化し、中間層細胞の複層化や嚢胞形成も観察され、エナメル質形成不全を呈した。以上の結果より *Msx2* は基質形成期エナメル芽細胞の分化機能発現には必須の因子ではなく、形成期から成熟期への移行および成熟期の分化状態の維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

P1-63

下顎頭軟骨形成に対する β -Xyloside の影響

○福岡 裕樹^{1,2}、森山 啓司^{1,2}、柴田 俊一³ (1)東医歯大 院医歯 顎顔面矯正、²東医歯大 グローバル COE プログラム歯と骨の分子疾患科学の国際研究拠点、³東医歯大 院医歯 顎顔面解剖)

【目的】プロテオグリカン (PG) は重要な細胞外基質の一つで、一次軟骨では大型のコンドロイチン硫酸 PG である Versican/Pg-M は軟骨形成前の間葉凝集の、Aggrecan は軟骨形成後の主な細胞外基質成分と報告されている。一方 PG 合成阻害剤の β -Xyloside は細胞に取り込まれると、そこを基点に異常なコンドロイチン硫酸鎖が合成され、結果として正常な PG の合成阻害が生じる。本研究は PG 合成阻害が二次軟骨である下顎頭軟骨の発生に及ぼす影響を検討することを目的とした。【方法】胎生 14 日齢の ICR マウスの下顎頭軟骨原基を摘出し、 β -Xyloside 存在下 (2.0mM) の無血清培地で 6 日間器官培養を行った。培養後、透明骨格標本を作成し下顎頭軟骨の形成を観察した。また、Aggrecan、Versican/Pg-M、Type I, II collagen の免疫染色、*in situ* hybridization にて細胞外基質のタンパク、mRNA 発現を定性的に評価した。【結果と考察】透明骨格標本からは Alcian blue 陽性の組織は認めず、明らかな軟骨形成は認められなかった。組織切片からは軟骨組織は形成されていたが、対照群と比較し明らかに矮小化していた。形成された軟骨組織内のタンパク、mRNA の発現に著明な差は認めなかった。以上より β -Xyloside は下顎頭軟骨の形態発生において明らかにその形成を抑制するが、分化した軟骨組織の性質は維持されることが示唆された。

P1-64

オキシタラン線維の走査電子顕微鏡による観察
○山崎 洋介¹、湯口 眞紀^{1,2}、磯川 桂太郎^{1,2} (1)大 歯 解剖 2、2)日大 総歯研 機能形態)

オキシタラン線維は歯根膜中に存在することが知られるが、その存在意義については未だ明らかでない。同線維はまた、眼の毛様小体(チン氏帯)、リンパ管係留フィラメントあるいは真皮乳頭層などにおいても特徴的に観察される。本研究では、電子顕微鏡的観察により、オキシタラン線維の胚組織内分布や形態的特徴について検討を加えた。観察対象とした鶏胚芽間葉組織には、発生の一時期に、歯根膜オキシタラン線維に類似した高い直線性を示すオキシタラン線維の分布が知られている。グルタルアルデヒド固定後、四酸化オスミウム後固定、脱水、置換、臨界点乾燥を行い、組織を切断、コーティングして走査電子顕微鏡(SEM)にて観察した。またサンプルの一部は固定、脱水後にEpon樹脂に包埋し、薄切、ウラン-鉛による電子染色の後、透過型電子顕微鏡(TEM)にて観察した。TEMでは、マイクロフィブリル束であるオキシタラン線維が組織内の細胞質突起に近接している像が多数観察された。SEMでは、鶏胚芽の上皮直下から伸長する長いオキシタラン線維が認められ、それらには間葉細胞の突起が絡み付いている所見や、オキシタラン線維が枝分かれする像も認められた。TEMによる切片観察では見られない、長いスパンにわたる線維の走行や、分岐の状態、細胞との立体的な位置関係などがSEM観察により明らかとなった。

P1-65

クロモグラニン A の炎症性疼痛発症における役割の解析
○孫 麗¹、武 洲¹、林 良憲¹、中西 博¹ (1)九大 院歯 口腔機能分子)

最近、私たちは唾液ストレス分子として知られるクロモグラニン A (CGA) がカテプシン B (CatB) 依存的にミクログリアにおいて IL-1 β 産生分泌を誘導することを報告した (Glia, 2010)。さらに、CatB 欠損マウスでは末梢炎症に伴う脊髄ミクログリアの IL-1 β 発現は軽度で、炎症性疼痛に抵抗性を示すことを報告した (孫他、第 53 回歯科基礎医学学術大会)。そこで今回は、CGA の炎症性疼痛の発症における役割についてさらに詳細に検討した。【結果】培養ミクログリアにおいて CGA により誘導される IL-1 β 産生はカスパーゼ-1 ならびに CatB 特異的阻害剤である YVAD ならびに CA074Me により有意に抑制された。一方、ATP あるいは LPA により誘導される IL-1 β 産生は YVAD でのみ有意に抑制された。また、CGA の髄腔内注入により野生型マウスでは疼痛が惹起されたが、CatB 欠損マウスは抵抗性を示した。一方、ATP あるいは LPA の髄腔内注入により惹起された疼痛は CatB 欠損による影響を受けなかった。さらに、高レベルの CGA が後根神経ニューロンにおいて認められた。【結論】末梢炎症に伴って一次侵害ニューロン軸索末端から分泌された CGA が脊髄ミクログリアにおいて CatB 依存的にプロカスパーゼ-1 活性化を介して IL-1 β を産生分泌させ、炎症性疼痛を惹起することが強く示唆された。

P1-66

TLR3 作動薬は頭頸部扁平上皮癌転移巣の癌細胞をアポトーシスに誘導する
○梅村 直己¹、坂上 宏¹ (1)明海大 歯 薬理)

我々はヒト頭頸部扁平上皮癌の原発巣細胞株と同一患者の転移巣細胞株を用い、様々な Toll 様受容体 (Toll-like receptor:TLR) によりアポトーシスが誘導されるか検討した。その結果、TLR3 作動薬である Poly (I):(C) が頭頸部扁平上皮癌転移巣細胞株を効果的にアポトーシスを誘導する事を明らかにした。またヒト頭頸部扁平上皮癌転移巣細胞株における TLR3 シグナル伝達を詳細に検討したところ、転移巣株においては NF- κ B の活性が減弱しており、それによりアポトーシスが強力に誘導される事を明らかにした。さらに頭頸部扁平上皮癌患者の組織においても TLR3 伝達における NF- κ B の活性を原発組織と転移巣組織とを比較した場合、明らかに転移巣組織における TLR3 シグナル伝達の NF- κ B の活性が減弱していた。つまり我々の新たな知見は *in vitro* だけでなく *in vivo* でも見られる普遍的な現象である。

P1-67

ヒト骨芽細胞における Gi/o 共役型 α 1B-アドレナリン受容体による K チャネル抑制作用と細胞増殖への影響
○兒玉 大介¹、戸苺 彰史¹ (1)愛院大 歯 薬理)

近年、中枢神経系および末梢神経系を介した骨代謝制御について多くの報告がなされている。我々は交感神経系の骨代謝における役割を検討しており、これまでにヒト正常骨芽細胞 SaM-1 において noradrenaline (NA) による α 1B アドレナリン受容体 (α 1B-AR) を介した K チャネル抑制作用を報告している。本研究ではこの K チャネル抑制作用のシグナル経路とその生理機能について検討を行った。細胞内 Ca イメージング法により SaM-1 において NA による α 1B-AR および PLC を介した細胞内 Ca 濃度の上昇が見られた。その一方で、NA による K チャネル抑制作用は PLC 阻害薬 U73122 に影響を受けず、Gi/o 共役型受容体阻害薬である百日咳毒素または G $\beta\gamma$ 阻害薬 gallein で前処理によって減弱した。BrdU 取り込み量の計測および WST assay による細胞増殖試験において、NA は細胞増殖を α 1-AR を介して促進し、 β -AR を介して抑制した。 α 1-AR を介した細胞増殖の促進作用は U73122 によって影響を受けず、gallein または PKA 阻害薬 H89 によって阻害された。以上の結果より、ヒト骨芽細胞 SaM-1 において α 1B-AR は Gq および Gi/o、双方と共役していることが示唆された。さらに NA による K チャネル抑制作用および細胞増殖促進作用は Gi/o と共役した α 1B-AR を介していることが示唆された。

P1-68

ラット皮膚三次元モデルにおいて上皮の TGFβ1 とインテグリン αv が線維芽細胞の形態変化を制御する

○秦 省三郎¹、岡村 和彦²、石川 博之¹、山崎 純³ (¹福歯大 成長発達歯、²福歯大 生体構造、³福歯大 細胞分子生物)

【目的】皮膚の恒常性の制御には上皮-結合組織の細胞間の相互作用が関与している。創傷治癒過程において線維芽細胞 (F) から筋線維芽細胞 (MF) への転換が癒痕の形成を招き、その転換には TGFβ1 が関与すると報告されている。本研究ではラット三次元皮膚再構築系を用いて F-MF 転換における分子機序を明らかにすることを目的とした。【方法】2日齢ラット背部真皮から F を単離、包埋したコラーゲンフィーダー上に、表皮から単離したケラチノサイトを播種した。MF マーカーの α-SMA、その制御に関与するとされる TGFβ1、integrin αv の発現を免疫染色、real-time PCR、ELISA 法により検討した。【結果および考察】真皮由来細胞における α-SMA の発現が免疫染色法あるいは real-time PCR 法によって明らかになったことから、F-MF 変換が起きていると考えられた。また、培地への上皮細胞依存的な TGFβ1 放出が ELISA によって確認できた。上皮細胞には TGFβ1 ならびに integrin αv の発現が認められた。TGFβ タイプ I 受容体拮抗薬 LY364947、TGFβ1 中和抗体、integrin αv 中和抗体を添加した群において α-SMA の発現が減少した。以上の結果から、F-MF 転換を上皮由来の内因性 TGFβ1 が誘導し、その制御に integrin αv が関与していることが示唆された。

P1-70

培養上皮細胞における Cl⁻チャンネル調節因子の遺伝子発現解析

○廣松 亮¹、八田 光世²、坂上 竜資¹、山崎 純² (¹福歯大 口腔治療、²福歯大 細胞分子生物)

CLCA 遺伝子は Cl⁻チャンネル調節因子をコードしており、Ca²⁺ 活性化 Cl⁻輸送系に関与すると考えられている。腺上皮における発現・機能解析の報告はあるが、他組織では不明な部分が残されている。本研究では、培養上皮における CLCA 遺伝子 mRNA 発現パターンおよびプロモーター活性について検討した。マウスケラチノサイト株 Pam212 は低カルシウム (0.05mM Ca²⁺) 培養において未分化状態を維持しており、高カルシウム (1mM Ca²⁺) 培養にスイッチすると分化誘導される。RT-PCR による発現パターン解析から、未分化 Pam212 において mCLCA2、mCLCA5 の発現が確認された。さらにカルシウム分化誘導に反応して mCLCA2 の mRNA 発現が増加することが明らかとなった。そこで mCLCA2 遺伝子発現調節の分子メカニズムを明らかにするため、プロモーター領域の deletion-mutant レポーターを作製してルシフェラーゼアッセイを行った。未分化 Pam212 において転写開始点から-302~-153bp 領域がプロモーター活性に重要であることが明らかとなった。さらに *in silico* DNA 配列解析により機能配列として GATA モチーフが予測されたことから、ケラチノサイトに発現する転写因子 GATA3 がプロモーター活性を制御している可能性が示唆された。

P1-69

レプチンは PI3K および JAK2/STAT3 経路を介して島皮質シナプス伝達を修飾する

○武井 浩樹^{1,2}、小林 真之¹、越川 憲明¹ (¹日大 歯 薬理、²日大 歯 小児歯)

レプチンは脂肪細胞から産生され、食欲抑制やエネルギー代謝、体重の調節などを行うペプチドホルモンである。大脳皮質島野 (島皮質) は古くから味覚野と知られ、レプチン受容体が比較的多く存在することが報告されているが、その生理作用は不明である。そこで、レプチンの島皮質局所神経回路に対する修飾作用について同時ホールセル・パッチクランプ法により検討した。レプチンは、抑制性シナプス後電流 (IPSC) を増大させる一方、興奮性シナプス後電流 (EPSC) を減弱させた。レプチンの細胞内情報伝達経路には phosphoinositide 3-kinase (PI3-K) と mitogen activated protein kinase (MAPK)、signal transducers and activators of transcription factors 3 (STAT3) を介する 3 つの経路が存在する。そこで、レプチンの修飾作用がどの細胞内情報伝達経路を介して生じるかをそれぞれの阻害薬を用いて調べた。PI3K もしくは JAK2/STAT3 阻害薬の存在下では、レプチンによる IPSC の増大は認められず、MAPK 阻害薬とレプチンの共投与では IPSC の増大が認められた。このことより、島皮質においてレプチンは PI3K および JAK2/STAT3 経路を介して味覚情報処理に対して抑制的に働くことが示唆された。

P1-71

COX-2 選択的阻害薬は破骨細胞分化を抑制する

○龍 家圭¹、天野 均²、山田 庄司² (¹昭大 医 薬理、²昭大 歯 歯科薬理)

