

一般演題口演

(B会場)

B会場

O-01～22

5月15日(金) B会場 9:00～10:20
B会場 14:00～15:00

5月16日(土) B会場 8:30～ 9:50

O-01

Red-Complex 細菌数と歯周病の罹患率および重症度との関係

2302

千ヶ崎 乙文

キーワード：Red-Complex, 歯周病原細菌, *Porphyromonas gingivalis*
【目的】 Red-Complex と呼ばれる *P. gingivalis* (*Pg*), *T. denticola* (*Td*), *T. forsythia* (*Tf*) と歯周病臨床検査値との関連について、わが国では健常者を含んだ大規模な調査はほとんど報告されていない。演者らは2007年に一般歯科医院に来院した患者を対象に歯周病の状態および唾液中の細菌の検出割合について報告し、本研究では同一データを用いて唾液中のRed-Complex細菌数と歯周病の臨床値との関連について解析した。

【材料と方法】 2003年から2006年に茨城県の某歯科診療所に初診患者として来院し、過去6か月以内に歯周治療を受けておらず、3か月以内に抗歯周薬の服用歴がない者992名を対象者とした。ブロービングポケットデプス (PPD)、ブロービング時の出血 (BOP) を計測し、エックス線写真から平均歯槽骨吸収量を算出した。刺激唾液を採取し、Real-time PCR法を用いてRed-Complex 3菌種の定量を行った。4mm以上のPPD部位の割合5%以上、BOP陽性部位の割合5%以上、平均骨吸収量1.5mm以上、の全てを満たす者を歯周病罹患者と定義し、細菌数との関連について解析した。

【結果と考察】 被検者の平均年齢40.0 ± 10.0歳、平均現在歯数27.7 ± 2.7本、喫煙者の割合16.4%であった。歯周病罹患者の割合は40.2%であり年齢階級の上昇とともに増加した。*Pg*は全被検者の45.9%で検出され、歯周病の罹患率および重症度と有意な関連が認められた。*Td*でも有意な関連は見られたが、関連の程度は*Pg*の方が顕著であった。*Tf*との関連は乏しかった。

【結論】 Red complexの中で、*Tf*量は歯周病の罹患率および重症度との有意な関連は認められなかったが、*Td*量では有意な関連が認められ、*Pg*量ではさらに強い関連が認められた。

O-03

宿主反応に着目した、歯周基本治療後の治癒遅延に影響を及ぼす因子の解析

2599

関 善弘

キーワード：レスポンス診断, 予後評価, 基本治療

【目的】 歯周基本治療後の残存するブロービング深さ (PPD) とさらなる付着喪失との相関性が報告されている。ブラークコントロールをベースにした歯周基本治療を行うことで、歯周組織に著大な改善が得られることから、個々の口腔に合わせた効果的な基本治療を施行する必要がある。近年、基本治療における歯周ポケット減少の基準値が報告され、注目を集めている。先行研究によって、ブラッシング後のブラーク残存率と基本治療後のPPD値との関係、および同部位のブラーク除去法の重要性については報告されている。しかしながら、ブラーク以外の因子がどの程度基本治療後のPPD値の改善に影響を及ぼすのか、未だに見解の一致をみていない。このため本研究では、非ブラーク因子と残存するPPD値の関連について定量的な解析を行った。

【材料と方法】 ブラークの影響を除外するため、ブラークコントロール値 (PCR値) 10%以下を維持している患者群を抽出した。歯周基本治療における歯周ポケット減少の基準値 (横田誠ら, 日歯周誌, 第25巻1号) を参照しながら、初診時と再評価時のポケットの測定値を比較した。ポケット減少基準値外にあるものを治癒遅延群と判定し、ポケット減少率とその原因について詳細な解析を行った。

【結果と考察】 ブラークの影響を除外しても咬合や、不良補綴物などさまざまな項目で歯周基本治療に対して治癒遅延に影響を及ぼすことから、ブラーク誘発型歯周炎と、非ブラーク誘発型歯周炎が存在することが示唆された。

【結論】 治療効率の高い基本治療を行うために、宿主反応に着目して、ブラーク誘発型歯周炎と非ブラーク誘発型歯周炎とに区別する必要があると考えられた。

O-02

歯周基本治療による歯肉溝滲出液中のLDL, 酸化LDLの変動

2504

石塚 元規

キーワード：歯肉溝滲出液, LDL, 酸化LDL

【目的】 LDLや酸化LDLは動脈硬化症の危険因子であり、歯周病との関連が注目されている。当研究室ではこれまでに、健全歯周組織の歯肉溝滲出液 (GCF) 中にLDL, 酸化LDLが存在することを初めて見出し、糖尿病患者GCF中のLDL, 酸化LDL濃度が健常者に比べ、有意に高いことも報告している。LDLと酸化LDLは歯周病の病態と相関することが推測され、歯周病診断の新たなマーカーとなりうる可能性がある。そこで本研究では、歯周基本治療 [スケーリング・ルートプレーニング (SRP)] によるGCF中のLDL, 酸化LDL変動を解析した。

【材料および方法】 昭和大学歯科病院歯周病科に通院する慢性歯周炎患者を対象に、GCF採取を行った。糖尿病、脳・心臓疾患、悪性腫瘍、骨粗鬆症の患者は対象者から除外した。GCFは、同一被験者から健全部位 (PD < 3mm, BOP (-)) と歯周病罹患部位 (PD ≥ 4mm) を上顎前歯・小臼歯部より選択し、歯周治療開始前、SRP処置後4、8週後にそれぞれペーパーポイントを用いて採取を行った。GCF中のLDLと酸化LDLの測定は、抗apoB抗体、抗酸化PCモノクローナル抗体を用いてサンドイッチELISA法にて行った。なお、本研究は昭和大学歯学部医の倫理委員会承認の下遂行した (承認番号2014-006号)。

