

一般演題口演

(A, B, C, D, E会場)

A 会場

A-01～08

B 会場

B-01～06

C 会場

C-01～08

D 会場

D-01～13

E 会場

E-01～05

5月31日(金) A会場 9:00～9:30
B会場 9:00～10:00
C会場 9:00～10:20
D会場 9:00～10:10

6月1日(土) A会場 11:40～12:30
D会場 11:40～12:30
E会場 11:40～12:30

A-01
0900
3101

粒子加速度を利用した流水式超音波菌垢除去器の
開発

滝口 尚

キーワード：超音波、粒子加速度、バイオフィーム

【目的】歯周炎、インプラント周囲炎の予防・治療には、バイオフィームの除去が欠かせない。特に進行したインプラント周囲炎に関しては、フィクスチャーが露出すると、多孔質に加工された数 μm の小窩を有する表面構造に微生物が入りこみ、菌ブラシや超音波スケーラーでは、微生物を十分に除去することは難しい。そこで今回我々は、微細構造へ超音波エネルギーを到達させるため、超音波の特徴である粒子加速度に着目し、流水中の水分子に加速度エネルギーを印加した流水式超音波洗浄法のブランク除去効果を検討した。

【材料および方法】使用機器は、超音波周波数400kHz、消費電力12W、水量300mL/分の条件で、60～180秒間、流水に超音波エネルギーを印加した。評価サンプルは、チタン試験片を組み込んだステントを3日間口腔内に保持し、試験片上にバイオフィームを形成させた。評価方法は、超音波照射前後の試験片を、走査型電子顕微鏡（SEM）とデジタルマイクロスコープにて観察・評価した。

【結果および考察】流水式超音波を180秒間試験片に作用させると、バイオフィーム残存率は、鏡面加工試験片で約19%、粗面加工試験片は約16%で術前（100%）と比較して有意に減少した。また、各試験片をSEMで観察すると、術前に観察された細菌塊が除去されていることが確認された。本研究から、粒子加速度を利用した流水式超音波洗浄法は各チタン試験片表面から微生物の除去が確認された。現在のところ、チタンの粗面加工部からのバイオフィーム除去に有効は手立てがない中で、本洗浄法は既存のバイオフィーム除去方法を補完することが期待される。

A-03
0920
3101

過酸化水素光分解殺菌技術を応用した新規歯周病
治療器の開発

菅野 太郎

キーワード：過酸化水素光分解殺菌技術、ヒドロキシルラジカル、可視光レーザーダイオード

【目的】深いポケットや根分岐部への歯周治療を、非外科処置のみで成功させるのは困難な場合が多い。これまでわれわれは、過酸化水素に405 nmの青色可視光レーザー光を照射することにより生成するヒドロキシルラジカルの強い酸化力を応用し、従来の非外科処置では治療困難な重度歯周病患者にも対応可能な新しい歯周病治療器の開発を目的に研究を行ってきた。本発表では、*in vitro*の研究結果を報告し、過酸化水素光分解殺菌技術の臨床応用への可能性を示すことを目的とした。

【材料および方法】過酸化水素光分解技術による、①生成するヒドロキシルラジカル量の計測、②口腔内細菌に対する殺菌効果の検証、③安全性の検証（ラットの口腔粘膜および全層皮膚欠損創への影響）、④耐性菌出現の可能性、について基礎的検討を行った。

【結果および考察】本殺菌技術では、光照射が行われている間のみヒドロキシルラジカルの生成が確認され、その生成量は、過酸化水素濃度・照射出力・照射時間・温度に依存することが明らかとなった。各種口腔内細菌の浮遊菌・バイオフィームモデルを用いた殺菌試験では、本殺菌技術は、非常に短時間で高い殺菌効果を発揮した。安全性の検証では、正常組織に異常所見が認められることもなく、且つ、創傷治癒促進傾向も認められた。また、本殺菌による耐性菌の誘導は起こらないことも示唆された。以上の基礎的検討の結果から、本殺菌技術を歯周病治療に応用することは可能であることが示唆され、今後、本殺菌技術を超音波スケーラーに組み込んだ新たな歯周治療器を提案していきたい。

A-02
0910
3101

大気圧温度制御プラズマによる口腔内細菌の殺菌
沖野 晃俊

キーワード：大気圧プラズマ、口腔内細菌、殺菌

【目的】ここ数年、大気圧プラズマを用いた材料の表面改質や殺菌の技術が研究されている。我々のグループでは、プラズマの温度を零下から150℃程度まで1℃以下の精度で制御できる温度制御プラズマを開発した。これにより、材料や生体にとって侵襲の低いプラズマ照射を可能にした。10%の酸素を含んだアルゴンプラズマでは、EZ2C培地上に播種した大腸菌に対して10秒の照射で4桁以上の殺菌を確認している。本研究の目的は、口腔内細菌の一つである齲蝕菌に対する殺菌能を評価することである。

【材料および方法】THB培地上に播種した齲蝕菌*S. mutans*等に様々なガスのプラズマを照射することで、各種ガスの殺菌効果を評価する。また、プラズマのガス温度を変えて、殺菌効果とガス温度の関係を調査する。さらに、紫外線を含むプラズマからの光のみを照射することで、殺菌の機序を調査する。

【結果および考察】ほとんど全てのガスにおいて、また、様々な温度のプラズマで*S. mutans*菌の殺菌を行うことができ、歯科治療機及び消毒機器への応用が可能であることが示された。また、プラズマからの光だけを照射しても十分に殺菌されなかったことから、プラズマ中のラジカルや高エネルギー粒子による殺菌であることが示唆された。

A-04
1140
2609

インプラント周囲炎と歯周炎では構成種と共起・
排除関係が異なる

丸山 緑子

キーワード：インプラント周囲炎、歯周炎、細菌叢解析

【目的】インプラント周囲炎は歯周病原細菌が関与するという報告もあるが、歯周炎の細菌叢との関与は不明である。本研究では、同一口腔内のインプラント周囲炎と歯周炎の細菌叢を16S rRNA遺伝子を標的としたパイロシーケンスを用いて解析し、細菌叢を比較することでその特徴を明らかにすることを試みた。

【材料および方法】Probing depth ≥ 4 mm、出血または排膿があり、X線写真上で骨吸収が存在するインプラント周囲炎と歯周炎に罹患している20名の患者を選択した。ポケットの最深部位から縁下プラークをペーパーポイントで採取した。DNA抽出後、universal primer で16S rRNA 遺伝子増幅し、増幅産物のパイロシーケンスを行った。

【結果および考察】全436,320本の配列（平均10,908本）を解析に用いた。インプラント周囲炎と歯周炎の種多様性および種構成に有意差は認められず、両部位からRed complexは検出されたが各種において差は見られなかった。しかし、各病態に特異的な細菌が存在し、インプラント周囲炎は歯周炎に比べて*Prevotella nigrescence*が、歯周炎はインプラント周囲炎に比べて*Peptostreptococcaceae* sp.と*Desulfomicrobium orale*が有意に多く検出された。また、両部位における、共起する種、排除する種の関係は明らかに異なっていた。すなわち、インプラント周囲炎と歯周炎は病態が類似した感染症であるが、環境の違いによって、起因する細菌種が異なるようである。このような細菌種が複合的に関与してインプラント周囲炎の発症に寄与すると考えられる。

A-05
1150
3101

抗菌光線力学療法を用いたインプラント周囲炎の
治療法に関する *in vitro* 研究

寺西 麻里奈

キーワード：インプラント周囲炎，抗菌光線力学療法，菌周病原細菌

【目的】近年，抗菌光線力学療法（antimicrobial Photodynamic Therapy：a-PDT）は，人体に対する為害作用が少なく，耐性菌が生じないことから，インプラント周囲炎の治療法としての臨床応用が検討されている。しかしながら，汚染されたインプラント体の殺菌法としてのa-PDTの有効性に対する*in vitro*における研究は極めて少ない。本研究は*in vitro*において，汚染されたインプラント体表面に対するa-PDTによる殺菌効果について検討を行うことを目的とした。

【材料および方法】①インプラント体の汚染処理：菌周病原細菌として *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43718株および *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277株を培養し，各培養液中にインプラント体（Zimmer Dental社）を24時間浸漬した。②実験群の設定：1）コントロール群：殺菌処置なし，2）MB群：メチレンブルー（MB）塗布のみ，3）Laser群：レーザー照射のみ，4）a-PDT群：MB塗布後レーザーを照射。レーザー照射には低出力半導体レーザー（PeriowaveTM，Periowave Dental Technologies社）を用いた。③評価法：インプラント体から菌を剥離させ，寒天培地および血液寒天培地にて培養し，コロニー数を比較した。また，電子顕微鏡によりインプラント体表面の形態変化を観察した。

