

P2-1

多視点 3D 解剖システムを用いた口腔領域の人体解剖学教育
 ○山合 友一朗¹、大野 充昭²、伊原木 聡一郎³、窪木 拓男² (¹岡大 院医歯薬 口腔機能解剖、²岡大 院 医歯薬 インプラント再生補綴、³岡大 病院 口腔外科 病態)

歯学部学生や研修医あるいは開業歯科医に対する人体解剖学教育は、臨床現場で常に必要な知識や経験を習得するための必要不可欠な学習である。しかし多くの場合、人体解剖は一過性の学習として捉えられがちであるうえ、人体解剖の自由な繰り返しは不可能なため、曖昧な記憶が臨床現場での妨げになる。それを補うために、種々のテキスト、図譜などがあるが、いずれも紙面に描かれた 2 次元のな人体像であるため、知識の補完には不十分であった。そこで、岡大ではバナソニック (株) と共同で 3D 解剖プロジェクトを立ち上げ、見たい時に、見たい場所で、見たい方向から、見たい深さで何度でも人体解剖が再現可能な多視点 3D 解剖システムを構築するに至った。今回、口腔領域の解剖に適合するように 2 種類の固定法を用い、3D 解剖撮影を施行した。まずホルマリン固定を用い、インプラントの植立の参考となるよう、上顎洞周囲や下顎管を重点的に扱い上歯神経叢と伴行動脈、下歯槽動脈分岐を可視化、同時に舌神経と舌下神経の走向、舌下動脈とオトガイ下動脈の吻合、下歯槽動脈切歯枝や鼻口蓋動脈の位置を明確化した。次に軟組織の可動性が保たれるシール法固定を用い、前頰三角隙と頰筋膜の広がり、開口させて口腔底最奥部の構造の可視化、外頰動脈と舌動脈、顔面動脈、顎動脈の分岐部の構造と走向の明瞭化を試みたので報告する。

P2-3

下顎隆起発生の起源に関する仮説
 ○崎山 浩司¹、坂東 康彦¹、瀧澤 将太^{1,2}、天野 修¹ (¹明海大 歯 解剖、²明海大 歯 口腔外科 2)

【目的】 歯科分野でよく知られている下顎隆起は、下顎骨体の舌側面がかつ顎舌骨筋線の上方に増殖する骨隆起と定義されている。これまでの研究では、下顎隆起の発生機序として、遺伝的要因、咀嚼による応力などの生後外的環境要因あるいは、その両方に起因していると言われてきたが未だ解明されていない。そこで本研究は、成人に発生する下顎隆起の部位とメッケル軟骨の発生学的観点から、下顎隆起の起源について新たな仮説を提供することを目的とした。【方法】 下顎骨形成に重要な時期に対応する段階である胎齢 10 週～13 週の子鼠を用いた。10～50 マイクロメートルのパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン-エオジン染色を行い、位相差顕微鏡下にて下顎骨の形成発育を観察した。【結果および考察】 胎齢 10 週では、メッケル軟骨が下顎骨内面に並走するように接した。胎齢 11 週では、オトガイ孔のレベルでメッケル軟骨は S 字状に屈曲し、下顎骨内面に接した。胎齢 12 週では、下顎骨の内側層板は発育段階の顎舌骨筋の上方で接し、メッケル軟骨に到達するほど内側に突出しメッケル軟骨の後方かつ上面を覆うほど発達した。胎齢 13 週ではオトガイ孔のレベルで、下顎骨内面に隆起するような形で、メッケル軟骨の一部だけが存在した。以上のことから、我々は内側層板の突出と屈曲したメッケル軟骨から構成される骨隆起が、下顎隆起の起源ではないかと示唆した。

P2-2

アクリル樹脂脈管注入鋳型法の改良
 ○諏訪 文彦¹、上村 守¹、竹村 明道¹、戸田 伊紀¹、方 一如² (¹大歯大 解剖、²大歯大 歯科 東洋)

【目的】 アクリル樹脂 (AR) 脈管注入鋳型法は、脈管の三次元的形態の観察には優れているが、改良点もある。この改良点は、市販の液体モノマーからハイドロキノン (HQ: 重合防止剤) を蒸留しないで除去する点、注入用 AR を加熱重合せずに粘度を一定にする点、注入の圧力・速度を一定にする点である。今回、これらを改良することを試みた。【方法】 市販の液体モノマーから HQ の除去は、NaOH 法を用いて行った。注入用 AR の粘度調整を一定化するために、液体モノマーと固体ポリマーを混和による方法とした。また、注入用 AR が、硬化し、気泡の発生が起こらない過酸化ベンゾイル (BPO) と N,N-ジメチルアニリン (DMA) の適正混合濃度比率を求めた。手指圧による注入を行わずに、機械的に AR を注入し、圧力・速度を測定した。【結果】 NaOH 法で、HQ が除去され、無色透明の液体モノマーを得ることができた。液体モノマーと固体ポリマーを混和比は、低粘度 AR: 重量比 9:1、高粘度 AR: 重量比 7:3 が適正であった。BPO と DMA の適正混合濃度比率は、注入用 AR の容量に対し、BPO が 1.0% で、DMA が 0.5% であった。低粘度 AR (粘度: 9.07 ± 0.52 mPa・s、量: 45 ml、速度: 5 ml/min、圧力 11.17 ± 1.60 mPa) を注入した後、高粘度 AR (粘度: 1036.33 ± 144.02 mPa・s、量: 5 ml、速度: 1 ml/min、圧力 58.50 ± 5.75 mPa) を注入し、走査型電子顕微鏡で、微細血管構築を観察した結果、毛細血管まで十分に注入されていることが確認された。

P2-4

GDD1/TMEM16E/Anoctamin 5 遺伝子産物の機能解析
 ○飛梅 圭¹、廣野 力¹、杉田 誠¹ (¹広大院医歯薬保 基礎生命)

GDD1 は優性遺伝性の顎骨骨幹異形成症の原因遺伝子としてミスセンス変異型が同定されたが、野生型は TMEM16 ファミリーに属し、TMEM16E と呼ばれる。一方、ナンセンス変異は劣性遺伝形質として肢帯型筋ジストロフィーに連鎖を示す。TMEM16A はカルシウム依存性クロライドチャンネルをコードするが、この遺伝子欠損マウスは筋ジストロフィーを発症しないことから TMEM16E は独自機能を持つことが推測される。本発表では、293 細胞を用いて解析した TMEM16E の特性を報告する。外来性に発現した TMEM16E はタンパク不安定性を示し、プロテアゾーム阻害により分解を免れ、筋分化によってタンパク発現量が亢進した。TMEM16A 発現細胞とは異なり、TMEM16E 発現細胞にカルシウム依存性クロライドチャンネル活性は検出できなかった。また、チャンネル活性部位を TMEM16A に移植したキメラ蛋白質は細胞膜局在およびタンパク安定性を獲得したにもかかわらず、チャンネル活性は示さなかった。TMEM16E を欠損する肢帯型筋ジストロフィー罹患者は筋以外の組織に症状がないことは TMEM16E が筋以外の組織で分解され機能しないことを示唆する。現在、TMEM16E 分子独自の機能、および顎骨骨幹異形成症を発症させるミスセンス変異による機能獲得を解明することを目指し検討を進めている。

P2-5

イレッサ投与による TGFβ3 ノックアウトマウス胎児の口蓋裂表現型の薬理学的改善
 ○滝川 俊也¹、引頭 毅²、高木 秀太¹、今井田 千恵¹ (朝日大 歯 口腔解剖、²朝日大 歯 口腔微生物)

【目的】上皮成長因子受容体(EGFR)を特異的に阻害する分子標的治療薬である肺癌治療薬イレッサがマウス胎児の口蓋突起内側縁上皮細胞(MEE細胞)の最終分化能力へ与える影響、および異なる2系統の TGFβ3 ノックアウト(KO)マウスの口蓋裂表現型に与える影響を調査した。

【方法】イレッサが野生型マウス胎児(ICR および C57BL/6J 系統)の MEE 細胞に与える影響を単一口蓋突起回転浮遊培養法で解析した。また、口蓋裂発症モデルマウスである TGFβ3 KO マウス(ICR および C57BL/6J 系統)の妊娠母獣にイレッサを腹腔内投与して、イレッサ投与がホモ胎児の口蓋裂表現型に与える影響を調べた。

【結果と考察】*in vitro* 解析により、ICR に比べて C57BL/6J 系統の野生型胎児では MEE 細胞の最終分化能力が著しく劣っており、イレッサ投与による EGFR の特異的機能阻害は C57BL/6J 系統の MEE 細胞の最終分化能力を ICR 系統のそれと同等のレベルにまで回復させることが判明した。また、完全口蓋裂のみを呈する C57BL/6J 系統 TGFβ3KO マウスを用いて妊娠母獣にイレッサを腹腔内投与し、妊娠 18 日で口蓋裂表現型を調べたところ、不完全口蓋裂を呈するホモ胎児が認められた。また、不完全口蓋裂のみを呈する ICR 系統 TGFβ3 KO マウスへのイレッサ投与でも口蓋裂表現型がより軽症化することが判明した。これらの結果はイレッサの低濃度短期投与による口蓋裂重症化抑制を標的とした予防的胎児薬物療法の可能性を示唆している。

P2-7

Fgfr1 conditional knock out mice derived ectopic chondrogenesis and osteogenesis in the cranial bone formation
 ○河井 まりこ¹、山本 敏男¹ (岡大 院医歯薬 口腔形態)

FGF(線維芽細胞増殖因子)受容体はその変異や欠損により、口蓋裂や頭蓋縫合早期癒合症などの頭蓋顔面部疾患の原因となることは広く知られているが、その全容は明らかではない。今回、われわれは頭蓋骨発生過程における FGF 受容体の役割を明らかにするため、頭蓋骨形成を担う神経堤細胞における fgfr1 欠損マウスの頭蓋骨形成過程の解析を行なった。具体的には胎生期から経時的に組織標本ならびに骨格標本の作製と解析を行なった。また、胎生期の骨形成関連因子の遺伝子発現解析を *in situ* hybridization にて行なった。Fgfr1 コンディショナル ノックアウトマウスは肉眼的には頭蓋骨の大きさが野生型と比較し、前後長が小さいものの、生後の発育は可能であった。組織学的には HE 染色標本では前頭骨中央部に桿状の異所性軟骨とその上方に骨形成が認められた。また、骨格標本においても同様に異所性軟骨ならびに異所性骨形成が認められた。さらに、胎生 10.5 日には前頭骨形成中央部に細胞の集積が認められ、細胞増殖能 BrdU 染色では陽性細胞がその部位に一致し、認められた。このように fgfr1 コンディショナル ノックアウトマウスでは胎生早期より異所性軟骨ならびに骨形成が認められた。

P2-6

歯の発生過程における重要な血管形成調節因子
 ○春原 正隆¹、佐藤 巖¹ (日歯大 生命歯 解剖一)

Objective : Our proposition in this work was to elucidate the role of some regulators on angiogenesis during tooth development. Method: We performed ISH by using Wnt pathway genes and the regulators of megakaryopoiesis and thrombopoiesis as probes and immunohistochemically stained serial sections of dental tissues with the antibodies against them. Result: We observed these genes in dental papilla and mesenchymal layers. β-catenin and its transcript were observed in mesenchymal layers and in dental papilla. On the other hand, the regulators of megakaryopoiesis and thrombopoiesis were also observed in mesenchymal layers. Conclusion: These findings suggested that Wnt signaling pathway is crucial and the regulators of megakaryopoiesis and thrombopoiesis also might have some roles in angiogenesis during tooth development in mice. *This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (No.22592052).

P2-8

マウス大腿骨における活性酸素除去酵素 (SOD) の発現
 ○安部 仁晴¹、柏原 祥顕²、菊地 隆太³、中川 敏浩¹、渡邊 弘樹¹ (奥羽大 歯 生体構造 口腔組織、²奥羽大 院歯 口腔組織構造生物、³奥羽大 院歯 顎口腔外科)

【目的】活性酸素はシグナル伝達や様々な生理的役割を担い、生体内では欠くことはできないが、活性酸素の過剰な発生は細胞障害を引き起こす。この過剰な活性酸素を細胞内より除去するために、活性酸素除去酵素 (SOD) が発現する。これまで我々はマウス大腿骨を用い、軟骨内骨発生における活性酸素合成酵素の発現を検索し、活性酸素が軟骨細胞の増殖と分化および骨基質形成に関与することを本学会にて報告した。今回は、SOD の発現を検索し、活性酸素合成酵素の局在と比較検討した。

【材料と方法】材料には 3、18 週齢マウス大腿骨を用いた。方法は 4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定、大腿骨を摘出後、同液にて浸漬固定、10% EDTA にて脱灰、パラフィン包埋した。薄切後、通法に従い免疫組織化学的染色を行い光顕観察した。

【結果】3 週齢マウス大腿骨における抗 Mn-SOD の反応は、前肥大細胞層に限局して弱陽性反応が観察された。また、骨化帯の骨芽細胞では、抗 Mn-SOD 陽性反応は観察されなかった。18 週齢では抗 Mn-SOD 陽性を示す細胞はほとんど観察されなかった。

【考察】活性酸素除去酵素の一種である Mn-SOD について検討したところ、前肥大細胞層に限局して発現が観察されたことから、Mn-SOD は軟骨細胞の分化を調節している可能性、活性酸素の過剰な蓄積による細胞死を制御している可能性が考えられた。

P2-9

両生類 *Xenopus laevis* (アフリカツメガエル) における DMP1 遺伝子の同定および発現解析
 ○米倉 智子¹、本間 宏実¹、桜井 敦朗¹、森口 美津子²、見明 康雄²、豊澤 悟³、新谷 誠康¹ (東歯大 小児歯、²東歯大 超微、³阪大 歯 病理)

【目的】 Dentin Matrix Protein 1 (DMP1) は主に骨細胞や象牙芽細胞で産生され、硬組織の石灰化に関与する細胞外基質タンパク質である。本研究では両生類のアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*; カエル) において DMP1 遺伝子の同定および発現解析を行い、分子進化学的に検討した。【方法】カエル顎骨 cDNA ライブラリーおよびゲノム DNA を用いて、カエル DMP1 の塩基配列と遺伝子構造を決定した。さらに、リアルタイム PCR および *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、カエル DMP1 遺伝子の発現を解析した。【結果および考察】カエル DMP1 の推定アミノ酸配列は羊膜類と比較して相同性は低いものの、その遺伝子構造やアミノ酸の構成比率は酷似していた。また、その遺伝子は歯を含んだ顎骨および脛骨、大腿骨骨頭において特異的に発現し、骨では骨細胞、歯では主に象牙芽細胞において発現していることが示された。しかし、カエル DMP1 遺伝子の発現は初期から中期の歯胚の象牙芽細胞に認められるが、後期には認められなくなった。従って、哺乳類とは異なり、カエル DMP1 は象牙質の形成のみに関与し、維持には関与しないと考えられた。以上の結果から、DMP1 は進化速度が速い分子であるものの、四肢動物においては一貫して骨や歯の形成および骨の恒常性の維持に関与していることが示された。

P2-10

歯髓細胞クローンの分化能の違いによる遺伝子発現の変動
 ○小林 朋子¹、鳥居 大祐¹、筒井 健夫¹、筒井 健機¹ (日歯大 生命歯 薬理)

【目的】 ヒト歯髓細胞クローンの分化能の違いと発現遺伝子の相違を解析した。
 【方法】 11 歳女性埋伏智歯由来初代歯髓培養細胞から 50 クローンを単離した。石灰化能 (Osteogenic:O) と軟骨分化能 (Chondrogenic:C)、および脂肪分化能 (Adipogenic:A) は組織化学染色法で検討した。各クローンを aging に達するまで継続培養した。網羅的遺伝子発現は DNA マイクロアレイで解析した。
 【結果】 細胞集団倍加数が 40 以上まで分化能を維持した細胞は 5 クローンあり、その内訳は、3 種類の分化能 (OCA) を有するものが 3 クローン、2 種類の分化能 (OC) を有するものが 1 クローン、1 種類の分化能 (O) を有するものが 1 クローンであった。これら 5 クローンの分化能の違いと発現遺伝子の相違との関係を解析したところ、OCA と OC、OC と O の比較では、細胞周期や細胞増殖関連遺伝子が主に変動していた。また、OCA と OC、O の順に発現が下降する遺伝子は 946 個で糖代謝関連遺伝子等が多く、OCA、OC、O の順に発現が上昇する遺伝子は 876 個で細胞周期や分化関連遺伝子等が変動していた。
 【考察】 多分化能を有する間葉系幹細胞様クローンでは細胞分裂関連遺伝子が多く発現変動し、エネルギー代謝が活発なこと、分化能がより限定されたクローンでは分化関連遺伝子の発現が変動することが示唆された。今後、遺伝子の強制発現や発現抑制試験を行い分化能との関連を検討し、分化能マーカーとなる候補遺伝子の絞り込みを行う予定である。

P2-11

筋発生関連因子における筋関連 microRNA 標的の進化
 ○安藤 準¹、山根 明¹ (鶴見大 歯 物理)

Pax-3, Pax-7 および miR-1, 133 は筋発生に関与し、進化の歴史上殆どの左右相称動物が持つ因子だが、Pax-3/7 における miR-1/206, 133 の標的配列は主に脊椎動物を中心に存在することを昨年の歯科基礎医学会で発表した。今回は microRNA およびその標的となる筋関連因子の対象を広げて解析した結果、若干の知見を得たので報告する。miR-1/206, 133, 181, 208 の標的配列は、全体として構造タンパク質の 3'-UTR には標的配列は少ないが、転写因子である Pax3/7、増殖因子の IGF-1/2 の 3'-UTR に多く存在することが明らかになった。また miR-1, 133 の標的配列が主として脊椎動物に偏る傾向は Pax-3/7 以外でも共通であった。miR-181, 208 は脊索動物以降に出現するにもかかわらず、脊椎動物以前から標的配列が認められた。いっぽう筋発生と関係がないと考えられ、なおかつ多細胞動物に広く保存されている miR-10, 99/100 については標的配列が散見されるものの、その存在確率は筋発生に関係の深いと考えられる microRNA と比較し明らかに低かった。以上の結果から、microRNA による筋発生の制御は主に Pax-3/7, IGF を介して、脊椎動物を中心とした大型で体制の複雑な動物においてその関与がより強いと考えられる。

P2-12

Cytokines-induced matrix metalloproteinase (MMP)-3 regulated cell proliferation in odontoblast-like cell derived from mouse embryonic stem (ES) cells
 ○檜山 太希¹、尾関 伸明¹、山口 秀幸¹、中田 和彦¹、茂木 眞希雄²、中村 洋¹ (愛院大 歯 歯内治療、²愛院大 薬 生体機能化学)

OBJECTIVES: The present study used odontoblast-like cells derived from ES cells transfected with siRNA to reduce MMP-3 levels to investigate whether induction of MMP-3 expression by cytokines suppressed apoptosis and promoted cell proliferation. METHODS: We used a MMP-3 activity assay, a cell proliferation assay, and DNA fragmentation ELISA analysis to evaluate the siRNA-mediated down-regulation of MMP-3 expression and activity, and any changes in the proliferative/apoptotic responses associated with this reduced expression. RESULTS: Cytokines induced the expression of MMP-3 mRNA and protein, and increased activity and cell proliferation, but not apoptosis. When MMP-3 expression was silenced by MMP-3 siRNA, we noted a potent and significant suppression of cytokines-induced MMP-3 expression and activity, decreased cell proliferation and increased apoptosis. CONCLUSIONS: Our results suggest that cytokines induce MMP-3-regulated cell proliferation and anti-apoptosis effects in odontoblast-like cells derived from ES cells in addition to their better documented destructive role in inflammation.

P2-13

α7 integrin-positive human skeletal muscle stem cells differentiate into odontoblast-like cells with induction of altered adhesive and migratory phenotype

○尾関 伸明¹、茂木 眞希雄²、山口 秀幸¹、檜山 太希¹、中田 和彦¹、中村 洋¹ (1愛大院 歯内治療、2愛大院 薬 生体機能化学)

【目的】 We examined whether *α7* integrin-positive human skeletal muscle stem cells (*α7*⁺ hSMSC) would have the potential to differentiate into the odontoblast-like cells. **【Methods】** Cell aggregates were cultured with retinoic acid (RA), plated on gelatin scaffold (GS) and cultured with bone morphogenetic protein-4 (GS/BMP-4). Odontogenic differentiation was assessed by expression of odontoblast phenotype such as DSPP, Enamelysin and ALP. We examined modulation of integrin expression and adhesion/motility functions with ECM. **【Results】** Following RA and GS/BMP-4 treatment, *α7*⁺ hSMSC transdifferentiated along an odontogenic pathway expressing DSPP and enamelysin. The differentiated cells acquired specific function, as evidenced by the appearance of odontoblastic phenotypes such as ALP and calcification. Since anti-*α1* integrin antibody could suppress the expression of odontoblastic markers such as DSPP and Enamelysin using current cultured system. **【Conclusions】** These findings demonstrate that *α7*⁺ hSMSC are pluripotent stem cells capable of differentiation along odontogenic lineages.

P2-15

培養ヒト歯根膜細胞の特性と硬組織形成能の解析
○鳥居 大祐¹、古西 清司²、後藤 真一³、筒井 健機¹ (1日歯大 生命歯 薬理、2日歯大 生命歯 微生物、3日歯大 新潟生命歯 理工)

【目的】 歯根膜には骨芽細胞やセメント芽細胞への分化能を持つ歯小嚢由来前駆細胞の存在が知られている。しかし、その特性やセメント芽細胞への分化過程には不明な点が多い。今回、骨髄間質や真皮で存在が確認されている多能性幹細胞と同様の表面抗原を発現する少数細胞を培養ヒト歯根膜細胞から分取し、それらのセメント芽細胞分化能を検討した。**【方法】** ヒト歯根膜由来正常細胞 (Pel) と不死化細胞 (Pelt) を FACS 解析し分取前後の細胞について BMP-2 または BMP-7 刺激によるセメント芽細胞分化を定量 RT-PCR や免疫染色で検討した。また、石灰化培地で培養した細胞を alizarin red (AR) 染色および EPMA で解析した。**【結果】** Pel および Pelt では 99.8% 以上が間葉系マーカー CD44、73、90、105 陽性であった。多能性幹細胞マーカーである SSEA-3 の陽性率は 0.8% 以下であった。一方、BMP-2 や BMP-7 刺激後 2 週目の細胞ではセメント芽細胞マーカーの CAP と CEMP1 の発現が上昇した。また、石灰化誘導後 3 週目では AR 陽性の結節様構造物が観察され、EPMA でカルシウムとリンが検出された。CD44、105、SSEA-3 共陽性細胞の BMP-7 刺激後 2 週目の細胞では、CAP および CEMP1 が陽性であった。**【考察】** 培養ヒト歯根膜細胞は少数の SSEA-3 陽性細胞を含みセメント芽細胞や石灰化能陽性細胞に分化し得ることを確認した。これらの特性は不死化後の細胞にも維持されていた。(会員外共同研究者：国立成育医療研究センター 成育遺伝 渡辺信之)

P2-14

Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞の作製

○藤原 弘明¹、清島 保¹、永田 健吾¹、和田裕子¹、木原 慎子^{1,2}、長谷川 佳那^{1,3}、染矢 祐孝^{1,4}、坂井 英隆¹ (1九大 院歯 口腔病理、2九大 院歯 歯科矯正、3九大 院歯 歯科保存、4九大 院歯 口腔機能修復)

【目的】 現在、ヒト由来の歯原性間葉細胞の作製の報告は見られるが、歯原性上皮細胞の作製の報告は未だに報告がない。本実験の目的は、歯の再生に必須な歯原性上皮細胞の作製である。**【材料と方法】** ヒト由来の角化細胞 (HaCaT 細胞) に当研究室において歯胚発生初期に重要な働きをしていると報告してきた Thymosin beta 4, X-linked (TMSB4X) を導入し、TMSB4X 過剰発現株において歯原性因子の発現や石灰化形成能の有無を分子生物学的手法および免疫細胞化学染色などを用いて解析を行った。**【結果および考察】** TMSB4X 過剰発現株を 3 週間の石灰化誘導培養を行ったところ、石灰化がみられた。歯原性上皮に発現がみられる CK14 や PITX2 の有意な上昇が認められた。また、Type II RUNX2、や歯原性因子 (amelogenin, ameloblastin, enamel) の mRNA および蛋白の発現レベルの有意な上昇を認め、免疫細胞化学染色においてもこれらのタンパクの共発現がみられた。TMSB4X 過剰発現株を石灰化誘導 1 週後にヌードマウス背部皮下に移植し、3 週および 6 週飼育後に移植部位に石灰化を認め、in vitro と同様の結果を得た。以上の結果から HaCaT 細胞に TMSB4X を導入することで歯原性上皮細胞の作製の可能性が示唆された。

P2-16

マウス歯肉上皮由来角化細胞への Thymosin beta 4 遺伝子導入による歯原性上皮細胞誘導

○染矢 祐孝^{1,2}、清島 保¹、永田 健吾¹、和田裕子¹、藤原 弘明¹、木原 慎子^{1,3}、長谷川 佳那^{1,4}、古谷野 潔²、坂井 英隆¹ (1九大 院歯 口腔病理、2九大 院歯 インプラント・義歯補綴、3九大 院歯 歯科矯正、4九大 院歯 歯科保存)

【目的】 Tb4 (Thymosin beta 4) は、beta-thymosin ファミリーに属する 43 個のアミノ酸からなるペプチドでありアクチン重合阻害作用を有することで知られている。本研究室では過去に Tb4 がマウス下顎第一大臼歯の発生初期に歯胚上皮に強発現しており、Tb4 をノックダウンすると歯胚の発生・発育が障害されることを明らかにした。また Tb4 には細胞の形質転換を促進する Direct-reprogramming 作用が報告されている。本研究では Tb4 遺伝子の導入により初代歯肉上皮細胞が歯原性上皮細胞へ形質転換を起こすかどうか検討した。**【方法】** BALB/C マウス (生後 2-3 週齢) の歯肉上皮組織より初代上皮細胞を単離し Lipofection 法により Tb4 を遺伝子導入し Tb4 強制発現株を作製した。Tb4 強制発現株に対し real-time PCR を行い歯原性因子の発現解析、石灰化誘導実験において石灰化物生成の有無を調べた。**【結果と考察】** real-time PCR の結果より、Tb4 非導入細胞に比べて、Tb4 強制発現株では Tb4 の発現量が増加していた。本発表では Tb4 を強制発現させたマウス口腔粘膜上皮細胞における歯原性因子の発現や石灰化物形成などについて解析し、歯原性上皮細胞への形質転換の可能性について検討した。

P2-17

ヒト乳歯歯髓組織由来の不死化細胞は骨および脂肪細胞への分化能を持つ

○赤澤 友基¹、長谷川 智一¹、帖佐 直幸²、吉村 善隆³、浅川 剛吉⁴、石崎 明²、岩本 勉^{1,5}
 (¹徳大 病院 小児歯、²岩医大 生化 細胞情報、³北大 院歯 口腔病態 細胞分子薬理、⁴昭大 スペシャルニーズ口腔医学 障害者歯科、⁵徳大 院 HBS 医療創生科学 社会環境衛生 小児歯)

【目的】 齶蝕や外傷における歯髓組織の再生機構および恒常性の維持には、歯髓細胞の修復制御機構について検討することが重要であると考えられるが、研究に必要な歯髓細胞には不死化した細胞株が存在しないのが現状である。そこで今回、ヒト乳歯歯髓より分離した線維芽細胞様細胞（乳歯歯髓細胞）に対して (*hTERT*) 遺伝子を導入し不死化細胞株の樹立を行ったので報告する。【方法】 咬合誘導を目的として抜去された乳歯より歯髓組織を無菌的に分離し、分離した歯髓細胞に対して neomycin 耐性遺伝子を持つ *pBABE-neo-hTERT* plasmid の安定的遺伝子導入を行った。その後 single cell cloning を行い、石灰化能および脂肪細胞への分化能の検討を行った。【結果】 single cell cloning により 27 clones の細胞株が得られた。これらのうち 3 clones の細胞株は *hTERT* 活性を有し、細胞倍化指数は 100 PDs 以上を示し、不死化していると考えられた。このうちの 1 つの細胞株は von Kossa 染色陽性の石灰化能と、oil-red O 染色陽性の脂肪細胞への分化能を有していた。【考察】 今回樹立したヒト乳歯歯根膜細胞の不死化細胞株は、今後の再生医療研究や歯科修復材料の細胞毒性試験に非常に有用であると考えられる。

P2-19

両生類顎槽骨の再生過程における甲状腺ホルモンレセプターの発現について

○三輪 容子¹、春原 正隆¹、山口 泰平²、佐藤 巖¹ (¹日歯大 生命歯 解剖 1、²鹿大 院歯 歯健康科学 発生発達成育)

【目的】 哺乳類は肝臓部など一部の臓器にのみ再生能を有するが、有尾両生類アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) は四肢のみならず顎骨においても切断後数カ月で歯や歯周組織も含めた顎骨がほぼ完全な形で再生することが報告されている。甲状腺ホルモンは脊椎動物に共通して存在し骨形成と骨吸収を促進し骨代謝回転を高める作用を有することが知られている。アカハライモリを用いて下顎骨歯槽部切断後の再生実験を行い再生途中の顎骨における甲状腺ホルモンレセプターの発現を検討し顎骨再生時の甲状腺ホルモンの影響を考察した。【方法】 東北産アカハライモリの下顎骨右側歯槽骨を切断し 50 日間飼育した後、下顎骨を採取した。固定・脱灰後にパラフィン切片を作製し組織学的に顎骨再生の過程を観察した。また in-situ ハイブリダイゼーション法にて甲状腺ホルモンレセプターの mRNA 発現を検出した。【結果と考察】 歯槽骨切断後 50 日の下顎骨において歯槽骨切断部では外側皮質骨から内部にかけて再生した骨組織が観察された。甲状腺ホルモンレセプター mRNA は再生中の顎骨周囲の線維芽細胞に散在して発現していた。このことから甲状腺ホルモンは顎骨再生において何らかの影響を及ぼしていると考えられる。

P2-18

間葉系幹細胞が分泌する SCRG1 は骨分化を抑制する

○青松 恵美子¹、帖佐 直幸²、衣斐 美歩²、客本 齋子²、加茂 政晴²、長谷川 智一³、佐藤和朗¹、三浦 廣行¹、石崎 明² (¹岩医大 歯 矯正、²岩医大 生化 細胞情報、³徳大 院 HBS)

【目的】 SCRG1 は間葉系幹細胞 (MSC) の骨分化に伴って発現量が大きく減少するシステインリッチペプチドで、哺乳動物において高度に保存された遺伝子であるが、その機能は明らかになっていない。本研究では SCRG1 が MSC の増殖や骨分化に及ぼす影響について検討した。【材料と方法】 ヒト骨髄由来 MSC、UE7T-13 細胞を組換え SCRG1 を添加した骨分化誘導培地で培養し、カルシウム沈着をアリザリンレッド染色で評価した。また SCRG1 添加による細胞増殖活性への影響は WST-1 アッセイによって評価した。SCRG1 刺激による細胞内シグナル伝達経路の活性化、とくに MAP キナーゼファミリーと PI3 キナーゼ/Akt 経路については、ウェスタンブロットにて検討した。【結果】 骨分化誘導培地に SCRG1 を添加することによって濃度依存的にカルシウム沈着が抑制された。SCRG1 が MSC の細胞増殖活性に及ぼす影響については、SCRG1 添加により細胞増殖はわずかに増加したものの、SCRG1 非添加群と比較して有意差は認められなかった。さらに SCRG1 刺激による細胞内シグナル伝達経路を検討した結果、Akt のリン酸化が顕著に増強された。【考察および結論】 SCRG1 は PI3 キナーゼ/Akt 経路を活性化することによって MSC の骨分化を抑制することが示された。SCRG1 は MSC が産生・分泌することから、オートクリン/パラクリン的に作用することにより、MSC の未分化能維持に寄与する可能性が示唆された。

P2-20

抜歯創治癒に関与する骨髄由来細胞の動態について

○佐藤 泰生¹ (¹岩医大 病理 病態解析)

【目的】 体性幹細胞は、幹細胞周囲の微小環境 (ニッチ) で制御され維持されると考えられている。しかし成体の抜歯創治癒過程において、幹細胞を含む骨髄ニッチ構成細胞の動態は不明である。そこで本研究では、ラットの抜歯後経過の組織材料を用いて、骨髄ニッチ構成細胞を特徴づけるマーカーの発現を観察し細胞の動態とマーカー分子の機能を検討した。【方法】 ラットの上顎第一臼歯を抜去し、術後 12 時間、1, 3, 5, 7, 10 日目の抜歯創を含む組織切片を作製した。骨髄ニッチ構成細胞とみなされている、SNO 細胞のマーカー: N-cadherin、CAR 細胞のマーカー: CXCL12 (SDF-1)、洞様毛細血管内皮のマーカー: CD31、造血幹細胞のマーカー: CD150 について、蛍光抗体直接法にて組織学的に観察した。【結果と考察】 N-cadherin の発現は骨髄の骨内膜と抜歯窩に新生した骨梁の周囲にみられた。CXCL12 の発現は、抜歯後 1 日では抜歯窩壁の血管内に認められ、3 日では抜歯窩内の線維芽細胞様細胞にみられた。5 日ないし 7 日では抜歯窩に隣接する骨髄の、抜歯窩側の骨内膜および骨髄細胞に強く発現していた。10 日では抜歯窩内の骨梁間に認められた。CD150 は、骨髄内と 5 日ないし 7 日の新生骨梁間にみられた。抜歯創治癒に関与する骨髄由来細胞の移動には CXCL12 の発現が重要な役割を担っていることが示唆された。

P2-21

HDACi 処理細胞移植による骨増成法の検討

○江口 香里¹、秋葉 陽介^{1,2}、秋葉 奈美^{1,2}、北見 恩美^{1,3}、加来 賢¹、魚島 勝美^{1,2} (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)

抗癌剤、抗てんかん薬として臨床応用されているヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDACi) にはエピジェネティクス制御による転写活性、遺伝子発現能があることが知られている。これまでに我々は *in vitro* において VPA、TSA による骨芽細胞分化促進に関する知見を得ているが、HDACi 処理された細胞の移植による *in vivo* での骨形成を観察した報告は未だ見られない。本研究では各種 HDACi の骨芽細胞分化促進作用を検索し、HDACi によって処理された細胞の *in vivo* における骨形成能について検討した。ラット大腿骨から採取した骨髄間質細胞を各種 HDACi で処理し、骨芽細胞の石灰化能に与える影響に関して検索したところ、VPA、TSA に加え BML210、SAHA において石灰化の上昇が観察された。また、コラーゲンスポンジに骨髄間質細胞を播種、HDACi で処理した後、ラット頭蓋骨に形成した限界径骨欠損部に移植し、移植後 3 週間後 μ CT を用いた 3 次元再構成画像により評価したところ、対照群に比較して HDACi 処理細胞移植欠損において欠損中央部における新生骨形成の促進が観察された。以上の結果から HDACi の種類によって骨形成能賦活化作用に差があることが示唆され、更に細胞への HDACi 処理を既存の骨増成法と併用することによって、より確実に予知性の高い骨増成法が開発できる可能性が示唆された。

P2-23

象牙芽細胞様細胞に対する多血小板血漿の作用

○Yeom kyounghun^{1,2}、鷲尾 絢子¹、有吉 渉²、北村 知昭¹、西原 達次² (九歯大 保存治療、²九歯大 感染生物)

多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma; PRP) は成長因子を多く含み、創傷治癒や組織再生に効果があると言われている。本研究では、象牙芽細胞様細胞 (KN-3 細胞) を用い、PRP が KN-3 細胞の抗炎症作用と分化能に与える影響を検討した。KN-3 細胞を 0、0.1、1、2、5、10% の PRP を含有した培地で 6 時間、あるいは 5% PRP で 0、1、3、6、12、24 時間培養後、抗炎症反応を示す IL-1Ra とラクトフェリン、および炎症性サイトカインである IL-1beta の発現を real time PCR で解析した。また、KN-3 細胞が示す象牙芽細胞分化能への影響を検討するため、0、0.1、1、2、5、10% の PRP を含有した培地で KN-3 細胞を 1 時間培養し、象牙芽細胞分化マーカーである dentin sialophosphoprotein (DSPP) および dentin matrix protein-1 (DMP-1) の発現を real time PCR で解析した。さらに、石灰化能への影響を検討するため、5% PRP を含有した培地で 0、3、7、10、14 日培養後、alkaline phosphatase (ALP) 染色を行った。その結果、5% PRP により IL-1Ra とラクトフェリンの発現は時間依存的・濃度依存的に増加した。一方、IL-1beta 発現には有意な変化はなかった。さらに、DSPP および DMP-1 発現は PRP 濃度依存的に増加し、ALP 活性は PRP の作用時間に依存して増加した。以上より、PRP は抗炎症作用とともに象牙芽細胞への分化誘導能・石灰化能を促進する可能性が示唆された。

P2-22

複数サイトカインによる同時刺激は間葉系幹細胞の骨分化誘導能を促進する

○横田 潤¹、帖佐 直幸²、高橋 典子²、衣斐美歩²、客本 斉子²、加茂 政晴²、長谷川 智一³、近藤 尚知¹、石崎 明² (岩医大 歯 インプラント、²岩医大 生化学 細胞情報、³徳大 院 HBS)

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) の骨分化は様々な成長因子の作用によって制御される。本研究では骨形成のカップリングファクターである TGF- β に着目し、TGF- β と他の成長因子の組合せが MSC の骨分化能に及ぼす影響を検討した。【材料と方法】ヒト骨髄由来 MSC、UE7T13 細胞を TGF- β 単独または TGF- β と IGF-I、PDGF、VEGF の 2 種類の成長因子を添加した骨分化誘導培地で培養し、Alizarin Red 染色による石灰化能の評価ならびに骨分化マーカー遺伝子の発現を RT-PCR で解析した。さらに、細胞内シグナル伝達因子のリン酸化をウェスタンブロットで解析した。【結果】MSC の石灰化能は TGF- β と他の成長因子を組合せることによって増強され、アルカリホスファターゼの mRNA 発現も上昇した。さらに 2 種類の成長因子の添加群のみで骨シアロタンパクの発現が検出された。TGF- β と他の成長因子の共刺激によって ERK と Akt のリン酸化が増強され、特に TGF- β と PDGF の組合せで顕著であった。TGF- β と PDGF 共処理による石灰化能の増強は MEK ならびに PI3K 阻害剤で有意に抑制された。【結論および考察】TGF- β による MSC の骨分化誘導能は IGF-I、PDGF、VEGF といった複数の成長因子の存在によって増強され、この効果は MEK/ERK や PI3K/Akt といった細胞内シグナル伝達に依存することが示された。MSC の細胞内シグナル伝達を制御することによって骨再生促進効果が期待される。

