

P1-1

ラット下顎骨発生における石灰化

○林 利華¹、狐塚 雅弘¹、宍戸 駿一¹、柿内 裕輔¹、逸見 晶子¹、大方 広志²、笹野 泰之¹ (1東北大院歯 顎口腔形態創建、²東北大院歯 歯内歯周治療)

【目的】下顎骨発生における石灰化について、詳細は不明である。本研究では、発生・成長過程のラットを用いて、組織像、マイクロX線CT画像、およびCa、P、Cの元素分布と濃度を解析し、下顎骨の石灰化過程を検討することを目的とした。【方法】胎生15、16、18、20日齢および生後1週齢のラットを浸漬した灌流固定し、頭部を試料とした。試料の一部はマイクロX線CTで撮影し、また、一部はalcian blue-alizarin redで染色しwhole mount 試料とした。さらに一部の試料を凍結包埋して下顎骨中央部に至るまで前頭断切片を作製し、ヘマトキシリン-エオジンで染色した。切片を得た凍結包埋試料を凍結乾燥し、断面を対象に分析走査電子顕微鏡 (SEM-EDX) を用いてCa、P、Cの元素を解析した。【結果】組織切片とwhole mount 試料から、メッケル軟骨周囲に胎生15日で顎骨が、胎生16日で骨が見られた。SEM-EDXによる解析で、胎生16日の骨組織に一致してCaとPの分布が認められ、その分布は生後1週に至るまで拡大した。また元素濃度比Ca/Pは上昇し、C/PとC/Pは低下した。マイクロX線CTでは、胎生18日以降で骨の不透過像の増大が観察された。【結論】ラット下顎骨は胎生15日にメッケル軟骨周囲に発生し、胎生16日から生後1週に至るまで石灰化が徐々に進行することが示された。

P1-3

リクイリチゲニンの破骨細胞形成への効果

○内野 加穂¹、岡元 邦彰¹、坂井 詠子¹、福岡 裕¹、岩竹 真弓¹、西下 一久¹、筑波 隆幸¹ (1長大院歯 口腔病態薬理)

【目的】漢方薬として広く用いられている甘草には抗炎症作用や抗酸化作用を有することが知られている。その成分にはリクイリチゲニンなどのフラボノイド系の物質が含まれている。以前より我々は、ポリフェノールが破骨細胞分化・活性化を抑制することを報告してきた。今回、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、抗酸化作用を持つリクイリチゲニンによる破骨細胞形成への効果を調べた。(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、また細胞増殖能をCell Counting Kit-8を用い評価した。さらに、ウエスタンブロッティング法を用いて、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。(結果) RAW-D細胞とマウス骨髄細胞の破骨細胞形成はリクイリチゲニンの濃度依存的に抑制が認められた。また、リクイリチゲニンはRANKL刺激後のIκBαのリン酸化を阻害し、NFATc1、カテプシンK、Srcのタンパク発現も抑制した。(考察) リクイリチゲニンはIκBαのリン酸化を阻害していることから、IκBαの下流のNF-κBに制御されているタンパク質の発現を抑制し、破骨細胞形成を阻害したことが示唆された。

P1-2

Porphyromonas endodontalis の発現するユニークなジペプチジルペプチダーゼ(DPP)VおよびDPP7

○柳瀬 絵見¹、根本 優子¹、下山 佑²、木村 重信²、馬場 友巳¹、根本 孝幸¹ (1長大院歯 口腔分子生化学、²岩医大 口腔微生物/免疫)

Porphyromonas gingivalis および *P. endodontalis* は糖非発酵性グラム陰性桿菌で、それぞれ成人性歯周炎および感染根管の起炎菌である。*P. endodontalis* はジンジパイン様活性をもたず、一方でKA-MCAを強力に分解するDPP活性を有することを以前報告した。今回、両菌のKA-MCA分解活性について検討し、これまで細菌類では報告のないDPPVによって担われていることを示すと同時に、両菌のDPPVおよびDPP7の性質を比較検討した。【方法】*P. endodontalis* ATCC 35406ゲノムDNAより推定DPPV(MER236725)および推定DPP7(MER278904)遺伝子領域をそれぞれPCRクローニングにより分離し、大腸菌発現系で発現精製した。【結果】帰属未明とされていたMER278904はその基質特異性よりPeDPP7と同定された。ほとんどすべての細菌のDPP7が700-720残基長なのに対し、PeDPP7は818残基よりなりユニークであった。実際に予想される100 kDa分子の発現をイムノブロットにより確認した。両菌種由来の組換えタンパク質は、KA-, SY-, GF-, ML-MCAを分解した。PeDPPVはより高活性で、特にKA-MCAに対する k_{cat}/K_m はPgDPPVの18倍であった。【結論】これまで細菌では報告のないDPPV遺伝子を確認し、その基質特異性と酵素学的パラメーターを決定した。PeDPPVとDPP7は*P. gingivalis* 由来の相同分子とは性質が異なり、両菌体で見られるKA-MCA分解活性の差はDPPV活性の差に起因すると考えられた。

P1-4

三叉神経運動ニューロン樹状突起の能動的特性

○中井 健人¹、中村 史朗²、望月 文子²、中山 希世美²、矢澤 格²、井上 富雄² (1昭大 歯 口生理)

【目的】神経細胞の樹状突起には様々な電位依存性イオンチャネルが存在し、シナプス入力を増幅するなど、複雑な情報処理を行う可能性が報告されてきた。しかし極めてよく発達した樹状突起をもつ三叉神経運動ニューロンでも同様の情報処理機構が存在するかどうかは不明である。そこで我々はカルシウムイメージング法を用いて、幼若期ラット三叉神経運動ニューロン樹状突起の能動的特性を調べた。【方法】実験には生後1-5日齢のラット脳幹スライス標本を用いた。三叉神経運動ニューロンからパッチクランプを行い、活動電位を誘発させた際の蛍光強度変化を共焦点レーザー顕微鏡で記録した。【結果】三叉神経運動ニューロンに活動電位を誘発させると細胞体および樹状突起で蛍光強度の増加がみられ、樹状突起ごとに異なる蛍光強度変化パターンが認められた。さらにテトロドトキシン(1 μM)を投与すると蛍光強度増加比が著しく減弱したことから、この蛍光強度の変化には樹状突起に分布する電位依存性ナトリウムチャネルの活性化が関与していることが示された。【考察】三叉神経運動ニューロンの樹状突起はシナプス入力を受動的に細胞体へと伝えるだけでなく、それ自体が興奮性を持つことによってシナプス入力情報の増幅や加工など複雑な情報統合処理を行っている可能性が考えられた。

P1-5

カルシウム系骨補填材による血管形成抑制
 ○関 裕子¹、高橋 萌¹、清水 良央¹、及川 麻理子¹、熊本 裕行¹ (東北大 歯)

【目的】臨床では様々な骨補填材が使用されているが、組織再生に必要な血管形成への影響については不明である。本研究では各材料の血管形成への影響を検討するため多角的に解析を行った。【方法】1. 材料：正球状の焼結 HA 顆粒および不規則形状の β -TCP 顆粒を用いた。2. In vitro 系：ヒト血管内皮細胞と線維芽細胞の共培養系を用いた。滅菌した約 8 mg の各材料を培養液中に浸漬し、7、11 日間培養した。顕微鏡下にて血管長、分岐数、面積を計測した。3. In vivo 系：ラットの頭蓋骨に直径 3 mm の骨欠損を形成し、各材料を移植後、骨膜で被覆、縫合した。マイクロ CT 撮影後、パラフィン包埋切片を作製し、HE 染色を施した。顕微鏡下にて病理組織学的に観察後、血管数、血管腔の大きさを計測した。【結果】1. In vitro 系では両材料も 11 日目まで血管の増生が確認された。 β -TCP は焼結 HA に比べ血管長、分岐数、面積は有意に大きな値を示した ($p < 0.05$)。2. In vivo 系では組織学的に両材料も高度な炎症はみられなかった。両材料でも顆粒周囲に多核巨細胞が認められ、焼結 HA の周囲に線維性組織が形成されたが、 β -TCP では乏しかった。組織形態計測では両材料も 1 週から 2 週まで有意に血管数は減少し、面積は増加した ($p < 0.05$)。 β -TCP は焼結 HA に比べ、血管数は有意に少なく、面積は大きかった ($p < 0.05$)。【考察】骨補填材である焼結 HA は β -TCP に比べて血管形成の抑制がみられると思われた。

P1-7

CCN3 の軟骨特異的過剰発現は内軟骨性骨形成の遅延を誘発する
 ○角谷 宏一¹、服部 高子²、桑原 実穂¹、大野 充昭³、星島 光博²、窪木 拓男³、滝川 正春² (岡大 歯、²岡大 院医歯薬 口腔生化、³岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴)

CCN ファミリータンパク質 3 (CCN3/NOV) は分泌タンパク質で、軟骨細胞の増殖、分化を制御している事が報告されつつある。また、CCN3 のドメインの一つを欠失した遺伝子改変マウスの解析から、骨格の正常な発育への CCN3 の重要性が示唆されるが、これまで明確な内軟骨性骨形成への関与の報告は無い。今回我々は内軟骨性骨形成における CCN3 の役割を解明するために、軟骨組織特異的に CCN3 を過剰発現するマウスを作製し、表現型の解析を行った。Col2a1 promoter 下流に GFP 融合 mouse CCN3 遺伝子を接続したトランスジェニックマウスを作製し、軟骨組織特異的 CCN3 過剰発現を得た。胎生 15.5 および 18.5 日齢の CCN3^{Col2a1tg} マウスの長管骨は、骨化部分が太く短く、CCN3^{Col2a1tg} 長管骨の *in situ* hybridization で、軟骨分化の遅延が観察され、骨芽細胞におけるマーカー遺伝子の発現も抑制されていた。さらに軟骨内への血管侵入が抑制されている事が抗 CD31 抗体を用いた蛍光免疫染色で観察された。胎生 18.5 日齢の CCN3^{Col2a1tg} 長管骨切片で海綿骨の骨梁形成が抑制されており、海綿骨内 TRAP 陽性細胞の減少が見られた。これらの結果より、軟骨組織における CCN3 の過剰発現は、内軟骨性骨形成の最終段階である軟骨から骨への転化を遅延させる事が明らかとなった。

P1-6

マウスメッセル軟骨後方部の消失様相
 ○鎌口 真由美¹、井上 貴一郎²、高橋 茂²、加藤 剛士²、上北 広樹²、牛島 夏末³、土門 卓文² (北大 歯、²北大 院歯 口腔機能解剖、³北大 院歯 学術支援)

【目的】メッセル軟骨は、前方では軟骨内骨化とやや異なる様式で消失するようであるが、後方では骨に包圍され消失する中部から下顎孔の部、蝶下顎靭帯となる下顎孔から錐体鼓室裂部、そして耳小骨となる後端部など部位特異な経緯を辿るため、とくに後部の消失様式に関してはいまだ不明な点が多い。そこで下顎孔前後の部位を中心にメッセル軟骨後部の消失様相について検討した。【方法】マウスでは出生時にメッセル軟骨後半が完全に消失していないため、生後 1 日のマウスを用い、メッセル軟骨の消失様相を、TRAP、ACP、MMPs、Cathepsin K、F4/80、Collagen の局在を組織化学的に検討した。【結果と考察】メッセル軟骨は、AlcianBlue で染色される軟骨が耳小骨から下顎孔の手前まで棒状に確認され、前方ほど軟骨基質は失われ、代わって軟骨膜から変化した細胞が塊となって棒状構造を維持しているが、第 3 臼歯直下で完全に消失する。この全長すべての部位で、軟骨膜部と軟骨膜から変化した細胞塊に MMP-9 が認められ、また MMP-1、Cathepsin K が軟骨と軟骨膜部の細胞に認められた。しかし TRAP、ACP、F4/80 陽性の細胞はメッセル軟骨およびその周囲にほとんど認められなかった。このことからメッセル軟骨の消失はメッセル軟骨の軟骨膜に存在する細胞が主体的に関与していると考えられる。また骨に包圍された軟骨膜細胞の塊では ALP、1 型 Collagen も分泌し骨化にも関与していると考えられる。

P1-8

CBCT を用いたサル下顎骨臼歯部の舌側小孔の解析
 ○花谷 佳菜子¹、島田 和幸³、佐藤 巖² (日歯大 生命歯 4 学年、²日歯大 生命歯 解剖 1、³鹿大 院医歯 神経病 人体構造解剖)

ヒトの下顎管から出る舌側の小孔の存在は以前から知られており、179 の下顎骨を調べて正中中部で最も高く (96.23%)、小白歯部でもかなりの頻度 (27.5%) があり、臼歯部でも第三大臼歯部 (4.7%, 2/42)、第二大臼歯部 (6.1%, 4/66)、第一大臼歯部 (11.7%, 7/60) で小孔の存在が知られている (von Arx et al. J Oral Maxillofac Surg. 2011)。今回、私たちはサルの舌側の小孔に注目し、ヒトの研究同様に非破壊解析装置である CBCT を用い、鹿大所蔵の日本サル (17 例) を用いて詳細な解析を行い、以下の結果を得た。本研究では正中中部に 100% の頻度で複数の小孔が存在し、臼歯部では第三大臼歯部 (2.9%, 3/34)、第二大臼歯部 (35.3%, 12/34)、第一大臼歯部 (29.4%, 10/34) で高い頻度で小孔が出現した。しかも同じ部位での複数出現が第二大臼歯部で 3 例、第一大臼歯部で 2 例みられた。一般にサルでは臼歯部の歯槽部が狭く、ヒトの幅広い臼歯部では槽間中隔などに無数の小孔がみられる。このため、サルの狭い臼歯部ではこれらの小孔は存在するスペースが確保できないなどから、サルの臼歯部舌側の小孔の存在はヒトにみられる歯槽の栄養に於けるのではないかと考えた。今後は詳細な肉眼解剖によりこの小孔に存在する血管や神経の分布を観察することで小孔の存在意義を明らかにしたい。

P1-9

口腔内乾燥を訴える患者に認められた口唇粘膜上皮のバリア機構の破綻
 ○宇都宮 怜子¹、合島 怜央奈^{1,3}、吉住 潤子²、木附 智子²、檀上 敦³、山下 佳雄³、城戸 瑞穂¹ (¹九大 院歯 分子口腔解剖、²九大 院歯 顔面口腔外科、³佐賀大 医 歯科口腔外科)

【目的】口腔内乾燥を呈するシェーグレン症候群(SS)の患者は、口腔内の痛覚過敏を訴えることが多いが、そのメカニズムは明らかでない。私たちは、唾液腺組織の病変に加え、粘膜上皮における病理的变化が症候に関与するとの仮説を立て実験を行った。【方法】九大の倫理審査委員会の承認の下、SS患者の診断時口唇腺生検の余剰粘膜の切片を作製し、免疫染色を行った。粘液嚢胞の患者からの組織を対照群とした。【結果と考察】SSと診断された患者の口唇粘膜上皮下には多数のマクロファージのマーカー Iba-1 またはマクロファージや顆粒球のマーカー CD11b 陽性細胞が認められた。上皮には細胞内浮腫を示す細胞塊が散在し、こうした領域には Iba-1 または CD11b 陽性細胞が浸潤していた。更に、正常組織では上皮細胞間に明瞭なラインとして認められる細胞間接着タンパクの E-cadherin 陽性反応は、変性した細胞では不明瞭で、上皮間接着構造の障害が示唆された。また、そうした細胞では上皮のバリア機能を担う陽イオン透過性チャネル transient receptor potential channel vanilloid type 4 の発現の低下も観察された。上皮下の神経の分布には SS 群と粘液嚢胞群との間に差が認められなかったことから、SS における上皮への免疫細胞浸潤や上皮細胞間接着装置の破壊が、痛覚過敏等の症状に関連している可能性が示唆された。

P1-10

Wnt5a に関してレチノイン酸がマウス舌筋の発育異常を誘導する研究
 ○劉 波¹、劉 涵¹、肖 晶¹ (¹大連医大 口腔医学院 口腔基礎)

Aim: To study the aberrant morphogenesis and related molecular mechanism of retinoic acid (RA)-induced tongue malformation. Methods: Exogenous RA was used to induce tongue malformation in fetal mouse. Myogenic cell proliferation was analyzed by BrdU incorporation and staining, and the differentiation was measured by IHC assays and qRT-PCR. The expression of relative molecules was evaluated by qRT-PCR. The histological changes of tongue and its muscles were characterized by light and transmission electron microscopy (TEM). Results: The tongue of fetal mouse treated with RA failed to descend at E14.5 and kept abnormally at relative higher position. The proliferation was decreased and the expressions of Myf5 and MyoD were down-regulated significantly at this stage. And also Wnt5a and Camk2d were down-regulated and Tbx1 was up-regulated. Conclusions: Overdose of retinoic acid induces hypoplasia and disorder of tongue muscles. Wnt5a/CaMKII pathway is involved in RA-treated tongue malformation.

P1-11

レチノイン酸が C2C12 細胞系における筋分化を誘導する研究
 ○劉 波¹、劉 涵¹、肖 晶¹ (¹大連医大 口腔医学院 口腔基礎)

Aim: To study the effect and mechanism of excess RA on myogenic differentiation of C2C12 cells. Methods: Effects of RA on the proliferation and cell cycle of C2C12 were detected by CCK-8 assay and Flow cytometry (FAC), respectively. The differentiation was measured by IHC assays and qRT-PCR. The expression of related molecules were evaluated by qRT-PCR. Results: RA inhibited the proliferation and cell cycle of C2C12 cells in a dose-dependent manner. Myf5 was lower than the Control from culture day 0.5 (D0.5) to D6; MyoD decreased on D1, increased from D2, and decreased on D6, similar to the Control. Myogenin increased gradually from D0 to D6, consisted with the Control; MRF4 was higher than the Control on D6. IHC result showed that myosin heavy chain (MyHC)-positive cells were observed from D2 to D6, but the MyHC expression was lower and the cell bodies exhibited more elongated and bifurcate in RA group. The expression of Tbx1, Wnt5a, Ror2 and PKC δ was up-regulated, and PKC δ was significant compared to the Control. Conclusion: Excess RA could induce delayed myogenic differentiation of C2C12 cells depended on the dose, and Wnt signal may play an important role in the process.

P1-12

マウス iPS 細胞の骨芽細胞分化過程における神経ペプチドレセプターの発現について
 ○長尾 怜美¹、後藤 哲哉²、江草 宏³、矢谷 博文³、小林 繁²、牧 憲司¹ (¹九歯大 口腔機能発達、²九歯大 解剖、³阪大 院歯 歯科補綴 1)

【背景と目的】骨組織には交感神経と知覚神経支配が分布し、最近の研究により骨芽細胞分化は神経性の調節を受ける事が分かっている。しかし、未分化間葉系細胞から骨芽細胞までの分化過程においてどの神経ペプチドによって調節を受けているかは不明である。今回、我々は iPS 細胞から骨芽細胞への分化において、神経ペプチドレセプターの発現を調べることによって、どの神経ペプチドの影響を受けているかを調べた。【方法】MitomycinC 処理をしたマウスフィーダー細胞 (SNL) 上に播種したマウス iPS 細胞は、胚葉体形成を経て骨芽培地で 28 日間培養し、骨芽細胞を形成した。分化過程を多分化能維持期、胚葉体形成期、骨芽細胞分化期の大きく 3 段階に分けて、それぞれ RNA 抽出、RT-PCR にて、 β 2-AR, CGRP-R, NK1-R の mRNA 遺伝子発現を検討した。【結果と考察】交感神経系の β 2-AR は多分化能維持期から発現していることが分かった。知覚神経系の CGRP-R も多分化能維持期から発現しているのに対し、NK1-R は骨芽細胞分化期の 7 日目以降に発現することが分かった。これらのことから、iPS 細胞の骨芽細胞分化過程には、交感神経系および知覚神経系の分子機構が関与している可能性が示唆された。NK1-R については骨芽細胞分化期以降に発現していることより、NK1-R のリガンドであるサブスタンス P が骨芽細胞分化後期に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

P1-13

乳癌骨転移巣における骨細胞産生因子の組織化学的解析

○山田 珠希¹、坪井 香奈子¹、平賀 徹³、山本 知真也¹、田中 祐介¹、長谷川 智香¹、織田 公光²、網塚 憲生¹ (北大 院歯 硬組織発生生物、²新大 院医歯 口腔生化学、³松歯大 口腔解剖二)

【目的】骨細胞は基質ミネラルの維持、骨改造及び血中リン濃度の調節を行なっているが、癌の骨転移巣という特殊な環境は骨細胞の機能に影響を与えると考えられる。そこで我々は、乳癌骨転移モデルを用いて、骨転移巣における骨細胞産生因子について組織化学的に検索することを目的とした。【材料及び方法】生後7週齢の雌性 nu/nu マウスの左心室に乳癌細胞 (MDA-MB-231) 浮遊液を注入した。28日後、軟エックス線にて骨破壊像を確認後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、通法にてパラフィン包埋を行った。大腿骨の組織切片を作製し、骨細胞産生因子である DMP-1、FGF23 と sclerostin 及び骨芽細胞と破骨細胞マーカーである ALP と TRAP について組織化学的に解析した。【結果と考察】乳癌細胞が転移した周囲の骨基質表面には、多数の ALP 陽性骨芽細胞及び TRAP 陽性破骨細胞が局在した。乳癌転移巣に隣接する皮質骨内の骨細胞は DMP-1 陽性であったが、FGF23 及び sclerostin ともに陰性を示した。一方、骨転移巣における乳癌細胞は FGF23 強陽性を示した。以上、乳癌細胞は FGF23 を過剰産生することで低リン環境という骨転移に最適な環境を形成する可能性、また、周囲の骨細胞の機能を抑制する可能性が示唆された。

P1-15

bisphosphonate 投与中止後の骨の細胞群における組織化学的検索

○坪井 香奈子^{1,2}、佐々木 宗輝¹、長谷川 智香¹、北川 善政²、網塚 憲生¹ (北大 院歯 硬組織、²北大 院歯 口腔内科)

骨粗鬆症治療薬である bisphosphonate (BP) は、破骨細胞を抑制する。しかし、破骨細胞の抑制が骨芽細胞とのカップリングに影響が及ぶこと、一方、BP 投与を中止すると破骨細胞形成のリバウンドが生じる可能性も危惧されている。そこで、我々は生後6週齢 ICR マウスへ10日間の alendronate 皮下投与を行い、投与中止後の骨組織において ALP、TRAP、スクレロシンなどの組織化学を行った。BP 投与直後のマウス大腿骨・脛骨では、コントロール群に比べて多数の TRAP 陽性破骨細胞が骨組織に存在していた。BP 投与中止後には破骨細胞は活発に骨吸収を行うのではなく、その数を減少させてゆき破骨細胞のアポトーシス像も観察されたことから、リバウンドの可能性は低いと考えられた。一方、骨芽細胞のマーカーである ALP 陽性反応は速やかに回復せず、骨細胞はスクレロシンを多量に産生するとともに、自らは萎縮する傾向を示した。以上から、BP 投与中は破骨細胞の骨吸収抑制を補うために、何らかの機序で破骨細胞形成が亢進したと考えられた。一方、BP 中止により、破骨細胞数が速やかに回復したが、骨芽細胞・骨細胞系の回復には長期間を要すると推察された。よって、BP 投与後の骨組織の正常化には破骨細胞だけでなく、骨芽細胞・骨細胞の状態も考慮する必要があると考えられた。

P1-14

FGF23/klotho 軸の破綻は血管骨化を誘導する klotho 遺伝子変異マウスを用いた組織学的検索

○長谷川 智香¹、山田 珠希¹、佐々木 宗輝¹、笹野 泰之²、網塚 憲生¹ (北大 院歯 硬組織発生生物、²東北大 院歯 顎口腔形態創建)

メンケベルグ型動脈硬化は病態の進行に伴い動脈中膜に石灰化を生じる。そこで、我々は、中膜石灰化のモデル動物である klotho 遺伝子変異 (*kl/kl*) マウスの大動脈を組織化学的に検索した。

生後7週齢 *kl/kl* マウスでは、野生型マウスと比較して大動脈中膜に著しい石灰化を認めた。石灰化領域の血管平滑筋細胞は TNAP/ENPP1 陽性を示す骨芽細胞様細胞へと変化しており、その周囲には多数の I 型コラーゲン線維および基質小胞を認めた。石灰化が進行した領域では、オステオポンチン、オステオカルシン、基質グラ蛋白陽性を示す石灰化基質が形成されており、基質内部には FGF23 陽性骨細胞様細胞が、また、基質表層には TRAP 陽性破骨細胞様細胞が出現した。TEM-EDX 法で元素分析を行うと、これらの石灰化基質は結晶構造を有するリン酸カルシウムであることが示された。現在の考え方では、血管石灰化は血中 Pi 濃度上昇に起因するとされているが、FGF23/klotho 軸の主役である *kl/kl* を欠損したマウスでは Pi 濃度が上昇しても著しい血管石灰化を示さない。従って、我々は全身的な FGF23/klotho 軸の破綻以外に原因があると考え、現在、DNA array などを用いた解析を進めている。

以上、*kl/kl* マウスでは、血管平滑筋細胞が骨芽細胞様細胞へ変化することにより血管石灰化および血管骨化を誘導する可能性が示唆された。

P1-16

マウス舌乳頭における活性酸素合成酵素 (Nox) の局在

○柏原 祥顕¹、安部 仁晴²、菊地 隆太³、中川 敏浩²、渡邊 弘樹² (奥羽大 院歯 口腔組織構造生物、²奥羽大 歯 生体構造 口腔組織、³奥羽大 院歯 顎口腔外科)

【目的】活性酸素は、生体内で様々な生理活性を持つことが報告されている。近年、活性酸素合成酵素 (Nox) ファミリーが明らかになり、生体の各組織器官におけるこれらの酵素種の局在について検索されてきた。しかし、舌乳頭と活性酸素の関係についての報告は現在までみられない。そこで今回我々は、舌乳頭における Nox ファミリーの局在を検索した。【材料及び方法】材料は、マウスの舌を用いた。方法は、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定、舌を摘出後、パラフィン包埋を行った。薄切後、通法に従い、Nox1、2、3、4 抗体を用い、免疫組織化学的染色を行い、顕微鏡観察した。【結果】有郭乳頭の顆粒層から基底層における細胞において、Nox1、2、3、4 は弱陽性から陽性を示した。有郭乳頭の味蕾を構成する細胞は、Nox1、4 に弱陽性、Nox2、3 に強陽性反応を示していた。糸状乳頭上皮の顆粒層から基底層において、Nox1、2 の発現はわずかであるが、その間の上皮である糸状乳頭間上皮の顆粒層と有棘層においては、Nox1、2、3、4 に対して陽性を示した。【考察】活性酸素は、舌乳頭の上皮では角化の促進に関与し、糸状乳頭間上皮では、アポトーシスを引き起こし、形態形成の維持を行っていると考えられる。味蕾において Nox2、3 が強発現したことから、活性酸素が味覚受容に関与すると思われた。

P1-17

口蓋粘膜上皮におけるタイトジャンクションの細胞生物学的研究

○塩津 範子^{1,2}、川本 忠文³、河井 まりこ¹、鳥井 康弘²、山本 敏男¹ (¹岡大 院医歯薬 口腔形態、²岡大 院医歯薬 総合歯科、³鶴見大 歯RI 研セ)

【目的】タイトジャンクション(TJ)は隣接する上皮細胞を密着させ、細胞間のバリア機能に関与する。構成分子にはオクルディン(OCD)とクローディン(CLD)がある。近年、重層扁平上皮である皮膚に TJ の存在が報告され、水分蒸散のバリア機能が明らかになっている。口腔粘膜上皮は重層扁平上皮であり、異物や咀嚼による過酷な環境にさらされている。今回、咀嚼粘膜である口蓋粘膜の上皮におけるバリア機能を調べる目的で、まず TJ の分布、および OCD と CLD の発現や局在を調べた。【方法】マウスを用い、OCD、CLD-1,2,3,4,5,8 の免疫組織化学とウエスタンブロット解析(WB)を行った。免疫組織化学用には川本法で凍結切片を作製した。また、硝酸ランタン法、凍結切断法 (FF) での電顕観察も行った。【結果】電顕では顆粒層上部に TJ が認められ、FF では TJ ストランドが観察された。蛍光免疫染色では、OCD と CLD-1,4,8 は顆粒層上部に反応が認められたが、これらの CLD は他の層にも陽性であった。CLD-2,3,5 は陰性であった。WB では OCD、CLD-1,2,4,5,8 は陽性で、CLD-3 は陰性であった。【結論】口蓋粘膜上皮では、顆粒層上部に TJ が存在し、構成分子として OCD、CLD-1,4,8 の存在が明らかとなった。各 CLD の顆粒層上部以外の分布についての意義は検討を要する。WB では陽性、蛍光免疫染色では陰性の CLD-2,5 は上皮以外の組織によるものと推測された。(共同研究者：佐々木博之(帝京平成大、阪大・特任教授))

P1-19

卵巣摘出レプチン受容体遺伝子変異 (db/db) マウスの骨組織における組織化学的検索

○田中 祐介^{1,2}、長谷川 智香¹、山田 珠希¹、織田 公光³、鄭 漢忠²、網塚 憲生¹ (¹北大 院歯硬組織発生生物、²北大 歯 口外、³新大 医歯学 生化)

【目的】レプチンは脂肪細胞で産生される食欲調節ホルモンであり、骨代謝にも影響を及ぼすとされている。我々は、レプチン非作用下のエストロゲン欠乏による骨組織異常を明らかにする目的で、レプチン受容体変異を有する db/db マウスに卵巣摘出 (OVX) を行い、組織化学的に解析した。【方法】12 週齢の雌性 db/db マウスと野生型 (WT) マウスを OVX し、20 週齢で大腿骨・脛骨を通常にてアルデヒド固定した。ALP、TRAP と leptin R の局在を組織化学にて、また、leptinR、ER α と PPAR γ 2 の発現を RT-PCR にて解析した。【結果】db/db 群では著しい骨量の減少と脂肪細胞の増加を認めた。ALP 陽性骨芽細胞領域は db/db 群で減少し、db/db-OVX 群ではさらに減少したが、WT 群の OVX による減少幅より小さかった。leptinR と ER α の発現は 4 群とも同様であり、leptinR 陽性反応は骨芽細胞に認められた。PPAR γ 2 の発現は db/db 群と db/db-OVX 群で上昇していた。【考察】db/db マウスでは OVX を行わなくとも ALP 陽性反応が著しく低下したこと、db/db-OVX 群では ALP 陽性領域が減少したが、WT マウスにおける OVX 群の減少幅に比べると低いことを考慮すると、レプチンの骨芽細胞に対する作用はエストロゲン欠乏に比べて大きい可能性が推測された。

P1-18

副甲状腺ホルモン投与による骨細胞周囲の骨基質改変について

○本郷 裕美¹、山田 珠希¹、宇田川 信之²、網塚 憲生¹ (¹北大 院歯硬組織発生生物、²松歯大 生化)

【緒言】1960 年代に Bélanger により、PTH 投与による骨細胞性骨溶解が提唱されたが、その機序は依然明らかになっていない。そこで我々は、マウスの外頸静脈に PTH 投与し、数時間後の骨細胞・骨小腔の変化について組織化学的に検索した。【材料と方法】生後 11 週齢の雄性 ICR マウスに human PTH (1-34; 80 ug/kg) を外頸静脈投与し、数時間後における骨細胞・骨小腔を原子間力顕微鏡によるナノインデンテーション、透過型電子顕微鏡および von Kossa 染色にて観察した。また破骨細胞が存在しない RANKL-/-マウスにカルセインを投与し蛍光顕微鏡観察した。【結果と考察】PTH 投与後 6 時間の皮質骨において、一部の骨小腔が僅かな形状変化を示したが、骨小腔周囲は著しい弾性率の低下を示した。9 時間後には、骨小腔は拡大し、その周囲には von Kossa 陰性の末石灰化骨基質が認められた。そのような骨小腔壁は凹凸を示し、内部には断片的な石灰化基質とコラーゲン線維が観察された。一方で、RANKL-/-マウスの骨小腔周囲にはカルセイン標識を観察したことから、小腔壁への石灰化が示唆された。以上より、骨細胞は PTH などに反応して、骨小腔周囲の骨基質を融解、あるいは、石灰化沈着を行う可能性が推察された。(本研究は阪大学・中野貴由教授との共同研究として行われた)。

P1-20

炎症抑制因子ガレクチン 9 の膜表面受容体 Tim3 を介した破骨細胞形成制御

○森山 加奈子^{1,2}、久木田 明子³、上原 範久¹、張 旌旗¹、高橋 一郎²、久木田 敏夫¹ (¹九大 歯 分子口腔解剖、²九大 歯 矯正、³佐賀大 医 微生物)

【目的】ガレクチンは β -ガラクトシドを有する糖鎖に特異的に結合するレクチンであり、細胞増殖・分化や免疫系の調節を行う因子である。ガレクチン-9 (Gal-9) は好酸球に対する走化性や Th17 細胞形成の抑制などの活性を持つことが知られており、炎症に対して抑制的に作用することが報告されている。しかしながら炎症性骨破壊の主役である破骨細胞に対する作用については不明の点が多い。最近、Gal-9 の受容体である Tim-3 が自然免疫において重要な働きをすることが分かってきた。本研究では炎症性骨破壊に於ける Gal-9/Tim-3 システムの関与について検討した。【方法】破骨細胞分化系として破骨細胞前駆細胞株 RAW-D 細胞及びマウス、ラットの骨髄細胞を用いた。炎症性骨破壊の系として、アジュバント関節炎ラットを用いた。Tim-3 の発現について RT-PCR 法、ウエスタンブロット法、免疫染色法等により検討した。【結果と考察】Gal-9 は破骨細胞形成を顕著に抑制した。アンタゴニストである β ラクトースの添加によりその阻害は解除された。試験管内での破骨細胞形成系において、破骨前駆細胞に Tim-3 の高い発現を認めた。多核の破骨細胞も Tim-3 を発現していた。免疫組織学的解析により、ラット脛骨遠位端に存在する破骨細胞が Tim-3 を高発現することが分かった。炎症部位では Gal-9 が高発現することが知られており、Tim-3 を介した破骨細胞形成制御が行われている可能性が考えられた。

P1-21

オステオポンチン欠損が歯の損傷後の歯髄治癒過程に及ぼす影響について
 ○斎藤 浩太郎^{1,2}、大島 勇人¹ (新大 院医歯硬組織形態、²日本学術振興会)

【目的】今回我々はオステオポンチン (OPN) 欠損が歯の損傷後の歯髄治癒過程に及ぼす影響について解析した。

【方法】生後3および5~6週齢の野生型マウスおよびOPNノックアウトマウスの上顎第一臼歯を抜去後に再植、または歯冠部を舌下部へと移植、あるいは近心歯冠部に溝状に窩洞を形成した。術後1日から4週に灌流固定し、抗nestin、抗OPN免疫組織化学を施し光顕にて観察した。

【結果および考察】野生型マウスでは、術後1日に象牙芽細胞のnestin陽性反応が消失した。術後3~5日には、再植/移植群では歯髄内の血行の回復が開始し、全実験系において既存の象牙質の石灰化前線に連続的なOPN陽性反応が認められた。窩洞形成群では術後3日、再植/移植群では術後5~7日にnestin陽性の象牙芽細胞様細胞が認められ、既存の象牙質と第三象牙質との境界部にOPN陽性反応が認められた。一方OPNノックアウトマウスでは、窩洞形成群と多くの移植群では術後に象牙芽細胞分化と第三象牙質形成が認められたものの、移植群で骨形成が阻害され、再植群および一部の移植群の標本では術後歯髄内に血行の回復が認められず、歯髄治癒が起らなかった。以上より、歯の損傷後の歯髄治癒過程において、OPN欠損は象牙芽細胞分化には影響しないものの、歯髄の血行回復や歯髄腔内骨形成を阻害することが明らかになった。

P1-22

ラット象牙芽細胞でのATPの小胞分泌について
 ○岩鍋 恵理奈¹、後藤 哲哉²、郡司掛 香織¹、片岡 真司²、黒石 加代子¹、上田 雅恵¹、小林 繁² (九歯大 院歯顎機能矯正、²九歯大 頭頸解析)

【目的】歯の疼痛伝達には象牙芽細胞が感覚受容細胞として機能している。その機能については動水力学説を初めとして多くの説が存在しているが、象牙芽細胞から神経へのシグナル伝達に関しては解明されていない。ATPレセプターであるP2X3受容体、さらにNTPDase (ATP分解酵素) が象牙芽細胞周囲の神経線維で発現していることが示されている。これらより、ATPが歯の疼痛伝達に関与していることが示唆されるが、象牙芽細胞からどのようにATPが放出されるかは明らかでない。小胞型ヌクレオチドトランスポーター (VNUT) はATPを小胞内へ取り込み、ATPの小胞分泌を行う。本研究では、象牙芽細胞からのATPの放出にVNUTが関与するかについて調べた。【材料と方法】6週SDラットより臼歯を抜去し、歯髄を分離してRT-PCRを行った。また、ラットの灌流固定を行い、上顎第一臼歯を取り出した。その後、10% EDTAで3週脱灰、凍結切片を作成し、抗Nestin抗体と抗VNUT抗体および抗SNAP25 (膜融合タンパク) 抗体で免疫染色を行った。【結果と考察】RT-PCRによって歯髄でのVNUTの発現が確認された。免疫染色によって象牙芽細胞でVNUTおよびSNAP25の局在が示された。これらの発現により、象牙芽細胞から小胞輸送によりATPが運ばれ、歯髄神経に伝達されていることが示唆された。よって、象牙芽細胞による疼痛伝達においてVNUTを介したATP分泌が関係している可能性が示唆された。

P1-23

機械的圧迫力を付与したヒト歯根膜線維芽細胞におけるAsporinとSclerostinの発現と放出について
 ○上田 雅恵¹、後藤 哲哉²、黒石 加代子¹、郡司掛 香織¹、岩鍋 恵理奈¹、小林 繁² (九歯大 院歯顎機能矯正、²九歯大 頭頸解析)

