

O-1

Smad8はBMPシグナルを抑制的に調節する
 ○片桐 岳信¹、藤本 舞¹、宮本 阿礼¹、古株 彰一郎¹、自見 英治郎²、大澤 賢次¹ (埼玉大 ゲノム 病態生理、²九歯大 分子情報生化)

【目的】活性化されたBMP受容体は、相同性の高い転写因子Smad1、Smad5、Smad8をC末端のリン酸化によって活性化し標的遺伝子の発現を調節する。Smad1/5/8のリン酸化は、ネガティブ・フィードバックによって誘導される抑制型Smad (Smad6とSmad7)によって競合的に阻害される。構成的活性型Smad1/5/8を作製した結果、Smad8はSmad1/5に比べて転写活性が極度に低く、他の生理作用を有する可能性が示唆された。本研究は、Smad8がBMPシグナルの抑制因子として機能することを報告する。

【方法・結果】構成的活性型変異を導入したSmad1またはSmad5はC2C12細胞のALP活性を誘導したが、Smad8はほとんど誘導しなかった。構成的活性型BMP受容体と野生型Smad1を共発現させると強いALP活性を誘導した。一方、Smad8はBMP受容体を抑制し、構成的活性型Smad1の活性も抑制した。Smad6/7はBMP受容体を抑制したが、構成的活性型Smad1は抑制しなかった。C2C12細胞をBMPで刺激すると、Smad6/7に加えSmad8 mRNAが3時間以内に増加した。

【考察】Smad8はSmad1/5と相同性が高く、BMPシグナルを伝達すると考えられてきた。しかし、Smad8は転写活性が低く、Smad1/5によるBMPシグナルを抑制した。また、Smad8の発現は、抑制型Smad6/7と同様にBMPシグナルで誘導された。従って、BMPシグナルで誘導されるSmad8は、BMPシグナルを抑制的に調節する可能性がある。【会員外共同研究者】塚本翔

O-3

コリプレッサー TLE3はHDACを介して骨芽細胞分化を抑制する

○古株 彰一郎^{1,2}、佐藤 毅¹、榎木 祐一郎¹、大久保 正彦¹、片桐 岳信³、依田 哲也¹ (埼玉大 口腔外科、²ハーバード大 歯 発生生物、³埼玉大 ゲノム医学 病態生理)

骨髄の骨芽細胞と脂肪細胞は共通の前駆細胞である骨髄間質細胞から分化するが、その分化調節メカニズムには不明な点が多い。骨粗鬆症や加齢などでは、骨髄における脂肪細胞の分化が亢進し、骨芽細胞分化は抑制され骨量が減少する。最近、コリプレッサーであるTLE3が前脂肪細胞で脂肪細胞分化を促進することが報告された。そこで今回我々はTLE3の骨芽細胞分化に対する作用を検討し、TLE3が骨髄間質細胞の骨芽細胞分化を抑制することを見出したので報告する。免疫染色によりTLE3が骨髄間質細胞の核に強く発現することを確認した。次にTLE3を過剰発現させたところ、骨芽細胞分化が抑制され、脂肪細胞分化が促進された。また、RNA干渉により内在性TLE3をノックダウンした細胞では、骨芽細胞分化が促進され、脂肪細胞分化が抑制された。さらにRunx2の転写活性への影響についてOSE2-luc活性を指標に検討したところ、TLE3はRunx2の過剰発現で誘導したOSE2-luc活性を強力に抑制した。一方で、Histone Deacetylase (HDAC)阻害剤であるTSAの添加により、TLE3によるOSE2-lucの抑制が解除された。以上より、TLE3はHDACを介して骨髄間質細胞の骨芽細胞分化を抑制することが明らかとなった。

O-2

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

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

【目的】レプチンは脂肪細胞で産生される食欲調節ホルモンであり、骨代謝にも影響を及ぼすとされている。我々は、レプチン非作用下のエストロゲン欠乏による骨組織異常を明らかにする目的で、レプチン受容体変異を有するdb/dbマウスに卵巣摘出(OVX)を行い、組織化学的に解析した。

【方法】12週齢の雌性db/dbマウスと野生型(WT)マウスをOVXし、20週齢で大腿骨・脛骨を通常法にてアルデヒド固定した。ALP、TRAPとleptin Rの局在を組織化学にて、また、leptinR、ERαとPPARγ2の発現をRT-PCRにて解析した。

【結果】db/db群では著しい骨梁の減少と脂肪細胞の増加を認めた。ALP陽性骨芽細胞領域はdb/db群で減少し、db/db-OVX群ではさらに減少したが、WT群のOVXによる減少幅より小さかった。leptinRとERαの発現は4群とも同様であり、leptinR陽性反応は骨芽細胞に認められた。PPARγ2の発現はdb/db群とdb/db-OVX群で上昇していた。

【考察】db/dbマウスではOVXを行わなくともALP陽性反応が著しく低下したことが、db/db-OVX群ではALP陽性領域が減少したが、WTマウスにおけるOVX群の減少幅に比べると低いことを考慮すると、レプチンの骨芽細胞に対する作用はエストロゲン欠乏に比べて大きい可能性が推測された。

O-4

PP2A CaはOsterixを介して骨芽細胞分化を調節する。

○岡村 裕彦¹、羽地 達次¹ (徳大院 HBS 口腔組織)

PP2Aは細胞の分化・増殖やアポトーシスに関与するセリン/スレオニンプロテインフォスファターゼである。PP2Aは触媒サブユニット(PP2A Ca)を中心に三量体を形成し、様々な蛋白質の脱リン酸化に関与する。今回我々は、骨芽細胞分化におけるPP2A Caの役割について検討した。【方法】1.分化誘導培地で培養したマウス骨芽細胞MC3T3-E1からサンプルを調整し、PP2A Caの発現と活性を調べた。2. shRNAによりPP2A Caの発現を抑制したMC3T3-E1 (shPP2A)を樹立し、分化・石灰化能を調べ、骨分化マーカーの発現をリアルタイムPCRとウエスタンブロットを用いて解析した。3. Osterixプロモーター活性をルシフェラーゼアッセイを用いて解析した。4. shPP2A細胞にOsterixのsiRNA導入を行い、分化・石灰化能を評価した。【結果と考察】骨芽細胞分化の初期段階でPP2A Caの発現と活性が低下した。shPP2A細胞は分化・石灰化能が亢進し、Osterix、Bone sialoprotein および Osteocalcin等の骨分化マーカーの発現が増加した。shPP2A細胞ではOsterixプロモーター活性が亢進していた。Osterix発現抑制によりshPP2A細胞の分化・石灰化能亢進が抑制された。以上の結果より、PP2A CaはOsterixを介して骨芽細胞の分化・石灰化能を調節する重要な因子であることが分かった。

O-5

骨細胞は interferon- β (IFN- β) を産生し破骨細胞形成を負に制御する

○林田 千代美¹、伊東 順太¹、中谷地 舞²、岡安 麻里²、大山 洋子³、羽毛田 慈之¹、佐藤 卓也¹ (¹明海大 歯 形機成 口腔解剖、²明海大 歯 形機成 歯科矯正、³明海大 歯 病診治 口腔顎顔面外科)

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

O-7

マウス骨端板の septoclast における E-FABP の免疫電顕的局在と食餌ビタミン A・レチノイン酸の影響

○坂東 康彦¹、瀧澤 将太¹、崎山 浩司¹、天野 修¹ (¹明海大 歯 解剖)

【背景】我々はこれまで骨代謝に影響を与える n-3 系長鎖不飽和脂肪酸 (PUFA) やビタミン A およびその誘導体であるレチノイン酸と親和性の高い表皮型脂肪酸結合タンパク (E-FABP) がマウス脛骨骨端板で septoclast に特異的に発現することを示した。今回、免疫電顕法により E-FABP 陽性細胞の超微細構造を明らかにし、さらにビタミン A、レチノイン酸摂取量が E-FABP 陽性細胞に与える影響を調べた。

【方法】実験 1: 4 週齢 (P4w) マウス脛骨頭組織に対し pre-embedding 法により抗 E-FABP 抗体を用いた免疫電顕的観察を行った。実験 2: 1) 抗 E-FABP 抗体と抗レチノイン酸受容体 (PPAR) 抗体の二重染色を行った。2) レチノイン酸を過剰摂取させた P4w、ビタミン A 欠乏食を離乳期より摂取させた P9w マウスに対し抗 E-FABP 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。

【結果】実験 1: E-FABP 陽性細胞は細胞質突起が骨端板横隔に伸び、さらに微絨毛が横隔の基質まで達していた。E-FABP は細胞質基質、ミトコンドリアおよび核に局在していた。実験 2: 1) E-FABP 陽性細胞に PPAR β/δ の局在が認められた。2) レチノイン酸過剰摂取マウス、ビタミン A 欠乏食摂取マウスともに E-FABP 陽性細胞の密度の減少と細胞質突起の欠失、形態不全が認められた。