【結果および考察】 歯周病罹患部位から採取したGCF量、GCF中のタンパク濃度およびLDL・酸化LDLの濃度は、健全部位に比べ高値を示した。また、SRP処置後4週の時点で、GCF中のLDLおよび酸化LDL濃度は減少した。これらの結果より、GCF中のLDLおよび酸化LDLは、歯周病に伴う歯周組織の傷害の状態を示すマーカーとして有用性が示唆された。

O-04

glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP) は歯周炎を抑制する

2402

鈴木 佑基

キーワード：glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP), GIP受容体欠損マウス, 実験的歯周炎

【目的】 近年、2型糖尿病のインスリン分泌障害に対する新たな治療戦略としてインクレチンと呼ばれるホルモンが注目されている。インクレチンの一つであるGIPは、インスリン分泌促進作用、膵β細胞容積の増加作用、グルカゴン分泌促進作用など膵内作用と、脂肪蓄積促進作用などの膵外作用が知られている。さらに脂肪細胞に対する抗炎症作用も報告されているが、他の組織に対する抗炎症効果は明らかではない。本研究では、GIPの歯周炎に対する影響を検討する目的で、GIP受容体欠損マウス (GIPKO) に実験的歯周炎を惹起し、歯周炎の状態を解析するとともに、GIPの抗炎症作用についてヒト急性単球性白血病細胞株であるTHP-1細胞を用いて検討した。

【方法】 8週齢の雄性 GIPKOと野生型マウス (WT) の半数に対し、上顎左側第二臼歯歯肉間部にリガチャーワイヤー (Nilaco 0.10mm) を留置し、実験的歯周炎を惹起し、歯周炎誘導後2週間後に歯肉における遺伝子発現解析、組織学的評価を行った。THP-1細胞にGIPを添加しプレインキュベーションした後、LPS (Lipopolysaccharide) を添加し、遺伝子発現解析した。

【結果】 GIPKO歯周炎群は、WT歯周炎群に比較し有意なTNF-αおよびiNOS遺伝子発現の増加を認め、炎症性細胞浸潤はより顕著であった。また、Mac-1陽性マクロファージの著明な増加を認めた。THP-1細胞はLPS添加によりTNF-αおよびiNOS遺伝子発現が有意に増加したが、GIPはLPSによるTNF-αおよびiNOS遺伝子発現を濃度依存的に抑制した。

【考察】 本研究より、GIPが歯周炎に抑制的に作用していることが示唆された。

O-05

Loeys-Dietz 症候群モデルマウスの作製と解析

2901

津島 賢一郎

キーワード：ロイスディーツ症候群，マルファン症候群，侵襲性歯周炎，TGF- β

【目的】TGF- β 受容体 (TGFBR) 遺伝子変異によって発症するロイスディーツ症候群 (LDS) は，マルファン症候群 (MFS) と共通の所見を伴う常染色体優性遺伝疾患である。我々は，侵襲性歯周炎実態調査において，侵襲性歯周炎を伴った LDS 患者を見出した。近年，MFS と歯周炎の関連については報告がなされているが，LDS については報告がなされていない。そこで我々は，同患者の遺伝子変異を再現したノックイン (KI) マウスを作製し，表現型解析を行った。

【材料および方法】遺伝子変異を導入したノックインベクターを構築し，通法により KI マウスを樹立した。KI マウスからゲノム DNA を抽出し，PCR 法により遺伝子型を決定した。WT および KI マウスの線維芽細胞 (MEFs) を胎生 13.5 日の胎仔から分離し，樹立した。同 MEFs を無血清培地で 24 時間培養し，その後 TGF- β にて刺激した。抽出した全 RNA を用いリアルタイム PCR 法によって TGF- β 誘導性遺伝子である PAI-1 発現量を検討した。

【結果と考察】KI マウスのヘテロ接合体は正常に出生したが，ホモ接合体は出生しなかった。同ヘテロ接合体は繁殖可能で，見かけ上は正常であったが，生後 180 日までの生存日数を調べたところ，WT マウスに比べ早世である傾向が認められた。また，MEFs を TGF- β で刺激することにより，KI 群では WT 群と比べて PAI-1 の発現上昇が低くなることを認めた。

【結論】今回作成した KI マウスにおいては，TGF- β シグナルに変異をきたし，致死的变化をもたらすことが示唆された。今後は，同 KI マウスを用いて実験的歯周炎モデルを作製し，TGF- β シグナルが歯周組織の恒常性維持に及ぼす影響について検討を行う予定である。