【結果および考察】コントロール群，MB群，Laser群と比較してa-PDT群は生菌数の減少傾向が見られ，a-PDTはインプラント体表面のA.a, P.gに対して殺菌効果がある可能性が示唆された。

A-07
1210
3103

TGF-β2固定化チタンが骨形成に与える影響

鈴木 琢磨

キーワード：チタン，TGF-β2，トレシルクロリド法

【目的】現在，インプラント材料としてチタンが幅広く臨床応用されている。しかしながら，チタン材料自体には骨形成の促進や細胞の活性化亢進などの生体活性機能は認められない。臨床においてはさらに積極的に生体の治癒あるいは再生に関与できる生体活性型の材料の開発が求められている。

本実験では，骨形成因子として知られるTGF-β2をトレシルクロリド法により表面に固定化し，チタンが周囲骨組織にどのような影響を及ぼすのかを知るために，ラット実験モデルを用いて大腿骨に埋入したTGF-β2固定化チタン周囲の新生骨形成状態を組織学的に評価した。

【材料および方法】TGF-β2の固定化はトレシルクロリド法で行った。すなわちチタンにトレシルクロリドを37℃で2日間反応させた後，TGF-β2水溶液にトレシル化チタンを37℃で1日間浸漬してTGF-β2をチタン表面に固定化した。TGF-β2の固定化はFT-IRにより確認した。

動物実験には，6週齢の雄性Wistar系ラットを使用し，大腿骨に骨欠損を作製し試料を埋入した。埋入1，2，4週間後に，ラット大腿骨を回収し，骨形成状態をマイクロCTと組織学的に観察した。

【結果および考察】2週間後の試料では，TGF-β2固定化チタン周囲に骨様組織が形成され，アリザリンレッドS染色により骨様組織中に石灰化物が観察された。対象群では，チタン周囲に石灰化物は認められなかった。本実験において，Ti表面にTGF-β2を固定化することにより，Ti周囲に骨形成を促進させる可能性が示唆された。

A-06
1200
3101

抗菌光線力学療法を用いたインプラント周囲炎の
非外科的治療効果

成田 宗隆

キーワード：インプラント周囲炎，抗菌光線力学療法

【目的】インプラント周囲炎は，有病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。抗菌光線力学療法（a-PDT）は，インプラント周囲炎に対する新たな治療方法として注目されているが，エビデンスは十分ではない。そこで我々は，インプラント周囲炎に対するa-PDTによる治療効果をインプラント周囲組織の臨床パラメータと細菌検査から評価した。なお本研究は，明海大学歯学部倫理委員会において承認のもと実施した（承認番号：A1012）。

【材料および方法】明海大学病院歯周病科に来院した患者のうち，インプラント上部構造装着後2年以上経過したインプラント周囲炎患者17名（33本）を対象とした。縁上のブラークコントロール後，a-PDTはインプラント周囲ポケット内にメチレンブルー溶液（BiogelTM）を注入後，低出力半導体レーザー（PeriowaveTM，Periowave Dental Technologies社）のチップを挿入し，照射した。照射部位は頬舌側近遠心（4部位）で，照射時間は各部位60秒とし，1週毎に4回照射した。治療成績は治療前と2週後の臨床パラメータ（mPI, mBI, BOP, 排膿の有無，PPD）の結果，および細菌検査[総菌数，菌周病原細菌（P.g, A.a, T.d, P.i）数および対総菌数比率]から比較した。

【結果および考察】mBI, BOPおよびPPDは治療後に有意な改善を示し，総菌数および菌周病原細菌数は減少傾向を示した。以上より，a-PDTはインプラント周囲炎に対して有効性を示す可能性が示唆された。今後は観察期間や他の治療手段との併用療法について，更なる検討が必要である。

A-08
1220
3103

高気孔性PLGA/β-TCPスキャフォールドの骨増
生効果

吉田 崇

キーワード：β-TCP，PLGA，スキャフォールド，FGF2

【目的】β-トリリン酸カルシウム（β-TCP）は骨誘導能を有する吸収性セラミックである。今回，菌周組織再生用デバイスへの応用を目的として，気孔率90%以上のβ-TCPスキャフォールドを試作した。さらに強度向上のために生分解性プラスチックのポリ乳酸（PLGA）にてコーティング補強を行い，物性と骨増生効果を評価した。

【材料および方法】ポリウレタンフォーム（イノアックコーポレーション）にβ-TCP（富田製薬）を付着焼結したβ-TCPスキャフォールドを作製した（イノアック技術研究所より提供）。次に20%PLGA溶液を用いてβ-TCPスキャフォールドをコーティング処理した。コーティング前後のスキャフォールドの形態，細胞付着性，圧縮強度，および気孔率の変化を評価した。また，ラット背部皮下，頭蓋骨上へスキャフォールドおよびFGF2添加スキャフォールドを埋植して組織学的評価を行った。

【結果および考察】PLGA/β-TCPスキャフォールドのSEM観察にて，スキャフォールド表面に薄くPLGAコーティング層が形成され，β-TCPブロックの内部へも浸透していた。細胞付着性に変化は無く細胞親和性は良好と考えられた。圧縮強度はコーティングによって6倍に上昇，気孔率はほぼ同等であった。皮下埋植試験において良好な生体親和性と組織のイングロースを認めた。頭蓋骨上への埋植試験では，PLGAコーティングによって，さらにFGF2添加により，骨増生が促進された。PLGAコーティングすることで生体親和性・高気孔性を維持しながら，生体内で高いスペースメイキング効果が得られたことが示された。

B-01
0900
2504

イルソグラジンマレイン酸による歯肉上皮細胞の制御

宮川 剛史

キーワード：イルソグラジンマレイン酸、歯肉上皮細胞、抗炎症
【目的】イルソグラジンマレイン酸 (IM) は胃上皮細胞の恒常性維持に加え歯肉上皮細胞 (HGEC) の細胞間接着装置の発現低下の抑制やIL-8の発現増加の抑制を行う事をこれまでに報告してきた。本研究では、より詳細なIMの抗炎症効果を検討するため、他の炎症関連因子の発現に対するIMの影響について検討した。

【材料および方法】実験に用いたHGECは、智歯抜歯時にインフォームドコンセントを得た患者から歯肉を採取し分離培養したものを用いた。コンフルエントまで培養したHGECを、IM, ERK インヒビター PD98059, p38MAP kinase インヒビター SB203580によってそれぞれ前処理し、その後加熱死菌処理した *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (A.a) で刺激を加えた後に細胞を回収した。HGECの炎症関連因子の発現をリアルタイムPCR法、ELISA法、免疫染色法、ウェスタンブロッティング法によって解析した。

【結果および考察】HGECにA.a刺激を加えるとIL-6, MMP-3, ICAM-1の発現量は上昇するが、IMの前処理を行うとその発現増加は抑制された。またp38 MAP kinase インヒビターはIL-6及びMMP-3の、ERK インヒビターはMMP-3及びICAM-1の発現増加を抑制した。またラット歯肉に、A.a刺激を加える事で生じる接合上皮に見られるICAM-1の発現増加は、IMの前処理によって抑制された。IMはA.a刺激による細胞間接着装置の発現抑制を回復するだけでなく、炎症関連因子の発現増加を抑制することで炎症初期における歯肉上皮細胞応答を制御していることが示唆された。

B-03
0920
2504

低酸素状態が歯肉上皮細胞の炎症反応に及ぼす影響

伊山 舜吉

キーワード：炎症、低酸素応答、歯肉上皮

【目的】近年、炎症反応によって惹起された低酸素状態が、各種炎症性疾患の病態形成に関与することが明らかとなってきた。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、マウス歯周病モデルを用いて炎症歯周組織における低酸素部位を同定するとともに、低酸素状態が歯肉上皮細胞に及ぼす影響について検討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株を経口感染させることで、歯周病モデルマウスを樹立した。組織の低酸素状態は、pimonidazoleを用いた免疫化学染色法にて検討した。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epi 4を低酸素 (5%O₂) 下にて培養し、IL-1β誘導性IL-6, IL-8の遺伝子発現をreal-time PCR, タンパク産生をELISAにて検討した。さらにHIF-1αの活性化剤であるdeferrioxamine, 阻害剤であるchetomin, あるいはHIF-1αのsiRNAを用いて、IL-1β誘導性IL-6, IL-8発現変化におけるHIF-1αの関与について検討を加えた。

【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の歯肉上皮に低酸素状態の亢進を認めた。また、ヒト歯肉上皮細胞での低酸素下でのIL-1β誘導性IL-6, IL-8の発現抑制を認め、このメカニズムにHIF-1αが関与することが明らかとなった。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ることが示唆された。