【目的】炎症性サイトカインや機械的刺激により誘導されるプロスタグランジン合成酵素であるシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) は、骨代謝に重要な役割を持っていることが報告されている。本研究は選択的 COX-2 阻害剤であるセレコキシブが、*in vitro* で破骨細胞分化に影響を与えるか否かを調べることを目的に検索した。

【方法と結果】Sephadex G-10 カラムを用いて、全骨髄細胞から造血幹細胞画分に、可溶性 NF-κB リガンド (sRANKL) (100 ng/ml) とマクロファージコロニー刺激因子 (CSF-1) (100 ng/ml) の共添加によって破骨細胞に分化誘導し、6 日後に TRAP 陽性細胞数を測定した。セレコキシブ添加群 (1~10 μM) は、濃度依存的に破骨細胞形成数が有意に減少した。また、マクロファージ系株細胞である RAW 264.7 細胞に sRANKL (100 ng/ml) を添加する破骨細胞形成系においても、同様にセレコキシブ濃度依存的に破骨細胞形成数が有意に減少した。破骨細胞の分化の指標となるアクチンリングを持つ破骨細胞数も顕著に減少した。ハイドロキシアパタイトコーティングディッシュを用いた実験系においても、セレコキシブの濃度依存的に破骨細胞による吸収窩形成を抑制した。

【考察】これらの結果は、COX-2 活性阻害剤が前破骨細胞から破骨細胞への分化を直接抑制することが示唆された。

【結論】破骨細胞分化過程において、COX-2 シグナル伝達経路が関与する可能性が示唆された。

会員外共同研究者 岩井信市、小口勝司

P1-72

ROCK 阻害剤 (fasudil) による抗腫瘍性ケモカイン (CXCL14/BRAK) の分泌促進作用を応用した新規抗腫瘍療法の研究開発

○宮本 千央¹、前畑 洋次郎¹、高橋 俊介¹、吉野 文彦¹、吉田 彩佳¹、徳富 文彬¹、高橋 聡子¹、畑 隆一郎²、李 昌一¹ (¹神歯大 薬理、²神歯大 口腔難治研)

【目的】 これまでに我々は、抗腫瘍ケモカイン CXCL14/BRAK (BRAK) の細胞外分泌が口腔扁平上皮癌において抑制されていることを報告してきた。一方、細胞外分泌に関与する RhoA/ROCK 経路が悪性腫瘍において過剰に活性化し、腫瘍における物質輸送を破綻させるという報告がある。そこで、脳血管攣縮治療薬として臨床応用されている選択的 ROCK 阻害剤 fasudil を用いて、ROCK 阻害剤が BRAK の分泌および腫瘍進展に与える影響を検討した。【方法】 マウス線維肉腫細胞株 (MC57) を用いて BRAK 発現細胞 (MC57-BRAK) および非発現細胞 (MC57-MOCK) を作成し、これらの細胞に対する fasudil 処理による BRAK の細胞外分泌量の変化を ELISA 法にて解析した。また、MC57-BRAK および MC57-MOCK をマウス背部皮下に移植し、fasudil を投与して腫瘍縮小率を解析した。【結果】 MC57-BRAK において fasudil 処理により BRAK の細胞外分泌量が有意に亢進した。また MC57 移植実験においては、MC57-BRAK 移植 fasudil 投与群において有意な腫瘍進展抑制効果が認められた。【考察】 fasudil が BRAK の分泌亢進を介して腫瘍進展を抑制する事が示された。本研究結果から fasudil が脳血管攣縮治療薬のみならず抗腫瘍薬として臨床応用できる可能性が示唆された。

P1-74

脂肪分解・熱産生系を制御する新しい分子 PRIP
○奥村 俊哉¹、原田 佳枝¹、鎌田 伸之²、兼松 隆¹ (¹広大院医歯薬保 細胞分子薬理、²広大院医歯薬保 口腔外科)

PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) は、ホスホリパーゼ C (PLC) δ -1 に高い相同性を示すが PLC の酵素活性を持たない。我々は PRIP ノックアウト (KO) マウスを作製して PRIP の生理機能解析を行った。KO マウスは野生型 (WT) マウスに比べて白色脂肪量が少なかった。その成因を明らかにするために、呼吸交換率を測定したところ、KO マウスのエネルギー代謝における脂肪利用率が亢進している事が分かった。そこで、KO マウスの脂肪分解制御と熱産生機構について検討を行った。KO マウスの白色脂肪細胞では、脂肪分解酵素であるペリリピンや HSL のリン酸化が亢進し、中性脂肪の分解が恒常的におきている事が明らかとなった。PRIP は、タンパク質脱リン酸化酵素 (PP1 と PP2A) を標的分子ヘリクルートする分子である。そこで、脂肪分解シグナリングにおける脱リン酸化制御について検討を行った。PRIP 分子存在下では、飢餓誘導刺激や交感神経 (アドレナリン) 刺激に依存して PP1 と PP2A が脂肪滴へ移行する。しかし、PRIP 欠損細胞ではその移行は減少し、脂肪分解酵素の脱リン酸化制御が PRIP 依存性である事が明らかとなった。また、KO マウスの褐色脂肪細胞では、熱産生タンパク質 (UCP1) の発現が亢進しており、その結果体温が高くエネルギー産生能が亢進している事が分かった。以上より、PRIP は脂肪分解制御分子であり、生体の熱産生をも制御する新しい機能分子である事が明らかとなった。

P1-73

IP₃ 受容体蛍光リガンドを用いた新しい蛍光センサーの開発；IP₃ 受容体蛍光リガンドとリガンド結合ドメインの結合による蛍光変化

○村田 佳織¹、森田 貴雄²、根津 顕弘²、齊藤 正人¹、谷村 明彦² (¹北医大 歯 小児歯、²北医大 歯 薬理)

【目的】 我々は、LIBRA という IP₃ 受容体のリガンド結合ドメインと蛍光タンパク質 (CFP、YFP) を融合させた分子センサーを開発した。この分子センサーの蛍光変化率を改善するために、蛍光リガンドを用いた分子センサーの開発を試みている。今回は、新たに合成した蛍光リガンド (F-ADA、F-LL) による LIBRA の蛍光変化について報告する。

【方法】 Lipofectamin2000 を使って、COS7 細胞に分子センサー遺伝子を導入した。分子センサー発現細胞を穿孔し、IP₃ や、蛍光アデノフォスチン誘導体による蛍光変化を AQUACOSMOS で解析した。

【結果と考察】 蛍光リガンド F-ADA と LIBRA の反応を調べたところ、IP₃ の結合では、蛍光比が約 10% 上昇したのに対して、F-ADA では、蛍光比が約 25% 低下した。それに対して IP₃ 結合性を持たない変異体では、F-ADA による蛍光変化が起こらなかった。また低親和性蛍光リガンド F-LL 存在下で IP₃ を加えると、蛍光比の上昇が観察された。これらの結果はリガンド結合ドメインと蛍光リガンドの結合による FRET を利用することによって、LIBRA よりも蛍光変化率が大きい IP₃ センサーを開発できる可能性を示唆する。また、蛍光リガンドの結合による蛍光変化は、LIBRA の CFP と蛍光リガンドの FRET によるものである可能性が示された。今後、蛍光ドナーとアクセプターの最適化による蛍光変化率のさらなる増大を試みる。

P1-75

p130Cas は破骨細胞の機能発現に重要な役割をもつ

○永井 香絵^{1,2}、福島 秀文²、大澤 賢次²、田村 幸彦³、青木 和広³、大谷 啓一³、中村 仁美^{1,2}、牧 憲司¹、自見 英治郎² (¹九歯大 口腔機能発達、²九歯大 分子情報生化学、³東医歯大 硬組織)

【目的】 p130Cas (Cas) は細胞内のアクチン重合・細胞骨格の再構成に関与する分子であり、欠損マウス由来の破骨細胞では Cas のチロシンがリン酸化されないことから、Cas が Src の下流分子として働くことが予想された。しかし、Cas 欠損マウスが胎生致死であるため、in vivo における骨の解析は出来なかった。そこで破骨細胞特異的に Cas を欠損させた (OC-CasKO) マウスを作製し、Cas の骨吸収における重要性を検討した。【方法と結果】 OC-CasKO および対照マウスの骨形態計測の結果より、OC-CasKO マウスでは、対照マウスと比較して著明な骨量の増加が認められた。OC-CasKO マウスは対照マウスと比較して、骨形成率に変化はなく、多数の破骨細胞が存在したことから、骨量の増加は破骨細胞の分化障害ではなく、骨吸収能の低下に起因すると考えられた。そこで OC-CasKO または対照マウスの骨髄細胞と骨芽細胞を活性型ビタミン D3 存在下で共存培養し、形成された破骨細胞を象牙片上で培養し、酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ (TRAP) およびファロイジンの 2 重染色を行なったところ、OC-CasKO マウス由来の破骨細胞では対照マウス由来の破骨細胞と比較してアクチンリングを持つ TRAP 陽性破骨細胞の割合が著しく減少し、吸収窩も殆ど形成されなかった。【結論】 p130Cas は破骨細胞の骨吸収に重要である。

P1-76

4種の *Porphyromonas gingivalis* ジペプチジルペプチダーゼの基質特異性と産生ジペプチドレパートリー

○柳瀬 絵見¹、Rouf SM Abdur¹、小野 俊雄¹、根本 優子¹、根本 孝幸¹ (長大 院医歯薬 口腔分子生化学)

【目的】 *Porphyromonas gingivalis* は Pro 特異的 DPPIV, 疎水性アミノ酸特異的 DPP7, Asp/Glu 特異的新規 DPPII を発現するが、これら以外にも塩基性アミノ酸特異的 DPPIII 遺伝子の存在が推定されている。私達は *P. gingivalis* のタンパク質分解レパートリーがこれら DPP の総和であるのか、あるいはさらに未知のペプチダーゼが関与するのかが検討した。【方法】 4種の DPP を大腸菌系で発現精製し、基質特異性を決定した。ATCC33277、各種 DPP 欠損株、およびジンジパイン完全欠損株 KDPI36 を嫌気培養し、菌体のペプチド分解活性を測定した。【結果】 リコンビナント DPPIII は酵素活性を有した。DPPIII、IV、7、11 の最適基質はそれぞれ RR-、GP-、ML-、LD-MCA であり、さらに DPP7 は N 末に疎水性アミノ酸を好むことを今回新たに見いだした。菌体のジペプチド分解活性は、ML>GP>KA>GF>LR>LQ>TY>LD>LE>VD-MCA であり、欠損株の分解能の結果から、これら基質の分解は DPPIV、7、11 によることが示された。一方、RR-、KK-MCA は KDPI36 株では分解されないことから、DPPIII は菌体表面には発現しておらず、野生株ではジンジパインがそれらの分解を担っていると推定された。加えて、極性アミノ酸からなるジペプチドは代謝されなかった。【結論】 *P. gingivalis* のジペプチド産生は主に DPPIV、7、11 とジンジパインに依存し、極性アミノ酸より成るジペプチド産生能は極めて低い可能性が示唆された。

P1-78

インクレチンを介したオステオカルシンの作用
○安武 雄¹、溝上 顕子¹、平田 雅人¹ (九大 歯 口腔細胞工学、²九大 歯 矯正歯科学)

近年、骨は体の支持器官であるとともに内分泌器官でもあることが明らかとなっている。骨芽細胞が合成するオステオカルシン (OC) は、大部分は骨基質として骨に埋め込まれているが、一部は血中に放出され、3つのグルタミン酸残基がカルボキシル化されたもの (GlaOC) と低カルボキシル化状態のもの (ucOC) の2つの型で循環している。そのうち、ucOC がインスリン分泌を促し、全身のエネルギー代謝に関わっている。一方、インクレチン (GLP-1 や GIP) もインスリン分泌を促すホルモンとして知られている。GLP-1 は小腸上皮粘膜細胞から分泌され、膵β細胞の保護、グルカゴンの分泌抑制、食欲の抑制などの作用も合わせて有する。我々は、マウス小腸上皮細胞由来 STC-1 細胞およびマウス小腸上皮細胞に ucOC の受容体と考えられる分子、Gprc6a が存在することを確認した。ucOC の腹腔内あるいは経口投与によって血中 GLP-1 濃度が上昇したが、GlaOC ではその作用は認められなかった。また、ucOC 投与によって血中インスリン濃度は上昇したが、GLP-1 受容体のアンタゴニストである exendin (9-39) によって抑制された。以上の結果から、ucOC は小腸に発現する Gprc6a に作用して GLP-1 の分泌を促し、膵臓への直接作用に加えてインスリンの分泌を促進していることが示唆される。

P1-77

アグリカンの高レベル発現に必要な新たなエンハンサー配列について

○池田 裕^{1,2}、大城 暁子²、和泉 雄一^{1,3}、篠村 多摩之² (¹東医歯大 院医歯 歯周病、²東医歯大 院医歯 結合組織再生、³東医歯大 GCOE)