P2-24

ラット臼歯矯正移動時における歯髄内 prostanoid receptor の遺伝子発現と免疫組織学的局在解析

○大倉 直人¹、大倉 麻里子²、重谷 佳見¹、吉羽 永子¹、吉羽 邦彦¹、齋藤 功²、興地 隆史¹ (新大院医歯 う蝕、²新大院医歯 歯科矯正)

歯の移動時に生じる痛みの機構については、主として歯根膜神経の変化が報告されているが、歯髄の変化はほとんど解析されていない。そこで本研究では、急性炎症や痛みの調節因子である prostaglandin (PG) E₂、I₂ に着目し、矯正力を負荷されたラット臼歯歯髄におけるこれらの受容体 (EP1-4 および IP receptor) の mRNA 発現および免疫組織化学的局在を解析した。8 週齢の Wistar 系ラットを使用し、Waldo の方法に準じ、上顎右側第一、第二臼歯間にエラスティック片を挿入して実験的に矯正力を 24 時間負荷した後、第二大臼歯の歯冠歯髄における prostanoid receptor の mRNA 発現をリアルタイム PCR で解析するとともに、これらの局在を蛍光抗体法で観察した。その結果、矯正力負荷によって第二大臼歯歯髄において、EP4 および IP の mRNA 発現レベルが有意に上昇することが確認された。また、蛍光二重染色によって IP と neurofilament との共染色が認められた。歯髄では IP が末梢神経に発現しており、歯の移動時の痛覚受容に関与する可能性が示唆された。

P2-25

ヒト歯髄幹細胞に対するビリルビンの影響

○星野 慶弘¹、山座 孝義²、馬 蘭¹、山座 治義¹、野中 和明¹ (¹九大 院歯 小児口腔医学、²九大 院歯 分子口腔解剖)

【目的】先天性胆道閉鎖症などによる高ビリルビン血症患者においては、ビリルビンの沈着によって起こるビリルビン着色歯、歯肉の黄染と易出血性、う蝕の多発、歯胚形成の遅延、歯髄腔の拡大などの口腔内臨床症状が報告されている。しかし歯胚形成や象牙質形成に対するビリルビンの直接的な作用については不明のままである。本研究では、象牙質細胞の幹細胞とされる歯髄幹細胞の生存や細胞増殖に対するビリルビンの影響について解析した。【方法】健康者より脱落乳歯を採取し、その歯髄より歯髄幹細胞を単離・培養した。培地にビリルビンを添加し、一定時間後の細胞生存数を解析した。さらにビリルビン影響下での歯髄幹細胞の細胞増殖能および細胞死についても検討した。【結果】対照群と比較してビリルビン作用群では、乳歯幹細胞の生存が有意に減少していた。またビリルビン影響下では歯髄幹細胞の増殖能は低下し、さらにアポトーシスを思わせる細胞死が観察された。【考察】高ビリルビン血症においては、ビリルビンが直接的に歯髄幹細胞の増殖や生存を低下させ、歯胚形成や象牙質形成に影響を与えていると示唆された。

P2-26

歯胚初代上皮細胞における結合組織増殖因子 CCN2 の発現とその役割

○志茂 剛¹、栗尾 奈愛¹、奥井 達雄¹、黒田 大雅¹、松本 憲一¹、堀切 優¹、伊原 聡一郎¹、吉岡 徳枝¹、佐々木 朗¹ (¹岡大 院歯 歯髄 口腔顎顔面外科)

【緒言】結合組織増殖因子 (CTGF/CCN2) は歯胚発生過程で内エナメル上皮に発現するが、in vitro におけるその発現と機能は明らかとなっていない。本研究では、ウシ鐘状期歯胚上皮細胞初代培養系を用い CCN2 発現およびその機能を調べたので報告する。【方法および結果】ウシ鐘状期歯胚から上皮細胞を dispase を用いて単離、初代培養し、アスコルビン酸、beta-glycerol phosphate 添加し、[35S]methionine ラベルした細胞でパルスチェイスを行うと、I 型コラーゲン、また、ALP 活性、Ca 産生量の異なった培養系が確立できた。15% ウシ胎児血清存在下で培養を行うと、増殖期には CCN2 の著しい発現上昇を、一方静止期ではその発現は減少することが、Northern blot 解析で明らかとなった。また、組換え CCN2 タンパク質で歯胚上皮細胞を刺激すると、FGF-2 と相乗的に増殖能を増大させ、BMP-4 と協同的に ALP 活性を上昇することが明らかとなった。【結論】CCN2 は歯胚上皮細胞の増殖期に増大し、オートクライン作用により、細胞増殖、分化を FGF-2、BMP-4 とともに促進させることが示唆された。(会員外共同研究者：小山英樹)

P2-27

トガリネズミの上顎臼歯の咬頭形成順序

○山中 淳之¹、岩井 治樹¹ (¹鹿大 院歯 歯科機能形態)

現生の有袋類や有胎盤哺乳類の臼歯の歯冠形態は著しい多様性を示すが、これらは全て白亜紀前期に登場したトリボスフェニック型臼歯を基本形にして進化してきたものである。トガリネズミなどの食虫類は現在もこの基本形の臼歯形態を保持している。本研究はトガリネズミ科の実験動物スunks (*Suncus murinus*) の臼歯の発生過程を調べることで、咬頭形成と形態形成期のシグナリングセンターであるエナメル結節との関係を明らかにするものである。スunks 胚頭部の前頭断連続組織切片を作製し、H-E 染色、*Shh*, *Fgf4* の *in situ* hybridization を行った。上顎第一大臼歯 (M¹) の歯胚上皮の 3 次元再構築を行い、それに *Shh*, *Fgf4* の発現部位を重ね合わせた。帽状期の 1 次エナメル結節の一部が、鐘状期前期の 2 次エナメル結節に引き継がれ、これが将来の M¹ の paracone に相当した。これはマウスの歯胚の結果と一致し (Cho et al., 2007)、古生物学における最初の咬頭とも一致する (Osborn, 1981)。歯胚サイズの増大とともに、一定の間隔をあけて別の 2 次エナメル結節が次々に出現した。paracone の次に、metacone, protocone, hypocone, それから類側の styler cusps の順番で 2 次エナメル結節が出現した。スunks の M¹ では、metacone が最初に石灰化を開始するので (花村他, 1983)、2 次エナメル結節の出現の順序と咬頭の石灰化の順序は必ずしも一致しないことが分かる。

P2-28

硬骨魚類条鰭類ガアの歯とガノイン鱗の比較

○笹川 一郎¹、石山 巳喜夫²、横須賀 宏之²、三上 正人³、内田 隆⁴ (¹日歯大 新潟生命歯先端研、²日歯大 新潟生命歯解剖二、³日歯大 新潟生命歯微生物、⁴広大院歯歯髄 口腔細胞生物)

【目的】歯の起源については大別して外胚葉由来と内胚葉由来の二説がある。外胚葉説では鱗から歯が由来するので両者は相同とされる。歯と鱗の形態学的比較はあるものの、発生過程や組織化学による有機基質の比較はまだ不十分である。歯の起源研究の一環として、硬骨魚類の鱗表層の ganoine と歯の enamel を比較し、その同一性を検討した。【方法】硬骨魚類条鰭類ガアの顎歯の collar enamel と鱗の ganoine を材料とした。有機基質を検討するため、哺乳類 amelogenin 由来の抗体、抗血清および部位特異抗体を用い、protein A-gold 法 (光顕・電顕) により免疫組織化学を行った。電顕で微細構造も観察した。【結果と考察】鱗の ganoine 基質 (preganoine) は抗 amelogenin 抗体に反応し、その使用各抗体に対する反応は歯の collar enamel の場合とほぼ同様であり、enameloid には反応が出ない。これより、ganoine には amelogenin 類似タンパクが存在し、これは歯の collar enamel のものと同じかよく似ていると考えられる。また、ganoine 形成期に存在する有機基質は、高石灰となる成熟期には消失することから、結晶の成長に伴う有機基質の脱却機構の存在が示唆される。これは、歯の enamel 形成の成熟期の機構に類似すると考えられる。これらの知見は、鱗の ganoine が歯の enamel と相同とする説を支持する。

P2-29

皮下移植歯の歯髄腔内に形成される骨様組織の由来

○細矢 明宏¹、雪田 聡²、吉羽 邦彦³、吉羽 永子³、笠原 悦男⁴ (¹松歯大 解剖²、²静岡大 教育 理科教育、³新大 院医歯 う蝕、⁴松歯大 保存²)

【目的】歯髄は外部刺激に反応して骨様および象牙質様組織を形成するが、歯髄腔内に現れる骨芽細胞様細胞の由来ならびに分化機構は不明である。そこで本研究では、歯髄の潜在的骨様組織形成能を明らかにする目的で、ラット臼歯皮下移植後の硬組織形成過程を免疫組織化学的に観察した。【方法】4週齢 GFP 発現ラット上顎第一臼歯を抜歯し、ただちに野生型ラット腹部皮下へ他家移植した。5-20日後に移植歯を周囲組織と共に取り出し固定、GFP、 α -平滑筋アクチン (SMA)、Smad4、Runx2、Osterix の局在を観察した。【結果と考察】移植5日後、歯髄上部に壊死がみられ、典型的な象牙質細胞は消失したが、根尖部の象牙質に接して多数の細胞を封入した新生硬組織が認められた。10日後、壊死組織の回復とともに、歯冠部歯髄で幼若骨様組織が形成された。20日以降、根尖部および歯冠部歯髄に形成された硬組織は量を増し、組織学的に骨様を呈した。GFP の免疫反応は、根尖部および歯冠部歯髄の骨芽細胞様細胞で認められた。幹細胞マーカーの一つである α -SMA は歯冠部の骨様組織周囲の細胞で陽性を示したが、根尖部歯髄では陰性であった。一方、骨芽細胞分化マーカーの Smad4、Runx2 ならびに Osterix は、根尖部および歯冠部歯髄の骨芽細胞様細胞で陽性反応がみられた。以上より、歯髄には分化段階の異なる骨芽細胞前駆細胞が存在し、広範囲な歯髄傷害後に骨様組織を形成することが明らかとなった。

P2-31

AKT シグナルがグリコーゲン代謝を促進しエナメル芽細胞分化を誘導する

○依田 浩子¹、大島 勇人¹、原田 英光² (¹新大院医歯 硬組織形態、²岩医大 解剖 発生生物・再生医学)

【目的】エナメル芽細胞分化過程におけるグリコーゲン合成、蓄積ならびに分解の動態を明らかにするとともに、細胞内グリコーゲン蓄積の機能的意義およびそれを制御するシグナル分子機構について in vitro 系にて検証した。【方法】ICR マウス上顎切歯を用いて、グリコーゲンとグリコーゲン合成・分解酵素の局在について免疫組織学的に検索した。胎生期下顎臼歯、生後下顎切歯の器官培養ならびに歯原性上皮細胞培養系を用いて、グリコーゲン代謝関連酵素の抑制や AKT-GSK シグナルの活性化がエナメル芽細胞の分化に及ぼす影響について調べた。【結果と考察】エナメル芽細胞は、分泌期へと分化する直前に、グリコーゲン合成酵素を不活性型から活性型へと変化させ、細胞内にグリコーゲン蓄積する。蓄積したグリコーゲンは、分泌期になると分解が亢進して減少する。器官培養された歯胚にグリコーゲン合成や分解の阻害剤を添加すると、エナメル芽細胞の分化が障害された。一方、IGF-1 刺激によって AKT シグナルを活性化すると、細胞内グリコーゲンの貯留が促進されるとともにエナメル基質形成が亢進した。以上より、エナメル芽細胞は AKT シグナルによりグリコーゲンの合成と分解を調節しており、一過性に細胞内にグリコーゲンを貯蓄することでその後の細胞分化に必要なエネルギーを確保していることが明らかとなった。今後は糖代謝異常とエナメル質形成不全との関連性について検索を進めていく予定である。

P2-30

小児における齲蝕と遺伝的要因についての検討

○下村-黒木 淳子¹、竜 佑宗¹、梨田 智子² (¹日歯大 新潟生命歯 小児歯、²日歯大 新潟生命歯 生化)

【目的】齲蝕は、バイオフィームであるプラーク中の齲蝕原性細菌が直接的原因となり、さらに環境的要因及び遺伝的要因などにより修飾されて発症する多因子疾患である。遺伝的要因の中には、塩基配列の変異 (遺伝子多型) によるものも含まれる。そのうち、変異が1塩基のみである SNPs (single nucleotide polymorphisms) と齲蝕感受性に関する研究が数多く報告されているが、実際には個々の患者の齲蝕感受性は多様であり、臨床に反映させるためには、さらに多種の遺伝子についての研究が必要である。そこで本研究では、齲蝕原性細菌と齲蝕感受性に関与すると考えられる SNPs との関係を検討し、小児における齲蝕のリスクファクターを明らかにすることを目的とする。【対象及び方法】対象は日歯大新潟病院小児歯科に来院した乳歯列期および混合歯列期の患児とし、頬粘膜より採取した DNA を用いて数種類の遺伝子について SNPs の解析を行った。各群における齲蝕原性細菌の検出率と SNPs の発現頻度の比較検討について、 χ^2 検定を用いて分析した。なお本研究を行うにあたり、全ての患児及び保護者に対し研究目的の十分な説明を行い同意を得た。【結果及び考察】検討した遺伝子のうち、齲蝕原性細菌の検出率と、SNPs の発現頻度との間に相関のあるものを認めた。今回の結果から SNPs の検討も齲蝕感受性を検討する上で有効な手段であることが示唆された。

P2-32

レーザー照射による齲蝕予防に関する研究— μ CT 法による表層下脱灰と再石灰化の観察

○東理 頼亮¹、岡田 康男¹ (¹日歯大 新潟生命歯 病理)

近年、歯科診療でのレーザー技術の応用が著しい。今回、歯面へのレーザー照射によるう蝕病変回復プロセスを理解する目的で、表層下脱灰を伴うヒト臼歯を用いて、炭酸ガスレーザー照射による歯質内部の質的・量的変化を非破壊的・経日的に観察を行い、病巣の範囲と石灰化度の変化を時間軸で追跡した。実験には、本学倫理委員会規定にて使用が許可された大臼歯に、平滑面白斑う蝕を有するものを対象として、バンドソーにてう蝕領域を含む歯質をブロック状に作製し、フッ化ナトリウム塗布と炭酸ガスレーザー照射の併用を経日的に行った。試料は鳥津製作所マイクロフォーカスエックス線撮影装置 SMX-100CT と RATOC 社画像解析ソフト TRI/3D BON を用いて、時系列での μ CT 画像と無機塩濃度変化を定量解析した。結果として、レーザー照射試料と未照射の試料における脱灰深度に有意な差はみられなかった。レーザーが直接照射されるエナメル質表面の色調は、周囲の健全部と類似していたが、 μ CT 画像観察結果から深部の齲蝕病巣の形状や無機塩濃度に著明な変化はみられなかった。本研究の結果から表層下脱灰の領域は炭酸ガスレーザーの照射によって抑制されない可能性が示唆された。本研究は独立行政法人日本学術振興会科学研究費 (課題番号 22791847) の助成を得たものである。

P2-33

合成ペプチドによる in vitro 石灰化阻害
○藤沢 隆一¹、田村 正人¹ (北大 歯 口腔生
化)

【目的】硬組織の石灰化においては、リンタンパク質が重要な役割を演じている。たとえば、象牙質形成では、象牙質リンタンパク質がヒドロキシアパタイトの核形成を行うことが知られている。塩基性アミノ酸のペプチドは、これらのタンパク質に結合してその効果を阻害することが考えられる。本研究では、この阻害機構について明らかにし、合わせてリン酸基の石灰化における役割について検討する。【方法】試験管内石灰化系としては、タンパク質またはペプチド等をスポットしたナイロン膜を、カルシウムまたはリン酸イオンをしみこませた紙でサンドイッチする系を用いた。カルシウムイオンとリン酸イオンは両側から拡散していき、膜上にリン酸カルシウム結晶を沈着させる。形成された結晶は、アリザリンレッドによって染色した。【結果と考察】象牙質リンタンパク質、フォスピチン(卵のリンタンパク質)では、石灰化促進効果が見られたが、高濃度のタンパク質は逆に阻害する傾向があった。ポリ・アルギニン(poly(Arg))、または塩基性ペプチドのプロタミンは、これらのリンタンパク質の石灰化促進効果を阻害した。poly(Arg)は、リンタンパク質のモデルであるデンドリマーとフォスフォセリンの複合体の石灰化促進効果も阻害した。Argは、リンタンパク質のリン酸基をブロックして、そのCaイオンとの結合を阻害し、石灰化の核生成を抑制すると考えられる。

P2-35

ヒト乳歯歯髄細胞における SDF-1 の発現調節機構
○長谷川 智一¹、赤澤 友基¹、帖佐 直幸²、吉村 善隆³、浅川 剛吉⁴、石崎 明²、岩本 勉^{1,5}
(¹徳大 病院 小児歯、²岩医大 生化学細胞情報科学、³北大 院歯 口腔病態細胞分子薬理、⁴昭大 スペシャルニーズ口腔医学 障害者歯、⁵徳大 院 HBS 医療創生科学 社会環境衛生小児歯)

【目的】Stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1)は骨髄における造血系幹細胞の局在に必須であり、また血管内皮前駆細胞、間葉系幹細胞を濃度依存的に遊走を誘導することから、組織修復に重要な働きを担っていると考えられる。歯髄においても同様の自己修復機構が働いているが、その機構については不明な点が多い。そこで我々が樹立したヒト乳歯歯髄細胞を使用して、歯髄細胞における SDF-1 の発現調節について検討を行った。【方法】乳歯歯髄細胞を FGF-2 20 ng/ml の濃度で 48 時間培養後、Trisol を使用して total RNA を抽出した。その後定量的 RT-PCR 法によって SDF-1 mRNA の発現量を検討した。また歯髄細胞における FGF-2 シグナル伝達経路を各種阻害剤を投与して検討を行った。【結果】SDF-1 mRNA 発現に対する FGF-2 の影響を評価した。その結果、FGF-2 の投与によって SDF-1 の発現が抑制された。この抑制効果は FGF 受容体の阻害剤である AZD4547 の投与によって消失したことにより、FGF-2 による作用と考えられた。【考察】FGF-2 などのサイトカインによる SDF-1 発現の調節機構が明らかとなれば、歯髄組織における恒常性の維持機構について、間葉系幹細胞の遊走調節機構と融合した考察が可能と考えられている。

P2-34

Guaiacol は象牙芽細胞の TRPV3 チャネルに作用する
○陽田 みゆき¹、津村 麻記²、佐藤 正樹²、Sobhan Ubaidus²、田崎 雅和²、澁川 義幸² (東
歯大 口腔健康臨床科学 小児歯科、²東歯大
生理)

Guaiacol は、優れた鎮痛作用を有し、歯科臨床で広く利用されている薬剤である。象牙芽細胞は transient receptor potential (TRP) チャネルを介して刺激を受容することが知られているが、guaiacol の象牙芽細胞に対する作用については、未だ不明な点が多い。本研究では、マウス由来象牙芽細胞系細胞 (odontoblast lineage cells, OLC) に guaiacol を作用させた場合の細胞内カルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) の変化について fura-2 を用いたカルシウムイメージングで解析した。細胞外 Ca^{2+} 存在下において、OLC に 0.8 mM guaiacol を投与すると $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。同一濃度の guaiacol 連続投与によって、 $[Ca^{2+}]_i$ の増加は徐々に脱感作した。一方、細胞外 Ca^{2+} 非存在下で OLC に guaiacol を投与すると、このような $[Ca^{2+}]_i$ の増加はみられなかった。従って、guaiacol により誘発される $[Ca^{2+}]_i$ 増加は、細胞外からの Ca^{2+} 流入であることが示された。TRP vanilloid subfamily member 3 (TRPV3) チャネルの antagonist である 2,2-diphenyltetrahydrofuran を guaiacol と同時投与すると、guaiacol による $[Ca^{2+}]_i$ の増加は抑制された。guaiacol は OLC の TRPV3 チャネルを活性化し、細胞外からの Ca^{2+} 流入による $[Ca^{2+}]_i$ 増加を誘発することが示唆された。また、guaiacol 連続投与により TRPV3 チャネルが脱感作することで、象牙芽細胞からの感覚情報が減弱し、歯髄鎮痛作用がもたらされる可能性が示唆された。

P2-36

ラット切歯エナメル芽細胞における Prickle の局在
○西川 純雄¹、川本 忠文² (鶴見大 歯 生物、
²鶴見大 歯 RI 研究セ)

Prickle は平面内細胞極性 (PCP) を担うコアタンパク質の一つで、膜タンパク質である Vangl により細胞膜にリクルートされ、極性を持つ分布をすることが知られている。ラット切歯エナメル芽細胞にはこのコアタンパク質の Frizzled3、Vangl1 および Vangl2 が免疫組織化学的に検出されている。本研究では Prickle1、Prickle2、Prickle3、Prickle4 の局在について免疫組織化学的に検出を行った。【材料と方法】9 日齢ラットの未固定非脱灰切片を作製し、一次抗体を 20 倍から 50 倍に希釈し 4℃で一晩標識し、Alexa Fluor 488 標識または Alexa Fluor 555 標識二次抗体で可視化し、蛍光顕微鏡で観察した。【結果と考察】Prickle1 と Prickle2 は増殖期から分化期にかけて点状または棒状の反応が見られ、形成期では近位と遠位の細胞間結合装置に反応が見られた。中間層にも反応が見られた。Prickle2 は成熟期にも反応がみられた。Prickle3 はエナメル芽細胞には繊維状の反応が見られ、中間層や、乳頭層が強く標識された。Prickle4 は形成期に強い反応が細胞質に見られた。Prickle2 と Vangl1 の 2 重染色を行うと共局在が見られた。このように PCP 関連タンパク質がエナメル芽細胞の極性形成とエナメル質形成と密接に関わることを示唆している。

P2-37

ヒト上顎第一大臼歯、第二乳臼歯におけるエナメル象牙境とエナメル質外表面の幾何学的形態解析
○森田 航¹ (京大 理 自然人類)

歯冠形態の変異については、分類や系統関係の解析、咀嚼に関わる機能適応など様々な研究が行われている。本研究は比較的研究例が少ない形態形成過程に注目した歯冠形態変異の分析を行った。エナメル象牙境 (EDJ) は、歯乳頭と内エナメル上皮の間に形成される基底膜の形態を表し、エナメル質外表面 (OES) は、そこにエナメル質が沈着することにより形成される。これまで、EDJ は OES よりも進化的に保守的な形態を残し、また、乳歯は永久歯よりも祖先的な形質を多く保持すると報告されている。そこで、未咬耗のヒト上顎の第一大臼歯 (UM1) と第二乳臼歯 (um2) の EDJ と OES の形態を幾何学的形態測定法により解析し、形状変異の相関と、エナメル質沈着が OES の形態変異に及ぼす影響を検討した。その結果、UM1、um2 共に EDJ と OES 間で共変動する形状変異の傾向は類似しており、エナメル質沈着による形態の改変は限定的であることが示された。形態的な統合性の指標である RV 相関係数は、um2 の方が高かった。また UM1 と um2 間、EDJ と OES 間で有意差のあった主成分の示す形状変異には祖先的形質との対応関係が見られた。さらに UM1 の EDJ と um2 に共通する形状変異傾向が抽出され、EDJ と um2 という異なる文脈で言及されてきた祖先的形質には共通部分があることが示唆された。

P2-38

ラット歯胚の象牙芽細胞における LEF1 のユビキチン化

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

【目的】 LEF1 は Wnt シグナル伝達経路の転写因子で象牙芽細胞への分化を制御し、前象牙芽細胞に出現するが象牙芽細胞に分化すると消失することが報告されている。しかし LEF1 消失の直接の機序については不明である。近年 NLK により活性化する NARF が LEF1 のユビキチンリガーゼであることが報告された。そこで象牙芽細胞の分化における LEF1 のユビキチン化を検索する目的で上記の因子について免疫組織化学的検索を試みた。【方法】材料は胎生 19 日、生後 15 日のラット臼歯歯胚で、固定後パラフィン切片を作成して、抗 LEF1、抗 NARF、抗 NLK による免疫反応を行った。【結果】胎生 19 日では LEF1 の反応は歯頸彎曲付近の前象牙芽細胞の核で強く、象牙前質に接する象牙芽細胞では減弱していた。NARF と NLK の反応は逆に、前象牙芽細胞では不明瞭で、象牙芽細胞ではより明瞭であった。生後 15 日においても LEF1 の反応がヘルトヴィッヒ上皮鞘に接する前象牙芽細胞は明瞭で、象牙前質に接する象牙芽細胞は不明瞭であるが、NARF と NLK は象牙芽細胞では明瞭な陽性反応を示すが、前象牙芽細胞では不明瞭であった。【考察】 NARF と NLK は LEF1 に置き換わるように分化した象牙芽細胞に出現したことから、前象牙芽細胞から象牙芽細胞への分化において LEF1 は NLK を介して活性化する NARF によりユビキチン化され、消失することが示唆された。

P2-39

ヒト歯髓組織から outgrowth する細胞による組織構築に関する研究

○吉羽 永子¹、吉羽 邦彦¹、大倉 直人¹、細矢 明宏²、中村 浩彰²、興地 隆史¹ (¹新大 院医歯 う蝕、²松歯大 解剖 2)

【目的】 演者らはヒト歯髓創傷治癒過程では、 α -SMA 陽性細胞が創面に遊走し fibrillin-1 (FBN1) タンパクの分解と mRNA の下方制御が起こることを報告した。本研究では遊走する細胞と細胞外基質の検討を目的に、ヒト歯髓組織から outgrowth する細胞による組織構築を検索した。【方法】 歯髓を厚さ 1.5 mm にスライスし Millicell-CM filter 上で培養した。培養 1 週後スライス片近傍に覆髓材 MTA (直径 1 mm) を静置しさらに培養した。切片を作成し α -SMA, nestin, CD146, CD31, CD45, FBN1, 2,3, fibronectin (FN), I 型コラーゲンに対する免疫染色、TUNEL 法での apoptosis の検出、定量 RT-PCR による FBN1 と FN の発現を調べた。【結果と考察】 培養 10 日後、スライス片周囲に伸び出した組織の細胞は α -SMA 強陽性を呈し CD146 陽性の血管様構造も認められた。細胞外基質は FN 強陽性を示す一方、FBN1 に対する染色性は弱く定量 RT-PCR の結果と一致した。培養 3 週後 MTA は CD146 陽性の血管を含む数十層の α -SMA 陽性細胞に囲まれ、5 週後では MTA 周囲に apoptosis による細胞の希薄層が観察された。時間の経過とともに α -SMA の染色性は減弱し FBN1 陽性反応が認められた。CD45 陽性細胞の多くは I 型コラーゲン共陽性であり fibrocyte と考えられた。Outgrowth する細胞は α -SMA 陽性を呈しここでは血管新生を伴い、初期には FBN1 が下方制御され細胞外基質の変化も伴うことから、in vivo における歯髓創傷治癒過程と類似した変化を示すことが示唆された。

P2-40

Micro CT image versus transparent specimen findings of extracted Japanese mandibular incisors' root canal formation

○亀本 博雅¹、勝又 明敏¹、喜多 奏¹ (¹朝日大 歯 歯科放射線)

Aims: Root canal morphology of mandibular incisors is problematic for the dental practitioner when performing endodontic procedures. Transparent specimens stained with India ink have long been used however micro-focus CT systems are increasingly favored for observation of tooth structures. Methods: Transparent specimens of 57 extracted mandibular incisors were prepared. India ink was administered to the pulp chamber by injection, and stained teeth were then decalcified. A further 57 teeth were scanned using micro-focus CT with a voxel size of 50 μ m. Results: Two root canals per tooth were found in 12% of transparent specimens and 19% of teeth observed by micro-focus CT. Lateral branch canals were found in 5% of transparent specimens and 4% in the CT group. Canal branching in the root apex region was seen in 14% of specimens in the transparent group and 25% in the CT group. The average distance from the surface of the tooth root to the point of divergence was 2.0 mm in the transparent group and 1.2 mm in the micro-CT group. Conclusions: It can be suggested that micro-focus CT imaging is superior to staining with India ink for the visualization of short branch canals.

P2-41

肺魚歯板の高石灰化組織 petrodentine 形成過程の組織化学的解析と象牙芽細胞の cell cycle の一過程におけるグリコーゲンの蓄積

○岡 俊哉¹、三上 正人²、石山 巳喜夫³ (1日歯大 新潟生命歯 生物、2日歯大 微生物、3日歯大 解剖 2)

【目的】肺魚類に特徴的な構造を持つ歯板の主要な構成要素である petrodentine 形成の詳細を調べるため、その形成細胞である odontoblast について組織化学的な検索を行った。【方法】3種の現生肺魚 (*Protopterus aethiopicus*, *P. dolloi*, *Lepidosiren paradoxa*) を入手、常法により組織切片を作成した後、ALP、ACP、TRAP 等の酵素組織化学染色、ワンギーソン、PAS などの一般染色および、透過電顕による観察を行った。【結果と考察】肺魚 odontoblast には高い酵素活性があり、petrodentine 形成過程における有機基質の分解と吸収という二相性の細胞機能を裏付ける所見が得られた。petrodentine 前駆体 (prepetrodentine) 形成および引き続いて起こる petrodentine 成熟完了前後の odontoblast は PAS 強陽性を示し、電顕による観察でも odontoblast の細胞質および突起部分にグリコーゲンの顕著な貯留が確認された。odontoblast による petrodentine 形成には、グリコーゲンの蓄積が何らかの重要な役割を果たしている事が推察される。

P2-43

味蕾におけるカドヘリンの発現

○瀬田 祐司¹、鬼頭 文恵¹、豊野 孝¹、片岡 真司¹、豊島 邦昭¹ (1九歯大 歯 口腔組織)

味蕾を構成する細胞は周囲の上皮細胞と同様に、約 10 日の寿命を持ち、味蕾の内で常に味細胞の更新が行われている。したがって常に味細胞が更新される味蕾において、味の識別が常に正しく行われるためには味情報を伝達する味神経がその味刺激に対する受容体を発現する味細胞を正確に認識して、シナプスを形成しなければならない。しかしながら、味蕾においてどの様にして味神経が特定の味受容体を発現する味細胞を認識して、シナプスを形成するのかについては未だに解明されていない。本研究では、味細胞と味神経との間で行われている選択的なシナプス形成機序の解明を目的として、味細胞の細胞膜に発現しているカドヘリンスーパーファミリーを中心とした細胞膜表面分子の探索をおこなった。RT-PCR で検索すると、有郭乳頭上皮において、N-, R-cadherin, Neurexin1 の発現が認められた。さらに in situ Hybridization で味蕾細胞での発現を検索すると、N-cadherin, Neurexin1 は味蕾細胞の 1 部の細胞での発現が認められた。味蕾内で N-cadherin は 2 型細胞のマーカーと Neurexin1 は 3 型細胞のマーカーとの局在が一致した。味蕾細胞の細胞型には、細胞型特有の膜表面分子が発現し、味神経が特定の味細胞を認識するために、味細胞の膜表面分子を認識している可能性が示唆された。

P2-42

ネコ糸状乳頭の上皮乳頭および微細血管構築の部位による形態差

○竹村 明道¹、疋田 勝也¹、諏訪 文彦¹ (1大歯大 解剖)

【目的】ネコ糸状乳頭の上皮乳頭および微細血管構築を走査電顕で観察し、それぞれの部位別形態差を、さらに同一部における両者の形態差を調査した。【材料と方法】上皮乳頭観察標本および微細血管鋳型標本に各 2 頭用いた。両標本を、舌尖部、前部、中部、後部に 4 等分して観察した。【結果】上皮乳頭：楕円柱状の基部と基部上面から突出する突起で構成されていた。舌尖部で、基部上面外周を楕円状に配列する 7~10 個の円錐状突起で構成されていた。前部で、基部上面から咽頭側に傾斜する 1 本の巨大な棒状の突起で構成されていた。中・後部で、基部上面から前部より小さな咽頭側に傾斜する 1 本の円錐状の突起で構成されていた。微細血管構築：舌尖部で、楕円状に配列する 7~10 個の毛細血管ループで構成されていた。前部で、巨大な 1 本の棒状の咽頭側に傾斜する毛細血管網とその前方の多数の毛細血管ループで構成されていた。中・後部で、後方の大きな 1 本の円錐状の咽頭側に傾斜する毛細血管網と前方の楕円状に突出する多数の毛細血管ループで構成されていた。上皮乳頭と微細血管構築の比較：舌尖部では、上皮乳頭は多数の突起が、微細血管構築は多数の毛細血管ループがみられ、両者の楕円状に配列する形態は類似していた。前・中・後部では、上皮乳頭は 1 本の突起がみられ、微細血管構築は前方の多数の毛細血管ループと後方の 1 本の毛細血管網がみられ、両者の形態に類似点はみられなかった。

P2-44

ケラチノサイトのカルシウム分化誘導による細胞接着分子発現変化

○宮崎 綾子^{1,2}、大久保 つや子²、八田 光世²、石川 博之¹、山崎 純² (1福歯大 成長発達歯、2福歯大 細胞分子生物)

カルシウムはケラチノサイトの増殖や分化における調節因子としての役割を果たしている。本研究では、カルシウムによって制御されるケラチノサイトの分化、遊走、接着に着目し、これらの制御に深く関わるインテグリンなどの細胞接着分子と細胞外基質との相互関係を中心に検討を行った。マウスケラチノサイト Pam212 細胞においては、インテグリン $\beta 1, \beta 4, \beta 5, \beta 6$ が発現していた。リアルタイム PCR により mRNA の発現を調べると、低 Ca 条件 (0.05 mM) に比して正常 Ca 条件 (1 mM) 下ではインテグリン各分子の発現量が減少した。これらインテグリン β 分子の減少は、分化マーカーのインボルクリンの増加と共に起きていた。これらのことから、Ca 濃度の上昇による細胞分化に際してインテグリン β 分子の発現が減少すると考えられた。蛍光免疫染色においても正常 Ca 条件下において減少傾向が観察されると共に、細胞内局在の変化も見られた。また、低 Ca 条件に比べて正常 Ca で培養した細胞では有意に遊走が抑制された。各種細胞外基質に対する接着能を検討したところ、Pam212 細胞は、特にフィブロネクチンとビトロネクチンに対する接着が強いことが観察され、Ca 濃度によって接着が変化した。以上のことから、カルシウムによる分化誘導によってインテグリン β 分子の発現が減少し、接着や遊走に影響を与える可能性が示唆された。

P2-45

口腔粘膜上皮の過形成病変におけるデスモゾーム関連遺伝子の発現
○落合 隆永¹、中野 敬介¹、長谷川 博雅¹ (1松歯大 口腔病理)

【目的】デスモゾームタンパク質 (DPs) は口腔粘膜の上皮内腫瘍 (OIN) などをはじめとする腫瘍で発現の増減あるいは異所性発現がみられる。我々は、非腫瘍性増殖病変における DPs の変化を免疫組織学的に検討してきたが、未だ全容は明らかでない。そこで、粘膜の過形成病変の DPs の遺伝子発現を検討した。【方法】対照群には異常な角化や異型を欠く 8 例の正常粘膜を用いた。実験群には上皮の過形成を伴った 10 例の粘液嚢胞を使用した。各検体のパラフィン包埋標本から RNA 抽出し、逆転写反応を行い得られた cDNA を実験に用いた。OIN3 で変化を示す膜貫通型 DPs である Desmoglein1 (DSG1) と Desmocollin3 (DSC3) および γ -Catenin (JUP) を RT-PCR 法と Real-Time PCR 法で解析した。統計解析は Mann-Whitney U 検定を行い $p < 0.05$ で有意差ありとした。【結果】対照群と実験群の全例で DSG1、DSC3、JUP の遺伝子発現が確認された。実験群において発現が消失する遺伝子群はなかったが、Real-Time PCR の結果 DSG1 と DSC3 遺伝子の発現が増加していた。逆に JUP の発現は実験群で減少していた。以上の結果は、統計学的にも有意差を認めた。【結論】増殖活性亢進や不規則な細胞増殖などの過形成性変化が、DSG1 や DSC3 の遺伝子発現を亢進させ異所性発現が惹起される可能性が示唆された。

P2-47

ストレス関連物質による歯周細胞増殖因子への影響
○定岡 直¹、川原 一郎¹、八上 公利²、牧 茂² (1松歯大 口腔衛生、2松歯大 社会歯)

【目的】生体外から受けるあらゆるストレス因子に対し、生体内では糖タンパク質であるクロモグラニン A を産生する。神経内分泌系の生理活性物質で、自律神経系の活動指標である。また、抗菌ペプチドの産生、肥満細胞の遊走に関与するなど、全身および局所の免疫調節機構と密接に関係している。我々はこれまでに歯根膜線維芽細胞に対するストレスに対して細胞がクロモグラニン A を産生することを報告している。今研究では、このクロモグラニン A が歯周組織細胞に対してどのように作用しているのかを探ることとした。【方法】歯周組織のモデルとして正常ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPdLF) を用いて、非添加群 (対照) とクロモグラニン A 添加群を一定時間培養した。そして細胞周期関連遺伝子群の機能解析を行った。【結果】クロモグラニン A 添加群では細胞増殖因子と呼ばれる TGF- β や、細胞分裂促進に関わる MAPK の遺伝子群が増大していた。また、TGF- β や MAPK 遺伝子群の情報伝達に深く関る Smad 遺伝子群もクロモグラニン A 添加時には増大した。【結論】これまでに他の細胞でのクロモグラニン A の作用として細胞増殖ならびに成長因子作用、アポトーシス抑制作用、また血管拡張作用を含む炎症調節作用を持つ。線維芽細胞にとって隣接細胞との接着を制御する因子となることが報告されており、歯根膜線維芽細胞も同様の作用を持つ可能性が示唆される。

P2-46

セメント芽細胞が発現する F-spondin の抗炎症作用に関する検討
○北川 雅恵¹、宮内 睦美²、岡 広子³、外丸 祐介⁴、高田 隆^{2,3} (1廣大 病院 口腔検査セ、2廣大 院医歯薬保 口腔顎顔面病理病態、3廣大 院医歯薬保 国際歯科医学連携開発、4廣大 自然科学研究支援開発セ)

我々はこれまでに F-spondin が歯周組織ではセメント芽細胞に特異的に発現し、石灰化に関与することを報告してきた。最近、F-spondin が変形性関節炎において軟骨代謝を制御することが報告された。そこで、炎症時におけるセメント芽細胞の F-spondin の役割について明らかにすることを目的に検討を行った。LPS 刺激によりヒトセメント芽細胞 (HCEM) の発現する F-spondin mRNA の発現増加と IL-6 発現低下が認められた。一方、siRNA による F-spondin のノックダウンは、IL-6 の発現低下を回復した。また、F-spondin 過剰発現により IL-6 の発現が有意に低下した。さらに、LPS 刺激により発現する Erk のリン酸化が F-spondin 過剰発現により抑制されたことから、F-spondin は Erk 経路を抑制することで IL-6 の発現を抑制することが示された。In vivo では、F-spondin トランスジェニックマウス (SPONI-TG) を作製し、LPS で 4 週間刺激することで歯周炎を惹起させたところ、SPONI-TG では成熟した破骨細胞や好中球の数が少なく、歯槽骨の吸収も抑制されていた。以上より、セメント芽細胞が発現する F-spondin は IL-6 の発現を抑制することにより炎症反応を抑制し、歯周炎においてセメント芽細胞はセメント質を病的吸収から保護している可能性が示された。

