

一般演題口演

(A会場・B会場・C会場・D会場)

A 会 場

O-01～03

B 会 場

O-04～06

D 会 場

O-07～09

O-28～35

C 会 場

O-10～27

5月12日（金）	A会場	8：50～ 9：20
	B会場	8：50～ 9：20
	D会場	8：50～ 9：20
	C会場	15：30～16：10, 16：20～17：20
5月13日（土）	C会場	8：30～ 9：50
	D会場	8：30～ 9：50

O-01

糸結による実験的歯周炎マウスモデルにおける
接合上皮の経時的变化について

3001

竹村 翼

キーワード：歯周病, 接合上皮, E-Cadherin, Filaggrin

【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。これまでに、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が、未だ不明な点が多い。接合上皮バリアの破壊メカニズムを解明することは、上皮細胞の機能制御による歯周病予防法の開発に繋がると考えられる。本研究では、糸結歯周炎マウスモデルを用いて、接合上皮における経時的な形態的变化、細胞間接着に関与するE-Cadherin、および上皮バリア機能の恒常性維持に関与するFilaggrinの発現変化について検討した。

【材料と方法】マウスは7週齢BALB/cAJcLを使用した。両側上顎第二大臼歯に7-0糸結を結紮し、30分、6、12、24、48時間後、また3、4、5、7、10日後に屠殺した。上顎骨を採取し、10%ホルマリンにて24時間固定、10%EDTAで4週間脱灰後、パラフィン包埋し、切片(5μm)を作製した。HE染色、免疫染色(E-Cadherin, Filaggrinの検出)を用いて接合上皮の経時的变化を組織学的に評価した。

【結果と考察】HE染色では、結紮24時間後に接合上皮の破壊、および上下皮結合組織のセメント質からの剥離が観察された。結紮3日目以降から、内縁上皮の修復が認められた。接合上皮におけるE-Cadherin, Filaggrinの発現は結紮24時間で消失していた。また結紮24時間後の外縁上皮においてFilaggrin陽性細胞が上昇していた。以上の結果から、糸結結紮モデルにおいては、結紮後24-48時間で内縁上皮の破壊がピークに達し、3日目以降では修復に転じることが推察される。また、内縁上皮の回復に外縁上皮の応答が関与することが示唆された。

O-03

歯周病病態におけるTh17細胞に対するIL-35の役割
についての基礎的検討

2504

岡田 康佑

【目的】主にヘルパーT(Th)17細胞から産生されるインターロイキン(IL)-17は、歯周病における炎症反応に関与することが知られている。また、Th17細胞の分化を制御する転写因子として、Retinoid-related Orphan Receptor(ROR)αおよびRORγtが知られており、それぞれRORA, RORCという遺伝子でコードされている。一方、制御性T(Treg)細胞から産生される抗炎症性サイトカインであるIL-35は、Th17細胞の分化を阻害するという報告があり、歯周病病態においても炎症反応を抑制する可能性が考えられているが、その関与やメカニズムは未だ明確になっていない。そこで、本研究では、歯周病病態におけるIL-35の役割を明らかにする為の基礎的研究として、Th17細胞への分化および、IL-17産生に対するIL-35の直接的な影響を検討した。

【材料と方法】健康者および、慢性歯周炎患者末梢血中のTh17, Th1, Treg細胞の割合をFlow Cytometryを用いて解析した。また、末梢血中のCD4⁺T細胞をTh17細胞へ分化誘導した後にrIL-35(1ng/mL)を添加し、IL17A, RORAおよびRORCの遺伝子発現をReal-Time PCR法にて、また、IL-17Aのタンパク産生量をELISA法にて解析した。

【結果】末梢血中のTh17, Th1, Treg細胞の割合は、両群間に有意な差は認められなかった。また、Th17細胞分化誘導により有意に上昇した、IL17A, RORA, RORC mRNA発現およびIL-17Aタンパク産生量は、rIL-35添加により有意な減少が認められた。

【考察】IL-35は、Th17細胞の転写因子であるRORαおよびRORγtの抑制を介して、直接的にTh17細胞の分化および、IL-17産生を抑制し、過剰な炎症反応を制御する可能性が示唆された。

O-02

アロマトーゼ阻害薬が歯周組織構成細胞に及ぼす影響

2504

長谷川 詩織

キーワード：アロマトーゼ阻害薬, 乳がん, 歯肉線維芽細胞, 血管内皮細胞

【目的】我々は乳がん治療薬のアロマトーゼ阻害薬アナストロゾール服用後に全顎的な浮腫性の歯肉腫脹を認めた一例を経験した。そこでアナストロゾールが歯周組織に及ぼす影響について*in vitro*実験系にて検討した。

【材料および方法】アロマトーゼ阻害薬服用により生じる体内のエストロゲン濃度減少、アンドロゲン濃度増加がヒト歯肉線維芽細胞(HGF)の細胞外基質(ECM)産生・分解に及ぼす影響と、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)の透過性に及ぼす影響を検討した。さらにアナストロゾールとともに*Porphyromonas gingivalis*(Pg) LPSにてHGFを共刺激し、炎症及び骨吸収に関連するサイトカインの発現を検討した。次にアナストロゾールが直接的にHGF及びHUVECに及ぼす影響について上記と同様に検討し、Pg LPSとの共刺激時のHGFのサイトカイン発現を検討した。

【結果および考察】テストステロン濃度増加によりHGFのコラーゲン発現は上昇した。MMP-1, MMP-3, カテプシンB mRNA発現は抑制され、TIMP-1 mRNA発現が増加した。HUVECの透過性は性ホルモンの濃度変化の影響を強く受けない可能性が示された。またエストロゲン濃度減少により細菌感染時のIL-6, IL-8, MCP-1及びIL-17A mRNA発現は増強された。アナストロゾールはHGFの増殖能を亢進し、ECM発現を増加させると同時に上記と同様のプロテアーゼ発現を抑制した。HUVECの透過性はアナストロゾールにより亢進し、Pg LPSとの共刺激下でHGFの細菌感染時に生じるサイトカイン発現は増強された。以上の結果より、アナストロゾールはHGF及びHUVECに作用し、浮腫性の歯肉増殖の病態を形成するとともに骨吸収を亢進させる可能性が示唆された。

O-04

スフィンゴシン-1-リン酸はWnt5aを介して間葉系
幹細胞の骨芽細胞分化を促進する

2504

橋本 陽子

キーワード：間葉系幹細胞分化, スフィンゴシン-1-リン酸(S1P), Wnt5a

【目的】スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は、細胞の増殖・分化・遊走を制御する脂質メディエーターである。これまでに演者らは、マウス間葉系幹細胞株C3H10T1/2におけるS1Pの脂肪細胞分化抑制作用を報告した。一方、骨芽細胞分化誘導においてS1Pによる骨芽細胞分化マーカー発現増加と石灰化促進作用を見出したが、その作用点やメカニズムは明らかではない。そこで、S1Pが骨形成を制御するWntシグナル伝達経路を介して、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を促進するという仮説を立て検討を行った。

【材料と方法】マウス間葉系幹細胞株C3H10T1/2を用いた。Wnt5a, Wnt10b, low-density lipoprotein receptor-related protein(LRP)5, LRP6, alkaline phosphatase(ALP), osteocalcin(OC)の遺伝子発現はreal-time PCR法にて解析した。細胞外に分泌されたWnt5a, Wnt10b, Dickkopf1(Dkk1)のタンパク質発現は、ELISA法にて解析した。

【結果と考察】Wnt5a, LRP5, LRP6, ALP, OCのmRNA発現、Wnt5aタンパク質の分泌は、S1P添加により増加したが、Wnt10bのmRNA発現、タンパク質の分泌は変化しなかった。S1P添加により増加したLRP5, LRP6, ALPのmRNA発現は、Wnt5a中和抗体の添加によって減少した。一方、標準Wntシグナル伝達経路の阻害因子Dkk1の中和抗体添加によって、ALP, OCのmRNA発現は更に増加したが、LRP5, LRP6のmRNA発現には影響は認められなかった。以上の結果から、S1PのWnt5a分泌促進作用によりLRP5/6発現が増加し、標準Wntシグナル伝達経路が活性化され、C3H10T1/2細胞の骨芽細胞分化が促進される可能性が示唆された。