B-02
0910
2504

TGF-β1が歯肉上皮細胞のアポトーシスシグナル、E-cadherinに与える影響

吉本 哲也

キーワード：TGF-β1、アポトーシスシグナル、歯肉上皮細胞

【目的】歯肉上皮細胞は細菌の侵入に対して物理的バリアーとして機能する一方、サイトカインを産生するなど歯周病の発症、進行に深く関与すると考えられる。これまでに *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 刺激によって歯肉上皮細胞のsmad2シグナルが活性化されることを報告した。TGF-β1はsmad2シグナルの重要な活性化因子であり、上皮細胞に対して上皮間葉移行やアポトーシスを誘導することが知られている。また接合上皮においても、TGF-β1の発現が報告されていることから、歯肉上皮細胞におけるTGF-β1シグナルを解明することは歯肉の初期炎症の機序の解明につながると考えられる。そこで、本研究では、歯肉上皮細胞へのアポトーシスシグナルまた細胞間接着へのTGF-β1の影響を明らかにすることとした。

【材料および方法】不死化したヒト歯肉上皮細胞OBA9 (大阪大学、村上伸也教授から供与) を使用し、TGF-β1を作用させた後、タンパクを抽出した。リン酸化smad2, アポトーシス抑制因子であるbcl2, bcl-xL, アポトーシス促進因子であるbax, bim, リン酸化bad, またcleaved caspase-9, -3, -7さらにE-cadherinをウェスタンブロット法によって評価した。

【結果および考察】TGF-β1は、リン酸化smad2の発現を増加した。その後、bax, bim, リン酸化badの発現を増加し、一方でbcl2, bcl-xLの発現は減少した。また、TGF-β1はcleaved caspase-9, -3, -7の発現を増加したが、E-cadherinの発現は減少した。以上のことから、TGF-β1はsmad2を介しアポトーシスシグナルを誘導すること、また歯肉上皮細胞接着を破壊することが示唆された。

B-04
0930
2504

再構成歯胚の萌出により形成された接合上皮は歯原性上皮に由来する

八島 沙羅

キーワード：接合上皮、歯原性上皮、再構成歯胚

【目的】以前より、接合上皮の起源が歯原性上皮である可能性が指摘されているが、歯原性上皮の特異的マーカーが存在しないことから確定的な報告はない。そこで今回、我々は、GFPマウスの歯原性上皮細胞を用いて、接合上皮が歯原性上皮由来であるか検討した。

【材料および方法】GFPマウス歯胚 (E15) より歯原性上皮組織を、WTマウス歯胚 (E15) より間葉組織を採取し、組織再構成を行い、GFP (+) の上皮・WTの間葉の張り替え歯胚を作成した。この歯胚を、事前に上顎第一大臼歯を抜歯し、治癒を確認したWTマウスの上顎第一大臼歯相当部に移植・萌出させた。その後、GFP陽性細胞の局在を観察することにより、接合上皮の由来を追求した。再構成による構造の変化が起こっていないことは、laminin5, integrinβ4, CK14の蛍光免疫組織化学で確認した。

【結果および考察】移植後40日 (萌出中) では、縮合エナメル上皮の縮合が進み、エナメル質と接する部分にGFP陽性細胞が存在した。移植後50日 (萌出完了) で、再構成歯が咬合面に達した。このとき、形成されていた接合上皮は、GFP陽性細胞が多くを占め、歯原性上皮由来であることが示された。また、これは、移植後80日 (萌出後1ヶ月) でも維持されていた。また、再構成歯、天然歯ともに、integrinβ4は接合上皮の全層と口腔上皮の基底層で、laminin5は接合上皮の歯と接する部分と口腔上皮の基底層で、CK14は接合上皮の全層と口腔上皮の基底層で、発現が確認され、再構成による構造の変化が生じていないことが示された。今後は、さらなる長期観察を続ける予定である。

B-05
0940
2504

ヒト歯肉上皮細胞におけるinterleukin (IL) -17
とIL-17受容体の発現プロファイル

宮内 小百合

キーワード：IL-17, 歯肉上皮細胞, 細菌感染

【目的】 Interleukin (IL) -17は歯周炎の病態形成に関連していることが示唆されている。IL-17ファミリーのうちIL-17Cは細菌感染によって腸管粘膜上皮より産生され、自然免疫の活性化および炎症応答の増強に働くことが近年報告された。本研究の目的は、歯肉上皮におけるIL-17CとそのレセプターとされるIL-17REを含むIL-17およびIL-17 receptor (IL-17R) ファミリーの発現、さらにIL-17Cにより誘導される応答について解析することである。

【材料および方法】 ヒト歯肉上皮不死化細胞株epi4（大阪大学大学院 村上伸也教授より供与）におけるIL-17Rファミリーの発現をRT-PCR法にて、各種抗原刺激によるIL-17ファミリーの遺伝子発現変動およびRecombinant IL-17A, IL-17C刺激時の各種遺伝子発現変動をreal-time PCR法にて解析した。

【結果および考察】 ヒト歯肉上皮細胞においてすべてのIL-17受容体が恒常的に発現していた。E. coli LPS, Pam3CSK4, IL-1 β , TNF- α 刺激によりIL-17Cの遺伝子発現が上昇したことから、歯肉上皮において細菌感染によりIL-17Cが産生され歯周炎の病態形成に関与することが示唆された。IL-17AおよびIL-17C刺激によりIL-6, MCP-1の遺伝子発現は共通して上昇したことからIL-17CにはIL-17Aと共通するシグナリング経路が存在することが考えられる。しかし遺伝子発現誘導における相違は、それぞれの異なる役割を示唆する。ヒト歯肉上皮におけるIL-17Cの働き、およびその受容体であるIL-17RE下流のシグナリングの解明を含め、さらなる検討が必要であると考えられる。

C-01
0900
2504

アルツハイマー病と歯周病との関連性に関する研究

石田 直之

キーワード：アルツハイマー病, *Porphyromonas gingivalis*, 歯周病
【目的】 現在、我が国における認知症の半数以上を占めるアルツハイマー型認知症 (AD) は、認知機能の障害発症前段階として脳内におけるアミロイド β (A β) の増加とその蓄積に起因する慢性疾患として捉えられている。また近年、糖尿病や脂質異常症などの生活習慣病とADの関連性が報告されている。本研究で、我々は歯周病がADの病態に及ぼす影響を検討するため、アルツハイマー病モデルマウスに*Porphyromonas gingivalis* (Pg.) を感染させた実験的歯周炎モデルを作製し、感染群と悲感染群における行動変化および脳内の病態を比較した。

【材料および方法】 62週齢アルツハイマー病モデルマウス (APP-Tgマウス) にPg. ATCC 33277株を口腔内投与し、実験的歯周炎を惹起した。Pg. 投与5週後にマウスの認知機能を評価するため行動試験を行った。その後、73週齢で屠殺し、脳、下顎骨を採取した。歯周炎惹起の確認は下顎骨をmicro-CTで撮影して行った。A β 量は、脳をホモジナイズしてELISA法にて定量した。加えて、脳内のA β 沈着を抗A β 抗体による免疫染色後、画像処理ソフトImageJを用いて解析した。

【結果および考察】 Pg. 投与群では、非投与群に比べてより高度な歯槽骨吸収を認め、歯周病の発症を確認した。Pg. 投与群では、行動試験においても認知機能の低下を認めた。また、脳内におけるA β の沈着面積はPg. 投与群で有意に広く ($p<0.01$)、A β 量も有意に高かった ($p<0.05$)。以上の結果より、歯周病はアルツハイマー病の病態増悪に関与している可能性が示唆された。

B-06
0950
2203

急性および慢性歯肉炎症における免疫抑制分子
B7-H1の関与

前川 祥吾

キーワード：B7-H1, 免疫抑制分子, 歯肉炎症

【目的】 歯槽骨吸収を指標とするマウス歯周病モデルでは、T細胞は病態増悪に働いている可能性がT細胞欠損マウスの実験から示されている。B7-H1 (CD274) はT細胞に発現する免疫抑制受容体PD-1のリガンドのひとつであり、種々の臓器炎症において末梢免疫寛容誘導に働いていることが報告されている。本研究では、歯肉上皮を含む角化上皮細胞にB7-H1を強発現させたトランスジェニックマウス (B7-H1tg) と全ての細胞におけるB7-H1を欠損させたB7-H1KOあるいはPD-1/B7-H1WKOマウスを用いて、歯周病原細菌によって誘導された歯肉炎症誘導におけるB7-H1:PD-1経路の関与を検討することを目的とした。

