

P2-1

マウス口腔内プラーク常在菌叢の網羅的解析

○松山 順子¹、佐藤 拓一²、Quispe-Salcedo Angela³、石田 直子^{2,4}、高橋 信博²、大島 勇人³ (¹新大院医歯 小児歯、²東北大 院歯 口腔生化、³新大院医歯 硬組織形態、⁴東北大 病院 障害者歯)

【目的】 げっ歯類は口腔内疾患のモデルとして利用されることが多いが、その口腔内プラーク常在菌叢についての報告は限られている。本研究では、マウス口腔内からプラークを採取し、常在菌叢の網羅的解析を試みた。

【方法】 生後3週齢のICRマウスを用いて、深麻酔下にて上顎第一臼歯を抜去し、40 mM リン酸カリウム緩衝液 1.0 mL に浸漬、付着細菌を浮遊させた。テフロンホモジナイザーによって、分散均一化後、同緩衝液によって、10⁴まで希釈し、CDC血液寒天平板に接種した。嫌気(7日間)および好気(1日)培養後、生育したコロニーから細菌数(CFU)および細菌構成について解析した。併せて、細菌カウンタ(Panasonic社)によるデータを培養法と比較した。

【結果と考察】 マウスプラーク試料の嫌気および好気培養によるCFUは、平均(8.9±11.4)×10⁵および(8.8±14.3)×10⁵と、同程度であった。また、細菌カウンタによるCFUは、平均(8.0±7.2)×10⁵であった。嫌気培養した平板から計94株の細菌コロニーを分離し、好気培養試験を行ったところ、91%(86株)が通性嫌気性菌であった。現在、16S rRNA PCR シークエンス法による菌種同定を進めている。細菌カウンタによって、試料中の細菌数が、嫌気あるいは好気培養した場合と遜色なく、極めて迅速に得られることが判明した。成熟したマウスプラーク細菌叢の解析についても併せて報告する予定である。

P2-2

Candida albicans の鉄獲得に関与する細胞表面タンパク質コード遺伝子

○柴山 和子¹、菊池 有一郎¹、国分 栄仁¹、佐藤 裕²、石原 和幸¹ (¹東歯大 歯微生物、²東歯大 歯生化)

【目的】 細胞増殖に必須である鉄の獲得機構を含め *C. albicans* の生体内増殖機構の詳細は未だ解明されていない。*C. albicans* は血清中のトランスフェリン結合鉄の利用能を欠くが、菌糸形菌体では赤血球成分であるヘモグロビンを生体内増殖のための鉄源として利用する可能性が報告されている。*C. albicans* の細胞表面タンパク質コード遺伝子の鉄獲得機構への関与について検討を行った。【方法】 *C. albicans* 野生株 SC5314、細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株および親株を供試した。菌糸形菌体は酵母形 *C. albicans* を RPMI1640 培地中で培養することにより得た。ヒトヘモグロビンに対する *C. albicans* の親和性は、ヘモグロビンコートした試験管内壁に対する付着を観察した。*C. albicans* のヘモグロビン利用能は、鉄欠乏状態の培養系に鉄源としてヒトヘモグロビン溶液を添加し培養後、生菌数を Alamar blue を用いて測定した。【結果と考察】 野生株および親株に比べ、*C. albicans* 細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株ではヒトヘモグロビンに対する親和性の低下と、ヘモグロビン利用能の減弱が認められた。細胞表面タンパク質コード遺伝子がヒトヘモグロビンを鉄源として取り込むことが示唆された。鉄獲得機構の更なる理解のため、同遺伝子の赤血球破壊やヘモグロビン放出への関与を明らかにする必要がある。

P2-3

破骨細胞分化誘導に対するフランス海岸松抽出成分の抑制効果

○渡辺 清子¹、遠山 歳三¹、高橋 俊介²、李 昌一²、浜田 信城¹ (¹神歯大 感染制御、²神歯大 生体管理)

【目的】 ピクノジェノール® (PYG) は、フランス海岸松から抽出される植物性生理活性物質であり、抗酸化作用を始め種々の活性を有することが知られている。我々は、第52回総会において本抽出成分が *P. gingivalis* 感染により誘導されるラット歯槽骨吸収を抑制することについて報告した。本研究では、PYGの骨吸収抑制の機序について解明する目的で、破骨細胞の分化、延命に対する抑制効果について検討した。【材料および方法】 破骨細胞の分化誘導は、C57BL/6Nマウス大腿骨より採取した骨髄細胞を 1α, 25(OH)₂D₃ 存在下で破骨細胞分化支持細胞である MC3T3-G2/PA6 と共培養することにより誘導し、種々の濃度の PYG 液添加における阻害効果について検討した。また、延命抑制効果は、RANKL 存在下の成熟破骨細胞に PYG 液を添加し 48 時間後の TRAP (+) 細胞数を計測して判定した。【結果および考察】 実験には 0.025%~0.0001% (w/v) の抽出液を使用した。供試した MC3T3-G2/PA6 に対する細胞傷害性はいずれの濃度においても認められなかった。1α, 25(OH)₂D₃ で誘導される破骨細胞数は 0.0001%濃度まで有意に減少し、また、RANKL 刺激による破骨細胞の延命活性も PYG 液の添加により濃度依存的に阻害された。以上の結果から、フランス海岸松抽出物は破骨細胞の分化誘導および延命を抑制し、骨吸収を抑制する可能性が示唆された。

P2-4

ヒト胎盤栄養膜細胞における *P. gingivalis* 感染が DNA 損傷シグナルに及ぼす影響

○稲葉 裕明¹、久保庭 雅恵²、天野 敦雄² (¹阪大院歯 口腔科学フロンティアセ、²阪大院歯 予防歯科)

【目的】 近年、広汎な疫学研究から、歯周病と早産および低体重児出生との関連性が指摘されることとなった。この原因は、*P. gingivalis* が胎盤や羊水から検出されたことから、本菌による血行性経胎盤感染と考えられている。我々は以前、*P. gingivalis* が胎盤の栄養膜細胞に付着・侵入すると、G1期での細胞周期停止を誘導し、細胞増殖を妨げることを明らかにした。本研究では、ヒト胎盤栄養膜細胞に *P. gingivalis* を感染させ、DNA 損傷シグナル経路の解析を行った。【方法】 *P. gingivalis* 33277 株をヒト絨毛膜外栄養膜細胞株 (HTR-8 細胞) に感染させ、細胞周期とアポトーシスを FACS により検出した。また DNA の損傷シグナル経路は、Western blot 法により解析した。【結果】 *P. gingivalis* の感染は、DNA 損傷シグナルである ATR、Chk2 および p53 をリン酸化した。さらに G1 期の停止とアポトーシス誘導中に p53 の蓄積とアポトーシスの誘発に関連する転写因子 Ets1 の増加が認められた。【考察】 *P. gingivalis* の付着・侵入は、細胞周期 G1 期停止やアポトーシスを導く DNA 損傷シグナルの活性に関与していることが示唆された。(会員外共同研究者: Univ. of Louisville (USA) Richard J Lamont)

P2-5

Porphyromonas gingivalis による Akt/GSK3beta pathway の制御

○中山 真彰¹、井上 哲圭¹、大原 直也¹ (¹岡大 歯 口腔微生物)

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) の持続感染は、歯周組織の炎症、歯槽骨の喪失を引き起こし、口腔機能に影響を及ぼす。本研究では *Pg* の感染による宿主細胞応答、特に細胞生存・増殖、分化に重要とされる Akt を中心とした細胞機能に着目し、分子・細胞レベルから病態発症解明の分子基盤を構築することを目的とする。歯肉上皮株化細胞 Ca9-22 に *Pg* を感染させ、Akt の活性化について検討した。また *Pg* 感染による Akt を制御する上流因子および Akt の下流にある基質タンパク質 GSK3β への影響について調べた。具体的には上流因子として PDK1、PTEN および protein phosphatase (PP) の関与を、下流因子として基質タンパク質である GSK3β を解析した。その結果、*Pg* 感染は Akt のリン酸化活性を経時的に減少させた。PDK1、PTEN および PP はいずれも *Pg* 感染による Akt の脱リン酸化に関与しないことが示唆され、Akt の制御には上記以外の抑制系が働いていると考えられた。Akt の基質タンパク質 GSK3β のリン酸化は、*Pg* 感染による Akt のリン酸化減少と並行して同様に減少した。したがって、*Pg* 感染は Akt を不活性化させ、GSK3β の活性化を引き起こすと考えられた。

P2-7

Hydrophobicity and N-glycosylation patterns of *Porphyromonas gingivalis* FimA variants

○Marni Cueno¹、今井 健一¹、落合 邦康¹ (¹日大 歯 細菌)

Porphyromonas gingivalis fimbriin (FimA) mediates bacterial interaction with host tissues by mediating bacterial adhesion and colonization at targeted sites. There are six known FimA variants based on nucleotide sequences and though several extensive studies were done on FimA, to date, no structural analyses between FimA variants have been performed. Here, we predicted each FimA protein structure, variant hydrophobicity and N-glycosylation patterns. Throughout the study protein modelling was performed using the amino acid sequences of each FimA variant deposited in the NCBI database and the Phyre 2 software. Protein structural analyses were performed using the Jmol software. In each predicted protein structure, we identified the epithelial-binding region, hydrophobic segments and N-glycosylation sequons of each FimA variant. We found that the protein segment of the epithelial-binding region was similar in each variant. In contrast, we found that the hydrophobicity and N-glycosylation patterns in each variant differ. We suspect that both hydrophobicity and N-glycosylation pattern contributes to *P. gingivalis* pathogenicity.

P2-6

マウス骨髄細胞 M1 細胞のアポトーシスを *Porphyromonas gingivalis* 線毛は阻害する

○竹下 玲¹、末續 真弓¹、広瀬 公治²、安井 利一¹ (¹明海大 歯 社会健康科学、²奥羽大 歯 口腔衛生)

【目的】慢性炎症性疾患の病態局所に、多量の単球・マクロファージが浸潤した上、その細胞死（アポトーシス）が阻害されることによって、それらの細胞の居座りが示唆されている。従って、このアポトーシス抑制機構を検討することは、意義あることと思われる。*P. gingivalis* は、成人性歯周疾患の発症に密接に関係する。また、本菌線毛は、付着因子として機能し、さらに、炎症性サイトカイン誘導作用を有し、病態形成に密接に関係することが示されている。しかしながら、本菌線毛が、単球・マクロファージのアポトーシスを制御するか否かについて検討した報告は少ない。その点を検討した結果、本菌線毛が、M1 細胞のアポトーシスを強く抑制することを見出した。

【材料と方法】(1) 細胞：M1 細胞を用いた。(2) アポトーシスの判定：DNA 電気泳動法で DNA の断片化を調べた。(3) DNA 断片化率：diphenylamine assay で検討した。(4) caspase-3 の活性測定：基質ペプチド鎖で検討した。

【結果】(1) M1 細胞を血清枯濁条件下で培養するとアポトーシスが誘導されるが、*P. gingivalis* 線毛を処理すると、強く抑制された。(2) また、本菌線毛抗体は、この抑制作用を阻害した。(3) caspase-3 の活性化は、本菌線毛で抑制された。

【結論と考察】*P. gingivalis* 線毛は、M1 細胞のアポトーシスを、強く抑制した。従って、本菌線毛が、単球細胞の細胞死を抑制するにより、炎症反応の慢性化に貢献する可能性が示唆された。

P2-8

Slackia exigua を培養するための新たな液体培地の検討と *Fusobacterium nucleatum* とのバイオフィーム形成に与える影響

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

【目的】難培養性の糖非分解性嫌気性グラム陽性桿菌である *Slackia exigua* を *Fusobacterium nucleatum* と共培養するとそのバイオフィーム形成が促進されることを報告してきた。しかし、*S. exigua* 単独では液体培地での培養が困難であるため、その詳細については不明であった。今回、溶血成分を加えた液体培地を試作するとともにその培地の使用が *S. exigua* のバイオフィーム形成に与える影響について検討を加えたので報告する。【方法】羊脱線維血液と純水を 1:4 の比率で混合して血液を溶血させた後、遠心、ろ過して 20% 溶血液を得た。この溶血液 (0.1~2.0%) を添加した Tryptic soy broth, Brain Heart Infusion, GAM 液体培地で *S. exigua* を嫌気培養し、濁度を測定して増殖を評価した。また、*S. exigua* やその培養上清と *F. nucleatum* とのバイオフィーム形成に対する溶血液の添加の効果について検討した。【結果】0.1~1.0% の範囲で溶血液を添加した各培地で濃度依存的に *S. exigua* の増殖促進効果が認められた。特に GAM 液体培地でその効果が強く認められた。バイオフィーム形成実験においては溶血液の添加で *F. nucleatum* 単独でもバイオフィーム形成は増加を示したが、*S. exigua* との共培養や培養上清の添加でよりバイオフィーム形成が促進された。以上のことより、溶血液添加培地の利用が *S. exigua* などの難培養性細菌の研究に有用であることが示唆された。

P2-9

健康者の口腔と鼻腔におけるブドウ球菌種の多様性

○續橋 治¹、布施 恵¹、深津 晶¹、市村 真奈¹、
牧村 正治²、福本 雅彦¹ (¹日大 松戸歯 歯科
臨床検査医、²日大 松戸歯 歯科医学教育)

【目的】院内感染対策の一環として、病院職員の口腔および鼻腔から試料を採取し、ブドウ球菌のメチシリン耐性を含めた分布、また同一被験者のそれぞれの場所から分離された同一菌種の遺伝子型の相同性を比較することにより、ブドウ球菌の口腔と鼻腔の往來の可能性を調査した。【方法】病院職員6名の口腔および鼻腔から滅菌綿棒にて試料を採取し、マンニト食塩培地に形成されたブドウ球菌様集落を算定後、PCR法により菌種同定を行った。また分離菌株がメチシリン耐性であるかも検討した。さらに口腔、鼻腔共に同一菌種が検出された場合、AP-PCR法により遺伝子学的に共通であるか否かを調査した。【結果と考察】全ての職員の口腔と鼻腔からブドウ球菌が検出され、総菌数に対するその平均比率は、口腔が0.003%であり、鼻腔が30.7%であった。共に主要な菌種は *S. epidermidis* であった。*S. aureus* は2名の職員の鼻腔から検出されたが、それら分離菌株はMRSAではなかった。MRSA以外のメチシリン耐性株は3名の口腔と4名の鼻腔から検出され、その大半が *S. epidermidis* であった。口腔と鼻腔から分離した同一菌種は、異なる遺伝子型を示した。これらの結果から、口腔と鼻腔における主要な菌種は *S. epidermidis* であり、そのメチシリン耐性傾向が懸念され、またブドウ球菌の口腔と鼻腔の往來の可能性は低いことが示唆された。

P2-10

Tea Tree Oilの構成成分が及ぼす細菌発育ならびにバイオフィーム形成における静菌効果の比較
○藤田 真理¹、宮川 博史¹、鎌口 有秀¹、中澤 太¹ (北医大 歯 微生物)

【目的】これまで我々は、天然精油 Tea Tree Oil (TTO)の主要抗菌成分であるモノテルペンアルコールが口腔バイオフィーム内の細菌に対する優れた抗菌効果を有すること、また一方でバイオフィーム形成過程における抗菌効果が低いことを報告してきた。本研究では、TTOならびにTTOの構成成分について静菌効果ならびにバイオフィーム形成抑制能を比較検討した。【方法】供試菌株として *Streptococcus mutans* Ingbritt株を用いた。TTOならびにその構成成分は同条件で可溶化し、各種実験に用いた。培養菌体に対する抗菌効果はMIC(最少発育阻止濃度)ならびに処理後の生菌数で評価した。バイオフィーム形成過程における抗菌効果は各種構成成分存在下で形成されたバイオフィーム量を、またバイオフィーム中の細菌に対する抗菌効果は処理後の生菌数を測定することにより評価した。【結果】モノテルペンである α -terpinene、 γ -terpinene は優れた静菌効果を示し、また初期過程におけるバイオフィーム形成を抑制することが確認された。一方バイオフィーム中の細菌に対する抗菌効果は認められなかった。【結論】 α -terpinene、 γ -terpinene はモノテルペンアルコールと比較して初期過程におけるバイオフィーム形成抑制効果に優れることが確認された。以上の結果より、TTOの各種抗菌成分における口腔バイオフィームに対する作用機構の差異が示唆され、今後それらの応用によりさらなる有効活用が期待される。

P2-11

Porphyromonas gingivalis の外膜ヴェシクルは様々な抗原と病原因子を運ぶ

○中尾 龍馬¹、高柴 正悟²、古園 さおり³、渡邊 治雄^{1,4}、大西 真¹、泉福 英信¹ (国立感染研細菌1、²岡大 院医歯薬 歯周病態、³東大 生物生産工学七、⁴国立感染研)

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* が産生する外膜ヴェシクル(Outer membrane vesicle: OMV)は、マウスモデルにおいて高い免疫原性を示すことが、近年明らかとなった。本研究では、歯周病患者血清を用いて *P. gingivalis* のOMVの抗原性について調べた。まず、ATCC 33277 野生株、およびOMV産生が著しく減少した *galE* 株の全菌体を固相化したELISAにおいて、歯周病患者血清の抗 *P. gingivalis* 抗体価を調べたところ、野生株よりも *galE* 株で有意に低い値を示した。また、患者血清はOMVに強く反応することに加え、患者血清をOMVで吸収すると全菌体に対する反応性が減弱した。OMVに対する患者血清の反応性をウエスタンブロットで調べると、患者血清間で反応するバンドは様々であったが、約70および45kDaのバンドは共通して検出された。SDS-PAGEで展開されたOMVタンパクの質量分析により、*P. gingivalis* の病原因子の構成タンパクであるRgp、Kgp、FimA等がOMVの主要な構成分子であることが明らかとなった。以上、*P. gingivalis* のOMVが、歯周病の免疫学的マーカーとして診断に利用できる可能性、およびOMVが歯周病の発症や増悪の病理に直接あるいは間接的に関与する可能性が示唆された。

P2-12

Rothia 属菌の口腔内部位別の分布状況

○内堀 聡史¹、續橋 治²、後藤 治彦¹、小林 平¹、會田 雅啓¹ (¹日大 松戸歯 クラウンブリッジ補綴、²日大 松戸歯 歯科臨床検査医)

【目的】 *Rothia* 属菌は口腔常在菌であるが、近年、上気道、肺、難治性根尖生歯周炎および心内膜炎患者等より分離され日和見感染起因菌としての可能性が報告されている。ヒトの口腔から分離される *Rothia* 属菌種は *R. dentocariosa* と *R. mucilaginosa* の2菌種であり、これら2菌種を分離するための選択培地の開発については第53回歯科基礎医学会学術大会(2011年)、日本補綴歯科学会第121回学術大会(2012年)でそれぞれ報告している。そこで *Rothia* 属菌が日和見感染起因菌としての見地から、本研究ではこれらの選択培地を用いて *Rothia* 属菌の口腔内各部位における分布比率の検索を試みた。【材料と方法】 *R. dentocariosa* ならびに *R. mucilaginosa* の選択培地を用いて、パラフィン刺激唾液、歯肉溝浸出液、小窩裂溝、歯頸部、頬粘膜、舌背、義歯床粘膜面および軟化象牙質各部位の試料を採取し、*Rothia* 属菌の口腔内における分布比率を算定した。【結果と考察】 対象者におけるパラフィン刺激唾液中の *R. dentocariosa* および *R. mucilaginosa* の検出比率はBHI平板に増殖した総菌数のおよそ3%前後であり、各部位において両菌種とも検出比率に顕著な相違は認められなかった。しかし、舌背においてのみ *R. mucilaginosa* の検出比率が明らかに高かった。以上の結果より *Rothia* 属菌は口腔各部位に棲息しており、特に *R. mucilaginosa* が舌背を主要棲息部位としていることが判明した。

P2-13

FimA II 型 *P. gingivalis* (TDC60) 新規治療標的分子の探索--新規標的分子 PepD の構造および機能解析--

○柴田 恭子¹、鈴木 守²、安孫子 宜光¹ (¹日大 松戸歯 生化学・分生、²阪大 蛋白研)

P. gingivalis は、グラム陰性嫌気性桿菌であり、糖分解を行わない細菌である。従って、その増殖・エネルギー基質として、ペプチド・アミノ酸を利用することが知られており、ジペプチドをそのまま菌体内に取込むと考えられている。ペプチダーゼを含む *P. gingivalis* のタンパク質分解酵素に関する研究は、ジンジパインやコラーゲン分解を標的としたジペプチジルペプチダーゼ IV (DPPIV) について多くなされてきたが、その他のプロテアーゼ、ジペプチダーゼ、オリゴペプチダーゼについては、ほとんど報告されていない。TDC60 株での特異病原因子探索を目的として、全タンパク質二次元電気泳動による解析を行った結果、TDC60 株で、metallopeptidase M20 群に分類されるジペプチダーゼの一つである PepD (PGTDC60_1655) の発現が多かったことから、本分子の機能解明を目的として構造解析を行った。TDC60 株 PepD は、他菌種で報告されている M20 群の酵素とアミノ酸相同性は低いものの、高い構造相同性を示し、金属含有の二量体分子であることが判明した。一方、ペプチダーゼ阻害剤である Bestatin が、*P. gingivalis* の増殖抑制をすることはすでに報告されているが、*P. gingivalis* における Bestatin の標的酵素は不明であった。Bestatin が、PepD 活性を抑制したことから、PepD が、*P. gingivalis* のエネルギー獲得機構に関与する可能性が示唆された。共同研究者：藤原芳江、阪大、蛋白研

P2-14

Fusobacterium nucleatum の表層 *N*-acetylneuraminic acid と宿主に対する役割についての考察

○米田 早織¹ (¹広大 医歯薬保 細胞分子薬理)

N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) は細胞表層や血清中に見られる 9 炭糖である。近年この Neu5Ac は、歯周病原細菌にとって栄養源としてのみではなく、宿主細胞への付着及び侵入や初期免疫経路に影響を与えることが知られている。本研究で使用した歯周病原細菌 *Fusobacterium nucleatum* は、2002 年、全ゲノム配列解析により Neu5Ac トランスポーターをはじめとした関連遺伝子の存在が明らかになった。今回、我々は *F. nucleatum* 14 菌株 (臨床分離株: 11 株、実験室株: 3 株) を用いて、各株における表層 Neu5Ac 存在菌数及び明度を検討した。結果、*F. nucleatum* は臨床分離株及び実験室株間で菌数・明度に違いは見られなかったが、亜種もしくは培地の栄養状態によって両者共に違いが見られた。このことから *F. nucleatum* は Neu5Ac を介して表層形態を変化させることで周囲環境に順応している可能性が示唆された。*F. nucleatum* はその強い付着力のため口腔内バイオフィルムの中心的役割を担っているだけでなく、炎症性腸疾患や糖尿病などの全身疾患との関連性が示唆されている。*F. nucleatum* は表層の Neu5Ac を利用し宿主からの免疫応答を回避、結果として歯周病疾患のみではなく全身疾患の発症と関連しているかもしれない。

P2-15

Dental plaque biofilm 中のアミノ酸の代謝機構 - CE-TOFMS を用いたメタボロミクスの視点から -

○鷺尾 純平¹、高橋 信博¹ (¹東北大 院歯 口腔生化学)

【目的】 Dental plaque biofilm (DPB) 細菌によるアンモニア (NH₃) 産生は、ウレアーゼ活性や Arginine deiminase system に加え、アミノ酸分解活性の関与が報告されている (高橋、2003)。そこで、DPB 中のアミノ酸組成および各々からの NH₃ 産生活性について検討し報告した (IADR, 2012)。本研究では、特に NH₃ 産生の多かった Glutamine などのアミノ酸について、その代謝メカニズムをメタボロミクスの手法を用いて検討した。さらに、食事に伴って間欠的に供給される glucose が DBP のアミノ酸代謝に与える影響についても検討した。

【方法】 4 人の健康な被験者から DPB を採取した。各アミノ酸及び glucose 溶液 (50 mM) を加え 37 度で 15 分間静置した前後の代謝物量を NH₃ 測定器及び CE-TOFMS を用いたメタボローム解析で定量し、代謝機構について考察した。

【結果】 NH₃ と共に glutamine から glutamate が、glutamate から 2-oxoglutarate が、cysteine から serine が、serine から pyruvate が、aspartate から fumarate が、arginine から citrulline や ornithine が、各々特徴的に産生された。さらに glucose 添加によって NH₃ 産生量が減少した。

【結論】 DPB 内では各アミノ酸が特徴的な代謝機構によって分解・利用され NH₃ が産生されること、glucose がアミノ酸代謝を抑制することが明らかになった。本結果からアミノ酸代謝は酸の中和を通しう蝕予防に寄与する可能性が示唆された。

P2-16

A. actinomycetemcomitans LPS のヒト歯肉線維芽細胞傷害作用に対する緑茶カテキンの効果

○齋藤 真規¹、桑原 紀子¹、高田 和子¹、平澤 正知¹ (¹日大 松戸歯 口腔微生物)

【目的】 *A. actinomycetemcomitans* (*A. a*) は歯周疾患で重要な役割を演じていると考えられている。また、*A. a* 内毒素 (LPS) は前炎症性メディエーター誘導や、歯肉線維芽細胞 (HGFs) の増殖抑制作用で知られている。今回、*A. a* Y4 株から得た高濃度 LPS による HGFs 傷害作用に対する緑茶カテキンの効果について検討した。【方法】 1 % yeast extract 加 BHI で培養した *A. a* および *Escherichia coli* (*E. c*) 菌体を温フェノール水抽出後、カラムクロマトグラフィーにて精製したものを *A. a* LPS および *E. c* LPS とし、LPS の HGFs 傷害作用が濃度および時間に依存するか検討した。また *A. a* LPS 細胞傷害作用に対する緑茶カテキンの阻害効果は細胞、*A. a* LPS および各種緑茶カテキン成分の同時添加、あるいは細胞を各種緑茶カテキン成分で前処理した実験系で行った。【結果と考察】 *A. a* および *E. c* LPS の HGFs に対する細胞傷害作用は濃度および時間に依存した。また *A. a* LPS は *E. c* LPS と比較して強い細胞傷害作用を示した。各種緑茶カテキン成分の同時添加および細胞をカテキンで前処理した *A. a* LPS の細胞傷害作用の実験系において Cg および EGCg で HGFs 傷害作用が阻害された。これらの結果から *A. a* LPS は強い HGFs 傷害作用を有することが見出された。また、Cg および EGCg が細胞傷害作用を阻害したことから HGFs 表層の LPS 受容体とガラクト基を有する緑茶カテキン成分が結合することで細胞傷害を阻害する可能性が推察された。

P2-17

ゾウ口腔由来ミュータンス・レンサ球菌属菌の性状解析

○桑原 紀子¹、齋藤 真規¹、平澤 正知¹、高田 和子¹ (¹日大 松戸歯 口腔微生物)

【目的】ヒト口腔に常在するミュータンス・レンサ球菌の系統発生の研究の一環として、今回ゾウ口腔から分離したミュータンス・レンサ球菌株について性状解析を行った。

【方法】分離・純培養した菌は菌種同定するとともに、う蝕原性試験、血清学的検討を行った。また16S rRNA 遺伝子および *groEL* 遺伝子の塩基配列による系統学的検討を行った。