【考察】septoclast に E-FABP を介する n-3 PUFA やレチノイン酸の代謝経路が存在し、ビタミン A はレチノイン酸を介して septoclast による軟骨内骨化の軟骨横隔吸収にも関与することが示唆された。

O-6

疑似微小重力に対するキンギョ再生ウロコにおける破骨細胞の応答と RANKL 発現変化

○池亀 美華¹、服部 淳彦²、山本 敏男¹、鈴木 信雄³ (¹岡大 院医歯薬 口腔形態、²東医歯大 教養 生物、³金沢大 環日本海域環境研究セ)

魚類のウロコには骨組織と類似した硬組織が存在し、骨組織同様にカルシウム代謝調節ホルモンや、機械的刺激に応答する。2011 年の本学会で、我々は宇宙空間の微小重力環境においてキンギョの再生ウロコの破骨細胞の多核化が亢進することを報告した。破骨細胞の形成、誘導、活性化には、骨芽細胞系細胞が発現する RANKL が重要であることが知られるが、魚類ウロコにおける RANKL 発現についてはほとんど知られていない。そこで、ウロコにおける破骨細胞活性化への RANKL の関与について明らかにするために、特異抗体を作製し、免疫組織化学によりキンギョ再生ウロコにおける RANKL の局在を検出するとともに、3D クリノスタットによる疑似微小重力下でウロコを培養し、RANKL の発現変化を検討した。その結果、RANKL の免疫活性は再生ウロコの溝条中、あるいはその辺縁に沿って局在する単核の紡錘形細胞に認められた。疑似微小重力群では、静置培養した対照群と比較して、破骨細胞の多核化が促進され、RANKL の免疫活性が増加する傾向が見られた。破骨細胞は主に溝条に沿って観察されることから、これらの溝条に沿って局在する RANKL 陽性単核細胞が、破骨細胞形成や活性化に関与していることが示唆された。(共同研究者: 金沢大 環日本海域環境研究セ 山本 樹、富山大 生命科学先端研究セ 遺伝子実験施設 田淵圭章、JAXA 矢野幸子)

O-8

Curdlan-dectin-1 を介した新たな破骨細胞分化の制御機構

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

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

O-9

破骨細胞分化におけるアセチルコリンエステラーゼの関与

○佐藤 毅¹、榎木 祐一郎¹、古株 彰一郎¹、大久保 正彦¹、白井 通彦²、依田 哲也¹ (埼玉大 医 口外、²九歯大 歯 歯周病)

高齢化社会において増加している認知症のうちアルツハイマー病は、進行すると骨密度の低下を認める。治療薬のドネペジル (DPZ) などある種のアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤 (AChEI) を服用していると、骨折のリスクが有意に低いことが報告された。最近の研究から AChE およびブチリルコリンエステラーゼ (BChE) を阻害する AChEI であるピリドスチグミンは、骨において ACh を蓄積させて破骨細胞にアポトーシスを起こすことが明らかとなった。しかしながら BChE を阻害しない DPZ については検討されていないため、今回 DPZ が骨関連細胞に与える影響を検討した。試薬として AChE および DPZ を、骨芽細胞として MC3T3-E1、破骨細胞としてマウス骨髄細胞を用いて増殖・分化について検討した。増殖抑制作用のない DPZ は骨芽細胞分化に影響を与えなかった。一方、DPZ は骨髄細胞に増殖促進作用・破骨細胞に分化抑制作用を示し、破骨細胞にアポトーシスは認められなかった。また、DPZ は破骨細胞において Id2 発現を上昇させ、laminin-1 beta の発現を低下させた。さらに破骨細胞分化過程において AChE および laminin-1 beta の発現が上昇しており、AChE を破骨細胞に作用させると分化が促進された。AChEI は骨組織において ACh の蓄積ではなく AChE の阻害により、破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

O-10

周期的圧縮刺激は PGE₂ の産生を介して破骨細胞分化を誘導する

○荒木 大介¹、原 哲也¹、伊志嶺 知沙¹、皆木 省吾¹ (岡大 院医歯薬 咬合・有床義歯補綴)

【目的】 骨のリモデリングの調節には機械的刺激が重要であることが知られているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。近年、骨免疫学の見地から骨周囲の細胞からの産生因子の重要性が報告されている。本研究では、ラット歯肉線維芽細胞 (rGF) を用いて、機械的刺激による破骨細胞分化関連因子の産生変化とその産生因子による破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響を調査した。【方法】 Wistar 系雄性的ラットの口蓋粘膜から単離した rGF に、培養細胞伸展システム (STB-140, STREX) を用いて周期的圧縮刺激 (CCF) を負荷した。負荷後から様々な時間経過後に RNA と培養上清を回収し、real time PCR 法にて破骨細胞分化関連因子の遺伝子発現と ELISA 法にて培養上清中の PGE₂ 産生を解析した。また、可溶性 RANKL と CCF を負荷した rGF の培養上清を 10% あるいは 30% (vol/vol) 添加して RAW264.7 細胞を 6 日間培養した後、TRAP 陽性細胞を観察した。【結果】 CCF によって rGF における COX-2 と IL-6 の遺伝子発現が刺激され、両遺伝子とも負荷後 1 時間以内に増加した。また、PGE₂ 産生も CCF によって約 10 倍増を示した。RAW264.7 細胞は、CCF を負荷した培養上清を添加することによって、TRAP 陽性細胞数が顕著に増加した。【考察】 高濃度の PGE₂ は炎症初期の骨破壊に関与すると報告されており、CCF によって産生された PGE₂ が破骨細胞分化を促進する可能性が示唆された。

O-11

RANKL 遺伝子欠損マウスにおける破骨細胞様細胞の微細構造学的解析

○宮本 幸奈^{1,2}、長谷川 智香²、佐々木 宗輝²、織田 公光³、宇田川 信之⁴、山本 恒之²、網塚 憲生² (¹北大 歯 6 年、²北大 院歯 硬組織発生生物、³新大 歯 口腔生化、⁴松歯大 歯 口腔生化)

【目的】 我々は RANKL^{-/-}マウスにマクロファージと破骨細胞の共通の性質を持ち、石灰化基質を取り込む大型細胞が存在すること、また、活性型骨芽細胞が多数存在することを報告してきた。そこで今回は、その微細構造を明らかにする目的で透過型電子顕微鏡にて破骨細胞様大型細胞を観察した。【材料と方法】 生後 10 週齢の RANKL^{-/-}マウスと野生型マウスの大腿骨・脛骨をアルデヒド固定し、パラフィンと epoxy 樹脂包埋した。H-E 染色と TRAP などの組織化学を行い、透過型電子顕微鏡にて微細構造観察を行った。【結果および考察】 RANKL^{-/-}マウスに存在する破骨細胞様大型細胞は TRAP 陽性示さず、骨組織内に散在して観察された。透過型電子顕微鏡観察では、これらの細胞は波状縁を持たず、細胞内小器官に乏しい明帯様の構造で主に軟骨基質を取り囲んでいた。取り込まれた軟骨基質はコラーゲン線維が露出し崩壊像を示していた。このような破骨細胞様大型細胞は、辺縁クロマチンの発達した核を持ち、細胞質には多数のミトコンドリアと大小の小胞が認められた。以上のことから、RANKL^{-/-}マウスに存在する破骨細胞様大型細胞は、軟骨基質を取り込む機能を有し、微細構造学的に破骨細胞に類似した形態を持つことが示唆された。

O-12

破骨細胞の骨吸収活性を制御する Wnt5a-Ror2 シグナルによる Rho 活性化

○上原 俊介¹、宇田川 信之¹、高橋 直之²、小林 泰浩² (松歯大 口腔生化、²松歯大 総歯研)

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

O-13

三次元立体構築画像を用いた切歯管の構造に関する解剖学的研究

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

【目的】上顎前歯部欠損の補綴治療では、インプラント補綴が選択肢としてあるが、切歯窩の拡張を伴う骨吸収により最適なインプラント埋入が困難になる場合がある。我々の講座ではマイクロCTで撮影したデータから三次元立体構築画像を作成し、上顎骨白歯部の三次元的な骨形態計測を行い報告してきたが、上顎前歯部特に切歯管周囲の解剖学的研究は少なく不明な点が残されている。そこで、本研究では上顎前歯部および切歯管周囲の骨内部構造の形態を把握するため骨形態計測を行い、インプラント埋入に必要と思われる基礎的データの取得を試みた。【試料と方法】試料は年齢および性別のわかる東京慈恵会医科大学解剖学講座所蔵の日本人頭蓋骨20体を用いた。これらをマイクロCTにて撮像を行った。得られたスライスデータから三次元立体構築ソフトを用いて、内部構造の観察および骨形態計測を行った。【結果と考察】切歯窩の形態を3つの型に分類しそれぞれの計測項目を設定した。すべての距離、厚径の計測項目に有意差は無く、形態分類ごとに大きな傾向はなかった。しかし、インプラント埋入時にその成否を大きく左右する埋入角度については最高71.110°、最小44.039°と個体差があることが明らかとなった。さらに上顎骨では歯牙の脱落により頬側からの吸収が起り、その形態が大きく変化するため、インプラント手術ではCTによる事前の診査、診断の重要性が示唆された。