O-05
2504

マウス頭蓋骨欠損モデルにおける歯根膜細胞スフェロイドの骨再生能

佐野 孝太郎

キーワード：歯根膜細胞, スフェロイド, 骨再生能

【目的】細胞が多数凝集して3次元状態になったスフェロイド（細胞凝集塊）は、単層培養細胞に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、スフェロイド作製技術を利用して、多分化能を有する歯根膜細胞（PDL）からPDLスフェロイドを作製し、マウス頭蓋骨欠損モデルにおいて骨再生能を検討することを目的とした。

【材料と方法】ヒト抜去歯より採取した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。C57BL/6Nマウス（46匹）の右側頭蓋骨頂部に骨欠損（直径3mm）をトレフィンバーで作製し、マトリゲル®をスキャフォールドとして、PDLスフェロイド移植と単層培養PDL移植を行った。また、コントロールとして、マトリゲル®移植、偽手術（sham）を行った。14日、28日後に屠殺し、エックス線写真撮影後、脱灰薄切標本を作製した。HE染色を行い、移植により生じた新生骨について検証した。

【結果と考察】エックス線写真解析において、PDLスフェロイド移植群は他の群と比較して有意に高い新生骨量を示した。組織切片解析においても、PDLスフェロイド移植群では新生骨様組織を認め、骨欠損閉鎖率、新生骨面積率が他群に比較し有意に高かった。

【結論】マウス頭蓋骨欠損モデルにおいて、PDLスフェロイド移植は単層培養PDL移植に比べ、骨組織再生を促進することが示唆された。非会員共同研究者：中澤浩二（北九州市立大学）、有吉渉、中富満城（九州歯科大学）

O-07
2499

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

松永 絢明

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、LPS刺激マクロファージと共培養した脂肪細胞で発現が顕著に増大したComplement factor B（CfB）に着目し、①ヒト血中CfBはインスリン抵抗性マーカーと正の相関を示すこと、②高脂肪食負荷マウスでは血中CfB濃度が有意に増大することを報告した（第58回春季歯周病学会）。今回、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、CfBを過剰発現した3T3-L1前駆脂肪細胞、ならびに脂肪細胞特異的CfB過剰発現（CfBTg）マウスを用いた検討を行った。

【材料・方法】1. 3T3-L1にCfB遺伝子を過剰発現させ、脂肪細胞分化・脂肪蓄積に及ぼす影響を検討した。2. 通常食負荷CfBTgマウスにおいて糖・インスリン負荷試験を行い、同腹野生型マウスと比較した。3. 同CfBTgマウスの内臓、皮下、褐色脂肪組織、肝臓における脂肪合成、糖代謝、炎症関連遺伝子の発現を解析した。

【結果・考察】CfB遺伝子を過剰発現させた3T3-L1では、脂肪細胞分化誘導後のPpar γ 、Cebpaなどの遺伝子発現の亢進が遅延化したことからCfBの発現が脂肪細胞の分化過程および機能に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。また、CfBTgマウスは同腹野生型と比較して、内臓脂肪及び皮下脂肪組織重量が増大し、耐糖能の低下傾向、インスリン抵抗性の亢進がみられた。以上から、CfBが肥満、インスリン抵抗性の病態形成に関わる可能性が示唆された。

O-06
2504

SIPはS1PR2シグナル伝達経路を介したSmad1/5/8リン酸化亢進及びRunx2発現増加作用により骨形成を促進する

東 克匡

キーワード：骨芽細胞, SIP/S1PR2シグナル, 骨形成

【目的】スフィンゴシン-1-リン酸（SIP）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。演者らは、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞株MC3T3-E1細胞においてSIPによるS1PR2/RhoA/ROCK経路の活性化が、Smad1/5/8リン酸化亢進とRunx2発現増加を介して骨芽細胞分化に関与することを第59回春季本学術大会にて報告した。本研究では、*in vivo*でのS1PR2作動薬による骨形成促進作用とS1PR2/RhoA/ROCK経路の関与を検討した。また、マウス初代培養骨芽細胞を用いて骨芽細胞分化におけるSIP/S1PR2経路の重要性について検討した。

【材料と方法】8週齢雄性C57BL/6Nマウス腹腔内にS1PR2作動薬、S1PR1/2及びROCK阻害薬を1日1回、28日間投与し、 μ CTにて脛骨における海綿骨の骨量、骨梁幅、骨梁数の変化を解析した。また、マウス初代培養骨芽細胞を用いて、S1PR2/RhoA/ROCK経路がSmad1/5/8リン酸化とRunx2発現に及ぼす影響についてウエスタンブロット法にて検討した。

【結果と考察】*in vivo*において、S1PR2作動薬による骨量、骨梁幅、骨梁数の増加とS1PR2阻害薬による抑制を認めたが、S1PR1阻害薬による影響は認められなかった。また、ROCK阻害薬により骨量、骨梁数は減少した。一方、初代培養骨芽細胞において、SIPによるS1PR2/RhoA/ROCKを介したSmad1/5/8リン酸化亢進、Runx2発現増加が認められた。以上の結果から、新規SIP/S1PR2シグナル伝達経路はSmad1/5/8リン酸化亢進、Runx2発現増加を介し、骨形成を促進することが示唆された。

【結論】本研究で明らかとなったS1PR2/RhoA/ROCK経路による骨形成促進作用は、骨再生における新たな治療法の開発に繋がる可能性がある。

O-08
2203

歯周病原菌代謝産物酪酸の作用：酪酸の加齢促進作用とアルツハイマー誘導性

落合 邦康

キーワード：酪酸, アルツハイマー症, 酸化ストレス

歯周病が種々の全身疾患や高齢者のアルツハイマー型脳症（AD）と関連する可能性が示唆されているが、特にADとの関連性については不明点が多い。われわれは歯周病原菌の主要代謝産物・酪酸が高濃度で各種細胞に細胞死（J. Dent. Res., 2008, J. Immunol., 2004, 2003他）や酸化ストレス（Microb. Pathog., 2015, Cell Stress Chap., 2015, 2014, Anaerob., 2014他）を誘導することを報告してきた。今回われわれは、これらの現象が生体内においてどのような影響を及ぼすかを検討した。ラット歯肉内に酪酸接種後、採取した血液細胞から各種酸化ストレス関連シグナル（heme, hydrogen peroxide, catalase, NOX1, NOX2）、細胞死関連シグナル（calcium, CASP1, CASP3）および加齢関連マーカー（NAD, SIRT1, mTOR）の検出を試みた。また、接種後の脳より海馬、松果体、視床下部、小脳、大脳をそれぞれ分離し、酪酸の脳に及ぼす影響を検討した。その結果、血中の酸化ストレスおよび細胞死関連シグナルの著しい変動が見られ、ストレスが上昇していることが判明した。また、NAD, SIRT1の低下に伴い、加齢関連疾患マーカーmTORが上昇した。脳においては海馬への影響が最も顕著でTauタンパクが増加した。酪酸を指標としたこれらの実験結果から、歯周病は加齢プロセスを促進すると共にAD発症に深く関与する可能性が示唆された。

O-09

2499

脾島に浸潤した活性化マクロファージは脾β細胞におけるアポトーシス促進分子の発現を誘導する

鶴田 満大

キーワード：微細慢性炎症、脾β細胞、Xafl

【背景】2型糖尿病では、病態の進行に伴い脾島構成細胞であるα細胞、β細胞の機能異常に加え、マクロファージを中心とした炎症性細胞の脾島内への浸潤が観察される。しかし、浸潤炎症性細胞が脾島機能に及ぼす影響については未解明な部分が多い。

【目的】脾島組織での浸潤炎症細胞と脾α、β細胞との相互作用が、脾島の機能異常を惹起し糖尿病の病態を増悪させるという仮説を検証する。

【方法】マウス由来脾α細胞株αTC1、脾β細胞株βTC6をそれぞれマウスマクロファージ由来細胞株RAW264.7と共培養し、これらの系に*E.coli* LPSを添加した際のαTC1およびβTC6における発現変動遺伝子をDNAマイクロアレイ法にて網羅的に解析した。そこから抽出された遺伝子についてリアルタイムPCR法でmRNA発現、ウェスタンブロット法でタンパク質発現の解析を行った。培養上清中のIFNβ濃度をELISA法にて定量した。