会員外研究協力者

森崎隆幸（国立循環器病研究センター）

O-07

脂肪細胞分化過程における PLAP-1 の機能解析

2504

阪下 裕美

キーワード：PLAP-1，3T3-L1 細胞，脂肪細胞分化，siRNA

【目的】近年，歯周病と肥満病態との関連性が示唆されているが，両病態を結びつけるメカニズムの詳細については，未だ不明な点が多い。一方，歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担う分子である PLAP-1 について，我々はこれまでに歯根膜だけでなく脂肪組織においてもその発現が認められること，PLAP-1 ノックアウト (KO) マウスにおいては高脂肪食誘導性の肥満病態が抑制されることを明らかにしてきた。そこで，本研究では，脂肪前駆細胞が脂肪細胞へと分化する過程における PLAP-1 の機能の一端を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞を isobutyl-methylxanthine (IBMX)，dexamethasone (DEX)，insulin 存在下に培養することで脂肪細胞分化誘導を行い，PLAP-1 の発現動態をリアルタイム PCR 法にて検討した。また，脂肪前駆細胞から脂肪細胞へ分化する際に細胞内に蓄積される脂肪滴を Oil Red O により染色し，定量解析を行った。さらに small interfering RNA (siRNA) を用いて 3T3-L1 細胞における PLAP-1 の発現を抑制した。同細胞株を脂肪細胞分化誘導した際の脂肪細胞分化関連遺伝子の発現動態をリアルタイム PCR 法にて検討し，脂肪滴の蓄積を Oil Red O 染色により検討した。

【結果と考察】リアルタイム PCR 法の結果，3T3-L1 細胞の脂肪分化誘導により分化初期で PLAP-1 の発現が上昇した。さらに，3T3-L1 細胞の PLAP-1 発現を抑制することで，脂肪細胞関連遺伝子の発現が低下し，脂肪滴の形成も低下した。

【結論】3T3-L1 細胞においては，PLAP-1 の遺伝子発現を抑制することで，脂肪細胞への分化が抑制されることが明らかとなった。

O-06

CCL19-CCR7 経路がエネルギー消費に及ぼす影響に関する検討

2499

佐野 朋美

キーワード：CC Chemokine receptor 7，CC Chemokine Ligand 19，脂肪組織，エネルギー消費

【目的】近年，マクロファージに加え樹状細胞による脂肪組織の炎症への関与やケモカインシグナルとインスリン抵抗性との関連が注目されている。一方，歯周病の重症化においては循環血中活性化樹状細胞が増加するという報告がある。前回大会では，*in vitro*，*in vivo* の肥満モデルにおいて，活性化樹状細胞を誘引する CC Chemokine Ligand 19 (CCL19) の遺伝子発現，血清中濃度の増大を認めたこと，また，CCL19 の受容体である CC Chemokine receptor 7 (CCR7) 欠損マウスにおいて，高脂肪食誘導性の肥満およびインスリン抵抗性の発症が抑制されたことを報告した。今回，CCR7 欠損マウスが高脂肪食負荷による肥満およびインスリン抵抗性発症の抑制に至るメカニズムについてさらに詳細な検討を行った。

【材料と方法】通常食あるいは高脂肪食を負荷させた野生型および CCR7 欠損の計 4 群のマウスを使用した。食餌負荷開始から 15 週後に冷刺激下での直腸温を測定し，16 週後に各マウスを解剖し，肝臓，脂肪，筋組織における各種遺伝子発現量，血清中タンパク濃度について，リアルタイム PCR 法および ELISA 法にて解析した。

【結果と考察】高脂肪食負荷群において，CCR7 欠損マウスでは，野生型マウスに比べ有意に直腸温が高く，また，通常食群でも同様の傾向が認められたことから，CCR7 欠損マウスでは野生型マウスに比べ熱産生が亢進していることが推察された。

【結論】肥満モデルにおいて CCL19 の遺伝子発現および血清中濃度が増大しているという前回の結果と合わせて，CCL19-CCR7 経路がエネルギー消費に影響を及ぼし，結果的に肥満ひいてはインスリン抵抗性の発症に関与している可能性が示唆された。

O-08

糖尿病患者における歯肉出血の改善効果についての検討

2504

阪本 貴司

キーワード：糖尿病，歯肉出血，ブラークコントロール，GBI，改善効果

【目的】糖尿病患者の歯肉縁上のブラーク除去（以下ブラークコントロール）による歯肉出血の改善効果を検討することを目的として糖尿病患者と健常患者の Gingival Bleeding Index (G.B.I.) を比較した。

【材料および方法】本発表は同意を得た 17 名の患者を対象とし，治療後の検査データを使用した後ろ向き調査である。17 名のうち 7 名は内科で糖尿病と診断された患者（男性 5 名，女性 2 名，平均年齢 63.1 歳）であった。非糖尿病患者の 10 名は特記すべき内科的疾患に罹患していない健常者（男性 5 名，女性 5 名，平均年齢は 58.8 歳）とした。初診時の G.B.I. 値，清掃指導後の G.B.I. 値，指導前後の G.B.I. 値から算出した G.B.I. 改善率（術後 G.B.I. 値 ÷ 術前 G.B.I. 値 × 100）について糖尿病患者 5 名と非糖尿病患者 10 名の検査結果を比較した。比較検定には Mann-Whitney U-test を適用し有意水準は 5% とした。

【結果および考察】初診時の G.B.I. 値に有意差は見られなかった。清掃指導後の G.B.I. 値は糖尿病群（median 20.6%）は，健常者群（median 13.5%）に比較して有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。G.B.I. 改善率でも糖尿病群（median 84.4%）は，健常者群（median 20.1%）に比較して有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。糖尿病患者は縁上ブラークの除去による歯肉出血の改善効果が健常者に比較して悪いと推察された。