O-14

脈管構造の組織立体構築と Virtual Reality 観察

○鳥津 徳人¹、田谷 雄二¹、添野 雄一¹、白子 要一¹、藤田 和也¹、佐藤 かつお¹、青葉 孝昭¹ (日歯大 生命歯 病理)

生体諸臓器・組織の立体観察に向けては、多種の画像解析法が開発されているが、細胞レベルでの空間分解能を保持した上で、臓器・組織の内部構造を自在に直視できることが望まれている。我々はこれまでに、連続薄切標本の多重免疫標識とバーチャルスライド(VS)を併用した組織立体構築法を確立してきた。今回の報告では、3D情報をインターラクティブに動的観察できる画像処理機能(NVS ExFact VR)を併用して、脈管性臓器例としてヒト腎小体と尿管構造およびマウス舌組織の血管・リンパ管網を供覧する。観察対象の組織実質と脈管間質を免疫組織化学(およびPAS染色)により標識し、組織画像はVS装置(空間分解能0.46μm/pix.)によりデジタル記録した。広領域・高画質のVS画像を用いた組織立体構築では、画素容量が飛躍的に増大するなかで、通常のviewerソフトによる3D観察では画像操作の遅れなど不便さを感じることも多い。今回の3D観察法(Virtual Reality)の特質として、高精細の微小脈管構造の画質を保持した上で、観察方位や拡大率を即時に変えられる。さらに、3D情報の高圧縮機能を活かしてWeb配信(QuickTime)も可能となっており(<http://www.ndu.ac.jp/~path-home/>)、研究・教育分野での有用性は高いと考えている。共同研究者：上杉憲子(筑波大学腎血管病理)

O-15

3次元CT画像を用いた口腔解剖学教育—副鼻腔容積と歯の関係—

○高橋 常男¹、前田 信吾¹、一條 幹史¹、高橋 雄輔¹、森山 浩志²、熊坂 さつき³、小林 繁⁴ (神歯大院 3次元画像解剖、²昭大 医 解剖、³駒澤大 医療健康科学 診療放射線技術科学、⁴九歯大 歯 頭頸部構造解析)

【目的】平成21年度に神歯大解剖実習棟内に、4列マルチスライスCT装置を設置した。本CTによって得られる画像情報を解剖実習時は、献体者の最後の状態を学生に知らせる情報とし、研究時は3次元画像構築を行った物を用いる目的でデータを蓄積し、平成24年度の解剖実習から撮影した画像情報の運用を始めた。解剖体の画像は、固定液注入の前後に於ける画像変化が読影に及ぼす影響を副鼻腔の容積変化と無歯顎、残存歯の関係を検討したので報告する。【方法】最初に全身のCT撮影を1~5mmのスライス厚で行い、画像診断は放射線科医立会いのもとで行った後、副鼻腔の容積、残存歯の確認をDicom Viewer Osilixを用いて行った。【結果及び考察】CT画像の読影精度は、過去の報告より注入後の胸部及び腹部内臓の読影は困難であり、固定液注入後の変化だけでなく、死後の経過による変化も考えられ課題が多かった。固定液注入前後における副鼻腔の容積については、洞容積の減少や増大、個々の解剖体における残存歯の数、副鼻腔の大きさなどの相対的關係について研究における結果と考察を報告する。

O-16

軟骨石灰化不全ラット(CCIラット)における頭蓋底軟骨結合の形態学的解析

○竹内 綾¹、永山 元彦²、葛島 康平¹、渡部 博之¹、江原 道子²、天野 均³、田中 政巳⁴、渡辺 実⁵、田沼 順一²、北井 則行¹ (朝日大 歯 歯科矯正、²朝日大 歯 口腔病理、³昭大 歯 歯科薬理、⁴会津大 短大 食物栄養、⁵聖マリアンナ医大 院 実験動物施設)

【目的】我々は、これまでにSDラット由来の自然発症型軟骨石灰化不全(CCI)ラットが野生型と比較して、全身の低成長と軟骨内骨化不全を示すことを報告してきた。今回、軟骨成長の特微的な形態変化を示した頭蓋底軟骨結合に着目し、CCIラットとSDラットを形態的に比較した。【方法】生後4週齢のCCIラットとSDラット各6匹を4% paraformaldehydeで還流固定後、マイクロCT装置(35kV, 200mA)で頭部を撮影し、得られた画像から3次元解析ソフトで頭蓋底軟骨結合部のMineral Density(MD)値を算出した。マイクロCT撮影後、各頭部矢状断方向のパラフィン切片を作製し、Hematoxylin-Eosin染色、Safranin O/Fast Green染色およびAlcian Blue染色を行った。【結果と考察】マイクロCT画像では、CCIラットの頭蓋底軟骨結合部で著しい軟骨幅の拡大を示した。また、SDラットと比較してCCIラットでは著しく不均衡な軟骨成熟状態を示した。一方、組織学的には、SDラットと比較してCCIラットの蝶形骨間軟骨結合と蝶形後頭軟骨結合は前後幅が長く、軟骨成長板における軟骨細胞の配列の乱れや軟骨基質の分布異常がみられた。以上の所見から、CCIラットの頭蓋底では、他部位と同様に軟骨内骨化不全による低成長を示すと考えられた。

O-17

チンパンジーの棘孔の形態変異

○近藤 信太郎¹、内藤 宗孝²、松野 昌展¹ (1)大 松戸歯 解剖1、²愛院大 歯 歯科放射線)

【目的】棘孔は蝶形骨大翼の脳面で卵円孔の後外側に位置する小孔で、卵円孔と同様に中頭蓋窩と側頭下窩を連絡する。この孔は中硬膜動脈と下顎神経硬膜枝の通路となる。チンパンジー (*Pan troglodytes*) の卵円孔は他の霊長類よりもヒトと類似した形態を呈することを昨年の本学会学術大会で報告した。今回は棘孔の変異をチンパンジーとヒトと比較した。【材料と方法】頭蓋骨を肉眼およびCT画像により観察した。【結果と考察】チンパンジーでは棘孔が存在するもの、棘孔と卵円孔が癒合するもの、棘孔が欠如するものが認められた。ヒトでは卵円孔と棘孔が癒合するものは認められたが、棘孔が欠如するものは見られなかった。中硬膜動脈は棘孔から頭蓋腔に入り、内頭蓋底および頭蓋冠内面の動脈溝に沿って分布する。このため、頭蓋標本において動脈溝を辿っていくと棘孔に達することになる。チンパンジーの頭蓋骨ではヒトに比べて動脈溝の走行が明瞭ではなかったが、動脈溝が棘孔に至ることは確認できた。棘孔が欠如した個体では動脈溝は卵円孔に到達したことから、卵円孔が中硬膜動脈の通路と考えられた。チンパンジーの卵円孔と棘孔は外頭蓋底の方が内頭蓋底より近接していた。ヒトでは内・外頭蓋底いずれにおいてもチンパンジーより2つの孔は離れていた。以上の結果から、卵円孔と棘孔が近接していることがチンパンジーにおける棘孔の変異の要因と考えられる。

O-19

マウス上顎骨チタンインプラント植立モデルを用いた即時埋入と遅延埋入における骨・インプラント界面の治癒の違いについて

○渡辺 泰典¹、斎藤 浩太郎¹、大島 勇人¹ (1)新大 院医歯 硬組織形態)

【目的】今回我々は、マウスを用いた上顎骨チタンインプラント植立モデルを確立し、遅延埋入と即時埋入におけるインプラント周囲歯槽骨の骨吸収リスクと骨質を評価すると共にインプラント植立後のオッセオインテグレーション確立過程を検索した。【方法】生後4週齢マウス上顎右側第一臼歯 (M1) を抜去後、ドリルを用いて窩洞を形成し、インプラントを埋入した (即時埋入群)。また、2週齢マウス M1 を抜去後、4週間抜歯窩の治癒を待ち、同様に窩洞を形成し、インプラントを植立した (遅延埋入群)。0~28日後にアルデヒド系固定液で灌流固定し、抗オステオポンチン (Opn) 抗体および抗 Ki67 抗体を用いた免疫染色、TUNEL 染色、TRAP 酵素組織化学を施した。未脱灰標本については、EPMA を用いて定量解析と元素解析を行った。【結果および考察】即時埋入群・遅延埋入群共に術後28日までにオッセオインテグレーションが確立されたが、両群の間で骨・インプラント接触面積および歯頸側の骨吸収、並びに石灰化度に有意な相違はなかった。インプラント植立初期では、即時埋入群の方で肉芽形成および骨形成が進行していた。以上より、本実験はマウス顎骨におけるインプラント植立モデルの確立に成功し、経時的な、かつ細胞レベルの骨・インプラント界面の治癒過程が、即時埋入群で骨形成が早期に惹起されるものの、即時埋入群と遅延埋入群との間でおおきな差がないことが明らかになった。