【結果および考察】 BALB/c野生型 (wt), B7-H1tg, B7-H1KO, あるいはB7-H1/PD-1WKOマウスに、ヒト歯周病患者より分離した高病原性Pg.菌株 (TDC60) を歯肉に塗布あるいは上皮内注射を行い、急性および慢性炎症を誘導した。B7-H1tgでは、未感染でも歯肉浸潤細胞の減少が認められ、感染7日後における明らかな細胞浸潤と炎症性サイトカイン発現抑制が認められた。感染7週間においては、Pg.菌株特異的IgG抗体価の顕著な増強と歯槽骨吸収の抑制が認められた。B7-H1欠損マウスでは、Pg.菌によって誘導される急性期の組織学的炎症は顕著に増強されていた。7週間におけるPg.菌株特異的IgG抗体価はwtと差が見られないものの、Pg.菌感染による歯槽骨吸収は明らかに抑制されていた。以上のことから、歯肉上皮および免疫細胞に発現されるB7-H1は、急性期炎症、抗体産生、および歯槽骨吸収において異なる関与をしている可能性が示唆された。

C-02
0910
2402

IL-6受容体抑制治療中の関節リウマチ患者の歯
周状態

小林 哲夫

キーワード：関節リウマチ, サイトカイン標的療法, 歯周状態

【目的】 インターロイキン-6 (IL-6) 受容体を標的とした生物学的製剤は、関節リウマチ (RA) 治療において高い寛解率が報告されている。そこで、IL-6受容体抑制治療中のRA患者の歯周状態ならびに血清サイトカイン濃度の変動を解析した。

【材料および方法】 インフォームドコンセントが得られ、IL-6受容体抑制治療中のRA患者30名に、ベースライン時と8週後に歯周検査、RA検査、血液採取を行った。血清中のIL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ-3 (MMP-3)、抗CCP抗体レベルをELISA法にて測定した。対照群として、IL-6受容体抑制治療を受けていない29名のRA患者も同様の検査・測定を行った。

【結果および考察】 ベースライン時では血清IL-6レベル以外は全ての指標・測定値において有意な群間差は見られなかった。ベースラインからの変化量を解析した結果、治療群では対照群と比べて、GI, BOP, PD, CALの有意な改善と血清IL-6, MMP-3レベルの有意な減少を認めた。ブランクコントロールレベルを含めた他の指標・測定値では有意な群間差は認められなかった。更に、治療群では、血清MMP-3レベルがBOPと、抗CCP抗体レベルがPDおよびCALと各々有意な正の相関を認めた。以上から、IL-6受容体抑制治療中のRA患者では、血清MMP-3レベルと抗CCP抗体レベルの歯周状態への影響が示唆された。

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)

C-03
0920
2402

Porphyromonas gingivalis 菌性感染が誘導する早産
発症過程における Galectin-3 の役割

敖 敏

Keyword: *P. gingivalis*, Preterm birth, Galectin-3

【Aim】: Epidemiological studies revealed a link between periodontal disease and preterm delivery of low birth weight (PTLBW), however, the mechanism remain unclear. This study was aimed to estimate the influence of *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) on PTLBW using a *Pg* dental infection mouse model and further investigated the detailed mechanism by *in vitro* study.

【Materials & Methods】: *In vivo* experiment: 8-wks-old ♀ C57Bl/6J mice were infected with *Pg*-w83-strain (10^8 CFU) from the pulp chamber (*Pg*+). Mating was started at 6wks post-infection when periapical granuloma was established. Gestational day (gd) and birth weight were examined and placental tissues were harvested for IHC staining and PCR on gd15. Serum, placental tissue and amniotic fluid were collected for ELISA of cytokines. Uninfected mice were used as negative control (*Pg*-).

In vitro experiment: HTR-8 (trophoblast), HuhT1 (endothelial cell) and THP1 (monocyte) cell lines were used to assess the effect of *Pg* /*Pg*-LPS. 【Results】: *Pg*+ showed 2days of preterm birth ($p<0.01$) and low birth weight ($p<0.01$). The amnion-epithelium was damaged in *Pg*+ and trophoblasts and endothelium became degenerative. Moreover, galectin-3 (an immune regulator) suffused the whole placental tissue and dramatically increased in amniotic fluid ($P<0.01$). The weaker immuno-expression of CD-31 indicated endothelial damage and immuno-expression of COX-2 and TNF- α increased in placental tissue of *Pg*+. *Pg* was detected in placental tissue. *Pg*-LPS up-regulated the expressions of COX-2, TNF- α and galectin-3 in HTR-8, HuhT1 and THP1 cells. Moreover, recombinant galectin-3 stimulation further increased expressions of them.

【Conclusions】: Dentally applied *Pg* reaches placental tissue through blood circulation and induces PTLBW in which galectin-3 acts as an important immune regulator.

C-05
0940
2402

ラット実験の歯周炎は TNF- α が誘導する炎症反
応を活性化し大動脈における単球の接着を増加さ
せる

宮島 真一

キーワード: TNF- α , 動脈硬化, NF- κ B, 単球

【目的】炎症は動脈硬化の形成と密接な関係にあり、慢性炎症である歯周炎が動脈硬化と関連するという疫学的報告や実験的報告は数多く存在するが、その詳細な機序は明らかでない。そこで我々はラットに実験的歯周炎を惹起し大動脈に及ぼす影響を検討したので報告する。

【材料および方法】7週齢雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットの上顎左右第二臼歯歯頸部にナイロン糸を結紮し、実験的歯周炎を惹起した。無処置のラットを正常群とした。歯周炎惹起4週間後に屠殺し、歯肉における遺伝子発現解析および病理組織学的評価、また歯槽骨の μ -CT解析を行った。大動脈においては遺伝子発現解析、免疫染色による病理組織学的評価を行った。

【結果および考察】歯周炎群は正常群と比較し、歯肉において TNF- α , IL-6 遺伝子発現の有意な上昇と炎症性細胞浸潤および歯槽骨の吸収を認めた。

歯周炎群において血清中の白血球数は有意に増加した。大動脈において TNFR1, VCAM-1, TNF- α 遺伝子発現の有意な上昇を認めた。また大動脈における免疫染色において NF- κ B および VCAM-1 陽性細胞数の有意な増加を認めた。さらに、大動脈表層に接着する単球の有意な増加を認めた。

これらの結果により、歯周炎は TNF- α が誘導する炎症反応を介して動脈硬化を惹起する重要な役割を担っている可能性が示唆された。

C-04
0930
2402

Porphyromonas gingivalis 感染による心筋梗塞後の
心室リモデリングの悪化

始平堂 由佳

キーワード: 歯周病原細菌, 心筋梗塞, 心室リモデリング

【目的】慢性炎症は心血管疾患の進行に重要な役割を担う。歯周病は慢性炎症性疾患であり、心血管疾患との強い関連性が報告されている。また歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) が心血管疾患患者の冠動脈や血栓のアテローム斑より検出されているという報告がある。しかし、心筋梗塞後の心室リモデリングにおける *Pg* の影響については知られていない。そこで本研究では *Pg* に感染させたマウスに実験的に心筋虚血を起こし、心筋梗塞後の心室リモデリングに対する影響を評価した。

【材料および方法】マウスの背部皮下にチャンバーを埋入し、その14日後から 10^8 CFU/mL の *Pg* の懸濁液を 0.1mL, 週1回, 計3回投与した。対照群には PBS を投与した。チャンバー埋入から21日間後にマウスの左前下行枝を結紮し、心筋梗塞モデルを作製した。モデル作製の14日後で心エコー測定を行い、また心臓を採取して病理組織学的分析を行った。

【結果および考察】カプランマイヤー法にて生存率を比較したところ、*Pg* 感染群では対照群と比較して生存率が悪化していた。心エコーにおいて *Pg* 感染群では、左室内径短縮率が減少していたことから、心機能の低下が示唆された。病理所見より、*Pg* 感染群では心室における線維化の亢進が観察された。以上の結果から、*Pg* 感染が心筋梗塞後の心室リモデリングを悪化させることが示唆された。

C-06
0950
2504

タバコ煙が *Porphyromonas gingivalis* と歯肉上皮細胞との相互作用に及ぼす影響

今村 健太郎

キーワード: 喫煙, 歯肉上皮細胞, 遊走能

【目的】喫煙は歯周病の重大なリスクファクターである。喫煙が歯周組織に及ぼす影響については、主にニコチンを中心に研究がなされてきた。しかし、タバコ煙が宿主細胞に及ぼす影響、とくに歯周病原細菌の存在下における影響については、未だ明らかにされていない。そこで本研究では、タバコ煙と *Porphyromonas gingivalis* 感染がヒト歯肉上皮細胞の機能、とくに増殖能および遊走能に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】ヒト歯肉上皮細胞 Ca9-22 を 10% FBS 添加 MEM にてコンフルエントに達するまで培養した。任意の濃度のニコチンまたはタバコ煙抽出液 (CSC) を 24h 作用させた後、細胞の生死をトリパンブルー排除試験、細胞増殖能を WST-1, 遊走能を wound healing assay にて評価を行った。細胞形態の変化は、共焦点レーザー顕微鏡 (CSLM) にて解析した。以上の実験は、*P. gingivalis* ATCC 33277 の感染下 (MOI= 100, 2h) でも行った。