【結論】糖尿病患者と健常患者の清掃指導後の G.B.I. 値を比較した結果，糖尿病群は健常者群に比較して有意に高かった。

O-09

2504

古典的 β -catenin/Wnt経路の活性化による骨髄由来
間葉系幹細胞のセメント芽細胞分化に及ぼす影響

間 悠介

キーワード：間葉系幹細胞, 古典的 β -catenin/Wnt経路, Wnt3a

【目的】歯周組織再生療法の一つとして細胞移植治療が注目され、多分化能を有する骨髄由来間葉系幹細胞(MSCs)はその細胞源として有用である。これまでに、セメント芽細胞の分化マーカーであるCementum Protein 1 (CEMP-1) やCementum Attached Protein (CAP) の歯根膜細胞における発現が、リチウムイオンの作用で亢進することが報告されており、これは古典的 β -catenin/Wnt経路の活性化に関与していることが知られている。そこで本研究では、同経路の活性化に寄与するWnt3aに着目し、MSCsのセメント芽細胞への分化に及ぼすWnt3aの影響を調べることを目的とした。

【材料と方法】不死化ヒトMSCs (UE6E7T-3) を維持培地 (DMEM+10 % FBS) で1日培養後、RT-PCR法にてCEMP-1 mRNA 発現を調べた。また、種々の濃度のWnt3a(0~200 ng/mL)を含む骨誘導培地(α -MEM + 10 % FBS + 0.1 nM デキサメサゾン + 100 mM β -グリセロフォスフェート + 50 μ g/mL アスコルビン酸) 中で1週間培養後に細胞を回収し、CEMP-1, CAP, Alkaline phosphatase (ALP), Osteocalcin (OCN) のmRNA 発現量をreal-time PCR法にて測定した。また、Alizarin Red 染色にてカルシウムの沈着の有無を調べた。

【結果と考察】不死化ヒトMSCsにおいてCEMP-1 mRNA 発現を認めた。そのMSCs培養系にWnt3aを加えた結果、CEMP-1 のmRNA 発現量が上昇し、CAP, ALP, OCNといったセメント質・骨関連タンパクのmRNA 発現が増大した。また、Alizarin Red 染色によってカルシウムの沈着を確認した。これらの結果より、Wnt3aがMSCsの骨・セメント質関連タンパクのmRNA 発現量を上昇させることで、セメント芽細胞様細胞への分化を促進し、より効果的なセメント質再生に寄与することが示唆された。

O-11

2206

カルプロテクチンがヒト歯肉線維芽細胞の炎症関連
因子の発現に及ぼす影響

西川 泰史

キーワード：カルプロテクチン, ヒト歯肉線維芽細胞, 炎症関連因子

【目的】カルプロテクチンは、S100A8とS100A9の蛋白複合体からなる抗菌ペプチドである。また歯周病細菌*Porphyromonas gingivalis*由来LPS (P-LPS) は好中球のカルプロテクチン産生を誘導する。我々は、歯周炎患者の歯肉溝滲出液中のカルプロテクチン濃度が高値を示し、その知見を指標とした新規歯周病診断の確立を目指している。一方、歯周炎の病態におけるカルプロテクチンの組織への作用は不明な点が多い。そこで本研究では、カルプロテクチンが歯肉線維芽細胞の炎症関連因子発現に及ぼす影響について検討した。

【材料及び方法】株化ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) はDMEMを用いてサブコンフルエントになるまで培養後、リコンビナントS100A8, S100A9, カルプロテクチンを添加し、経口的な培養上清中のMCP-1, IL-6, VEGF, 及びproMMP-1濃度を市販の各種ELISAキットを用いて測定した。また、TLR2, TLR4 mRNA 発現はRT-PCR法を用いて調べた。

【結果及び考察】S100A8, S100A9およびカルプロテクチン添加により、HGFのMCP-1, IL-6, proMMP-1産生が有意に増加した。一方、VEGF産生はs100A8, s100A9添加により増加したが、カルプロテクチン添加では増加しなかった。また、NF- κ B阻害剤によって、これらの炎症関連因子の産生は有意に抑制された。TLR4mRNAの発現はP-LPS刺激で増加したが、TLR2mRNAは検出されなかった。

【結論】カルプロテクチンは歯周組織の炎症を亢進する可能性が示唆された。

O-10

2206

歯小囊細胞におけるWnt/ β -cateninシグナルによる
Osterix発現誘導へのp38 MAPキナーゼの関与

向阪 幸彦

キーワード：歯小囊細胞, Wntシグナル, Osterix, 細胞分化, p38 MAPキナーゼ

【目的】古典的Wnt/ β -cateninシグナルは硬組織形成における重要な調節因子として知られている。近年、遺伝子改変マウスを用いた研究から古典的Wntシグナルはセメント質形成に不可欠であることが示唆されている。我々はこれまでに同シグナルがセメント芽細胞の前駆細胞と考えられている歯小囊細胞のアルカリフォスファターゼ発現を遺伝子および蛋白レベルで誘導すること、加えてそのシグナルの下流経路に転写因子Osterixが介在することを報告した(第57回春季歯周病学会学術大会)。今回、我々は古典的Wntシグナル刺激に対するマウス歯小囊細胞株のOsterix発現誘導の分子メカニズムについて検討を行なった。

【材料と方法】マウス歯小囊細胞株 (Somerman博士, NIDCRより分与) をリコンビナントWnt3a (Peprotech) 存在下で培養し、以下の方法にて機能解析を行った。1) 遺伝子発現：定量性リアルタイムPCR法, 2) β -catenin核内移行：蛍光免疫細胞化学法, 3) β -catenin転写活性：TOPflashプラスミドを用いたレポーターアッセイ法

【結果と考察】①Wnt3aアンタゴニストDickkopf-1による前処理はOsterix遺伝子の発現誘導を抑制した。②p38/MAPキナーゼ阻害剤前処理はOsterix遺伝子の発現誘導を抑制した。③p38/MAPキナーゼ阻害剤前処理は β -cateninの転写活性を抑制したが、 β -cateninの核内移行の抑制はみられなかった。

