

一般演題口演

(A, B, C 会場)

A 会場

A-01～10

B 会場

B-01～13

C 会場

C-01～23

5 月 18 日 (金)	A 会場	9 : 00～ 9 : 50, 14 : 00～14 : 50
	B 会場	9 : 00～10 : 20, 14 : 00～14 : 50
	C 会場	9 : 00～10 : 20, 14 : 00～14 : 50
5 月 19 日 (土)	C 会場	9 : 00～10 : 50

A-01
9:00
3001

中学生の歯肉炎におけるアンケート調査と健診結果の比較 第3報：平成23年度結果

目々澤 雅子

キーワード：若年者における歯肉炎，中学生，歯科健康診断
【目的】現在，若年者における歯肉炎の存在が問題となりつつある。これまで国内の公衆衛生学的検討は少なく，また単年度の検討はあっても連続した数年間にわたる検討はない。われわれは平成19～23年度の5年間にわたり江戸川区内の中学生を対象に歯周病などに対する意識調査をおこない，口腔内診査による健康診断結果と比較・検討を行った。
【対象および方法】これまで第50回総会にて平成19年度の結果を，第53回総会にて20～22年度の結果につき発表を行った。区内の中学校生徒10,932名を対象に歯科・歯周病変に関する質問10項目の意識調査を施行し，さらに口腔内診査として歯並び，ブラーク，歯肉炎につき評価した。アンケート形式の意識調査の結果と口腔内診査結果をつきあわせた後，解析を行った。
【結果および考察】歯肉炎を有する群は23年度では13.7%みられ，そのうち30.8%が自覚を有していた。自覚を有さず，歯肉炎がある群は12%であった。1回の歯磨き時間が3分未満の群で歯肉炎を有していたものは17.0%であり，3分以上の群は13.2%であった。このほかこれまでと同様に歯磨き回数・歯垢付着・慢性頭痛などとの関連についても検討を行った。歯周病の有病率は19年度36%，20年度38%，21年度20%，22年度17%からさらに低下し，のみならず歯肉炎がありつつ自覚のなかった群が21年度25%，22年度14%から減少を認めた。5年間にわたる検討とその結果を元に行なってきた啓蒙活動が江戸川区の中学生に対する歯周病への関心を集め，実際の好結果に結びついたものと考えられる。

A-03
9:20
2402

糖尿病関連歯周炎の診断指標スクリーニングに向けた医科・歯科連携研究

板東 美香

キーワード：糖尿病関連歯周炎，GCF，スクリーニング
【目的】糖尿病（DM）は歯周病のリスクファクターであり，DM関連歯周炎の客観的な診断方法の確立は，その早期発見・治療に重要である。我々はこれまでに，歯肉溝滲出液（GCF）中のカルプロテクチン（CPT）とYKL-40が歯周病の炎症のマーカーとなりうること，グリコアルブミン（GA）がDM関連歯周炎患者のGCF中に多く存在することを報告した。本研究では，DM関連歯周炎の診断指標のスクリーニング法を検討するため，医科の協力を得てDM患者のGCF中のCPT，YKL-40およびGAを測定した。
【材料および方法】徳島通信病院・内科を受診したDM患者のうち，徳島大学病院臨床研究倫理審査委員会の承認の下に同意が得られた被験者についてGCFを採取し，PD，GIおよびBOPを診査した。また，同病院からHbA1cなどのDMに関する情報の提供を受けた。引き続き，GCF中に含まれるCPT，YKL-40およびGAの量をELISAキットにより測定した。
【結果および考察】DM患者のGCF中のCPTとYKL-40量は歯周炎部位で非歯周炎部位と比較して有意に高かった（同一患者内での両部位の比較で約2倍の高値）。一方，DM患者のGA量は以前報告した非DM被験者値と比較して有意に高かった。全サンプルのHbA1cとGAの間には相関関係は認められなかったが，HbA1c ≥ 7 のサンプルではGCF中のGAは高いレベルを示した。本研究によりDM関連歯周炎の総合診断にCPT，YKL-40およびGAのマーカーが有用であることが示唆され，DM関連歯周炎の早期発見・治療のための，医科・歯科連携によるスクリーニングの重要性が示された。

A-02
9:10
2504

重度歯周病患者の歯周治療後の治療反応性と予後に影響を及ぼす因子に関する後ろ向き多施設研究 原井 一雄

キーワード：重度歯周病患者，データベース，因子分析
【目的】重度広汎型歯周病（SGP）患者の歯周基本治療およびSupportive periodontal therapy（SPT）における治療反応性や予後に影響を及ぼす因子分析は，特に国内においては検討が不十分である。本研究は，本学会専門医あるいは認定歯科衛生士の所属する大学および開業施設におけるSGP患者の患者情報および臨床検査値をデータベース化し，後ろ向き症例集積として評価分析し，その治療および管理目標を明らかにすることを目的とした。
【材料および方法】症例集積研究参加11施設を受診し，歯周治療後にSPT中のSGP患者166名（男性70名，女性96名，49.5 $\pm$ 10.6歳，初診時現在歯数24.9 $\pm$ 3.1歯，慢性歯周炎117名，喫煙率20.5%）を対象とした。評価時期は，①初診②SRP前③SRP後④SPT開始時⑤最新SPT時とした。歯の喪失の評価およびSPT時の歯の喪失に影響を及ぼす因子分析は，SPT3年以上経過95名（SPT平均期間5.5 $\pm$ 4.9年）を対象とした。検査データの収集には歯周検査データベースPRP（DSC社）を使用した。
【結果および考察】歯の喪失数（歯の喪失率）は，歯周治療期①～④で1.5 $\pm$ 2.1歯（6.3 $\pm$ 9.2%），SPT期④～⑤で0.3 $\pm$ 0.8歯（2.3 $\pm$ 4.8%）であった。SPT期における喪失歯率は0.06歯/年/患者であった。歯の喪失に有意な影響を及ぼす患者レベルの因子は，歯周治療期ではSRPの方法，歯槽骨吸収・年齢比が挙げられたが，SPT期においては有意な因子は認められなかった。本研究におけるSGP患者のSPT期の喪失歯率は，コンプライアンス良好な重度歯周病患者に関する欧米の長期予後成績（約0.1歯/年/患者，SPT平均期間10年）に匹敵するものと考えられる。

A-04
9:30
2504

歯周治療による関節リウマチへの影響

岡田 萌

キーワード：関節リウマチ，歯周治療，リウマチ因子
【目的】近年，歯周病原菌感染と関節リウマチ（RA）の関連が多く報告されているが，本研究の目的は，歯周治療がRAの臨床状態および生化学検査結果に及ぼす効果を評価することである。
【材料および方法】新潟県立リウマチセンターにてインフォームドコンセントが得られ，口腔衛生指導とスケーリングを含めた非外科的な歯周治療を行ったRA患者26名を対象に，ベースライン時および6週後に歯周組織検査と血清の採取を行った。血清中のIL-6，TNF- α ，抗CCP抗体レベルをELISA法にて測定し，更に，Porphyromonas gingivalisに対する血清Immunoglobulin G（IgG）抗体価を測定した。対照群として，上記の歯周治療を受けていない29名のRA患者についても同様の検査ならびに測定を行った。
【結果および考察】歯周治療群では，GI，PPD，CAL，PCR，BOPにおいて，ベースライン時と比較し6週後に統計学的に有意な改善が認められた。これら，GI，PPD，CAL，PCR，BOPでの経時的変化量はすべて，対照群の変化量と比べ，有意差が認められた。更に，P. gingivalisに対する血清IgG抗体価は歯周治療群で6週後に有意に減少し，非歯周治療群ではIL-6，TNF- α ，MMP-3が増加した。抗P. gingivalis IgG抗体価とリウマチ因子レベルに有意な相関が認められた。以上から，歯周治療は抗P. gingivalis IgG抗体価を減少させ，リウマチ因子レベルに影響を及ぼしている可能性が示唆された。
会員外共同研究者：村澤 章博士，伊藤 聡博士，阿部麻美博士（新潟県立リウマチセンター）

A-05
9:40
2504

抗TNF療法による関節リウマチ患者の歯周組織状態の改善

小林 哲夫

キーワード：関節リウマチ，抗サイトカイン療法，歯周組織
【目的】関節リウマチ（RA）治療において、腫瘍壊死因子（TNF）を標的とした生物学的製剤が現在広く用いられ、RAの臨床的寛解が多く報告されている。そこで今回は、抗TNF療法の歯周組織への影響を検証するために、同療法を受けたRA患者の歯周組織状態ならびに血清サイトカイン濃度における変動を解析した。
【材料および方法】新潟県立リウマチセンターにてインフォームドコンセントが得られ、抗TNF療法（Infliximab, Etanercept, Adalimumab）を受けたRA患者26名を対象に、ベースライン時および6週後に歯周組織検査と血清の採取を行った。血清中のIL-6, TNF- α , 抗CCP抗体レベルをELISA法にて測定した。対照群として、抗TNF療法を受けていない26名のRA患者についても同様の検査ならびに測定を行った。
【結果および考察】抗TNF療法群では、GI, PPD, CAL, BOPにおいて、ベースライン時と比べて6週後に統計学的に有意な改善が認められた。これらのGI, PPD, CAL, BOPでの経時的変化量はすべて、対照群の変化量と比べて有意差が認められた。一方、PCRは2群ともに有意な経時的変化は認められなかった。更に、抗TNF療法群のみ血清TNF- α 濃度の有意な低下が認められた。抗CCP抗体レベルでは群間差が認められ、抗TNF療法群で低下傾向にあった。以上から、抗TNF療法による血清TNF- α 阻害は、歯周組織の炎症症状を改善させる可能性が示唆された。会員外共同研究者：村澤 章博士、伊藤 聡博士、小林大介博士（新潟県立リウマチセンター）

A-07
14:10
2504

各種電動歯ブラシのプラーク除去効果

鈴木 丈一郎

キーワード：電動歯ブラシ，プラーク除去効果，歯周組織
【目的】近年、電動歯ブラシの開発はめざましく、各社特徴のある製品を販売している。当講座でも長年各種電動歯ブラシの研究を行っている。今回は、最近開発された電動歯ブラシと手用歯ブラシのプラーク除去効果と歯周組織の変化を比較検討する。
【材料および方法】被験者は前歯部を中心に4mm以上の歯周ポケットを有し、縁上のスクレーピングが終了した患者40名（男性14名、女性26名、平均年齢56.2歳）を選定し、各10名ずつの4グループに振り分け、3種の電動歯ブラシ群（オムロンヘルスケア社製Mediclean551TM、PHILIPS社製ソニックアフレックスケアーTM、サンスター（株）社製ガム・電動歯ブラシTS-X5TM）と1種の手用歯ブラシ群（サンスター（株）社製プロクトTM）を割り付けた。ブラッシング指導は行わず、各種電動歯ブラシはマニュアルに準じた方法、手用歯ブラシは、患者が従来行っている方法とし、歯磨剤、洗口剤の使用は禁止した。使用した臨床パラメーターは、プロービングデプス（PD）（被験歯のみ）、オレリーのプラークコントロールレコード（PCR）（全歯）、Gingival Bleeding Index（GBI）（被験歯のみ）、Gingival Index（GI）とし、診査時期は術前、2週間後、4週間後とした。
【結果および考察】PD, PCR, GBIともに各種歯ブラシ間に有意差は認められず、すべての歯ブラシにおける術前と4週間後の間には上記項目で有意差が認められた。GIは、音波歯ブラシが電動、手用歯ブラシに比べ効果的である傾向が認められ、以上より歯ブラシ間に差はないが、経時変化とともにPD, PCR, GBIは減少し、GIは音波歯ブラシが有効であることが示唆された。