P2-48

歯周炎患者歯周靭帯由来幹細胞の免疫調節能に対するエリスロポイエチンの影響
○増田 啓太郎¹、山座 孝義²、馬 蘭³、星野 慶弘³、樋口 勝規¹、久木田 敏夫² (1九大 病 口腔総合診療、2九大 院歯 分子口腔解剖、3九大 院歯 小児歯)

昨年度本学会において、エリスロポイエチンが歯周疾患罹患歯に由来する歯周靭帯幹細胞 (炎症性歯周靭帯幹細胞) の細胞増殖能やセメント質形成能を向上させることを報告した。正常歯周靭帯幹細胞では T 細胞などの免疫細胞に対する調節能が知られており、歯周組織の恒常性の維持に機能していることが示唆されている。本研究では、炎症性歯周靭帯幹細胞における免疫調節能を解析するとともに、その能力に対するエリスロポイエチンの効果を検討した。本研究では、九大病院口腔総合診療科にて抜歯を余儀なくされた歯周疾患罹患歯の歯周靭帯を使用した。対照群としては埋伏智歯の歯周靭帯を用いた。正常歯周靭帯幹細胞と比べ炎症性歯周靭帯幹細胞ではヒト T 細胞増殖抑制能が低下していたが、エリスロポイエチンで刺激すると低下した T 細胞増殖抑制能が正常歯周靭帯幹細胞とほぼ同等に回復した。以上から、エリスロポイエチンは歯周組織再生に有効なツールとなりうる可能性が示唆された。

P2-49

顎顔面部血管注入法による歯周組織微細血管観察法の検討

○松尾 雅斗^{1,2}、飯村 彰^{1,2} (1神歯大 口腔科学、
2横須賀・湘南地区災害医療歯科学研究セ)

【目的】顎顔面部血管注入法による歯周組織微細血管の検討を目的として、プラークコントロール下のインプラント周囲歯肉微小血管の変化を観察した。インプラント周囲組織は天然歯に比べ血管構築が粗造で血流が乏しいため炎症防御機構が脆弱であると言われている。この防御機構を維持するためにはインプラント歯肉のプラークコントロールが重要な課題の一つである。【方法】本実験は学内動物倫理委員会の承認後、実験指針に沿って行った。ビーグル犬を用い、下顎前臼歯部に純チタンスクリューインプラントを埋入した。オッセオインテグレーション確認後下記の3群にわけた。口腔清掃を毎日処置したものをプラークコントロール群、しないものを対照群とした。また、歯頸部にデンタルフロスを設置したものを炎症群とした。90日後に血管注入用合成樹脂を注入し試料を作製し、走査電顕にて観察した。【結果と考察】対照群では歯頸部に沿った背の低い10~80μm程度の血管ループが観察された。プラークコントロール群ではU字型の形態をした10~30μmの毛細血管ループが規則正しく配列していた。炎症群では、血管網は100μm前後の径の太い、内腔変性を伴う血管に変化していた。これらの結果からプラークコントロールにより血管形態および微小循環を健康なものに維持することが示唆された。また、顎顔面部血管注入法は歯周組織微細血管観察に有用な方法であることが示された。

P2-50

セメント質初期形成における上皮鞘細胞と歯小囊細胞の動態について

○山本 恒之¹、長谷川 智香¹、山本 知真也¹、
本郷 裕美¹、山田 珠希¹、織田 公光²、網塚 憲生¹ (1北大 院歯 硬組織発生物、2新大院 医歯 口腔生)

【目的】ヘルトヴィッヒ上皮鞘がどのようにして断裂するのかについてはまだよくわかっていない。また断裂後に上皮鞘細胞の一部はEMT(epithelial-mesenchymal transition)によりセメント芽細胞になるとの説が台頭している。本研究で上皮鞘の断裂機構及びEMTの組織学的解析を試みた。【材料と方法】3週齢ラット上顎第1臼歯歯根の矢状断パラフィン切片を作成した。基質分解酵素(MMP7、KLK7、ADAM10)、あるいはALPに対する抗体で一次染色し、抗ケラチン抗体で二次染色した。【結果と考察】第1臼歯近心根根尖部を3つの部位に分け観察した。部位1:上皮鞘がまだ断裂していない部位。部位2:象牙質形成と上皮鞘の断裂が始まる部位。部位3:セメント質形成が開始する部位。上皮鞘細胞(ケラチン陽性)は全部位でALPに反応するものの、部位1よりも部位2、3で細胞は小型化し反応も弱くなった。また全部位で3種の基質分解酵素に反応した。歯小囊細胞は部位1では上皮鞘側よりも歯槽骨側でALP強陽性反応を示した。部位2で上皮鞘近くの大形化した歯小囊細胞にもALPに強く反応するものが現れた。部位3では歯根表面のセメント芽細胞も強いALP反応を示した。以上から、上皮鞘は酵素を分泌し接着装置を破壊して断裂すること、上皮鞘にEMTは起こらずセメント芽細胞は歯小囊由来であることが示唆された。

P2-51

ラット歯肉由来間葉系幹細胞による硬組織形成について

○高橋 智美¹、牛島 夏未¹、滝田 裕子¹、飯塚 正¹ (1北大 院歯 学術支援)

【目的】歯肉は他の口腔組織に比べ侵襲が少なく比較的簡便に入手できるというメリットがあり、組織再生のソースとして非常に有効な候補と成り得ると考えられる。そこで今回我々は、歯肉由来間葉系幹細胞からの硬組織の誘導・形成能について検討を行った。【材料と方法】生後6週齢のWistar Ratから歯肉組織を摘出し、分離培養して得られた線維芽細胞を使用した。間葉系幹細胞のマーカーとして、抗STRO-1抗体による免疫染色を行った。また、ウェスタンブロッティング法によりSTRO-1の発現を確認した。骨、軟骨および脂肪分化誘導培地による培養をそれぞれ行い、各種染色にて経時的に骨芽細胞および軟骨細胞、脂肪細胞への分化の程度を検討した。【結果・考察】歯肉組織由来線維芽細胞は免疫染色においてSTRO-1陽性を示した。さらにウェスタンブロッティング法にてSTRO-1タンパクの発現が認められた。骨分化誘導培地による培養では、アルカリホスファターゼ活性、オステオポンチンの発現、および硬組織基質の形成が認められた。軟骨分化誘導培地による培養では、軟骨基質の形成が確認できた。また、脂肪分化誘導培地での培養により脂肪細胞への分化がみられた。以上のことより、歯肉由来線維芽細胞は多分化能を示し、間葉系幹細胞としての機能を有することが明らかとなり、硬組織誘導・形成の可能性が示唆された。

P2-52

光機能化処理インプラントにおける実験的炎症時の周囲組織変化について

○高橋 俊介¹、高橋 聡子¹、松尾 雅斗¹ (1神歯大 口腔科学)

【目的】光機能化処理は紫外線を用いてインプラント表面性状の改良を行う方法の一つである。本法によりインプラント周囲の骨芽細胞の集積や血管新生などが促進され骨結合期間が短縮されるとされる。また、抗炎症性が増加するとの報告もある。本研究では、光機能化処理が実験的インプラント周囲炎の防御機構に影響するか検討を行なった。【方法】本研究は学内動物倫理委員会の承認後、実験指針に沿って行った。ビーグル犬を用い、下顎前臼歯部歯槽窩内に純チタンスクリュー型インプラントを即時埋入した。片側は光機能化処理を行った実験群、他方は対照群とした。90日後、オッセオインテグレーションを確認後、インプラント体歯頸部にデンタルフロスを設置し、さらに90日間実験的インプラント周囲炎を惹起させた。試料は、MicroCT撮影し骨吸収面積を計測した。また、走査電顕にて観察した。【結果と考察】オッセオインテグレーション獲得時には光機能化群、対照群とも大きな差はなかった。実験的インプラント周囲炎の惹起後、対照群ではインプラント体歯頸部を中心としたリング状の骨吸収が観察された。それに対して、実験群ではその歯頸部の骨吸収量は有意に小さかった。以上の結果から光機能化処理はインプラント周囲組織への炎症波及を抑制する可能性が示唆された。(共同研究者:神歯大・咀嚼機能制御補綴学講座、星 憲幸、石井康鉉、木本克彦)

P2-53

矯正治療に伴う痛みの定量評価：動物モデルによる解析

○安達 一典¹、佐々木 会²、須田 直人²、坂上 宏¹ (1明海大 歯 薬理、2明海大 歯 矯正)

【目的】矯正治療における歯の移動では痛みを伴うことがあり、その疼痛制御は重大な課題である。そこで歯の移動で生じる侵害受容と歯周組織変性を定量可能な動物モデルの評価系を開発した。【方法】Wister系雄性ラットの上顎門歯と上顎右側第一臼歯をコイルスプリングで連結し30~50gの矯正力を負荷した。負荷1(D1)、3(D3)、7(D7)日後に全身麻酔下で電気刺激電極を上顎両側第一大臼歯部に留置し、同部刺激誘発開口反射の閾値を測定した。実験終了後、歯周組織と三叉神経節の標本作製し、それぞれ多核破骨細胞浸潤(TRAP染色)とサテライトグリア細胞(SGC)活性(GFAP染色)を観察した。また、移動歯周囲の知覚異常検討のためラットの鼻根部をvon Frey hair刺激し、頭部回避閾値を浅麻酔下で検討した。【結果・考察】D1以降、右側の開口反射誘発閾値は、左側に比較して有意な低下(56.5±12.6%)を示した。閾値低下はD3でも認められ、D7には認められなくなった。右側の頭部回避閾値も同様にD1~D3で有意な低下(54.3±62.9%)を認めたが、D7には認められなくなった。多核破骨細胞はD1から出現し、D3からD7にかけて増加した。また装置装着後1日目に右側の三叉神経節においてSGCの活性が認められた。これらのことから本研究の動物モデルにより、歯の移動で生じる疼痛と組織変性を同時に定量評価できると考えられる。

P2-55

実験的歯の移動による歯根周囲の破骨細胞の活性化は感覚神経-中枢-交感神経のループを介して惹起される

○近藤 久貴¹、近藤 真代^{1,2}、宮澤 健²、後藤 滋巳²、戸苅 彰史¹ (1愛院大 歯 薬理、2愛院大 歯 矯正)

【背景】我々は、実験的歯の移動が歯周組織の交感神経活動を亢進し、歯根周囲における破骨細胞を増加させることを報告した(Bone. 2013; 52(1):39-47)。本研究では歯の移動に伴う求心性の感覚神経活動が、交感神経活動の亢進に関わっている可能性を検討した。【方法】交感神経、感覚神経あるいは交感神経中枢を6-hydroxydopamine、capsaicinあるいはgold-thio glucoseで遮断したマウスの第1、第2臼歯の間に矯正用ラバーバンドを挿入し、歯の移動量を解析した。【結果・考察】交感神経および感覚神経のいずれの遮断も歯の移動量および歯根周囲破骨細胞の増加を抑制した。歯周組織の神経線維分布の免疫染色では、歯の移動に伴い感覚神経および交感神経マーカーの免疫染色性の増加がみられたが、感覚神経遮断により感覚神経のみならず交感神経の染色性が低下し、交感神経遮断では感覚神経系の染色性低下はみられなかった。また、感覚神経遮断の影響は感覚神経遮断マウスにアドレナリンβ受容体作動薬 isoprenaline を投与することによりレスキューされた。さらに、交感神経中枢を破壊したマウスにおいても歯の移動が抑制されることを確認した。これらの結果は歯の移動に伴う求心性の感覚神経シグナルが、中枢-末梢の交感神経を介し、歯根周囲の破骨細胞を活性化し歯の移動を促進することを示唆している。

P2-54

歯科矯正学的メカニカルストレスが惹起するHSP47のマウス歯根膜細胞における局在変化

○村岡 理奈¹、中野 敬介²、山田 一尋¹、川上 敏行² (1松歯大 歯科矯正、2松歯大 院 硬組織疾患病態解析)

【目的】メカニカルストレスに対する歯周組織の適応は、矯正学的な歯の移動において重要であり、これまでに本学会にて熱ショック蛋白(HSP27、HSP70)発現について報告してきた。今回我々はHSP47に着目し、歯根膜組織におけるその発現動態について、メカニカルストレスを一定時間負荷後に解除した際の発現推移を検討した。【方法】マウス上顎臼歯部歯根膜にセパレーターによるメカニカルストレスを3時間負荷した。メカニカルストレス負荷後のマウス歯根膜組織を観察するため、セパレーター除去直後から最大1週間後までのマウス上顎臼歯部歯周組織を経時的に摘出し、パラフィン連続横断切片を作製し、免疫組織化学的に染色した。【結果および考察】対照群では歯根膜全域にわたり、均一にHSP47の活性を認めた。実験群において、ストレス負荷直後の牽引側歯根膜でHSP47の発現増強があった。ストレス負荷3時間後に負荷を解除し、その1時間後に圧迫側歯根膜で発現増強があり、3時間後では圧迫側と牽引側ともにHSP47の発現増強が認められた。9時間後では一時的に陽性反応の減弱があったが、24時間以降に再度歯根膜全域と歯槽骨に発現増強が認められた。以上より、HSP47は歯根膜組織のコラーゲン合成を通じて細胞傷害に対する回復反応に寄与し、一方で、発現する時間軸ごとにHSPが発揮する機能も異なる事を強く示唆した。

P2-56

ラット切歯の歯周組織におけるオキシタラン線維の発達—エナメル質側とセメント質側の比較

○井上 孝二¹、原 矢委子²、佐藤 哲二² (1鶴見大 歯 電顕研究セ、2鶴見大 歯 解剖・組織細胞)

【目的】本研究では、無根歯であるラット切歯のエナメル質側(唇側)とセメント質側(舌側)の歯周組織に分布するオキシタラン線維系について検討した。【材料と方法】胎生17日~生後60日のWistar系ラットの切歯を試料として用いた。麻酔下でザンボン固定液にて固定、脱灰後、作製されたパラフィン切片はオキシタラン染色法に供された。一部の試料は、Karnovsky固定液にて固定後、薄切切片が作製され、電顕下で観察された。さらに、胎生20日から生後35日の切歯セメント質側とエナメル質側の歯周組織に分布するオキシタラン線維数を計測した。【結果・考察】オキシタラン線維は胎生18日に初めて確認され、オキシタラン線維は切歯の歯軸とほぼ平行に走行していた。切歯舌側ではセメント質の形成にともなって、オキシタラン線維の一部が埋入されるのが観察されたが、唇側ではそのような線維は見られなかった。次に、切歯のセメント質側とエナメル質側に分布するオキシタラン線維数を測定し、統計学的解析をおこなった。胎生23日以降、切歯の形成部位に関らず、セメント質側のオキシタラン線維は、エナメル質側よりも有意に密に分布していた。電顕観察からは、オキシタラン線維はコラーゲン線維とともに、歯の咬合圧に対する緩衝材としての役割を果たしていた。オキシタラン線維系は血流量の調整とともに、セメント質側では歯の支持機能にも関ることが示唆された。

P2-57

ラット耳下腺分泌顆粒に特異的な pH インジケータの合成と応用
 ○福島 美和子¹、加藤 治¹、横山 愛¹、吉垣 純子¹ (1日大 松戸歯 生理)

本研究の目的は、耳下腺分泌顆粒をラベルする蛍光 pH インジケータを開発することである。唾液腺の分泌顆粒は未成熟な時期があり、内部は酸性に維持されると予想される。よって、蛍光 pH インジケータによる酸性顆粒のラベルで、未成熟分泌顆粒の検出が可能だと考えた。しかし、唾液腺の分泌顆粒は既存の蛍光 pH インジケータを長時間保持できず、画像解析は困難である。蛍光 pH インジケータを顆粒内に安定に保持するため、我々はすでに開発した分泌顆粒特異的 Halo Tag レポータータンパク質 (SS25H) を応用した。SS25H に共有結合するリガンドの末端に、蛍光 pH インジケータの SNARF-1 が結合した SNARF-O2 を合成した。SNARF-O2 を SS25H を含む細胞液に添加後、抗 Halo Tag 抗体によるイムノプロットで結合能を確認した結果、SNARF-O2 蛍光が HaloTag タンパク質に結合したバンドとして検出された。また、SNARF-O2 ラベルした SS25H 発現細胞を共焦点レーザー顕微鏡観察したところ、SNARF-O2 蛍光が分泌顆粒内に検出された。以上のことから、SNARF-O2 は分泌顆粒に特異的かつ安定的に局在した。一方、SNARF-O2 処理細胞を塩化アンモニウム溶液でアルカリ化しても、pH 依存性の変化は見られなかった。アルカリ化への抵抗性は、分泌顆粒自身の高い緩衝能を反映したと考えられる。

P2-58

メタンフェタミン断薬ストレスはラット唾液腺において PACAP-DBI pathway を活性化し唾液分泌を抑制する
 ○大久保 みぎわ¹、四宮 敬史¹、塚越 絵里¹、川口 充¹ (1東歯大 薬理)

我々はこれまでメタンフェタミン断薬ストレスがラット唾液腺細胞において、ステロイド合成系の最初に産生されるプレグネノロンの合成酵素である CYP11A1 産生を促進することを明らかにした。また、ラット顎下腺灌流実験においてプレグネノロンは唾液分泌を抑制した。以上の結果からメタンフェタミン断薬ストレスはステロイド産生系を促進し、唾液分泌を抑制することが示唆された。しかし、このストレスが唾液分泌を抑制することの直接の証明はなされていない。また、どの様な経路で CYP11A1 産生を促進するのかは明らかではない。ところで、メタンフェタミンが pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) を介して diazepam-binding inhibitor (DBI) の産生を促進すること、DBI はミトコンドリアにある peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) を活性化することでステロイド産生を促進することが中枢の研究で報告されている。本研究においてラット唾液腺においてメタンフェタミン断薬ストレスが DBI および PACAP の産生を促進することを quantitative RT-PCR と Western blot 法を用いて明らかにした。さらに、このストレスが耳下腺、顎下腺および舌下腺のピロカルピン刺激唾液分泌を低下させることをカンニューレーション法により明らかにした。以上の結果からメタンフェタミン断薬ストレスは PACAP-DBI 系を介してステロイド産生系を活性化し唾液分泌を抑制することが示唆された。

P2-59

NOD マウス耳下腺腺房細胞における抗菌性タンパク質の発現
 ○梨田 智子¹、吉江 紀夫²、佐藤 律子³、今井 あかね¹、下村 浩巳¹ (1日歯大 新潟生命歯 生化、2日歯大 新潟生命歯 解剖 2、3日歯大 新潟短大)

唾液中には数種類の抗菌タンパク質が存在することが知られているが、感染、疾患発病等の非正常時において発現変化するのは報告されていない。我々は non-obese diabetic (NOD) マウスの耳下腺腺房細胞における遺伝子発現解析から、グラム陰性菌に対する抗菌性および抗炎症性があると言われている bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) ファミリーに分類されるタンパク質の中に、NOD マウスで発現が上昇するものがあることを見出した。そこで、マウス耳下腺におけるこのタンパク質の発現および局在性を調べた。

【方法】雌の NOD/ShiJcl マウスおよびコントロールとして C57BL/6Jcl マウスを用い、耳下腺を摘出し、調製した腺房細胞から RNA を抽出した。遺伝子解析は cDNA microarray (SurePrint G3, Agilent Tech.)、RT-PCR およびリアルタイム PCR (LightCycler, Roche) により行い、タンパク質は Western blotting および免疫染色により解析した。

【結果】遺伝子解析から、耳下腺において *Bpifal* (PSP) は NOD マウスでも正常マウスでも同程度発現していたが、*Bpifb1* の発現は正常マウスにおいて低く、糖尿病発症 NOD マウスにおいて著しく高かった。Western blotting および免疫染色により、NOD マウスにおける *Bpifb1* のタンパク質発現が高いことが確認された。また、ヒト唾液中にもこのタンパク質が検出された。

【結論】*Bpifb1* は NOD マウス耳下腺腺房細胞で高発現していた。

P2-60

唾液中グリシンとプロリンは年齢と歯周病に非依存的に一定の比率を示す
 ○田中 庄二¹、秋田 紗世子¹、片山 直^{1,2}、坂上 宏³、杉本 昌弘⁴ (1明海大 歯 口腔診断、2明海大 歯 保存修復、3明海大 歯 薬理、4慶大 先端生命科学研)

【目的】口腔内の加齢変化は、生活様式の変化とともに、唾液腺の機能低下等も加わり複雑である。様々な年齢と歯周病の進行度の異なる患者のメタボローム解析を実施し、代謝物の変化を網羅的に定量した。【方法】学内倫理委員会の規定に従い、様々な年齢と健常者及び進行度の異なる歯周病患者から唾液を採取し、メタボローム解析を行った。【結果と考察】計 144 物質の定量を行い、40 歳を境目に有意に濃度の高くなる代謝物が多く存在し、歯周病とともに酸化ストレス関係の物質の上昇を確認した。全代謝物で互いに相関をとると、多くのアミノ酸が高い相関を示した。プロリンが常にグリシンの 0.63 倍で一定の比率にあることが新たに判明した。これは、年齢や歯周病にも関係なく一定で、特に高齢者では高血圧やうつ病、また、それに伴う治療薬の影響もなく一定であった。この原因として、加齢による MMP の上昇に伴うコラーゲンの分解が考えられるが、同時に検出されることが期待されるハイドロキシプロリンはグリシンとの相関を示さなかった。また、マクロファージ細胞の LPS 活性化ではグリシンの分泌のみが上昇するために、プロリンとの相関を説明することもできない。この一定の比率をとる原因の同定には更なる追求が必要であり、また、どのような状況で破綻するかを調べる必要があるが、この比率は口腔内または唾液腺の状態を反映する指標になる可能性がある。

P2-61

ヒト唾液腺 HSG 細胞における構成的な AQP5 の取り込み

○長谷川 敬展¹、姚 陳娟¹、赤松 徹也¹、吉村 弘¹ (徳大 院 HBS 口腔分子生理)

近年、我々は、水チャネルアキアポリン 5 (AQP5) が細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇で素早く一過的に短鎖ユビキチン (Ub) 化されることを見出した。この AQP5 短鎖 Ub 化の役割について、細胞内輸送への関与が想定されるが、その実証には至っていない。本研究では、マウス正常 AQP5 あるいは非 Ub 化 AQP5 を発現させたヒト唾液腺 HSG 細胞などを用いて、複数の解析法で AQP5 短鎖 Ub 化とエンドサイトーシスの関連性を探った。蛍光標識デキストラン取り込み解析では、時間依存的なデキストランの取り込みはあるものの、 Ca^{2+} イオノフォア A23187 処理で AQP5 短鎖 Ub 化を惹起しても、AQP5 取り込み促進等の効果は見られなかった。また、細胞表面ビオチン化および脱ビオチン化を用いた生化学的解析においても、AQP5 取り込みは時間依存的に起こるが、A23187 非依存的・短鎖 Ub 化非依存的であった。細胞外領域にタグ配列を挿入した AQP5 の発現細胞を用いて直接 AQP5 の局在を観察すると、時間依存的、A23187 非依存的・短鎖 Ub 化非依存的に取り込まれた AQP5 は、細胞内で粒状のシグナルとして観察され、一部は EEA1 陽性の初期エンドソームに局在していた。以上の結果は、HSG 細胞では構成的な AQP5 取り込み機構が存在するものの、短鎖 Ub 化による調節的な AQP5 取り込み機構の存在の可能性やその重要性は乏しいことを示している。

P2-63

ウイルスベクターを用いた発光および蛍光プローブの唾液腺細胞への導入と機能解析

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

【目的】発光プローブは励起光を必要としないため、光毒性などの組織ダメージや自家蛍光を回避できる事から、蛍光プローブに代わるイメージングツールとして期待されている。またアデノ随伴ウイルス (AAV) は外来遺伝子をゲノムに挿入できるため長期間の遺伝子発現が可能である。また唾液腺では導管細胞への特異的な遺伝子導入が期待できる。本研究は唾液腺の *in vivo* イメージングを目的とし、発光プローブのナノランタン Ca^{2+} 発現アデノウイルス (Ad5-NL- Ca^{2+}) と、蛍光 Ca^{2+} センサー (YCnano50) 発現 AAV ベクターを作製し、唾液腺細胞における機能解析を行った。【方法】 Ad5-NL- Ca^{2+} ベクターおよび AAV-DJ-YCnano50 ベクターを作製した。これらを唾液腺などの培養細胞に導入して発現させ、AQUA-COSMOS イメージングシステムにより Ca^{2+} 動態を解析した。【結果と考察】 Ad5-NL- Ca^{2+} を導入した HeLa 細胞の約 80% で NL- Ca^{2+} が発現した。25 μ M 発光基質 (セレンタラジン-h) 存在下でヒスタミン刺激を加えると、一過性またはオシレーション様の Ca^{2+} 応答が観察された。今後は発光 cAMP センサーを作製し、これらのセンサーを発現させた唾液腺を使ったシグナル解析を行う予定である。

P2-62

唾液腺再生におけるサチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の関与

○赤松 徹也¹、姚 陳娟¹、長谷川 敬展¹、吉村 弘¹ (徳大 院 HBS 口腔分子生理)

【目的】唾液腺は主導管結紮後、再開放することで、腺房部はアポトーシスにより消失するが、導管細胞が増殖し、腺房部を再生することが知られているが、その分子機構は依然不明である。本研究では唾液腺主導管結紮-再生モデルを用い、サチライシン様前駆体蛋白質変換酵素 PACE4 の関与について検討した。【方法】7 週齢雄性 SD ラットを深麻酔下、外科的に注意深く顎下腺右側主導管を結紮 (L) した。左側は非結紮の対照 (CL) とした。結紮 1 日後と 1-2 週間後 (L1d, L1, L2)、および結紮 1 週間後に再開放し、更に 1-2 週間後 (L101, L102) に各々顎下腺を摘出し、各種解析に用いた。【結果と考察】 L1d において唾液の貯留を伴う顎下腺の腫脹が認められ、腺重量も増加した。L1 および L2 では顎下腺の萎縮、腺重量の減少が認められ、この変化は L101 および L102 も同様であった。この様な変化は対照群 (CL) では認められなかった。各顎下腺から蛋白質を調整し、ウエスタンブロットにより解析したところ、PACE4 の発現は L1d では殆ど検出できないが、L1, L2 では誘導が認められた。この発現誘導は L1CL, L2CL では認められなかった。免疫蛍光染色の結果、PACE4 は腺房部に局在すると考えられた。PACE4 はラット顎下腺発生過程で強く発現するが、生後成熟に伴い抑制され、成熟後は殆ど発現しないことから、主導管結紮により誘起される唾液腺再生過程に PACE4 の関与が示唆された。

P2-64

唾液中ヒスタチン mRNA レベルと口腔環境衛生との相関性

○佐藤 律子¹、梨田 智子²、三上 正人³、今井 あかね² (¹日歯大 新潟短大、²日歯大 新潟生命科学、³日歯大 新潟生命科学 微生物)

【目的】唾液タンパク質ヒスタチンは唾液腺で合成され、歯周病原菌に対する抗菌作用や抗真菌作用、また近年損傷治癒作用を有するとされている。唾液中ヒスタチンの増加により口腔環境衛生レベルの上昇が予想されるが、この関連性についての疫学的研究は未だなされていない。一方、唾液中には唾液腺由来の mRNA が安定的に含まれていることが近年報告されている。そこで、唾液中から mRNA を抽出してヒスタチン mRNA の発現量を調べ、口腔環境衛生を示す各種項目を検査してヒスタチンレベルと口腔環境衛生との相関性について評価した。【対象および方法】被験対象者は健康な女性 (18-59 歳; 平均年齢 35.3 歳) 15 名とした。口腔環境衛生は、Dentocult[®]SM、Dentocult[®]LB および Dentobuff[®]Strip (Orion Diagnostica) を使用し、*Streptococcus mutans* および *Lactobacillus* の計測数および唾液緩衝能を測定した。これに唾液流速と問診項目を加えた総評をカリエススコアとした。また、RNeasy Protect Saliva Mini (QIAGEN) を用いて自然流出唾液から RNA を抽出した。*HTN1* (histatin-1) および *HTN3* (histatin-3) の発現を RT-PCR および q-PCR (Applied Biosystems) により解析し β -actin (*ACTB*) との比 (*HTN/ACTB*) を求めた。【結果および考察】唾液中 mRNA の *HTN/ACTB* 比とカリエスリスクとの間には負の相関性が見られた。唾液腺におけるヒスタチン発現量の増加はカリエスリスクを低下させることがわかった。

P2-65

唾液ヒスタチンによる熱ショック蛋白質の Toll 様受容体リガンド効果抑制機序
 ○今村 泰弘^{1,2}、王 宝禮³ (1松歯大 薬理、²松歯大 院 遺伝創薬、³大歯大 教育開発)

【目的】ヒスタチンは、歯周病・う蝕原因菌に対して抗菌作用を示す唾液蛋白質である。我々はこれまでに、熱ショック蛋白質 HSC70 が Toll 様受容体 (TLR) 2、4 のリガンドとして働き、NF- κ B を活性化すること、ヒスタチンが HSC70 と結合することにより、これらシグナル伝達を抑制することについて明らかにした。本研究では、HSC70 のリガンド機能において、ヒスタチン 3 はどのような機序により抑制するのか検討した。【方法】合成したヒスタチン 3 あるいはコントロールペプチドとリコンビナント HSC70 をそれぞれ混合した。これら混合物に V8 プロテアーゼを加えて限定的に消化し、SDS-PAGE 後、クマシー染色を行なった。【結果】HSC70 はヒスタチン 3 と結合することにより、V8 プロテアーゼで消化されにくくなった。一方、コントロールペプチド存在下の HSC70 はヒスタチン 3 存在下の場合と比べ、V8 プロテアーゼでより消化された。【考察】HSC70 は TLR2、4 を介したシグナル伝達の活性化 (NF- κ B 活性化) に伴い、炎症性サイトカイン産生を誘導する。ヒスタチン 3 は HSC70 と結合することにより、HSC70 の高次構造変化をもたらす、TLR に対する HSC70 のリガンド効果を抑制すると考えられる。以上から、ヒスタチンは抗菌作用のみならず、口腔内損傷により細胞から放出された HSC70 の炎症作用を抑制する自然免疫関連因子であると示唆される。

P2-67

腺様嚢胞癌における ABCG2 および CD133 の免疫組織学的検索
 ○玉村 亮¹、辻極 秀次²、岡田 裕之¹、寒河江 登志朗¹、長塚 仁² (1日大 松戸歯 解剖 2、²岡大 院 医歯薬 口腔病理)

【目的】腺様嚢胞癌は悪性唾液腺腫瘍の一つであり、5 年生存率は高いものの局所再発、肺転移を高率にきたしやすく、長期的な予後は不良である。近年、様々な腫瘍において癌幹細胞の存在が報告され、臨床への応用が期待されている。本研究では、癌幹細胞マーカーを用いた免疫組織化学的検索により、腺様嚢胞癌における癌幹細胞について検討した。【方法】岡大病院病理部口腔病理診断部門で取り扱った腺様嚢胞癌 25 例について、ABCG2 および CD133 に対する抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。同時に Ki-67 についても検索した。【結果】ABCG2 は全症例において腫瘍細胞に陽性を示し、胞巣内の単一細胞あるいは数個の細胞集団に蛋白の局在を認めた。局在様式は組織型による差異はみられず、主に胞巣辺縁の細胞が陽性を示した。また、ABCG2 の局在は Ki-67 の局在と一部オーバーラップして認められた。一方、CD133 は管腔構造の内面のみ観察された。【考察】ABCG2 は腺様嚢胞癌の癌幹細胞マーカーとして有用である可能性が示唆され、ABCG2 陽性細胞は癌幹細胞を含む階層構造の上層の細胞を認識している可能性が考えられた。また、局在様式から基底膜など細胞外基質がニッチの形成に関与することが示唆された。

P2-66

赤色蛍光強発現 tg マウス唾液腺細胞の蛍光発現に関する研究
 ○古川 真司¹、畠山 慧¹、堀 智樹¹、石崎 明²、大塚 正人³、藤村 朗⁴、金野 吉晃¹、清野 幸男¹、三浦 廣行¹ (1岩医大 歯 口腔保健育成歯科矯正、²岩医大 生化 細胞情報科学、³東海大 医 基礎医学系分子生命科学、⁴岩医大 解剖 機能形態)

【目的】赤色蛍光強発現 tg マウス(大塚ら)は、唾液腺細胞レベルの tdTomato 蛍光発現部位の詳細な報告はまだない。本 tg マウス幹細胞をトレーサーとして用いる再生医療の研究は、唾液腺のみならず、他の臓器の再生への利用が期待される。そこで本研究では、本 tg マウスを用いた唾液腺幹細胞による再生医療の基礎データ作成を目的とした。【試料および方法】赤色蛍光強発現 tg マウス(3 週齢、10 匹、岩医大動物実験承認番号 23-075)の顎下腺、舌下腺を摘出し、固定後、通法によりパラフィン切片を作製した。tdTomato の局在観察には無染色、その他に Phalloidin 染色、HE 染色、PAS 染色を施し、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡にて観察、撮影を行った。【結果】無染色像と Phalloidin 染色の Merge 像で、tdTomato と F-actin の存在部位は一致していた。顎下腺細胞は細胞質内にアモルファスに蛍光が観察されたが、隣接する舌下腺細胞は胞体内の分泌顆粒を取り囲むように籠状の蛍光が観察された。【考察】今回、tdTomato の細胞内局在は、F-actin に大きく影響される可能性が示唆された。現在、本 tg マウスの顎下腺細胞を採取し、赤色蛍光強発現顎下腺由来細胞株の樹立を試みている。この細胞株の樹立により、顎下腺由来細胞の *in vitro* や *in vivo* における動態観察が容易になると期待される。

P2-68

異なる咀嚼負荷飼育マウスの唾液腺に対する DNA チップ解析
 ○河原 和子¹、森田 克也²、清水 慶隆³、二川 浩樹¹ (1広大院 医歯薬保健 口腔生物工、²広島文化学園大 院看護 薬理、³広大院 医歯薬保健 歯科麻酔)

【目的】肥満症や糖尿病患者の耳下腺は顎下腺に比べて脂肪沈着が亢進しやすい。習慣的な咀嚼負荷が唾液腺の糖・脂質代謝に関与する可能性を明らかにすることを目的として動物実験を行った。【材料および方法】ヒト型肥満・糖尿病モデルマウス(以下肥満マウス)と同系統の正常マウスをそれぞれ 2 群に分けて、同一組成の固形飼料あるいは粉末飼料にて 3ヶ月間飼育した。サンプリングは 16 時間絶食させたマウスにブドウ糖液(1 g/体重 1 kg)を腹注投与し、所定の時間に麻酔薬を投与し失血死させて唾液腺を採取した。遺伝子転写レベルの比較は各飼育群 3-4 匹で行い、解析には 194 種の糖・脂質代謝関連遺伝子を搭載したマウスメタボリック DNA チップを用いた。各遺伝子転写レベルの飼育群間における統計的な差違については、通法に従いノーマライズ後 Student t test に依った(有意水準=0.05)。【結果および考察】肥満マウスの顎下腺試料では、固型飼料群と粉末飼料群間で発現に有意差のある遺伝子は認められなかった。しかし耳下腺では、肥満マウスで 71 種、正常マウスで 114 種の遺伝子において飼料群間で転写レベルの有意差が認められ、有意差のあった全遺伝子において、シグナル平均値は固型飼料群>粉末飼料群であった。以上から、習慣的咀嚼負荷が耳下腺の糖・脂質代謝関連遺伝子の活性化に影響する可能性が示唆された。

P2-69

マウス唾液腺の発生過程における PACAP レセプター局在の解析
 ○野中 直子¹、中村 雅典¹ (¹昭大 歯 口腔解剖)

唾液分泌の制御は、主に自律神経支配のもとで行われる。Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) は、ヒツジの視床下部から単離・構造決定された神経ペプチドで、現在では多数の生理機能を持つ神経ペプチドとして種々の組織に認められている。これまでの我々の研究では、8 週齢と 8 か月齢の C57BL/6 マウス (♂) から三大唾液腺の耳下腺・顎下腺・舌下腺を採取し、PACAP レセプター (PACIR) について免疫組織学的検討を行い局在について検討した結果、8 週齢と 8 か月齢の三大唾液腺を比較すると、PACIR の免疫反応の局在には加齢に伴う明確な違いは見られなかった。今回の研究では、出生時 (0 日)・1・3・5・7 日の耳下腺・顎下腺・舌下腺を採取し、発生学的に PACIR の免疫反応の局在について検討を行った。耳下腺の発育は顎下腺・舌下腺の発育より極端に遅く、腺房や導管の形成は生後 3 日目位から確認できたが、免疫染色での反応は弱かった。顎下腺では、PACIR は線条部導管と顆粒性導管内にある細胞 (pillar cell) に免疫反応が認められた。また舌下腺では、PACIR の免疫反応は線条部導管に認められた。

P2-70

X 線照射されたマウスの胎仔期の顎下腺に対するアミノチオール系防護剤の効果
 ○那須 優則¹、中原 貴²、井出 吉昭² (¹日歯大 生命歯 共同研セ、²日歯大 生命歯 発生・再生)

【目的】胎仔期の顎下腺に及ぼす放射線の影響、および化学的防護剤 amifostine の効果を組織化学的、機能的に追究した。【方法】(1)マウス胎仔期 15.5 日目の唾液腺原基を分離、器官培養し、30 分間 10 mM の WR-1065 (amifostine の活性型；還元型) に浸漬し X 線 (0, 1, 3 Gy) 照射した。(2)妊娠 15.5 日目 (プラグ形成を 0.5 日とする) の親マウスに amifostine (リン酸型；プロドラッグ) を X 線照射 30 分前に 0.1 mg/g 投与した。実験(1),(2)ともに 2 日後の AQP3, AQP5, E-cadherin の発現を観察した。【結果】組織化学的観察で、放射線照射により胎仔顎下腺の分枝形態形成が遅延し、水の輸送チャンネルの AQP5 の発現が低下すること、そして防護剤がこれらの影響を軽減する傾向があることがわかった。

P2-71

糖尿病モデルラット大唾液腺に対するショウガ投与の影響について
 ○池田 利恵^{1,2}、佐藤 住美江²、菊池 憲一郎² (¹日歯大東京短大 歯科衛生、²日歯大 生命歯 解剖 2)