【目的】骨芽細胞に圧迫力を付与すると骨形成を促進するという報告があるが、矯正的歯の移動時において、圧迫側では骨吸収が起り、さらに骨形成は阻害されている。よって、圧迫側では骨吸収促進のみならず、ヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDL細胞) からの骨形成抑制因子、Asporin (ASP) や Sclerostin (SOST) が関わっていると考えられる。hPDL細胞におけるSOSTの発現はまだ確認されておらず、かつ機械的圧迫力に対するASPとSOSTの発現変化についても明らかにされていない。本研究では培養hPDL細胞へ遠心力による機械的圧迫力を付与した時のASPとSOSTの発現と放出を調べた。【方法】矯正治療のため抜去した小白歯から採取したhPDL細胞を使用し、遠心力 (40/90/135/160 xg) を24時間付与した。ASPとSOSTの遺伝子発現量はPCR法、タンパク発現量は免疫染色、細胞外放出量はELISA法にて調べた。【結果】in vivoではASPはPDL細胞、破骨細胞、骨芽細胞に発現し、in vitroではASPとSOSTはhPDL細胞に発現していた。hPDL細胞に遠心力を付与することにより、SOST mRNAの発現は減少したが、ASP mRNAは90 xgで最大の発現を示し、40/135/160 xgでは有意に減少した。また、ASP免疫陽性細胞数および細胞外放出量は増加し、SOST免疫陽性細胞数は減少した。【考察】hPDL細胞に機械的圧迫力を付与した場合、圧迫側ではSOSTでなくASPによって骨形成阻害が行われている可能性が示唆された。

P1-24

歯根膜におけるプライマリー・シリアの出現率と過剰咬合による変化
 ○井田 貴子¹、加来 賢¹、北見 恩美^{1,2}、魚島 勝美^{1,3} (新大 院医歯生体補綴、²日本学術振興会、³新大 医歯学総合病院)

プライマリー・シリアは細胞表面に突出している非運動性の毛様オルガネラで、組織発生と維持に重要な役割を果たしている。さらにその形態から細胞の機械的刺激受容器として機能するとの報告があるが、歯根膜におけるその局在と存在意義については明らかではない。本研究ではプライマリー・シリアの歯根膜における出現と過剰咬合によるその変化について免疫組織学的に検索した。3日間の過剰咬合を付与したラット上顎臼歯のパラフィン包埋標本を作成し、抗acetylated tubulin抗体にてプライマリー・シリアの検出を行った。上顎第一臼歯の歯頸部、根尖部、根分岐部歯根膜細胞数を計測し、陽性細胞率を算出した。プライマリー・シリアの歯根膜全体における出現率は12.9±2.9%であり、歯頸部 (16.0±4.9%)、分岐部 (12.8±1.8%)、根尖部 (9.9±2.0%) の順に高い出現率を示し、歯槽骨側と比較してセメント質側に高い出現率を示した。更に過剰咬合により、根分岐部、根尖部の歯槽骨側において著明な増加が認められた。以上の結果より、プライマリー・シリアが歯根膜中のセメント質近傍に多く観察されること、またその出現率は部位により異なることが明らかとなった。過剰咬合に対する出現率が部位特異的に変化することから、機械的刺激に対する歯根膜の部位特異的な応答にプライマリー・シリアが関与している可能性が示唆された。

P1-25

咬合負荷が抜歯即時埋入チタンインプラント周囲の骨組織に与える影響について

○池田 欣希¹、長谷川 智香²、網塚 憲生²、横山 敦郎¹ (1)北大 院歯 口腔機能補綴、²北大 院歯 硬組織発生物)

【目的】インプラント臨床では埋入後早期や即時の機能負荷が行われているが、その際のインプラント周囲骨組織の反応については不明な点が多い。そこで我々は、埋入後早期の咬合負荷がインプラント周囲骨組織に与える影響について組織化学的に検索した。【方法】生後4週齢の雄性Wistar系ラットの上顎左側第一臼歯を全身麻酔下で抜歯し、チタンスクリュー（以下インプラント体）を即時埋入した。実験群には、埋入1週または2週後にインプラント体上部に接着性レジンを追加して咬合負荷を与え、対照群には咬合負荷を与えなかった。咬合負荷1週後にアルデヒド固定し、パラフィン切片を作製後、ALP、TRAP、オステオカルシン(OCN)、オステオポンチン(OPN)の免疫組織化学を行った。【結果と考察】対照群及び実験群ともにスクリューのスレッド間には新生骨が形成されていたが、1週及び2週ともに実験群では、対照群と比較して、スレッド間における骨梁が太く骨梁間が減少する傾向がみられた。TRAP陽性破骨細胞やALP陽性骨芽細胞の局在性は実験群と対照群の間で差異は認められなかったが、骨梁におけるOCN陽性・OPN陽性セメントラインは、対照群では太く複雑な鋸歯状を示すのに対し、実験群では細く滑らかな走行を示す傾向が認められた。以上から、埋入後早期の適度な咬合負荷は骨改造を緩やかにし、スレッド間の骨梁の太さを増加させる可能性が示唆された。

P1-27

ラット頭蓋骨発生・成長過程における骨基質石灰化の成熟に関する検討

○逸見 晶子¹、大方 広志²、三上 靖人¹、鈴木 治³、笹野 泰之¹ (1)東北大 院歯 顎口腔形態創建、²東北大 院歯 歯内歯周治療、³東北大 院歯 顎口腔機能創建)

【目的】骨発生における石灰化の成熟については知見が乏しい。本研究では、発生・成長期のラット頭蓋骨を構成する元素の分布と相対的濃度及び結晶構造の解析を行い、骨基質の石灰化を検討することを目的とした。【方法】胎生16、18、20日齢、生後1、6週齢のラットを固定し、頭部を試料とした。その後、試料を非脱灰で凍結包埋して頭蓋骨前方部まで前頭方向に切片を作製し、組織学的に検討した。切片を得た凍結包埋試料を凍結乾燥し、断面を対象に分析走査電子顕微鏡(SEM-EDX)を用いて構成元素(Ca、P、C)の分布と相対的濃度を解析した。さらに、X線回折(XRD)により、各発生・成長段階のラット頭蓋骨基質の石灰化物の結晶構造を解析した。【結果】組織切片上で、胎生16日に頭蓋骨の形成が認められた。SEM-EDXによる分析では、骨組織に一致してCaとPの集積が見られ、その他の部位にCの集積が見られた。骨基質における元素濃度比Ca/Pは胎生16日で低く、発生・成長に伴い上昇する傾向が見られた。また、C/Ca、C/Pは胎生16日で高く、胎生18日以降は低下した。さらに、XRDによる解析では、胎生16日以降生後6週に至る過程で骨基質の石灰化物の結晶構造が成熟することが示された。【結論】ラット頭蓋骨は発生・成長過程で、有機質の相対的な減少を伴いながら石灰化が進行し、非晶質リン酸カルシウムから低結晶性のアパタイトに成熟する。

P1-26

C2C12培養筋芽細胞の増殖におけるmiR-29の役割について

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

【目的】C2C12培養筋芽細胞を用いた研究から、miR-29がHDAC4を介し分化を抑制していることがすでに報告されている。本研究の目的は、C2C12の増殖におけるmiR-29の役割を明らかにすることである。【材料および方法】C2C12培養筋芽細胞を10%ウシ胎児血清含有培養液中で、3~4日間培養した。細胞増殖をMTT比色法、miR-29aの発現をReal-time PCR法により調べた。さらにmiR-29aに対するインヒビター(mirVanaTM miRNA inhibitor, Life technologies)を培養液に添加し、C2C12の増殖に及ぼす影響について調べた。【結果】C2C12の増殖は培養開始後1日目にはわずかに増加し2~4日で顕著に増加した。4日目は培養開始時と比較し4倍以上増加していた(p<0.01)。また、miR-29aの発現量は培養開始時と比較し1日目に約12倍に増加し(p<0.05)、2日目以降の急激に減少した。miR-29aに対するインヒビターで処理したC2C12の増殖は2日目以降にネガティブ・コントロールで処理したC2C12と比較して約60%抑制されていた(p<0.01)。【結論】以上の結果より、miR-29aがC2C12の増殖調節機序に関与している可能性が示唆された。

P1-28

骨格筋筋芽細胞シートへの間葉系細胞の影響

○梅澤 貴志¹、山根 茂樹¹、井出 吉信¹、阿部 伸一¹ (1)東歯大 歯 解剖)

【目的】我々はこれまでに日本家兎口腔粘膜上皮細胞シートと骨格筋筋芽細胞シートを積層した上皮細胞-筋芽細胞ハイブリットシートを開発し、構造維持に重要な細胞骨格タンパクや接着タンパクの観察を行ってきた。現在は上皮細胞シートと筋芽細胞シートの間に関葉系細胞の層を挟んだより正常組織に近い三層構造の積層シートの作製に取り組んでいる。今回は日本家兎骨格筋筋芽細胞と間葉系細胞を様々な条件で共培養を行い、間葉系細胞が骨格筋筋芽細胞の増殖、分化に与える影響を検討した。

【方法】6ウェルプレートインサート上に日本家兎口腔粘膜から分離した骨格筋筋芽細胞を播種したものを用意し、コラーゲンゲルの有無ならびに日本家兎より採取した間葉系細胞との共培養の有無による影響について検討した。間葉系細胞はコラーゲンゲル内で培養した場合とセパレート培養した場合についても影響を観察した。培養後筋芽細胞シートを回収し、凍結切片による組織学的な観察を行った。

【結果】間葉系細胞と共培養することによって、日本家兎由来骨格筋筋芽細胞は形態学的に差異が生じることがわかった。また、コラーゲンゲルを積層することによっても形態学的な変化が観察された。

【考察】骨格筋筋芽細胞シートの作製においては間葉系細胞との共培養、細胞外マトリックスの重要性が示唆された。今後は間葉系細胞の骨格筋筋芽細胞に対する影響の機序の容細な検討が必要であると考えられた。

P1-29

歯牙発生過程における Tie2/Ang1 の局在の検索
○中島 和慶¹、柴田 恭明²、澤瀬 隆¹、池田 通² (¹長大 院医歯薬 口腔インプラント、²長大 院医歯薬 口腔病理)

Tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 2 (Tie2)は、血管内皮細胞に発現する受容体型チロシンキナーゼで、そのリガンド Angiopoietin1 (Ang1)は血管支持細胞から分泌され、パラクラインな機序によって血管の新生や安定化に関与する事が知られているが、両分子の歯牙における局在は明らかにされていない。今回我々は、マウス下顎第一大臼歯発生過程における両者の局在を観察した。Tie2は胎生18日目(E18)に、象牙芽細胞頭頂側で発現が開始した。生後1日目(P1)では、Tie2は象牙基質に埋入した象牙突起に局在し、その発現は成熟歯牙の象牙芽細胞でも維持されていた。Nestinとの免疫蛍光二重染色では、両者の局在は一致した。一方、骨芽細胞でのTie2の発現はみられなかった。Ang1は、E18では内エナメル上皮、前エナメル芽細胞、ならびに象牙芽細胞に局在した。P1では、Ang1は象牙基質に局在し、P3以降では、象牙前質ならびに管周象牙質に局在し、その発現は成熟歯牙においても維持された。以上の結果は、Tie2/Ang1が、パラクラインな機序で象牙芽細胞分化に関与する一方、成熟歯牙においてはオートクラインな機序で象牙質維持に関与する事を示唆した。

P1-30

唾液腺介在部導管細胞はCD117とCD66aを指標として分離できる
○竹山 旭¹、吉川 美弘²、池尾 隆²、森田 章介¹、檜枝 洋記³ (¹大歯大 院歯 口腔外科1、²大歯大 院 生化、³大歯大 院 生物)

【目的】唾液分泌障害の根本的治療法として幹細胞を利用した再生医療が期待されている。唾液腺上皮幹細胞は介在部や排出部導管に存在するが、唾液腺構成細胞を分離する方法が確立されていないため、詳しい性状はわかっていない。本研究では、細胞表面分子CD117とCD66aが唾液腺構成細胞を系統的に分離するための有用なマーカーであることを報告する。【材料・方法】成体マウス顎下腺の凍結組織切片および単一細胞標本をCD117、CD66a、腺房マーカーAQP5、導管マーカーCLDN4、基底・筋上皮マーカーCK5に対する抗体および蛍光標識2次抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡観察およびFACS解析を行った。動物実験は大歯大動物実験規定に従った。【結果】顎下腺の腺房、介在部導管、線条/排出部導管の各細胞、そして基底・筋上皮細胞ではCD117とCD66aの染色強度が異なっていた。介在部導管細胞はCD117+CD66aHi、線条・排出部導管の一部の細胞はCD117+CD66aLoであり、これらの細胞をFACS分離できた。【結論】唾液腺上皮幹細胞の存在部位である介在部導管および線条・排出部導管の細胞を、生きたまま分離することに成功した。これらの細胞の分化能や唾液腺再生能、発現遺伝子を調べることによって、唾液腺幹細胞の性質を詳細に解析することが可能となり、唾液腺再生医療の確立に大きく貢献することが期待される。

P1-31

矯正の歯の移動時におけるアレルギー誘導性歯根吸収促進機構
○村田 直久¹、五百井 秀樹¹、大内 雅博¹、合島 怜央奈²、沖 雄二²、山座 孝義²、高橋 一郎¹、城戸 瑞穂² (¹九大 歯 歯科矯正、²九大 歯 分子口腔解剖)

【目的】矯正歯科治療における予期せぬ歯根吸収の機構は解明されていない。我々は、九大病院矯正歯科における疫学調査において、歯根吸収とアレルギー疾患との間に有意な関連があることを見出した。アレルギー誘導性歯根吸収の機構解明を目的として、アレルギー惹起歯根吸収モデルラットを作製し、破骨細胞の誘導との関連が知られているTh17細胞関連サイトカインや脂質メディエーターの発現変化を検討した。【方法】6週齢BNラットにOVA感作を行い、アレルギー疾患モデルを作製した。14日後、上顎切歯と第一大臼歯(M1)にcoil springを装着して矯正力を負荷し、24時間後にM1周囲歯槽骨を採取し、脂質およびRNAの抽出を行い、ELISA法および定量PCRを用いて解析した。【結果と考察】Coil springを装着したアレルギー群では、OVA非感作群、coil spring非装着群および無処置群と比較して、IL-17およびIL-23の発現上昇が認められた。さらに、ロイコトリエンB4などの脂質メディエーターの発現量の上昇が認められた。これらの結果から、アレルギー惹起による歯周組織中のTh17細胞関連サイトカインや脂質メディエーターなどのバランスの変化が、歯の移動による破骨細胞の分化誘導を伴う歯根吸収に影響していることが示唆された。

P1-32

ジルコニア上で培養したC2C12細胞の骨芽細胞分化能
○斉藤 まり¹、唐木田 丈夫²、山本 竜司²、長野 孝俊¹、五味 一博^{1,2}、大井田 新一郎² (¹鶴見大 歯 歯周病、²鶴見大 歯 分子生化)

ジルコニアは優れた生体適合性や高い機械的強度を有するセラミックスであり、歯科インプラントのアパットメント(支台部)として応用されている。【目的】今回我々は、ジルコニアのフィクスチャー(歯根部)としての適応性を調べるために、ジルコニア、チタン及びガラスディスク上でマウス未分化筋芽細胞株であるC2C12細胞を培養し、細胞増殖能及び骨芽細胞分化能について比較検討することを試みた。【材料及び方法】C2C12細胞をそれぞれのディスク上に播種し、10%FBS含有αMEM培養液中で培養して細胞増殖能を測定した。また、石灰化誘導培地(アスコルビン酸、β-グリセロリン酸、BMP2、レチノイン酸含有)を用いて培養し、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、アリザリンレッド(ARS)染色、カルシウム量の測定を行うことで骨芽細胞分化能を検討した。【結果と考察】細胞増殖能、石灰化誘導時のALP活性及びARS染色像において、ジルコニアディスク上で培養した細胞は、チタン及びガラスディスク上で培養した細胞とはほぼ同じ所見が得られ、骨芽細胞への分化が認められた。これらの結果は、フィクスチャーにおけるジルコニアの歯科インプラント材料としての将来的有用性を示唆している。

P1-33

Sp7による骨芽細胞分化機構と自己プロモーター制御

○小守 寿人¹、宮崎 敏博¹、森石 武史¹ (¹長大院医歯薬 細胞生物)

Runx2は骨芽細胞の後期分化を抑制するが、Sp7の機能は完全には解明されていない。今回骨芽細胞分化におけるSp7の役割を追及した。Runx2は、Runx2-/-の頭蓋冠由来細胞においてSp7の発現を誘導した。Sp7発現アデノウイルスの導入は骨芽細胞の後期分化段階でBglap2発現と石灰化を抑制、初期培養骨芽細胞へのsh-Sp7発現アデノウイルス導入は、Alpl、Coll1a1、Bglap2の発現及び石灰化を減少させた。2.3 kb Coll1a1プロモーターSp7トランスジェニック(tg)マウスでは骨量が減少、皮質骨は線維骨様を示し、骨芽細胞密度は増加、骨形成は低下していた。また、骨芽細胞及び骨細胞突起の減少が見られた。骨芽細胞におけるCol1a1、Spp1、Ibsp、Bglap2の発現は低下、BrdUの取り込み頻度は増加していた。さらに、Sp7 tgマウスおよびRunx2 tgマウスで低下していた骨量は、Sp7/Runx2ダブルtgマウスでさらに低下、Coll1a1とBglap2の発現も低下していた。Sp7とRunx2の発現誘導はそれぞれRunx2 tg、Sp7 tgマウスで認められなかった。Sp7 tgマウスとSp7を導入した細胞では内在性Sp7の発現が増加していた。Sp7の導入はSp7プロモーターを活性化、sh-Sp7の導入は抑制した。そして、チップアッセイで、Sp7プロモーター近傍領域に内在性Sp7の結合が検出された。これらの結果から、Sp7とRunx2はそれぞれRunx2とSp7に依存しない方法で、後期骨芽細胞の分化を抑制し、Sp7が正に自身のプロモーターを調節することが示された。

P1-35

大脳皮質形成におけるステロイドホルモンの局在と役割

○駒田 致和¹、池田 やよい¹ (¹愛院大 歯 解剖)

大脳皮質はヒトで最も高度に発達させてきた器官であり、様々な神経機能を支配している。胎生期の適切な時期に適切な数と種類の神経細胞が形成されることで構造、機能ともに成熟した大脳皮質が形成される。その発生機構は転写因子や液性因子をはじめ、多くのシグナル因子によって調節されている。つまり、この調節因子が様々な要因によって阻害され、組織・機能的に大脳皮質の発生・成熟が阻害されると、様々な精神・神経疾患や高次脳機能障害の原因となることが予想できる。これまでに我々は、大脳皮質の発生においてエストロゲン様作用を引き起こす内分泌かく乱物質の胎児期曝露によって、大脳皮質の形成異常が引き起こされることを報告してきた。エストロゲンレセプターのノックアウトマウスの解析などにより、エストロゲンが脳の発生や成熟に重要な役割を果たしていることが示唆されているが、大脳皮質の発生における役割には不明な点が多い。本研究課題では、ステロイドホルモンの産生を調節する転写因子であるSteroidogenic factor-1(SF-1)ノックアウト(KO)マウスをステロイドホルモン欠損モデルマウスとして、大脳皮質形成におけるエストロゲンの役割の直接的な解明を試みた。大脳皮質におけるエストロゲンやエストロゲン産生酵素の分布や存在を発生時期特異的に解析するとともに、SF-1KOマウスの大脳皮質形成における異常を組織学的に詳細に解析したので報告する。

P1-34

iPS細胞を用いた歯胚組織再生

○坂野 深香¹、大津 圭史¹、藤原 尚樹¹、原田 英光¹ (¹岩医大 解剖 発生生物・再生医学)

[背景、目的] 人工多能性幹細胞(iPS細胞)は歯科再生医療のための細胞ソースとして注目されている。我々は以前、iPS細胞から分化誘導した神経堤細胞(NCLC)が、歯原性間葉細胞や歯系幹細胞に分化する能力を持つことを示した。そこで本研究ではNCLCが、歯胚上皮組織と共培養することで歯を構成する細胞に分化し、3次元的な歯胚構造を構築できるかを検討した。[方法] iPS細胞から分化させたNCLCと胎生14.5日齢ddYマウス臼歯上皮組織をsemi-solid medium上で8日間共培養し、その後ddYマウス腎被膜下に移植した。移植15日後に試料を摘出、固定、脱灰した後、パラフィンに包埋し切片を作成した。作製した切片に対してH-E染色、象牙芽細胞マーカー(DSP, DMP1, Nestin)に対する免疫染色を行った。[結果] 培養8日後、歯胚上皮組織とNCLCとの共培養体は3次元的に歯胚様の外観を呈していた。またマウス腎被膜下移植後の組織切片ではH-E染色にて歯胚の組織像が観察され、細胞突起をもつ象牙芽細胞様の細胞はDSP, DMP1, Nestin陽性であった。[結論] 本研究より、iPS細胞から分化誘導した神経堤細胞が象牙芽細胞へと分化し、3次元的な歯胚組織を形成できることがわかった。このことから将来この細胞が、歯の器官再生に有用であることが示された。

P1-36

象牙芽細胞における一次繊毛形成遺伝子IFT88の生理機能の解析

○河田 かずみ¹、竹田 扇¹ (¹山梨大 院医工 解剖細胞生物)

一次繊毛は細胞外環境を感知するセンサーとして機能することが知られており、象牙芽細胞を含む、体を構成する殆どの細胞に存在する。一次繊毛の形成に関与するものとして、Intraflagellar transport protein (IFT) 88が知られているが、これは同時に細胞分裂にも関わっていることが近年報告されている。今回、我々は、象牙芽細胞においてIFT88の新たな生理機能の一端を示す知見を得たので報告する。象牙芽細胞株KN-3細胞においてIFT88をノックダウンし、一次繊毛欠損KN-3(sh-IFT88 KN-3)細胞を作製した。細胞播種後1日のsh-IFT88 KN-3細胞において、細胞接着・増殖速度はいずれも低下を示した。これは、KN-3細胞にPI3K inhibitorの添加時と同様の結果であった。また、細胞播種後4日のsh-IFT88 KN-3細胞において、象牙芽細胞分化マーカー遺伝子の発現の増加、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の抑制が確認された。また、初代象牙芽細胞の分化の進行と共に一次繊毛を有する細胞数は一旦は上昇を見せるものの、次第に減少することが明らかとなった。以上の結果から、象牙芽細胞において、IFT88は増殖期にはPI3Kシグナルを介して細胞接着・速度を制御し、分化初期には一次繊毛特異的シグナルの受容を介して象牙芽細胞の分化を制御する可能性が強く示唆された。

P1-37

Runx/Cbfb シグナリングはアンドロゲン代謝を介した唾液腺の雌雄二形性発現を制御する
 ○伊藤 慎将¹、柳田 剛志²、山城 隆³ (1) 大阪大学歯学部 歯科矯正、(2) 大阪大学病院 矯正歯、(3) 大阪大学歯学部 顎顔面口腔矯正)

【背景】唾液腺は雌雄二形性を示す特徴的な組織である。齧歯類の唾液腺介在部に接する導管の末梢部に、特殊な細胞内顆粒をもつ上皮からなる顆粒管が存在する。その形成は成熟した雄に特有であり、未成熟期の精巣摘出によりその構造は失われる。また唾液腺疾患の罹患に性差があることが知られており、唾液腺の雌雄二形性を決定づける分子機構の解明は、臨床的にも重要である。

【方法】Runx 分子の共役因子である Core binding factor β (Cbfb) を上皮特異的に欠損させたコンディショナルノックアウトマウス (*Cbfb^{tm1a}*) を作成し、唾液腺を解析した。組織学的解析は、*in situ* hybridization 法および免疫組織染色を用い、遺伝子発現解析は、リアルタイム RT-PCR 法を用いて行った。

【結果】*Cbfb^{tm1a}* では、35 日齢の雄の顎下腺において顆粒管が消失していた。*Cbfb^{tm1a}* の顎下腺では、顆粒管細胞のマーカーである *Klk-1* の著しい発現低下がみられ、またアンドロゲン (AG) レセプターのマーカーである *Crisp-3* の発現も低下していた。さらに *Cbfb^{tm1a}* は、AG レセプターの活性化補助因子である Stat-3 のリン酸化が有意に減少しており、同時に AG を活性化させる 5α リダクターゼの発現低下がみられた。

【考察】Runx シグナルは、齧歯類の顎下腺の顆粒管形成において、AG レセプターの活性化補助因子である Stat-3 のリン酸化と、 5α リダクターゼの発現維持を介してアンドロゲンの作用機序制御に関与していることが示唆された。

P1-38

Simvastatin がマウス歯肉線維芽細胞由来 iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響
 ○大川 博子¹、江草 宏¹、矢谷 博文¹ (1) 大阪大学歯学部 クラウンブリッジ補綴)

【目的】本研究の目的は、simvastatin が iPS 細胞の骨芽細胞分化に及ぼす影響を検討することである。【方法】成体マウスから分離培養した歯肉線維芽細胞を用いて作製した iPS 細胞 (mGF-iPSCs) を、1 μ M simvastatin 含有骨芽細胞分化誘導培地にて 28 日間培養し、RT-PCR 解析を用いて骨芽細胞分化特異的遺伝子 (osteocalcin, collagen 1, osterix) の発現を検討するとともに、Alizalin Red 染色により細胞外基質の石灰化を観察した。また、simvastatin の mGF-iPSCs に対する細胞毒性および増殖能に及ぼす影響を、WST-1 細胞増殖および細胞生存アッセイを用いて検討した。さらに、mGF-iPSCs の三次元細胞凝集体を作製し、1 μ M simvastatin 含有骨芽細胞分化誘導培地にて 30 日間分化誘導後、SCID マウス皮下へ移植した。移植 28 日後に、移植細胞による異所性の骨形成を組織学的に評価した。【結果】simvastatin は、mGF-iPSCs の骨芽細胞分化特異的遺伝子の発現および細胞外基質の石灰化を著明に促進した。また、simvastatin は 0.01-1 μ M の濃度範囲で mGF-iPSCs の増殖を濃度依存的に抑制した。さらに、simvastatin 存在下で骨芽細胞へ分化誘導した細胞移植体の内部には、非添加の場合と比較してより成熟した骨組織の形成を認めた。【結論】本研究の結果、simvastatin は mGF-iPSCs の骨芽細胞分化を促進し、mGF-iPSCs による異所性骨形成を促進することが明らかとなった。

P1-39

ミノドロン酸の同位体顕微鏡を用いた骨組織分布と破骨細胞に対する影響
 ○佐々木 宗輝¹、本郷 裕美¹、小林 幸雄²、坂本 尚義²、網塚 憲生¹ (1) 北大 院歯 硬組織発生生物、(2) 北大 創成研)

【緒言】近年、骨粗鬆症の治療にもちいられる月一回経口投与のビスフォスフォネート製剤が破骨細胞や骨芽細胞に与える影響を明らかにするため、我々は同位体顕微鏡でミノドロン酸の骨組織分布を観察すると共に破骨細胞の変化を組織化学的に検索した。【材料と方法】生後 8 週齢の雄性 ICR マウスに安定同位体である ¹⁵N を標識したミノドロン酸を外頸静脈から投与し、3 時間、24 時間、1 週間、1 ヶ月後に灌流固定を行いパラフィンまたはエポキシ樹脂に包埋した。切片作成後、同位体顕微鏡によるミノドロン酸の骨組織分布の観察、ならびに ALP/TRAP、TRAP/カテプシン K の二重染色を行った。【結果と考察】ミノドロン酸は骨幹端骨梁の形成面ならびに吸収面の両方の骨表面に認められた。投与直後から 1 週間後では成長板近くの一次骨梁表面に、1 ヶ月後では二次骨梁の骨表層内部に局在する傾向を示した。ミノドロン酸投与 24 時間以内では、ALP/TRAP および TRAP/カテプシン K の局在性は大きく変化しなかった。しかし、1 週間・1 ヶ月後では、破骨細胞における TRAP とカテプシン K の局在が一致しなくなり、一部、アポトーシスを示した。ALP 陽性骨芽細胞は、1 週間後では扁平化したが、1 ヶ月後ではふくよかな形態を示すものが局所的に観察された。従って、ミノドロン酸は、骨基質に広範囲に結合すること、骨吸収抑制があるが破骨細胞の障害性が低いことから、骨芽細胞とのカップリングを維持するものと推測された。

P1-40

骨細胞は interferon- β (IFN- β) を産生し破骨細胞形成を負に制御する
 ○林田 千代美¹、伊東 順太¹、中谷地 舞²、岡安 麻里²、大山 洋子³、羽毛田 慈之¹、佐藤 卓也¹ (1) 明海大 歯 形機成 口腔解剖、(2) 明海大 歯 形機成 歯科矯正、(3) 明海大 歯 病診治 口腔顎顔面外科 1)

【目的】骨細胞による破骨細胞 (OC) 形成調節について、株化骨細胞 MLO-Y4 の培養上清 (MLO-Y4-CM) 及び骨細胞を高純度を含む骨片 (OEBF) の新規培養法を用いて検討した。【方法】OC 形成の評価は、骨髄細胞から M-CSF により OC 前駆細胞 (OCP) を誘導、さらに可溶性 RANKL を加え OC を誘導する系を用いた。OEBF は、5 週齢マウス大腿骨骨幹を 2 mm \times 3 mm の骨片にし、骨片表面の細胞をコラゲナーゼ/EDTA 処理で除去し調製、トランスウェルプレートインサートウェル上で器官培養法に準じ培養した。【結果と考察】OCP 形成期に MLO-Y4-CM 存在下で誘導した細胞では、*double-stranded RNA protein kinase (PKR)* mRNA の発現亢進、可溶性 RANKL が産生を促進する c-Fos の翻訳阻害及び OC への分化能の低下が見られた。これら MLO-Y4-CM の作用は抗 IFN- β 中和抗体の添加で一部解除された。インサートウェル上の OEBF と骨髄細胞を OCP 形成期のみ共存培養すると OC 形成は抑制され、この抑制は抗 IFN- β 中和抗体添加で一部回復した。実際、MLO-Y4 細胞及び OEBF は IFN- β mRNA を発現していた。また、OPG 欠損マウス由来の OEBF も OC 形成を抑制した。以上の結果から、骨細胞は IFN- β を産生し OC 形成を抑制することが示唆された。

P1-41

レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) の破骨細胞形成と炎症性骨破壊に対する役割の解明

○伊東 順太¹、中谷地 舞^{1,2}、林田 千代美¹、岡安 麻里^{1,3}、大山 洋子^{1,4}、佐藤 卓也¹、羽毛田 慈之¹ (明海大 歯 口腔解剖、²明海大 歯 歯科矯正、³東大 医 口腔外科・歯科矯正歯科、⁴明海大 歯 口腔外科一)

【目的】我々は細胞外 LDL が破骨細胞形成に必須であることを明らかにしてきた。しかし、骨代謝と脂質の関連には未だ不明な点が多く残る。そこで本研究では、破骨細胞形成と炎症性骨破壊に対する酸化 LDL 受容体の役割を解明するために、レクチン様酸化 LDL 受容体-1 (LOX-1) および scavenger receptor class A (SRA) の遺伝子欠損 (KO) マウスと野生型 (WT) マウスを用いて検討した。【方法】3 系統の骨髄細胞からの破骨細胞形成を *in vitro* で測定した。また、各マウスの頭蓋骨骨膜下に LPS を 5 日間投与した炎症性骨破壊モデルを作製し、頭蓋骨における破骨細胞形成関連因子の mRNA の定量を行った。【結果】SRA KO の *in vitro* の破骨細胞形成は WT と同等であったが、LOX-1 KO において、細胞融合促進によって破骨細胞形成が増加した。一方、頭蓋骨における *TRAP*、*Cathepsin K*、*NFA Tc1* mRNA の発現は WT と SRA KO では LPS で同等に増加したが、LOX-1 KO では LPS による遺伝子発現誘導は小さいものであった。この時各マウス間の LPS による *TNF- α* 、*RANK* mRNA 発現誘導に差はなかったが、*RANKL* mRNA は、LOX-1 KO でその発現誘導が減少した。【結論】LOX-1 は潜在的に破骨細胞抑制因子であるが、炎症部位において、*RANKL* 発現が LOX-1 依存的に調節されることが示唆された。

P1-43

ラット三叉神経節における endomorphin-1 の分布; 免疫組織化学的手法による検討

○矢島 健大¹、佐藤 匡²、齋藤 正寛¹、市川 博之² (東北大 院 歯 歯科保存、²東北大 院 歯 口腔器官構造)

endomorphin (EM) は μ オピオイド受容体に特異的に結合するペプチドである。EM-1 は脳に広く分布し、EM-2 は脊髄に含まれていることが知られている。しかしながら末梢組織における EM の分布については不明な点が多い。本研究では、ラット三叉神経節における EM-1 の分布を免疫組織化学的手法である ABC 法により調べた。三叉神経節においては、EM-1 を発現する一次感覚ニューロンが豊富に存在していた (40.4%)。これらのニューロンは小型から中型であった。小型のニューロンでは 79.9%、中型のニューロンでは 37.6% が EM-1 を発現していた。EM-1 を含む大型のニューロンは非常に稀であった (5.5%)。さらに、侵害受容ニューロンのマーカーである calcitonin gene related peptide (CGRP) と EM-1 との関係を蛍光二重染色法により調べたところ、多くの小型ニューロンでこれらの物質の共存が認められた。また、逆行性トレーサーである Fluorogold (FG) を用いて、三叉神経節における EM-1 陽性ニューロンの支配領域についても調べた。FG をラット顔面皮膚あるいは歯髄に注入し、三叉神経節における FG 陽性ニューロンでの EM-1 の発現について比較した。顔面皮膚を支配するニューロンの一部では、EM-1 の発現が観察されたが、歯髄を支配するニューロンでは非常に稀であった。以上の結果から、EM-1 が三叉神経節において侵害刺激の伝達に関与することが示唆された。

P1-42

粉末食を与えて飼育したマウスの下顎骨形態変化
○柳田 剛志¹、久保田 聡²、滝川 正春²、山城 隆³ (¹岡大病院 矯正、²岡大 院 医歯薬 口腔生 化、³阪大 院 歯 顎顔面口腔矯正)

【背景】不正咬合の頻度は歴史的に見て増加している。これは咀嚼機能が低下し顎骨が退化縮小した結果であると言われている。しかしこのような環境因子が、どのように骨の形態に影響を及ぼすのか不明である。硬さの違う食餌で飼育すると、ウサギやラットの顎骨形態に変化が生じることは報告されているが、顎骨形態決定の分子生物学的解析を効率的に進めるためには、マウスで同様のモデルを作成する必要がある。ところが、マウスのような小さな動物では、従来の単純 X 線装置で骨格の変化を観察することは難しかった。【方法】離乳直後より、固形状マウス試料で 2 週間飼育した生後 5 週齢のオス ICR マウスと、粉末状マウス試料で飼育したオス ICR マウスを使用して解析を行った。実験動物用 X 線 CT 装置 (ラシータ LCT-200、日立アロカ社) にて撮影したデータを、3D 解析ソフト (VGStudio MAX 2.0、ポリウムグラフィクス社) を用いて立体構築を行った。その後、セファログラム分析法を用いてサンプル間の比較を行った。【結果と考察】非破壊的にマウスの顎骨の形態を詳細に解析し、食餌の硬さの違いがマウスの顎骨形態形成に影響を与えることを明らかにした。粉末食を与えたマウスは骨格性ハイアングルの形態的特徴を有していた。今後、このモデルマウスを用いて顎骨形態決定の分子生物学的解析をすすめていく予定である。尚、本研究は JSPS 科研費 24792284 の助成を受けて実施したものである。

P1-44

ヒト上顎骨における大口蓋管の観察

○大峰 悠矢¹、福田 真之¹、野口 拓¹、木下 英明¹、松永 智¹、井出 吉信¹、阿部 伸一¹ (¹東 歯大 歯 解剖)

【目的】上顎臼歯部におけるインプラント治療では、骨が十分に存在するため上顎結節部に支持が求められることが多い。上顎結節部や周囲構造には不明な点が多く残されており、局所解剖学的な検索を行った。【方法】東京慈恵会医科大学所蔵の平均年齢 28.2 歳の日本人頭蓋骨のうち、有歯顎 20 体 40 側を用いた。マイクロ CT にて撮影を行ったのち、三次元立体構築を行った。基準平面は HIP 平面に設定した。その後、大口蓋管の長径 l、前後径 a、幅径 b、体積 v および基準平面とのなす角度 θ_1 について計測を行った。さらに大口蓋管を定点 K、L、M で前頭断したのち、上顎結節部から大口蓋管への距離 d および基準平面と d のなす角度 θ_2 、上顎第二大白歯遠心辺縁線と大口蓋管への距離を結ぶ線と基準平面とのなす角度 θ_3 を計測した。【結果と考察】大口蓋管を底面とし翼口蓋窩の最下点に至る円錐状の構造が認められた。l は 9.8 ± 0.8 、a は 2.3 ± 1.1 、b は 2.2 ± 1.4 ミリメートル、v は 47.6 ± 27.6 立方ミリメートル、 θ_1 は $32.6 \pm 5.9^\circ$ であった。かつ d は 12.6 ± 2.8 ミリメートル、 θ_2 は $49.8 \pm 12.1^\circ$ 、 θ_3 は $51.0 \pm 11.1^\circ$ であった。上顎結節部のフィクスチャー埋入の場合、長径 14 ミリメートル以上、 θ_2 に関して舌側に 60° 程度に傾斜させ埋入を進めた場合には、大口蓋管に近接する可能性があることが示唆された。

P1-45

両側性非対称にみられた顎二腹筋前腹の破格の一例

○山崎 洋介¹、磯川 桂太郎^{1,2} (1)日大 歯 解剖 2、2)日大 歯 総歯研 機能形態)

顎二腹筋前腹の破格は高い頻度で見られ、形態的なバリエーションがあることが知られる。その報告は古くからあり、症例報告も過去に数多い。本報告の顎二腹筋前腹の破格は、両側性にみられ、過剰筋束の数や形態が左右非対称であった。顎二腹筋異常の型別分類としての Zlabek(1933)および山田(1935)の分類に基づけば、右側は起始型と停止型の、左側は起始型の過剰筋束が存在する複合型となっていた。また顎二腹筋の正中縫線を跨ぎ、両側の顎二腹筋中間腱を繋ぐように走行する過剰筋束も存在した。18世紀以降の45の文献から、図や写真により示されている303症例と照合したが、同じ種類の筋異常の報告は無く、稀有な症例と考えられた。これら過剰筋束は、発生起源を同じくする顎舌骨筋の過剰筋束である可能性や、顔面神経の支配を受ける顎二腹筋後腹と関係する筋束である可能性もあるが、いずれの過剰筋束も左右顎二腹筋前腹の内側でかつ顎二腹筋前腹と同一平面内にあること、顎舌骨筋神経からの枝が過剰筋束の頭側から侵入することから、やはり顎二腹筋前腹の過剰筋束であると結論した。これら顎二腹筋前腹の過剰筋束は、第一鰓弓に由来する顎下部の複雑な形態形成を反映したものである。顎下部の解剖や臨床的施術は、本報告例を含めて顎二腹筋前腹の多様かつ種々の頻度で生じる破格を念頭に実施する必要がある。