【結果】分離した2菌株を *eleA* および *eleC* とした。RapidID 32 STREP による菌種同定では、*eleA* は *Streptococcus mutans*、*eleC* は *Streptococcus uberis* と最も近似していた。血清学的試験では、*eleA* は既知のミュータンス・レンサ球菌に対する血清型にあてはまらなかったが、*eleC* は血清型 *d* であった。16S rRNA 遺伝子の塩基配列はともに *Streptococcus criceti* と最も高い相同性(98-99%)を示した。*groEL* 遺伝子では *eleA* と *eleC* はそれぞれ *S. mutans* および *Streptococcus ursoris* と高い相同性を示したが、DNA-DNA hybridization の結果はそれらとは別菌種であると考えられた。GC 含量は両菌種とも 35-37mol% で *S. mutans* に類似していた。シヨ糖を基質とした非水溶性グルカン合成活性は *eleA* および *eleC* とも有していたが、シヨ糖依存性の菌体固着能は見られなかった。

【結論】今回分離したゾウ口腔から分離した *eleA* および *eleC* 株は既知のものとは異なった新しい菌種であると考えられた。本研究は基盤形成支援事業(H20-24 文部科学省)の助成により行われた。

P2-18

Streptococcus anginosus の耐酸性に関わる酵素の役割

○佐々木 実¹、古玉 芳豊¹、下山 佑¹、木村 重信¹ (¹岩医大 微生物 分子微生物)

【緒言】*Streptococcus anginosus* は口腔常在菌であるが、胃癌、食道癌および口腔癌との関連性も示唆されている。特に胃は酸性環境にあることから、我々は本菌の耐酸性に関わる酵素活性について検討し、ATPase および Arginine deiminase (ADI) の両活性が *S. anginosus* の耐酸性に関与している可能性を示唆してきた。本研究では、ADI 遺伝子を単離、その欠損株を作製し、*S. anginosus* の耐酸性における ADI の役割を検討した。

【方法】*S. anginosus* NCTC 10713 株およびその ADI 欠損株 ($\Delta arcA$)、*S. mutans* ATCC 25175 株を用いた。 $\Delta arcA$ は野生株 (*S. anginosus* NCTC10713) の相同組換えによる挿入変異により作製した。耐酸性は酸性環境 (pH 4.0、1.5 h) での菌の生存率および酸性培地での増殖率から検討した。また、耐酸性酵素として ATPase 活性および ADI 活性を測定した。【結果と考察】ATPase 活性は野生株、 $\Delta arcA$ および *S. mutans* いずれの菌株でも認められた。一方、ADI 活性は野生株では認められたが $\Delta arcA$ では欠失し、*S. mutans* では認められなかった。耐酸性生存率は *S. mutans* 同様、野生株、 $\Delta arcA$ とも高い値を示し、野生株、 $\Delta arcA$ 間で有意な差は認められなかった。また、酸性環境下での増殖は野生株と $\Delta arcA$ 間に明確な差は認められなかった。以上の成績より *S. anginosus* の ADI は本菌の耐酸性に強い影響は及ぼさないことが示唆された。

P2-19

S. mutans のマルトース代謝遺伝子の解析

○佐藤 裕¹ (¹東歯大 生化)

【目的】我々は2004年の本学会において、本菌の *malR* (maltose operon transcriptional repressor) 遺伝子の機能について報告した。*malR* の114bp下流には *malQ*、*glgP* と名付けられた遺伝子が存在し、下流の *glgP* 遺伝子発現が約15倍上昇していたことから、*malR* はこのオペロンの負の調節因子であると報告した。最近我々はこのオペロンにつき更に若干の解析を行ったので報告する。【方法】*S. mutans* UA159株を用い、3つの遺伝子の失活変異株を通法により構築し、グルコースとデンプン分解産物を炭素源とした増殖を調べた。また、*malQ*、*glgP* 遺伝子をそれぞれ大腸菌にクローニングしてそれらの活性を酵素法により測定した。【結果】*S. mutans* の *glgP* 遺伝子はグリコーゲンホスホリラーゼ遺伝子として *glgP* と名付けられているが、これが実際にその活性をもっているか明らかでなかったため、大腸菌クローンでその活性を確認した。*malQ* 遺伝子は大腸菌クローンでマルターゼ活性が認められた。更に、マルトースを炭素源として培養した菌は *malR* 失活株と同程度の *glgP* 遺伝子発現が認められた。*S. mutans malQ* 変異株はマルトースやマルトデキストリンを炭素源として増殖出来なかった。【考察】*malQ*、*glgP* 遺伝子はオペロンを構成し、*malR* の失活により、或いはマルトースにより発現誘導された。又マルトース代謝において *malQ* は必須遺伝子と考えられた。

P2-20

Streptococcus criceti E49株の挿入配列 ISScrI の挿入部位の同定

○田村 晴希¹、山田 ありさ¹、加藤 裕久¹ (¹岩医大 薬理(病態制御))

【目的】*Streptococcus criceti* の挿入配列 ISScrI は付着因子をコードする antigen I/II 相同遺伝子 (*paalB*) の A 領域に挿入することを我々は以前報告した。今回 *S. criceti* E49 株の挿入部位を同定することを目的とした。

【方法】E49 株のゲノム DNA を用い、inverse PCR 法とプラスミド部分ライブラリーのスクリーニングを行った。また、*S. criceti* 4 菌株 (HS-6、HS-1、E49、OMZ61) を用い、抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) とデキストラン凝集能について評価した。

【結果および考察】E49 株において2箇所の挿入部位を同定した (AB182586、AB257318)。周辺域には *Streptococcus mutans* UA159 株での SMU.1462c、SMU.1463c 遺伝子と相同性を示す遺伝子がみられた。他方の挿入部位周辺には相同遺伝子が認められなかった。

以前、ISScrI を DNA プローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、*S. criceti* 4 菌株は同じバンドパターンを示した。そこで、今回、4 菌株の MIC とデキストラン凝集能について評価したところ、興味深いことに、OMZ61 株ではエリスロマイシン耐性を示した。また、デキストラン凝集は HS-6 株と OMZ61 株でみられ、E49 株と HS-1 株は凝集しなかった。これらの所見は菌株間で形質の差があることを示唆している。

P2-21

抗菌ジェルによる要介護者口腔微生物数のコントロール効果

○田村 宗明^{1,2}、落合 邦康^{1,2} (1)日大 歯 細菌、²日大 総歯研 生体防御)

【目的】口腔ケアは口腔環境のみならず全身の健康維持に極めて重要である。演者らは、高齢者および要介護者を中心とした口腔ケアを目的に、*in vitro*において種々の口腔病原菌に対し抗菌効果を示すが、正常細菌叢には影響を与えないカテキンジェルを開発し、報告した。今回、カテキンジェルを用いた大規模な臨床試験を行い、経時的菌数の変化について検討した。【方法】藤田保健衛生大学・七栗サナトリウム歯科にて、同意を得られた要介護高齢者55名(平均年齢69.3歳)に4週間、カテキンジェルもしくはプラセボジェルを口腔内塗布した。唾液をサンプルとして採取し、被験群の2ならびに4週間後の各菌種数の変化をReal Time PCR法で検討した。【結果と考察】*Actinomyces naeslundii*ならびに*Porphyromonas gingivalis*はカテキンジェル塗布2週後に有意な菌数の減少が認められた。また、*Candida albicans*、*Fusobacterium nucleatum*ならびに*Treponema denticola*は塗布4週後に菌数減少したが、カテキンジェル塗布による総*Streptococcus*属菌数には影響は認められなかった。これらの結果から、カテキンジェルは高齢者および要介護者の口腔細菌数のコントロールと口腔環境維持に有効であることが示唆された。(会員外協力者：株式会社明治・健康栄養ユニット・メディカル栄養事業部 高見正雄；藤田保健衛生大学・七栗サナトリウム・歯科 藤井 航、永田千里、坂口貴代美)

P2-22

PCRによる*F. nucleatum* subsp.の同定および*F. nucleatum* subsp.*polymorphum*の自己凝集を分散する*P. gingivalis*の物質について

○鎌口 有秀¹、岡本 公彰²、高田 和子³、藤田 真理¹、宮川 博史¹、中澤 太¹ (1)北医大 歯 微生物、²鶴見大 歯 口腔細菌、³日大松戸歯 感染 免疫)

【目的】これまで*F. nucleatum* (*F. n.*) subsp.*polymorphum* (*poly.*)の自己凝集が*P. gingivalis* (*P. g.*)にて分散される現象を報告してきた。今回はこの現象が他のsubsp.でも起こるかどうかが検討するため、*F. n.*の5subsp.を容易にPCRで同定することを検討した。また、*F. n.* subsp.*poly.*の自己凝集を分散する*P. g.*の成分についても検討を行った。【方法】*P. g.* ATCC 33277、KDP129 (*kgp-*)、KDP133 (*rgpA-*、*rgpB-*)、KDP136 (*rgpA-*、*rgpB-*、*kgp-*) (中山教授より分与)、*F. n.* subsp.*poly.* AK58を供試した。自己凝集は試験管に各菌液を添加し、振とう後、判定した。【結果と考察】*F. n.*の5subsp.の*rpoB*のシーケンエスを比較し、各subsp.に特異的なprimerを試作し、PCRを行った。理論値に相当する1バンドが各subsp.でみられたことより、PCRで5subsp.の同定が可能になったことが明らかになった。*P. g.* ATCC 33277、KDP129、KDP133、KDP136の培養上清は*F. n.* subsp.*poly.*の自己凝集を分散した。また、分子量10,000のフィルターによる限外ろ過により、活性は上部に残存した。以上のことより、*F. n.*のsubsp.をPCRにて容易に同定できることが明らかになった。また、*F. n.* subsp.*poly.*の自己凝集を分散させる*P. g.*が産生する物質はRgp、Kgpとは異なる、分子量10,000以上の物質であることがわかった。

P2-23

A. actinomycetemcomitans 血清g特異抗原合成遺伝子群の解析

○高田 和子¹、續橋 治²、林 一彦³、平澤 正知¹ (1)日大 松戸歯 口腔微生物、²日大 松戸歯 歯科臨床検査医、³日大松戸歯 社会歯科)

【目的】*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*は侵襲性歯周炎の起原菌と考えられている。我々は以前、歯周病部位から分離した同菌種を解析したところ、新血清型であることが判明しg型とし報告している。今回その新しい血清型g株の特異抗原合成遺伝子群の解析を行った。【方法】*A. actinomycetemcomitans* NUM-4039株(血清型g)を用いた。通法に従いDNAを調製し、既知および新たにデザインしたprimerを用い、得られたPCR産物から塩基配列を決定した。既報の配列との相溶性比較はDDBJからの検索により行った。【結果および考察】NUM-Aa 4039株の血清型g特異抗原合成遺伝子群は約21kbpの塩基数で18種のorfを含んでいた。その相溶性を既報の菌株と比較すると血清型a, b, c, d, eおよびfでそれぞれ49.9、83.0、85.0、46.9、96.0および72.0%であった。血清型eと最も近似しているため18種のorfを比較解析したところ、5'側11orfおよび3'側5orfの相溶性は核酸およびアミノ酸とも92-99%であった。その間に挟まれた可変部においては血清型gにおいて、血清型eに含まれない1500bpの挿入塩基部分が存在していた。このことは、血清型gとeの抗原決定基がそれぞれグルコースーラムノースあるいはN-アセチルグルコサミンーラムノースであるところからその差異によるのではないかと推察される。文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業(平成20年~平成24年)の助成によって行われた。

P2-24

抗真菌薬暴露後の*Candida albicans*と*Candida glabrata*の走査型電子顕微鏡観察について

○永山 知宏¹、上川 善昭²、佐藤 友昭¹ (1)鹿大院医歯 歯科薬理、²鹿大院医歯 顎顔面疾患制御)

【背景】抗真菌薬の作用メカニズムは明らかにされているが、カンジダによる形態学的変化に関する報告は少ない。今回、われわれは、抗真菌薬暴露後の*C. albicans*と*C. glabrata*の形態学的変化について検討した。【材料と方法】*C. albicans*標準株(ATCC18804) [酵母型と仮性菌糸型]と*C. glabrata*標準株(ATCC90030)の懸濁液と抗真菌薬(アムホテリシンB、ミコナゾール[AMPH-B, MCZ; 4μg/mL]、イトラコナゾール[ITCZ; 2μg/mL])をそれぞれ混和し、5分間暴露させた。ナノバコーレータ(孔径0.6μmフィルター膜)上に、その液を塗布し、滅菌水で洗浄した後、通法に従って電顕試料を作製した。低真空走査型電子顕微鏡(Miniscope TM-1000 HITATHI; SEM)を用いて形態学的変化について検討した。【結果】すべての抗真菌薬暴露後の形態は、*C. albicans*の酵母型では、表面に穴が開き、しわ状に変化しているのが認められた。仮性菌糸型では、表面が凹凸不整で、一部分が肥厚したり、細くなったりしている像が観察された。*C. glabrata*でも、*C. albicans*の酵母型と同様に形態変化している像が観察された。【結語】*C. albicans*と*C. glabrata*に対する抗真菌薬暴露の形態変化は同じであったことがわかった。

P2-25

Streptococcus mitis の choline binding protein E 欠損株の性状

○森崎 弘史¹、有本 隆文¹、片岡 嗣雄¹、谷口 誠¹、深町 はるか¹ (昭大 歯 口腔微生物)

【目的】 *mitis* 群レンサ球菌の一部などが持つ choline binding proteins (Cbp) は細胞壁の phosphorylcholine (Pc) と結合する一群のタンパク質で、様々な生理機能や病原性に関わることが知られている。我々はこれまでに *Streptococcus mitis* NCTC12261 株の Cbp の1つである CbpE が Pc esterase 活性を持つことを明らかにした。今回、CbpE が細胞壁 Pc を分解することで他の Cbp の機能調節に関わる、という予測のもと *S. mitis* の CbpE 欠損株 (Δ CbpE) を作製し、その性状を調べた。【方法】 増殖曲線は培養菌液の濁度を経時的に測定して作成した。形質転換能は pVA838 の導入による形質転換体の出現率で評価した。 β -galactosidase (β -gal) 活性は 2-Nitrophenyl- β -D-galactopyranoside を基質として測定した。【結果と考察】 野生株と Δ CbpE の増殖は静止期までは差がなかったが、静止期以降に野生株の濁度が低下するのに対し、 Δ CbpE は 2 日間培養後もほとんど変化しなかった。この結果から Δ CbpE では溶菌活性を持つ Cbp (LytC, CbpD) が正常に機能しない可能性が考えられた。これらの Cbp は形質転換の際にも機能するため、形質転換能を調べた。その結果、 Δ CbpE の形質転換率は野生株の 10.1%であった。また、*S. mitis* は β -gal 活性を持つ Cbp を保有するため、培養上清の β -gal 活性を比較したところ、 Δ CbpE の活性は野生株の 5.8%であった。以上の結果は CbpE が他の Cbp の局在や機能調節に関与する可能性を示唆した。

P2-27

マウス口腔扁平上皮癌と間葉系間質細胞の移植が腫瘍の生着と全身免疫系に及ぼす影響

○東 康加^{1,2}、神谷 真子¹、川木 晴美¹、高山 英次¹、智原 栄一²、近藤 信夫¹ (朝日大 歯 口腔生化、²朝日大 歯 麻酔)

【目的】 口腔癌の悪性化には患者の免疫応答能や癌組織を取り巻く間質細胞で構成される微小環境の関与が指摘されているが、そのメカニズムは未だ十分に理解されていない。本研究では、口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) 株と間質細胞を用いた動物実験系を樹立し、腫瘍の増殖や全身免疫能の変化を検討した。【方法】 OSCC 細胞株としては、C3H マウス由来頬粘膜扁平上皮癌 (Sq1979、理研 BRC) を用いた。脂肪組織由来幹細胞 (ASC) は同系統雄マウスより採取した。C3H/HeN マウス (雄/6 週齢) の側腹皮下に、Sq1979 (0~10⁷個/body) のみ、あるいは Sq1979 と ASC (1.5×10⁶個/body) を混合して移植し、腫瘍の生着・増大を観察した。癌移植後 59 日目に採取した脾細胞を抗 CD3 抗体を用いて試験管内で刺激培養し、48 時間後の上清中インターフェロン- γ (IFN- γ) を ELISA 法にて測定した。【結果と考察】 10⁵個の Sq1979 のみ移植マウスでは腫瘍は全例 (0/3) 生着しなかったが、10⁶個の移植マウスでは 1/3 例に生着した。一方 10⁶個の Sq1979 を ASC と共に移植すると、全例 (3/3) において腫瘍が生着した。10⁷個移植したマウスでは全例に生着した。さらに脾細胞の IFN- γ の産生能は、ASC の有無に関わらず OSCC 移植群でコントロールの非移植マウスに比べ低下していたが、この時腫瘍径の大きい個体ほど顕著に低下していた。以上の結果より、口腔癌の悪性化は宿主の免疫能の低下と相関し、間葉系間質細胞の存在により促進することが示唆された。

P2-26

S. mutans に対するハイビスカスティーの抗菌活性

○Sulistyani Herastuti¹、藤田 真理¹、眞島 いづみ¹、佐藤 寿哉¹、宮川 博史¹、鎌口 有秀¹、中澤 太¹ (北医大 歯 微生物)

Background: 72.1% of Indonesian's people had dental caries experience and 46.5% was active caries. The impact of dental caries is disfunction of the oral cavity that will affect nutritional status and quality of life. One of the prevention effort is herbal medicines because they do not give side effects and cheaper. Objective: To investigate the antibacterial activity of roselle tea against *S. mutans*. Methods: The study was experimental in the laboratory with posttest and control group design. Study I: the samples was roselle tea with concentration from 25% to 0%. The variables measured were the number of colonies of *S. mutans* on various concentrations of extract. Study II: the sample was 2% roselle tea. The variables measured were the number of colonies of *S. mutans* at various times of contact. Results: A minimum concentration of roselle tea was 1.56%. The minimum contact time was 1 min. The higher the concentration of roselle tea, the number of *S. mutans* bacterial colonies decreased. The longer the contact time of roselle tea with bacteria, the number of *S. mutans* bacterial colonies decreased. Conclusion: The conclusion was roselle tea has antibacterial activity against *S. mutans*.

P2-28

歯肉上皮癌細胞株 Ca9-22 のアポトーシス誘導における PHLDA1 の役割

○村田 貴俊¹、角田 衣理加²、今井 奨³、花田 信弘³ (鶴見大 歯 教育探索歯、²鶴見大 歯 臨床探索歯、³鶴見大 歯 探索歯)

目的: PHLDA1 (pleckstrin homology-like domain, family A, member 1) は T 細胞のアポトーシス過程で発現が上昇する遺伝子として報告されたが、PHLDA1 の関与なしでもアポトーシスが起ることが明らかにされている。このように PHLDA1 はアポトーシス発現に関与している可能性は高いが不明な点が多い。本研究は PHLDA1 とアポトーシスとの関連を調べることを目的とする。方法: PHLDA1 を比較的高発現している Ca9-22 を使用し、アポトーシス誘導と PHLDA1 との関係調べた。PHLDA1 の検出はウェスタンブロッティング法をおこなった。アポトーシス誘導はアクチノマイシン D を使用した。アポトーシスの検出は DNA ラダーまたはウェスタンブロッティング法によるカスパーゼ 3 の検出によりおこなった。RNA 干渉を応用し、PHLDA1 のノックダウンをおこなった。結果: アクチノマイシン D 添加後 8 時間以降で DNA ラダー、カスパーゼ 3 が検出された。一方、PHLDA1 はアクチノマイシン D 添加後 4 時間で一旦発現が上昇する傾向を見せたが、24 時間後には発現が極端に減少した。PHLDA1 のノックダウンによりアポトーシス誘導が促進された。考察: PHLDA1 はアポトーシス抑制に関与している可能性を示唆する。

P2-29

エストロゲン欠乏によって増悪されるシェーグレン症候群病態への Th17 細胞の関与

○新垣 理恵子¹、山田 安希子¹、工藤 保誠¹、石丸 直澄¹ (徳大 院 HBS 口腔分子病態)

【目的】自己免疫疾患発症には性差があり、シェーグレン症候群 (SS) は最も女性優位に発症する自己免疫疾患である。このような性差発現にはエストロゲンが重要な役割を担っていると考えられ、私達は SS モデルマウスにおいてエストロゲン欠乏が唾液腺組織にアポトーシスを誘導し、さらに IL-23 を多く産生する形質細胞様樹状細胞増加を誘導すること等を報告してきた (J. Exp. Med. 205:2915, 2008, Am. J. Pathol. 174:1715, 2009)。最近、自己免疫疾患病態形成に中心的な役割を担う新たな T 細胞サブセットとして注目されている Th17 細胞の分化誘導にダイオキシン受容体である aryl hydrocarbon receptor の関与が報告された。そこでエストロゲン欠乏が誘導する SS 発症時の Th17 細胞の動態を検討することを目的とした。【方法】雌優位に SS 病態を発症する NOD マウスに卵巣摘出 (Ovx) を施し、病態発症の増悪および唾液腺浸潤 T 細胞・頸部リンパ節 T 細胞サブセットを解析した。【結果と考察】NOD マウスでは Ovx により炎症性細胞浸潤が早期に出現し SS 病態は増悪された。Ovx 群の唾液腺浸潤 T 細胞は Sham 群に比較して優位に IL-17 を産生し、血清中においても高濃度の IL-17、IL-6 が認められた。IL-17 は唾液腺上皮細胞から炎症性サイトカイン産生を誘導した。これらの結果よりエストロゲン欠乏が局所での標的臓器のアポトーシスに加え、Th17 細胞シフトを誘導して SS 病態増強に関与することが示唆された。

P2-30

実験的菌周炎モデルマウスの IFN- γ と IL-10 の産生能

○竹内 浩子^{1,2}、高山 英次¹、川木 晴美¹、神谷 真子¹、久保 朱里^{1,2}、白木 雅文²、渋谷 俊昭²、近藤 信夫¹ (朝日大 歯 口腔生化、²朝日大 歯 歯周病)

【目的】歯周疾患が免疫系の関与しうる糖尿病や心疾患など全身疾患と関連することは知られているが、これら全身疾患と歯周疾患との免疫生化学的関連については十分に明らかにされていない。そこで本研究では、マウス歯周炎モデルを作成し、このマウスの全身免疫能の変化を検討した。【材料と方法】16 週齢雄マウス (C57BL/6J) 上顎臼歯部の咬合面にレジジン築盛し、同部の頰側歯肉に LPS を投与した (RL マウス)。さらに PBS 投与のみ (P マウス)、LPS 投与のみ (L マウス)、レジジン築盛+PBS 投与 (RP マウス) の各種対照群を作成した。LPS、PBS は 3 日毎に追加投与し、7 日目および 21 日目に脾細胞を抗 CD3 ϵ 抗体により刺激し、IFN- γ と IL-10 の産生量を ELISA 法により定量した。上顎骨処置部はマイクロ-CT による画像解析と H-E、TRAP 染色で組織像を検討した。【結果および考察】RL マウス脾細胞の IFN- γ 産生能と IL-10 産生能は、対照群に比べ 7 日目と 21 日目いずれにおいても有意に低く、RL マウスの Th1 スコア (IFN- γ /IL-10 比) は、7 日目に比べ 21 日目において増加していた。画像解析では 21 日目に著明な骨吸収が認められた。本実験的歯周疾患モデルマウスにおいては、口腔内に誘導された炎症が全身の免疫系バランスに影響することを示している。さらに、全身免疫能変化の機構をフローサイトメーター解析や LPS 刺激によるサイトカイン産生能解析などにより検討しているところである。

P2-31

抗原塗布後の舌下粘膜樹状細胞の動態

○張 晨陽¹、大野 建州¹、東 みゆき¹ (東医歯大 院 免疫 分子免疫)

舌下粘膜は舌下免疫療法の抗原投与部位として使用されているが、舌下粘膜樹状細胞 (DC) がどのように免疫制御に関与しているかは不明である。CD207 は、ランゲルハンス細胞 (LC) のマーカーとして報告されたが、上皮 DC の一部も CD207 を発現し、LC とは異なる役割を担っている。本研究では、舌下部への FITC ハプテンあるいは OVA タンパク抗原塗布前後の舌下粘膜における DC 動態変化を、頬粘膜塗布と比較しながら、抗 CD207 および抗 MHC class II 抗体を用いて組織学的に検討した。染色性と存在部位の違いから、DC は、CD207⁺ LC、CD207⁺ 粘膜下 (SM) DC、MHC class II⁺ CD207⁻ SMDC の 3 亜群に分類できた。舌下粘膜レジデント LC および SMDC の分布は、頬粘膜や舌背粘膜と比較し明らかに少なかった。しかしながら、FITC 塗布 6 時間後では顕著に増加していたことから、単球由来 DC が新規にリクルートしたことが示唆された。24 時間後の舌下粘膜では、DC 分布がほとんど認められなくなっていたが、頬および舌背粘膜では、まだかなりの DC が存在していた。OVA 塗布もほぼ同様の結果であったが、応答変化は遅く弱かった。本結果から、舌下への反復抗原投与は、レジデント DC を枯渇させ、新しくリクルートした単球由来の DC によって抗原特異的応答が担われる可能性が示唆された。

P2-32

CD2 架橋刺激は NK92 細胞からのグランザイム B 放出を増強する

○井上 博¹、内橋 賢二¹、西川 泰央¹ (大歯大 生理)

【目的】歯周炎などの炎症歯周組織には、リンパ球をはじめとする免疫担当細胞の浸潤が認められることにより、局所的免疫反応が歯周疾患の発症と進展の要因の一つであると考えられる。NK 細胞は活性化レセプターを介したシグナルにより細胞傷害活性を発揮する。今回、CD2 架橋刺激による NK92 細胞からのグランザイム B 放出とそのメカニズムについて検討した。【方法および結果】1) NK92 細胞表面上の CD2 発現について FACSCalibur を用いて解析した。NK92 細胞表面上には刺激が加わるのに十分な量の CD2 が存在した。2) NK92 細胞に CD2 架橋刺激を加え、24 時間培養して上清中に放出されたグランザイム B を Western blotting (WB) により検出した。NK92 細胞からのグランザイム B の放出は CD2 の濃度依存性に増強した。3) NK92 に CD2 架橋刺激を加えて WB を行い ERK1/2 のリン酸化について検討した。CD2 架橋刺激により ERK1/2 のリン酸化が増強された。4) NK 細胞に CD2 架橋刺激と MEK1/2 阻害剤 U0126 を加え、24 時間培養して上清中に放出されたグランザイム B を WB により検出した。U0126 を用いて ERK1/2 の活性化を抑制することにより NK92 細胞からのグランザイム B の放出は抑制された。また、この抑制は U0126 の濃度依存性に増強された。【考察】CD2 架橋刺激により NK92 細胞は活性化し、グランザイム B の放出が増強されることを確認した。この活性化には ERK1/2 のリン酸化が関与している可能性が示唆された。

P2-33

アミロイドーシスの診断におけるイメージング剤としてのコンゴレッドへの好中球ミエロペルオキシダーゼ系の影響

○尾西 みほ子¹、小田島 武志² (北医大 歯生化、²札幌基礎医学教育学研)