【結論】古典的Wntシグナルによる歯小囊細胞でのOsterix発現誘導において、p38/MAPキナーゼが β -catenin転写活性レベルで関与していることが示唆された。本研究の結果はセメント芽細胞の分化制御機構の解明につながるものと考えられる。

O-12

3001

骨吸収抑制剤としてのビスフォスフォネート製剤が
歯周炎組織へ及ぼす影響

井手口 英隆

キーワード：歯周炎, 骨吸収抑制剤, ビスフォスフォネート製剤

【目的】近年、ビスフォスフォネート製剤 (BP) の骨吸収抑制作用を歯周炎治療に応用する研究が報告されたが (J Periodontol 2014), その有用性には疑問がある。一方で、歯周感染によるBP関連顎骨壊死 (BRONJ) の誘発はよく知られている。そこで本研究では、歯周組織でのBPの骨吸収抑制作用に対する歯周感染の影響を調べることを目的に、BPを歯周感染前後に投与した際の歯周組織の変化を組織学的に解析した。

【材料及び方法】C57BL/6Jマウスの第二大臼歯に*Porphyromonas gingivalis* W83の菌液に浸漬した絹糸を結紮して、歯周炎モデルマウスを作製した (1週間で骨吸収を確認)。感染前1週間あるいは感染時にプレドロン酸 (ZA, 2 μ g/30 g体重：ガン患者投与量に相当) を1週間腹腔投与した (感染前投与群および感染時投与群)。感染2週間後、マイクロCT解析および歯周組織のHE染色とTRAP染色による組織学的解析を行い、同時に炎症の強度と局在をmyeloperoxidase活性による分子イメージング法で解析した。

【結果】感染前投与群では、歯槽骨吸収が抑制されたが、骨表面にはTRAP陽性細胞が存在し、層板構造が乱れていた。一方、感染時投与群では、骨吸収は進行し、腐骨様の組織も存在した。分子イメージング解析では、ZAを投与した群では歯周組織の炎症強度が減弱し、その程度は感染前投与群で強かった。

【考察と結論】ZAを投与すると、歯周組織の炎症と歯槽骨の吸収は抑制されたが、組織像は正常骨とは異なった。そのため、歯周炎へのBP適応にはさらなる工夫が必要である。

O-13

ラマン分光法を用いた根面性状の評価

3101

中村 紫野

キーワード：ラマン分光法、根面デブライドメント、医療機器

【目的】歯肉縁下の根面デブライドメントは歯周病の予後を左右する重要な治療のひとつであるが、歯周基本治療中のそれは縁下歯石を直視できず、術者の手指の感覚に頼ることが多い。ラマン分光法は入射光と異なる波長をもつラマン散乱光を分光し、解析することにより、物質の分子構造や結晶構造などを知る手法である。また測定環境や物質の状況に依存せず、非破壊的に状態分析が可能である。

本研究の目的はラマン分光法を用いて根面に沈着した歯石の除去段階でラマンスペクトルに変化が見られるか検討することである。

【材料と方法】根面に歯石が沈着したヒト抜去歯30本の表面をポータブルラマン分光光度計（Enwave Optonics, Inc. ProRaman-L）を用いて、歯石が多量に沈着している状態、手用スケーラーで大きな歯石を除去したが根面の凹凸が残っている状態、デブライドメントを続け根面滑沢になった状態、さらに健全象牙質まで露出させた状態の4点で行った。測定条件は励起波長785nm、出力100mW、露光時間10秒、露光回数10回とした。

【結果と考察】歯石が多量に沈着している状態で測定を行うと強い蛍光のみが見られた。次に手用スケーラーで歯石を除去していくと蛍光強度は下がり、ハイドロキシアパタイト（以下、HA）のラマンバンドピークである 960cm^{-1} が見られた。さらに根面滑沢になった状態では、 960cm^{-1} とその他のHAのピークである440、 580cm^{-1} と有機物のピークである $\sim 2940\text{cm}^{-1}$ も観察できた。

この時、蛍光強度をHAのバンド強度で規格化することにより定量的評価が可能になった。

【結論】ラマン分光法を用いて歯根表面の蛍光強度を測定することにより、歯石の有無を判定できる可能性が示唆された。

O-15

歯根膜幹細胞由来液性因子による歯周組織再生と濃縮倍率の影響

2504

永田 瑞

キーワード：再生、幹細胞、歯根膜

【目的】歯根膜幹細胞（PDLSC）は歯根膜組織中から単離培養可能な間葉系幹細胞（MSC）である。現在MSCが培養上清中に様々なサイトカインや成長因子を分泌することが明らかとなっており、骨髄由来MSC培養上清を移植することで歯周組織再生を誘導することも報告されている。しかしその作用メカニズムや最適な投与方法についてはいまだ不明な点が多い。本研究の目的はPDLSC培養上清（PDLSC-CM）の移植が歯周組織再生を促進するか否かを、培養上清の濃縮倍率を変化させ検討することである。

【材料と方法】健全抜去歯より歯根膜組織を回収し、酵素処理を用いてPDLSCを分離培養した。無血清DMEMを添加し48時間後の培養上清を回収し、限外濾過を用いて通常濃縮PDLSC-CM（約27倍）および高濃縮PDLSC-CM（約450倍）を作製した。コントロール群として無血清DMEMを濃縮したControl-CMを作製した。実験的歯周組織欠損をラット下顎第一臼歯部頰側に外科的に作製し、培養上清をコラーゲンスポンジに含浸し移植した。4週後にラットを屠殺しマイクロCTによる歯槽骨形成を観察した。またPDLSC-CM中のタンパク成分をELISA、protein arrayを用いて解析した。