【目的】 軟骨は II 型コラーゲンやアグリカンなどの細胞外マトリックスが豊富な組織である。我々はこうした豊富なマトリックス産生に必要な、転写レベルでの制御機構を明らかにすることを目的に研究を進めている。軟骨におけるアグリカンや II 型コラーゲンの特異的な発現に関わる因子として Sox9 が知られているが、今回アグリカンの遺伝子発現を増大させるためには、既知の Sox9 結合配列以外に新たなエンハンサー配列が必要であることが示唆されたので報告する。【方法】 ラットのアグリカン遺伝子をコードする Bac clone (167kb) よりゲノム DNA 断片を調製し、それらを用いて β-galactosidase と hygromycin phosphotransferase の融合遺伝子を含む、アグリカンのレポーター遺伝子を数種類構築した。次に、これらのレポーター遺伝子をゲノム DNA 断片と共にラット軟骨肉腫細胞に遺伝子導入し、hygromycin B による薬剤選択を行なって安定発現株を得た。得られたクローンは X-gal 染色を行い、レポーター遺伝子の発現レベルについて比較検討を行った。【結果と考察】 レポーター遺伝子単独では X-gal で染色されるクローンは僅かであった。ところが、アグリカンのプロモーターから約 30kb 上流の DNA 断片とともに遺伝子導入を行うと、X-gal の染色性が明らかに増大した。従って、アグリカンの高い発現レベルを獲得するには既知の Sox9 結合配列だけでは不十分であり、新たなエンハンサーが必要であることが示唆された。

P1-79

蛍光色素 alamar Blue を用いたバイオマテリアル付着歯周病関連細菌定量法

○石黒 和子^{1,2}、鷲尾 純平²、佐久間 陽子¹、竹内 裕尚¹、佐々木 啓一¹、高橋 信博² (¹東北大 院歯 口腔システム補綴、²東北大 院歯 口腔生化学)

【目的】 義歯等の Biomaterial 表面に形成される biofilm は、残存歯のう蝕や歯周病、さらには口臭、口内炎、誤嚥性肺炎等の原因となることが示唆されている。我々は、*Streptococcus*、*Actinomyces*、*Veillonella* といった歯肉関連細菌を対象とする、蛍光色素 alamarBlue を用いた非 RI でかつ簡便な細菌付着定量法を確立した (第 50 回歯科基礎医学会)。そこで本研究では、*Porphyromonas gingivalis* (Pg)、*Prevotella intermedia* (Pi)、*Fusobacterium nucleatum* (Fn) といった歯肉関連細菌を本方法へ応用するため、alamarBlue との反応性および代謝基質の影響を検討した。

【方法】 各菌を、Fastidious anaerobic broth 培地 (Lab M Ltd) を用いて嫌気培養後、対数増殖期に集菌を行い菌懸濁液を調整し、そこへ 1% の alamarBlue 溶液を加えて 37°C でインキュベートし、蛍光強度を測定した。さらに、代謝基質である 0.5% glucose あるいは 0.5% tryptone を添加し、その影響を検討した。

【結果】 代謝基質なしでの反応性 (蛍光強度) は、これまで行ってきた *Streptococcus mutans* などの歯肉関連細菌より低かった (約 0.2-14.6%) が、glucose 添加によって Pi で 4.2 倍、Fn で 5.2 倍、trp 添加によって Pg で 2.1 倍、Pi で 4.4 倍、Fn で 48.6 倍に増加した。

【結論】 適切な代謝基質を加えることで検出感度が増加し、歯肉関連細菌でも alamarBlue 法による付着定量が可能であることが示された。

P1-80

滑膜細胞における高分子量ヒアルロン酸による ADAMTS4 産生抑制機構

○片岡 良浩^{1,2}、有吉 渉¹、沖永 敏則¹、金氏 毅²、高橋 哲³、西原 達次¹ (¹九歯大 歯 感染分子生物、²九歯大 歯 形態機能再建、³東北大 歯 口腔病態外科)

【目的】細胞外マトリックス (ECM) の破壊は関節炎の病態形成において重要である。近年、初期の ECM 分解に関わる新規のプロテアーゼとして、アグリカナゼが注目されているが、その発現や活性については不明な点が多い。今回、我々は、培養滑膜細胞を用いて代表的なアグリカナゼである ADAMTS4 の発現に対する高分子量ヒアルロン酸 (HA) の影響を分子生物学的に検証した。【方法】ヒト滑膜線維芽細胞様細胞である HFLS に IL-1 β を添加し培養した。培養後の細胞より mRNA を抽出し、ADAMTS4 および MMP9,13 の遺伝子発現レベルを定量した。また IL-1 β による ADAMTS4 の発現誘導に対する高分子量 HA の作用について解析した。【結果】HFLS において IL-1 β 刺激により、ADAMTS4 および MMP9 の mRNA 発現の亢進が認められた。一方、HA 併用群では IL-1 β による ADAMTS4 の発現誘導は抑制された。p38 の阻害剤によって IL-1 β により誘導される ADAMTS4 の発現は抑制されるとともに、IL-1 β による p38 のリン酸化亢進は HA 併用群で抑制された。【考察】滑膜細胞からの ADAMTS4 の発現亢進が関節炎における関節マトリックスの破壊に関与することが明らかとなった。さらに、この亢進は HA によって抑制され、またこの抑制には p38 の経路が関与していることが示唆された。

P1-81

成体マウス毛包内の神経堤由来細胞の単離と象牙芽細胞分化誘導

○森澤 絵里^{1,2}、須澤 徹夫¹、宮内 知彦²、鈴木 航^{1,2}、馬場 一美²、上條 竜太郎¹ (¹昭大 歯 口腔生化学、²昭大 歯 歯科補綴)

【目的】神経堤細胞は胎生初期の神経管癒合部に発生、胚内を広く遊走後に定着先の環境で多様に分化する細胞で、一部は多分化能を保持して成体内に潜伏することから再生医療への応用が期待される。本研究では、神経堤由来細胞が多数存在し、臨床的に低侵襲に採取できる毛包に着目し、象牙芽細胞への分化誘導を検討した。【方法】神経堤由来細胞を GFP で標識した PO-Cre/CAG-CAT-EGFP 成体マウス毛包からセルソーターを用い、GFP を指標に細胞を純化、象牙芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞への分化誘導を試みた。細胞分化は real-time PCR 法による細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現と Alkaline phosphatase (ALP) 活性染色、Oil Red O 染色、Alcian blue 染色、石灰化能は Alizarin red 染色で評価した。【結果】GFP 陽性細胞は軟骨細胞様細胞や脂肪細胞様細胞へと分化した。BMP-2 含有の分化誘導培地で培養すると象牙芽細胞マーカー Dentin sialophosphoprotein の発現が上昇し、強い ALP 活性染色と Alizarin red 染色陽性を示した。【考察】毛包の神経堤由来細胞は様々な細胞への分化能を有しており、象牙芽細胞様細胞への誘導は、低侵襲で大人からも採取可能な細胞ソースとして象牙質再生への応用が示唆された。会員外共同研究者：大隅典子 (東北大学院)

P1-82

進行性骨化性線維異形成症から同定された新規 ALK2 変異体の機能解析

○藤本 舞¹、須田 直人²、片桐 岳信¹ (¹埼玉大 ゲノム 病態生理、²明海大 歯 歯科矯正)

【目的】進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は、小児期から全身の骨格筋組織内で異所性骨化を生じる遺伝性疾患である。FOP の責任遺伝子は、異所性骨形成を促す BMP 受容体の ALK2 と知られている。我々は、FOP における既知 ALK2 変異体を筋芽細胞 C2C12 に一過性に発現させると、BMP 非存在下でも BMP の細胞内情報伝達系が活性化されることを報告した。最近、成人になって骨化を開始した遅発性の比較的軽度な FOP 症例から、新規の ALK2 変異体 (G325A) が同定された。本研究では、この新規 ALK2 変異体の遺伝子機能を明らかにするため解析を行った。【方法】野生型、FOP の典型的変異体である R206H、および G325A を各々筋芽細胞 C2C12 に一過性に発現させた。免疫染色法で細胞内局在を解析し、BMP レポーターアッセイ (Id1WT4F-luc)、およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を指標とした骨芽細胞分化誘導活性を検討した。【結果】G325A 変異体は、野生型や R206H 変異体と近似した細胞膜局在と発現量を示し、R206H 変異体と同程度の Id1WT4F-luc 活性誘導能を示した。一方、Smad を介した ALP 誘導活性は R206H 変異体に比べ弱かった。【考察】以上の結果から、遅発性の FOP 症例から新規に同定された G325A 変異体も、既知の変異体と同様に構成的活性型変異体であることが明らかとなった。しかしながら、G325A は R206H と比較して Smad を介した骨芽細胞分化誘導活性が弱く、この点が臨床症状が軽度な一因と考えられる。

P1-83

歯周病原菌由来リシン特異的ジンジバインはオステオプロテグリンを優先的に分解し TNF- α および IL-1 β による破骨細胞分化を促進する

○秋山 智人^{1,2}、宮本 洋一¹、山田 篤¹、高見 正道¹、吉村 健太郎¹、星野 真理江^{1,2}、宮本 尚^{1,3}、横 宏太郎³、馬場 一美²、上條 竜太郎¹ (¹昭大 歯 口腔生化学、²昭大 歯 歯科補綴、³昭大 歯 歯科矯正)

Porphyromonas gingivalis 由来の gingipains は歯周組織破壊を引き起すタンパク質分解酵素である。我々は、lysine 特異的 gingipain (Kgp) が、破骨細胞分化抑制因子 osteoprotegerin (OPG) の分解により Toll 様受容体依存的な破骨細胞分化を促進することを見出した。そこで、歯周病で産生が亢進する TNF- α および IL-1 β による破骨細胞分化に対する Kgp の影響ならびに Kgp による OPG の不活性化機序を解析した。マウス骨芽細胞/骨髄細胞共存培養において、Kgp は TNF- α および IL-1 β による破骨細胞分化を促進した。一方、IL-17A による破骨細胞分化は、Kgp により抑制された。そこで、Kgp によるこれらのサイトカインと OPG の分解をウェスタンブロット法と比較した。TNF- α および IL-1 β は、Kgp の濃度および処理時間依存的に分解されたが、OPG に比べ安定だった。一方 IL-17A は、OPG と同様、速やかに分解された。したがって、炎症性サイトカインによる破骨細胞分化に対する Kgp の効果は、各サイトカインと OPG の Kgp に対する安定性の違いに依存すると考えられた。さらに、Kgp との反応で生じた OPG 断片の N 末アミノ酸配列の解析から、Kgp は OPG のデスドメイン類似領域を切断することで、RANKL との会合に必要な OPG の二量体形成を阻害し、破骨細胞分化抑制能を消失させると考えられた。

P1-84

P.gingivalis 由来 Lipopolysaccharide によるヒト歯根膜細胞 RUNX2 遺伝子のエピジェネティクス修飾

○高井 理衣¹、植原 治²、佐藤 惇¹、山崎 真美¹、西村 学子¹、荒川 俊哉³、齊藤 正人¹、田隈 泰信³、安彦 善裕¹ (¹北医大 歯 臨床口腔病理、²北医大 歯 微生物、³北医大 歯 生化、⁴北医大 歯 小児歯)

【目的】歯周病原菌の一つである *P. gingivalis* (*P.g* 菌)は、歯周組織に様々な変化を与え、歯周炎の進行に関与する。*P.g* 菌由来の LPS は骨芽細胞の分化を抑制するが、そのメカニズムは不明である。エピジェネティクス修飾は、DNA 配列の変化を伴わずに遺伝子の表現系を変化させるものであり、主に DNA メチル化とヒストン修飾がある。本研究は、LPS のヒト歯根膜細胞 (HPDL) の骨芽細胞への分化抑制に、エピジェネティクス修飾が関与するか明らかにすることを目的とした。

【方法】HPDL (LONZA) を DMEM にて培養後、*P.g* 菌由来 LPS (WAKO) (10 μ g/ml) を添加し 4、24 時間経過したものと、LPS (10、1000 ng/ml) 添加と非添加を 3 日間づつ 1ヶ月間繰り返したものをを用いた。その後、DNA を抽出し Bisulfite 処理後、Power SYBR Green による Real time RT-PCR 法で RUNX2 プロモーター領域のメチル化解析、および、抗アセチル化ヒストン H3 抗体 (Thermo) による定量 ChIP assay でアセチル化解析を行った。

【結果および考察】LPS 刺激により、24 時間および 1ヶ月培養した HPDL では、それぞれ RUNX2 遺伝子に高メチル化が認められた。特に 24 時間でより高度にメチル化していた。また、4 時間では RUNX2 遺伝子の脱アセチル化が確認された。これらのことから LPS のエピジェネティクス修飾の HPDL の RUNX2 発現低下への関与が示唆された。

P1-86

TGF- β 1 により誘導された上皮間葉転換に伴うヒト口腔扁平上皮癌細胞の細胞運動の解析

○齋藤 大嗣¹、帖佐 直幸²、客本 斉子²、高橋 典子²、大久保 直登³、衣斐 美歩³、石崎 明²、加茂 政晴³ (¹岩医大 歯 口腔顎顔面再建 口外、²岩医大 生化 細胞情報、³岩医大 医歯薬総研 腫瘍生物)

