

一般演題口演

(C会場・D会場)

C 会 場

O-01~14

O-21~28

D 会 場

O-15~20

O-29~36

5月20日 (金) C会場 8:50~10:10, 10:20~11:20
D会場 8:50~ 9:50

5月21日 (土) C会場 8:30~ 9:50
D会場 8:30~ 9:50

O-01
2203

*Porphyromonas gingivalis*によるヒト肥満細胞のIL-31誘導は歯肉上皮細胞のバリア機能を低下させる
多田 浩之

キーワード：慢性歯周炎、インターロイキン-31、肥満細胞
【目的】IL-31はTh2細胞やマスト細胞から産生され、上皮細胞から炎症性サイトカインやケモカイン産生を誘導することで炎症を惹起する。慢性歯周炎の歯周組織には肥満細胞が集積するが、歯周炎の病態形成における肥満細胞の役割は明らかにされていない。本研究では*Porphyromonas gingivalis*によるヒト肥満細胞からのIL-31誘導機序および上皮バリア機能への影響について検討した。
【材料と方法】肥満細胞欠損マウスおよび野生型マウスの口腔に*P. gingivalis*を感染後、歯肉のIL-31 mRNA発現をqPCR法で測定した。ヒト肥満細胞株HMC-1に*P. gingivalis*野生型株ないしジンジバイン欠損株を感染後、IL-31産生量をELISA法で測定した。歯肉上皮バリア機能への影響は、トランスウェル膜上に培養したヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22に*P. gingivalis*感染後のHMC-1細胞培養上清を添加し、上皮細胞間のFITC-dextran透過量にて評価した。
【結果と考察】野生型マウスの口腔に*P. gingivalis*を感染させると歯肉のIL-31 mRNA発現が亢進したのに対して、肥満細胞欠損マウスではIL-31発現レベルが減弱した。ヒト肥満細胞に*P. gingivalis*を感染させると著明な量のIL-31が産生され、ジンジバイン欠損株では同活性が減弱した。*P. gingivalis*による肥満細胞からのIL-31産生は、同細胞をJNKならびにNF- κ B阻害剤で処理すると抑制された。*P. gingivalis*を感染させた肥満細胞の培養上清を歯肉上皮細胞に処理すると、IL-31依存的にFITC-dextran透過量が亢進した。
【結論】*P. gingivalis*により肥満細胞から産生されたIL-31は、歯肉上皮細胞のバリア機能を低下させ、慢性歯周炎の病態を増悪させる可能性が示唆された。

O-03
2504

歯周病感染器官培養モデルを用いた抗菌薬の効果に関する研究
竹下 正章

キーワード：歯周炎、上皮内感染、器官培養、抗菌薬、歯周病原細菌
【目的】慢性歯周炎に対する抗菌薬の使用は補助的なものと考えられてきた。しかしながら局所抗菌薬法を併用した治療がSRPを中心とした機械的除去療法のみ群に比べ、糖尿病患者の高感度CRPおよびHbA1cをより低下させるとした研究成果が報告された。すなわち、組織内部の歯周病原細菌を含め感染源を完全に除去するために抗菌薬の併用が必要不可欠であるが、そのためには組織内部に対する抗菌薬の効果の評価する必要がある。そこで本研究は、上皮組織を使用し歯周病感染器官培養モデルを確立すること、同モデルを用いて組織内部に対する抗菌薬の評価を行うことを目的として以下の検討を行った。
【材料と方法】*Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) およびマウスの背面皮膚を用いて歯周病感染器官培養モデルを作成し、同モデルを用いて*Pg*、*Prevotella intermedia* (*Pi*)、*Fusobacterium nucleatum* (*Fn*)の単独感染、あるいは3種類の中から2種類を組み合わせた共感染モデルを作成した。抗菌薬処理後の組織内部の生存菌をColony forming unitsの測定により評価することで歯周病感染器官培養モデルによる抗菌薬効果の検証を行った。
【結果と考察】組織内部に注入した菌に対する抗菌薬の効果は菌種によって異なることが示された。さらに2種類の菌種を混合した歯周病混合感染器官培養モデルでは、1種類のみ菌種による器官培養とは異なる結果が示された。
【結論】2種類の菌種を用いた混合感染器官培養モデルでは*Pg*との共感染により、*Pi*、*Fn*がアジスロマイシンやセフジニルに対して抗菌薬抵抗性を示し、本研究で使用した3種類の菌種とその共感染に対してはセフジニル、メトロニダゾールの併用が有効であると考えられた。

O-02
2206

*Porphyromonas gingivalis*口腔投与のコラーゲン誘導性関節炎増悪メカニズムの解析
佐藤 圭祐

キーワード：*P. gingivalis*口腔感染、腸管免疫応答、IL-17
【目的】歯周疾患と様々な全身疾患の関連が報告されているが、その分子機構については未だ不明な点が多い。我々は、嚥下された*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)が腸内細菌叢を変化させることで、全身性の炎症を誘導することを報告した。今回、コラーゲン誘導性関節炎(Collagen-induced arthritis: CIA)モデルマウスを用いて、*P. gingivalis*が関節炎悪化を引き起こすメカニズムを解析した。
【材料と方法】6週齢雄DBA/1Jマウスを*P. gingivalis* W83株の経口投与をしたinfection群、基材のみ投与したsham群に分け、週2回感染を5週間(合計10回感染)行った。その後、II型コラーゲンを免疫し実験的関節炎を発症させ、6週間後にサンプリングを実施した。関節炎症状、糞便の細菌叢解析、腸管膜リンパ節・パイエル板のリンパ球をFACS解析、血清・リンパ球培養上清のELISA解析、膝関節の組織学的解析を行った。
【結果と考察】infection群はsham群と比較して、関節炎症状の悪化が認められた。マイクロCT像により四肢の骨破壊が確認でき、組織学的解析より膝関節滑膜への炎症性細胞浸潤を認めた。また、infection群では、腸管膜リンパ節・パイエル板においてTh17への分化誘導が促進し、血清・リンパ球培養上清中のIL-17の上昇が観察された。*P. gingivalis*口腔感染による腸内細菌叢を介した腸管免疫応答への影響により、関節炎症状が悪化したことが示唆された。会員外共同研究者：大野 博、加藤 完(理化学研究所)、遠藤 直人、近藤 直樹(新潟大学整形外科学分野)

O-04
2504

組織透過性を利用した半導体レーザーによるaPDTについて
佐々木 康行

キーワード：抗菌光線力学療法、半導体レーザー、光感受性物質
【目的】歯周治療では、光感受性物質が特定波長の光により励起され生じる一重項酸素によって、歯周ポケット内バイオフィルムの破壊を行う抗菌光線力学療法(aPDT)が注目され始めている。我々はこれまで、810nm半導体レーザーと光感受性物質であるインドシアニングリーン封入ナノ粒子(ICG-Nano/c)を用い、ポケット内照射によるaPDTの基礎的、臨床的研究を行ってきた。810nm半導体レーザーは組織透過性が高いため、歯周ポケットからではアクセスしにくい部位に対して、歯周ポケット外からレーザーを作用させる新たな照射法に応用できる可能性がある。今回、歯周ポケット外照射の基礎的研究として歯肉モデルを作製し、aPDTによる殺菌効果を検討した。
【材料と方法】aPDT群として、 2×10^6 CFU/mlに調整した*Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277株)の菌液とICG-Nano/c (10mg/ml)の溶液を混合し、歯肉モデルに組み込み、レーザー照射(平均出力1.5W, CWモード, 1, 3, 5分間)を行った。その後、血液寒天培地で7日間培養後コロニー数を計測した。対照群として、ICG-Nano/c添加及びレーザー照射を行わないものをコントロール群、ICG-Nano/cを添加しただけのものをICG-Nano/c群、レーザーを照射しただけのものをレーザー群として、同様に計測した。
【結果と考察】コントロール群に対し、すべての群において有意な差が認められ、ICG-Nano/c群では約55%の殺菌効果、レーザー群においては約52%の殺菌効果、aPDT群においては約99%の殺菌効果が認められた。aPDT群において照射時間の増加に伴い、殺菌効果も増加した。
【結論】組織を透過した光によっても、aPDTによる殺菌効果が生じることが示唆された。

O-05

骨細胞培養系における AGE と LPS 刺激による スクレロステンの発現上昇

2402

稲垣 裕司

キーワード：スクレロステン, AGE, LPS, 骨細胞

【目的】糖尿病患者の骨質はコラーゲン架橋に最終糖化産物 (AGE) が介在することで脆弱になることが知られている。一方、糖尿病関連歯周炎では重篤な歯槽骨吸収が頻繁に認められる。スクレロステンは骨細胞から特異的に産生され骨形成を抑制する分泌タンパク質で、加齢や糖尿病によって増加し骨の脆弱化に関与する。最近、糖尿病ラットに歯周炎を惹起させるとスクレロステン陽性骨細胞が増加し維持されること、および骨細胞に AGE を加えるとスクレロステンの発現が増加することが報告された。本研究は、糖尿病関連歯周炎における重篤な歯槽骨破壊機序の一端を明らかにするために、培養骨細胞に AGE と歯周病原因子であるリポ多糖 (LPS) を加えてスクレロステンの発現を検討した。