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) は好中球に存在するヘムタンパク質で、生体防御に関与する酸化還元酵素である。私共は現在迄に MPO が過酸化水素 (H_2O_2) およびハロゲンイオン、特に塩素イオンの存在下で、タンパク質、脂質、炭水化物、核酸などの生理的物質、ベンツピレン、アンチマイシン等の化学物質を酸化する事実を明らかにしている。本研究ではアミロイド症の診断に用いられるアミロイドタンパク質沈着領域イメージングの標識化合物の一種であるコンゴレッド (CR) が MPO 系の酸化作用を受け、CR の造影効果が何らかの影響を受ける可能性を調べる目的で、MPO 系と CR との反応性を検討した。CR はアミロイドの β シート構造に対して親和性の高い芳香族アゾ色素であり、pH が 3.0 から 5.2 の間で紫色から赤橙色物質に変換する。一般に β シート構造をもつタンパク質は多くの溶媒に難溶性で、好中球などによる食作用に対しても抵抗性を示す。今回、CR が MPO、 H_2O_2 および塩素イオンの存在下で、pH 5.5 付近で脱色される事実が分光光度法で観測された。反応は MPO、 H_2O_2 、塩素イオン、水素イオンの各濃度に依存し、MPO の阻害剤である NaN_3 で完全に阻害された。これらの結果から、MPO- H_2O_2 -Cl⁻系は CR を酸化し、CR のアミロイドタンパク質の造影効果に対して影響を及ぼし、また、CR がアミロイドタンパク質の β シートに結合することにより β シート自身も MPO 系の酸化反応の標的となり得る可能性が示唆された。

P2-35

遺伝子編集酵素 AID が口腔癌進展に及ぼす影響

○宮崎 裕司¹、井上 ハルミ¹、菊池 建太郎¹、草間 薫¹ (明海大 歯病理)

Activation-induced cytidine deaminase (AID) は塩基配列中のシトシンをウラシルに変換する作用を示す遺伝子編集酵素であり、多様な抗体産生および免疫グロブリンのクラススイッチに関与することが知られている。正常状態では活性化 B 細胞のみに発現しているといわれているが、慢性萎縮性胃炎からの胃癌や、慢性肝炎・肝硬変からの肝細胞癌、潰瘍性大腸炎からの大腸がんといった、慢性炎症を背景とした癌化過程における上皮性細胞にも AID が発現することが報告されている。また、p53 遺伝子の変異を誘発して発癌に関与することも言われている。癌進展の際には上皮-間葉移行 (EMT) が生じるとされており、E-cadherin の発現減弱と N-cadherin の発現亢進が指標の一つとなるが、E-cadherin の発現減弱には TGF- β およびその下流のシグナル伝達分子が関与すると考えられている。近年、Smad ファミリー分子に属する Smad2 が選択的スプライシングを受けることで DNA 結合能を変化させることが示されたが、その分子メカニズムならびに EMT との関連性は未知である。我々はこれまでに、口腔癌由来細胞株において炎症性サイトカインにより AID の発現が亢進することを明らかにしており、この発現亢進と癌進展との関連性を調べることを目的として本研究を行った。その結果、AID は Smad2 の選択的スプライシングを制御して E-cadherin の発現調節を行うことで EMT を介した癌進展に関与している可能性が示唆された。

P2-34

ニッケル刺激マウス線維芽細胞による NO 産生と IL-1 β によるその増強

○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)

これまでに我々は Ni アレルギーモデルマウスを用いた解析から、LPS などの TLR リガンドが金属アレルギー発症のアジュバントとなりうることを、そして IL-1 がその発症において重要であることを報告した。金属アレルギーは T 細胞依存性アレルギーであるが、炎症局所の非免疫細胞もアレルギー性炎症の病態発現に重要な役割を担っている。そこで本研究では、Ni²⁺ 刺激によって誘導されるマウス真皮線維芽細胞 (mouse dermal fibroblast: MDF) の炎症反応を解析すると共に、それに対する TLR リガンドおよび IL-1 の影響を解析した。MDF を Ni²⁺ 存在下で 4 日間培養したところ、Ni²⁺ 濃度に依存した有意な細胞障害性が認められた。一方、Ni²⁺ 濃度に依存した NO 産生の誘導も認められ、25 μ M 以上の Ni²⁺ 刺激により刺激 3 日目からの NO 産生が認められた。さらに、IL-1 β と Ni²⁺ で共刺激することにより NO 産生の有意な増強が認められた。これに対し高濃度 (100 ng/mL) の Pam₃CSK₄ では NO 産生の増強が認められたが、LPS との共刺激では増強は認められなかった。Ni²⁺ 刺激 MDF による NO 産生は iNOS 阻害剤存在下で有意に低下し、Ni²⁺ 単独および IL-1 β との共刺激により MDF の iNOS 発現が上昇した。また、Ni²⁺ 刺激 MDF による NO 産生は HIF 阻害剤存在下で有意に低下した。以上の結果から、1) Ni 刺激により MDF の NO 産生が誘導され IL-1 β によりその産生が増強されること、2) この NO 産生は HIF を介した iNOS 発現によることが示された。

P2-36

熱ショック蛋白質による炎症性サイトカイン産生に対するヒスタチンとその変異体の影響

○今村 泰弘¹、青木 伯永²、宮沢 裕夫³、王宝禮⁴ (松歯大 薬理、²松歯大 小児歯、³松歯大院 健康政策、⁴大歯大 教育開発)

【目的】唾液中蛋白質ヒスタチンは、歯周病・う蝕原因菌に対する抗菌作用とこれらの菌由来プロテアーゼに対する阻害作用を有する。これまでに我々は、熱ショック蛋白質 HSC70 による Toll 様受容体 (TLR) 2、4 シグナルの活性化及びヒスタチンによるこれらシグナル伝達の抑制について明らかにした。本研究では、ヒスタチン 3、4、5 及びヒスタチン 3 の変異体が HSC70 による TLR シグナル活性化において、どの様な影響を及ぼすのか検討した。【方法】ヒスタチン 3 の変異体は HSC70 への結合に重要なペプチドのアミノ酸配列から予測し、ヒスタチン 3 の 5-8、11-13 番アミノ酸を置換した M(5-8)、M(11-13) を合成した。ヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) を HSC70 のみ、HSC70 と上記各種ヒスタチンの混合物でそれぞれ刺激した。24 時間後、培養液を回収し、IL-6 及び IL-8 の産生量を ELISA にて解析した。【結果】HSC70 による HGFs の IL-6、IL-8 産生は、ヒスタチン 3、5 により抑制され、その効果はヒスタチン 3 が有意であった。また、ヒスタチン 4、M(5-8)、M(11-13) は、これらサイトカインの産生を抑制しなかった。【考察】HSC70 は TLR2、4 を介したシグナル伝達により NF- κ B を活性化し、炎症性サイトカイン産生へと導く。ヒスタチン 3 は HSC70 と結合し、これらのシグナル伝達を抑制する働きがある。従って、ヒスタチンは口腔内損傷によって細胞から放出された HSC70 の炎症作用を抑制する自然免疫関連因子であると考えられる。

P2-37

オゾンジェルの歯周病関連細菌への影響
 ○王 宝禮¹、今村 泰弘² (大歯大 歯科医学教育、²松歯大 歯科薬理)

【目的】オゾンは天然に存在し、かつ分解後酸素に戻るという環境に優しい酸化剤である。オゾン水は手指消毒を始め、眼科での目の消毒、新生児の臍部洗浄等に利用されているが、半減期が30分程度と早い。オゾンジェルは、グリセリンにオゾンを溶解させることにより、長時間オゾンを保存可能であり、一切オゾンガスの気散がない。本研究では、オゾンジェルの歯周病関連細菌への殺菌効果を検討した。【材料および方法】Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia, Fusobacterium nucleatum, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Eikenella corrodens を供試菌株とし、オゾンジェル 1000ppm 並びにオゾンクリーム 1000ppm (オゾンジェルと PEG400, PEG4000 の混合物) を 1g 測り、調製した菌液を 1mL 滴下した。72 時間培養後、寒天培地上のコロニー数をカウントし、殺菌性の有無を確認した。【結果と考察】嫌気性菌に対して、滅菌生理食塩液並びにグリセリンは殺菌効果を示さなかったのに対し、オゾンジェル並びにオゾンクリームは A a 菌、E c 菌を除いて強い殺菌効果を示した。これら 2 つの菌株については、いずれもグラム陽性桿菌であり、効果の得られたグラム陰性桿菌群との細胞壁構造の違いが効果の差につながったものと考えられる。今後は臨床応用に向けて剤型や至適濃度の検討を行う。

P2-38

麻酔薬ユーキノールによる TRPV1 チャネル活性の抑制作用
 ○吉田 卓史¹、高橋 かつお²、若森 実¹ (東北大 院歯 歯科薬理、²東北大 歯)

Eugenol has been used in dental practice to relieve pain. The agent is partly similar in chemical structure to capsaicin which selectively activates sensory neurons *via* a specific receptor TRPV1. It has been reported that eugenol activates TRPV1 channel in a heterologous expression system and rat trigeminal ganglion (TG) neurons. On the other hand, it has also been reported that eugenol exerts their antinociceptive effects *via* the TRPV1 located on sensory terminals in the spinal cord. To elucidate the molecular mechanisms underlying pharmacological actions of eugenol on TRPV1 channel, we investigated the channel properties of TRPV1 using mouse TRPV1 expressing HEK293 cells and mouse TG neurons. Eugenol inhibited the capsaicin-induced inward currents in a concentration-dependent manner. Moreover, eugenol (1 mM) caused small inward current in TG neurons. These results indicate that eugenol is a partial-agonist of TRPV1, and competes with capsaicin at the binding site in TRPV1. The inhibitory effect of eugenol (1 mM) was larger in the case of inward current (ca. 45%) than that of outward current (ca. 20%), suggesting the additional effect of eugenol on the moiety of the channel pore.

P2-39

フェノール類による CRAC チャネルの遮断
 ○鈴木 崇弘^{1,2}、坪井 明人²、吉田 卓史¹、若森 実¹ (東北大 院歯 歯科薬理、²東北大 院歯 加齢歯科)

【目的】細胞応答におけるセカンドメッセンジャーとして、Ca²⁺ は極めて重要な役割を果たしている。興奮性細胞では Ca²⁺ 透過型リガンド作動性チャネルや電位依存型 Ca²⁺ チャネルが細胞内に Ca²⁺ を流入させるが、非興奮性細胞では受容体活性化チャネル (receptor activated Ca²⁺ channel: RACC) が Ca²⁺ 流入経路となる。RACC に含まれる Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) チャネルは、小胞体の Ca²⁺ 枯渇により活性化されるストア作動型 Ca²⁺ チャネルの一つであり、Ca²⁺ 選択性が極めて高い。本研究では、電位依存性 Na⁺ チャネルや Ca²⁺ チャネルを遮断することが知られているユーキノールとその構造類似化合物の CRAC チャネルブロッカーとしての有効性をラット好塩基球白血球 (RBL) 細胞を用いて検討した。【方法】10mM の Ca²⁺ を含む細胞外液中で、10μM の IP₃ を含む電極内液を用いて CRAC チャネルを活性化させ、パッチクランプ法で記録した。各種薬物は Y-tube 法にて投与した。【結果と考察】膜電流は内向き整流性を示し、逆転電位は 50mV より脱分極側にあった。過分極側ではカプサイシン>イソイゲノール、オイゲノール>バニリン、グアヤコールの順に CRAC チャネルを遮断し、フェノール、ジンゲロン、2メチレン-4メチルフェノールは無効だった。以上より、フェノール誘導体の中には CRAC チャネル電流を遮断する物があることが明らかになった。

P2-40

成長因子受容体キナーゼ阻害剤による非外科的顎嚢胞治療法開発のための基礎的研究
 ○山口 洋子¹、津田 啓方^{1,3}、大木 秀郎^{2,4}、大塚 吉兵衛^{1,3}、鈴木 直人^{1,3} (日大 歯 生化、²日大 歯 口外 1、³日大 歯 総歯研 機能形態、⁴日大 歯 総歯研 生体防御)

歯科口腔外科領域で遭遇する顎嚢胞には、主に歯根嚢胞および角化嚢胞性歯原性腫瘍がある。これらの嚢胞が拡大した場合、外科的に切除する治療法が選択され、生体への侵襲が大きい。そこで、新たな顎嚢胞の治療方法を模索してきた。すなわち、両嚢胞壁の主要な構成細胞である線維芽細胞の細胞死を成長因子受容体キナーゼ阻害剤で誘導できれば非外科的治療法の開発が可能になると考えた。コンフルエントに達した歯根嚢胞由来線維芽細胞および角化嚢胞性歯原性腫瘍由来線維芽細胞様細胞を用い、各種成長因子受容体キナーゼ阻害剤の効果を調べた。その結果、単独の阻害剤では、FGFR 阻害剤 (PD166866) と PDGFR 阻害剤 (Glivec) が細胞死を誘導した。また、デュアル/トリプルキナーゼ阻害剤である FGFR/VEGFR 阻害剤 (PD173074) および EGFR/PDGFR/VEGFR 阻害剤 (PD089828) では、PD089828 で細胞死の誘導効果が高く、いずれも単独阻害剤の効果を上回っていた。PD173074 および PD089828 の効果を、歯肉上皮細胞を用いて調べたところ、PD089828 で上皮細胞の細胞死誘導効果が高かった。以上のことから、成長因子受容体キナーゼ阻害剤を組み合わせることで嚢胞内に直接局所投与し、嚢胞壁の線維芽細胞や裏装上皮の細胞死を誘導することで、嚢胞の発生やその拡大予防が可能になり、非外科的な顎嚢胞の治療法が開発できると考えている。

P2-41

fMLPで誘導されるラット好中球の細胞遊走におよぼす局所麻酔薬の影響

○家始 聡介¹、東 幸雄²、智原 栄一¹、柏俣 正典² (¹朝日大 歯 麻酔、²朝日大 歯 歯科薬理)

【目的】局所麻酔薬はNaチャネルの阻害を介して末梢神経系の刺激伝導を可逆的に阻害する局所麻酔作用および心筋細胞に対する抗不整脈作用以外に、抗炎症作用のあることが報告されているが、その機序は明らかにされていない。本研究で、炎症性細胞である好中球の遊走発現におよぼす局所麻酔薬の影響について検討を行った。【方法】カゼインで誘導したラット好中球をfMLPで刺激して遊走を惹起させた。遊走能はリアルタイムに観察しながら、定量的に遊走速度および極性形成を測定可能なEZ-Taxiscanを用いて検討した。各種シグナルタンパク質の活性化状態は、特異抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。【結果および考察】局所麻酔薬(lidocaine、procaine)はfMLPで誘導されるラット好中球の細胞遊走における遊走速度を濃度依存的に抑制したが極性形成には影響を与えなかった。また、局所麻酔薬はfMLPで誘導されるミオシンIIの活性化を阻害したが、Phosphatidylinositol 3-kinaseおよびp38MAPKの活性化には影響しなかった。好中球のミオシンII活性化には、Ca-カルモジュリン依存性のMLCKおよびRhoキナーゼが関与することが知られている。しかしRhoキナーゼは極性形成にも関与することから、局所麻酔薬の好中球遊走能抑制作用はCaシグナル伝達系を介していることが示唆された。

P2-42

エチドロネートによる骨型アルカリ性ホスファターゼ活性の可逆的な非拮抗阻害

○鈴木 邦明¹、菊地 均¹、吉村 善隆¹、出山 義昭¹ (¹北大 院歯 口腔病態 細胞分子薬理)

【目的】骨型のアルカリ性ホスファターゼ(ALP)活性に対するビスホスホネートであるetidronateの活性阻害様式を調べた。【材料と方法】骨芽細胞株MC3T3-E1細胞のマイクロソームを使用し、基質としてパラニトロフェニルリン酸(pNPP)を用いてpH 10.35で反応を行なった。pNPPの分解により生じたリンをChifflet法で定量して、活性を求めた。【結果と考察】ALPによるetidronateの分解は観察されなかった。ALP活性はetidronateの濃度に依存して阻害され50%阻害濃度は約1.2mMであった。種々濃度のetidronate存在下でALP活性のpNPP濃度依存性を測定すると、最大活性はetidronateの濃度に依存して減少した。Hill plotによりpNPPによる50%活性化濃度を計算すると、etidronateの濃度に関わらず0.34から0.52mMの範囲でほぼ一定でありetidronateはALP活性を非拮抗的に阻害することを示唆した。次にALP活性がほぼ完全に阻害される濃度でetidronateとインキュベートした後に、希釈してetidronateの濃度を下げて活性を測定したところ、希釈の倍率に依存して活性が回復したことから、etidronateによるALP活性の阻害は可逆的であると考えられた。【結論】EtidronateはALP活性を非拮抗的に阻害し、その阻害は可逆的である。

P2-43

立効散の鎮痛効果の検討

○堀江 憲夫^{1,4}、安達 一典²、長尾 隆英²、松田 友彦²、加藤 崇雄¹、日野 峻輔¹、下山 哲夫¹、金子 忠良^{3,4}、草間 薫¹、坂上 宏² (¹埼玉大 総 医セ・歯口外、²明海大 歯 薬理、³日大 歯 口 外2、⁴明海大 歯 病理)

【目的】甘草、細辛、竜胆、防風、升麻からなる立効散は、歯痛などに対し鎮痛・抗炎症効果を有するが、その作用発現機構および鎮痛効果の発現と薬物動態の関連性は明らかでない。今回立効散の鎮痛効果と体内動態の関連性を、マウスの仮性疼痛反応観察とHPLC解析により検討した。【方法】立効散(200、400、600mg/kg)を蒸留水に溶解しマウスに投与(0.1ml/10g,p.o.)し、20-90分後に0.6%酢酸を投与(0.1ml/10g,i.p.)しWrithing syndromeの発現を他の行動指標と併せて45分間測定した。同様に立効散の成分生薬(立効散400mg/kg相当量)の鎮痛効果も検討した。薬物動態測定のために、立効散(400mg/kg,p.o.)を投与されたマウスに全身麻酔(ペントバルビタール50mg/kg,i.p.)を施し10-90分後に採血(1ml)を行った。血中の生薬成分は除タンパク後、HPLCにて解析した(254、280nm)。【結果と考察】立効散の各生薬成分の血中濃度は投与10分後から速やかに上昇し、20-30分後ピークに達し、その後減少し、90分後には検出限界以下になった。鎮痛効果も投与20分後から用量依存的に有意(P<0.05)に観察され、更に前処置時間の延長(90分)は、有意に(P<0.05)鎮痛効果を増強した。以上の結果は、立効散の鎮痛効果の発現に代謝産物が関与することを示唆する。

P2-44

ラッパウニの又棘毒に由来する新規マイトジェンの探索

○篠原 光子¹、中川 秀幸²、西五辻 理江³、大浦 清¹ (¹大歯大 薬理、²徳大院 環境共生、³大歯大 院 薬理)

【目的】ラッパウニは殻径が約10cmの大型種で、体表が有毒な又棘で覆われている。又棘に刺されると、発赤や腫れなどが生じる。今回はラッパウニの又棘毒から新規なマイトジェンの探索を試みた。【方法】徳島産ラッパウニ(24個体)から大型又棘を採取し生理食塩水で抽出を行い、又棘標品とした。又棘標品の分画・精製はSuperdex 200カラムとImmobilized D-galactose(IDG:固定化D-ガラクトース)カラムを用いた。各画分の生物活性はウサギ赤血球の凝集活性、モルモット好中球の遊走活性及びマウス脾臓細胞におけるマイトジェン活性を指標として測定した。【結果】又棘標品をSuperdex 200カラムにより分画し、回収画分をP-I、P-II、P-III及びP-IV画分とした。そこで赤血球凝集活性を示し、最も回収率が高かったP-IV画分をIDGカラムにより分画・精製を行い、非吸着画分をIDG-I画分、吸着画分をIDG-II画分として回収した。SDS-PAGEでは、IDG-I画分は28kDa、IDG-II画分は32kDaの位置にほぼ単一のタンパク質バンドを呈した。IDG-I画分は赤血球凝集活性を示さなかったが、IDG-II画分は低濃度より凝集活性を示した。IDG-I及びIDG-II画分は共に遊走活性ならびにマイトジェン活性を示した。以上の結果から、ラッパウニの又棘毒には28kDaの新規マイトジェン様タンパク質が含まれることが分かった。

P2-45

クマ笹抽出液 (ササヘルス、SE)の紫外線防御および抗酸化成分の構造解析

○松田 友彦¹、坂上 宏^{1,2}、北嶋 まどか³、大泉 浩史³、大泉 高明³ (1明海大 歯 MPL、²明海大 歯 薬理、³大和生物研)

【目的】クマ笹抽出液であるササヘルス(SE)の薬理作用として、我々はこれまでに細胞に対する紫外線防御作用、抗酸化活性、抗炎症作用、抗菌作用などを報告した。しかし、これらの薬理作用を示す活性成分については、不明である。そこで今回、細胞に対する紫外線防御作用と抗酸化活性の2つの薬理作用に着目し、活性成分の精製と活性評価を検討した。【方法】SEの凍結乾燥粉末(2.3g)をエタノールで抽出し、逆相カラムおよびHPLCにて精製を行い、化合物1(4.9mg)を得た。この化合物1について、¹H-および¹³C-NMRによる構造解析を行った。また、この化合物のHSC-2細胞に対する紫外線防御作用およびDPPHラジカルを用いた抗酸化活性を測定した。【結果と考察】波長280nmの検出において、SEの主要成分が紫外線防御作用および抗酸化活性を示すことが確認された。この成分は¹H-NMRより、1,4-置換ベンゼンのシグナルと*trans*のオレフィンのシグナルが確認され、*trans-p*-クマル酸に類似している構造であることが推察された。化合物1の細胞に対する紫外線防御作用は、SEと比較しEC₅₀の値が約4倍強いが、抗酸化活性については、SEと比較し約1.5倍弱かった。化合物1の薬理作用として細胞に対する紫外線防御作用を明らかにし、SEの強い抗酸化活性に化合物1が寄与することが示唆された。

P2-47

漢方薬、漢方成分及びグリチルリチンの紫外線に対する細胞保護作用

○加藤 崇雄¹、日野 峻輔¹、堀江 憲夫^{1,2}、松田 友彦³、梅村 直己⁵、金子 忠良⁴、下山 哲夫¹、坂上 宏^{3,5} (1埼医大 総セ 歯口外、²明海大 歯 病理、³明海大 歯 MPL、⁴日大 歯 口外2、⁵明海大 歯 薬理)

【目的】漢方薬は様々な口腔疾患の治療に使用されている。我々は、前大会で漢方薬及び漢方成分の紫外線の細胞に対する保護効果(抗UV活性)を報告した。今回、漢方成分のグリチルリチン含有量と抗UV活性との間の相関関係について検討した。【方法】ヒト口腔扁平上皮癌細胞HSC-2を96穴マイクロプレートに播種後、DMEM培地中で48時間培養し、プレートに附着させた。種々の濃度の試料を含むリン酸緩衝液100μlに置換後、20.5cm離れた距離で1分間UV照射(波長:253.7nm)した。新鮮な培地に置換し、48時間培養後、MTT法により相対的生細胞数を測定した。濃度依存性曲線から、50%細胞傷害濃度(CC50)およびUV照射細胞の生存率を50%まで上昇させる濃度(EC50)を求めた。有効係数(SI)は、次式で求めた。SI=CC50/EC50。抗UV活性を示す成分は、HPLCにより分画を行った。アポトーシス誘導活性は、ウエスタンブロッティング法を用いたPARPの切断活性(カスパーゼの活性化)を指標に測定した。【結果・考察】グリチルリチンの含有量と抗UV活性との間には相関関係は認められなかった。竜胆の主成分であるQR-4(仮称)に強い抗UV活性が認められたが、約35種の漢方薬及び漢方成分の抗UV活性は低かった。甘草は、UV照射誘発性のアポトーシスを僅かに抑制した。

P2-46

Cafestolの破骨細胞形成と骨吸収活性への影響

○福岡 裕¹、坂井 詠子¹、菅原 めぐみ^{1,2}、西下一久¹、岡元 邦彰¹、筑波 隆幸¹ (1長大 院医歯薬 口腔病態薬理、²長大 院医歯薬 歯科矯正)

【目的】コーヒーの中に含まれるCafestol(カフェストール)は、ポリフェノールの一種であり、抗癌作用や抗炎症作用および解毒酵素を活性化作用を有することが知られている。しかし、骨代謝における影響、特に破骨細胞に対する効果は明らかになっていない。今回、我々は、カフェストールの破骨細胞形成と骨吸収活性への影響を調べた。【方法】マウスマクロファージ細胞株RAW-DをRANKL刺激により破骨細胞へ誘導する系と、マウス骨髄細胞をM-CSFとRANKLで刺激する系を用い、TRAP染色により多核破骨細胞の形成を評価した。また、ウエスタンブロッティング法を用いて、タンパク質の発現の程度を比較し、骨吸収活性の評価は、Osteo Assay Surfaceを用いて行った。【結果】RAW-Dとマウス骨髄細胞のいずれの細胞においてもカフェストールの濃度依存的な破骨細胞形成の抑制が認められた。NFATc1のタンパク発現抑制がカフェストールの濃度に依存して認められ、カテプシンKのタンパク発現は、25μMカフェストールの濃度においてのみ抑制された。Osteo Assay Surface上に形成された吸収面積を比較したところ、カフェストールを添加したグループでは、骨吸収の抑制が有意に認められた。【考察】カフェストールは、NFATc1の発現を抑制することから、このNFATc1によって転写制御を受けているカテプシンKの発現が抑えられ、破骨細胞形成及び骨吸収活性が阻害されたと考えられる。

P2-48

Fisetinの破骨細胞形成と骨吸収活性への影響

○坂井 詠子¹、菅原 めぐみ^{1,2}、福岡 裕¹、西下一久¹、岡元 邦彰¹、筑波 隆幸¹ (1長大 院医歯薬 口腔病態薬理、²長大 院医歯薬 歯科矯正)

【目的】イチゴ由来ポリフェノールであるFisetinは、抗炎症作用および抗酸化作用を有することが知られている。炎症性サイトカインや酸化ストレスは破骨細胞分化を促進することから、Fisetinによる破骨細胞形成と骨吸収活性への影響を調べた。【方法】マクロファージ系細胞株RAW-DをRANKL刺激により破骨細胞へ誘導する系と、マウス骨髄細胞をM-CSFとRANKLで刺激する系を用い、TRAP染色により多核破骨細胞の形成を評価した。またウエスタンブロッティングを行い、破骨細胞のマーカータンパクの発現とRANKL刺激後のシグナルの活性化を比較した。骨吸収活性の評価は、Osteo Assay Surfaceを用いて行った。第2相抗酸化酵素群の発現をリアルタイムPCRで確認した。【結果】Fisetinの濃度依存的な破骨細胞形成の抑制と骨吸収の抑制が認められた。FisetinはRANKL刺激後のErkとAktのリン酸化を阻害し、NFATc1、カテプシンK、Srcのタンパク発現を濃度依存的に抑制した。さらにFisetinは転写因子Nrf2の核移行を促進し、Hemeoxygenase-1やNAD(P)H:quinone oxidoreductase-1などの第2相抗酸化酵素群の発現を上昇した。【考察】Fisetinは、NFATc1の発現を抑制することから、このNFATc1によって転写制御を受けているSrcやカテプシンKの発現を抑え、破骨細胞形成及び骨吸収活性を阻害したものと考えられる。さらに第2相抗酸化酵素群の発現を促進したことから、酸化ストレスを減少させたと考えられる。

P2-49

クマ笹抽出液 (ササヘルス) の口腔疾患治療効果の可能性

○坂上 宏¹、松田 友彦²、友村 美根子^{2,3}、友村 明人³、田中 庄二⁴、町野 守⁴、安井 利一⁵、北嶋 まどか⁶、大泉 浩史⁶、大泉 高明⁶ (1明海大 歯 薬理、2明海大 歯 MPL、3明海大 歯 生化、4明海大 歯 口診、5明海大 歯 口衛、6大和生物研)