A-06
14:00
3001

歯周炎患者の食事によるビタミンC摂取量と歯周炎重症度の関係について

谷下 人六

キーワード：ビタミンC摂取量，歯周炎重症度，食事分析
【目的】ビタミンCは免疫力を高め、病原菌に対する抵抗力を強める働きがあり、血漿中のビタミンC濃度と歯周組織の破壊程度には負の相関関係があるという報告がある。そこで、今回我々は歯周炎患者のビタミンC摂取量を調べ、歯周炎重症度との関係について検討した。
【材料および方法】糖尿病のない50歳以上の歯周炎患者176名を被験者とした。喫煙者群は71名、非喫煙者群は105名であった。被験者は初診時に24時間の食事内容についての問診を受け食事分析ソフト「マウスで選ぶ簡単栄養バランス診断」にて栄養分析を行った。ビタミンCの1日あたりの所要量を100mgとし、実際の摂取量を%で示し、喫煙者群、非喫煙者群共に70%未満、70-99%、100%以上の3つのグループに分類した。すべての被験者は歯周組織検査を行い、10枚法にてX線撮影を行った。歯周組織の歯周炎重症度はX線写真で判定し、骨吸収なし-0、歯根の1/3未満の骨吸収-1、1/3以上1/2未満の骨吸収-2、1/2以上の骨吸収-3とし、被験者の歯周炎重症度は、すべての歯の重症度の平均値より、0以上1未満-grade1、1以上2未満-grade2、2以上-grade3とした。ビタミンCの摂取量により分類した3つのグループで、歯周炎重症度が最も重いgrade3と判定された被験者の割合を計算し、グループ間の比較を行った。
【結果および考察】grade3に分類され、歯周炎が重症化している患者の割合は、非喫煙者群ではビタミンC摂取量による差は認められなかったが、喫煙者群では、ビタミンC摂取量が少ないほど歯周炎が重症化している患者の割合が多かった。

A-08
14:20
2198

測定者の訓練および評価に関する歯周ポケット測定訓練用顎模型の有効性

須永 昌代

キーワード：教材開発，歯周ポケット測定，歯学教育
【目的】歯周ポケット検査では、測定者間および同一測定者における測定誤差の問題が存在する。しかし、測定者間の誤差を軽減させるために、患者の歯周ポケットを何度も計測して測定者の検査精度を標準化することは困難である。そこで、歯周ポケット測定訓練用顎模型（500H, PRO：㈱ニッシン製）を用いて、測定者の測定技術の訓練および検査精度の評価を行い、同模型が測定者の訓練に有効か否かを検討した。
【対象および方法】11機関（大学、病院、歯科診療所）、66名の歯科医師、歯科衛生士が、歯周ポケット測定訓練用顎模型を用いて、合計24歯を6歯ずつ4つのブロックに分け、ブロック毎に歯周ポケットの測定、正解値の確認作業を繰り返した。計測結果と歯周ポケット設定値を比較し、正解率（設定値 $\pm$ 1mmを正解とした）を算出して検査精度を評価した。全ての測定終了後に質問紙調査に回答してもらい模型の評価を行った。
【結果および考察】正解率は、歯科医師87.2 $\pm$ 8.6%（平均値 $\pm$ 標準偏差：以下同様）、歯科衛生士：91.2 $\pm$ 6.0%であった。計測の順番による正解率の推移は、1番目に計測したブロックから4番目に計測したブロックの順にそれぞれ、88.4 $\pm$ 8.3%、89.8 $\pm$ 7.9%、91.1 $\pm$ 7.9%、91.6 $\pm$ 8.2%であり、計測を重ねるほど有意に正解率が上昇した。質問紙調査による評価結果では、プロービング技術の練習になる（94%）、プロービング技術の評価に役立つ（89%）等の結果が得られた。これらのことより、本歯周ポケット訓練用顎模型は、歯周ポケット測定の訓練に有効であり、測定者の検査精度の評価にも応用可能であることが示唆された。

A-09
14:30
3103

超高気孔率ハイドロキシアパタイトの顆粒または
ブロック体が歯周骨内欠損に及ぼす臨床効果：12
か月予後

白井 義英

キーワード：超高気孔率ハイドロキシアパタイト、顆粒、ブロッ
ク体

【目的】 超高気孔率ハイドロキシアパタイトの顆粒またはブロッ
ク体を歯周骨内欠損に応用し、その12か月予後について検討し
た。尚、本研究は本学歯学部倫理委員会の承認済みで患者に文書
を用いて十分説明し同意を得た。

【材料および方法】 20名の患者で4mm以上のポケット（PD）
と4mm以上の付着レベル（CAL）、規格エックス写真より3
mm以上の骨欠損深さ（IBD）を示す20部位を2群に分けて、
掻爬した骨内欠損部に無作為に顆粒またはブロック体を填塞した。

【結果】 ベースラインでは顆粒 vs ブロック体は、平均でPDは
7.4mm vs 7.5mm, CALは8.1mm vs 8.4mm, IBDは4.9mm vs
5.0mmで群間差は無かった。12か月予後では、PDは3.9mm vs
4.0mm, CALは4.9mm vs 5.8mm, IBDは2.0mm vs 2.5mmで群
間差は無かった。ベースラインと12か月後の群内比較では、両
群ともに有意な改善がみられた。ただし、3か月、6か月時点で
CALに於いて顆粒群がブロック体群に比較して有意な改善を示
した。

【考察】 超高気孔率ハイドロキシアパタイトの顆粒、ブロック体
ともに12か月予後で歯周骨内欠損に有効に作用した。顆粒の方
が歯周骨内欠損に緊密に填塞できることから、比較的早期に骨伝
導作用が生じ3か月、6か月の早期の時点で付着の獲得において
差が現れたものと思われる。一方ブロック体には予め細胞を気孔
内に進入させて、骨誘導活性を維持した培養骨の開発が望まれる。

B-01
9:00
3101

フォトンカウンティング検出器によって収集され
たデンタルパノラマ画像を用いた歯周病診断

尾川 浩一

キーワード：光子計数、パノラマ画像、エネルギー情報

【目的】 従来のデンタルパノラマ画像のデータ収集では、検出光子の
エネルギーの積分値が計測されるために、透過したX線のエネルギ
ースペクトルの変化など、被写体の物性に関する情報が失われる。一方、
複数のエネルギーウィンドウを用いて計測したデンタルパノラマ画像
は、検出光子のエネルギー情報を活用することができるので、新しい
画像診断の可能性を提供する。われわれは、このエネルギー情報を歯
周病診断に活用する方法を考案した。

【材料および方法】 デンタルパノラマ装置QRmaster-Pを用いて、管
電圧80kV、管電流4mA、収集時間12秒で撮影された3つのエネル
ギーウィンドウ（W1：25-38keV, W2：39-54keV, W3：55-80keV）の
パノラマ画像に対して以下の処理を行った。歯槽骨、歯根膜、象牙質
部分に矩形の関心領域を設定し画素毎に、タフボーンで校正を行った
それぞれのエネルギーウィンドウ内の光子の減衰量の和およびW3/
W2の量を散布図として描いた。次にそれらの関心領域毎に重心の位
置を計算し、歯槽骨と歯根膜部分の重心の距離を算出し、その距離と
歯科医の診断結果との関係を調べた。対象とした患者は6名であり、
これらの患者の36カ所（正常部、歯周病部）に対して解析を実施した。

【結果および考察】 歯周病患者の歯槽骨と歯根膜部分の重心の距離は、
正常例と比較して短くなる傾向があり、距離0.08を判断基準として
用いた場合、歯科医の診断結果と非常に高い相関を示した。このこと
から、エネルギー情報を用いた歯周病診断の可能性が示された。今後
はより多くの患者の様々なパノラマ画像を用いて、検出能に関する精
度を検討する予定である。

A-10
14:40
2799

歯科医院の外科処置における静脈内鎮静法の有効
性について

斉藤 光博

キーワード：外科処置、精神的ストレス、静脈内鎮静法

【目的】 歯科治療では、抜歯、歯周外科、インプラントなど、侵襲
度の高い観血的な外科処置の占める割合が多い。一方、来院する
患者の中には、外科処置に対しての精神的ストレスから、必要な
処置が行えない場合や大学病院または地域の病院歯科に依頼しな
くてはならないケースにしばしば遭遇する。そこで今回当院にて、
観血的な外科処置に対し強い緊張を示す患者に対して静脈内鎮静
法（以下IVS）下での施術を行い、多少の知見を得たので報告する。

【材料および方法】 今回の対象は、外科処置の必要な全身状態に異
常の無い患者のうちIVSを行った8名、および行わなかった8名
を対象とした。IVSは、局所麻酔の後、静脈確保を行い、ミダゾ
ラムもしくはジアゼパムを緩徐に注入して行った。眼瞼下垂、意
識レベルの低下など、鎮静効果の発現を確認後に処置を開始した。
術中は血圧、脈拍、SPO₂、RPPを5分ごとに測定した。IVSを行
った患者は、処置終了後最低120分間、回復室にて休養させ、運
動機能に異常の無いことを確認の後帰宅させた。

【結果および考察】 術前はこの患者も強く緊張を示していたが、
IVS開始後からは表情がやわらぎ、緊張が軽減した。血圧や脈拍
も術前には高値を呈していたが鎮静開始後からはほぼ正常値を示
した。IVSを行わなかった患者は、術前から術後まで一貫して血
圧・脈拍とも高い傾向を示した。今回の比較検討から術式による
測定値の大きな変化は見られなかった。静脈内鎮静法を適切に応
用することで、開業医院で可能な外科処置の範囲は拡大すると考
えられる。