【方法】細胞はマウス骨細胞株 MLO-Y4-A2 を用いた。AGE は BSA とグリセラルデヒドを用いて作製し、対照として非糖化 BSA を用いた。MLO-Y4-A2 細胞に AGE 存在下で *P. gingivalis* 由来 LPS を加えて培養し、LPS 刺激 24 時間後のスクレロステンの発現をリアルタイム PCR 法で確認した。

【結果と考察】MLO-Y4-A2 細胞では AGE 添加 24 時間でスクレロステンの発現が対照と比べて増加し、さらに AGE 添加した MLO-Y4-A2 細胞に LPS 刺激を加えると、スクレロステンの発現が LPS 非刺激と比べてさらに増強された。以上の結果から、糖尿病関連歯周炎の歯周組織では AGE と LPS の両方の作用により骨細胞からのスクレロステンの発現が増強され、重篤な歯槽骨破壊に関与する可能性が示された。

O-07

Porphyromonas gulae 感染糖尿病モデルマウスの歯周炎病態の評価

2402

芥川 桂一

キーワード：糖尿病, 歯周炎, 慢性炎症

【目的】糖尿病は歯周病の進行・発症に関与する。一方で慢性炎症性疾患である歯周炎では血中の炎症性サイトカインレベルが上昇することによって血糖値のコントロールが困難となる。このように歯周炎と糖尿病には負のスパイラルの関係が成立している。したがって、糖尿病における歯周炎の憎悪の詳細なメカニズムの解明は両疾患のコントロールにおいて重要である。本研究では、糖尿病モデルマウスを用いて網糸結核および歯周病原細菌である *Porphyromonas gulae* (Pg) によって歯周炎を誘発し、糖尿病病態下における歯周病原細菌感染と炎症の評価を行った。

【材料と方法】マウスは BALB/c 並びに KK/TaJcl を使用した。KK/TaJcl に HFD32 を給餌することで糖尿病モデルマウスを作製した。上顎左側第二後臼歯に 5-0 絹糸を結紮した絹糸結紮モデルに Pg10⁸CFU を 3 日毎に口腔内に投与した。Pg は口腔内滞留時間を確保するため 2% carboxymethyl cellulose 含有 PBS に懸濁して投与した。マウスをコントロール群、結紮群、Pg 投与群 (Pg 群)、結紮及び Pg 投与群 (LigPg 群) の 4 群に分け、Pg に対する血清抗体価、血清中の CRP 並びに IL-6 の値を評価した。

【結果・考察】BALB/c において Pg 群、LigPg 群で血清抗体価が上昇した。その上昇は Pg 投与開始 14 日目で Pg 群と比較して LigPg 群で大きかった。また、KK/TaJcl において糖尿病モデルマウスの LigPg 群では非糖尿病マウスの LigPg 群より血清抗体価の上昇が大きかった。さらに、糖尿病群の LigPg 群において血清中の CRP、IL-6 は非糖尿病のコントロール群より高かった。以上から、糖尿病モデルマウスにおいて Pg 感染に対する応答が亢進し、炎症を憎悪させることが示唆された。

O-06

カロテノイドは高グルコース下で培養したヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 誘導性蛋白分解酵素産生を抑制する

2206

Lew Jung Hwan

キーワード：カロテノイド, 糖尿病関連歯周炎, IL-6, 蛋白分解酵素

【目的】糖尿病関連歯周炎の病態には、高グルコースによる歯肉線維芽細胞の IL-6 シグナルの増強効果に関与する。また、その治療の一つとして抗菌薬の併用が推奨されているが、臨床的にはより有効な治療戦略の確立が望まれる。野菜や果物に含まれるカロテノイド類の多くは抗酸化作用を有し、生活習慣病の予防に効果があるとされる。本研究では、高グルコース下で培養した歯肉線維芽細胞における IL-6 誘導性蛋白分解酵素の産生に及ぼすカロテノイドの効果を検討した。

【材料と方法】細胞：ヒト歯肉線維芽細胞 CRL-2014™ (ATCC) を購入し、培養は 10% FBS 含有 DMEM (グルコース濃度：5.25 mM) を用いて行った。薬物：IL-6 と sIL-6R は R&D systems™ から購入し、カロテノイドとして β-カロテン、リコピンおよびレチノイン酸を用い、Sigma から購入した。細胞障害性の検討：各種カロテノイドによる細胞障害性は MTT 法を用いて調べた。MMP-1、カテプシン L 産生の検討：MMP-1 産生は ELISA キット (R&D systems™) を用いて調べ、カテプシン L 産生はウェスタンブロッティング法で調べた。細胞は IL-6+sIL-6R で 24 時間刺激し、各種カロテノイドはその刺激 1 時間前に前処理した。

【結果】ヒト歯肉線維芽細胞において、高グルコース培養条件下で IL-6 誘導性 MMP-1、カテプシン L 産生が有意に亢進された。β-カロテンおよびレチノイン酸添加により、IL-6 誘導性 MMP-1、カテプシン L 産生が有意に抑制された。

【考察と結論】β-カロテンとレチノイン酸は、高血糖下でのヒト歯肉線維芽細胞の IL-6 による蛋白分解酵素の産生を抑制して、糖尿病関連歯周炎の進行を緩和する可能性が示唆された。

O-08

脂肪組織 Complement factor B が炎症および代謝制御に及ぼす影響

2499

松永 紘明

キーワード：Complement factor B, 脂肪組織

【目的】肥満インスリン抵抗性の病態形成において、脂肪組織に浸潤したマクロファージと脂肪細胞との相互作用による炎症反応が重要視されている。演者らはこれまでに、脂肪組織における慢性炎症およびインスリン抵抗性の惹起に関与する因子の網羅的解析から、LPS 刺激下でマクロファージと共培養した脂肪細胞において補体調節因子 Complement factor B (CfB) の遺伝子発現が著明に増大することを見出した。さらに、ヒト血中 CfB は体格指数、インスリン抵抗性、tumor necrosis factor-α 等のインスリン抵抗性マーカーと正の相関を示した。そこで、本研究では、脂肪組織慢性炎症、インスリン抵抗性における CfB の役割を明らかにするため、脂肪組織特異的に CfB 遺伝子を過剰発現させた (CfBTg) マウスを作製し、脂肪組織 CfB が炎症および代謝制御に及ぼす影響について検討することとした。

【材料・方法】1. 野生型マウスにおいて高脂肪食負荷による血清中 CfB 濃度への影響を検討する。2. 脂肪組織特異的に発現する aP2 プロモーターに CfB 遺伝子の cDNA を結合させたプラスミドを C57BL/6N 系統のマウス前核期受精卵に導入して作製した CfBTg マウスを用いて、各組織における炎症応答および代謝制御について同腹野生型マウスと比較検討する。

【結果・考察】高脂肪食を負荷させた野生型マウスでは、普通食負荷野生型マウスと比較して血清中 CfB 濃度の有意な増大がみられた。また、CfBTg マウスは同腹野生型とほぼ同等の生育を示した。現在解析中の脂肪組織 CfB が炎症および代謝制御に及ぼす影響についてあわせ報告する。

O-09

低酸素状態が歯肉線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響

2504

森本 千晶

キーワード：低酸素応答, コラーゲン, 歯肉線維芽細胞

【目的】 コラーゲンは歯周組織を構成する主要成分の一つであり, 同分子の産生は歯周組織における創傷治癒や再生過程に必須である。本研究では低酸素状態が歯肉線維芽細胞のコラーゲン産生に及ぼす影響とそのメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

【材料及び方法】 ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) を通常酸素 (20%O₂) あるいは低酸素 (1%O₂) 下に培養し, コラーゲンの発現を免疫染色法, western blotting (WB) 法にて解析するとともに, コラーゲン産生の指標としてプロコラーゲンC末端 (PIP) をELISA法にて測定した。またHIF-1 α 阻害剤である chetomin を用いて, 低酸素環境下でのコラーゲン合成におけるHIF-1 α の関与について検討するとともに, コラーゲン合成に必須の水酸化酵素PLOD2, P4HA1の役割について解析を加えた。