【結果・考察】共培養条件下ではαTC1およびβTC6ともLPS刺激によるType1 IFN誘導遺伝子群の有意な発現増大を認めた。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βTC6においてのみ顕著に亢進した。βTC6に、IFNβまたはLPS刺激RAW264.7細胞の培養上清を添加するとXaflタンパク質の発現が増大し、LPSで刺激したRAW264.7ではIFNβの産生が亢進したことから、TLR4リガンド応答性のマクロファージ由来IFNβによりβTC6のXafl発現が誘導されることが示された。以上の結果より、軽微な慢性炎症が脾島浸潤マクロファージからのIFNβ産生を亢進させることで、高血糖症や脂質異常症などに起因した細胞ストレスによるβ細胞のアポトーシス誘導系が促進され、糖尿病の病態増悪に寄与することが示唆された。

O-11

2504

HMGB1が歯槽骨治癒に及ぼす影響

青柳 浩明

キーワード：HMGB1、炎症、歯槽骨治癒、抜歯窩

【目的】核内クロマチン結合タンパクであるhigh mobility group box 1 (HMGB1) は、炎症性刺激によって細胞外に分泌され、炎症性メディエーターとしても機能する。近年では、幹細胞の遊走を促進して皮膚の再生に関係することが報告され、再生医療の分野でも注目されている。本研究では、HMGB1が歯槽骨治癒に及ぼす影響を明らかにするために、マウスの抜歯窩モデルを用いて組織学的な影響を調べた。

【材料と方法】C57BL/6マウス（雄、8週齢）にHMGB1の中和抗体またはisotypeの対照抗体（2 mg/kg）を腹腔内投与した。その後、上顎左側第二大臼歯を抜歯し、1、3、5、7日後に上顎骨を摘出して、以下の観点で歯槽骨の治癒を組織学的に解析した。1.ヘマトキシリンエオジン染色による歯槽骨の治癒過程の観察と骨面積の測定 2.マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子解析 3.免疫蛍光染色によるHMGB1の局在の観察 4.ミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性を標的とした分子イメージングによる炎症強度の定量 5.免疫染色によるマクロファージ、血管内皮細胞、破骨細胞、骨芽細胞数の定量

【結果】対照抗体群と比較してHMGB1中和抗体群では、抜歯窩周囲における骨面積が減少しており、治癒が遅延した。さらに、MPO活性は減弱し、血管新生に関わる遺伝子群の発現は減少した。また、治癒過程におけるマクロファージ、血管内皮細胞、破骨細胞、そして骨芽細胞の数は少なかった。

【考察と結論】HMGB1を阻害すると、創傷治癒初期での炎症は抑制され、免疫反応や血管新生そして骨新生に関与する細胞が減少して、歯槽骨の治癒が遅延した。今後は幹細胞の動態を調べ、歯槽骨再生に関わる炎症制御のタイミングを考える必要がある。

O-10

2402

最終糖化産物とLPSはMAPKおよびNF-κBを介してマウス骨細胞のスクレロステチンの発現を調節する

坂本 英次郎

キーワード：糖尿病関連歯周炎、最終糖化産物、リポ多糖、骨細胞、スクレロステチン

【目的】糖尿病患者では歯周病の罹患率が高く、歯槽骨吸収など歯周組織の破壊が重篤化しやすい（糖尿病関連歯周炎）。骨細胞に由来するスクレロステチン(sclerostin: SOST)は骨形成を抑制する分泌蛋白で、糖尿病により分泌が増加する。一方、糖尿病合併症の原因物質として最終糖化産物（AGE）が注目されている。本研究では、骨細胞におけるSOST発現に対するAGEとLPSの影響とシグナル伝達経路について検討した。

【材料と方法】マウス骨細胞株MLO-Y4-A2を10%FBSを含むα-MEM培地で培養し、BSA、AGEあるいは*P.gingivalis*由来LPS（P-LPS）を一定期間作用させた後、細胞生存率、SOSTとRAGEの遺伝子発現（Real-time PCR法）と蛋白発現（ELISA）について検討を行った。また、MAPKとNF-κBの阻害剤を添加し、SOST発現およびMAPK関連蛋白のリン酸化についてウェスタンブロット法にて検討した。

【結果と考察】実験に使用した濃度のBSA、AGEおよびP-LPSは骨細胞の生存率に影響を与えなかった。AGE添加によりSOSTとRAGEの遺伝子発現は増加し、P-LPSとの共添加によりその作用は増強された。また、AGEはRANKL遺伝子の発現を抑制したが、P-LPSは逆に増強する傾向を示した。SOSTとRAGEの蛋白発現についても同様の効果が認められた。AGEによりERK、JNKおよびp65のリン酸化が亢進され、MAPKおよびNF-κBの阻害剤によりAGE誘導性SOST発現増加は阻害された。以上の結果より、AGEとP-LPSは、骨細胞においてMAPKとNF-κBを介してスクレロステチン発現を調節し、糖尿病関連歯周炎の病態に影響を及ぼしていることが考えられる。

O-12

3199

外傷を与えた骨髄の骨形成に骨粗鬆症治療薬が与える影響

宮崎 揚子

【目的】歯周病で歯を喪失しインプラント治療を選択するとき、埋入部位の骨密度が低い場合、確立された対処法はなくインプラントの初期固定を得るのは容易ではない。本研究では骨密度を改善する方法を確立するために、骨粗鬆症治療薬を骨髄外傷治癒時に応用し、骨形成反応を調べた。

【方法】麻酔下にて、SDラットの左側脛骨骨幹部に5ヵ所に骨髄穿孔を行った。反対側脛骨は内部コントロールとした。ラットを無作為に分配しALN群にはアレンドロン酸（0.8mg/kg/w）、PTH群には副甲状腺ホルモン（20μg/kg/d）、VC群には生理食塩水を術後より2週間投与した。骨髄穿孔部の骨形成はマイクロCTで解析し、組織形態計測法を用いて破骨細胞数と新生骨量を定量した。さらにPCRアレイを使い骨髄の骨関連遺伝子発現も調べた。統計分析は分散分析を用いた。

【結果】全ての群において骨髄穿孔は骨形成を誘導したが、ALNとPTHの投与はVCに比べて有意に骨形成を増加させた。しかし、骨関連遺伝子の発現はALNとPTHで異なった。PTHはDlx5, chrd, Acvr1などの骨形成タンパク関連遺伝子を発現させたが、ALNはこれらの遺伝子発現を抑制した。

【考察】ALNやPTHを骨創傷治癒が起こっている時に投与すると、骨形成が促進されることがわかった。しかし、その機序はALNとPTHで異なることも明らかとなった。この研究より、骨髄穿孔時にALNやPTHを投与すると骨梁形成を促し、骨密度を大きく改善できることがわかった。

O-13

2504

Osteogenic protein-1 添加コラーゲン膜はラット下顎角骨欠損における骨再生を促進する

尾崎 愛美

キーワード：Osteogenic protein-1, コラーゲン膜, ラット下顎角骨欠損モデル, 歯槽骨再生

【目的】現在、骨再生誘導（Guided Bone Regeneration; GBR）法は、臨床において広く応用されている。しかし、その再生した骨の質や量、適応症、治療期間について改善点が多く残されている。今回、従来のGBR法に用いられるコラーゲン膜に成長因子であるOsteogenic protein-1（OP-1）を添加し、骨再生を促進する新規システムを考案した。そこで、ラット下顎角骨欠損モデルを用いて、骨再生に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】10週齢の雄性近交系ラット（F344/jcl）の下顎角に、内径4.0 mmのトレファインバーを用いて、下顎角臨界骨欠損モデルを作製した。欠損のみ（Control群）、欠損をコラーゲン膜で被覆（CM群）、OP-1を0.5 µg（L-OP-1群）、もしくは2.0 µg（H-OP-1群）をコラーゲン膜に添加し欠損を被覆した群に分けた。術後8週において、実験動物用マイクロX線CT（µCT）によるエックス線学的観察およびHematoxylin Eosin, Villanueva bone染色による組織学的観察を行った。また、in vitroにて、コラーゲン膜から徐放されるOP-1の経時的変化についてELISA法にて測定を行った。

【結果】術後8週において、µCT像からControl群、CM群と比較してL-OP-1群、H-OP-1群で欠損部に骨様組織の再生を認めた。組織学的観察からH-OP-1群において既存骨から連続した明らかな新生骨像を認めた。また、OP-1はコラーゲン膜から3日目をピークに14日まで継続的に徐放することが認められ、その量はピーク時に約80%であった。