B-02
9:10
2302

マイクロチップ基板を用いた血中サイトカインの
迅速検出法の構築

阿部 佳織

キーワード：マイクロチップ、サイトカイン、歯周病診断

【目的】 歯周病の正確で客観的な診断は、歯周病の予防や適切な治療
法の選択において重要である。近年、各種体液中に含まれるサイト
カインなどが歯周病診断の有用なバイオマーカーになると報告され
ている。しかし、測定操作が煩雑であり、測定に時間がかかること
から、診療室では測定されていない。そこで、本研究では、数cm
角のチップ（マイクロチップ基板）上に微細加工技術を用いて形成
されたマイクロ流路内で、高速、高効率に抗原抗体反応を行うこと
で、診療室でも測定可能な迅速、省サンプル、簡易な歯周病診断デ
バイスの構築を行った。

【材料および方法】 測定対象として炎症性サイトカインである
Interleukin-6（IL-6）とTumor Necrosis Factor- α （TNF- α ）を選択
した。微細化インクジェット装置を用いて環状ポリオレフィン製マ
イクロチップ基板上に形成したマイクロ流路（幅300 μ m、深さ100
 μ m）の任意の部位に抗IL-6抗体および抗TNF- α 抗体を吐出・固
定化後、抗原抗体反応を利用することで血中IL-6およびTNF- α の測
定を行った。

【結果および考察】 96穴プレートを用いた市販ELISA法（従来法）
と同様に、マイクロチップ基板上で血中IL-6およびTNF- α を定量的
に再現性良く測定することが可能となった。また、マイクロチップ
基板では、抗原抗体反応35分（従来法の1/6）、使用血漿量2 μ l（従
来法の1/50）で、従来法と同様の検出感度（2pg/ml）を得ること
ができた。これらの結果から、マイクロチップ基板を用いた測定は、
迅速で客観的な歯周病診断法への応用が可能であると考えられる。

B-03
9:20
2402

ダークココアの動脈硬化抑制作用の検討
エビカテキンの抗炎症作用の観点から

永安 慎太郎

キーワード：脂肪細胞、マクロファージ、NF- κ B

【目的】歯周病などの慢性炎症が代謝疾患の病態に影響を及ぼす可能性が示唆されており、その機序として脂肪細胞-マクロファージ相互作用が有力視されている。一方、ダークココアの摂取により心血管イベント発生率が著明に減少することが報告され、ココア含有エビカテキン（EC）のイベント抑制効果が注目されている。そこで、ECを作用させた両細胞の共培養系にLPS刺激を加えた際の炎症関連分子の動態変化を解析し、炎症抑制効果を検討した。

【材料および方法】1. 供試細胞：RAW264.7と3T3-L1を分化させ実験に用いた。2. 共培養とmRNAの回収：両細胞の共培養にECを作用させ、*E. coli* LPS (1ng/ml) 刺激を加え、0, 4, 8, 12, 24時間後の培養上清と両細胞に発現したmRNAを回収した。3. ECの抗炎症作用の検討：DNAマイクロアレイ法にて脂肪細胞の発現遺伝子量をcontrol群と比較し、リアルタイムPCR法で確認した。4. ECの作用機序の検討：パスウェイ解析、リアルタイムPCRによる検証、ELISA・WB法を用いた蛋白レベルでの解析を行った。

【結果および考察】ECを作用させたLPS刺激下共培養系における脂肪細胞では、IL-6をはじめとする炎症性サイトカインやケモカインの遺伝子発現が抑制され、ECの抗炎症作用が確認できた。また、転写因子の解析からその作用点はNF- κ Bであることが判明した。さらに脂肪細胞、マクロファージそれぞれに対するECの作用を検討した結果、ECは主にマクロファージに作用することが判明した。以上からECは細菌感染によって惹起される脂肪細胞-マクロファージ相互作用での炎症反応の増幅を抑制し、これにより心血管イベント発生率を減少させる可能性が示唆された。

B-05
9:40
2504

分化度の異なる骨髄間葉系幹細胞間の相互作用が骨再生に及ぼす影響

橋高 瑞穂

キーワード：骨髄間葉系幹細胞、歯周組織再生、細胞分化

【目的】広範囲に破壊された歯周組織を骨髄間葉系幹細胞（MSC）移植によって再生することが期待されている。複数の硬組織と軟組織から構成される歯周組織を再生するには、MSCを種々の歯周組織構成細胞へ確実に分化させる必要がある。細胞分化は液性因子、細胞外基質および細胞間接着によって調節される。さらに、分化度の異なる細胞間の相互作用がそれぞれの細胞の機能発現を制御すると考えた。本研究では、分化度の異なるMSC間の相互作用が骨再生に及ぼす影響を調べるために、一定期間分化誘導を受けたMSC（分化MSC）と継代直後のMSC（未分化MSC）複合体の骨再生能を検討した。

【材料および方法】MSCは3週齢のF344ラットの大腿骨髄から分離、培養し、3代継代したMSCを以下の実験に供した。MSCを50 μ g/ml アスコルビン酸と10% FBSを含むDMEMで1週間培養し、豊富な細胞外基質に存在するMSCを分化MSCとした。分化MSCと未分化MSC複合体を骨分化誘導培地で5日間培養後、ラット頭蓋骨に作製した骨欠損部に移植した（分化MSC+未分化MSC複合体移植群）。さらに、分化MSCのみ移植群および非移植群を設定した。骨再生量は、移植後4週の切片をHE染色した後、画像解析ソフトによって計測した。

【結果および考察】骨再生量は分化MSCのみ移植群が分化MSC+未分化MSC複合体移植群および非移植群と比べて有意に多かった。分化MSCと未分化MSCの相互作用がMSCによる骨再生に影響を及ぼすことが明らかとなった。分化度の異なるMSC間の相互作用がMSCの分化を制御できる可能性が示唆された。

B-04
9:30
2504

歯肉線維芽細胞由来の液性因子が間葉系幹細胞の骨分化に与える影響

兼田 英里

キーワード：間葉系幹細胞、歯肉線維芽細胞、液性因子

【目的】歯周組織再生のひとつとして間葉系幹細胞（MSC）移植が行われている。移植されたMSCは、移植局所において様々な刺激を受けて増殖・分化する。歯周組織構成細胞から分泌される液性因子もMSCの分化に影響を与えると考えられる。そこで、本研究では歯肉線維芽細胞（HGF）に着目し、HGFから分泌される液性因子によるMSCの骨分化への影響を検討した。

【材料および方法】MSCの単独培養、およびTranswellを用いて下層にMSC、上層にMSCまたはHGFでの非接触の共培養を行った。培養後、MSCからRNAを抽出し、未分化MSCに特徴的な転写因子のmRNAレベルおよびマイクロRNA（miRNA）発現をReal-time PCRによって検討した。また、骨分化誘導培地で培養後、MSCにおける骨分化マーカー遺伝子のmRNAレベルおよびアルカリフォスファターゼ（ALP）活性を検討した。

【結果および考察】HGFとMSCの共培養において、MSCにおけるETV1、ETV5、FOXP1、KLF12のmRNA発現を増加させた。また、380種類のmiRNA発現レベルを比較したところ、18のmiRNAの上昇、11のmiRNAの減少が確認された。さらに、HGFとMSCを骨分化誘導培地で共培養すると、MSCにおけるBMP-2、osteocalcinのmRNA発現は減少し、骨分化に対して抑制的に働くSmad7のmRNA発現は上昇した。また、ALP活性の低下が認められた。以上の結果から、MSC移植による歯周組織再生において、HGF由来の液性因子は転写因子群およびmiRNAを介して、MSCの骨分化を抑制している可能性が示唆された。

B-06
9:50
2504

ヒト歯根膜細胞におけるインフラマソームの発現

山羽 聡子

キーワード：歯根膜細胞・インフラマソーム

【目的】近年、病原体による侵襲に対してだけでなく、組織の修復・再生・恒常性の維持などの生命反応の基盤病態として慢性炎症が注目されている。インフラマソームはCaspase1の活性化を制御する複合体の総称で、微生物などの外来性および細胞外基質成分などの内因性の病因因子センサーとして、感染のない正常状態でも微弱な炎症反応を制御し、組織恒常性の維持の一因となっていることが明らかとなっている。本研究では、歯周組織におけるインフラマソームの役割を検討するため、ヒト歯周組織構成細胞におけるインフラマソームの発現、およびヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程におけるインフラマソームの発現動態を検討した。

【材料および方法】ヒト歯周組織構成細胞（歯根膜細胞・歯肉上皮細胞・歯槽骨由来骨芽細胞・歯肉線維芽細胞）において、インフラマソーム関連遺伝子の発現をRT-PCR法を用いて検討した。さらに、ヒト歯根膜細胞を石灰化誘導培地（10% FCS・50 μ g/ml アスコルビン酸・10mM β グリセロリン酸含有 α -MEM）にて長期培養することにより、硬組織形成細胞へ分化誘導した際のインフラマソーム関連遺伝子の発現をReal-timePCR法にて解析した。

【結果および考察】ヒト歯周組織構成細胞において、ASCやCaspase1などのインフラマソーム関連遺伝子の発現を認めた。また、ヒト歯根膜細胞の硬組織形成分化過程においてNLRP3の発現上昇を認めた。以上の結果より、ヒト歯根膜細胞においてインフラマソームが発現しており、歯周組織の恒常性の維持・歯周病の発症に関与している可能性が示唆された。

B-07
10:00
2504

Sprouty2 を標的とした歯周組織再生の可能性

田中 麗

キーワード：歯周組織再生, Sprouty2, bFGF

【目的】Sprouty2 (Spry2) とは古典的 MAP キナーゼである ERK により誘導されるネガティブフィードバック制御因子であり, bFGF による ERK の活性を抑制することが明らかになっている。近年, 口腔発生学における Spry2 の役割を探索する研究が精力的に行われているが, 歯周組織に関してその詳細のメカニズムは未だ不明である。本研究は Spry2 が歯周組織の再生において新しい治療標的となり得るのかを調査することを目的としている。

【材料および方法】マウス Spry2 の優性阻害変異体を作製し, MC3T3-E1 マウス骨芽細胞および GE1 マウス歯肉上皮細胞に遺伝子導入を行った。それぞれを bFGF・EGF・血清等にて刺激を行った後, 細胞内シグナル伝達経路をウエスタンブロット法により解析した。また, Spry2 が細胞増殖や骨分化に及ぼす影響について, それぞれ MTT assay と ALP assay を用いて検証した。

【結果および考察】MC3T3-E1 に Spry2 優性阻害変異体を導入することで bFGF・血清刺激による ERK の活性化が増強され, GE1 では逆に EGF・血清刺激によって ERK の活性が減少した。また, Spry2 抑制 MC3T3-E1 の細胞増殖能はやや亢進しており, 逆に Spry2 抑制 GE1 では抑えられていた。さらに, Spry2 抑制 MC3T3-E1 は対照群と比較して ALP 活性が亢進していた。一方, Spry2 抑制 GE1 では EGF にて刺激すると EGF 受容体の減少が確認された。これらの結果から, 歯周病による歯槽骨吸収部位に対して Spry2 阻害剤を使用することによって, 歯肉上皮の侵入が妨げられ, 再生の空間が維持されると同時に骨芽細胞による石灰化が誘導されることが期待される。