O-18

成長期におけるソフトフード摂取がラット顎関節に与える影響

○加藤 剛士^{1,2,3}、高橋 茂²、上北 広樹¹、土門 卓文² (1)北大 院歯 リハビリ補綴、²北大 院歯 口腔機能解剖、³札幌北検病院)

【目的】本研究では、成長期ラットにソフトフードを継続的に摂取させた時、顎関節にどのような影響が及ぶのかを形態学的に明らかにすることを目的とした。【方法】Wistar 系雄性ラット24匹を用い、21日齢で離乳させた。離乳後、液状食 (実験群) あるいは固形食 (対照群) を与え、1~8週間飼育した。飼育期間が終了したラットを4%パラホルムアルデヒド溶液にて還流固定後、頭部を摘出し10% EDTA 溶液で脱灰した。以後通法に従って顎関節部を含む前頭断連続切片を作製した。切片には HE 染色を施し、組織学的に観察するとともに顎関節部の3次元組織計量を行った。また一部の切片には BrdU 免疫染色を施し、顎関節部の細胞増殖活性を測定した。【結果と考察】実験群4週目の顎関節部軟骨の肥大細胞層は対照群よりも薄く、特に下顎窩において顕著であった。また8週において、実験群の下顎頭の幅径や長径、下顎窩相当部の頬骨突起の幅径や高径は対照群に比べて小さかった。BrdU 免疫染色では実験群の下顎頭 (1, 4週) や下顎窩 (4週) の増殖層細胞の陽性率が対照群より低下した。以上の結果から成長期におけるソフトフード摂取はラット顎関節の成長を阻害することが明らかとなり、これには増殖層細胞の増殖活性低下が関連していると考えられた。

O-20

咬合負荷が抜歯即時埋入チタンインプラント周囲の骨組織に与える影響について

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

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

O-21

骨芽細胞の分化にジルコニアの表面性状が及ぼす影響

○谷口 祐介^{1,2}、城戸 寛史¹、山崎 純² (福歯大 口腔インプラント、²福歯大 細胞分子生物)

【目的】チタン製インプラントにおいて表面の粗面化が骨結合の強化をもたらすことが明らかとなっている。しかし、ジルコニアセラミクスを粗面化によって同様の効果を期待できるかは不明である。そこで本研究ではジルコニアの粗面形状が骨芽細胞様細胞(MC3T3-E1)の形態、増殖、分化、石灰化に与える影響を明らかにすることを目的とした。【方法および結果】機械研磨(研磨 Zr) (Sa: 0.185 μm)あるいはファイバーレーザー処理した(粗面 Zr) (Sa: 1.75 μm) イットリア添加正方晶ジルコニアプレート(10 mm×10 mm)の上に MC3T3-E1 を播種し、10% FBS 添加 α-MEM を用いて培養した。走査型電子顕微鏡と光学顕微鏡による形態観察並びに WST アッセイによる細胞増殖の評価をした。その結果、播種後 6 時間後の粗面 Zr 上の細胞は研磨 Zr 上よりも伸展の程度が小さかった。7 日目以降で粗面 Zr 上の細胞増殖は滑面 Zr 上よりも有意に亢進していた。次に、MC3T3-E1 を分化誘導させる条件下で、分化関連遺伝子の mRNA 量とアルカリホスファターゼ(ALP)活性とアリザリンレッド(AZ)染色を比較した。誘導 14 日目のオステオカルシン発現量と誘導 7 日目の ALP 活性は研磨 Zr よりも粗面 Zr の方が有意に増加していた。誘導 14 日後の AZ 染色によって、粗面 Zr では研磨 Zr よりも高い石灰化像が認められた。【結論】ジルコニアの粗面化が MC3T3-E1 の形態に影響を与え、増殖能、ALP 活性並びに石灰化を促進することが示唆された。

O-23

ラット骨髄由来細胞の増殖・分化における炭酸含有アパタイトの焼結温度依存的影響

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

【目的】我々は新しい骨補填材として、物性が骨アパタイトに類似する炭酸含有アパタイト(CA)を開発した。そして CA が焼結水酸化アパタイト(HA)やβ-リン酸三カルシウム(β-TCP)よりも破骨細胞性吸収が迅速であることを示してきた。しかしながら CA の細胞特性については詳細な解析を行っていなかった。そこで種々の焼結温度にて CA を仮焼あるいは焼結し、ラット骨髄由来細胞の応答特性を検討した。

【方法】ラット骨髄由来間質細胞(rBMSC)あるいは骨髄懸濁液を調整して実験に用いた。まず 3 種の異なる温度(400、550、700℃)で焼結した CA を用いて rBMSC を培養し(CA400、CA550、CA700 群)増殖と接着を検討した。また骨髄懸濁液を播種し活性型ビタミン D₃ を添加して混合培養を行い骨芽細胞、破骨細胞分化について検討した。同様に HA 群、β-TCP 群を作成し、無コーティングの培養器(NC 群)とともに比較対象とした。

【結果および考察】CA は HA、β-TCP に比べ細胞の初期接着を阻害せず細胞増殖を促進しその効果は CA400 群が最も高かった。骨芽細胞への分化ではアルカリホスファターゼ活性は HA 群に次いで CA700 群が高かったが石灰化および破骨細胞の出現率は CA400 群が優れていた。400℃仮焼 CA は強度の点で 700℃焼結 CA に劣るが、両者の混合材を用いてそれぞれの利点が発揮されるかどうかを今後の検討課題としたい。

O-22

絹フィブロインスポンジ体の初期骨誘導能について

○内田 僚一郎¹、木場 秀夫²、Bhawal Ujjal³、荒井 清司⁴、久保山 昇⁵、西山 典宏¹ (日大 松戸歯 歯科生体材料、²日大 松戸歯 口腔病理、³日大 松戸歯 生化学・分子生物、⁴日大 松戸歯 小児歯、⁵日大 松戸歯)

【目的】先に我々は骨補填材料として水系絹フィブロインスポンジ体(水系)をウサギ大腿骨の骨欠損部に埋植した結果、埋植後 4 週で新生骨が形成され、溶媒系絹フィブロインスポンジ体(溶媒系)に比べ新生骨再生能が高いことを明らかにした。本研究では絹フィブロインスポンジ体の埋植初期における組織の骨形成量の測定及び免疫組織化学染色を行い、骨形成に関与する遺伝子の発現の様相を検討した。【方法】ウサギの大腿骨上顆に骨欠損を作製し、絹フィブロインスポンジ体を埋植した。動物は 1 群 3 頭とし、第 1 群は穴だけの群(対照群)、第 2 群は水系、第 3 群は溶媒系をそれぞれ埋植した。埋植後 1 週と 2 週の大腿骨を摘出し μCT を用いて骨欠損埋植部の骨塩量と骨体積率の測定を行った。また、骨形成に関与する特異的なマーカーの発現を免疫組織化学染色法で検討した。【結果】μCT を用いて測定した骨塩量と骨体積率は水系の方が溶媒系よりも高い値を示し、同様に 1 週より 2 週目で高い値を示した。また、免疫組織化学染色では骨形成過程におけるマーカーの発現は溶媒系と比較して水系で多く観察され、1 週よりも 2 週目で顕著に観察された。【結論】水系絹フィブロインスポンジ体は初期の骨誘導形成へ関与することが示唆された。

O-24

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

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

【背景】口腔 *Veillonella* は、口腔バイオフィームの形成初期から存在し、それを構成する主たる早期定着菌として報告されている。現在、*V. atypica*、*V. denticariosi*、*V. dispar*、*V. parvula*、*V. rogosae*、*V. tobetsuensis* が知られている。しかし、口腔 *Veillonella* が、口腔バイオフィーム形成に及ぼす詳細なメカニズムや菌体間情報伝達機構等の解明は未だに進んでいない。

【目的】*V. parvula* 培養上清が、*Streptococcus sanguinis* 及び *V. parvula* のバイオフィーム形成に及ぼす影響を明らかにする。