【結論】ラット下顎角骨欠損モデルにおいて、OP-1添加コラーゲン膜からの継続的なOP-1の徐放により骨再生を積極的に促すことが示された。

O-15

3103

歯根膜細胞由来SSEA-3陽性細胞の特性解析

船津 太一郎

キーワード：歯根膜細胞, SSEA-3

【目的】近年、ヒト間葉系組織に多分化能を有し腫瘍性をもたないMuse（Multilineage-differentiating stress enduring）細胞が報告された。この細胞は細胞表面抗原であるSSEA-3, CD105両陽性細胞として細胞集団から分離できることが明らかとなっている。本研究の目的は歯根膜細胞中のSSEA-3陽性細胞に焦点を当て、それらの細胞の特性を解析することにある。

【材料と方法】LONZAより購入した歯根膜線維芽細胞を用いて抗SSEA-3抗体にて一次染色、FITCで二次染色を行いFACSにて歯根膜細胞由来SSEA-3陽性細胞を得た。これら細胞を96穴プレートに播種し、自己複製能の観察を行うとともに増殖した細胞より採取したRNAを用いて3胚葉性の遺伝子発現を観察した。

【結果と考察】歯根膜線維芽細胞由来SSEA-3陽性細胞においてクラスター形成、さらに自己複製能が確認された。また採取したRNAから3胚葉性の遺伝子発現が確認された。今回の結果により、歯根膜線維芽細胞から自己複製能を持ち3胚葉性の遺伝子を発現している細胞を分離することができた。また今回使用した歯根膜線維芽細胞集団はほとんどが間葉系細胞と考えられCD105の発現が予想されることから、Muse細胞に近い特性を持つ細胞であることが考えられる。便宜抜歯や智歯抜歯で得られる抜去歯は医療廃棄物であり、それら抜去歯から歯根膜等の組織を得ることができる。現在、主に骨髓細胞を用いた細胞再生医療が行われているが、それらに比べ低侵襲で細胞を得られるメリットがある為、今後新たな細胞源として有効性が期待される。

【結論】歯根膜線維芽細胞からSSEA-3陽性細胞を分離することができ、それら細胞は3胚葉性の遺伝子を発現することが示された。

O-14

2504

絹糸結紮マウス歯周病モデルにおける歯根膜組織の遺伝子発現の解析

平井 麻絵

キーワード：マウス歯周病モデル, 歯根膜組織, レーザーマイクロダイセクション, 炎症性サイトカイン

【目的】絹糸結紮によるマウス実験的歯周病モデルは局所的な炎症性の歯槽骨吸収を特徴とし、各種遺伝子改変マウス等を用いることにより、同モデルは歯周病の病態解析に広く用いられている。しかしながら、同モデルにおける歯根膜組織の病態生理学的な反応性については十分な情報が得られていない。そこで本研究では、絹糸結紮マウス実験的歯周病モデルにおける歯根膜組織を、レーザーマイクロダイセクション（LMD）にて採取し、同組織の遺伝子発現について定量的に解析することを目的とした。

【材料と方法】8週齢のC57BL6J ♀マウスの上顎左側第二後臼歯に5-0絹糸を結紮し、7日間SPF環境下にて飼育した。CO₂を用いて安楽死後、結紮側を試験側、上顎右側第二後臼歯を含む上顎骨をコントロール側として採取し、µCTにて骨吸収を評価した。一方、採取した上顎骨を非脱灰で急速凍結した後、20µmの新鮮凍結切片を作製した。クレシルバイオレット液にて染色後、Leica社製LMDにて歯根膜組織を採取した。次いで、採取した歯根膜組織よりRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にて各種遺伝子発現を定量的に解析した。

【結果と考察】µCT解析の結果、絹糸結紮による第二後臼歯周囲に歯槽骨の吸収が確認された。LMDを用いて回収した歯根膜組織より抽出したRNAは一歯あたり約30ngであった。リアルタイムPCR法による解析結果から、コントロール側と比較し、試験側の歯根膜組織においてIL-6やOsteopontinの遺伝子発現の上昇が認められた。本結果より同上マウスモデルでは結紮周囲の肉内組織のみならず、歯根膜組織においても炎症反応が誘導されることが示唆された。

O-16

2504

ヒト老化歯根膜細胞におけるマイトファジーの機能低下

鈴木 美麻

キーワード：マイトファジー, 老化歯根膜細胞, 老化, 活性酸素種

【目的】歯根膜は、I型Collagen, Periostinなどの細胞外基質蛋白を多量に産生する弾性線維組織であり、メカニカルストレスに適応することで歯周組織の恒常性維持を担っている。ミトコンドリアは細胞代謝のエネルギーとなるATPの産生を担うオルガネラであり、蛋白の生成において重要な役割を果たす。しかしながら、ダメージの蓄積されたミトコンドリアは活性酸素種（ROS）を放出し、細胞構成蛋白やDNAを酸化、傷害することで炎症、アポトーシスを細胞レベルで誘導する。ミトコンドリアの異常は、老化に伴って亢進し、メタボリックシンドロームなどの成人性疾患の病態との関与が報告されている。そのため、ダメージを受けたミトコンドリアの細胞内クリアランス機構であるマイトファジーの機能低下が注目されている。そこで、本研究では、ヒト歯根膜細胞（HPDL）における老化に伴うマイトファジーの機能低下について検討することを目的とした。

【材料と方法】透過型電子顕微鏡像を用いてHPDLにおけるミトコンドリアの形態学的な評価を行った。細胞内ROSおよびミトコンドリア内の活性酸素（mitoROS）については、蛍光プローブにて染色し、蛍光顕微鏡ならびにFACS解析を行った。また、HPDL並びにHela細胞にMT-mKeima-Red-Park2を遺伝子導入し、CCCP処理によるミトコンドリア局在蛋白（mKeima）の励起光のシフトを共焦点顕微鏡にて検出し、マイトファジーを定量的に解析した。

【結果と考察】HPDLにおいては、細胞老化に伴い異常なミトコンドリアと、ROSの増加が認められた。HPDLにおいては、マイトファジーの低下によるダメージミトコンドリアの蓄積が、過剰なROS産生に影響を及ぼす可能性が示唆された。

O-17

低酸素状態が歯周組織構成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, コラーゲン合成, 歯肉線維芽細胞, 歯根膜細胞

【目的】コラーゲンは歯周組織を構成する主要な細胞外基質の一つであり, 同分子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。一方, 低酸素応答が同上過程で重要な役割を果たすことが報告されている。そこで本研究では低酸素が歯周組織構成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。

【材料と方法】ヒト歯肉線維芽細胞(HGF)及びヒト歯根膜細胞(HPDL)を通常酸素(20%O₂)あるいは低酸素(1%O₂)下にて培養し, コラーゲン発現を免疫染色法, western blot法にて解析し, コラーゲン産生の指標としてプロコラーゲンC末端をELISA法にて測定した。またHIF-1α阻害剤chetominを用いて低酸素下でのコラーゲン合成におけるHIF-1αの関与について検討し, 同合成に必須の水酸化酵素P4HA1, PLOD2の役割について解析した。

【結果と考察】低酸素下での培養にてHGF及びHPDLのコラーゲン産生が亢進した。低酸素下での培養はコラーゲンの遺伝子発現に影響なく, 一方, P4HA1, PLOD2の遺伝子及びタンパク発現を上昇させた。また低酸素誘導性コラーゲンの産生亢進及びP4HA1, PLOD2発現上昇はchetomin処理により有意に抑制された。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減少した。一方, PLOD2の発現抑制により培養上清中のコラーゲン発現に著明な変化なしに細胞周囲の発現が低下した。以上の結果から, 低酸素がHIF-1αを介してP4HA1の発現を上昇させることによりコラーゲン合成を活性化させ, 一方でPLOD2の発現を上昇させることによりコラーゲン線維の架橋構造を安定化させることで, HGF及びHPDLのコラーゲン産生を制御することが示唆された。