【目的】クマ笹抽出液 (ササヘルス、SE) は、OTC で入手可能な第三類医薬品に属し、口内炎に対する効能が知られている。OTC 薬の効能のエビデンスを得ることは重要な検討課題である。我々は、SE が抗炎症作用、抗菌作用のみならず、リグニン配糖体の特微的な薬理作用 (卓越した抗ウイルス作用、紫外線に対する細胞保護作用、ビタミン C との相乗作用) を示すことを報告した。今回、口腔疾患に対する治療効果を評価するために、SE の口腔扁平苔癬様異形成症患者に対する治療効果、そしてマウス破骨細胞成熟分化に及ぼす効果について検討した。【方法】学内倫理委員会の規定に従い、患者の同意を得て、SE の 50%希釈液 (13.3 ml) を患者に 1 日 3 回、毎食時に経口投与した。12 か月間、定期的に口内写真撮影、唾液中の IL-6、IL-8 の定量を行った。マウス骨髄細胞の M-CSF と RANKL 刺激による破骨細胞への成熟分化の程度を、TRAP 染色により測定した。【結果と考察】SE の連続投与により口腔粘膜のレース状白斑の縮小、IL-6 と比較し IL-8 のより顕著な唾液中濃度の低下が観察された。SE は破骨細胞成熟分化を抑制した。SE の口腔疾患に対する適応の可能性が示唆された。

P2-50

リグニン配糖体によるアンチエイジング効果の探索: 紫外線防護効果

○南部 俊之¹、嶋田 淳¹、坂上 宏² (1明海大 歯 口外 I、2明海大 歯 薬理)

【目的】リグニン配糖体は、そのポリフェニルプロペノイド部分が卓越した抗ウイルス活性を、その配糖体部分が免疫増強活性を示す。紫外線 (UV) は、ヒドロラジカルを生成し、老化マーカーである 8-オキソグアニンを生成し、突然変異を誘発することが知られている。今回、UV に対するリグニン配糖体の細胞保護効果を、種々の抗酸化剤や多糖体と比較検討した。【方法】ヒト口腔扁平上皮癌細胞を 96 穴プレートに附着させ、培養液を除去後、サンプルを含むリン酸緩衝液 (PBS) 中で、20.5 cm 離れた距離から UV (波長 253.7 nm) を 1 分間照射した。新鮮培地に置換し、48 時間培養後、MTT 法により相対的生細胞数を測定した。濃度依存性曲線から、50%細胞傷害濃度 (CC₅₀) および UV 照射下で生存率を 50% まで上昇させる濃度 (EC₅₀) を求めた。有効係数 (SI) は、次式で求めた。SI = CC₅₀/EC₅₀。【結果・考察】五葉松、赤松、黒松、タエダ松、エリオッティー松、五葉松の実の殻由来のリグニン配糖体の抗 UV 活性 (TS = 7-38) は、ビタミンやバニリン (TS = 63-64) には及ばなかったが、タンパク質結合多糖 (PSK)、硫酸多糖、AEC 化多糖 (TS = 8)、没食子酸 (TS = 5)、EGCG (TS = 3)、茶抽出物やベットボル類 (TS = 1-3) よりも高い値を示した。リグニン配糖体のアンチエイジング効果の可能性が示唆された。

P2-51

キトサンオリゴ糖の鎮痛作用 (第 2 報)

○寺澤 理恵¹、小磯 和夫¹、米原 典史¹ (1奥羽大 歯 口腔病態解析制御)

【目的】天然多糖であるキチン・キトサンは創傷治癒促進作用や抗腫瘍作用など様々な薬理作用を有する。今回我々は、高分子多糖であるキトサンを加水分解し、水溶性としたキトサンオリゴ糖 (CHS-oli) を用いて鎮痛作用を検討した。【方法】実験には ICR 雄性マウスを用い、酢酸ライジング法とホットプレート法の 2 種類の鎮痛試験を行った。酢酸ライジング法ではマウスの腹腔内に酢酸を投与した後、5 分間ごとに 30 分までライジング反応の回数を測定した。ホットプレート法では 53°C のプレートからの逃避時間を測定した。逃避時間は薬物投与直後から 15 分間隔で 120 分間測定した。薬物は腹腔内投与 (i.p.) および経口投与 (p.o.) を行った。【結果と考察】酢酸ライジング法: CHS-oli (500 mg/kg) の i.p. はライジング反応を有意に抑制した。CHS-oli の p.o. (500 mg/kg-10g/kg) は用量依存的に抑制した。これらの効果はアスピリン (250 mg/kg) の効果と同程度だった。ホットプレート法: CHS-oli (500 mg/kg) の i.p. は熱刺激に対する逃避時間を延長した。p.o. では逃避時間の延長はみられなかった。アスピリン (250 mg/kg) の i.p. は逃避時間を延長したが、p.o. では逃避時間の延長はみられなかった。試験法の違いによって鎮痛効果に差異がみられたが、CHS-oli とアスピリンは類似した結果を示した。CHS-oli は生体に対して毒性が低く、安全性が高いことが知られており、アスピリンよりも優れた鎮痛薬になりうる可能性がある。

P2-52

P2X レセプターの活性化はマウス睪島からのインスリン分泌を刺激する

○大谷 政博¹、大浦 清¹ (1大歯大 薬理)

我々は新規の糖尿病治療薬の開発を目指して、イオンチャネル型のプリン作動性レセプター (P2X) に着目して本研究を行った。最初にマウスの睪島における P2X₁ サブタイプの発現を、RT-PCR、蛍光免疫染色及びウェスタンブロット法で確かめた。次に、P2X レセプターの内因性アゴニストである ATP が、高濃度グルコース存在下でインスリン分泌を促進することを明らかにした。この ATP の効果は、P2X レセプターに高親和性のアンタゴニストである PPADS によって阻害された。また、合成 ATP アナログである ATP_γS も同様の刺激効果を示した。P2X₁ レセプターに選択的な阻害剤が開発されていないので、次にこのレセプターの potentiator として知られていた ivermectin (イベルメクチン) の作用を調べた。その結果、イベルメクチン共存下で ATP の効果が増強されただけではなく、イベルメクチン自身が刺激効果を示すことが明らかとなった。以上のデータから、ATP によるインスリン分泌促進作用に P2X₁ レセプターが関与していると推測された。さらにイベルメクチンが濃度依存的にインスリン分泌を促進することを確かめた。以上の結果から、P2X レセプターの活性化がマウス睪島からのインスリン分泌を刺激することが示唆され、新規のインスリン分泌促進薬開発のための標的となりえる可能性が考えられた。

P2-53

ヒト口腔癌細胞に傷害活性を有する新規イソキノリン誘導体類のデザイン

○石原 真理子¹、山内 雅司² (明海大 歯 口腔生物再生医工学 基礎化、²明海大 歯 社会健康科学 医療情報科学)

【目的】前回、イソキノリン類(TQ)の構造とヒト口腔扁平上皮癌細胞および白血病細胞の細胞傷害活性に有意な相関関係があることから、ヒト口腔癌細胞により高い活性を持つ新規イソキノリン化合物の分子設計に関して発表した。今回、更に新たな知見を得たので報告する。【方法】分子記述子は CONFLEX で最安定配座を決定後、MOPAC/ PM5 法で計算した。新規化合物の分子設計は ACD/Structure Design Suite ソフトを用いた。【結果と考察】ACD/Structure Design Suite を用いてイソキノリン骨格の2位に付いた置換基変換により想定された対象化合物は3984種類にのぼった。そこで実験結果から、TQ化合物のオクタノーラー水分配係数(Log P)は2.2付近に活性があったので、Log P値2.0~2.3が予想される化合物に絞り込み(313種類)、更に合成のし易さを考慮して40種類の化合物を得た。これらの化合物の分子記述子(生成熱、水和の安定性、HOMOエネルギー、LUMOエネルギー、絶対ハードネス、絶対電気陰性度、反応指数、分子の表面積、体積等)から細胞傷害活性が期待される新規化合物の検索を行っている。

P2-54

ラット顎下腺腺房細胞において副交感神経作動薬で誘導されるCl⁻分泌への交感神経β₁作動薬とβ₂作動薬の影響

○廣野 力¹、杉田 誠¹、柴 芳樹¹ (广大 院医歯薬保 口腔生理)

【目的】副交感神経作動薬により誘導されるラット顎下腺腺房細胞からのCl⁻分泌にβ₁作動薬およびβ₂作動薬が及ぼす影響の差異を明らかにする。【方法】コラゲナーゼ処理で分散させたラット顎下腺腺房細胞からのCl⁻放出をイオンチャンネル活性がわかるホールセルパッチクランプ法とイオンチャンネルと輸送体の両方の活性を反映したCl⁻分泌がわかるグラミシジン穿孔パッチ法でイオン電流として測定した。分離腺房細胞にFura2-AMを負荷しARGUS-HISCAシステムで細胞内Ca²⁺濃度を蛍光強度比(F340/F380)でモニターした。【結果】副交感神経作動薬カルバコール(CCh)刺激で誘導される振動性のCl⁻電流はホールセルパッチクランプ法でもグラミシジン穿孔パッチ法でもβ₁作動薬のドブタミンで抑制されたが、β₂作動薬のテルブタリンでは抑制されなかった。CChで誘導される細胞内Ca²⁺濃度上昇はドブタミンでもテルブタリンでも増強された。Ca²⁺濃度上昇はフォルスコリン+IBMXでも増強され、さらにドブタミンやテルブタリンを添加してもそれ以上変化しなかった。【考察】β₁受容体活性化とβ₂受容体活性化は、CChで誘導される腺房細胞内のCa²⁺濃度上昇には、cAMP産生を介して増強する共通な反応を生じるが、下流にあるイオンチャンネルや輸送体の活性に対しては異なる反応経路を有することが示唆される。

P2-55

IP₃R分子内におけるIRAG結合領域

○増田 渉¹、福島 秀文¹、自見 英治郎¹ (九歯大 生命科学 分子情報生)

細胞外からの刺激に対する細胞内Ca²⁺濃度の上昇は、唾液分泌や破骨細胞分化などの様々な事象に重要な因子である。イノシトール1,4,5-三リン酸受容体(IP₃R)を介した小胞体からのCa²⁺動員は、この細胞内Ca²⁺濃度の上昇に大きく関与している。近年IP₃RがIRAGとPKG1βとともにヘテロ複合体を形成することが報告された。複合体を形成したI型IP₃Rは、PKAによるリン酸化が抑制され、リン酸化によるCa²⁺動員の増強が消失した。その理由として、IP₃RがIRAGと結合することでPKAのリン酸化部位へのアクセスが阻害されることが考えられた。そこで本研究では、IP₃R分子内におけるIRAGとの結合領域を同定することを試みた。まずI型IP₃Rを5つの断片に分け、各断片をクローニングした後、IRAG(GFP)とともにCOS7細胞に共発現させ、抗GFP抗体を用いた免疫沈降実験を行った。その結果、aa923~aa1582に相当する断片が共沈された。さらにこの断片の欠変異体を作製し、同様の実験を行ったところ、断片のC末端側40アミノ酸領域がIRAGとの結合に重要である事が明らかとなった。この領域を欠失させた変異IP₃Rをクローニングし、IRAG(GFP)とともにCOS7細胞に共発現させたところ、変異IP₃RはIRAG(GFP)と共沈されないと同時に、PKAによってリン酸化された。本領域はI型IP₃RのPKAによるリン酸化部位と非常に近接していることから、複合体の形成によりPKAがリン酸化部位へアクセスできない可能性が示唆された。

P2-56

ラット顎下腺腺房細胞へのStim1-mKO1発現によるCa²⁺ストアおよびCa²⁺放出量の増大

○森田 貴雄¹、根津 顕弘¹、東城 庸介²、谷村 明彦¹ (北医大 歯 薬理、²北医大 歯 生物物理)

【目的】我々はアデノウイルスを用いてラット顎下腺腺房細胞に機能的なStim1-mKO1を発現させることに成功し、昨年の本会で、Stim1-mKO1の発現により、Ca²⁺応答が増強することを報告した。本研究ではCa²⁺応答の増強についてさらなる解析を行ったので報告する。【方法】Stim1-mKO1発現アデノウイルス粒子をラット(10-18週齢)の顎下腺開口部から逆行性に注入し、1-2日後に実験に用いた。酵素処理により分離顎下腺腺房細胞を調製し、Argus-Hiscaを用いてCa²⁺応答を解析した。また、麻酔下でラットの顎下腺開口部にチューブを挿入し、アゴニストの腹腔内投与により分泌された唾液の分泌量を測定した。【結果と考察】Stim1-mKO1発現細胞では、カルバコール(CCh)刺激によるCa²⁺流入量の増大に加えて、Ca²⁺放出量が大きくなった。この放出量増大の割合は低濃度のCCh刺激ほど大きかった。また、Stim1-mKO1発現細胞ではCa²⁺イオノフォア(ionomycin)による放出量の増大が見られたが、IP₃受容体に対するIP₃の感受性は変化しなかった。コントロールのmKO1の発現細胞では放出量の増大は見られなかった。この結果から、Stim1の過剰発現によりCa²⁺ストアが増大した事が示唆され、このストアの増大を介してCa²⁺応答が増強し、唾液分泌を亢進する事が考えられる。さらにStim1-mKO1の発現による唾液分泌の亢進の傾向が見られており、現在Stim1発現による唾液分泌への影響についてさらなる解析を進めている。

P2-57

$\alpha 6$ インテグリンは顎下腺分枝形態形成の伸長反応に関与している
 ○小山 典子¹、水越 堅詞¹、柏俣 正典¹ (朝日大 歯 歯科薬理)

【目的】インテグリンは細胞と細胞外基質の接着に関わる細胞膜タンパク質で、ラミニンやフィブロネクチンなどの細胞外基質と結合し接着斑を形成するとチロシンキナーゼ活性を持つ focal adhesion kinase (FAK) の自己リン酸化をおこして細胞内シグナル伝達系を活性化することが知られている。また、インテグリンは癌浸潤や転移、創傷治癒や器官形成に深く関与していると考えられている。本研究でわれわれは胎仔マウス顎下腺の分枝形態形成におけるインテグリンの機能を明らかにするために検討を行った。【材料と方法】胎仔マウスから一対の顎下腺を摘出し、一方を対照群、一方を処理群として培養液中にインテグリン $\alpha 6$ の中和抗体である GoH3 を添加して培養を行い、形態変化を観察した。同様に胎生 13 日齢の顎下腺原基から上皮を分離し、上皮組織に対する直接的な GoH3 の影響について検討を行った。【結果および考察】GoH3 を添加して培養すると顎下腺の分枝形態形成が抑制された。上皮組織のみを培養をした結果から、おもに FGF10 によって引き起こされる伸長反応が GoH3 によって抑制されていることがわかった。以上の結果から、インテグリン $\alpha 6$ は伸長反応を制御することによって分枝形態形成を調節していることが示唆された。今後、如何なるシグナル伝達を介してインテグリンが分枝形態形成を制御しているのかを検討する。

P2-59

加齢に伴うマウス唾液腺における PACAP レセプター局在の解析
 ○野中 直子¹、中村 雅典¹ (昭大 歯 口腔解剖)

唾液分泌の制御は、主に自律神経支配のもとで行われる。Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、ヒツジの視床下部から単離、構造決定された神経ペプチドで、現在では多数の生理機能を持つ神経ペプチドとして種々の組織に認められている。本研究では、8 週齢と 8 か月齢の C57BL/6 マウス (♂) から耳下腺、顎下腺、舌下腺を採取し、PACAP レセプター (PAC1R) の局在について免疫組織学的検討を行った。耳下腺では、PAC1R は線条部導管に免疫反応が認められた。顎下腺では、PAC1R は顆粒性導管内にある細胞 (pillar cell) に強い免疫反応が認められた。舌下腺では、PAC1R の免疫反応は線条部導管に認められた。また、舌下腺線条部導管には、8 か月齢において顆粒を有する細胞の出現が認められた。一方、8 か月齢の顎下腺においては、実質内に著しいリンパ球浸潤が認められた。8 週齢と 8 か月齢の三大唾液腺で比較した結果、PAC1R の免疫局在には加齢に伴う明確な違いは見られなかった。以上の結果から、PAC1R のそれぞれの唾液腺における局在が明らかになった。舌下腺での顆粒を有する細胞の機能の解析は、加齢に伴う唾液腺の機能変化を知る上で有益となることが考えられる。更に、顎下腺におけるリンパ球浸潤は、唾液腺疾患の病態解明の一助となると考える。

P2-58

自然発症 2 型糖尿病モデルラットにおける顎下腺の形態学的研究
 ○守下 綾香¹、上村 守²、諏訪 文彦² (大歯大院 解剖、²大歯大 解剖)

【目的】1 型糖尿病モデルラットでの顎下腺の形態的变化は報告されているが、自然発症 2 型糖尿病モデル (GK) ラットでは報告されていない。そこで、GK ラットと正常ラットの顎下腺を比較し、両者に形態学的差異があるかを調査した。【方法】正常群として生後 8 週齢 Wistar 系雄性ラット 6 匹 (空腹時血糖値: 114.8 ± 29.5 mg/dL)、糖尿病群として同週齢 GK 雄性ラット 6 匹 (空腹時血糖値: 205.3 ± 48.7 mg/dL) の合計 12 匹を使用した。両群各 3 匹をヘマトキシリン・エオジン重染色標本に使用し、光学顕微鏡で観察し、撮影した画像を画像解析ソフトで漿液細胞の断面積を計測した。両群各 3 匹を微細血管鋳型標本に使用し、走査型電子顕微鏡で観察し、撮影した画像を上記ソフトで毛細血管の直径を計測した。なお、いずれの値も Student の *t* 検定 ($p < 0.01$) で統計処理した。【結果】光学顕微鏡標本では両群とも漿液細胞の形は扇形や多角形をし、核は円形で、基底側に位置していた。しかし、漿液細胞の断面積は正常群より糖尿病群の方が有意に約 0.8 倍小さかった。微細血管鋳型標本では両群とも微細血管構築は網目状を呈していた。しかし、毛細血管の直径は正常群より糖尿病群の方が有意に約 0.7 倍小さかった。【考察】糖尿病では唾液分泌量が低下すると報告されている。GK ラット顎下腺で高血糖は漿液細胞では萎縮性変化、毛細血管では細小血管症を引き起こしていた。これらのことが唾液の分泌を低下させると考えられた。

P2-60

耳下腺腺房細胞の開口分泌における Rab27 のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) の関与
 ○今井 あかね¹、梨田 智子¹、下村 浩巳¹ (日歯大 新潟 生化)

低分子量 GTPase である Rab は GTPase-activating protein (Rab-GAP) と guanine nucleotide exchange factor (GEF) の働きにより、GTP/GDP サイクルを巡って膜輸送に係わっている。我々はこれまでに Rab27 が特異的エフェクターと共同して耳下腺腺房細胞の isoproterenol (IPR) 刺激時開口分泌に関与していること、GTP/GDP サイクルに Rab27-GAP である EPI64 および GDP dissociation inhibitor が関わっていること等を示した。今回は腺房細胞中の Rab27 の完全な GDP/GTP サイクルを明らかにするため、今まで報告されていなかった Rab27-GEF について調べた。【方法と結果】ラット耳下腺腺房細胞に GEF 活性を有する DENN ファミリーの mRNA が発現しているか RT-PCR により調べ、9 種類の mRNA 発現を認めた。このうち、Rab27-GEF 活性を持つ DENN/MADD のタンパク質発現を Western Blot により調べ、可溶性画分に認めた。またこの抗体をストレプトリジン O 処理した腺房細胞に導入し、IPR 刺激すると濃度依存的にアミラーゼ分泌が阻害され、有意に GTP 型 Rab27 が減少した。さらに GST 融合 DENN domain リコンビナントタンパク質を細胞導入した場合も同様にアミラーゼ分泌が阻害された。【考察】以上の結果から、耳下腺腺房細胞中の DENN/MADD は Rab27-GEF として機能し、IPR 刺激による開口分泌には Rab27 の GDP/GTP サイクルが重要であるということが明らかになった。

P2-61

マウス耳下腺における水チャネル AQP5 のイソプロテレノールによる down-regulation の機構
 ○姚 陳娟¹、長谷川 敬展¹、赤松 徹也¹、吉村 弘¹ (徳大 院 HBS 口腔分子生理)

【目的】マウス耳下腺の水チャネル、アクアポリン 5 (AQP5) はイソプロテレノール (IPR) 刺激により、その蛋白質発現量が減少することを見出し、その制御機構について検討した。【方法】雄性 ICR マウスに IPR を腹腔投与 (13 mg/kg BW) し、所定時間後に耳下腺を摘出して AQP5 の発現レベルを免疫組織化学法、Western blotting、RT-PCR 等により解析した。【結果】IPR 刺激により、12-24 時間後に耳下腺 AQP5 の mRNA 量は顕著に増加したが、蛋白質量は著しく減少した。この減少は IPR 投与 1 時間前にカルパイン阻害剤 (ALLM と calpeptin) を投与することで抑えられた。AQP5 を含むマウス顎下腺膜分画に純化 μ -calpain を加えて in vitro でインキュベートすると、 μ -calpain が濃度時間依存的に AQP5 を分解した。この分解は μ -calpain を ALLM と calpeptin で前処理することで完全に阻害された。また、Western blot 解析及び活性測定の結果、IPR 刺激により耳下腺の μ -calpain が活性化されることが確認された。更に、免疫組織化学法により、 μ -calpain は AQP5 と共に耳下腺腺房細胞の細胞膜に局在することも判明した。【結論】IPR 刺激により活性化されたカルパインが AQP5 の分解を引き起こす可能性が示された。

P2-63

歯周病患者における唾液と歯肉滲出液中の代謝プロファイル

○田中 庄二¹、秋田 紗世子¹、町野 守¹、坂上 宏²、杉本 昌弘^{3,4}、曾我 朋義³、富田 勝³ (明海大 歯 口診、²明海大 歯 薬理、³慶應大 先端生命科学研、⁴京大 院医 メディカルイノベーション)

【目的】混合唾液中のアミノ酸を含む代謝物のプロファイルは、加齢や癌や歯周病において特異的に変化することが知られている。また、歯肉溝滲出液 (GCF) におけるプリン体分解経路の物質の歯周病サイトでの上昇、唾液中では歯周病患者におけるグルタミン酸およびペプチド類の上昇、慢性辺縁性歯周炎では、唾液中のフェニルアラニン、バリンなどの上昇、そしてビルビン酸や N-アセチル類の物質の低下が報告されている。そこで本研究では、歯周病患者における唾液と GCF の代謝プロファイルの関係を調べた。【方法】学内倫理委員会のガイドラインに従い、健常者および進行度の異なる歯周病患者から GCF および唾液を採取し、メタボローム解析を行った。【結果と考察】唾液においては、健常者と歯周病患者の比較では、アミノ酸の統計的に有意な上昇は認められず、N-アセチル類や TCA 回路の代謝物の上昇が認められ、既存の研究結果の再現性が確認された。アミノ酸のバランスを比較したところ、唾液と健常部の GCF では相関値 0.74 (中央値)、健常部と炎症部の GCF では 0.86、唾液と炎症部の GCF では 0.64 となり、炎症部の GCF だけ他と違うプロファイルのパターンを示した。この GCF のアミノ酸プロファイル変動が唾液中プロファイルに直接反映される量ではないが、限定的に影響していることが示唆された。

P2-62

唾液中抗菌タンパク質 mRNA の発現評価と加齢との相関性
 ○佐藤 律子¹、柴崎 浩一¹ (日歯大 新潟短大)

【目的】唾液中の mRNA は、唾液腺から遊離されるエクソソームを起源とし、安定な状態で抽出可能である。唾液中の抗菌物質である histatin-3 および cystatin S の発現は、唾液腺および全身の生理状態を反映していると予想されることから、我々は加齢によって唾液中抗菌物質の発現が変化すると考えた。そこで、若年層群と中高年層群間における唾液中 histatin-3 および cystatin S の mRNA の発現の相違を調べた。【対象および方法】被験者は女性に限定し、健常者 30 名 (若年層: 10~20 歳代、中高年層: 30~50 歳代) を対象とした。自然流出唾液 1 ml を採取し、RNeasy Protect Saliva Mini を用いて RNA を抽出した。RNA の定量および純度検定は、NanoDrop 1000 を用いた測定値により行った。cDNA 合成には Transcriptor First Strand cDNA Kit を用いた。RT-PCR により histatin-3 および cystatin S の発現を検討し、Multigauge を用いて電気泳動後のバンドを定量し、内部標準 (GAPDH) との比を発現量として示した。【結果および考察】被験者の唾液に含まれる RNA 量は、102~2,520 ng/mL と、個人により著しい差があった。histatin-3 および cystatin S の発現については、若年層群と中高年層群間には有意差は認められず、むしろ個人による差が大きかった。生活習慣により発現差が生じた可能性があることから、今後、アンケート調査を解析して、唾液中抗菌物質と生活習慣の相関性を検討することが必要であると考えられた。

P2-64

マウス耳下腺導管結紮による nestin の発現
 ○横山 愛¹、加藤 治¹、福島 美和子¹、吉垣 純子¹ (日大 松戸歯 生理)

【背景と目的】唾液腺腺房細胞は唾液分泌を担う重要な器官である。頭頸部への放射線治療や、自己免疫疾患などで唾液腺に傷害が起こると腺房細胞が減少し唾液分泌能は低下する。この傷害が軽度であればのちに腺房細胞は回復する。現在までに回復した腺房細胞の由来は明らかになっていない。我々は以前、唾液腺初代培養の実験において組織への傷害は細胞を脱分化へと導くこと、そして未成熟となった腺房細胞は神経幹細胞マーカーである nestin を発現し、唾液腺幹細胞マーカーとして有用であることを発見した。そこで今回、マウス耳下腺導管を結紮することにより唾液腺傷害モデルを作製し、nestin が発現するのかが検討した。【方法】C57BL/6 マウス耳下腺導管を深麻酔下にて結紮後 4、7、10 日目に摘出し、ウェスタンブロット法、HE 染色、および nestin 抗体での免疫組織化学染色を施した。【結果】導管結紮側では非結紮側に比べ nestin のタンパク発現量が高かった。また HE 染色において、萎縮した腺房細胞が導管結紮側で認められた。免疫組織化学染色では、導管結紮側唾液腺組織に nestin 陽性細胞が観察された。【結論】導管結紮においても結紮が組織傷害となり唾液腺の脱分化を誘導し、未分化な状態となった唾液腺は nestin を発現することが明らかになった。今後、nestin 陽性細胞が腺房細胞に分化するかを確かめる。

P2-65

マウス耳下腺筋上皮細胞における骨格筋アクチンの発現

○梨田 智子¹、吉江 紀夫²、羽下-辻村 麻衣子²、今井 あかね¹、下村 浩巳¹ (¹日歯大 新潟生命歯 生化、²日歯大 新潟生命歯 解剖)

【目的】我々は、糖尿病発病マウス耳下腺において、筋上皮細胞の減少と同時に、骨格筋分子 (α 骨格筋アクチン:Acta1、骨格筋ミオシン軽鎖:My1I) が減少することを認めた (9th European Symposium on Saliva 発表)。このことは、筋上皮細胞に骨格筋分子が発現していることを示唆している。しかし、筋上皮細胞における平滑筋アクチンの豊富な発現はよく知られているものの、骨格筋分子の発現は未だ報告されていない。そこで、筋上皮細胞における骨格筋分子の発現の確認を行った。

