## 一般演題回演

(B会場・C会場)

B 会場

O-01~06 O-19~23

C 会場

O-07~18 O-24~27

6月1日(金) B会場 9:00~10:00, 15:00~15:50

C会場 9:00~10:00, 10:20~11:20

6月2日(土) C会場 9:00~ 9:40



炎症歯根膜におけるPLAP-1の発現

2504

平井 麻絵

O-02 初代培養マウス歯根膜由来細胞のクローン解析

2504

上田 亜美

キーワード:歯根膜, PLAP-1, 炎症, レーザーマイクロダイセクション

【目的】PLAP-1はsmall leucine rich proteoglycan familyに属する細胞外基質タンパクで、TGF-β、BMP-2、FGF-2等のサイトカインと直接結合することで歯根膜細胞の機能を制御する。さらに、同分子はTLRの機能制御を介し、LPS誘導性の炎症反応を抑制する。しかしながら、PLAP-1の発現制御メカニズムについては未だ十分な情報がない。そこで本研究では、炎症反応が歯根膜におけるPLAP-1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。

【材料及び方法】Lonza社ヒト歯根膜細胞(HPDL)をヒト型リコンビナントIL-1β、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 存在下にて48h培養し、PLAP-1の発現をリアルタイム PCRにて検討した。一方で、絹糸結紮歯周病モデルマウスより顎骨を採取、新鮮凍結切片を作製し、レーザーマイクロダイセクションにて歯根膜組織を採取した。PLAP-1遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法、タンパク発現を LC-MS/MS分析にて検討した。【結果および考察】HPDLを IL-1β、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 存在下にて培養した結果、PLAP-1の発現はコントロールと比較し有意に抑制された。また、絹糸結紮歯周病モデルマウスの歯根膜組織における PLAP-1の発現は遺伝子レベル、タンパクレベルのいずれにおいてもコントロール側と比較し、有意に抑制されていることが明らかとなった。炎症歯根膜組織における炎症抑制因子 PLAP-1の発現低下は、過度の炎症反応を惹起する一因となる一方で、同分子の補完が歯周病に対する新たな治療法となる可能性を示唆している。

O-03

新規機能性脂肪酸の歯肉上皮細胞における抗酸化ストレス作用の検討

2504

構地 麻衣

キーワード:機能性脂肪酸、歯肉上皮細胞、酸化ストレス、抗酸化作

【目的】酸化ストレスの本態は活性酸素 (ROS) であり、歯周疾患への関与が示唆されている。乳酸菌による脂肪酸代謝物のうち10-オキソ-トランス-11-オクタデセン酸 (KetoC) は、ヒト肝細胞において抗酸化応答エレメント (ARE) プロモーター経路を介して抗酸化ストレス作用を発揮することが報告されており、歯肉上皮においても同様の効果が期待される。本研究の目的は、新規機能性脂肪酸の歯肉上皮細胞における抗酸化ストレス反応への関与を検討し、歯周炎の病態形成への影響を検証することである。

【材料と方法】歯肉上皮細胞株 Epi4(大阪大学大学院歯学研究科 村上伸也教授より供与)において、tert-ブチルヒドロベルオキシド(TBHP)誘導性 ROS 産生に対する KetoC の作用について、フローサイトメトリーにて解析した。ARE プロモーター活性をルシフェラーゼアッセイ、抗酸化ストレス関連遺伝子発現を qPCR、MAPキナーゼカスケードの関与を Western Blotting にて解析した。

【結果と考察】Epi4においてTBHP誘導性ROS産生は、KetoCの前処置により抑制された。KetoC刺激によりAREプロモーター活性、抗酸化ストレス関連遺伝子発現、およびERKのリン酸化が認められ、KetoCは歯肉上皮細胞においてMAPキナーゼカスケードを介して抗酸化作用を誘導することが示唆された。会員外共同研究者:小川順、岸野信重(京都大学大学院農学研究科)

キーワード:歯根膜細胞,初代培養,クローニング

【目的】歯根膜は間葉系幹細胞や前駆細胞を含み、それらの細胞は必要に応じて歯槽骨・セメント質の形成細胞へと分化すると考えられている。そこで歯根膜由来の細胞集団から樹立した1細胞クローンを個々に解析することで、歯根膜中の分化度の異なる細胞の機能を明らかとすることを目的とした。

【材料と方法】6週齢野生型マウスから抜去した第一大臼歯近心根面より歯根膜組織片を採取した。同組織を100ng/ml FGF-2含有培地で静置培養し、組織片より遊走・増殖した細胞をマウス歯根膜由来細胞とした。さらに、この細胞集団からシングルセルソーティングを行い、得られたすべてのクローンを石灰化誘導培地にて培養し、アリザリン染色による石灰化ノジュール形成を指標に、石灰化能のスクリーニングを行った。次いで、石灰化能の異なるクローンを選別し、FACSによる細胞表面抗原解析(CD73、CD105、Sca-1、CD140a、CD140b)、ALP活性測定を行い、比較検討を行った。

【結果と考察】シングルセルソーティング法により1細胞由来のモノクローンを37個樹立し、石灰化能の高いクローンと低いクローンをそれぞれ3つずつ選別した。6クローンともにCD73、CD105、CD140aの高い発現および高いALP活性を示し、これらの観点については両群に差は認めなかった。

【結論】マウス歯根膜由来細胞のクローン細胞株を樹立・解析したところ、その石灰化能の違いにも関わらず、解析したクローンはいずれも ALP 活性が高く、共通した表面抗原を発現した。今後両群の遺伝発現を網羅的に比較することで、分化過程を制御する因子が同定できるものと期待される。

O-04

タバコ煙の長期曝露が歯肉線維芽細胞の細胞機能に 及ぼす影響

2504

辰己 真理

キーワード: 喫煙, タバコ煙濃縮物, 歯肉線維芽細胞

【目的】喫煙は歯周病の発症・悪化に関わる環境的危険因子であり、 喫煙者の歯周組織は長期間、慢性的にタバコ煙成分に曝露されてい る。本研究では、長期にわたるタバコ煙成分の曝露が歯肉線維芽細胞 の細胞機能に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】歯肉線維芽細胞(HGF)を試料として用い、タバコ煙 主成分の一つであるニコチンあるいはタバコ煙濃縮物(cigarette smoke condensate: CSC)存在下で長期間培養し、炎症性サイトカイン・細胞外マトリックスの発現に及ぼす影響を検討した。また、ニコチンあるいはCSCの長期存在がHGFの細胞遊走能に及ぼす影響を Wound healing assay にて検討した。