【目的】唾液は口腔の健康維持のために重要な役割を果たしている。糖尿病が唾液腺に与える影響を明らかにし、さらに、代謝上昇や血圧低下の効果が報告されているショウガの投与が、糖尿病モデルラットの唾液腺にどのような影響を与えるかを明らかにする目的で、本研究を実施した。【方法】糖尿病モデルラットとして GK ラットを用いた。粉末飼料のみを与えたグループをコントロール、粉末飼料に 3% のショウガ粉末を混合して与えたグループを実験群とし、1 か月間、同一条件下で飼育し、血糖値、体重、水摂取量、飼料摂取量を測定した。さらに大唾液腺のパラフィン切片を作成し、組織学的染色および抗アミラーゼ抗体を用いた免疫組織化学染色を施し、光学顕微鏡で観察した。【結果と考察】血糖値、体重増加率、水摂取量、飼料摂取量に対するショウガ投与の影響は認められなかった。耳下腺に存在する漿液細胞には、多数の空胞が認められた。顎下腺の漿液細胞にもごく少数の空胞がみられたが、舌下腺の漿液および粘液細胞には空胞が見られなかった。ショウガ投与により、耳下腺の漿液細胞では空胞が減少する傾向がみられ、細胞質のエオジン染色性が増加した。また、アミラーゼの免疫染色性が増加したことから、ショウガ投与により耳下腺の漿液細胞におけるアミラーゼ産生が増加したことが示唆された。顎下腺と舌下腺の漿液、漿液および粘液細胞では、ショウガ投与の影響は認められなかった。

P2-72

マウス顎下腺原基の分枝形態形成における Shh の影響
 ○水越 堅詞¹、小山 典子¹、林 徹¹、村上 政隆²、杉谷 博士³、松浦 幸子³、柏俣 正典¹ (¹朝日大 歯 歯科薬理、²生理研 細胞器官、³日大 獣医 生化)

【目的】分枝形態形成は器官形成において重要な現象であり、胎生期における上皮・間葉相互作用やそれらに関連する成長因子によって制御されている。本研究では、hedgehog (HH) ファミリーに属する蛋白質のひとつで、器官形成においてその重要性が報告されている Sonic hedgehog (Shh) に注目し、マウス顎下腺原基の分枝形態形成に対する効果を検討した。【方法】胎生 13 日 ICR 系マウスより顎下腺原基を採取し、Shh (200, 500, 1000, 2500 ng/ml) を添加した DMEM/F12 無血清培地を用い、フィルター上で器官培養を行った。培養開始 24, 48 h 後にそれぞれの濃度での形態変化を観察し Shh の効果を検討した。また、Shh 各濃度で 24, 48 h 培養した後、ErbB1 の特異抗体を用いてイムノプロット解析を行った。さらに、Shh (1000 ng/ml) で刺激した顎下腺を 1, 6, 12 および 24 h 後に回収し、EGF, HB-EGF, NRG1, ErbB1-4 の mRNA 発現レベルの変化をリアルタイム RT-PCR にて解析した。【結果と考察】1) Shh 1000 ng/ml 以上の濃度で刺激した顎下腺では end buds 数の有意な増加を認めた。2) Shh 刺激 1 h 後に EGF mRNA の発現レベルが有意に上昇した。3) イムノプロット解析では Shh 添加群で ErbB1 の発現増加を認めた。以上の結果より、Shh は分枝形態形成に対し促進的に働くと考えられる。この Shh の作用は、EGF/EGFR 系の活性化を介して発現している可能性が示唆された。

P2-73

胎生 12 日齢と胎生 13 日齢のマウス顎下腺原基の違いについて
 ○小山 典子¹、水越 堅詞¹、林 徹¹、柏俣 正典¹ (朝日大 歯 歯科薬理)

唾液腺が形成される過程において、上皮間葉相互作用が重要な役割を演じている。マウスの顎下腺は胎生 11 日目に口腔底の粘膜上皮が顎部方向に陥没することから始まる。胎生 12 日目になると上皮の先端に切れ込み (分枝) が入り、その後 2 方向に分かれ茎部の伸長が起きる。さらにそれぞれの上皮の先端は分枝と伸長反応を繰り返すことで外分泌腺の基本構造が形成される。ところで、胎生 13 日齢のマウスから摘出された顎下腺原基から間葉を除き、上皮組織を培養すると、器官形成は停止してしまう。一方、胎生 13 日齢の顎下腺原基をそのまま培養すると、無血清の条件下で培養しても分枝形態形成が継続して進行する。つまり、顎下腺器官形成メカニズムの本質は顎下腺自体にあると考えられる。しかしながら、胎生 12 日齢のマウスから摘出された顎下腺原基を胎生 13 日齢の顎下腺原基と同様に培養しても分枝形態形成はほとんど進行しない。そこで、われわれは胎生 12 日齢および胎生 13 日齢のマウスから顎下腺を摘出し、上皮と間葉を分離した後に、胎生 12 日齢の上皮組織と胎生 13 日齢の間葉組織をそれぞれ組み合わせて器官培養を行った。その結果、培養後 48 時間後から分岐の形成が認められ、その後継続した分枝形態形成が認められた。以上の結果から、胎生 12 日齢から 13 日齢の間に間葉で生じる何らかの変化が顎下腺の分枝形成の着手と継続に重要な役割を果たすことが示唆された。

P2-75

Rab14 GTPase の CCN2/CTGF 結合因子としての同定、およびこれらの相互作用が軟骨細胞の小胞輸送に及ぼす役割
 ○星島 光博^{1,2}、服部 高子¹、青山 絵理子³、西田 崇¹、滝川 正春^{1,3} (岡大 院医歯薬 口腔生化、²岡大 病院 矯正歯科、³岡大 歯 機能系 共同)

CCN2 は軟骨に強い発現を示し、軟骨細胞の増殖・分化だけでなく、線維芽細胞や血管内皮細胞の接着・遊走など多彩な生理機能を発揮する液性因子である。我々は CCN2 の機能を調節する分子を探索し、これらの分子間の相互作用が軟骨細胞に与える影響を調べた。軟骨細胞様細胞株 HCS-2/8 由来の cDNA ライブラリーから、CCN2 と結合する因子として Rab14 を同定した。GFP 融合 CCN2 と Halo 融合 Rab14 蛋白質 (WT)、またはその constitutive active (CA) form あるいは dominant negative (DN) form を COS7 細胞で発現させ、細胞内の局在を調べた。その結果、CCN2 を共発現しない場合、Rab14 WT は細胞質全体に均一な分布を示したが、CCN2 と Rab14 WT または CA form を共発現すると、両者は細胞質全体でドット状に共局在した。一方で、CCN2 と DN form は、主に核周辺の領域に限局してドット状に共局在した。さらに、Rab14 およびその変異体を HCS-2/8 細胞に過剰発現させたところ、プロテオグリカン (PG) の細胞周囲への蓄積は、DN form の Rab14 では野生型と比較して 75% に低下した。今回の結果は、軟骨細胞内で CCN2 と Rab14 が相互作用し、PG を含む小胞の輸送に関与している可能性を示唆している。

P2-74

進行性骨化性線維異形成症から同定された 2 種類の ALK2 変異体は II 型受容体に対する感受性が異なる
 ○藤本 舞^{1,2}、大澤 賢次¹、古株 彰一郎¹、須田 直人²、片桐 岳信¹ (埼玉大 ゲノム 病態生理、²明海大 歯 歯科矯正)

【目的】 進行性骨化性線維異形成症 (FOP) は BMP1 型受容体 ALK2 の遺伝的変異により、全身の骨格筋組織内で異所性骨化を生じる。典型的 FOP 症例 R206H では小児期から成長に伴い骨化が進行し、さらに筋損傷によって急激な異所性骨化が起こる。最近、FOP の非典型的の症例として、筋損傷後も骨化を認めずに成人になって初めて骨化した遅発性の症例から、新規の ALK2 変異 (G325A) が同定された。本研究では、G325A の活性化機構を解析した。【方法・結果】 マウス筋芽細胞株 C2C12 に ALK2 変異体と筋損傷で発現の増加する II 型受容体 (BMPR-II) を共発現させて ALP 活性を測定した。R206H は BMPR-II で活性化されたのに対し、G325A の活性は上昇しなかった。G325A は、別の II 型 BMP 受容体の ActR-IIB により活性化され、キナーゼ活性のない ActR-IIB 変異体では活性化されなかった。ALK2 の細胞内領域には II 型受容体によってリン酸化され得る 9 つの Ser/Thr 残基がある。G325A の 203 番目の Thr を Val に置換すると ActR-IIB による活性化が阻害されたが、Thr203 以外の 8 つの Ser/Thr 残基を置換しても ActR-IIB で活性化された。【考察】 筋損傷後に異所性骨化を認めなかった症例から同定された G325A は、BMPR-II で活性化されずに、ActR-IIB で活性化された。この活性化には、ActR-IIB による ALK2 の Thr203 残基のリン酸化が重要と考えられた。FOP の臨床症状は各 ALK2 変異体の BMP の II 型受容体に対する感受性によって異なる可能性がある。

P2-76

PKR は炎症性骨破壊において重要な役割を果たしている
 ○寺町 順平¹、森本 景之²、羽地 達次¹ (徳大院 HBS 口腔組織、²産医大 医 解剖)

【目的】 PKR は TNF α 、LPS などに応答し、細胞の防御機構やアポトーシスに関与する蛋白質リン酸化酵素である。我々は PKR が RANKL による破骨細胞形成に重要な役割を果たしていることを報告したが、歯周病による炎症局所の微小環境における PKR の役割については不明である。そこで LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞 (HGF)、骨髄ストローマ細胞 (BMSC)、破骨細胞に対する PKR の役割を検討した。【方法】 歯周炎を惹起させたラットを作成し PKR の発現を検討した。HGF と BMSC およびマウス骨髄由来破骨細胞に PKR 阻害剤 (2AP) を前処理し、LPS 刺激後の RANKL の発現、細胞内情報伝達系と破骨細胞形成を検討した。【結果と考察】 歯周炎を惹起させたラットの歯周組織での PKR の発現は対照群に比べて上昇していた。HGF、BMSC、破骨前駆細胞において LPS、TNF α により PKR の発現が誘導された。LPS は HGF、BMSC の RANKL の発現を誘導し、2AP 処理により解除された。LPS は単独では破骨細胞形成を誘導しないが、RANKL を前処理することで破骨細胞形成を誘導し、その効果は 2AP 処理により解除された。HGF、BMSC、破骨前駆細胞で 2AP は LPS により活性化される NF- κ B、MAPK シグナルを抑制した。以上の結果から PKR は炎症局所の微小環境において破骨細胞の形成に関与していることが示唆された。

P2-77

臚細胞による骨芽細胞の制御

○和田 悟史¹、島田 明美²、中村 芳樹¹、中島和久²、二藤 彰² (鶴見大 歯 矯正、²鶴見大 歯 薬理)

【目的】歯根膜は形態学的に臚および靭帯と類似した緻密結合組織であり、歯を顎骨に固定するとともに、咬合力などのメカニカルフォースが顎骨に直接加わらないように緩衝する役割を果たしている。従って歯根膜組織内の細胞と骨芽細胞には相互作用があると想定されるが、分子レベルでのメカニズムは明らかになっていない。今回の研究では歯根膜類似組織である臚組織による骨芽細胞への作用に着目し、臚由来細胞が骨芽細胞を制御するか否かを検討した。【資料および方法】マウスの臚由来細胞と骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞の共培養を行い、分化への影響を調べた。さらに、臚細胞由来の可溶性物質が MC3T3-E1 細胞に影響を与えるか調べるために、両者の conditioned medium (CM) を MC3T3-E1 細胞に添加し、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色および免疫蛍光染色を行った。【結果および考察】MC3T3-E1 細胞単独培養に比べて、臚由来細胞との共培養時にオステオカルシンの発現が減少した。CM 添加実験において培養 14 日後、両者の形態に変化が認められ、ALP 活性染色でも異なる染色パターンが認められた。免疫蛍光染色では、臚由来細胞-CM 群で cleaved caspase3 陽性細胞が MC3T3-E1-CM 群に比べて多く認められた。【結論】臚由来細胞の可溶性物質が骨芽細胞の機能および生死を制御している可能性が示唆された。

P2-79

流体剪断応力により重合したアクチンにより CCN2 の発現と骨芽細胞の分化は誘導される

○本城 正¹、久保田 聡²、上岡 寛³、山城 隆⁴、滝川 正春²、山本 照子⁵ (¹ 鳥大 医 附 属 病 院 口 腔 外、² 岡 大 院 医 歯 薬 口 腔 生 化、³ 岡 大 院 医 歯 薬 歯 科 矯 正、⁴ 阪 大 院 歯 顎 顔 面 矯 正、⁵ 北 大 院 歯 顎 口 腔 矯 正)

流体剪断応力 (FSS) は骨のリモデリングを生じる主要なメカニカルストレスである。一方 CCN ファミリープロテイン 2 (CCN2) は近年、骨欠損に対する組織再生因子であることが明らかとなってきた。本研究では骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 を用いて FSS 負荷による Ccn2 発現に対する作用を評価し、そのメカニズムを調べた。Ccn2 の発現は FSS により劇的に上昇し、その強度は FSS に比例した。FSS による Ccn2 の発現は Rho キナーゼ阻害剤である Y27632 により阻害された。さらにアクチンフィラメント重合阻害剤を用いたところ、FSS による Ccn2 の発現はブロックされた一方で、アクチンフィラメント重合促進剤である cytochalasinD や jasplakinolide は Ccn2 の発現を増強した。これらの結果はアクチンフィラメントの形成が骨芽細胞への分化を誘導することを示唆した。加えて Rho シグナルを阻害する cAMP 依存性キナーゼは Ccn2 に対する FSS の効果を抑制した。以上から FSS による Ccn2 の増大と骨リモデリングにおいてアクチンフィラメント重合と Rho キナーゼが重要な役割を果たすことが示された。

P2-78

エストロゲンの骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の各種 ATPase に対する作用

○孔 令群¹、鈴木 邦明²、山出 義昭¹、工藤 智也¹、吉村 善隆¹ (¹ 日の出歯科診療所、² 北大 院 歯 口 腔 病 態 細 胞 分 子 薬 理)

【目的】骨芽細胞様 MC3T3-E1 (E1) 細胞を用い、無機イオンの輸送に関与する可能性のある各種 ATPase に対するエストロゲンの作用を明らかにすることを目的とした。【方法】各種濃度の 17β-エストラジオール (17β-E) 存在下で 10、20、30 日間培養した E1 細胞のホモジェネートを使用し、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性と ATPase 活性を測定した。【結果と考察】1. ALP 活性は、どの日数でも 10⁻⁹M から 10⁻⁵M の 17β-E で濃度に依存して増加し、10⁻⁵M でその作用は顕著であった。2. Na,K-ATPase 活性を 17β-E は 20 日目に約 2 倍増加したが、17β-E の濃度依存性は認められなかった。3. Ca-ATPase 活性は、10⁻⁵M の 17β-E ではどの日数でも有意に増加した。一方、Ca,Mg-ATPase 活性も 17β-E により増加した。4. Mg-ATPase 活性に対する 17β-E の作用は、20 及び 30 日では ALP に対する作用に類似していたが、20 日での 17β-E 濃度依存性は観察されなかった。以上の結果から、17β-E による E1 細胞の各イオン輸送 ATPase 活性の活性化時期は異なっていたが、ATPase に対する活性化作用は 10⁻⁵M という高濃度で強いことが示唆された。石灰化部位に存在すると推測される、アルカリ性至適 pH で高濃度の Ca を必要とする ATPase は、10⁻⁵M の 17β-E で顕著に促進されたことから、石灰化部位に Ca を供給する ATPase となる可能性があると考えられた。

P2-80

メカニカルストレスに対する歯槽骨 SOST mRNA の経時的発現変動

○藤原 敦¹、渡邊 竜太²、青木 啓太^{1,3}、矢野 航²、佐藤 和彦²、小萱 康徳²、北井 則行¹、江尻 貞一² (¹ 朝 日 大 院 歯 歯 科 矯 正、² 朝 日 大 院 歯 口 腔 解 剖、³ 朝 日 大 院 歯 歯 科 放 射 線)

【目的】生理的に遠心移動しているラット臼歯を矯正学的に近心移動させ、メカニカルストレスの方向を変化させることで誘導される SOST mRNA (mRNA) の発現変動を検索した。【材料と方法】ラット上顎臼歯部を Waldo 法により近心移動させ、術後 6、12、18、24 時間後に上顎骨を摘出し、*in situ* Hybridization により SOST mRNA の発現を検索した。観察部位は第一臼歯の近心口蓋根 (MP) と遠心口蓋根 (DP) 間の根間中隔歯槽骨とした。通常飼育した動物を対照群とした。【結果と考察】対照群では MP 遠心に面する根間中隔の歯槽骨が圧迫されていた。MP 遠心の歯槽骨中の骨細胞では生理的遠心移動に伴う圧迫により mRNA の発現が抑制されていた。DP 近心の歯槽骨中の骨細胞では mRNA 発現が認められたが、骨形成が生じている骨表面直下の骨細胞では mRNA の発現は認められなかった。また、実験群では DP 近心に接する歯槽骨が圧迫されていた。術後 6 時間、12 時間では対照群と同様の所見であったが、術後 18、24 時間では対照群で認められた DP 近心の歯槽骨中の骨細胞の mRNA の発現が消失していた。従って、矯正力により歯の移動方向を逆転させ骨に強いメカニカルストレスが加わると、18 時間後には骨細胞での SOST mRNA の発現が消失していることが示された。

P2-81

メカニカルストレスによって歯槽骨に生じる応力分布と sclerostin 免疫局在の変化について
 ○渡邊 竜太¹、青木 啓太^{2,3}、藤原 敦²、矢野航¹、佐藤 和彦¹、小萱 康徳¹、北井 則行²、江尻 貞一¹ (朝日大 歯 口腔解剖、²朝日大 歯 歯科矯正、³朝日大 歯 歯科放射線)

【目的】メカニカルストレスに誘導される骨改造現象調節機構を解明するため、咬合力により臼歯が遠心移動しているラットを用い、生理的および矯正学的歯牙移動時の歯槽骨の反応を生体力学的・組織学的に検索した。【材料と方法】ラット上顎歯槽骨に仮想咬合力で生じる応力分布を μ CT3 次元有限要素法にて解析し、骨標識の観察、TRAP 染色、sclerostin 免疫染色を行った。また歯牙に矯正処置を施し、1、3、5、7日後の sclerostin 陽性反応の局在変化を検索した。【結果】圧縮歪みが分布する領域の歯槽骨表面に骨吸収が認められ、伸展歪み分布領域の歯槽骨表面に骨形成が認められた。sclerostin 免疫反応は歯槽骨全域に認められたが、強い剪断応力が分布する領域の歯槽骨では sclerostin 免疫反応は減弱していた。矯正処置後1、3日目に近心口蓋根-遠心口蓋根間歯槽骨の sclerostin 免疫反応は消失していたが、矯正力が減弱する5、7日目では同部位の骨細胞に sclerostin 免疫反応を認めた。【結論】圧縮歪み領域に骨吸収が、伸展歪み領域に骨形成が誘導される事が示された。また骨細胞が剪断応力を感知し sclerostin 産生を抑制することが示唆された。さらに矯正力によって速やかに sclerostin 産生が停止され、矯正力の減弱とともに産生を再開する可能性が示された。

P2-82

W9 ペプチドの破骨細胞形成抑制作用と骨芽細胞分化促進作用
 ○中村 美どり^{1,2}、宇田川 信之^{1,2}、青木 和広³、大谷 啓一³ (松歯大 生化、²松歯大 総歯研、³東医歯大 院医歯薬 硬組織薬理)

【目的】我々はこれまでに、W9 ペプチドを正常マウスに投与することにより、骨幹部での石灰化率および骨形成率の上昇が認められ、結果として皮質骨密度が有意に上昇することを報告した。今回、マウス骨髄培養系における破骨細胞形成と骨芽細胞分化に対する W9 ペプチドの効果を検討した。【方法】約8週齢の正常 ddY マウスから骨髄細胞を採取し、RANKL と M-CSF 存在下で7日間培養後、TRAP 染色と ALP 染色を施し、破骨細胞と骨芽細胞の分化に対する W9 ペプチドの効果を検討した。【結果】正常マウス骨髄細胞における RANKL 誘導性の破骨細胞形成に対して W9 は TRAP 陽性多核破骨細胞形成を濃度依存的に抑制した。W9 (100 μ M) 添加群において、TRAP 陽性多核細胞形成が完全に阻害されたが、ALP 陽性の骨芽細胞は多数出現した。W9 (200 μ M) 添加群においては、ALP 陽性骨芽細胞からなる Nodule 形成が著明に認められた。【考察・結論】RANKL に結合する W9 ペプチドは、RANK シグナルを阻害することにより破骨細胞分化を抑制する。さらに、W9 ペプチドは骨芽細胞表面の RANKL に結合し骨芽細胞分化を誘導するものと考えられる。RANKL-RANK シグナルは、骨吸収のみならず、骨芽細胞による骨形成にも重要な役割を有する可能性がある。会員外共同研究者：古屋優里子 保田尚孝 (オリエンタル酵母工業株式会社)

P2-83

p130Cas の破骨細胞における骨吸収能発現のメカニズム
 ○大澤 賢次^{1,2}、福島 秀文¹、田村 幸彦³、青木和広³、大谷 啓一³、牧 憲司¹、自見 英治郎¹ (九歯大 分子情報生化、²埼玉大 ゲノム 病態生理、³東医歯大 硬組織薬理、⁴九歯大 口腔機能発達)

【目的】p130Cas (Cas) は細胞内のアクチン重合や細胞骨格の再構成に関与する分子で、破骨細胞特異的に Cas を欠損させたマウス (OC-CasKO) では破骨細胞の吸収不全による大理石骨病を呈する。そこで、この細胞を用いて Cas による破骨細胞の骨吸収能調節機構について検討した。【結果と考察】1. 野生型マウス (WT) 由来破骨細胞と比較して、OC-CasKO 由来破骨細胞ではアクチンリング形成が抑制され、波状縁の形成不全を認めた。2. 両群由来の破骨細胞をプレート上に播種すると、細胞接着に重要な β 3 インテグリン、c-Src および Pyk2 のリン酸化に差はなかった。3. OC-CasKO ではアクチン重合に関わる Rac1 の活性が減少しており、Rac1 および下流の Arp3 の細胞内局在が、WT ではアクチンリングと共局在したが、OC-CasKO では細胞内全体に分布していた。4. Rac1 の活性調節因子である Dock5 は、WT では c-Src、Pyk2 と会合するが、OC-CasKO では会合しなかった。さらに OC-CasKO では c-Src と Pyk2 の会合が減弱していた。5. OC-CasKO 由来破骨細胞に野生型 Cas 遺伝子を導入すると Dock5 は Cas と会合し、骨吸収機能が回復したが、Pyk2 との会合ができない変異型 Cas を導入しても Dock5 は Cas と会合せず、骨吸収機能は回復しなかった。以上より、p130Cas は c-Src、Pyk2、Dock5 と複合体を形成し、Rac1-Arp3 シグナルを活性化させることにより破骨細胞の骨吸収能を制御していると考えられた。

P2-84

骨折治癒過程におけるソニックヘッジホッグの役割
 ○松本 憲一¹、堀切 優¹、志茂 剛¹、栗尾 奈愛¹、奥井 達雄¹、黒田 大雅¹、佐々木 朗¹ (岡大 院医歯薬 口腔顔面外科)

【緒言】ソニックヘッジホッグ (SHH)、Focal adhesion kinase (FAK) 共に骨芽細胞の増殖、分化に重要な役割を担っている。今回我々は、骨折治癒過程における SHH と FAK の発現ならびにそれらの関連性について検討したので報告する。【材料ならびに方法】ICR マウス雄8週齢、第8肋骨骨折モデルを作製した。Short hairpin FAK RNA レンチウイルスを骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 細胞に感染させ、FAK ノックダウン骨芽細胞を作製した。また、破骨細胞形成能の検討は、MC3T3-E1 細胞とマウス骨髄 CD11b+ 細胞との共存培養系を用いた。【結果】骨折後3、5、14日目に皮質骨断端部の TRAP 陽性破骨細胞に隣接した ALP 陽性骨芽細胞に SHH、pFAK-Thy397 発現した。in vitro において、SHH を MC3T3-E1 細胞に添加すると、pFAK-Thy397 の発現上昇を認め、増殖能、分化能、破骨細胞形成能は有意に促進されたが、FAK ノックダウン細胞にはこれらの促進効果は認められなかった。【結論】骨折治癒過程増殖期から仮骨形成期において、骨髄細胞、骨芽細胞から産生される SHH は、骨芽細胞における pFAK-Tyr397 リン酸化を介し、骨芽細胞増殖、分化や破骨細胞形成を促進することが考えられた。

P2-85

骨シアロ蛋白質(BSP)遺伝子の Runx2 による転写調節機構の解明

○山内 雅人¹ (神歯大 院歯 高度先進口腔医学)

【目的】骨シアロ蛋白質(BSP)は骨芽細胞やセメント質等の硬組織特異的発現を特徴とし、それらの石灰化に重要な機能的役割を担う基質蛋白質である。演者はマウス BSP の遺伝子調節領域 9.0 kb をクローニングし、同領域内に存在する 3 か所の Runx2 認識配列(OSE2)の転写調節機構を検討した。【方法】各 Runx2 認識配列(OSE2-1~OSE2-3)の連結断片と転写開始点上流プロモーター領域 0.1 kb を結合したキメラ遺伝子を作製し、リポーターベクターにクローニングした。さらに線維芽細胞株 C3H10T1/2 に一過性にトランスフェクションして、それらの転写活性を検討した。また、各 Runx2 認識配列を含む遺伝子領域のクロマチン活性化状態は前骨芽細胞株 MC3T3E1 細胞によるクロマチン免疫沈降法にて検討した。【結果および考察】3 か所の Runx2 認識配列のうち OSE2-2 の連結ベクターは Runx2 発現ベクターの添加により約 14 倍の転写活性の上昇を示した。また OSE2-3 の連結ベクターは約 3 倍の活性上昇を示したが OSE2-1 は活性抑制を示した。また、Runx2 抗体とアセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法の結果、Runx2 の結合により OSE2-2 のクロマチン状態は活性化していた。これまでマウス BSP の遺伝子調節領域 9.0 kb が組織特異性を維持することを示してきたが、今回報告した 3 か所の Runx2 認識配列が協調してその転写制御を行っていることが強く示唆された。

P2-87

機械的刺激は DC-STAMP の発現抑制により RAW264.7 細胞の破骨細胞分化誘導を抑制する

○吉村 善隆¹、亀山 純香^{1,2}、長谷川 智一³、出山 義昭¹、鈴木 邦明¹、飯田 順一郎² (北大院歯 細胞分子薬理、²北大院歯 歯科矯正、³徳大病院 小児歯)

機械的刺激は、骨代謝において重要な役割を果たしているが、破骨細胞に機械的刺激を直接作用させた報告は少ない。今回、伸展刺激が破骨細胞分化にどのような影響を与えるのかを検討した。RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞を Bio-Flex plate にて 72 時間培養した後、Flexercell tension system を用い、30 cycle/分、10% 伸展刺激を 6、12、24 時間作用させた。TRAP 染色にて破骨細胞(2 核以上)数および巨大破骨細胞(8 核以上)数を測定し、破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR 法にて定量し、タンパク質発現量の変化をウェスタンブロット法にて解析した。24 時間伸展刺激群では TRAP 陽性破骨細胞数および巨大破骨細胞数は有意に減少した。破骨細胞マーカー遺伝子群の mRNA 発現量は、6、12、24 時間のいずれの時点でも有意に減少した。また、破骨細胞の融合因子である DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量も伸展刺激によって減少した。DC-STAMP のタンパク質発現量は、24 時間の伸展刺激によって顕著に減少し、接着因子である E-cadherin、Integrin α V および Integrin β 3 のタンパク質発現量も減少した。これらの結果より、伸展刺激は DC-STAMP などの細胞融合に関係する分子の発現を抑制し、細胞融合を抑制することで破骨細胞分化を抑制した可能性が示唆された。

P2-86

Sanguisorba officinalis 由来化学成分の破骨細胞分化に対する影響

○坂井 詠子¹、岩竹 真弓¹、西下 一久¹、福岡裕¹、岡元 邦彰¹、筑波 隆幸¹ (長大院医歯薬 口腔病態薬理)

【目的】バラ科の多年草ワレモコウ(*Sanguisorba officinalis*)の根より抽出精製した化学成分である Sanguin H-6 は、LPS 刺激した腹腔マクロファージにおいて抗酸化作用を示すことが報告されている。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 Sanguin H-6 による破骨細胞分化への影響を調べた。【方法】マクロファージ系細胞株 RAW-D を RANKL 刺激により破骨細胞へ誘導する系と、マウス骨髄細胞を M-CSF と RANKL で刺激する系を用いた。TRAP 染色による多核破骨細胞数の計測と Osteo Assay Plate を用いた骨吸収活性の比較、及び細胞生存率を Cell Counting Kit-8 を用い評価した。さらにウエスタンブロット法を用いて、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。【結果と考察】Sanguin H-6 は毒性のない濃度で顕著に破骨細胞形成と骨吸収活性を阻害した。また、Sanguin H-6 は RANKL 刺激後の ERK と p38 MAPK のリン酸化を阻害した。第 2 相抗酸化酵素であるヘムオキシゲナーゼの発現を顕著に誘導する一方、NFATc1、カテプシン K、Src のタンパク発現は濃度依存的に抑制した。さらに Sanguin H-6 は NFATc1 と NF- κ B1547:B の核移行を抑制した。以上の結果から、Sanguin H-6 は破骨細胞分化シグナルの NFATc1 と NF κ B の経路を阻害することで分化を阻害するものと思われる。(共同研究者：田中隆 長大院医歯薬天然物化学、北島玲那 長大歯学部)

P2-88

破骨細胞の分化抑制に関するザクロポリフェノールの作用メカニズムの解明

○岩竹 真弓¹、坂井 詠子¹、西下 一久¹、岡元 邦彰¹、筑波 隆幸¹ (長大院医歯薬 口腔病態薬理)

【目的】ザクロの果皮の約 50% を占めるブニカラジンは強力な抗酸化作用を持つポリフェノールで、動脈硬化抑制・抗腫瘍などの効果がある。しかしながら、破骨細胞へのブニカラジンの作用については解明されておらず、本研究に着手することにした。【方法】破骨細胞の分化にはマウス骨髄マクロファージ細胞株 RAW-D およびマウス骨髄細胞を用いた。薬物代謝第 2 相酵素 NQO-1 の発現による抗酸化効果をリアルタイム PCR によって調べた。破骨細胞形成については TRAP 染色法により評価した。また、RANKL によって誘導される p38MAPK や NF κ B などのリン酸化についてウェスタンブロット法により検討した。骨吸収はピットアッセイ法を用いた。【結果と考察】ブニカラジンは RANKL 存在下で濃度依存的に破骨細胞形成を抑制した。また、ブニカラジンの破骨細胞毒性への影響が少ない濃度において、NQO-1 の発現は経時増加した。さらに、ブニカラジンは I κ B、NF- κ B、p38 MAPK、および ERK のリン酸化を抑制した。したがってブニカラジンは、I κ B キナーゼ活性の抑制を介して RANKL 誘導性の I κ B および NF- κ B の依存的経路と ERK、p38 MAPK それぞれの MAPK カスケードの活性化も抑制していることが明らかになった。以上の結果から、破骨細胞形成が阻害されていると考えられる。(共同研究者：田中 隆：長大院医歯薬 天然物化学)

P2-89

骨折治癒過程における TRPV4 チャネルの関与
 ○沖 雄二¹、合島 怜央奈¹、畠山 純子¹、大崎 康吉¹、張 旌旗¹、村田 直久¹、木附 智子¹、城戸 瑞穂¹ (九大 院歯 分子口腔解剖)

【目的】細胞内外のカルシウムにより骨の細胞が調節されることから、カルシウムは骨のホメオスタシスに最も重要なものの一つである。骨のカルシウム維持に関わるチャネルが多く報告されてきたが、TRP (transient receptor potential) チャネルファミリーが骨において大きな役割を果たしていることが解ってきた。中でも TRPV4 は、軟骨細胞や破骨細胞の分化に関わる事が報告されている。本研究では、TRPV4 の機能を明らかにすることを目的として骨折の治癒過程における TRPV4 遺伝子欠失の影響を検討した。【方法】野生型マウスと TRPV4 遺伝子欠損マウス (TRPV4KO) を用いた。マウスの膝蓋骨直下の脛骨近位端中心部より髓内釘を挿入し、骨折作製装置により脛骨遠位部に横骨折を加えた。手術後 2 週間および 4 週間後に脛骨を摘出し、通常に従って固定を施した。高解像度 μ CT 解析および組織学的な解析を行った。【結果と考察】 μ CT 撮影像の三次元解析により、TRPV4KO は野生型と比較して、骨組織量、骨梁大きさ、骨密度の値が有意に小さかった。組織観察において TRPV4KO では野生型より骨化部位が少なく、骨の再生が遅延していることが推測された。また、TRPV4 KO では仮骨部位の細胞成分が野生型よりも粗であり、さらに軟骨の形成が野生型より少なかった。以上より TRPV4 の欠損は、骨折の治癒を遅延させていることが考えられた。

P2-91

ヒト骨肉腫由来 MG-63 細胞培養上清中の破骨細胞分化制御因子
 ○唐木田 丈夫¹、山越 康雄¹、大井田 新一郎¹ (鶴見大 歯 分子生化)

破骨細胞の分化は主に骨芽細胞から発現される膜結合型の破骨細胞分化因子 (RANKL) と分泌型の破骨細胞形成抑制因子 (OPG) によって調節されていることが知られている。【目的】今回我々はヒト骨肉腫由来の MG-63 細胞の培養上清に含まれる破骨細胞分化制御因子を分離精製し同定することを試みた。【方法】MG-63 細胞を 10% FBS 含有 α MEM 培養液中で培養した後、培養液を無血清 α MEM に交換して 3 日間培養した。培養上清をイオン交換クロマトグラフィーにて分離し、素通り画分を溶出した後、5 段階の NaCl 濃度グラジエント (0.1 M, 0.2 M, 0.4 M, 0.8 M, 1.6 M) でタンパク質画分を溶出した。破骨細胞分化に対する効果を調べるために、それぞれの画分を可溶性 RANKL とともにマウス単球由来の RAW264 細胞に添加し、3 日間培養して酒石酸抵抗性酸ホスファターゼ活性を測定した。【結果】イオン交換クロマトグラフィーで分離した画分のうち、素通り画分及び 0.1 M NaCl 溶出画分には破骨細胞分化を促進する物質が、0.2 M 及び 0.8 M NaCl 溶出画分には抑制する物質が含まれていることが判明した。【結論】MG-63 細胞の培養上清中には破骨細胞分化促進因子と荷電状態の異なる 2 つの抑制因子が共存していることが示唆され、現在それら物質の同定を検討中である。

P2-90

Effect of VCAM-1 on the osteoclast differentiation in RAW264.7 cells
 ○林 寛¹、氏井 庸介¹、合田 征司²、池尾 隆²、松本 尚之¹ (大歯大 院歯 矯正、²大歯大 院歯 生化)

【目的】RANKL 刺激による破骨細胞分化機序について解明することを目的とした。今回、RANKL 刺激による破骨細胞分化における VCAM-1 の役割の詳細を解明するために以下の検討を行う。【方法】VCAM-1 を plate に固層化し RAW264.7 細胞を 24 時間培養後 3 日間 RANKL 刺激を加え、TRAP 染色を行い TRAP 陽性反応かつ多核化してあるものを破骨細胞としその数を測定した。また、VCAM-1 を固層化し RAW264.7 細胞を RANKL にて 30 分刺激を行い FAK および ERK のリン酸化を Western Blotting で確認した。PBS(-)にて洗浄後 sample buffer (0.0625M tris-HCl (pH6.8), 2% SDS, 15% glycerol, 5% 2ME) を加えて、99°C で 3 分間ボイルし泳動用試料とした。等量の試料を 8% SDS-PAGE に供し PVDF メンブレンに転写し、リン酸化特異的 1 次抗体、HRP 標識 2 次抗体を反応させ、X 線フィルムにて感光させ現像した。同一メンブレンを WB stripping solution strong で処理し、1 次抗体を用いて同様に検出した。【結果】VCAM-1 との共刺激は RAW264.7 細胞の破骨細胞分化能を有意に促進した。また、VCAM-1 と RANKL 共刺激において FAK (py397, py576) および ERK のリン酸化が増強されたが、FAK、ERK のタンパク質量に変化は認められなかった。【考察】以上より、RAW264.7 細胞において炎症性サイトカインにより発現される VCAM-1 が破骨細胞分化を促進し、そのシグナル伝達経路には FAK (pY397, pY576)、MAP Kinase の ERK 経路が関与している可能性が示唆された。

P2-92

破骨細胞分化の後期に産生される Wnt1 は破骨細胞機能を促進する
 ○天野 滋¹、大森 喜弘¹ (明海大)

【目的】昨年の本学会で、破骨細胞分化の初期に誘導される Wnt6/ β -catenin シグナルが、DC-STAMP 遺伝子発現を促進し破骨細胞の多核化に関与していることを報告した。今回私共は、破骨細胞分化の後期に誘導されてくる Wnt1 が破骨細胞の骨吸収機能に関与しているか否か破骨細胞前駆細胞株 4B12 細胞を用いて検討したので報告する。【方法・結果】1) 4B12 細胞を M-CSF と sRANKL で刺激したところ、1 日目に Wnt2b と Wnt6 が、3 日目に Wnt5b と Wnt9a が、そして 5 日目に Wnt1 の遺伝子発現が認められた。2) 4B12 細胞を dentin slice 上に 5000 個播種し、まず M-CSF と sRANKL を含有する培地で 5 日間培養した。その後、同様の培地に交換、さらに Wnt1 を添加し 5 日間培養した。その結果、Wnt1 を添加することによって非添加群より骨吸収活性の上昇が認められた。また、Itgb3、Car2、Ctsk、Mmp9 の遺伝子発現の上昇が認められた。3) Wnt1 のシグナル伝達経路のターゲットである β -カテニンを siRNA でノックダウンしたところ、Car2 の遺伝子発現が抑制された。【考察】M-CSF と RANKL 刺激によって破骨細胞分化の後期に誘導されてくる Wnt1 は、破骨細胞の骨吸収機能を正に制御している可能性が示唆された。

P2-93

膜ナノチューブを介する破骨前駆細胞間融合の走査電顕的解析

○張 旌旗¹、高橋 良^{1,3}、久木田 明子²、成松 加奈子^{1,4}、上原 範久¹、山座 孝義¹、城戸 瑞穂¹、久木田 敏夫¹ (¹九大 歯 分子口腔解剖、²佐賀大 医 微生物、³九大 歯 咀嚼機能再建、⁴九大 歯 矯正)