【方法】マウス (C57BL/6J) あるいは ICR) から耳下腺を摘出し、酵素消化による分散後、遠心分離により腺房細胞とその他の細胞を含む画分を分離した。また、分散後の混合液を EDTA 処理後、密度濃度勾配遠心に付し、筋上皮細胞を分離した。遺伝子解析は PCR により行い、タンパク質発現は Western blotting および免疫組織化学により解析した。

【結果】腺房細胞は、平滑筋アクチン (Acta2) を発現していたが骨格筋成分は発現していなかった。一方、腺房細胞以外の細胞画分は平滑筋アクチンの他に骨格筋アクチンおよびミオシン軽鎖を含んでいた。免疫組織化学から、骨格筋アクチンは筋上皮細胞に発現しており、また単離した筋上皮細胞に骨格筋アクチンが発現していることが確認された。

【結論】マウス耳下腺筋上皮細胞は、平滑筋アクチンだけではなく、骨格筋アクチンおよび骨格筋ミオシン軽鎖を発現していた。

P2-66

ヒト歯根膜におけるリゾホスファチジン酸シグナル

○荒川 俊哉¹、岡山 三紀²、小原 伸子³、設楽 彰子¹、入江 一元³、溝口 到²、田隈 泰信¹ (¹北医大 歯 生化、²北医大 歯 矯正、³北医大 歯 組織)

【目的】リゾホスファチジン酸 (LPA) は、新たな脂質メディエーターとして近年注目され、体毛形成や血管形成など様々な機能に関与していることが明らかになってきているが、歯根膜における機能やシグナルについては不明な点が多い。そこで、歯根膜における LPA シグナルを解明することを目的とした。

【方法】ヒト抜去歯より得られた歯根膜組織より歯根膜線維芽細胞を単離、培養後、LPA シグナルに関わる遺伝子群の発現を RT-PCR 法により解析した。また、歯根膜細胞への LPA 添加およびメカニカルストレスの負荷 (遠心機による重力負荷) を行い、誘導される遺伝子群の RT-PCR による解析および DNA マイクロアレイ解析により比較検討を行った。さらに、マウス歯胚における LPA 受容体発現の変化を解析した。【結果】歯根膜細胞およびマウス歯胚において、LPA1 の強い発現が認められた。LPA 合成酵素では Autotaxin (Lyso-PLD) の発現がみられた。また、メカニカルストレス負荷によって、NR4A3 (核受容体)、RGS2 (G タンパク調節因子)、Autotaxin などの mRNA の誘導が見られた。【考察】歯根膜では LPA 受容体および合成酵素が強く発現しており、LPA 刺激やメカニカルストレスに対して発現応答もあることから、LPA シグナルは歯根膜組織を改造・再生するシグナルとして重要な役割を果たしていることが示唆された。

P2-67

天然低分子化合物、ハルミンの歯根形成促進作用

○藤原 尚樹¹、大津 圭史¹、坂野 深香¹、太田 正人²、原田 英光¹ (¹岩医大 解剖 発生生物・再生医、²東医歯大 院医歯 総合 分子発生)

【目的】歯根形成は Hertwig 上皮鞘 (HERS) と周囲間葉組織の相互作用によって進行することが知られているが、この調節メカニズムは未だ解明されていない。天然低分子化合物、ハルミンは歯芽細胞や破骨細胞に作用し、骨代謝を調節することが知られている。今回我々はハルミンの歯周組織形成への関与、特にマウス臼歯の歯根発達に対する影響について検討した。【材料と方法】本研究ではマウス臼歯の HERS とマウス HERS 由来細胞株、HERS01a を用いた。器官培養は歯根形成過程が観察可能な Fujiwara ら (2005) の方法を用いて行った。歯根発達への影響は、歯髄にハルミンをしみ込ませたビーズを埋め込み、この歯胚を SCID マウス腎被膜下に移植して、マイクロ CT によって検討した。HERS01a 細胞培養において細胞数を、器官培養系による BrdU assay によって細胞増殖への影響を検討した。【結果と考察】ハルミンは歯槽骨の形成に加え、移植歯胚の歯根形成を促進した。また HERS01a 細胞株での細胞増殖、器官培養下での歯根形成を促進した。BrdU assay においてハルミンは HERS 中の陽性細胞数を増加させ、歯周組織においても同様の作用を示した。本研究はハルミン が HERS 発達と共に歯根形成をコントロールする可能性を示唆した。

P2-68

TGF- β による歯周靭帯由来血管内皮前駆細胞様細胞の増殖抑制と平滑筋細胞様分化のシグナル解析

○客本 斉子¹、吉田 茉莉子¹、大久保 直登²、帖佐 直幸¹、長谷川 智一³、高橋 典子¹、衣斐 美歩²、加茂 政晴¹、石崎 明¹ (¹岩医大 生化細胞情報科学、²岩医大 医歯薬総合研 腫瘍生物学、³徳大 病院 小児歯)

【目的】歯周靭帯 periodontal ligament (PDL) 由来細胞の血管構成細胞への増殖・分化を制御する細胞内シグナル伝達経路の詳細は明らかとされていない。これまで我々は、歯周靭帯由来 SCDC2 細胞は血管内皮前駆細胞様細胞 (EPC) で、I 型コラーゲンゲル三次元培養下で血管様構造物を形成することを報告した (Okubo *et al.*, 2010)。加えて、FGF 刺激下の ERK シグナル抑制時には平滑筋細胞 (SMC) マーカーを発現することを報告している (Takahashi *et al.*, 2012)。今回、SCDC2 細胞の増殖や血管内皮細胞 (EC) および SMC 分化に及ぼす TGF- β 誘導性 Smad2/3 ならびに p38MAPK シグナルの影響を調査した。【方法】細胞増殖は Alamar Blue 代謝測定法、EC, SMC 分化は定量的 RT-PCR 法と免疫蛍光細胞染色法により、シグナル経路の解析はウエスタンブロット法と阻害剤を用いて行った。【結果と考察】TGF- β は SCDC2 細胞増殖を抑制し、この効果は抑制性の Smad7 で解除された。また TGF- β は EC マーカー発現を抑制し、この効果は p38MAPK 阻害剤の SB203580 により解除された。さらに、TGF- β は SMC マーカー発現を促進し、この効果は Smad7 で抑制された。以上より、SCDC2 細胞では TGF- β が Smad2/3 シグナル依存的に増殖を抑制するとともに Smad2/3 と P38MAPK シグナル依存的にこの細胞の SMC 分化の方向性を決定する可能性が示唆された。

P2-69

糖尿病性歯周炎発症における骨吸収の分子機構の解明

○張 皿¹、大澤 賢次²、松尾 拓¹、福島 秀文²、自見 英治郎² (九歯大 口腔病態病理、²九歯大 分子情報生)

目的：2型糖尿病は動脈硬化などの重篤な合併症の他に糖尿病性歯周炎を誘発する。本実験では、糖尿病性歯周炎発症における骨吸収のメカニズムを細胞・分子レベルで明らかにすることを目的とした。方法：(1) 8週齢の野生型マウス (WT) と2型糖尿病モデルマウス (db/db) の右下顎第一臼歯歯肉にLPSを注入して実験的に歯周炎を惹起させ、対照群はPBS注入した。8日後にマウスの右下顎骨を摘出し、 μ CTにより歯槽骨の骨吸収を評価した。(2) WT と db/db マウスの歯槽骨を摘出し、LPS 存在下または非存在下で器官培養を行い、培地中に溶出されたカルシウム量を測定した。(3) WT と db/db マウスの骨髓細胞を調製し、様々な濃度のRANKLとLPSの存在下または非存在下で培養し、誘導されたTRAP陽性多核細胞数を計測した。結果と結論：db/dbマウスではWTマウスに比べてLPS注射による歯槽骨の吸収が亢進していた。同様に、歯槽骨器官培養でも、LPS添加によるカルシウム溶出量が有意に亢進し、さらに様々な濃度のRANKLによる破骨細胞分化もdb/dbマウスの骨髓細胞で亢進していた。また、LPSによる破骨細胞分化の促進作用はdb/dbマウスでより顕著であった。以上から、db/dbマウスにおける歯周炎がWTマウスと比較して重度となるメカニズムとして、db/dbマウスにおける破骨細胞分化の亢進が考えられた。

P2-71

歯周病変部の歯石と歯肉縁下歯石の組織構造および組成の検討

○三島 弘幸¹、大久保 厚司²、西野 彰恭³、笹川 一郎⁴、青柳 秀一⁴、見明 康雄⁵ (高知学園短大 生活科学、²日宇歯科、³にし歯科、⁴日歯大 新潟生命歯 先端研究セ、⁵東歯大 口腔超微構造)

研究の目的は、歯周病変部に形成された歯石と歯肉縁下歯石の構造と組成を比較検討することである。歯周病変により形成された歯石は2例(男性54歳、男性64歳)である。歯肉縁下歯石は青年(20歳代)5例及び中年(40歳代から60歳代)21例を用いた。デジタルマイクロスコープ、 μ CT、SEM、SEM-EDS、X線回折法などを用いて解析を行った。中年の縁下歯石において多角形、フレイク状、桿菌様の構造物が多く認められ、青年の縁下歯石では小さな顆粒状構造物が多く、桿菌様の構造物は中年より少なかった。縁下歯石において、層状構造が見られた。歯周病変部の歯石では顆粒状であった。Ca, P, Mg, Naが主に含有していた。青年縁下歯石では局所的にFを含有し、中年縁下歯石では局所的にAlを含有していた。歯周病変部歯石では、微量元素でS, Alも含有し、局所的にSi, Feが検出された。青年歯肉縁下歯石のCa/P比は1.75とhydroxyapatiteに近く、中年歯肉縁下歯石のCa/P比は1.50とwhitlockiteに近かった。歯周病変部歯石のCa/P比は1.52とwhitlockiteに近かった。X線回折法では、青年縁下歯石はhydroxyapatiteであり、中年縁下歯石はwhitlockiteであり、歯周病変部歯石もwhitlockiteであった。歯石の形成機構は形成部位、加齢、性差や炎症などによる微小環境の差により変化し、歯石の構造や化学組成が変化することが示唆される。

P2-70

エルゴチオネインによる歯肉上皮細胞における遺伝子発現変化のバイオインフォマティクスによる解析

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

【目的】エルゴチオネイン(EGT)は、食用キノコであるタモギタケに特に多く含まれる、水溶性のアミノ酸の一種である。タモギタケ由来EGTはフリーラジカルのスカベンジャーとしての働きや抗カンジダ効果のあることが明らかとなっている。本研究では、EGTの口腔内への応用を想定し、EGTにより歯肉上皮細胞から発現誘導される遺伝子を、マイクロアレイを用いて網羅的に検討した。同時にIngenuityソフトウェアを用いて遺伝子群の機能予測とネットワークの解析を行った。【方法】細胞は、ヒト歯肉上皮前駆細胞(CELLNTEC社)を用いた。細胞培養液にタモギタケ由来EGT(1mM)を添加し、24時間後にTotalRNAを抽出し、Agilent社製マイクロアレイにて遺伝子発現解析を行った。また発現変化がみられた遺伝子に関してIngenuity Pathway Analysis(IPA)を用いて分子間ネットワークの解析を行った。【結果および考察】歯肉上皮前駆細胞のEGTの添加による遺伝子発現変化をEGT非添加群と比較した結果、発現が2倍～約50倍上昇した遺伝子は約230種同定された。これらの遺伝子群にIPAを行いnetworkを解析したところ、血液凝固機構および歯周組織の安定化に関係する因子が多くみられた。以上より、歯肉上皮細胞においてEGTが歯周病による歯周組織の障害に対して防御的な働きに作用する可能性が示唆された。

P2-72

口腔上皮のLPS刺激によるヒストンアセチル化のプロファイリング解析

○西村 学子¹、植原 治²、高井 理衣¹、荒川 俊哉³、山崎 真美¹、佐藤 惇¹、佐藤 英樹¹、田隈 泰信³、安彦 善裕¹ (北医大 歯 生体機能・病理学系 臨床口腔病理、²北医大 歯 口腔生物学系 微生物、³北医大 歯 口腔生物学系生)

【目的】Epigeneticsは、DNAの塩基配列を伴わず遺伝子の発現が変化する現象であり、主に環境因子により変化し、その代表的なものにDNAの高メチル化やヒストン修飾がある。本研究では、P. gingivalis由来LPS刺激による歯肉上皮細胞のヒストンアセチル化修飾についてchromatin immunoprecipitation-on-chip (ChIP on chip)による網羅的解析を行った。

【方法】ヒト歯肉由来上皮細胞は、PCT Gingival epithelium mediumにて培養後、LPSを10 μ g/ml添加、4時間培養し、LPS無添加細胞と比較検討した。ChIP assay KitによりDNA精製を行い、Human promoter 488K (244Kx2) microarray plateにDNAをハイブリダイズ後、Feature Extraction Softwareにより解析した。またmicroarray dataの再現性確認はChIP-DNAにより定量的PCR法を行った。

【結果】microarray plate全体(474,411probe)中、250probe(68gene)がLPSより発現上昇し、176probe(49gene)に発現低下が認められた。また発現上昇した遺伝子の定量的PCR法を行ったところ、MET, FAIM, FILIP1, CHRNB3などのプロモータ領域にヒストンアセチル化が確認された。

【考察】以上より、LPS刺激による口腔上皮のヒストンのアセチル化修飾と脱アセチル化は、特異的遺伝子を誘導していることが示唆された。

P2-73

歯肉線維芽細胞におけるフェニトインとカルシウム感知受容体との関係
 ○服部 敏己¹、中野 敬介²、川上 敏行² (1松歯大 歯科薬理、2松歯大 総歯研 病態解析)

【目的】抗てんかん薬であるフェニトインはニフェジピン(抗高血圧薬)と同様に副作用として歯肉肥大を起こす。ニフェジピンによるこの作用には歯肉線維芽細胞の細胞内カルシウム濃度([Ca²⁺]_i)の上昇が関係している可能性がある。このことから今回の実験ではフェニトインによる歯肉肥大のメカニズムを探るために、フェニトインは[Ca²⁺]_iを上昇させるか、もしそうであればその機序を明らかにすることを目的とした。【材料および方法】材料にはヒト正常歯肉線維芽細胞 Gin-1 を用いた。[Ca²⁺]_i測定は蛍光性Ca²⁺指示薬としてfura-2/AMを用いてビデオ画像解析法により行なった。【結果】フェニトインは濃度依存的に[Ca²⁺]_iを上昇させた。カルシウム感知受容体アゴニストである gentamicin, neomycin, spermine, LaCl₃および verapamil は有意に[Ca²⁺]_iを上昇させた。Ca²⁺を除去した灌流液、NPS2390(カルシウム感知受容体アンタゴニスト)および TMB-8(細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺遊離阻害薬)はフェニトインによる[Ca²⁺]_iの上昇を抑制した。U73122(ホスホリパーゼC阻害薬)はフェニトインによる[Ca²⁺]_iの上昇を抑制した。一方 m-3M3FBS(ホスホリパーゼC活性化薬)はフェニトインによる[Ca²⁺]_iの上昇を増強した。【考察】これらの結果からフェニトインによる[Ca²⁺]_iの上昇にはカルシウム感知受容体と、更に細胞内Ca²⁺ストアからのCa²⁺遊離が関与していることが考えられる。

P2-75

機械的刺激に誘導されるコラーゲン修飾酵素が歯根膜組織に及ぼす影響
 ○加来 賢¹、野澤 恩美¹、秋葉 陽介¹、魚島 勝美^{1,2} (1新大院 生体歯科補綴、2新大 医歯学総合病院)

I型コラーゲンは歯根膜において細胞外基質タンパクの7割以上を占め、歯根膜組織の主たる機械的特性を担っている。I型コラーゲンの生合成は細胞内外での一連の翻訳後修飾により制御され、分子間架橋結合(クロスリンク)によって組織の3次元構造の構築を可能としている。本研究ではコラーゲン修飾酵素の発現変化を検索し、機械的刺激が歯根膜コラーゲン線維の翻訳後修飾に及ぼす影響について解析を行った。ヒト歯根膜細胞をコラーゲンゲル中に播種し、0-2 g/cm²の荷重を付与したところ、I型コラーゲン分子自体をコードするCOL1A2遺伝子の発現に変化は認められなかったが、コラーゲン修飾酵素のLysyl Hydroxylase2(LH2)、Lysyl Oxidase(LOX)遺伝子の発現に上昇が認められた。さらにI型コラーゲン分子の2量体であるbeta鎖の増加が観察され、クロスリンクの亢進が認められた。またラットを用いた動物実験では、3日間の過剰咬合によって歯根膜組織におけるコラーゲン線維の増加が観察されると共に、歯根膜細胞では、機械的刺激に対する発現変化が知られているp-FAK、HSP27、HSP70、およびコラーゲン修飾酵素のLH2、LOX陽性細胞の増加が認められた。以上の結果より、機械的刺激によるコラーゲン修飾酵素の発現変化が、歯根膜組織の維持に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

P2-74

歯周炎患者歯周靭帯由来幹細胞に対するエリスロポイエチンの影響
 ○増田 啓太郎¹、山座 孝義²、馬 蘭³、牧野 友祐⁴、星野 慶弘³、樋口 勝規¹、久木田 敏夫² (1九大 病 口腔総合診療、2九大 院歯 分子口腔解剖、3九大 院歯 小児歯、4九大 院歯 クラウンブリッジ)

昨年度本学会において、歯周疾患罹患歯より単離した歯周靭帯幹細胞(炎症性歯周靭帯幹細胞)の幹細胞特性を明らかとし、正常歯周靭帯幹細胞と比べ炎症性歯周靭帯幹細胞の幹細胞特性が低下している事を報告した。本研究では、炎症性歯周靭帯幹細胞における障害された機能を回復させるべく、エリスロポイエチンに注目して、その細胞特性の変化について解析した。本研究では、九大学病院口腔総合診療科にて抜歯を余儀なくされた歯周疾患罹患歯の歯周靭帯を使用した。対照群としては埋伏智歯の歯周靭帯を用いた。正常歯周靭帯幹細胞と比べ炎症性歯周靭帯幹細胞では細胞増殖能およびセメント質形成能が劣っていた。エリスロポイエチン刺激炎症性歯周靭帯幹細胞では、その低下していた細胞増殖能やセメント質形成能が正常歯周靭帯幹細胞とほぼ同等の能力の回復が認められた。以上から、エリスロポイエチンは歯周組織再生に有効なツールとなりうる可能性が示唆された。

P2-76

レトロウイルスベクターによる歯根膜細胞由来のiPS細胞の樹立とその安全性の検討
 ○花田 信弘¹、野村 義明¹、石川 美佐緒²、八城 祐一²、新井 千博²、山口 貴央³、村田 貴俊¹、野田 晃司²、高野 吉郎¹、中村 芳樹² (1鶴見大 歯 探索歯、2鶴見大 歯 歯科矯正、3鶴見大 歯 歯科保存一、4東医歯大 歯 硬組織構造生物)

目的：ヒト細胞に由来するiPS細胞を歯科分野の再生医療に用いる際の安全性について検討する。方法：ヒト歯周靭帯線維芽細胞(HPDL)とレトロウイルスベクターを用いてHPDL-iPS細胞を樹立した。また、本研究で樹立したヒト細胞由来のiPS細胞とHPDLの染色体の核型分析を行った。結果：HPDLとレトロウイルスベクターを用いて我が国で初めて歯根膜細胞由来のiPS細胞(HPDL-iPS)を樹立することに成功した。しかしHPDL-iPS細胞からのテラトーマ形成実験において三胚葉の形成の確認はできたが、それらの組織以外に一部未分化な細胞組織像も観察され、腫瘍組織とも考えられた。HPDL-iPS細胞とHPDLの染色体の核型分析ではHPDLの核型は100%正常であったのに対し、HPDL-iPS細胞では、10~20%の割合で核型異常の発現がみられた。考察：今回樹立したHPDL-iPS細胞は、レトロウイルスによる遺伝子導入を行っていることから、この核型異常がベクターに由来する可能性がある。今後、様々な遺伝子導入法でHPDL-iPS細胞を作製し、核型異常を起こさない条件を検討する。また、がん関連遺伝子を中心にiPS細胞の疾病関連遺伝子発現を含めiPS細胞の総合的な安全性を検討していきたい。

P2-77

ラット歯周病実験モデルにおける炎症性サイトカインと破骨細胞について

○阿部 和正¹、田村 宗明^{1,2}、落合 邦康^{1,2} (1)日大 歯 細菌、²日大 総歯研 生体防御)

【目的】歯周病発症には歯周病原菌のみならず、種々の免疫応答が関与していることから、歯周病発症機序解明に様々な研究が行われている。しかし、ヒト口腔を再現する適切な動物実験モデルがほとんどなく、また、既法では過剰な菌を長期接種するなど実際の発症機序を適切に反映しているとは言い難い。我々は、これらの問題点を解決する目的で、挿入材を利用した新たなラット歯周病実験モデルを開発した。今回、この実験モデルにおける骨吸収量、炎症性サイトカインならびに破骨細胞数について検討した。【方法】実験動物はSD系ラット(雄、10週齢)を、供試菌株として *Porphyromonas gingivalis* ATCC33277を用いた。ラット上顎右側第一・第二臼歯間にハイドロキシアパタイト不織布シート(ACバイオテクノロジー社製)を装着後、菌を接種し、30日間飼育した。飼育期間における歯槽骨吸収量、歯肉内炎症性サイトカイン量ならびに破骨細胞数について検討した。【結果と考察】挿入材を利用することにより、より少量の菌接種ならびに短期間で歯槽骨の吸収が認められた。炎症性サイトカインのmRNA量は接種後12日より顕著に上昇し、破骨細胞数の増加も確認した。これらの結果から、このラット歯周病実験モデルは従来の実験法に比べ、少量の接種菌と短期間で歯周病を発症することができるとともに、歯周局所の炎症ならびに歯槽骨吸収を再現できることが示唆された。

P2-79

歯周組織における Fibulin-4 と LOXL2/エラスチン複合体の解析

○山内 由宣¹、中富 佑香¹、中島 一記¹、敦賀 英知²、沢 禎彦²、石川 博之¹ (1)福歯大 成長発達歯 矯正歯科、²福歯大 生体構造 機能構造)

【目的】弾性線維の形成はエラスチンが架橋することにより進行する。また、lysyl oxidase (LOX)はエラスチンと結合しエラスチンの架橋に関与することが報告されているが、LOXとエラスチンの結合を誘導する分子は不明である。そこで、LOXファミリーのLOXL2と弾性線維形成に不可欠なFibulin-4に着目し、Fibulin-4の発現抑制時のLOXL2/エラスチン複合体の変化を解析した。【資料および方法】ヒト歯肉線維芽細胞を培養し、形態学的、生化学的解析を行った。形態学的分析として免疫染色を行い蛍光顕微鏡にて観察を行った。生化学的解析としてLOXL2の遺伝子発現をRT-PCRにて、また、タンパク質沈着をWestern blotにて解析した。siRNAによりFibulin-4の発現を抑制した際のLOXL2/エラスチン複合体の形成を免疫沈降法にて解析を行った。【結果および考察】形態学的観察によりLOXL2の一部はエラスチンと共存しており、免疫沈降によりLOXL2とエラスチンは複合体を形成した。Fibulin-4を抑制するとLOXL2とエラスチンの複合体形成は抑制された。Fibulin-4はLOXL2とエラスチンの結合に関与し弾性線維形成に関与していると考えられる。【結論】Fibulin-4は、LOXL2/エラスチン複合体形成に関係し、弾性線維形成機構を調整している可能性が示唆された。

P2-78

メカニカルストレスが骨髄由来細胞の歯周組織への移動に及ぼす影響

○富田 美穂子¹、中野 敬介²、村岡 理奈³、中村 貴美¹、浅沼 直和¹、辻極 秀次⁴、長塚 仁⁴、川上 敏行² (1)松歯大 歯 口腔生理、²松歯大院 病態解析、³松歯大 歯 矯正、⁴岡大院 歯 歯 口腔病理)

【目的】骨髄由来細胞は多分化能をもち、歯髄内の樹状細胞様細胞や象牙芽細胞にも分化する事が明らかにされた。そこで今回は、この細胞の歯周組織への分化状態を調べるために、メカニカルストレスを与えた歯根膜内の骨髄由来細胞を観察した。【方法】GFP (green fluorescence protein) トランスジェニックマウスの骨髄を移植した8週齢のC57BL/6雌マウス10匹を使用した。上顎第一大臼歯と第二大臼歯の間に2×2mmのラバーダム(間歇的メカニカルストレス負荷)を5週連続して挿入した実験群(n=5)とラバーダムを挿入しない対照群(n=5)に分け、マウスを固定後、歯周組織の5μm水平連続切片を作製した。ウサギポリクロナール抗GFP抗体を使用して免疫組織化学染色を行い、両群における歯根膜組織内の骨髄由来細胞量を比較検討した。【結果】両群の歯根膜組織内には圧迫側と牽引側ともにGFP陽性細胞が認められた。また歯根膜全体に対するGFP陽性部の割合は、実験群は5.77±3.24%(mean±SD)、対照群は0.71±0.45%であり、実験群における発現量は対照群と比較して有意に高かった(Mann-Whitney U test: p<0.001)。【考察】これらの結果よりメカニカルストレスは骨髄由来細胞の歯周組織への移動を促進させ、リモデリングを行うために必要な線維芽細胞、破骨細胞、毛細血管等を歯根膜組織内に増加させる事が示唆された。

P2-80

化学的ストレスにより歯根膜線維芽細胞が発現するストレス反応性タンパクについて

○定岡 直¹、八上 公利^{2,3}、笠原 香¹、川原 一郎^{1,4}、中根 卓¹、牧 茂^{1,3} (1)松歯大 口腔衛生、²松歯大 社会歯科、³松歯大院 口腔健康政策、⁴松歯大院 臨床病態)

生体はストレスを受けると適応反応の1つとしてChromogranin A (ChgA)を産生する。ChgAは自律神経系の活動指標とされる一方で、免疫調節機構にも関与しており、歯周病患者や喫煙者の生体内で産生量の増加が報告されている。タバコはアセチルコリン受容体を介して歯周組織の免疫抑制や炎症反応を起こし、歯周病の発症と進行に関わるとされる。そこで、歯周組織に対する影響を調べる為に、ニコチン添加時の歯根膜線維芽細胞のChgA産生量を検索した。歯周組織のモデルとして正常ヒト歯根膜由来線維芽細胞(HPdLF)を用いて、非添加群(対照)と、受動および能動喫煙に相当する硫酸ニコチン添加群を一定時間培養した。HPdLFのChgAの産生量は培養液中のChgA濃度をELISA法にて、ChgA遺伝子発現はqPCR法を用いて定量した。また、免疫組織化学染色法を用いて確認した。対照のHPdLFは、ChgAをわずかに産生し、免疫組織化学的にChgAの陽性反応が認められた。ニコチン添加のHPdLF群ではChgAのmRNA発現量とタンパク産生量および免疫染色の陽性率がいずれも増加した。それらの量は能動喫煙相当よりも受動喫煙相当のニコチン濃度で高値を示した。ヒト歯根膜由来線維芽細胞(HPdLF)はChgAを産生し、ニコチンによりChgAの産生が増加することが明らかとなった。またChgAの産生量は受動喫煙相当で最も高かった。

P2-81

歯根膜形成における Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) の免疫組織化学的局在について

○畠山 雄次¹、畠山 純子²、岡 暁子³、敦賀 英知¹、稲井 哲一朗¹、沢 禎彦¹ (福歯大 生体構造 機能構造、²九大 院歯 分子口腔解剖、³福歯大 成育小児)