【結果と考察】HGFはCSC長期存在下でIL-6、MMP-1のmRNA発現を亢進する一方で、I型コラーゲンの発現を抑制する傾向を示した。また、ニコチンあるいはCSC長期曝露群において細胞遊走能の顕著な低下を認めた。これらの結果から、長期にわたる喫煙習慣は歯肉線維芽細胞における炎症反応を惹起する一方、その創傷治癒能力を低下させることで歯周病の病態形成に関与する可能性が示唆された。

歯周病原菌誤嚥による肺炎発症メカニズム(1) 一P. gingivalisによる呼吸器系上皮細胞からの炎症 性サイトカイン誘導—

渡辺 典久

キーワード:歯周病と全身疾患、誤嚥性肺炎、炎症性サイトカイン、 Porphyromonas gingivalis

【目的】特に高齢者や要介護者では口腔細菌を含んだ唾液や食物残渣を誤嚥する機会が多く、誤嚥性肺炎の発症リスクが高い。実際に気管肺胞洗浄液や痰等から、歯周病原菌が多く検出される。しかし、口腔細菌がどのように誤嚥性肺炎を引き起こすのか、なぜ予防に口腔ケアが有効なのかは未解明のままである。前回の本学会で我々は、肺炎の発症において中心的な役割を担う炎症性サイトカインの産生をP. gingivalis (P.g) が強く誘導することを示した。今回、その機序を含め詳細な検討を加えたので報告する。

【方法と結果】P.gは、咽頭、気道及び肺の上皮細胞において、肺における好中球浸潤や組織破壊等に関わるIL-8とIL-6の産生を強く誘導したが、興味深いことにその量は肺炎球菌によるものと比較し数倍以上高い値であった。また、マウスを用いた実験においても、肺においてサイトカインの発現誘導が認められた。さらに、P.gは、NF-kB及びMAPKを活性化すること、P.gによる炎症性サイトカイン誘導がNF-kB、p38及びJNKの阻害剤により抑制されることがわかった。

【考察】P.gが咽頭上皮細胞に作用し、NF-kBやMAPKを活性化することにより、炎症性サイトカイン産生の誘導を介して肺炎の発症に深く関与していることが示唆された。実際に、口腔衛生状態が悪い人は $10^{12}$  個以上の細菌を日々嚥下していると考えられるが、本研究ではそれ以下の菌量を実験に使用している。我々は、歯周病原菌が肺炎球菌等のレセプターの発現を誘導することも見出しており(ポスター発表)、肺炎予防に口腔ケアが有効であることを分子レベルで提示できたと考える。

0-07 脂肪組織

脂肪組織 complement factor B は脂肪細胞の成熟および肥満を促進する

2499

松永 紘明

## キーワード:補体B因子, 脂肪組織

【目的】肥満症患者の脂肪組織では、脂肪細胞とマクロファージの相互作用による炎症反応がインスリン抵抗性(IR)を増悪する。本研究では、LPSで刺激したマクロファージと共培養した脂肪細胞において補体因子B(CfB)の遺伝子発現が亢進したことから、脂肪細胞CfBが脂肪細胞の分化成熟および、肥満・IRに及ぼす影響を検討した。【材料・方法】①LPS刺激したRAW264.7マクロファージと3T3-L1脂肪細胞を共培養し脂肪細胞における補体因子の遺伝子発現を検討。②成人の血中CfB濃度とIR関連マーカーとの相関を解析。③前駆脂肪細胞にCfB遺伝子を導入し、脂肪細胞分化関連遺伝子発現・脂肪・糖和の影響を検討。④野生型マウス(WT)に普通食または高脂肪食を負荷させ血中のCfB濃度を比較。⑤脂肪細胞特異的にCfB遺伝子を過剰発現させたマウス(CfBTg)を作製し同腹仔WTと比較。

【結果・考察】①LPS刺激したRAW264.7と共培養した脂肪細胞では、CBの遺伝子発現が亢進した。②血中CB設度はIR関連マーカーと正の相関を示した。③CB遺伝子を導入した脂肪細胞では分化後期でも脂肪細胞分化成熟関連遺伝子発現が亢進し、脂肪滴蓄積量が増大した。④高脂肪食負荷群の血中CB設度は通常食負荷群に比べ増加した。⑤CBTgはWTに比べ、体重が増大、IRが増悪した。CBTgでは皮下・内臓脂肪組織重量、脂肪滴のサイズが増大し、皮下脂肪組織では脂肪細胞分化、脂肪合成・蓄積に関連する遺伝子発現が亢進した。以上より、CBが脂肪細胞の分化成熟、脂肪蓄積を亢進させ、肥満・IRの増悪に関与することが示唆された。

O-06

Porphyromonas gingivalis口腔投与が無菌マウスに 与える影響の解析

2203

佐藤 圭祐

キーワード: P. gingivalis 口腔感染, Gnotobiote

【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、因果関係に関する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が腸内細菌叢を変動させ、腸管免疫応答に影響することで全身性の炎症を誘導することを報告した。しかし、P. gingivalis 自体の影響については明らかになっていない。そこで今回、無菌マウスを用いたノトバイオート実験を行なうことで検証した。

【材料と方法】6週齢雄無菌マウスC57BL/6をP. gingivalis W83株を経口投与したP. g群, コントロールとしてLactobacillus salivarius ATCC11741を投与したL. s群, 基材のみ投与したSham群に分け, 週2回投与を5週間行った。サンプリングを行った後, 歯槽骨吸収解析, 血清中のタンパク解析, 腸間膜リンパ節・脾臓のリンパ球サブセット解析, 歯肉・腸管・肝臓の遺伝子発現解析を行った。