O-19

3次元培養骨髄間葉系幹細胞集塊Clumps of a MSC/ECM complexの細胞分化を制御するメカノトランスダクション機構の解析

3199

小松 奈央

キーワード：再生医療, 間葉系幹細胞, メカノトランスダクション, YAP/TAZ, 3次元培養

【目的】骨髄間葉系幹細胞(MSC)と細胞自身が産生する細胞外基質(ECM)を利用することでClumps of a MSC/ECM complex (C-MSC)が得られる。C-MSCは3次元培養細胞集塊で, 効果的な組織再生能を示す(Cytotherapy, 2015)。一方, 基質の固さ, 細胞密度, 浮遊状態などの因子がメカノトランスダクションを誘導し, 転写制御因子YAP/TAZを介してMSCの細胞分化を制御するという報告がある。本研究では, C-MSC内においてもメカノトランスダクション機構が機能し, 細胞分化能を制御するかを明らかにする。

【材料と方法】ヒトMSCsを24穴培養皿に2.0×10⁵cells/wellで播種し, 50μg/ml アスコルビン酸含有の増殖培地で4日間培養し十分なECMを産生させた。これを鈍的に剥離し, 細胞シートの状態で浮遊させ, さらに増殖培地で培養することで細胞集塊C-MSCを得た。この培養過程におけるF-actinの形態, YAP/TAZの局在と活性, 分化能について解析した。

【結果と考察】C-MSC作製過程における浮遊培養状態では, F-actinの脱重合が促進した。これと一致して, 経時的なYAP/TAZの核外移行, 発現量の低下, およびその転写活性の低下が確認された。さらに, C-MSCは骨分化能より脂肪・軟骨分化能が高かった。一方, F-actinの脱重合に必須のcofilin1に対するsiRNAを導入したところ, YAP/TAZ活性が増加し, 脂肪・軟骨分化能が低下し, 骨分化能が上昇した。以上のことから, 3次元培養されるC-MSCでは, 浮遊状態であることがF-actinの脱重合を介してYAP/TAZの活性を減弱し, 脂肪・軟骨分化方向に誘導されやすくなることが示された。

【結論】C-MSCにおいてはメカノトランスダクションが機能し細胞分化を制御することが明らかとなった。

O-18

*Fusobacterium nucleatum*による好中球のneutrophil extracellular traps産生を介した炎症反応の増悪

2203

多田 浩之

キーワード：慢性歯周炎, 自然免疫, 好中球細胞外トラップ

【目的】好中球は, 微生物の刺激に応じてneutrophil extracellular traps (NETs)を産生する。NETsは好中球に存在するヒストン, DNA, 好中球エラスターゼや抗菌タンパクが結合した網状構造物であり, 好中球の感染防御機構である。しかしながら, 過剰なNETs産生は炎症性疾患や自己免疫疾患の病態形成に関与する。本研究では, 歯周病関連細菌である*Fusobacterium nucleatum*によるNETs産生と炎症反応の誘導について検討した。

【材料と方法】ヒト前骨髄球細胞株HL-60をレチノイン酸含有RPMI 1640培地で分化誘導し, 好中球様細胞として供試した。*F. nucleatum* ATCC 25586株はtryptic soy brothにて嫌気培養した。*F. nucleatum*感染によるHL-60細胞からのNETs産生は, SYTOX Greenで染色し蛍光量で測定した。感染後, 細胞からDNase Iで分離したNETsにおけるヒストンH3, シトルリン化ヒストンH3およびサイトカイン発現をウェスタンブロット法で検出した。ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)をtranswell filterにて培養し, transmigration assayを行った。

【結果と考察】HL-60細胞に*F. nucleatum*を感染させるとNETsが産生され, NETsにおけるシトルリン化ヒストンH3発現が著明に亢進した。*F. nucleatum*感染により産生されたNETsのmacrophage migration inhibitory factor発現が亢進した。また, HUVECを同NETsで刺激すると, 好中球の細胞外遊走が亢進した。

【結論】歯周病局所において, *F. nucleatum*感染により好中球から産生されるNETsは, MIF等の炎症性サイトカインを有しており炎症反応を誘導することから, NETsは歯周病の病態形成に関与する可能性が示唆された。

会員外共同研究者：西岡貴志（東北大学大学院歯学研究科）

O-20

慢性歯周炎患者に対するカテキンゲルの有効性

3102

高井 英樹

キーワード：カテキンゲル, 慢性歯周炎, 局所薬物配送システム

【目的】ブラークコントロールには, 機械的および化学的ブラークコントロールがあり, ブラッシングによる機械的ブラークコントロールは最も効果的であるが, 毛先の到達性の限界から, 抗菌薬による化学的ブラークコントロール法が補助的な方法として行われ, 歯周基本治療終了後に4mm以上の歯周ポケットに対して局所的に抗菌薬を投与する局所薬物配送システムが行われている。我々は, 化学的ブラークコントロール剤としてのカテキンの有用性を検索する目的で, 歯周ポケット内にカテキンゲルを局所投与し, 臨床パラメーターおよび細菌数の変化について解析した。

【材料および方法】慢性歯周炎患者24名をプラセボ, カテキンゲル, ミノサイクリンおよび混合(カテキン+ミノサイクリン)群に振り分け, 4mm以上の歯周ポケット内に3ヵ月間, 月に1回局所投与した。投与前後に, PPD, CAL, BOP, PIIおよびGIを測定し, 局所投与を行った4mm以上の歯周ポケットからは, 滅菌ペーパーポイントを使用して歯肉溝滲出液を採取し, Real-time PCRにて細菌検査を行った。

【結果および考察】プラセボ群と比べて, カテキンゲル, ミノサイクリンおよび混合ゲル群で, 局所投与3ヵ月後にPPDおよびCALに改善傾向が認められ, カテキンおよびミノサイクリン群では, プラセボと混合ゲル群と比較し, BOPとGIに改善傾向が認められた。カテキンゲル局所投与3ヵ月後には*S. intermedia*の減少が, 混合ゲル投与後には*S. sanguinis*の増加が認められた。ミノサイクリン局所投与3ヵ月後には, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*の減少が認められた。以上の結果から, カテキンの局所投与は歯周治療に有用である可能性が示唆された。

O-21

2504

ヒト歯根膜幹細胞の増殖、硬組織分化およびミトコンドリア形態に及ぼす赤色LED照射の影響

山内 伸浩

キーワード：赤色LED、ヒト歯根膜幹細胞、MAPK経路、ミトコンドリア

【目的】近年、光線力学療法としてLEDが注目されているが、歯周組織再生への影響に関して詳細は不明である。本研究では、赤色LEDの歯周組織再生への効果を調べるため、ヒト歯根膜幹細胞(hPDLSCs)の増殖、ミトコンドリアおよび硬組織分化誘導への影響、MAPK経路の関与について検討した。

【材料および方法】hPDLSCsは、ヒト抜去歯歯根膜より分離、培養をした。光源は(株)モリタより供与されたLedEngin社製 高出力赤色LED(中心波長:650 nm)を用いた。細胞増殖は生細胞プロテアゼ(LCP)とアデノシン三リン酸(ATP)を検討し、至適エネルギー量を策定し、LED照射後のミトコンドリア形態を観察した。硬組織分化誘導後、至適エネルギー量でLED照射を行い、硬組織分化能を検討した。またMAPK経路を構成するERK1/2、JNK、P38タンパク発現を観察し、ERK1/2経路阻害剤(PD98059)およびJNK経路阻害剤(SP600125)を用いて同様の実験を行った。

【結果と考察】8 J/cm²で、細胞増殖が共に最も増加したので至適エネルギーとした。LED照射で細胞形態に変化はみられないが、ミトコンドリア形態が顆粒状に変化した。硬組織分化誘導後、LED照射を行うと、硬組織分化能および石灰化物形成能は共に有意に増加した。また、ERK1/2およびJNKはLED照射で活性化したが、P38に影響はみられなかった。PD98059によりRunx2 mRNA、Osterix mRNAの発現およびALP活性は減少したが、SP600125では影響しなかった。OCN、PIP産生量および石灰化物形成能は、両阻害剤添加とともに減少した。

【結論】赤色LED照射はミトコンドリア形態および膜電位状態を変化させ、ERK1/2およびJNK経路の関与で硬組織分化を促すことが示唆された。

O-23

2504

歯周治療に向けたAgクラスター/ローズベンガル複合体の特性評価

蒨 佳奈子

キーワード：抗菌的光線力学療法、Agクラスター/ローズベンガル複合体、歯周病原細菌

【目的】抗菌的光線力学療法(a-PDT)は光感受性物質が光励起によって活性酸素を発生させ殺菌する治療法である。Agクラスター/ローズベンガル複合体(Ag/RB複合体)は新規の光感受性物質であり、光励起によって一重項酸素が生成され、さらにAgクラスターの自己酸化による銀イオンの溶出がおこる。これまでに*S. mutans*に対する抗菌活性を有することが報告されている。そこで本研究ではAg/RB複合体の歯周病治療への応用を目指して歯周病原細菌に対する抗菌活性と生体細胞親和性について評価した。