【目的】膜ナノチューブ(TNTs)は極めて細いトンネル状の細胞間橋であり、免疫系細胞間の情報伝達において重要な役割を演ずる。破骨細胞は造血幹細胞に由来する前駆細胞が特異的に認識・融合することによって形成される多核細胞である。RANKL 下流のシグナル伝達機構についてはよく分かってきたが、前駆細胞同士の融合機構については不明な点が多い。我々は破骨前駆細胞間の融合に TNTs が重要な役割を示唆する所見を報告した。今回、前駆細胞間の融合過程で高頻度に出現する TNTs について、走査電顕を用いて観察し、融合過程の詳細な形態学的解析を行った。【方法】破骨前駆細胞株である RAW-D 細胞を RANKL および TNF- α で刺激し、培養破骨前駆細胞の TNTs を走査電顕で解析した。【結果と考察】 TNTs は形態学的に細型、中型、太型の 3 種類に分類することができた。中型 TNTs は遠隔の細胞と連結する傾向が高いことが分かった。TNTs の太さの違いは分子輸送能や情報伝達能と関係していることが示唆された。また、TNTs は 2 個の前駆細胞間の結合のみならず、複数の前駆細胞同士の結合にも使われており、細胞間の融合も観察された。遠くに存在する特定の細胞との間にも TNTs は形成されており、遠隔への迅速な情報伝達が行われている可能性が示唆された。TNTs を介した分子の移動を含む相互作用が前駆細胞間の融合に重要な役割を持つ可能性が示唆された。

P2-95

ケルセチンは膜型エストロゲン受容体 GPR30 を介して破骨細胞の分化を抑制する

○増原 正明¹、塚原 飛央¹、佐藤 友昭¹ (¹鹿大院医歯 歯科薬理)

ケルセチンはタマネギ、ケッパーなどをはじめとする多くの食物に含まれるフラボノイドであり、抗炎症作用や抗酸化作用などが報告されている。さらに骨吸収の減弱作用についても報告されているが、破骨細胞の分化や活性化に対してケルセチンがどのように作用しているかについてはほとんど解明されていない。本研究では骨髄細胞からの *in vitro* 破骨細胞分化系を用いて、10 μ M のケルセチンによって RANKL による破骨細胞が抑制されること、およびこの抑制にエストロゲンの核内受容体 ER α だけでなく膜型エストロゲン受容体 GPR30 が関与していることを見いだした。GPR30 は破骨細胞の分化のすべての時期で発現しており、GPR30 の特異的アゴニストは破骨細胞分化を抑制し、さらに GPR30 のアンタゴニスト添加によってケルセチンの分化抑制からの回復が見られた。また、siRNA 法を用いて GPR30 をノックダウンすることによってもケルセチンの分化抑制からの回復が見られた。ケルセチンによって破骨細胞分化のマスター制御因子 NFATc1 の発現は変わらないこと、Akt や PKC のリン酸化に影響が見られることから、M-CSF と RANKL といったサイトカイン刺激だけでなく G タンパク質共役受容体からのシグナルも破骨細胞分化に大きく影響を与えているものと考えられる。

P2-94

牽引力は CTGF シグナルを介して頭蓋縫合における血管形成を促進する

○竹下 信郎¹、長谷川 正和¹、関 大輔¹、宮下 俊郎¹、山本 照子¹ (¹東北大 院歯 顎口腔矯正)

縫合は頭蓋顔面の骨と骨を結合する線維性組織で、頭蓋顔面骨格の成長中心として知られる。また縫合は、頭蓋顔面に負荷される機械的刺激を受容する役割を持ち、矯正歯科治療では顎整形力を縫合に作用させ、成長期患者の骨格性不調和の改善を図る。しかし、機械的刺激が縫合に及ぼす生物学的影響の全容は明らかではない。本研究では、牽引力に対する縫合の初期反応として、血管形成に着目して解析を行った。6 週齢 ICR マウスの頭頂骨にスプリングを装着し、矢状縫合に 20 g の牽引力を 0、3、および 12 時間負荷した。間葉系幹細胞マーカー発現を解析した結果、矢状縫合で STRO-1 陽性細胞、CD44 および CD73 の発現が認められたが、牽引力負荷後 12 時間にそれらの発現は減少した。VEGF と内皮細胞マーカーの発現は、3 時間で上昇した。CTGF 発現もまた 3 時間で上昇し、さらに CTGF 中和抗体は牽引力による VEGF 発現の上昇を抑制した。また ERK および JNK の阻害剤は、牽引力による CTGF および VEGF 発現の上昇を、それぞれ部分的に抑制した。本研究により、牽引力に対する縫合の初期反応において、血管形成が誘導されることが示された。この血管形成は CTGF により制御され、また MAPK も部分的な制御に関与することが示唆される。さらに、縫合における間葉系幹細胞の存在が初めて示され、牽引力による内皮細胞発現の亢進に関与することが推察される。

P2-96

RANKL により Venus を発現誘導するマクロファージレポーター細胞株の作成と破骨細胞分化の解析

○久木田 明子¹、久木田 敏夫² (¹佐賀大 医 微生物、²九大 院歯 口腔分子細胞)

【目的】破骨細胞の分化は RANKL によって誘導されるが、融合や骨吸収の制御機構はまだ不明の点が多い。本研究においては、カテプシン K プロモーターを用いて蛍光タンパク質を発現するレポーターマクロファージ細胞を樹立することを目的とした。【方法】カテプシン K プロモーターの下流に GFP 改変型である Venus をコードする cDNA を挿入したプラスミドを構築し、マクロファージ RAW-D 細胞に導入した後 G418 を用いて耐性クローン RAW-ctsk-Venus を選択した。RAW-ctsk-Venus に RANKL などの因子を添加し破骨細胞分化能を Venus の発現と TRAP 染色により測定した。Venus の発現強度は共焦点顕微鏡及び蛍光光度計で測定した。【結果】 RAW-ctsk-Venus1 は RANKL の添加により TRAP 陽性の多核細胞を形成し、Venus の発現が単核細胞と多核細胞で検出された。Venus の発現は LPS や IL-1 β によっては上昇しなかったが、RANKL と TNF α によって誘導された。さらに、NFAT 阻害剤は RANKL による RAW-ctsk-Venus1 から形成される Venus 陽性の多核細胞の形成を阻害したが、形成された途中の破骨細胞に NFAT 阻害剤を添加すると Venus の蛍光強度がやや亢進した。【結果と考察】 RAW-ctsk-Venus1 は、破骨細胞の分化における単核細胞と多核細胞の違いや、分化・機能に関わる因子のハイスループットな解析に利用できるレポーター細胞であると考えられた。

P2-97

RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に及ぼす IL-17A の影響

○井上 博¹、堂前 英資²、合田 征司²、内橋 賢二¹、西川 泰史¹ (大歯大 生理、²大歯大 生化)

【目的】歯槽骨の骨吸収メカニズムは部分的にしか解明されていない。IL-17A は骨芽細胞上の receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) 発現を誘導し、破骨細胞分化に対して間接的に作用することが知られている。しかし、破骨細胞前駆細胞に対する IL-17A の直接的な影響は不明である。そこで今回私たちは、破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞に対する IL-17A の直接的な影響について検討した。【方法】1) RAW264.7 細胞上の IL-17 レセプターをフローサイトメーターにて確認した。2) IL-17A の細胞増殖に対する影響について細胞増殖測定用試薬 WST-1 を用いて検討した。3) IL-17A の破骨細胞分化に対する影響を分化実験 (TRAP 染色) にて検討した。4) IL-17A の p38 MAPK リン酸化についてウエスタンブロット法にて検討した。【結果】1) RAW264.7 細胞上に IL-17 レセプターの存在を確認した。2) IL-17A は細胞増殖に影響を与えなかった。3) RANKL と IL-17 で共刺激を加えると RANKL による破骨細胞分化の増強が抑制された。4) RANKL 単独刺激により p38 MAPK のリン酸化が起こった。しかし、RANKL と IL-17A の共刺激では RANKL 単独刺激に比べ、p38 MAPK のリン酸化が抑制された。【考察】以上の結果より、IL-17A による破骨細胞分化抑制は細胞増殖抑制によるものではなく破骨細胞分化シグナルが抑制されたことによる可能性が示唆された。また破骨細胞分化シグナルに p38 MAPK が関与している可能性が示唆された。

P2-99

骨芽様培養細胞 MC3T3-E1 のアルカリ性ホスファターゼ活性を増加する血清中因子について

○戸円 智幸¹、深田 哲也¹、橋本 修一¹ (日歯大 生命歯 共同研 アイソトープ研究施設)

【目的】我々は、これまでに骨芽様培養細胞 MC3T3-E1 細胞のアルカリ性ホスファターゼ (ALP) 活性の増加には、Zn²⁺ と血清 (FCS) 中の高分子量因子が必要であることを報告してきた。今回、この活性増加が遺伝子発現を伴ったものであるかを調べるとともに、FCS 中の誘導因子をゲル濾過により分画し検索した。【方法】実験には、ほとんど ALP を発現していない (ALP 比活性: 5 pmol/min/ μ g) MC3T3-E1 細胞を用いた。この細胞を、キレックス交換樹脂処理により、金属 2 価イオンを除去した 10% FCS 添加培地に置き換え、15 μ M Zn²⁺ を添加して培養した。Zn の細胞への取り込みは、⁶⁵Zn を用い SDS-PAGE 後の ARG により確認した。酵素活性を増加する血清中の因子を検索するため、FCS をゲル濾過により分画し、各分画で細胞培養後 ALP のアッセイを行った。一方、ALP 遺伝子の発現を PCR により調べた。【結果】FCS および Zn²⁺ の両方を添加した培地では、ALP 活性が 10 倍以上増加し、PCR により ALP 遺伝子の発現量が増加していた。一方、⁶⁵Zn の細胞内蛋白質への取り込みも FCS との同時添加によるのみ認められた。FCS をゲル濾過で分離したところ、400 k、150 k、67 k、30 k の分子量に相当する分画に活性増加のピークが認められた。【考察】これらの結果から、Zn²⁺ と血清因子による ALP 活性の誘導は、ALP 遺伝子の発現量増加によるとともに、血清中にはこれに関わる複数の因子が存在することが示唆された。

P2-98

ラッパウニの大型又棘に由来する新規レクチンの精製

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

ラッパウニは体表が短く硬い棘と柔らかい球状の又棘に覆われている。又棘は無毒な小型と有毒な中型及び大型に分類され、刺されると局所に腫れや痛みなどが生じる。今回は大型又棘のタンパク質画分より新規レクチンの精製を試みた。【方法】徳島産ラッパウニ (50 個体) から大型又棘を採取し生理食塩水でタンパク質の抽出を行い、その凍結乾燥粉末を大型又棘標品とした。大型又棘標品からのレクチンの分画・精製は Superdex 200 カラムと Immobilized D-galactose (IDG) カラムの組み合わせにより行った。回収した各画分の生物活性はウサギ赤血球の凝集活性、マウス脾細胞の細胞増殖活性及びモルモット好中球の遊走活性を指標とした。【結果と考察】大型又棘標品を Superdex 200 カラムにより分画し、回収画分を P-I、P-II、P-III 及び P-IV 画分とした。赤血球凝集活性が高く、回収率の高かった P-II 画分を IDG カラムにより分画・精製を行い、非吸着画分を IDG-I 画分、吸着画分を IDG-II 画分として回収した。Native-PAGE では、IDG-I 画分は 24 kDa、IDG-II 画分は 170 kDa の位置にほぼ単一のタンパク質バンドを呈した。一方、SDS-PAGE では、IDG-I 画分は 23 kDa 及び 25 kDa の位置に、IDG-II 画分は 28 kDa の位置にタンパク質バンドを呈した。IDG 画分はともに細胞増殖活性及び遊走活性を示した。以上の結果より、ラッパウニの大型又棘には 6 量体レクチンが存在すると思われた。

P2-100

EGF による PDL 由来 EPC の増殖、分化制御

○木村 仁迪^{1,2}、大久保 直登¹、帖佐 直幸¹、衣斐 美歩¹、客本 斉子¹、加茂 政晴¹、金野 吉晃²、三浦 廣行²、石崎 明¹ (岩医大 生化 細胞情報、²岩医大 歯 矯正)

【目的】人為的な歯の移動に伴い、その歯根周囲の歯周靭帯 (PDL) では、線維組織あるいは血管組織のリモデリングが観察される。これまでに我々は、ラット PDL 由来初代培養細胞から派生した single cell-derived culture 2 (SCDC2) が、血管内皮前駆細胞 (EPC) として働いて三次元培養下で血管様管腔構造を形成することを明らかとした。今回我々は、上皮成長因子 (EGF) により活性化される各 MAPK シグナルが、SCDC2 細胞の増殖ならびに筋線維芽細胞への分化に与える影響について調査した。【材料と方法】EGF が SCDC2 細胞の細胞増殖に与える影響について、WST-1 法により調査した。各 MAPK シグナル伝達物質の活性化について、ウエスタンブロット法にて調査した。またこの細胞への牽引力が誘導する筋線維芽細胞分化に対し EGF がどのように影響するかについて、定量的 RT-PCR 法あるいは蛍光抗体を用いた免疫細胞学的手法により調査した。【結果】EGF は、MAPK に属する ERK、JNK ならびに p38 MAPK 依存的に、SCDC2 細胞の増殖を促進した。また EGF は、牽引力により誘導される各種筋線維芽細胞マーカーの発現を ERK 依存的に抑制したが、ストレスファイバー形成には影響しなかった。【考察及び結論】今回の研究により、EGF が MAPK 依存的に PDL 中に存在する EPC の増殖を促進し、またこの細胞の筋線維芽細胞分化を抑制することで歯周靭帯中のコラーゲン線維含有量を調節し、人為的な歯の移動に影響する可能性が示唆された。

P2-101

D-dopachrome tautomerase のインスリン抵抗性改善機序に関連する分子の探索

○岩田 武男¹、石本 恭子²、水澤 典子¹、吉本 勝彦¹ (1徳大 院 HBS 分子薬理、2徳大 院 HBS 口腔顔面矯正)

【背景・目的】 アディポカインである D-dopachrome tautomerase (DDT) の組換え蛋白質を肥満マウスに投与するとインスリン抵抗性が改善する。DDT のインスリン抵抗性改善の分子機序を明らかにするため、DDT 発現抑制系及び過剰発現系を用いて脂肪細胞で発現が変動する遺伝子の同定を行った。

【方法】 ヒト前駆脂肪細胞株である SGBS 細胞から分化させた脂肪細胞に DDT 遺伝子に対する shRNA を発現させ DDT 発現抑制脂肪細胞を作製した。この細胞で発現が変動する遺伝子をマイクロアレイ解析及び qRT-PCR により検討した。また DDT を脂肪細胞で特異的に発現する遺伝子改変マウス (DDT-TG マウス) を作製し、高脂肪食による肥満誘導を行った際の、体重、耐糖能、脂肪組織及び肝臓の遺伝子・蛋白質発現について検討した。

【結果】 DDT 発現抑制脂肪細胞では血管内皮細胞増殖因子 (VEGF-A) の発現低下、セレノプロテイン P (SEPP-1) の発現上昇が認められた。DDT-TG マウスでは高脂肪食によるインスリン抵抗性発症が抑制され、その脂肪組織では VEGF-A が高発現しており、肝臓では逆に発現が低下していた。

【考察】 脂肪組織での VEGF-A の発現低下はインスリン抵抗性を増悪させる報告があり、DDT は脂肪組織で VEGF-A の発現を上昇させることでインスリン抵抗性発症を抑制している可能性がある。

P2-102

タイプ 1 型と 2 型糖尿病マウスにおける腎リンパ管新生

○内山 貴誠¹、高田 俊輔¹、敦賀 英知²、畠山 雄次²、石川 博之¹、沢 禎彦² (1福歯大 成長発達歯、2福歯大 生体構造)

糖尿病性腎症では、メサンギウムのコラーゲン増生による糸球体硬化と糸球体毛細血管壁の肥厚が見られ、糖尿病マウスの腎は浮腫による肥大化と組織間隙の増大を示す。本研究は糖尿病性腎症の環境下で誘導される腎脈管の形態学的変化について検討した。Streptozotocin 誘発性 1 型糖尿病マウスと KK/Ta2 型糖尿病マウスについて、腎の脈管分布の免疫組織化学的検索を行った。リンパ管は podoplanin、血管は PECAM-1 で鑑別し、単位面積あたりのリンパ管数と血管数について比較した結果、血管数に変化は見られないが、リンパ管に増生の起きていることが明らかとなった。腎リンパ管は腎皮質ではほとんど見られず、髄質に多く分布する。1 型糖尿病マウスでは 50~100 μm の大きさのリンパ管に、また 2 型糖尿病マウスでは 50 μm 以下の微小リンパ管に増生が見られ、糖尿病性腎症では浮腫を解消するため、代償的にリンパ管が増生することが考えられた。1 型糖尿病マウスは Streptozotocin 投与 1ヶ月以内に、また 2 型糖尿病マウスは高カロリー餌による飼育 4ヶ月で糖尿病を発症する。糖尿病の長期経過をたどった腎臓では、髄質に増生したリンパ管が成長するため、2 型糖尿病マウスよりも管腔が大きくなることが考えられた。糖尿病性腎症は腎細胞癌のリンパ節転移に対する助長因子となるかもしれない。

P2-103

睪島からのインスリン分泌におけるアデノシン受容体の役割

○大谷 政博¹、大浦 清¹ (1大歯大 薬理)

我々は糖尿病治療薬の開発のための新たな標的として、アデノシン受容体に着目して本研究を行った。最初に、マウス睪島及び睪β細胞株の両方において、すべてのアデノシン受容体サブタイプ (A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃) の mRNA が発現していることを RT-PCR 法で確かめた。次に、内因性の非選択的アゴニストであるアデノシンが、高濃度グルコース存在下でインスリン分泌を 2~3 倍促進することを明らかにした。このアデノシンの促進作用は、A_{2A}受容体のアンタゴニストによって阻害されたが、他のサブタイプのアンタゴニスト及びヌクレオシドトランスポーターの阻害剤に対しては影響を受けなかった。また、選択的 A_{2A}受容体のアゴニストによっても同様にインスリン分泌が促進されることを確かめた。したがって、アデノシンによるインスリン分泌促進作用に A_{2A}受容体が関与していることが推測された。以上の結果から、A_{2A}受容体の活性化がマウス睪島からのインスリン分泌を刺激することが示唆され、インスリン分泌促進薬の開発のための新たな標的となり得ると考えられた。

P2-104

Regulation of insulin secretion by phospholipase C-related catalytically inactive protein

○浅野 智志¹、兼松 隆¹ (1広大 院医歯薬保細胞分子薬理)

糖尿病と歯周疾患は密接に関連している。インスリン分泌能を回復させる治療法の開発は、患者さんの QOL を向上させるために急務な課題である。我々は、phospholipase C-related catalytically inactive protein (PRIP) ノックアウトマウスにおいて、血漿のインスリン含量が増加すること、また、PRIP は GABA_A receptor-associated protein (GABARAP) と相互作用し、GABA_A受容体の形質膜への発現を調節している事を報告した。そこで、我々は、PRIP ノックアウトマウス睪島細胞を用いて、グルコース刺激時のインスリン分泌における PRIP の関与を確認したところ、第 2 相のインスリン開口分泌が亢進することが分かった。さらに、mouse insulinoma 細胞 (MIN6) の PRIP をノックダウンして解析を進めたところ、インスリン含有顆粒の移動性が亢進し、顆粒と GABARAP や KIF5 (顆粒輸送に関与するモータータンパク質) との共局在性が増強された。これらの表現型は、PRIP と GABARAP の結合を阻害するペプチドを MIN6 に発現させた場合においても確認できた。以上より、PRIP が、GABARAP が仲介するインスリン顆粒輸送を抑制的に調節し、インスリン開口分泌機構を制御していることが明らかとなった。

P2-105

発育期における塩分制限が顎骨・歯の形成に及ぼす影響

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

食生活の急激な変化によって短期間で顎骨や歯の形態は変化するという。顎骨や歯の形成においては、脂質やタンパク質の不足による影響を受けることが報告されている。発育・成長には脂質やタンパク質だけではなく、補酵素となるミネラルも必須である。本研究では、細胞の浸透圧調節、筋収縮などに働き、生命保持に欠かせないミネラルの一つである食塩について、顎骨や歯の形成における塩分の栄養学的な意義を明らかにすることを目的とし、発育期の塩分制限食の摂取が顎骨や歯の形態に及ぼす影響について検討した。実験にはSDラットを用いた。胎生期から出生後2ヶ月後までの間、通常飼料(通常食群)または塩分制限飼料(減塩食群)で飼養された仔ラットの1)下顎骨および下顎頭、白歯冠長など諸径の計測、2)下顎頭のCT撮像、3)下顎頭における細胞形態の観察を行い、比較検討を行った。その結果、1)減塩食群の下顎骨のオトガイ近心部から下顎頭遠心突出部までの長さ、下顎頭と下顎頭を合わせた長さおよび白歯近遠心径が通常食群と比較して短かった。2)CT画像所見では、減塩食群の骨髓腔の面積が通常食群と比較して大きかった。3)通常食群と比較して減塩食群の下顎頭の肥大軟骨細胞層が厚く、骨への石灰化の遅延の可能性がみられた。以上の結果から、下顎骨、下顎頭および白歯の形成に塩分が重要な働きを担っている可能性が示唆された。

P2-106

一口量とBMIとの関係

○塩澤 光一¹、奥村 敏¹(¹鶴見大 歯 生理)

【目的】近年、肥満傾向は早食いなどの食習慣と密接に関わっていることが示されているが、ヒトの摂食行動のいったい何が肥満と直接関わっているかについては不明な点が多い。そこで本研究は、健康な成人被験者の食品摂取量および咀嚼行動と肥満度との関係について調べた。【方法】37名の成人被験者(男性20名、女性17名、平均23.6歳)に、プリッツ、魚肉ソーセージおよびロールパンをそれぞれ自由に摂取させた後、最終嚥下まで咀嚼させた。各自の一口量は摂取前後の食品の重量および長さを測定して求めた。また咀嚼回数カウンターで最終嚥下までの咀嚼回数を計測した。被験者の咀嚼能率はManlyらの篩分法およびグルコセンサーによるグルコース値で求めた。被験者の肥満度はbody mass index (BMI)で見積もった。【結果および考察】被験者の咀嚼能率とBMIとは有意な相関を示さなかった。プリッツの一口量とBMIは有意な相関を示さなかったが、ソーセージ一口量およびパン一口量とBMIはどちらも有意な正の相関を示した。一方、ソーセージ咀嚼回数およびパン咀嚼回数とBMIではどちらも有意な相関を示さなかった。以上の結果から、自由に噛み取らせた場合、長さよりも量が大きく一口量に関わるソーセージやパンなどの食品咀嚼では、一口量と肥満度とは高い相関を示すが、咀嚼回数は肥満度と直接関わっていないことが示された。

P2-107

Molecular characterization of PRIP as an adaptor protein of Akt

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

PLC-related but catalytically inactive protein (PRIP) is a protein with a domain organization similar to PLC- $\delta 1$. We have reported that PRIP interacts with protein phosphatases, PP1 and PP2A, depending on the phosphorylation level of PRIP. We also found that Akt was precipitated along with PRIP from neuronal cells. In this study, we investigated the interaction between PRIP and Akt by mapping the binding site and examine the phospho-regulation. Co-immunoprecipitation assay revealed that both Akt and PP2A were co-precipitated along with PRIP, and the precipitation was up-regulated when the cells were stimulated with insulin. GST-pull down experiments using recombinant GST-Akt and his-tagged PRIP or the deletion mutant of PRIP (74-298) showed the direct binding of Akt to 74-298 residues in RPIP. Pretreatment of PRIP with Akt in the presence of ATP increased this interaction. Akt phosphorylated PRIP, and analyses using PRIP mutants revealed that Ser-96 was important for regulating the interaction with Akt. These results indicate that PRIP modulates Akt signaling by the regulation of complex formation between Akt and protein phosphatases.

P2-108

ホスホイノシチド代謝と連繋したTRPC3,C6,C7チャンネルにおける自律的制御機構の解明

○今井 裕子¹、吉本 尚平^{1,2}(¹九大 病院 全身管理歯科、²九大 院歯 口腔細胞工)

ホスホイノシチド(PIPs)は、種々のイオンチャンネルの重要な制御因子であることが知られている。我々は、受容体作動型の実選択的陽イオンチャンネルであるTRPC3,C6,C7チャンネルに着目し、PIPsの役割について検討した。これらのチャンネルの活性化には、PI(4,5)P₂の代謝産物であるジアシルグリセロールが必須であるがPIPsの変動そのものにも影響を受けると言われている。そこで、これらのチャンネル群に対するPIPs動態による影響を測るツールとして、電位作動性PIPs脱リン酸化酵素Voltage-Sensing Phosphatase (VSP)を用い検討した。HEK293細胞にTRPC6とVSPを共発現させVSPを活性化させると、TRPC6電流の一過的抑制が記録され、この抑制にはPI(4,5)P₂の急速な脱リン酸化が深く関与していることを見出した。TRPC3,C7においても同様の抑制を示したが、その強度や回復時間はTRPC7>TRPC6>TRPC3の順であった。更に、ムスカリン受容体を過剰発現させ検討した結果、同じ順にTRPC電流が速く不活性化(減衰)すると同時に、VSPによる一過的抑制の程度も減弱した。以上より、PI(4,5)P₂はTRPC3,C6,C7チャンネルにおいて活性化・不活性化の双方に作用し、チャンネルサブタイプ別に異なる親和性による電流の自律的制御を行っていることが示唆された。

P2-109

マウス顔面皮膚の急性炎症疼痛発症に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核ニューロン AMPA 受容体サブユニット GluR2 および GluR3 trafficking の関与

○坪井 美行¹、岩田 幸一¹ (1日大 歯 生理)

【目的】三叉神経脊髄路核尾側核 (Vc) ニューロンに発現する AMPA 受容体サブユニット GluR2 と GluR3 の trafficking のマウス顔面へのホルマリン注射により引き起こされる急性炎症性疼痛に対する関与を明らかにすることを目的とした。【方法】それぞれのサブユニットの trafficking に関与するタンパク質 (PICK1 と GRIP1/2) との結合を遺伝子操作 (C 末端への Knock-in) により阻害したマウス (デルタ7KI マウス) と野生型マウスの顔面皮膚に4%のホルマリンを10 μ l 注入し、顔面皮膚の急性炎症モデルマウスを作製した。侵害性行動として顔面皮膚の引っ掻き時間を計測した。ウレタン (1.5 g/kg、腹腔内注射) で麻酔したマウスの顔面皮膚へ機械および温度刺激を与えた後、pERK および Fos 蛋白陽性ニューロンの分布を、Vc を含む延髄と上部頸髄において検索した。また、Vc から侵害受容ニューロン活動を記録し、ホルマリン注射前後でのスパイク頻度の変化を解析した。【結果】野生型マウスに比べ、両サブユニットのデルタ7KI マウスともに、引っ掻き行動時間の短縮、late phase における Fos タンパク陽性細胞の発現の減少、WDR ニューロンの放電頻度の低下が認められた。【結論】GluR2 および GluR3 の trafficking はホルマリン注射後の late phase における異常感覚発症に重要な役割を担っている可能性が示された。

P2-110

ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-クロライド系による腭エラスターゼの損傷

○尾西 みほ子¹、小田島 武志² (1北医大 歯 生理、2札幌基礎医学教育研究所)

エラスターゼは、腭臓、動脈壁、好中球、血小板および脾臓に存在し、結合組織のエラスチンを特異的に分解する。ミエロペルオキシダーゼは多形核白血球に存在し、生体防御に関与する。ミエロペルオキシダーゼが好中球中のエラスターゼ作用を増強させるといういくつかの報告がある。ヒト多形核白血球によって生産されたオキシダント種が α_1 -プロテアーゼインヒビターを不活性化し、その結果、好中球エラスターゼによって引き起こされるタンパク質分解を間接的に増強するという報告がある。また、オキシダントが直接、好中球エラスターゼによる細胞外マトリックスのタンパク質分解を増強するという報告がある。本研究は、ミエロペルオキシダーゼがエラスターゼの作用を減少させる可能性を検討する目的で行った。実験には、ブタ腭臓由来エラスターゼ (タイプ I, Sigma) を用い、酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中で、ミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-クロライド系とインキュベートした。その結果、エラスターゼの紫外部の吸収スペクトルは変化し、エラスチン・コンゴレッドを用いたエラスチンの分解から評価したエラスターゼ活性は、ミエロペルオキシダーゼ系の処理により減じた。これらの結果から、エラスターゼはミエロペルオキシダーゼ-過酸化水素-クロライド系によって損傷を受けたと結論した。

P2-111

IL-4 による一酸化窒素合成酵素遺伝子 *NOS2* の発現抑制機構

○廣井 美紀¹、山口 花¹、大森 喜弘¹ (1明海大 歯 口腔生物再生医工 微生物)

【目的】IFN γ と LPS は、マクロファージ (M Φ) の炎症性遺伝子の発現を相乗的に増強し M1 M Φ へ分化誘導する。一方、IL-4 は抗炎症性 M2 M Φ の誘導だけでなく、M1 M Φ の遺伝子発現を抑制することが知られている。今回我々は IL-4 による M1 M Φ の炎症性遺伝子の発現抑制機構について、*NOS2* を標的遺伝子として解析を行なった。【結果】マウスマクロファージ様細胞株 RAW264.7 を IL-4 で前処理後、IFN γ と LPS で所定の時間刺激した。*NOS2* 遺伝子、タンパク質発現を検討した結果、IFN γ 、LPS の共刺激により *NOS2* の発現は相乗的に増強したが、IL-4 の前処理によりその発現は抑制された。この IL-4 による発現抑制は、IL-4 により誘導される転写因子 STAT6 のノックダウンにより消失した。*NOS2* 遺伝子プロモーター上の IFN γ 、LPS による制御領域をルシフェラーゼアッセイにより検討した結果、-62~-44 領域に存在する OCT-1 結合配列が必要であった。【考察】IFN γ 、LPS の共刺激による M1 M Φ の *NOS2* 遺伝子の発現に OCT-1 が関与していること、またこの IL-4 による発現抑制に STAT6 が関与していることが明らかとなった。さらに *NOS2* プロモーター上には STAT6 結合配列がないことから、この抑制機構に STAT6 が *NOS2* 転写活性に必要なコアクチベーターを競合している可能性が示唆された。

P2-112

IL-1 β で刺激した歯肉線維芽細胞、歯根膜線維芽細胞に対する立効散の抗炎症効果の検討

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

【目的】立効散は幅広く口腔内疼痛に用いられる漢方薬で、口内炎の治療にも用いられる。われわれは今までに立効散の鎮痛効果について、マウス Raw264.7 細胞を用いたアラキドン酸カスケードに対する検討、マウスの仮性疼痛反応による検討を行ってきた。また培養歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞を用い、種々の生薬の抗炎症効果を報告してきた。今回これら細胞を用い立効散の抗炎症効果を検討した。【方法】歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞を培養後、無刺激あるいは IL-1 β 刺激 (1 ng/mL) で立効散 (0 mg/mL から 4 mg/mL) を添加し、24 h 後に生細胞数 (MTT 法) を算定し、産生された培養液中の PGE2 濃度 (EIA 法) を測定した。【結果・考察】未刺激では立効散は歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞の PGE2 産生を促進しなかった。IL-1 β 刺激では立効散は歯肉線維芽細胞および歯根膜線維芽細胞の PGE2 産生を抑制した。しかし両細胞の抑制の態度には差が認められた。現在炎症性サイトカインである IL-8 産生に対する立効散の影響を検討中である。

P2-113

抗原塗布後における舌下粘膜樹状細胞の特徴
 ○張 晨陽¹、大野 建州¹、東 みゆき¹ (東医歯
 大 院医歯 分子免疫)

Though sublingual mucosa (Slm) is utilized as the site for sublingual immunotherapy (SLIT) that induces tolerance against allergens, the involvement of oral mucosal DCs (OMDCs) in tolerance mechanisms has not been elucidated. Here we compared the distribution and dynamics of OMDCs between Slm and buccal mucosa (Bm) after topical antigen painting. Based on histological examination of CD207 and MHC class II expression, we evaluated three types of DCs; a) CD207⁺ (MHCII⁺) epithelial LCs, b) MHCII⁺ submucosal (sm) DCs c) CD207⁺ smDCs. Although distribution of OMDCs was clearly less in the Slm, MHCII⁺ smDCs markedly increased at 6 h after FITC painting, suggesting new recruitment of monocyte-derived DCs. At 24 h, most DCs in Slm disappeared, whereas substantial DCs still existed in Bm. OVA painting onto Slm showed similar but less and slower responses. Repeated antigen painting onto Slm induced a rapid exhaustion of resident OMDCs and recruitment of CD11b⁺DC/Mφ. In a cedar pollen-induced pollinosis model, SLIT also induced disappearance of resident DCs and appearance of CD11b⁺DC/Mφ. Our results suggest that the unique dynamics of sublingual DCs may contribute to tolerance induction of SLIT.

P2-115

カラゲニン誘発局所炎症反応に対するデクスメ
 トミジンの抑制作用
 ○助川 信太郎¹、長塚 仁²、宮脇 卓也¹ (岡大
 院医歯薬 歯科麻酔、²岡大 院医歯薬 口腔病
 理)

$\alpha 2$ アドレナリン受容体の選択的アゴニストであるデクスメトミジン (Dex) は、麻酔臨床では静脈内投与で鎮静薬として使用されている。近年、局所麻酔薬への Dex の添加によって局所麻酔作用が増強することが示され、局所投与の有用性が示唆されている。さらに、Dex には *in vitro* 研究で抗炎症作用があることが報告されている。そこで今回われわれは、Dex を局所投与することによる抗炎症作用について検討を行った。【方法】5%カラゲニンをラットの後肢足蹠に皮下注射することによって局所炎症反応を誘発した。炎症反応の評価として、注射後の後肢足蹠の浮腫、炎症細胞の浸潤、TNF- α および COX-2 の産生レベルを評価した。Dex はカラゲニンと混合し、カラゲニンによる炎症反応への影響を評価した。また、 $\alpha 1$ アドレナリン受容体作動薬であるフェニレフリンの炎症反応への影響、および $\alpha 2$ アドレナリン受容体拮抗薬であるヨヒンピンの拮抗作用についても検討を行った。【結果】カラゲニン注射後 4 および 6 時間後肢足蹠の浮腫、炎症細胞浸潤、TNF- α および COX-2 の産生の増加がみられた。Dex はカラゲニンによる炎症反応を抑制したが、フェニレフリンは抑制しなかった。ヨヒンピンは Dex の作用を拮抗した。【結論】Dex の局所投与は $\alpha 2$ アドレナリン受容体を介して局所の炎症反応を抑制することが明らかになった。

P2-114

前癌病変における腫瘍関連マクロファージの局在
 とその分化誘導機構の解析
 ○森 一将¹、廣井 美紀²、嶋田 淳¹、大森 喜
 弘² (明海大 歯 病態診断治療 口腔顎顔面外
 科 1、²明海大 歯 口腔生物再生医工 微生物)

【緒言】近年、マクロファージ (Mφ) はその機能的役割の違いから免疫系を活性化し抗腫瘍活性を有する M1 Mφ、および免疫系を抑制し癌の浸潤・増殖に関与する M2 Mφ に大別されている。これまでに、口腔扁平上皮癌における Mφ の局在を検討した結果、口腔癌局所では CD163 + M2 Mφ が存在するという知見を得た。そこで今回我々は、前癌病変における Mφ の局在とその分化誘導機構について検討を行なった。【方法】口腔白板症および病理組織学的に正常粘膜を検体とし、各種抗体 (M2 Mφ: CD163, M1 Mφ: CD80, Th 細胞: CD4, Tc 細胞: CD8, Th1 細胞: CXCR3, Th2 細胞: CCR4) を用いた免疫組織学的解析を行った (明海大歯学部倫理委員会承認番号 A0920 号) 【結果】1) CD163 + Mφ の浸潤と上皮性異形成との間に相関関係が認められた。2) 白板症において CXCR3 + 細胞 (Th1) の浸潤が認められたが CCR4 + 細胞 (Th2) は認められなかった。3) 上皮下における IFN γ 誘導性遺伝子である STAT1 の陽性細胞数と CD163 + 細胞との間に相関関係が認められた。4) 上皮内に浸潤している CD163 + Mφ は、STAT1 と共局在していた。【考察】従来 CD163 は抗炎症性 M2 Mφ のマーカーとして用いられてきたが、前癌病変部に存在している CD163 + Mφ は M1 Mφ の表現型を示す可能性が示唆された。

P2-116

マウス扁平上皮癌細胞における IFN γ 耐性機構
 ○山口 花¹、廣井 美紀¹、大森 喜弘¹ (明海大
 歯 微生物)

【目的】インターフェロン (IFN) は抗腫瘍作用を有するサイトカインであるが、腫瘍細胞の中には IFN に耐性を示すものもあり、IFN の臨床応用を阻む一つの障壁となっている。我々はこれまでヒト口腔扁平上皮癌細胞における IFN γ 耐性のメカニズムについて検討を行ってきた。今回マウス腫瘍細胞株で IFN γ 耐性を示す細胞株を探索したところ、細胞増殖抑制作用に耐性を示す SCCVII 細胞を見出したのでその分子機構について検討した。【結果】IFN γ に感受性を示すメラノーマ細胞株 B16F1 を対照として、IFN γ の細胞増殖抑制作用を検討したところ、SCCVII では IFN γ の増殖抑制効果は認められなかった。IFN γ によって活性化される転写因子 STAT1 のチロシン、セリンのリン酸化、IFN γ 誘導性遺伝子 (STAT1, CXCL9, CXCL10, CXCL11) の発現は両細胞で認められた。一方、細胞周期制御因子 cyclinA2, cyclinD1, CDK1 の IFN γ による発現抑制作用は、SCCVII では認められなかった。【考察】SCCVII における IFN γ の耐性機構は、Jak/STAT 経路に異常が認められるものではなく、その下流の細胞周期制御因子の制御に異常があることが示唆された。この限定的な IFN γ 耐性はヒト口腔扁平上皮癌細胞でも認められており、その *in vivo* における生物学的な意義の解明に本細胞は有用であることが示唆された。

P2-117

ユーキノールの口腔内細胞による炎症性サイトカイン産生に及ぼす影響

○高 泰浩¹、齊藤 嘉大²、村上 幸生¹、片山直^{1,3}、坂上 宏² (1明海大 歯 口腔診断、2明海大 歯 薬理、3明海大 歯 保存修復)