【結果と考察】無菌環境でP. gingivalis単独の口腔投与は歯槽骨吸収を誘導しなかった。また、腸間膜リンパ節・脾臓のリンパ球サブセットに変化は認められなかった。Sham群と比較してP. g群, L. s群で、歯肉・腸管・肝臓の炎症性サイトカイン遺伝子発現に変動は認めなかったが、腸管タイトジャンクションタンパク遺伝子については発現上昇を認めた。血清中Endotoxinレベルに変動は認められなかった。以上より、P. gingivalis 自体が影響を及ぼすのではなく、dysbiosisを誘導することにより全身に影響していることが示唆された。

O-08 2499 膵島に浸潤した活性化マクロファージはIFNβ-Xafl 経路を介した膵β細胞のアポトーシスを促進する

鶴田 満大

キーワード: 膵β細胞, Xafl

【背景】2型糖尿病患者の膵島では炎症性細胞の浸潤が見られるが、 炎症性細胞が膵島機能に及ぼす影響や膵β細胞減少の機序は明らかで はない。

【目的】Endotoxemiaによる慢性炎症が膵α、β細胞機能に及ぼす影響を検討する。

【方法】①マウス膵 $\alpha$ 細胞株 $\alpha$ TC1,膵 $\beta$ 細胞株 $\beta$ TC6をぞれぞれマウスマクロファージRAW264.7と共培養し,各系にLPSを添加した際の $\alpha$ , $\beta$ 細胞における発現変動遺伝子をマイクロアレイ法にて網羅的に解析。②①で抽出した遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で確認。③ $\beta$ 細胞のみで発現が亢進した遺伝子に着目し,アポトーシスに及ぼす影響について,ウェスタンプロット法,ELISA法,TUNEL法を用いて検討。

【結果】 共培養条件下では $\alpha$ 、  $\beta$ 細胞ともLPS刺激によるインターフェロン (IFN) 誘導遺伝子群が有意に発現増大した。これらの遺伝子群のうち、アポトーシス惹起に関与する Xafl の遺伝子発現は $\beta$ 細胞においてのみ顕著に亢進した。LPSで刺激したRAW264.7ではIFN $\beta$ の産生が亢進し、 $\beta$ 細胞にIFN $\beta$ またはLPSで刺激したRAW264.7の培養上清を添加すると Xafl タンパク質の発現が増大した。IFN $\beta$ を添加した $\beta$ 細胞では、アポトーシス誘導がみられた。

【考察】 膵島に浸潤した活性化マクロファージから分泌されたIFNβ は膵β細胞における Xafl 発現の亢進を介して膵β細胞のアポトーシスを誘導することが示された。 歯周炎症や metabolic endotoxemia によって活性化したマクロファージはIFNβ 仲介性のβ細胞アポトーシスを促進し、糖尿病病態を増悪する可能性が示唆された。

最終糖化産物はヒト歯肉線維芽細胞におけるIL-6と ICAM-1の発現増加を介して単球との接着を誘導する 野中 康平

キーワード: 糖尿病関連歯周炎, 最終糖化産物, ヒト歯肉線維芽細胞, IL-6, ICAM-1, 細胞接着

【目的】歯周病は糖尿病の合併症の1つであり、糖尿病関連歯周炎では歯周組織に重度の炎症と破壊を生じる場合がある。一方、最終糖化産物(Advanced glycation end-products: AGEs)は糖尿病合併症の起因物質であるが、歯周組織でのAGEs作用の詳細は不明である。我々は、歯肉線維芽細胞(HGFs)においてAGEsがIL-6とICAM-1の発現を増強することを報告した(第59回秋季日本歯周病学会学術大会)。本研究では、AGEsによる歯周炎病態への作用を調べるために、AGEsがHGFsと単球との接着に及ぼす影響を検討した。

【材料および方法】ヒト歯肉線維芽細胞株(CRL2014)に AGEs を作用させIL-6とICAM-1の遺伝子発現と蛋白産生レベルを定量的 PCR 法と ELISA 法で確認した。 AGEs で前培養した HGFs と蛍光色素ラベルしたヒト単球細胞(THP-1)を共培養し、細胞の接着度を蛍光顕微鏡観察と蛍光強度測定により調べた。 siRNA でIL-6をノックダウンした HGFs についても単球との接着への影響を検討した。

【結果および考察】AGEsによりHGFsのIL-6とICAM-1の遺伝子発現と蛋白産生が増加し、単球との接着が促進した。HGFsのIL-6遺伝子発現をノックダウンさせると、AGEs誘導性のICAM-1発現と単球との接着が抑制された。これらの結果からAGEsは歯肉線維芽細胞の炎症関連因子の発現を調節し、炎症・免疫反応に関与する単球の接着を誘導することにより、糖尿病関連歯周炎での歯周組織の炎症や破壊などの病態形成に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

0-11

薬物性歯肉増殖症におけるNR4A1の役割

2504

畑野 紗希

キーワード:薬物性歯肉増殖、シクロスポリンA、NR4A1、TGF-B 【目的】薬物性歯肉増殖症(増殖症)は、フェニトイン・ニフェジピン・ シクロスポリンA (CsA) の副作用で、歯肉の肥厚を特徴とする歯周 疾患である。現在の治療法は主に、変薬、歯肉切除だが、高齢化や疾 患の多様化から上記の方法が制限されることも稀ではない。また歯肉 切除後も内服を継続する限り再発することも少なくない。したがっ て、変薬や歯肉切除を必要としない新規治療法の開発が必要である。 近年,全身の線維症は,TGF-βシグナルを抑制する核内受容体 NR4A1の機能不全の結果, コラーゲンの産生が亢進し, 発症してい ることが明らかになった。そこで本研究では、増殖症の新規治療法開 発のため、NR4A1に着目し、詳細なメカニズムの解明を目的とした。 【材料と方法】CsAのヒト歯肉線維芽細胞(HGF)への前投与が、 TGF-β刺激で上昇するNR4A1とtypeI collagenのmRNA発現に及ぼ す影響をリアルタイム PCR で調べた。CsA の標的分子である NFAT のsiRNAを導入しNR4A1のmRNA発現の変化を調べた。また、 NR4A1のノックアウト(KO)マウスの歯肉幅径を野生型マウスと比 較した。

【結果と考察】CsAの前投与はTGFβによるNR4A1のmRNA発現の上昇を抑制し、typeI collagenの発現は更に上昇させた。またNFATのsiRNAの導入でNR4A1のmRNA発現は抑制された。さらにNR4A1KOマウスの歯肉幅径は野生型マウスと比較し増加した。