B-09
14:00
3199

Platelet Rich Fibrin (PRF) 圧延器の試作と性能評価

小林 美登

キーワード：PRF, 再生療法

【目的】PRF は, 操作性の向上を目指して開発された「ゲル状の PRP」である。歯科領域では上顎洞挙上術に用いられることが多い。しかし, その場合ガーゼで押しつぶしたものが好んで用いられ, 成形の過程で血漿成分と血小板の損失があることが想像される。これは組織再生の観点からは大きな損失であるだろうと考えられる。このような欠点を補う目的から我々は圧延時に PRF の厚さが 1 mm となる様な圧延器を試作し, その性能評価を行った。

【材料および方法】ヒト末梢血から調製した PRF をガーゼで膜状に圧搾, もしくは PRF 圧延器にて厚さ 1 mm の膜状に圧延した。PRF の表面微細構造は走査電子顕微鏡 (SEM) により観察した。細胞の足場としての性能についてはヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を用いて検討した。また, 歯周再生治療の際, 創部に PRF 膜を填入し, その予後を観察した。

【結果および考察】ガーゼで潰した PRF 膜は表面のフィブリン線維からフィブリン特有の網目状構造が失われ平坦となり血小板も潰れてしまっていた。血管内皮細胞を培養すると内部への侵入はなく増殖は表面に限られた。一方, 圧延 PRF 膜ではフィブリンの網目構造は保たれており, 細胞は PRF 内部まで侵入し管腔様構造を形成した。圧延した PRF を歯周再生治療に用いると, 創部の治癒はきわめて良好であった。以上の結果より, PRF 圧延器は「次世代の PRP」として十分な効果が期待される「PRF の血漿成分を適度に温存した PRF 膜」の形成に有効であることが示唆された。

B-08
10:10
3103

吸収性バイオマテリアル (β -リン酸三カルシウム / カルボキシメチルキチン複合体スポンジ) の骨再生効果に関する研究

谷山 勝義

キーワード： β -TCP, カルボキシメチルキチン, 骨再生

【目的】人工骨として β -tricalcium phosphate (β -TCP) は広く用いられているが, そのほとんどは形態が顆粒であるため欠損部への移植時に移植部位から漏出し充填量が規定できないことがある。また粒径が様々であり, その吸収性および骨伝導能に差異が生じている可能性がある。カニやエビなどの甲殻類に含有されるアミノ多糖であるキチンを, カルボキシメチル化して水溶性にした CM-chitin は低い抗原性, 高い生体親和性, 良好な生体分解性を有している。そこで β -TCP 充填時の操作性向上と吸収速度を適切に調節するために, CM-chitin と β -TCP を混合してスポンジ状に成形した β -TCP/CM-chitin 複合体スポンジ (TCP/CM) に着目した。本研究ではラット頭蓋骨欠損を用いて, TCP/CM の骨形成に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】実験動物には Wistar 系ラット (10 週齢, 雄, 18 匹) を用いた。麻酔下にて, トレフィンバー (直径 5 mm) を用いて頭蓋骨左右 2 部位に 5 mm の骨欠損を外科的に作製した。片側には TCP/CM を充填 (実験群) し, 対側は充填せず未処置 (対照群) とした。4, 8, 12 週 (各週 6 匹) の観察期間終了後, 新生骨形成について組織学的観察および組織形態計測を行った。

【結果および考察】全ての観察週において, 実験群は対照群より新生骨面積, 欠損閉鎖率が有意に高く, 残存 TCP/CM は経時的に減少し 12 週ではほとんど認められなかった。以上の結果より, TCP/CM は, 良好な骨伝導性を維持しながら高い吸収性を併せ持つことでラット頭蓋骨欠損において有意に骨形成を促進させたと考えられる。

B-10
14:10
3101

ラット口蓋粘膜の創傷治癒に対する低出力パルス超音波の影響

西村 将吾

キーワード：低出力パルス超音波, 遊離歯肉移植術, 創傷治癒

【目的】遊離歯肉移植術は, 露出根面の被覆, 付着歯肉の獲得などの歯肉歯槽粘膜の解剖学的問題を改善する有効な方法として臨床応用されているが, 移植片の供給側である口蓋部が開放創となり, 術後疼痛, 出血, あるいは術後感染を生じる可能性がある。低出力パルス超音波 (LIPUs) は線維芽細胞成長因子や血管内皮細胞成長因子の産生を促進する事が in vitro で報告されており, 軟組織の創傷治癒を促進できる可能性がある。本研究の目的は, 軟組織切除後の開放創に LIPUs を照射した際の創傷治癒に及ぼす影響を評価する事である。

【材料および方法】実験動物には, 生後 8 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。口蓋粘膜に, 骨に達する深度で頬口蓋方向 (BP) 2 × 近遠心方向 (MD) 4 (mm) で粘膜を切除し, 軟組織欠損を作製した。LIPUs の照射条件は, 周波数 3.0 MHz, 出力 30 mW/cm², 照射時間 15 分間とした。照射群は, 軟組織切除後 1, 2, および 3 日の 3 回照射を行った。軟組織欠損部は, シリコン印象材を用いて印象採得し, 石膏模型により面積, および BP, MD の長径の測定を行い, 欠損の縮小率を術直後の欠損サイズをベースライン (BL) とし, (BL - 欠損サイズ) / BL × 100 (%) より求めた。

【結果および考察】BP の縮小率は, 非照射群の 45% に対し, 照射群は 60% であった。MD の縮小率は, 非照射群の 31% に対し, 照射群は 35% であった。創傷面積の縮小率は, 非照射群の 61.7% に対して, 照射群は 65.5% であった。本研究の結果から LIPUs 照射はラット口蓋粘膜の創傷治癒を促進する可能性があることが示された。

B-11
14:20
2609

インプラント周囲炎治療に関する基礎的研究
第3報 イヌ実験のインプラント周囲炎に対する
各種除染処置の有効性に関する組織学的評価
成田 宗隆

キーワード：インプラント周囲炎，除染

【目的】インプラント周囲炎は，発症率が増加傾向であると報告される一方，現在まで有効な治療方法は確立していない。われわれは第53回本学術大会において，汚染したインプラント表面に対する除染処置の有効性について，臨床のパラメータの比較を行い報告した。本研究の目的は，除染処置後におけるインプラント周囲組織の反応について組織学的に観察することである。

【材料および方法】イヌ6頭に埋入した骨接合型インプラントに対し，実験的インプラント周囲炎を惹起させた後，フラップ手術併用（ST）群，および反対側を非併用（NST）群に分け，除染を行った。除染方法は，プラスチックスケーラー（PS），超音波スケーラー（US），およびEr:YAGレーザー（EL）とした。検討項目として，除染処置後の経過期間（4週，12週）による比較，および各種除染処置法による比較を組織学的形態計測結果から行った。

【結果および考察】4週，12週群ともにインプラント周囲組織では，炎症性細胞浸潤が認められなかった。インプラントに接している新生骨の形成量は，ST群がNST群と比較し，多く認められた。また，ST群の中で，USを用いたものが，PSおよびELよりも多い傾向を認めた。これは，臨床パラメータの結果と相関を示していた。以上の結果から，フラップ手術を併用し，汚染したインプラント表面を明視下で確実な除染を行うことで，除染効果が高まることが示唆された。また，インプラント周囲炎に対する原因除去療法としての除染処置は，周囲組織の炎症を確実に消失させる有効な手段として考えられる。

B-13
14:40
2202

ヒト歯周炎歯肉 in vivo 再現モデルを用いた
IL-1 β 発現についての解析

鎌田 要平

キーワード：IL-1 β ，*P. gingivalis*，gingiva

【目的】免疫不全マウス皮下にヒト歯周病歯肉を移植し，3次元形態を再現する in vivo モデルを用いて感染実験を行い，IL-1 β 発現量と臨床病態との関連について検討することを目的とした。

【材料および方法】軽度から中等度慢性歯周炎と診断され，歯周外科手術を行った7名と重度慢性歯周炎と診断され，歯周外科手術もしくは抜歯術を行った4名。免疫不全マウスへの歯肉移植方法は Tsukinoki らの方法に従った。実験群には *P. gingivalis* を培養した BHI 培地を皮下に 1.0ml 接種，対照群には BHI 培地を皮下に 1.0ml 接種した。実験群，対照群ともに，移植部位組織を採取し，Real-time PCR 法を用いて IL-1 β 発現量の検出，IL-1 β の局在を明らかにするために免疫組織化学染色に用いた。

【結果および考察】免疫不全マウスに移植した移植後の歯肉上皮組織では，歯肉形態は維持されていた。軽・中等度慢性歯周炎群における IL-1 β 発現量は，実験群では 0.013 ± 0.011 ，対照群では 0.003 ± 0.003 と有意差を認めた ($P < 0.05$)。重度慢性歯周炎群における IL-1 β 発現量は，実験群では 0.002 ± 0.001 ，対照群では 0.008 ± 0.007 と有意差を認めなかった。上皮組織では棘細胞に強く認めるが全層性に陽性像が観察された。軽・中等度慢性歯周炎症例において，*P. gingivalis* 感染にて IL-1 β の発現は促進されたが，重度慢性歯周炎では *P. gingivalis* 感染にて IL-1 β の発現は抑制された。実際の歯周炎状態の歯肉組織は，病態の違いにより IL-1 β の産生量が異なることが示唆された。

B-12
14:30
2206

ヒト歯肉線維芽細胞に対する Nd:YAG レーザー
照射による影響 —熱的相互作用の検討—
吉橋 直弥

キーワード：Nd:YAG レーザー，光化学作用，熱化学作用

【目的】低出力レーザー照射の作用には，熱作用と光作用の2つがある。また，Nd:YAG レーザーの細胞への影響，特に基礎的報告が少ないことに着目し，今回我々は，照射時間を統一し，照射条件を組み合わせることにより，ヒト歯肉線維芽細胞に対する熱的相互作用について検索した。

【材料および方法】培養細胞へのレーザー照射：株化されたヒト歯肉線維芽細胞（（株）DS ファーマメディカル）を500個/ウェルに調整後，96ウェルプレートに播種し48時間培養後，Nd:YAG レーザー（歯科用パルス Nd:YAG レーザーネオキュア 7200 SPL-7200（株）松風，京都）の照射条件を実験1：（5，10pps），（100，200，400mJ）のそれぞれの組み合わせ群。実験2：2W群（①400mJ 5pps，②20mJ 100pps），7.2W群（③180mJ 40pps，④80mJ 90pps）とし，培養細胞へ10秒間レーザー照射後，1，3，5日時に下記の測定を行った。この条件下にて，細胞増殖数の測定，TGF- β 1 産生量の測定および，細胞の形態的観察を行った。