P1-47

ヒト上顎骨白歯部皮質骨における生体アパタイト結晶配向性解析

○笠原 正彰¹、松永 智¹、井出 吉信¹、阿部 伸一¹ (1)東歯大 解剖)

【目的】骨質の一つである生体アパタイト (BAp) 結晶の配向性は、局所応力に対して骨量 (骨密度) よりも鋭敏に反応することから、骨強度を示す新しい指標として注目が集まっている。顎骨は、歯を介して様々な荷重を負担し再構築されるため、その複雑な構造特性を解明するのは困難であった。そこで我々は微小領域 X 線回折法を用いて BAp 結晶配向性地図を作製し、上顎骨における構造特性の定量的評価を行うことを目的とした。【方法】試料は正常咬合を有するヒト上顎骨とし、関心領域は第一大臼歯周囲の皮質骨とした。BAp 結晶配向性の計測は微小領域 X 線回折装置を用いて回折強度比を算出し、三次元的な評価を行った。【成績・考察】口蓋側皮質骨においては近遠心方向に、頬側皮質骨においては咀嚼方向・頬側口蓋側方向に優先配向性が得られた一方、頬側皮質骨においては咀嚼方向、頬側方向に優先配向性が得られた。この結果より、上顎骨において骨成長と異なる方向の BAp 配向性が示され、複雑な咀嚼荷重によるメカニカルストレスが上顎骨皮質骨に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

P1-46

一次求心ニューロンによる精製 A 型ボツリヌス毒素の取り込みと軸索輸送

○丸濱 功太郎¹、松香 芳三²、寺山 隆司¹、窪木 拓男³、杉本 朋貞¹ (1)岡大 院医歯薬 口腔機能解剖、2)徳大 院 HBS 咬合管理、3)岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴)

【目的】我々は精製 A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) の疼痛抑制効果に着目し、これまでに末梢に投与した BoNT/A が神経障害性疼痛モデルラットの痛覚関連行動を軽減すること、また三叉神経節において神経伝達物質遊離を抑制することを報告した。しかし、神経障害性疼痛に対する臨床応用への期待が高まる BoNT/A が疼痛抑制効果を発現する詳細なメカニズムは未だ不明である。本研究では、末梢に投与した BoNT/A の三叉神経における取り込み機構ならびに輸送メカニズムを検討した。【方法】Sprague-Dawley 系ラットの培養三叉神経節細胞に蛍光標識した BoNT/A 重鎖を加え、細胞内における BoNT/A の局在を、またラット頬髭部中央に蛍光標識した BoNT/A 重鎖を投与し、摘出した三叉神経節細胞における BoNT/A の局在を共焦点レーザー顕微鏡装置にて観察した。【結果と考察】投与 20 分後、培養三叉神経節細胞内に標識の局在が観察された。また末梢投与 60 分後、同側三叉神経節細胞内において標識の局在が観察された。さらに、コルヒチン前投与により、三叉神経節細胞内の標識蛍光輝度が有意に低下した。本結果は、末梢に投与した BoNT/A が一次求心ニューロンに取り込まれ、軸索輸送により細胞体に到達することを示すものである。本研究は、輸送された BoNT/A が神経障害性疼痛の発症への関与が示唆される神経節内の神経伝達物質遊離を抑制する可能性を示唆するものである。

P1-48

温度感受性 TRP チャネルによる口腔粘膜の新しい創傷治癒機構

○合島 怜央奈^{1,2,3}、大崎 康吉¹、張 旌旗¹、木附 智子¹、村田 直久¹、城戸 瑞穂¹ (1)九大 院歯 分子口腔解剖、2)佐賀大 医 歯科口腔外科、3)佐賀大 医 生体構造機能 組織神経解剖)

【目的】TRPV3 チャネルは温度センサーとして知られ、32°C 以上の温かい温度で活性化される非選択的な陽イオンチャネルである。我々はこれまでに TRPV3 が口腔上皮細胞に高発現し、口腔内の温度環境を積極的に感知していることを明らかにしてきた。本研究では口腔粘膜に生じた傷の治りが速やかであることに着目し、この速やかな治癒に「口腔内の温度環境とそれを感受する TRPV3 チャネルが関与する」との仮説を立てた。【方法】C57BL/6 の上顎第一臼歯を抜歯する創傷モデルを作製し、創部での TRPV3 の発現を調べた。粘膜治癒に重要な役割を担う上皮細胞の増殖と TRPV3 の関係を明らかにするため、野生型マウス (WT) と TRPV3 遺伝子欠失マウス (V3KO) より調整した培養口腔上皮細胞を用い、TRPV3 を活性化する刺激が増殖能へ与える影響を調べた。また WT と V3KO における抜歯後の粘膜治癒を比較した。【結果と考察】創部粘膜では TRPV3 mRNA およびタンパクの発現が上昇していた。口腔上皮細胞を TRPV3 アゴニストで刺激すると細胞数が増加し、さらにアゴニストおよび温度刺激により細胞増殖マーカー陽性細胞数が増加した。また V3KO では WT と比較し口腔粘膜の増殖マーカー陽性細胞数が減少していた。さらに V3KO の粘膜治癒は WT より遅延していた。以上より、口腔粘膜には温度を感知する機能的な TRPV3 チャネルが発現し粘膜の創傷治癒に寄与している可能性が示唆された。

P1-53

ラット中枢 GLP-1 の反射性嚥下におよぼす作用
 ○水谷 論史¹、小橋 基¹、藤田 雅子¹、美藤 純弘¹、松尾 龍二¹ (大塚 院医歯薬 口腔生理)

【緒論】以前の研究で、我々はオレキシン-A を第四脳室内滴下投与することにより上喉頭神経由来の反射性嚥下が抑制され、この抑制は孤束核交連部のオレキシン 1 受容体を介して生じることを明らかにした。オレキシン-A は摂食亢進ペプチドであることが知られている。一方、Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は摂食抑制ペプチドとして知られており、GLP-1 受容体は最後野や孤束核に存在する。そこで、今回我々は、GLP-1 を投与し、上喉頭神経由来の反射性嚥下におよぼす作用を調べた。【方法】実験にはウレタン・クロラロース麻酔下の SD ラットを用いた。上喉頭神経を剥離、切断し、その中枢端で 20 Hz の頻度で 20 秒間の電気刺激を与えることにより、嚥下反射を惹起した。GLP-1 はリンゲル液に溶解し、60 nL の溶液を延髄内に微量注入した。微量注入前後の初回嚥下潜時の変化と、刺激中 20 秒間の嚥下回数の変化を観察した。【結果および考察】最後野および孤束核交連部を含む部位への GLP-1 微量注入により、上喉頭神経由来の反射性嚥下が抑制された。一方で、嚥下起動神経群の存在する孤束周辺部 (dorsal swallowing group) に GLP-1 を微量注入しても反射性嚥下は抑制されなかった。これらの結果により、GLP-1 は最後野あるいは孤束核交連部のニューロンを介して反射性嚥下を抑制することが示唆された。

P1-54

麻酔下ウサギにおける自律神経活動変化が及ぼす開口反射への影響
 ○酒井 翔悟¹、辻 光順¹、真柄 仁¹、辻村 恭憲¹、井上 誠¹ (新大 院医歯 摂食嚥下リハビリ)

【目的】低閾値刺激によって引き起こされる開口反射は咀嚼・嚥下時に抑制を受けることが知られているが、嚥下時における開口反射の変調メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究は嚥下反射を誘発する上喉頭神経 (SLN) 電気刺激や呼吸活動を変調させる KCN 投与時の開口反射の変調を観察し、嚥下中枢および自律神経系中枢と開口反射の変調との関連を考察する事を目的とする。【方法】ウレタン麻酔下 (1.0 g/kg, iv) のウサギを使用した。開口反射および嚥下反射の指標のために顎二腹筋、顎舌骨筋筋電図を記録し、下歯槽神経への電気刺激 (低閾値 1.5 T、高閾値 4 T) により開口反射を誘発した。自律神経活動の変調を目的に与えた上喉頭神経 (SLN) への連続電気刺激や KCN (200 μg, iv) の投与時の呼吸リズム (横隔膜筋電図)、脈拍 (心電図)、血圧 (大腿動脈)、開口反射の変調を観察した。【結果と考察】SLN 刺激時に観察された自律神経活動の変調と嚥下反射発現には関連を認めなかった。SLN 刺激や KCN の投与による自律神経活動変調時には低閾値刺激誘発性の開口反射の抑制が観察された。嚥下時の開口反射の抑制には、嚥下中枢に加え自律神経中枢の関与が示唆された。

P1-55

上喉頭神経同時刺激による嚥下誘発の促進
 ○高橋 功次朗^{1,2}、北川 純一²、山村 健介²、齋藤 功¹ (新大 院医歯 矯正、²新大 院医歯 口腔生理)

【目的】飲食物を嚥下する際に、食塊によって刺激される左右喉頭粘膜からの求心性情報が、嚥下中枢においてどのように処理されているかを電気生理学的に検討した。【方法】Wistar 系雄性ラット (200 - 400 g) を、ウレタン麻酔 (1.0 g/kg, ip) し、背位に固定した。その後、気管カニューレを挿入し、両側上喉頭神経を割出した。左右上喉頭神経の中枢端に双極ステンレス電極を取り付け、電気刺激 (10-100 μA, 1.0 ms, 10-70 Hz) を与え、誘発された嚥下反射の潜時を解析した。嚥下運動の指標には顎舌骨筋から導出した筋電図を用いた。【結果】両側上喉頭神経を同時に電気刺激した場合、上喉頭神経を単独で刺激した時に比べ、嚥下反射の誘発潜時の短縮が観察された。この両側上喉頭神経の同時刺激による嚥下反射の促進は、5 Hz 以下の低頻度刺激で有意であった。しかし、10 Hz 以上の頻度で同時刺激した場合、上喉頭神経を単独で刺激した時の嚥下誘発潜時と有意な差が認められなくなった。【考察】左右側からの上喉頭神経同時電気刺激が嚥下誘発を促進させるという結果は、嚥下中枢内での空間的加重を示している。すなわち、実際の摂食状態を考慮した場合、左右喉頭粘膜からの食塊による化学的および機械的な刺激による求心性情報が、嚥下中枢において加算され、嚥下反射に対する促進効果を高めていると考えられる。

P1-56

マウス味蕾における甘味特異的な GLP-1 の分泌
 ○高井 信吾¹、安松 啓子¹、吉田 竜介¹、重村 憲徳¹、二ノ宮 裕三¹ (九大 院歯 口腔機能解析)

近年、味細胞において様々な消化管ホルモンが発現しているという報告がなされている。この消化管ホルモンは味覚情報伝達機構に関与している可能性が示唆されているが、メカニズムは不明であり、その解明が急務となっている。今回我々は、腸管から分泌され、膵臓β細胞に働きかけてインスリン分泌を促すホルモンとして知られている GLP-1 に着目した。まずはじめに、免疫組織学的手法を用いて、マウス舌茸状乳頭味細胞における GLP-1 の発現を確認した。その結果、GLP-1 発現味細胞の約半数は、甘味受容体ヘテロダイマーを形成する T1R3 を共発現していることがわかった。一方、酸味受容細胞に存在すると考えられている GAD67 とは 15% 程度しか共発現が見られなかった。さらに、単一味細胞に記録電極を当て、活動電位を記録することが可能なルーズパッチクランプ法を用い、味刺激に対する細胞の 1 分間の応答を記録後、記録電極内溶液を回収、分析した。その結果、甘味刺激に対して応答する細胞から回収した電極内溶液中の GLP-1 濃度は、苦味に応答した細胞のそれよりも高値を示した。また、甘味刺激に応じ味蕾全体から分泌される GLP-1 量を測定した結果、甘味強度に依存して GLP-1 濃度は高くなる傾向を示した。以上の結果は、GLP-1 は特定の甘味感受性味細胞から、甘味刺激特異的に分泌されていることを示唆する結果である。

P1-57

三叉神経節内へのA-タイプKチャンネル拮抗薬の電気泳動的投与による顎関節由来A δ -C-三叉神経節ニューロンの興奮性増強効果について
 ○原 紀文¹、武田 守¹、高橋 誠之¹、松本 茂二¹ (1日歯大 生命歯 生理)

【目的】 *in vivo* において三叉神経節 (TRG) 内へのA-タイプKチャンネル拮抗薬 (4-AP) の微小電気泳動的投与による顎関節支配のA δ -C-TRGニューロンの興奮性が増強されるかについて、マルチバレル微小電気泳動・細胞外記録法を用いて電気生理学的に検討を行った。

【結果】 麻酔下のラット TRG より、顎関節部位の電気刺激に応じるA δ -及びC-TRGユニット放電を記録したTRG内への4-APの電気泳動的投与により大多数のユニットにおいて自発放電スパイクが誘導された。一方、顎関節部位電気刺激に誘発されるA δ -C-TRGユニットのスパイク放電頻度は4-APの投与電流依存的に有意に増強された。自発放電スパイクを誘発させる4-AP投与電流の平均的閾値はA δ -ニューロンに比較してC-ニューロンは有意に低い値を示した。顎関節電気刺激によるスパイク増大させる平均的閾値もA δ -ニューロンに比較してC-ニューロンは低い値を示した。

【考察と結論】 *in vivo* の条件下においてTRG内への4-APの電気泳動的投与により顎関節支配のTRGニューロンの興奮性が増強し顎関節炎と同様、小型TRGニューロンの興奮性増強効果があることが判明した。4-AP感受性はA δ -に比較してC-TRGニューロンが高かった。したがって、顎関節を支配するC-TRGニューロンA-タイプKチャンネルはA δ -TRGニューロンに比較して顎関節炎随伴する疼痛により重要な役割を演じている可能性を示唆している。

P1-59

L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制と脳幹部神経活動の連関
 ○奥舎 有加^{1,2}、平井 喜幸¹、船橋 誠¹ (1北大 院歯 口腔生理、2北大 院歯 高齢者)

【目的】 我々は以前に、ヒスタミンの前駆体であるL-ヒスチジンの腹腔内投与により生じる摂食抑制において、悪心や味覚異常は随伴していないことを報告した。本研究は、L-ヒスチジン誘発の摂食抑制と脳幹部神経活動との連関を明らかにすることを目的として行った。【方法】 SD系雄性ラット(250~350g)を用い、L-ヒスチジン(0.5、0.75g/kg)を腹腔内に投与して摂食量を測定した。その後、4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い、脳を摘出し凍結ミクロトームを用いて厚さ50 μ mの連続切片を作成した。c-Fosタンパクの発現をABC法により可視化する免疫組織化学的解析を行った。上述の実験を前迷走神経幹切離群についても行った。【結果】 L-ヒスチジン腹腔内投与により容量依存的に摂食量の有意な減少を認め、孤束核におけるc-Fos陽性細胞数の増加が認められた。また、前迷走神経幹切離群ではL-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制は生じなかった。【考察】 L-ヒスチジン腹腔内投与による摂食抑制は孤束核ニューロン活動の増加を伴うことが明らかとなり、これらが迷走神経求心路からの入力によることが示唆された。

P1-58

ラットの舌を支配する三叉神経節ニューロンにおけるTRPV1とANO1の発現
 ○金澤 卓也¹、松本 茂二¹ (1日歯大 生命歯 生理)

【目的・方法】 Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) は侵害熱受容チャンネルとして知られている。近年、Ca²⁺ activated Cl⁻チャンネルの1種であるAnoctamin 1 (ANO1)が脊髄後根神経節(DRG)ニューロンにおいて、TRPV1と高率に共存することが報告された。さらに、ANO1の阻害によりカプサイシン誘発電流が減弱することから、これらのイオンチャンネルが共役的に侵害受容に対して重要な役割を果たすことが示唆された。そこで、舌前方部を支配する三叉神経節(TRG)ニューロンを逆行性ニューロントレーサーであるFluoro gold (FG)を用いて標識し、TRGニューロンにおけるTRPV1とANO1、侵害受容マーカーの1つであるSubstance P (SP)の発現と共存について、免疫組織化学的手法により検討した。

【結果】 TRGのFG陽性細胞において、TRPV1陽性細胞の多くはANO1も発現していた。さらに、TRPV1、ANO1を共に発現している細胞はSP陽性を示す傾向があった。

【結論・考察】 舌前方を支配するTRGニューロンにおいて、侵害熱受容チャンネルであるTRPV1とANO1の多くは共発現することが判明した。さらに、両チャンネルが発現している細胞の多くは侵害受容マーカーのSPをも発現していた。従って、TRPV1とANO1は共役的に舌の侵害受容に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

P1-60

マウス顎下腺の時計遺伝子、時計制御遺伝子と機能分子mRNAの概日リズム
 ○内田 仁司^{1,2,3}、阪井 丘芳²、中村 渉¹ (1阪大院歯 口腔時間生物、2阪大院歯 顎治、3日本学術振興会)

唾液は摂食等の刺激により分泌量が増加する。一方、安静時唾液量は1日の時刻に応じて変化する。しかし、その日内変動の制御機構は明らかでない。本研究では、マウス顎下腺の遺伝子発現の時間変動を個体及び培養組織と比較検討し、唾液腺機能リズムの生じる機構を解明することを目的とした。概日リズムの測定は時計遺伝子Per2発光レポーターマウスから顎下腺を摘出して器官培養し、生物発光を連続的に記録した。マウス顎下腺PER2発現量は明瞭な概日リズムを示したが、1週間の測定期間中にリズム振幅が減衰した。次に、マウス顎下腺を培養し24時間で6時間毎にサンプリングし、時計遺伝子Per2、Bmal1、時計制御遺伝子Dbp、機能分子Aqp5、AmyのmRNA量を定量して*in vitro*における発現変動を検討した。時計遺伝子mRNAの発現量は明瞭な概日変動を示した。Aqp5とAmy mRNAも概日変動を示し、それらの発現タイミングはDbpと同期していた。更に、マウス個体から4時間毎に24時間、各点で顎下腺を採取し、*in vivo*におけるmRNA発現を定量して*in vitro*の発現リズムと比較した。*In vivo*において顎下腺の時計遺伝子mRNA発現は概日リズムを示した。一方、Aqp5 mRNAは概日リズムを示したが、発現量のピークはマウスの活動期である夜間に位置し、Amy mRNAは概日リズムを示さなかった。以上の結果から、顎下腺機能の概日リズムは顎下腺自体の概日リズムをベースにして、中枢性の制御を受けていると考えられた。

P1-61

新生仔ラットの呼吸と循環にデクスメドミジン腹腔内投与が及ぼす影響

○田宮 旬子¹、佐伯 周子¹、井出 良治¹、松本 茂二¹ (1日歯大 生命歯 生理)

【目的】 α_2 アドレナリン受容体アゴニストであるデクスメドミジン (以下 DEX) は、新たな鎮静薬として成人に限らず小児領域にも普及しつつある。本実験では、新生仔ラットに DEX を腹腔内投与し、呼吸・循環系に起こる変化を調べた。

【方法】 新生仔ラット (生後 2~4 日齢, n=10) を対象とした。実験当日、イソフルラン麻酔下で腹腔内に極細チューブ (直径 0.28 mm) を挿入・留置した。動物をチャンバーに静置し覚醒後、先ず安静状態で測定を行い、次にチューブを介して DEX (0.04 mg/kg, 容量 0.013 ml/kg) を腹腔内投与し、10 分後に同様に測定した。呼吸測定にはニューモタコグラフを用い、1 回換気量 (V_T)、呼吸数 (f_R)、吸気時間 (T_I)、呼気時間 (T_E) を求めた。更に、皮下電極を用いて心拍数 (HR) も算出した。

【結果】 実験群 (n=5) では DEX 投与により V_T の変化を伴わない f_R の有意な減少が認められ、分時換気量は有意に低下した。この f_R の低下は、主に T_E の延長によるものだった。更に、DEX 投与により HR の有意な減少も認められた。なお、生理食塩水のみを投与した動物 (コントロール群, n=5) に有意な変化は認められなかった。

【結論】 本実験より、DEX は新生仔ラットの換気量を減少させ、それは主に T_E 延長による f_R 減少によりもたらされることが示された。加えて、HR も減少したことから、DEX の呼吸循環系への影響には、個々への直接効果に加え、両者の相互作用による結果も含まれていることが示唆された。

P1-63

三叉神経運動核咬筋領域内の γ 運動ニューロンの電気生理学および形態学的特性

○西村 佳世^{1,2}、磯貝 由佳子^{1,2}、齋藤 充¹、佐藤 元¹、豊田 博紀¹、山城 隆²、姜 英男¹ (1阪大 院歯 高次脳口腔機能、2阪大 院歯 口腔分化発育情報)

三叉神経運動核咬筋領域には、咬筋を支配する α 運動ニューロンおよび咬筋筋紡錘の錘内筋を支配する γ 運動ニューロンが存在している。咬筋では、一個の筋紡錘のなかに多数の錘内筋線維を含むことが報告されており、閉口運動では他の運動に比して γ 運動ニューロンがより重要な役割を果たす可能性が高い。そこで、三叉神経運動核を含む脳幹スライス標本を作成し、咬筋領域のニューロンからホールセル電流固定記録を行い、発火特性やそのイオン機構に基づいた電気生理学的特性の検討を行った。基線電位を -75 mV に設定し脱分極性パルス電流を与えると、ある特定のニューロンで、持続性 Na^+ 電流による緩徐な脱分極電位が認められ、さらに、脱分極性パルス電流の終了後、 Ca^{2+} 依存性陽イオン電流による緩徐な脱分極性後電位が認められた。過去の報告から、こうした特定のニューロンは α 運動ニューロンでない可能性が高いと考えられたため、その発火特性の解析を行った。電気生理学の記録終了後、記録細胞を α および γ 運動ニューロンのそれぞれのマーカーである NeuN あるいは Err3、コリン作動性ニューロンのマーカーである choline acetyltransferase (ChAT) および Ia 神経終末のマーカーである VGLUT1 の蛍光三重染色を行った。染色した切片を共焦点レーザー顕微鏡で観察し、 γ 運動ニューロンの形態学的解析を行った。

P1-62

象牙芽細胞におけるアルカリ感受性の検討

○津村 麻記¹、佐藤 正樹¹、Sobhan Ubaid¹、児玉 紗耶香¹、陽田 みゆき²、西山 明宏³、田崎 雅和¹、澁川 義幸¹ (1東歯大 生理、2東歯大 口健 小児歯、3東歯大 オーラル)

歯科臨床では第三象牙質、象牙質橋 (dentin bridge) 形成を誘発する目的で水酸化カルシウム製剤や mineral trioxide aggregate (MTA) が使用されている。しかし、これらの製剤が象牙質形成過程を駆動する機序は不明である。これらの薬剤の共通点としてアルカリ性であることがあげられる。そこで、本研究では象牙芽細胞におけるアルカリ刺激感受性を検討した。新生仔ラット切歯から得た歯髄スライス標本上で dentin sialoprotein, nestin, dentin matrix protein-1 の免疫蛍光染色により象牙芽細胞を同定し、fura-2 を用いて細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) を計測した。アルカリ刺激は pH10 の細胞外溶液 (クレブス溶液) を象牙芽細胞に投与することにより行った。細胞外 Ca^{2+} 存在下において、pH10 のクレブス溶液を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。pH10 のクレブス溶液の反復投与を行ったところ、pH10 のクレブス溶液による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は脱感作しなかった。加えて、pH10 のクレブス溶液による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は TRPA1 (transient receptor potential ankyrin 1) チャネルアンタゴニストである HC030031 の投与で抑制された。象牙芽細胞においてアルカリ刺激は TRPA1 チャネルにより受容され、その受容は脱感作しないことが示唆された。

P1-64

内因性レプチンとエンドカンナビノイドがマウスの甘味感受性に及ぼす影響

○仁木 麻由¹、上瀧 将史¹、吉田 竜介¹、二ノ宮 裕三¹ (1九大 院歯 口腔機能解析)

中枢の視床下部で摂食調節に関わるレプチンとエンドカンナビノイド (2-AG, AEA) が、舌の味覚器にあるそれぞれの受容体を介し甘味を調節することがこれまでの研究で明らかになっている。レプチンは甘味を抑制し、エンドカンナビノイドは甘味を増強させる。今回我々は、C57BL/6J マウス、食餌性肥満マウス、レプチン受容体変異 *db/db* マウスを用い、生体内 (味覚器) で両者がどのように甘味を調節しているかを調べた。それぞれの受容体拮抗薬を投与して味刺激の鼓索神経応答を調べたところ、C57BL/6J マウスは、レプチン受容体拮抗薬 (LA) により甘味応答が有意に増強したが、エンドカンナビノイド受容体拮抗薬 (AM251) では変化は認められなかった。食餌性肥満マウスは、血中レプチン濃度が上昇するにつれ、LA による応答変化率は減少し AM251 では上昇した。また *db/db* マウスは、AM251 で甘味応答が有意に抑制され、茸状乳頭中の 2-AG 量も C57BL/6J マウスに比べ多く、2-AG 合成酵素を発現している細胞も多かった。以上のことから、正常ではエンドカンナビノイドではなくレプチンにより甘味は恒常的に抑制されているが、肥満によりレプチン機構が破綻すると優位な甘味修飾物質がレプチンからエンドカンナビノイドへ移行する可能性が示唆された。(非会員共同研究者: 大栗 弾宏、Dipatrizio NV、Piomelli D)

P1-65

胃酸分泌抑制剤ニザチジンの唾液分泌促進作用について

○植田 紘貴¹、菅 真有²、八木 孝和¹、宮脇 正一² (¹鹿大 医・歯病院 発達系歯科セ 矯正歯科、²鹿大 院医歯 歯科矯正)

【目的】口腔乾燥症は高齢社会の到来により増大している。我々は、脳腸相関の観点から内臓感覚と唾液分泌機能を含む口腔生理機能の関連について検討を行ってきた。近年、H2 ブロッカーであるニザチジンが副次的に唾液分泌を促進することが報告されているが、その作用機序は未だ不明な点が多い。本研究は、ニザチジンが中枢へ作用し、自律神経活動と協調して唾液分泌を促進するという仮説を立て検証を行った。【資料および方法】実験には Wistar 系雄性ラットを用いた。ケタミンおよびキシラジンで全身麻酔を行い脳定位装置を用いて第四脳室にカニューレを設置した。左側顎下腺導管にポリエチレンチューブを挿入後、左側頸部迷走神経を切断し中枢側に刺激電極を設置した。電気刺激は 5 V、10 秒間とし、迷走神経刺激前後の唾液分泌量を圧力トランジューサーで計測した。さらに第四脳室へのニザチジン投与前後の唾液分泌量を記録した。【結果および考察】ニザチジン非投与下において迷走神経刺激により誘発された唾液分泌量と比較して、ニザチジン投与後に迷走神経を刺激した場合に多くの唾液分泌が誘発された。本結果から、ニザチジンの中枢投与は迷走神経刺激を伴う場合により多くの唾液分泌を促進することが示唆された。【結論】ニザチジンは迷走神経活動と協調して唾液分泌を促進する。本薬は今後新たな口腔乾燥症治療薬として歯科臨床で応用される可能性があると考えられる。

P1-66

エタノールおよびアセトアルデヒドの口渴中枢ニューロンに対する作用

○氏原 泉^{1,2}、人見 涼露²、小野 堅太郎²、柿木 保明¹、稲永 清敏² (¹九歯大 老年障歯、²九歯大 生理)

二日酔いの時に起こる口渴感、脳の口渴中枢に対するエタノールおよび代謝産物であるアセトアルデヒドの作用により起こるかもしれない。我々はラット脳スライス標本を用いて、口渴中枢として知られる脳弓下器官ニューロンに対するエタノールおよびアセトアルデヒドの作用を調べた。実験には、細胞外記録法 (Multichannel Systems) およびパッチクランプ法を用いた。脳弓下器官ニューロンのマルチユニットのうち約半数において、エタノール (50-200 mM) 投与により用量依存性に発火頻度の増加がみられた。一方、アセトアルデヒド (3-100 μM) は脳弓下器官ニューロンのマルチユニットの大半において、用量依存性に抑制を示した。また、抑制性反応前に一過性の興奮性反応が認められた。この興奮性反応は、グルタミン酸受容体阻害剤および GABA 受容体阻害剤の存在下でも観察された。膜電位固定記録においてエタノールは、抑制性シナプス後電流の大きさを減らすことなく頻度を増加させた。脱分極は、TTX 存在下でも観察された。これらの結果は、エタノールおよびアセトアルデヒドはラット脳弓下器官ニューロンに対して直接あるいは間接的に作用し、水や塩分の摂取を調節している可能性を示唆する。

P1-67

ラット唾液腺の血流動態に関連する副交感神経性血管拡張線維の局在性

○佐藤 寿哉¹、石井 久淑¹ (¹北医大 歯 生理)

【目的】ラット顎下腺では反射性の副交感神経性血流増加反応が生じることが報告されている。しかし、唾液腺内の血管拡張神経の走行や血流増加の部位特異性は不明である。本研究はレーザーバックルイメージング血流計 (LSI) を用いて、ラット顎下腺および舌下腺における反射性副交感神経性血流増加反応誘発時の血流動態を解析し、血流増加の波及を基に想定される血管拡張神経の走行を検討した。【方法】ラットはウレタン麻酔後、ミオブロックで非動化し、人工呼吸下で管理した。大腿動脈と静脈にカテーテルを挿入し、それぞれ体幹血圧測定と薬物投与に用いた。また、頸部交感神経幹と迷走神経は頸部で両側とも切断した。舌神経を求心性に電気刺激し、LSI にて顎下腺および舌下腺の血流動態を解析した。【結果および考察】舌神経刺激により顎下腺および舌下腺の血流増加が認められた。これらの血流増加は小葉に沿って限局性に始まり、その後、唾液腺全体に波及した。両腺の血流増加反応はアトロピン (0.1 mg/kg) およびヘキサメトニウム (10 mg/kg) の投与によりほぼ完全に抑制されたことから、大部分がムスカリン受容体を介した副交感神経性血管拡張反応であることが明らかになった。血流動態の経時的な変化から、副交感神経性血管拡張神経は小葉間を血管に沿って走行し、腺房全体に分枝することが示唆された。

P1-68

Somatostatin_{2A} 受容体を介した GABA ニューロンの脱抑制による侵害受容性頸髄後角ニューロンの促通効果

○高橋 誠之¹、武田 守¹、松本 茂二¹ (¹日歯大 生命歯 生理)

【背景と目的】最近 *in vitro* で脊髄後角第二層抑制性介在ニューロンがソマトスタチン (SST) により脱抑制され侵害受容ニューロンの興奮性を増強することが報告された。本実験では *in vivo* で三叉神経領域の侵害刺激に応じる上部頸髄後角 (C1) ニューロンの興奮が GABA ニューロンを介して SST により変調を受けるか否かをマルチパレル電極細胞外記録法と免疫組織化学法で検討した。【方法】ラット開口反射を指標とし歯髄に侵害レベルの電気刺激を与え、C1 第二層のユニット放電を記録、局所電気泳動的に投与した SST、SST_{2A} 受容体拮抗薬 (Cyana-mide I54806)、GABA_A 受容体拮抗薬 (Bicuculline) の効果を検討した。この部位の介在ニューロンの GABA 合成酵素 (GAD67)、SST_{2A} 受容体の活性の共存の有無も検索した。【結果】記録された 14 個のユニット放電頻度は電気泳動的局所投与された SST により有意に増加し、その効果は投与電流依存的、可逆的応答であった。この促通効果は SST_{2A} 受容体拮抗薬の投与により遮断され、GABA_A 受容体拮抗薬により抑制された。同部位の SST_{2A} 受容体と GAD67 免疫組織活性の共存も確認された。【結論と考察】歯痛伝達に関わる頸髄後角ニューロンの興奮性は SST_{2A} 受容体を介した GABA ニューロンの脱抑制により促通を受けることが示唆され、歯髄損傷、炎症等における三叉神経領域の侵害受容伝達に頸髄後角の抑制性介在性ニューロンが発現する SST_{2A} 受容体は疼痛緩和の新たな分子標的となることが推察された。

P1-69

ビジュアルフィードバックを用いた随意的口唇閉鎖力調節の特性

○宮本 剛至¹、笹山 智加²、加藤 隆史³、山田 一尋¹、増田 裕次² (¹松歯大 院歯 硬組織疾患、²松歯大 院歯 顎口腔機能、³阪大 院歯 口腔解剖二)

口唇閉鎖機能はさまざまな口腔機能を営む上で重要な役割を持つ。しかし、随意的な口唇閉鎖力の特性については不明な点が多い。そこで、本研究では随意的な口唇閉鎖力の調節能力における方向特異性や性差を明らかにすることを目的とした。実験は、個性正常咬合を有する健康成人男性 13 名、女性 18 名を対象として行った。8 方向からの力が、バーの長さとしてリアルタイムで表示できるディスプレイを被験者の前方に配置した。つまり、そのとき口唇が出力している力を目で確認することができるようにした。各方向別に最大努力で発揮された力の 50% の値をターゲット値として表示し、口唇閉鎖力をターゲット上に 5 秒間維持するように指示した。口唇閉鎖力が発揮されにくいことが明らかとなっている左右の 2 方向を除いた 6 方向について測定を行った。口唇閉鎖力が発揮されてからの 3 秒間で、ターゲットとした値の ±8% 内に維持できた時間の割合を正確率とした。6 方向の正確率には、男性と女性のいずれにおいても方向による有意な相違が認められ、上下方向の正確率が斜め方向の正確率よりも高い傾向が認められた。また、男性に比べて女性の正確率が低い傾向にあり、4 つの斜め方向の正確率の平均値は有意に女性の方が低かった。これらの結果から、口唇閉鎖力は正中で上下方向の強さを調節する方が容易であること、および性差の存在が示唆された。

P1-71

三叉神経運動核における α および γ 運動ニューロンのサイズの分布についての検討

○磯貝 由佳子^{1,2}、山城 隆²、姜 英男¹ (¹阪大院歯 高次脳口腔機能、²阪大院歯 口腔分化発育情報)

ラットの三叉神経運動核の背外側部及び腹内側部には、それぞれ、閉口筋及び開口筋を支配する運動ニューロン (MN) 群が分布している。筋紡錘は、閉口筋には存在するが開口筋には存在しないため、筋紡錘を支配する γ MN は開口筋支配 MN 群内に存在せず、そのサイズの分布は単峰性を示す。閉口筋支配 MN 群のサイズの分布は二峰性を示し、小型細胞群の分布が閉口筋 MN 群でのみ認められることから、小型細胞群は γ MN であると想定されてきた。しかし、その真偽は確定していない。そこで、この小型細胞群が γ MN 群のみで構成されているのか、あるいは α MN と γ MN の両方を含むのかを、三叉神経を含む脳幹スライス標本を作成し、免疫組織学的に検討した。 α MN と γ MN の分子マーカーとしては、脊髄運動核で報告されている Neuronal Nuclei (NeuN) および Estrogen related receptor 3 (Err3) をそれぞれ用いた。その結果、閉口筋 MN 群における α MN のサイズ分布は二峰性を、 γ MN は単峰性を示した。小型の α MN 群のピークは γ MN 群のピークと同様のサイズを示し、閉口筋 MN 群における小型細胞群は α MN を含むことが明らかになった。このことは、サイズの原理から、閉口筋 α MN 群が支配する筋線維は径の極めて小さいものから径の大きいものまで含むことを示唆する。

P1-70

下歯槽神経損傷後に発症する顔面部異所性痛覚過敏に対する Connexin43 の関与

○梶 佳織^{1,2}、篠田 雅路²、清水 典佳¹、岩田 幸一² (¹日大 歯 歯科矯正、²日大 歯 生理)

下歯槽神経切断 (IANX) により顔面皮膚に異所性痛覚過敏が発症することが明らかにされているが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では IANX により顔面部異所性痛覚過敏に対する Cx43 の役割を解明することを目的とした。深麻酔下で IANX モデルラットの作成し、口ひげ部の機械刺激に対する頭部引込め反射閾値 (HWT) を測定した。術後 1 日目より HWT は有意に低下し、14 日目まで続いた。IANX 後 8 日目に同ラットの三叉神経節細胞での Cx43 発現を Western blotting 法および免疫組織化学染色法にて解析した。その結果、IANX8 日目において多くの Cx43 タンパク発現を認めた。また、免疫組織学検索によって多くの Cx43 陽性細胞が、三叉神経節内で観察された。また、ほとんどの Cx43 陽性細胞は三叉神経節細胞を取り囲むように分布しており、グリア細胞に発現している可能性が高い。以上の結果から、IANX により顔面皮膚に発症する異所性痛覚過敏には、三叉神経節に存在するグリア細胞が活性化し、さらに Cx43 を介してグリア細胞活性が三叉神経節全体に広がることによって、神経節細胞活動が増強することにより引き起こされた可能性が考えられる。

P1-72

Nicotine 誘導性 CCN2/CTGF がヒト歯周組織由来培養細胞の線維化に与える影響

○五十嵐 寛子^{1,4}、久保田 聡²、立花 利公³、村 檉 悦子¹、岡部 正隆⁴、滝川 正春²、沼部 幸博¹ (¹日歯大 歯周病、²岡大 院医歯薬 口腔生化学、³慈恵大 共用施設、⁴慈恵大 解剖)

喫煙者の歯肉に肥厚が見られるが、これらの関係を示した報告は少ない。そこで、線維化因子である結合組織成長因子 (CCN2/CTGF) に着目し、ヒト歯肉線維芽細胞と歯根膜由来線維芽細胞における TGF- β 1 と CCN2/CTGF との関係、nicotine の CCN2/CTGF 産生に与える影響、I 型コラーゲン、MMP-1、TIMP-1 そして TGF- β 1 に対する nicotine の影響、さらに、nicotine 影響下における CCN2/CTGF と I 型コラーゲンとの関係について探索した。その結果、両細胞において TGF- β 1 刺激により CCN2/CTGF の増加が認められ、両者に正の相関が示唆された (Takeuchi et al. J Periodontal Res. 2009)。また Nicotine 刺激により細胞数の減少および細胞に空胞変性が認められる一方、CCN2/CTGF の増加が認められた。興味深いことに Type I collagen にも増加が認められ、それは CCN2/CTGF 中和抗体によって打ち消された (Takeuchi et al. J Dental Res. 2010)。さらに nicotine 刺激によって MMP-1 の分泌は起こらず、TIMP-1 および TGF- β 1 の増加が認められた。以上から、nicotine の刺激により増加した CCN2/CTGF により I 型コラーゲンが誘導され、nicotine により I 型コラーゲンの恒常性の調節因子である MMP-1、TIMP-1 にアンバランスが生じることにより I 型コラーゲンが蓄積するという、歯周組織線維化の分子機構が明らかとなった。

P1-73

移植細胞の初期動態とストレスタンパク質 HSP27 導入による影響

○北見 恩美^{1,3}、加来 賢¹、井田 貴子¹、秋葉 陽介^{1,2}、魚島 勝美^{1,2} (¹新大 院医歯 生体歯科 補綴、²新大 医歯学総合病院、³日本学術振興会)

インプラント前処置として用いられる骨増成法において、細胞移植を併用する方法が行われているが、移植細胞の生着率等、その初期動態については未だ不明な点が多い。一方、各種ストレス下において産生される Heat Shock Protein (HSP) は、細胞のストレス耐性を向上させることが知られている。本研究ではヒト顎骨由来細胞をラット頭蓋骨骨膜下に移植し、移植細胞の初期挙動を解析した。観察期間を通して移植細胞中に TUNEL 染色陽性のアポトーシス細胞が検出され、その数は3日後に最大であった。細胞増殖を示す PCNA 陽性細胞は3日後より観察され、5日後に最大であった。ストレスタンパクの1つである HSP27 の発現が顕著な細胞数は3日後に最大となりその後減少した。そこで、移植細胞の HSP27 発現亢進は結果的にアポトーシス回避に繋がっている可能性があると考え、次に骨芽細胞における HSP27 発現亢進の影響を解析した。発現ベクターを用いて骨芽細胞株 (MC3T3-E1) に HSP27 を過剰発現させたところ、細胞増殖能、石灰化能に影響は認められなかったが、TNF- α に誘導される TUNEL 陽性細胞数の減少が観察され、アポトーシスの抑制が認められた。以上の結果より、移植細胞における HSP27 の発現がその生着に有利に働いている可能性が示唆された。

P1-74

未分化性維持に関連している miRNA-720 は歯髄細胞の細胞増殖・分化を制御する

○Hara Emilio¹、大野 充昭¹、Pham Hai¹、窪木 拓男¹ (¹岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴)

microRNAs (miRNAs) play crucial roles in stem cell biology, related to cell reprogramming and cell differentiation. To search for novel miRNAs that can control the fate of dental pulp cells (DPCs), we sorted side population (SP) cells, known to be enriched in stem cells, and performed a miRNA array. As a result, miR-1260b and miR-720 were highly expressed in the differentiated main population (MP) cells. Gain-and-loss of function analysis showed that miR-720 regulates the expression of NANOG and DNA methyltransferases DNMT3A, DNMT3B and DNMT1 in DPCs. Knockdown of miR-720 significantly increased the levels of NANOG as well as the number of SSEA4 + cells, but down-regulated the levels of DNMTs. miR-720 also regulated the proliferation of DPCs as determined by immunocytochemical analysis against ki-67, as well as odontogenic differentiation demonstrated by alizarin red staining, alkaline phosphatase activity and osteopontin mRNA level. Our findings identify mi-720 as a novel miRNA involved in the regulation of stem cell fate of DPCs.