【材料と方法】硝酸銀(I)とグルタチオンの混合溶液に、水素化ホウ素ナトリウムを添加して銀クラスターを作製した。その後ローズベンガルを混和、限外濾過してAg/RB複合体を作成した。次に、Ag/RB複合体の抗菌性並びに細胞親和性を評価した。抗菌性評価には*A. actinomycetemcomitans*(Aa)と*P. gingivalis*(Pg)を使用し、細胞親和性評価にはNIH-3T3線維芽細胞を用いた。各懸濁培地にAg/RB複合体(10μg/mL)を添加して白色LED(1分間)照射による光励起を行い、24時間後に抗菌性、細胞親和性を評価した。

【結果と考察】Ag/RB複合体は光励起により有意にAa、Pgの濁度の増加を抑制したことから、歯周病原菌の増殖を抑制すると考えられた。一方、生体細胞における細胞付着伸展、LDH活性、細胞増殖に対する影響はほとんど認められなかった。

【結論】Ag/RB複合体は光励起により歯周病原菌に対する抗菌活性を示し、生体細胞に対して良好な親和性を示した。

O-22

2504

Er:YAGレーザーを併用した新規の歯周ポケット治療法の臨床評価：ランダム化比較試験

青木 章

キーワード：歯周ポケット、Er:YAGレーザー、スケーリング・ルートプレーニング、ランダム化比較試験、スケーラー

【目的】本研究では、従来のスケーリング・ルートプレーニング(SRP)にEr:YAGレーザーを併用した新規歯周ポケット治療法[Er:YAG laser-assisted comprehensive periodontal pocket therapy(Er-LCPT)]の有効性をSRP単独と比較検討した。

【被験者と方法】2009 - 2014年に東京医科歯科大学歯学部附属病院歯周病外来で、歯周基本治療後に5mm以上の歯周ポケットが2か所以上残存している患者20名を対象とした。スプリットマウスデザインにて、従来のSRPまたはEr-LCPT法のいずれかをランダムに割り付け処置した。Er-LCPT法では、キュレット型スケーラーによるSRP後、根面を注水下でレーザー照射した。またポケット内面の軟組織壁および骨内欠損が存在する場合には欠損内のデブリドメントをキュレットとレーザーを併用して行った。さらに上皮の創内への遊走の遅延と血餅の安定化を目的として、レーザーで肉内辺縁上皮を除去し、非接触照射にてポケット入り口の血餅凝固を行った。術前、術後3か月、6か月、1年後のアタッチメントレベル、プロービングデプス、BOPの変化を評価した。なお、本研究は歯学部倫理審査委員会の承認と患者の同意の下に行われた。

【結果】術後、両群共に副作用や合併症はなく歯周ポケットの臨床的改善が認められ、治療1年後にEr-LCPT群ではSRP群より有意に高いポケットの減少量とアタッチメントゲインが得られた。

【結論】残存ポケットの治療において、Er:YAGレーザーを補助的に併用する新規の歯周ポケット治療法(Er-LCPT)は従来のSRPよりも治療を促進する可能性が示された。

O-24

2609

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3報：水平荷重解除後のFAI細菌漏洩程度の比較研究

安井 純子

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】水平荷重負荷により、インプラント-アバットメント接合部(FAI)封鎖性が低下することを明らかにしてきた。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。これらを前提に、本研究では、数種のコニカルコネクションを有したインプラントを使用し、アバットメントへの水平荷重負荷による、FAI封鎖性の低下が、細菌侵入に影響を与えるか検討を行った。

【材料と方法】コニカルコネクションを有したAadva(Aa)、Aadvaと同一形状の純チタン製インプラント(pTi)、およびOsseospeed(Os)を使用した。アバットメントスクリュー先端に*S. mutans*(ATCC 25175)標準菌液を付着させた後、フィクスチャーとアバットメントを締結した。その後、アバットメントに、水平荷重(225N)を加えた後、水平荷重負荷を解除し、培養液に浸漬させた。その後、FAIからの細菌漏洩の程度を、培養液中に増殖した細菌数を測定することにより調べた。

【結果と考察】培養、12時間ではAa、Aadva pTi、Osともに細菌の漏洩は、ほとんど認められなかった。24時間以降では、Os、Aadva pTiにおいて、細菌数が増加した。Aaは、Os、Aadva pTiと比較して、細菌の漏洩が有意に少なかったことから、FAIの封鎖性と細菌漏洩程度には、相関性があることが認められた。

O-25
2504

イオン徐放性S-PRG フィラーの粒子サイズが抗菌性
及び細胞親和性に及ぼす効果

眞弓 佳代子

キーワード: S-PRG フィラー, *S. mutans*, *A. Actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*

【目的】 S-PRG (Surface prereacted glassionomer) フィラーは6種類のイオンを徐放し, 特に F^- や BO_3^{3-} の徐放は抗菌効果が期待できる。当教室ではこれまでにS-PRG フィラーの粒子サイズを制御し, 象牙質表面へのS-PRG フィラー固定化による機能性コーティングに成功した (平成28年秋季日本歯科保存学会にて発表)。そこで本研究では, 粒子サイズの異なるS-PRG フィラーコーティング被膜を作製し, 口腔内細菌に対する抗菌効果, また生体細胞への影響を検討した。

【材料と方法】 分級 (沈降法) により粒子サイズ (250, 500, 1000, 3000nm) が異なる4種類のS-PRG フィラー分散液 (松風) を調製した。各分散液 (1wt%) を組織培養ディッシュに滴下後, 乾燥してコーティング被膜を作製した。被膜無しをコントロールとした。まずSm菌, Aa菌, Pg菌の懸濁液を各被膜上に播種, 24時間培養後に濁度を測定した。次に, 各被膜上にNIH3T3細胞を播種, LDHアッセイとWST-8アッセイを行った。

【結果と考察】 濁度測定の結果, すべての粒子サイズのS-PRG フィラー被膜で有意に低い濁度を示した。250nm, 500nm被膜では特に低い濁度を示し, 良好な抗菌性が発揮されたと考えられた。一方, 細胞培養試験においてLDH活性はコントロールより低く, 細胞毒性は少ないと考えられた。しかし250nm, 500nm被膜上の細胞増殖は他に比べ有意に低かった。

【結論】 粒径が小さいS-PRG フィラーの被膜は強い抗菌性を示し, LDH活性と細胞増殖を抑制した。

O-27
3102

Use of a composite of bone substitute and collagen
barrier membrane for local ridge augmentation at
peri-implant dehiscence defects

Young Woo Song

Keywords: animal study, ridge augmentation, bone patch, histology, micro-computed tomography

Objectives: To evaluate the effects of a composite of bone substitute and collagen barrier membrane (bone patch) for local ridge augmentation at peri-implant dehiscence defects on the clinical efficacy and volume stability in dogs.

Materials and methods: Implant placement and ridge augmentation procedure were performed at surgically created peri-implant dehiscence defects in canine mandible (n=6). Four treatment modalities were randomly applied: i) bone patch group, ii) GBR without pin fixation group (bone graft and collagen membrane), iii) GBR with pin fixation group, and iv) negative control group. After 12 weeks, clinical, micro-CT and histological analyses were performed. **Results:** Histologic analysis showed that bone patch group had similar results to GBR group and GBR with fixation group in terms of new bone formation. Micro-CT analysis revealed similar results to histologic analysis in terms of total volume maintenance. Operating time was significantly shorter in bone patch group compared to GBR group and GBR with fixation groups.

Conclusions: GBR using bone patch could simplify the ridge augmentation procedure with reduced operating time and equivalent biological performance compared to the conventional procedure.