【目的】TGF- β は細胞の増殖抑制因子であるが、他方上皮間葉転換などを起こし癌化や癌の重症化にも関与している。本研究ではヒト口腔扁平上皮癌細胞 (hOSCC) における TGF- β の作用を明らかにするために、そのシグナル伝達機構と細胞運動への関与を検討した。【方法】各 hOSCC 細胞株を TGF- β 1 含有培地にて培養し、RT-PCR、ウェスタンブロットおよび蛍光免疫染色により解析した。上清は質量分析によるタンパク質解析を行った。遊走能は wound healing assay および Boyden chamber により分析した。【結果と考察】TGF- β 刺激により間葉マーカーである N-cadherin および vimentin の顕著な発現の増加に対して上皮マーカーの局在性の変化が見出された。Smad シグナルとして Smad2 のリン酸化、および Smad7 の発現増加が、転写因子として Snail と Slug の発現増加が見られた。また TGF- β 1 刺激により遊走能が増加したため、細胞接着に関連する分泌タンパク質の同定を行った結果、integrin α 3 β 1 と相互作用をもつ複数のタンパク質の産生が見出された。細胞の遊走能は、integrin α 3 と β 1 ブロッキング抗体により阻害された。また TGF- β 1 刺激により増加した FAK のリン酸化が integrin α 3 のブロッキング抗体により抑制されたことから、integrin α 3 β 1 からのシグナルにより遊走能が増加している可能性が示唆された。

P1-85

破骨細胞分化における Dectin-1 の作用について
○山崎 徹^{1,2}、有吉 渉¹、沖永 敏則¹、細川 隆司²、西原 達次¹ (¹九歯大 歯 感染分子、²九歯大 歯 口腔再建)

【目的】Dectin-1 は C-type レクチン受容体の一つで、 β -glucan を認識して宿主の防御応答を誘導する。破骨細胞前駆細胞には Dectin-1 が恒常的に発現しており、特定の糖鎖構造を認識して骨代謝活性を変化させることが知られている。今回、Dectin-1 を介した破骨細胞分化・機能における影響を検討した。【方法】マウス破骨細胞前駆細胞株 RAW264.7 細胞の Dectin-1 過剰発現株 (d-RAW) および control vector 導入株 (c-RAW) を使用した。細胞を β -1,3glucan である curdlan および破骨細胞分化因子 (RANKL) を添加して、培養を行った。培養後の細胞の破骨細胞分化について TRAP 染色で解析した。【結果】RANKL により誘導される破骨細胞の形成は curdlan の添加により増加したが、形成された破骨細胞は curdlan 未添加群に比べ、細胞の巨大化が認められず、actin ring の染色性も低下していた。さらに、この傾向は c-RAW に比べ d-RAW で著明であった。【考察】Curdlan は Dectin-1 との結合を介して、RANKL 誘導下の破骨細胞分化および成熟を制御している可能性が示唆された。

P1-87

共有結合性タグを用いた唾液腺細胞における小胞輸送の解析

○設楽 彰子¹、荒川 俊哉¹、田隈 泰信¹ (¹北医大 歯 生化)

【目的】共有結合性タグ (Halo タグ、FlAsH タグ、SNAP タグ) は近年、新しいイメージング技術として注目されている。本研究では、これらのタグを融合した輸送のマーカータンパク質を唾液腺細胞に発現させ、染色効率および小胞輸送の解析を行った。【方法】輸送マーカータンパク質 (Na⁺/K⁺ATPase, GPI) の cDNA に、タグの cDNA を結合させたベクターを作製し、HeLa 細胞または唾液腺導管由来培養細胞に導入して発現させた後、それぞれのタグを蛍光リガンドにて染色し共焦点顕微鏡にて観察した。また、Halo タグ融合 Na⁺/K⁺ATPase を発現した HeLa 細胞を 2 種類の蛍光リガンドにて時間差で染色し、Na⁺/K⁺ATPase の細胞内輸送をパルスチェイス解析した。【結果と考察】Halo タグを融合した輸送マーカータンパク質は Halo-Tag-TMR ligand によって細胞膜が特異的に染色されたが、SNAP タグ、FlAsH タグを融合したものは、ミトコンドリア様の非特異的な染色が観察された。また、Halo タグ融合 Na⁺/K⁺ATPase の輸送を共焦点顕微鏡にてパルスチェイス解析したところ、蛍光標識された Na⁺/K⁺ATPase が経時的に膜へ輸送される様子が観察された。これらの結果から、唾液腺細胞における小胞輸送機構を解析するツールとして Halo タグが適していることが示された。

P1-88

骨髄由来間質細胞の増殖と骨芽細胞への分化における焼結炭酸アパタイトの機能解析

○尾上 一平^{1,2}、川木 晴美¹、近藤 雄三^{1,2}、神谷 真子¹、高山 英次¹、土井 豊³、永原 國央²、近藤 信夫¹ (朝日大 歯 口腔生化、²朝日大 歯 インプラント、³朝日大 歯 歯科理工)

我々は骨アパタイトと物理的性状が酷似する焼結炭酸アパタイト(S-CA)を開発し、S-CAがラット骨欠損部において骨再生を促進することを動物実験により示してきたが、その作用機序は不明である。そこで、S-CAを培養プレートに様々な濃度でコーティングしその上でラット骨髄より採取した間質細胞を培養して(S-CA群)、増殖と骨芽細胞への分化について検討した。市販の水酸化アパタイトをS-CAと同様に使用した群(HA群)とコーティングを行わないプレートで培養した群(コントロール群)を比較対象とした。その結果、細胞増殖はコントロール群と比較してHA群では抑制されていたのに対しCA群では濃度依存的に有意に促進された。次いで、骨芽細胞への分化の指標としてアルカリホスファターゼ(ALP)の活性と石灰化を、アスコルビン酸を添加した培地で10日間培養した後に評価した。その結果、細胞あたりのALP活性はS-CA群とコントロール群では差は見られなかったがHA群のALP活性は他の2群と比較して有意に低かった。そして石灰化ではS-CA群の石灰化が顕著であった。以上のことからS-CAは骨髄由来の細胞の増殖を促進しその結果として骨再生促進に寄与している可能性が示唆された。

P1-89

Hチャネル活性を示す最後野ニューロンの化学受容性と摂食行動調節機序

○平井 喜幸¹、前澤 仁志¹、船橋 誠¹ (北大 歯 口腔生理)

【目的】過分極作動性カチオンチャネル(Hチャネル)活性を示す最後野ニューロンは全体の約60%を占める最大亜群である。このタイプのニューロンの化学受容性と摂食行動調節との関連については不明な点が多く残されている。そこで本研究では、免疫組織化学的解析と味覚嫌悪学習を指標とした行動実験を用いて解析を行った。【方法】Wistar系雄性成体ラットを用いた。最後野および弧束核のニューロン活動を調べるため、アポモルヒネ、またはATPを投与した後、免疫組織化学法によりc-Fos発現を可視化して神経活動を定量した。味覚嫌悪学習の計測は、ZD7288(Hチャネル拮抗薬)を腹腔内投与した群と生理食塩水を腹腔内投与した群(コントロール群)の二群に分け、アポモルヒネの皮下投与による内臓不快感を無条件刺激とし、サッカリンによる甘味刺激を条件刺激として味覚嫌悪学習の獲得を計測し、これに対するZD7288の影響を調べた。【結果と考察】アポモルフィン、ATPを投与した群の最後野および弧束核においてc-Fos陽性細胞数は増加した。ZD7288前投与群の最後野ではc-Fos陽性細胞数は有意に減少したが、弧束核では変化なかった。また、ZD7288前投与群ではアポモルフィンにより誘発される味覚嫌悪学習の獲得が阻害された。これらより、Hチャネル活性を示す最後野ニューロンが悪心・嘔吐誘発に関与していることが示された。

P1-90

ビスフェノールA曝露による危機回避行動への影響

○藤本 哲也¹、西川 泰央¹ (大歯大 生理)

【目的】ビスフェノールA(BPA)は環境ホルモンの一つであり、歯科材料とも関係が深い。我々はBPAが極微量の周産期曝露で仔ラットのオスに様々な中枢影響を及ぼすことを報告してきた。今回はBPAによるメスに対する作用に着目し、オスとの違いについて検討を行った。【方法】BPAを周産期ラットに曝露したあと、仔ラットの成長後に高架十字迷路による活動性と不安に関する試験を行った。また、情動とも関係が深い扁桃体内側核領域のニオイ応答を2種類のニオイで比較した。【結果】オープンフィールド試験で認められた活動性の性差は、高架十字迷路上ではオスでみられなかった。メスはBPAにより活動性が増加し性差が出現した。曝露メスではオープンアーム滞在時間の増加も認められた。扁桃体内側核領域のニューロンに対し、2種のニオイ物質(捕食者のニオイ、植物の香)に対する興奮性応答を調べた。曝露オスにおいて捕食者のニオイに敏感になるのに対し曝露メスでは逆の結果になった。【考察】BPAはオスラットの不安傾向を増強させる一方、メスラットの不安を軽減させた。曝露メスにおいては危機回避能の低下が示唆される。BPAは周産期のホルモンレベルの性差に依存した作用様式を及ぼすと考える。

P1-91

体液調節に関与した中枢ニューロンのアルコールに対する応答

○稲永 清敏¹、人見 涼露¹、小野 堅太郎¹ (九歯大 歯 生理)

二日酔いをした時に飲む冷たい水あるいはスポーツドリンクは格別である。その要因は、味覚感受性の変化あるいはアルコールによる利尿効果であると考えられているが、メカニズムは十分に理解されていない。本研究の目的は、アルコールやその代謝産物が直接水分やナトリウム摂取に関連した脳神経核に作用し、飲水あるいは食塩摂取行動を引き起こすかどうかを調べることであった。ウイスター系雄性ラットを用い、行動実験、c-Fos免疫組織化学実験、スライス標本を用いた電気生理学的実験を行った。腹腔内に投与したエタノールにより水分摂取量の増加が認められた。アセトアルデヒド分解酵素活性阻害剤であるシアナミドのエタノールとの併用投与により水分および食塩水摂取量がさらに増加した。脳弓下器官、正中中心核、室傍核、視索上核にエタノールやエタノール+シアナミドの腹腔内投与によるc-Fos陽性細胞の増加が観察された。電気生理学実験により、エタノールは脳弓下器官ニューロンの放電頻度を増加させること、GABA性入力に影響を与えることが判った。以上より、アルコールおよびアセトアルデヒドが直接口渴中枢ニューロンに作用し、水分や塩分摂取を促進している可能性が示唆された。

P1-92

ヒト随意性嚥下における旨味刺激の効果
 ○ 畠山 文¹、中村 由紀¹、北田 康之²、矢作 理花²、井上 誠¹ (新大院医歯 摂食・嚥下リハ、²盛岡味覚・嚥下研)

【背景と目的】嚥下は、随意性にも反射性にも引き起こすことが可能であり、上位脳および末梢からの入力はいずれも延髄の嚥下中枢を賦活化することで嚥下運動の発現をもたらす。また、口腔への味刺激のみでは嚥下反射を誘発することはないものの、味刺激が上位脳もしくは嚥下中枢の神経活動に変化をもたらすことが、過去の研究により報告されている。本研究では、ヒトの舌前部に旨味刺激を与えた時の随意性嚥下に対する効果を調べた。【方法】健康成人 20 名を対象に、舌前部への溶液注入を目的として経口的に外径 1.0 mm のシリコンチューブを挿入固定した。蒸留水、グルタミン酸・イノシン酸ナトリウム (旨味) 水溶液または塩化ナトリウム (NaCl) 水溶液を微量注入 (0.2 ml / min) しながら、出来るだけ早く繰り返し嚥下をするよう指示した。この際、両溶液に含まれる Na⁺濃度を 6、40、240 mM と設定した。嚥下時の舌骨上筋群表面筋電図記録を用いて、各溶液刺激時の嚥下間隔時間を算出し、溶液間で比較した。【結果と考察】旨味および NaCl 水溶液刺激時のいずれにおいても、蒸留水刺激時と比べて嚥下間隔時間は減少した。また、旨味溶液の促進効果はより低い Na⁺濃度で表れた。以上の結果は、旨味成分による随意性嚥下の促進効果を示すものであり、旨味成分ならびに Na⁺による嚥下中枢への入力の加重効果が示唆された。

P1-94

fMRI を用いた嗅覚刺激に伴う脳活動部位の探索
 ○ 深見 秀之¹、堀江 沙和^{1,2}、上野 育子³、工藤 與亮³、佐々木 真理³、久保田 将史⁴、櫻庭 浩之⁴、佐原 資謹¹ (岩医大 生理学 病態生理、²岩医大 医歯薬総合研 腫瘍生物、³岩医大 医歯薬総合研 超高磁場 MRI、⁴岩医大 歯 補綴・インプラント)