【結論】CsAによるNR4A1の発現抑制はTGFβによるHGFのコラーゲンの産生を亢進させ、歯肉増殖を発症する可能性が示唆された。

O-10

カルプロテクチンはマウス骨細胞の炎症および骨代 謝関連因子の発現を制御する

2504

高木 亮輔

キーワード:カルプロテクチン、骨細胞、IL-6、RANKL

【目的】歯周病は、病原細菌の感染により歯周組織の炎症と組織破壊を生じる慢性炎症性疾患であり、これまで病原因子として、主に病原細菌由来のLPSなどに焦点が当てられていたが、最近、宿主側の傷害関連分子パターン(DAMPs)に属するカルブロテクチン(S100A8/S100A9)などの役割が注目されている。しかしながら、歯周炎における歯槽骨吸収の病態において、骨組織の主要細胞である骨細胞に対するDAMPsの影響については明らかではない。そこで本研究では、カルブロテクチンによる骨細胞の炎症および骨代謝関連因子の発現への影響について検討した。

【材料と方法】マウス骨細胞株MLO-Y4-A2細胞を、カルプロテクチン添加a-MEM-10%ウシ血清培地を用いて培養した。細胞生存率を確認し、細胞からRNAおよび蛋白質を通法に従い分離した。カルプロテクチンのシグナル関連受容体、炎症および骨代謝関連因子の遺伝子発現をReal-time PCR法で、蛋白質発現をELISA法で解析した。

【結果】カルプロテクチン(50nM)では骨細胞に有意な細胞障害を認めなかった。骨細胞にはカルプロテクチンの受容体であるRAGEとTLR-4の遺伝子発現が認められ、カルプロテクチンによりIL-6, ICAM-1, RANKLの遺伝子および蛋白質の発現が有意に増加した。一方、オステオカルシンの発現は抑制されたが、骨細胞間のギャップ結合に関連するコネキシンとパネキシンの遺伝子発現には影響は認められなかった。

【結論】カルプロテクチンは、骨細胞の炎症および骨代謝関連因子の 発現を調節し、歯周病の病態形成に影響を及ぼしている可能性が示唆 された。

O-12 2402 Porphyromonas gingivalis 感染関節リウマチモデルマウスにおける腸内細菌叢の変化が関節炎増悪に与える影響

濵本 結太

キーワード:Porphyromonas gingivalis、関節リウマチ、腸内細菌叢【目的】近年歯周炎と全身疾患との関連が注目を集めており、当研究室では関節リウマチ(RA)モデルマウスにおいて、Porphyromonas gingivalis(Pg)感染がRAを増悪させることを明らかにしてきた。しかしその詳細については不明な点が多い。また腸内細菌叢は生体の恒常性に大きく関与しており、その乱れが様々な疾患に関与することがわかってきた。RA患者でも腸内でPrevotella copriが増加したという報告がある。本研究ではPg感染による腸内細菌叢の変化に着目し、RA増悪に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】SKGマウス(4~6週齢、雌)にラミナリン(LA)10 mgを腹腔投与したLA群、Pg W83(10°CFUを2% carboxymethyl cellulose含有PBSに懸濁)を口腔投与したPg群、その両方を行ったLA/Pg群、何もしていないCtrl群について、6週後の腸内細菌叢を分析した。同時に回収した新鮮な糞便を、SKGマウス(4~6週齢、雌)に腸内細菌移植(FMT)後、LAを腹腔投与し、6週後にRAの評価を行った。

【結果と考察】Pg感染実験ではCtrl群以外の群で腸内細菌叢の変化が認められ、特にPrevotlla属の増加が確認された。FMT実験ではPg群、LA/Pg群のFMT群で、直接Pg投与を行っていないにもかかわらず、Pg感染実験に比べてarthritis scoreが早期に増加時し、組織学的にも関節炎が増悪していた。

【結論】Pg感染よってSKGマウスの腸内細菌叢が変化することが示唆された。更にFMTの結果から,変化した腸内細菌叢がRA 増悪に関与していることが示唆された。

覚醒時および睡眠時に形成されるデンタルバイオ フィルムの三次元的構造解析

3002

外園 真規

キーワード:バイオフィルム

【目的】就寝前の口腔ケアが歯周病やう蝕の予防に効果的であるという考えが広く浸透しているが、その根拠は唾液中の細菌数を検討したものに過ぎない。我々は第147回日本歯科保存学会にて、睡眠時に形成されるバイオフィルムは覚醒時と比較し構成細菌数には変化を認めないが、構成細菌叢は偏性嫌気性細菌の割合を増すことを報告した。本研究では、さらなる比較検討のため三次元的構造に注目し、解析を行った。

【材料と方法】我々が開発した*in situ* バイオフィルム形成モデルを用いて、覚醒時8時間および睡眠時8時間の間に形成したバイオフィルムをLIVE/DEAD®BacLight™Bacterial Viablity Kitを用いて染色、または核酸をDAPI、菌体外多糖をFITC標識ConAおよびFITC標識WGAで染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果と考察】バイオフィルムの厚みは睡眠群と比較し覚醒群で有意に大きく、体積は生菌、死菌ともに覚醒群で大きいという結果が得られた。また、睡眠群と比較し覚醒群では菌体と菌体外多糖の体積は大きいが、菌体と菌体外多糖の比には差がないことが示された。この結果と睡眠時および覚醒時に形成されるバイオフィルムの構成細菌数には差を認めないという我々の以前の報告より、睡眠群では細菌の密度が高いことが示された。これは睡眠時に唾液分泌量が低下し、水分の減少により体積が低下したためであると考えられる。

【結論】 覚醒時および睡眠時に形成されるバイオフィルムは構造が異なり、睡眠時に形成されるバイオフィルムは覚醒時に形成されるものと比較し厚みは小さく、細菌の密度は高いことが示された。

