

一般演題口演

(B会場・C会場)

B 会 場

O-01~06

O-12~26

C 会 場

O-07~11

5月26日(金) B会場 9:30~10:30, 14:40~16:00
C会場 9:30~10:20
5月27日(土) B会場 10:50~11:20, 14:00~14:40

O-01

実験的歯周炎を惹起したKK-A^yマウスでは、糸球体中のHPGDS発現上昇を介して腎症が増悪する
佐藤 晃平

キーワード：実験的歯周炎モデル, KK-A^y, 2型糖尿病, 糖尿病性腎臓病, HPGDS

【背景】我々は、これまでに2型糖尿病モデルKK-A^yマウスにおける糖尿病性腎臓病(DKD)が、実験的歯周炎によって増悪することを報告してきた(第64回秋季日本歯周病学会学術大会)。今回、腎機能の中心を担う糸球体における病理変化に着目し、歯周病がDKD病態の増悪に寄与する糸球体中の因子の探索を目的に実験を行った。

【方法】13週齢のKK-A^yマウスを用いて、上顎第2臼歯への6-0絹糸結紮による実験的歯周炎を3週間持続させた結紮群と、非結紮群を設定した。対象群としてC57BL/6マウスにも同様に結紮・非結紮群を設定した。各条件のマウスから糸球体分画を単離し、RNA-sequenceやウェスタンブロッティングを行った。

【結果】KK-A^yマウスにおいて、DKDに伴い上昇した糸球体中の線維化関連因子や炎症性サイトカインの遺伝子発現は、非結紮群と比較して結紮群では有意な上昇がみられた。RNA-sequenceにより、造血器型プロスタグランジンD2合成酵素(HPGDS)の遺伝子発現が非結紮C57BL/6マウスと比べて非結紮KK-A^yマウスで約200倍上昇し、結紮KK-A^yマウスでは非結紮KK-A^yマウスよりもさらに約1.7倍増大しており、HPGDSのタンパク発現も同様の傾向を示した。絹糸結紮を1.5週間で解除し、さらに1.5週間治療期間を設けたKK-A^yマウスでは、糸球体のHPGDS発現は非結紮KK-A^yマウスと同等のレベルを示した。

【考察】2型糖尿病モデルKK-A^yマウスにおいて、実験的歯周炎による有意なDKD病態の増悪が起こること、またこの増悪にはHPGDSが関与する可能性が示唆された。

O-03

糖尿病モデルラットにおける実験的歯周炎の治療期の網羅的遺伝子発現解析
中川 佳太

キーワード：歯周炎, 糖尿病, 実験的歯周炎, RNA シークエンス

【背景・目的】糖尿病患者に対する歯周治療の反応性が低下することが報告されているが、その明確なメカニズムは十分に明らかにされていない。そこで2型糖尿病モデルラットを用いて、実験的歯周炎の治療過程における発現遺伝子の網羅的解析を行うことで、糖尿病が歯周組織の治療に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

【材料・方法】レプチン受容体(*fa/fa*)の変異により2型糖尿病モデル動物である雄性8週齢Zucker diabetic fatty (ZDF) ラット、対照群として、高血糖を示さないZucker-lean (ZL) ラットの下顎第2臼歯に40絹糸を1週間結紮した。歯槽骨吸収量の評価をマイクロCTを用いて結紮前、結紮1週間後、結紮除去1日後に行った。また結紮除去1日後に結紮歯の周囲の歯肉を採取し、Total RNA抽出後にRNAシークエンス(RNA-seq)にて遺伝子の網羅的解析を行った。

【結果】ZDF群においてインスリン負荷試験及び経口グルコース負荷試験により、インスリン抵抗性が確認された。また絹糸結紮によりZDF群では有意に骨吸収が増加した。また結紮除去1日後においてZL群では吸収した歯槽骨の部分的な回復が認められたが、一方でZDF群においては吸収した歯槽骨の有意な回復は認められなかった。結紮除去1日後の歯肉におけるRNA-Seq解析の結果、ZDF群においてインスリンシグナルに関与する遺伝子群の低下が認められた。

【考察・結論】2型糖尿病モデルラットにおいて、絹糸除去後の歯槽骨回復の減少が認められた。またRNA-seq解析の結果から、糖尿病は歯肉におけるインスリンシグナルの変化によって、歯周組織の治療遅延を引き起こす可能性が示唆された。

O-02

歯周病による高血糖増悪に対する腸内細菌の多様性及びFXRの関与
富永 翔太郎

キーワード：糖尿病, 高血糖, 腸内細菌

【目的】口腔内細菌の嚥下が、腸内細菌叢の変動を介して糖尿病を悪化させる可能性が報告されているが、その詳細な分子メカニズムは十分に解明されていない。本研究は、消化管へと嚥下された歯周病菌が腸内細菌叢のdysbiosisを引き起こすことで高血糖を増悪させるという作業仮説に基づき、小腸及び肝臓に存在し糖代謝を制御する核内受容体であるFarnesoid X receptor (FXR)の機能発現に対して、歯周病菌の嚥下がどのような影響を及ぼすのかを検討した。