感覚認識の研究はヒトで脳機能マッピングを用いて近年盛んに行われている。functional MRI (fMRI) 脳機能マッピング法では、血中ヘモグロビンの酸化度の変化による信号 (BOLD 信号) を検知しており、echo planar imaging (EPI) 法を用いた高速撮像による手法が主流となっている。しかし、従来の高磁場 (< 3T) MRI での EPI 法では周囲組織との磁化率の違いにより脳底部において画像の歪みや欠落が著名に見られる。そのため、味覚および嗅覚領域の研究では、末梢で受容された情報が、どのような経路で大脳皮質まで運ばれ、その質や強さを認識しているか未だ解明できない部分が多い。そこで今回、7-Tesla MRI 装置を用いて、3D-SPGR のパルスシークエンスで、β-フェニルエチルアルコール (花の匂い) で匂い刺激を与えた時の fMRI を試みた。その結果、EPI 法と比較して 3D-SPGR では脳底部の歪みが少ない画像が撮像できた。さらに、BOLD 信号の検出能力を高めるために強度画像と位相画像を合わせた磁化率強調画像 (susceptibility weighed image: SWI) で画像解析を行ったところ、直回、島皮質等に賦活が見られた。3D-SPGR による fMRI および SWI を用いた画像解析は嗅覚認識に関与する脳部位の探索に有用であると考えられる。

P1-93

胎生ラットの孤東核吻側部におけるシナプス関連タンパク質の発現
 ○ 諏訪部 武¹、西川 泰央¹ (大歯大 生理)

本研究では延髄味覚神経回路の構築を理解する目的で幼若孤東核吻側部のシナプス関連タンパク質の発現を観察した。胎生 13、14、15 および 16 日のラットを用い、孤東核吻側部に発現するシナプス関連タンパク質を免疫組織化学的に同定した。胎生 13 日、孤東 (孤東核に投射する求心性神経線維束) 内に neurofilament 陽性線維が観察された。胎生 14 日、neurofilament、syntaxin および bassoon 陽性線維が孤東から分枝して正中に向かって伸長し始めた。胎生 15 日、孤東内に synaptophysin および synaptobrevin 陽性線維が観察された。胎生 16 日、孤東から分枝した neurofilament 陽性線維は幼若孤東核の中でさらに分枝して複雑な神経網を形成していた。幼若孤東核の中に syntaxin、bassoon、synaptophysin 陽性線維も観察されたが、抗 synaptobrevin 免疫反応は不明瞭であった。以上の結果から、求心性線維が孤東から幼若孤東核へ伸長するのに伴い、幼若孤東核の中にまずシナプス前末端の構築に重要な syntaxin と bassoon が発現し、これに遅れてシナプス小胞の形成に重要な synaptophysin が発現して延髄味覚神経回路が構築されていくことが明らかとなった。

P1-95

島皮質錐体細胞の電気生理学的ならびに形態学的特性の解析
 ○ 安達 一典^{1,2}、吉田 篤³、坂上 宏¹、越川 憲明²、小林 真之² (明海大 薬 薬理、²日大 歯 薬理、³阪大 歯 口腔解剖 2)

【目的】島皮質は、顆粒層 (GI)、不全顆粒層 (DI)、無顆粒層 (AI) に分類され、各領域が個別の情報処理を担っている。その神経メカニズムの解明は、島皮質の機能を明らかにする上で必須である。そこで、電位依存性色素を用いた光学計測法と in vivo patch-clamp 法を用いて、島皮質内の興奮伝播の時空間的解析を行い、錐体細胞の生理学的・形態学的特性を明らかにした。【方法】ラット島皮質に電位依存性色素を脳表から負荷し、GI/DI 部位への電気刺激で誘発される興奮伝播を記録した。また、biocytin 含有内液を用いた whole-cell patch-clamp 法にて、GI/DI の II/III 層錐体細胞から細胞内記録を行い、膜電位応答を記録した。さらに、記録細胞を ABC 法にて可視化し、その形態学的解析を行った。【結果と考察】GI/DI への電気刺激で生じた興奮は、尾側から吻側方向への伝播が優位であり、その神経基盤として錐体細胞の吻側に伸展する特徴的な軸索形態の存在が考えられた。錐体細胞の膜電位は、1-2 Hz で UP state と DOWN state を繰り返し、近傍への電気刺激に対して DOWN state では EPSPs のみが観察されるのに対して、UP state では顕著な IPSPs が認められた。これら錐体細胞の特性は、島皮質が state に応じて膜電位応答を変化させることで情報処理を行っていることを示唆している。

P1-96

ストレスが閉経マウスモデルの情動および GABA 機能に与える影響

○塚原 飛央¹、増原 正明¹、齒村 貴弘²、永山 知宏¹、植村 正憲²、佐藤 友昭¹ (鹿大 歯 歯 科応用薬理、²鹿大 歯 歯科機能形態)

ストレスは、各種神経系に影響を与えるが、GABA 系などの抑制系神経への障害機序についての報告は少ない。我々は、ストレスと卵巣摘出 (OVX) が GABA 系神経をどのように障害するかをまず、行動科学的に分析した。マウスに OVX あるいは偽手術 (Sham) を行い、この 2 群にストレス経口投与負荷 (S) と非負荷 (NS) を行い、4 群に分け GABA 系の影響を検討するためジアゼパム (DZ)、17 α 、 β estradiol (α 、 β E2) 等を単独および併用で投与し、新規物質探索試験 (NOT)、高架十字路迷路試験 (EPM)、強制水泳試験 (FST) を行った。OVX 群は Sham 群に対して FST で無動時間 (IT) が増加したが、ストレスの負荷の有無は行動成績には影響しなかった。そこで、GABA 系の影響を検討するために DZ を投与した。OVX-NS + DZ 群では、OVX-NS 群に対して NOT、EPM、FST において総探索時間、オープンアームの滞在時間 (OAT) の増加、および IT が減少した。一方で OVX-S + DZ 群と OVX-S 群では成績に差がなかった。ゆえに、ストレスと OVX が GABA 系に影響を与えていることが示唆された。また、E2 の単独投与は OVX-S 群で OAT を減少させたが、DZ との併用では逆に増加した。さらに、 α E2 が OVX-S-DZ 群において IT を増加させたのに対して、 β E2 は OVX-S-DZ 群で IT を FST において変化させなかった。以上の結果より、ストレスが閉経モデルマウスの GABA 機能異常へ関与する可能性があり、それを α E2 が β E2 より情動において多面的に改善することが示唆された。

P1-98

難治性疼痛の発症における新規エストロゲン受容体 GPR30 の役割

○本山 直世¹、森田 克也²、北山 友也²、西村 英紀¹、兼松 隆²、土肥 敏博³ (鹿大 院医歯薬保 健康増進歯、²鹿大 院医歯薬保 細胞分子薬理、³日薬大 薬物治療)

一般に女性は男性に比べ痛みの感受性が高いとされ、片頭痛、繊維筋痛症、顎関節症等は圧倒的に女性が多いと言われている。更に、更年期を境に疼痛閾値が様々に変化することも知られ、エストロゲンの関与が取り沙汰されている。近年、細胞膜に存在する新規エストロゲン受容体 GPR30 が同定された。GPR30 は脊髄および自律神経、感覚神経に発現しており、侵害刺激により発現調節を受ける等、疼痛制御に関わる可能性が考えられる。そこで、GPR30 を介した疼痛制御について詳細に検討した。

GPR30 アゴニスト G1 の脊髄腔内投与により、投与直後より用量依存性の強い疼痛反応を惹起することを見出した。本疼痛反応は雄マウスより雌マウスでより強いものであった。G1 全身投与および三叉神経脊髄路核を刺激する大槽内投与においても同様の疼痛反応を惹起した。G1 脊髄腔内投与による疼痛反応は、GPR30 アンタゴニスト G15 で拮抗された。神経障害性疼痛モデルマウスで G15 の脊髄腔内投与、大槽内投与および全身投与により疼痛の寛解を認め、さらに、RNA 干渉により脊髄および三叉神経脊髄路核の GPR30 をノックダウンすることで神経障害性疼痛を寛解できることを明らかにした。

以上より、新規エストロゲン受容体 GPR30 が痛覚伝達の制御に重要な役割を果たすことを明らかにし、GPR30 が新規鎮痛薬開発のターゲット分子となる可能性を示唆した。

P1-97

交連線維を介した左右島皮質間連絡様式の光学計測による解明

○溝口 尚子¹、小林 真之²、越川 憲明² (日大 歯 摂食機能療法、²日大 歯 薬理)

島皮質味覚野 (GC) は視床腹内側核 (VPMpc) を介して末梢からの味覚情報を受けており、その伝達は同側優位である。一方、反対側 GC から脳梁を介して味覚情報を受けている (Hayama and Ogawa, 2001)。しかし、反対側 GC からの入力の大きさや時空間的特性については不明である。そこで、交連線維を介した左側 GC から右側 GC への投射分布を解剖学的に明らかにすると同時に、左側 VPMpc および左右 GC の電気刺激 (50 Hz, 5 連パルス) によって誘発される左側 GC での興奮伝播の様式を *in vivo* 光学計測によって明らかにした。Fluorogold を左側 GC へ注入したところ、右側 GC と第 V 層錐体細胞と左側 VPMpc の細胞が標識されていた。左側 VPMpc を電気刺激して観察される左側 GC における興奮伝播の時空間的パターンは、左側 GC 刺激時の興奮伝播とよく類似していた。右側 GC を電気刺激すると潜時約 20 ms で興奮伝播が観察され、続いて GABA_B 受容体 antagonist で阻害される抑制性信号が認められた。左側 GC 刺激による興奮は、右側 GC への同時刺激により増強され、特に左側 GC に対する応答の振幅が小さいときに顕著であった。以上の結果から、交連線維を介した反対側からの投射は、GC における弱い味覚信号を増強することで味の検知閾を高めている可能性が示唆された。

P1-99

細胞内 cAMP 上昇が大脳皮質味覚野から口腔体性感覚野への信号伝播速度に与える影響

○吉村 弘^{1,2}、長谷川 敬展¹、姚 陳娟¹、赤松 徹也¹ (徳大 院 HBS 口腔分子生理、²金沢医大 医 生理)

cAMP は細胞内セカンドメッセンジャーとしてニューロンの機能を変化させることが知られている。我々は、bromo-cAMP を用いて細胞内 cAMP を上昇させた場合、大脳皮質ニューロンのシナプス伝達効率が低下することを報告した。シナプス伝達効率の低下は信号伝播速度の低下を引き起こすことが予想される。そこで、今回我々は味覚野から口腔体性感覚野に伝播する信号の伝播速度に対する細胞内 cAMP 上昇の影響を調べた。味覚野、口腔体性感覚野を含むラット脳スライスを作製し、光学的計測装置を用いて味覚野への電気刺激が引き起こす信号伝播の様子を観察した。細胞外液にカフェインを加えると、味覚野を出発した信号は口腔体性感覚野に到達するようになり、これには NMDA 受容体の活動に依存するオシレーションも伴っていた。さらに細胞外液に bromo-cAMP を加えると、オシレーション活動は低下したが信号伝播速度に影響はなかった。一方、細胞外液にカフェインと bromo-cAMP を同時に加えた場合、信号伝播速度の低下とオシレーション活動の低下を認めた。以上のことから、bromo-cAMP による細胞内 cAMP の上昇は NMDA 受容体の活動に影響を与え、その結果として味覚野から口腔体性感覚野への信号伝播速度の低下を引き起こすが、NMDA 受容体が十分に活動した後では、信号伝播速度に対する細胞内 cAMP 上昇の影響は少ないと考えられる。

P1-100

可撤性義歯を想定した金属フレームによる脳機能画像へのアーチファクトについて

○庄井 和人¹、笛木 賢治¹、泰羅 雅登²、五十嵐 順正¹ (¹東医歯大 院医歯 部分床義歯、²東医歯大 院医歯 認知神経生物)

[目的]現在、ヒトの脳活動を非侵襲的に、高い空間分解能で画像化するfMRIが普及し、歯科研究においても咀嚼運動時の脳賦活部位や補綴治療による脳活動の変化について報告されている。義歯装着者において義歯を装着した状態でMRI撮像を行う際、義歯の金属フレームによる脳機能画像へのアーチファクトが懸念される。そこで、ファントムでアーチファクトの影響範囲を調べるとともに、ヒトの脳機能画像上でのアーチファクトの影響の有無を明らかにすることを目的とする実験を行った。[方法]撮像には1.5T MRI装置(Magnetom Vision, Siemens)を用いた。ファントム内にCo-Cr合金で作製した下顎義歯を想定した金属フレームを設置してEPI撮像を行い、アーチファクトの影響範囲を調べた。次に健常者3名で下顎歯列に合わせた金属フレームを作製し、装着した状態と装着しない状態とでの把握運動および咀嚼運動時の脳活動を比較した。[結果と考察]ファントムのEPI画像からアーチファクトの影響範囲は最大70mmであった。頭蓋底と下顎歯列との距離がこれより離れていれば下顎義歯装着時の金属フレームによる脳機能画像への影響は小さいと考えられる。また、ヒトの脳活動の記録において金属フレーム装着、非装着時の賦活部位のピーク座標とクラスター分布の一致度は高く、アーチファクトの影響は認められなかった。以上から下顎義歯の金属フレームによる脳機能画像へのアーチファクトは小さいと考えられる。

P1-102

Activation of microglial cells in the trigeminal subnucleus caudalis evoked by inflammatory stimulation of the oral mucosa

○黄 宏智¹、中塚 美智子¹、岩井 康智¹ (¹大歯大 歯 口腔解剖)

[Objective] We observed that glial cells in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) were activated in response to noxious stimulation of oral mucosa. [Methods] The tongue of rats (250g) were stimulated with 10 μ l of either normal saline (control) or 5% formalin (experimental) for 5 minutes. Rats were allowed to survive for 1 hour or 24 hours after the stimulation. Frozen Sec.s of each brainstem were processed for immunohistochemical study of the expression of ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) and phosphorylated-p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK). Immunoreactions occurred in the specimens were evaluated and analyzed. [Results] Iba1-immunoreactive (IR) cells were significantly increased in the Vc (1h and 24h after stimulation, $p < 0.05$). An increase in the number of phosphorylated-p38 MAPK-IR microglia in the Vc was also distinctly observed (1h and 24h after nociception, $p < 0.05$). [Conclusions] Microglial cells in the Vc are activated in response to noxious stimulation of oral mucosa. The expression of phosphorylated-p38 MAPK plays certain important roles in regulatory microglial activation in the Vc.