【材料と方法】バイオフィームの形成にはワイヤー法を用いた。事前に *S. sanguinis* のバイオフィームを形成させたワイヤーを、*V. parvula* 培養上清入り試験管に挿入し、嫌気条件下で培養後、*S. sanguinis* によるバイオフィーム形成量を解析した。また、同培養上清と *V. parvula* 懸濁液の混合液に、同ワイヤーを挿入したバイオフィームの形成量も解析した。培養後、全 DNA を抽出し、定量的 real-time PCR により、ワイヤー上に形成されたバイオフィームの構成菌種を定量した。【結果と考察】*V. parvula* 培養上清は、*S. sanguinis* のバイオフィーム形成を抑制した。しかし、同培養上清と共に *V. parvula* 菌体が存在した場合は、その形成を促進した。これらの結果は、*V. parvula* 培養上清中におけるバイオフィーム形成抑制・促進因子、菌体間情報伝達物質の存在、また、これらの変化等を示唆するものと考えている。

O-25

口腔アクチノバクテリアは硝酸依存的に *P. gingivalis* を殺す

○南部 隆之¹、真下 千穂¹、山根 一芳¹、山中 武志¹、福島 久典¹ (大歯大 歯 細菌)

次世代シーケンズ技術の急速な発展により、歯周組織健康者および歯周病患者における歯肉縁下菌叢の膨大な情報が蓄積しつつある。我々は、これらのデータより口腔アクチノバクテリアである *Actinomyces* と *Rothia* が健康者の菌叢と強い相関があることに着目し、これらの細菌がもつ硝酸還元活性が歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) の増殖に与える影響について検討した。*Actinomyces oris* MG-1 (*Ao*) と *Pg* ATCC33277 を共培養したところ、培養後の *Ao* の CFU は培地中の硝酸濃度に影響を受けなかったが、*Pg* の CFU は硝酸濃度依存的に著しく減少した。またその減少は *Ao* の硝酸還元酵素の欠損により消失した。一方、*Rothia mucilaginosa* DY-18 と *Pg* との共培養実験においても、上と同様に硝酸依存的に *Pg* の CFU 減少がみられた。また、培養系に一酸化窒素スカベンジャーを加えることでこの CFU の減少が抑圧されたことから、硝酸還元により生じた一酸化窒素が *Pg* の殺菌に関与していると結論した。

O-26

酪酸に依存した *Actinomyces naeslundii* のバイオフィルム形成を阻害する物質の検討

○荒井 俊明^{1,2}、落合 邦康³、毛利 彰太⁴、佐伯 洋二⁴、泉福 英信¹ (感染研 細1部 第6室、²日大松戸 院松戸歯 顎外、³日大 歯 細菌、⁴ロッテ中央研究所 口腔科学研究室)

【目的】う蝕や歯周病の病原であるバイオフィルム形成を抑制することは、口腔内の疾患を予防するうえで重要である。我々は、歯周病原性細菌の代謝産物である酪酸が *Actinomyces naeslundii* のバイオフィルム形成を促進することを明らかにしてきた。本研究では、酪酸に依存した *A. naeslundii* のバイオフィルム形成を抑制する物質を開発することを目的として、ミズナ冷水抽出物(以下、サンプル M)のバイオフィルム形成抑制効果について検討を行った。【方法】*A. naeslundii* X600 株に対し TSB 培地に 60 mM 酪酸、0.25% スクロース、1 mg/ml サンプル M を加え、フローセル法を行った。バイオフィルムは LIVE/DEAD 染色した後共焦点レーザー顕微鏡にて観察し、サンプル M の効果を検討した。【結果と考察】酪酸を添加するとバイオフィルム形成が増加し、そのバイオフィルムは生菌に加え死菌が同程度存在していた。生菌に対する死菌の比率は、酪酸を加えない場合よりも加えた場合で高かった。1 mg/ml のサンプル M の存在下で *A. naeslundii* のバイオフィルム形成を観察すると、その形成量が抑制された。またサンプル M は、死菌の付着を抑制することでバイオフィルム形成を抑制することが観察された。以上の結果からサンプル M は、酪酸に依存した *A. naeslundii* のバイオフィルム形成を抑制することが明らかとなった。

O-27

歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の主要膜タンパク質の機能解析

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

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

O-28

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

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

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

O-29

ランチビオティクス耐性に関与する *Streptococcus mutans* の新規二成分制御系因子 NsrRS と LcrRS の同定

○松尾 美樹¹、小松澤 均¹ (鹿大 院医歯 口腔微生物)

【目的】口腔内には 600 種以上の細菌が常在し、共存・拮抗しながら自らの生存領域を確保している。細菌の口腔内常在化に必要な因子の一つとして、他の細菌が産生するバクテリオシン耐性が考えられる。本研究では、口腔内常在菌であり、う蝕原性菌である *Streptococcus mutans* のバクテリオシン耐性機構の解明に当たり、細菌特有の情報伝達系である二成分制御系 (TCS) に着目した。【方法】*S. mutans* の持つ 15 組すべての TCS 欠損株を用いて、種々の細菌の産生するバクテリオシン感受性を網羅的に検証した。さらに、遺伝子発現解析による TCS の標的因子の検証とバクテリオシン産生菌との共培養試験を行った。【結果と考察】ランチビオティクスであるナイシンとヌカシンに各々耐性を担う 2 組の TCS (NsrRS, LcrRS と命名) が明らかになった。遺伝子発現解析から、ナイシン作用時、NsrRS 上流に位置する機能未知の *nsrX* 発現を誘導すること、ヌカシン作用時、LcrRS 上流に位置する ABC トランスポーター *lctFEG* 発現を誘導することが明らかになった。共培養試験の結果、各々の TCS は、ナイシン産生型乳酸菌、ヌカシン産生型ブドウ球菌との共存に重要な役割を果たすことが明らかになった。本研究から、*S. mutans* では、ランチビオティクスであり、構造が異なるナイシンとヌカシンに対し、2 組の TCS が耐性獲得に関与し、バクテリオシン産生細菌との共存に重要であることが示唆された。

O-31

Porphyromonas gingivalis FimA 線毛の遺伝学的および血清学的解析

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

【目的】*Porphyromonas gingivalis* の FimA 線毛は、バイオフィルム形成などに機能する。本線毛の主要構成タンパク質 FimA をコードする *fimA* 遺伝子には I~V および Ib の 6 つの遺伝子型が存在する。本研究では、84 株の *P. gingivalis* の *fimA* 遺伝子の全塩基配列を解析するとともに、FimA 線毛の血清学的解析を行った。さらに、バイオフィルム形成能を検討した。【結果】84 株はいずれか 1 つの遺伝子型に分類され、I、Ib、II、III、IV および V 型はそれぞれ、10、16、29、13、10 および 6 株で存在した。II 型 *fimA* 遺伝子の塩基配列は多様であり、いくつかの亜型に細分化されるようである。次に、I~V 型の代表菌株由来の FimA 線毛で作製した抗血清を用いて、線毛発現を検討した。I および Ib 型は抗 I 型血清に認識された。II 型は抗 II 型血清と強く反応したが、多くは抗 III 型血清とも交差反応した。また、II 型の塩基配列の多様性との関連性はみられなかった。III、IV および V 型は、それぞれ自身の抗血清と強く反応した。唾液コートプレートへのバイオフィルム形成性を検討したところ、I 型は他の型よりも高値を示した。また、いずれの遺伝子型においても、線毛発現量とバイオフィルム形成能との間に、正の相関が認められた。【考察】同じ遺伝子型内でも、遺伝子配列は多様である場合があったが、血清反応性は遺伝子型と一致した。バイオフィルム形成能は、遺伝子型よりも線毛発現量に依存すると考えられる。

O-30

Red-complex 構成細菌間での異なる進化機構

○遠藤 亜希子¹、渡辺 孝康²、丸山 史人^{2,3}、和泉 雄一¹、中川 一路² (¹東医歯大 院医歯 歯周病、²東医歯大 院医歯 細菌感染制御、³東医歯大 院医歯 環境遺伝生態)

歯周病は Polymicrobial disease という複数の微生物の混合感染により引き起こされる疾患の一つであり、*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia* の 3 菌は歯周病原部位から高頻度に検出されることから Red-complex と名付けられている。この 3 菌のゲノムレベルでの情報は限られており、*P. gingivalis* は 3 株、*T. denticola* は 6 株、*T. forsythia* に至っては 1 株の全ゲノム情報しか公開されていない。そこで、*T. forsythia* 臨床分離株 2 株の全ゲノム解析を新規に行い、3 種間でのゲノム構造を比較するとともに、共通・非共通遺伝子の同定と系統解析、一塩基多型 (SNP) 解析を行った。さらに、細菌の獲得免疫機構である Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) に着目することで、外来性 DNA の侵入に対する本菌の防御機能を予測した。*T. denticola*、*T. forsythia* は *P. gingivalis* とは対照的にゲノム構造は安定しており、ゲノム再構成に関与すると考えられる可動性遺伝子の数も少なかった。また、SNP 解析と CRISPR 解析の結果、選択がかかる遺伝子の種類や排除対象となる外来因子が異なっていることがわかった。さらに、これらが歯周ポケットでどのように共生しているのかが見えてきたので、この知見について紹介したい。