【目的】歯根膜はセメント芽細胞を含む多様な細胞が含まれている組織である。Lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1) は細胞膜およびリソソーム膜にみられる膜タンパク質であるが、セメント芽細胞由来細胞に発現していることが報告された。しかし、歯根膜における LAMP-1 発現細胞の局在は不明であることから、歯根膜形成過程における免疫組織学的検討を行った。【方法】胎生 15 日齢および生後 1 週齢の歯胚、2 週齢および 4 週齢マウスの下顎臼歯を対象として、それぞれを固定および 10% EDTA にて脱灰後、パラフィン包埋し連続切片を作成した。それぞれの週齢の切片に対し、抗マウス LAMP-1 抗体を用いた免疫組織化学染色を行った。【結果】胎生 15 日および生後 1 週齢において歯小囊組織の細胞は LAMP-1 抗体に対する陽性反応がわずかであった。生後 2 週齢において歯根膜における細胞に陽性反応がみられたが、根尖周囲の歯根膜の細胞の反応は少なかった。生後 4 週齢において歯根膜の細胞および有細胞セメント質表面の細胞に陽性反応がみられた。【考察】歯小囊の細胞の反応がわずかであった一方、歯根膜およびセメント質表面の細胞に抗 LAMP-1 抗体に対する陽性反応がみられたことから、歯小囊から歯根膜に組織分化するにしがたい LAMP-1 をより強く発現する細胞が出現する可能性が示唆された。

P2-83

ラット臼歯歯胚における LEF1、SP6、P-Smad1/5/8 の分布

○森口 美津子¹、山田 まりえ²、見明 康雄¹、山口 康昭²、山本 仁¹ (東歯大 口腔超微構造、²新潟医療福祉大 医療技術 理学療法)

【目的】LEF1 は Wnt シグナル伝達経路の転写因子で象牙芽細胞の分化をコントロールする。エナメル芽細胞の分化や機能を促進する SP6 は、Wnt と BMP のシグナル伝達経路を仲介する転写因子と考えられ、その過剰出現により LEF1 が消失するとされている。故に LEF1 と SP6 は互いに拮抗して機能すると考えられるが、これについて in vivo で詳しく検索した報告は見られない。そこでエナメル芽細胞や象牙芽細胞における LEF1、SP6、P-Smad1/5/8 (BMP 経路の活性化転写因子) を免疫組織化学的に検索し、三者の関係について考察した。【方法】材料は胎生 19 日、生後 10 日のラット臼歯歯胚で、固定後パラフィン切片を作成して、抗 LEF1、抗 SP6、抗 P-Smad1/5/8 による免疫反応を行った。【結果】胎生 19 日では SP6 と P-Smad1/5/8 はエナメル上皮とその直下の間葉細胞の核に陽性反応を示したが、LEF1 のそれらの反応は弱い傾向を示した。生後 10 日では SP6 と P-Smad1/5/8 はエナメル芽細胞と象牙芽細胞の核に明瞭な反応を示し象牙芽細胞では不明瞭であるが、LEF1 は逆に前象牙芽細胞の核にのみ明瞭な反応を示した。【考察】SP6 と P-Smad1/5/8 は LEF1 に置き換わるように相反する部位の上皮系および間葉系の細胞に分布したことから、LEF1 は前象牙芽細胞にあって象牙芽細胞の分化をコントロールし、SP6 は LEF1 に代わって象牙芽細胞とエナメル芽細胞に出現し、BMP 経路を活性化してその分化と機能に関与することが示唆された。

P2-82

マウス歯胚における Prickle1 および Prickle2 の局在の蛍光抗体法による検出

○小原 伸子¹、入江 一元¹、柴田 俊一² (北医大 歯 組織、²東歯大 顎顔面解剖)

【目的】上皮細胞の平面内極性を制御する Planar cell polarity (PCP) シグナル経路の構成要素は、平面内極性以外にも発生過程の様々な事象に関わっていることが明らかになりつつある。PCP シグナル経路の様々な要素の遺伝子発現を in situ hybridization により検索した結果、マウス歯胚の発生過程で、Prickle1 は星状網で、また Prickle2 は一次エナメルノットで明らかな発現の増加がみられた。これらの分子はその機能と関連して特異的な細胞内局在を示す場合があることが知られているので、本研究では分子の局在を調べた。【方法】材料はマウスを用い、凍結切片を作製し間接蛍光抗体法により観察した。【結果と考察】Prickle1、Prickle2 ともに遺伝子発現について得られている結果とほぼ矛盾の無い分布が観察されたが、他の系で観察されるような膜での非対称的な分布や核内への集積はみられなかった。いっぽうで、ごく少量の Prickle1 および Prickle2 分子が点状に染色されるのが、歯胚の上皮および間葉、さらには歯胚外の組織においてもいたるところで観察された。アセチル化チューブリンに対する抗体を用いた二重染色の結果、これら点状の分布は中心小体と密接な関係にあることが分かり、両者の中心小体との位置関係は異なっていた。これらの結果から、2つの分子が歯の発生に特異的に関わっている可能性と同時に、これら分子のまだ知られていない普遍的な役割の可能性が示唆された。

P2-84

両生類下顎骨における甲状腺ホルモンレセプターの発現について

○三輪 容子¹、山口 泰平²、島田 和幸³、佐藤 巖¹ (日歯大 生命歯 解剖 1、²鹿大院医歯 健康科学 発生発達成育、³鹿大院医歯 神経病 人体構造解剖)

【目的】哺乳類において器官再生臓器の分子機構解析では in vitro での研究が主体で in vivo では肝臓部分切除など一部の臓器・条件に限られ、顎顔面領域での器官再生についてはほとんど解明されていない。一方、両生類は四肢や眼球など幅広い器官で再生機能について分子レベルから観察されており、顎顔面領域でも顎骨を切除後に歯や歯周組織も含めほぼ完全な形で再生することが報告されている。このことから歯胚原器を誘導する要素が再生時の顎骨に存在すると予測される。【方法】本研究では顎骨再生過程と甲状腺ホルモンレセプター (TH/THR) 系との関連性を考え、再生過程での甲状腺ホルモンレセプターの発現を免疫染色法と in-situ ハイブリダイゼーションを用いて発現の時期と局在性を検討した。【結果と考察】甲状腺ホルモンレセプターは歯胚の形成過程において象牙芽形成と石灰化開始期において象牙芽細胞の歯冠側で強い発現が見られた。甲状腺ホルモンは脊椎動物で共通に存在しており、特に両生類では変態に大きく関与し成長時には脱皮を誘発する因子と考えられている。顎顔面の器官再生についても何らかの影響を与えている可能性が高いことが示唆された。本研究は平成 23、24 年度科学研究費補助金 若手 B (研究課題番号: 23792117) の助成を受けたものである。

P2-85

Calcifying cystic odontogenic tumor における Notch シグナルの免疫組織化学的検討

○中野 敬介^{1,3}、落合 隆永¹、辻極 秀次²、長塚 仁²、長谷川 博雅^{1,3}、川上 敏行³ (1松歯大 歯 口腔病理、2岡大 院 口腔病理病態、3松歯大 院 硬組織疾患病態解析)

【背景】歯の形成は歯原性上皮組織と歯原性外胚葉性間葉組織の複雑な相互作用下に行われる。Notch はこのプロセスに関連する重要な因子であり、腫瘍の組織発生や細胞分化への関与が示唆されている。そこで、上皮と間葉由来の腫瘍成分からなる混合性歯原性腫瘍の Calcifying cystic odontogenic tumor (CCOT) について、Notch シグナル関連因子の発現状況を免疫組織化学的 (IHC) に検討した。【方法】検索材料はマラヤ大学歯学部口腔病理学講座によって診断された CCOT5 症例で、Notch とそのリガンドである Jagged、Delta の発現状況を IHC によって検討した。【結果と考察】腫瘍胞巣には Notch1、Notch4 および Jagged1 の陽性反応があり、それらの分布様式は類似していた。また幻影細胞では Notch1 と Jagged1 の強陽性反応があった。一方、腫瘍胞巣に Notch2、Notch3、Jagged2 および Delta の発現はなかった。腫瘍の固有間質には Notch3 および Notch4 の陽性反応があった。これらの結果は、Notch-Jagged シグナル系が CCOT の腫瘍組織形成と幻影細胞の出現に重要な役割を有することを示唆している。【共同研究者】 Prof. Siar CH, Univ. of Malaya, Malaysia

P2-87

Amelogenesis imperfecta and gingival hyperplasia occurred in the FAM20A deficiency mice

○安 春英¹、隈部 俊二¹、中塚 美智子¹、上田 甲寅¹、乾 千珠子¹、岩井 康智¹ (1大歯大 口腔解剖)

FAM20A is a member of family of related proteins that has been named family with sequence similarity 20 (FAM20) with three members (FAM20A, FAM20B and FAM20C) in mammals. Recently, some studies have reported that patients with Amelogenesis Imperfecta caused by FAM20A mutation displayed several dental phenotypes including hypoplastic enamel, failure of tooth development and gingival hyperplasia. In the present study, we aimed to clarify how the loss of FAM20A protein influenced the development of dental tissues in the lineage 230 mouse which we had reported previously. Immunohistochemical study indicated that FAM20A protein expressed in osteoid tissue and tooth germ of lineage 230 normal mice, but does not expressed in lineage 230 homozygous mice. The light microscopic study demonstrated hypoplastic enamel and gingival hyperplasia in the lineage 230 homozygous mice. In conclusion, this study revealed that the FAM20A protein is required for enamel formation and gingival growth in mice. Nonmember collaborator: Hak Hotta (Div. of Microbiology, Kobe Univ. Grad. Sch. of Medicine).

P2-86

Quenching Probe 法による歯髄 DNA からの遺伝子解析

○堤 博文^{1,2}、伊澤 光^{1,2}、丸山 澄^{1,2}、小室 歳信^{1,2} (1日大 歯 法医学、2日大 総歯研 社会歯)

【はじめに】我々は、「蛍光消光現象」(Quenching Probe (QP) 法)による ABO 式血液遺伝子型検査(以下 ABO 式検査)の他に、ABO 式検査とアメラロゲン領域を指標とした性別判定および ABO 式検査と RH 遺伝子型検査(Rh-CcD、-ED および -eD 遺伝子)の同時判定法について検討した。【試料および方法】試料は、室温で5~25年間保存された32歯から抽出した歯髄 DNA を用いた。それぞれの検査に用いるプライマーと Q プローブ(日鉄環境エンジニアリング)を作製し、リアルタイム定量 PCR 解析システム Mx3000P(アジレント)を用いて DNA を増幅した後、Melting curve を作成し解析した。反応溶液は LightCycler 480 Genotyping Master 液、Uracil-DNA Glycosylase (いずれもロシュ)、リファレンス Dye、プライマー、プローブおよび鋳型 DNA 2μl(1ng~20ng)、計 20μl とした。PCR 条件は 95℃・10 分行った後、95℃・10 秒、62~69℃・20~40 秒、72℃・10 秒を 40~50 サイクル行った。【結果・考察】歯髄 DNA を試料とし、QP 法による ABO 式検査、性別および RH 式検査の同時判定は可能であった。本法による ABO 式検査は従来法に比べプローブ数・PCR 回数は少なく済み、性別判定においてもプライマーの数は少なく済み。また、本法に用いたプローブは標的塩基に特異的に結合し、プローブ末端に化学修飾することにより、従来法で認められた増幅エラーによる誤判定がなくなり、本法は正確・簡便・迅速な検出法である。

P2-88

マラッセ上皮細胞の特異性

○倉重 圭史¹、近藤 有紀¹、村井 雄司¹、齊藤 正人¹、安彦 善裕² (1北医大 歯 小児歯、2北医大 歯 口腔病理)

【目的】

マラッセ上皮遺残 (ERM) は、間葉組織中に埋入された上皮である。歯周組織内において増殖傾向を示さず、上皮塊として残存するため休眠状態にあるといわれているものの、cyclin dependent kinase (CDK) や Telomera に関する詳細な報告はない。本研究では、ブタ ERM 細胞とブタ歯肉上皮細胞 (OE) と比較による ERM の特異性の検索を行うことを目的とした。

【方法】

OE および ERM を培養し、MTT assay による増殖能の比較、cDNA を作製し Telomere Reverse Transcriptase (tert)、nanog、stat3 の特異的プライマーにより RT-PCR を行った。また、ケラチンによる分化程度、p27 および CDK による細胞周期についての免疫蛍光染色を行った。

【結果】

培養細胞において OE に比較し ERM が有意な増殖を呈し、RT-PCR では ERM に tert の強発現を認めた。また、ERM に幹細胞マーカーである nanog および stat3 の発現していることが明らかになった。免疫蛍光染色において p27 の核内での陽性発現を認めた。

【考察】

ERM は、組織内では小塊とし増殖傾向を認めないものの、培養細胞において、tert の強発現を呈するため、著明な増殖能をもつこと可能性が明らかになった。また、ERM において p27 の核内陽性発現から組織内では、G0/G1 期にある可能性が示唆された。

P2-89

エナメル芽細胞の接着における DCC/Netrin-1 相互作用の関与

○中川 綾子¹、後藤 哲哉²、片岡 真司²、長尾 怜美¹、森川 和政¹、小林 繁²、牧 憲司¹ (九歯大 口腔機能発達、²九歯大 頭頸部構造解析)

【目的】歯冠の形態形成は内エナメル上皮の増殖によって制御される。歯冠外形の完成後、内エナメル上皮はエナメル芽細胞に分化し、エナメル質基質を分泌する。近年の研究で、接着分子である ameloblastin がエナメル芽細胞同士を拘束することにより細胞の増殖を抑え、分化状態の維持に関与することが示された。DCC は細胞膜に発現する依存型レセプターであり、そのリガンドである Netrin-1 との相互作用を通じて、神経軸索の誘導、細胞接着、アポトーシス制御など様々な役割を果たす。本研究は、DCC の持つ細胞接着の制御に着目し、ameloblastin の分泌に対する DCC/Netrin-1 の相互作用について考察した。【方法】生後 5 日から 19 日 (P5-P19) のマウスから上顎第三臼歯歯胚 (M3) を取り出し、通常に従って固定・脱灰し、凍結切片を作製した。切片はそれぞれ Netrin-1、DCC、ameloblastin に特異的な抗体を用いて染色され、免疫組織化学的に観察した。【結果と考察】P8 の M3 のエナメル芽細胞歯髄側先端において、Netrin-1 の発現が見られた。P11 に Netrin-1 および DCC の共発現が見られた。以降、歯冠期の間発現は持続するが、歯冠の完成した P19 に発現は観察されなかった。ameloblastin の発現は、P11 以降にエナメル芽細胞の歯髄側先端および側面で発現し、以降、P19 まで観察された。以上より、DCC は ameloblastin の分泌を制御することで、エナメル芽細胞の分化を維持し、歯冠の形態形成に関与すると推察された。

P2-91

ラット炎症歯髄に対する薬物輸送担体の遺伝子発現解析

○大倉 直人¹、重谷 佳見¹、細矢 明宏²、吉羽 永子¹、吉羽 邦彦¹、興地 隆史¹ (新大 歯 うち、²松歯大 口腔解剖二)

薬剤輸送担体 (トランスポーター) は体内における薬剤や生理活性物質に対して細胞膜を隔てた内向 / 外向輸送の重要な機能タンパクであり、様々な臓器で多種におよぶトランスポーターが発見されている。しかし、歯髄組織においてはその役割は不明であり、基質輸送解明の基礎となるトランスポーター解析は我々を除いてほとんど行われていない。そこで本研究では、遺伝子工学的手法によって正常歯髄および実験的炎症歯髄に対するトランスポーター発現の比較解析を行い、歯髄炎時でのトランスポーターにおける役割の一端について解明することを目的とした。8 週齢の Wistar 系ラットの上顎切歯歯髄に LPS を貼付することで歯髄炎を誘発させ、術後 1、3、6、12 および 24 時間で歯髄を摘出し、これを基に cDNA を作製し、RT-PCR ならびにリアルタイム PCR を行った。本研究では、LPS で誘発した炎症歯髄に対して、PGE2 輸送に関与するとされている prostaglandin (PG) transporters (Pgt) や非ステロイド性抗炎症薬の輸送に関与するとされている multidrug resistance-associated protein 4 (Mrp4) の mRNA 発現レベルが経時的に変化することが確認された。これらトランスポーターが歯髄炎の病態形成や炎症歯髄での薬物動態調節に関与している可能性が大きく示唆された。

P2-90

実験的歯間分離によりマウスの歯髄に発現する硬組織関連因子の免疫組織化学的検討

○佐藤 将洋¹、中野 敬介^{2,3}、長谷川 博雅³、川上 敏行² (松歯大 歯科保存 2、²松歯大 総歯研 硬組織疾患病態解析、³松歯大 歯 口腔病理)

実験的歯間分離のストレスが歯髄に及ぼす影響について、硬組織関連因子発現の観点から免疫組織化学的 (IHC) に検討した。実験には ddY 系雄性マウス 36 匹を使用した。イソフルランの吸入による全身麻酔下にて、マウスの上顎右側の第一臼歯 (M1) と第二臼歯 (M2) の間に口蓋側からウェッジを 30 分 (30 分群) ないし 3 時間 (3 時間群) 挿入し、その直後から最大 1 週間後まで経時的に、また対照として反対側 (無処置) から試料採取を行った。当該歯根の歯髄の横断像を得るように厚さ 4μm の水平断連続切片を作製し、病理組織学的ならびに IHC により検索した。対照群の歯髄では血管内皮細胞や歯髄固有細胞に Runx2 と ALP の弱い発現があり、これは咀嚼や舌圧などの生理的メカニカルストレスに対して発現していると推察された。実験群では、30 分群と 3 時間群ともに Runx2 の発現は 24 時間後にほぼ最大を呈し、以後その発現は徐々に消退し、1 週間後対照群と同レベルになっていた。また、ALP においても、30 分群と 3 時間群ともに ALP の発現は Runx2 と同様に 24 時間で最大を呈し、その後発現は弱まり、1 週間後対照群と同レベルにまで低下していた。以上の結果、Runx2 および ALP の免疫組織化学的発現を指標とする限り、臨床的なウェッジ挿入による大きな傷害作用は起きないと考えられた。

P2-92

硬骨魚類条鰭類ガーのカラーエナメル質の免疫組織化学的観察

○笹川 一郎¹、三上 正人²、石山 巳喜夫³、横須賀 宏之³、内田 隆⁴ (日歯大 新潟歯 先端研、²日歯大 新潟歯 微生物、³日歯大 新潟歯 組織、⁴広大院医歯薬保 口腔細胞生物)

【目的】エナメル質の起源を解明する研究の一環として、硬骨魚類条鰭類ガーの顎歯にある collar enamel を主に有機基質の面からを検討した。ガーの collar enamel は形態的類似から、さらに哺乳類由来の抗 amelogenin 抗体に陽性の反応をしめすことから、哺乳類のエナメル質に相当すると報告されている。しかし、collar enamel の有機基質の実体はまだ不明である。【方法】顎歯の collar enamel 形成期の歯胚を材料とし、哺乳類 amelogenin 由来の抗体、抗血清および部位特異抗体を用い、protein A-gold 法 (光顕・電顕) により免疫組織化学を行った。さらに、ウエスタンブロッティングで確認した。【結果と考察】免疫組織化学では、抗 amelogenin 抗体と抗血清、および C 末端と中央部の特異抗体に明瞭に反応する。ウエスタンブロッティングでは、78kDa と 65kDa のところに明瞭なバンドが認められた。これらの結果よりガーの collar enamel では、哺乳類の amelogenin とは異なるが、amelogenin に似たドメインを持つタンパク質の存在が示唆される。

P2-93

古代アンデス住民の類縁関係—歯冠計測値による分析

○北川 賀一¹、真鍋 義孝¹、小山田 常一¹ (長大院医歯薬 顎顔面解剖)

先スペイン期、南米アンデス地域では多様な文化が繁栄した。各文化間の関係は、考古学的には様々な分析がなされているが、各文化を担った人々の関係は不明な点が多い。本研究では、ペルー北部海岸のモチエ (n=36)、シカン (n=22) とチムー (n=4)、南部海岸のパラカス・ナスカ (n=30) とイカ・チンチャ (n=5)、南部高地ウルバンバ川流域のインカ (n=48) の6集団に、スペインとコンタクト後の北部海岸のコロニアル (n=13) を加えた7集団間の関係を、上・下顎第1大臼歯の歯冠計測値により分析した。

その結果、北部海岸では、モチエからチムーにかけて歯が大きくなる傾向が認められた。栄養状態の改善や歯の大きい集団の流入がその原因として考えられる。南部海岸のパラカス・ナスカは北部海岸のモチエによく似ていた。そのほかの海岸部の集団も互いに比較的似ていたが、南部高地のインカは歯が小さく、他の集団とあまり似ていなかった。これらのことは、海岸部の集団では遠隔地でも遺伝的交流があったのに対し、海岸部と高地の集団間では遺伝的交流があまりなかったことを物語っているのかも知れない。

P2-94

乳歯列期重度齲蝕症における *DEFBI* の遺伝子型解析

○青木 伯永¹、今村 泰弘²、王 宝禮^{2,3} (1松歯大 小児歯、2松歯大 薬理、3大歯大 教育開発)

【目的】齲蝕症発症と抗菌タンパク質・ペプチドの作用との関連研究報告は数多くみられるが、宿主要因、特に遺伝的要因との関連性を調べた研究報告は始まって間もない。本研究では齲蝕症発症の遺伝的要因を明らかにするために、口腔内の細菌感染防御機構に大きく関与し、口腔上皮から産生される抗菌性ペプチド、ディフェンシンに着目し、乳歯列期重度齲蝕症とβ-ディフェンシン1遺伝子(*DEFBI*)の3部位 (G-20A・C-44G・G-20A) との関連について検討を行った。【対象と方法】対象は乳歯列期の3歳から6歳の健常児で、コントロール群は齲蝕がない50名、重度齲蝕群は齲蝕経験指数が10以上の50名とした。実験方法はインフォームドコンセント取得後、舌細胞を採取し、ゲノムDNAを抽出した後、これを鋳型としてPCR-RFLP法にて解析を行った。【結果】遺伝子型解析を行った結果、コントロール群、重度齲蝕群共にG-20AではG/Aが、C-44GではC/Cが、G-52AではG/Aが最も高い出現率を示した。また、統計解析を行ったところ有意差は認められなかった。【考察】口腔環境が不良であるにも関わらず齲蝕症を発症しないケースでは、宿主の遺伝的要因による影響がかなり大きいことが示唆されるが、本研究では明らかな相関は認められなかった。このことから、齲蝕症は細菌感染ならびに環境因子も大きく関与した多因子性疾患であることが改めて考えられた。今後、更なる齲蝕症関連候補遺伝子の探索を行う予定である。

P2-95

咬頭切削後の所属リンパ節における歯髄から遊走する樹状細胞の解析

○荒牧 音¹、Bhingare Arundhati²、大野 建州²、張 晨陽²、田上 順次¹、東 みゆき² (1東医歯大院 口腔制御、2東医歯大院 分子免疫)

歯髄には樹状細胞様細胞の存在が報告されているが、その性状および機能については未だ明らかでない。我々は、マウス歯髄にCD11c⁺F4/80⁻とCD11c⁺F4/80⁺の少なくとも2種類の樹状細胞(DC)が存在し、咬頭切削処理2時間後には切削側歯髄に移動することを報告してきた。なかでも、CD11c⁺F4/80⁺細胞は2時間後に共刺激分子CD86を発現し、24時間後では消失することから、これらの細胞は所属リンパ節(RLN)に遊走したことが推測された。本研究では、切削刺激後のRLN(顎下リンパ節)を解析し、歯髄から遊走したと考えられるDCを同定するとともに、その細胞表面発現型について検討した。切削後のRLNにおける総細胞数は、10-18時間で増加した。未処理マウス顎下リンパ節と比較して、咬頭切削マウスRLNではGr-1⁺CD11b⁺(Fr1)細胞の顕著な増加が認められた。これらの細胞は、CD11c^{low}F4/80⁺であり、CD11c⁺F4/80⁺のGr-1⁺CD11b⁺(Fr2)細胞と区別可能であった。Fr1細胞は歯髄から遊走した細胞であることが示唆された。この細胞は、CD207CD317で、CD326、CD103、CD209を低く発現していた。また、CD80、CD86、MHC class II発現が比較的低いことから、免疫寛容誘導性のDCであることが示唆された。

P2-96

埋伏過剰歯の幹細胞の特性について

○庄井 香¹、青木 和広²、大谷 啓一²、下川 仁彌太¹ (1東医歯大院医歯 小児歯、2東医歯大院医歯 硬組織薬理)

【目的】近年、ヒト歯髄や歯小囊には幹細胞が存在することが明らかとなっている。東医歯大学歯学部附属病院小児歯科外来では年間約70症例の埋伏過剰歯摘出手術が行われている。それらは感染のリスクが少なく、幹細胞の有用なリソースであるといえる。今回、摘出埋伏過剰歯より歯髄および歯小囊を採取し、幹細胞の特性について比較検討した。【材料と方法】本学小児歯科外来にて摘出された過剰歯の歯髄および歯小囊を採取し、その組織からRNAを抽出し、遺伝子発現を解析した。また、歯髄細胞および歯小囊細胞を培養し、細胞表面抗原および遺伝子発現を解析すると共にin vitroで分化誘導を行い多分化能を調べた。【結果と考察】過剰歯歯髄、歯小囊組織およびそれらの培養細胞から抽出したRNAから、幹細胞マーカーとされるOct4、NanogおよびSox2の発現が認められた。培養細胞における細胞表面抗原の解析では、CD146は70~90%、CD90は90~100%、CD105は3~7%の細胞で陽性であったが、CD45は陰性であった。in vitroの分化誘導では、骨芽/象牙芽細胞、軟骨形成細胞および脂肪細胞への分化が認められた。以上より、埋伏過剰歯歯髄および歯小囊由来細胞には間葉系幹細胞に類似した細胞が同程度存在することが示唆された。

P2-97

フォスフォセリンとカチオン・デンドリマーによる石灰化
 ○藤沢 隆一¹、田村 正人¹ (¹北大 歯 口腔分子生)

【目的】硬組織の石灰化においては、酸性リントタンパク質が重要な役割を演じている。たとえば、象牙質形成では、象牙質リントタンパク質がヒドロキシアパタイトの核形成を行うことが知られている。本研究では、リントタンパク質のモデルとして、フォスフォセリンとカチオン・デンドリマーの複合体を用い、リン酸基の石灰化における役割について検討する。【方法】試験管内石灰化系としては、タンパク質またはデンドリマーをスポットしたナイロン膜を、カルシウムまたはリン酸イオンをしみこませたる紙でサンドイッチする系を用いた。カルシウムイオンとリン酸イオンは両側から拡散していった、膜上にリン酸カルシウム結晶を沈着させる。形成された結晶は、アリザリンレッドによって染色する。なお、カチオン・デンドリマーは分子表面に多数のアミノ基を有している。【結果と考察】カチオン・デンドリマーまたはフォスフォセリン単独では、軽度の石灰化促進効果が見られた。両者が共存すると、この石灰化促進効果が、特に低濃度領域において増強された。なお、グルタルアルデヒドによって、両者を共有結合しても、増強効果の上昇は見られなかった。また、この促進効果は、リン酸基をブロックするポリ・アルギニンによって阻害された。フォスフォセリンは、デンドリマー表面に結合して、リントタンパク質類似の酸性クラスターを形成して Ca イオンを集積し、石灰化を促進すると考えられる。