【結果および考察】実験1では，パルスレートを固定し，パルスエネルギーを変化させることで細胞に与える影響について検索したが，大きな差は見られなかった。そこで，同出力で照射条件を変えると，細胞増殖について D5 において 2W の両群間において統計学的有意差がみられた。TGF- β 1 の産生量では，D1 において cont. 群と両 2W 群とそれぞれ，また，D5 において 2W の両群間において統計学的有意差がみられた。このことは，同出力の Nd:YAG レーザー照射において，照射条件を変えることにより，細胞に与える影響に差が生じる可能性が示唆された。

C-01
9:00
2504

Porphyromonas gingivalis 感染マウスモデルにお
いて PCSK9 産生が上昇し脂質プロファイルが変
動する

宮沢 春菜

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*，PCSK9，LDLc

【目的】歯周炎は全身の炎症状態と脂質代謝に影響を与え，動脈硬化を促進すると考えられる。動脈硬化病変成立には血中コレステロールの増加，マクロファージの泡沫化が重要である。我々はマウスにおいて歯周病原細菌感染が HDLc 生成を抑制する機構を明らかにした。しかし LDLc レベル調節に関与する分子への影響は不明である。PCSK9 は LDL 受容体 (LDLR) の分解を誘導し血中—細胞内コレステロールレベルの調節に関与する分子である。本研究の目的は，*Porphyromonas gingivalis* 感染マウスモデルにおける PCSK9 発現および脂質プロファイルの変動を明らかにすることである。

【材料および方法】C57BL/6 マウスに 10^9 CFU の *P. gingivalis* W83 株を腹腔内投与した。肝臓における PCSK9 遺伝子発現は real-time PCR 法にて，血清中 SAA および PCSK9 レベルは ELISA 法にて，肝臓における LDLR 発現は Western blot 法にて，脂質プロファイルは高感度ゲルろ過 HPLC 法にて解析した。

【結果および考察】*P. gingivalis* 感染により，血清 SAA レベルは上昇し，肝臓における PCSK9 遺伝子発現，血清 PCSK9 レベルも上昇した。また，肝臓における LDLR 発現の低下と血清 LDLc レベルの上昇が認められた。これらのことから，*P. gingivalis* 感染による PCSK9 産生の誘導により LDLR が分解され，循環血中におけるコレステロールのクリアランスが低下した結果，血清 LDLc が上昇した可能性が示唆された。歯周炎が PCSK9 および脂質プロファイルに影響を与えるメカニズムについて今後更に検討していく予定である。

C-02
9:10
2504

菌体破砕物による感作とその菌肉溝内滴下は菌周ポケットの形成を誘導する

長野 史子

キーワード：菌体破砕物，菌周ポケット，感作

【目的】 歯周炎は歯槽骨の吸収とアタッチメントロスを特徴とし、その発症には細菌および細菌成分と宿主の免疫系が関与するとされている。当講座ではラットを用いた実験において LPS とその特異抗体による免疫複合体の形成が歯周組織破壊を誘導すること、さらに卵白アルブミンと比較することで抗原の有する生物学的活性も破壊の程度に関連することを報告した。この研究では口腔内に存在するグラム陽性細菌もしくはグラム陰性細菌の菌体破砕物でラットに感作と滴下を行い、歯周組織への影響を調べた。

【材料および方法】 グラム陽性細菌の *Staphylococcus aureus* (以下 S. a.) と、グラム陰性細菌の *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (以下 A. a.) を PBS で懸濁したものを超音波で 1 分間破砕後 10 分間加熱し、それぞれの菌体破砕物を作製した。菌体破砕物とアジュバントを混和し、ラットに 2 回の腹腔内注射し感作を行った。対照群には PBS を腹腔内注射した。2 回目の感作の 24 時間後から歯肉溝内にそれぞれの菌体破砕物 (左側第 1 大白歯口蓋 12.5mg/ml と右側第 1 大白歯口蓋 25mg/ml) を 10 日間滴下した。なお滴下 0 日目、5 日目、10 日目には採血を行い A. a., S. a. に対する血清中の抗体レベルを ELISA で確認した。

【結果および考察】 両群ともに実験群では菌周ポケットが形成されており、A. a. 滴下群の方が有意に深かった。実験群の血清中の抗体レベルは 5 日目から全て上昇していた。グラム陰性菌とグラム陽性菌の菌体破砕物は、それぞれで感作をした後に滴下を行うと、その程度は異なるが両群とも菌周ポケットを形成した。

C-04
9:30
2499

P. gingivalis 菌性感染は非アルコール性脂肪肝の病態を進行させるリスクファクターである

古庄 寿子

キーワード：菌性感染，P. gingivalis，NASH

【目的】 非アルコール性脂肪肝 (NASH) はメタボリックシンドロームの肝臓での表現型で、約 10-20% が肝硬変・肝癌に移行するとされる。近年、NASH の病態進行する促進因子として細菌感染が注目されるが、菌性感染と NASH の関係は未だ明らかでない。そこで Porphyromonas gingivalis (Pg) の菌性感染が NASH の病態進行に及ぼす影響を調べた。

【材料および方法】 ① 5 週齢野生型マウスを通常食 (CD) と高脂肪食 (HFD) で 12 週間飼育後、半数の上顎第 1 臼歯菌叢から Pg (W83 株) を感染させ、6 週後の歯周組織・血清・肝臓を採取し組織像、血清検査所見を 4 群間 (CD/Pg-・CD/Pg+・HFD/Pg-・HFD/Pg+) で比較検討した。② パルミチン酸処理で脂肪化させたヒト肝細胞 (HC3716-hTERT) 株を用い、Pg-LPS 刺激による炎症性サイトカイン・インフラマソーム mRNA 発現を調べた。③ NASH 患者肝生検材料における線維化と Pg 感染との関連性を検討した。

【結果】 ① Pg 感染 6 週後に歯根肉芽腫が形成され、病巣内に Pg を検出した。血清中の LPS 濃度は感染群で有意に上昇した。HFD/Pg- 群の肝では脂肪化と軽度の炎症が見られた。これらの変化は HFD/Pg+ 群でより顕著で、広範な線維化領域も出現した。Pg+ 群では肝細胞やクッパー細胞内に Pg が検出された。② パルミチン酸処理で誘導された脂肪化肝細胞では、Pg-LPS 添加により炎症性サイトカインやインフラマソームの mRNA 発現が著しく上昇した。③ 約半数の NASH 患者の肝臓で Pg を検出した。また、Pg を検出した症例ではより線維化が進行する傾向が見られた。Pg の菌性感染が NASH の病態を増悪させるリスクファクターであることが明らかとなった。

C-03
9:20
3101

LED による短波光を用いた Porphyromonas gingivalis の殺菌。

中田 智之

キーワード：Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT), Porphyromonas gingivalis, LED

【目的】 Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) は特定の波長・強度の光により引き起こされる化学反応を利用した殺菌効果を用いた治療法である。従来 aPDT はアルゴンレーザー (509nm) などの長波が用いられてきたが、近年 Porphyromonas gingivalis などの一部の歯周病原生細菌に対する短波光 (410nm) の効果が研究されている。aPDT の光源として LED は小型で発熱することなく、単波長の光を発生する特性を持つため、研究および口腔内での使用に適している。本研究は数種類の波長・特性の異なる LED を aPDT の光源として使用し、その効果を比較し、作用を検討することが目的である。

【材料および方法】 Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 株を使用した。培養後、遠心分離により得た沈殿を比色計にて OD=0.3 となるよう PBS で攪拌し、試料とした。LED の照射は 96well マイクロプレートの 1 well につき 10 倍希釈した試料 100 μ l を分注して行った。LED 発光チップの先端からマイクロプレート底面までの距離を 1cm に位置付け、各色の LED において照射束が 10J/cm² となるよう照射時間を決定した。対照群はマイクロプレートに分注し、LED の照射は行わなかった。全ての LED の照射終了後、hemin (5 μ g/ml), menadione (0.5 μ l/ml) 添加血液寒天培地を用いて CFU を測定した。

【結果および考察】 対照群と比べ、紫色光・青色光・白色光いずれにおいても CFU は有意に減少した。

C-05
9:40
2504

骨粗鬆症モデルラットへのビスフォスフォネート系薬剤投与初期段階での歯槽骨に対する影響

高崎 俊輔

キーワード：ビスフォスフォネート系薬剤，骨粗鬆症，歯槽骨

【目的】 ビスフォスフォネート系薬剤投与における歯周組織への初期段階での影響を、骨粗鬆症モデル (卵巣摘出ラット) を用いて組織形態学的及び生化学的に検索する。

【材料および方法】 7 週齢 wistar 系雌性ラット 36 匹を 3 群に分け実験に供した。2 群は、7 週齢時に卵巣摘出手術を行い、飼育開始 4 週目よりビスフォスフォネート系薬剤としてリセドロン酸ナトリウム n 水和物 (和光純薬工業) を 2 回 / 週 (0.07mg/kg/ 回) 皮下投与群 (Ris. 群) と卵巣摘出手術のみを行なった群 (OVX 群) とに分けた。卵巣摘出手術を施さなかった群 (Cont. 群) はそのまま通常飼育した。その後、12 週齢時から 15 週齢時に毎週各群安楽死させ試料を採取した。採取した上顎骨は、骨構造と骨塩の状態を観察するために、 μ CT 撮影および EPMA による分析と組織学的解析を行った。尚、本実験は日本歯科大学動物実験委員会承認の元に行った。

【結果および考察】 μ CT における観察では、12 週齢時における大腿骨の骨粗鬆化が確認されたものの、歯槽骨における観察では明らかな変化は認められなかった。しかし、EPMA による分析では 15 週齢時における OVX 群・Ris. 群の歯槽骨が粗になっていることが確認された。本研究結果から、ビスフォスフォネート系薬剤投与の初期段階では、大腿骨の骨粗鬆化が認められたとしても顎骨での骨粗鬆化は遅延する可能性が示唆された。

本実験は会員外実験協力者として日本歯科大学生命歯学部共同利用研究センター小川正明准教授、那須優則准教授、鈴木さつき准教授の協力のもと行った。

C-06
9:50
2205

窒素含有ビスフォスフォネート (NBP) は破骨細胞 Clcn7 型 Cl⁻ 輸送体 (Clcn7) の機能を抑制する
大城希美子

キーワード: 破骨細胞, Clcn7, 窒素含有ビスフォスフォネート
【目的】 歯周病では、破骨細胞による骨吸収が亢進している。骨ミネラルの溶解は、破骨細胞の波状縁に発現する H⁺ ポンプと Clcn7 から分泌される酸によって起こる。近年、骨吸収性疾患の治療に類用されている NBP の骨吸収抑制機序は、破骨細胞のメバロン酸代謝における farnesyl diphosphate synthase (Fdps) の抑制によるものとされるが、破骨細胞の酸分泌機能に対する影響は不明である。そこで、今回、Clcn7 に対する NBP の効果を検討した。