【目的】我々は、ユーキノールがヒト口腔正常細胞および腫瘍細胞に同等の細胞傷害性を示すことを報告した。今回、IL-1β刺激後の口腔正常細胞によるIL-8の産生に及ぼすユーキノールの効果を検討した。【方法】生細胞数は、トリプシン剥離後、血算板を用いて算定した。培養液中のIL-8はELISA法により測定した。【結果】IL-1β刺激により歯肉線維芽細胞(HGF)、歯根膜線維芽細胞(HPLF)は、多量のIL8を産生し(約200-300 ng/ml)、以下、歯髄細胞(HPC)(約40-50 ng/ml)、皮膚ケラチノサイト(HaCat)、口腔扁平上皮癌細胞(HSC-2, HSC-4)(15 ng/ml以下)の順に産生が低下した。IL-8の産生は成長因子に依存し、培養液からウシ胎仔血清(FBS)を除去するとIL-8産生は約90%低下した。ユーキノール(5-500 μM)は、HGF細胞のIL-8産生を促進したが、HPC細胞に対しては2相性の影響を示し、血清の有無をとわず、低い濃度(5 μM)では僅かな促進効果、高い濃度(500 μM)では阻害効果を示した。ユーキノールはLPS刺激のHGF、HPC細胞においても同様の影響を示した。【結論】ユーキノールの抗炎症効果は、HPC細胞でのみ観察された。ユーキノールの狭い治療域は、歯科での投与量の慎重な検討の重要性を示唆している。

P2-119

ストレス環境下における消化器粘膜での mouse β-defensin-3 の発現

○川嶋 理恵¹、清水 智子²、山本 裕子²、松木千紗²、林 隆司²、東 雅啓²、近藤 裕介^{2,3}、猿田樹里²、槻木 恵一² (1自医大 院医 口外、2神歯大 院 環境病理、3東海大 医 病理診断)

【目的】心理的、身体的ストレスは消化器粘膜に悪影響を及ぼすことが知られている。本研究では、ストレス下における糖尿病モデルマウスの消化器粘膜での mouse β-defensin3(mBD-3)の発現を明らかにした。【方法】2型糖尿病モデルマウスであるNSY/Hosマウスを用いて、拘束ストレス負荷群(S+群; n=4)と、ストレスを負荷しない群(S-群; n=4)に分けた。各群において、歯肉、食道、胃でのmBD-3の発現量をReal-time PCR、免疫染色、in situ hybridizationを用いて調べた。また、NSY/Hosマウスに糖質コルチコイドとしてデキサメタゾンを全身投与(n=4)し、食道におけるmBD-3の遺伝子発現を調べた。【結果】上部消化管粘膜でのmBD-3の遺伝子発現量は、食道、歯肉、胃の順であった。食道においては、ストレス負荷によりmBD-3の遺伝子発現が有意に低下し(P<0.05)、タンパク発現についても同様の結果が得られた。マウスへのデキサメタゾンの全身投与によって、食道のmBD-3が有意に低下した(P<0.05)。【結論】ストレス負荷により食道におけるmBD-3の発現が低下することから、ストレスマネジメントにより消化器粘膜での抗菌ペプチドによる粘膜防御能が維持される可能性が示唆された。

P2-118

Kaede トランスジェニックマウスを利用した歯髄から所属リンパ節に遊走する樹状細胞の同定

○Bhingare Arundhati¹、大野 建州¹、張 晨陽¹、東 みゆき¹ (1東医歯大 院医歯 分子免疫)

Bacterial products diffuse via the dentinal tubule toward the pulp and evoke immune responses. We have previously found that two types of dendritic cells (DCs) exist in murine dental pulp; CD11c⁺F4/80⁻ and CD11c⁻F4/80⁺ cells. After cusp trimming, these cells migrated to the treated side with enhanced expression of CD86. To identify migrating DCs from the dental pulp, we examined phenotypes of regional lymph node cells (rLNC) in comparison with intact LNC. Analysis of rLNC revealed significant increment of two specific subsets; Gr-1⁺CD11b⁺F4/80⁻CD11c^{hi}Ly6c^{hi} (Fr1-1) and Gr-1⁺CD11b⁺F4/80^{dim}CD11c^{med}Ly6c^{lo} (Fr1-2). In this study, to determine actual migrating DC from dental pulp, we used photoconvertible fluorescent protein "Kaede" transgenic mice. Kaede protein changes from green to red upon exposure to violet light. At 2 h after cusp trimming, we exposed the treated cusp to violet light and then analyzed rLNC. The photoconverted Kaede-red positive cells includes mainly CD11b⁺Gr-1⁻F4/80^{lo/+}CD11c^{hi} cells and partly Fr1-1. The use of Kaede transgenic mice allowed us to monitor a minor subset of cell migration. Non-member collaborator; Michio Tomura, Kyoto University

P2-120

ラット炎症惹起歯髄におけるプロスタグランジン E 産生酵素の発現にあたる酸化亜鉛ユーキノール練和物の影響

○深田 哲也¹、戸円 智幸¹、橋本 修一¹ (1日歯大 生命歯 共同利用研究センター トープ研究施設)

【緒言】プロスタグランジン (PGE₂) は脂質メディエーターであり炎症の増悪や寛解に関与している。これまで我々はラット歯髄炎症モデルにおいて PG 合成酵素である COX-2 のみならず、膜結合型 PGE 合成酵素 (mPGES-1) の発現が亢進すること、これに対し酸化亜鉛ユーキノール練和物 (ZOE) 中のユーキノールが両酵素の発現と活性を調節し PGE₂産生を低下させることを報告してきた。今回、我々はラット歯髄炎症モデルを用い両酵素の発現状態を組織学的に検討した。【方法】7週齢雌性 Wistar 系ラットの下顎切歯に麻醉下で深さ 5 mm の窩洞を形成し、窩洞形成部を ZOE または酸化亜鉛 - 水練和物 (ZOW; 炎症惹起歯髄) で仮封した。仮封の翌日、下顎切歯を摘出し、通常に従い薄切切片を作成した。切片は特異抗体を用いて染色した。【結果・考察】未処置歯髄では COX-2 および mPGES-1 の発現を検出されなかったが、ZOW 填塞歯髄では窩洞部位近傍に強く発現を認めた。これに対して、ZOE 填塞歯髄では両酵素の発現は歯髄全体に認められたものの、填塞部位付近での発現量は低く抑えられていた。一方、両群いずれの歯髄においても mPGES-1 の発現とマクロファージとの局在が一致する部分が認められた。これらのことより ZOE 填塞により COX-2, mPGES-1 の発現パターンが変化する細胞の一つがマクロファージである可能性が強く示唆された。

P2-121

Effects of Rac1 on the production of MMP-3 by TNF- α

○小正 玲子¹、合田 征司²、吉川 一志¹、池尾 隆²、山本 一世¹ (大歯大 保存、²大歯大 生化)

【目的】歯髓組織では TNF- α などの炎症性サイトカインが産生され歯髓炎が惹起される。また、刺激を受けた歯髓組織では細胞外マトリックス分解酵素である MMPs が産生される。そこで、TNF- α 刺激による MMP-3 産生に対する small G protein の関与について検討した。【方法】本研究に参加同意を得た患者の抜去歯 (大歯医倫 110751 号) より歯髓組織を採取・培養し、3~10 世代目をヒト歯髓由来線維芽細胞として本研究に使用した。ヒト歯髓由来線維芽細胞を 5.0×10^5 cells/well になるよう播種し、24 時間培養後、TNF- α を各種条件下で加え、刺激終了後、上清中の MMPs の産生を Western Blotting, Gelatin Zymography にて検討した。次に、Rac1 Inhibitor を各種条件下で加え、上清中の MMPs の産生を検討した。ヒト歯髓由来線維芽細胞を 5.0×10^5 cells/well になるよう播種し、TNF- α 100 ng/ml を 0, 0.5, 1, 3, 5, 10 分のタイムコースで加え、Rac1 のリン酸化について検討した。【結果】ヒト歯髓由来線維芽細胞への TNF- α 刺激は、MMP-3 の産生を濃度依存的に増強したが、MMP-2 の産生には影響しなかった。TNF- α 刺激時の Rac1 Inhibitor は、MMP-3 の産生を濃度依存的に減弱した。MMP-2 の産生に変化は認められなかった。TNF- α 刺激による Rac1 のリン酸化は経時的に変化した。【結論】以上のことより、ヒト歯髓由来線維芽細胞では TNF- α 刺激による MMP-3 産生に small G protein の Rac1 が関与していることが示唆された。

P2-123

シグナル伝達分子 MyD88 は顎下腺における B-1 細胞浸潤の制御と唾液中の抗体産生の調節に関与する

○引頭 毅¹、滝川 俊也²、柴田 健一郎³ (朝日大 歯 口腔感染医療 口腔微生物、²朝日大 歯 口腔構造機能発育 口腔解剖、³北大 院歯 口腔病態 口腔分子微生物)

MyD88 は自然免疫系の調節に寄与する重要な細胞内シグナル伝達分子であり、Toll 様受容体や IL-1 受容体の下流において様々な免疫応答の開始と制御を行っている。そのような背景から、MyD88 は口腔領域の免疫応答にも関与すると考えられるが、その具体的な役割は明確でない。本研究では Myd88 遺伝子を欠損したマウスを利用し、唾液中の抗体レベルや唾液腺における抗体産生と関連する免疫応答における MyD88 の役割を調査した。MyD88 欠損マウスではコントロールマウスと比較して唾液中の IgA と IgG1 のベースレベルが上昇しているのに対し、IgM と IgG3 のレベルは減少していた。顎下腺から抽出した全 RNA のマイクロアレイ解析により、MyD88 欠損マウスでは、*Cd19*、*Ms4a1*、*Igh-VJ558* や *Igj* などの B 細胞関連遺伝子群の発現の上昇が認められた。組織学的解析では、顎下腺の集合導管の周囲にリンパ球浸潤が認められた。顎下腺から分離した細胞の FACS 解析により、MyD88 欠損マウスでは B220⁺細胞が増加しており、CD5⁺CD23⁻または CD5⁻CD23⁺であることから、B-1 系統の B 細胞であることが分かった。マイクロアレイ解析では *Glycam* や *Cxcl13* の発現が上昇していたため、これらが唾液腺における B 細胞の浸潤を誘導する可能性が示唆された。以上より、唾液腺における B-1 細胞の浸潤の制御や唾液中の抗体産生の調節に MyD88 が関与していることが示唆された。

P2-122

新規アディポカイン apelin による炎症応答に対する影響

○小原 成将¹、秋房 住郎³、白井 通彦¹、笠井 宏記¹、沖永 敏則²、有吉 渉²、西原 達次² (¹九歯大 歯 歯周、²九歯大 歯 感染分子生物、³九歯大 口保 口腔保健管理)

【目的】成熟した脂肪組織が分泌する様々な生理活性物質はアディポカインと総称され、肥満自体が軽度炎症状態であるとする metaflammation を説明する主要な因子とされている。一方、アディポカインの中にはアディポネクチンのように炎症反応を抑制する効果を持つものも報告されており、アディポカインの免疫機能に関する機能は不明な点が多い。今回我々は、新規アディポカインである apelin が免疫機能において果たす役割を解明するために、マクロファージ及び内皮細胞への各種刺激に対する炎症応答に apelin が与える影響を検討した。【方法】マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞、マウス血管内皮細胞株 UV η 2 細胞を用い、apelin 受容体である APJ の発現を western blot にて観察した。次に J774.1 細胞を [Pyr1]-apelin-13 (0.1-10 μ M) で 16 時間前培養した後、大腸菌由来 LPS 100 ng/ml 刺激による IL-1 β 、IL-6、UV η 2 細胞には TNF- α 1 ng/ml 刺激による I-CAM1 の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR にて測定した。【結果と考察】J774.1 細胞では LPS 刺激が誘導する IL-1 β 、IL-6 の遺伝子発現を、UV η 2 細胞では TNF- α 刺激が誘導する I-CAM 遺伝子発現がそれぞれ抑制された。これらのことから、apelin は炎症局所において多角的に炎症応答を抑制している可能性が示唆された。

P2-124

エナメル上皮腫および角化嚢胞性歯原性腫瘍に関する研究

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

エナメル上皮腫 (AM) や角化嚢胞性歯原性腫瘍 (KCOT) は、局所侵襲性を示す良性歯原性腫瘍である。これらの良性腫瘍における局所侵襲メカニズムの一端としてタンパク質分解酵素である MMP-1、-2、-9 の関与がこれまでに示唆されているが、悪性腫瘍の浸潤メカニズムに比して未知な点が多い。これを明らかにすることを本研究の目的とし、その一環として DNA メチル化による遺伝子発現制御を探ることとした。また、局所侵襲は腫瘍細胞の異常増殖も一因ではないかと考え、MMP や integrin の発現制御にも関与しているとの報告が散見される上皮成長因子受容体 erbB の関与も探ることとした。エピジェネティックな発現制御が行われている可能性を探るためにメチル化シトシン (5-mC) に対する免疫染色を行ったところ、AM では強陽性反応がみられたのに対し、KCOT では強弱の反応性が混在する傾向がみられた。次いで erbB に対する免疫染色を行った結果、AM、KCOT のいずれでも erbB2 の強陽性反応が認められ、また KCOT では erbB3 の弱陽性反応も認められた。これらの結果より、AM と KCOT はともに局所侵襲性を有するがそのメカニズムは異なっており、AM では細胞周期制御因子が高メチル化を受けて不活化されている可能性、KCOT では erbB3 が脱メチル化を受けている可能性が示唆された。

P2-125

口腔顎顔面領域の悪性リンパ腫における BAFF-R の発現についての免疫組織化学的研究
 ○岡田 康男¹ (1日歯大 新潟生命歯 病理)

B-cell の悪性化には B-cell activating factor of the tumor necrosis factor family (BAFF) が関係していると報告されている。BAFF には、B-cell maturation antigen (BCMA), transmembrane activator and calcium-modulator and cyclophilin ligand interactor (TACI) および BAFF-receptor (BAFF-R) の 3 つの receptor があり、BAFF-R だけが BAFF のみに結合する。しかし、BAFF-R の免疫組織化学染色結果の報告例は少ない。そこで、口腔顎顔面領域の悪性リンパ腫症例について BAFF-R の免疫組織化学染色を行い、併せて CD5 染色結果と比較検討した。

対象は当教室にファイルされている 31 例で、diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) 20 例、follicular lymphoma (FL) 5 例、plasma cell myeloma (PCM) 1 例、extranasal plasmacytoma (EOP) 1 例、B-lymphoblastic lymphoma (B-LBL) 1 例、Hodgkin lymphoma 3 例である。

BAFF-R は、31 例中 11 例に発現を認めた。DLBCL では 20 例中 6 例に BAFF-R の発現を認め、そのうち GCB type が 1 例、non-GCB type が 5 例であった。FL の 5 例では Grade II の 2 例、Grade IIIA の 3 例はすべてに BAFF-R の発現を認めた。CD5 は DLBCL の 3 例に発現がみられ、それは non-GCB type の BAFF-R(+)DLBCL であった。

以上より、BAFF-R は初期段階の B-cell lymphoma である DLBCL の一部や FL の一部に発現し、tumor cell の増殖に関与している事が示唆された。

P2-127

Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 (HPIP) は口腔扁平上皮癌の浸潤を制御する

○入江 太郎¹、外菌 知恵¹、安原 理佳¹、田中 準一¹、河野 葉子¹、山本 剛¹、美島 健二¹ (1昭大 歯 口腔病態診断 口腔病理)

Pre-B-cell leukemia homeobox interacting protein 1 (HPIP) は転写因子であり微小管のネットワークを介してエストロゲン受容体の機能を制御する。また、赤血球の分化や乳癌細胞の増殖に関与することが明らかにされている。われわれは LC/MS/MS により口腔扁平上皮癌の質量分析を行ったところ初期浸潤癌において HPIP が特徴的に検出されることを見出した。そのためさらに口腔扁平上皮癌における HPIP の発現とその機能的役割について検討を進めたので報告する。

【方法】正常粘膜上皮、異形成と扁平上皮癌を含む手術検体を用いて免疫組織化学的解析を行った。HPIP mRNA の発現量については凍結標本を用いた laser microdissection 法と real-time PCR 法により検討を行った。さらに SCC-9 細胞を使用し HPIP siRNA を用いた invasion assay を行った。

【結果】HPIP は正常粘膜上皮においてはほとんど発現しておらず、正常粘膜上皮に比べて異形成や浸潤癌において高かった。また浸潤癌においては小型化した胞巣にその陽性像が目立った。Invasion assay では HPIP siRNA により癌細胞の浸潤が抑制された。

【考察】HPIP は浸潤様式や浸潤能に直接的に関与することが明らかになったことから、悪性度評価や治療の標的としての有用性が期待し得るものと考えられる。

P2-126

ヒト口腔がん細胞株の side population 細胞における遺伝子発現プロファイル
 ○野崎 中成¹、西五辻 理江²、大浦 清¹ (1大歯大 薬理、2大歯大 院 薬理)

【目的】口腔由来のがんにおけるがん幹細胞存在の有無とその性状を調べるため、side population (SP) と main population (MP) 細胞を分離し、遺伝子発現の比較を網羅的に行った。【方法】ヒト口腔がん細胞株 SCC-4 を用いた。がん幹細胞は抗がん剤耐性が亢進しているため、Hoechst の排泄とその阻害剤 Reserpine を指標に、フローサイトメーターで SP 細胞を同定、ソーティングにより分離した。SP 細胞と MP 細胞から総 RNA を調製し、GeneChip[®] Human Gene 2.0 ST Array (Affymetrix) を用いて、網羅的発現解析を行った。【結果】SP 細胞は、全体の約 1.48% 存在した。遺伝子発現プロファイル解析により、MP 細胞を基準にして、SP 細胞で発現が 10% 以上高かったものは、抗がん剤排泄に関わる ABC トランスポーター ABCG2/BCRP、ABCC2/MRP2、乳がん、大腸がん、膵臓がんなどのがん幹細胞マーカー CXCR4、CD44、PROM1/CD133、細胞の自己複製能に関わるサイトカイン IL8 を含む 15.8% であった。発現が 10% 以上低かったものは、抗がん剤取り込みに関わるヌクレオシドトランスポーター SLC29A1/ENT1 を含む 16.6% であった。【考察】がん幹細胞では薬物排泄能が亢進し、抗がん剤耐性を示すという特徴がある。口腔由来のがんに、薬物排泄能が亢進している細胞が存在した。その細胞では、がん幹細胞の特徴を示す遺伝子発現が認められ、がん幹細胞の存在が示唆された。

P2-128

マウス口腔扁平上皮癌 (Sq1979) の進展が脾細胞 IFN- γ 産生能に及ぼす影響

○東 康加¹、神谷 真子²、稲垣 俊弘³、川木 晴美²、高山 英次²、櫻井 学¹、智原 栄一¹、近藤 信夫² (1朝日大 歯 歯科麻酔、2朝日大 歯 口腔生化学、3朝日大 歯 口腔外科)

【目的】口腔癌の悪性化には、患者の免疫応答能や癌組織を取り巻く微小環境の関与が指摘されているが、そのメカニズムは未だ十分に理解されていない。本研究では、口腔扁平上皮癌細胞 (OSCC) 株を同系統マウスに移植し、腫瘍の増殖に伴う免疫能の変化を検討した。【方法】C3H マウス由来頬粘膜扁平上皮癌 Sq1979 (理研 BRC)、あるいはサブクローン L-5 (高増殖型) を同系統マウス (雄/6 週齢) 側腹皮下に移植し、腫瘍の増大を経時的に観察した。コントロール群には生理食塩水のみを投与した。一定期間観察した後、これらの担癌マウスから脾細胞を採取し、抗 CD3 抗体を用いて試験管内で刺激培養した。48 時間後、上清を回収し、その 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】OSCC 移植群は、どちらの群もコントロール群に比較して、脾細胞の IFN- γ の産生能は低下しており、腫瘍体積と有意な逆相関が認められた。以上の結果より、口腔癌の増大に伴い宿主の抗腫瘍免疫が抑制されることが示唆された。さらに、現在移植腫瘍の形質と宿主脾細胞のサイトカイン産生能の関係について、IFN- γ 以外のサイトカイン産生能も含め、検討している。

P2-129

エナメル上皮腫に発現する HSP27 の免疫組織化学的検討

○中野 敬介¹、久保 勝俊²、杉田 好彦²、前田 初彦²、長谷川 博雅¹、川上 敏行¹ (¹松歯大 院硬組織疾患病態解析、²愛院大 歯 口腔病理)

【目的】 エナメル上皮腫は菌原性上皮に起因する最も一般的な腫瘍の一つであるが、局所的に侵襲性があり再発の危険性も高く、口腔外科領域では極めて重要な腫瘍である。従って、腫瘍細胞の分化に関する知見の集約は治療の上からも重要な研究課題であると思われる。Heat Shock Proteins (HSPs) は様々な組織の細胞内に広く分布し、熱ストレスに対する細胞の防御のみならず、細胞の分化、増殖および機能維持に重要なタンパクであることが判明しており、近年では腫瘍細胞分化との関連も報告されている。しかし、エナメル上皮腫における HSPs 発現に関しては不明な点が多い。【方法】 本研究ではエナメル上皮腫における HSP27 発現の免疫組織化学的観察を行い、エナメル上皮腫の組織型、部位による発現の違いを検討した。【結果と考察】 濾胞型エナメル上皮腫の腫瘍胞巣では、胞巣中央部の扁平上皮化を生じた腫瘍細胞、実質囊胞辺縁部の腫瘍細胞に強い陽性反応がみられた。胞巣最外層の立方型、高円柱状細胞の多くは陰性であった。一方、叢状型エナメル上皮腫の腫瘍胞巣では、発現状態にばらつきがあるものの、ほぼ全ての腫瘍細胞が陽性を示していた。腫瘍間質では散在性に血管内皮細胞や線維芽細胞に陽性反応が認められた。これらの結果から、HSP27 はエナメル上皮腫の腫瘍細胞に発現し、腫瘍細胞の化生や、腫瘍の組織型の違いに関与していると考えられた。

P2-131

エナメル上皮腫細胞の RANKL および細胞外 Ca²⁺ による奇異な形態変化および形質転換

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

エナメル上皮腫は、顎骨内の骨を吸収し、ときに膨大な腫瘍を形成して機能的および審美的障害をもたらす。昨年我々は、充実型エナメル上皮腫由来の細胞株である AM-1 が、直接的骨吸収を引き起こし、細胞外 Ca²⁺ により破骨細胞様に細胞融合・多核化といった形態変化を引き起こすことを報告した。今回は、AM-1 が細胞外 Ca²⁺ による破骨細胞様形態変化のみならず、RANKL により、上皮間葉転換およびマクロファージ様転換といった奇異な形質変化が制御されていることを見出した。1 mM CaCl₂ を添加して培養した AM-1 の lysate を用いてウエスタンブロットを行うと、RANKL、RANK および Cathepsin K の発現が検出された。さらに、破骨細胞の細胞融合に重要な役割を果たす DC-STAMP の発現も観察された。しかしながら、TRAP 染色には陰性であった。次に、培養下に RANKL (50 ng/mL) を追加投与すると、上皮のマーカーである keratin および E-cadherin の発現とともに、悪性腫瘍の転移時にみられる上皮間葉転換の指標である N-cadherin および vimentin の発現も観察された。破骨細胞 (マクロファージ) 様形態変化を伴うことから、マクロファージのマーカーである CD68 についても検討を行うと、RANKL 投与下のみが発現が観察された。以上の結果から、AM-1 は細胞外 Ca²⁺ および RANKL により、破骨細胞様および悪性腫瘍様に奇異な形態変化および形質転換を起こしながら骨溶解および増殖することが示唆された。

P2-130

WISP1/CCN4: 前立腺癌の増殖・骨転移に対する新規標的因子

○大野 充昭^{1,2}、窪木 拓男¹、Young Marian² (¹岡大 院医歯薬 インプラント再生補綴、²アメリカ国立衛生研究所)

欧米において、前立腺癌は男性において最も高頻度に診断される癌であり、男性の癌死の原因の第 2 位に挙げられるが、未だ前立腺癌の増殖や骨転移の詳細なメカニズムは明らかでない。我々は CCN4 遺伝子が前立腺癌の増殖・骨転移に関与していることを明らかにしたので報告する。初めに、ヒト前立腺癌の組織切片を用い、CCN4 の発現量を免疫組織化学的に評価した。その結果、Gleason 分類が低いほど CCN4 が高発現することが明らかとなった。また、前立腺癌患者の血清 CCN4 を ELISA 法を用い定量した。その結果、早期癌の患者の血清中から CCN4 が多く検出された。以上の結果から、CCN4 と前立腺癌の関与が予測される。そこで次に CCN4 が前立腺癌の増殖・骨転移に及ぼす影響を明らかにするため、ヒト前立腺癌細胞にルシフェラーゼベクターを遺伝子導入した PC-3-Luc 細胞 (以下 PC-3) をヌードマウスの背部皮下移植、もしくは心腔内投与した。腫瘍移植後、抗 CCN4 抗体を腹腔内投与し、その効果を調べた。その結果、抗 CCN4 抗体投与群では腫瘍の増殖および転移は有意に抑制された。さらに CCN4 が細胞遊走に与える影響を Boyden chamber 法にて検討した。その結果、CCN4 は PC-3 の細胞遊走を有意に促進した。一方、抗 CCN4 抗体にて前処理した PC-3 は細胞遊走能が有意に低下した。以上の結果より、CCN4 は前立腺癌の診断ツールになる可能性のみならず、抗 CCN4 抗体を用いた前立腺癌治療への応用の可能性が示唆された。

P2-132

口腔扁平上皮癌におけるソニックヘッジホッグの血管新生因子としての役割

○黒田 大雅¹、栗尾 奈愛¹、志茂 剛¹、伊原木 聡一郎¹、奥井 達雄¹、堀切 優¹、松本 憲一¹、佐々木 朗¹ (¹岡大 院医歯薬 口腔顎顔面外科)

【緒言】 ヘッジホッグシグナルは腫瘍増殖に関与することが報告されているが、口腔扁平上皮癌におけるその役割はまだ明らかとされていない。本研究では、口腔扁平上皮癌におけるソニックヘッジホッグ (SHH) の血管新生因子としての役割に関して検討を行ったので報告する。【方法】 血管新生能の検討は、6 週齢 Wister Rat aorta ring assay を使用した。SHH のヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) に対する遺伝子発現は、クロンテック社 cDNA アレイメンブレンを用い解析した。【結果】 SHH、Gli-2 高発現、低発現口腔扁平上皮癌細胞株共に cyclopamine による細胞増殖能、遊走能に有意差は認められなかった。マウス背部皮下移植モデルにおいて、cyclopamine 投与群はコントロール群と比較して有意に腫瘍増大とともに CD31 陽性新生血管は抑制された。SHH は Rat aorta ring の増殖・管腔形成を促進し、その効果は cyclopamine によって抑制された。cDNA アレイの結果、SHH 添加により HUVEC における、血管新生因子 (5)、増殖因子 (9)、MMP 群 (3) に関わる遺伝子群が上昇することが明らかとなった。【結論】 口腔癌細胞から産生される SHH は、血管内皮細胞に作用して血管新生因子を誘導し、腫瘍増大を促進することが示唆された。

P2-133

2型糖尿病治療薬メトホルミン塩酸塩の口腔扁平上皮癌に対する腫瘍増殖抑制効果

○栗尾 奈愛¹、志茂 剛¹、黒田 大雅¹、松本 憲一¹、佐々木 朗¹ (岡大 院医歯薬 口腔顎顔面外科)

【目的】 一般に糖尿病患者では発癌率が高く、糖尿病治療薬、メトホルミン塩酸塩の内服患者では発癌率が有意に低いことが報告されている。近年メトホルミンの抗腫瘍効果が注目されており、その作用機序として AMPK キナーゼの活性化による mTOR シグナルの抑制による抗腫瘍効果が報告されている。口腔癌では細胞増殖因子 IGF-1 とその下流の mTOR の高発現が報告されており、本研究では口腔扁平上皮癌におけるメトホルミンの腫瘍増殖抑制効果に関して検討をおこなったので報告する。【方法】 in vivo 腫瘍モデルは、口腔扁平上皮癌細胞株 HSC-2 細胞をヌードマウス背部皮下へ移植し作製した。in vitro における解析は HSC-2 細胞を用い MTT アッセイ、Tunnel アッセイを用いて検討した。タンパク発現は免疫染色、ウエスタンブロット法を用いた。【結果】 口腔癌切除標本において IGF-1, IGF-1R, mTOR の高発現が認められた。IGF-1 により HSC-2 細胞の細胞増殖が促進され、メトホルミン濃度依存的に抑制された。シグナル伝達では IGF-1 により AMPK のリン酸化が抑制されたがメトホルミン投与群では抑制効果を認めなかった。メトホルミン投与群で Tunnel 陽性細胞の増加を認め、腫瘍細胞のアポトーシスが示唆された。マウス腫瘍移植モデルにおいて、メトホルミン投与群では腫瘍増殖が有意に抑制された。【結論】 メトホルミンは口腔扁平上皮癌における腫瘍増殖を抑制し、口腔癌の新たな治療戦略となりうる事が示唆された。

P2-135

ユージオール暴露後の口腔内細胞における代謝変動

○齊藤 嘉大¹、高 泰浩²、村上 幸生²、田中 庄二²、片山 直²、坂上 宏¹、杉本 昌弘³ (1明海大 歯 薬理、2明海大 歯 口腔診断、3慶大 政策・メディア研究科)

【目的】 ユージノールは、歯髄鎮静に使用されているが、その口腔細胞に対する傷害性のメカニズムに関する報告は少ない。我々は、前回、ユージオールが、アポトーシスを誘導せずに、ヒト口腔正常細胞および扁平上皮癌細胞に、同程度に細胞傷害活性を誘導することを報告した。今回、その細胞傷害活性の分子メカニズムを探る一環として、細胞内代謝産物の変動を追跡した。【方法】 ヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 と口腔正常細胞 (歯肉線維芽細胞、歯髄細胞、歯根膜線維芽細胞) は、DMEM + 10% FBS 中で培養した。生細胞数は、トリプシン剥離後、血算板を用いて算定した。5% D-マンニトールで洗浄後、内部標準物質を含むメタノール液で、細胞内代謝産物を抽出し、メタボローム解析に供した。細胞内微細構造は、透過型電子顕微鏡で観察した。【結果と考察】 ユージノールを HSC-2 細胞に添加した場合、初期過程で、ATP の利用 (AMP/ATP 比) の減少、ポリアミン (プトレッシン) 濃度の上昇、それに続き、酸化ストレスマーカー (酸化型グルタチオン、システイン-グルタミンジスルフィド、メチオニンスルホキシド) の上昇が観察された。ユージオールは、HSC-2 細胞に非アポトーシスを誘導する可能性を示唆した。現在、口腔正常細胞につき、同様な解析を行っている。

P2-134

Significance of podoplanin expressing stromal fibroblasts in oral squamous cell carcinoma

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

Podoplanin is a mucin-type glycoprotein and a lymphatic endothelial marker. It is also well known that podoplanin expresses in various cancer cells including oral squamous cell carcinoma (OSCC). Apart from podoplanin expression in cancer cells, recent studies have suggested that podoplanin expression in stromal fibroblasts may predict poor prognosis in various cancers. In order to clarify the significance of podoplanin expressing fibroblasts in OSCC, we performed immunohistochemistry for podoplanin and SMA. Results showed that podoplanin positive stromal fibroblasts were detected in 73.9% of OSCCs and in 82.8% of those in metastatic lymph nodes. SMA immunoreactivity was observed in 56.5% of OSCCs and in 82.8% of the metastatic tissues. As a result of further examination, podoplanin positive fibroblasts were also positive for SMA in 74.5% of OSCCs and in 95.8% of those in the metastatic lymph nodes. In addition, the intensity of reactivity for SMA was enhanced as that of podoplanin positivity is stronger. In conclusion, these findings indicate that podoplanin expressing stromal fibroblasts are considered as myofibroblasts that may contribute to cancer progression of the oral cavity.

P2-136

がん性疼痛緩和治療における血小板活性化因子 (PAF) 阻害薬の有用性

○本山 直世¹、森田 克也²、北山 友也³、兼松 隆³、栗原 英見⁴、土肥 敏博⁵ (1広大 院医歯薬 保 健康増進歯学、2広島文化学園大 院看護薬理、3広大 院医歯薬保 細胞分子薬理、4広大院医歯薬保 歯周病態、5日薬大 薬物治療)

がん性疼痛は従来の鎮痛薬が奏功しないため、オピオイド類や、抗うつ薬、抗てんかん薬等鎮痛補助薬が用いられているが、それらの有効性、使用には限界があり、新しい治療法・治療薬の開発が待たれている。私達は、血小板活性化因子 (PAF) 阻害薬が原因の異なる各種難治性疼痛モデル動物で強力で長期間持続性の鎮痛作用を有することを報告してきた。本研究では、PAF 阻害薬のがん性疼痛緩和作用について検討を加えた。実験は、C3H/HeN マウスの大腿骨髄内に NCTC2472 細胞を移植し、骨がんモデル (FBC) マウスを作製した。がん性疼痛はアロディニアスコア、アロディニア閾値、Guarding behavior (安静時に患肢を持ち上げる行動)、Limb-use abnormality (体動時に患肢を不自然に使う行動) で評価した。FBC マウスにおいて PAF 阻害薬は長期間持続する鎮痛作用を示した。さらに脊髄 PAF 受容体ノックダウンにより同様の鎮痛作用を認めた。PAF 阻害薬とモルヒネの併用はモルヒネの鎮痛作用を著しく増強した。この併用により、モルヒネの副作用 (便秘) がもはや問題とならない程にモルヒネ投与量を軽減できた。以上、PAF 阻害薬はがん性疼痛を強力に抑制し、その機序に脊髄 PAF 受容体の特異的阻害が含まれること、PAF 阻害薬とオピオイド類との併用はがん性疼痛の緩和治療に有益である可能性を示した。

P2-137

Zoledronate の細胞障害におけるミトコンドリアの変化について

○田島 雅道¹、坂上 宏¹ (明海大 歯 病態診断治療 薬理)

【目的】 骨転移癌の治療に zoledronate (ZD)を投与されている患者が、口腔外科の治療後に顎骨壊死を発症する機序は明らかでなく、有効な治療法も確立されていない。ZDによる細胞障害時に起こるミトコンドリアの変化について解析を行った。【方法】 マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 に対する ZD の反応性を調べた。細胞増殖活性測定は WST-8 を用い、細胞内の極性変化を POLARIC にて観察した。ミトコンドリア膜電位を JC-1 の蛍光変動で測定した。Caspase 活性は CellEvent で評価し、細胞内活性酸素種 (ROS) 生成は CM-H₂DCFDA を用い、励起光反復照射による ROS 生成を蛍光量から評価した。【結果】 MC3T3-E1 に対する ZD の細胞増殖阻害は濃度依存的で、アスコルビン酸と β -グリセロリン酸添加でその細胞障害性は増強された。ZD はミトコンドリアの極性を変化させ、膜電位を上昇させた。細胞内 ROS 生成は抑制されているが、アポトーシスを誘導した。【考察】 Zoledronate は細胞にアポトーシスを誘導するが、むしろミトコンドリア機能は抵抗性を示している可能性が示唆された。

P2-139

ホルマリン刺激に対するキトサンオリゴ糖の鎮痛作用

○寺澤 理恵¹、小磯 和夫¹、米原 典史¹ (奥羽大 歯 歯科薬理)

【目的】 天然多糖類の一種であるキチン・キトサンは創傷治癒促進作用や抗腫瘍作用など様々な薬理作用を有することが知られている。また、これらは毒性が低く、安全性が高い。今回は高分子多糖であるキトサンを加水分解し、水溶性としたキトサンオリゴ糖 (CHS) を用いて、ホルマリン刺激に対する CHS の鎮痛作用を検討した。【方法】 実験には ICR 雄性マウスを用い、鎮痛試験はホルマリンテストを行った。マウスの後肢右足趾に 2.5%ホルマリンを皮下注射し、その注入足に対する licking 行動の時間を 5 分間ごとに 30 分間測定し、これを疼痛反応として評価した。実験薬物はホルマリン投与 30 分前に腹腔内 (i.p.) または経口投与 (p.o.) した。【結果と考察】 ホルマリンの投与による疼痛反応は 0~5 分 (第一相) と 15~30 分 (第二相) の 2 つのピークを示した。i.p. においては 50 mg/kg CHS はいずれの相も licking 反応を抑制しなかったが、250 mg/kg CHS は第一相を抑制せず第二相のみ有意に licking 反応を抑制した。50 mg/kg アスピリンにおいても第二相のみ有意に licking 反応を抑制した。5 mg/kg モルヒネは第一相、第二相いずれも有意に licking 反応を抑制した。p.o. においては 250 mg/kg CHS と 50 mg/kg アスピリンは第二相のみ有意に licking 反応を抑制し、その効果は類似していた。これらのことから、CHS はアスピリンと同様に主に炎症によって引き起こされる疼痛を抑制する作用を持つことが明らかになった。

P2-138

ヒト口腔癌細胞に傷害活性を有する新規イソキノリン誘導体類のデザイン (その 3)

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

【目的】 前回、イソキノリン類 (TQ) の構造とヒト口腔扁平上皮癌細胞および白血病細胞の細胞傷害活性に有意な相関関係があることから、ヒト口腔癌細胞により高い活性を持つ新規イソキノリン化合物の分子設計に関して発表した。今回、更に新たな知見を得たので報告する。【方法】 分子記述子は CONFLEX で最安定配座を決定後、MOPAC/PM5 法で計算した。新規化合物の分子設計は ACD/Structure Design Suite ソフトを用いた。【結果と考察】 ACD/Structure Design Suite を用いてイソキノリン骨格の 2 位に付いた置換基変換により想定された対象化合物は 3984 種類にのぼった。そこで実験結果から、TQ 化合物のオクタノール-水分配係数 (Log P) は 2.2 付近に活性があったので、Log P 値 2.0~2.3 が予想される化合物に絞り込み (313 種類)、更に合成のし易さを考慮して 40 種類の化合物を想定し、そのうちの 30 種類の分子記述子を得た (生成熱、水和の安定性、HOMO エネルギー、LUMO エネルギー、絶対ハードネス、絶対電気陰性度、反応指数、分子の表面積、体積等)。これらの分子記述子から細胞傷害活性が期待される新規化合物の検索を行っている。

P2-140

フッ化ナトリウム暴露後の口腔内細胞における代謝変動

○坂上 宏¹、田中 庄二²、片山 直^{2,3}、Garcia Contreras Rene^{1,4}、杉本 昌弘⁵ (明海大 歯 薬理、²明海大 歯 口腔診断、³明海大 歯 保存修復、⁴メキシコ州立自治大、⁵慶大 先端生命科学研)

【目的】 フッ化ナトリウム (NaF) は、齲蝕予防、再石灰化の改善、抗菌活性を示し、歯磨剤や洗口液の成分として利用されている。しかし、NaF は、フッ素沈着や、胸腺細胞には壊死、肺や腎の上皮細胞、象牙芽細胞、骨芽細胞にはアポトーシスを誘導することが報告され、高濃度での傷害性が問題になっている。我々は、NaF が、歯肉線維芽細胞と比較し、口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 に強くアポトーシスを誘導することを報告した。今回、その細胞傷害活性の分子メカニズムを探る一環として、細胞内代謝産物の変動を調べた。【方法】 アポトーシスの誘導は、カスパーゼ-3 の活性化により測定した。生細胞数は、トリプシン剥離後、血算板を用いて算定した。5% D-マンニトールで洗浄後、内部標準物質を含むメタノール液で、細胞内代謝産物を抽出し、メタボローム解析に供した。【結果と考察】 NaF は HSC-2 細胞に添加後、30 分以内に、解糖系の 2-phosphoglycerate から phosphoenolpyruvate への反応、TCA 回路の 2-oxoglutarate から succinate の生成に至る反応阻害された。2 時間後に、ATP の利用 (AMP/ATP 比) が増加し、酸化ストレスマーカー (GSSG, cysteine-glutathione disulphide, methionine sulfoxide) が上昇し、4 時間以降でカスパーゼ-3 が活性化した。NaF のアポトーシス誘導に先立ち、エノラーゼ反応および TCA 回路が阻害された可能性が示唆された。

P2-141

ユーキノールの TRPV1 チャンネルに対する抑制機構解明

○吉田 卓史¹、高橋 かおり²、若森 実¹ (¹東北大院歯 歯科薬理、²東北大 歯)

Eugenol, the major component of essential oil of clove, has been used in dental practice to relieve pain. It has been reported that eugenol activates TRP (transient receptor potential) V1 channel in a heterologous expression system and rat trigeminal ganglion (TG) neurons. On the other hand, it has also been reported that eugenol exert their antinociceptive effects *via* the TRPV1 located on sensory terminals in the spinal cord. In this study, to elucidate the molecular mechanisms underlying pharmacological actions of eugenol on TRPV1 channel, we investigated the channel properties of TRPV1 using mouse TRPV1 expressing HEK293 cells. Eugenol inhibited the capsaicin- or proton-induced inward currents in a concentration-dependent manner. The inhibitory effect of eugenol (1 mM) was larger in the case of inward current (ca. 45%) than that of outward current (ca. 20%). It suggests that eugenol may function as a channel pore blocker. Moreover, it found eugenol reduce the cell surface expression level of TRPV1 proteins in western blotting. These results suggest eugenol attenuates TRPV1 channel activity and may cause antinociceptive effects.