P2-98

ラット切歯における Vangl1 と Celsr1 の局在
 ○西川 純雄¹、川本 忠文² (¹鶴見大 歯 生物、²鶴見大 歯 RI 研究セ)

ラット切歯は1本の歯でそのエナメル質形成と象牙質形成の全形成過程を観察できる利点がある。平面内細胞極性は apical-basal polarity とは別な細胞極性で、組織や器官の形態形成に役割を担っている。平面内細胞極性タンパク質の Vangl1 と Celsr1 の局在を蛍光免疫組織化学により基質形成期のエナメル芽細胞と象牙芽細胞について検討した。9日齢ラットの未固定非脱灰切片を作製し、抗 Vangl1 抗体(G-17, Santa Cruz)と抗 Celsr1 抗体で標識し、FITC 標識または Alexa488 標識二次抗体で可視化した。この結果 Vangl1 は分化期の内エナメル上皮と予定中間層細胞に、スポット状に散在して反応が見られた。基質形成期ではエナメル芽細胞上の反応が減少しているが、中間層にはスポット状の反応が多くみられた。一方象牙芽細胞には反応が見られなかった。Celsr1 はエナメル芽細胞を含むエナメル器の上皮細胞には反応が見られないが、象牙芽細胞では象牙質形成開始直後から強い反応がみられた。Vangl1 と Celsr1 はいずれも膜タンパク質で、平面内細胞極性のコアとなる要素である。別な平面内細胞極性タンパク質の frizzled-3 と Vangl2 もエナメル芽細胞中に存在することが報告されている。エナメル質形成や象牙質形成に平面内細胞極性が関わることが示唆される。

P2-99

ラット炎症歯髄モデルにおける膜結合型プロスタグランジン合成酵素 -1 発現細胞の同定
 ○深田 哲也¹、戸円 智幸¹、橋本 修一¹ (¹日歯大 生命歯 共同利用研究セ アイソトープ研究施設)

緒言) プロスタグランジン (PG) E₂ は多様な作用を有する脂質メディエーターである。炎症時には種々の組織において、炎症の増悪・寛解に関与しているとされる。炎症歯髄においても PGE₂ 含有量の増加とその合成酵素の一つであるシクロオキシゲナーゼ (COX)-2 の発現を確認している。さらに我々はラット歯髄炎症モデルにおいて COX-2 のみでなく、その下流の合成酵素の一つである膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES)-1 の発現が増えることを報告した。しかし、歯髄炎症時に mPGES-1 が歯髄のどの細胞で発現するかは明らかではない。そこで我々はラット歯髄炎症モデルを用い mPGES-1 発現細胞の同定を試みた。方法) 7 週齢雄性 wistar 系ラットの下顎切歯に麻醉下で深さ 5 mm の窩洞を形成し、窩洞形成部を外部との交流が無いように仮封した。窩洞形成の 1 日後に下顎切歯を摘出し、通常に従いパラフィン切片ならびに凍結切片を作成した。切片はそれぞれの酵素に特異的な抗体を用いて染色した。結果・考察) 正常歯髄と比較して炎症惹起歯髄では抗 mPGES-1 抗体並びに抗 COX-2 抗体陽性細胞が顕著に増加していた。両酵素の局在と単球系細胞のマーカー抗原 CD-68 を共染色すると同一の細胞が染色された。また、一部には、mPGES-1、COX-2 陽性の繊維芽細胞も観察された。これらのことから、ラット歯髄炎症モデルにおける PGE₂ 産生増加には単球系細胞や繊維芽細胞が関与していると考えられる。

P2-100

初期軟骨分化における CCN3 の機能解析
 ○川木 晴美^{1,2}、久保田 聡²、尾上 一平^{1,3}、近藤 雄三^{1,3}、神谷 真子¹、高山 英次¹、近藤 信夫¹、滝川 正春² (¹朝日大 歯 口腔生、²岡大院医歯薬 口腔生、³朝日大 歯 インプラント)

CCN ファミリーは共通構造をもつ多機能分泌タンパク質群であり、一部のメンバーが骨形成に重要な因子であると示唆されている。我々はマウス肋軟骨由来の軟骨細胞を用いた解析から CCN3 が軟骨では細胞増殖と分化をメンバー中で唯一抑制する機能を示すことを報告してきた。一方で、CCN3 はメンバー中では四肢発生の最も早期に発現していることを見出し、内軟骨性骨化過程の調節に寄与する因子であることを報告してきた。そこで本研究では、四肢発生初期の軟骨形成期に他のメンバーに先駆けて発現する CCN3 の機能を解析した。胎生 11.5 日のマウス肢芽を酵素処理して得た細胞にリコンビナント CCN3 あるいは CCN3 をターゲットとする siRNA を添加し増殖・分化について検討した。その結果、CCN3 は肋軟骨由来の軟骨細胞では増殖とプロテオグリカン合成、長期培養後の石灰化を抑制するのに対し、肢芽由来の細胞では増殖の促進、およびアグリカンの mRNA 発現促進、プロテオグリカン合成を促進した。以上のことから軟骨の初期分化過程では、CCN3 は細胞増殖・分化を促進し四肢発生に貢献していることが示唆された。(会員外共同研究者: Nouredine Lazar and Prof. Bernard Perbal)

P2-101

op/op マウス大腿骨における活性酸素合成酵素の発現

○安部 仁晴¹、柏原 祥顕^{1,2}、高橋 進也³、中川 敏浩¹、渡邊 弘樹¹ (奥羽大 歯 生体構造 口腔組織、²奥羽大 院歯 口腔組織構造生物、³奥羽大 歯 口腔外科)

【目的】これまで我々はマウス大腿骨を用い、軟骨内骨発生における活性酸素合成酵素 (Noxファミリー) の発現を検索し、活性酸素が軟骨細胞の増殖と分化および骨基質形成に関与することを本学会にて報告した。今回は、骨代謝異常疾患の一つである大理石骨病モデルマウスを用い、正常マウスと比較検討した。

【材料と方法】材料には3~40週齢 *op/op* マウス大腿骨を用いた。方法は4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定、大腿骨を摘出後、同液にて浸漬固定、10% EDTAにて脱灰、パラフィン包埋した。薄切後、通法に従い免疫組織化学的染色を行い顕微鏡観察した。

【結果】*op/op* 3週齢でNox4は軟骨内骨発生の各層における軟骨細胞に観察されたが、Nox1、Noxal、Noxolは増殖層と肥大層の細胞に局限していた。18週齢では反応性は減弱しているもののNox4は、依然として多くの軟骨細胞に陽性反応がみられた。40週齢ではNox1、Noxal、Noxol陽性の軟骨細胞は、ほとんど観察されなかったが、Nox4に陽性を示す軟骨細胞が散在していた。

【考察】*op/op* マウス大腿骨でもNoxの発現が観察され、活性酸素は軟骨細胞の増殖分化だけではなく、その後のアポトーシスを含めた軟骨細胞の死滅過程に関与することが考えられた。

P2-103

ラクトフェリンは細胞分化を制御し、卵巣摘出ラットの骨量減少を抑制する

○二宮 禎¹、細矢 明宏²、平賀 徹²、小出 雅則¹、中村 浩彰² (1松歯大 総歯研、2松歯大 歯 口腔解剖)

【背景・目的】ラクトフェリン (bLF) は、免疫作用や抗菌作用のみならず、骨量低下抑制や骨強度増加作用を有することが報告されている。しかしながら、bLFの骨代謝に関する効果は、詳細に検討されていない。今回、我々は、bLFの骨粗鬆症ラットの骨組織に対する効果および細胞分化に対する作用を検討した。

【方法・結果】卵巣摘出SDラットに一日一回、bLF (10、100 mg/kg BW) を経口投与し、マイクロCTで骨量変化を観察した。実験開始2週目より、bLF投与群において骨量減少を抑制する効果が認められた。組織化学的評価により、bLF投与が破骨細胞数を減少させることが明らかになった。また、未分化間葉系細胞株C3H10T1/2細胞を用いた実験において、bLFは、*osterix*、*runx2*、*osteocalcin*の遺伝子発現を高め、骨芽細胞分化を亢進した。一方、骨髄細胞を用いた破骨細胞分化の実験では、bLFは *cathepsin K*、*calcitonin receptor*、*nfatc1*の遺伝子発現を低下させ、破骨細胞分化を抑制した。そして、*survival assay* および *pit assay* において、bLFは、破骨細胞の生存および吸収能を抑制することが示された。

【結論】bLFは、破骨細胞分化を抑制および骨芽細胞分化を促進することで、骨粗鬆症モデルラットの骨量低下を抑制する。

P2-102

遷延する炎症における骨再生阻害因子 TGF-β1 の阻害機序の解明

○岡田 晶子¹、落合 宏美^{1,2}、斎藤 暁子¹、東 俊文^{1,2} (1東歯大 生化、2東歯大 ハイテクリサーチセンター)

【目的】炎症が長期に及ぶことが骨再生阻害要因となる一員として炎症性サイトカイン TGF-β1 に注目し、そのメカニズムを解明する。【方法】ヒト歯根膜細胞を TGF-β1 を添加した骨分化誘導培地 (OBM) で培養した (一回投与群)。長期炎症モデルとして、TGF-β1 を含む OBM を 12 時間毎に交換し複数回投与群を設定し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果を元に両条件下において、IGF-1 およびリン酸化 Akt の検出を行った。【結果】 TGF-β1 複数回投与群において、IGF-1 添加により ALP 活性、骨分化マーカー遺伝子、および IGF-1 mRNA の発現が著しく回復した。複数回投与群において IGF-1 タンパクと Akt のリン酸化が著しく減少した。【考察】反復性の TGF-β1 投与は IGF-1 の発現とシグナル伝達を阻害することで骨分化を抑制していることが示された。また、IGF-1 を補うだけで抑制されるはずの骨分化が完全に回復可能であった。このことから、持続的に分泌される TGF-β1 が IGF-1 の発現を抑制し骨破壊および骨再生を制御しており、IGF-1 の補填がそれに対する治療に役立つ可能性が示唆された。

P2-104

BMP 誘導骨再生におけるゼラチンのペプチド担体としての有用性

○Al Abdullah Md Mamun¹、Masud Khan^{1,2}、Alles Neil¹、田村 幸彦¹、大谷 啓一¹、青木 和広¹ (1東歯大 院歯医 硬組織薬理、2東歯大 GCOE)

W9 peptide (W9) is TNF-α and RANKL antagonist. Gelatin hydrogels are proven to be an appropriate carrier for BMP. The aim of this study is to clarify the feasibility of gelatin hydrogels as a carrier of W9 on BMP-induced bone formation. A critical-defect-calvaria model was applied in five-week-old male C57BL/6 mice. The mice were sacrificed on day 28 after surgery. Micro-CT and DXA analyses revealed that the gelatin hydrogel led to the bone formation by 1μg BMP to the same extent as type I collagen, the classical carrier. Interestingly, the W9 (0.56 mg) accelerated the BMP-induced increase of BMD more than twice compared to BMP alone when the gelatin hydrogel was used. This increase of BMD was significantly higher compared to that when the collagen carrier was used. Our data suggest that gelatin hydrogels could be a better carrier for inducing the anabolic effect of W9 on local bone formation compared to collagen.

Acknowledgments: We thank Prof Yasuhiko Tabata and Dr. Makoto Matsui (Kyoto Univ.) for providing gelatin hydrogel. We also thank Dr. Hisataka Yasuda and Dr. Yuriko Furuya (Oriental Yeast Co., Ltd) for valuable discussion on the anabolic effects of W9 peptide.

P2-105

Osteocyte における sclerostin 遺伝子発現に及ぼすレーザー照射の影響
 ○横瀬 敏志¹、門倉 弘志¹ (奥羽大 歯 歯科 保存 保存修復)

【目的】歯科用レーザーの生体への作用は High Level Laser Treatment (HLLT) としての組織への蒸散作用と Low Level Laser Treatment (LLLT) としての創傷治癒促進作用があると考えられている。しかし現在、LLLT の効果については不明な点が多い。本実験は炭酸ガスレーザー照射がどのように骨細胞に作用するかを調べることを目的とした。【材料と方法】生後4日目のラットの頭蓋骨からコラゲナーゼ酵素液および EDTA 脱灰溶液にて骨細胞を分離した。培養骨細胞についてアルカリフォスファターゼ (ALP) 染色およびスクレロスチンと DMP-1 の免疫染色法を行った。培養骨細胞に炭酸ガスレーザーを照射し、SOST および DMP-1 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて解析した。【結果】培養骨細胞は培養3日目において形態的には突起を伸ばし、ALP 陰性であった。培養骨細胞にはスクレロスチンおよび DMP-1 の発現が免疫染色とリアルタイム PCR 法で共に認められた。炭酸ガスレーザー照射群では対照群に比較して SOST の発現が抑制され、DMP-1 の発現は亢進した。【考察】スクレロスチンは canonical Wnt signaling pathway のアンタゴニストであり、スクレロスチン遺伝子のノックアウトマウスでは骨形成が促進されることが知られている。本実験から、osteocyte における遺伝子発現に炭酸ガスレーザーが作用し、骨代謝に影響することが示唆された。【結論】歯科用レーザーの LLLT 作用は骨細胞の遺伝子発現に影響を及ぼす。

P2-107

ヒストン脱アセチル化阻害剤全身投与による骨形成促進作用の検討
 ○秋葉 陽介¹、野澤 恩美¹、加来 賢¹、魚島 勝美¹ (新大 歯 生体歯科補綴)

目的：抗がん剤、抗癲癇薬として用いられているヒストン脱アセチル化阻害剤 (HDACI) は、遺伝子配列に影響を及ぼすことなく (エピジェネティクス) DNA の転写活性、遺伝子発現を上昇させる。骨代謝においては骨芽細胞の機能促進と破骨細胞の抑制により骨形成を促進することが知られている。演者らはこれまでに、in vitro において HDACI が骨形成促進に有効である可能性を示した。本研究では、HDACI の全身投与による骨形成への影響を検索する。方法：4週齢ラットの上顎両側第一第二臼歯を抜歯し、3週間後から HDACI として Valporic acid (VPA) ((600 mg/kg/day) 投与を開始した。抜歯4週間後にピーソリーマにて直径 1.7 mm の円筒形骨欠損を形成した。骨欠損形成後 7、14、21 日において新生骨形成の組織学的評価を行い、血清中のマーカーより骨代謝動態を検索した。結果と考察：組織学的評価より、窩洞形成後 14 日、21 日の試料において VPA 投与群に有意な骨形成の上昇がみられた。μCT 画像においても同様に窩洞形成後 14、21 日後においてコントロールと比較して多くの新生骨形成が観察された。骨髄より採取した細胞の ALP 活性は VPA 投与群においてコントロールに比較して有意に高かった。以上の結果から比較的短期間の VPA 投与は骨芽細胞の活性上昇を促し、骨欠損修復を促進する可能性が示唆された。

P2-106

骨芽細胞カルシウムチャネルに対するインターロイキンの修飾作用
 ○遠藤 隆行¹、田崎 雅和¹ (東歯大 歯 生理)

【目的】インターロイキン (IL) は慢性炎症、リウマチ、骨粗鬆症などの病的な状態で骨破壊に関与することが知られていたため、炎症性サイトカインと認識されていた。近年、生理的な状態でも骨モデリングに重要な役割を演じることが報告され注目をあびている。そこで、本研究では培養骨芽細胞に全細胞膜記録型パッチクランプ法を適用し、電位依存性カルシウムチャネルに対する IL の効果を調べた。【方法】培養した骨芽細胞 MC3T3-E1 細胞に、全細胞膜記録法パッチクランプ法を適用した。パッチピペット内には人口細胞内液 (主成分：塩化セシウム 150 mM、EGTA 5 mM、グルコース 10 mM、HEPES 10 mM) を充填した。細胞外液はバリウムを主成分とする組成の液 (塩化バリウム 108 mM、HEPES 10 mM) で灌流した。この条件下で、電位固定法で膜電位を -80 mV に固定し、-10 mV への脱分極刺激を与えることにより、全細胞膜を流れるカルシウムイオン電流を記録した。IL は灌流液を解して細胞に与えられた。【結果と考察】実験は3細胞で行った。50 nM の IL-1α、IL-2、IL-4 は MC3T3-E1 細胞のカルシウムイオン電流を促進した。今回得られた結果より、IL が骨芽細胞のカルシウムチャネルを活性化させることにより、細胞の興奮性を増加させる可能性が示唆された。

P2-108

Wnt6/beta-catenin シグナルは DC-STAMP の発現を上昇させることによって破骨細胞の融合を促進する
 ○天野 滋¹、大森 喜弘¹ (明海大 歯 口腔生物再生医工)

【目的】昨年の本学会で、M-CSF と sRANKL で破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞を刺激すると β-catenin が核に移行してこくこと、siRNA を用いてこの β-catenin 遺伝子をノックダウンすると破骨細胞の多核化が抑制され、さらに多核化に関与する DC-STAMP の遺伝子発現が抑制されることを報告した。今回私共は、DC-STAMP 遺伝子発現制御に Wnt/β-catenin シグナルがどのように関与しているか破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞を用いて検討したので報告する。[方法・結果]1) 破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞を M-CSF と sRANKL で刺激したところ、Wnt1、Wnt2b、Wnt5b、Wnt6、Wnt9a の遺伝子発現が破骨細胞の分化段階で認められた。2) M-CSF と sRANKL 刺激によって1日目から発現上昇が認められた Wnt6 を、siRNA を用いてノックダウンしたところ、核内に移行する β-catenin 量の減少、DC-STAMP 遺伝子発現の抑制、さらに破骨細胞の多核化の抑制が認められた。3) DC-STAMP プロモーター領域には NFAT と AP-1 結合配列が存在していることが報告されているが、TCF/LEF 結合配列も存在し ChIP アッセイで β-catenin/TCF 結合が認められた。[考察]M-CSF と RANKL 刺激によって誘導される Wnt6/β-catenin シグナルが DC-STAMP 遺伝子発現を促進し破骨細胞の多核化に関与していることが示唆された。

P2-109

硫酸化 GAGs 可視化における HID-TCH-SP 染色法の応用

○小萱 康徳¹、渡邊 竜太¹、佐藤 和彦¹、江尻 貞一¹ (朝日大 歯 口腔解剖)

【目的】硫酸化 GAGs の検出には、(1) 陽性荷電染料染色法、(2) 抗体染色法、(3) 蛍光分子プローブ法などが適用されている。HID-TCH-SP (high iron diamine thiocarbohydrazide silver proteinate) 染色法は、安価で、細胞内外のすべての硫酸化 GAGs を同時に検出でき、酵素消化法併用で同定も可能であること、さらに包埋後染色法で急速凍結試料にも適用可能といった多くの利点を有している。今回、基底膜や軟骨等に局在する硫酸化 GAGs の超微局在様式を比較検討し、本法のさらなる応用の可能性について考察を加えた。【結果および考察】歯胚基底膜へパラン硫酸の硫酸基部分は、発生初期段階で lamina densa 両側に規則正しく配列、次いで基底膜全体に不規則に配列するようになり、その後前エナメル芽細胞膜陥入部へ集積した。このように本法ではへパラン硫酸の超微局在変化が観察可能であった。急速凍結した軟骨を LRWhite に包埋、超薄切片作製後 HID-TCH-SP 染色を施した試料では、CS、KS 鎖の硫酸基が平滑な軟骨細胞膜から細胞領域基質全体に渡ってほぼ等間隔に局在、時に数珠状配列を呈した。免疫染色法は CS や KS の間接的検出であるのに対し、本法は硫酸基の native に近い局在を直接可視化することができ、石灰化や発生の分野における応用が期待される。

P2-111

NF-κB2 の p100 のプロセッシングは骨代謝において重要である

○大澤 賢次¹、福島 秀文¹、Alles Neil²、青木 和広²、張 皿³、大谷 啓一²、自見 英治郎¹ (九歯大 分子情報生化学、²東医歯大 硬組織薬理、³九歯大 口腔病態病理)

【背景と目的】NF-κB inducing kinase (NIK) の機能欠失型の点変異によって、NF-κB2 の p100 から p52 へのプロセッシングが阻害される aly/aly マウスでは、骨吸収の抑制と骨形成の亢進が認められる。しかし、この骨量増加は p100 のプロセッシングの阻害に起因するのか、あるいは NIK が別の下流分子の機能を抑制することに起因するのかは不明である。そこで、aly/aly マウスと p100 と p52 を共に欠損する NF-κB2 欠損 (NF-κB2^{-/-}) マウスを交配 (aly/aly/NF-κB2^{-/-}) し、骨の表現型を解析し、細胞レベルで検討した。【方法と結果】6 週齢雄の野生型、aly/aly および aly/aly/NF-κB2^{-/-} マウスの骨形態計測を行ったところ、aly/aly/NF-κB2^{-/-} マウスでは aly/aly マウスで認められた骨量の増加は見られなかった。各マウスより骨髄細胞を RANKL で刺激し、また骨芽細胞を BMP2 で刺激すると、aly/aly/NF-κB2^{-/-} マウスでは aly/aly マウスに見られた破骨細胞形成の抑制と骨芽細胞分化の亢進とともに解除された。【考察】aly/aly マウスに見られる骨量の増加は、NIK の別の下流分子ではなく、p100 のプロセッシングの阻害に起因すると考えられる。【結論】NF-κB2 の 100 から p52 へのプロセッシングは骨代謝調節に重要である。

P2-110

NF-κB1 の欠損は非荷重による骨量減少を抑制する

○中村 仁美^{1,2}、Alles Neil³、青木 和広³、増田 渉²、福島 秀文²、大谷 啓一³、牧 憲司¹、自見 英治郎² (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 硬組織薬理)

【目的】力学的負荷は骨量や骨強度を維持する上で重要なファクターの一つである。これまでに、力学的非荷重の条件下で骨組織において NF-κB1 (p50) サブユニットの発現が特異的に上昇することを明らかにした。本研究では、野生型および NF-κB1 欠損マウスに尾部懸垂を行い、骨量減少の程度を比較した。【方法】野生型マウス、NF-κB1 欠損マウスに尾部懸垂を行い、軟 X 線撮影、骨密度測定、および骨形態計測を行った。骨組織より全 RNA を調製し、骨形成マーカー (ALP、オステオカルシン) および RANKL、OPG の発現量を検討した。各マウスの対照および尾部懸垂群より骨髄細胞を調製し、骨芽細胞および破骨細胞を分化誘導した。【結果】野生型マウスを尾部懸垂すると、骨形成の抑制、破骨細胞数の増加と骨形成マーカーの発現が低下したが、NF-κB1 欠損マウスでは骨形成速度、破骨細胞数もほとんど変化せず、骨量減少は軽度であった。しかし、両マウス間で尾部懸垂後の骨組織における RANKL の発現上昇は同程度であった。野生型マウスの尾部懸垂群の骨髄細胞では、骨芽細胞分化の低下と破骨細胞形成が亢進したが、NF-κB1 欠損マウスでは骨芽細胞分化も破骨細胞形成も変化しなかった。【考察】NF-κB1 欠損マウスは、尾部懸垂時における破骨細胞分化の亢進が抑制されることで骨量減少に抵抗性であると考えられる。

P2-112

Jansen 型 PTH/PTHrP 受容体の機能異常の解析

○下村-黒木 淳子¹、竜 佑宗¹、松田 貴絵¹、田中 聖至¹、織田 公光²、網塚 憲生³ (日歯大 新潟生命歯 小児歯、²新大院医歯 口腔生化学、³北大 院歯 硬組織発生生物学)

【目的】人体の骨格組織である骨・軟骨の分化形成において、副甲状腺ホルモン、副甲状腺ホルモン関連ペプチド、及びその受容体 (PTH-R) は重要な役割を果たす。今回、PTH-R の点突然変異によって生じる Jansen 型骨幹端軟骨異形成症の骨格異常について *in vitro* で解析を行った。【方法】野生型および Jansen 型変異 PTH-R (変異型 PTH-R) 遺伝子発現ベクターを、HEK293T 細胞に導入し、各 PTH-R を強発現させた。その後、免疫染色、Western blot および免疫沈降、さらに PTH(1-34) 添加による cAMP 産生について、luciferase assay を行った。【結果と考察】Western blot を行ったところ、PNGaseF 処理前後で異なるバンドパターンを示した。この結果から、野生型 PTH-R と変異型 PTH-R では糖鎖修飾に何らかの違いがあることが示唆された。次に Co-immunoprecipitation を行ったところ、野生型 PTH-R 同士および野生型 PTH-R と変異型 PTH-R が互いに dimer を形成していることが示唆された。さらに免疫染色より、野生型 PTH-R を導入した HEK293T 細胞では細胞膜上に受容体の発現を認めたが、変異型 PTH-R を導入した HEK293T 細胞では細胞膜上への均等な発現が認められなかった。最後に luciferase assay では、変異型 PTH-R は PTH 無添加の状態でも恒常活性を持っていたが、野生型 PTH-R と共発現させた場合、luciferase activity が有意に低下した。以上より、野生型 PTH-R と変異型 PTH-R は相互作用していることが考えられた。

P2-113

関節リウマチ滑膜線維芽細胞様細胞における VE-カドヘリン発現とその誘導機構

○山崎 典孝¹、須藤 遥¹、前田 元太¹、千葉 忠成¹、今井 一志¹ (1日歯大 生命歯 生化)

関節リウマチ (RA) は多発性滑膜炎を主体とする自己免疫疾患で、関節滑膜には炎症、血管新生、滑膜線維芽細胞様細胞 (RSFL) の過増殖等の様々な変化が生じる。滑膜組織への血管新生は内部の細胞へ栄養を供給し、RA の進展に不可欠な役割を果たす。本研究では、RSFL による血管内皮細胞型の VE-カドヘリンの発現とそのメカニズムを検討した。免疫組織学的に VE-カドヘリンは血管内皮細胞とそれに近接する RSFL に陽性反応を示した。培養 RSFL を用いてその誘導機構を検討したところ、VE-カドヘリンは VEGF により誘導され、細胞接着分子として機能することが確認された。RSFL は VEGFR2 を発現しており、インヒビターを用いた実験から古典的 MAPK シグナルが主な VE-カドヘリン発現誘導シグナルであることが明らかになった。RA 滑膜組織で生じる低酸素状態と炎症性サイトカイン TNF α は VE-カドヘリンを細胞外ドメインでシェディングした。RSFL の VE-カドヘリンの発現には VEGF-VEGFR2-MAPK によるシステムが大きな役割を果たすと考えられる。本研究は所属機関倫理委員会の承認のもとに行った。

P2-115

Foxc1 遺伝子の頭蓋冠骨発生における機能

○町田 章彦^{1,2}、奥原 滋¹、原田 清²、井関 祥子¹ (1東医歯大 院医歯 分子発生、2東医歯大 院医歯 顎顔面外科)

DNA binding domain として forkhead domain をもつ転写因子 *Foxc1* は、頭部未分化間葉細胞に発現し、形成過程にある髄膜や脈絡叢の間葉に発現が限局するようになる。*Foxc1* 遺伝子の機能欠損変異ミュータントマウス、*congenital hydrocephalus* (*Foxc1^{ch/ch}*) は、水頭症とともに頭頂部の骨欠損、髄膜の形成不全を認める。*Foxc1^{ch/ch}* では、正常な髄膜発生過程で発現する *Bmp7* などの分子の発現レベルの低下が認められた。一方、未分化状態に関与する転写因子 *Twist1* は、頭部未分化間葉細胞に発現し、髄膜の形成過程でその発現が低下するが、*Foxc1^{ch/ch}* では維持されたままであった。*Bmp7* 欠失マウスでは頭頂部の骨欠損が認められ、また形成過程にある髄膜での *Twist1* の強制発現によって、頭蓋冠骨原基の頭頂部への成長が抑制された。これより、髄膜の発生はその外側に発生している頭蓋冠骨の頭頂部への成長に深く関与している可能性が示唆された。