O-15

絹糸結紮による実験的歯周炎マウスモデル歯周組織 における細胞応答の経時的変化

3001

竹村 翼

キーワード:接合上皮、E-Cadherin、CCL2、炎症性サイトカイン【目的】歯周炎は接合上皮バリアが破壊され細菌が深部に侵入し、炎症が増悪することで発症・進行すると考えられている。細胞間接着因子の発現低下と種々のサイトカイン産生が接合上皮破壊に関与していることが報告されている。私どもは組織破壊メカニズムの詳細を解明するために、絹糸結紮歯周炎マウスモデルにおける接合上皮の経時的形態変化について報告してきた。本研究では同モデルにおける接合上皮の経時的な細胞応答の解明を目的とし、IL-1β、TNF-α、マクロファージ走化性因子(CCL2)、細胞接着因子(E-Cadherin)、細胞増殖マーカー(ki67)の発現変化を検討した。

【材料と方法】マウスは7週齢BALB/cAJcLを使用した。上顎第二大 臼歯に7-0絹糸を結紮し、12時間、1~10日後に屠殺した。歯肉を採取しRealTime-PCR法にてIL-1β、TNF- $\alpha$ 、CCL2、E-Cadherinの発現を解析した。上顎骨を採取し通法通りに切片を作製し、免疫染色 (Ki67)を用いて接合上皮の経時的変化を組織学的に評価した。

【結果と考察】CCL2の発現は12時間後から上昇し、4日以降は減少した。E-Cadherinの発現は1日後から減少し始め、4日以降は回復した。IL-1β、TNF-αの発現は1日後から上昇し2日にピークに達したが、4日以降は減少に転じた。免疫染色ではKi67の発現は5日以降の内縁上皮の修復に伴って発現していた。以上から、本モデルにおいてCCL2の発現上昇後に上皮バリアの破壊、炎症性サイトカインの上昇が生じ組織破壊が進行し、4日以降に上皮バリアが回復傾向にあることが示唆された。

0-14

歯周炎におけるインフラマソーム活性抑制における Dectin 受容体の関与について

2203

井上 真紀

キーワード: 歯周病, Aggregatibacter actinomycetemcomitans, dectin-1, インフラマソーム

【背景・目的】我々は歯周炎発症における炎症応答にて、ヒトマクロファージ内でインフラマソームが活性、細胞死ピロトーシス誘導を報告してきた。その過程でインフラマソーム活性発現において、NLRPs など細胞内外受容体が大きな役割を果たし、マクロファージに発現している $\beta$ -1、3 glucan 受容体は自然免疫に関与することが知られている。そこで $\beta$ -1、3 glucan 受容体である Dectin-1 に着目、この分子発現がインフラマソーム活性に及ぼす影響を検証した。

【方法】我々が開発した細菌侵入実験系に従い、歯周病細菌Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4株をマウスマクロファージRAW 細胞およびDectin-1 過剰発現RAW 細胞に侵入させた。Dectin-1 リガンドとしてCurdlanを使用し、遺伝子発現解析はReal-Time RT-PCR 解析、タンパク発現はウェスタンブロッティング解析およびELISA 測定を行った。

【結果】RAW細胞において、A. actinomycetemcomitans侵入による細胞増殖抑制が誘導された。Dectin-1過剰発現細胞株では細胞増殖の抑制は解除され、インフラマソーム関連細胞内受容体NLRP3、NAIP、NLRC4の発現誘導が認められた。Dectin-1過剰発現細胞株において、Curdlan前処理により、炎症性サイトカインIL-1βの遺伝子およびタンパクの発現誘導が著しく抑制された。

【結論】β-1,3 glucanがDectin-1に結合することでインフラマソーム 活性のIL-1β発現を特異的に抑制することが強く示唆された。

0-16

脳由来神経栄養因子(BDNF)がマクロファージ活性化に及ぼす影響

2204

佐々木 恒也

キーワード:脳由来神経栄養因子(BDNF),マクロファージ,炎症性サイトカイン,貪食

【目的】当研究室では脳由来神経栄養因子(BDNF)の歯周組織再生促進能を明らかにしてきた。近年,BDNFは多発性硬化症などの神経疾患においてマクロファージやグリア細胞の細胞機能を制御し,炎症制御,組織再生,神経保護に関与することが報告されている。そこで本研究では,BDNFが歯周組織再生促進過程においてマクロファージの細胞機能を制御していると考え,BDNFのマクロファージ活性化に及ぼす影響を検討した。

【材料と方法】マウスマクロファージ様細胞株RAW264.7を使用し、BDNFの高親和性受容体TrkBの発現を免疫蛍光染色で調べた。RAW264.7をBDNF(50ng/ml)単独もしくはTrkBの阻害剤であるK252a(50nM)の存在下で3, 6, 12, 24時間刺激し、炎症性サイトカイン(IL-6, IL-1β, TNF-α)のmRNA発現をリアルタイムPCRで解析した。貪食能の評価は同様の実験群で12時間培養し、Phagocytosis Assay Kit(Cayman Chemical)を用いて解析した。

【結果】RAW2647はTrkBを発現していた。BDNF刺激によって IL-6、IL-1β、TNF-αのmRNA発現が上昇し、その発現上昇はK252a 存在下で抑制された。貪食能はBDNF刺激によって無刺激時の約2.5 倍に上昇し、それはK252a存在下で抑制された。

【結論】BDNFはTrkBを介してマクロファージを活性化することが明らかとなった。今後、BDNFによる歯周組織再生促進へのマクロファージの関与を明らかにしていく必要がある。



副甲状腺ホルモンがマウスiPS細胞の骨芽細胞分化 に及ぼす影響

2504

佐藤 正敬

キーワード:骨芽細胞分化, iPS細胞, 副甲状腺ホルモン

【目的】副甲状腺ホルモン(PTH)は、間歇的投与における骨へのアナボリックな作用から、現在骨粗鬆症薬として用いられており、歯周組織再生療法への応用も期待されている。また、iPS細胞はその増殖能、多分化能から様々な組織が混在する歯周組織を再生させるための細胞供給源として注目を集めている。しかしながら、iPS細胞の分化過程におけるPTHの作用は不明である。本研究の目的は、iPS細胞の骨芽細胞分化過程におけるPTHの効果を明らかにすることである。