【結果および考察】喫煙者の唾液中濃度に相当するニコチン濃度の範囲において、Ca9-22 の増殖能に変化は認められなかった。CSC 濃度 0.1-50 μ g/ml では遊走能に濃度依存性の促進が認められ、CSLM では細胞骨格に変化が観察された。250 μ g/ml (ニコチン濃度約 6.0 μ g/ml) 以上の CSC 濃度では遊走能の抑制が認められたことから、CSC は濃度により上皮細胞に二相性の影響を及ぼすことが示唆された。一方、*P. gingivalis* を感染させると遊走能は全体的に抑制され、CSC による促進傾向は認められなかった。以上より、タバコ煙の歯肉上皮細胞への影響は *P. gingivalis* 感染により修飾されることが示唆された。

C-07
1000
2203

Methanobrevibacter oralis およびヒトのグループ II
シャペロニンに対する免疫応答の解析

平井 公人

キーワード：古細菌, 自己免疫応答, シャペロニン, CCT

【目的】重度の歯周炎局所で検出率の高い古細菌である *Methanobrevibacter oralis* (*M. oralis*) のシャペロニン (Cpn) とヒトのグループ II Cpn である CCT が相同性の高い分子であることから, *M. oralis* の Cpn が自己免疫応答を誘導している可能性ある。そこで, *M. oralis* の Cpn ならびにヒト CCT サブユニットに対する免疫応答性を解析した。

【材料および方法】1. 被験者血清：歯周病患者 30 人, 自己免疫疾患患者 31 人, および健康者 18 人から採取した。2. 抗原：市販されているサブユニット CCT1, CCT5, CCT6, そして HSP60, さらに下記の方法で合成した CCT3, CCT4, CCT8, および *M. oralis* の Cpn を使用した。3. リコンビナントタンパクの構築：サブユニット CCT3, CCT4, CCT8 および *M. oralis* の Cpn をコムギ胚芽無細胞タンパク合成技術により合成した。4. 免疫応答の解析：ドットプロット法とウエスタンプロット法により免疫応答の解析を行った。

【結果および考察】CCT3, CCT4, CCT8 に対して健康者群よりも患者群で血清反応性が高いため, 同サブユニットが自己抗体の標的となっていることが示唆された。さらに今回の結果からは HSP60 に対してどの患者群も血清反応性が非常に弱かったことから, CCT の方が自己免疫応答を誘導しやすいことが示唆された。*M. oralis* の Cpn に対しては健康者を含む全ての被験者群で強い血清反応を示すものが多かった。これは全身に分布する古細菌の Cpn との交差反応によるものと考えられる。

D-01
0900
2205

in vivo において PDGFBB は PDGFR α 陽性細胞の
遊走を促進させる

森川 暁

キーワード：再生医学, 成長因子, 骨芽細胞

【目的】歯周病による骨欠損部への再生療法が普及してきている。この再生の足場として人工骨を補填することがあるが, 骨への置換には間葉系幹細胞や骨芽細胞前駆細胞の人工骨内への遊走もしくは増殖が必要となる。これまでに人工骨内への細胞遊走を期待し様々な成長因子について解析が多くなされてきているが, その成長因子の中には骨芽細胞分化を抑制する因子があることが知られている。そこでわれわれは細胞遊走を促進しかつ骨芽細胞分化を抑制しない成長因子を探すことにした。

【材料および方法】In vitro：マウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1) を BMP-2 単独, BMP-2 および PDGFBB, HGF, FGF2, TGF β をそれぞれ添加し 72 時間培養後に定量的 PCR で解析した。また, この細胞抽出液を用いて Western blot 法によってタンパクレベルでの MAPK (Erk, p38, JNK) の発現について解析した。In vivo： β -TCP に 2 μ g の PDGFBB を添加し, それをマウス大腿筋内に埋入した。埋入後 3 日, 7 日の時点で屠殺, β -TCP を摘出し免疫組織学的に解析を行った。

【結果および考察】骨芽細胞分化マーカーである ALP, OCN, RUNX2, および OSX の発現から, PDGFBB が HGF, FGF2, TGF β と比較して骨芽細胞分化を抑制することなく細胞遊走を促進させることを見出した。そして, In vivo で PDGFBB は間葉系幹細胞/骨芽細胞前駆細胞の表面マーカーである PDGFR α 陽性の細胞を β -TCP 内に強力に遊走させることがわかった。以上より PDGFBB は骨芽細胞の分化を抑制することなく宿主の細胞を β -TCP 内に遊走させることが示唆された。

C-08
1010
2203

比較ゲノム解析から見出された *Tannerella*
forsythia 特異的生存戦略

遠藤 亜希子

キーワード：歯周病原細菌, CRISPR, 全ゲノム解析

【目的】*Tannerella forsythia* は Red Complex の 1 つであるが, 一般的に培養が難しいことから, 病原性発現機構だけではなく, 口腔内での性状すらほぼ解明されてない。また菌の性状を明らかにするうえで重要なゲノム情報も実験室株の ATCC 株 1 株に限られている。そこで, 2 株の臨床分離株の全ゲノム配列を決定し, 比較ゲノム解析から, 本菌の生存戦略や進化機構を予測した。

【材料および方法】臨床分離株 2 株のゲノム DNA を新型シーケンサーに供試し, 得られた配列情報を基に全ゲノム塩基配列を決定, 既知の ATCC43037 と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, 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。

【結果および考察】本種では, 臨床分離株においても頻繁なゲノム再編成は認められず, 病原性に関与すると考えられる遺伝子は 3 株で全て保存されていた。また, SNP 解析の結果, 同義置換より非同義置換を多く起こす遺伝子を多数保有している事が判明した。CRISPR 解析の結果, 本菌の CRISPR は他の歯周病原細菌からの DNA の侵入を阻害していることが示唆された。つまり本菌は, ゲノム再編成をほとんど起こさない, 固有の遺伝子セットを保存する傾向にある, 他種からの遺伝子伝播も阻害する, 保有する遺伝子の非同義置換により進化する, ということが明らかになった。

D-02
0910
2206

有糸分裂期転写因子は間葉系細胞の表現型を制御
する

高井 英樹

キーワード：遺伝子発現, 転写因子, 骨芽細胞

【目的】骨再生医療の確立は骨形成前駆細胞の生物学的特性を調節する機能が重要である。骨形成前駆細胞は, 組織構成に必要な細胞数を生成するために有糸分裂細胞周期を経ている間, 骨表現型を維持しなければならない。近年, 骨芽細胞を用いた研究にて, 細胞分裂時に Runx2 mRNA の発現が増加している事がわかってきている。これは骨芽細胞が骨表現型を維持するのに Runx2 が重要な因子である事が考えられた。しかしながら, 細胞分裂期中の他の転写因子の発現についてはまだ報告されていない。そこで我々は骨芽細胞を用いて細胞分裂期中の転写因子 mRNA 量およびタンパク質量の検索を行った。

【材料および方法】MC3T3-E1 は α MEM で 80% コンフルエントまで培養し, 100ng/ml ノコタゾールにて 18 時間培養後, 細胞を回収し, 様々な転写因子 mRNA 量およびタンパク質量の検索を行った。さらに siRNA を用いて骨芽細胞特異的な転写因子タンパク質を抑制後, 細胞を回収し, 様々な転写因子 mRNA 量の検索を行った。

【結果および考察】骨芽細胞が細胞分裂時に骨表現型を維持するために, Runx2, Runx3, Satb2 および Msx2 が重要である事を明らかにした。さらに siRNA を用いた結果から, 骨芽細胞で重要な転写因子 (Runx2, Runx3, Satb2 および Msx2) を抑制すると, Dlx3 mRNA の発現を上昇させ, Sp7 mRNA の発現を減少させた。このことから, 骨芽細胞は骨芽細胞から前骨芽細胞に誘導されたと考えられた。

D-03
0920
2504

アメロジェニン会合タンパクのプロテオーム解析
豊田 敬介

キーワード: Amelogenin, GRP78 / BiP, プロテオーム

【目的】 歯周組織の再生にエナメル基質タンパク質 (EMD) が用いられ良好な治療結果が報告されている。しかしながら歯周組織の再生機序についての詳細は明らかとなっていない。そこで、我々は EMD の 90% 以上を占める主要成分であるアメロジェニンに注目し、その結合タンパク質の解析を行い再生機序の検討を行った。

【材料および方法】

○1 胎生マウス cDNA から GST 融合アメロジェニンを作成し、さらに rmAMEL (recombinant murine amelogenin) を精製した。