【結果と考察】術後4週のマイクロCT像において通常濃縮PDLSC-CM、高濃縮PDLSC-CMを移植した群ではコントロール群と比べて両者とも歯槽骨再生量の促進が観察された。また高濃縮PDLSC-CMを移植した群では通常濃縮PDLSC-CMを移植した群と比べて歯槽骨再生が促進する傾向にあった。PDLSC-CM中のタンパク成分ではVEGFやIL-6などが高い傾向を示した。

【結論】高濃縮された歯根膜幹細胞由来液性因子の移植は歯周組織再生を促進し、新たな歯周組織再生法となる可能性が示唆された。

O-14

金クラスターの光励起による細菌増殖抑制

2504

宮田 さほり

キーワード：金クラスター、光殺菌治療（aPDT）、活性酸素

【目的】金クラスター（ $\text{Au}_{25}(\text{SR})_{18}$ 、径0.9 nm）は金原子25個からなるナノ物質で、光励起することで活性酸素の一種である一重項酸素を生成する。本研究では金クラスターの光殺菌治療への応用を目指し、金クラスターを歯科用光照射器により光励起した際の細菌及び生体細胞に対する増殖抑制効果を評価した。

【材料と方法】金クラスターは、塩化金酸とグルタチオンの混合溶液に、水素化ホウ素ナトリウム還元剤を添加して作製した。光照射器にはベンキュアー（モリタ、 $1000\text{mW}/\text{cm}^2$ 、420-480nm）を使用した。まず金クラスターの培地への添加（0、5、50、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ ）と光励起（1分間）が*S. mutans*に与える影響をSEM観察、LIVE/DEAD染色、濁度測定、CCK-8 Assay、Lactate Assayにて評価した。同様に金クラスターの光励起がMC3T3-E1細胞の初期付着と増殖に与える影響をSEM観察及びCCK-8 Assayにて評価した。

【結果と考察】金クラスターの光励起は*S. mutans*に対してコロニー形成を抑制、死菌を増加させた。濁度測定、CCK-8 Assay、Lactate Assayでは金クラスター濃度依存的に抑制が見られ、細菌増殖は50%程度まで有意に減少した。また、E1細胞の付着には影響しなかったが、増殖はコントロールの50%程度まで有意に抑制された。金クラスターは歯科用光照射器による短時間の光励起でも抗菌効果を示すほどの活性酸素を生成したと考えられた。

【結論】金クラスターを歯科用光照射器により光励起すると、細菌及び生体細胞の増殖抑制効果を示した。

O-16

間葉系幹細胞集塊Clumps of a MSC/ECM complexを用いた他家細胞移植骨再生療法の開発

2504

竹下 慶

キーワード：complex mesenchymal stromal cells, extracellular matrix, bone regeneration, xenograft

【目的】間葉系幹細胞（MSC）と自己生産された細胞外基質（ECM）を利用して得られる細胞集塊Clumps of a MSC/ECM complex（C-MSC）は3次元的にMSCを培養・賦形・移植が可能で、組織再生を促進する。MSCを安価・確実に供給する細胞バンクの利用が試みられているが、他家移植となるため拒絶反応のリスクが残る。これを克服するためMSCの免疫調節能を制御する同種他家移植療法の開発が検討されている。本研究では、IFN- γ 前処理することで免疫調節性酵素IDOを高発現するC-MSCを樹立し、これを利用した他家細胞移植療法の確立を目的とした。

【方法】理化学研究所から提供されたヒトMSCを、24wellプレートに 2×10^5 cells/wellの細胞密度で播種し、 $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のアスコルビン酸含有の増殖培地にて4日間培養した。これをマイクロビッドチップを用いて剥離し、ECMとMSCから構成される細胞シートの状態ではプレートから遊離させ細胞集塊C-MSCを得た。C-MSCをIFN- γ （10.50、 $100\text{ng}/\text{ml}$ ）で24時間刺激したものをC-MSC γ とし、そのIDOのmRNA発現、タンパク発現を測定した。CD3抗体によって刺激した末梢血単核球（PBMC）とC-MSC γ を共培養し、PBMCの増殖抑制効果を確認した。ヒトC-MSC、C-MSC γ （10、50、 $100\text{ng}/\text{ml}$ ）をマウス頭蓋冠欠損モデルに移植し、4週後の骨再生をmicro CTによって分析した。

【結果】C-MSC γ はC-MSCと比較して高いIDO mRNAおよびタンパク発現を示した。CD3抗体刺激によって増加したPBMCの増殖活性はC-MSC γ との共培養によって有意に抑制された。C-MSC γ （ $100\text{ng}/\text{ml}$ ）移植が骨再生を促進することがmicro CTを用いた分析によって示された。

【結論】C-MSC γ は免疫調節能を有するため新たな他家細胞移植療法として利用できる可能性が示された。

O-17

脱分化脂肪細胞移植による歯周組織再生の試み

3199

本田 雅規

キーワード：脱分化脂肪細胞，歯周組織再生，移植

【目的】皮下脂肪組織から単離した脂肪細胞は，自発的に脱分化することで均一な増殖および多分化能力をもつ脱分化脂肪細胞（DFAT）となる。DFATは血管新生作用等を備えることから多種多様な疾患への治療用細胞として有用になると考えている。今回われわれは，実験的に作製したラットの歯周組織欠損モデルにDFATの移植実験を行い，歯周組織再生の有用性が示唆される実験結果が得られたので報告する。