【材料および方法】 マウス破骨細胞及びテトラサイクリン誘導性に Fdps をサイレンシングした Raw264.7 細胞に Whole-cell patch clamp 法及び蛍光測定法を適用して、Clcn7 活性への NBP の影響を検討した。

【結果および考察】 マウス破骨細胞及び Raw 細胞の Clcn7 の発現及び活性は、分化とともに増加した。NBP は、Clcn7 活性を濃度依存性に抑制した。しかし、作用機序の異なる窒素非含有ビスフォスフォネートは効果を示さなかった。更に、Fdps をサイレンシングした Raw 細胞の Clcn7 活性は低下した。また、NBP による Clcn7 活性の抑制は、メバロン酸代謝経路の下流シグナルであるゲラニルゲラニル酸 (GGOH) により回復し、GGOH のゲラニルゲラニル化阻害剤は、NBP 同様に Clcn7 活性を抑制した。

以上から、NBP は破骨細胞の骨吸収における Cl⁻ 分泌を調節していることが明らかとなった。また、NBP は、骨吸収形態を抑制するだけでなく、Clcn7 活性を低下させ、酸分泌を抑制することによっても、骨吸収を抑制していることが示唆された。

C-08
10:10
2504

Irsogladine maleate inhibits Toll-like receptor 2 enhancement mediated by *Porphyromonas gingivalis* in human gingival epithelial cells

Irma Josefina Savitri

キーワード: Irsogladine Maleate (IM), TLR2, Pg, HGEC

【目的】 *Porphyromonas gingivalis* (Pg), the etiological bacteria of periodontitis, possesses some ligands which regulate inflammation through Toll-like receptors (TLRs). TLR2 is known to be expressed on the surface of human gingival epithelial cell (HGEC). To date, we reported the possibility of IM for prevention of inflammation by suppressing IL-8. To clarify the whole function of IM, in this study, we examined the inhibitory effect of IM on TLR2 stimulated by Pg in HGEC.

【材料および方法】 The immortalized HGEC (OBA-9, kindly gifted from Shinya Murakami, Osaka University) was pretreated with or without IM (1 μ M) before Pg (10⁸ cells/mL) stimulation. Then, real-time PCR and ELISA were performed to examine IL-8 and TLR2 expression. To determine IL-8 involvement in TLR2 mRNA enhancement, neutralization antibodies of IL-8 (10 μ g/mL), CXCR1 (10 μ g/mL) and CXCR2 (10 μ g/mL) were applied into OBA-9 before Pg stimulation.

【結果および考察】 Pg stimulation showed the induction of IL-8 and enhancement of TLR2 in mRNA and protein level. However, IM pretreatment inhibited their up-regulation. The neutralization of IL-8 and CXCR2 inhibited TLR2 mRNA enhancement in OBA-9. In conclusion, the inhibitory effect of IM on TLR2 might be mediated by IL-8 suppression.

C-07
10:00
2202

ヒト歯肉組織再現モデルにおける TLR を介した抗菌性ペプチド発現の解析

東 雅啓

キーワード: hBD2, TLR, *Pgingivalis*

【目的】 歯周炎は特異的な病原細菌の感染により惹起され歯周組織の破壊を引き起こす。病原細菌に対して初期防御機構として重要な役割をもつものとして抗菌性ペプチドが存在し、その中でも human- β -defensin2 (hBD2) は上皮性分子として炎症刺激により発現が誘導される。また、その誘導シグナルに関与する Toll-like receptor (TLR) 2 及び 4 は膜貫通型受容体タンパクで、病原体に認識・応答することで免疫システムを機能させる。しかしこれらメカニズムに関して、生体モデルを用いた検討が未だ充分には行われていない。そこで本演題ではヒト歯肉組織再現モデルを使用し、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に対しての免疫応答を TLR 及び hBD2 の発現量から検討を行った。

【材料および方法】 慢性歯周炎患者の歯肉を用いて、Tsukinoki ら (*J Periodont Res* 2007) の方法に従いヒト歯肉組織再現モデルをヌードマウス (♂, 6-8 週令) にて作製した。その後ヒト歯肉に対して *P. gingivalis* を嫌氣的に感染させ、サンプリングし定量 PCR 解析を行った。また、移植したヒト歯肉の発現を確認するため免疫組織化学染色も行った。

【結果および考察】 移植後歯肉においてもヒト由来であることが確認され、さらに歯肉における TLR2, 4 及び hBD2 遺伝子発現が *P. gingivalis* 感染により有意に増加した。従ってヒト歯肉組織再現モデルにおいても TLR を介した抗菌性ペプチドの産生が誘導されており、歯周炎病態の解析にこのモデルが有用であることが示唆された。

C-09
14:00
2504

歯肉上皮細胞において Smad2/3 は細胞接着分子と細胞外基質の発現を促進する

本郷 昌一

キーワード: Smad2/3, インテグリン, 細胞外基質

【目的】 歯肉上皮が細胞間および歯面との接着を維持することは、歯周炎の進行や歯周組織の創傷治癒において重要と考えられている。TGF- β は、細胞接着分子や細胞外基質との相互作用によって、上皮細胞の増殖、遊走、および接着に深く関与している。TGF- β は主に Smad2/3 の活性化によって標的遺伝子の発現を制御するが、そのシグナル伝達において Smad2 と Smad3 では機能が異なると考えられる。我々は以前、Smad2 が細胞接着分子と細胞外基質の発現を促進することを明らかにした。そこで、本研究では、これら遺伝子発現に対する Smad3 の影響を調べ、Smad2 遺伝子導入時の結果と比較した。

【材料および方法】 健康な歯周組織を有するドナーの歯肉を採取し、歯肉上皮細胞を Keratinocyte-Serum Free Medium で培養した。この細胞に Smad3 発現ベクターをリポフェクション法にて遺伝子導入し、24 および 48 時間後に全 RNA を回収した。リアルタイム PCR 法を用いて、Smad3 遺伝子導入による細胞接着分子と細胞外基質の遺伝子発現の変化を経時的に調べた。

【結果および考察】 Smad3 遺伝子導入細胞において、Smad2 遺伝子導入時と同様に、インテグリン β 6、テネイシン C、そしてフィブロネクチン 1 の遺伝子発現量は上昇した。しかし Smad2 遺伝子導入時とは異なり、インテグリン α 5 の遺伝子発現量は減少した。すなわち、歯肉上皮細胞における Smad3 の過剰発現は、Smad2 の過剰発現と同様に細胞接着分子および細胞外基質の発現を促進させるが、そのメカニズムは異なる可能性が示唆された。

[本研究は、本研究科倫理委員会の承認を得た (#975)]

C-10
14:10
2299

Caveolin-1 による 菌周組織由来線維芽細胞の
VEGF 産生誘導

滝沢 尚希

キーワード：Caveolin-1, VEGF, 線維芽細胞

【目的】 Caveolin-1 (Cav-1) は細胞膜上に存在する膜タンパクであり、様々なサイトカインのシグナル伝達系を制御することが知られる。一方、昨今、細胞外に放出された Cav-1 が前立腺がんの転移を誘導することが報告され、Cav-1 作用の多様性が注目されている。本研究では、菌周組織由来線維芽細胞を標的として、とりわけ細胞外に放出され得る Cav-1 の生物学的意義に着目し、その菌周病の病態形成において果たす役割について検討した。

【材料および方法】 細胞は、ヒト健常菌周組織から分離したヒト菌肉線維芽細胞 (HGF) およびヒト歯根膜細胞 (PDL) を用いた。培養は 10% FBS 含有の DMEM および α MEM を用いて行った。まず、細胞を IL-1, IL-6 および TNF- α で刺激し (0~48 時間)、全細胞タンパクおよび上清を回収した。Cav-1 発現は、通法にしたがい WB 法を用いて検討した。次に、細胞を Cav-1 (1,000ng/ml, Abnova) あるいは上述のサイトカインで刺激した後 (0~48 時間)、上清を回収した。VEGF の産生性は市販の ELISA キット (R&D) を用いて測定・検討した。なお、各実験系で得られたデータの有意差は、Student's t-test を用いて検定した。【結果および考察】 HGF および PDL を IL-1, IL-6 および TNF- α で刺激すると、Cav-1 が細胞外に放出誘導された。さらに、Cav-1 は HGF および PDL の VEGF 産生性を有意に亢進した ($p<0.05$)。このことは、炎症性サイトカインによって線維芽細胞から放出された Cav-1 は、オートクリン・パラクリン的に VEGF 産生を誘導し、結果として菌周炎症の悪化をきたすという“新たな菌周病の病態機序”の可能性を示唆する。

C-12
14:30
2203

Aggregatibacter actinomycetemcomitans における
RNA シャペロン (Hfq) の蛋白質発現制御と病原
性への関与

田口 裕子

キーワード：Hfq, non-coding RNA, RNA シャペロン

【目的】 Host factor required for replication of the RNA phage Q β (Hfq) は、non-coding RNA と共に mRNA に作用し、蛋白質の発現を調節する RNA シャペロンとして知られ、約半数の細菌種に保存されている分子である。しかし、細菌種によっては、RNA シャペロンとしての機能を保有していない場合もある。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* (Aa) の *hfq* 欠損株を作成し、Hfq の発現制御と病原性への関与について調べることを目的とした。

【材料および方法】 Aa ATCC 29523 株を使用し、相同性組み換え法によって *hfq* 欠損株を作成し、Southern hybridization によって変異株の同定を行った。親株と欠損株の菌体を、二次元電気泳動によって展開し、各蛋白質スポットを ImageMasterTM (GE Healthcare) によって検出・定量した。さらに、HeLa 細胞に対する侵入試験を Meyer らの記載 (*Infect. Immun.*, 1991) に準じて行い、野生株と欠損株の上皮細胞への侵入能を比較した。

【結果および考察】 欠損株の蛋白質プロファイルを解析した結果、親株と比較して、複数の蛋白質発現に差のあることが分かった。各蛋白質スポットの総蛋白量に占める割合を算出し、割合が 0.3% 以上のスポットにおいて両株を比較した場合では、11 のスポットの発現量に 2 倍以上の差があった。また、上皮侵入試験において、細胞侵入した細菌数を算出した結果、*hfq* 欠損株ではその数が減少していた ($p<0.05$)。以上の結果から、Aa の Hfq は各種の蛋白質の発現制御に関与し、それは上皮侵入に関連した機能に関連することが示唆された。