○2 共焦点顕微鏡にて骨芽細胞 (SaOS-2) への rmAm の取り込みを経時的に観察した。

○3 骨芽細胞 (SaOS-2) を可溶性分画と膜分画に分けて GST pull down assay を行い、アメロジェニン会合分子について 2 次元泳動で検討した。CBB 染色で可視化後、主要な会合蛋白スポットをゲルから切り出し、MALDI-TOF MS 分析を行った。

【結果および考察】 rmAMEL が骨芽細胞への取り込まれることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した。骨芽細胞におけるアメロジェニン会合分子のプロテオーム解析において、可溶性分画では細胞骨格系・分子シャペロンが多数検出されたが、膜分画では小胞体関連タンパクが多く含まれていた。その中で ER シャペロンである Grp78 / BiP のみが細胞質および膜分画の両方で検出され、さらに *in vitro* の両者の会合を Western blot で確認した。近年、小胞体ストレスと骨形成の関与が報告されている。Grp78 / BiP は ER だけでなく細胞膜にも発現しているため、アメロジェニンの取り込みおよび小胞体ストレスを介した骨形成への関与について解析を進めてゆきたい。

D-05
0940
2504

セメント芽細胞において細胞外カルシウム刺激は PGE₂/EP4 を介して Fibroblast growth factor-2 の発現を増強する

金谷 聡介

キーワード: セメント芽細胞, FGF-2, 細胞外カルシウム, EP4

【目的】 セメント芽細胞はセメント質の修復に重要な役割を果たしている。我々はこれまでに、細胞外 Ca²⁺ は、サイクリック AMP (cAMP) / プロテインキナーゼ A (PKA) 依存的に Fibroblast growth factor (FGF) -2 の発現を増強することを明らかにした。さらに、細胞外 Ca²⁺ がセメント芽細胞のプロスタグランジン E₂ (PGE₂) 産生を誘導することを見出した。本研究では FGF-2 発現増強に対する PGE₂ の関与について解析を行った。

【材料および方法】 マウスセメント芽細胞は、Somerman 博士 (National Institutes of Health (NIH)) が樹立した細胞 (OCCM-30) を用いた。細胞外 Ca²⁺ (10mM) 刺激は、DMEM 培地に CaCl₂ を添加することにより行った。遺伝子発現の解析は SYBR を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて行った。

【結果および考察】 CaCl₂ 刺激はシクロオキシゲナーゼ (COX) -2 遺伝子発現を亢進し、さらに PGE₂ 産生を誘導した。COX-2 阻害剤 (NS-398) で細胞を前処理すると、FGF-2 遺伝子発現の増強が有意に抑制された。この抑制は、PGE₂ 受容体である EP4 に対する作動薬 (ONO-AE1-329) を添加することにより完全に解除された。また、EP4 阻害剤 (ONO-AE3-208) で細胞を前処理したところ、FGF-2 遺伝子発現の増強が有意に抑制された。一方、CaCl₂ による FGF-2 遺伝子発現の亢進は、EP4 作動薬を添加することにより相乗的に増強された。以上の知見は、FGF-2 の発現増強は PGE₂/EP4 を介することを示唆するもので、細胞外 Ca²⁺ と EP4 作動薬によるシグナルは、新たな歯周組織再生のメカニズムとして有用と考えられる。

D-04
0930
2504

脳由来神経栄養因子 (BDNF) はヒト血管内皮細胞の炎症性サイトカイン発現を制御する

大日方 祐介

キーワード: BDNF, 炎症性サイトカイン, ヒト血管内皮細胞

【目的】 脳由来神経栄養因子 (BDNF) は歯周組織再生に有用であることが、近年の研究から明らかになっている。また炎症の治療機転には再生現象が関与し、逆に再生医療を成功に導くためには炎症性サイトカインなど多くの分子制御が必要であると考えられる。本研究は、ヒト血管内皮細胞 (HMVEC) の炎症性サイトカイン発現に及ぼす BDNF の影響を検討することとした。

【材料および方法】 1. 細胞: HMVEC (LONZA, Walkersville, MD) を EBM-2 培地 (LONZA) で培養後、5 代継代細胞を以下の実験に供した。2. 培養: 培養終了 6 時間前に IL-1β (10 ng/ml) を無血清下で作用させた。さらに IL-1β 添加 0, 3, 6, 18 時間前に HMVEC を BDNF (1, 10, 50, 100 ng/ml) で前処理した。3. 炎症性サイトカイン関連遺伝子発現: HMVEC から総 RNA を回収、精製した後、IL-6, IL-8, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 の mRNA 発現を real-time PCR 法を用いて解析を行った。

【結果および考察】 BDNF は IL-1β によって誘導された IL-6, IL-8, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 の mRNA 発現促進を抑制した。本研究から、BDNF は HMVEC における炎症反応の制御に関与している可能性が示唆された。

D-06
0950
2504

歯周組織再生における骨髄間葉系幹細胞移植の担体としての PLGA の有用性の検討

藤田 貴子

キーワード: 歯周組織再生, 骨髄間葉系幹細胞, PLGA

【目的】 骨髄間葉系幹細胞 (MSC) は移植された局所において歯周組織構成細胞へ分化し、歯周組織再生を促進することが明らかになっている。しかし、水平性骨欠損などの大規模欠損では、移植細胞を 3 次元的に保持し、セメント質・歯周靱帯を伴う歯槽骨再生を速やかに誘導する必要があると考える。そこで本研究は、形態維持能力をもち生体適合性がある Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) の MSC 移植における担体としての有用性を検討した。

【材料および方法】 1. 細胞: 腸骨由来ヒト MSC (理研, 東京) を、継代数 7 で以下の実験に供した。2. 培養: 2 × 4 × 5 mm サイズの PLGA block (GC, 東京) に MSC を播種後 10 % 胎児血清添加 DMEM (培地 A) 中で 1 日静地培養し、培地 A および培地 A に 50 mg/ml Ascorbic acid, 10 mM β-glycerophosphate, 0.1 mM Dexamethasone を添加した骨分化培地中で 37℃ にて回転培養した。3. 細胞接着: 培養 1 日後、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて PLGA への MSC の接着を観察した。4. 骨関連タンパク質発現: RNA iso[®] によって PLGA block を溶解し、PLGA 内の MSC から総 RNA を抽出し骨分化マーカー遺伝子の発現を real-time PCR 法にて解析した。

【結果および考察】 培養 1 日目に PLGA block 内において MSC の PLGA への接着および細胞の伸展が SEM で観察された。また、PLGA block 中の MSC は骨分化誘導によって骨関連タンパク質の mRNA 発現が促進された。以上の結果から、PLGA block を担体として MSC を生着させた移植体は大規模な歯周組織欠損を再生するため有用である可能性が示唆された。

D-07
1000
2504

Platelet-rich fibrin (PRF) との複合化によるヒト培養骨膜シートの骨形成活性の亢進

堀水 慎

キーワード：培養骨膜シート, Platelet-rich fibrin, スキャホールド

【目的】これまで我々は顎顔面領域の骨再生療法において培養骨膜シートとともにPlatelet-rich plasma (PRP) を移植し、顕著な治療成果を挙げてきた。近年開発されたPlatelet-rich fibrin (PRF) は、PRPと同様に血小板とその増殖因子を多く含む臨床応用が進んでいる。さらにPRFのフィブリンメッシュは3次元構造がスキャホールドとして有効であるという報告もある。そこで我々は、PRFをスキャホールドとしてin vitroで培養骨膜シートを複合化することを着想し、その有効性を検証した。

【材料および方法】ヒト歯槽骨より採取した骨膜片を14日間組織片培養培養骨膜シートを作製した。これをヒトPRF上に生着させ、さらに14日間培養した。この複合体を組織学的に評価するとともに、ヌードマウス背部皮下および頭蓋骨骨欠損部へ移植し、骨形成活性を組織学的、X線学的に評価した。

【結果および考察】in vitroではPRF内部へ多数の細胞が侵入し、細胞周囲にコラーゲン沈着が観察された。また骨膜片とPRFとの界面にはALP陽性細胞の高密度集積がみられ、石灰化物沈着が増加した。移植部位では、背部皮下のPRFは分解され厚いコラーゲン層に置換されており、頭蓋骨骨欠損部の新生骨量は増加した。これらの現象は増殖分化促進された細胞がフィブリンメッシュの上に膜状に集積し、骨膜の形成層 (cambium layer) によく似た環境を作り出しているためと考えている。