P2-142

漢方薬、漢方成分及びグリチルリチンの紫外線に対する細胞保護作用

○加藤 崇雄¹、日野 峻輔¹、堀江 憲夫^{1,2}、金子 忠良^{2,4}、下山 哲夫¹、草間 薫²、坂上 宏^{3,5} (¹埼玉大 総セ 歯口外、²明海大 歯 病理、³明海大 歯 MPL、⁴日大 歯 口外、⁵明海大 薬理)

【目的】漢方薬は様々な口腔疾患の治療に使用されている。前大会でヒト口腔扁平上皮癌細胞 HSC-2 による漢方薬及び漢方成分の紫外線の細胞に対する保護効果を報告した。今回、ヒト皮膚ケラチノサイト細胞 HaCaT による漢方薬および漢方成分の抗 UV 活性と HSC-2 細胞で得られたデータとの相関について検討した。【方法】HaCaT を播種後、DMEM 培地中で 24 時間培養し、プレートに付着させた。種々の濃度の試料を含むリン酸緩衝液 100 μl に置換後、20.5 cm 離れた距離で 10-480 秒間 UV 照射した。照射時間を 90 秒とした。培地を置換し、24 時間培養後、MTT 法により相対的生細胞数を測定した。照射時間を 90 秒として種々の濃度の漢方薬および漢方成分の抗 UV 活性を測定した。濃度依存性曲線から、50% 細胞傷害濃度 (CC50) および UV 照射細胞の生存率を 50% まで上昇させる濃度 (EC50) を求めた。有効係数 (SI) は、次式で求めた。SI = CC50/EC50。【結果・考察】HaCaT は UV の照射時間 10 秒から死滅し始め、90 秒で 30% 以下になった。HaCaT を用いた場合の方が、全体的に高い SI 値を示した。HSC-2 を用いて抗 UV 活性が検出されないものは、HaCaT でも同様であったが、両細胞間では明確な相関関係は認められなかった。抗 UV 活性が比較的高いものは、沢瀉、細辛、黄耆、黄連、山梔子、竜胆、竜胆であった。

P2-143

過酸化水素を担持した殺菌性歯科用レジンに対するメラノイジンの効果

○井上 貴一郎¹、水野 守道²、高橋 茂¹、牛島 夏未³、中島 利徳¹、松村 馨¹、土門 卓文¹ (¹北大 院歯 口腔機能解剖、²北大 院歯 口腔分子生化学、³北大 院歯 学術支援)

【目的】感染脱灰象牙質でも、無菌化できれば、残存コラーゲン・ネットワークの再石灰化が可能となるため、感染象牙質の無菌化は MI に基づく齲蝕治療に極めて有用である。過酸化水素は、分解により発生するヒドロキシラジカルに強い殺菌能があり感染象牙質の無菌化も可能であるが、高分子化合物に含有できなかった。そこで過酸化水素を担持した歯科用レジンを作製し、消失の速いヒドロキシラジカルに対し、スピントラップ剤としてのメラノイジンの殺菌能長期保持に対する効果を検討した。【方法】過酸化水素を担持させる各種歯科材料の検討結果より充填用光重合レジンを採用し、各種メラノイジンをスピントラップ剤として過酸化水素と結合させ、保持効果を peroxide test、FOX 法で、殺菌効果を S.mutans を用いたハローテストで評価した。【結果と考察】スピントラップ効果は、グルコースとヒスチジンから成るメラノイジンが 45 日後でも良い結果を示した。そこでグルコースとヒスチジンからなるメラノイジンを結合させ 37℃ 湿度 100% で保管した結果、メラノイジン結合試料では 70 日まで溶解斑の形成が認められたのに対し、対照群では 1 週で確認できなくなった。以上より過酸化水素を担持した充填用光重合レジンに、グルコースとヒスチジンより合成したメラノイジンを混合すると過酸化水素による殺菌活性を長期間安定的に保持できることが明らかになった。

P2-144

密度勾配遠心法で精製された *Porphyromonas gingivalis* 外膜ヴェシクルとその構造と機能

○中尾 龍馬¹、泉福 英信¹ (¹感染研 細菌 1)

Porphyromonas gingivalis の外膜ヴェシクル (OMV) には高い粘膜炎誘導能があり、歯周病のワクチン原に応用できる可能性が示唆されている。しかし、一般的な精製法で得られた OMV は大きさが様々で、線毛も含まれる。本研究の目的は、OMV をさらに精製することで、その構造や機能の詳細を明らかにすることである。*P. gingivalis* の培養上清を膜濾過した後の濾液を超速心し、得られた沈渣を Iodixanol 密度勾配遠心に供した。上層から 11 分画したものを (# 1-11) を、電子顕微鏡 (EM)、各種 OMV 構成タンパク、LPS、線毛抗体のウエスタンブロット、口腔上皮細胞株に対する脱離活性試験等に供試した。EM により、軽い分画 #4 に粒子径の大きな OMV (58.2 ± 52.9 nm) が、やや重い分画 #8 には小さな OMV (33.2 ± 7.2 nm) が観察された。最も重い分画 #11 には線毛が多く OMV は乏しかった。各分画に含まれる構造の違いは、各種抗体のウエスタンブロットによっても確認された。また、OMV の認められた分画には高い細胞脱離活性が認められたが、線毛の多い分画にその活性はほとんど認められなかった。以上、密度勾配遠心法により、線毛の除去、および OMV の大きさの違いによる分取が可能であった。また、OMV は大きさの違いに関わらず、細胞に対する高い脱離活性があることが明らかとなった。

P2-145

P. gingivalis ジンジバインによる PI3K/Akt 経路の抑制機序

○中山 真彰¹、井上 哲圭¹、中山 浩次²、大原直也¹ (¹岡大 院医歯薬 口腔微生物、²長大 院医歯薬 口腔病原微生物)

Porphyromonas gingivalis (*Pg*) の持続感染は、歯周組織に影響を及ぼし、口腔機能の低下を招く。本研究では、細胞の生存・増殖、代謝などに重要な機能を持つ PI3K/Akt 経路へ与える *Pg* 感染の影響とその作用機序を解析した。*Pg* を歯肉上皮細胞に感染させ、Akt の活性化および Akt 下流因子について *in vitro* kinase assay, Western blotting, 免疫染色法にて解析を行った。また Akt 上流因子 PDK1, PTEN や protein phosphatase (PP) の役割についても解析した。次に *Pg* の病原因子ジンジバインの関与について検討するために、ジンジバイン完全欠損変異株 (MT 株) を用いた感染実験を行ない、野生株 (WT 株) を用いた場合と比較した。*Pg*-WT 株は Akt を抑制し、Akt 下流因子へのリン酸化レベルを変化させていた。Akt 上流因子に関しては、PTEN および PP は *Pg*-WT 株による Akt の脱リン酸化に関与しないことが示唆されたが、PDK1 は細胞膜に局在しないことが示された。*Pg*-MT 株では、Akt の抑制や PDK1 の細胞膜局在に変化は認められなかった。従って、ジンジバインが細胞膜タンパク質に影響を与え、PI3K 活性の低下による PDK1 の細胞膜局在に変化を起し、PDK1/Akt 伝達遮断により Akt 制御系の攪乱に繋がっていると考えられた。

P2-147

マルトオリゴ糖の分解に関与する *S. mutans* *malQ* 遺伝子の特徴付け

○佐藤 裕¹、柴山 和子²、東 俊文^{1,3} (¹東歯大 生化学、²東歯大 微生物、³東歯大 口科研セ)

【目的】 昨年の本学会において、本菌の *glgP*, *malQ* 遺伝子は菌体内グリコーゲン様多糖分解よりも、唾液存在下のデンプン代謝に関与する意義が大であることを報告した。また *malQ* 遺伝子産物はグルコース遊離活性があり、 α 1,4-glucosidase ではないかと推察したが、ゲノムプロジェクトで annotate されている glucanotransferase 活性について検討した。【方法】 昨年度報告した *malQ*, *glgP* 遺伝子の大腸菌クローンより分離精製した His-Tag MalQ および GlgP 精製タンパク質を用い単独および両者共存下の反応を解析した。マルトースの MalQ 反応産物を薄層クロマトグラフィー (TLC) により解析した。【結果と考察】 TLC の結果から、MalQ タンパク質によるマルトース反応産物はグルコースのみが生じるのではなく、グルコースとマルトリオースより大きいマルトオリゴ糖が生成することが分かった。これは MalQ が glucosidase ではなく、glucanotransferase であることを示唆していた。GlgP 単独での反応と異なり、GlgP は MalQ 共存下で見かけ上マルトースに対しホスホリラーゼ活性を示した。これはマルトースに対する MalQ による glucanotransferase 反応で生じたマルトオリゴ糖に対し同活性を示した結果と考えられた。従って MalQ タンパク質は 4- α -glucanotransferase の一種である Disproportionating Enzyme であることが強く示唆された。

P2-146

A 群レンサ球菌は宿主カルパインの活性化を介して上皮バリアを突破する

○住友 倫子¹、中田 匡宣¹、寺尾 豊²、川端重忠¹ (¹阪大 院歯 口腔細菌、²新大 院医歯微生物)

【目的】 A 群レンサ球菌 (Group A *Streptococcus*; GAS) は、物理バリアである咽頭や皮膚の上皮細胞層を突破した後、組織内への侵入と増殖により、劇症型レンサ球菌感染症を引き起こすと推測されている。我々はこれまでに、GAS が細胞間接着分子の分解により上皮バリアを突破すること、ならびに、その突破機構には溶血毒素の一つである Streptolysin S (SLS) が関与することを明らかにした。本研究では、SLS が誘導する宿主細胞間相互作用に着目し、GAS の上皮バリア突破機構への宿主プロテアーゼの関与について検討した。

【方法】 各種阻害剤で処理したヒト腸管上皮細胞 Caco-2 の上皮バリアモデルに、劇症型 GAS 感染症由来の NIH35 株 (M28 型) および SLS 欠失株を感染させ、菌体の上皮バリア通過能を評価した。また、GAS 感染が誘導する宿主細胞間相互作用は、免疫蛍光抗体法およびウエスタンブロット法により解析した。

【結果と考察】 野生株の上皮バリア通過能は、カルパイン阻害剤の添加により著しく低下した。野生株感染細胞では、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に伴い、細胞内プロテアーゼであるカルパインの細胞膜部位への移行が認められた。また、カルパイン局在部位における細胞間接着分子の分解は SLS の変異や BAPTA-AM の添加により抑制された。以上の結果から、SLS は宿主上皮細胞にカルシウムイオン依存的なカルパインの活性化を誘導し、GAS の上皮バリア通過に寄与することが示唆された。

P2-148

口腔における *Rothia aeria* の分布と薬剤耐性

○續橋 治¹、内堀 聡史²、福本 雅彦¹ (¹日大 松戸歯 歯科臨床検査医学、²日大 松戸歯 クラウンブリッジ補綴)

【目的】 近年、膿瘍、敗血症および呼吸器感染患者から *Rothia aeria* (*R. aeria*) が分離されたという報告がなされており、これら疾患の起原菌と考えられている。しかし、口腔における本菌の分布に関する報告は見られない。そこで歯垢検体における本菌の検出状況を検索するとともに、同分離菌株の薬剤感受性を調べた。【方法】 本研究において、開発した *R. aeria* 用選択培地は高い回収率と選択性を示したことから、本選択培地を用いて 10 名の歯垢試料から通常に従い *R. aeria* の検出を試みた。菌種同定は、16S rRNA 遺伝子を基に設計した検出用プライマーを用いた PCR 法により行なった。また、4 名から得られた各 5 菌株について希釈法を用い各種抗菌剤に対する MIC を検査した。【結果および考察】 *R. aeria* は、全被験者の歯垢試料から検出され、総菌数に対する検出比率は平均 1.1% であった。薬剤感受性については、1 名の被験者の分離 5 菌株すべてが MLS 系薬剤に高度耐性、他の 1 名の分離 5 菌株すべてが GM に耐性を認めた。これらの結果から、本選択培地は口腔試料からの *R. aeria* の分離に有用であり、また *R. aeria* の総菌数に占める割合は比較的低率であるが、口腔に常在しているものと判断された。さらに口腔分離菌株は *R. aeria* type strain JCM11412 と異なり、薬剤耐性傾向を示したことから、今後も引き続きモニタリングすることが重要であるものと考えられる。

P2-149

ゾウ口腔から分離した *Streptococcus salivarius* 様菌について

○齋藤 真規¹、高田 和子¹、平澤 正知¹ (¹日大 松戸歯 口腔微生物)

【目的】当研究室ではヒトに常在する齧蝕原因菌 mutans streptococci の由来を研究する一環として、動物口腔から同菌を分離し、その解析を行っている。今回、ゾウ口腔から採取した試料を mitis salivarius 平板培地上で培養した際に見られた菌体外多糖合成集落形成菌株のうち、*S. mutans* group に属さなかった分離株について、その性状解析を試みた。【方法】ゾウ口腔から分離した菌体外多糖形成が認められた菌株について通法に従いその性状解析を行った。【結果】分離した2菌株を NUM 6304 および NUM 6306 として rapid ID 32 STREP にて菌種同定したところ、前者は *Streptococcus* sp.、後者は 92.4% の相同性で *S. salivarius* と同定された。16S rRNA 遺伝子配列の相同性では前者が *S. salivarius* subsp. *salivarius* に、後者が *S. vestibularis* に最も近縁でそれぞれ 96.8% および 97.0% を示した。rpoB 遺伝子配列の相同性は両菌株とも *S. vestibularis* に 93% であった。両菌株とも既知の *S. salivarius* group との DNA-DNA ハイブリダイゼーションの結果は 50~70% の相同性であった。また、両菌株とも *S. salivarius* 固有の *gtf-L* 遺伝子断片を保有していたが、蔗糖からの非水溶性多糖合成能およびガラス管付着能は NUM 6306 で強く認められた。【結論】NUM 6304 および NUM 6306 は *S. salivarius* group に属する新菌種である可能性が示唆された。

P2-151

環境ストレスに应答する *Porphyromonas gingivalis* non-coding RNA の検索

○平塚 浩一¹ (¹日大 松戸歯 生化学・分子生物学)

【目的】近年、多くの細菌で相当数の non-coding RNA が同定され、様々な病原性タンパク質やストレス応答タンパク質をコードする mRNA の翻訳や安定性を調整することがわかってきた。本研究は、*P. gingivalis* の non-coding RNAs を次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定・解析し、*in silico* で既に予測されているものと照合するとともに、新規の non-coding RNA の候補を見いだす事を目的とする。【方法】様々なストレス負荷を菌体にかけて後、経時的にサンプルから全 RNA を抽出した。次世代高速シーケンサーを用いて、発現する全ての RNA を網羅的に解析し、ゲノム塩基配列上にマッピングした。遺伝子 (rRNA, tRNA 含む) 間領域で RNA の発現が認められるものを抽出し、Los Alamos で予測された 649 種の non-coding RNA 領域と重複するかを確認した。【結果と考察】*in silico* 予測された全 649 種類の non-coding RNA 候補のうち、発現が認められたのは、388 種 (59.8%) であり、FPKM 値の大小の差は 10^5 に及んだ。逆に予測されながら発現が全く認められなかったのは 261 種 (40.2%) であった。また一方で予測領域でない場所からの発現が認められた領域は 56 か所存在し、新規 non-coding RNA の領域の可能性が疑われた。

P2-150

ヒト・ブランクの糖アルコール代謝：メタボロミクスのアプローチ

○鷲尾 純平¹、高橋 信博¹ (¹東北大 院歯 口腔生化学)

【目的】Sorbitol (Sor) は Xylitol (Xyl) と同様に糖アルコールであるが、一部の口腔細菌は代謝し酸を産生する。そこでヒトブランク (HP) の Sor と Xyl 代謝についてメタボロミクス的に比較検討した。

【方法】被験者 6 名より、Glu、Sor 及び Xyl 溶液洗口の前後に HP を採取し、糖代謝経路 (解糖系、ペントースリン酸回路 [PPP]、TCA 回路) の代謝中間体・代謝産物および各種アミノ酸を対象とし、CE-TOFMS によるメタボローム解析を行った。【結果及び考察】Sor 洗口時には、Sor 6-リン酸や各種糖代謝関連中間体が確認され、HP によって Sor が代謝されることが示されたが、乳酸産生量は Glu 洗口時の 9.7% と僅かであった。一方、Pyruvate (Pyr) は 25%、acetyl CoA (Ac) は 65% であったことから、Sor から解糖系を経て産生される Pyr の大部分は乳酸へ代謝されるのではなく、Ac を経由して代謝されることが示唆された。Glu 洗口時にはほとんどのアミノ酸が減少 (平均 25%) したのに対し、Sor 洗口時には増加 (平均 46%) した。Xyl 洗口時では Xyl 5-リン酸の産生以外は糖代謝経路がほぼ機能しておらず、アミノ酸は Glu 洗口時と同様の減少傾向を示した。Sor ば Xyl と同様に HP による酸産生は少ないが、アミノ酸産生を促進する可能性が考えられた。

P2-152

咽頭における *Rothia aeria* の分布および口腔分離株との遺伝子型の比較

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

【目的】*Rothia* 属の中でヒトの口腔から分離されるのは、*R. dentocariosa* と *R. mucilaginosa* があり、口腔常在菌と考えられている。これらの菌は日和見感染起因菌と考えられており、咽頭においても常在しているとの報告もある。しかし我々の研究において、*R. aeria* も口腔常在菌であると判断されるが、本菌の咽頭における分布等の詳細な報告はない。そこで我々は咽頭における本菌の分布状況を検索した。また、唾液および咽頭試料から得られた *R. aeria* 分離株の遺伝学的タイピングを行った。【材料と方法】健康者 5 名の唾液、そして咽頭から滅菌綿棒により採取したものを試料とし、*R. aeria* 用選択培地を用いて *R. aeria* の検出比率を算定した。菌種同定は 16S rRNA 遺伝子を基に設計した検出用プライマーを用いた PCR 法により行った。また唾液と咽頭試料から得られた分離株は OPA-03 プライマーを用いた AP-PCR 法により、遺伝学的に共通であるかを検討した。【結果と考察】全被験者の唾液と咽頭から *R. aeria* が検出され、総菌数に相違はあるものの、その検出比率はどちらの試料も平均 2% 程度であった。また、唾液と咽頭試料から得られた分離株は、AP-PCR 法により同一被験者間で同じ型別を示した。これらの結果から本菌の総菌数に占める割合は比較的低率であるが、口腔および咽頭の常在菌であるものと判断された。また口腔と咽頭においては、同一の型別を有する *R. aeria* が常在していると考えられる。

P2-153

Candida albicans による IL-1 β 産生誘導のメカニズム

○長谷部 晃¹、佐伯 歩¹、杉山 正博¹、柴田 健一郎¹ (北大 院歯 口腔分子微生物)

【目的】インフラマソームは多くの炎症性疾患の発症と進行において中心的な役割を果たしており、その活性化により炎症誘導性のサイトカインである IL-1 β の産生が誘導される。本研究では、*C. albicans* (Ca) によるインフラマソーム活性化のメカニズムを調べることを目的とし、Ca による IL-1 β 産生誘導のメカニズムを調べた。

【材料と方法】GFP を発現する Ca pACT-GFP (アパティーン大学 A. J. Brown 教授より分与) を用いて、ヒト単球・マクロファージ系細胞 THP-1、マウス樹状細胞系細胞 DC2.4 ならびに XS106 を刺激した。細胞の培養上清中の IL-1 β は ELISA で測定し、培養上清中の成熟型 IL-1 β はウェスタンブロッティングで確認した。THP-1 の活性化は PMA 処理により行い、THP-1 による Ca の取り込みはフローサイトメーターで測定した。また、抗真菌薬としてアンホテリシン B、THP-1 による取り込み阻害剤としてサイトカラシン D を使用した。

【結果と考察】Ca は THP-1 細胞には IL-1 β の産生を誘導したが、DC2.4 ならびに XS106 細胞には誘導しなかった。すべてのこれらの細胞は Ca を取り込んだことから、樹状細胞系の細胞にとって、IL-1 β の産生誘導と Ca の取り込みとは無関係であった。THP-1 を PMA により活性化すると Ca による IL-1 β 産生誘導が増強され、産生された IL-1 β は成熟型であることが確認された。さらに IL-1 β 産生誘導には、生きている Ca が取り込まれることが重要であることがわかった。

P2-155

口腔癌に対する BCG 生菌療法による抗腫瘍、延命効果の検討

○村上 純¹、大原 直也²、中山 真彰²、辻極秀次³、長塚 仁³、此内 浩信¹、柳 文修¹、畦坪輝寿¹、浅海 淳一⁴ (岡大 病院 歯放、²岡大 院歯 口腔微生物、³岡大 院歯 口腔病理、⁴岡大 院歯 歯科放射線)

【目的】BCG (Bacillus Calmette-Guerin) 生菌療法は、現在その副作用が少ない点などから、表在性膀胱癌に限られ利用されている。口腔癌においても、BCG 療法の効果が認められれば、臨床上的利点は大きい。そこで今回われわれは、口腔癌に対する BCG 生菌を効果的かつ安全な抗腫瘍併用治療薬としての可能性を検討した。【材料および方法】C3H:HeN マウスに対して、同マウス由来頬部扁平上皮癌 sq-1979 株を背部皮下もしくは尾静脈より播種、担癌させ、モデルマウスを作製、実験に供した。モデルマウスに対して、BCG 菌株と 5-FU の単独、併用投与を行い、抗腫瘍効果を解析した。【結果】BCG・5-FU 併用群では他群と比して背部皮下腫瘍の増大が抑制された。この腫瘍抑制は 5-FU 単独投与より効果的であり、BCG 併用による抗腫瘍剤投与量の低減の可能性を示唆できた。さらに転移モデルでは、非投与群と比較して、5-FU 群、BCG・5-FU 併用群、BCG 群に高い生存率を認め、転移の抑制、延命効果が期待できた。また、背部腫瘍を摘出した後に投薬を開始する再発モデルでは、BCG・5-FU 併用群で他群と比して背部腫瘍再発の抑制が見られた。また、実験を通じて BCG 投与による体重の減少はなく、副作用の軽減も期待できた。【結論】今回の結果より、口腔癌治療においても、BCG 療法の利用の可能性が見込まれ、臨床上的利点は大きいと考えられた。

P2-154

プロタミン派生ペプチドの抗真菌活性と応用に向けた機能改変

○長 環¹、永尾 潤一¹、今吉 理恵子¹ (福歯大 機能生物 感染生物)

【目的】我々は、サケ由来プロタミンから派生するペプチド (プロタミンペプチド: VSRRRRRRGGRRRR) が *Candida albicans* をはじめとする *Candida* spp. に対して抗真菌活性を示すことを明らかにしている。本研究では、*Candida albicans* に対する抗真菌活性の作用機作と応用を目指したペプチドの機能改変について報告する。【結果と考察】1. Spider 培地は 37℃ で *Candida albicans* の酵母形から菌糸形への形態変換を誘導する培地である。10 μ M プロタミンペプチドを作用させると、ペプチドは細胞内に透過し、ATP 流出や活性酸素産生を経て殺菌的效果を示す。抗真菌活性を示さない 1 μ M プロタミンペプチドでは *Candida albicans* の細胞内に浸透せず、細胞表面に付着して形態変換能を抑制した。すなわち、プロタミンペプチドは *Candida albicans* に対して濃度依存的に殺菌作用と形態変化抑制作用を示すことが明らかとなった。2. プロタミンペプチドはアルギニンリッチな塩基性ペプチドであるため高塩濃度下では活性が低下する。そこでプロタミンペプチドをジスルフィド結合により環状化する試みを行った。環状化プロタミンペプチドの抗真菌活性は直鎖型プロタミンペプチド以上に高いことが判明した。塩感受性に関しても環状化により高塩濃度下でも活性が維持され、応用への可能性が期待できる。(学会外共同研究者: マルハニチロホールディングス 庵原啓司)

P2-156

Porphyromonas gingivalis HtrA タンパク質の性質

○雪竹 英治¹、佐藤 啓子¹、中山 浩次¹ (長大院歯 口腔病原微生物)

グラム陰性菌の菌体表面タンパク質は細胞質内で翻訳された後、内膜、ペリプラズム、外膜と輸送される。輸送されるタンパク質が、各々の局在で相応しいカタチをとらない場合、ペリプラズム内の品質管理タンパク質 HtrA プロテアーゼによって処理される。菌周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* においても、上記の現象は観察され、unfold な分泌タンパク質は HtrA によって分解される。*P. gingivalis* の HtrA タンパク質は、1 つのセリンプロテアーゼドメインと 2 つの PDZ ドメインをもつ。*P. gingivalis* HtrA タンパク質を His タグ融合タンパク質として、大腸菌で発現させた。これまでに他の菌の HtrA family proteins で報告されているのと同様に、精製した *P. gingivalis* HtrA タンパク質は、多量体を形成しており、unfolding タンパク質のみを基質として、タンパク質分解活性を有することが分かった。*P. gingivalis* HtrA タンパク質も *P. gingivalis* 菌体内でタンパク質品質管理に関わることが示唆される。(会員外共同研究者: 柴田雅敏)

P2-157

歯周病菌におけるタンパク質分泌装置関連分子 PorU の解析

○成田 由香¹、佐藤 啓子¹、雪竹 英治¹、中山 浩次¹ (長大 院医歯薬 口腔病原微生物)

Porphyromonas gingivalis は phylum *Bacteroidetes* に属するグラム陰性偏性嫌気性細菌であり、*Treponema denticola* や *Tannerella forsythia* とともに重度歯周炎に関わる red complex の構成菌である。*P. gingivalis* の菌体表層タンパク質の多くは C 末端に保存されたドメイン (CTD) を有し病原性や抗原性に関与している。これまでに我々は、強力な歯周病原因子であるジンジパインをはじめとする CTD 含有タンパク質分泌機構 (PorSS) を報告している。PorSS の構成タンパク質の 1 つである PorU は CTD ドメインを持ち、アミノ酸配列からジンジパインと同様に C25 システインプロテアーゼファミリーに分類されるプロテアーゼであることが予測された。*porU* 欠損株では PorSS が正常に機能せず、ジンジパインが菌体内に蓄積していること、そして PorU のプロテアーゼドメインの活性中心をアミノ酸置換した変異体の解析から、ジンジパインの成熟に PorU がプロテアーゼとして関与することが示唆されている。今回、複数の PorSS 関連遺伝子変異株における PorU の局在の比較解析を行ったので報告する。

P2-159

カイコ感染モデルによる病原真菌 *Candida albicans* の形態と病原性の関連性の評価

○松本 晴仁¹、永尾 潤一¹、今吉 理恵子¹、長環¹ (福歯大 機能生物 感染生物)

【目的】*C. albicans* は口腔、膈、皮膚、腸管に常在し、日和見感染を引き起こす病原真菌である。本菌は二形性を示し、酵母形から菌糸形への形態変換を起こす。本研究では、カイコ感染モデルを構築し、*C. albicans* の形態と病原性の関連性を評価した。【結果と考察】我々が開発した菌糸形誘導培地 (GlcNAc 培地) は cAMP-PKA 経路を介して形態変換を誘導する。GlcNAc 培地に酵母形細胞を接種後 0 分 (酵母形; Y0 cells)、60 分 (酵母形; Y60 cells)、120 分 (菌糸形; H120 cells) の各細胞を調製し、カイコ感染での病原性を評価した。30°C において Y60 cells は他の細胞と比べ生存率の低下が顕著であり、接種 24 時間後において Y60 cells は他の細胞と比べカイコ内で菌数が増加していた。*In vitro* におけるカイコ体液中での形態変換能を調べた結果、Y60 cells は 30°C、2 時間で菌糸形への形態変換が起こったが、Y0 cells は酵母形のままであった。一方、37°C では細胞間でカイコ生存率に顕著な差はなく、*in vitro* において Y0 cells と Y60 cells 共に 37°C、2 時間で菌糸形に形態変換した。以上の結果から、*C. albicans* の酵母形、菌糸形の形態ではなく、酵母形から菌糸形への形態変換能そのものが病原性発現に関与することが示唆された。

P2-158

口腔細菌のインフルエンザウイルス感染促進作用
○神尾 宜昌¹、今井 健一¹、田村 宗明¹、Cueno Marni¹、落合 邦康¹ (日大 歯 細菌)

【目的】インフルエンザウイルス (IFV) は、新たに合成された virus 粒子と感染細胞のレセプターが結合しているため、細胞外に放出されない。そこで、virus 表面の neuraminidase (NA) により結合が切断され、細胞から出芽した virus 粒子が細胞外へ放出される。口腔からは、NA 産生細菌が検出されており、virus 放出を促進し、感染を重症化する可能性がある。本研究では、口腔の NA 産生細菌のスクリーニングおよび口腔細菌由来 NA が virus の放出に及ぼす影響について検討した。【方法】NA 産生株のスクリーニングは、NA 産生陽性菌として、*S. pneumoniae* を用い、*A. naeslundii*、*P. gingivalis* および代表的レンサ球菌の計 19 菌株を用いて行った。培養上清 (Sup) 中の NA 活性は 4-MUNANA 法で測定した。NA 活性を示す Sup 存在下で A 型 IFV (H3N2) を MDCK 細胞に MOI=0.01 で感染させた。その後、培養液中に放出された virus 量をブランク法により測定した。【結果と考察】全供試菌株で NA 活性が検出されたが、*S. orali* と *S. mitis* が特に活性が高かった。NA 活性が高い両菌株の Sup 存在下で感染を行ったところ、形成ブランク数は *S. mitis* で 28 倍、*S. oralis* で 21 倍と著しく増加した。NA 活性が高い口腔細菌 Sup により virus の放出が促進されることから、IFV 感染および重症化に口腔細菌が関与する可能性が示唆された。会員外共同研究者：清水一史 (神戸大 院医 微生物) (平成 25 年度日大長特別研究、私立大学戦略的研究基盤形成事業)

P2-160

離乳前後および成熟マウスの口腔内ブランク常在菌叢の網羅的解析

○松山 順子¹、佐藤 拓一²、Quispe-Salcedo Angela³、高橋 信博²、大島 勇人³ (新大 院医歯 小児歯、²東北大 院歯 口腔生化学、³新大 院医歯 硬組織形態)

【目的】げっ歯類は口腔内疾患モデルとして利用されているが、その口腔内ブランク常在菌叢についての報告はあまり多くない。そこで、生後 3・6 週齢および 9ヶ月齢マウス口腔内からブランクを採取し、常在菌叢の網羅的解析を行った。

【方法】ICR マウスを用いて、深麻酔下にて上顎第一臼歯を抜去し、緩衝液に浸漬し、試料とした。分散均一化後、同緩衝液にて希釈し、CDC 血液寒天平板に接種した。嫌気培養 (7 日間) 後、生育したコロニーから細菌量 (CFU) を求め、16S rRNA PCR シークエンス法によって細菌種を同定し、細菌構成について解析した。

【結果と考察】3 週齢、6 週齢および 9ヶ月齢マウスブランク試料の CFU は、それぞれ平均 $(8.9 \pm 11.4) \times 10^5$ 、 $(1.7 \pm 3.2) \times 10^5$ および $(4.7 \pm 4.7) \times 10^3$ であった。3 週齢および 6 週齢の優勢菌は、それぞれ *Enterococcus* (53%、31%)、*Escherichia* (19%、26%)、*Lactobacillus* (17%、21%)、*Lactococcus* (8.5%、8.3%) であった。一方、9ヶ月齢では、*Lactobacillus* (83%)、*Lactococcus* (8.6%) が優勢であった。本研究で離乳前後および成熟したマウスブランクの細菌構成が、培養とシークエンス解析を組み合わせた分子生物学的手法によって、明らかになった。また、ヒトでは小児、成人とも、*Streptococcus*、*Actinomyces*、*Veillonella* が優勢菌と報告されており、マウスは食性が異なり、ブランク細菌構成が大きく異なることが判明した。

P2-161

歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の分離と修飾様式の検討
 ○出水川 雅司¹、井貝 亮太¹、堀江 俊¹、長谷川 義明²、川端 淳司¹、北井 則行¹、村上 幸孝² (¹朝日大 歯 歯科矯正、²朝日大 歯 口腔微生物)

【目的】蛋白質のリン酸化修飾はさまざまな生命現象を支える翻訳後修飾の一つである。これまで、歯周病関連細菌 *P.gingivalis* では、二成分制御系などを除いて、リン酸化蛋白質についてはよく分かっていない。そこで、*P.gingivalis* の菌体成分から主なりん酸化蛋白質を分離し、それらの修飾様式を検討した。【方法】*P.gingivalis* ATCC 33277 株を通常に従って嫌気培養した。回収した菌体を破砕した後に界面活性剤により可溶化した。菌体成分に存在するリン酸化蛋白質はリン酸基アフィニティークロマトグラフィーにより分離した。得られた吸着画分を濃縮し、電気泳動で展開した後、質量分析による同定を行った。また、PVDF 膜に転写した後、抗リン酸化 Tyr 抗体を用いたウェスタンブロットによりリン酸化修飾様式の検討を行った。【結果と考察】吸着画分を電気泳動で展開すると、CBB 染色により 6 本の主なバンドが検出され、質量分析により新奇のリン酸化蛋白質が同定された。これらのバンドはリン酸化蛋白質に特異的な Pro-Q Diamond で強く染色された。一方、ウェスタンブロットにおいても特異的な 2 本のバンドが検出できたため、Tyr がリン酸化修飾された蛋白質の存在が示唆された。現在、質量分析によるリン酸化修飾部位の詳細な検討も進めている。

P2-163

Prevotella intermedia の熱ショックタンパクとバイオフィーム形成
 ○山中 武志¹、山根 一芳¹、南部 隆之¹、真下 千穂¹、福島 久典¹ (¹大歯大 細菌)

Prevotella intermedia が菌体外多糖を産生してバイオフィームを形成する際、熱ショックタンパク (HSPs) 遺伝子の転写レベルが上昇していることを報告した。今回、リコンビナント GroEL, DnaK (rGroEL, rDnaK) を用いて、これら HSPs とバイオフィーム形成の関わりを crystal violet microplate assay で検討した。*P. intermedia* のバイオフィーム形成株と非形成株間で、次世代シーケンサーによるパイロシーケンシングとゲノムマッピングによる変異解析も行った。供試菌には既に全ゲノム配列が明らかにされている strain 17 と、strain 17 から得たバイオフィームを形成しない strain 17-2、ならびに標準菌株である ATCC 25611 を用いた。バイオフィームアッセイの結果、培地に加えた rGroEL, rDnaK は strain 17 のバイオフィーム形成を完全に抑制し、strain 17-2, ATCC 25611 株のバイオフィーム形成を増強した。プレート上に固相化した rGroEL, rDnaK は strain 17-2 のバイオフィーム形成のみ促進した。Strain 17-2 のゲノム配列の変異解析を行った結果、chromosome I 上の TaqI-like C-terminal specificity domain protein 遺伝子 (PIN17_0430) と chromosome II 上の glucose/galactose transporter (PINA1569) 遺伝子に明らかな変異が認められた。今回の研究結果から、2つの HSPs は *P. intermedia* 菌体と外部環境との接着に関与していると考えられるが、菌株の性状によって作用が異なることが示唆された。

P2-162

Candida albicans の二形成変換に関与する細胞表面タンパク質コード遺伝子
 ○柴山 和子¹、菊池 有一郎¹、国分 栄仁¹、佐藤 裕²、石原 和幸¹ (¹東歯大 歯 微生物、²東歯大 歯 生化)

【目的】*C. albicans* の病原性は、未同定因子を含め複数の病原因子が複合的に作用して発揮されるものと推察されている。本菌は環境の変化に対応したユニークな二形成発育 (酵母形・菌糸形) を特徴とし、カンジダ症成立には菌糸形成とそれに続く組織侵襲が重要となる。二形成変換への関与の可能性を有する細胞表面分子に焦点を当て、菌糸形での増殖能と菌糸形成能について検討した。【方法】*C. albicans* 野生株 SC5314、細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株および親株、補完株を供試した。補完株は *URA3* 選択マーカー利用し作製した。菌糸形菌体の増殖には 2.5% FCS 添加 RPMI1640 培地を用い、クリスタルバイオレット染色法により評価した。菌糸形成誘導には 10% FCS 添加 YPD 培地上を用いて観察を行った。【結果と考察】野生株および親株に比べ、*C. albicans* 細胞表面タンパク質コード遺伝子の欠失変異株では菌糸形増殖が抑制された。また、血清誘導条件下での菌糸形成能に減弱がみられ、菌糸は不完全な形態を呈した。補完株では、菌糸形増殖と菌糸形成ともに野生型および親株と同程度の回復が確認された。この細胞表面分子が *C. albicans* の二形成変換に関与することが示唆された。