O-26
3101

フィクスチャー表面のバイオフィーム除去に対する
流水式超音波歯垢除去器の有効性

滝口 尚

キーワード: 超音波, バイオフィーム, 振動加速度

【背景・目的】 流水式超音波歯垢除去器は, 水流に超音波を印加し, 発生した加速度エネルギーを利用して非接触で洗浄するシステムである。インプラントも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。そこで, 本研究ではインプラント治療を受けている患者を対象に, 開発した流水式超音波歯垢除去器を用いてバイオフィーム除去効果を評価した。

【材料と方法】 被験者はインプラント治療を受けている10名の患者を対象に, 埋入済フィクスチャーに粗面アバットメントを72時間装着し, 表面にバイオフィームを付着させた。その後, 流水式超音波歯垢除去器 (周波数345kHz) またはブラシコーンを用いて各60秒間バイオフィームの除去を行った。評価方法は, 術前, 前後の残存バイオフィームの割合, PHP指数および, 術中の痛み, 不快感は100mmVASを用いて評価した。

【結果と考察】 バイオフィームの除去効果は, 術前のバイオフィーム残存率100%に対し, 流水式超音波歯垢除去器で中央値33.5%, ブラシコーンで中央値51.0%に減少した。痛み評価は流水式超音波歯垢除去器では中央値9.4mm, ブラシコーンでは中央値0mmであった。本研究から流水式超音波歯垢除去器は, 術前と比較して有意にバイオフィームを除去できることが確認され, この効果はブラシコーンと同等であった。また, 本装置は非接触下で作用させるため, インプラント表面に機械的損傷を与えないことも特徴である。これらのことから, 流水式超音波歯垢除去器は, インプラント体に付着したバイオフィーム除去に有効であると考えられる。

O-28
2402

歯周炎と全身疾患 (糖尿病・関節リウマチ) に共通
するリスク遺伝子の解析

小林 哲夫

キーワード: 歯周炎, 糖尿病, 関節リウマチ, リスク遺伝子

【目的】 近年, 歯周炎と全身疾患との関連性が示唆されているが, その遺伝子レベルでの関連性については殆ど解明されていない。そこで本研究では, 慢性歯周炎 (CP), 糖尿病 (DM), 関節リウマチ (RA) の発症との関連が報告されている17種の遺伝子多型を解析し, その分布の疾患特異性について検討した。

【材料と方法】 新潟大学医歯学総合病院, 徳島大学病院, 岡山大学病院, 愛知学院大学歯学部附属病院を受診され, インフォームドコンセントが得られたCP群251名, DM群153名, RA群199名, ならびに健常 (H) 群130名より末梢血液サンプルを採取し, ゲノムDNAを抽出後, nano-Invader DNA chipシステムにて17種の遺伝子多型 (PTPN22, PADI4, IL-1A, IL-1B, TNF- α , IL-6, KCNQ1, STAT3) の遺伝子型を決定した。また, 遺伝子型分布の群間差の有意性を統計解析により検定した。

【結果と考察】 CP・DM・RA群の17種の遺伝子多型の分布はいずれもH群の分布と有意差は認められなかった。しかしながら, 年齢・性別・喫煙を調整した多重logistic解析の結果, 2種のSTAT3多型 (rs74416, rs8069645) とCPとの間に有意な関連を認めた (ともに $P < 0.001$)。また, STAT3 rs74416 G/G分布は4群 (RA+CP, RA, CP, H) 比較のRecessive modelで有意差が認められ ($P = 0.013$), CPとRAの共通リスク遺伝子型の可能性が考えられる。rs74416はSTAT3遺伝子イントロン上で, その機能的役割は不明であり, 遺伝子型間の機能検証が必要である。

【結論】 STAT3 rs74416はCPとRAの共通リスク遺伝子多型となる可能性が示唆された。

O-29

糖尿病と歯周病に関連したアンケート調査 第一報
糖尿病患者の歯周病に対する意識

2402

黒澤 正雄

キーワード：歯周病，糖尿病，医科歯科連携

【目的】歯周病と糖尿病との関連についてこれまで多くの報告がなされてきたが，糖尿病患者自身が歯周病と糖尿病との関係を認知しているかの報告は少ない。本調査では歯科ではなく内科に通院している糖尿病患者に対し歯科的事項のアンケート調査を行い，今後の医科歯科連携における糖尿病対策の一助とすることを目的とする。

【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。項目は，基本事項として5項目（年齢，性別，糖尿病歴，HbA1cおよび現在の糖尿病治療法）と歯科的事項の計16項目である。本報告では糖尿病と歯周病が関係あることを知っているかどうかの設問に対し，その他15項目とクロス集計を行い，項目ごとに糖尿病と歯周病が関係あることを知っている群と知らない群との間に分布の違いがあるかどうか χ^2 検定を行い検討した。

【結果と考察】アンケート回収数は2,205名（66.0 $\pm$ 12.2歳）で，糖尿病歴は11.6 $\pm$ 9.2年，現在の糖尿病治療については10.7%が食事・運動療法のみ，63.5%が内服薬治療，21.8%がインスリン治療を受けている患者群であった。糖尿病と歯周病との関連を知っている群と知らない群では，糖尿病歴の長さ，治療内容の違いにより有意な分布の違いを認め，罹患期間が長いほど，またインスリン治療を受けている群で認知度が高かった。これは病状の進行に伴い両者の関係を知る機会が増加したためと推察され，糖尿病発症早期，予防の段階から両者の関連について認識してもらう必要があると考えられた。

【結論】本調査結果は，今後の医科歯科連携における糖尿病対策の一助となるものと考えられる。

O-31

Porphyromonas gingivalis の感染が妊娠および胎児に及ぼす影響の評価

2504

宇田川 小百合

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*，歯周炎，早産・低体重児

【目的】妊婦の歯周炎と早産・低体重児出産との関連が報告されているが詳細なメカニズムは不明な点が多い。本研究の目的は，歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis*（以下Pg）の感染が妊婦・胎児に及ぼす影響をマウスを用いて分子生物学的に解析し早産・低体重児出産に対する影響を明らかにすることである。

【材料と方法】Slc: ICR雌マウスの妊娠1日目からPg（ATCC33277, 10⁸ cells）を静脈注射で毎日投与した歯血症モデル群（ED群），妊娠1日目に1回のみ投与した群（E1群），妊娠15日目に1回のみ投与した群（E15）および妊娠1日目から毎日生理食塩水を静脈注射した対照群を作製し，出産の時期・出生児体重について評価した。また妊娠17日目（E17）での胎盤・臍帯・羊膜における炎症及び低酸素に関連した遺伝子発現の変動及びPgの組織感染をqPCR法で解析した。E17での対照群とED群の臍帯における遺伝子発現の変動をDNAマイクロアレイ法にて網羅的に解析し，発現の変動が認められた遺伝子をqPCR法にて確認した。

【結果と考察】全ての群において出産の時期に有意な差は認められなかったが，ED群とE15群は対照群と比べ，仔の出生時体重が有意に低値を示した。また胎盤・臍帯・羊膜のいずれからもPgは検出されなかった。ED群およびE15群においては胎盤では*Il6*，臍帯では*Hif1 α* の有意な上昇が認められた。羊膜ではPgの感染の有無による*Il6*や*Hif1 α* の発現の差は認められなかった。DNAマイクロアレイ法によりPgの感染による臍帯での胎児発育不全や炎症に関連する遺伝子発現の変動が確認された。

【結論】妊娠後期の歯周病原細菌感染により臍帯は低酸素状態となり低体重児出産を引き起こす可能性が示唆された。

O-30

歯周炎患者における腸内細菌叢の解析

2504

中島 貴子

キーワード：歯周炎，腸内細菌叢，ディスバイオーシス

【目的】我々は，マウスにおいて嚥下された*Porphyromonas gingivalis*が腸内細菌叢を変化させることで全身性に軽微な炎症を誘導し，これにより歯周炎が様々な全身疾患のリスクを高める要因の一つになり得ることを報告した。今回，マウスで示した仮説がヒトにおいても生じているかを明らかにするため，歯周炎患者の腸内細菌叢と唾液細菌叢を網羅的に解析し，健常者と比較した。

【材料と方法】全身の慢性疾患を有しておらず過去6か月間に抗生物質の服用をしていないという条件を満たす中等度から重度歯周炎患者12名（男性4名，女性8名），歯周組織に問題の無い成人10名（男性4名，女性6名）より糞便と未刺激唾液を採取した。DNAを抽出後16S rRNA遺伝子のV1-V2領域をPCR増幅し，イルミナ社製MiSeqにて配列解析を行った。各配列データをデータベースに照合して97%以上の塩基配列相同性が認められる場合を同一Operational Taxonomy Unit（OUT）として分類し，それぞれの頻度を求めた。各群のOUTの類似性はUniFrac解析で検討した。