【材料と方法】マウスiPS細胞をアテロコラーゲンスポンジ(ACS)へ播種し、骨芽細胞分化誘導培地(OBM)及びOBM+PTH添加培地にて3次元培養を行った。OBM単独を対象群、OBM+PTH培地を連続投与群、PTH添加6時間後にOBM培地に変更したものを間歇投与群として実験を行った。骨芽細胞分化の評価としてアルカリホスファターゼ(ALP)染色及びリアルタイムPCRを用いた。

【結果と考察】ALP染色において、対照群と比較しPTH間歇投与群の染色強度が高く、連続投与群では低い傾向にあった。リアルタイムPCRでは、12日でPTH間歇投与群のAlp発現の増加傾向が認められ、連続投与群では減少傾向にあった。また、4日で対照群と比較し間歇投与群のRunx2発現の増加傾向が認められた。このことから、PTHの間歇投与はiPS細胞の骨芽細胞分化を促進し、連続投与は骨芽細胞分化を抑制させることが示唆された。

【結論】PTH間歇投与はiPS細胞の早期における骨芽細胞分化を促進することが示唆された。

O-19

慢性歯周炎患者における GCF 中の骨型 ALP と臨床 パラメータとの関係

2299

上原 直

## キーワード:歯肉溝滲出液

【目的】歯周組織では高いアルカリホスファターゼ(ALP)活性があることが知られている。ALPにはいくつかのアイソザイムが存在し、歯根膜の遺伝子型は骨型(BAP)であると報告されている。本研究の目的はGCF中のBAP検索の意義を検討することである。

【材料と方法】被験者は、日本歯科大学附属病院SPT患者76名から健常部位(PD≤4mm・BOP (-))、病変部位(PD≥4mm・BOP (+))と定義しGCF採取・解析を行った。検査項目はPII、GCF量、GI、PD、CAL、BOP、歯槽骨吸収、BAP量、AST活性、蛋白質量とした。解析にはBAP量のカットオフ値を作成し、カットオフ値未満を低BAP量群、カットオフ値以上を高BAP量群とし、健常・病変部位を4群間に分け Steel-Dwass検定を行った。なお、本研究は日本歯科大学生命歯学部倫理委員会承認のもと遂行された(承認番号:NDU-T 2014-56)。

【結果と考察】健常部位と比較して病変部位においてBAP量は統計学的に有意に高い値を示した。カットオフ値を用いた解析では、健常部位における高BAP量群は、低BAP量群に対しAST活性と蛋白質量が統計学的に有意に高い値を示した。このことから歯周組織が損傷すると歯根膜由来のBAPが遊離すると考えられる。

【結論】BAP測定は微弱な歯周組織の損傷を捉えられる可能性が示唆された。

文部省科学研究費(基盤C, 課題番号:17K11995・17K11996)の助成を受けた。

O-18 2504 副甲状腺ホルモン製剤の全身投与および中性自己組 織化ペプチドの局所応用がラットの歯周組織欠損の 治癒に及ぼす影響

吉田 航

キーワード:副甲状腺ホルモン,中性自己組織化ペプチド,歯周組織 再生療法

【目的】副甲状腺ホルモン(PTH)製剤は骨粗鬆症治療薬として使用されており、骨形成促進作用が明らかにされている。中性自己組織化ペプチドハイドロゲル(SPG-178)は、三次元的足場材料として注目されている。本研究の目的はPTHの全身投与とSPG-178の局所応用の併用による歯周組織治癒の影響を検討することである。

【材料および方法】SPG-178の微細構造を走査型電子顕微鏡(SEM)にて観察した。10週齢のWistar系雄性ラットの上顎第一臼歯近心に規格化欠損を形成後、根面をルートプレーニングし、外科的に歯周組織欠損を作成した。欠損内にSPG-178を応用した群とUnfilled群(対照群)に分け、各々にPTH全身投与・非投与の計4群に設定した。術後2週で形態学的、組織学的、免疫組織学的に検討した。

【結果と考察】SPG-178をSEMで観察した結果、生体の細胞外マトリックスと類似した微細な網目状構造が認められ、細胞増殖における三次元的足場材料として適していると考えられた。マイクロCTによる骨梁構造解析では、PTH非投与・対照群と比較し、PTH投与・SPG-178応用群では骨体積率、骨梁数が有意に高い値を示した(p<0.05)。H-E染色では、PTH投与群、SPG-178応用群でともに対象群と比較して、より多くの新生骨様構造が認められた。PCNA染色では、PTH非投与・対照群と比較し、PTH投与・SPG-178併用群でPCNA陽性細胞率が有意に高い値を示した。(p<0.01)。

【結論】PTHの全身投与とSPG-178の局所応用の併用は、早期での歯槽骨治癒を促進することが示唆された。

O-20

乳酸菌生成エキスの歯周病に及ぼす影響について

2504

吉峰 正彌

キーワード:乳酸菌生成エキス. 唾液検査. 細菌比率

【目的】乳酸菌生成エキスは免疫賦活化作用などを有し、摂取により S.mutansの減少なども報告されており、全身の免疫力を増強させる ことで、口腔内環境の改善が期待できる。そこで、本研究では、乳酸 菌生成エキスの摂取による口腔内環境の変化を多角的に観察した。 【材料および方法】被験者は、SPTに移行した成人男女20名とし、無 作為に10名ずつ研究群とプラセボ群に分け、研究群に8週間、乳酸菌 生成エキス、アルベックス® (株式会社ビーアンドエス・コーポレー ション) を毎日服用させた。測定項目は、臨床パラメーターとして Probing pocket depth (PPD), Bleeding on probing (BOP), Gingival Index (GI), Plaque Index (PII) を、唾液検査項目として免疫グ ロブリン (IgA), 遊離ヘモグロビン (Hb), 乳酸脱水素酵素 (LD), 細菌検査項目としてPorphyromonas gingivalis (P.g), Toreponema denticola (T.d), Tannerella forsythia (T.f) 3種の各細菌数, 口腔 内総細菌数を研究開始より0(飲用前), 2,4,8週で計4回測定した。 【結果と考察】4週後においてBOPおよびGIで、また8週後に口腔内 総細菌数で研究群に有意に改善が認められた。また、8週後のT.f/ T.d, P.g /T.dの細菌比率に2群間で有意な差が認められたことより, 乳酸菌摂取が口腔内細菌比率を変化させるなど口腔内の免疫的な改善 に寄与したものと推察された。