P1-101

A role of P2X₇ receptor in neuropathic pain following trigeminal nerve injury

○渡邊 峰朗¹、内田 隆¹ (¹広大 院医歯薬保基礎生命科学 口腔細胞生物)

The present study directly addresses the roles of the P2X₇ receptor (P2X₇R), an ionotropic ATP receptor, and cytokines in the induction of orofacial pain following chronic constriction injury (CCI) of the infraorbital nerve (IoN). Rats were used, and ligatures of 4-0 chromic gut were tied around the IoN. A438079, a P2X₇R antagonist or SB203580, a phosphorylated (p)-p38 MAPK inhibitor, was infused intrathecally into CCI-treated rats. In another group of rats, BzATP, a P2X₇R agonist, was infused intrathecally with A438079, SB203580 or etanercept, a TNF- α receptor-binding recombinant drug. CCI of the IoN induced allodynia/hyperalgesia (AH) and up-regulation of P2X₇R, TNF- α in the trigeminal sensory nuclear complex (TNC). AH or up-regulation of TNF- α in the TNC following CCI of the IoN was inhibited by A438079 or SB203580. Treatment of rats with BzATP induced AH and up-regulation of TNF- α and p-p38 in the TNC. AH or up-regulation of TNF- α following BzATP treatment was inhibited by SB203580 and etanercept. Based on these findings, phosphorylation of p38 MAPK via P2X₇R may induce neuropathic pain, which is most likely mediated by TNF- α released by microglia.

P1-103

条件刺激として混合味溶液を用いた味覚嫌悪学習の特徴

○片川 吉尚¹、安尾 敏明²、玄 景華¹、裕 哲崇² (¹朝日大 歯 口腔病態医療 障害者歯科、²朝日大 歯 口腔機能修復 口腔生理)

8週齢の雄性Wistar/STラットを用いて、嗜好性もしくは嫌悪性のある混合味溶液を条件刺激とした味覚嫌悪の般化パターンを検討した。条件刺激として「5mM サッカリンと0.03M NaClの混合溶液(A溶液)」または「5mM サッカリンと1M NaClの混合溶液(B溶液)」のいずれかを摂取させた直後に、無条件刺激として0.15M LiCl(条件づけ群)または生理食塩水(コントロール群)を体重の2%量腹腔内投与した動物を作成し、各種味溶液に対する10秒間リック数を通法に従い測定した。この測定に先立ち、別のラットでA溶液は蒸留水より嗜好されることを、B溶液は嫌悪されることを48時間2ビン法により確認した。その結果、A溶液条件づけ群のラットはA溶液そのものに対するリック数がコントロール群より有意に小さかった他、5mM サッカリンや0.03M NaCl溶液に対するリック数もコントロールより小さかった。また、B溶液条件づけ群のラットは5mM サッカリンに対するリック数がコントロール群より有意に小さかったが、B溶液と1.0M NaCl溶液に対するリック数はコントロール群と差がなかった。これらの結果は、味覚嫌悪の獲得や般化の度合いは条件刺激となる味溶液の各コンポーネントに対する嗜好性により調節されていることを示唆している。

P1-104

実験動物における連続舌運動スキルの習得
○戸田 孝史¹、工藤 忠明¹ (¹東北大学 歯 口
腔生理)

【目的】ヒトの摂食、構音では巧緻的舌運動が必要となるが、その神経機構は明らかではない。大脳中心後回一次体性感覚野とその周辺領域で連続舌運動時のニューロン活動を調べるため動物に課題を学習させた。【方法】*Macaca fuscata* 雌 1頭を用い馴化、訓練を行った。舌運動課題は、方向の異なる2枚のスライドドア(上下・左右)を連続的に開け前方の報酬を舌尖で取るものである。まず、試作装置を実験者が手に持ち動物の顔面に近づけ予備訓練を行うと同時に、最適なドアの大きさやその取っ手の形状について検討した。最終的な操作パネルを製作した後、頭部固定下での訓練を進めた。操作パネルを90度ずつ回転させてドアの操作方向を変え4種類の課題とした。舌とドアとの接触をモニターすると同時に、2個のPCカメラを用い1秒間30コマで撮影した。【結果と考察】予備訓練が奏功し、1年9か月後の頭部固定下での習得は順調であり、約2週間で4種類すべての課題について習熟し、パネルの向きを頻繁に変えても的確に連続動作を行うようになった。1試行の最短遂行時間は約1.5秒であり、開始信号、最初のドア操作開始、2番目のドア操作開始、報酬タッチ、閉口、の時間間隔は、それぞれ約0.5、0.4、0.4、0.2秒であった。舌の可動範囲内でパネルの位置、方向を変化させ、課題の難易度を調節することも可能である。【謝辞】実験動物は、ナショナルバイオリソースプロジェクトから提供を受けた。

P1-105

舌と硬口蓋の習慣性咀嚼側刺激により誘発される体性感覚野由来の神経活動—脳磁図を用いた検討
○平澤 仁志¹、平井 喜幸¹、白石 秀明²、船橋 誠¹ (¹北大 歯 口腔生理、²北大 医 小児)

【目的】口腔内刺激により誘発される体性感覚野由来の神経活動と習慣性咀嚼側(PCS)との関連については不明な点が多い。運動機能を有する舌と有しない硬口蓋の体性感覚誘発脳磁場(SEF)を全頭型脳磁図計により測定し、舌と硬口蓋のSEFとPCSとの関連を検討した。【方法】対象は健康成人12名(男性10名、女性2名、平均年齢29.3歳)。PCSは右側6名、左側6名。舌と硬口蓋の左右側を別々に感覚閾値の3倍で600回電気刺激した。各半球(対側と同側半球)の18chのRMS波形より、刺激後10-150msの平均振幅(RMS[10, 150])を求めた。大脳皮質の反応を評価するため刺激前の平均振幅を引いた値、aRMS(=RMS[10, 150]-RMS[-50, -5])を用いた。【結果】すべての被験者で舌と口蓋刺激により両側半球に反応を認めた。舌のPCS刺激時のaRMSは 8.66 ± 5.72 、 5.23 ± 3.28 fT/cm(対側、同側半球)、non-PCS刺激時のaRMSは 5.43 ± 4.17 、 4.15 ± 2.89 fT/cm(対側、同側半球)。口蓋のPCS刺激時のaRMSは 5.62 ± 2.41 、 5.39 ± 2.67 fT/cm(対側、同側半球)、non-PCS刺激時のaRMSは 5.36 ± 3.12 、 4.02 ± 1.83 fT/cm(対側、同側半球)。舌のPCS刺激時の対側半球でのaRMSはnon-PCS刺激時の対側半球と同側半球のaRMSより有意な増加を認めたが、口蓋では差がなかった。【結論】探索運動により感覚を受容する舌の誘発脳反応はPCSによる影響を受けるが、受動的に感覚を受容する硬口蓋では影響を受けないことが示唆された。

P1-106

リズム的な顎運動中の前庭神経核ニューロン活動
○佐藤 義英¹、石塚 健一¹、矢島 絵理子²、岩崎 信一¹ (¹日歯大 新潟生命歯 生理、²日歯大 新潟生命歯 矯正)

【目的】前庭神経核は三叉神経感覚核と相互神経線維連絡があり、内側前庭神経核小細胞部は咬筋運動ニューロンに投射していることが明らかになっている。我々は開口反射、咬筋単シナプス反射と皮質誘発性のリズム的な顎運動が前庭神経核刺激により変調されることを明らかにした。これらのことから、前庭神経核は顎運動の調節に関与している可能性が考えられる。一方、外側前庭神経核ニューロンは歩行運動の着地相開始時に発火頻度が増加することが報告されている。そこでリズム的な顎運動における前庭神経核ニューロン活動について検索した。【方法】実験にはウレタン麻酔下ラットを用いた。硬口蓋の機械刺激により、リズム的な顎運動を誘発させた。前庭神経核ニューロンからの細胞外記録と咬筋・顎二腹筋前腹からの筋電図記録を行った。顎運動開始3秒前と顎運動開始3秒後の前庭神経核ニューロンの発火頻度を比較した。記録終了後、記録部位を組織学的に確認した。【結果と考察】内側前庭神経、外側前庭神経核、上前庭神経核と下前庭神経核から、顎運動中、発火頻度が増加または減少するニューロンが記録された。発火頻度の変化と顎運動の相(開口相と閉口相)の間には関係がなかった。これらニューロンの発火頻度は、受動的な開口に対し変化しなかった。これらのことから、前庭神経核は顎運動の調節に関与していることが示唆された。

P1-107

三叉神経節内におけるNK1受容体の抑制による三叉神経脊髄路核ニューロンの中樞性感作の減弱について
○武田 守¹、高橋 誠之¹、松本 茂二¹ (¹日歯大 生命歯 生理)

【目的】我々は顎関節炎におけるアロディニア発現には三叉神経節内(TRGs)ニューロン間のクロストークが重要であることを指摘してきた。本実験では三叉神経脊髄路核(SpVc)のWDRニューロン活動変化がTRGsへのNK1受容体拮抗薬によりどのように変調されるかを検討した。【方法】麻酔ラット顎関節にCFAを投与し炎症を誘発した。炎症誘導後のラットの顔面皮膚と顎関節電気刺激に応じるSpVc領域においてWDRニューロンの自発放電頻度、機械刺激に対するスパイク発火頻度、閾値について炎症群と正常群で比較した。また炎症群のWDRニューロンで観察された興奮性増強効果がTRGsへのNK1受容体拮抗薬の微細電気泳動的投与により変調されるか否かを検討した。【結果と考察】顎関節と顔面皮膚電気刺激に応じる25個のWDRニューロンを記録した。炎症2日後のWDRニューロンの自発放電および顔面皮膚機械刺激に対する発火頻度は有意に増加していた。また炎症群では機械刺激の閾値は正常群に比較し有意に低下した。CFA投与後1.2日の炎症群のWDRニューロンの自発放電の増強はTRGsへのNK1受容体拮抗薬により有意に抑制されたが、機械刺激に対する発火頻度増加と閾値の低下は炎症誘発1日ではNK1受容体拮抗薬により有意に抑制されたが、2日後で無効であった。顎関節炎により生じるアロディニアは炎症初期TRGs内のSPを介したクロストークの抑制はアロディニア発現を抑制することが示唆された。

P1-108

神経節における電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.8 と Nav1.9 の分布：乳幼仔ラットの後根神経節と節状神経節ニューロンを対象とした免疫組織化学的検討

○佐伯 周子¹、井出 良治¹、高橋 誠之¹、金澤 卓也¹、田宮 旬子¹、牧野 路生¹、松本 茂二¹ (日歯大 生命歯 生理)

【目的】ラットの後根神経節 (dorsal root ganglion, DRG) と節状神経節 (nodose ganglion, NG) ニューロンを対象に、免疫組織化学的手法を用い、電位依存性ナトリウムチャンネル (voltage-gated sodium channels, VGSC) の中でテトロドトキシン非感受性 (TTX-R) の Nav1.8 と Nav1.9 の発現の分布を調べた。【方法】深麻酔した乳幼仔ラット (9-11 日齢) から摘出した DRG と NG の凍結組織切片を対象に抗 Nav1.8 と抗 Nav1.9 抗体による二重染色を行った。【結果】任意抽出した DRG と NG ニューロン (DRG 663 個、NG 707 個) を検討したところ、それぞれ全体の 65% (DRG 428 個、NG 458 個) が Nav1.8 陽性を示した。一方、Nav1.9 陽性ニューロン数は DRG 全体の 40% (262 個) に達したが、NG では全体の 2% (15 個) に留まった。更に、各神経節の Nav1.8 陽性ニューロン中、Nav1.9 も陽性を示したのは DRG で 52% (224 個)、NG では僅か 0.4% (2 個) だった。【結論】以上より、痛み情報を中枢へ伝える役割を担う TTX-R VGSC として Nav1.8 と Nav1.9 の機能的な差異を検討する上で、両チャンネルの分布が異なる DRG と NG ニューロンは有用な研究対象と考えられた。