P1-75

脂肪細胞の分化と成熟におけるオステオカルシンの役割

○大谷 崇仁¹ (¹九大 歯科研 口腔細胞工)

骨細胞が作るオステオカルシン (osteocalcin, OC) の大部分は Gla タンパクとして骨基質に埋められているが、わずかな量が循環している。最近、OC が血糖値やエネルギー代謝の調節に関わっていることが示されたが個々の臓器における OC の効果と作用機序の検討は十分になされていない。今回我々は脂肪細胞の分化および成熟における OC の役割について検討した。脂肪細胞としてマウス 3T3-L1 細胞株を分化誘導して実験に供した。カルボキシル化していない OC (ucOC, uncarboxylated OC) を種々の濃度で培地に添加したところ、0.01 ng/ml の濃度から 5 ng/ml をピークに細胞内のアディポネクチンの発現および培地中への分泌がおこることを認めた。一方、Gla 型 (GlaOC) は無効であった。アディポネクチンの発現や分泌に一致して ERK のリン酸化および peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ の発現増加を認めた。この ucOC 刺激における ERK、PI3K、PKA 各経路の関わりを調べるために各々の阻害剤 U0126、LY294002、H-89 の効果を検討した。U0126、H-89 が ucOC 依存的な ERK および CREB のリン酸化を抑制し、それに伴い PPAR- γ およびアディポネクチンの発現増加を抑制した。一方、LY294002 は無効であった。以上の結果から脂肪細胞では ucOC 刺激特異的に ERK および cAMP / PKA 経路が活性化し、PPAR- γ およびアディポネクチンの発現量の増加が生じることが示された。

P1-76

CXCL3 は脂肪細胞分化を正に制御する

○楠山 譲二¹、坂東 健二郎¹、柿元 協子¹、大西 智和¹、松口 徹也¹ (¹鹿大 院医歯 口腔生 化、²日本学術振興会)

脂肪細胞はアディポカインと総称される生理活性物質を分泌することで、代謝や病態形成に関与することが知られている。脂肪細胞の産生するケモカインとしては CCL2 (MCP-1) が報告されているが、その他のケモカインの分泌や役割についてはよく分かっていない。我々は脂肪細胞分化に伴う種々のケモカインの発現を調べ、新規アディポカインとしての機能を検討した。マウス脂肪前駆細胞株 3T3-L1 細胞を分化誘導し、ケモカイン群の発現レベルを網羅的に解析したところ、CXCL3 (MIP-2 β)、CXCL13 (BLC)、CCL24 (MPIF-2) の mRNA 発現レベルが著明に上昇した。またケモカイン受容体群については、CXCL3 受容体である CXCR2 の発現が高くなった。リコンビナント CXCL3 を培地に添加しながら、3T3-L1 細胞を分化させると、脂肪滴の形成や脂肪分化マーカー遺伝子の発現が促進した。一方、CXCL3 と同様に CXCR2 リガンドである CXCL2、CXCL13 を加えた場合は、脂肪細胞の分化に影響を与えなかった。さらに CXCL3 および CXCR2 の siRNA によるノックダウンを行うと、脂肪細胞分化は抑制された。3T3-L1 細胞への CXCL3 投与によって活性化されるシグナル分子を検討したところ、ERK、JNK がリン酸化され、その標的遺伝子として C/EBP δ を同定した。このように脂肪細胞によって産生される CXCL3 は、オートクライン/パラクラインの作用によって、分化を促進する新規アディポカインであることが示唆された。

P1-77

カテプシン D 欠損マウスの脳病変における脳ペリサイト消失と免疫細胞の脳内浸潤の関与
 ○岡田 亮¹、武 洲¹、中西 博¹ (九大院歯口腔機能分子)

【目的】神経性セロイド様リポフスチン蓄積症 (NCL) は進行性のニューロン死を伴う疾患グループで、8 種類の原因遺伝子が同定されている。カテプシン D (CatD) 遺伝子は原因遺伝子の一つで CLN10 として知られている。NCL におけるニューロン死には活性化ミクログリアが関与すると考えられているが、脳内に浸潤した免疫細胞が関与する可能性については検討されていない。そこで、NCL 病態モデルマウスの CatD 欠損マウスを用い、免疫細胞の脳内浸潤の可能性ならびに浸潤メカニズムについて解析を行った。

【方法・結果】脳内の常在性ミクログリアと末梢由来の単球・マクロファージの割合を解析した結果、CatD 欠損マウスでは単球・マクロファージの割合が野生型マウスと比較して増加していた。また、CatD 欠損マウスの脳血管は野生型マウスと比較して直径が有意に太く、異常な形態を示していた。さらに、CatD 欠損マウスでは血管構造維持に重要なペリサイトが消失していた。野生型マウスより単離した脳ペリサイトを CatD 阻害剤存在下で培養すると酸化ストレスによる細胞死が誘導された。

【考察】以上の結果より、リソソーム蓄積に伴う酸化ストレスによる脳ペリサイト消失により脳血管構造が破綻し、末梢由来の単球・マクロファージが浸潤することでニューロン死に関与することが示唆された。

P1-78

アメロプラスチンは口腔上皮細胞の細胞増殖を抑制する
 ○西藤 法子^{1,2}、有吉 渉¹、沖永 敏則¹、鷲尾 絢子²、北村 知昭²、西原 達次¹ (九歯大 感染生物、²九歯大 保存治療)

【目的】これまでの研究で、エナメルマトリックスタンパクの 1 つであるアメロプラスチンに上皮細胞増殖抑制効果が存在していることを見出した。しかし、アメロプラスチンの上皮細胞に対する詳細な生物学的機能については未だ不明な点が残されている。そこで、リコンビナントアメロプラスチンを作製し、*in vitro* の培養系を用いて上皮細胞の細胞増殖に及ぼす影響について解析を行った。【方法】アメロプラスチン発現プラスミドをサル腎上皮細胞 (COS7) にエレクトロポレーション法で遺伝子導入した。細胞を回収し Halo-Tag Mammalian Protein Purification System (Promega) を用いてアメロプラスチンタンパクを精製し、精製効率を Western Blotting で定量化した。精製後のアメロプラスチンを脱塩後、凍結乾燥し *in vitro* の実験系に使用した。精製タンパクをヒト扁平上皮癌細胞 (SCC25) に作用させ増殖抑制効果を WST-1 assay で調べた。【結果と考察】今回、リコンビナントアメロプラスチンを効率良く精製し、*in vitro* の培養系を用いて、アメロプラスチンの新規の生物学的活性を見出した。特に、精製アメロプラスチンタンパクは上皮細胞の増殖に対して、濃度依存的に抑制することが明らかになった。現在、精製アメロプラスチンの活性部位を同定し、上皮細胞の抑制に関わる分子メカニズムについて検討しているところである。

P1-79

RelB は NF- κ B2 のプロセッシングを誘導し、*aly/aly* マウスの破骨細胞分化抑制を解除する
 ○谷口 礼^{1,2}、福島 秀文²、牧 憲司¹、自見 英治郎² (九歯大 歯 口腔機能発達、²九歯大 歯 分子情報生)

【目的】NF- κ B inducing kinase (NIK) 遺伝子に不活型変異をもつ *aly/aly* マウスは、NF- κ B2 である p100 から p52 へのプロセッシングがみられないことから RelB の核移行が阻害され、破骨細胞形成が抑制される。一方、p100 と p52 が存在しない NF- κ B2 遺伝子欠損マウス (NF- κ B2 KO) は野生型と同程度の破骨細胞が存在し、RelB の核移行も認められる。このことから NF- κ B2 のプロセッシングおよび RelB の核移行が破骨細胞分化に重要であると考えられる。そこで破骨細胞分化における NF- κ B2 と RelB の役割について検討した。【方法・結果】*aly/aly* マウス由来破骨細胞前駆細胞に RelB を遺伝子導入し RANKL で刺激すると破骨細胞形成の抑制が解除され、その際 NF- κ B2 のプロセッシングがみられた。NF- κ B2 KO マウス由来の細胞にプロセッシングがおきない p100 の変異体を遺伝子導入すると破骨細胞形成が抑制され、RelB を遺伝子導入しても破骨細胞形成の回復が認められなかった。*aly/aly* マウス由来の細胞に RelB を遺伝子導入し、RelB 依存的に上昇する遺伝子を検索すると Cot の発現上昇が認められた。【考察】*aly/aly* マウスの破骨細胞分化抑制は、RelB の過剰発現により Cot の発現が上昇し、NF- κ B2 のプロセッシングが誘導され、解除することが示唆された。

P1-80

MC3T3-E1 細胞におけるインクレチン受容体の発現変化
 ○青山 絵美奈¹、渡 一平¹、井上 カタジナ アンナ²、柳下 正樹²、小野 卓史¹ (東医歯大 院歯 咬合機能矯正、²東医歯大 院歯 硬病生)

【目的】インクレチンとして知られる glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) と glucagon-like peptide-1 (GLP-1) は、十二指腸 K 細胞および小腸 L 細胞からそれぞれ分泌され、膵 β 細胞に作用してインスリン分泌を促進する。これらの受容体である GIP receptor (GIPR) および GLP-1 receptor (GLP-1R) は、骨芽細胞に発現していることが報告されているが、その機能の詳細は不明であり、糖代謝との関連も明らかではない。そこで、骨芽細胞におけるインクレチン受容体の機能を検討する目的で *in vitro* の実験を行った。【方法】MC3T3-E1 を高グルコース培地および骨形成タンパク質 (BMP-2) 添加高グルコース培地にて、24 時間、48 時間および 72 時間培養し、GIPR および GLP-1R の発現量の変化を real-time PCR を用いて解析した。【結果】MC3T3-E1 細胞における GLP-1R、GIPR の同時発現が確認され、その発現量は BMP-2 添加により増加した。さらに、BMP-2 添加培地において、GLP-1R、GIPR の発現量はグルコース濃度の影響を受けることが示唆された。また、GLP-1R は時間依存的にも発現量が増加する傾向が認められた。

P1-81

成長板軟骨細胞の肥大化に関与する新規 RNA 分子の探索

○原 規子¹、久保田 聡¹、青山 絵理子¹、滝川 正春¹ (岡大 院医歯薬 口腔生化)

内軟骨性骨形成過程は、顎骨の一部を含む大部分の骨の成長を決定する重要な発生・成長プロセスである。そこでは骨原基中の軟骨細胞が静止期を脱して増殖軟骨細胞となることにより成長を実現し、さらに肥大化を経て石灰化を誘導し骨形成が成し遂げられる。この分化過程を制御するさまざまな細胞内外の情報伝達分子、転写因子や転写後調節因子などのタンパク質、そして転写後調節の一翼を担うマイクロ RNA などについてはすでに多くの報告がある。しかしながら軟骨細胞の分化を制御、もしくは媒介する長鎖非コード RNA (ncRNA) に関しては現在までほとんど情報が無い。本研究ではニワトリ軟骨細胞を用いたモデルを利用し、石灰化時期を規定する軟骨細胞後期分化、すなわち肥大化に関連する長鎖 ncRNA 候補を探索した。まずニワトリ胎児胸骨原基より、肥大軟骨細胞 (upper sternum: US) および増殖軟骨細胞 (lower sternum) を分離培養し、それぞれから RNA を抽出した。続いてこれを用いてマイクロアレイ解析を行い、両細胞間で発現強度の差が 8 倍を超える遺伝子群のデータベースを構築した。そこから既知のタンパク質コード遺伝子群、およびタンパク質をコードしていると予測される遺伝子群を除外することにより候補を絞り込み、これらについてリアルタイム RT-PCR 法により両者間の発現量の差を再確認した。現在その構造・機能解析を進めており、その後得られた知見も併せて報告する予定である。

P1-83

ブタ幼若エナメル質中の生理活性物質と低分子エナメルインについて

○木下 冨子¹、唐木田 丈夫²、大井田 新一郎²、朝田 芳信¹、山越 康雄² (鶴見大 歯 小児歯科、²鶴見大 歯 分子生化)

【目的】幼若エナメル質中にはマウス筋芽細胞 (C2C12 細胞) 及び歯根膜由来培養細胞 (PDL 細胞) に対してアルカリホスファターゼ (ALP) 活性を上昇させて石灰化を促進させる物質が含まれていることが知られているので、それら生理活性物質を分離精製することを試みた。【方法】生後約 5 ヶ月のブタ永久第二大臼歯より幼若エナメル質を採取しリン酸緩衝液 (pH7.4) (N) と炭酸緩衝液 (pH10.8) (AL) を用いてタンパク質を抽出した。N 画分に対してはさらに 40% 飽和となるように硫酸分画を行った (N-1E)。AL 及び N-1E 試料をヘパリンクロマトグラフィーにて分離し、各溶出画分に対して C2C12 及び PDL 細胞に対する ALP 活性を調べた。さらに N-1E 試料から分離され、ALP 活性を上昇させる画分中に含まれる主要タンパク質を LC/MS 分析にて同定した。【結果と考察】AL 及び N-1E 試料はヘパリンクロマトグラフィーによりそれぞれ 5 及び 7 つの画分に分離された。AL 試料では、0.2 M 及び 1 M NaCl 溶出画分に C2C12 細胞に対して、また、ヘパリン未吸着画分と 50 mM NaCl 溶出画分に PDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させる物質が含まれていた。N-1E 試料では 0.1 M NaCl 溶出画分に PDL 細胞に対して ALP 活性を上昇させる物質が存在しており、この画分中に含まれている主要タンパク質が、S³⁰⁰-R¹⁹² を範囲とする分子量約 16 kDa のエナメルインであることが判明した。現在、このエナメルインのヘパリンとの親和性及び生理活性物質との関連について検討中である。

P1-82

LAMP2 is involved in the intracellular transport of RANKL

○Rajapakshe Anupama¹、井上 カタジナアンナ¹、柳下 正樹¹、横山 三紀¹ (東医歯大 院医歯 硬生化)

RANKL is essential for both osteoclast differentiation and activation through cell-cell contact. Since RANKL mainly resides intracellularly, the mechanism of intracellular transport of RANKL is important to understand how the amount of cell-surface RANKL is regulated. Previously, the association of RANKL with secretory lysosomes in osteoblastic cells was reported. However, it is not clear whether RANKL is directly transported by lysosomes or not. In the present study, we investigated subcellular localization of RANKL by focusing on lysosome-associated membrane protein 2 (LAMP2), which is the major component of lysosome membrane and considered to be involved in the lysosome motility.

In mouse preosteoblastic cell line (MC3T3-E1), RANKL was not co-localized with LAMP2, regardless the cells underwent osteoblastic differentiation or not. However, when the expression of LAMP2 was reduced by siRNA treatment, RANKL was accumulated to peri-nuclear regions, implying a defect in the plus-end-direct transport along microtubules. The results suggest that, although RANKL is transported via transport vesicles distinct from lysosomes, LAMP2 is involved in the intracellular transport of RANKL.

P1-84

歯根膜線維芽細胞に高発現する CXCL12 の機能について

○八城 祐一¹、野村 義明²、石川 美佐緒¹、新井 千博¹、野田 晃司¹、花田 信弘²、中村 芳樹¹ (鶴見大 院歯 矯正、²鶴見大 歯 探索歯)

【緒言】歯根膜は他の結合組織と比較してコラーゲン線維や基質の代謝が活発であり、この代謝を担うのは歯根膜線維芽細胞 (PDLFs) であるといわれている。しかし、この歯根膜の線維芽細胞の供給については明らかでない。我々はこの PDLFs の発現遺伝子の網羅的解析から、線維芽細胞や骨芽細胞に分化する間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cells: MSCs) に対する走化性をもつ遺伝子 Chemokine ligand12 の高い発現を認めた。本研究の目的はヒト歯根膜線維芽細胞 (HPDLFs) における CXCL12 の発現および MSCs の走化性を検討することである。【資料および方法】HPDLFs およびヒト皮膚線維芽細胞 (HDFs) の細胞内発現遺伝子を網羅的に比較検討し、さらに CXCL12 発現量を解析した。機能的解析として MSCs を用いた Migration assay を行った。また、MSCs を HPDLFs および siRNA 導入 HPDLFs の Condition Medium (CM) に暴露し RT-PCR を行った。CXCL12 の局在はラット歯根膜領域の凍結切片片を使用し免疫組織学的に検討した。【結果】マイクロアレイ解析の結果より HPDLFs における CXCL12 の高発現を認めた。また qRT-PCR、ELISA の結果から同様の結果を得た。Migration assay では HPDLFs の走化性は HDFs に対し有意に高かった。CM によって CXCL12 発現亢進が認められた。免疫組織学的には CXCL12 は歯根膜に強く発現していた。【結論】PDLFs は CXCL12 を産生し、細胞外に分泌することで血管内の MSCs を歯根膜内に誘導するのではないかと考えられる。

P1-85

ヒト歯根膜細胞におけるギャップ結合を介した細胞間コミュニケーションの検討

○加藤 龍史¹、石原 嘉人²、川邊 紀章²、上岡 寛²、山本 照子¹、山城 隆³ (¹東北大院歯 顎口腔矯正、²岡大院歯 歯科矯正、³阪大院歯 顎顔面矯正)

【目的】歯根膜は矯正力等の機械的刺激を受けて応答性の反応を示し、ギャップ結合(GJ)を介した細胞間コミュニケーションは、それらの刺激に対する情報伝達系の一つとして歯周領域の恒常性維持に重要な役割を担うと考えられる。本研究は、ヒト歯根膜細胞におけるGJの発現と機能性について比較検討を行い、GJを介した細胞間コミュニケーションの骨代謝へ及ぼす影響を調べた。【資料および方法】実験は、健全な便宜抜去小白歯から単離した歯根膜細胞において行った。矯正的歯の移動時における圧迫側モデルとして低酸素培養を2% O₂下で行った。GJの機能性は、蛍光退色法(FRAP)により検討を行った。mRNA発現はRT-PCR、タンパク発現はWestern Blotting法を用いて検討した。【結果および考察】FRAPによる蛍光輝度の回復が認められ、その回復はGJ阻害剤投与群および低酸素群において濃度・時間依存的に抑制された。GJを構成する主要タンパクであるConnexin-43の発現量は、低酸素環境下において時間依存的に減少した。GJ阻害剤投与群において、RANKL mRNA発現は有意に上昇する一方で、OPG mRNA発現の有意な減少を認めた。【結論】歯根膜細胞間におけるGJ結合を介した細胞間コミュニケーションが骨代謝制御へ関与している可能性が示唆された。

P1-86

メタボローム解析による口腔扁平上皮癌のエネルギー代謝特性の解明とバイオマーカーの探索

○小川 珠生^{1,2}、鷲尾 純平²、高橋 哲¹、高橋 信博² (¹東北大院歯 顎顔面口腔外科、²東北大院歯 口腔生化学)

【目的】近年、メタボローム解析による癌特有のエネルギー代謝が解明しつつあり、癌の診断や治療法の開発に有益な新情報となる事が期待されている。しかし口腔扁平上皮癌(OSCC)を対象とした研究はほとんどない。そこで本研究では、OSCCのメタボローム解析を行い、エネルギー代謝特性の解明とバイオマーカー(BM)の探索を試みた。【方法】東北大学病院受診患者33人を対象とし、手術時に切除した癌組織と周囲正常組織を試料とし、メタボローム解析を行った。代謝産物の同定・定量にはCE-TOFMS(HMT社)とグルコース測定kit(和光純薬)を用い、得られたデータから群間比較、ヒートマップ、クラスター解析によりBMを探索した。本研究は所属研究科研究倫理委員会の承認を得た。【結果】正常組織と比較し、癌組織ではグルコース(72±67%)、グルタミン(90±55%)の減少と、乳酸(161±68%)、コハク酸(285±345%)、フマル酸(154±15%)、リンゴ酸(157±102%)、グルタミン酸(158±82%)の増加が認められ、いずれも統計学的に有意であった。しかし、明確なBMは見出されなかった。【考察】OSCCにおいて、Warbrug効果(解糖系の亢進)に加え、グルタミノリシス(グルタミンの利用亢進)が認められ、正常細胞と比べ、アミノ酸から効率的にエネルギーを得ていることが示された。癌特異的BMではなく、代謝パターンによる癌鑑別の可能性が示唆される。

P1-87

扁平上皮癌細胞におけるGLUT1を介したEGFRの発現制御

○吉本 尚平^{1,2}、長野 公喜¹、杉山 悟郎¹、森田 浩光²、中村 誠司³、平田 雅人¹ (¹九大院歯 口腔細胞工、²九大病院 全身管理歯科、³九大院歯 顎顔面腫瘍制御)

がん細胞では、正常細胞に比し5~8倍程度グルコース取り込み能が上昇しているといわれ、経路についてはGLUT1がその役割を担っていると考えられている。今回我々はGLUT1を介したグルコース流入がEGFRの発現に影響を与えるという結果を得た。ヒト口腔扁平上皮癌細胞株(HSC-2、HSC-3)、ヒト皮膚扁平上皮癌細胞株(A431)および対照としてヒト正常角化細胞株(HaCaT)を用い、2種類の異なる濃度のグルコース(低濃度:LG, 5.5 mMまたは高濃度:HG, 25 mM)を含む培地中(10%血清を含有)で培養した。上記全ての細胞においてHG培地では、ErbB受容体蛋白であるEGFR、HER2、HER3およびHER4の全ての発現が認められることをウエスタンブロット法で確認した。一方LG培地で培養すると、HSC-2、HSC-3及びA431はErbB受容体全てにおいて発現量の減少を認めた。このような現象はHaCaT細胞では認められなかった。このErbB蛋白の発現量の減少はグルコース流入量によるものと考え、グルコース輸送体であるGLUT1~4およびSGLT1~3の発現をRT-PCRにて確認した結果、GLUT1のみが共通して発現していた。さらに、グルコース輸送体は通過するが解糖系による代謝は受けない2-deoxy-D-グルコースを加えると高濃度添加に関わらずEGFR発現の著明な低下を認めた。以上の結果より、扁平上皮癌細胞においてEGFRの発現がGLUT1を介したグルコース流入と引き続く代謝により調節されていることが示唆された。

P1-88

ヒアルロン酸が破骨細胞に及ぼす影響

○廣田 秀逸¹、川本 章代¹、吉川 美弘²、高橋 一也¹、池尾 隆²、小正 裕¹ (¹大歯大院歯 高齢者歯、²大歯大 生化学)

【目的】関節リウマチ(RA)の治療方法の一つとしてヒアルロン酸(HA)が用いられる。しかし、HAがRAの症状である傍関節性骨粗鬆症や関節骨破壊に作用するメカニズムは明らかになっていない。そこで破骨細胞前駆細胞を用いて、HAが破骨細胞分化に及ぼす影響について検討した。【方法】マウス骨髄由来細胞(ddY雄6週齢)(BM)や頭蓋冠由来骨芽細胞(ddY雄1日齢)(OB)を1,25(OH)2D₃、PGE2存在下で、またBMのみをRANKLとM-CSF存在下で、それぞれHAを添加した培地で培養した。BMのRANKL、OPG発現をReal time-PCRで測定した。【結果および考察】BMとOBを共培養すると、TRAP陽性細胞が染色され、それらのTRAP陽性細胞数はHA刺激群で減少した。OBの増殖はHA刺激群において促進したが、RANKLやOPG mRNA発現に変化がなかった。一方、RANKL、M-CSF存在下でのBMの破骨細胞への分化は、HA刺激群で抑制された。また、HA刺激群でBMの細胞接着は抑制された。HAが骨芽細胞の増殖を促進し、BMの接着を抑制することで、骨芽細胞と破骨細胞前駆細胞数のバランスが崩れ、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が抑制される可能性が示唆された。

P1-89

Cdc42は軟骨形成に必須の遺伝子である

○鈴木 航^{1,2}、山田 篤¹、相澤 怜^{1,3}、鈴木 大¹、中山 睦子^{1,4}、山本 松男³、横 宏太郎¹、馬場 一美²、上條 竜太郎¹ (昭大 歯 口腔生化、²昭大 歯 歯科補綴、³昭大 歯 歯周病、⁴昭大 歯 歯科矯正)

Rhoファミリー低分子量Gタンパク質Cdc42は、アクチン細胞骨格系の制御を介した細胞の増殖、分化、細胞死など、細胞機能にとって重要な役割を果たしている。しかし、Cdc42を全身で欠損させたマウスが胎生初期で死亡するため、生体レベルでの機能には不明点が多い。そこで我々は、マウス生体内で組織特異的に遺伝子を欠損させるCre-loxPシステムを用い、II型コラーゲンプロモーター制御下でCreを発現させ、軟骨細胞特異的にCdc42遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス(Cdc42fl/fl; Col2-Cre)を作製し、軟骨細胞の分化、成熟に対する機能解析を行った。作製されたコンディショナルノックアウトマウスはコントロールマウス(Cdc42fl/fl)と比較し、体長で17.6% (P<0.05)、大腿骨長で21.8% (P<0.01)の減少が認められた。また、大腿骨成長板での増殖軟骨層の短縮、柱状配列の喪失、肥大軟骨層の肥厚などの表現型が認められ、海綿骨における類骨量の増加も認められた。大腿骨成長板での遺伝子発現様式を検討した結果、増殖軟骨細胞マーカー遺伝子である*type II collagen*、肥大軟骨細胞分化マーカー遺伝子である*type X collagen*および*matrix metalloproteinase 13*の発現低下が認められた。以上の結果から、Cdc42は成長板における軟骨分化および軟骨内骨化を制御し、軟骨形成に必須の役割を果たしていることが示唆された。

P1-91

象牙質・幹細胞複合体の骨再生への応用

○田中 雅士^{1,2}、川木 晴美¹、小栗 健策^{1,2}、森 春菜²、神谷 真子¹、高山 英次¹、吉田 隆一²、近藤 信夫¹ (朝日大 歯 口腔生化、²朝日大 歯 歯科保存)

我々は自己供給可能な骨補填材料として、象牙質に注目した。象牙質を自己由来の幹細胞の足場として、ヒト歯髓由来幹細胞(hDPSC)と象牙質からなる象牙質・幹細胞複合体(凝集塊)を作成し、形状観察を行い、細胞数、アルカリホスファターゼ(ALP)活性について既存の骨補填材である水酸化アパタイト(HA)やβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)を比較対象に検討した。

象牙質は患者の同意のもと、朝日大歯学部倫理委員会の承認を得て採取した抜去歯より調整した。まず種々の細胞密度で細胞塊作成条件を検討し播種後3~5日で凝集し、細胞塊が形成されることを確認した。そして細胞塊を固定し、アルカリホスファターゼ(ALP)染色を行ったところHAでは濃染されたが象牙質、β-TCPではほとんど染色されなかった。走査型電子顕微鏡観察を行うと象牙質を用いた細胞塊では多数の細胞が顆粒を被包しているのが観察された。さらに細胞塊中の細胞数を比較すると、象牙質顆粒の細胞塊では細胞増殖が顕著であり他の材料と比較して有意に上昇していた。

hDPSCは今回用いた全ての材料とともに細胞塊を形成し、骨補填材へ応用可能であることが示唆された。現在、実験動物の皮下への細胞塊移植実験を行い骨誘導能について検討中である。

P1-90

破骨細胞の前駆細胞における接着シグナルは分化誘導受容体(RANK)の発現を誘導する

○望月 文子¹、高見 正道²、宮本 洋一²、井上 富雄¹、上條 竜太郎² (昭大 歯 口腔生理、²昭大 歯 口腔生化)

破骨細胞は骨組織にのみ存在する多核細胞だが、その局在性がどのような機序で制御されているかは不明である。我々は、破骨細胞の前駆細胞(破骨前駆細胞)の骨基質への接着が破骨細胞分化の「場」を決める一因ではないかと仮説をたて、接着シグナルの役割について解析した。マウスの骨髄細胞からM-CSFで誘導したBone marrow-derived macrophage(BMM)を破骨前駆細胞として用いた。BMMは接着可能なラミニンコートプレート上で分化誘導因子RANKLの刺激により破骨細胞に分化したが、BMMが接着できないゲル上(メチルセルロース)では分化しなかった。この時、プレート上ではRANKLによるIκBのリン酸化と転写因子NFATc1の発現上昇が認められたが、ゲル上ではそれが認められなかった。しかし、TNF-αやLPSはプレート、ゲルの差に関係なくIκBのリン酸化を誘導したことから、ゲル上ではRANKL受容体(RANK)に依存したシグナルだけが障害されていると予想した。そこでRANKの発現レベルを解析したところ、プレート上に比べてゲル上では著しく低いことが判明した。しかしそれは、BMMをゲルからプレート上へ移行することにより回復した。また、強制的にRANKを発現させると、ゲル上でも破骨細胞に分化したことから、接着シグナルはRANKの発現を誘導する役割を担うことが示唆された。すなわち破骨細胞の局在性には、骨基質への接着によるRANKの発現上昇が関与すると推察される。

P1-92

GLUT4 トランスロケーションにおける Akt による tomosyn のリン酸化の影響

○長野 公喜¹、竹内 弘²、杉山 悟郎¹、大谷 崇仁¹、平田 雅人¹ (九大 院歯 口腔細胞工、²九歯大 口腔応用薬理)

インスリン応答性のグルコース取り込みは、Aktによるグルコーストランスporter 4 (GLUT4)を含有する小胞(GLUT4 storage vesicles; GSV)の細胞膜上へトランスロケーションによって行われる。我々はGSVトランスロケーションへの関与が報告された開口分泌調節タンパク質 tomosyn に Akt のリン酸化モチーフが存在することを見出したので、Aktによる tomosyn のリン酸化の有無と GSV トランスロケーションへの関わりについて検討した。試験管内リン酸化実験を行ったところ、野生型 tomosyn は Akt1、Akt2 によってリン酸化されたが783番目のSerをAlaに置換した変異体(S783A)はリン酸化されなかった。さらに、細胞を用いた実験でもインスリン刺激によって野生型はリン酸化されたが、変異体のリン酸化は認められなかった。次に、GSV輸送に関わるSNAREタンパク質 syntaxin 4 と tomosyn の試験管内結合実験を行ったところ、両分子の結合はAktによる tomosyn のS783のリン酸化によって抑制された。これらの結果から、インスリン刺激に伴うGSVのトランスロケーションの調節にはAktによる tomosyn のS783のリン酸化が関与することが示唆された。

P1-93

炎症・組織再生を制御する CCN1 の 3' 非翻訳領域を介した遺伝子発現調節
 ○村瀬 友里香^{1,2}、久保田 聡¹、前田 彩¹、原規子¹、住吉 久美¹、西田 崇¹、佐々木 朗²、滝川 正春¹ (¹岡大 院医歯薬 口腔生化、²岡大 院医歯薬 口腔顎顔面外科)

CCN1 は CCN ファミリーに属するタンパク質で、細胞外基質や成長因子、接着因子などの協同因子との相互作用を通じて炎症、組織再生過程で重要な役割を演じている。特に近年関節疾患や組織線維化との関連が明らかとなり、顎顔面領域でも注視すべき分子のひとつである。CCN1 の機能は共存する協同分子に大きく依存するので、CCN1 がいつでもどこに存在するかを規定する遺伝子発現制御の解明は重要な課題である。そこで本研究では、CCN1 mRNA に存在する 3' 非翻訳領域 (3'-UTR) に焦点をあて、それを介した遺伝子発現制御機構を解析した。まずヒト CCN1 遺伝子の 3'-UTR を蛍光シフェラーゼ遺伝子下流に接続し遺伝子発現に対する影響を検討したところ、強い抑制効果が観察された。続いてこの 3'-UTR を前後半に分断し、各々の活性を評価した実験では、両方の断片が等しく遺伝子発現抑制効果を発揮した。さらに前半部分について欠損変異体を作成し、同様の評価で抑制エレメントを 110 塩基長まで絞り込んだ。興味深いことに in silico 解析ではこのエレメントは安定した二次構造を形成すると予測された。一方後半については二次構造形成予測、およびマイクロ RNA の標的予測で得られた候補部分につき効果を検証したが、いずれも抑制活性を示さなかった。後半部分の抑制機能を担う部分の同定が今後の課題である。本研究は仲川洋介、湊雅直、住吉久美博士との共同研究である。

P1-95

破骨細胞の骨吸収活性を制御する Wnt5a-Ror2 シグナルによる Rho 活性化
 ○上原 俊介¹、宇田川 信之¹、高橋 直之²、小林 泰浩² (¹松歯大 口腔生化、²松歯大 総合歯科医学研究所)

Wnt5a は Ror2 受容体を介し、破骨細胞分化誘導因子 RANKL の受容体である RANK の発現を亢進し、破骨細胞分化を促進する。今回我々は、破骨細胞の骨吸収機能における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割を明らかにするため、破骨細胞特異的 Ror2 欠損マウス (Ror2 cKO) を解析した。Ror2 cKO は骨量増加を呈し、骨吸収マーカーである血清 CTX は低値を示した。しかし、骨形態計測では破骨細胞の減少を認めなかった。培養実験において Ror2 cKO 由来の破骨細胞は、アクチンリング形成および吸収窩形成不全を示した。すなわち Ror2 シグナルは、破骨細胞の骨吸収活性を調節することを示唆した。低分子量 G タンパク質である Rac 及び Rho は、骨吸収に関与する。そこで、Ror2 cKO 由来の破骨細胞において恒常的活性化型 (CA)-RhoA あるいは CA-Rac1 を過剰発現した。CA-RhoA は低下した骨吸収活性を回復させた。Wnt シグナルにおける Rho 活性化因子である Daam2 の発現は、破骨細胞分化に伴い増加した。shRNA を用い Daam2 発現を抑制したところ、吸収窩形成が抑制された。また、Daam2 をノックダウンした破骨細胞において CA-RhoA を発現すると、低下した吸収窩形成は回復した。以上より、Ror2 シグナルは Daam2 を介して Rho を活性化し、破骨細胞の骨吸収活性を制御する。会員外共同研究者：山下照仁 (松歯大)、南康博 (神戸大)

P1-94

歯周病関連菌の義歯用レジン (PMMA) 表面への付着性および唾液による影響
 ○石黒 和子^{1,2}、鷲尾 純平²、佐久間 陽子¹、竹内 裕尚¹、福島 庄一³、佐々木 啓一¹、高橋 信博² (¹東北大 院歯 口腔システム補綴、²口腔生化、³次世代歯科材料工)

【目的】義歯表面 biofilm は、齲蝕、歯周病、誤嚥性肺炎等の原因となる。我々は、齲蝕関連菌を対象として、alamarBlue による非 RI 微量細菌付着定量法を確立し、細菌の PMMA 表面付着を定量した。しかし、歯周病関連菌の多くは alamarBlue との反応が弱く、各菌特異的な代謝基質を加え、反応を活性化させる必要がある (石黒ら、2012)。本研究では *Porphyrromonas gingivalis* (Pg) 及び *Fusobacterium nucleatum* (Fn) の PMMA への付着を従来法及び基質添加改良法で測定し、さらに唾液による PMMA 表面処理の影響を検討した。
 【方法】Pg (ATCC 33277)、Fn (JCM 8532) の各標準株を用いた。PMMA プレートを経衝液あるいは唾液で一晩処理した。各菌懸濁液を 37℃ で 2 時間付着させ、1% alamarBlue 溶液と代謝基質 (Pg: 0.5% tryptone、Fn: 0.2% glutamate) を加え、3 時間後の蛍光強度から付着量を算定した。
 【結果】Pg、Fn とも、改良法において蛍光強度が 13.8 倍、161 倍に増加した。両菌とも PMMA 表面に付着し、Pg の付着量は Fn の 3.0 倍であった。また、両菌とも唾液によって付着量に有意な変化はなく、唾液で付着が増減する齲蝕関連菌 (Sakuma et al., 2013, in press) と異なっていた。
 【結論】改良法によって歯周病関連菌の付着が定量できた。義歯表面 biofilm から歯周病関連菌が検出されているが (Teles et al., 2012)、これらの細菌が義歯表面に直接付着できることが示された。