D-10
1150
2504

低酸素状態が歯根膜細胞のPLAP-1発現に及ぼす影響

山本 智美

キーワード：歯根膜細胞, PLAP-1, HIF-1 α

【目的】組織の低酸素状態に対する応答は、低酸素誘導因子 (HIF-1) の活性化を介して、組織の恒常性維持や再生過程において重要な役割を担うことが報告されている。一方で、我々の研究室では歯根膜特異的分子であるPLAP-1が歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担うことを明らかにしてきた。そこで本研究では低酸素状態が歯根膜特異的分子であるPLAP-1の発現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】ヒト歯根膜細胞を低酸素下 (1%O₂) にて培養し、PLAP-1遺伝子発現をreal-time PCR法にて検討した。また、Deferoxamineを用いてHIF-1 α を活性化した際のPLAP-1の発現についてreal-time PCR法およびWestern Blottingにて検討した。さらにHIF-1 α の阻害薬ケトミンあるいはsiRNAを用いてHIF-1 α を抑制した際のPLAP-1発現に及ぼす影響について解析を加えた。

【結果および考察】ヒト歯根膜細胞を低酸素下にて培養することによりPLAP-1の遺伝子発現の上昇を認めた。また、Deferoxamine刺激によりHIF-1 α 発現の上昇を確認するとともに、PLAP-1分子の発現上昇を認めた。低酸素誘導性のPLAP-1発現は、ケトミン存在下あるいはHIF-1 α siRNA導入により有意に抑制された。以上の結果から低酸素下にて歯根膜細胞はHIF-1 α 依存性にPLAP-1の発現を誘導することが明らかとなり、PLAP-1が歯根膜細胞の低酸素応答に関与する可能性が示唆された。

D-09
1140
2504

IL-6はIL-1 β が誘導するヒト歯根膜由来細胞のCCL20産生を増強する

細川 義隆

キーワード：IL-6, CCL20, ヒト歯根膜由来細胞

【目的】Th17細胞が歯周炎の病態に関与している事が報告されている。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。本研究ではヒト歯根膜由来細胞 (HPDLC) のCCL20産生に与えるIL-6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-6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】HPDLC上のgp130およびIL-6R発現をflow cytometry法により、HPDLCからのCCL20産生をELISA法により、STAT3のリン酸化をwestern blot法を用い解析した。

【結果および考察】HPDLCは細胞表面にIL-6Rを発現しておらずgp130のみ発現していた。IL-6/sIL-6R刺激はHPDLCのIL-1 β 誘導CCL20産生を増強した。また、IL-1 β は高濃度のIL-6産生を誘導し、IL-1 β 存在下にsIL-6Rを加えるとCCL20産生が増強された。また、IL-1 β とIL-6/sIL-6R刺激においてHPDLC内のSTAT3リン酸化が亢進しており、STAT3阻害剤でIL-1 β とIL-6/sIL-6Rが誘導したCCL20産生は抑制された。この結果より、IL-6 trans-signalingはIL-1 β が誘導するCCL20産生を増強する事により歯周炎病変局所へのTh17細胞浸潤に関与している可能性が示された。また、IL-6 trans-signalingが増強するIL-1 β 刺激HPDLCからのCCL20産生にSTAT3を介したシグナル伝達経路が関与している事が示された。

D-11
1200
2504

ヒト歯根膜細胞伸展刺激による骨形成タンパク質-2 (BMP-2) の発現誘導

鈴木 理紗子

キーワード：細胞伸展刺激, BMP-2, ヒト歯根膜細胞

【目的】歯根膜は、圧縮力、伸展力、および振動・衝撃力などの機械的刺激に常に晒されている組織である。ヒト歯根膜 (hPDL) 細胞は、これら機械的刺激を生化学的反応へ変換することにより歯根膜を含む歯周組織の恒常性を維持していると考えられている。しかし、そのメカニズムは十分に解明されていない。本研究は細胞伸展刺激下における増殖因子の発現に与える影響を解析した。

【材料および方法】ヒト歯根膜組織より得られたhPDL細胞をI型コラーゲンでコートしたチャンバーでコンフルエントまで培養し、その後、細胞伸展装置STB-140 (Strex Co.) を用いて、1/60 Hz、5%伸展率の条件下で6時間刺激を行った。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】細胞伸展刺激により、BMP-2 mRNA発現が増強した。同発現誘導は、転写阻害剤actinomycin D存在下で抑制されたが、タンパク合成阻害剤cycloheximide存在下での抑制はみられなかった。このことから、その発現には新生タンパク合成は必要とせず、また転写レベルでの制御であることが示唆された。また、同反応はERK/MAP kinase 阻害剤 (PD98059) 存在下で有意に抑制されるばかりでなく、細胞伸展刺激によりERK/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。以上の知見から、細胞伸展シグナルによりBMP-2が誘導され、歯根膜を含む歯周組織の恒常性維持において機能している可能性が示唆された。

D-12
1210
2299

マウスのCD49f陽性顎下腺細胞が発現する成長因子の探究

池田 淳史

キーワード：唾液腺, activin, follistatin

【目的】唾液は、口腔内環境を保つ重要な働きを担っている。しかし、その唾液を分泌する唾液腺は、通常自己再生能を持たず、一度障害を受けると機能回復は難しい。近年、唾液腺中の排泄導管の上皮細胞にCD49fを発現している細胞が存在し、内胚葉系の様々な臓器の細胞へと分化する能力を持つことが報告された。本研究は、CD49f陽性細胞の性質解明のため、この細胞の成長因子、特にactivinとfollistatinの発現量の変化を調べることを目的とした。

【材料および方法】マウス顎下腺組織から、磁気ビーズ法で分離した直後のCD49f陽性細胞と陰性細胞の全RNAを用いて、PCRアレイを行った。そこで差のあったInhibin β_B と、これに関連した同じactivin構成分子であるInhibin β_A 、activinに拮抗するFollistatinのタンパク質発現量を、分離した直後のCD49f陽性細胞、陰性細胞およびKeratinocyte Serum Free Mediumで培養したCD49f陽性細胞を用いてウエスタンブロット法で比較検討した。

【結果および考察】INHIBIN β_A 、INHIBIN β_B 、そしてFOLLISTATINの発現量は分離直後のCD49f陽性細胞よりも、培養したCD49f陽性細胞の方が多かった。このことから、分離直後のCD49f陽性細胞は、分離直前の組織の状態を反映してACTIVINを分泌し、無用な増殖を抑制した状態であり、一方、本培養条件では、CD49f陽性細胞がFOLLISTATINを産生することによって、細胞増殖を行っていると考ええる。以上から、CD49f陽性細胞のactivin-follistatin相互作用は唾液腺の細胞増殖に関与していることが示唆された。

E-01
1140
2499

Porphyromonas gingivalis 口腔感染はマウス腸内細菌叢を変動させインスリン抵抗性を誘導する

山崎 和久

キーワード：口腔細菌, 腸内細菌, メタボリックシンドローム

【目的】歯周疾患は様々な全身疾患と関連することが報告されている。関連メカニズムとして歯周病変部を介した菌血症、局所で産生された炎症性サイトカインによる全身の軽微ではあるが持続的な炎症の誘導、分子相同性を介した免疫応答などが挙げられているが、いずれも決定的とは言えない。我々は嚥下した細菌による腸内細菌叢の変化とそれに伴う代謝性内毒素血症が有力な原因であるという仮説を立て、これを検証した。

【材料および方法】6週齢のC57BL/6マウスにCMセルロースに懸濁した*P. gingivalis* W83株あるいは基剤のみを週2回口腔より接種し、5週間後にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験、血中インスリンレベルについて測定した。また、腸内細菌叢については感染終了後に開腹し、回腸より採取した糞便よりRNAを抽出し、PCR増幅した16S rDNAの配列を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。

【結果および考察】グルコース負荷試験、インスリン負荷試験の結果*P. gingivalis* 口腔感染によりインスリン抵抗性が誘導されることが明らかになった。空腹時血中インスリンレベルは感染マウスで高い傾向が示されたが、統計学的有意な差ではなかった。腸内細菌叢は感染群と対照群において分類学上の門のレベルでは有意な違いは認められなかったが、下部の階層まで解析するといくつかの目や科において興味深い違いが認められた。高脂肪食接種と同様、歯周病原細菌の嚥下により、腸内細菌叢が変化することが明らかになった。我々はこのことが歯周疾患と様々な全身疾患を関連づける有力な経路であると考ええる。

D-13
1220
2105

齲蝕と歯周疾患のリスク評価の検討（第1報）

金子 至

キーワード：齲蝕, 歯周疾患, リスク評価

【目的】唾液検査等に基づいた齲蝕と歯周疾患のリスク評価から、個々の病態に応じたより合理性のあるメンテナンスをおこなう。【材料および方法】当院では、1995年から唾液検査等の資料を基に齲蝕と歯周疾患のリスク評価を行い、メンテナンス期間や処置内容を決めていた。しかし、資料を有効活用するためにデータベース化する必要があると考え、その際、今までのリスク評価に用いていた項目や項目ごとの重み付けの妥当性を再検討した。方法：多変量解析（数量化理論1類）を用いて、妥当と思われる全ての項目を選択した場合と、最適な項目を選択した場合の2通りについて解析した。最適な項目の選択にはstepwise法を用いた。