P1-110

カプサイシンの皮下投与により生じるカエルの機械性アロディニア

○古山 昭¹、大須賀 謙二¹、米原 典史²、宗形 芳英¹ (1奥羽大 歯 口腔機能分子生物、2奥羽大 歯 口腔病態解析制御)

熱感受体チャンネル TRPV1 の活性化により、熱刺激や機械刺激に対する感受性が亢進することが知られている。本研究では、ウシガエルおよびツメガエルの後肢皮下にカプサイシンを注入し、防御反応閾値に与える影響を行動学的に評価した。Plantar テストでは、哺乳類で報告されている、カプサイシン投与による温熱性痛覚過敏の誘導は見られず、熱刺激に対する感受性はカプサイシン投与の影響を受けなかった。一方、Von Fly テストを行った結果、カプサイシン注入後では機械刺激に対する感受性亢進が見られ、その効果は 24 時間以上持続したが、この機械性アロディニアは TRPV1 受容体の拮抗阻害剤である capsazepine により抑制された。次に、哺乳類のカプサイシン誘導性温熱性痛覚過敏の発生と維持には、末梢におけるグルタミン酸およびその受容体が関与していることが示唆されている。しかし本研究の結果、カエルの後肢皮下にグルタミン酸を投与しても、温熱性侵害刺激感受性の変化は見られなかった。以上の結果から次の 2 点が示唆される。(1) カエル TRPV1 受容体の活性化は熱刺激感受性に影響を及ぼさないが、それは TRPV1 の下流にグルタミン酸による熱刺激感受性修飾機構が存在しないためかもしれない。(2) TRPV1 受容体はカエルの機械刺激感受性を変化させるが、そこにはグルタミン酸による感受性修飾機構は関与しない。

P1-109

三叉神経の求心性入力に副交感神経性血管拡張反応を介した脳血流維持に与える

○石井 久淑¹ (1北医大 歯 生理)

【目的】近年、我々は三叉神経や迷走神経の求心性刺激で生じる咀嚼筋や口唇の副交感神経性血管拡張反応はこれらの諸器官のみならず、総頸動脈の血流増加を誘発することを明らかにした。したがって、副交感神経性血管拡張反応は顎顔面頭部領域の血流維持に重要であることが示唆される。副交感神経性血管拡張線維は脳血管や内頸動脈においても組織学的に報告されているが、脳神経の求心性入力によるこれらの線維を介した脳血流調節機構については不明である。本研究は 1) 三叉神経の求心性入力と脳血管に分布する副交感神経性血管拡張線維との関係と 2) それらの脳血流に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、舌神経の求心性刺激が内頸動脈の血流動態に及ぼす影響を検討した。【方法】麻酔したラットの内頸動脈の血流量は超音波血流計を用いて、咬筋と口唇の血流変化はレーザードップラー血流計を用いて記録した。両側の頸部交感神経幹と迷走神経は頸部で切断し、これらの影響を完全に除去した。【結果と考察】舌神経刺激はいずれの測定部位においても刺激強度と頻度に応じた血流増加を誘発した。内頸動脈の血流増加は咬筋や口唇血流及び体幹血圧の変化に非依存的に生じ、自律神経節遮断薬の投与で顕著に抑制された。これらより、三叉神経の求心性入力は副交感神経性血管拡張反応を介した脳血流増加を誘発し、この血流増加作用は脳血流維持に重要なメカニズムの一つであることが示唆される。

P1-111

パルス電磁場刺激依存的な神経突起伸長誘導メカニズムの検討

○工藤 忠明¹、清水 良央²、金高 弘恭³ (1東北大院歯 口腔生理、2東北大院歯 口腔病理、3東北大院歯 歯学イノベーションリエゾンセ)

【目的】パルス電磁場 (PEMF) 刺激による神経分化への影響は未解明な点が多い。そこで PEMF 単独刺激を用い、ラット PC12 細胞における神経突起伸長の可能性とそのメカニズムを検討した。PC12 細胞は NGF や他の誘導剤により、神経突起を伸長させた神経様細胞に分化する細胞である。【方法】励磁コイル上にセットされた PC12 細胞に、PEMF 刺激 (磁束密度 700mT、周期 0.172 Hz、パルス幅 0.04 ms) を 1 日当たり合計 0 時間～12 時間加え、その際の神経突起伸長を評価した。PEMF の細胞への作用機序を解析するため、PEMF が細胞内シグナル伝達に及ぼす影響について ERK 阻害剤 U0126、NGF 受容体 (TrkA) 阻害剤 GW441756、および PKA 阻害剤 H89 を用いた検討も実施した。【結果と考察】本研究にて実施した PEMF 処理により、神経突起を有する PC12 細胞の割合が、NGF 等を併用せずとも増加した。また、この PEMF 曝露により p38 ではなく ERK 経路の持続的な活性化が誘導された。さらに、U0126 処理により PEMF 依存的な ERK1/2 の活性化と神経突起形成が著しく抑制された。しかしながら、この抑制効果は GW441756 や H89 では認められなかった。これらの結果は、本研究で採用した PEMF 刺激が単独で PC12 細胞の神経突起を形成させる能力があること、さらに TrkA や PKA に非依存的な MEK-ERK1/2 シグナル経路の活性化が、本細胞における PEMF 依存性神経突起伸長において必須のものとして機能することを示唆する。

P1-112

ライフステージにおける味覚嗜好性の相違についての検討

○乾 千珠子¹、上田 甲寅¹、山本 隆²、中塚美智子¹、安 春英¹、隈部 俊二¹、岩井 康智¹ (大歯大 口腔解剖、²畿央大 健康科)

一般的に加齢に伴い生体にとって必要なエネルギーは減少する傾向にある。またそれに関連して食事の嗜好性も変化する。しかし、必要エネルギーの減少に伴って味覚嗜好性がどのように変化していくのかは明らかにされていない。そこで本研究では、各ライフステージでの味覚嗜好性の変化を明らかにすることを目的とし、3-6 週齢、8-11 週齢、17-20 週齢、34-37 週齢および 69-72 週齢の SD 雄性ラットの 5 群に対しニビン法を用いて検討した。実験の結果、0.3 M ショ糖、5 mM サッカリンおよび 0.1 M グルタミン酸ナトリウムの嗜好率は週齢の増加に伴い減少する傾向を示した。また、0.5 M ショ糖に対する嗜好率も 34-37 週齢群までは減少する傾向を示したが、69-72 週齢群では嗜好率が上昇した。一方、 3×10^{-4} M 塩酸キニーネおよび 3×10^{-5} M 塩酸キニーネについては、週齢の増加に伴い嗜好率が上昇する傾向がみられた。0.1 M 塩化ナトリウムまたは 0.1 M 塩酸における嗜好率については群間で有意な差はみられなかった。また、ショ糖、塩化ナトリウムまたは塩酸キニーネについて濃度間の比較したところ、69-72 週齢群では高い濃度の溶液を好む傾向を示した。これらの結果から、甘味、苦味およびうま味に対する嗜好性は加齢による影響を受けることが明らかとなった。また、高齢期では高い濃度を好んだことから、加齢による味覚感受性の低下が嗜好性の変化の原因の一つである可能性が考えられた。

P1-114

甘味・うま味受容体 (T1R1 または T1R3) を発現する味細胞の応答解析

○吉田 竜介¹、高井 信吾¹、二ノ宮 裕三¹ (九大 院歯 口腔機能解析)

G タンパク質共役型受容体である Taste receptor type 1 (T1Rs) は甘味、うま味の受容体として機能する。T1R メンバーはヘテロダイマーを形成し、甘味 (T1R2 と T1R3)、およびうま味 (T1R1 と T1R3) 物質により活性化される。しかしながら、これら T1Rs を発現する味細胞が、実際にどのような応答特性を持つかは不明である。本研究では、2 種の遺伝子改変マウス (T1R3-GFP マウスおよび T1R1-mcherry マウス) を用い、それぞれ茸状乳頭味蕾内の T1R1、T1R3 発現味細胞を同定し、基本味刺激に対する応答プロファイルを調べた。多くの T1R3 発現味細胞は甘味刺激に最も強い応答を示し、一部はうま味刺激に対し最も強い応答を示した。また T1R1 発現味細胞はうま味刺激に最も強い応答を示すものの、その多くは甘味刺激に対して最も強い応答を示した。甘味、うま味の細胞内情報伝達経路に関与する T1R3、gustducin、または TRPM5 を欠損させたマウスと T1R3-GFP マウスを掛け合わせ GFP-KO マウスを作成し、その応答特性を調べたところ、いずれのマウスにおいても味刺激に反応する T1R3 発現味細胞は観察されなかった。これは T1R3 発現味細胞において T1R3、gustducin、TRPM5 のいずれもが応答発現に必要であることを示唆する。また T1R1 を欠失した T1R1 発現味細胞ではうま味応答はほぼ消失し、甘味応答の減弱も見られた。これは T1R1 がうま味のみならず甘味の感受性にも影響する可能性を示唆する。

P1-113

L-グルノラクトンオキシダーゼ欠損ラットにおけるビタミン C 水溶液の嗜好性

○安尾 敏明¹、裕 哲崇¹ (朝日大 歯 口腔機能修復)

ビタミンは生体にとって必要不可欠の栄養素である。ところが、その必要量は微量であるため、どのように動物は検知し摂取しているのかその詳細については未だ不明である。本研究では、この機序を明らかにするため、ビタミン C (以下、VC) に着目し、行動学的実験および電気生理学の実験を行った。はじめに、VC 合成酵素である L-グルノラクトンオキシダーゼが欠損した Osteogenic Disorder Shionogi (ODS)/ShiJcl-od/od (VC 合成能欠如) ラットを用いて、VC 欠乏前後での対蒸留水嗜好性を、48 時間二瓶法により検討した。その結果、VC に対する嗜好性は欠乏前に比べ、欠乏時では有意に増加することが明らかとなった。また、ビタミン C 合成能がある ODS/ShiJcl-+/+ (野生型) ラットを用いて、同様の実験を行ったが、VC 嗜好性に変化は見られなかった。次に、VC が味物質として味覚器に作用しているのかどうかを調べるため、VC 合成能欠如ラットと野生型ラットの VC 水溶液に対する鼓索神経応答解析を行った。その結果、VC 欠乏有無に関わらず、両群のラットは VC 水溶液に対して鼓索神経応答を示した。以上の結果から、体内に VC が不足した場合、その嗜好性を増加させ、摂取行動を引き起こすメカニズムが生体内に存在すること、ラットは VC を味として認識し、選択している可能性が示唆された。

P1-115

長期間の乾燥がもたらす角膜求心性線維の応答性の変化

○黒瀬 雅之¹、山田 好秋¹、北川 純一¹、山村 健介¹ (新大院歯 口腔生理)

【目的】角膜乾燥症 (DES) は、異常なまたは不十分な涙膜により引き起こされる痛みを伴う疾患である。涙膜を構成する涙腺からの涙の分泌は、角膜求心性線維によって管理されており、その中で、多数の TRPM8 Channel の発現が確認されている。Cool Cell は、涙の蒸発による角膜の冷却と高浸透に反応することで、角膜上の涙膜の状態をモニタしていると考えられている。本研究では、実験的に誘発した DES が Cool Cell に及ぼす影響を検討することとした。【方法】片側の眼窩上・眼窩下涙腺を摘出後 4-8 週間経過し、尚かつブルーライト下でのフルオレセイン染色により Grade 3-4 と判定したラットを用いて、ウレタン・クロラロース麻酔下にて、三叉神経節から Cool Cell を同定した後、冷・温刺激と Menthol (TRPM8 agonist) に対する神経応答を記録した。また、涙の分泌量と瞬目反射の経過変化を記録した。【結果と考察】涙腺の摘出は、涙の分泌量を非摘出側の 35% まで減少させ、瞬目反射数を非摘出側の 300% 以上増加させた。35℃ の固定温度下での持続性神経活動は、摘出群と非摘出群では差はなかった。摘出群の冷刺激 (25℃、150s) により誘発される神経活動の Peak Frequency は有意に増加し、Cooling Threshold は有意に高くなった。矛盾冷覚 (52℃、25s) に対する応答は有意に増加し、Menthol に対する感受性は有意に増強した。これらのことから、DES は角膜求心性線維を感作することが示唆された。

P1-116

腫瘍の微小環境形成に関与する血球系細胞の動態について

○玉村 亮¹、辻極 秀次¹、片瀬 直樹¹、長塚 仁¹ (岡大 院医歯薬 口腔病理)