P1-96

培養幹細胞を用いた象牙質顆粒の機能解析
 ○小栗 健策^{1,2}、川木 晴美¹、田中 雅士^{1,2}、森 春菜²、神谷 真子¹、高山 英次¹、吉田 隆一²、近藤 信夫¹ (¹朝日大 歯 口腔生化、²朝日大 歯 歯科保存)

我々は象牙質顆粒を根尖封鎖材として応用すべく研究を行ってきた。そして象牙質が根尖部で dentinal plug を形成することを動物実験にて示した。しかし象牙質顆粒填入後の周囲組織の応答については不明な点が多い。そこで象牙質および人工骨補填材存在下での細胞応答を様々な組織由来の幹細胞 (ヒト歯髓由来幹細胞 (hDPSC)、ヒト骨髄由来幹細胞 (hBMSC)、ヒト脂肪由来幹細胞 (hASC)) を用いて検討した。象牙質は患者の同意のもと朝日大歯学部倫理委員会の承認を得て抜去歯より調整した。象牙質顆粒、HA、β-TCP に対する細胞の初期接着を細胞播種後 12 時間で検討した結果、3 種の細胞とも骨補填材非存在下 (NC) と比べ有意差はみられなかった。次いで細胞増殖について検討した結果、象牙質顆粒は 3 種の幹細胞の増殖を有意に促進したが、HA、β-TCP では細胞増殖促進は認められなかった。アルカリホスファターゼ (ALP) 活性は HA で有意に高かったが象牙質顆粒および β-TCP には有意な促進効果は認められなかった。今回用いた材料は細胞接着を顕著に阻害するものではなかった。そして細胞増殖においては、象牙質顆粒は比較的用いた人工材料よりも有意に促進効果を示した。しかしながら象牙質による ALP 活性上昇促進効果は認められず、本材料が未分化な状態で増殖を促進する基材として有望であることが示唆された。今後は培養後の細胞の性状を詳細に検討するため、遺伝子発現解析を行っていく予定である。

P1-97

炭酸含有アパタイトの骨髄由来間質細胞の接着・増殖促進効果の検討

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

【目的】我々は骨組織の欠損を生理的に再生、再建することを目指し、骨アパタイトに物理化学的性状が酷似する炭酸含有アパタイト(CA)を開発した。そしてCAが既存の人工骨補填材料と同等の骨誘導性を有し、破骨細胞性吸収が迅速であることを動物モデルを用いて示してきた。しかしながら、in vivoで確認されたCAの効果についての詳細なメカニズム解析は行われていなかった。そこで我々はラット骨髄由来間質細胞を用い接着および増殖について検討した。

【方法】ラット骨髄由来間質細胞を調整し、この細胞を整粒したCA、水酸化アパタイト(HA)、β-リン酸三カルシウム(β-TCP)を0.25~8 mg/wellにてコーティングした培養器で培養し、無コーティングの培養器をコントロール(NC群)として増殖と接着について検討した。また、播種後12時間で固定、あるいはタンパク質試料を回収してVinculinの蛍光免疫染色とERK1/2のリン酸化解析を行った。

【結果および考察】CA群ではHA、β-TCP群に比べコーティング量依存的に細胞増殖が促進され、細胞の初期接着においてもHA、β-TCPが接着を阻害する傾向がみられるのに対しNC群と同等の細胞接着がみとめられた。さらに、CA群においてVinculinの染色性とERK1/2の活性化が顕著であった。以上のことからCAはHA、β-TCPに比べ細胞接着性に優れており、それにはERK1/2経路が関与していることが示唆された。

P1-99

デキサメタゾン培養骨芽細胞が形成する石灰化物のリン酸含有量と硬さを増強する

○宮本 尚^{1,2}、宮本 洋一¹、横 宏太郎²、上條 竜太郎¹ (昭大 歯 口腔生化、²昭大 歯 歯科矯正)

骨強度は、骨密度だけでなく石灰化細胞外基質の物理化学的性質、すなわち骨質に依存する。本研究では、骨芽細胞様MC3T3-E1細胞(以下、細胞)の石灰化培養系を用い、骨芽細胞が形成する石灰化物の物理化学的性質に影響を与える要因を解析した。通常の増殖培地(培地A)、アスコルビン酸(Aa)とβ-グリセロリン酸(Gp)を添加した培地A(培地B)、デキサメタゾン(Dex)を添加した培地B(培地C)の3種類の培地で細胞を2週間培養した。培地Aで培養した細胞のアルカリホスファターゼ活性は、培地Bあるいは培地Cのものより高かった。培地Bと培地Cの培養系では、アリザリン赤とコッサ染色陽性の石灰化物が観察された。培地Bと培地Cでの石灰化物のカルシウム量に有意な差はなかった。ラマン分光法で分析すると、培地Bの石灰化物にはリン酸基が確認できなかったが、培地Cでは、カルシウム沈着に遅れてリン酸基含量の上昇が観察された。一方、糖質コルチコイド受容体阻害剤存在下に培地Cで培養した細胞の石灰化物はリン酸基を含まなかった。さらに、培地Cで生じた石灰化物の硬さをナノインデンテーション法で解析したところ、培地Bで生じた石灰化物に比べ、有意に硬かった。ヒドロコルチゾンでも上記と同様の結果が得られた。以上より、骨芽細胞の石灰化物形成にはAaとGpで十分だが、より硬いリン酸カルシウムを含む石灰化物の形成には副腎皮質ステロイドが必要であることが示された。

P1-98

炭酸含有アパタイトの骨芽細胞増殖分化促進効果の検討

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

【目的】近年、リン酸カルシウム基材が骨代用材、骨修復材として整形外科領域を中心に臨床応用されており、β-リン酸カルシウム(β-TCP)が整形外科領域において骨欠損の補填材に使用され、ハイドロキシアパタイト(HA)が歯科用インプラント体のコーティング材に応用されている。我々はより生理的な骨再生を目指し、生体吸収性の骨補填材料として炭酸含有アパタイト(CA)を開発した。そして焼結温度の異なるCA上では骨髄由来細胞の応答性が異なることを見出した。そこで3種の焼結温度のCAを用いてラット頭蓋冠由来骨芽細胞の増殖分化について検討した。

【方法】Wisterラット胎仔頭蓋冠由来骨芽細胞を調整して実験に用いた。この細胞を3種の異なる温度(400、550、700℃)で焼結したCAを培養器に4 mg/wellずつコーティングした上で培養して(CA400、CA550、CA700群)増殖と接着、アルカリホスファターゼ(ALP)活性および石灰化レベルについて検討した。同様にHA、β-TCP群を作成し、無コーティングのものとともに比較対象とした。

【結果および考察】CAはHAに比べ骨芽細胞の接着・増殖に優れておりその効果はCA400群が最も高かった。ALP活性はHA群が高く、次いでCA700群が高かったが石灰化においてはCA群が優れており特にCA400群で顕著であった。以上よりCAは骨芽細胞の増殖分化において優れた材料であることが示された。

P1-100

骨芽細胞のスフィンゴミエリン合成酵素(SMS2)が破骨細胞分化に及ぼす影響

○加山 智規¹、吉川 美弘²、池尾 隆²、岡崎 定司¹ (大歯大 欠損歯列補綴咬合、²大歯大 生化)

【目的】1,25(OH)₂D₃は骨芽細胞の機能を亢進することで破骨細胞の分化を促進する。一方、白血球細胞株はスフィンゴミエリンを減少させることで、細胞機能の発現を促進することが知られている。今回、私たちは役割が明確にされていない骨芽細胞のSMS2に着目し、SMS2と骨芽細胞が発現する破骨細胞分化調節因子との関連について検討した。【方法】1日齢 ddY マウスの頭蓋冠から単離した骨芽細胞(OB)からSMS2をsiRNAにてノックダウンした。6週齢 ddY マウス脛骨より単離した骨髄細胞(BM)と1,25(OH)₂D₃刺激下で共培養し、1週間後TRAP染色を行った。また、SMS2をノックダウンし、1,25(OH)₂D₃で刺激したのちRANKLのmRNA発現をreal-time PCR法にて解析した。同様にRXRタンパク質発現をウエスタンブロッティング法により解析した。【結果と考察】SMS2をノックダウンするとOBとBMの共培養によるTRAP染色陽性多核細胞形成が抑制された。さらに、1,25(OH)₂D₃刺激でRANKLのmRNA発現は有意に低下した。一方RXRは1,25(OH)₂D₃刺激に関係なく、タンパク質の発現が抑制された。以上により、SMS2はRXRを介してRANKLの発現を制御することで、破骨細胞分化を調節している可能性が示唆された。

P1-101

マウス口腔扁平上皮癌による脾細胞インターフェロロン γ 産生能の抑制効果
 ○稲垣 俊弘¹、神谷 真子²、東 康加³、川木 晴美²、高山 英次²、村松 泰徳¹、近藤 信夫² (朝日大 歯 口腔外科、²朝日大 歯 口腔生化学、³朝日大 歯 歯科麻酔)

【目的】我々は本学会において、口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) 株を移植した同系マウスにおいて脾細胞のインターフェロロン γ (IFN- γ) 産生能が腫瘍体積の増大に逆相関して低下し、抗腫瘍免疫能が抑制されることを報告している (東ら 第54回、55回 歯科基礎医学会学術大会)。そこで本研究では、この分子機構を解明するために、*in vitro* 共培養系を用いて癌細胞と免疫細胞の直接的相互作用を検討した。【方法】C3H マウス由来頬粘膜扁平上皮癌細胞株 (Sq1979、理研BRC) とそのサブクローン Sq23311 (原発巣より採取) および L-5 (転移リンパ節より採取) を用いた。これら OSCC 細胞の共存下で、同系統のマウスから採取した脾細胞を抗 CD3 抗体にて 48 時間刺激培養し、上清に分泌される IFN- γ をはじめとするサイトカインの産生能を ELISA 法にて測定した。【結果と考察】L-5 は Sq1979 や Sq23311 に比較して高い移植生着率、成長速度を示していた。Sq1979 および Sq23311 は、抗 CD3 抗体刺激で惹起される脾細胞の IFN- γ の産生量を OSCC 細胞数依存的に低下させたが、L-5 は抑制効果を全く示さなかった。以上の結果から、Sq1979 および Sq23311 はマウス脾細胞集団に直接作用し免疫応答能を抑制することが示された。現在さらに異なる形質の OSCC 細胞株を用いて、脾細胞のサイトカイン産生能の制御について検討を進めている。

P1-103

急性ストレス負荷時のラット副腎髄質における TrkB の役割
 ○近藤 裕介^{1,2}、東 雅啓²、猿田 樹理²、林 隆司²、松木 千紗²、山本 裕子²、清水 智子²、川嶋 理恵³、榎木 恵一² (東海大 医 基盤診療病理診断、²神歯大 院 環境病理、³自医大 院 歯科口腔外科)

【目的】演者らは、唾液腺において急性拘束ストレス時に BDNF の発現が増加し、血中へ移行することで、遠隔臓器に影響を及ぼすことを報告した。さらに、ラット副腎髄質で BDNF の受容体である TrkB が有意に増加することを報告した。今回は、ストレス時に副腎髄質で発現する TrkB の役割と、副腎における BDNF 発現とその局在についての検討を行った。【方法】ラットに急性拘束ストレスを 60 分負荷した後、TrkB を刺激するために Agonist antibody (Anti-TrkB) を投与し、その 5 分後に血中カテコールアミン濃度測定を行った。副腎摘出モデルラットに対しても同様な方法で実験を行った。また、ラット副腎に対して PCR、*In situ hybridization*、免疫組織化学を行い BDNF の発現と局在の検討を行った。【結果】Anti-TrkB を投与した実験では血中カテコールアミン濃度の有意な上昇が認められた。副腎摘出モデルラットではアドレナリン、ノルアドレナリンの有意な上昇は認められなかった。また、BDNF 発現と局在の解析では、BDNF は副腎髄質に発現することが認められた。【考察】副腎に発現する TrkB はストレス応答としてカテコールミンを放出する役割を担うことが示唆された。また副腎髄質に BDNF が発現したことから、Autocrine 機構によるカテコールアミン放出誘導機序の存在が示唆された。

P1-102

不正咬合と片頭痛との関連について
 ○猿田 樹理¹、東 雅啓¹、林 隆司¹、清水 智子¹、山本 裕子¹、松木 千紗¹、川嶋 理恵²、近藤 裕介^{1,3}、榎木 恵一¹ (神歯大 院 環境病理、²自医大 院 歯科口腔外科、³東海大 医 病理診断)

【目的】近年、頭痛と顎関節症との関連性について研究が進んでおり、頭痛と咬合との関連性についても注目されている。しかし、頭痛と不正咬合が関与しているかどうかは、いまだ不明瞭な点が多い。そこで本研究では、片頭痛と不正咬合の関連性について検討することを目的とした。【資料および方法】被験者は、神歯大附属横浜研修センター・横浜クリニック頭痛外来にて、国際頭痛分類第二版により診断を受けた片頭痛患者 60 名 (平均年齢 39.3 歳) と頭痛のないコントロール群 40 名 (平均年齢 31.3 歳) とした。すべての被験者に対し、生活習慣や顎関節に関するアンケート、口腔内写真撮影、上下歯列の印象採得を行った。これらの資料をもとに統計を行い、片頭痛群とコントロール群間での違いを比較した。【結果および考察】顎関節症状についての問診票では、大開口時のひっかかりを自覚している人がコントロール群で有意に高かったが、その他有意差が認められなかった。模型所見においては、片頭痛患者ではコントロール群と比較し、オーバーバイト、くさび状欠損歯数、歯間内開口角、Angle の分類で有意差が認められた。また、片頭痛群の Angle2 級不正咬合のうち、1 類が 9%、2 類が 62%、判別困難が 29% となった。片頭痛群とコントロール群間では、模型所見でいくつかの特徴的な所見が認められた。以上の結果よりこれらは、片頭痛をもつ患者の口腔内の特徴と考えられた。

P1-104

ヒト歯周炎歯肉における hBD-2 発現誘導の解析
 ○東 雅啓¹、清水 智子¹、猿田 樹理¹、佐藤 武則²、近藤 裕介^{1,3}、林 隆司¹、山本 裕子¹、松木 千紗¹、浜田 信城²、榎木 恵一¹ (神歯大 院 環境病理、²神歯大 院 微生物、³東海大 医 病理診断)

【目的】歯周病原細菌の曝露をいち早く受ける歯肉上皮細胞では、細胞表面に存在する Toll-like receptor (TLR) を介して human β -defensin-2 (hBD-2) の発現を誘導することで病態の重症化を防いでいる。この発現メカニズムを含めたヒト歯肉における免疫反応を直接的に解析した報告は未だない。そこで本演題ではヒト歯肉組織再現モデルを使用し、*Porphyromonas gingivalis* に対するヒト歯肉組織の免疫応答を、TLR、hBD-2 の発現量と局在から検討を行った。【方法】慢性歯周炎患者の歯肉を用いて、Tsukinoki ら (*J Periodont Res* 2007) の方法に従いヒト歯周炎歯肉再現モデルをヌードマウス (♂、6-8 週令) にて作製した。その後ヒト歯肉に対して *P. gingivalis* を感染させ、サンプリングし定量 PCR および免疫組織化学的解析、*in situ hybridization* を行った。さらに、移植後歯肉のヒト特異的発現を確認するため免疫組織化学染色を行った。【結果と考察】移植後歯肉においてもヒト由来であることが確認され、また歯肉における TLR および hBD-2 発現が *P. gingivalis* 感染によって有意に増加した。従ってこのモデルにおいても TLR による病原体認識機構が抗菌ペプチド産生を誘導していることが示唆され、このモデルがヒト組織における歯周病病態の解析に有用であると考えられる。

P1-105

マウス咬筋の持続的活動における IL-1 の役割
 ○千葉 航¹、米田 博行²、菅原 俊二³、遠藤 康男³ (東北大学 歯 加齢歯科、²東北大学 歯 口腔システム補綴、³東北大学 歯 口腔分子制御)

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

P1-107

CCN3 は骨再生における抑制因子である
 ○松下 祐樹^{1,2,3}、坂本 啓¹、南里 篤太郎^{1,4}、原田 清²、山口 朗¹ (東医歯大 院医歯 口腔病理、²東医歯大 院医歯 顎顔面外科、³長大 院医歯 口腔腫瘍治療、⁴長大 院医歯 顎・口腔再生外科)

CCN3 は CCN ファミリー (CYR61、CTGF、NOV の頭文字由来) に属する分泌性タンパク質である。我々は、CCN3 が骨芽細胞の分化を抑制することを報告してきたが、骨再生における役割は明らかにされていない。本研究では骨再生過程における CCN3 の役割を明らかにすることを目的とした。8 週齢雄性マウスの大腿骨骨幹部に骨欠損を作成し、骨再生過程における遺伝子発現の変動をマイクロアレイで解析したところ、骨再生過程の初期で Ccn3 の発現が上昇していた。野生型マウスの骨再生過程の初期で Ccn3 の発現が上昇することを RT-PCR と蛍光免疫染色法でも確認した。2.3 kb Coll1a1 promoter を用いた Ccn3 transgenic (Ccn3 Tg) マウスの骨格は、骨形態計測法で野生型マウスに比べ、骨量が減少していた。一方、Ccn3 knockout (Ccn3 KO) マウスの骨量は野生型と差がなかった。Ccn3 Tg マウスの骨再生は野生型と変化がなかったが、Ccn3 KO マウスの骨再生は野生型マウスより亢進していた。さらに、Ccn3 KO マウスの骨再生過程では、野生型マウスに比べて Runx2、osteocalcin などの骨芽細胞分化に関連する遺伝子の発現が骨再生初期で有意に上昇していた。骨再生初期における Smad1/5 のリン酸化、核移行は、Ccn3 KO マウスの方が野生型マウスに比べて亢進していた。以上のことから、CCN3 は骨再生の初期に発現が上昇し、骨の再生を抑制している因子であることが明らかとなった。

P1-106

in vivo におけるヒト歯肉炎症肉モデルを用いた hBD-2 および IL-1 β 発現と臨床病態との関連についての検討

○清水 智子¹、東 雅啓¹、川嶋 理恵²、林 隆司¹、猿田 樹理¹、佐藤 武則³、近藤 裕介⁴、山本 裕子¹、浜田 信城³、榎木 恵一¹ (神歯大院 環境病理、²自医大 院 歯科口腔外科、³神歯大院 微生物、⁴東海大 医 病理診断)

【目的】歯肉上皮細胞では細菌や炎症性サイトカインの刺激によって human β -defensin-2 (hBD-2) が産生され、初期防御に関与する。しかしヒト歯肉を用いて反応性を解析した報告はない。そこで、ヒト歯肉組織を免疫不全マウスに移植した *in vivo* モデルを作製し、細菌感染させて hBD-2 および IL-1 β の発現レベルと歯肉炎の重症度との関連について検討を行った。【方法】歯肉外科手術または抜歯術を行った軽・中等度慢性歯肉炎患者 24 名、重度慢性歯肉炎患者 13 名より歯肉を採取した。そして、ヒト歯肉組織はヌードマウス皮下に移植し、*Porphyrromonas gingivalis* を感染させ 2 時間後、定量 PCR を用いて hBD-2、IL-1 β mRNA 発現を解析した。【結果と考察】軽・中等度慢性歯肉炎群において、*P.gingivalis* 感染によって hBD-2 の発現は有意 ($P < 0.05$) に増加したが、重度慢性歯肉炎群では有意な増加を認めなかった。また、IL-1 β と hBD-2 は相関 ($r = 0.421, P < 0.05$) した。これらの結果から、重度慢性歯肉炎では、感染後 hBD-2 の発現が抑制されており、病態の違いと hBD-2 の発現動態 (感染後の歯肉上皮の反応性) の間には関連がある可能性が示唆された。

P1-108

コラーゲンゲルを用いたラット唾液腺における創傷治癒関連細胞の解析

○小林 史卓^{1,2}、井上 孝^{1,2} (東歯大 口腔科学研究セ、²東歯大 臨床検査病理)

【目的】ラット顎下腺の創傷部にコラーゲンゲルを填入してゲル内に侵入する細胞の特徴と動態を免疫組織化学的に検討した。【方法】ラット顎下腺に生検パンチを用いて $\phi 3$ mm の欠損を付与し、欠損部には 1:コラーゲンのみ、2:EGF 添加、3:bFGF 添加、4:FGF7 添加、5:BMP-2 添加、6:マトリゲルを填入した。3、5、7、14 日後に標本作製し、免疫組織化学染色をおこなった。填入したゲルの残存面積および各抗体陽性細胞数の計測をおこなった。【結果】1 では、5 日目からコラーゲンゲルの吸収がみられ侵入細胞数が増加した。14 日目でゲルは消失し線維性結合組織による置換が認められた。免疫組織化学的染色では、CD49f 陽性細胞が創面付近に接するゲル周囲内に観察され、ゲル中心部へは vimentin、 α -SMA、GFAP に陽性を示す細胞の侵入が主体で、僅かに CK19 陽性を示す細胞もみられた。2、3、4 では、1 と比較してゲルの吸収促進および侵入細胞数の増加が認められた。5 では、ゲル周囲に硬組織片の形成がみられた。6 では侵入細胞が細胞塊を形成し増殖した。【考察】創傷部へゲルを填入後、CD49f 陽性細胞が創面付近に発現し、BMP-2 添加時に同部に硬組織形成が認められたことから創傷面から幹細胞が発現し創傷治癒に関与することが示唆された。また、ゲル内へ増殖因子を添加することで治癒を促進したことは、幹細胞の分化を促したためであると考えられた。

P1-109

卵巣摘出ラットの抜歯窩新生骨形成におよぼすビスホスホネートの影響

○山崎 貴希¹、蛭間 信彦¹、見明 康雄¹、森口 美津子¹、澤田 隆¹、山本 仁¹、柳澤 孝彰¹ (東歯大 超微構造)

【目的】 Bisphosphonate 関連性顎骨髄壊死 (BRONJ) の危険因子の中で、抜歯などの侵襲的歯科処置は最も重要な因子とされている。本研究は BRONJ の発生機序を明らかにする目的で卵巣摘出ラットをエストロゲン低下による骨粗鬆症モデルラットとし、Bisphosphonate 製剤 (BP) 投与が抜歯後の治癒過程、特に新生骨形成にどのような影響を及ぼすかを検討した。【方法】 9 週齢の雌 Wistar 卵巣摘出ラットの顎第二臼歯を抜去後、対照群 (生理食塩水投与群) と BP 投与群の二群 (各 6 匹) に分け、1、2、4 週間経過後に同部を採取した。試料は脱灰後パラフィン切片を作製し、H-E 染色および TRAP 染色を行い、新生骨形成状態・破骨細胞の数・形態を観察した。試料の一部は非脱灰とし μ CT を用いて新生骨の骨密度を測定した。さらに研磨標本を作製し、コンタクトマイクロラジオグラフィ (CMR) を撮影した。【結果と考察】 BP 投与群では対照群に比べ、核の濃縮、多核、巨大細胞などの像が観察され、また骨表面からの乖離する破骨細胞数が増加していた。新生骨骨密度は、抜歯後 1 週経過後・4 週経過後で BP 投与群のほうが control 群よりも少なかった。抜歯後 2 週では両群で顕著な差が見られなかった。以上の結果から、BP は抜歯後の治癒の際に、早期の段階で抜歯窩内の新生骨形成に影響を及ぼすと考えられた。また、BP 投与群での密度の低い骨梁構造は BRONJ の炎症の広がりに影響を及ぼすことが考えられた。

P1-110

レジンモノマーはアジュバントとして歯科材料アレルギーによるマウスでのアレルギーを促進する

○坂東 加南^{1,2}、田中 志典^{1,3}、黒石 智誠¹、山本 照子²、菅原 俊二¹、遠藤 康男¹ (東北大 院歯 口腔分子制御、²東北大 歯 顎口矯矯正、³東北大 歯 歯学イノベーションリエンジ)

【背景と目的】 レジンモノマー (RM) が原因とされる接触過敏感症がしばしば報告されている。歯科医療従事者では、皮膚疾患の 64% は RM が原因だったとの報告もある。しかし、RM のアレルギーとしての強さは極めて弱く、マウスモデル確立の報告はなく、私達も成功していない。しかし、私達は RM の methyl methacrylate (MMA), 2-hydroxyethyl MA (HEMA) が Ni アレルギーでアジュバント効果を示すこと、RM 重合防止剤として使用される hydroquinone (HQ) がアレルゲンになることを報告した。本研究では HQ アレルギーに対する RM のアジュバント効果を検討した。【方法】 感作処理として HQ を acetone または acetone/RM 混合液に種々の濃度で溶解し、マウス剃毛脇腹に塗布した (200 μ l/mice)。7 日後、惹起処理として同溶液を耳介に塗布 (20 μ l/ear) し、炎症 (腫脹) を測定した。【結果】 感作投与が HQ を acetone だけに溶解した場合に比べ、HQ を acetone/RM 混合液に溶解した場合に強い腫脹が観察された。【考察】 以上の結果は、RM が HQ アレルギーに対するアジュバント効果を持つ事を示唆する。従って、臨床において、“HQ や金属がアレルゲン、RM がアジュバント” として誘導されるアレルギーが“レジナルアレルギー” と見なされる可能性がある。

P1-111

長期 LPS 刺激されたヒト歯根膜線維芽細胞における DNA メチル化の網羅的解析

○高井 理衣¹、植原 治²、中條 隆俊¹、佐藤 英樹¹、吉田 光希¹、佐藤 惇¹、西村 学子¹、荒川 俊哉³、田隈 泰信³、安彦 善裕¹ (北医大 歯 臨床口腔病理、²北医大 歯 保健衛生、³北医大 歯 口腔生)

【目的】 エピジェネティクスは、DNA 塩基配列の変異を伴わず遺伝子発現が変化するので、主に DNA 高メチル化やヒストン修飾がある。近年、エピジェネティクスの歯周炎症や進行への関与を示唆する報告はあるが、その詳細は不明である。本研究では、*P.gingivalis* 由来 LPS による歯周組織のエピジェネティクスを明らかにするため、長期 LPS 刺激でのヒト歯根膜線維芽細胞 (HPdLs) における DNA メチル化の網羅的解析を行った。

【方法】 HPdLs (LONZA) を LPS (WAKO, 1 μ g/ml) 添加、無添加 DMEM (3 日毎に交換) にて、1ヶ月間培養した。コントロールは、LPS 非添加 DMEM にて 1ヶ月間培養した。培養後、DNA を抽出、cytidine 5-dUTP および cytidine 3-dUTP にてラベリング、Human CpG islands 224k array に DNA をハイブリダイズ、DNA Microarray Scanner (Agilent technology) にて解析した。解析データの再現性確認のため、上位と下位 10 遺伝子ずつの定量的リアルタイム PCR (MSP 法) を行った。

【結果および考察】 全 30112 probes (5760 遺伝子) 中、12918 probes (2910 遺伝子) に 4 倍以上の高メチル化がみられ、10330 probes (3375 遺伝子) に 1/4 以下の低メチル化が認められた。解析データと定量的リアルタイム PCR から、CACNA1F 遺伝子に最も高メチル化が認められた。これらのことより、長期 LPS 刺激での HPdLs の多くの遺伝子応答が、DNA メチル化に関わることが示唆された。

P1-112

自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析

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

【目的】 自己免疫反応は自己の細胞や組織に対する免疫反応であり、腫瘍免疫もまた自己に発生した腫瘍細胞に対する免疫反応であることから、自己免疫と腫瘍免疫には何らかの共通点あるいは相違点が想定されるが、詳細については不明な点が多い。本研究では、シェーグレン症候群を含む自己免疫疾患モデルマウスである B6/*lpr* マウスを用いて腫瘍移植実験を行うことにより、新規の腫瘍免疫制御機構を明らかにすることを目的とする。【材料及び方法】 C57BL/6 (B6) マウスと B6/*lpr* マウス (自己免疫疾患モデル) に対し悪性黒色腫細胞 (B16F10) 及び GM-CSF を強発現する G-B16F10 の移植実験を行い、腫瘍の増殖、各種免疫細胞分画を病理学的あるいは免疫学的手法を用いて検討した。【結果】 B6/*lpr* マウスに移植した B16F10 の腫瘍増殖は対照群に比較して軽度の亢進が見られ、B6/*lpr* マウスに移植した G-B16F10 の増殖は対照群に比較して有意に亢進していた。G-B16F10 を移植された B6/*lpr* マウスの CD11b 陽性細胞は対照群に比較して有意に上昇していたことに加え、腫瘍本体中の VEGF は有意に増加していた。【結論】 自己免疫疾患モデルへの腫瘍移植実験結果から、自己免疫反応を背景にしたマクロファージは正常な腫瘍免疫システムに何らかの機能不全をもたらす可能性が示された。

P1-113

核内長鎖 non-coding RNA – その唾液腺腫瘍における役割 –

○外菌 知恵¹、入江 太朗¹、安原 理佳¹、田中 準一¹、美島 健二¹ (昭大 歯 口腔病態診断 口腔病理)

Non-coding RNA (ncRNA)はタンパク質をコードしないRNAである。ncRNAの中でも数百から数千塩基対に及ぶ「長鎖ncRNA」については、その大部分の生理機能は不明であった。我々はこれまでに核内長鎖 ncRNA である MALAT-1 が口腔粘膜上皮異形成や扁平上皮癌において発現が高まることを明らかにしてきた。今回唾液腺腫瘍における MALAT-1 の発現について検討したので報告する。

【方法】 当科にて診断された唾液腺腫瘍 17 症例について in situ hybridization を行った。また laser microdissection 法と real-time PCR 法によりその発現量を検討した。さらに唾液腺腫瘍 87 症例がスポットされた tissue array を用いて in situ hybridization を行いその生存解析を行った。

【結果】 MALAT-1 は正常唾液腺、良性腫瘍、悪性腫瘍の順に発現が亢進し、筋上皮系細胞と導管上皮系細胞の両者に発現した。生存解析においては MALAT-1 陽性症例において予後不良となる傾向がみられた。

【考察】 唾液腺腫瘍において良性腫瘍より悪性腫瘍において陽性率が高まる傾向がみられたこと、その発現が予後に影響する傾向がみられたことから、MALAT-1 は唾液腺腫瘍の表現型そのものに大きな役割を果たしていることが示唆された。

会員外共同研究者：秋光信佳；東京大アイソトープセンター 森泰昌；国立がん研究所、大西忠博；株式会社エム・シー・オー

P1-115

転移能力違い舌扁平上皮癌細胞系における体外浸潤の比較

○劉 涵¹、劉 波¹、肖 晶¹ (大連医大 口腔医学院 口腔基礎)

Objective: Epithelial-mesenchymal transition (EMT) is the key process driving cancer invasion and metastasis. The aim of this study was to investigate the invasion mechanism of miR-140-mediated potential negative regulation of Smad3 expression in tongue squamous cell carcinoma (TSCC) in vitro. Methods: Tca8113 (mut-p53) and UM-SCC6 (wt-p53) cells that migrated through the membranes and attached to the transwell lower-chamber compartments were harvested aseptically. Immunocytofluorescent was applied to detect the expression of E-cadherin and Vimentin. qRT-PCR was also used to detect the mRNA levels of miR-140 and Smad3. Results: E-cadherin was detected in both cell lines, whereas Vimentin was partially detected. In invasive mesenchymal-type cells, E-cadherin was significantly reduced, while Vimentin was increased. Furthermore, we discovered that the expression of Smad3 was suppressed by miR-140 only in UM-SCC6 cells. Conclusion: EMT was found in both cell lines during the invasion. The abnormal expression of miR-140 and Smad3 in UM-SCC6 had remarkable association with the invasiveness. The gene of p53 may be involved in the EMT procedure.

P1-114

ヒトパピローマウイルス (HPV) 感染が口腔扁平苔癬 (OLP) の悪性化に関与する可能性についての検討

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

【目的】 我々はヒトパピローマウイルス (HPV) が口腔前癌状態である口腔扁平苔癬 (OLP) の悪性化に関与する可能性を考え、同疾患における HPV 感染を検索した。

【材料および方法】 愛院大歯学部附属病院および関連施設にて OLP と診断された 200 症例 (頬粘膜 132 例、歯肉 30 例、舌 19 例、口唇 15 例、口蓋 4 例) のホルマリン固定パラフィン包埋病理組織切片より DNA 抽出し、コンセンサスプライマー (GP, GP⁺, MY) を用いた PCR を実施した。そこで陽性と判定した 83 症例について型特異的プライマー (HPV-6, 11, 16, 18, 33) を用いた PCR を実施した。また、*In-situ* Hybridization と免疫染色により HPV 感染を確認した。

【結果】 コンセンサスプライマーを用いた PCR における 3 種のプライマーのうちいずれかで陽性になった割合は 41.5% であった。型別の HPV 感染率は、多い順に、16 型 (25.5%)、18 型 (23.5%)、11 型 (6.5%)、6 型 (5.5%)、33 型 (3.5%) であった。悪性病変に関与する 16、18、33 型のいずれかに感染している症例は 31.5% にのぼった。また、*In-situ* Hybridization では上皮全層の、免疫染色では上皮上層の細胞の核に HPV DNA 陽性像がみられた。

【結論】 今回の結果は、多くの HPV が OLP 病変に存在していることを示すものであり、HPV 感染が OLP の悪性化を起こす危険因子の一つである可能性が示唆された。

P1-116

エナメル上皮腫における CCN2 の発現と間質線維芽細胞への作用について

○武部 祐一郎¹、辻極 秀次¹、于 湊¹、藤井 昌江¹、河合 穂高¹、玉村 亮²、佐々木 朗³、長塚 仁¹ (岡大 院医歯薬 口腔病理、²岡大 院医歯薬 口腔顎顔面外科、³日大 松戸歯 解剖 2)

【緒言】 腫瘍間質は腫瘍の形態や性格に影響を及ぼす因子として注目されている。歯原性腫瘍においても、腫瘍間質が腫瘍の生物学的特性に寄与すると考えられるが、腫瘍間質に着目した研究は少ない。本研究ではエナメル上皮腫において、腫瘍実質が間質に及ぼす影響について検討した。【材料と方法】 エナメル上皮腫を用い、間質に影響を及ぼす因子として TGF-β、BMP4、CCN2、CD68、RANKL の発現と局在を免疫組織化学的に検索した。さらに、エナメル上皮腫摘出物から間質線維芽細胞を初代培養して得た ASF0000、ASF0111 細胞にエナメル上皮腫由来細胞株 AM-1 細胞の培養上清や rhCCN2 を加え、影響を観察した。【結果および考察】 腫瘍間質は線維の増生が強い Fibrous type (Ft) と粘液腫状を示す Myxoid type (Mt) に大別された。TGFβ、BMP4、RANKL の腫瘍実質での発現と間質の性状に関連は認めなかった。腫瘍実質で CCN2 が高発現している部位に近接する間質は Ft を示し、間質でも高発現していた。Ki-67 は CCN2 発現の高い部位で陽性率が高かった。間質の CD68 陽性細胞数は Mt で多かった。In vitro の実験で、AM-1 培養上清または rhCCN2 を添加すると細胞増殖は亢進し、免疫組織化学と一致した。以上から、エナメル上皮腫では、成長因子の発現の差異が、間質の性状に関与する可能性が考えられた。特に CCN2 は間質の線維化に寄与することが示唆された。

P1-117

ラクトフェリンの舌下からの吸収による脳への移行と抗酸化能との関連についての検討

○林 隆司¹、山本 裕子¹、吉野 文彦²、吉田 彩佳²、猿田 樹理¹、東 雅啓¹、近藤 裕介^{1,3}、川嶋 理恵⁴、李 昌一²、槻木 恵一¹ (¹神歯大 院環境病理、²神歯大 院 口腔科学、³東海大 医病理診断、⁴自医大 院 歯科口腔外科)

[目的]ラクトフェリン(LF)は乳汁や唾液などに存在し多機能性を有することから、サプリメントとして経口投与で応用されることが多い。経口投与は最も安全だが初回通過効果を受ける。そこで、迅速な効果を目的としてラットにウシLF(bLF)を舌下投与し、更に唾液由来LF(sLF)の舌下からの吸収について検討し、LFの抗酸化能との関連を調べた。[方法]ラットをbLF投与群とBSA投与群の2群に分け、各粉末を舌下投与後5分、15分、30分にてサンプリングし、脳内bLF濃度をELISA法で測定した。また三大唾液腺摘出後1週および2週のラットを用いて脳内および血中sLF濃度をELISA法で測定し、sLFの舌下からの吸収による移行量を検討した。更に抗酸化能は、hydroxyl radicalおよびsuperoxideの消去率をESR法で測定した。[結果と考察]bLF舌下投与後5分で脳内bLF濃度が有意に上昇し、それ以降は低下傾向であった。またsLFの舌下からの吸収については、摘出後1週の脳内および血中sLF濃度がControl群と比較し有意に低下した。更に抗酸化能に関しては、hydroxyl radicalを約40%有意に消去した。これらの結果から、唾液腺摘出による唾液流出量の減少が脳内および血中sLF濃度を低下させることが示唆された。sLFの舌下からの吸収にbLF舌下投与の外因的要素が加わり、より効果的な抗酸化能を発揮すると思われる。

P1-119

唾液腺腫瘍におけるPTEN及びSmad4の発現

○劉 涵¹、劉 波¹、肖 晶¹ (¹大連医大 口腔医学院 口腔基礎)

Objective: to analyze the expression of PTEN and Smad4 in salivary gland tumors. Methods: 24 of pleomorphic adenoma (PA) and 45 of adenoid cystic carcinoma (ACC) were submitted to immunohistochemistry. 19 of normal salivary gland (NSG) were used as control. Results: In NSG, intense staining of PTEN was observed in both of cytoplasm and nuclus in myoepithelial and duct cells; but Smad4-positive cells only localized in the cytoplasm of seromucous cells. In cell-rich PA, high rates of nuclear staining of PTEN in myoepithelial-like cells and high rates of cytoplasm Smad4 in pleomorphic tumor cells were observed; PTEN and Smad4 expression showed marked variation within tumors, just like in NSG. In ACC, PTEN and Smad4 positive rate decreased with the decreasing degree of histological differentiation (P<0.05). The loss of PTEN expression was observed in solid type, while Smad4 showed strong nuclear expression in some cases (33%). Conclusion: Our studies suggest that PTEN and Smad4 may play a potential role in suppressing the formation of malignant tumor in salivary glands synergistically.