【材料と方法】ラット皮下脂肪組織を酵素処理後に成熟脂肪細胞分画を採取し，天井培養することでDFAT細胞を調製した。初めに，in vitroにて骨芽細胞と脂肪細胞への誘導能を確認した。次に，ラット下顎骨臼歯部に外科的に露出させた下顎第一臼歯遠心根から第二臼歯近心相当部の歯槽骨をインバーテッドバーにて縦2mm×横3mm×深さ1mmの骨欠損を作成した。欠損部に蛍光標識したDFATを移植しマイクロCTによる再生硬組織の観察とその量の経時的計測を行うとともに，HE染色，アザン染色およびPicrosirius Red染色を用いた組織学的な評価を行った。対照群として，低速度遠心分離時に遠沈管底部に沈降する間質細胞群（ASCs）を用いた。

【結果】micro-CTによる観察から実験群，対照群ともに，歯根吸収や骨性癒着することなく欠損部に硬組織の形成が観察された。移植5週後の組織学的解析から実験群，対照群において新生骨組織およびセメント質様硬組織の再生およびそれらの硬組織へのコラーゲン線維の埋入が認められた。蛍光標識されたDFATは再生した歯根膜組織中に散在していた。

【結論】以上の結果からASCsと同様にDFAT細胞は歯周組織の再生を促進することが示唆された。

O-19

新規に同定したアメロジェニン会合蛋白Grp78がヒト歯根膜幹細胞/前駆細胞株の機能に及ぼす役割の検討

2504

豊田 敬介

キーワード：アメロジェニン，グルコース制御タンパク78

【目的】我々は，エナメル基質蛋白の主成分であるアメロジェニンのプロテオーム解析を行い，新規アメロジェニン会合分子としてGrp78を同定・報告してきた。歯周組織再生に歯根膜が必須である観点より，ヒト歯根膜幹細胞/前駆細胞株（hPDLSCs）におけるアメロジェニン（rM180）刺激とGrp78が及ぼす影響を検討した。

【材料及び方法】Grp78を強発現またはノックダウンしたhPDLSCsで以下の検討を行った。①Grp78の発現分布およびrM180細胞内取り込み時のGrp78の局在変化：共焦点蛍光顕微鏡撮影 ②遺伝子発現変動の検討：マイクロアレイ解析 ③細胞増殖・細胞遊走・細胞接着実験 ④Grp78強発現およびrM180刺激の細胞骨格への影響：共焦点蛍光顕微鏡撮影 ⑤RhoファミリーG蛋白活性化：Rac1, Cdc42 activation assay

【結果および考察】rM180はhPDLSCs細胞内へ取り込まれる際に，細胞膜上に発現しているGrp78と共局在している事を確認した。マイクロアレイ解析では，rM180刺激によりTGF-β経路を活性化する一方で，Grp78発現量が細胞遊走関連遺伝子群の発現制御に関与することを確認した。また，rM180刺激はhPDLSCsの細胞増殖へ影響及ぼすことなしに，細胞接着・細胞遊走能を促進したが，これらの効果はGrp78の発現量依存性であった。以上よりhPDLSCsにおけるアメロジェニン誘導性の細胞遊走促進効果はGrp78依存性であり，Rac1の活性化と葉状仮足の形成がアメロジェニン誘導性の細胞遊走に必須のプロセスであることが示唆された。

O-18

未分化間葉系幹細胞の脂肪細胞分化抑制に関与するスフィンゴシン-1-リン酸受容体の探索

2504

橋本 陽子

キーワード：未分化間葉系幹細胞分化，脂肪細胞，スフィンゴシン-1-リン酸

【目的】歯根膜組織には未分化間葉系幹細胞が存在し，その分化の制御は歯周組織再生に重要である。脂質メディエーターであるスフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は，細胞膜上の5つのGタンパク質共役受容体（S1P₁～S1P₅）を介して細胞に作用する。これまでに演者らは，S1PのGiタンパク質を介したcAMPの蓄積阻害が，未分化間葉系幹細胞株C3H10T1/2の脂肪細胞分化を抑制することを見出した。そこで今回，S1PによるcAMP蓄積阻害作用に関わるS1P受容体を探索した。また，S1Pが細胞増殖に及ぼす影響についても検討した。

【材料と方法】マウス未分化間葉系幹細胞株C3H10T1/2を用いた。S1P受容体発現はreal-time PCR法を用いて検討した。細胞内cAMP蓄積は，S1P受容体阻害剤を用いて検討した。

【結果と考察】C3H10T1/2細胞において，S1P₁とS1P₂が多く発現していた。脂肪細胞分化誘導によりこれらの発現は減少したが，S1Pの添加によりS1P₁の減少は認められなくなった。次に，細胞内cAMP濃度について検討した。S1P₁阻害剤により，Giタンパク質阻害剤同様，S1PによるcAMP蓄積阻害は認められなかった。一方，S1P₂阻害剤ではS1PによるcAMP蓄積阻害作用に影響は認められなかった。また，細胞増殖について検討したところ，S1Pは脂肪細胞分化時の細胞増殖には影響を及ぼさなかった。

【結論】S1PはC3H10T1/2細胞において，S1P₁/Gi依存性に脂肪細胞分化を抑制した。また，S1Pは細胞増殖よりも脂肪細胞への分化に影響を及ぼす可能性が示唆された。