齲蝕病態（DMF 歯数）は301例、対象者の年齢は 46.3 ± 12.7 歳、現在歯数は 26.3 ± 4.0 本だった。歯周病病態（平均PPD）はペリオチェックを「している」151例、対象者の年齢は 47.0 ± 13.8 歳、現在歯数は 26.3 ± 4.1 本だった。

【結果および考察】齲蝕病態（DMF 歯数）は、全項目を選択した場合の予測寄与率が33%、平均値も中央値もほぼ同様で、比較的正規分布に近かった。多変量解析にstepwise法を適用した場合の予測寄与率は31%であった。歯周病病態（平均PPD）は、全項目を選択した場合の予測寄与率が47%で悪い方へ歪んでいた。多変量解析にstepwise法を適用した場合の予測寄与率は46%であった。上記2方法の解析結果に大きな有意差はなかったが、妥当と考えられる全項目の合計点数によるリスク評価がより合理的であると考えられた。この結果を基に、データベース化に向けてさらに検討したいと考える。

E-02
1150
2499

Porphyromonas gingivalis 口腔感染マウスモデルで誘導されるインスリン抵抗性は脂肪組織及び肝臓における炎症反応と関連する

有松 圭

キーワード：口腔細菌, メタボリックシンドローム, インスリン抵抗性

【目的】動脈硬化性疾患や糖尿病は歯周疾患と強い関連を持つことが報告されている。インスリン抵抗性はいずれの疾患に対してもリスク因子として作用することが明らかとなっている。しかし歯周疾患のインスリン抵抗性誘発メカニズムの詳細は明らかになっていない。我々は口腔細菌嚥下により生ずる代謝性菌血症がインスリン標的臓器において炎症を引き起こすことでインスリン抵抗性を誘発するという仮説を立て、これを検証した。

【材料および方法】6週齢雄のC57BL/6マウスにCMセルロースに懸濁した*P. gingivalis* W83株あるいは基剤のみを週2回口腔より接種した。5週間後に脂肪組織及び肝臓を採取し、炎症性サイトカイン発現とインスリンの標的遺伝子であるGLUT4, G6Pase, Pepck等の糖代謝関連遺伝子及びタンパクの発現量を解析した。

【結果および考察】感染群の脂肪組織、肝臓、血清中の炎症性サイトカイン発現は上昇していた一方、血中の糖を取り込むことで血糖値を下げる作用を持つGLUT4の遺伝子発現は脂肪組織において有意に低下していた。さらに、糖を合成し、血糖値を上げる作用を持つG6Paseの遺伝子発現が肝臓において有意に上昇した。以上のことから、*P. gingivalis* 口腔感染により、全身性に炎症性サイトカインが誘導され、糖代謝関連遺伝子の発現が変化することにより、インスリン抵抗性が惹起される可能性が示唆された。

E-03
1200
2402

歯肉におけるインスリン抵抗性の発現にプロテインキナーゼCおよび酸化ストレスが及ぼす影響
水谷 幸嗣

キーワード：インスリン抵抗性、肥満、歯肉

【目的】近年、糖尿病やメタボリックシンドロームが歯周病のリスク因子であることが明らかにされ始めているが、その詳細なメカニズムは不明な点も多い。そこで、歯肉におけるインスリン抵抗性発現の有無と、その機序を検討した。

【材料および方法】肥満によるインスリン抵抗性モデル動物のZucker Fatty (ZF) ラットと対照動物 (Zucker Lean: ZL) の下顎臼歯部の辺縁歯肉を採取し、プロテインキナーゼC (PKC) の活性と、炎症性マーカーならびに酸化ストレスマーカーのmRNAレベルの発現を比較した。また、ex vivoにてインスリン刺激を行い、Akt, Erk, 血管内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) の活性化レベルによってインスリンシグナリング阻害の評価を行った。

【結果および考察】ZF群は有意に高い体重、および血中のインスリン濃度、遊離脂肪酸、CRPを示したが、両群とも歯槽骨吸収量に差は見られなかった。歯肉を解析したところ、ZF群でPKCの活性が有意に高く、また酸化ストレスマーカーの発現も有意に高いレベルであった。さらに歯肉へのインスリン刺激を行ったところAktおよびeNOSのリン酸化が対照群に比べて有意に低かった。しかしながら、PKC阻害薬、抗酸化剤の存在下ではAkt, eNOSのリン酸化が一部回復をした。

本研究により、初めて歯肉におけるインスリン抵抗性が定量的に分析され、肥満状態での歯肉におけるインスリンシグナルの阻害は血管内皮も含めて生じていることが判明した。そして、その阻害にはPKC活性化および酸化ストレスが関与していることが示唆された。

E-05
1220
2599

LPS刺激マクロファージ共存下マウスメサングウム細胞における発現遺伝子の網羅的解析
箸方 厚之

キーワード：歯周炎、慢性炎症、腎症、マクロファージ浸潤

【目的】糖尿病性腎症 (腎症) の成因として、従来から高血糖に基づく代謝異常が最重要であると唱えられてきた。一方、腎症患者の糸球体には高度なマクロファージ浸潤が観察され、腎固有の細胞との相互作用の結果、炎症が惹起され腎症の進行が促進される可能性が指摘されている。さらに、欧米の疫学研究で歯周炎と腎症の関連性を示唆する結果もある。そこで、本研究では歯周炎と腎症の関連性についての分子基盤を明らかにするために、低濃度LPS刺激条件下の糸球体メサングウム細胞とマクロファージの共培養系におけるメサングウム細胞の遺伝子発現解析を試みた。

【材料および方法】マウス糸球体メサングウム細胞株CRL-1927とマウスマクロファージ由来細胞株RAW 264.7を用いた。両細胞を液性因子のみが移動可能なトランスウェルシステムで共培養し、両細胞をE. coli LPS (1ng/ml) 刺激後、0, 4, 8, 12, 24時間後のメサングウム細胞のmRNAと培養上清を回収した。DNAマイクロアレイ法にて各時間におけるメサングウム細胞の遺伝子発現を解析し、発現遺伝子群をLPS未刺激の細胞におけるそれらと比較した。発現が明らかに亢進しているものを抽出し、リアルタイムPCR法、ELISA法にて遺伝子発現とタンパク質産生量の検証を行った。

【結果および考察】DNAマイクロアレイにおいて、LPS刺激下共培養のメサングウム細胞では、CXCL5などの炎症性ケモカイン産生に関与する遺伝子発現が亢進した。また、腎症との関連が指摘されているLipocalin2の発現が遺伝子、タンパク質レベルで顕著に増加した。包括的な解析結果を、報告する。

E-04
1210
2206

最終糖化産物が歯肉線維芽細胞における酸化ストレス反応に及ぼす影響

梶浦 由加里

キーワード：最終糖化産物、歯肉線維芽細胞、酸化ストレス

【目的】歯周病は糖尿病の第6番目の合併症であり、糖尿病関連歯周炎では通常の歯周炎と比較して病態の重篤化が認められる。一方、糖尿病関連歯周炎患者では血液中の酸化ストレスマーカーが高値であり、糖尿病患者では糖尿病合併症の原因因子である最終糖化産物 (advanced glycation end-product: AGE) の血中レベルが上昇する。しかしながら歯肉組織局所における糖尿病関連歯周炎の病態やAGEの作用については明らかではない。そこで本研究では、培養歯肉線維芽細胞におけるAGEの酸化ストレス反応および抗菌ペプチド発現に及ぼす影響について検討を行った。

【材料および方法】ヒト歯肉組織片から線維芽細胞を分離し、培地にPorphyromonas gingivalis由来Lipopolysaccharide (P-LPS) およびAGEを添加し一定期間培養した後、細胞からDNAとRNAを抽出した。酸化ストレスマーカー (8-OHdG) および抗酸化酵素 (HO-1)、サイトカイン (IL-6) や抗菌ペプチド (S100A8, S100A9, β -defensin2) の発現をELISA法およびRT-PCR法にて調べた。

【結果および考察】歯肉線維芽細胞においてP-LPSは8-OHdGの発現を有意に増加させ、AGEは8-OHdG発現を増加させる傾向を示した。HO-1, IL-6と β -defensin2の遺伝子発現はP-LPSとAGEの共存下で強く発現した。一方、S100A8とS100A9の発現はP-LPSにより増加したが、AGEとの共存下ではその増加が抑制された。これらの結果から、AGEはP-LPSとともに歯肉線維芽細胞の酸化ストレス反応を誘導し、抗酸化酵素、サイトカインおよび抗菌ペプチドの発現に影響を及ぼすことが示唆された。