【結論】乳酸菌生成エキスの服用が、口腔内の免疫的な改善に寄与したことが示唆された。

関節リウマチ患者のカルバミル化タンパクおよび好中球細胞外トラップの血清レベルに及ぼす歯周治療の影響

金子 千尋

キーワード:関節リウマチ, 歯周治療, カルバミル化タンパク, 好中 球細胞外トラップ

【目的】演者らのグループは、歯周治療による関節リウマチ(RA)活動度と血清シトルリン化タンパクの改善を報告した。近年では、血清カルバミル化タンパク(CarP)と好中球細胞外トラップ(NET)のRAへの関与が示唆されている。そこで、本研究では、RA患者におけるRA活動度、CarPおよびNETの血清レベルに及ぼす歯周治療の影響を評価した。

【材料および方法】インフォームドコンセントが得られたRA患者39名(RA群)、慢性歯周病患者30名(CP群)、健常者43名(H群)を対象に、RA・歯周検査を行った後、CarPおよびNET血清レベルをsandwich ELISAにて測定した。このうち、非外科的歯周治療を受けたRA患者23名に対して、治療8週後に同様の臨床検査および生化学的測定を行った。

【結果および考察】年齢・男女比・喫煙状態は3群間で有意差は認められなかった。RA群とCP群のCarP血清レベルはH群と比較して有意に高い値を示した。一方、NET血清レベルはH群と比較してRA群のみ有意に高い値を示した。歯周治療後の歯周状態およびRA活動度は有意な改善を認めた。さらに、歯周治療はCarP血清レベルを有意に低下させたが、NET血清レベルの有意な変動は認められなかった。以上から、歯周治療によりRA活動度とCarP血清レベルの低下が認められ、RA患者におけるタンパクカルバミル化に歯周治療が関与する可能性が示唆された。

会員外共同研究者: 村澤 章博士,中園 清博士,伊藤 聡博士 (新 潟県立リウマチセンター)

O-23 2203 Bioactive metabolite inhibits proinflammatory cytokines by macrophage treated with *Porphyromonas* gingivalis lipopolysaccharide via G-Protein-coupled Receptor 120 Benso Sulijaya

 $\begin{tabular}{ll} Keywords: Metabolite, KetoC, inflammation, $P.gingivalis$ LPS, macrophages \end{tabular}$ 

**Objectives:** Modulating the inflammation in periodontal disease is critical; hence, targeted anti-inflammatory therapeutic as an adjunctive therapy is suggested. KetoC, a bioactive metabolite, is known to have various beneficial physiological effects; though, its effect on the inflammation remains unclear. Here, we studied the effect of KetoC on macrophages induced *by Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide (*P.g* LPS), and explored the intracellular mechanism.

Materials and methods: RAW 264.7 cells were pre-incubated with KetoC and then treated with P.g LPS. Levels of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukin (IL)-6, and IL-1 $\beta$  were analyzed. Receptor for KetoC was clarified. AH7614 and GW1100, specific antagonists of G-Protein-coupled Receptor (GPR) 120 and GPR40 respectively, were used. Nuclear Factor-κB signaling pathway was examined by Western blotting assay.

Results: 5μM of KetoC significantly reduced TNFα, IL-6, and IL-1β. GPR120 and GPR40 are detected in the cell. Added AH7614, but not GW1100 diminished the action of KetoC. When bound with GPR120, KetoC downregulated nuclear NF-κB p65 protein levels.

Conclusions: By binding to its receptor GPR120, KetoC inhibited the pro-inflammatory cytokines via NF-kB p65. KetoC is a promising bioactive anti-inflammatory candidate for treating periodontal disease. (Non-JSP collaborators: Jun Ogawa and Shigenobu Kishino, Kyoto Univ. Japan)

O-22 2206 The role of proteoglycans in the pathogenesis of drug induced gingival overgrowth (DIGO)

Rehab Yahya Fara Sallam Alshargabi

**Keywords:** SPOCK-1, Transgenic mouse, gingival overgrowth **Objectives:** We previously suggested complete loss of Cathepsin-L (CtsL) function promoted gingival overgrowth (Nishimura. et al., Am J Pathol, 2002). SPOCK-1, belonging to proteoglycan family, is a specific inhibitor of CtsL. The aim of this study is to investigate the role of SPOCK-1 in DIGO.

Materials and methods: Human gingival fibroblasts were collected from patients who underwent flap operations at Kyushu university hospital. The cells were stimulated with Phenytoin (PHE), Cyclosporin A (CsA) or Nifedipine (NFE). The mRNA and protein levels of SPOCK-1 were examined by quantitative real time PCR and western blotting. As in vivo study, Spock-1 transgenic mice and wild-type littermates were generated, grown, and sacrificed at 8 weeks after birth. Gingival appearance was observed by microscopy.

**Results:** The results indicated that PHE, CsA and NFD promoted the expression of SPOCK-1 both at mRNA and protein level. The gingiva of Spock-1 transgenic mice exhibited different degrees of fibrosis

**Conclusions:** SPOCK-1 upregulation was common among the three drug used, which may indicate the importance of SPOCK-1 in the pathophysiology of DIGO.

O-24 2402 糖尿病と歯周病に関連したアンケート調査 第二報 糖尿病治療と歯科受診との関連性について 黒澤 正雄

キーワード: 歯周病、糖尿病、定期的口腔衛生管理

【目的】糖尿病治療のガイドラインにおいて歯周治療および定期的口腔衛生管理など歯科受診の必要性が論じられている。本報告では歯周病の診断・治療経験の有無および定期的口腔清掃・刷掃指導の有無が、糖尿病にどのように関連しているかをアンケート調査から明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】盛岡市医師会内科医会の協力を得て糖尿病治療で内科を受診している患者を対象に、糖尿病と歯周病に関連したアンケート調査を実施した(回答者2205名)。本報告では歯周病の診断または治療を受けたことがあるかどうかの設問、ならびに定期的な口腔清掃や刷掃指導を受けているかどうかの設問から得られた回答がHbA1cの変動要因となり得るかについて、二元配置分散分析および多重比較検定を用いて統計的に検討した。