P1-118

F-spondin は歯周組織の硬組織破壊を抑制する

○岡 広子¹、北川 雅恵²、高田 隆^{1,3} (¹広大院 医歯薬保 国際歯科医学連携開発、²広大病院 口腔検査セ、³広大院 医歯薬保 口腔顎顔面病理病態)

歯周組織の慢性炎症性病変である辺縁性歯周炎は歯槽骨破壊を伴う一方で、臨床的に歯根吸収が認められることは稀有である。このことから、歯根周囲に特異的な細胞や因子が周囲の硬組織維持に大きく関わっていると示唆される。そこで、我々が近年セメント芽細胞に特異的に発現する遺伝子として報告したF-spondin に注目し、硬組織破壊機構に対する影響を検討したところ次の結果が得られた。1) F-spondin 投与により、M-CSFに対する破骨細胞前駆細胞の遊走は有意に抑制された。2) F-spondin 投与はRANKLによるNfatC1の誘導を抑制し、破骨細胞分化関連マーカー (TRAP, Cathepsin K, DC-STAMP) の発現およびTRAP陽性多核細胞の誘導を抑制した。3) F-spondin 過剰発現マウス由来の骨芽細胞からの分泌因子はRANKLによる破骨細胞分化誘導を抑制した。4) siRNAを用いてLDL receptor-related protein 8 (LRP8)を抑制すると1)、2)、3)で認められた抑制作用の一部が解消された。以上、歯周組織において、F-spondin は破骨細胞前駆細胞の遊走・分化を抑制し、硬組織破壊を制御する作用を持つことが明らかとなり、歯周組織において硬組織破壊を抑制する可能性が示唆された。

P1-120

LPSの破骨細胞形成に対するMDPの作用の検討

○石田 匡彦¹、北浦 英樹¹、木村 桂介¹、高田 春比古²、山本 照子¹ (¹東北大院 歯 顎口腔矯正、²東北大院 歯 口腔微生物)

近年高齢化に伴い、歯周病などの病的骨吸収を伴った疾患が問題となっている。この病的骨吸収はグラム陰性菌のLPSによって引き起こされることが知られている。LPSはTLR4受容体を介して骨吸収を引き起こすことが知られている。一方、ペプチドグリカンの構成成分であるMDPはNOD2を介して炎症を誘導するとされている。そこで本報告ではLPSによって引き起こされる破骨細胞誘導に対するMDPの作用を検討した。本研究では、マウス頭蓋部にLPS及びMDPの濃度を変え注入し、屠殺後組織切片を作製しTRAP染色により破骨細胞形成を評価した。また、頭蓋骨よりRNAを抽出後、リアルタイムPCRを行い破骨細胞形成マーカーのmRNAレベルを測定した。骨吸収を評価するために血中のTRACP 5b濃度を測定した。その結果、LPS単独でも高濃度では、破骨細胞形成が強く促進されたが、低濃度の場合では、破骨細胞形成が促進されなかった。一方、LPSとMDPを同時にMDPを注入した場合は、破骨細胞形成が強く促進され、また、相乗的に破骨細胞形成マーカーの発現の増強と、TRACP 5b濃度の増加が認められた。これらの結果からMDPはin vivoにおいてLPSによって誘導される破骨細胞形成を促進し、骨吸収を増強することが分かった。歯周病等の病的骨吸収は、LPSとMDPが連携して働き、骨吸収を相乗的に誘導していると考えられる。

P1-121

Curdlan-dectin-1 を介した新たな破骨細胞分化の制御機構

○山崎 徹^{1,2}、有吉 渉¹、沖永 敏則¹、細川 隆司²、西原 達次¹ (九歯大 感染分子、²九歯大 口腔再建リハ)

【目的】 Dectin-1 は主にマクロファージや樹状細胞に発現し、βグルカンとの結合により、さまざまな細胞内反応を引き起こす。今回、βグルカンの一つである curdlan が receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) 誘導下の破骨細胞形成に及ぼす影響について調べた。【方法】 マウス単球系細胞 RAW264.7 の dectin-1 過剰発現細胞を用い、RANKL、curdlan を添加して培養した。また、マウス骨髄細胞を用い、macrophage-colony stimulating factor (M-CSF)、RANKL、curdlan 刺激下で培養を行った。Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性多核細胞数を計測した。Osteo Assay Stripwell Plate にて骨吸収活性を評価し、さらに、破骨細胞のアクチンリング形成を観察した。RT-PCR、Western blotting にて nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1)、および関連分子を解析した。【結果】 Curdlan は RANKL 誘導下の成熟 TRAP 陽性多核細胞形成、さらに、吸収窩形成、アクチンリング形成を抑制した。また、NFATc1 とその関連分子、c-Fos の発現を抑制した。【考察】 Curdlan は RANKL 誘導下のシグナル経路を阻害することで、破骨細胞形成を抑制する可能性があることが示唆された。

P1-123

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

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

【目的】 歯周病原細菌である *Fusobacterium nucleatum* のバイオフィームへの参入にはすでに付着定着している菌との共凝集による結合が必要であることが知られている。我々はこれまでに齶蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* との共凝集においてグルカン合成に関与する遺伝子発現レベルが高まる事を報告した。口腔内では種々の菌が混在しており、クオラムセンシングによる菌のバイオフィーム形成との関係を解明することは齶蝕発生メカニズムの解明につながると考える。付着に強く関連するとされるグルカン合成遺伝子 *gtfC* とクオラムセンシングに関与すると考えられている *luxS* 遺伝子の発現について検討した。【方法】 *S. mutans* MT557 に対し *F. nucleatum* ATCC25586 を Cisar らの方法に準じ嫌気条件下にて共凝集試験を行った。また *F. nucleatum* を 70℃、10 分間熱処理した後、共凝集試験を行い熱未処理菌と比較した。その後、凝集した菌体から RNA を調製し cDNA を合成し、*gtfC* と *luxS* について定量的 real-time PCR (qRT-PCR) にて遺伝子発現量を比較した。【結果】 *S. mutans* と *F. nucleatum* との共凝集が認められた。*S. mutans* の遺伝子発現は、熱未処理 *F. nucleatum* と共凝集する事で *gtfC* および *luxS* の発現レベルの上昇が認められたが、熱処理 *F. nucleatum* との共凝集においては遺伝子発現レベルが低下した。【考察】 *S. mutans* と *F. nucleatum* の間において異種菌間シグナル分子の存在が示唆された。

P1-122

S. sanguinis のバイオフィーム形成に対する *V. parvula* 培養上清の作用

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

【背景】 口腔 *Veillonella* は、口腔バイオフィームの形成初期から存在し、それを構成する主たる早期定着菌として報告されている。現在、*V. atypica*、*V. denticariosi*、*V. dispar*、*V. parvula*、*V. rogosae*、*V. tobetsuensis* が知られている。しかし、口腔 *Veillonella* が、口腔バイオフィーム形成に及ぼす詳細なメカニズムや菌体間情報伝達機構等の解明は未だに進んでいない。【目的】 *V. parvula* 培養上清が、*Streptococcus sanguinis* 及び *V. parvula* のバイオフィーム形成へ及ぼす影響を明らかにする。【材料と方法】 バイオフィームの形成にはワイヤー法を用いた。事前に *S. sanguinis* のバイオフィームを形成させたワイヤーを、*V. parvula* 培養上清入り試験管に挿入し、嫌気条件下で培養後、*S. sanguinis* によるバイオフィーム形成量を解析した。また、同培養上清と *V. parvula* 懸濁液の混合液に、同ワイヤーを挿入したバイオフィームの形成量も解析した。培養後、全 DNA を抽出し、定量的 real-time PCR により、ワイヤー上に形成されたバイオフィームの構成菌種を定量した。【結果と考察】 *V. parvula* 培養上清は、*S. sanguinis* のバイオフィーム形成を抑制した。しかし、同培養上清と共に *V. parvula* 菌体が存在した場合は、その形成を促進した。これらの結果は、*V. parvula* 培養上清中におけるバイオフィーム形成抑制・促進因子、菌体間情報伝達物質の存在、また、これらの変化等を示唆するものと考えている。

P1-124

Porphyromonas gingivalis において電気穿孔法で導入可能なプラスミドベクターの構築

○田川 淳平¹、井上 哲圭²、佐藤 啓子³、内藤 真理子³、中山 真彰²、中山 浩次³、山城 隆⁴、大原 直也² (1岡大 病院 矯正、2岡大 院医歯薬 口腔微生物、3長大 院医歯薬 口腔病原微生物、4阪大 院歯 矯正)

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* へのプラスミド導入には現在接合伝達法が用いられている。本研究では、操作が簡便な電気穿孔法で導入できる汎用性の高いプラスミドの作製を試みた。プラスミドの作製に当たり、接合伝達法で *P. gingivalis* に導入可能な大きさ 11.0 kb の *Bacteroides* 属-大腸菌シャトルベクター pVAL-1 を使用した。最初に pVAL-1 の全塩基配列を決定し、次に pVAL-1 の配列の中で、*Bacteroides* 属/*Porphyromonas* 属の菌体内で複製に必要な最小領域を決定した。そして決定した領域を大腸菌用プラスミド pBlueScript II にクローニングした。さらに抗生物質耐性遺伝子カセットをこのプラスミドに挿入することにより、大きさ約 4.5 kb のプラスミド pTIO-1 を構築した。pTIO-1 は電気穿孔法により、導入された *P. gingivalis* 6 株と *Bacteroides* 属 3 菌種すべてに導入された。pTIO-1 の *P. gingivalis* ATCC 33277 への導入効率は高く、また pVAL-1 と比較して安定性は増加していた。定量 PCR の結果、pTIO-1 と pVAL-1 のコピー数は共に 1 と算出された。以上のことから pTIO-1 は電気穿孔法で簡便に使用できる *P. gingivalis* 用のプラスミドであることが示された。

P1-125

Porphyromonas gingivalis PGN_1796 は薬剤感受性に関与する

○田口 裕子¹、佐藤 啓子⁴、井上 哲圭²、加野小奈美³、中山 真彰²、前田 博史¹、中山 浩次⁴、大原 直也² (¹岡大 院医歯薬 歯周病態、²岡大 院医歯薬 口腔微生物、³岡大 院医歯薬 歯科矯正、⁴長大 院医歯薬 口腔病原微生物)

【目的】*Porphyromonas gingivalis* (Pg) PGN_1796 は Leucine-rich repeat モチーフを持つ 1125 アミノ酸からなるタンパク質をコードする。その機能を解析することを目的とし、PGN_1796 遺伝子を欠損させた ΔPGN_1796 株を作製した。解析の途上、親株と比較して ΔPGN_1796 株は、複数の抗生物質に対する感受性が低下していることが示唆された。本研究では ΔPGN_1796 株の抗生物質に対する感受性の変化を調べ、その原因となる機序を明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】Pg ATCC 33277 株を使用し、相同組換え法により ΔPGN_1796 株を作製した。遺伝子組換えの確認は PCR で行なった。抗生物質に対する感受性は微量液体希釈法を用いて測定した。

【結果および考察】ΔPGN_1796 株は血液寒天培地上に平滑で黒色の集落を形成し、大きさも親株のものとは認められなかった。薬剤感受性については、Metronidazole 及び Tetracycline に対する MIC が親株に対して 2 倍以上上昇した。Metronidazole と Tetracycline では作用機序が異なることから、PGN_1796 は物質の排出/透過性に関与することが推測される。現在、他の薬剤に対する感受性の変化およびそれら抗生物質感受性の変化をもたらす機序の解析を進めている。

P1-127

次世代シーケンサーを用いた歯石細菌叢の解析
○城 隆太郎¹、熊田 直子¹、石丸 英彦¹、森嶋 清二²、近 亮¹ (¹ライオン株式会社 分析技術センター、²ライオン歯科衛生研究所)

【目的】歯石は歯周病など様々な口腔疾患との関連が指摘されており、歯石沈着の予防は重要な課題となっている。しかし、歯垢細菌の石灰化メカニズムに関しては、未だ不明な点も多い。そこで、我々は細菌学的な視点から歯石形成のメカニズムを明らかにすることを目的とし、次世代シーケンサーを用いて歯石の細菌叢を網羅的に解析した。

【方法】本研究に同意の得られた 20~60 代の成人 30 名(男性 19 名、女性 11 名)を対象者とし、下顎前歯舌側に形成された歯石を採取した。一方、歯石非形成部位として上顎前歯舌側より歯垢を採取した。歯石はさらに超音波処理により歯石と周囲に付着していた歯垢とに分離した。その後、脱灰およびピーズ破砕により DNA を抽出し、16S rDNA v1-2 領域を PCR 増幅した後、454 GS FLX titanium プラットフォームによるシーケンシングに供し、歯石、歯石付着歯垢、歯石非形成部位歯垢の 3 検体の菌叢比較を行った。

【結果と考察】1 検体当たり 3,000 リードの 16S 配列を用いた OTU 解析の結果、調べた 3 部位の中で歯石の OTU 数が有意に少なく、菌種多様性が低いことが明らかとなった。また、Unifrac 解析の結果、歯石周囲と非形成部位との間で有意な菌叢の違いが確認され、歯石形成部位には特有の菌叢が存在することが示唆された。

会員外共同研究者：真木 佐恵子、河村 有美子、堀尾 茉衣((公財)ライオン歯科衛生研究所)、服部正平、大島健志朗、須田 互(東大院 新領域)

P1-126

新規植物抽出物による口腔微生物発育抑制効果

○大屋 学¹、田村 宗明^{1,2}、今井 健一^{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】日常的な口腔ケアの欠如は口腔内フローラのバランスを崩し、口腔疾患の原因となるばかりでなく、様々な全身性疾患の原因となることが報告されている。近年、高齢者の増加に伴い、正常な口腔衛生環境の維持は極めて重要な問題となっている。今回、効果的な口腔ケア剤の開発を目的として、新たな植物抽出物の口腔微生物の発育に及ぼす影響、特に *Candida albicans* に対する抗菌作用について検討した。【方法】臨床応用を目的とし、植物抽出物 10 種類の抗菌作用について、口腔微生物 10 菌株を用いて改良型寒天拡散法にて評価した。その結果、最も抗菌作用の強い黄金草の抽出物、オウゴンエキスを供試し、高齢者ならびに義歯装着者から検出率が高い *C. albicans* に対する発育および菌糸形変換抑制効果について検討した。菌糸形変換に関連する遺伝子発現への影響を Real Time PCR で測定した。【結果と考察】オウゴンエキスはう蝕原因菌、歯垢形成関連菌、歯周病原菌および真菌に良好な抗菌効果を示した。しかし、口腔の環境維持に重要なレンサ球菌群の発育に及ぼす影響は認められなかった。また、オウゴンエキスは、レジニン付着 *C. albicans* の発育を顕著に阻害した。低濃度で菌糸形変換を抑制するとともに、変換関与の特異的な遺伝子発現も抑制した。以上の結果から、植物抽出物・オウゴンエキスは口腔ケアに使用できる可能性が示唆された。(会員外協力者：一丸ファルコス株式会社・田中清隆)

P1-128

Streptococcus sanguinis の菌体表層スクレアーゼは自然免疫からの回避に寄与する

○住岡 龍一¹、森田 知里¹、中田 匡宣¹、岡橋 暢夫²、住友 倫子¹、川端 重忠¹ (¹阪大 院歯 口腔細菌、²阪大 院歯 口腔科学フロンティアセ)

【目的】*Streptococcus sanguinis* は感染性心内膜炎患者の病巣から高頻度で分離される。病態形成の過程で本菌は血中において感染防御機構を回避し、心臓へ定着すると考えられる。近年、好中球の細胞外殺菌機構として NETs が注目されている。本研究では、*S. sanguinis* の推定細胞壁架橋型スクレアーゼ SWAN に着目し、本酵素が NETs による殺菌からの回避に寄与するかについて検討した。【方法】組換え SWAN を作製し、核酸分解能、金属イオン要求性および至適 pH を検討した。同様に、推定活性残基をアラニンに置換した点変異組換えタンパクを作製し、スクレアーゼ活性を測定した。また、組換え SWAN による NETs DNA の分解を蛍光顕微鏡で観察した。さらに、*S. sanguinis* が SWAN 活性により NETs の殺菌を回避するかについて、*swan* 欠失株を用いて検討した。乳酸球菌を用いた異種発現系を構築し、同様の解析に供した。【結果と考察】組換え SWAN は Mg²⁺ と Ca²⁺ の共存下で核酸を分解し、中性付近の pH で最も高い分解活性を示した。点変異組換えタンパクでは酵素活性が消失したことから、推定活性残基は SWAN の活性に必須であると推測された。NETs への感染実験では、野生株と比較して、*swan* 欠失株の生存率は低下した。また、異種発現系では、SWAN の発現により菌生存率は上昇した。以上の結果から、SWAN のスクレアーゼ活性により *S. sanguinis* は NETs の殺菌を回避することが示唆された。

P1-129

Porphyromonas gingivalis の PGN₁₂₀₂ (*rpoN*) は必須遺伝子である

○加野 小奈美¹、井上 哲圭²、田口 裕子³、田川 淳平⁴、中山 真彰²、山城 隆⁵、大原 直也² (岡大 院医歯薬 矯正歯科、²岡大 院医歯薬 口腔微生物、³岡大 院医歯薬 歯周病態、⁴岡大病院 矯正、⁵阪大 院歯 矯正)

目的：細菌は RNA ポリメラーゼのシグマ因子を複数保有している。*rpoN* 遺伝子産物 sigma-54 は大腸菌などでは運動性や窒素代謝に関わる分子の遺伝子発現に関与する。*P. gingivalis* ゲノム上にも *rpoN* が存在するが、その機能は不明である。*P. gingivalis* の sigma-54 の機能を明らかにするために、本菌の *rpoN* 欠損株の作製を試みた。

方法：*P. gingivalis* ATCC 33277 株を供試菌とし、*rpoN* (PGN₁₂₀₂) 遺伝子欠損株作製には相同組換え法を用いた。*rpoN* 発現プラスミドベクターの *P. gingivalis* への導入は電気穿孔法によった。

結果と考察：当初 PGN₁₂₀₂ 欠損株の作製を試みたが、PGN₁₂₀₂ 欠損株は得られなかった。次に、*rpoN* 発現ベクター保持菌を作製し、ゲノム上の PGN₁₂₀₂ の欠失を試みた。その結果、発現ベクター保持菌ではゲノム上の PGN₁₂₀₂ を破壊することができた。また、ゲノム上の PGN₁₂₀₂ が破壊された株では発現ベクターは脱落しなかった。以上より、*P. gingivalis* では *rpoN* は必須遺伝子であることが強く示唆された。なお、菌種によっては *rpoS* 遺伝子産物が *rpoN* 遺伝子産物の機能を相補し合う場合、逆に拮抗的に働く場合が報告されているが、*P. gingivalis* には *rpoS* 様遺伝子は存在しなかった。

P1-131

歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の主要膜タンパク質の性状解析

○安彦 友希¹、永野 恵司¹、吉田 康夫¹、吉村 文信¹ (愛院大 菌 微生物)

【目的】 *T. denticola* の主要な膜画分タンパク質を解析したところ、機能未知の TDE2508 (45 kDa) が検出された。そこで本研究では、TDE2508 の性状および機能解析を試みた。【方法】 *T. denticola* ATCC 35405 株の菌体破砕物を超遠心後、可溶性、膜画分に分離し、さらに、膜画分を内膜および外膜に分離した。TDE2508 はウェスタンブロット法にて検出した。*T. denticola* の付着因子である Msp についても同様に行った。TDE2508 欠失変異株は、標的遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子 (*ermB*) に置換して作製した。付着性はポリスチレンプレートおよび歯肉上皮細胞 (Ca9-22) を用いて検討した。自己凝集性は菌懸濁液を静置し、濁度 (OD600) を経時的に測定した。菌体表面の疎水性は n-ヘキサソール分配法を用いた。【結果】 TDE2508 は外膜に局在し、また複合体を形成している可能性が示された。欠失株は、ポリスチレンプレートおよび歯肉上皮細胞への付着性が有意に上昇した。しかし、自己凝集性および疎水性には変化が見られなかった。また、Msp の発現にも変化はみられなかった。【結論】 TDE2508 は付着制御に関与していることが推察された。しかし、TDE2508 の菌体表面への露出については不明であり、本タンパク質による付着制御機構については、直接的あるいは間接的かを含めてさらなる検討が必要である。

P1-130

Streptococcus sanguinis によるインフラマゾームの活性化

○佐伯 歩¹、杉山 正博¹、長谷部 晃¹、中澤 太²、柴田 健一郎¹ (北大 院歯 口腔病態 口腔分子微生物、²北医大 菌 微生物)

【目的】 口腔常在菌である *Streptococcus sanguinis* (Ss) は感染性心内膜炎の原因菌として注目されている。現時点では、その病因論は十分には明らかにされていないが、炎症性サイトカインの一つである IL-1 がその病態の形成に関与しているという報告がなされている。IL-1β の産生には細胞内センサーである inflammasome の活性化が必要であるが、Ss による inflammasome の活性化については明らかにされていない。本研究では、Ss による inflammasome の活性化について検証した。【方法】 菌株は *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 を用い、細胞としては A/J マウス由来樹状細胞 (XS-106 細胞) を用いた。IL-1β の産生は ELISA 法と Western blot 法で評価した。caspase-1 ならびに NLRP3 の発現は Real-time PCR 法で調べた。【結果と考察】 菌体ならびに培養上清は XS-106 細胞に IL-1β の産生ならびに細胞死を誘導し、IL-1β の産生誘導活性は pan-caspase ならびに caspase-1 阻害剤、さらに caspase-1 のノックダウンにより抑制された。XS-106 細胞の生菌刺激で NLRP3 の発現が上昇し、また、NLRP3 特異的な siRNA でノックダウンすると IL-1β の産生量が低下した。さらに、菌体刺激で Reactive oxygen species (ROS) が産生され、ROS の阻害剤 (N-acetylcysteine) で IL-1β の産生が抑制された。以上より、Ss 菌体ならびに培養上清には XS-106 細胞に NLRP3 inflammasome を活性化する物質が存在し、ROS が関与していることが示唆された。

P1-132

神経障害性疼痛に対する GABA トランスポーター阻害薬の鎮痛効果

○秦泉寺 紋子^{1,2}、十川 千春²、宮脇 卓也¹、森田 克也³、十川 紀夫²、北山 滋雄² (岡大 院医歯薬 歯科麻酔、²岡大 院医歯薬 歯科薬理、³広島文化大 看護 薬理)

現在用いられる神経障害性疼痛 (NP) 治療薬には抗うつ薬などがあるが、副作用や不十分な治療効果などの問題があり、新薬の開発が望まれる。脊髄における抑制性神経伝達物質の調節は疼痛制御において重要であり、その代表的な伝達物質である GABA は NP 制御に関与すると考えられる。われわれは、中枢神経系での GABA の調節を担う GABA トランスポーター (GAT) に着目し、GAT 阻害薬の鎮痛効果を検討した。坐骨神経結紮による NP モデルマウスを作製し、GAT サブタイプである GAT-1 (SLC6A1) に特異的な阻害薬 SKF89976A (SKF) と、Betaine/GABA トランスポーター (BGT-1: SLC6A12) に比較的選択的な阻害薬 NNC 05-2090 (NNC) の抗アロディニア効果を検討した。NNC を脊髄腔内投与または腹腔内投与を行った場合いずれにおいても抗アロディニア効果を認め、一方 SKF の抗アロディニア効果は NNC より弱かった。これらの薬物の、モノアミントランスポーター (MAT) と GAT サブタイプに対する阻害作用について検討するため、GAT および MAT 安定発現細胞株を用いて、トリチウムラベルした基質取込み活性より阻害濃度を解析した。SKF は GAT-1 に対する特異性が非常に高く、NNC は GAT サブタイプの中で BGT-1 の阻害が最も強かった。さらに NNC は各 MAT にも BGT-1 とほぼ同等の阻害作用を示した。以上より、NNC の抗アロディニア効果は BGT-1 と MAT 阻害効果の複合的なものである可能性が示唆された。

P1-133

骨芽細胞における Na,K-ATPase の機能

○山田 淳一¹、出山 義昭²、吉村 善隆²、鈴木 邦明²、八若 保孝¹ (¹北大 院歯 小児・障害者 歯科、²北大 院歯 細胞分子薬理)

Na,K-ATPase は細胞内外の Na⁺ならびに K⁺の維持を行う膜輸送タンパクである。近年、Na,K-ATPase が細胞接着や細胞内情報伝達に関与することが明らかにされている。本研究では、Na,K-ATPase の骨芽細胞における機能を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】 マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 (E1)細胞を通常法により培養し、3日毎に回収した。Na,K-ATPase 活性の測定は Chifflet らの方法により行った。また、Na,K-ATPase の $\alpha 1$ ならびに $\beta 1$ サブユニットのタンパク質発現は Western blot 法により検討した。さらに、Na,K-ATPase の阻害薬である Ouabain を細胞に作用させて、細胞数の変化を検討した。

【結果と考察】 E1 細胞の Na,K-ATPase 活性は confluence 以前において最も高く、confluence を過ぎるとその活性は急激に減少した。Na,K-ATPase $\alpha 1$ サブユニットタンパク質の発現も同様の変化を示した。一方、 $\beta 1$ サブユニットタンパク質の発現はほとんど変化しなかった。さらに培養液中に Ouabain (1~500 μ M) を添加すると濃度依存的に E1 細胞の増殖は抑えられたが、500 μ M においても細胞死は認められなかった。以上の結果から、Na,K-ATPase は骨芽細胞の増殖に関与し、特に $\alpha 1$ サブユニットの発現がその調節に関わっていることが示唆された。

P1-135

ヒト歯肉線維芽細胞内カルシウムイオン調節機構におけるフェニトンの関与

○林 良宣¹、村田 佳織¹、倉重 圭史¹、齊藤 正人¹、谷村 明博² (¹北医大 歯 小児歯科、²北医大 歯 薬理)

【目的】 副作用として歯肉増殖を起こす抗てんかん薬フェニトイン (PHT) の歯肉線維芽細胞の Ca²⁺動態への作用を明らかにした。

【方法】 正常ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) に Ca²⁺蛍光色素 Fura2-AM を導入し、PHT による細胞内 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) の変化を画像解析システムで測定した。

【結果と考察】 HGF に 10~100 μ M の PHT を作用させると、濃度依存的に持続的な [Ca²⁺]_i 上昇が認められた。この作用は可逆的で、PHT の除去によって [Ca²⁺]_i は速やかに低下した。また、PHT による [Ca²⁺]_i 上昇は、細胞外 Ca²⁺非存在下でも認められた。さらに、PHT は Epidermal Growth Factor (EGF) による [Ca²⁺]_i 上昇反応を大きく増強させた。同様に PHT は、ホスホリパーゼ C 活性化剤 m3-M3FBS や小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害剤タプシガルギンによって起こる持続的な [Ca²⁺]_i 上昇に対しても増強作用を示した。小胞体 Ca²⁺-ATPase 阻害によって細胞内 Ca²⁺ストアを枯渇させた HGF において、[Ca²⁺]_i 上昇の増強が起こったことから、この作用に細胞外への Ca²⁺排出阻害が関与する可能性が示唆された。

【結論】 臨床的に用いられる濃度の PHT が、Ca²⁺排出阻害によって生理的反応や病態に関与する Ca²⁺応答を増強する可能性が示唆された。

P1-134

PICK1 は CalcineurinB と結合し破骨細胞分化を促進する

○鎌野 優弥^{1,2}、江草 宏¹、佐伯 万騎男²、大川 博子¹、矢谷 博文¹ (¹阪大 院歯 口腔補綴、²阪大 院歯 薬理)

我々はこれまでに神経細胞株を用いて、NFAT 活性を制御する calcineurin B に結合するタンパク質として PICK1 を見出している。本研究の目的は、PICK1 の破骨細胞分化制御への関与を検討することである。**【方法】** マウス骨髄由来マクロファージ (BMM) を RANKL 刺激下で培養し、PICK1 遺伝子およびタンパク質の発現を real-time RT-PCR および Western blot 法にて検討した。BMMs における PICK1 と calcineurin B の結合を免疫沈降法にて検討した。また、RAW264.7 細胞 (RAW) に PICK1 遺伝子を導入し、破骨細胞分化誘導後の TRAP 陽性多核細胞数を計測した。さらに、NFAT レポーター遺伝子を導入した RAW を用いてテトラサイクリン (Tet) 誘導性 PICK1 遺伝子発現株を作製し、Tet 刺激による NFAT 活性を計測した。また、NFAT レポーター RAW に PICK1 と calcineurin B の結合阻害薬を添加し、NFAT 活性を測定した。**【結果】** PICK1 mRNA およびタンパク質の発現が BMM の破骨細胞分化に伴って増加し、さらに、破骨細胞における PICK1 と calcineurin B の結合が確認された。PICK1 の強制発現によって、TRAP 陽性多核細胞数は有意に増加し、Tet の添加は細胞の NFAT 活性を有意に促進した。PICK1 と calcineurin B の結合阻害薬は細胞の NFAT 活性を有意に抑制した。**【結論】** PICK1 は破骨細胞前駆細胞において calcineurin B に結合し、NFAT シグナリングの活性化を介して破骨細胞分化を促進している可能性が示唆された。

P1-136

還元型コエンザイム Q10 の歯周組織の加齢変化に対する効果について

○米田 俊樹¹、友藤 孝明¹、江國 大輔¹、東 哲司¹、遠藤 康正¹、粕山 健太¹、町田 達哉¹、森田 学¹ (¹岡大 院医歯薬 予防歯)

【目的】 加齢と酸化ストレスとの間に関連性があることが知られている。本研究では抗酸化作用を有する還元型コエンザイム Q10 (rCoQ10) をラット歯肉に塗布し、歯周組織の加齢変化に対する有効性を検討した。**【方法】** 4ヵ月齢の Fischer 雄性ラット 14 匹を、7 匹ずつ、対照群 (単軟膏を塗布) と実験群 (1% の濃度で rCoQ10 を配合した単軟膏を塗布) の 2 群に分けた。軟膏塗布は 1 日 1 回、週 5 回の頻度で行い、2ヵ月間行った。**【結果】** 実験群の血清中の酸化ストレス度は、対照群より有意に低かった (p<0.05)。また、歯肉結合組織のコラーゲン密度について、試験群の値は対照群と比べて有意に大きくなった (p<0.05)。一方、歯槽骨レベル及び多核好中球数は、対照群と実験群との間に有意な差を認めなかった。**【考察】** rCoQ10 には加齢に伴う酸化ストレスを減少させるとともに、歯肉組織のコラーゲンを増加させる効果があることが示唆された。

P1-137

下垂体腺腫における miRNA 発現解析

○小野 信二¹、岩田 武男²、水澤 典子³、吉本 勝彦² (徳大 院 口腔教育 分子薬理、²徳大 院 HBS 分子薬理)

下垂体腺腫は、各下垂体ホルモンの過剰分泌を伴う成長ホルモン (GH) 産生腺腫、プロラクチン (PRL) 産生腺腫、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 産生腺腫およびホルモンの過剰分泌を伴わない非機能性腺腫 (NF 腺腫) に分類されるが、これらの腺腫の発症機序は不明である。miRNA は 20~25 塩基ほどのノンコーディング RNA で、特定の遺伝子発現調節に関わる機能分子である。様々な疾患で特定の miRNA 発現異常が報告されており、特に癌や腫瘍で発現異常をきたす miRNA は癌遺伝子や癌抑制遺伝子としての機能を有すると考えられる。そこで各タイプの下垂体腺腫での miRNA プロファイリングを行い下垂体腺腫発症に関与する miRNA の同定を目的に研究を行った。正常下垂体 8 例、GH 産生腺腫 14 例、PRL 産生腺腫 6 例、ACTH 産生腺腫 13 例、NF 腺腫 20 例の miRNA マイクロアレイ解析を行い、各タイプの腺腫で特徴的な発現が認められる miRNA について qRT-PCR による検証を行った。またそれらの miRNA についてマウスの各組織での発現解析を行った。その結果、脳および下垂体に特異的に発現し、各タイプの腺腫に特徴的な発現を示す miRNA がいくつか得られたので報告する。これらの miRNA はそれぞれのタイプの下垂体腺腫の発症に関与する可能性がある。

P1-139

唾液腺の老性萎縮や老性遺伝子発現変化に及ぼすホエーの効果

○Pieczonka Tomasz¹、Bragiel Aneta¹、石川 康子¹ (徳大 院 HBS 分子薬理)

Physiological aging induces salivary gland atrophy and hypofunctions. Whey, by-product of cheese making, may offer many benefits to humans. We investigated the effect of whey-administration on age-dependent changes of salivary glands. 【方法】 Male Wister rats (3 or 16 mo old) were given laboratory chow and whey or water ad libitum. Two mo later, salivary glands were fixed in formalin. Sections were stained with hematoxylin and eosin. The glands were also processed for RNA isolation. Gene expression profile was studied by using Affymetrix GeneChip array and analyzed by Gene Spring software. 【結果】 Histological analyses showed acinar atrophy in sublingual (SL) glands from senescent but not young rats. These age-dependent changes were found to be reversible after whey-administration. In SL glands from senescent rats, whey-administration induced more than 10-fold increase in the expression of proline-rich protein genes (Prp2, Sgp158) and cystatin S gene (Cyss) and 2-fold decrease in granzyme B gene (Gzmb) compared to water-administration. 【考察】 Whey-administration restores the age-dependent atrophy and gene expression of SL glands. (共同研究者: 株アプロサイエンス 福田佳奈、金智蓮、金敦祚)

P1-138

カテプシン S に依存した抗原提示は神経障害性疼痛の維持に必須である

○張 馨文¹、武 洲¹、林 良憲¹、中西 博¹ (九大 院 歯 口腔機能分子科学)

【目的】 神経障害性疼痛の発症にはミクログリアが重要な役割を果たすことが明らかとなっているが、疼痛の慢性化メカニズムについては不明な点が多い。最近、慢性化における免疫細胞の関与が示唆されている。そこで MHC クラス II 分子の抗原結合に必須なインバリアント鎖切断 (lip10 から CLIP への切断) を担うカテプシン S (CatS) の神経障害性疼痛における役割を解析した。【方法・結果】 脳移行性のない CatS 阻害剤 Z-FL-COCHO (i.p.) は神経障害性疼痛の発症には影響することなく慢性化を有意に抑制した。神経障害に伴って脾臓が肥大し、CD4 陽性 T 細胞ならびに IFN- γ の増大が認められた。一方、CatS 阻害剤を投与したマウスならびに CatS 欠損マウスではこのような変化は認められなかった。また、CatS 欠損マウスでは脾臓には lip10 が蓄積していた。さらに、脾臓摘出マウスでは神経障害性疼痛の慢性化が起こらず、神経障害 14 日目の野生型マウスの脾臓より調整した splenocyte を CatS 欠損マウスに腹腔内投与すると持続的な疼痛が誘発された。【結論】 以上の結果より、神経障害に伴う脾臓における CatS に依存した抗原提示による CD4 陽性 T 細胞の活性化が神経障害性疼痛の慢性化に重要であることが明らかとなった。CatS 阻害剤など免疫抑制剤が神経障害性疼痛の治療に有用であることが示唆される。

P1-140

窒素含有 bisphosphonates (N-BPs) の炎症壊死作用: リン酸 transporter 阻害剤の効果

○山本 朋美^{1,2}、岡田 諭^{1,3}、佐藤 衣莉¹、佐々木 啓一²、菅原 俊二¹、遠藤 康男¹ (東北大院 歯 口腔分子制御、²東北大院 歯 口腔システム補綴、³東北大院 歯 顎顔面外科)

【背景】 N-BPs は顎骨壊死のリスクをもつ。N-BPs は軟組織細胞にも取り込まれ、細胞毒性を示すが、その細胞内取り込み機序は不明だった。当教室の岡田はリン酸 transporter (Pi-TP) 阻害剤 phosphonoformate (PFA) が、zoledronate (骨吸収抑制作用と顎骨壊死発症リスク最強の N-BP) のマウスでの炎症壊死作用を抑制することを発見し、その細胞内取り込みに Pi-TP の関与を示唆した。Minodronate は 2009 年発売の本邦開発 N-BP である。私達のマウス実験では、その炎症壊死作用は zoledronate 以上であり、non-N-BP の clodronate はこれを抑制する。今回は N-BPs の細胞内取り込みへの Pi-TP 関与の普遍性を検証するため、3 種類の N-BPs (minodronate, zoledronate, alendronate) について、PFA とその関連物質の効果を比較した。【結果】 (i) マウス耳介での炎症壊死を指標にした実験で、いずれの N-BPs に対しても、PFA および PFA 構造類似の PAA, PPA, PBA は抑制効果を示し、その効果は PAA > PFA > PPA > PBA であった。(ii) Radio-isotope 標識 alendronate の耳介組織への貯留を PFA と clodronate は減少した。【考察】 上記結果は、N-BPs の軟組織細胞への取り込みには、いずれの場合も Pi-TP が関与し、この取り込みを non-N-BP の clodronate は抑制するとの考えを支持し、また、顎骨壊死の予防・治療に clodronate と N-BP の併用の有効性が期待される。

P1-141

骨芽細胞様細胞におけるずり応力による細胞内カルシウム濃度の上昇にグルタミン酸が関与する
○土屋 範果^{1,2}、兒玉 大介¹、後藤 滋巳²、戸苅 彰史¹ (1愛院大 院歯 薬理、2愛院大 院歯 矯正)

【目的】マウス頭蓋骨由来骨芽細胞様細胞 (以下 MC3T3-E1 細胞) において機械刺激による細胞内カルシウム濃度 (以下 $[Ca^{2+}]_i$) 上昇や ATP やグルタミン酸 (以下 Glu) などの伝達物質放出が報告されている。しかし、その詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、機械刺激伝達における伝達物質放出の役割について調べた。【試料および方法】MC3T3-E1 細胞に機械刺激 (ずり応力) を与えた際の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いた Ca^{2+} イメージング法により測定した。【結果および考察】機械刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は、細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を阻害する 2-APB や U73122 の作用により有意に抑制された。また、伝達物質の放出を阻害する monensin や brefeldin によっても抑制された事により、機械刺激により放出された伝達物質が細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を起す事が示唆された。次に、放出される伝達物質について検討した。機械刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇は ATP 受容体阻害薬によって変化が認められなかったが、Glu 受容体阻害薬によって抑制された。これにより機械刺激による $[Ca^{2+}]_i$ の上昇には、Glu が関与している事が示唆された。【結論】機械刺激を受容した骨芽細胞は Glu を放出し、放出された Glu が自己の細胞に作用する事により $[Ca^{2+}]_i$ の上昇が起こる。

P1-143

放射線粘膜炎に対する DMX シートの効果
○四宮 敬史¹、吉川 正信^{1,2}、川口 充¹、奥村 重年³、大久保 みぎわ¹ (1東歯大 薬理、2東海大 医 臨床薬理、3ロート製薬 (株))