【目的】腫瘍間質は微小環境を形成し血管新生や腫瘍の浸潤・転移などに関与する。近年、腫瘍の微小環境形成にはマクロファージなど血球系細胞が重要な役割を果たすことが報告されている。そこで本研究では、GFP トランスジェニックマウス骨髄移植マウスに腫瘍を移植し、腫瘍組織における血球系細胞の動態について検討した。【方法】8週齢雌性 C57BL/6 野生型マウスに 10Gy の放射線照射後、同系 GFP トランスジェニックマウスから採取した骨髄細胞を尾静脈から移植した。骨髄細胞移植 1ヶ月後、マウス肺癌 (LLC 細胞) および悪性黒色種 (B16 細胞) 細胞を背部皮下および尾静脈へ移植、皮下原発モデルと肺転移モデルを作製した。皮下および肺腫瘍組織を摘出後、組織学的検討を行った。【結果】 LLC 細胞、B16 細胞ともに背部皮下において腫瘍組織の塊状増殖を認め、肺では複数の転移巣の形成が観察された。腫瘍組織内には類円形および樹枝状の形態を示す多数の GFP 陽性細胞が認められ、GFP 陽性細胞数は原発巣に比較して、転移巣で有意に増加していた。腫瘍組織内には GFP 陽性細胞とともに血管の侵入も多数観察されたが、CD11b と F4/80 は陰性を示した。【考察】骨髄由来の血球系細胞は腫瘍の微小環境を形成し、腫瘍の増殖・転移に関与する可能性が示唆された。腫瘍の微小環境形成に関与するマクロファージ以外の血球系細胞の存在が示唆された。

P1-117

酸性細胞外 pH は上皮間葉移行を誘導する微小環境因子である

○加藤 靖正¹、鈴木 厚子²、前田 豊信¹、島村 和宏^{2,3} (奥羽大 歯 口腔機能分子生物、²奥羽大院 歯 小児歯、³奥羽大 歯 小児歯)

癌組織の細胞外 pH は酸性であることはよく知られている。私達はこれまでに、マウスメラノーマ細胞をモデルとしてマトリックスメタロプロテアーゼ-9(MMP9)の発現が酸性細胞外 pH により誘導されること、この誘導機構にはホスホリパーゼや酸性スフィンゴミエリナーゼなどのリン脂質の代謝酵素が関与していることを報告してきた。一方、酸性細胞外 pH は、細胞内骨格に作用することも見出している。上皮系の癌細胞の線維芽細胞様の形態への変化は、上皮間葉移行 (EMT) として知られ、癌細胞の浸潤や転移過程で見られる変化である。本研究では、ルイス肺癌細胞をモデルとして、EMT に対する酸性細胞外 pH の影響を調べた。まず、ルイス肺癌細胞を C57BL/6 マウスの尾静脈に注射し、肺へ転移した細胞を回収後、戻し培養した。これを LLC-meta-I 細胞とした。この操作をさらに 3 回繰り返して、高転移性 LLC-meta-IV 細胞を得た。LLC-meta-I 細胞は、通常の培養条件では、細胞間が密集して敷石状に増殖したが、酸性 pH にて培養すると細胞間の接着性は低下し、線維芽細胞様に変化した。この形態は、LLC-meta-IV 細胞によく似ていた。RT-qPCR にて、EMT のマーカーである E-カドヘリンやビメンチンの発現を調べると、酸性培養により、E-カドヘリン発現は低下し、ビメンチン発現は促進された。これらのことから、酸性細胞外 pH は EMT を誘導する微小環境因子として機能することが示唆された。

P1-118

Sec6 の抑制は α -E-catenin の発現増強を介して口腔癌細胞における細胞間接着を改善する

○田中 俊昭¹ (山形大 医 解剖二)

Sec6/8 複合体は、神経細胞、上皮細胞、腺細胞や線維芽細胞などに認められる。Sec6/8 複合体の機能としては、分泌顆粒が細胞膜に結合する際に細胞膜における特異的な分泌部位に必須であり、カルシウム依存的な細胞間接着において、細胞質から細胞膜へ移行することが知られている。また、Sec6/8 複合体は上皮細胞において、apical junctional complex に特異的な細胞間接着タンパクによって、細胞膜における局在が限定されていることや MDCK 細胞において E-cadherin や nectin を基盤とする接着複合体と関与していることが報告されている。しかし、これまで腫瘍細胞において、Sec6/8 複合体と細胞間接着因子については未だ明らかとなっていない。そこで今回、われわれは口腔癌細胞株を用いて Sec6/8 と細胞間接着タンパクを調べたところ、Sec6 は α -E-catenin の発現量を介して E-cadherin や β -E-catenin の機能を制御していることが明らかとなった。さらに、Sec8 は Sec6 を制御することによって細胞間接着を調節していることが明らかとなった。この結果、口腔癌細胞において Sec6/8 複合体は腫瘍の悪性度と関係する可能性が示唆された。

P1-119

口腔癌における p120 カテニンと beta-カテニン発現の免疫組織学的解析

○笹谷 和伸¹、前田 元太¹、須藤 遥¹、千葉 忠成¹、今井 一志¹ (日歯大 歯 生化)

浸潤先端部癌細胞における E-カドヘリンの発現低下は口腔癌の進展と密接に関連し、その発現低下の原因には遺伝子発現の停止とタンパクの制御異常がある。E-カドヘリン細胞内ドメインには p120 カテニンと β カテニンが結合し、E-カドヘリンをアドヘレンスジャンクションに安定に保つ。両者は E-カドヘリンに結合していない状態では異なった作用をもつと考えられている。しかし、両カテニンの発現パターンを比較した検討はない。本研究では、口腔癌 (n=67) における発現を免疫組織学的に検討した。両カテニンは浸潤先端部で細胞膜に陽性となる癌細胞数が著しく減少したが、 β カテニンは細胞質内に染色される割合が有意に上昇した。低分化癌では両カテニンの陽性癌細胞率は低く、高浸潤性癌では p120 カテニン陽性癌細胞率が有意に低下した。両カテニンの陽性癌細胞率は E-カドヘリンの発現と正の相関を示した (P<0.01)。口腔癌細胞を TGF- β /TNF- α あるいは TGF- β /EGF 処理したところ、p120 カテニンは通常とは異なるアイソフォームの発現が上昇したのに対し、 β カテニンの発現には変化が見られなかった。以上の結果から、p120 カテニンと β カテニンの細胞膜での発現は E-カドヘリンの発現と密接な相関をもつが、両カテニンの発現は異なるメカニズムで制御されると考えられる。本研究は所属機関倫理委員会の承認のもとに行った。

P1-120

口腔癌の進展にはカドヘリンスイッチではなく、E-カドヘリンの発現低下が関連する

○橋本 孝志¹、添野 雄一²、田谷 雄二²、青葉 孝昭²、那須 優則³、前田 元太¹、須藤 遥¹、千葉 忠成¹、今井 一志¹ (1日歯大 歯 生化、²日歯大 歯 病理、³日歯大 歯 共同利用研)

E-カドヘリンからN-カドヘリンへのカドヘリンスイッチは癌の進展と上皮間葉移行 (EMT) に伴う象徴的な現象とされ、腺癌細胞の高度悪性形質の獲得に働く。しかし、重層扁平上皮癌におけるその存在と働きは一定の見解を得ていない。本研究では口腔癌 (n=63) におけるE-カドヘリンとN-カドヘリンの発現を免疫組織学的に検討した。E-カドヘリン陽性癌細胞率は浸潤先端部で著しく減少した。細胞膜に陽性反応を示す癌細胞率は分化度の低下 (P<0.01) と浸潤能の上昇 (P<0.01) とともに減少した。N-カドヘリンに陽性反応をしめす癌細胞はまれで、臨床病理学的因子との関連は認められなかった。そこで、in vitro において両カドヘリンを発現する口腔癌細胞株をマウスに同所移植して生じた腫瘍を免疫染色したところ、同様の現象が再現された。すなわち、E-カドヘリン陽性癌細胞は浸潤先端部で減少したが、N-カドヘリン陽性癌細胞はみられなかった。これらの結果は、口腔癌の進展にはE-カドヘリンを介した癌細胞間接着の低下が重要な役割を果たし、N-カドヘリンへのカドヘリンスイッチは働いていないことを示す。癌細胞周囲の微小環境がカドヘリンの発現をコントロールしていると予想される。本研究は所属機関倫理委員会と動物実験委員会の承認のもとに行った。

P1-122

アジアにおける口腔病理学の標準化と専門医化への戦略的調査 -モンゴル国での活動報告-

○久保 勝俊^{1,2}、河合 遼子¹、加藤 世太¹、烏居 亮太¹、吉田 和加^{1,2}、杉田 好彦^{1,2}、佐藤 恵美子^{1,2}、前田 初彦^{1,2} (1愛大院 歯 口腔病理、²愛大院 未来口腔医療研究セ)

【目的】口腔疾患の予防・治療には、適切な病理診断が必要不可欠であるが、ほとんどのアジア地域の開発途上国では基本的な病理学の教育すら行われていないのが現状である。平成22年度に基盤研究(B) (海外学術調査)、「研究課題名:新世紀に向けたアジアにおける口腔病理学の標準化と専門医化動向に関する戦略的調査」(研究代表者:前田初彦)に採択されており、今回、我々は、その取り組みの一環としてモンゴル健康科学大学において口腔病理学の教育を行ってきたのでその概要を報告する。【方法】モンゴル健康科学大学は1942年にモンゴル国の首都ウランバートルに創立された国立大学で、医科系技術者養成機関である。中でも、歯学部は昨年に新校舎を設立し、歯学教育の充実に力を注いでいる。我々は同大学歯学部を訪問し、教育の現状、特に病理診断の現状について調査を行った。また、滞在中、口腔病理学の講義を行い、講義修了後に試験を実施した。さらに、受講者への修了証の授与を行った。【結果と考察】同大学歯学部での教育の現状で病理学の教育、特に口腔病理学の教育は十分とは言えなかった。今回の講義は参加人数が100名超で、活発な質疑応答もみられた。また、受講者に対する講義後のアンケートでの評価は良好であった。今後は、他のアジア諸国へも同様に教育支援を行っていく予定である。

P1-121

頭頸部扁平上皮癌細胞において酸化ストレスは腫瘍抑制性ケモカインBRAK/CXCL14の発現を抑制する

○前畑 洋次郎^{1,3}、宮本 千央^{1,3}、吉野 文彦^{1,3}、加藤 靖正⁴、吉田 彩佳^{1,3}、高橋 聡子^{1,3}、高橋 俊介^{1,3}、畑 隆一郎^{2,3}、李 昌一^{1,3} (1神歯大 歯科薬理、²神歯大 口腔生化学・分子生物、³神歯大 難治研、⁴奥羽大 歯 口腔機能分子生物)

腫瘍組織では様々な活性酸素種 (ROS) が産生され、腫瘍細胞の悪性形質の獲得や腫瘍進展を促進することが知られている。これまでに我々は、口腔扁平上皮癌細胞 (HNSCC) においてBRAK/CXCL14 (BRAK) が抗腫瘍作用を示すケモカインであることを報告してきた。今回我々は、ROS がBRAKの発現を低下させること、さらにEGFR/MEK/ERK経路の阻害によりROSによるBRAKの発現低下を抑制することを明らかにしたので報告する。HNSCC細胞株において、ROS処理により腫瘍進展促進性ケモカインであるIL-8の発現上昇に伴いBRAKの発現が低下した。また、これらの遺伝子発現の変化はH₂O₂処理時と比較して、酸化力の強いHO[•]処理時に亢進することが確認された。さらに、抗酸化剤及びEGFR、MEKリン酸化阻害剤前処理により、ROS処理によるIL-8発現上昇およびBRAK発現低下は共に抑制されることが示された。これらの結果から、HNSCCにおいてROSはEGFRのチロシンキナーゼをリガンド非依存性なMEK-ERK経路の活性化を介してBRAKの発現を低下させることが示された。従って、腫瘍組織で産生されるROSは腫瘍進展機構を惹起するだけでなく、EGFR/MEK/ERK経路を活性化して腫瘍進展抑制機構を破綻させることが示された。

P1-123

累進型TBL(チーム基盤方学習)の第2学年および第4学年への導入

○葛城 啓彰¹ (1日歯大 新潟生命歯 微生物)

【目的】講義からTBLに移行するために必要な準備と計画を立案し、第2学年および第4学年の講義で累進型として実践した。【対象と方法】日歯大学新潟生命歯学部第2学年79名(感染微生物学)および第4学年84名(菌性感染症)の講義を対象とした。TBL導入に際して、学生にPreparation(2年:予習ノート作成、4年:関連論文によるレポート作成)、Pretest(学習前プレテスト:個人とグループ)、Product(グループ討論)、Peer Review(学習後の同僚評価)、Portfolio(2年は予習ノート提出、4年はポストテスト)の5Pシステムの実施を行うことを説明し、同意を得た。TBL実施に当たり学生を各学年とも6-7名ずつ12グループに分割し、2年は実習室で、4年は教室で行った。TBL終了後、授業評価学生アンケート、出欠状況、講義支援システムアクセス状況、評価について比較検討した。【結果及び考察】いずれの学年も講義よりTBLの方が出席率、授業態度は改善の傾向を示した。学生アンケートの結果から、TBLでは講義に比べ学生が発言する機会も増え、グループワークはコミュニケーション能力の向上にも役立ち楽しいと感じていた。しかし、TBLをまた行いたいと感じている学生は30%前後であり、講義に比べ負担が大きいのと感じていた。これらの結果から、TBLはプレテスト・ポストテストを基本とした講義にグループ討論での学年に応じた課題を準備すれば、機能しうるものと考えられる。