【結果と考察】定期的口腔清掃・指導の有無はHbAlcの有意な変動因子であり(P=0.042<0.05)、定期的口腔清掃・指導を受けている者はHbAlcが有意に低かった。一方、歯周病の診断・治療経験の有無はHbAlcの有意な変動因子ではなく、交互作用効果も認められなかった。このことより歯周病の診断や治療を受けただけではなく、継続した口腔衛生管理・指導を受けることが糖尿病治療に有益であると考える。

【結論】定期的口腔衛生管理および指導の有無はHbAlcに影響を与えることが明らかとなった。すなわち、糖尿病発症早期または予防の段階から糖尿病と歯周病との関連を教育し、さらに定期的な口腔衛生管理指導を受けさせることが重要である。

糖尿病重症度により層別したPISAによる歯周病重 症度と動脈硬化との関連

2402

杉 典子

キーワード:糖尿病、歯周病、歯周炎症表面積、頚動脈肥厚、教育入 陰

【緒言】近年、新たな歯周病評価法として歯周炎症表面積(PISA)が注目されている。口腔内の歯周組織炎症部位の面積を定量的に評価できる点で比較的理解が容易であり、歯周病評価法としての有効性が既に報告されている。しかし、これまでにこの評価法を用いて動脈硬化や糖尿病合併症との関連について検討した報告はなく、本研究にて検討する。

【方法】2010年4月から2017年3月に教育入院した2型糖尿病患者387名(平均年齢64.07歳, 男性比率58.9%)のうち, 無歯覇者42名を除く345名を解析対象とした。PISAで評価した歯周病重症度(軽度: <215, 中等度:216-600, 重度:≥600の三分位にて定義)に対して、頚動脈肥厚, 血管壁硬化, 閉塞性動脈硬化, 糖尿病合併症(腎症, 網膜症, 神経障害, 冠動脈疾患, 脳血管疾患)の有無との関連をロジスティック回帰分析にて検討した。さらに, 糖尿病重症度(HbA1c≥10%、<10%)にて層別して同様の解析を実施した。

【結果】PISAによる歯周病重症度と各糖尿病合併症の間に有意な関連は認められなかったが、糖尿病重症度にて層別化したところ、HbA1cが10%未満群では、PISAによる歯周病重症度と頚動脈肥厚(IMT≥1.1)との関連が認められ、歯周病軽度群に対する重度群の頚動脈肥厚のオッズ比は2.74(1.02-7.40)であった。

【結論】HbA1cが10%未満群では、PISAにて評価した歯周病と動脈硬化との関連が認められ、PISAによる歯周病の重症度評価はHbA1cが10%未満の者についてより有効である可能性が考えられた。

O-27

2114

性別と年齢で層別した東日本大震災後の心理社会的 要因と口腔内環境との関連:福島県「県民健康調査」 坪井 綾香

キーワード:東日本大震災、口腔内環境、トラウマ反応、横断研究、 短息間足触事調本

【目的】大規模災害後の生活習慣の変化や、心理社会的ストレスの増大が口腔内環境に及ぼす影響についての報告は少ない。本研究は、その関連について性と年齢にて層別し検討した。

【方法】対象は、東日本大震災時に避難地域に居住し、健診を受診した者で、平成23年度質問紙調査に回答した73,431人とし、精神的不調、トラウマ反応、運動習慣、飲酒、喫煙習慣、震災による避難の有無、失業の有無、と震災後の口腔内環境との関連を検討した。"歯の痛み" が災害後悪化した者を口腔環境悪化とした。精神的不調はKessler6(K6)、トラウマ反応はPTSD Checklistにて評価した。解析は、ロジスティック回帰分析にて、年齢性別調整及び多変量調整オッズ比を算出した。

【結果】精神的不調,トラウマ反応,避難,失業がある者,運動習慣がない者において,災害後に口腔内環境が悪化した者の割合が有意に高かった。特に,トラウマ反応は男性と65歳未満に,避難は65歳以上においてその関連が強く,該当項目以外すべての変数にて調整した多変量調整オッズ比(95%信頼区域)はそれぞれトラウマ反応が,女性2.40(1.95-2.96),男性3.51(2.71-4.53),65歳未満2.91(2.41-3.51),65歳以上2.59(1.88-3.57)であり,避難は65歳未満1.43(1.23-1.67),65歳以上1.89(1.44-2.47)であった。

【結論】震災後の社会的要因、心理的要因、生活習慣は口腔内環境の 悪化と関連し、その関連の強さは性と年齢により異なった。性と年齢 別の対応が今後必要になる可能性が示唆された。 O-26

歯周病専門医申請症例の臨床データを用いた歯周炎 症表面積 (PISA) の基準値の検討

2199

畑中 加珠

キーワード: 多施設研究, 歯周病専門医, 歯周炎症表面積

【緒言】特定非営利活動法人 日本歯周病学会が設ける歯周病専門医制度の申請書類は、電子化したことによって、その情報を蓄積して管理・解析することが可能となった。これを利用して、歯周病の治療指針として反映できる臨床データベースを構築することは高い意義がある。近年、歯周炎症表面積(PISA)は、歯周病の炎症部の面積を定量的に評価できる新たな臨床評価指標として注目されているが、その値の基準は未だ不明である。そこで、本研究は、多施設の歯周病専門医の申請書データからPISAを算出して、各治療ステージにおける値を検討1.た。

【方法】2010年5月から2016年5月に8施設で取得した歯周病専門医の申請症例114例を用いた。Nesse Wら (*J Clin Periodontol*, 2008) の方法によって、歯周ポケットの深さとプロービング時の出血からPISAを算出した。初診時、歯周基本治療終了時、SPT移行時、そして最新SPT時でそれぞれ算出して解析した。

【結果】歯周病専門医症例の選択基準である中等度以上の歯周炎において、PISAの中央値は、初診時1,267.6mm²(最大値4,190.2mm²-最小値185.6mm²),歯周基本治療終了時211.8mm²(1,470.7mm²-0.0mm²),SPT移行時53.3mm²,(502.5mm²-0.0mm²),そして最新SPT時30.0mm²(357.8mm²-0.0mm²)であった。

【結論】中等度以上の歯周炎患者の客観的な治療指標としてPISAを用いると、初診時は表面積約1,300mm²の歯周病の炎症がSPT時は100mm²未満に減少することが明らかになった。