【結果および考察】 低酸素下での培養にてHGFのコラーゲン産生の亢進が認められた。低酸素下での培養はI型コラーゲン遺伝子発現に影響を与えなかった一方で, PLOD2及びP4HA1の遺伝子及びタンパク発現を上昇させた。一方で, 低酸素誘導性コラーゲン産生の亢進及びPLOD2, P4HA1発現上昇は, chetomin処理によりいずれも有意に抑制された。さらに低酸素誘導性コラーゲン産生の亢進はP4HA1の発現抑制により有意に抑制された。以上の結果から, 低酸素環境下において, HGFはHIF-1 α 依存的にプロコラーゲン水酸化酵素P4HA1の発現を上昇させることによりコラーゲン産生を亢進している可能性が示唆された。このことは歯周組織の創傷部局所等で誘導された低酸素環境に対し, 生体が細胞外基質の産生を亢進することで, 治癒の促進に関与するのではないかと考えられる。

O-11

Porphyromonas gingivalis由来lipopolysaccharideの骨細胞への影響

2504

瀬名 浩太郎

キーワード：骨細胞, P. gingivalis, lipopolysaccharide, サイトカイン

【目的】 骨細胞は骨組織のなかでも90%以上を占め, 長寿命の細胞だが, 骨芽細胞や破骨細胞と比較して, その機能はほとんど知られていない。近年, 骨細胞が骨芽細胞の機能や破骨細胞の分化を調節することが報告され, 骨代謝において骨細胞が重要な役割を果たすと考えられている。しかしながら, 歯周疾患における骨細胞の役割については不明である。従って, 本研究の目的は歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis*由来のlipopolysaccharide (Pg-LPS) の骨細胞への影響, 特にサイトカイン産生への関与の解明である。

【材料と方法】 骨細胞として, マウス長管骨由来骨細胞株およびマウス頭蓋冠由来の骨細胞を用いた。Pg-LPSに対するレセプターや関連タンパクの発現についてはPCR法による解析を行った。さらにPg-LPS刺激により誘導されたサイトカインについてreal-time PCRおよびELISA法による解析を行った。

【結果と考察】 マウス長管骨由来骨細胞株およびマウス頭蓋冠由来の骨細胞の両方においてPg-LPSに対するレセプターや関連タンパクの発現を認めた。また, Pg-LPSが骨細胞におけるTNF α およびRANKLの産生を誘導した。骨細胞に関わる最近の知見より, 骨細胞由来の破骨細胞分化因子が骨組織の恒常性の維持に重要な役割を果たしていることが示唆されており, 歯周疾患においても骨細胞が役割を果たしていることが推察される。

【結論】 本研究より, Pg-LPSにより骨細胞からのサイトカイン産生が誘導され, 骨吸収を伴う歯周疾患における骨細胞の関与の可能性が示唆された。

O-10

microRNA-34aによるヒト歯根膜細胞の老化制御

2504

池上 久仁子

キーワード：歯根膜細胞, 老化, microRNA

【目的】 加齢性の慢性炎症性疾患である, 糖尿病, 心筋梗塞, リウマチ性疾患は, 老化による臓器の機能不全を特徴とし, その原因として細胞老化説が報告されている。歯周組織は, 細菌感染, 活性酸素種, メカニカルストレスなどの老化誘導刺激に曝露されていることから, 共通の病態誘導機構が示唆される。microRNA (miRNA) は20~25塩基のノンコーディングRNAで, 標的mRNAに結合することでタンパクへの翻訳抑制を介し機能阻害する分子であり, 個体発生や疾患発症のみならず, 老化・寿命の制御に関わる事も近年明らかとなっている。そこで本研究では, miRNAに焦点をあて, 老化歯根膜細胞 (HPDL) 由来のECM蛋白と炎症性サイトカイン産生に関与する分子機構について検討した。

【材料と方法】 *in vitro*においてHPDLの継代培養により複製老化を誘導し, 老化HPDLを樹立した。継代数の異なるHPDLからmiRNAを精製し, 老化に伴う発現変動をmiRNAアレイ, RT-qPCR法を用いて解析し, 老化HPDL特異的miRNAと標的mRNAを同定した。またmiR-34aの合成二本鎖オリゴ (mimic), miR-34aと相補鎖を持つ合成一本鎖オリゴ (inhibitor) を導入し, 同上老化HPDLにおける機能制御について検討した。

【結果と考察】 老化HPDLにおいては, IL-6, Periostinの発現上昇と相関して, miR-34aの発現が増強していた。その際に, miR-34aの標的mRNAの一つである, SIRT1の発現低下が認められた。老化HPDLにおいては, miR-34a - SIRT1を介したエピジェネティックな分子制御により, 老化形質が誘導されたことが示唆された。

O-12

W9ペプチドはOPG遺伝子欠損マウスの歯槽骨吸収を改善する

2504

尾崎 友輝

キーワード：骨形成, 骨吸収

【目的】 歯周病において, 歯槽骨吸収はRANKL-RANKシグナルの病的活性化により生じる。W9ペプチド (W9) は, RANKL-RANKシグナルを阻害して破骨細胞の分化及び機能を抑制する (*J. Clin. Invest.* 2006)。更にW9は骨形成促進作用を示す (*J. Biol. Chem.* 2013)。Osteoprotegerin (OPG) は, RANKL-RANKシグナルを阻害して破骨細胞の分化及び機能を抑制する。我々はOPG遺伝子欠損 (OPGKO) マウスが重度の歯槽骨吸収を呈することを報告した (*Endocrinology* 2013)。我々はOPGKOマウスにW9を投与して歯槽骨吸収を改善できるか検討した。

【材料と方法】 12週齢のOPGKOマウスにW9 (10 mg/kg, オリエンタル酵母工業) を3回/日の5日間皮下投与し, 6日目に歯槽骨を採取した。また, リセドロネート (RIS) (0.1 mg/kg) を1回/日の3日間皮下投与した。マイクロCT (μ CT) 撮影より, セメントエナメル境から歯槽骨頂間距離を8点測定し, 合計を歯槽骨吸収量とした。第一臼歯根間中隔の歯槽骨量を定量した。骨形態計測により, 歯槽骨の破骨細胞数と骨芽細胞数を定量した。歯槽骨のosterix及びALPの免疫染色を行った。

【結果と考察】 μ CT解析より, OPGKOマウスに対するW9やRIS投与は歯槽骨吸収量を有意に減少させた。W9やRIS投与により歯槽骨量は有意に増加した。W9やRIS投与により破骨細胞数は減少した。W9投与により骨芽細胞数は増加した。一方, RIS投与で骨芽細胞数は増加しなかった。W9投与によりosterix及びALP陽性骨芽細胞は増加傾向を示した。

【結論】 W9は歯槽骨吸収抑制のみならず骨形成作用を伴う歯周病治療薬となりうる可能性が示された。会員外共同研究者：古屋優里子, 二宮禎, 保田尚孝, 中村美どり, 高橋直之

O-13

Optineurinが歯周組織破壊に及ぼす影響

2599

松井 志薫

キーワード：オプチニューリン, 骨代謝, 破骨細胞

【目的】緑内障や筋委縮性側索硬化症の原因遺伝子として同定されたOptineurin (OPTN) が骨 Paget 病の関連遺伝子であることがゲノムワイド関連解析によって示され、OPTN の loss of function 変異によって破骨細胞が活性化されることが報告され、OPTN が骨代謝に関連することが明らかになった。そこで本研究はOPTN ノックアウト (KO) マウスを用いてOPTN が歯周組織破壊に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】C57BL/6N系統のOPTN ノックアウト (KO) マウスと Wild type (WT) マウスの6~8週齢を用いた。大腿骨から骨髓単球細胞を分離し、M-CSFとRANKLにて刺激を行い、培養7日目にTartrate-resistant acid phosphate (TRAP) 染色によって破骨細胞形成を評価した。次に、頭頂部へLPSとRANKLを3日毎に皮下注射し、10日後にmicro CT撮影によって頭蓋骨の骨吸収を比較した。また歯周組織破壊には絹糸結紮歯周炎モデルを使用した。上顎第二臼歯に5-0絹糸を結紮し、7日後にmicro CTを撮影し3D画像において上顎第一臼歯遠心、上顎第二臼歯近心および遠心、上顎第三臼歯近心のセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離を測定し、歯槽骨吸収を評価した。

【結果と考察】OPTN KO マウスはWTマウスと比較して、TEAP陽性細胞数、LPSとRANKLの皮下注射による頭蓋骨の骨吸収、絹糸結紮歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収において有意な上昇を認めた。OPTNは破骨細胞分化に抑制的に働くことから、OPTN KOマウスにおいては破骨細胞が活性化され顕著な骨吸収がおこることが示唆された。破骨細胞におけるOPTNのシグナリングネットワークを解明することが歯周組織破壊機構解明の一助となると考えられる。

O-14

乳歯と永久歯の歯肉溝滲出液中に含まれるタンパク質の網羅的解析 (第2報)