C-11
14:20
2203

菌肉上皮細胞への *Porphyromonas gingivalis* 侵入
機構における ICAM-1 及び Rab5 の関与

加藤 佳子

キーワード：Porphyromonas gingivalis, Rab5, ICAM-1

【目的】 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg.) は細胞内へ侵入し、細胞機能傷害等を引き起こすことが報告されており、炎症性歯周組織で産生される TNF- α 等により、Pg. の細胞付着に関与する ICAM-1 の発現が促進することも知られている。さらに、細菌の侵入経路の一つであるエンドサイトーシスにおいて、低分子 G タンパク質 Rab5 が制御因子として関与していることが報告されている。本研究では、TNF- α 刺激した菌肉上皮細胞における Pg. の侵入効率または、Pg., Rab5, 及び ICAM-1 の細胞内局在を検討した。

【材料および方法】 ヒト菌肉上皮癌細胞 (Ca9-22 細胞) を TNF- α にて刺激し、Pg. ATCC 33277 株と共培養した。その後、塗抹法により細胞内へ侵入した Pg. の菌数を定量した。また、GFP-Rab5 を発現させた Ca9-22 細胞を TNF- α 刺激し、上記共培養後、Rab5, ICAM-1 及び Pg. の細胞内局在を蛍光顕微鏡にて観察した。【結果および考察】 塗抹法により、細胞内に侵入した Pg. の菌数を比較したところ、TNF- α 刺激した Ca9-22 細胞では、無刺激の細胞に比べ、細胞内に侵入した菌数は有意に増加しており、さらに同細胞内で Rab5, ICAM-1 及び Pg. の共局在を認めた。以上の結果から、TNF- α 刺激による Pg. の細胞内侵入の増加には、ICAM-1 と Rab5 を介したエンドサイトーシスに関与していることが示唆された。

C-13
14:40
3199

ヒト血清付加培地を用いた脂肪組織幹細胞の生体
外増殖能の検討

田島 聖士

キーワード：脂肪組織幹細胞, ヒト血清, 生体外増殖能

【目的】 基礎研究における細胞培養時に添加する血清は、現在ウシ胎児由来の血清 (以下 FBS) が一般的に広く使用されている。一方、脂肪組織由来幹細胞 (以下 ASCs) は将来の再生医療における間葉系細胞として注目を集めているが、臨床応用するうえでは、自己由来の血清を使用することが未知の病原体感染等のリスクを減じる上でも重要である。そこで今回我々は、ヒト由来 ASCs のヒト血清 (以下 HS) 添加培地環境における生体外増殖能について検討した。

【材料および方法】 閉鎖系血清調整デバイスを用いて健常ボランティアより末梢血 200ml を採取した後、遠心分離により HS を調整した ($n=8$)。手術時の余剰ヒト皮下脂肪組織より酵素処理にて抽出した ASCs をヒト血清添加培地 (DMEM, 10% HS) で培養を開始し、各実験群において増殖能を検討した。コントロール群としてウシ胎児血清添加培地内 (DMEM, 10% FBS) を用いた。

【結果および考察】 全ての実験群は、コントロール群と比較した場合、良好な細胞増殖が確認され、細胞倍加時間は短縮傾向が認められた。また、ASCs の体外増幅は、ヒト血清添加培地を用いることにより、安全にかつ FBS と比較しても効率よく行うことが可能であることが示唆された。

C-14
9:00
2504

ナノハイドロキシアパタイトによる BMP-2 発現誘導

須藤 瑞樹

キーワード: nano-HA, BMP-2, ヒト歯根膜細胞

【目的】我々はこれまでに、ヒト歯根膜細胞 (hPDL cell) および歯髄細胞に細胞外 Ca^{2+} を感知する機構が存在し、その活性化により BMP-2 の発現が増強されることを初めて明らかにした (Biochem Biophys Res Commun 394, 1093, 2010)。さらに、両細胞とも細胞外リン酸刺激で、BMP-2 の発現が増強されることを示した (Bone 48, 1409, 2011)。この BMP-2 発現誘導のメカニズムへの細胞外で結晶化するリン酸カルシウムの関与の可能性を検討するために、ナノサイズのハイドロキシアパタイト (nano-HA) を用いて hPDL cell を刺激したところ BMP-2 の発現が強く誘導されることを見出したので報告する。

【材料および方法】ヒト歯根膜組織より得られた hPDL cell に nano-HA ($\phi < 200 \text{ nm}$; Sigma) を添加し、3日間培養を行った。遺伝子発現は SYBR[®] グリーンを用いたリアルタイム RT-PCR 法 (Bio Rad) にて解析を行った。細胞内シグナル分子のリン酸化解析はウェスタンブロット法により解析を行った。

【結果および考察】nano-HA 刺激により濃度依存的に BMP-2 mRNA 発現が増強した。同じ条件下では、BMP-3, -4, -7 mRNA 発現には有意な変化は見られず、これは BMP-2 に選択的なものであった同反応は p38/MAP kinase 阻害剤存在下で有意に抑制されるばかりでなく、nano-HA 刺激により p38/MAP kinase のリン酸化が誘導されることから、本シグナル経路の活性化が必須であることが示唆された。以上の知見は、nano-HA を歯周組織再生治療に応用する上で有用な研究基盤となると考えられる。

C-16
9:20
2504

歯周組織再生における異なる組織由来細胞シートの比較

妻沼 有香

キーワード: 歯周組織再生, 細胞シート, 歯根膜細胞

【目的】我々はイス 3 壁性骨欠損モデルに培養自家歯根膜細胞シートを β -3リン酸カルシウム (β -TCP) と共に移植し、顕著な歯周組織再生を示すことを報告した。本研究ではイス 1 壁性骨欠損モデルを用いて、歯根膜細胞、骨膜細胞、骨髄由来間葉系幹細胞の歯周組織再生能の比較検討を行った。

【材料および方法】4頭のビーグル犬より各々歯根膜細胞、骨膜細胞、骨髄由来間葉系幹細胞を採取した。各細胞を温度応答性培養皿に播種した後、5日間骨誘導培地で培養を行った。1壁性の骨欠損を左右の下顎第1大臼歯近心と第3小臼歯近心に作成した。異なる組織由来の各細胞シートを培養皿から回収し、露出した歯根面に自家移植した。骨欠損には β -TCP とコラーゲンの混合物を充填した。コントロール群には β -TCP とコラーゲンの混合物のみを充填した。移植後8週で屠殺・固定後、組織学的評価および解析を行った。

【結果および考察】歯根膜細胞シート移植群では他群と比べて顕著に厚い新生セメント質の再生と良好に方向づけられた歯根膜線維の再生が認められた。歯槽骨の再生率において、各群間に有意差は認められなかったが、歯根膜細胞群において最も高い再生率を示した。さらに歯根膜細胞シート移植群でのみ、再生した歯根膜組織の上部において抗神経線維タンパク抗体陽性の神経線維が確認された。これらの結果より歯根膜とセメント質再生において異なる組織由来の細胞に有意な違いがあり、歯根膜細胞と β -TCP/コラーゲンを組み合わせた治療は歯周組織再生に有効な手段となりうるということが示唆された。

C-15
9:10
2207

分極アパタイト上における骨芽細胞および破骨細胞挙動の比較

中村 美穂

キーワード: アパタイト, 破骨細胞, 骨芽細胞

【目的】ハイドロキシアパタイト (HA), β リン酸三カルシウム (β -TCP) に代表されるリン酸カルシウム系バイオマテリアルは、生体骨内に埋植すると周囲に骨形成を誘導するという骨伝導能を有する。我々の研究グループでは、骨芽細胞や破骨細胞機能を亢進させることを目的として、バイオマテリアルの結晶構造や表面特性を改質する研究を行った。

【材料および方法】HA, 炭酸含有 HA, β -TCP の緻密体試料を作製し、一部の試料について電気分極処理を行った。結晶構造等のキャラクターゼーションおよび各試料表面特性評価を行った。さらに、ヒト末梢血由来単核球を用いた破骨細胞評価、マウス骨髄細胞を用いた骨芽細胞評価を行った。

【結果および考察】表面特性評価より、HA の構造中に炭酸置換した炭酸含有 HA 表面、また、電気分極処理を施した表面では約2倍ぬれ性が向上したことが確認された。破骨細胞評価より、炭酸含有 HA 表面上では破骨細胞による明瞭な吸収窩が観察された。しかし、HA, β -TCP 表面上では明瞭な吸収窩が観察されなかった。前者では高結晶性であるため、後者では高溶解性であることが理由であると考えられる。骨芽細胞評価では、炭酸置換による変化はみられなかったが、電気分極処理面では接着・初期分化の亢進効果がみられた。これは、表面ぬれ性の向上により、接着斑形成が促進され、細胞接着能が亢進したためと考えられる。以上のことより、炭酸置換による構造変化および電気分極処理による荷電は、骨芽細胞・破骨細胞に効果を及ぼすことが確認された。

C-17
9:30
2299

侵襲性歯周炎は TLR2 遺伝子多型と関連する

高橋 茉莉香

キーワード: 侵襲性歯周炎, TLR2, 遺伝子多型

【目的】侵襲性歯周炎 (AgP) は全身的には健康であるが急速な歯周組織破壊を伴う歯周炎であり、家族集積性がみとめられることから、遺伝的要因の関与が示唆されている。日本人の AgP では *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) 感染も関与していると考えられている。今回我々は、Toll-like receptor (TLR) のうち、*Pg* の認識に関わる TLR2 に着目し、AgP との関連を検討した。

【材料および方法】いずれも日本人である AgP 患者 38 名および、一般健常者 190 名を対象とした。TLR2 遺伝子内に存在する single nucleotide polymorphism (SNP) のうち rs7696323 と rs3804100 を Tag SNP として選択し、PCR-RFLP 法によりそれぞれの遺伝子型を決定した。また、-196~-174 に存在する insertion/deletion (Ins/Del) 多型を PCR 法により同定した。これら3種の遺伝的多型をマーカーとして関連解析を行った。また、3者で構成する haplotype との関連についても permutation test で検討した。

【結果および考察】AgP への抵抗性が Ins/Del 多型における Ins アリル ($p=0.022$)、rs3804100 における T アリル ($p=0.018$) と有意に関連した。また、Ins/Del-rs7696323-rs3804100 の3者で構成する haplotype と AgP との関連を検討したところ、Ins-C-T haplotype が抵抗性と有意な関連 ($0.252 \text{ vs. } 0.479$, $p=0.0003$) を示した。Ins アリルは TLR2 高発現と関連することの報告があることから、TLR2 の高発現 haplotype が AgP への抵抗性と関連することが示唆された。

C-18
9:40
2504

SIP は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して OPG 遺伝子発現・骨芽細胞分化を促進する
平塚 俊志