【目的】頭頸部放射線治療においては、口腔粘膜の障害と唾液腺に起因した唾液分泌機能低下による患者の QOL 低下が問題となっている。本研究では口腔湿潤作用ならびに創傷治癒効果が報告されているサケ白子プロタミン分解ペプチド配合の DMX シート (ロート製薬株式会社) を用いて、放射線照射により生じた潰瘍ならびに唾液分泌減少に対しての DMX シートの効果を調べた。【方法】9 週齢雌性 C3H/HeN マウスを用いて、放射線非照射群、放射線照射群 (DMX シート非貼付群、DMX シート貼付群) にグループ分けした。放射線照射 (実効線量 6 Gy、6.25 Gy、6.5 Gy ならびに 7 Gy) を 5 日間行い、照射 6 日目から 10 日目まで 1 日 1 回、DMX シートを硬口蓋部に貼付し、上皮厚計測と口腔水分計ムース (株式会社ライフ) による口腔水分量計測を行った。【結果】放射線照射群において上皮厚は減少したが、DMX シート貼付群では非貼付群に比べて照射 10 日後での上皮厚が大きかった。口腔水分量は放射線非照射群では放射線照射群と比較して有意な減少が認められ、放射線照射 7 日後に急激に減少したが、DMX シート貼付群では非貼付群と比較して照射 8 日後から 10 日後にかけて口腔水分量の有意な増加が認められた。【考察】これらの結果から、DMX シートは上皮厚減少ならびに放射線性唾液腺障害による唾液分泌減少に対して効果があり、プロタミン分解ペプチドによる口腔粘膜に対する治癒効果ならびに口腔湿潤作用によることが示唆された。

P1-142

RANKL 結合ペプチドの軟骨細胞分化促進と軟骨破壊抑制作用
○菅森 泰隆¹、加藤 玄樹¹、田村 幸彦¹、大谷 啓一¹、青木 和広¹ (1東歯大 院歯 硬組織薬理)

<目的> 腫瘍壊死因子 1 型受容体模倣ペプチドである W9、およびオステオプロテグリン模倣ペプチドである OP3-4 は、共に RANKL に結合し骨吸収抑制作用を示す。また、W9 は骨芽細胞上の RANKL に結合し、骨形成を促進する可能性が示されている。一方、軟骨細胞に RANKL が発現することから、本実験では、RANKL 結合ペプチドが軟骨細胞分化に影響を与えるか否か検討した。

<方法> 軟骨細胞の増殖評価を ATDC5 を用いて行った。50 μ M、100 μ M、200 μ M の濃度で OP3-4 を添加。72 時間後に生細胞数の測定を行った。また、W9 および OP3-4 を添加後 14 日目に Alcian blue 染色による分化評価を行った。また、コラーゲン誘導関節炎 (CIA) モデルを用い、4 mg/kg/day の W9、9 mg/kg/day および 18 mg/kg/day の OP3-4 を浸透圧ポンプにより皮下投与し組織学的解析を行った。

<結果> 50 μ M 以上の OP3-4 添加により軟骨細胞の生細胞数が有意に増加した。OP3-4 濃度依存的に Alcian blue 陽性面積の増加が認められたが、W9 よりその増加作用は低かった。CIA モデルを用いた検討では、W9 および OP3-4 による軟骨破壊像の抑制が認められた。

<結論> RANKL 結合ペプチドは、軟骨細胞の分化促進作用と CIA モデルにおける軟骨破壊抑制作用を示した。骨形成活性が W9 より強い OP3-4 の方が軟骨に対する作用は弱かったことから、RANKL 結合ペプチドの軟骨に対する作用が RANKL 依存的な作用か否か、今後検討する予定である。

(この研究は下川仁彌太、高橋真理子 (両名ともに東京医科歯科大学) の協力をいただきました。)

P1-144

Na,K-ATPase 活性及びそのリン酸化反応中間体量に対するフッ素の作用
○沖野 雄一郎¹、出山 義昭²、吉村 善隆²、鈴木 邦明² (1北大 院歯 予防歯、2北大 院歯 細胞分子薬理)

【目的】フッ化物 (F) は腐蝕防止に広く応用されているが、急性・慢性毒性が制限要素となり応用の範囲が限定されている。Na,K-ATPase は細胞内外の Na と K の濃度勾配の形成・維持を行う酵素である。この酵素が F の毒性のターゲットとなりうると推測し、ATPase 活性及びリン酸化反応中間体 (EP) 形成に及ぼす F の作用を検討した。【方法】活性はラット脳由来の精製 Na,K-ATPase を用い、ATP 加水分解により生じた無機リンを Chifflet 法で定量し測定した。EP 形成量は ATPase を使い、³²P-ATP を用いて形成した ³²P-EP 量を測定した。各種濃度の F と AlCl₃ を添加し活性と EP 形成量に対する影響を調べた。【結果と考察】Na,K-ATPase 活性は F 濃度に依存して阻害された。50% 阻害濃度は約 1.4 mM で、最終濃度 5 mM ではほぼ 100% の活性が抑制された。Al 存在下では非存在下と同様に濃度に依存して酵素活性は低下し、Al 非存在下と比較してより低濃度の F で活性が抑制された。EP 形成量も F 濃度に依存し阻害されたが、完全には抑制しなかった。Al 存在下では EP 形成抑制が増強されたが、約 50% しか形成阻害されなかった。以上より Na,K-ATPase 活性抑制の濃度依存性と EP 形成抑制における F の濃度依存性が一致したことから、F は EP 形成を抑制することにより Na,K-ATPase 活性を抑制することが示唆された。また EP 形成量が約半分しか阻害されないことから Na,K-ATPase における half of the site reactivity の存在も示唆された。

P1-145

口腔癌で明らかになった keratin13 遺伝子のエピジェネティック変異

○永沼 香織^{1,2}、八田 光世²、大久保 つや子²、山崎 純² (福歯大 口腔顎顔面外科、²福歯大 細胞分子生物)

【目的】細胞骨格タンパク質である keratin13 (KRT13) は、口腔上皮の癌化さらに癌の悪性度に関連して発現抑制が認められるとの報告が多数あり、口腔癌の診断や病態の指標に有用と考えられている。本研究は口腔癌での KRT13 発現抑制に関わるエピジェネティック変異の解明を目的として KRT13 遺伝子領域のクロマチン修飾の解析を行った。【方法】正常上皮細胞 (HaCaT) 及び舌癌細胞 (高分化型: HSC4、低分化型: HSC3、SAS) を用いて、KRT13 mRNA 発現レベルを qPCR にて比較検討した。さらに KRT13 遺伝子プロモーター領域の CpG 部位のメチル化をパイサルファイト・シーケンス法、ヒストン修飾をクロマチン免疫沈降法にて解析した。【結果と結論】KRT13 mRNA の発現は HaCaT と HSC4 に比べて、HSC3 と SAS において著しく抑制されていた。KRT13 遺伝子プロモーター領域において CpG 部位はこれらの舌癌細胞において高度にメチル化されていた。一方、ヒストン修飾に関しては HSC3 と SAS において H3K4 トリメチル化の低下及び H3K27 トリメチル化の増加が確認された。これらの結果から、KRT13 遺伝子は低分化型舌癌細胞においてヒストン H3K4 及び K27 メチル化修飾を介したエピジェネティック変異により抑制されることが明らかになった。さらに、これらのメチル化修飾パターンの決定に重要な役割を担っているエピジェネティック酵素複合体 PRC2 (Polycomb repressive complex 2) の制御異常が関与している可能性が示唆された。

P1-147

顎顔面感覚入力に応答するウサギ視床ニューロン活動の電気生理学的検討

○鈴木 崇弘¹、若森 実²、田端 孝義¹、坪井 明人^{1,3} (東北大院歯 加齢歯科、²東北大院歯 歯科薬理、³東北メディカル・メガバンク機構)

【目的】顎口腔領域の感覚情報は、視床での情報処理後、大脳皮質に投射されて運動感覚を自覚する一方、下顎運動の制御にも関与していることが推察される。これら口腔顎顔面部の知覚は、三叉神経系を介して視床の後内側腹側核 (VPM) に達することが組織学的研究により明らかにされている。本研究の目的は、顎顔面領域の感覚情報が入力される視床ニューロンの電気生理学的特性を検討することである。【方法】実験にはウサギ (日本白色種、メス) を用いた。α-クロラロース・ウレタンにて麻酔した。視床 VPM に金属微小電極を刺入し、神経活動を記録した。記録後、屠殺した動物から脳を摘出し、組織学的に記録部位を同定した。【結果】ウサギ 26 羽より、266 個のニューロン活動を記録した。これらのニューロンは、Bregma より後方 3~5 mm、正中より外側 3.5~5 mm、大脳皮質表面より深さ 8~12 mm の範囲に位置していた。178 ニューロンは、前歯、白歯、頬粘膜などの口腔内への刺激に、29 ニューロンは、ヒゲ、顔面皮膚、口唇などの口腔外への刺激に応答した。また、口腔内刺激に応答するニューロン活動は口腔外刺激に応答するものよりも内側から記録された。一方、開口運動、噛みしめ運動など下顎運動に関連する刺激により 51 ニューロンが応答した。記録されたニューロンの 45% が速順応性だった。【結論】下顎運動の制御に関与する深部感覚情報は視床 VPM へ投射され、変調されることが示唆された。

P1-146

食塩感受性および非感受性高血圧診断用バイオマーカーとしての唾液中のイオンチャンネル

○Bragiel Aneta¹、Pieczonka Tomasz¹、石川 康子¹ (徳大院 HBS 分子薬理)

Aquaporin-5 (AQP5) and lipid rafts were identified in saliva. We showed that changes in saliva AQP5 levels can be used as an indicator of xerostomia. In this study, we investigated salivary ion channels in relation with hypertension. Wistar, spontaneously hypertensive rats/Izumo strain (SHR/Izm), Wistar Kyoto rats/Izumo strain (WKY/Izm), Dahl-Iwai salt-sensitive rats (Dahl-Iwai S) and salt-resistant (Dahl-Iwai R) rats were used. Rats were given NaCl solution or water to drink for 1 week. Western-blotting was used to analyse: sodium channel (ENaC and CFTR), chloride channel (CLC-Ca, CLC2 and CLC3), potassium channel (Kca), calcium channel (TRPV2) and water channel (AQP5) in saliva. ENaC, CFTR, CLC-Ca, CLC2, CLC-3, Kca, and TRPV2 have been identified in saliva from these rats. 0.5% NaCl decreased the level of salivary ENaC in Wistar, WKY/Izm, Dahl-Iwai R and Dahl-Iwai S rats but not in SHR/Izm rats. While, 0.5% NaCl decreased the level of salivary CLC-Ca in Wistar, WKY/Izm and Dahl-Iwai R rats but not in SHR/Izm and Dahl-Iwai S rats. These results suggest that salivary ENaC and CLC-Ca concentration may be useful tool to diagnose the salt-sensitive or salt-insensitive hypertension.

P1-148

Poxn 発現味覚ニューロンのショウジョウバエ摂食行動における機能

○古山 昭¹、大須賀 謙二¹、宗形 芳英¹ (奥羽大 歯 口腔機能分子生物)

Pox neuro (Poxn) 遺伝子はショウジョウバエ末梢神経および中枢神経系の発生において重要な機能を果たす。末梢の *Poxn* ニューロンは味覚受容器であり、*Poxn* 発現ニューロンは味覚受容機能を持つと信じられている。一方、*Poxn* 発現脳ニューロンの味覚情報処理への関与は十分に検討されていない。末梢および中枢の *Poxn* 発現ニューロンの摂食行動における機能を明らかにするために、我々は遺伝子操作により *Poxn* 発現ニューロンを特異的に破壊あるいは興奮抑制したショウジョウバエを用いて、摂食行動の諸過程がいかなる影響を受けているかを調べた。末梢と中枢の *Poxn* 発現ニューロンの機能を共に抑制した場合、摂食行動最初期の反射過程および、二瓶法における濃度識別能力に障害が見いだされた。脳における *poxn* 発現ニューロンのみ機能を回復させると、吻伸反射は依然として機能が低下していたが、ウェーバー比 33% 程度の濃度差では濃度識別は回復した。

P1-149

mGluR4 ノックアウトマウスの鼓索神経および舌咽神経におけるうま味受容体の機能解析
 ○安松 啓子¹、重村 憲徳¹、二ノ宮 裕三¹ (九大 院歯 口腔機能解析)

【目的】うま味受容体として mGluR4、T1R1 + T1R3、mGluR1 などが提唱されているが、神経レベルでのこれらの受容体の機能証明はまだまだ不十分で、特に舌咽神経における機能は未解明である。本研究では mGluR4-KO マウスのグルタミン酸応答について各受容体アンタゴニストを用い検討した。【方法】動物は mGluR4-KO 及び野生型マウスを用い、鼓索神経と舌咽神経の全神経線維束におけるうま味応答を記録した。その際受容体アンタゴニスト AIDA (group I mGluRs)、CPPG (group III mGluRs)、D-AP5 (NMDA 受容体)、NBQX (kainic acid 受容体と AMPA 受容体)、グルタミン (T1R1 + T1R3) を用いた。【結果と考察】mGluR4-KO マウスの鼓索と舌咽神経両方において、野生型に比べ MPG 応答が有意に減少した。KO マウスにおける残存グルタミン酸応答は、鼓索神経では AIDA、舌咽神経では AIDA と D-AP5 によって有意に抑制された。これらの結果から、野生型マウスの舌の鼓索神経領域では T1R1 + T1R3、mGluR1、mGluR4、舌咽神経領域では mGluR1、mGluR4、NMDA 受容体がグルタミン酸を受容する可能性が示唆された。非会員共同研究者：真鍋智宏、高橋一郎、岩槻健、畝山寿之

P1-150

混合味溶液の味質強度とおいしさをヒトはどう判断するか？
 ○片川 吉尚¹、安尾 敏明²、諏訪部 武²、玄景華¹、碓 哲崇² (朝日大 歯 口腔病態医療障害者歯科、²朝日大 歯 口腔機能修復 口腔生理)

混合味溶液の味質強度やおいしさが各コンポーネント単体の場合とどう異なるかを、同意を得た男性 (30 名) に対して gLMS 法 (Green ら; 1993) および LHS 法 (Lim ら; 2009) を用いて検討し、先行研究 (Bartoshuk; 1975, Frank & Archambo; 1986 など) と比較した。サッカリンナトリウム (Sacc; 0.3 mM-10 mM)、食塩 (Na; 0.03 M-1.0 M) および塩酸キニーネ (Q; 0.1 mM-0.3 mM) の味質強度とおいしさを評価させた後、5 mM Sacc と Na または Q の各濃度との混合溶液に対するものも評価させた。その結果、0.3 M Na と 5 mM Sacc の混合物の塩味強度は、Na 単体のものよりも有意に低かった ($p < 0.05$; Newman-Keuls 法)。おいしさは、混合物に対するものが Na 単体に対するものよりも有意に高かった ($p < 0.05$)。Q と 5 mM Sacc を混合した場合、Q 単体の苦味強度は、混合物のものよりも全濃度において有意に高く ($p < 0.001$)、おいしさでは、Q 単体のものは、混合物のものよりも有意に低かった ($p < 0.001$)。本研究の結果は、単体味溶液に味質の異なる溶液を混合すると各コンポーネントに対する味質強度が低下し、先行研究と類似の結果となった。また、おいしさは味溶液の混合により変化することを明らかにした。

P1-151

無顆粒島皮質における fast-spiking 細胞の軸索投射様式
 ○福田 理美¹、小林 真之¹、越川 憲明¹ (九大 院歯 薬理)

【緒言】島皮質は、味覚嫌悪学習など神経可塑性の制御に重要な役割を担っている。我々は、抑制性回路の中心的役割を果たす parvalbumin 陽性細胞の密度が高い領域と低い領域が無顆粒島皮質において隣接して存在することを明らかにしてきた (Chen et al., 2010)。このような特殊な抑制性神経回路の存在は、島皮質が独自の情報処理機構を持つことを示唆している。【目的】今回我々は、parvalbumin 陽性細胞と考えられる fast-spiking (FS) 細胞から whole-cell patch-clamp 記録を行い biocytin を注入することで、記録細胞の形態学的特徴を明らかにした。【結果・考察】無顆粒島皮質の parvalbumin 陽性細胞の密度が低い領域にある FS 細胞は、比較的広範囲に軸索が伸展しており、軸索密度も疎であるものが多かった。一方、無顆粒島皮質 V 層深部の parvalbumin 陽性細胞が高密度に分布する領域に存在する FS 細胞では、周辺細胞に対する高密度の軸索投射が観察された。興味深いことに、その軸索投射のほとんどは、V 層深部に局限しており、隣接する III 層への投射は極めて少なかった。V 層深部には皮質外へ投射する興奮性細胞が多く存在することから、この領域の FS 細胞は島皮質からの興奮性出力を強力かつ特異的に抑制する働きがあると推察される。

P1-152

CCK のマウス鼓索神経活動に及ぼす影響
 ○八坂 美沙¹、安松 啓子¹、仁木 麻由¹、重村 憲徳¹、二ノ宮 裕三¹ (九大 院歯 口腔機能解析)

コレシストキニン (CCK) は消化管ホルモンのひとつである。CCK の受容体には CCK-A、CCK-B 受容体の二種類が存在し、機能としては胆嚢収縮や膵酵素分泌を促すことが知られている。近年、味覚において様々な消化管ホルモンの発現報告がなされている。CCK も味細胞での発現が報告されており、味細胞・味神経間での modulator として機能している可能性が示唆されている。そこで、本研究では C57BL/6 マウスの膝神経節における CCK、CCK-A、CCK-B の遺伝子発現を調べた。次に CCK の静脈内投与によるマウス鼓索神経活動の変化を調べた。さらに、CCK-AR 遺伝子ノックアウト (KO) マウス、CCK-BKO マウス、野生型マウスを用いて鼓索神経全神経線維束における応答を記録した。その結果、RT-PCR 法により、膝神経節における CCK、CCK-A、CCK-B の発現が認められた。味神経応答解析により、CCK のマウス静脈内投与によって CCK が鼓索神経活動を引き起こしていることがわかったが、野生型マウスに比べて CCK-ARKO マウスでは苦味応答が減少し、CCK-BRKO マウスでは明らかな減少は認められなかった。以上の結果から CCK は味覚の modulator として働いている可能性が示唆された。(非学会員共同研究者：瀧口総一、中村誠司)

P1-153

閉口筋運動ニューロンに対する興奮性シナプス伝達のゲート機構に関与する TASK3 電流の発現系における解析

○田中 千恵^{1,2}、齋藤 充¹、佐藤 元¹、豊田 博紀¹、姜 英男¹ (¹阪大 院歯 口腔生理、²阪大院歯 第二補綴)

漏洩 K⁺電流は興奮性細胞の静止膜電位や入力抵抗を支配的に決定している。ニューロンにおいては、TASK1/3 チャネルが漏洩 K⁺電流を担っている。我々は、免疫組織学的手法により、三叉神経運動ニューロン (TMN) の細胞体及び樹状突起に、TASK1 及び TASK3 がそれぞれ主に発現していることを明らかにした。閉口筋等尺性収縮時には TMN の入力抵抗依存的に運動単位の序列動員が生じることから、TASK1/3 チャネル活動が運動単位の序列動員様式を決定している可能性が高い。我々は、一酸化窒素-cGMP-蛋白キナーゼ G (PKG) 系の活性化によって TASK1 が活性化されることを HEK 細胞の発現系で既に明らかにしている。ホールセル電流固定下の TMN では、cGMP 投与により入力抵抗は低下するが、EPSP の振幅は増加した。このことは、cGMP 投与により樹状突起局所の TASK3 が抑制され入力抵抗が上昇した可能性を示す。そこで、cGMP が TASK3 をどの様に修飾するかを明らかにするため、TASK3 を HEK293・COS-7・CHO 等の株細胞へ導入した。TASK3 を発現させた細胞は培養中あるいは記録時に人工脳脊髄液へ浸漬した際に崩壊した。そこで、Xenopus oocyte に TASK3 を導入したところ、安定的に発現させることができたが、cGMP による TASK3 電流の修飾は観察されなかった。これは、同細胞における PKG の発現量が細胞容積に比して小さいためであると考えられる。そのため、更に本実験に適した他の発現系を検索中である。

P1-155

嗅覚訓練マウスを用いた Dimethyl Sulfide に対する 3,7-dimethyl terpene 類の嗅覚マスキング作用の確認

○長田 和実¹ (¹北医大 歯 口腔生物 生理)

【目的】本研究では Y 字型迷路 (Y-maze) を用いたマウスの嗅覚訓練パラダイムを用い、口臭の原因成分の 1 つである dimethyl sulfide (DS) に対する芳香物質の嗅覚マスキング作用の評価を試みた。【方法】実験動物はにおいセンサーマウス (♀; n=6) として C57BL/6j を用いた。DS マスキング成分 (masker) としてシトロネラル (CN)、リモネン (LM)、シトラール (CR) を用いた。Y-maze の左右両側腕の先端より、絶水マウスに対して 10 ppm DS 溶液およびその溶媒のみのおいと同時に提示し、正しいにおいを選択した場合、報酬として一滴の水を与える。左右両側腕のにおいを何回も入れ替え、繰り返し実験し、マウスは DS の匂いを識別していることを確かめる。次に DS および様々な濃度の masker を同時に提示し、マウスが DS を識別不能となる masker の濃度を確かめ、各 masker の嗅覚マスキング強度を測定した。【結果と考察】1) 匂い嗅ぎマウスは DS に関しては odor cue が 100 分の 1 になると識別しなくなる。2) 10 ppm の DS の匂いを識別できるマウスは、テルペン類の共存で識別が出来なくなる。3) モノテルペンのマスキング作用は濃度依存的であり、CN が最も活性が高かった。本法を応用することにより、様々な化学物質のマスキング作用を定量的に、且つ個体レベルで評価出来る可能性が示された。

P1-154

ストレス負荷卵巣摘出マウスにおいて、KCC2 の発現減少による GABA 系の脱抑制が生じている可能性。そして、17 α -エストラジオールによる改善

○塚原 飛央¹、増原 正明¹、菌村 貴弘²、植村 正憲¹、佐藤 友昭¹ (¹鹿大 院医歯 歯科薬理、²鹿大 院医歯 歯科機能形態)

ストレスは、各種神経系に影響を与えるが、GABA 系に対する障害機序の報告は少ない。そこで、卵巣摘出マウス (OVX) の行動評価と GABA 系に与える影響を高架十字迷路試験 (EPM) 等の行動試験と免疫組織学的手法を用い、海馬 CA3 領域において検討した。ストレス負荷群 (OVX/S) は、ストレス非負荷群 (OVX/nonS) に比べ、EPM における open arm 滞在時間 (OAT) が増加し、GAD と GABA (A)-R 発現は増加した。一方、KCC2 (K-Cl-cotransporter) の発現は減少した。また、GABA (A)-R 作用薬であるジアゼパム (DZ) 投与時では、OVX/S 群においては、DZ 非投与時に比べ OAT は減少傾向があり、OVX/nonS 群においては、非投与時に比べ、OAT の増加が認められた。更に、これらストレスに対する行動変化の改善作用を検討するため、17 α (E2) 及び β E2 を投与すると、強制水泳試験では、 α E2 は β E2 よりも OVX/S 群の無動時間の減少と KCC2 発現の増加を生じた。これらにより、ストレス負荷は OVX マウスにおいて、KCC2 減少による GABA 系の脱抑制を引き起こし、高架十字迷路等において行動変化を生じる。その変化は、抗不安薬の奏功不定の一因になると考えられた。また、このような状態においては、17 α E2 投与が効果的であることが示唆された。

P1-156

脳血流動態における三叉一副交感神経性血管拡張反応の役割とそれらの GABA 入力による機能修飾機構

○石井 久淑¹、佐藤 寿哉¹ (¹北医大 歯 生理)

【目的】顎・顔面領域には副交感神経性血管拡張線維が存在し、三叉神経入力によるこれら線維の活性化は同領域に顕著な血流増加を誘発する。また、この反射性血流増加反応は脳幹の GABA 入力によって影響を受けることも近年明らかにされている。副交感神経線維は脳血管にも豊富に分布し、これらの線維の活性化は脳血流動態の調節に関与することが示唆されている。しかしながら、反射性血管拡張反応による脳血流調節については明らかにされていない。本研究は三叉一副交感神経性血管拡張反応の 1) 脳血流動態における役割と 2) GABA 入力による機能修飾機構を明らかにすることを目的とし、舌神経の求心性刺激或いは諸種の薬物が局所脳血流 (rCBF) に及ぼす影響を検討した。【方法】麻酔したラットの rCBF は 2 次元血流計を用いてイメージング解析した。舌神経は中枢性に電気刺激した。両側の頸部交感神経幹と迷走神経は頸部で切断し、これらの影響を完全に除去した。【結果と考察】rCBF は舌神経の単独刺激では有意な変化を示さなかったが、GABA_A 受容体抑制薬であるベンチレンテトラゾール投与を組み合わせた舌神経刺激で顕著に増加した。この rCBF 増加はヘキサメソニウム及びアトロピンの投与で有意に抑制された。したがって、三叉一副交感神経性血管拡張反応は脳血流増加に関与しており、この血流増加反応は中枢の GABA 入力により制御されていることが示唆される。

P1-157

顎-頸協調運動が開口反応時間におよぼす影響
○宗形 芳英¹、大須賀 謙二¹、古山 昭¹ (奥羽大 歯 口腔生理)

【目的】光刺激に対する開口反応時間を測定すると、多くの被験者で、同刺激による指屈曲反応時間から想定されるよりも延長する結果が得られる。今回、その原因として開口運動に協調する頭頸部後屈運動の影響を検討した。【方法】顎口腔および手指に特記すべき既往歴がなく、本実験の意義を十分に理解して協力を得ることができた健康成人 15 名を被験者とした。光刺激に対して素早く開口するように指示し、開口動作に協調して発現する頭部運動と開口運動を同時に測定した。さらに、頭部をヘッドレストに固定させた条件下でも同様に測定し頭部固定の影響を検討した。【結果・考察】すべての被験者で頭頸部後屈の反応運動が開口反応運動に先行して出現した。開口反応時間と頭頸部後屈開始時間との差は、開口反応時間が長い被験者ほど大きく、両者の間で有意な相関関係が認められた。頭部を固定した場合には、ほとんどの被験者で開口反応時間が短縮し有意な差が認められた。さらに、開口反応時間が長い被験者ほど大きく短縮する傾向があった。以上の結果から、開口反応時間がその神経経路から想定される時間よりも延長する一つの原因として、開口運動に協調する頭頸部後屈運動の影響が確かめられた。

P1-158

咀嚼と食行動に及ぼす桂花の香り
○山本 隆¹ (畿央大 健康科学 健康栄養)

心地よい香りの中に摂食抑制効果を示すものがあるかどうかを探索することが目的である。食事に際しての飲み物等の香り 6 種類の中からスクリーニングし、桂花 (キンモクセイ) とミルクの香りを選び実験を行った。ウイスター系雄性ラットにそれぞれの香りを 15 分間嗅がせた後、視床下部の摂食促進ペプチドと摂食抑制ペプチドの mRNA の活性を RT-PCR 法にて測定した。香りを慢性的に提示し、摂食量、体重を測定した。また、急性的に提示し、摂食パターンをビデオ撮影し、咀嚼筋 EMG 活動を記録し、分析した。ラットに桂花の香りを嗅がせた群、ミルクの香りを嗅がせた群、香りを嗅がせなかった群について、60 分後の摂食促進ペプチド (AgRP, MCH, NPY, prepro-orexin) と摂食抑制ペプチド (CART, POMC) の mRNA 活動を測定した結果、桂花の香りで、すべての摂食促進ペプチドの活性が低下し、食欲抑制物質の活性は上昇した。ミルク群ではほぼその逆の効果となった。嗅覚脱失によりこのような効果は消失した。各群について、長期的に香りを提示し、餌の摂取量、体重を測定すると、桂花群は餌の摂取量の減少、体重の減少が認められた。桂花の香りは嗅覚情報として視床下部に送られ、摂食促進ペプチドが減少し、摂食抑制ペプチドが増加したことにより結果的に体重が減少したと考えられる。[謝辞] この研究は、阪大人間科学研究科の乾 賢先生、阪大学歯学研究科の辻 忠孝先生との共同研究である。

P1-159

味覚中継核刺激によって誘発される島皮質での興奮伝播に対する嗅球刺激の効果
○溝口 尚子^{1,2}、小林 真之²、村本 和世¹ (明海大 歯 生理、²日大 歯 薬理)

味覚の情報処理には、嗅覚系からの入力が多く関与する。最近、島皮質には味覚のみならず嗅覚情報も入力することが明らかになってきた。しかし、その統合機構については不明な点が多い。そこで本研究は、味覚中継核である視床腹内側核 (VPMpc) の電気刺激によって誘発される島皮質での興奮伝播が嗅球 (OB) の電気刺激のタイミングによってどのように変化するか明らかにすることを目的として、ラット *in vivo* 標本を用いた光学計測による実験を行った。VPMpc を電気刺激 (50 Hz, 5 回刺激) すると、中大脳動脈に近接して左右の不全顆粒島皮質 (DI) およびその周辺皮質に興奮伝播が観察された。一方、OB 腹側表層を電気刺激したところ、島皮質腹側に位置する梨状皮質および無顆粒島皮質 (AI) に応答が認められた。VPMpc と OB をそれぞれ単独刺激した場合、興奮が伝播した領域に重なりはほとんど認められなかった。一方、同一個体で VPMpc と OB を同時刺激すると、AI において応答変化率に有意な増加が認められた。また、DI と PC では最大応答部位の振幅に有意な変化を認めなかった。これらの結果は、味覚と嗅覚の統合部位の一部は AI で行われていることを示唆している。

P1-160

カプサイシン受容体 TRPV1 の遺伝子多型と口腔痛み感覚
○吉住 潤子¹、宇都宮 怜子²、合島 怜央奈^{2,3}、木附 智子^{1,2}、城戸 瑞穂² (¹九大 院歯 顔面口腔外科、²九大 院歯 口腔解剖、³佐賀大 医歯科口腔外科)

【目的】痛みは、熱や機械的な刺激あるいは化学的な刺激などの多様な刺激により侵害受容ニューロンが活性化することにより惹起されると考えられている。痛みを惹起する化学的な刺激の一つとして、古くより唐辛子の辛味成分であるカプサイシンが知られているが、辛味の多様な感受性について明らかになったとは言えない。私たちは、カプサイシン受容体の TRPV1 (transient receptor potential channel vanilloid 1) の遺伝子多型 (SNP) に着目し、カプサイシン・温度感受性との関係を明らかにすることを目的として研究を行った。【方法】実験は九大臨床試験倫理審査委員会の承認を受け実施した。頬粘膜擦過により健康日本人 300 名よりゲノム DNA を抽出し、SNP 解析を行った。さらに、カプサイシンの辛味感知閾値、および冷・温覚閾値を測定した。【結果および考察】TRPV1 の SNP rs8065080 SNP (C>T) は、口腔へのカプサイシン刺激による辛味感受閾値および VAS 値に有意な差を認めた。温度については、有意な差は認められなかった。また、辛味の嗜好とは明らかな関連は認められなかった。TRPV1 の遺伝子型の差が辛味の感受性と関連を示したことから口腔の痛みにも影響することが考えられた。

P1-161

GLP-1 受容体欠損マウスにおける選択的甘味抑制について

○岩田 周介¹、安松 啓子¹、高井 信吾¹、重村 憲徳¹、二ノ宮 裕三¹ (¹九大 院歯 口腔機能解析)

Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) は腸管内分泌細胞 L 細胞から分泌されるインクレチンであり、近年 L 細胞が味覚 G タンパク質である α -gustducin と甘味・うま味受容体コンポーネント T1R3 を発現し、甘味刺激によって GLP-1 を分泌することが示唆されている。さらに GLP-1 の KO マウスの行動応答では甘味に対する感受性が低下しているという報告があるが、用いた味物質種は限定的であり、かつ味神経応答についての報告はまだない。GLP-1 の味覚修飾作用を検討するため、本研究では GLP-1rKO マウス、及び野生型マウス (C57BL/6) を用い、鼓索神経と舌咽神経の全神経線維束応答を記録した。また、甘味 (スクロース、サッカリン、D-フェニルアラニン、グルコース)、苦味 (キニーネ)、塩味 (NaCl)、酸味 (HCl)、旨味 (MSG + 1 mM IMP + 100 μ M アミロライド) の行動応答を 10 秒間リック測定法で解析した。その結果、GLP-1rKO マウスでは、野生型マウスに比べ、鼓索神経ではショ糖、サッカリン、SC45647、グルコース、MPG + IMP、舌咽神経においてはショ糖、SC45647、D-アミノ酸に対する応答が有意に減少した。また 10 秒間リック測定法では用いた全ての甘味物質に対するリック数の有意な減少が認められた。このことから、GLP-1 シグナリングが甘味感受性の維持あるいは増強に関与することが示唆された。

P1-163

覚醒サル一次体性感覚野ニューロンの熱刺激に対する応答特性

○海野 俊平¹、岩田 幸一¹ (¹日大 歯 生理)

一次体性感覚野 (S1) ニューロンの熱受容に対する役割を明らかにするために、2 頭のニホンザルの顔面皮膚に熱刺激強度弁別課題を訓練し、課題遂行中の S1 単一ニューロンの活動を記録した。サルの口髭部に設置した温度刺激用プローブより温度刺激を与えた。サルがボタンを押すとプローブ温度が 35°C から 45-47°C に上昇する (T1 期間)。ボタンを押し続けると温度がさらに 0.2-0.8°C 上昇し (T2 期間)、サルがこの温度変化を検出し 3 秒以内にボタンを離せば報酬としてジュースが与えられる。サルがこの課題を行わせると、T1 期間の温度が高いほど正答率は向上し、反応時間は短縮した。訓練完成後、サル S1 より課題遂行中の単一ニューロン活動を記録した。一部の S1 ニューロンは T1 と T2 の両方の温度変化に反応したが、多くのニューロンは T1 または T2 のどちらか一方の温度変化にのみ反応した。この結果から S1 ニューロン活動は単純に刺激部位に加えられた温度をコードしているのではなく、T1 と T2 の間のわずかな温度変化を検出するのに非常に適したパターンを示すことがわかった。また T2 期間のニューロン活動の応答潜時は、サルのボタン離しの反応時間と相関していた。これらの結果は S1 ニューロンの活動が侵害熱刺激弁別課題における微小な温度変化の検出に重要な役割を果たしていることを示唆している。

P1-162

下歯槽神経損傷後に孤束核内で認めたマイクログリアの応答

○柿原 理奈¹、諏訪部 武³、西川 泰央²、森田 章介¹ (¹大歯大 院 口腔外科一、²大歯大 生理、³朝日大 歯 口腔機能修復 口腔生理)

【緒言】下歯槽神経支配領域に対する侵害刺激に反応して、三叉神経脊髄路核尾側亜核でグリア細胞の数が増加することは報告されている。下歯槽神経は孤束核にも投射することから、本研究では下歯槽神経損傷に対する孤束核のマイクログリアの応答を組織学的手法により調べた。【材料および方法】7 週齢のラットを全身麻酔後、右側下歯槽神経を下顎角部で露出し、切断した。1 週後、ラット脳をパラホルムアルデヒドで固定し、厚さ 50 μ m の延髄スライス標本 (水平断) を作製した。抗 Iba1 蛍光免疫染色を行い、Iba1 陽性細胞を観察した。マイクログリアの個数は、蛍光像を構成するピクセルの個数を計測することで評価した。【結果】下歯槽神経切断群の手術側と非手術側、Sham 手術群の手術側において Iba1 陽性細胞を観察したところ、下歯槽神経切断群の手術側の孤束核吻側部でマイクログリアの増加を認めた。【考察】マイクログリアは損傷した神経の一次投射領域で増加する。一方、三叉神経脊髄路核尾側亜核では下歯槽神経切断後にグリア細胞の働きによってニューロン活動が亢進し、痛覚過敏の発症に関わることが報告されている。今回の実験から、下歯槽神経切断後にマイクログリアの応答を認めたのは、孤束核吻側部であった。ここには口腔領域からの感覚入力を取束し、味覚の投射部位であることから、下歯槽神経損傷は味覚に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。

P1-164

二日酔いでの口渇感は一アセトアルデヒドが原因でおこる

○稲永 清敏¹、氏原 泉^{1,2}、人見 涼露¹、小野 堅太郎¹、柿木 保明² (¹九歯大 歯 生理、²九歯大 歯 老年障害)

二日酔いをすると、時として強力な喉の渇きが生じる。一般的には、エタノールがバゾプレッシン分泌を抑制することによっておこる「アルコール利尿」が原因で喉が渇くといわれている。われわれは、エタノールの分解産物であるアセトアルデヒドが他の二日酔いの諸症状と同じく、喉の渇きの原因物質ではないかという仮説をたて実験を行った。実験にはウイスター系雄ラットを用いた。エタノール腹腔内投与により、水および食塩水の摂取量が増加した。アセトアルデヒド脱水素酵素阻害剤のシアンミドとの併用投与により、摂取量は増大した。シアンミド前投与後、アセトアルデヒドの投与により、水および食塩水の摂取量はさらに増加した。アセトアルデヒドがマスト細胞に作用しレニンを分泌させることが知られている。水および食塩水摂取量の増加は、マスト細胞膜安定剤およびアンジオテンシン II 受容体拮抗剤により減弱した。尿量は、水および食塩水を与えた場合にのみ、摂取量に見合った尿量の増加が遅れて観察された。c-Fos 免疫組織の結果より、エタノール投与により口渇中枢の神経細胞が活性化されることがわかった。これらのことより、二日酔いをした時、アセトアルデヒドのマスト細胞への作用を介して生成されたアンジオテンシン II が、口渇中枢にはたらき、喉の渇きを誘発している可能性が考えられた。

P1-165

ビタミンC欠乏ラットの5基本味に対する鼓索神経応答
 ○安尾 敏明¹、諏訪部 武¹、裕 哲崇¹ (朝日大 歯 口腔機能修復 口腔生理)