2206

守屋 佑美

キーワード：歯肉溝滲出液, 質量分析, 好中球機能

【目的】永久歯に比べて乳歯の歯肉溝滲出液が歯周炎に進行することは非常に稀である。永久歯と乳歯の歯肉溝滲出液の特性を比較するため、我々は永久歯と乳歯から採取した歯肉溝滲出液 (GCF) のタンパク質を網羅的に解析した (第58回秋季日本歯周病学会学術大会発表)。さらに解析を進め詳細な結果が得られたので報告する。

【材料と方法】昭和大学歯科病院小児歯科に入院中の混合歯列期の小児を対象とし、同一口腔内の上顎中切歯および乳犬歯からGCFを採取した。採取したGCFを用いて、質量分析法にてタンパク質の網羅的解析を行った。さらに好中球由来のタンパク質であるMyeloperoxidase (MPO), Lactoferrin (LF) についてはELISA法にて定量した。また、好中球細胞外トラップ (NETs) の形成に必須であるシトルリン化したHistoneをウエスタンブロット法にて確認した。なお、本研究は昭和大学歯学部医の倫理委員会承認の下行った (承認番号2013-033号)。

【結果と考察】タンパク質の網羅的解析の結果、乳歯GCFは好中球や上皮由来のものが多く、永久歯GCFは血漿や免疫グロブリン由来のものが多かった。ELISA法の結果、GCF中のMPOとLFの濃度は永久歯と比べて乳歯で有意に高かった ($P < 0.01$)。さらに、両者のGCFからシトルリン化したHistoneH3が検出された。本研究の結果より、永久歯と比較して乳歯の歯肉溝組織は好中球が豊富に存在していること、歯肉が健全な乳歯と永久歯の歯肉溝においてもNETs形成がみられることが示唆された。

O-15

歯根膜Nestin陽性細胞の解析

2504

岩山 智明

キーワード：歯根膜, 間葉系幹細胞, nestin, 周皮細胞

【目的】歯根膜には高い自己複製能と多分化能を有する間葉系幹細胞が含まれており、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担っていると考えられる。これまでに分子マーカーを用いて間葉系幹細胞を標識する試みが多くなされているが、その中でもマウスnestin陽性細胞は移植実験によって*in vivo*で自己複製能と多分化能を有することが示されている。そこで本研究ではマウス歯根膜中のnestin陽性細胞について、その局在や細胞性状、細胞系譜について解析を行った。

【材料と方法】Nestin-GFPマウスから上顎骨を採取し、固定・脱灰後、凍結切片を作製し、免疫組織学的解析を行った。ついで同マウスの結合組織からGFP陽性細胞を単離し、FACSによる細胞表面抗原の解析、CFU-Fアッセイ、骨芽細胞・脂肪細胞への分化誘導実験を行った。さらにNestin-Cre; R26-Tomatoマウスを作製し、細胞系譜解析を行った。

【結果と考察】歯根膜中のnestin陽性細胞は毛細血管近傍に位置し、周皮細胞マーカーを発現し、血管内皮細胞の基底膜にその細胞体を包まれた周皮細胞であった。単離したnestin陽性細胞は間葉系幹細胞マーカーであるCD44, CD90, CD105, Sca-1, PDGFRを発現し、高頻度にCFU-Fを形成し、骨芽細胞・脂肪細胞への分化能を有したことから、間葉系幹細胞を多く含む細胞集団であることが示唆された。細胞系譜解析により、nestin系譜細胞も周皮細胞であり、長期間の観察後も周囲の細胞へと分化せず、血管周囲に留まっていることから、歯周組織の恒常的な代謝回転には寄与しない細胞集団であることが示唆された。

【結論】歯根膜組織中のNestin陽性細胞は周皮細胞であり、間葉系幹細胞を多く含む細胞集団である。

O-16

歯根膜細胞におけるPLAP-1による低酸素応答の制御

2504

山本 智美

キーワード：PLAP-1, 低酸素応答, 歯根膜, 低酸素誘導性因子

【目的】本研究では、低酸素状態が歯根膜細胞におけるPLAP-1の発現に及ぼす影響を明らかにするとともに、PLAP-1が歯根膜細胞の低酸素応答に及ぼす影響とそのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を低酸素下 (1%O₂) にて培養し、PLAP-1の発現をreal-time PCR法及びウエスタンブロット法にて検討した。また、HIF-1 α 安定化試薬Deferoxamine (DFO) もしくはHIF-1 α 阻害薬chetominを用いてPLAP-1の発現にHIF-1 α が関与するかどうかを検討した。次に、si RNA導入によりPLAP-1を抑制したHPDLの低酸素応答について、HIF-1 α の発現を検討した。さらにTGF- β 中和抗体存在下でHPDLを培養した際の、HIF-1 α の発現についても検討を加えた。

【結果と考察】HPDLを低酸素下にて培養することによりPLAP-1の発現上昇を認め、また、DFO刺激によりPLAP-1の発現は上昇した。その上昇はchetomin存在下で抑制された。一方、PLAP-1抑制HPDLは、コントロールと比較し、低酸素下でのHIF-1 α の発現が亢進し、同変化はTGF- β 中和抗体存在下で抑制された。以上の結果より、低酸素によって誘導されたPLAP-1はHIF-1 α の発現を抑制的に制御し、そのメカニズムにTGF- β が関与していることが示唆された。本研究結果より、過度あるいは長期化した低酸素応答をPLAP-1依存的に制御するメカニズムが歯根膜組織の恒常性維持に関与しているのではないかと考えられる。

O-17

インテグリン発現による歯根膜細胞の遊走制御

2504

河村 麻理

キーワード：歯根膜細胞, 遊走, インテグリン, 細胞外基質

【目的】歯周組織の創傷治癒と再生には、歯根膜細胞の遊走が重要である。細胞遊走は、成長因子のみならず細胞外基質（ECM）とインテグリン/細胞骨格系間の作用によっても制御を受けるため、インテグリン発現の選択的制御は細胞遊走の促進に繋がる可能性がある。したがって、本研究では歯根膜細胞の遊走時に発現する細胞接着因子とECMを解析し、歯根膜細胞の遊走を制御するインテグリンサブユニットを調べた。

【材料と方法】1. 細胞と遊走：ヒト抜去歯から歯根膜細胞を分離培養し（岡山大学研究倫理委員会 #2070）、細胞骨格制御分子であるROCKとRac1の阻害剤いずれかの前処理下で、遊走因子で刺激した38時間後の細胞遊走面積を測定した。2. 遺伝子発現解析：遊走時の全RNAを回収し、PCR Arrayを用いて84種の細胞接着因子とECMの遺伝子発現を調べた。3. インテグリンの抑制と細胞遊走：インテグリンの各サブユニットの中和抗体によってインテグリンの発現を抑制し、細胞遊走へ与える影響を調べた。

【結果と考察】1. 細胞の遊走は血小板由来細胞増殖因子（PDGF-BB）によって増加した。その効果は、ROCK阻害剤が促進し、Rac1阻害剤が抑制した。2. 遊走時のフィブロネクチンとI型コラーゲンの遺伝子発現量は減少し、インテグリン（ $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\beta 1$ ）の発現量は増加した。この変化は、ROCK阻害剤とRac1阻害剤で前処理すると反対の傾向となった。3. インテグリン $\alpha 5$ と $\beta 1$ の中和抗体は、ともに遊走を抑制する傾向にあった。4. インテグリン $\alpha 5\beta 1$ の発現を制御することは、歯根膜細胞の遊走制御に応用できる可能性がある。

【結論】PDGF-BB刺激下での歯根膜細胞の遊走には、インテグリン $\alpha 5\beta 1$ 発現が関与する。

O-18

歯根膜細胞スフェロイドは骨分化能を増強する

2504

森谷 友貴

キーワード：歯根膜細胞, スフェロイド, 多分化能, 石灰化

【目的】スフェロイド（細胞凝集塊）は単層培養細胞と比べ、細胞分化などの生理的機能が向上しており再生医療への応用が期待されている。本研究では、多分化能を有することが知られている歯根膜細胞（PDL）とスフェロイド作製技術を利用して、PDLスフェロイドを作製し、その多分化能に関わる機能解析を行うことを目的とした。

【材料と方法】ヒト抜去歯より採取した歯根膜組織から単離・培養したPDLをスフェロイド作製用マイクロウェルチップに播種し、PDLスフェロイドを獲得した。PDLスフェロイドおよび単層培養PDLを用いて、FACSにより細胞表面抗原の発現を、Real-time PCR法によりOct-4, Nanogの遺伝子発現を検証した。さらに、骨分化誘導培地で培養し、Real-time PCR法によりALP, OCN, RUNX2の遺伝子発現を検証した。また、骨分化誘導により形成された石灰化結節をアリザリンレッドにて染色し、骨分化能について検討した。最後に、脂肪、軟骨分化誘導培地で培養し、オイルレッドO染色、アルシアンブルー染色を行った。