【結果と考察】患者群の歯周治療前の腸内細菌叢は菌種の構成・頻度を考慮して解析した場合に，唾液細菌叢は菌種の構成を対象として解析した場合に健常者のそれと有意な違いがあることが明らかになった。これらの結果は歯周炎患者の腸内細菌叢ではdysbiosisが生じており，その変化は唾液細菌叢と密接に関連することを示唆する。この研究の一部は日本歯周病学会企画調査研究助成の支援を受けて行った。

会員外共同研究者：須田 互（慶応義塾大学 医学部），服部正平（早稲田大学 理工学術院），森田英利（岡山大学 農学部）

O-32

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解析

2504

濱本 結太

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*，関節リウマチ，腸内細菌叢，メタゲノム解析

【目的】関節リウマチ（RA）は関節の腫脹・破壊をきたす慢性炎症性疾患で，その発症に遺伝的・環境的因子が複雑に関与している。近年歯周炎が背景因子の1つとして報告され，歯周病原細菌の1種である*Porphyromonas gingivalis*（Pg）口腔感染が，血中の炎症性サイトカインの上昇や関節における破骨細胞の活性化を引き起こし，RAモデルマウスの関節症状を悪化させることを報告した。本研究ではそのメカニズムを明らかにするために腸内細菌叢や腸管免疫に着目し検討した。

【材料と方法】マウスはRAモデルマウスであるSKGマウス（6-8週令，雌）を使用した。対照群ではRAを誘導するためにLaminarin（LA）10mgを腹腔に投与した。更にPg感染群では，Pg W83生菌またはホルマリン処理した死菌（10⁸ CFU 2% carboxymethylcellulose 含有PBS）を3日毎に口腔内へ投与した。6週間後にArthritis scoreでRAを評価した。腸内細菌叢の16S rRNAによるメタゲノム解析は糞便からPowerSoil（MO BIO Laboratories）を使用して細菌DNAを精製後，MiSeq（Illumina社）を用いて行った。腸管の炎症の評価は回腸部バイエル板の組織学的検討を行うとともに，糞便中のIgA量をELISA法で評価した。

【結果と考察】Pg生菌・死菌投与群では対照群と比較してRAスコアが亢進した。腸内細菌叢の変化は，*Verrucomicrobia*門の割合の減少と*Proteobacteria*門の割合の増加が認められた。また回腸部バイエル板においてその肥厚と腸管壁絨毛構造の破壊が認められた。更に糞中の遊離IgA量は有意に上昇していた。

【結論】SKGマウスのRA発症においてPg感染がその増悪に関与しており，そのメカニズムとして腸内細菌・腸管免疫の変化が影響していることが示唆された。

O-33

唾液中Red-Complex細菌数と歯槽骨高さとの相関性

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 と歯周病検査値との関連について、わが国では健康者を含んだ大規模な調査はほとんど報告されていない。演者らはこれまでに一般歯科医院の初診患者を対象に、歯周病検査値と唾液中のRed-Complex細菌の検出率および細菌数の関係について報告した。本研究では同一データにて細菌数と骨吸収との関連について解析した。

【材料と方法】 2003～2006年につくばヘルスケア歯科クリニック（茨城県）に初診患者として来院し、選択基準を満たした977名を被検者とした。歯周組織検査を行い、デンタルエックス線写真にて隣接面の歯槽骨頂からセメント-エナメル境までの距離（BCL）を算出した。Red-Complex 3菌種の定量は刺激唾液を採取し、Real-time PCR法を用いて行った。

【結果と考察】 被検者の平均年齢は38.0 ± 10.3歳、平均現在菌数は26.7 ± 2.3本、喫煙者の割合は16.6%であった。0.5mm単位のBCLのふり分け検査により平均3.0mm以上を進行した歯周炎患者と設定すると、その割合は被検者の14.8%であった。菌数を5段階に階層化すると各菌数の増加に伴ってBCLが有意に増加した。さらに多重ロジスティック回帰分析を行ったところ、平均BCLが3mm以上の者の割合は喫煙者で多く、年齢階級、各Red-Complex菌数の増加、および菌数と唾液量の減少とともに上昇した。各説明変数の影響の尤度比検定の結果、*P. gingivalis* (Pg) は他の2菌種や喫煙状況よりも高い尤度比を示した。それらを説明変数とするとROC曲線ではAUCは87.8%となった。

【結論】 多変量解析によって交絡要因を調整すると、唾液中のPgなどの細菌数によって進行した歯周炎患者を判別できる可能性があり、細菌検査の臨床的有用性が示唆された。

O-35

歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis*感染は補体因子C5aを介して関節炎を増悪させる

2203

宗永 修一

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*, 関節リウマチ, C5a

【目的】 歯周炎は歯周病原細菌の感染によって引き起こされる慢性炎症である。関節リウマチ（RA）患者の歯周炎罹患率は高いことが知られている。私どもは*Porphyromonas gingivalis* (Pg) 口腔感染が両疾患を関連付ける要素の一つであることを報告した。本研究ではPg投与RAモデルマウスを用いて、Pg感染とRA増悪に関与する免疫応答因子の中でも補体因子であるC5aに着目し、関節炎増悪メカニズムを解析した。

【材料および方法】 SKGマウスにlaminarin 10mg (LA) 腹腔投与し関節炎を誘導した。Pg W83 10⁸CFUを2%carboxymethyl cellulose含有PBS 50μlに懸濁後、綿球に含ませ3日おきに口腔内に30分間留置した。マウスは、対照群、LA投与群、Pg投与群、PgおよびLA投与群（Pg/LA群）の4群に分け、実験開始6週後に解析した。関節の炎症はArthritis score (AS) で、骨吸収をmicro CTで評価した。C5aの血中量をELISAで、関節組織中のC5a発現を免疫染色法で、肝臓のC5mRNAをqRT-PCR法で定量した。被験マウスの血清中C5aが骨髄由来単球細胞の破骨細胞分化に与える影響を評価した。

【結果と考察】 Pg/LA群でASの有意な上昇、関節の骨吸収像、血清ならびに関節でのC5a量の有意な上昇、肝臓でのC5 mRNA量の有意な上昇が認められた。破骨細胞分化はPg/LA群の血清を用いることで有意に増加し、抗C5a抗体の添加で抑制された。

【結論】 Pg感染がC5aを介して関節炎を増悪させることが示唆された。

O-34

エクソーム解析を用いた日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索

2504

宮内 静香

キーワード：侵襲性歯周炎, 疾患関連遺伝子, SMPD3, 歯根膜細胞

【目的】 侵襲性歯周炎（AP）は家族内集積を特徴とすることから、その発症には遺伝的要因の関与が示唆されている。そのため、炎症性サイトカイン等の一塩基多型（SNP：Single nucleotide polymorphism）が疾患発症要因の一つである可能性が報告されているが、詳細は不明である。本研究では、日本人AP患者のエクソーム解析を行い、日本人APの疾患関連遺伝子探索を行った。

【方法および結果】 大阪大学歯学部附属病院を受診しAPと診断された患者のうち、本研究への参加を応諾された患者44名を対象としたエクソーム解析を実施した結果、APの疾患関連候補遺伝子として、SMPD3のSNP rs145616324 (c.412C>T, p.Leu138Phe)を同定した（大阪大学ヒトゲノム研究承認番号629）。SMPD3ノックアウトマウスで骨格形成が遅延することから、SMPD3は硬組織形成に重要な役割を担っていると考えられる。そこで、ヒト歯根膜細胞（HPDL）の骨芽細胞への分化におけるSMPD3の役割を検討した。HPDLに野生型SMPD3もしくは当該SNPを含む変異型SMPD3を遺伝子導入し、石灰化誘導培地で培養後RNAを抽出し、石灰化関連因子の発現をリアルタイムPCRにより検討した。その結果、野生型SMPD3は石灰化関連因子の発現を上昇させたのに対し、変異型SMPD3導入群では、その発現上昇は認められなかった。

【結論】 エクソーム解析を用いて、日本人APの疾患関連遺伝子としてSMPD3を同定した。また、SNP rs145616324がSMPD3の活性を低下させることにより、歯根膜細胞の骨芽細胞への分化を制御することを見出した。以上のことから、SNP rs145616324によりSMPD3依存性の歯根膜組織の恒常性の維持が破綻をきたし、APが惹起される可能性が示唆された。