ビタミンは、周知のとおり、きわめて微量で動物の正常な生理機能を保持する不可欠の有機化合物で、不足すると特有の欠乏症を起こす。これまでの報告から、ビタミンA、B₁、B₆等の欠乏において、ある特定の味質に対する嗜好性が変化する可能性が示されている。申請者らは、これまでに、ビタミンC欠乏時にビタミンC水溶液に対する嗜好性が変化することを報告したが、ビタミンC欠乏時に現れるこの行動変化が、味覚の変化によって起きているのかどうかはまだ明らかにできていない。そこで、本研究では、5基本味(甘味:スクロース、塩味:塩化ナトリウム、苦味:塩酸キニーネ、酸味:塩酸、うま味:グルタミン酸カリウム)に対する鼓索神経応答がビタミンC欠乏時に変化するのかがどうかを明らかにするために、ビタミンC合成能欠如ラットを用いて、ビタミンC欠乏前後での5基本味に対する鼓索神経応答を記録し、解析を行った。その結果、欠乏前と比べ、欠乏後には、塩化ナトリウムや塩酸に対する鼓索神経応答が有意に減少していることが明らかとなった。以上の結果から、ビタミンCの欠乏状態は、一部の味覚受容機構に変化を及ぼす可能性のあることが示唆された。

P1-166

カプサイシンによって惹起される島皮質味覚野-自律機能関連領域間のθリズム同期化現象
 ○齋藤 充¹、豊田 博紀¹、佐藤 元¹、姜 英男¹ (阪大 院歯 高次脳口腔機能)

島皮質においては、味覚野(GI)と自律機能関連領域(AI)が吻尾的に隣接しているが、両領域の神経活動が協調し得るか否かは不明であった。我々はカプサイシン(CAP)を含む食品を摂取すると、顔面からの発汗や唾液分泌亢進、心血管系の促進等の自律反応が生じる。また、CAP摂取時にGIニューロンが活動することが近年機能的MRI解析により明らかになった。これらのことから、GIに発現しているCAP受容体TRPV1が活性化されると、両領域が機能協調し、その結果、これらの自律反応が生じた可能性が想定される。本研究では、ラット大脳薄切標本を用い、先ずGI第三層及び第五層錐体細胞(L3/L5 PC)におけるTRPV1電流の性質を調べた。全細胞電位固定下のL3 PCに対しCAP溶液をパフ投与し電流応答を観察すると明確な脱感作がみられなかったが、L5 PCではCa²⁺依存的な脱感作が認められた。次に、GI電気刺激により惹起した興奮の伝播の時空間的パターンを光学的膜電位測定法で観察した。CAP非存在下では単相的かつカラム状のパターンを示したが、CAP投与によりGIからAIへ広がる同期化したθリズムオシレーションへと変化した。全細胞電流固定記録の結果から、L3及びL5 PCはTRPV1活性化時にそれぞれ4 Hz及び8 Hzの持続的発火活動を示すことが判った。これらのθリズム発火活動が、GI-AI間にみられるθリズム同期化現象を引き起こしており、CAP摂取時の自律反応の神経基盤となっていることが示唆された。

P1-167

歯根膜侵襲刺激後の神経ペプチド pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) の発現について
 ○北浦 英樹¹、木村 桂介¹、石田 匡彦¹、山本 照子¹ (東北大 院歯 顎口腔矯正)

神経ペプチドは、中枢神経系および末梢神経系に広く分布し神経伝達物質、神経修飾因子として、また、侵襲性の刺激により痛みの伝達を担っていることなどが知られている。本報告では、歯の脱臼により歯根膜に侵襲性の刺激を与えた場合の神経ペプチドである Pituitary adenylylate cyclase activating polypeptide (PACAP) およびそのレセプターである PAC1 の発現および分布を調べた。6週齢SDラットの上顎第一臼歯を脱臼後、凍結組織切片を作製した。PACAP および PAC1 の免疫染色を行い、脱臼後の組織学的変化、PACAP 陽性神経線維および PAC1 陽性細胞の分布を調べた。脱臼後3、5日後には骨の吸収窩が認められ破骨細胞が骨表面に認められた。7日後には骨の吸収窩の骨表面に類骨が認められ骨芽細胞出現していた。PACAP 陽性神経線維は脱臼後、増加が認められた。また、PAC1 陽性の破骨細胞および骨芽細胞も増加した。蛍光二重染色により脱臼後 PACAP 陽性神経線維が PAC1 陽性破骨細胞および PAC1 陽性骨芽細胞に近接していることが認められた。侵襲刺激により歯根膜内に神経ペプチドである PACAP および PAC1 が増加することがわかった。また、PACAP が PAC1 陽性破骨細胞および骨芽細胞に近接していることから破骨細胞および骨芽細胞に作用し活性化している可能性が示唆された。

P1-168

絶食条件下での味蕾における味覚情報伝達系に関わる分子の発現調節
 ○豊野 孝¹、瀬田 祐司¹、片岡 真司²、鬼頭 文恵³、豊島 邦昭¹ (九歯大 歯 健康増進 口腔組織機能解析、²九歯大 歯 健康増進 頭頸部構造解析、³九歯大 歯 生体機能 老年障歯)

カロリー制限食のラットでは、甘味感受性が増加することが明らかになっている。しかしながら、味蕾での味覚情報伝達系に関わる分子に関して、摂食状態による発現調節機構は明らかになっていない。そこで、本研究では味蕾を含むマウス有郭乳頭において、絶食時におけるこれらの分子の発現量の変化をリアルタイムPCR法により調べた。自由飲水下で2日間絶食、または通常給餌を行ったC57BL6/J雄マウスの有郭乳頭上皮からtotal RNAを調製した後、cDNAを調製しリアルタイムPCR法による解析を行った。その結果、細胞内味覚情報伝達分子 gustducin および PLCβ2 に関しては、摂食時と比較して絶食時ではそれぞれ1.4倍、1.2倍の発現量の増加が認められた。次に甘味・うま味受容体 TIR ファミリー (TIR1, TIR2 および TIR3) に関しては、摂食時と比較して絶食時ではそれぞれ1.8倍、2.2倍および2.4倍の発現量の増加が認められた。一方、苦味受容体 T2R138 に関しては、絶食時では1.3倍の発現量の増加が認められた。以上の結果から、絶食により特に TIR ファミリーの転写が活性化されることが明らかになった。

P1-169

PRIP 蛋白の発現抑制はバレル皮質錐体細胞において一過性 GABA 抑制を強化する

○豊田 博紀¹、齊藤 充¹、佐藤 元¹、兼松 隆²、平田 雅人³、姜 英男¹ (阪大 院歯 口腔生理、² 広大院 医歯薬 歯科薬理、³ 九大院 院歯 口腔細胞工)

新規イノシトール 1,4,5-三リン酸結合蛋白質 (PRIP) は、GABA_A 受容体のシナプスへの移行に重要な役割を担っている。今回我々は、バレル野錐体細胞における抑制性後シナプス電流 (IPSC) 及び GABA パフにより生じる GABA_A 受容体電流が、PRIP1/2 分子欠損によりどのように変化するかについて検討した。mIPSC の発生頻度、振幅及び立ち上がり時間のいずれにおいても、PRIP1/2 ノックアウトマウス (DKO) と野生型マウス (WT) の間に有意差は認められなかったが、その 1/2 持続時間は DKO の方が WT に比べて有意に小さい値を示した。その一方、eIPSC の 1/2 持続時間はその逆の大小関係を示した。DKO の GABA_A 受容体電流は WT に比べて強い脱感作を示し、パフオフセット直後にハンパ状のテール電流が観察された。DKO で観察された強い脱感作及びハンパ状のテール電流は、BAPTA 及びカルシニューリン拮抗薬により抑制された。細胞内 Ca²⁺ 濃度上昇に伴う GABA_A 受容体チャネルのキネティクス変化は、シナプス外 GABA_A 受容体でのみ生じると報告されており、また、カルシニューリンの活性化により、シナプス下 GABA_A 受容体がシナプス周辺へ移行することが報告されている。これらのことから、DKO の錐体細胞では、シナプス下 GABA_A 受容体がシナプス周辺に移行しており、シナプス伝達の際、シナプス下 GABA_A 受容体だけでなく、シナプス周辺 GABA_A 受容体も活性化されるため、一過性抑制が増強される可能性が示唆される。

P1-171

ラット顎下腺・舌下腺を支配する上唾液核ニューロンに対するオレキシンの興奮作用

○美藤 純弘¹、佐藤 匡²、藤田 雅子¹、小橋 基¹、市川 博之^{1,2}、松尾 龍二¹ (岡大 院歯薬 口腔生理、² 東北大 院歯 口腔器官構造)

【目的】オレキシンは視床下部外側野 (摂食中枢) ニューロンから分泌される摂食促進ペプチドである。予備実験でオレキシンは顎下腺・舌下腺を支配する副交感神経の一次中枢である上唾液核 (SSN) ニューロンを興奮させることを明らかにしている。本研究はその興奮作用をより詳細に分析し、また SSN ニューロンのオレキシン受容体を免疫組織化学的に調べた。【方法】Wistar 系成熟ラットの鼓索-舌神経に Fast Blue を注入して SSN ニューロンを逆行性に標識した。脳幹部の凍結切片を作製してオレキシン A と B 受容体を免疫染色した。Wistar 系幼若ラットの SSN ニューロンを同様に蛍光標識して新鮮脳スライス標本を作製した。標識細胞からホールセルパッチクランプ法により記録を行い、膜電位や膜電流に対するオレキシン A および B の影響を調べた。【結果および考察】多くの SSN ニューロンはオレキシン A および B 受容体を共発現していた。しかし活動電位や内向き電流発生に関しては、オレキシン A で誘発されるニューロンの割合の方がオレキシン B のものよりも多かった。また多くの SSN ニューロンで、オレキシン A により微小興奮性シナプス後電流の発生頻度が上昇した。よって SSN ニューロンは主にオレキシン A により興奮性調節を受けていることが示唆された。オレキシンは摂食時の豊富な唾液分泌に関与しているのかもしれない。

P1-170

神経障害性疼痛モデルにおける酸化型ガレクチンの鎮痛効果について

○米原 典史¹、寺澤 理恵¹ (奥羽大 歯 歯科薬理)

神経障害性疼痛は、神経損傷に伴う神経機能の異常に起因し、異常痛覚 (アロディニア) と痛覚過敏を主症状とする難治性の疼痛である。この疼痛には口腔・顔面領域では、抜歯・囊胞摘出術・インプラント植立術などの手術に伴う末梢神経の損傷に起因するもの、あるいは帯状疱疹後神経痛・三叉神経痛などの病因によるものがあり、多数のヒトがこの痛みを苦しんでいる。本研究では、神経障害性疼痛を発症する動物実験モデルを用い各種神経栄養因子の鎮痛効果を検討した。【方法】病態動物は、ICR マウス (20-25 g) の坐骨神経を緩やかにクロミック縫合糸で 3ヶ所結紮し作成した。神経栄養因子は結紮部位に 5 μl 直接塗布した。鎮痛効果は、熱刺激装置 (Plantar test) を用い、熱刺激に対する逃避潜時を測定することにより検討した。【結果】坐骨神経結紮により、結紮 7 日目から熱刺激に対する逃避時間の短縮 (痛覚過敏) が生じ、10 日から 14 日目にかけて逃避潜時は最短となった。酸化型ガレクチン塗布群は、生理食塩水塗布群に比べ結紮直後から 28 日目にかけて逃避潜時の著しい延長 (鎮痛効果) が観察された。酸化型ガレクチンは、神経損傷後の軸索再生の初期過程に重要な役割を果たすことが知られていることから、本研究結果は、酸化型ガレクチンが神経再生のみならず神経障害性疼痛の発症抑制および治療に有効な治療薬となりうる可能性を示唆している。

P1-172

乾燥による上皮細胞の乾燥は、さらなる乾燥を誘発する

○八田 あずさ^{1,2}、黒瀬 雅之¹、藤井 規孝²、山村 健介¹ (新大 院歯 口腔生理、² 新大病院 総合診療)

【背景】我々は、涙腺を摘出したモデル動物を用いて、角膜の長期間に渡る乾燥が、涙膜の状態をモニタリングしている角膜求心性神経活動に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。次に、影響を及ぼす因子として炎症性サイトカインに着目し、モデル動物を用いて、サイトカインの動態を検討した結果、摘出 1 週後の角膜上皮細胞において IL-6 の有意な増加が見られた。そこで、摘出 1 週後のモデル動物を用いて、電気生理学的手法により求心性神経線維の活動量の変化を記録し、サイトカインの及ぼす影響を検討した。【方法】片側の眼窩上・眼窩下涙腺を摘出 7-10 日間経過したラットを用いて、麻酔下にて、三叉神経節から冷刺激や高浸透に対して応答することで涙膜の状態をモニタリングしている角膜求心性神経細胞を同定した後、温度刺激と TRPM8 チャネルの作動薬であるメントールに対する神経応答を記録した。また、涙の分泌量と瞬目反射の経週変化を記録した。【結果と考察】涙腺摘出は、涙の分泌量を有意に低下させ、瞬目反射数を非摘出側と比較して有意に増加させた。摘出群の冷刺激により誘発される神経活動は非摘出群より有意に減弱し、誘発閾値の温度は有意に低かった。メントールに対する感受性は非摘出群と比較して、有意に増強したものの、脱感作を誘発する溶液の濃度は有意に低かった。これらのことから、サイトカインが角膜求心性線維の脱感作に関与していることが示唆された。

P1-173

睡眠時の末梢刺激応答性変化に関わる神経機構の検討

○日野 峻輔¹、加藤 崇雄¹、堀江 憲夫¹、下山 哲夫¹、坂上 宏²、安達 一典² (¹埼玉大 総医セ 歯口外、²明海大 歯 薬理)

【目的】近年、我々はサルの顎運動活動性が、安静覚醒 (quiet awake:QW) 時に比較して安静睡眠 (quiet sleep:QS) 時に低下することを報告した。そこで本研究では、その活動性変調に関わる神経機構を解明するために薬物投与が容易に行えるラットを用いて検討を行った。【方法】SD系雄性ラット(6週齢)に心電図、筋電図(顎二腹筋前腹)、脳波、眼電図記録用電極と舌刺激用電極(オトガイ舌筋)を留置し、一週間の回復期間の後に実験に用いた。QW時にオトガイ舌筋に電気刺激(200 μ s、0.2 Hz、5回)を加え、顎二腹筋活動を3/5以上で発現させる刺激強度を開口反射誘発閾値 (TH) とし5分間隔で3回計測した(QWB)。続いて、QS時とその後の覚醒 (QWA) 時のTHを求めた後、グリシン (150 mg/kg、i.p.) を投与し検討を行った。また、刺激強度と開口反射応答性の相関を検討するために、THの1.5-2倍の刺激を与えた。【結果】QWBにおいてTHは安定していたが、QSでは有意に上昇 ($P<0.05$ 、 $118.7\pm 3.3\%$ vs QWB) し、QWAではQWBのレベルまで戻った ($104.5\pm 1.9\%$ vs QWB)。また、QSではQWBと比較して開口反射潜時の延長と顎二腹筋 RMS の減少が各刺激強度で有意 ($P<0.05$) に認められた。グリシン投与はQWBのTHを上昇 ($P>0.05$ 、 $105.1\pm 3.5\%$ vs グリシン非投与) させたが、QSのTHを有意に上昇させることはなかった。【考察】ラットの顎運動機能は睡眠時にグリシン神経機構を介した抑制を受けていることが示唆された。

P1-174

環境ホルモン曝露ラットにおけるニオイ関連行動の解析

○藤本 哲也¹、西川 泰央¹ (¹大歯大 生理)

【目的】ビスフェノール A(BPA)は歯科材料にも用いられる環境ホルモンの1つである。我々は極微量BPAの周産期曝露が仔ラットのうつ情動を増強することを報告してきた。今回は情動行動の背景を調べるため、捕食者のニオイを用いた行動解析を試みた。【方法】4方向のチャンバーからなる十字型の観察ボックスを作製し、BPAを周産期曝露したあとの仔ラットをその中に置いて行動を解析した。初日はニオイを置かず、翌日、2方向のチャンバーの端にニオイ溶液を置いた。【結果】対照群においてニオイ存在下で活動性が低下したが、ニオイに対する回避行動は認められなかった。一方、曝露群では、活動性の低下とニオイ回避の両方が認められ、活動性の低下は雄ラットで顕著であった。【考察】本実験ではニオイ刺激として3%の溶液を用いた。これは対照群の回避行動に影響を与えず、活動性のみを低下させるニオイ強度と考えられた。この条件下でBPAは有意なニオイ回避行動を引き起こし、活動性を顕著に低下させたことから、BPA曝露ラットにおいてストレス感受性が亢進していることが示唆された。うつ情動においても雄で顕著であることから、その背景の1つとしてストレス脆弱性が考えられた。

P1-175

味覚感受性に与える冷刺激の影響：性差

○藤山 理恵¹、岡田 幸雄¹、戸田 一雄¹ (¹長大院 医歯薬 生体情報科学)

【目的】味覚と温度感覚の間には関連があることが報告されており、我々はこれまでに冷刺激による味覚感受性の効果について報告した。味覚障害患者は女性に多いと言われている。そこで今回、冷刺激の効果における性差について味質ごとに検討した。【方法】健常者249名のうち、男性131名、女性118名について調べた。全口腔法の変法である滴下法を用いて味覚検査を行ない、四基本味の認知閾値を調べた。1分間アイスキューブを口に含み、口腔内全体に作用させたのち、3分後に滴下法にて再検査を行った。【結果】全被験者について冷刺激前後の認知閾値を統計的に比較したところ、四基本味すべてにおいて味覚感受性の上昇がみられた。さらに男性と女性に分けて四基本味それぞれの冷刺激前後の認知閾値を統計的に比較した。四基本味のうち甘味と酸味の感度は男性・女性とも冷刺激による有意な上昇が観察され性差は無かった。しかし塩味の感度は男性では冷刺激による有意な上昇が観察されたが、女性では有意差は見られなかった。塩味とは反対に、苦味の感度上昇は男性では冷刺激による有意差は観察されなかったか、女性では有意差が見られた。【結論】冷刺激による味覚感受性は、甘味・酸味については性差が見られなかったが、塩味・苦味については性差が観察された。味覚感受性に与える冷刺激の影響は性別の違いにより、味質ごとに異なる可能性が示唆された。

P1-176

上喉頭神経連続電気刺激は嚥下反射をどのように脱感作させるのか？

○辻 光順¹、辻村 恭憲¹、井上 誠¹ (¹新大院 医歯 摂食・嚥下リハ)

【目的】上喉頭神経(SLN)への電気刺激は、その嚥下反射誘発の容易さからこれまで動物を用いた研究において広く用いられてきた。しかし、SLN連続電気刺激が嚥下反射誘発やその神経機構にもたらす影響については明らかになっていない。そこで本研究では、SLN連続刺激による嚥下誘発とその変調に関わる神経メカニズムについて検討した。【方法】38匹のウレタン麻酔下SD系雄性ラットを用いた。左側甲状舌骨筋および顎舌骨筋から筋活動電位を導出し、嚥下の指標とした。嚥下誘発のためのテスト刺激としてSLN、延髄孤束核(NTS)、皮質嚥下領域および反回神経刺激を選択し、嚥下回数および嚥下間隔時間を計測した。次に、条件刺激としてテスト刺激前にSLN連続刺激(SLN前刺激)を行い、その効果を検討した。最後に、SLN連続刺激時のNTSニューロン活動の変化を検討した。【結果】テスト刺激であるSLN連続刺激時には、経時的な嚥下回数の減少と嚥下間隔時間の延長を認めた。SLN前刺激は、いずれの嚥下誘発に対しても抑制効果を示した。SLN高頻度刺激時(30 Hz)のNTSニューロン活動は経時的に減少を認めたのに対し、低頻度刺激時(2 Hz)にはその変化は認められなかった。【結論】SLN連続刺激により生じた嚥下の脱感作に、嚥下中枢の活性化と関連するNTSニューロン活動の低下が関与している可能性が考えられた。

P1-177

三叉神経上核プレモーターニューロンの形態学および生理学的特性

○中村 史朗¹、中山 希世美¹、望月 文子¹、吉田 篤²、井上 富雄¹ (¹昭大 歯 口生理、²阪大院 歯 高次脳口腔機能)

我々はこれまで閉口筋および開口筋運動ニューロンに興奮性および抑制性出力を送るプレモーターニューロンが三叉神経上核(SupV)に存在することを報告してきた。しかしSupVプレモーターニューロンの形態学および生理学的性質は不明な点が多い。そこで本研究では、カルシウムイメージング法を用いて同定したSupVプレモーターニューロンの形態学および電気生理学的特性について解析した。生後1~6日齢Wistar系ラット脳幹スライス標本内のMoVを電気刺激すると、短潜時間で細胞内カルシウム濃度の上昇を示すニューロンがSupVに1232ニューロン中139個(11.2%)認められた。次に139個中38ニューロンからパッチクランプを行いMoVを100 Hz・3連発で電気刺激したところ、32個のニューロン(84.2%)で逆行性の活動電位が誘発された。逆行性応答を示したニューロンは、発火特性に基づいて高頻度スパイク発射型(HF)ニューロンと低頻度スパイク発射型(LF)ニューロンに分類された。さらにHF、LFニューロンを形態学的に検索したところ、樹状突起の分布および軸索の走行様式に両ニューロングループ間で差が認められた。以上の結果から、SupVに存在するプレモーターニューロンは、様々な電気生理学的および形態学的特性を有し、複雑で多様な下顎運動の遂行に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

P1-179

大動脈減圧神経と三叉-舌神経刺激による孤東核吻側部ニューロン応答

○石塚 健一¹、佐藤 義英¹ (¹日歯大 新潟生命 歯 生理)

孤東核吻側部は味覚の第一次中継核としてよく知られている。しかしながら、孤東核吻側部ニューロンは多くの異なる組織からの求心性入力を受けるとともに、多種類の末梢刺激に応答する。そこで、我々は孤東核吻側部ニューロンの大動脈減圧神経と舌-三叉神経刺激による応答をウレタンクロラロース麻酔下ラットで検索した。総計36個の自発発射を示す孤東核吻側部ニューロンを記録した。大動脈減圧神経刺激により12個(33%)のニューロンが有意($p < 0.05$)に発火頻度を変調したが、残りの24個(67%)の発火頻度の変調には有意差が認められなかった。変調を示した12個のうち、11個が発火頻度を減少させ、そして1個のニューロンが発火頻度を増加させた。一方、三叉-舌神経刺激により17個(47%)のニューロンが有意($p < 0.05$)に発火頻度を変調したが、残りの19個(53%)の発火頻度の変調には有意差が認められなかった。変調を示した19個のうち、11個が発火頻度を減少させ、そして6個のニューロンが発火頻度を増加させた。以上の結果より、大動脈減圧神経刺激と三叉-舌神経刺激は約半数以下の孤東核吻側部ニューロン活動に興奮性または抑制性効果を及ぼすことが明らかになった。

P1-178

体性感覚誘発脳磁場による口唇感覚異常の客観的評価

○前澤 仁志^{1,2}、吉田 和也³、美馬 達哉²、平井 喜幸¹、舩橋 誠¹、長峯 隆^{2,4}、福山 秀直² (¹北大 歯 口腔生理、²京大 医 脳機能セ、³京都医療セ 歯、⁴札医大 神経科学)

智歯抜歯後などに口唇感覚異常を生じることがあるが、下歯槽神経の走行が深いため、電気生理学的手法を用いて末梢神経の電気活動を記録することは困難である。口唇刺激による体性感覚誘発脳磁場(SEF)を用いて、下唇感覚異常の客観的評価を試みた。対象は口腔外科手術中の神経損傷により片側の下唇に感覚異常を有した患者6名(男性4名、女性2名、32-56才)と健常者10名(男性6名、女性4名、24-62才)。口唇粘膜(正中から2cm側方)に、一組のピン電極を接触させ、片側ずつ刺激した。感覚閾値の3倍で幅0.5msの定電流矩形波を刺激間隔1sで与えた。全頭型脳磁図計の平面型差分センサー204chで記録を行い、600回加算した。再現性のある2セッションの群加算を解析に用いた。すべての健常者の左右側刺激で対側頭頂側頭部に25ミリ秒付近を頂点潜時とするSEF反応(P25m)を認めた。また、P45m、P60m、P80mのうち少なくとも1つの反応を認めた。各反応の頂点潜時は右側刺激では23-33、42-50、56-67、72-98msであり、左側刺激では23-34、46-49、52-68、71-90msであった。患者の健常側刺激では、すべての被験者で対側半球にP25m(24-34ms)を認めたが、患側刺激ではP25mは認めなかった。5人で対側半球に小さな反応を認め、各被験者の反応の最短潜時は57、89、65、53、54msであった。SEFによるP25mの反応が下唇の感覚異常の客観的評価の指標になることが示唆された。

P1-180

海馬学習依存的なAMPA受容体のCA1シナプスへの移行は、両側の背側海馬にみられ、腹側海馬ではみられない

○水野 潤造¹、美津島 大^{1,2} (¹神歯大 院 歯 口腔科学、²山口大 院 医 システム神経科学)

近年、海馬での学習依存的なシナプス可塑性が報告されたが(Science 308: 83-88, 2005)、未だ多くが未解明である。我々は、ラットを用いて文脈学習である受動的回避学習(IA task)を行い、海馬CA1シナプスにおけるAMPA受容体のシナプス移行が学習依存的であることを報告した。さらに、このシナプス移行の阻止は文脈学習を阻害することから、AMPA受容体のシナプス移行が文脈学習に必要なことも確認した(PNAS 108: 12503-508, 2011)。左右の海馬CA1のシナプス結合には構造的差異があり、背側と腹側では機能的差異が存在する。本研究では、CA1領域のどの部分が学習成立に関わるか、文脈学習の記憶領域を確認するため、学習後のラットから急性脳スライスを作製してパッチクランプ解析を行った。まずvoltage clamp法で、左右の背側および腹側海馬のCA3-CA1線維を刺激し、CA1ニューロンからAMPA受容体およびNMDA受容体を介するEPSC反応を記録した。背側海馬のCA1ニューロンでは左右両側で学習依存的なAMPA/NMDA比の上昇が見られたが、左右差は認められなかった。一方、腹側海馬のCA1ニューロンでは学習依存的なAMPA/NMDA比の変化は見られず、左右差も認められなかった。また、current clamp法での解析では、学習依存的変化や左右差は認められなかった。以上より、学習依存的なCA3-CA1シナプスの可塑性は背側海馬の左右両側で見られるが、腹側海馬では見られないことが明らかになった。

P1-181

赤核刺激による開口反射の変調における外側網様核の関与

○佐藤 義英¹、石塚 健一¹、岩崎 信一¹ (1)歯大 新潟生命歯 生理)

【目的】我々は赤核刺激が低閾値求心性線維の刺激により誘発された開口反射を促進し、高閾値求心性線維の刺激により誘発された開口反射を減弱することを報告した。外側網様核は赤核からの投射線維を受けていることが明らかにされている。また外側網様核刺激は侵害性刺激誘発性開口反射を減弱するが、非侵害性刺激誘発性開口反射を減弱しないことが報告されている。従って、赤核刺激による開口反射の変調は外側網様核が関与していると考えられる。そこで赤核刺激による開口反射の変調が外側網様核の破壊により影響を受けるか検索した。【方法】実験にはウレタン麻酔下ラットを用いた。下歯槽神経刺激(試験刺激)により開口反射を誘発させ、顎二腹筋前腹からの筋電図を記録した。下歯槽神経の刺激強度は閾値の1.2倍か4倍とした。そして赤核の電気刺激(条件刺激)による開口反射の変調を記録した。次に外側網様核の電気破壊を行い、赤核刺激による開口反射の変調が影響を受けるか検索した。記録終了後、刺激部位と破壊部位を組織学的に確認した。【結果と考察】赤核刺激による低閾値求心性線維刺激誘発性開口反射の促進は、外側網様核を破壊しても影響を受けなかった。一方、赤核刺激による高閾値求心性線維刺激誘発性開口反射の減弱は、外側網様核破壊後、消失した。これらのことから、赤核刺激による高閾値求心性線維刺激誘発性開口反射の減弱は、外側網様核が関与していることが示唆された。

P1-183

光学的膜電位測定によって観察されたラットパレル野における周期的同期化

○佐藤 元¹、豊田 博紀¹、齋藤 充¹、姜 英男¹ (1)阪大 院歯 口腔生理)

ラットは複数のヒゲにより空間認知を行うことから、隣接カラムの神経細胞集団間で発火活動の協調や同期化が生じていると考えられる。実際、カイニン酸の灌流投与により、パレル野第2/3層に1-5 Hzの周期的同期活動が生じることが細胞外記録法により報告されている。一方、我々はカラム間の脱同期化にGABA_Bシナプス前抑制が関与することを既に報告している。本研究では、発火活動の周期的同期化、或いは、脱同期化に、GABA_Bシナプス前抑制が関与するか否かを明らかにするため、ラットパレル野のスライス標本を用いて光学的膜電位測定法により実験を行った。第3層に与えたpaired pulse刺激(200 ms間隔)により引き起こされる第2/3層における水平方向の興奮伝播の広がり、一発目より二発目の方が小さかった。この興奮伝播の広がりのpaired-pulse depressionは、bicuculline + APVの存在下でのみ認められ、GABA_B受容体阻害薬CGP55845により消失した。これらの結果は、GABA_Bシナプス前抑制が隣接カラム間の神経活動の脱同期化に関与することを示唆している。また、カイニン酸の灌流投与により、パレル野第2/3層の広い範囲にわたって、同期化した約5 Hzの振動活動が出現し、カイニン酸受容体拮抗薬の灌流投与により消失した。さらに、こうした周期的同期化はCGP55845によっても消失したことから、GABA_Bシナプス前抑制の働きにより、その周期が決定されている可能性が高いと考えられる。

P1-182

ラット咽頭及びその周囲組織におけるTRPV1とTRPV2の分布

○佐藤 匡¹、矢島 健大²、狩野 充浩¹、鈴木 敏彦¹、市川 博之¹ (1)東北大 院歯 口腔器官構造、2)東北大 院歯 歯科保存)

Immunohistochemistry for TRPV1 and 2 was performed on the pharynx and its adjacent regions. TRPV1-immunoreactivity (IR) was detected in nerve fibers beneath and within the epithelium and/or taste bud-like structure. In the pharynx, these nerve fibers were abundant in the nasooral part and at the border region of naso-oral and laryngeal parts. They were also numerous on the laryngeal side of the epiglottis and in the soft palate. TRPV2-IR was expressed by dendritic cells in the pharynx and epiglottis, as well as in the root of the tongue and soft palate. These cells were located in the epithelium and lamina propria. Some TRPV2-IR nerve fibers could be also observed in the epithelium of the soft palate. Retrograde tracing method revealed that many sensory neurons which innervate the pharynx or soft palate expressed TRPV1- or TRPV2-IR in the jugular-petrosal ganglion complex. Co-expression of TRPV1 and CGRP was frequent among pharyngeal and soft palate neurons. The present study suggests that TRPV1- and TRPV2-IR jugular-petrosal neurons may be associated with the regulation of the swallowing reflex. This work was collaborated with Ms. Rika Sasaki.

P1-184

連続舌運動課題遂行時における大脳体性感覚皮質のニューロン活動

○戸田 孝史¹、工藤 忠明¹、林 治秀¹ (1)東北大 院歯 口腔生理)

【目的】ヒトの摂食、構音では舌などの運動が連続的に遂行される。その巧緻的制御の神経機構を明らかにするため、覚醒動物の大脳中心後回一次体性感覚野(SI)の後方部から頭頂連合野にかけて、運動課題遂行中のニューロン活動を調べた。この領域では受容野を有するニューロンの割合が少ないことが知られている。【方法】*Macaca fasciata* 雌1頭の訓練を行った後、ニューロン活動記録を開始した。舌運動課題は、方向の異なる2枚のスライドドア(上下、左右)をすばやく連続的に開け前方の報酬を舌尖で取るものである。1試行の所要時間は、課題開始から報酬タッチまで約1秒である。舌とドアとの接触をモニターすると同時に、PCカメラを用い課題遂行の様子を撮影した。試行は20回以上行わせ、試行間の活動パターンのばらつきについて検討した。【結果と考察】SI後方部から連合野にかけて、231個のユニットが記録され、これらのうち口腔や顔面に受容野が同定されたものは33%(77/231)であった。残り67%は、探索したにもかかわらず受容野が同定できなかったユニットであり、これらのうちの10個は、課題中の特定の運動相にのみ活動し、試行間で活動パターンを比較すると極めて高い類似度を示した。このようなニューロンは、試行毎の感覚入力の変動に影響されずに連続動作の過程を正確にモニターするのに適している。【謝辞】実験動物はナショナルバイオリソースプロジェクトから提供を受けた。

P1-185

レプチンは甘味応答味細胞の甘味応答を特異的に抑制する

○吉田 竜介¹、仁木 真由¹、上瀧 将史¹、高井 信吾¹、二ノ宮 裕三¹ (¹九大 院歯 口腔機能解析)

レプチンはマウスの甘味に対する行動・神経応答を抑制する。この効果は、レプチンが味細胞の甘味応答を抑制することで生じると考えられるが、その詳細は明らかとなっていない。本研究では、マウス茸状乳頭味細胞におけるレプチン受容体 (Ob-Rb) の発現、および味応答に対するレプチンの効果を調べた。免疫組織化学的手法により Ob-Rb の発現を調べると、Ob-Rb は I 型細胞マーカーである GLAST 発現細胞 (~20%) や III 型細胞マーカーである GAD67 発現細胞 (~4%) よりも、甘味・うま味受容体コンポーネントである T1R3 を発現する味細胞 (~40%) に多く発現が見られた。味細胞応答を調べると、レプチンは甘味応答細胞の甘味応答を濃度依存的に抑制したが、酸味、苦味応答細胞の味応答には影響を与えなかった。また甘味応答細胞に対するレプチンの抑制効果はレプチン受容体アンタゴニストにより消失し、レプチン受容体変異マウスである *db/db* マウスでは見られなかった。また、低濃度のレプチン (1~5 ng/ml) に味細胞を順応させた後、高濃度のレプチンを与えた場合にもレプチンの甘味抑制効果は見られた。以上の結果は、レプチンが甘味応答味細胞の Ob-Rb 受容体を介し甘味応答を抑制することを示唆する。

P1-186

咬合挙上によるラット咬筋の筋肥大と筋線維タイプの選筋化にラパマイシンによる mTOR 抑制が与える影響

○梅木 大輔¹、大貫 芳樹²、新井 千博¹、奥村 敏²、中村 芳樹¹ (¹鶴見大 矯正、²鶴見大 生理)

【目的】Akt/mTOR シグナル伝達経路が咬合挙上による咬筋の筋肥大を伴う選筋化に関与しているかを、mTOR の阻害薬であるラパマイシン (RAPA) の投与することにより解明することにした。【方法】8 週齢の Wistar 系雄性ラット (24 匹) を、対照群、BO 群 (3 mm の咬合挙上)、RAPA 群 (1.2 mg/kg/日 腹腔内注射)、BO + RAPA 群に分け、2 週間飼育後、体重および摘出した咬筋 (両側) の重量を計測後、左側咬筋の筋線維直径を組織化学的手法にて測定した。右側咬筋におけるミオシン重鎖アイソフォーム (MHC I.IIa.IIId/x.IIb) mRNA 量を real time RT-PCR 法にて定量的に解析。MHC の構成比率を SDS-PAGE で解析し、S6K1 と 4E-BP1、および ERK1/2 のリン酸化レベルはウェスタンブロット法で解析した。【結果と考察】(1) 咬筋重量、筋線維直径は、BO 群において増加が認められ、RAPA 群で減少が見られた。(2) MHC mRNA の発現量では BO 群で選筋化傾向が認められたが、RAPA 群では変化が見られなかった。(3) BO 群で S6K1 と 4E-BP1 は増加が認められ、ERK1/2 では減少が認められた。以上の結果は、機械的刺激が Akt/mTOR 経路を介し、ERK1/2 経路を抑制することで、ラット咬筋の筋肥大と筋線維タイプの選筋化に関与していることを示唆する。

P1-187

マウス舌筋走行のマイクロ CT による可視化

○岩崎 信一¹、青柳 秀一² (¹日歯大 新潟生命歯 生理、²日歯大 新潟生命歯 先端研)

The aim of this study is to obtain information about the mouse tongue muscle by using micro-CT (μ CT) at low, middle, and high magnifications. With the use of osmium tetroxide, μ CT has been effectively employed to observe soft tissue. Therefore, we chose the mouse tongue as a soft tissue for μ CT, and generated 3D images of the tongue backed up by image rendering with histological resolution. During this observation, we developed new methods of low-magnification observation to show the relation between the tongue and surrounding tissues. We also applied high-resolution μ CT in high-magnification observation of muscle fiber fascicles. The results obtained in the present study are follows; 1. For low-magnification observation, pre-treatment with decalcification and freeze drying is suitable to observe the area between the muscle of the tongue and the bone around the tongue using μ CT. 2. For middle-magnification observation, the use of osmium tetroxide to observe the muscle arrangement of the tongue by μ CT is suitable. 3. For high-magnification observation, high-resolution μ CT is suitable for biological observation of the transverse muscle of the tongue through fiber fascicles.

P1-188

歯科基礎医学の講義に替わる TBL (チーム基礎学習) の実践に必要な 5P システムの改良

○葛城 啓彰¹ (日歯大 新潟生命歯)

【目的】能動的学習は歯科医師として生涯学習に重要である。現行カリキュラムの中で講義から第 2 学年の講義の変革に TBL を実践したのでその概略を報告する。【対象と方法】2011、2012 年度本学第 2 学年 79、62 名を対象とし、感染微生物学の講義に、前学期は一斉講義、後学期に TBL を実施し比較検討した。TBL 導入に際しては、学生に予習ノート作成、学習前プレテスト、ツリーマップ作成、学習後の同僚評価、予習ノートのポートフォリオの 5P システムの実施と、評価は TBL の形成的評価と後学期本試験の総括評価で行うことを説明し同意を得た。2012 年度は学生アンケート結果に基づき、ツリーマップの全グループ同時プレゼンテーションと学習後のポストテストを加えた 7P システムとし、前学期と比較検討した。【結果および考察】講義支援システムへのアクセス状況は、2011 年度は一課題あたり前期 6.3 ± 13.2 人、後期 24.5 人 ± 33.9 人、2012 年度は一課題あたり前期 8.1 ± 4.6 人、後期 25.9 人 ± 7.0 人と有意に増加した ($p < 0.001$)。前期・後期本試験では、再試験者該当者は、2011 年度は前期 18 名から後学期に 2 名に、2012 年度は前期 34 名から後学期に 16 名に有意に減少した ($p < 0.001$)。学生アンケートの結果では、2011 年、2012 年度とも TBL は学生の発言の機会が増え、楽しいと感じていた。今後も学生からの要望を取り入れ TBL のシステムを改良していくことは、更なる学生の能動的学習を促進するものと考えられる。