O-20

骨芽細胞および歯根膜幹細胞を用いた二層細胞転写羊膜の作製

2504

赤澤 恵子

キーワード：組織工学，幹細胞，再生

【目的】近年，組織工学的手法の発展により，培養細胞と移植担体を組み合わせる様々な方法が開発されている。我々は半導体作製などに用いられる「光リソグラフィー」技術を応用することにより細胞を担体表面へ転写する「細胞転写技術」を開発し，動物モデルにおける再生治療への応用の可能性を報告してきた。本技術の応用範囲の拡大の可能性を検討するため，間葉系幹細胞と骨芽細胞の二種類の異なる細胞を転写し，二層の細胞層を有する細胞転写移植担体を作製することを本研究の目的とした。

【材料と方法】抜去歯より得られた歯根膜を酵素処理し歯根膜幹細胞を培養した。ヒト頭蓋骨由来骨芽細胞（ScienCell社）を購入し実験に用いた。歯根膜幹細胞はアデノウィルスを用いてGFP遺伝子導入を行い，骨芽細胞のラベルにはPKH26を用いた。細胞転写基板としてガラス基板上にtetraethylene glycol層を作製し，UV照射により基板表面を細胞接着面とした。細胞転写用の担体として脱細胞処理を施したヒト羊膜を使用した。転写状態の検討は蛍光顕微鏡下および凍結切片の観察により行った。

【結果と考察】歯根膜幹細胞と骨芽細胞が二層となった転写基板上を羊膜にさらに転写することにより，生体内に移植可能な細胞を得るための至適条件を検討した。その結果，転写基板上に歯根膜幹細胞を播種した2.5時間後に骨芽細胞を播種し，その30分後に二層となった細胞付着基板を羊膜上に載せ，5時間後に基板を除去することで，効率よく細胞を羊膜上に転写できることが明らかとなった。

【結論】細胞転写技術を用いて異なる細胞を二層構造を保ちながら生体に移植することが可能となり，新たな再生医療方法として役立つことが示された。

O-21

2206

LPSの物理化学的性状および活性に及ぼす血清アルブミンとヘモグロビンの影響

小松 俊也

キーワード：LPS, 血清アルブミン, disaggregation

【目的】血清アルブミン(Alb)とヘモグロビン(Hb)によるlipopolysaccharide(LPS)のdisaggregationとLPS活性への影響について調べた。

【材料および方法】LPS disaggregationの測定：Sephacrose CL-4B濾過における、LPSの溶出位置で判定。LPSとタンパク質のinteraction：アフィニティークロマトグラフィーにて判定。好中球のLPS応答：好中球にLPSを作用させた後、fMLP刺激による活性酸素産生増強能を測定。

【結果】1) AlbまたはHbは、温度依存性およびLPS：タンパク質比依存性にLPSのdisaggregationを起こした。2) アフィニティークロマトグラフィーにて、Alb処理したLPSは、Albと複合体を形成することを示した。3) LPS-bovine serum albumin (BSA) 複合体から、Triton X-100によってLPSのみが分離することから、LPSとBSAは疎水結合により複合体を形成することを示した。4) Rd mutant LPSは、BSAによるdisaggregationもBSAとの複合体形成も起こさないが、triethylamine添加によって、BSAによるdisaggregationおよび複合体形成を示すようになったことから、disaggregationと複合体形成は密接に関連することを明らかにした。5) LPSとタンパク質の複合体がpolymyxin Bと複合体を形成することを利用して、ゲル濾過によりLPS-タンパク質複合体を単離し、複合体中のLPSとタンパク質の定量からそれぞれの分子比を明らかにした。6) 好中球の血漿依存性LPS応答は、抗LPS binding protein (LBP) 抗体によって抑制される。LBPのみではLPSに応答せず、LPSをAlbまたはHbと作用させた後、LBPと共に添加すると好中球の応答性が認められた。

【結論】LBP依存性の好中球のLPS応答には、血清タンパクによるLPSのdisaggregationが必須である。

O-22

2203

口腔レンサ球菌、歯周病原菌はインフルエンザを重症化する

落合 邦康

キーワード：インフルエンザ, 口腔レンサ球菌, 歯周病原菌

【目的】A型インフルエンザウイルス(IAV)の表面に突出するノイラミニダーゼ(NA)は、子孫ウイルス放出時にウイルス粒子を宿主細胞から遊離させ、感染拡大に働く。口腔からNA産生細菌が検出されることから、細菌由来NAがウイルスNAに相乗的に作用し、IAV放出を促進する可能性がある。本研究では、口腔細菌のIAV放出に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】NA活性の高い口腔細菌株培養上清(Sup)存在下でIAVをMDCK細胞に感染させ、培養液中に放出されたIAV量をプラーク法により解析、IAV感染細胞数を蛍光免疫染色法により算定した。さらに、ウイルスNA阻害薬(ザナミビル)処理時に、細菌由来NAがIAV感染に及ぼす影響について検討した。

【結果と考察】高いNA活性が認められた*Streptococcus mitis*および*Streptococcus oralis*のSup存在下でIAV感染実験を行ったところ、IAV放出量およびIAV感染細胞数は著しく増加した。*S. mitis*と*S. oralis*がザナミビルの効果に及ぼす影響を検討した結果、ザナミビルによるIAV放出抑制効果が認められなかった。【結論】プラーク内のNA産生口腔細菌はIAVの放出を促進させ、またNA阻害薬の効果を抑えた。さらに、われわれは*Porphyromonas gingivalis*がIAVの感染性獲得に関与していることも見出している。これらの結果から、専門的口腔ケアにより口腔内細菌数を減少させることはIAV感染の予防と感染拡大防止に効果があることが示唆された。(協力研究者：今井健一)