キーワード: SIP, Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路, OPG
【目的】スフィンゴシン-1-リン酸 (SIP) は、細胞膜上の G タンパク質共役受容体に結合することにより、種々の細胞に対して、増殖、運動、形態調節、分化など多彩な作用を及ぼす脂質メディエーターとして注目されている。
近年 SIP が破骨細胞の regulator で、骨吸収抑制剤として使用できる可能性が見出された。しかしながら、SIP が骨芽細胞に及ぼす影響についての知見は少ない。そこで今回、SIP が骨芽細胞の遺伝子発現及び分化に及ぼす影響について検討した。
【材料および方法】実験にはヒト骨肉腫由来骨芽細胞株 SaOS-2 及びマウス頭蓋冠由来の骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。m RNA 発現については RT-PCR 法及び real-time RT-PCR 法を、タンパク質発現については ELISA 法及びウエスタンブロット法を用いて検討した。骨芽細胞の分化・石灰化についてはアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定、アリザリンレッド染色及び von Kossa 染色を用いて検討した。
【結果および考察】SIP の添加により osteoprotegerin (OPG) の mRNA 及びタンパク質発現が増加した。さらに Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路において重要な役割を果たす GSK-3 β 及び Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路の転写因子である TCF7L2 のタンパク質発現の増加を認めた。SIP の添加により、ALP 活性は増加した。また、アリザリンレッド染色及び von Kossa 染色において、石灰化結節の形成が増加した。以上の結果から、SIP は Wnt/ β -カテニンシグナル伝達経路を介して OPG 遺伝子発現・骨芽細胞分化の促進に関与することが示唆された。

C-20
10:10
2504

ヒト歯肉線維芽細胞における IL-6/sIL-6R 誘導性 Angiogenin 産生に血管新生阻害薬 Terrein が及ぼす影響
山本 大介

キーワード: Angiogenin, Terrein, IL-6/sIL-6R
【目的】慢性炎症の進展には毛細血管の新生が関与する。Angiogenin (Ang) は、Ribonuclease ファミリーに属するポリペプチドの一つであり、強い血管新生作用を有することが報告されている。しかし、歯周炎組織における Ang の動態は明らかではない。本研究では、慢性炎症期にヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) が IL-6 の刺激を受ける際の Ang 産生性を検討し、さらに抗血管新生作用を有する Terrein が Ang の産生に及ぼす影響を調べた。
【材料および方法】Terrein は Altenbach らの記載に従い合成した (岡山大学大学院自然科学研究科 萬代大樹博士提供)。HGF は、10% FBS 含有 DMEM を用いて培養した。Terrein ($\sim 1,000 \mu\text{M}$) の細胞毒性は、MTT 法および DAPI 染色による細胞数計測 (ArrayScan) にて検討した。また、HGF に Terrein ($\sim 50 \mu\text{M}$) を 30 分間作用させた後に IL-6/sIL-6R (各々 $\sim 50\text{ng/ml}$) を添加して 24 時間培養した。上清中の Ang は市販の ELISA キット (R&D) を用いて定量した。統計解析は Student's t-test を用いて検討した。
【結果および考察】HGF は、Terrein ($\sim 50 \mu\text{M}$) によって細胞障害を受けなかった。HGF は恒常的に Ang を産生しており、IL-6/sIL-6R (各々 $10\text{-}50 \text{ ng/ml}$) を添加するとその産生は亢進した ($p < 0.05$)。また、Terrein ($10 \mu\text{M}$) で前処理すると、Ang の産生は抑制された ($p < 0.05$)。以上から、Ang は歯周組織における慢性炎症の進展に関与し、Terrein は Ang の産生を抑制することによって歯周炎組織における幼若な血管新生を阻害して、慢性炎症の進展を抑制する可能性が示唆された。

C-19
10:00
2299

歯肉線維芽細胞を標的とした新規融合蛋白 IL-1ra-sgp130 の抗炎症効果の検討
澤田 俊輔

キーワード: IL-1, IL-6, 融合蛋白 IL-1ra-sgp130
【目的】IL-1 および IL-6 は、歯周病の悪化に関与するサイトカインである。一方、IL-1ra および sgp130 は、IL-1 および IL-6/sIL-6R のアンタゴニストとして抗炎症作用を有する。我々は、IL-1ra と sgp130 の作用を併せ持つ新規融合蛋白 IL-1ra-sgp130 (融合蛋白) を合成した。今回、歯肉線維芽細胞 (HGF) を標的として、融合蛋白による IL-1 および IL-6/sIL-6R 作用の抑制効果を検討した。
【材料および方法】ヒト由来間葉系幹細胞株 UE7T13 細胞の RNA を鋳型とし、IL-1ra および sgp130 の cDNA を得た。それぞれの cDNA を pFLAG-CMV-5a (SIGMA) に組み込み、融合蛋白発現ベクターを構築した。その後、FreeStyle293F 細胞 (invitrogen) に遺伝子導入を行い、発現させた融合蛋白をアフィニティーカラムによって精製した。標的細胞はヒト健康歯肉由来 HGF とし、融合蛋白の細胞障害性は細胞の形態観察および MTT 法によって調べた。融合蛋白を前処理した細胞に、IL-1 (1ng/ml , R&D) および IL-6/sIL-6R (各々 50ng/ml , R&D) を 48 時間作用させた。カテプシン L および VEGF の産生性は、WB 法あるいは市販の ELISA キット (R&D) を用いて調べた。なお、統計解析は Student's t-test を用いて検討した。
【結果および考察】新規に合成した融合蛋白 IL-1ra-sgp130 は、HGF における IL-1, IL-6/sIL-6R 誘導性のカテプシン L および VEGF 産生を有意に抑制した ($p < 0.05$)。このことは、融合蛋白は IL-1 と IL-6/sIL-6R による歯周炎症の進行を同時に抑制制御し得ることを示唆する。
研究協力者: 帖佐直幸 (岩手医科大学細胞情報科学分野)

C-21
10:20
2504

IL-22 は IL-1 β が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CCL20 産生を増強する
細川 義隆

キーワード: IL-22, CCL20, ヒト歯肉線維芽細胞
【目的】IL-22 は Th17 細胞が産生するサイトカインの一種である。また、CCL20 は CCR6 をレセプターとするケモカインであり、Th17 細胞の遊走に関与していることが明らかとなっている。本研究ではヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) の CCL20 産生に与える IL-22 の影響を解析する事を目的とし実験を行った。特に炎症性サイトカインの一つである IL-1 β と IL-22 の相乗効果に焦点を絞り、細胞内シグナル伝達機構も含め検討した。
【材料および方法】HGFs は健康人歯肉より out growth 法により分離した。HGFs の IL-22 receptor 発現は RT-PCR 法により、HGFs からの CCL20 産生は ELISA 法により、HGFs 内シグナル伝達分子発現に関しては western blot 法を用い解析した。
【結果および考察】HGFs は IL-22 receptor の mRNA を発現していた。また、IL-1 β が誘導した CCL20 産生を IL-22 は相乗的に増強した。IL-1 β と IL-22 が誘導した CCL20 産生は、p38 MAPK, ERK ならびに NF- κ B の inhibitor により抑制された。さらに、IL-1 β と IL-22 の共刺激により、HGFs 内の I- κ B α のリン酸化が亢進された。これらの結果より、IL-22 と IL-1 β は相乗的に HGFs からの CCL20 産生を増強することにより、歯周炎病変局所への Th17 細胞浸潤に関与している事が示唆された。また、これらの相乗効果に NF- κ B を介したシグナル伝達機構が関与していることが明らかとなった。

C-22
10:30
2203

歯周炎患者歯肉溝滲出液による *Tannerella forsythia* Forsythia Detaching Factor の分子量変化

呂 宗彦

キーワード：FDF, 歯肉溝滲出液 (GCF), 切断酵素活性

【目的】 *Forsythia Detaching Factor* (FDF) は *Tannerella forsythia* (T. f) が保有する病原因子の一つであり, T. f 超音波破砕物の精製により 60kDa フラグメントと, その ²⁶⁸Lys の C 末端側で切断された 28kDa フラグメントの二つの主要なフラグメントが存在することが報告されている。しかし歯周炎部位局所において, 60kDa フラグメントが切断され, 28kDa フラグメントが生じているかは不明である。本研究では, 歯周炎部位と健常部位の GCF 中に FDF を切断するプロテアーゼが存在するか否かについて比較検討した。

【材料および方法】 20 名の慢性歯周炎患者 (歯周炎部位: PPD-4 mm 以上, 健常部位: PPD-3 mm 以下) より GCF を採取した。FDF 切断部位アミノ酸配列を含む合成基質 (Arg-Ala-Lys-p-nitroaniline) を用いて, GCF 中の FDF 切断酵素活性を定量した。また recombinant FDF (rFDF) を GCF で処理した際の分子量変化を, SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて検討した。

【結果および考察】 GCF 中の切断酵素活性の定量を行った結果, 歯周炎部位は健常部位よりも有意に高値を示した。また SDS-PAGE の結果, GCF 処理により rFDF の切断および分解が起きていることが示された。以上の結果より, FDF は GCF 中で切断・分解され, それらの産物が歯周炎の進行に関与している可能性が示唆された。

C-23
10:40
2206

Porphyromonas gingivalis 感染により誘導される低酸素が歯肉上皮細胞に及ぼす影響

伊山 舜吉

キーワード：歯周病原細菌, 炎症, 低酸素

【目的】 生体における酸素濃度は, 細胞の様々な生物学的機能を制御していることが知られている。近年炎症反応によって組織の低酸素状態が惹起されることが各種炎症疾患にて, 明らかとなっている。しかしながら歯周炎における低酸素状態の局在や, 低酸素が歯周炎の病態形成に果たす役割については十分な知見が得られていない。そこで我々は, マウス歯周炎モデルを用いて炎症歯周組織における低酸素部位を明らかにするとともに, 低酸素状態が歯肉上皮細胞に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】 8 週齢 C57BL/6 マウスに *Porphyromonas gingivalis* W83 株 (10⁸CFU/匹) を 3 日毎に 10 回経口感染させることで, 歯周病モデルマウスを樹立した。屠殺の 1 時間前に pimonidazole を腹腔内に注射し, 組織の低酸素状態を抗 pimonidazole 抗体を用いた免疫化学染色にて検討した。また, 歯肉上皮細胞における低酸素への応答性を検討するため, ヒト歯肉上皮細胞株である epi4 を低酸素インキュベーター (5% O₂, 5% CO₂, 90% N₂) を用いて培養した。24, 48 時間後に IL-6, IL-8 の遺伝子発現を real-time RT-PCR にて検討した。

【結果および考察】 免疫化学染色の結果, 歯周病モデルマウスでの歯肉上皮に低酸素状態の亢進を認めた。また, real-time RT-PCR により, ヒト歯肉上皮細胞での低酸素下での IL-6, IL-8 の遺伝子発現の上昇を認めた。これらのことから, 歯周炎において, 歯肉上皮が低酸素状態に陥り, その結果として炎症反応が調節されうることが示唆された。