【結果と考察】PDLスフェロイドは、単層培養PDLと同様に、歯根膜細胞で認められる表面抗原を発現し、単層培養PDLよりもOct-4, Nanogの遺伝子発現は上昇した。骨分化誘導培養において、PDLスフェロイドは、単層培養PDLと比較して、ALP, OCN, RUNX2の遺伝子発現が上昇し、石灰化結節量が増加した。また、PDLスフェロイドは単層培養PDLと同様に脂肪、軟骨への分化能を認めた。

【結論】PDLスフェロイドでは、単層培養PDLと同様に多分化能を有し、骨分化能を増強することが示唆された。

会員外共同研究者：中澤浩二先生（北九州市立大学）、有吉渉先生、中富満城先生（九州歯科大学）

O-19

骨芽細胞における新規S1P/S1PR2シグナル伝達経路はRunx2発現を増加させる

2504

東 克匡

キーワード：骨芽細胞分化, スフィンゴシン-1-リン酸, Smad1/5/8, Runx2

【目的】スフィンゴシン-1-リン酸（S1P）は、S1PR1-R5のGタンパク質共役受容体を介して細胞の増殖、分化に関与する。これまでに演者らは、S1P/S1PR1経路によるALP発現増加を見出したが、S1PによるALP発現増加にはS1PR1のみならずS1PR2も関与した。そこで本研究では、S1PR2を介したALP発現増加を仲介する経路として、RhoA/ROCK, Smad1/5/8を介したRunx2の発現増加に着目して検討を行った。

【材料と方法】マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株MC3T3-E1を用いて、S1P受容体及びRhoA/ROCKの阻害を行い、S1PがRhoA活性化、Smad1/5/8リン酸化及びRunx2発現に及ぼす影響について検討した。RhoA活性はRhoA G-LISAを、mRNA発現はリアルタイムRT-PCR法を、タンパク質発現はウエスタンブロット法を用いて検討した。

【結果と考察】MC3T3-E1細胞において、S1PによるS1PR2を介したRhoA活性化が認められた。また、S1PR2/RhoA/ROCKを介したSmad1/5/8リン酸化亢進及びRunx2発現増加を見出した。以上の結果から、骨芽細胞においてS1PR2を介した新規S1Pシグナル伝達経路は、Runx2発現を増加させ、ALP発現増加に関与することが示唆された。

【結論】MC3T3-E1細胞において、S1PによるS1PR2/RhoA/ROCK経路の活性化は、Smad1/5/8リン酸化亢進及びRunx2発現増加を引き起こし、骨芽細胞分化に関与する可能性がある。

O-20

高繰り返し超短パルス青色レーザーを用いた低出力照射が骨芽細胞へ及ぼす効果

2504

三上 理沙子

キーワード：レーザー, LLLI, 細胞増殖, 骨芽細胞, 細胞分化

【目的】低出力レーザー照射（Low level laser irradiation (LLLI)）は創傷治癒や骨折治癒の促進をすることが知られている。また、骨芽細胞を用いた*in vitro*の研究において、LLLIは様々な増殖因子、骨形成関連遺伝子の発現や石灰化を促進することが報告されている。しかし青色領域のレーザーを用いたLLLIの報告は未だほとんどなく、高繰り返しパルスによるLLLIの効果は十分に検証されていない。本研究では高繰り返し超短パルスの青色レーザーを用いたLLLIの骨芽細胞へ及ぼす作用を検討することを目的とした。

【材料および方法】骨芽細胞株ST2, MC3T3-E1を96穴プレートに播種し、骨誘導培地にて培養後、波長405nm, パルス幅3psの青色レーザー（Spectra-Physics, Insight DeepSee, 810nm SHG）を用いて0（非照射群）、31.3, 93.8, 156.3 mW/cm²の出力で各wellに対して1分間照射を行った。照射後7日間培養し、細胞増殖測定、ALP活性測定を行い、至適照射条件を探索した。さらに、Osterix, ALPなどの骨芽細胞分化マーカーのmRNA発現の測定をreal-time PCRを用いて行った。

【結果】非照射群と比較し、LLLI群では細胞増殖が有意に促進され（ $p < 0.05$ ）、その効果は出力依存性であった。またALP活性もLLLI群において有意に上昇し（ $p < 0.05$ ）、その効果は93.8 mW/cm²の出力において最大であった。骨芽細胞分化マーカーについては、93.8 mW/cm²のLLLT群において、照射72時間後、7日後のOsterix, ALPのmRNA発現が有意に増加していた（ $p < 0.05$ ）。

【結論】新規青色レーザーを用いたLLLIは骨芽細胞の細胞増殖、ALP活性を亢進させ、骨形成を促進させる可能性があることが示唆された。

O-21

One-Stage Full-Mouth SRP 後の生体応答と臨床効果

2504

両角 俊哉

キーワード：Full-mouth SRP, 生体応答, バイオマーカー

【目的】 One-stage full-mouth SRP (FM-SRP) は、治療後に歯周病原細菌が口腔内伝播するのを防ぐ目的で考案され、その臨床的效果については多くの報告がある。一方で、処置後の菌血症が生体に及ぼす影響について、その詳細は明らかでない。本研究の目的は、FM-SRP後の生体における生化学・細菌学的変化および臨床的效果を検討することである。

【材料と方法】 中等度～重度の広汎型慢性歯周炎患者29名においてFM-SRPを行った。末梢血と歯肉溝滲出液 (GCF) の採取を計3回 (処置前、1日後、6週後)、緑下ブランク採取と歯周病検査を計2回 (処置前、6週後) 行った。得られた試料からマルチプレックアレイによる血清・GCF中バイオマーカーの網羅的解析、Invader PLUSアッセイによる歯周病原細菌数の定量、ELISA法によるそれら細菌に対する血清抗体価および比濁時間分析法による血中エンドトキシン濃度を測定した。

【結果と考察】 処置前と1日後の比較で、血清中CRP、IFN- γ 、IL-6、IL-12p70が、GCFではIL-6、IL-12p70、TNF- α レベルが有意に上昇した。また起床時体温も有意に上昇した。処置前と6週後の比較では、総菌数、*P. gingivalis*数および比率 (対総菌数) が有意に減少した。歯肉炎指数、BOP陽性率、プロービングポケットデプス、臨床的アタッチメントレベルも6週後に有意な減少を示した。

【結論】 FM-SRPは高い治療効果を示す一方、処置直後では全身と局所において炎症性サイトカインを著しく上昇させていることが示唆された。

O-22

Azithromycin を用いたOne-Stage Full-Mouth SRP 後の生体応答と臨床効果

2504

八島 章博

キーワード：Azithromycin, Full-mouth SRP, 生体応答

【目的】 Azithromycin (AZM) はOne-Stage Full-mouth SRP (FM-SRP) 術前に投与することで感染のコントロールを行い、治療効果を上げるとともに菌血症を防止する目的で使用されるが、その効果の詳細は明らかでない。本研究の目的は、AZMを用いたFM-SRP後の生体における生化学・細菌学的変化および臨床的效果を検討することである。

【材料と方法】 中等度～重度の広汎型慢性歯周炎患者31名に対し術前にAZM2gを投与した後FM-SRPを行った。末梢血と歯肉溝滲出液 (GCF) の採取を計3回 (処置前、処置翌日、6週後)、緑下ブランク採取と歯周病検査を計2回 (処置前、6週後) 行った。得られた試料からマルチプレックアレイによる血清・GCF中バイオマーカーの網羅的解析、Invader PLUS assayによる歯周病原細菌数の定量、ELISA法によるそれら細菌に対する血清抗体価および比濁時間分析法による血中エンドトキシン濃度を測定した。

【結果と考察】 AZMを併用しFM-SRPを行うことで血清中CRPとGCF中CRP、IFN- γ 、IL-5、IL-6、IL-12p70、TNF- α が有意に上昇したが体温の上昇は認められなかった。6週後ではGCF中のCRP、IL-6、TNF- α および*P. gingivalis*血清抗体価、総菌数、*P. gingivalis*数、*P. intermedia*数が処置前より有意に減少した。GI、BOP陽性率、プロービングポケットデプス、臨床的アタッチメントレベルも処置前より6週後に有意に改善した。

【結論】 AZMを用いることでFM-SRPの臨床効果を上げるとともに、処置直後の全身における炎症性サイトカインと体温の上昇を抑制することが可能であることが示唆された。