O-32

Identification of integrin $\alpha 3$ as a molecular marker of cells undergoing epithelial mesenchymal transition and of cancer cells with aggressive phenotypes

○齋藤 正夫¹ (山梨大 院医工 生化)

The epithelial mesenchymal transition (EMT) is a crucial event in wound healing, tissue repair, and cancer progression in adult tissues. Transforming growth factor (TGF)- β induces EMT in mouse epithelial cells. Upon prolonged treatment, TGF- β successively induces myofibroblastic differentiation (EMyT) with increased expression of myofibroblast marker proteins, including smooth muscle α actin and calponin. We recently demonstrated that fibroblast growth factor (FGF)-2 prevented EMyT induced by TGF- β , and transdifferentiated the cells to those with much more aggressive characteristics (enhanced EMT). To identify the molecular markers specifically expressed in cells undergoing enhanced EMT induced by the combination of TGF- β and FGF-2, we performed a microarray-based analysis and found that integrin $\alpha 3$ (ITGA3) and Ret were upregulated. Intriguingly, ITGA3 was also overexpressed in cancer cells with aggressive phenotypes and its expression was downregulated by U0126, a MEK 1/2 inhibitor. Therefore ITGA3 is a potential marker protein for cells undergoing enhanced EMT and for cancer cells with aggressive phenotypes.

O-33

頭頸部扁平上皮癌における Dkk-3 の免疫組織化学的検討

○藤井 昌江¹、伊藤 聡¹、于 湊¹、武部 祐一郎¹、河合 穂高¹、辻極 秀次¹、長塚 仁¹ (1)岡大 院医歯薬 口腔病理)

【緒言】 Dkk-3 は癌抑制遺伝子として機能するとされる。しかし、我々は頭頸部扁平上皮癌 (HNSCC) において、Dkk-3 はリンパ節転移を促進する可能性を示唆した。そこで本研究では、HNSCC および上皮異形成における、Dkk-3 の発現と局在を免疫組織化学的に観察し、その役割について検討した。

【方法】 HNSCC 組織 90 症例 (高分化 53 例、中-低分化 37 例)、正常口腔粘膜上皮 20 例、軽度上皮異形成 19 例、中等度-高度上皮異形成 15 例を用い、Dkk-3 と関連分子の β -catenin の局在について評価した。

【結果】 Dkk-3 は、正常上皮では傍基底細胞層から棘細胞層の細胞膜が陽性で、上皮異形成では、細胞膜陽性の領域が中間層にまで増加した。上皮内癌では細胞質が陽性であり、浸潤癌では、癌巣の基底細胞様細胞から棘細胞様細胞の細胞膜および細胞質が陽性であった。HNSCC における Dkk-3 陽性例は 84.4% (76/90 例)、陰性例は 15.6% (14/90 例) であった。 β -catenin は Dkk-3 と同様の局在を示した。

【考察・まとめ】 Dkk-3 の局在変化は、正常粘膜上皮から上皮異形成および癌において連続的に認められた。正常粘膜上皮では細胞膜陽性であったが、上皮異形成や癌では細胞質陽性へと変化した。本研究の結果から Dkk-3 が発癌に関わる作用を有する可能性が考えられた。

O-35

扁平上皮癌細胞における GLUT1 を介した EGFR の発現制御

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

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

O-34

舌癌および癌周囲筋線維に発現する HMGB1 の役割

○瀧澤 将太¹、崎山 浩司¹、井上 勝元²、坂東 康彦¹、坂下 英明²、天野 修¹ (1)明海大 歯 形態機能成育 解剖、2)明海大 歯 口腔顎顔面外科)

【目的】 High Mobility Group Box 1 (HMGB1) は、癌の浸潤・転移を促進することが示唆されている。しかし、口腔癌における癌およびその周囲組織に関する詳細な報告はない。そこで舌癌および周囲筋組織の HMGB1 とその受容体である Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) の局在について検索した。【方法】 C3H/HeJ ノードマウスを用い、1 週間に 1 度のペースで計 4 回、舌尖に SCC7 癌細胞を注入した癌細胞注入群、コントロールとして DMEM 培養液を注入した培養液注入群、何も刺入しない無刺激群とそれぞれ設定した。観察部位は舌前方、中央の 2 部位とし抗 HMGB1 抗体、抗 RAGE 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。また、レーザーマイクロダイセクションにて各部位の試料を採取し、それぞれの mRNA 量を LightCycler を用いて測定した。【結果および考察】 癌細胞注入群において、舌前方から中央部にかけて舌癌の定着を H-E 染色像にて確認した。HMGB1 および RAGE の免疫組織化学染色像では、舌癌部、癌の周囲の筋線維だけでなく離れた部位の筋線維にも強く発現した。また、mRNA の発現量においても免疫染色と同様の強い発現が確認された。今回の結果から、HMGB1 は RAGE を介して細胞密度の高い骨格筋組織に間隙を作り、癌の浸潤の促進に関与していることが示唆された。

O-36

マウス歯胚形成過程における integral membrane protein 2a (itm2a) の発現様式

○木原 慎子^{1,2}、清島 保¹、永田 健吾¹、和田 裕子¹、藤原 弘明¹、長谷川 佳那^{1,3}、染谷 祐孝^{1,4}、高橋 一郎²、坂井 英隆¹ (1)九大 歯 口腔病理、2)九大 歯 歯科矯正、3)九大 歯 歯科保存、4)九大 歯 口腔機能修復)

【目的】 itm2a は胎生 10.5 日齢 (E10.5) と E12 の下顎で差別的に発現する因子として当教室では見出された。過去に筋肉、軟骨、骨や象牙芽細胞に発現を認めた報告がある。本発表では itm2a の歯胚形成過程における発現様式を検索した。【材料と方法】 Balb/c マウス E10.5~生後 5 日齢 (P5) の下顎第一臼歯の itm2a mRNA 発現様式を *in situ* hybridization、蛋白発現様式を免疫染色にて観察した。また培養細胞における細胞内局在を観察した。【結果と考察】 itm2a mRNA は E10.5-E12 下顎の外胚葉性間葉組織に発現を認めたが、歯胚形成相当部の口腔粘膜上皮やその直下の間葉細胞や蕾状期歯胚にシグナルはみられなかった。帽状期では内外エナメル上皮とエナメルノットに発現が認められた。鐘状期前期には内エナメル上皮とサービカルループ部に発現していた。鐘状期後期では、主に内エナメル上皮に発現が認められた。さらに内エナメル上皮が分化したエナメル芽細胞にも発現が認められた。また象牙芽細胞にも発現していた。歯胚以外では舌筋、頬筋などの筋肉、軟骨に発現がみられた。蛋白も mRNA 発現様式とほぼ同様であった。マウス歯原性上皮細胞を用いて細胞内局在を観察したところ、itm2a 蛋白は細胞質に顆粒状に確認された。これらの結果から、itm2a は歯胚形成過程における細胞の分化や基質形成への関与が示唆された。

O-37

無血清培地でのヒト歯髄細胞スフェロイドの特徴：
幹細胞の分布および神経・石灰化分化能
○肖 黎¹、筒井 健機¹（¹日歯大 生命歯 薬理）

スフェロイド培養は生体組織の分化、形態形成およびホメオスタシスを研究するために重要な培養法である。本研究では、Serum ReplacementTM(SR)を含有する無血清培地を用いて、ヒト歯髄細胞よりスフェロイドを形成し、そのスフェロイドの幹細胞動態、微小環境、細胞分布及び多分化能を調べた。細胞追跡法で細胞動態を検討したところ、スフェロイド中心部の細胞は長期間にわたって分裂しないことがわかった。スフェロイド中に低酸素状態が存在するにもかかわらず、大量の細胞死は観察されなかった。免疫染色法と qRT-PCR 法で解析したところ、STRO-1 と CD146 陽性の幹細胞がスフェロイドの中心部に存在し、幹細胞マーカーである NANOG, TP63 と CD44 の遺伝子発現は上昇した。スフェロイドを無血清培地中に 2 週間以上培養し続けると、HuC/D と P75 陽性の神経系細胞が出現し、神経細胞マーカーである CDH2, NFM, TUBB3 と CD24 の発現が上昇した。石灰化分化誘導開始 2 週間後、石灰化物がスフェロイド中、特に中心部の細胞に沈着した。また、スフェロイドの石灰化能が単層培養歯髄細胞より有意に高かったことが、アリザリンレッド染色定量法で分かった。無血清培地を用いて形成された歯髄細胞スフェロイドは神経や骨等の分化・発生の解析に有用なツールとして広く応用できる可能性がある。