P2-114

NF- κ B p65 は Smad4 と結合することで BMP2 による骨芽細胞分化を抑制する

○平田-土屋 志津¹、福島 秀文²、片桐 岳信³、諸富 孝彦⁴、青木 和広⁵、永野 健一⁵、大谷 啓一⁵、寺下 正道⁶、自見 英治郎² (1九歯大 齶 蝕制御、2九歯大 分子情報生化学、3埼玉大 ゲノム 病態生理、4福歯大 歯科保存、5東医歯大 院医歯 硬組織薬理、6九歯大 総合診療)

【目的】骨誘導因子 BMP は、転写因子 Smad 依存性に骨形成促進などの生理活性を示す。一方、転写因子 NF- κ B は炎症反応や免疫応答等に関与する。我々はこれまでに、BMP が Smad シグナルの他に NF- κ B も活性化することを明らかにしてきた。今回は、NF- κ B シグナルと BMP/Smad シグナルのクロストークをさらに検討した。【方法】胎生 13.5 日齢の野生型 (WT)、p65 欠損 (p65^{-/-})、p50 欠損 (p50^{-/-}) マウス胎仔から調整した線維芽細胞 (MEF) を用いた。p65、Smad1、および Smad4 の欠失変異体を発現させ、BMP シグナルに対する p65 の作用機序を検討した。【結果】BMP2 で刺激すると、WT MEF と比較して p65^{-/-} MEF では、強い ALP 活性上昇と多数の ALP 陽性細胞が誘導された。しかし、両細胞間で Smad1/5/8 のリン酸化レベルに差は認められなかった。p65^{-/-} MEF に WT p65 を過剰発現させると、BMP2 刺激で誘導される Id1-Luc レポーターの活性が抑制された。p65 の N 末端欠失変異体も同様に抑制したが、C 末端欠失変異体には抑制効果が認められなかった。p65 は Smad1 とは結合せず Smad4 と結合した。この p65 の結合には、Smad4 の N 末端領域が重要であった。【考察】p65 は、Smad 依存性の BMP 活性を抑制する。これは、p65 の C 末端が Smad4 の N 末端と相互作用するためと考えられた。

P2-116

デオキシアデノシンはメソトレキセートによる破骨細胞分化阻害及び炎症性骨破壊抑制を解除する

○屈 鵬飛¹、久木田 明子²、李 銀姫¹、渡邊 敏之¹、成松 加奈子¹、久木田 敏夫¹ (1九大 歯 分子口腔解剖、2佐賀大)

【目的】メソトレキセート (MTX) は破骨細胞と炎症性骨破壊を顕著に抑制するが、その抑制効果が炎症メディエーターでもあるアデノシンの受容体を介した作用により消失することを以前に報告した。今回はデオキシアデノシン (dAd) について検討した。また、アデノシンとデオキシアデノシンの代謝において鍵となる酵素である Adenosine deaminase (ADA) の関与についても検討を加えた。【方法】破骨細胞形成系としてラット骨髄培養系を用いた。炎症性骨破壊の系としてアジュバント関節炎ラット (AA ラット) を用いた。アデノシン受容体や ADA の発現等について半定量的 PCR 法を用いて検討した。また、骨破壊に対する効果について microCT を用いた解析を行った。【結果と考察】MTX は *in vitro* での破骨細胞分化を顕著に抑制した。この抑制効果は dAd の添加により解除された。この抑制解除は A_{2b}AR のアンタゴニスト MRS1754 による影響を受けなかったが、アデノシン受容体 A₁AR、A_{2a}AR、A₃AR のアンタゴニストであるカフェインにより部分的ではあるが有意に阻害された。AA ラットを用いた系で MTX は骨破壊を顕著に抑制したが、dAd の関節腔内投与により MTX による骨破壊抑制が解除され、顕著な骨破壊が認められた。尚、破骨細胞分化系に於いて ADA の発現が認められ、MTX 処理により発現が抑制されたことから、MTX による破骨細胞分化阻害において ADA の発現抑制が関与する可能性が示唆された。

P2-117

コラーゲンゲルにおける HMS0014 間葉系幹細胞の三次元培養による硬組織形成能の評価
 ○中塚 美智子¹、隈部 俊二¹、細矢 明宏²、安春英¹、上田 甲寅¹、乾 千珠子¹、松田 哲史¹、岩井 康智¹ (大歯大 歯 口腔解剖、²松歯大 歯 口腔解剖二)

【目的】ヒト間葉系幹細胞を三次元培養した際の硬組織形成能について評価する。【方法】ヒト間葉系幹細胞 (HMS0014、理研 BRC 提供) を Type I collagen gel に混和して 24well に 7.0×10^5 cells/ml となるよう播種し、70%コンフルエントまで培地として POWEREDBY10 (GP バイオサイエンス)のみ用いて培養を行った。70%コンフルエントまで到達後、POWERED-BY10のみ、または 125 μ g/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, 50 μ g/ml ascorbic acid, 10mM β -glycerophosphate, 10nM dexamethazone 含有 POWEREDBY10 を使用して三次元培養を行った。培地交換後 1日、3日、7日の初期の硬組織形成について組織学的および生化学的手法を用いて観察した。【結果】分化実験開始 3日目では、実験群において位相差顕微鏡像にて石灰化の様相を呈していた。7日目にはさらに顕著に石灰化が認められた。ALP 活性およびオステオカルシン形成量も対照群に比べて上昇していた。一方対照群は実験開始 3日目および 7日目に石灰化の様相を呈していたが、実験群に比べると顕著ではなかった。【結論】ヒト間葉系幹細胞は硬組織形成能を有し、三次元培養にて分化誘導することにより早期に石灰化を開始することが示唆される。

P2-118

マウス下顎頭軟骨の成長における離乳期の影響
 ○加川 千鶴世¹、古山 昭²、大須賀 謙二³、宗形 芳英²、島村 和宏¹ (奥羽大 歯 成長発育、²奥羽大 歯 口腔機能分子生物)

離乳時期の違いにおける顎骨の発達とその特徴を明らかにする目的で、ICR 系マウスを用いて行動実験と組織化学的検索をおこなった。14日に離乳したマウスを早期離乳群、18日・23日離乳を通常離乳群、28日離乳を遅延離乳群(以下、早期離乳群、通常離乳群、遅延離乳群)の3群に分け食餌摂取量、個体成長量、下顎頭軟骨組織の特徴を解析した。行動実験としての食餌摂取量を比較後、摂取量の差が著しい時期の体重と顎骨の大きさを測定した。また、各時期における下顎頭軟骨を構成する細胞層の相違と肥大分化を担う Type10collagen の局在を解析した。その結果、食餌摂取量、体重増加量、顎骨成長量ともに通常離乳群のマウスは発達著しく、次いで早期離乳群、遅延離乳群の順であった。下顎頭組織検索では、遅延離乳群は他群に比べ線維層から肥大細胞層の厚さがうすく、さらに細胞数も少ないという結果が得られた。免疫組織化学的検索による Type10collagen の検索では、早期離乳群と通常離乳群の肥大細胞層に陽性反応が確認されたが、遅延離乳群においては、肥大細胞層よりも軟骨基質部に陽性反応がみられた。これらの結果より、離乳時期の遅延は顎骨の成長を遅らせるのみならず、下顎頭軟骨の骨性にも影響を与えることが示唆された。また、Type10collagen の免疫陽性反応の結果より、下顎頭の骨化様式の特異性も裏付けられた。

P2-119

口腔扁平上皮癌による顎骨浸潤における NF- κ B の役割
 ○多田 幸代^{1,2}、福島 秀文²、大澤 賢次²、自見 英治郎² (九歯大 歯 歯科侵襲制御、²九歯大 歯 分子情報生)

癌組織では恒常的に転写因子 NF- κ B が活性化されることや、NF- κ B の活性化と口腔扁平上皮癌細胞の悪性度が相関することが報告されている。さらに我々は扁平上皮癌による顎骨浸潤モデルを用いて、NF- κ B の選択的阻害剤が顎骨浸潤を抑制することを報告した。本研究では NF- κ B の選択的阻害剤による顎骨浸潤抑制の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、検討を行った。ヒト扁平上皮癌細胞株 SAS 細胞、HSC2 細胞および Ca9-22 細胞を TNF α で経時的に刺激して、NF- κ B のメインサブユニット p65 抗体で蛍光免疫染色すると、刺激後 15分 で p65 の核移行が観察された。同様に Western blotting 法で確認すると、TNF α の刺激により p65 のリン酸化と I κ B α の分解が起こり、経時的に回復した。また、NF- κ B の選択的阻害剤である BAY11-7082 で前処理した後に TNF α で刺激すると、I κ B α の分解および p65 の核への移行が阻害された。さらに BAY11-7082 は TNF α 刺激による各細胞の増殖を抑制した。同様に BAY11-7082 は、TNF α 刺激による各細胞のマトリクスメタロプロテアーゼの発現誘導と基質分解活性を抑制する様子がゼラチンザイモグラフィで確認された。以上のことより、NF- κ B の選択的阻害剤は口腔扁平上皮癌の増殖抑制と基質分解活性を抑制することで顎骨浸潤を抑制すると考えられる。

P2-120

Hypothalamic Pituitary Adrenal (HPA) 軸は骨組織および脂肪組織の調節に重要である
 ○佐藤 毅¹、榎木 祐一郎¹、白井 通彦²、依田 哲也¹ (埼玉医大 医 口腔外科、²九歯大 歯 歯周病制御再建)

心因性ストレスが生体にかかる骨密度低下と肥満に関係することがわかっており、心因性ストレスが骨・脂肪代謝にも影響を与えると考えられている。しかしながら、この恒常性破綻についての科学的検証は不十分である。一方、ストレスにより HPA 軸が活性化されることは知られているが、HPA 軸における骨代謝・脂肪代謝への影響についてはいまだ明らかではない。そこでわれわれは、HPA 軸機能不全を呈する ACTH 受容体 (MC2R) および CRH のノックアウトマウスを用い、骨および脂肪組織について解析を行った。DXA 法による骨密度計測、胎児の骨格標本、脊椎骨・大腿骨における骨形態計測、ELISA 法による骨代謝マーカーの測定、脂肪組織の重量測定・HE 染色などを行った。その結果、MC2R^{-/-} mice では骨量が増加して脂肪量が減少していた。さらには、骨形成率の増加・骨芽細胞のオステオカルシン産生亢進が起こっていたため、この骨量増加は骨芽細胞による石灰化促進に起因することが明らかとなった。また、CRH^{-/-} mice においても骨量が増加して脂肪量が減少していた。HPA 軸機能不全において骨密度増加・脂肪量減少が見られたことから、HPA 軸は骨密度・脂肪量調節に重要であることが示唆された。本研究は、HPA 軸を標的としたストレスを制御する創薬開発にもつながる基礎的研究となると考えられる。

P2-121

骨芽様培養細胞 MC3T3-E1 のアルカリ性ホスファターゼ活性誘導に対する亜鉛の効果
 ○戸田 智幸¹、深田 哲也¹、橋本 修一¹ (日歯大 生命歯 共同研 アイソトープ研究施設)

【目的】我々は、これまで金属イオン除去培地を用いてマウス頭蓋冠由来骨芽細胞株 (MC3T3-E1) に対するアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の誘導について検索してきた。今回、Zn²⁺ 添加による MC3T3-E1 細胞の ALP 活性誘導について検索したので報告する。【方法】MC3T3-E1 培養細胞の ALP 活性は、通常の 1/1000 以下であった (5 pmol/min/μg protein)。この細胞を 24-well plate に播種し、イオン交換樹脂 (キレックス) 処理により金属イオンを除去した 10% FCS 添加 α-MEM に置き換えて培養した。これに Zn²⁺ を添加し、細胞増殖を ³H-Thymidine、蛋白質合成を ¹⁴C-Leucine、石灰化能をアリザリン染色法、ALP 活性を Bessey-Lowry 法、および ALP 量の変化を western blotting 法で検索した。【結果と考察】ALP 活性が極めて低い MC3T3-E1 細胞を用いて、金属イオンを含まない培地、あるいは 10% FCS 添加培地で培養しても、ALP 活性の変化は認められなかった。15 μM Zn²⁺ をこの培地に添加しても、ALP 活性の増加はほとんど認められなかったが、FCS を含む培地に添加すると 10 倍以上 ALP 活性の増加が認められた。一方、透析チューブを用いて FCS を分画し、Zn²⁺ と共に ALP 活性を誘導する因子を検索すると、100k 以上の分子であることがわかった。これらの結果から、ALP の発現には、Zn²⁺ と血清中に存在する高分子量の因子が必要であることが示唆された。

P2-123

インドオオアレチネズミの咬筋走行と食性との関係
 ○佐藤 和彦¹、渡邊 竜太¹、小萱 康徳¹、久保金弥²、江尻 貞一¹ (1朝日大 歯 口腔構造機能発育 口腔解剖、2星城大 リハビリ)

旧世界の砂漠・ステップ地帯に分布するネズミ科アレチネズミ亜科は、硬いイネ科植物や根茎を含む多様な植物を食べるため、激しい咬耗に備えて臼歯の歯根が遅くまで成長を続けるという特徴をもつ (Vorontsov, 1967, Agrawal, 1967)。このような食性に対する適応は、齧歯類では最も発達した咀嚼筋である咬筋の形態にもみられることが予想されるが、詳しい報告は未だなされていない。そこで本研究では、このグループの 1 種であるインドオオアレチネズミ (*Tatera indica*) の咬筋走行および層構造を肉眼によって観察し、近縁で雑食性のクマネズミ (*Rattus rattus*: ネズミ科ネズミ亜科) のものと比較した。その結果、インドオオアレチネズミの咬筋深層前部、および深層後部最表層の区画が著しく前傾した走行をもつことが明らかになった。このことは、本種の咬筋がクマネズミに比べて、(1) 深層前・後部の起始部境界がより前方に位置する、(2) 咬板が顕著に突出する、(3) 深層後部最表層にある区画の停止部が後下顎腱膜の後方に限定される、という特徴に起因するものと思われる。ネズミ科アレチネズミ亜科は、前方に下顎を動かして食物をすりつぶすことが知られており (Weijjs and Dantuma, 1975)、咀嚼時に硬い植物から受ける摩擦に抗する力が強化されていることが、本研究の結果から示唆される。

P2-122

エナメル上皮腫細胞による新たな直接骨溶解機構
 ○森田 浩光¹、吉本 尚平^{1,2}、中村 誠司³、平田 雅人²、安部 喜八郎¹ (1九大 病院 全身管理歯科、2九大 院歯 口腔細胞工、3九大 院歯 顎顔面腫瘍制御)

エナメル上皮腫は発現する NF-kappa B ligand (RANKL) により周囲の破骨前駆細胞を破骨細胞に分化させ骨吸収を引き起こすと考えられてきた。我々はエナメル上皮腫細胞が細胞膜上に発現する液胞型プロトンポンプ (V-ATPase) により直接的に骨溶解を引き起こすことを見出したので報告する。エナメル上皮腫細胞である AM-1 をリン酸カルシウムコートされた培養用ディッシュ上で 10 日間培養すると吸収窩が観察された。しかし V-ATPase の阻害薬である bafilomycin A1 (>1nM) の投与により、吸収窩の形成は濃度依存的に抑制された。ウエスタンブロット法および免疫蛍光染色により、AM-1 では V-ATPase および電位依存性クロライドチャネルの一種である CIC-7 の蛋白が、細胞膜上に多量に発現していることが観察された。AM-1 は破骨細胞と同様に多核化を引き起こすことも観察され、加えて RANKL の受容体である RANK の発現も検出された。この多核化は RANKL (30 μg/mL) を添加した際には観察されなかったが、塩化カルシウム (1mM) の添加により促進された。以上の結果から、AM-1 は破骨細胞と同様に細胞膜上の V-ATPase および CIC-7 により骨無機質成分であるリン酸カルシウムを溶解し、溶出したカルシウムイオンを感知もしくは吸収することによりポジティブフィードバックとして多核化し、周囲の破骨細胞と共に病的骨吸収を促進していることが示唆された。

P2-124

胎生期顎舌骨筋の成長における vimentin、desmin の発現について
 ○岸 飛鳥¹、山本 将仁¹、阿部 伸一¹、井出 吉信¹ (1東歯大 解剖)

【目的】Desmin と vimentin は、筋の分化、成熟、形態維持などにおいて重要な役割をもつ中間径フィラメントである。しかし、発生過程におけるこれらの発現と周囲の構造との関係について詳細が不明である。我々は、胎生期マウス顎舌骨筋と周囲組織における desmin、vimentin の局在、発現の検索を行った。【方法】胎生 12-16 日の ICR 系マウスを試料とし、4%パラホルムリン酸緩衝液にて固定後、通法に基づきパラフィン切片を作製した。切斷方向は前額断とした。形態学的観察を行うため H-E 染色を行った。さらに、免疫組織化学染色と RTPCR を行い desmin および vimentin の局在と発現の検索を行った。【結果および考察】H-E 染色の結果よりメッケル軟骨に沿って下顎骨が形成され、幼弱な顎舌骨筋が経時的に成長する経過が観察された。desmin は筋組織に特異的に発現が認められ、メッケル軟骨近接部に強い発現が認められ、日齢と共に発現領域、発現量が増加した。Vimentin は顎舌骨筋および周囲組織においても発現が認められ発現領域、発現量に変化は認められなかった。以上の事から顎舌骨筋は連続するメッケル軟骨から何らかの影響を受けて発育が進み、その過程において早期から desmin が重要な役割を担っている可能性が示唆された。さらに周囲の構造を含めた間葉系組織の発育は一体となって進むことが重要で、その過程に vimentin が関与すると考えられた。

P2-125

顎動脈終枝の分岐角度とその血管径の形態学的研究

○酒井 悠輔¹、佐藤 知哉¹、宇佐美 晶信¹、深井 直実¹ (奥羽大 歯 生体構造)

【目的】

頭頸部の癌に対する超選択的動注法では浅側頭動脈から顎動脈へ逆行性にカテーテルが挿入される。しかし、顎動脈の詳しい分岐角度や血管径については不明な点が多い。そこで、実習用日本人成人遺体を対象とし、浅側頭動脈からのカテーテルの挿入を想定し、浅側頭動脈と顎動脈の分岐角度とそれぞれの血管の内径および外径についての計測を行い、検討した。

【方法】

奥羽大学歯学部実習用遺体より顎動脈からの浅側頭動脈と顎動脈の分岐部を採取し計測した。顎動脈と浅側頭動脈の分岐部から遠位 10 mm の 2 点と分岐部を結ぶ直線のなす角度を分岐角度とし、内径および外径については、分岐部から 10 mm の部位を測定した。

【結果と考察】

顎動脈と浅側頭動脈の分岐角度について左右で有意差はみられなかった。顎動脈と浅側頭動脈それぞれの内径には左右差がみられなかった。また、同側の顎動脈と浅側頭動脈を比較するとその内径には有意差はみられなかった。しかし、同側の顎動脈と浅側頭動脈の外径については差がみられ、両側とも顎動脈の方が浅側頭動脈よりも外径が大きかった。以上より、カテーテルの挿入の際に 2 動脈の内径の差について考慮しなくてもいいと考えられる。また、外径に差のあることから、顎動脈の方が浅側頭動脈に比べ血管壁が厚いと考えられる。

P2-127

ラットの側頭筋深部筋束について

○井上 貴一郎¹、高橋 茂¹、山田 利恵¹、牛島夏未²、土門 卓文¹ (¹北大 院歯 口腔機能解剖、²北大 院歯 学術支援部)

【目的】 側頭筋深部筋束は、ヒトでは側頭下稜から筋突起内面に付く筋束で、側頭筋の一部と考えられているが、解剖学的な見解に不明瞭な点が多い。一方、一部の哺乳類では深側頭筋と呼ばれることもあり比較的明瞭との記述が多い。そこでヒト側頭筋深部筋束との比較検討に必要な所見を得るために、入手しやすい哺乳類であるラットを用い側頭筋深部筋束の剖出を行った。**【方法】** ヒトの咀嚼筋層構造(腱筋質相反の関係)を参考に、側頭筋の層構造を確認しながら側頭筋深部筋束の剖出を行った。**【結果と考察】** ラットの深部筋束全体は内側に頂点を持つやや捻れた三角柱をしており、前側は眼窩の後壁であり、外側は浅部筋束に覆われ、後内側は下部が内側翼突筋、上部が外側翼突筋と接している。深部筋束は 3 層構造(眼窩側層、外側層、内側層)で、眼窩側層は眼窩後部壁の前頭骨後方端の窩から起始し、筋突起内面と歯槽骨との境界部に幅広い腱膜で停止している。外側層は側頭下稜の上方部に 2 つ程度の腱で起始し、ヒトの内斜線と考えられる部分より前方の筋突起内面に停止している。内側層は側頭下稜に複数の腱で線状に起始し、ヒト内斜線およびその延長部と相同思われる部分に三角形状に停止している。これらの筋層の特徴から、ヒト深部筋束と相同な筋層は内側層と外側層の一部と考えられ、眼窩側層はヒトでは眼窩と下顎骨の形態的变化とともに消失しているものと考えられる。

P2-126

咀嚼能率と一口量との関係

○塩澤 光一¹、奥村 敏¹ (鶴見大 歯 生理)

【目的】 咀嚼する食品摂取量と咀嚼機能との関係については不明な点が多い。そこで本研究は、健康な成人被験者の摂取量と咀嚼能率との関係について調べた。**【方法】** 44 名の成人被験者(男性 26 名、女性 18 名、平均 22.3 歳)に、細いおさかなウインナー(直径 13 mm、日水、以下 V と略す)と通常の魚肉ソーセージ(直径 21 mm、日水、以下 S と略す)を自由に摂取、咀嚼させ、摂取した一口量、噛み取り長、および嚥下までの咀嚼回数を調べるとともに、ピーナッツを用いた Manly らの方法を用いて各自の咀嚼能率を測定した。**【結果と考察】** 一口量および最終嚥下までの咀嚼回数の平均値はどちらも V に比べて S の方が有意に大きな値を示したが、噛み取り長は S に比べて V の方が有意に長い値を示した。一方、V 一口量と S 一口量、また V 噛み取り長と S 噛み取り長はどちらも有意な正の相関を示した。しかしながら、V、S どちらの一口量、噛み取り長および咀嚼回数と咀嚼能率との間には有意な相関は認められなかった。以上の結果から、各自の摂取量(一口量や噛み取り長)の傾向は摂取する食品が異なっても維持されるのに対し、咀嚼能率の良し悪しは食品摂取量に関与しないことが示唆された。

P2-128

マウス味蕾におけるインスリン分泌ホルモンの発現

○高井 信吾¹、仁木 麻由¹、吉田 竜介¹、重村 憲徳¹、二ノ宮 裕三¹ (九大 歯 口腔機能解析)

GLP-1 と GIP は、ともにグルカゴン遺伝子由来し、腸管内分泌細胞より分泌されるインスリン分泌ホルモンである。近年、GLP-1 がマウス味細胞に発現していることが報告されたが、GIP の発現報告はこれまでになく、その働きや、どの味細胞に発現しているかといった詳細は未だ明らかでない。また、消化管ではグルカゴン遺伝子から GLP-1、GIP の mRNA 転写活性は paired homeobox 遺伝子である Pax6 により制御されていることがわかっている。そこで今回我々は、免疫組織学的手法を用い、マウス味細胞における GIP と Pax6 の発現を探索した。同時に、II 型細胞に発現し甘味受容体を形成する T1R3、及び酸味の受容に関わる III 型細胞に発現しているとされる GAD67 との共発現を調べた。その結果、マウス茸状乳頭味蕾では、T1R3 発現味細胞のうち 23% の細胞が GIP を共発現していた。また、GIP 陽性細胞のうち 71% の細胞に T1R3 の発現が見られた。それに対し、GAD67 陽性細胞のうち、GIP を発現している細胞は 5% 程度であった。GIP 陽性細胞のうち GAD67 を発現している細胞は約 25% であった。また、Pax6 は茸状乳頭味細胞に広範に発現しており、T1R3 陽性細胞の 87% で発現が見られた。以上の結果より、GIP は T1R3 発現細胞に多く存在することが明らかとなった。しかし、味細胞に存在するインスリン分泌ホルモンが甘味受容に関与しているかどうかについては、今後さらなる検討が必要である。

P2-129

Pax 遺伝子ファミリーにおける miR-1、133 の標的部位の進化
○安藤 準¹、山根 明¹ (鶴見大 歯 物理)

microRNA (miR)-1、133 は骨格筋の発生過程において高濃度に発現しており、骨格筋発生調節に重要な役割をはたしていると考えられている。筋発生や再生の調節に重要な役割を果たす pax-3 の 3' 非翻訳領域(3'-UTR)には miR-1 の、pax-7 の 3'-UTR には miR-1、133 の標的部位が存在する。そこで、我々は pax 遺伝子ファミリーの microRNA による調節機構の進化を明らかにするため、データベースを用いて pax 遺伝子の 3'-UTR における miR-1、133 seed 配列の結合可能部位の存在について検索した。哺乳類、鳥類、両生類、魚類では pax-3、7 共に miR-1、133 双方に対する結合可能部位が認められるが、尾索類、頭索類の pax 3、7 には miR-1、133 の結合可能部位は認められなかったが、その痕跡と考えられる塩基配列は認められた。また線虫類の pax-7 および頭索類、半索動物の pax-1、9 にそれぞれ miR-1 の結合可能部位が見られることから、原索動物の pax-3、7 において塩基置換などの変異が生じ、二次的に miR-1、133 の標的部位を失った可能性が示唆され、pax 遺伝子ファミリーの miR-1、133 による発現制御は脊椎動物の内進化したものではなく、より広く保存された機能と考えられる。

P2-130

ラット舌乳頭形態形成過程における舌粘膜での type II および type III コラーゲンの局在
○岩崎 信一¹、青柳 秀一²、佐藤 義英¹ (1日歯大 新潟生命歯 生理、2日歯大 新潟生命歯 先端研)

ラット舌糸状乳および有郭乳頭形成過程における type II・type III コラーゲンの局在を共焦点レーザー顕微鏡免疫組織化学的観察によって明らかにした。有郭乳頭は胎齢 15 日には既に形態形成が開始されており、糸状乳頭に比べ形成開始の時期が早い。糸状乳頭は胎齢 17 日以降に形成が進展する。Type II コラーゲンも type III コラーゲンも胎齢 15 日の有郭乳頭を含む舌粘膜に僅かに出現し、胎齢 17、19 日と進むにつれて粘膜内の分布が増加する。しかし、いずれの胎齢でも type III コラーゲンの方が type II コラーゲンよりも高密度に分布している。また、分布様式に関しても、type III コラーゲンは type II コラーゲンに比べ上皮直下の粘膜固有層で分布密度が高い。生後の 0、7、14 日のラットでは、両コラーゲンの分布量はさらに増大するが、舌筋周囲の筋膜形成と並行して type II および type III コラーゲンの局在が顕著である。胎児の有郭乳頭中心部の固有層結合組織部分には、type II および type III コラーゲンともがほとんど分布していないが、その機能的意義に関しては不明である。