O-23

SRPおよびLDDS前後における *Porphyromonas gingivalis* 検出キット (DK13-PG-001) の有用性に関する多施設共同研究

2302

中山 洋平

キーワード：細菌検査, *Porphyromonas gingivalis*, イムノクロマトグラフィ

【目的】 慢性歯周炎のリスク因子である歯周病原菌の検出は、根拠に基づく歯周治療を進めるために重要な検査項目である。我々は、モノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィによる新規検出キット (DK13-PG-001) を使用して、歯肉緑下ブランク中の*P. gingivalis*を検出し、キットスコアと歯周炎重症度で正の相関を示すことを報告した。そこで今回、歯周基本治療 (SRP) および局所薬物配送システム (LDDS) 前後での臨床パラメーターの変化と本キットおよびPCRインベーター法の結果を使用し、歯周基本治療における本キットの臨床的有用性を検討した。

【材料と方法】 慢性歯周炎患者62名のプロービングポケット深さ (PPD) 4～9mmの118部位を対象とし、ベースライン (SRP前)、再評価 (SRP後) および最終検査時 (LDDS後) に歯周病検査と細菌検査を行った。各治療前後での本キットとPCRインベーター法および臨床パラメーターの変化量との相関を検討した。

【結果と考察】 各治療段階で、本キットとPCRインベーター法の検出結果に強い正の相関が認められ、その感度は同等であった。SRP前後で、キットスコアとPPDおよびCALと正の相関が認められ、その変化量においても正の相関を認めた。

【結論】 *P. gingivalis* 検出キット (DK13-PG-001) は、チェアサイドにおける歯肉緑下ブランク中の*P. gingivalis*の半定量を、迅速かつ効果的に行うことができ、SRP後の臨床パラメーターの評価に有用であることが示唆された。

O-24

キャビテーション噴流を用いたフィクスチャー表面のバイオフィーム除去効果

2504

山田 純輝

キーワード：キャビテーション, インプラント周囲炎, バイオフィーム

【背景・目的】 インプラント周囲炎が進行しフィクスチャーが露出すると、多孔質に加工された表面にバイオフィームが付着し、除去は困難となる。一方、水中で水がベンチュリノズル内を通過すると急速な減圧に伴いキャビテーションが発生する。キャビテーション気泡の崩壊による衝撃力は金属材料の表面改質や種々の洗浄へ応用されている。そこで今回キャビテーション噴流を用いて多孔質なフィクスチャー表面に形成されたバイオフィームの除去効果を検討した。

【材料と方法】 キャビテーションノズルの出口形状 (出口長さ: L_d , 出口角度: θ), 噴射条件 (噴射圧力: p , 対象までのスタンドオフ距離: s) を変動させ、それぞれの条件においてPVDFセンサーを用いて単位時間当たりの衝撃エネルギーを測定した。最も衝撃エネルギーの大きい組み合わせの条件でバイオフィーム除去実験を行った。バイオフィームを4人のボランティアの口腔内ステント上に固定したフィクスチャー上に形成し、実験に供した。キャビテーション噴流とウォータージェットで除去効果を比較し、またキャビテーション噴流の噴射時間による除去効果への影響を検討した。除去効果は噴射前後の状態をデジタルマイクロスコープと走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察・評価した。

【結果・考察】 キャビテーション噴流はウォータージェットと比較して有意に高いバイオフィーム除去効果を示した。バイオフィーム残存率はキャビテーション噴流により、時間依存的に減少した。本研究から、キャビテーション噴流はフィクスチャー表面からバイオフィームを除去するための有効な方法であることが考察された。

O-25

慢性歯周炎に対する抗菌の光線力学療法と局所薬物
配送システムの生物学的効果

2504

保莉 崇大

キーワード：a-PDT, LDDS, バイオマーカー

【目的】近年、光と色素の併用による光化学反応を利用した抗菌の光線力学療法（a-PDT）が新しい手段として注目を集めている。これまでに様々な基礎・臨床的研究が行われ、その有用性が示唆されている。本研究の目的は、慢性歯周炎患者の歯周ポケットに対しa-PDTもしくは局所薬物配送システム（LDDS）を行い、その生化学・細菌学的変化および臨床的効果を検討することである。

【材料と方法】慢性歯周炎患者23名を無作為に2群に分け、プロービングポケットデプス（PPD）5-8 mmの2部位に対し、a-PDT（実験群）もしくはLDDS（対照群；ミノサイクリン軟膏）を2週連続（計2回）行った。歯肉溝滲出液（GCF）、緑下プラーク採取と歯周病検査を計3回（処置前、処置1週後、4週後）行った。得られた試料からGCF中バイオマーカーをマルチプレックスアレイにて網羅的に解析した。また、modified Invader PLUS assayにより歯周病原菌数を定量した。

【結果と考察】対照群においてIFN- γ 、IL-1 β 、*P. gingivalis*、*T. forsythia*数および各比率（対総菌数）が1週後に有意に減少した。臨床パラメーターでは、両群においてBOP陽性率、PPD、臨床的アタッチメントレベルが4週後に有意な減少を示した。今後はさらに被験者数を増やすと同時に細菌叢の変化についても解析する予定である。

O-27

多項目唾液検査システム（AL-55）の歯周病スクリー
ニング検査としての実用性検討

3001

牧 利一

キーワード：唾液、多項目検査、スクリーニング

【目的】唾液による総合的な口腔検査法の確立を目指し、演者らは、う蝕、歯周病、口腔清潔度に関する7項目の唾液因子を5分間で測定可能な唾液検査システム（AL-55）を開発した。これまでにAL-55の検査結果と口腔状態およびその変化との相関を立証している（第56、57回日本歯周病学会学術大会）。本研究では集団健診への応用に向けて、AL-55の歯周病に関する3項目（潜血、白血球、タンパク質）による歯周病スクリーニングの実用性を検証した。

【方法】【対象】同意が得られた日立健康管理センター健康診断の受診者197名を対象とした。【口腔内の検査】Probing pocket depth（PPD）を測定した。【AL-55による測定】蒸留水3mLによる洗口吐出液を試料とし、AL-55によって潜血、白血球、タンパク質の量を測定した。【解析】4mm以上のPPDの有無とAL-55の検査結果の関連性をt検定にて評価した。また、AL-55の3項目の各々について、4mm以上のPPDの有無を判定するカットオフ値をROC解析にて設定した。これらカットオフ値を用いて陽性と判定された項目数と4mm以上のPPDの有無との関連性をロジスティック回帰分析にて評価した。

【結果と考察】t検定の結果、AL-55の3項目のいずれも、4mm以上のPPDの有無と有意な関連を示した（ $p < 0.05$ ）。ロジスティック回帰分析の結果、AL-55の3項目のうち、陽性と判定された項目数が多いほど、4mm以上のPPDの有無に関するオッズ比がより高値を示した（陽性項目数が1項目：2.6、2項目：7.6、3項目：9.4）。

【結論】AL-55が集団健診における歯周病のスクリーニング検査に有用であることが示唆された。

O-26

日本人における歯科審美領域の評価

2699

伴場 紀子

キーワード：審美、スマイル、歯肉

【目的】近年、インプラント治療において、患者の審美的要求は高くなってきている。一般的に審美エリアとは、スマイルした時に歯肉が見える中切歯から犬歯までとされる。しかし、ドイツや中国での報告によると、小臼歯部においてもフルスマイル時に歯肉や歯間乳頭が見えることが報告されている。今回我々は日本人のフルスマイルを撮影し、審美領域について検討したので報告する。

【材料と方法】本研究は、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会の承認を受けて施行した（第327番）。対象は上顎に欠損がなく補綴処置のなされていない20～35歳の患者とした。スマイル時の写真撮影を行った後に中切歯の歯冠長径をノギスで計測し、画像編集ソフトで計測した中切歯の歯冠長径とノギスで計測した実測値により縮尺率を算出した。次に上唇に被覆されなかった歯肉および歯間乳頭の長さを計測し、縮尺率によって計測値を補正した。

【結果】対象は40名（女22名、男18名）、年齢は28.4 ± 3.2歳であった。スマイル時に左右共に歯肉/歯間乳頭が観察されたものは、中切歯65/93%、側切歯80/95%、犬歯70/95%、第一小臼歯83/90%、第二小臼歯80/90%、第一大臼歯28/40%であった。上唇に被覆されなかった歯肉の長さの中切歯1.3 ± 1.4mm、側切歯2.4 ± 1.8mm、犬歯1.9 ± 1.8mm、第一小臼歯2.3 ± 1.8mm、第二小臼歯2.3 ± 1.8mm、第一大臼歯1.0 ± 1.6mmであった。

【結論】日本人対象者の80%はフルスマイル時に第二小臼歯部まで歯肉が観察された。これらのことから、コーサソイド、漢民族と同様に、日本人においても従来考えられていたより後方歯まで審美領域になりえると考えられた。