O-39

マウス歯胚発生過程におけるエピジェネティクス制御機構の解明
○吉岡 広陽¹、南崎 朋子¹、吉子 裕二¹（¹広大院 歯薬保 硬組織代謝生物）

個体発生や細胞分化におけるエピジェネティクス制御機構の重要性が多数報告されているが、歯胚形成過程におけるその役割は不明な点が多い。本研究では DNA メチル化について、マウス歯胚発生過程、とりわけ上皮由来のエナメル芽細胞の発生・分化に注目して解析した。まず、10 日齢のマウス下顎切歯脱灰切片を作成し、ゲノム全体のメチル化レベルの解析を目的として、抗 5-Methylcytosine 抗体による免疫染色を行った。その結果、メチル化レベルは分泌期以降のエナメル芽細胞で上昇すると共に、クロモソームを形成することが確認された。そこで、6 日齢のマウス下顎切歯の切端または根尖からエナメル上皮層のみを分離して RNA を抽出し、新規メチル化酵素 Dnmt3a, Dnmt3b、および維持メチル化酵素 Dnmt1 の遺伝子発現レベルを比較検討した。Dnmt3a, Dnmt3b は発現の差を認めなかったが、Dnmt1 は根尖に高い発現を示した。同様に Dnmt1 の免疫染色では、cervical loop 領域の内エナメル上皮が強染され、分化に伴い低下した。詳細は解析中であるが、DNA メチル化阻害剤を使って発現が変動する遺伝子も見つかっている。以上の結果から、Dnmt1 は内エナメル上皮細胞の未分化状態の維持に関与している可能性が示唆されたが、一方、エナメル芽細胞の分化に伴いメチル化レベルが上昇する機構については未だ不明である。

O-38

歯の上下顎の違いの形成機構
○小澤 幸重¹（¹日大）

背景：演者は歯の形態形成の基本要因は 1) 体制の分化と同様であり、2) 咬頭や歯根は歯のあらゆるところから起こる可能性があり、3) 起点から対称的に分化し、4) 顎の形態分化によって制御される、5) 歯は顎骨弓に放射対称に位置し、分化方向も対称的である、ことを明かにし、昨年の本学会では歯の浮彫像と顎の形態成長、形成空間の分化との関係を報告した。今回は、歯の形態形成の最後の課題である上下顎の歯列の違いの要因を検討する。結果：歯の形態と分化の原則は上下左右の各歯が対称であり、上下顎の歯の分節（咬頭や歯根）は同じ対称的方向に分化する。しかし上下顎の同歯種の歯は異なる形態で適合する。それは発生としては 1) 歯の分節は各歯によって顎との関係が多様になるが、2) 上下顎の対称性により上下顎の噛み合う歯の形態は対称の補完機構により対咬する咬合関係を生む、ということである。対称構造の補完機構は、左右の手の動き、多軸対称の腸の蠕動運動などの機能面の例がある。上下顎は対称であるが故に相互に補完機構を示すのである。歯は今のところ唯一の形態的補完性の例とすることができ、これまでのあまたの学説はこの分析として評価検討されなければならない。

O-40

不可逆性歯髄炎での MMP-3 の抗炎症、組織再生作用のメカニズム解析
○中村 博幸¹（¹金沢大 院医薬保 細胞浸潤）

歯科の臨床でう蝕が歯髄の一部にでも及ぶと壊死が徐々に全体に広がる。現在これを阻止する有効な治療法がないため、他の部位の歯髄が正常であっても全部除去する以外に治療はなく抜歯後は歯牙を失う確率が高まる。超高齢社会において、歯を長持ちさせることは全身の健康維持にもつながるため、歯髄組織の再生が検討されている。以前私達は、歯髄幹細胞が細胞外マトリックス分解酵素の MMP-3 を高発現していることを見出した。さらに、イヌを用いて一部性不可逆性歯髄炎モデルを作製し MMP-3 の効果を検討したところ、術後 14 日においても歯髄組織は壊死することなく組織再生が誘導され、血管、神経、細胞外マトリックスも正常に再生されていた。また、MMP-3 処理により術後 3 日からマクロファージの浸潤が抑制されることを見出したが、MMP-3 の詳細なメカニズムは不明であった。そこで、本研究ではまず炎症を誘導することが知られている SHAP-ヒアルロン酸-プロテオグリカン複合体の歯髄炎組織中での形成について検討した。歯髄炎においてこの複合体形成が観察されるのに対して、MMP-3 処理した歯髄炎組織では観察されなかった。また、in vitro でプロテオグリカンが MMP-3 で直接分解されたことから、MMP-3 によるプロテオグリカンの分解が複合体形成を阻害し消炎に関わると考えられた。以上の結果から、歯髄炎の抜歯症例であっても MMP-3 により歯髄を保存できる可能性が示唆され実用化が期待される。

O-41

マウス由来象牙芽細胞における細胞膜伸展受容 TRP チャンネルと $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchanger の機能連関
○佐藤 正樹¹、津村 麻記¹、Sobhan Ubaidus¹、児玉 紗耶香¹、鷗田 みゆき²、西山 明宏³、望月 浩幸¹、小倉 一宏¹、田崎 雅和¹、澁川 義幸¹ (東歯大 生理、²東歯大 口健・小児歯、³東歯大 オーラル)

象牙芽細胞は象牙質を形成する一方、transient receptor potential (TRP) チャンネルを介して刺激を受容することが知られている。しかし TRP チャンネルと象牙質形成過程との関連については不明な点が多い。そこで TRP チャンネルと象牙質形成に関与する $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 交換体 (NCXs) の機能連関を検索した。実験には継代培養されたマウス象牙芽細胞 (odontoblast lineage cells, OLC) を用いた。標準細胞外液の NaCl を mannitol に置換して、等浸透圧溶液 (310 mOsm/L) と低浸透圧溶液 (150 - 300 mOsm/L) を作成した。OLC の応答はカルシウムイメージング、whole cell patch-clamp、リアルタイム RT-PCR を用いて評価した。OLC の細胞内 Ca^{2+} は低浸透圧溶液により増加し、この増加は TRPV1, TRPV2, TRPV4 チャンネルの阻害薬によって抑制された。またこれら TRP チャンネルの作動薬によって増加した Ca^{2+} は速やかに細胞外へ排出されたが、NCXs の阻害薬は Ca^{2+} の排出を抑制した。OLC は低浸透圧溶液に対して内向き電流を生じたが、TRP チャンネルの阻害薬によって抑制された。低浸透圧培地は TRPV1, TRPV2, TRPV4 チャンネルと NCXs の isoform である NCX2 と NCX3 の mRNA の発現を増加した。象牙芽細胞による細胞膜伸展刺激受容が、反応性象牙質形成を駆動することが示唆された。

O-43

象牙芽細胞における一次繊毛形成遺伝子 IFT88 の生理機能の解析
○河田 かずみ¹、竹田 扇¹ (山梨大 院医工解剖細胞生物)

一次繊毛は細胞外環境を感知するセンサーとして機能することが知られており、象牙芽細胞を含む、体を構成する殆どの細胞に存在する。一次繊毛の形成に関与するものとして、Intraflagellar transport protein (IFT) 88 が知られているが、これは同時に細胞分裂にも関わっていることが近年報告されている。今回、我々は、象牙芽細胞において IFT88 の新たな生理機能の一端を示す知見を得たので報告する。

象牙芽細胞株 KN-3 細胞において *Ift88* をノックダウンし、一次繊毛欠損 KN-3 (sh-*Ift88* KN-3) 細胞を作製した。細胞播種後 1 日の sh-*Ift88* KN-3 細胞において、細胞接着・増殖速度はいずれも低下を示した。これは、KN-3 細胞に PI3K inhibitor の添加時と同様の結果であった。また、細胞播種後 4 日の sh-*Ift88* KN-3 細胞において、象牙芽細胞分化マーカー遺伝子の発現の増加、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の抑制が確認された。また、初代象牙芽細胞の分化の進行と共に一次繊毛を有する細胞数は一旦は上昇を見せるものの、次第に減少することが明らかとなった。

以上の結果から、象牙芽細胞において、IFT88 は増殖期には PI3K シグナルを介して細胞接着・速度を制御し、分化初期には一次繊毛特異的シグナルの受容を介して象牙芽細胞の分化を制御する可能性が強く示唆された。

O-42

ヒトの乳歯における外套象牙質の組織構造と元素組成について
○高橋 正志¹、後藤 真一² (日歯大 新潟短大、²日歯大 新潟生命歯理工)