P2-164

ジンジバインにおける Ig-like domain
 ○佐藤 啓子¹、雪竹 英治¹、成田 由香¹、中山 浩次¹ (¹長大 院医歯薬 口腔病原微生物、²学習院大 理 物理)

歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* が分泌する、ジンジバインは自身も病原因子となるだけでなく、そのプロテアーゼ活性でもって、本菌の持つ凝集素、線毛などの他の病原因子の成熟にも関わる。ジンジバインには、シグナルペプチド領域、プロ配列領域、プロテアーゼドメイン、Ig-like domain、C 末端領域 (CTD) がコードされている。ジンジバインは細胞質内で前駆体として翻訳されたのち、細胞膜 (内膜) を通過し、外膜に移行する段階でプロセスを受け、菌体表面付近で成熟型になると考えられている。ジンジバインの菌体表面への輸送において、ジンジバインの CTD に隣接する Ig-like domain がどのような役割をもつのか、Ig-like domain を欠失した Kgp (KgpΔIg) を *P. gingivalis* 内で発現させたところ、KgpΔIg は菌体内で HtrA プロテアーゼにより分解を受けていた。プロテアーゼは unfold なタンパク質をターゲットとすることから、プロ型 KgpΔIg は輸送型をとることができず、HtrA により分解を受けていると考えられる。(会員外共同研究者: 中根大介)

P2-165

口腔癌における *Streptococcus anginosus* 感染と AID 異所性発現

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

【緒言】B細胞の遺伝子変異を誘導する活性化誘導シチジン脱アミノ酵素 (AID) は通常、抗原刺激を受けたB細胞にのみ存在するが、*Helicobacter pylori* 感染でマウス胃粘膜上皮細胞に異所性に発現することが明らかにされて以来、感染発癌との関連が強く示唆されている。本研究では *Streptococcus anginosus* の口腔癌発症機序の解明を目的に、口腔癌組織への *S. anginosus* 感染と AID 発現について検討した。さらに株化上皮細胞を用いて、*S. anginosus* 菌体およびその生理活性物質による AID 発現誘導についても検討を行った。【材料と方法】本研究は岩医大歯学部倫理委員会の承認を得て行った (#01177)。本学附属病院歯科医療センターを受診した口腔癌患者を対象に口腔癌組織を採取し、*S. anginosus* 感染および AID 発現をリアルタイム PCR で検討した。*S. anginosus* NCTC 10713 株の菌体および SAA (Sasaki ら、2001) 刺激による種々の株化上皮細胞での AID 発現誘導はリアルタイム PCR で検討した。【結果】口腔癌組織 9 例中 6 例で *S. anginosus* のゲノム DNA が検出され、そのうち 5 例では AID 発現誘導が観察された。一つのサンプルで病変中心部と周辺域を比較した結果、中心部での AID 発現が高かった。株化上皮細胞を用いた検討では *S. anginosus* 菌体、SAA のいずれの刺激によっても AID 発現が誘導された。【結論】*S. anginosus* は粘膜上皮細胞に AID の異所性発現を誘導し、本菌による発癌機序に関与している可能性が示唆された。

P2-166

HIV 唾液検査の科学的検証と HIV 検査相談機会の拡大に関する取り組み

○今井 健一¹、落合 邦康¹ (¹日大 歯 細菌)

わが国は、先進国の中で唯一 HIV 感染者とエイズ患者数が増え続けている。その最も大きな理由は、HIV 検査数の減少にある。その結果、感染に気付かずエイズ発症後に感染を知るケースが多い。HIV の感染拡大を防ぐ最も有効な手段は、感染者の早期発見であるが、現行の血液検査は、採血の専門スタッフと判定までの時間が問題となるばかりではなく、針刺し事故等の 2 次感染の危険性、採血困難な被検者への対応等の問題がある。検査キットの性能は向上しているものの、検査者数の増加にはつながっていない。従って、検査数増加が期待される、新たな検査法の導入が必須となっている。

我々は、簡便な検査法として唾液を用いた HIV スクリーニング検査キット (OraQuick;Orasure 社) の本邦への導入を検討している。OraQuick は、2004 年に米国 FDA 認可を得た、歯茎を拭うだけで 20 分で感染の有無判定ができる簡便かつ血液検査と同程度 (99.3%) の性能を有する検査キットである。現在、米国で行われている検査の約 8 割で使用されているが、昨年末には薬局等での発売も認可され自己検査が行えるようになった。しかし、わが国ではまだ未承認のため、唾液検査の有用性を検討したデータはない。我々は、唾液検査を日本における HIV 検査相談機会の拡大に繋がる可能性のある方法として、その実施の可能性と日本人における有用性を検討している。本学会ではその取り組みを紹介する。

P2-167

レッサーパンダ口腔由来 *Streptococcus mutans* 様株のゲノム解析

○桑原 紀子¹、内藤 真理子²、岡本 公彰³、齋藤 真規¹、平澤 正知¹、高田 和子¹ (¹日大 松戸歯 口腔微生物、²長大 院医歯薬 口腔微生物、³鶴見大 歯 口腔微生物)

【目的】ヒト口腔に常在する mutans streptococci の系統発生的研究の一環として、当研究室では様々な動物の口腔から同菌を分離し、その解析を行っている。今回レッサーパンダ口腔から分離した *Streptococcus mutans* 様菌 P13 株をヒト口腔由来 *S. mutans* と比較することを目的として P13 株のゲノム配列を決定した。【方法】P13 株のゲノム配列は GS-FLX system を用いてパイロシーケンスした。得られたデータをアセンブルし、contig を構築した。Primer walking 法によりゲノム配列を取得し、すでに解析されている *S. mutans* UA159 および GS5 株と比較した。【結果】P13 株のゲノムをパイロシーケンスした結果、冗長度 20.0 で配列が得られ、42 個の contig を構築することが出来た。取得したゲノムサイズは 2.09 Mb であり、UA159 および GS5 両株より長かった。MiGap アノテーションパイプライン等によるアノテーションを行ったところ、GC 含量は 36.7% であり、1,978 個の CDS が予測された。また 5 コピーの *rrn* オペロン、59 個の tRNA がコードされていた。P13 株と *S. mutans* UA159 株および GS5 株と比較解析したところ、頻繁なゲノム再構成は認められなかった。ヒト齲蝕の主要な病原因子であるグルコシルトランスフェラーゼをコードする *gtf* 遺伝子も遺伝子構造、構成ともに保存されており、今回レッサーパンダ口腔から分離した P13 株はヒト口腔由来 *S. mutans* と同一菌種であると考えられた。

P2-168

Porphyromonas gingivalis における遺伝的組換えと CRISPR による相反的な種内多様性制御

○丸山 史人^{1,2}、渡辺 孝康¹、野澤 孝志¹、中川 一路¹ (¹東医歯大 院医歯 細菌感染制御、²東医歯大 院医歯 環境遺伝生態)

細菌にとって種内多様性を制御することは進化上重要であり、同一菌体でのゲノム再構成や種内の菌株間での組換えなどがこれに関与する。一方で核酸の移動抑制機構として近年 clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) が注目されている。我々は、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 60 株の系統解析で、種内多様性が高いことを示してきた。そこで今回、本菌の種内多様性制御機構を解明する目的で、ゲノム再構成と組換えを詳細に調べた。3 株間のゲノム配列比較においてゲノム再構成発生点に insertion sequence (IS) が高頻度に認められることから、頻繁な IS 移動が再構成に関わっていることが推察された。また、MLST に用いられる 7 遺伝子の塩基配列をアラインメントして作成した 60 株のスプリット系統樹で網目構造が顕著であり、本菌では菌体間での組換えも頻繁におきていることがわかった。CRISPR スペーサー配列の相同性検索の結果、97% は相同な配列がなかった一方、残り 3% のうち 6 割以上は本菌のゲノム配列の一部と相同で、その多くが IS 上またはその近傍に位置していた。よって本菌の CRISPR は、菌体内の IS や他の *P. gingivalis* 菌体由来の DNA を標的として、IS の移動や外来 DNA 取込みを抑制していると考えられる。以上から、本菌は細胞内ゲノム再構成や細胞間組換えで多様性を創出する一方、CRISPR でそれらを抑制していると考えられる。

P2-169

Streptococcus troglodytae グルコシルトランスフェラーゼの系統学的解析
○岡本 公彰¹、今井 奨²、花田 信弘³ (鶴見大 歯 口腔微生物、²鶴見大 歯 探索歯)

【目的】 *Streptococcus troglodytae* はチンパンジーから分離された *S. mutans* に最も近縁の菌種である。今回、*S. troglodytae* の GTF 遺伝子を解析し、他のレンサ球菌との関連を比較した。【方法】 Roche454 シーケンサーを用いたピロシーケンシング法により *S. troglodytae* TKU31 株のドラフト scaffold を得た。MiGAP(DDBJ)により GTF 遺伝子を抽出し、Clustal W により他のレンサ球菌 GTF と比較した。【結果と考察】 *S. mutans* は非水溶性グルカンを作る GTF-I、水溶性グルカンを作る GTF-S および中間の性質を持つ GTF-SI の 3 種類の酵素があり、各々 *gtf-b*、*gtf-d* および *gtf-c* 遺伝子によりコードされている。Scaffold の解析により *S. troglodytae* は *S. mutans* と同様、*gtf-b*、*gtf-c* および *gtf-d* の 3 種類の類似した GTF 遺伝子を持ち、推定アミノ酸配列も類似していた。さらに既知のレンサ球菌 GTF と共に系統関係を調べると、GTF 遺伝子は 16S rRNA 遺伝子を基にした進化程度と一致した。種々の動物から得られたレンサ球菌 GTF-B および GTF-C は単一のクラスターを形成し monophyletic であった。GTF-D、GTF-S および GTF-T はそれぞれ独立したクラスターを形成し monophyletic を示した。これらのことから *S. troglodytae* は *S. mutans* と同様のう蝕病原性を有すること、および GTF 遺伝子は 16S rRNA 遺伝子を基にした進化程度と一致することが考えられた。

P2-171

Candida albicans の Hsp70 タンパク質 Msi3p はアゾール系抗真菌薬耐性を制御する
○永尾 潤一¹、長 環¹、今吉 理恵子¹ (福歯大 機能生物 感染生物)

We investigated the cellular function of Msi3p, belonging to the heat shock protein 70 family, in *C. albicans*. The mutant strain tetMSI3 was generated, in which *MSI3* was controlled by a tetracycline-repressive promoter. We controlled the *MSI3* expression level by doxycycline (DOX) and compared its phenotype with that of a control strain with a wild-type copy *MSI3*. *MSI3* was essential for cell growth *in vitro* and all the tetMSI3-infected mice survived after DOX administration. Drug susceptibility tests indicated that repression of *MSI3* expression resulted in hypersensitivity to fluconazole and conferred fungicidal action to fluconazole. RT-PCR analysis showed that the upregulation of *MSI3* expression in response to fluconazole was required for the induction of the calcineurin-dependent gene expression which confers fluconazole tolerance. These data suggest that Msi3p governs fluconazole tolerance by partially influencing the calcineurin signaling pathway and also other tolerance mechanisms.

P2-170

過酸化水素は口腔レンサ球菌の隠れた病原因子かもしれない
○岡橋 暢夫¹、沖永 敏則²、桜井 敦朗³、寺尾 豊⁴、中田 匡宣⁵、川端 重忠⁵、西原 達次² (阪大 院歯 フロンティア、²九歯大 感染、³東歯大 小児、⁴新大 院医歯 微生物、⁵阪大 院歯 細菌)

【目的】 マクロファージに口腔レンサ球菌を感染させると細胞死が誘導される。ここでは、これに関与する細菌側の病原因子を探索した。

【結果】 ヒトマクロファージ細胞株 THP-1 に口腔レンサ球菌 *Streptococcus sanguinis* を感染させると細胞死が誘導される。加熱死菌では細胞死は認められず、生菌が産生する何らかの病原因子が細胞死を誘導していると考えられた。ファゴサイトーシスを阻害する cytochalasin D を添加しても細胞死は起こることから、貪食された菌が細胞内で細胞死を引き起こす可能性は否定された。菌の感染によって IL-1 β の産生が促進されるが caspase-1 の活性化は認められず、inflammasome も細胞死には関与していないと考えられた。他の口腔レンサ球菌を感染させたところ、*S. mutans* や *S. salivarius* は細胞毒性を示さず、mitis group に属する口腔レンサ球菌が細胞死を誘導することが分かった。mitis group レンサ球菌が過酸化水素を産生することに着目して調べたところ、過酸化水素分解酵素 catalase が細胞死を抑制することが判明した。これらの結果は、口腔レンサ球菌の産生する過酸化水素がマクロファージの細胞死を誘導することを示唆している。

【結論】 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素に細胞傷害性があることは従来報告されておらず、これまで見過ごされていた病原因子としてその役割を考え直す必要があると思われる。

P2-172

Porphyromonas gingivalis Mfa1 線毛に付随する Mfa3 の局在化に関する研究
○井貝 亮太¹、長谷川 義明²、出水川 雅司¹、堀江 俊¹、川端 淳司¹、北井 則行¹、吉村 文信³、村上 幸孝² (朝日大 歯 歯科矯正、²朝日大 歯 口腔微生物、³愛院大 歯 微生物)

【目的】 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株 (33277 株) は、FimA および Mfa1 線毛を菌体表面に発現している。近年、Mfa1 線毛の付随成分として PGN0289 (Mfa3)、PGN0290 (Mfa4) および PGN0291 タンパク質が同定されたが、付随成分の構築機序は不明である。本研究では、Mfa1 線毛の構築機序を明らかにするための一助として、Mfa4 が Mfa3 の局在化に及ぼす影響を検討した。

【方法】 33277 株由来の *fimA* 欠損株および *fimA* 欠損株を親株として作製した *mfa4* 欠損株から全菌体抽出液を調製した。また、*fimA* 欠損株および *mfa4* 欠損株 (*delta fimA*) から Mfa1 線毛を精製した。得られた試料を用いて抗 Mfa3 抗血清によるウェスタンブロットを行った。

【結果と考察】 Mfa3 は、*fimA* 欠損株の全菌体抽出液では 2 つのタンパク質 (43 kDa および 40 kDa) バンドとして認められた。しかし、精製線毛には、40 kDa のみが検出された。一方、*mfa4* 欠損株の全菌体抽出液では、43 kDa のみが検出され、精製線毛には、いずれも検出されなかった。以上の結果から、Mfa1 線毛中には 40 kDa の Mfa3 のみが存在し、Mfa1 線毛への Mfa3 の局在化には、Mfa4 の関わる Mfa3 の成熟化が関与する可能性が示唆された。

P2-173

Cytotoxicity and antibacterial activity of roselle ethanol extract on oral bacteria in vitro

○Sulistiyani Herastuti¹, Fujita Mari¹, Mashima Izumi¹, Miyakawa Hiroshi¹, Kamaguchi Arihide¹, Nakazawa Futoshi¹ (¹Dept. of Oral Microbiol., Health Sci. Univ. of Hokkaido Sch. of Dent.)

Objective: The purpose of this study is to examine cytotoxicity and antibacterial activity of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) extract on oral bacteria in vitro. **Methods:** Roselle calyces powder was soaked with ethanol. After centrifugation, the extract was dried to remove the ethanol. Then, the extract was soluble in PBS and filtered aseptically. Cells of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *S. mutans* and *A. naeslundii* were treated with the extract for 5 min at room temperature to examine antibacterial activity. Cytotoxicity of the extract was also studied by using WST-1 on HGF and Ca 9-22 cells. **Results:** Roselle extract showed strong antibacterial activity against *P. gingivalis*. The activity on Gram-negative bacteria was higher than it's on Gram-positive bacteria. The extract had no cytotoxicity on HGF and Ca 9-22 cells. **Conclusion:** Roselle extract would be considered for antibacterial agent and safe to human oral cells.

P2-174

Porphyromonas gingivalis strains have varying sialic acid-binding positively-charged amino acid residues found in the sialidase domain

○Cueno Marni¹, 神尾 宜昌^{1,2}, 今井 健一^{1,2}, 田村 宗明^{1,2}, 落合 邦康^{1,2} (¹日大 歯 細菌, ²日大 総歯研 生体防御)

Porphyromonas gingivalis sialidase activity is associated with regulating virulence factors and pathogenesis. However, not all *P. gingivalis* strains are pathogenic which would insinuate that the sialidase domain may vary among strains. Throughout this study, we made use of *P. gingivalis* ATCC 33277 and W50. Generated sialidase homology models were validated through superimposition with known sialidase domain crystal structures, predicted sialic acid (SA) docking to each sialidase domain was performed, and SA-binding sites were determined and differentiated between the two *P. gingivalis* strains. We found that the *P. gingivalis* sialidase domain homology models are structurally accurate compared with those determined in crystal structures. In addition, molecular docking of SA to the *P. gingivalis* sialidase domain showed a difference in the number of positively-charged amino acid residues binding with SA. We propose that *P. gingivalis* sialidase activity is influenced by the number of positively-charged amino acid residues found in the *P. gingivalis* sialidase domain.

P2-175

侵襲性歯周炎原因菌のキノールペルオキシダーゼに対する阻害剤

○河原井 武人¹, 古西 清司¹ (¹日歯大 生命歯微生物)

【目的】我々は以前、侵襲性歯周炎原因菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa 菌) を用いた解析から、呼吸鎖のメンバーであり過酸化水素を代謝する膜結合性キノールペルオキシダーゼ (QPO) を見出し、本酵素が Aa 菌の毒性因子の一つであるロイコトキシンの産生に寄与することを明らかにした。今回、薬剤スクリーニングにより見出した QPO 阻害剤の阻害様式を動力学的手法により解析した結果を報告する。**【方法】**精製 QPO 試料は、Aa 菌 *qpo* をクローン化した大腸菌に過剰発現させ、QPO 過剰発現株の膜画分から抽出精製することにより調製した。ユビキノール-1 を基質として、各種濃度の阻害剤存在下での精製 QPO におけるペルオキシダーゼ活性を分光学的に測定した。**【結果と考察】**我々は本酵素に対する強力な阻害剤としてアスコフラノン (mixed-type 阻害、 $K_i=9.557$ nM) を過去に報告している。このアスコフラノンの類似体であるイリシコリン B にも強いキノールペルオキシダーゼ阻害活性が認められ、その阻害様式は mixed-type であり、 $K_i=565.9$ nM であった。一方、呼吸阻害剤に対する IC_{50} は、 $ZnCl_2=4.9$ μ M、 $HQNO=1.4$ μ M、 $KCN=85$ μ M、 NaN_3 は阻害しなかった。(会員外共同研究者：北里大・生命研・生物機能：塩見和朗、大村智)

P2-176

Streptococcus mutans のバイオフィームにおける精油由来 terpene alcohol の抑制効果

○藤田 真理¹, 宮川 博史¹, 鎌口 有秀¹, 中澤 太一¹ (¹北医大 歯 微生物)

【目的】これまで我々は、天然精油 Tea Tree Oil の主要抗菌成分である terpene alcohol が口腔バイオフィーム内の細菌に対する優れた抗菌効果を有することを報告してきた。本研究では、他の精油由来 terpene alcohol のバイオフィームにおける抑制効果を比較した。**【方法】**供試菌株として *Streptococcus mutans* Ingbritt 株を用いた。全ての terpene alcohol は同条件で可溶化し、抗菌実験に用いた。菌体に対する抗菌効果は terpene alcohol 処理後の生菌数で評価した。バイオフィーム形成過程における抗菌効果は各種条件下で形成されたバイオフィーム量を定量し、バイオフィーム形成後の細菌に対する抗菌効果は、処理後の生菌数ならびに WST-1 活性を測定することにより評価した。**【結果】**全ての terpene alcohol の抗菌作用が確認されたが、monoterpene alcohol はバイオフィーム形成後の細菌に対して、一方 sesquiterpene alcohol はバイオフィーム形成過程において顕著な抑制効果を示した。**【結論】**Terpinen-4-ol を含む monoterpene alcohol はバイオフィーム形成後の細菌に対して有効であり、sesquiterpene alcohol は顕著なバイオフィーム形成抑制効果が認められたがバイオフィーム形成後の細菌に対しては無効であることが確認された。以上の結果より、それらのバイオフィームに対する抑制作用機構の差異を考慮した口腔内応用が期待される。

P2-177

口腔ケアジェルによる口腔内カンジダ症および消化管移行抑制効果

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

【目的】口腔常在菌の増加と遷移は、口腔感染症の発症のみならず全身疾患の誘因となる。また、口腔フローラ形成菌の一部が消化器疾患の発症に関わる可能性が示唆されている。今回、ラット口腔感染実験モデルを用い、口腔内に定着・増殖した *Candida albicans* の消化管への移行、および口腔ケア用カテキンジェルの発症抑制効果について検討した。【方法】実験動物としてSD系ラット、供試菌株は *C. albicans* NUD202株を用いた。免疫抑制剤を接種後、被験菌を口腔へ1日1回で3日間接種した。菌接種終了後、3日毎に唾液および糞便を、day 17および31にラットを屠殺して舌、胃、小腸および大腸を採取した。サンプル処理後、CHROMagar *Candida* 培地にてCFUを算定した。一方、感染ラットにカテキンジェルを連日口腔内に塗布し、上記CFUへの影響と舌に定着した菌の形態および組織侵入性について検討した。【結果および考察】 *C. albicans* 接種群ではすべての試料から被験菌が検出され、菌の口腔内定着と消化器官への移行が確認された。カテキンジェル塗布群ではCFUが著しく減少した。菌接種群の舌で菌糸形変換が見られ、菌糸は顆粒層まで侵入していた。一方、カテキンジェル塗布群では舌表層の皮質層に酵母形が散在するのみであった。以上の結果から、口腔フローラ形成菌の一部は消化管へ移行する可能性が認められるとともに、カテキンジェルによる抗菌効果と消化管移行が抑制されることが確認された。

P2-179

Candida dubliniensis および *Candida albicans* に対する薬剤感受性試験結果の比較

○仲村 健二郎¹ (1日歯大 新潟生命歯 先端研究セ)

【目的】病原性真菌 *Candida dubliniensis* (*C. dub*) は1995年にSullivanらによって新菌種とされた。当初は主にHIV陽性患者での分離報告が多かったが、近年、健常者からの分離が多く報告されている。その形態や生物学的性状は *C. albicans* (*C. alb*) に酷似するが、ストレス応答性等が異なっている。今回、抗真菌剤Fluconazole (FLCZ)、Miconazole (MICZ)、Itraconazole (ITCZ) (アゾール系)、Flucytosine (5-FC) およびAmphotericin B (AMPH) の薬剤感受性試験を両菌で行い比較した。【方法】菌株は本学付属病院中央検査科の臨床分離株と健常者由来分離株及び標準株を用いた。薬剤感受性試験は、CLSI法に準拠して行い各菌株のMICを求めMIC値毎の分布を調べた。【結果と考察】アゾール系3剤では、いずれも *C. dub* が *C. alb* に比べ低感受性を示す菌株が多かった。特にFLCZで著明であった。5-FCでは *C. alb* で低感受性を示す菌株が多かった。またAMPHでは、各MICに対する分布は両菌ではほぼ同じであった。FLCZの結果から *C. dub* がHIV陽性患者で多く分離された背景にはFLCZの予防投与とFLCZに対する低感受性が関与している可能性が示唆された。共同研究者：久和 彰江、日歯大、先端研、菅原芳秋、同、中検

P2-178

Streptococcus criceti デキストラン結合レクチンB遺伝子の *Streptococcus mutans* における解析

○田村 晴希¹、山田 ありさ¹、加藤 裕久¹ (1岩医大 薬理 病態制御)

【目的】我々はこれまでに *Streptococcus criceti* においてデキストラン依存性凝集を示す菌株(ATCC 19642, OMZ 61)と示さない菌株(E49, HS-1)を同定した。*S. sobrinus*6715株ではデキストラン結合レクチンBがその凝集と関与することが分かっている。本研究の目的は *S. mutans* を用いて、*S. criceti* デキストラン結合レクチンB遺伝子によるデキストラン依存性凝集とバイオフィーム形成に及ぼす影響を調べることにする。

【方法】シャトルベクターにE49株のデキストラン結合レクチンB遺伝子(*dblB*)を入れ、*gbpC*の変異によって自らはデキストラン依存性凝集を示さない *S. mutans* GS-5株に形質導入した。デキストラン依存性の凝集は菌懸濁液にデキストランを添加し、混和後の変化を観察した。バイオフィーム形成はポリスチレンプレートを用い、brain heart infusionのみと1%グルコース、スクロース、マルトースを添加した場合について評価した。

【結果と考察】 *S. criceti* *dblB* 遺伝子をもつ菌株はデキストラン依存性凝集を示した。また同株はグルコースとマルトースを添加した場合、プレートに付着したバイオフィーム量の増加がみられた。一方、スクロース添加ではバイオフィーム量の増加は認められなかった。本研究の結果から、*S. criceti* *dblB* 遺伝子は *S. criceti* においてもデキストラン依存性の凝集とバイオフィーム形成に関与していることが示唆された。

P2-180

口腔 *Actinomyces* の酸産生能および増殖能に対する窒素源の効果

○則松 佑佳^{1,2}、川嶋 順子^{2,3}、山本 照子¹、高橋 信博² (1東北大院歯 顎口腔矯正、2東北大院歯 口腔生化学、3東北大院歯 歯内歯周治療)

【目的】口腔常在菌の一つ *Actinomyces* は健全部のみならず、齲蝕や歯周疾患病巣からも検出される。本菌は糖を代謝し酸を産生するが、その代謝過程でクエン酸回路の一部を利用しており、アミノ酸代謝との関連が示唆される。本研究では、*Actinomyces* の酸産生および増殖に対する窒素源(N)の影響について検討した。【方法】*Actinomyces naeslundii* (*An*) ATCC12104、*A. oris* (*Ao*) WVU627、*A. odontolyticus* (*Aod*) ATCC17929を用い、実験は全て嫌気条件下で行った。*An*、*Ao*のGlucose(G)からの酸産生速度をNの有無でpH-statにて測定した。さらに、3菌種を唾液、血清、ゼラチン存在下、Gの有無で培養し、培地の濁度(OD at 660 nm)とpHを測定した。【結果】*An*、*Ao*にNを加えると酸産生量が1.88±0.30倍になった。3菌種ともG非添加、G添加で血清存在下での増殖が高かった(OD=4.37±2.72、4.71±1.40)。*Ao*、*Aod*は唾液存在下でGの有無に関わらず増殖は低かったが、*An*は唾液にGを添加すると増殖が見られた(OD=0.62±0.07)。ゼラチンでは3菌種ともG添加で増殖が見られた(OD=1.29±0.34)。

【考察】N存在下で酸産生が促進されたことから、口腔 *Actinomyces* はNの取込系とそのクエン酸回路への流入経路を持つことが示唆される。G共存下、血清およびゼラチンで増殖したことから、*Actinomyces* は糖代謝と共役して、歯肉溝浸出液、歯周組織、象牙質有機質といったNを利用することが考えられる。

P2-181

PRIPは *Staphylococcus aureus* を包含するオートファゴソームの成熟を制御する

○原田 佳枝¹、兼松 隆¹ (¹廣大 院医歯薬保健細胞分子薬理)

【目的】我々は、PRIP (PLC-related catalytically inactive protein) が GABARAP に結合することから、そのホモログである LC3 (オートファジー調節分子) に結合する事を明らかにし、PRIP が LC3 を介した新たなオートファジー調節分子であると報告した。ここでは、オートファジーを介する感染防御機構に PRIP が関与するか、*S. aureus* の感染モデルを用いて検討した。【方法と結果】PRIP ノックアウト (PRIP-KO) マウスから MEF (mouse embryonic fibroblast) を調製し、*S. aureus* を感染させ、細菌を包含する GFP-LC3 陽性 autophagosome-like vacuole を観察した。PRIP-KO 細胞では野生型に比べ巨大化した vacuole 形成みられ、細胞内で *S. aureus* が増殖することが分かった。タイムラプス観察では、野生型細胞で出現した GFP-LC3 陽性 autophagosome-like vacuole が lysosome と融合して消失する過程が観察できたのに対し、PRIP-KO 細胞では lysosome との融合が障害された vacuole が観察され、*S. aureus* が vacuole から漏出する像も観察できた。また、酸性オルガネラ染色実験においては、PRIP-KO 細胞では、リソソームと融合した autophagosome-like vacuole の数が減少していることが明らかとなった。【結論】PRIP は、LC3 などのオートファジー関連分子を制御することで、オートファゴソームの成熟段階を促進的に調節し、*S. aureus* などの細菌感染に対する感染防御機構に関与する分子であることが明らかとなった。

P2-183

Capnocytophaga ochracea のバイオフィーム形成への Por 分泌機構の関与

○喜田 大智¹、菊池 有一郎²、国分 栄仁²、柴山 和子²、齋藤 淳¹、石原 和幸² (¹東歯大 歯周病、²東歯大 歯 微生物)

【目的】*Capnocytophaga ochracea* はデンタルプラーク中に認められるグラム陰性桿菌で、培地平面上での滑走能をもつ。本菌は歯周病巣局所だけでなく、易感染性患者の敗血症や骨髄炎等の病巣からの検出も報告されている。*C. ochracea* が含まれる phylum には、蛋白質分泌に関わる Por 分泌機構を持つものがあり、本菌にもそれを司る遺伝子群のオルソログが存在する。本研究では、その一つである *porT* オルソログの変異株を作製し、バイオフィーム形成への影響を検討した。【方法】*C. ochracea* ATCC 27872 株の *porT* に *ermF-ermAM* cassette を挿入した fragment を overlapping PCR により作製し、electroporation にて変異株を作製した。培地平面上での滑走運動は 3% 寒天含有 Tryptic soy blood agar 上で観察した。バイオフィーム形成量測定のため、TS broth にて前培養した *C. ochracea* を 96 well polystyrene plate に 100 μ l ずつ接種し、37°C、嫌気条件下で 6 ~ 24 時間培養した。培地除去後、バイオフィーム形成量をクリスタルバイオレット染色により測定した。【結果】*porT* オルソログ変異株は滑走能を失っていた。バイオフィーム形成量は野生株と比較して、培養後 6 時間で 45%、8 時間で 57%、24 時間で 45% 程度の減少を認めた。以上の結果から、*C. ochracea* のバイオフィーム形成に Por 分泌機構により輸送される蛋白質が関与する事が示唆された。

P2-182

バイオフィーム形成における *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子の役割

○菊池 有一郎^{1,2}、柴山 和子²、国分 栄仁^{1,2}、大原 直也³、中山 浩次⁴、石原 和幸² (¹東歯大 口科研、²東歯大 微生物、³岡大 口腔細菌、⁴長大 病原微生物)

【目的】細菌の ECF シグマ因子は、細胞外の生活環境変化に応答し、環境ストレスを回避している。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* は 6 種の ECF シグマ因子を保有しており、一部の ECF シグマ因子について DNA 修復や酸化ストレス消去、ジンジパイン産生能に関与するとの報告がある。しかし、ECF シグマ因子とバイオフィーム形成能との関連については、現時点では未報告である。本研究では、それぞれの ECF シグマ因子について遺伝子挿入変異株を作製し、そのバイオフィーム形成能について検討した。【方法】*P. gingivalis* 33277 株を親株とし、各々の ECF シグマ因子遺伝子内にエリスロマイシン耐性遺伝子カセットが挿入された変異株を電気穿孔法にて作製した。また、PGN_0274 と PGN_1740 変異株については相補株を作製した。バイオフィーム形成能は、クリスタルバイオレット染色法にて測定した。【結果と考察】野生株と比較し、PGN_0274, PGN_0319, PGN_1740 変異株はバイオフィーム形成能の増加を認めた。その中でも、PGN_0274 と PGN_1740 変異株にて顕著な増加を認めた。また、PGN_0274 と PGN_1740 変異株におけるバイオフィーム形成量の増加は、相補株にて野生株と同程度に回復した。以上の結果より、ECF シグマ因子 PGN_0274 と PGN_1740 は、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成を抑制するタンパク質の遺伝子発現を調整している可能性が示唆された。

P2-184

口腔細菌間での contact dependent activation の可能性について

○鎌口 有秀¹、長田 和実²、澁井 徹³、新岡 丈治⁴、岡本 公彰⁵、高田 和子⁶、藤田 真理¹、石井 久淑²、坂倉 康則³、中澤 太¹ (¹北医大 歯 微生物、²北医大 歯 生理、³北医大 歯 解剖、⁴北医大 薬 教育開発、⁵鶴見大 歯 口腔細菌、⁶日大松戸 歯 口腔細菌)

【目的】口腔細菌による biofilm 形成の要因として coaggregation も大きな役割を持つと考えられている。これまで、有機物存在下での coaggregation を検討してきた中で、*Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* (FNP) と *Propionibacterium acnes* (PA) とは coaggregation することに加え、PA は FNP の発育を促進した。今回は PA の FNP の発育促進作用について検討を行った。【方法】FNP AK 株、PA KT 株、*Actinomyces neslundii* (AN) ATCC 12014 株を hemin, menadione 添加 Tryptic soy broth にて嫌気培養した。【結果と考察】FNP は PA と共培養することにより FNP の発育の促進と悪臭の増加がみられた。PA の培養上清を FNP に添加し培養しても完全には共培養の現象を再現できなかった。共培養液の Gram 染色像より両菌は結合している像が多くみられたことより、contact dependent activation (仮称) が作用している可能性が示唆された。悪臭の増加は GC-MS 解析より、Methanethiol 等の新たな産生が原因であった。これは FNP の methionine gamma-lyase 遺伝子の新たな発現によるものと考えられた。また、AN を anchor cell として用いたプレートに FNP と PA を接種し、これらの菌が biofilm 形成にも関与することを confocal laser scanning microscope にて確認した。

P2-185

Porphyromonas gingivalis の薬剤排出ポンプ様分子をコードする遺伝子
 ○井上 哲圭¹、田口 裕子²、加野 小奈美³、中山 真彰¹、大原 直也¹ (岡大 院医歯薬 口腔微生物、²岡大 院医歯薬 歯周病態、³岡大 院医歯薬 歯科矯正)

薬剤排出系はこれまで種々の菌種で様々なタイプが見いだされてきた。近年、薬剤排出機能以外に病原性に関わることも示唆されている。歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) ATCC 33277 株のゲノムデータベース検索の結果、本菌ではマルチコンポーネント型薬剤排出ポンプ様分子をコードする遺伝子クラスターが7個見いだされた。これらの遺伝子クラスターは基本的に内膜蛋白質(CMP)、ペリプラズム蛋白質(MFP)、外膜蛋白質(OEP)をコードする遺伝子から構成されていたが、中にはCMPを複数含むもの、OEPを含まないものが存在した。遺伝子クラスターのうち6個は、その遺伝子構成を保持した形で、他のPgゲノム解析株W83株及びTDC60株に保存されていたが、1個はW83株で欠失していた。ATCC 33277株のMFP遺伝子はいずれのクラスターにも1個ずつ存在し、これらを相同置換により破壊した株(MFD株)を作製した。各MFD株について、各種薬剤に対するMICを微量液体希釈法及び寒天平板希釈法により野生株と比較したところ、薬剤感受性の上昇を示したMFD株が存在し、本菌は薬剤排出活性により薬剤低感受性となっていることが示唆された。現在、薬剤排出ポンプ様分子の病原性との関連性についても解析を進めている。<会員外協力者：小野美優、清水由梨香(岡大・歯・学生)>

P2-187

ウシ骨由来移植材の吸収過程の解析
 ○新井 宏¹、柳澤 伸彰¹、鈴木 治²、中村 雅典¹ (昭大 歯 口腔解剖、²東北大 院歯 顎口腔機能創建)

ウシ骨由来移植材(XDBBM)は歯周疾患による骨欠損部に対して使用される非吸収性骨補填材で、安定した歯周組織の再生が報告されている。しかしながら、XDBBM周囲の組織構築、特に吸収の有無に関しては明らかにされていない。本研究では、XDBBMの構造解析と骨髓腔内へのXDBBM及びカルシウム欠損アパタイト(Ca-d HA)埋入後の組織学的変化を経時的に解析した。XDBBMの解析はX線回折と赤外分光法で定性的に分析した。8週齢オスBALB/cマウス脛骨に1.0mm径の孔を開け、骨髓腔にXDBBMあるいはCa-d HAを埋入した。術後2、4、12週で試料採取・固定後、マイクロX線CT撮影し3次元の構築の解析を行った。その後、試料はH-E染色及びacid phosphatase染色(ACP染色)を行い、さらに、一部の試料は透過型電子顕微鏡による解析を行った。X線回折と赤外分光法の結果、XDBBMは炭酸含有ハイドロキシアパタイトであった。マイクロX線CTと組織学的解析の結果、処置後全ての段階でXDBBM及びCa-d HA周囲に新生骨が見られた。また、ACP陽性多核巨細胞が新生骨及び各補填材に直接接し、刷子縁を有することから破骨細胞であることが確認された。今回の結果から、XDBBMは炭酸含有ハイドロキシアパタイトであり、化学量論的なHAと異なっていることと、破骨細胞により吸収されることが明らかとなり、XDBBMは吸収性骨補填材であることが示唆された。

P2-186

天然アパタイトの生体応用の可能性
 ○見明 康雄¹、三島 弘幸²、下田 信治³ (東歯大 超微構造、²高知学園短大 医療衛生 歯科衛生、³鶴見大 歯 口腔解剖)

【目的】色調の違う天然アパタイトを解析して生体アパタイトとの組成や構造の違いを探求し、新たな歯科材料や硬組織の標準試料を開発するための情報を得ることを目的とした。【方法】天然アパタイトの分析は、EPMAとX線回折装置を用いて成分の定性分析と定量分析を行った。また、ラマン分光分析および大型放射光施設(Spring8)での測定を行った。【結果】EPMAおよびX線回折では、天然アパタイトの断面に多くの空洞ないし他結晶のインクルージョンが観察された。EDSおよびWDSによる分析では、全てのサンプルからFが検出され、Fluorapatiteであることが示された。また他の含有元素としてSi、O、Cl、S、Ca、P、Na、Mn、Mg、Al、K、Fe、Th、Baが検出され、色の違いにより含有元素および元素比が異なっていた。また、インクルージョン結晶としてThSiO₄、CaSO₄、SiO₂、Ca₂MgSi₂O₇、BaSO₄、CaCO₃等が考えられた。ラマン分光分析法でもFluorapatiteであることが示され、リン酸基PO₄³⁻のピーク値は964~967cm⁻¹でありFによるピークシフトと考えられた。大型放射光(Spring8)観察では、結晶の色の違いによりラインプロファイルがかなり異なっていた。【考察】天然アパタイトの色の変化はインクルージョンによると考えられたが、元素が結晶格子中に入っている可能性も否定できない。また大きな単結晶なので、生体石灰化組織の密度、結晶成長や結晶化などの測定のための標準試料として利用できる可能性が示唆された。