O-28

抜歯即時インプラント埋入における唇側皮質骨穿孔
のリスク評価：バーチャルシミュレーションスタ
ディー

2609

小島 康佑

キーワード：即時インプラント埋入、バーチャルシミュレーションスタ
ディー、唇側皮質骨の穿孔、コンビームCT

【目的】上顎前歯部におけるインプラントのフラップレス・抜歯即時埋入は、審美的な獲得や治療期間の短縮に有効と考えられている。しかし、植立部の骨量・骨形態によっては唇側皮質骨の穿孔が問題となる。そこで今回我々は術前シミュレーションソフトを用いて、上部構造の2つの固定様式による唇側皮質骨穿孔のリスクについて検討したので報告する。

【材料と方法】本研究は神奈川歯科大学倫理審査委員会の承認を受け施行した（第343番）。まず、上顎前歯をすべて有する患者の歯科用CT画像データ（ $n=35$ ）を術前シミュレーションソフトに取り込み3次元画像構築を行った。次に、 $\phi 3.3\text{mm}$ 、 $\phi 4.1\text{mm}$ のインプラント体を補綴学的に理想的な位置（スクリュー固定式およびセメント固定式の上部構造）にシミュレーションし、唇側皮質骨の穿孔頻度を調査した。

【結果と考察】 $\phi 4.1\text{mm}$ のインプラント体をスクリュー固定式で設計した場合、中切歯、側切歯、犬歯部においてそれぞれ17%、57%、27%、セメント固定式において0%、11%、1%の穿孔を認めた。また、 $\phi 3.3\text{mm}$ のインプラント体をスクリュー固定式で設計した場合、中切歯、側切歯、犬歯部においてそれぞれ4%、39%、6%、セメント固定式において0%、4%、1%の穿孔を認めた。両群において、インプラント体の直径及び固定様式に関わらず、側切歯での皮質骨穿孔率が最も高かった。

【結論】今回のバーチャルシミュレーションではスクリュー固定式はセメント固定式に比べ、インプラント体の唇側皮質骨穿孔のリスクが高かった。特に骨幅の狭い側切歯部においては顕著であったため、術前シミュレーションによるインプラントサイズの見直しや上部構造の固定様式の検討が重要と考えられた。

O-29
3104

間葉系幹細胞の細胞機能制御に関する micro RNA の探索

岩田 倫幸

キーワード：歯周組織再生，間葉系幹細胞，マイクロRNA
【目的】 間葉系幹細胞 (MSC) は多分化能を有し，MSC 移植による歯周組織再生療法への応用が目指されているが，MSC は移植局所において歯周組織構成細胞への分化する必要があるため，移植前に多分化能を維持した状態である必要がある。また，micro RNA が MSC の分化制御に影響を及ぼすことが知られている。
本研究では，micro RNA に着目し，MSC の多分化能維持に対して重要な役割を果たす因子の探索することを目的とした。
【材料および方法】 未分化維持状態を想定し，低酸素，低酸素誘導因子 (HIF-1 α) の誘導因子である塩化コバルトおよび脱分化作用を有する Noggin 添加条件下でヒト MSC の培養を行なった。MSC 未分化関連転写因子の mRNA 発現を検討し，更に，micro RNA Array を用いて特徴的に変化する micro RNA の検索を行なった。また，未分化状態での細胞機能制御に関与する micro RNA 同定のため，特徴的な変化を示した micro RNA 発現を強制的に増減させ，骨分化および炎症性サイトカイン発現に対する影響を検討した。
【結果および考察】 未分化維持状態に変化を示した micro RNA の中から未分化関連転写因子との相関から2つの micro RNA を候補として着目し，発現調整による未分化関連転写因子発現を確認したところ，ETV5 と GATA6 の発現は減少したが，KLF12, SOX11 の発現は増加した。更に，骨分化誘導時において骨分化関連遺伝子発現が促進され，炎症性サイトカイン遺伝子発現も亢進した。
以上から，未分化関連転写因子と micro RNA の相互作用によって MSC 細胞機能が制御されることが示唆された。
【結論】 MSC の細胞機能制御にこれらの micro RNA が低酸素誘導性転写因子群との相互作用に関して重要な役割を果たすことが示唆された。

O-31
2205

ヒト iPS 細胞と霊長類コモン・マーモセットを用いた新規歯周組織再生療法の試み

黄地 健仁

キーワード：ヒト iPS 細胞，間葉系幹細胞，神経堤細胞，コモン・マーモセット
【目的】 歯周組織は神経堤細胞に由来する間葉系組織である。良好な骨を維持するためには神経の存在が必須であるという報告から，骨と神経への分化が可能な幹細胞を用いることは歯周組織の再生には重要事項と考えられる。我々はヒト iPS 細胞を用いて神経堤様細胞集団へと誘導を行った。その集団から間葉系幹細胞を純化分離し，さらに霊長類コモン・マーモセットにおける同細胞の観察によりヒトと類似した霊長類の歯周組織解析と再生療法への応用の可能性を検討した。
【材料と方法】 ヒト iPS 細胞から作製された神経堤様細胞集団は細胞表面マーカーを指標としてフローサイトメーターにより解析し，分離された。細胞増殖能，分化能をもとに歯周組織再生療法応用へ向けてその性質を解析した。また胎児期から成体期のコモン・マーモセットの歯周組織における臨床所見，画像所見及び免疫組織学的評価を実施した。
【結果と考察】 ヒト iPS 細胞から作製された神経堤様細胞集団は，ヒト高純化間葉系幹細胞マーカー LNGFR, THY-1 を発現した。この細胞集団は自己複製能を有し，骨細胞を含めた間葉系，さらには神経細胞を含めた神経系への分化可能な幹細胞集団であった。また，コモン・マーモセットでは歯原性間葉組織に LNGFR⁺, THY-1⁺ の発現が観察された。
【結論】 神経堤細胞の性質を持ち合わせたヒト高純化間葉系幹細胞をヒト臨床応用に近づけるには霊長類のみならず霊長類レベルでの解析が必要である。ヒト iPS 細胞から効率よく LNGFR⁺THY-1⁺ 細胞を作製し，さらにヒトに類似したコモン・マーモセットの歯周組織における評価を行うことで，ヒト iPS 細胞及びコモン・マーモセットの再生医療への応用の可能性が示唆された。

O-30
3199

凍結保存が間葉系幹細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex による骨再生に及ぼす影響

本池 総太

キーワード：凍結保存，間葉系幹細胞，細胞外基質，骨再生
【目的】 間葉系幹細胞 (MSCs) と自身が産生する細胞外基質 (ECM) を利用して得られる細胞集塊 Clumps of MSCs/ECM complex (C-MSC) は，人工の足場材料を必要とせずに三次元的に MSCs を培養・移植可能で，効果的な組織再生能を示す (Cytotherapy, 2015)。一方，MSCs は MHC Class II の発現が低く，他家細胞移植療法への応用が期待されている。他家由来 MSCs から作成した C-MSC が凍結保存可能であれば，C-MSC を細胞製剤とみなす新規の組織再生療法の開発につながる。しかし，凍結時に生じる水分子の結晶が細胞膜を傷害し，MSCs の生存率・機能を著しく低下させる可能性がある。そこで本研究では，凍結保存が C-MSC の細胞機能に与える影響を検討した。
【方法】 ラット大腿骨から分離した MSCs から細胞集塊 C-MSC を作製した。C-MSC を一塊 (2 \times 10⁵ cells) ずつ 10% DMSO と FBS 含有の DMEM からなる凍結培地 500 μ l に浸漬し，凍結バイアルを用いて -80 $^{\circ}$ C で凍結した。48 時間後に 37 $^{\circ}$ C に設定した恒温水槽で急速解凍し，増殖培地で培養を行った。対照として細胞シートを凍結した群，及び凍結せずに培養を継続した C-MSC 群を用意した。それぞれの死細胞数を TUNEL 染色で観察した。また，石灰化誘導培地にて培養後，real time-PCR およびカルシウム沈着量で骨分化能を評価した。
【結果】 細胞シートの凍結では，多量の TUNEL 陽性細胞を認めたのに対し，C-MSC の凍結では死細胞の増加はほとんど見られなかった。また，凍結された C-MSC は通常と同等の石灰化能を有していた。
【結論】 C-MSC の凍結保存では，重篤な細胞死は誘導されず，高い骨再生能を維持していた。この事実は，C-MSC が骨再生療法のための凍結可能な細胞製剤として応用出来ることを示唆する。

O-32
2504

Effect of rhFGF-2 combined with gelatin/ β -TCP sponge on root coverage: a pilot study in beagle dogs.