[目的] ヒトの乳歯における外套象牙質の組織構造と元素組成の部位による違いについて検討した。[材料と方法] 脱落后、ただちに 10% 中性ホルマリンで固定したヒトの乳歯の唇 (頬) 舌側方向の研磨標本を作製し、偏光顕微鏡で観察した。同一標本の研磨面を、0.05 N HCl で 3 分間腐蝕、または 10% NaOCl で 1 時間脱有機し、定法により白金蒸着を施し、S-800 型走査電顕 (日立) で組織構造を観察した。無処理の同様な標本の咬頭部・歯頸部・根尖付近の、外套象牙質・中層象牙質・深層象牙質の元素の重量比率を、JXA-8900 型 EPMA (日本電子) で定量分析した。[結果] 乳歯の外套象牙質を偏光顕微鏡で観察すると、象牙細管は細く、多数に分岐していた。脱有機または酸腐蝕した外套象牙質を走査電顕で観察すると、象牙細管は約 0.5 μm より細く、基質は中層象牙質より多孔質であった。Ca・P の含有率は、外套象牙質と深層象牙質で低く、中層象牙質で高く、C の含有率はその逆の傾向を示した。Na の含有率は、外套象牙質で最高で、深層象牙質で最低であった。F の含有率には有意差が認められなかった。[考察] 外套象牙質形成時の象牙芽細胞は、多数の細い原形質突起を伸ばしていたと考えられる。外套象牙質は中層象牙質よりも石灰化度が低く、有機物の含有量が多いと考えられる。[結論] ヒトの乳歯の外套象牙質・中層象牙質・深層象牙質の間には、組織構造と元素組成において違いが認められた。

O-44

オフィスブリーチング法によるエナメル質表層下脱灰病巣の再石灰化促進効果
○飯塚 純子¹、谷口 紀江²、寺中 敏夫¹、高垣 裕子²、向井 義晴¹ (神歯大 う蝕制御修復、²神歯大 硬組織分子細胞生物)

[目的] エナメル質脱灰病巣表層にはサブミクロンレベルの孔や裂溝が存在し侵入したタンパク質等の有機質が着色の原因になるばかりでなく、再石灰化を妨げる可能性が報告されている。本研究では、オフィスブリーチング処理による侵入有機質の分解ならびに再石灰化誘導への可能性を Transversal Microradiography (TMR) にて検討した。【材料と方法】ウシエナメル質片に乳酸ゲルを用いて表層下脱灰病巣を作製後、安静時唾液に 5 日間浸漬した (lesion 群)。その後 35% 過酸化水素を主成分とするオフィスブリーチング材で処理する群 (bleach 群) と非処理群 (non-bleach 群) に分け、再石灰化溶液に浸漬した。4 週間後、薄片を切り出し、TMR 撮影を行った。専用分析ソフトを用いてミネラルプロファイルを作製、ミネラル密度およびミネラル喪失量を測定した。統計分析は、one-way ANOVA ならびに Tukey の検定を用いた。【結果と考察】bleach 群は、non-bleach 群に比較してミネラル密度の上昇したプロファイルが確認された。ミネラル喪失量は 2 群間に有意差はないものの bleach 群は non-bleach 群に比べ減少する傾向が見られた。本結果からオフィスブリーチングが病巣に侵入している有機質を分解し効果的に再石灰化を誘導する可能性が示唆された。本方法は臨床的に適応拡大可能な方法であり、ブラウンスポット等の着色エナメル質面に適用した場合には審美性の回復も兼ねた再石灰化誘導手段となり得るものと考えられる。

O-45

マウスのエナメル芽細胞の極性維持に関する *Msx2* 遺伝子の機能
 ○中富 満城¹、依田 浩子¹、大島 勇人¹ (新大院医歯 硬組織形態)

【背景】 *Msx2* 遺伝子はホメオボックス型の転写因子をコードし、ヒトの *MSX2* 変異において歯の形成異常が生じる例が報告されている。*Msx2* はエナメル芽細胞と中間層細胞に発現し、*Msx2*^{-/-}マウス (以下変異型) はエナメル質形成不全を呈するが、その詳細な発症機序については不明な点が多い為今回解析を試みた。【材料と方法】 生後の野生型および変異型マウスの切歯と臼歯を用いて、*in situ* hybridization、免疫組織化学染色、透過電顕、RT-PCR、EPMA、マイクロCT等により解析を行った。【結果と考察】 変異型エナメル芽細胞の増殖期・分化期・形成期において細胞の極性化および分化マーカー (*Shh*・*Dspp*)、エナメルタンパク質 (*Amel* 等)、タンパク分解酵素 (*Mmp20*・*Klk4*) の遺伝子発現は比較的正常に認められた。一方移行期から成熟期にかけて中間層細胞は複層化および角化して Hsp25 および複数種の Hard keratin を異所性に発現し、エナメル器内の嚢胞形成とエナメル芽細胞の極性喪失が観察された。しかし切歯と臼歯の嚢胞壁にはエナメルタンパク質の免疫反応陽性細胞の存在と異所性の石灰化物形成が観察されたことから、極性を喪失したエナメル芽細胞は嚢胞壁に残存していると考えられる。以上の結果より *Msx2* はエナメル芽細胞の初期分化と生存には必須の因子ではなく、極性維持機構への関与を通して正常なエナメル質形成に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

O-46

Rho シグナリングのエナメル芽細胞分化における役割
 ○大津 圭史¹、藤原 尚樹¹、原田 英光¹ (岩医大 解剖 発生・再生)

歯の発生においてエナメル芽細胞は分化の開始と同時に細胞の極性と形態を変化させる。以前我々は Rho キナーゼ (ROCK) がエナメル芽細胞の極性、形態形成を制御していることを示した。この結果は、Rho シグナリングの活性化がエナメル芽細胞分化を開始させるための重要なファクターであることを示唆していた。そこで本研究では、遺伝子改変マウスや培養細胞を用い、RhoA の活性化状態とエナメル芽細胞分化との関連について検討を行った。マウス切歯において、活性化型 RhoA、ARHGEF は分化したエナメル芽細胞に強く認められる一方、apical bud で見られなかった。また、エナメル芽細胞で RhoA, ROCK dominant negative form が発現するマウスの切歯では、エナメル芽細胞分化が著しく抑制されており、E-cadherin, Occludin の局在も変化していた。また、培養エナメル上皮細胞において、Rho inhibitor 投与は、幹細胞関連遺伝子の発現を増加させ、Rho activator 投与はそれらを減少させた。さらに Rho の抑制で発現増加が認められる Slug を siRNA にてノックダウンさせると、これら未分化関連因子の遺伝子発現が抑制された。以上の結果から Rho-ROCK シグナルは、エナメル上皮幹細胞からエナメル芽細胞へ分化を開始させるスイッチ因子であることが示唆された。

O-47

MMP20 と KLK4 の相互作用について
 ○山越 康雄¹、唐木田 丈夫¹、大井田 新一郎¹ (鶴見大 歯 分子生化)

エナメル質形成において、エナメリシン (MMP20) 及びカリクレイン 4 (KLK4) は、エナメルタンパク質の分解に関わる主要プロテアーゼである。【目的】 今回我々は、(1) MMP20 の KLK4 及び (2) KLK4 の MMP20 に対する作用を明らかにすることを目的とした。【方法】 生後約 5 ヶ月のブタ永久第二大臼歯より幼若及び成熟エナメル質を採取し、MMP20 (pMMP20) と KLK4 (pKLK4) を分離精製した。(1) MMP20 の KLK4 に対する作用に関しては KLK4 の活性化実験を行った。リコンビナント proKLK4 を用いて、pMMP20 及びリコンビナント・ヒト MMP20 (rhMMP20) を作用させ、反応後の KLK4 の活性をサイモグラフィーにて調べた。さらにエドマン分解にて proKLK4 に対する pMMP20 及び rhMMP20 の作用部位を同定した。(2) KLK4 の MMP20 に対する作用に関しては MMP20 の不活化実験を行った。pMMP20 に対して pKLK4 を pH7.4 及び pH5.5 下で作用させ、時間ごとの活性の変化をサイモグラフィーにて調べた。さらに rhMMP20 に対して pKLK4 及びリコンビナント・ヒト KLK4 (rhKLK4) を作用させ、切断部位をエドマン分解にて同定した。【結果】 (1) proKLK4 は pMMP20 及び rhMMP20 によって Q²⁹-I³⁰ が切断されることにより活性化されることが判明した。(2) pMMP20 及び rhMMP20 は pH7.4 下で pKLK4 によって K¹¹⁸-K¹¹⁹ 及び D¹⁷⁸-S¹⁷⁹ が切断されることで不活化され、pH5.5 下では不活化されなかった。【結論】 MMP20 は KLK4 を活性化し、活性化された KLK4 は MMP20 を不活化する。