Ammar Shujaa Addin

Keywords: Root coverage, Gingival recession, rhFGF-2, gelatin/ β -TCP, Beagle dogs
Objective: Coronally advanced flap combined with subepithelial connective tissue graft is still to be the gold standard therapy for the treatment of gingival recession defects. However, this procedure is associated with increased morbidity and patient discomfort, related to the harvesting procedure. The use of growth factors as means to promote and accelerate wound healing and regeneration may provide a new paradigm in root coverage. Therefore, in this study, we evaluated the effect of rhFGF-2 combined with gelatin/ β -TCP on root coverage in dogs
Material and Methods: This study was approved by the institutional animal care and use committee of Tokyo Medical and Dental University (0160319 A). In six beagle dogs, artificial gingival recession defects were created on the buccal surfaces of right and left maxillary canines. Bilateral defects were randomized to receive rhFGF-2 combined with gelatin/ β -TCP sponge or gelatin/ β -TCP sponge alone. Quantitative/qualitative analyses were performed histomorphometrically, as well as radiographically using Micro-CT.
Results: Clinically complete root coverage was achieved in both groups. Regarding Micro-CT results, rhFGF-2/gelatin/ β -TCP group demonstrated statistically significant outcomes in terms of bone volume and bone area. Histologically new bone height and new cementum were more pronounced in the rhFGF-2 combined with gelatin/ β -TCP sponge than in the scaffold alone group.
Conclusion: rhFGF-2 combined with gelatin/ β -TCP is more effective in promoting new bone formation and periodontal attachment than the scaffold alone after root coverage.

O-33

チタン製インプラントの腐食を考察する

2609

松井 孝道

キーワード：チタン製インプラント、腐食、インプラント周囲炎

【目的】インプラントに使用されている純チタンはin vitroでの研究によって一定条件下では腐食することが明らかにされている。そこで口腔内に存在するチタン製インプラントの腐食の実態について調査した。

【材料と方法】口腔内に存在し撤去された各種インプラントの粘膜貫通部の鏡面研磨面を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察するとともに、インプラント周囲炎に対して外科的治療が必要となり摘出されたインプラント周囲の肉芽組織を電子線マイクロアナライザー (EPMA) によりチタンの溶出が認められないかチタンの元素マッピングを行った。

【結果と考察】口腔内から撤去された各種インプラントの鏡面研磨面からは口腔内に存在した期間にかかわらず多数の腐食孔が観察された。また摘出されたすべてのインプラント周囲の肉芽組織からもチタン元素が確認された。

【結論】チタンは生体親和性が高く、耐食性に優れた金属であるが、この耐食性はチタン表面に不動体皮膜として形成される厚み数nmのチタン酸化膜によるものである。しかし口腔内での過酷な環境下でpHの低下、溶存酸素濃度の低下、細菌、フッ素の存在など様々な要因が複雑に関連し合うとチタンの腐食につながっていくものと思われる。粘膜貫通部のチタン鏡面研磨面に腐食孔が形成されるとブラークコントロールにも不利となる。特にインプラント周囲炎に罹患し骨吸収によりインプラントの粗造面が骨縁上に露出した場合、チタンが腐食しやすい環境となり、溶出したチタンは骨吸収の促進因子となり得るため注意が必要である。

O-35

グルコース濃度がナノレベル表面構造制御チタン金属上における硬組織分化誘導に及ぼす影響

2504

山脇 勲

キーワード：高血糖、骨芽細胞、硬組織形成、オッセオインテグレーション、酸化チタン

【目的】近年、インプラント周囲炎症例が多く報告され、中でも糖尿病患者はリスクが高く、確実な初期固定の早期獲得が望まれる。本研究では、グルコース濃度がナノレベル表面構造制御チタン表面上での硬組織形成誘導に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】市販JIS規格2級純チタンを研磨後に10M水酸化ナトリウム水溶液に室温で24時間浸漬・攪拌しTitania Nano Sheet構造 (TNS) を析出し、TNS析出チタンと非析出チタンをそれぞれ600℃で1時間焼成し実験に供試。生後8週齢Goto-Kakizaki雄性ラットの大腿骨髄から骨髄間葉細胞を単離し、播種。その後、空腹時血糖値を参考に、通常グルコース群 (5.5mM)、コントロールされた糖尿病患者群 (8.0mM)、非コントロール糖尿病患者群 (12mM、24mM) の4群に濃度調整した培養液で硬組織分化誘導を行い、Alkaline phosphatase (ALP) 活性、Osteocalcin (OCN) 産生、細胞外マトリックスへのCalcium (Ca) の析出ならびに硬組織組成の検討を行った。

【結果と考察】培養1、2週ともにグルコース濃度が上昇するにつれて両群ともに低いALP活性を示した。培養3、4週のOCN産生量とCa析出量では、5.5mMと比較して24mMはほぼ同等量、8.0mM、12mMは著明に低い傾向を示した。Alizarin染色像では、グルコース濃度上昇によってCa析出結晶が縮小化しており、石灰化状態に影響を及ぼしていると考えられた。

【結論】糖尿病による高血糖状態はナノレベル表面構造制御チタン金属において、インプラントフィクスチャーの初期固定やインプラント周囲炎予防に重要な役割を果たす骨髄細胞の硬組織分化および正常な石灰化物形成に影響を及ぼすことが示唆された。

O-34

インプラント-アバットメント接合部封鎖性に及ぼす水平荷重負荷の影響第2報：純チタンとチタン合金の材質の違いによる比較研究

2609

安井 絢子

キーワード：インプラント-アバットメント接合部、封鎖性、側方圧

【目的】インプラント上部構造に側方圧が加わることで、インプラント-アバットメント接合部 (FAI) 封鎖性は低下することが示唆されている。FAI封鎖性の低下は、同部への細菌侵入を許容し、インプラント周囲疾患の誘因となる可能性がある。そこで我々は、数種のコンカルコネクションを有したインプラントを使用し、FAI封鎖性の違いを明らかにしてきた。今回、同一形状の純チタン (pTi) インプラントとTi-6Al-4Vインプラントを作製し、材質の違いがFAI封鎖性に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】同一形状の、コンカルコネクションを有したpTi (Grade IV) およびTi-6Al-4Vで作製したインプラント体を使用した。インプラント体を、それぞれ治具に固定後、アバットメントを推奨トルクにてスクリューで固定した。アバットメントに対し、水平荷重 (23~225N) を加え、走査型電子顕微鏡 (SU-70, HITACHI) にてインプラントとアバットメントの間隙を計測した。また、深度測定器 (DH-B, ユニオン光学) にて水平荷重負荷前後のインプラント体内径 [X軸 (水平荷重に対して平行な軸)、Y軸 (水平荷重に対して垂直な軸)] を計測した。

【結果と考察】1.FAI距離：225 Nおよび水平荷重負荷解除の際、有意な差を認めた。2.水平荷重負荷前後のインプラント体内径：X軸方向の内径で有意な差を認めた。pTiは、Ti-6Al-4Vインプラントと比較して114N以上で、FAI距離が約1.5倍、側方荷重負荷解除の際には、約4倍大きいことから、Ti-6Al-4Vの封鎖性はpTiと比較し、良好であることが示唆された。

O-36

類似した臨床症状を呈する複合感染症から紐解く恒常性維持機構

2203

芝 多佳彦

キーワード：複合感染症、インプラント周囲炎、歯周炎、メタトランスクリプトーム解析、キーストーン種、共起ネットワーク

【目的】歯周炎とインプラント周囲炎は口腔内の代表的な複合感染症であり、その臨床症状は類似している。しかし、インプラント周囲炎では歯周炎と同様の治療を行っても効果が不十分かつ病状の進行が早いとされており、また両疾患主因となる細菌種については未だ論争がある。本研究の目的は、メタトランスクリプトーム解析を用い両疾患における細菌学的な類似性と非類似性を明らかにすることである。

【材料と方法】同一口腔内で歯周炎およびインプラント周囲炎に罹患部を有する12名を被験者とした。疾患部位より歯肉縁下ブラークを採取しRNAを抽出後、次世代シーケンサーを用いて塩基配列の決定を行った。またHuman Oral Microbiome Databaseから健常部位の塩基配列を併せて取得し、細菌学的病原因子の組成を比較・検討した。

【結果と考察】歯周炎とインプラント周囲炎では、生菌組成 (16S rRNA 遺伝子発現量) に非類似性が、機能遺伝子発現 (mRNA 発現量) に類似性が認められた。病原因子組成については両疾患で類似性が認められたが、健常部位のそれとは明らかに異なっていた。また生菌量と比較して機能遺伝子発現が有意に多い、活動性の高い細菌種とそれらの共起ネットワーク構造は、両疾患で非類似性が認められた。

【結論】歯周炎とインプラント周囲炎では異なる細菌種群が類似した機能遺伝子組成を保有しており、これが両疾患の臨床的類似性の基となると推測された。一方で健常部位と明らかに異なる病原因子組成は両疾患の発症と進行に関わると考えられた。また、活動性が高い菌種とそれらのネットワーク構造の違いは、両疾患の病態や予後の違いに関連すると考えている。