【材料と方法】本研究は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認下で実施した(動歯R-02-24-0)。7週齢の糖尿病マウス(db/db mouse)に対して、 1×10^9 CFUの*Porphyromonas gingivalis* (Pg)を100mlのCMCに懸濁し、3日ごとに30日間経口投与した。経時的な体重及び血糖値測定、糞便の採取を行い、30日後に安楽死させたマウスの腸内細菌の多様性解析と肝臓、小腸におけるFXR関連分子のmRNA及びタンパク発現の変化について解析した。さらに、FXRのアゴニストであるGW4064を投与することによる同上変化に対する影響を検討した。

【結果と考察】糖尿病マウスにPgを投与することで、腸内細菌の多様性の低下に加え、FXRの有意な発現低下、およびその関連分子の変動が認められた。また、GW4064を投与することでPg投与による高血糖状態増悪に対する抑制効果が認められた。

【結論】歯周病が糖尿病における高血糖増悪に及ぼす機序として、肝臓や小腸におけるFXRの機能が関与していることが示唆された。

O-04

マウス歯周炎モデルにおけるCXCR3アンタゴニスト局所投与が歯周組織に与える影響
石井 麻紀子

キーワード：マウス実験的歯周炎, 歯周炎, 歯周治療, CXCR3

【目的】歯周炎は、プラークをはじめとする様々な因子が関与する多因子疾患であるが、約50%に遺伝的要因が関与することが報告されている。これまでのゲノムワイド関連解析では、ケモカインCXCL9および10が歯周炎の発症や進行に関与することが明らかとなっている。そこで本研究は、同ケモカインレセプターであるCXCR3のアンタゴニスト(AMG487)を*P. gingivalis*-lipopolysaccharideを用いたマウス歯周炎モデルに局所投与し、歯周組織に与える影響について検討した。

【材料と方法】マウスを以下の3群に分け、上顎左右第一・第二臼歯間の口蓋側歯肉に溶液を注入した。1) ネガティブコントロール: Tris群(2μl Tris週2回注入), 2) ポジティブコントロール: LPS群(LPS 10mg/mL, 2μl, 週2回注入), 3) LPS+AMG487群(LPS 2μl+0.5 μM AMG487 (5mg/kg, 週1回/隔週注入)。実験開始から1週および6週後にマウス上顎を採取し、マイクロCTにて水平的骨吸収量の測定および組織学的検討を行った。

【結果と考察】LPS+AMG487群では、LPS群と比較し約47%の有意な骨吸収量の減少が認められた。さらに、LPS群では1週群・6週群ともに顕著な炎症性細胞浸潤と破骨細胞が確認されたが、LPS+AMG487群では炎症性細胞浸潤の抑制と破骨細胞数の有意な減少が認められた。以上の結果から、CXCR3受容体-リガンド複合体が歯周炎治療における潜在的な治療標的であり、薬物療法において将来的な臨床応用にAMG487が有用である可能性が示唆された。

O-05

Porphyromonas gingivalis 誘導菌周炎モデルマウスに対するゲニポシド酸の抗炎症効果についての研究

田村 哲也

キーワード：菌周病, ゲニポシド酸, IL-6, 破骨細胞

【目的】植物由来成分は副作用が少なく、抗炎症効果を示すものがある。杜仲に含まれるゲニポシド酸 (GPA) には抗炎症作用がある。しかし、GPA の口腔粘膜への作用は報告されていない。そこで、ヒト歯肉上皮細胞 (HGEC) もしくは *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P.g*) 感染菌周炎モデルマウスに GPA を作用させ、抗炎症効果を検討した。

【材料と方法】HGEC に GPA を作用させ、30分後 *P.g* (33277, ホルマリン固定 10^7 CFU/mL) で刺激し、上清中の IL-6, リン酸化タンパク質を ELISA, mRNA の発現を real-time PCR, TLR2 産生は western blotting で検討した。C57BL/6J マウスに GPA (50mg/50 μ L を 2% CMC に溶解) を作用させ、30分後 *P.g* (10^6 CFU) を週 2 回、6 週間口腔内に投与した。屠殺後歯槽骨吸収、血清 IL-6 産生量、TLR2 産生量を測定した。菌周組織の骨吸収および炎症スコアを測定した。マウス骨髄由来単球系細胞 (BMMCs) を、マウス RANKL 及び M-CSF とともに GPA 存在下で培養し、破骨細胞分化への影響を検討した。

【結果と考察】*P.g* 刺激により、HGEC において IL-6 の mRNA 発現の誘導と TLR2 産生増加が認められたが、GPA 作用によって TLR2 および IL-6 の産生抑制を認めた。そのメカニズムとしては MAPK リン酸化抑制作用が示唆された。*P.g* 感染菌周炎モデルマウスにおける、菌周組織および血清中 IL-6 濃度、歯槽骨吸収率は GPA 投与により抑制された。BMMCs の破骨細胞分化関連遺伝子の mRNA 発現は GPA 濃度依存的に抑制され、破骨細胞数も減少した。以上から、GPA は菌周組織の TLR2 を介した IL-6 産生を抑制すること、および破骨細胞分化を抑制することで菌周炎抑制効果を示すことが示唆された。

O-07

実験的菌周炎—菌周組織再生モデルにおける菌周組織エピゲノム変化の解析

大道寺 美乃

キーワード：菌周組織再生, 実験的菌周炎, エピジェネティクス

【目的】エピジェネティクスは、DNA メチル化による局所クロマチン修飾と、ゲノム立体構造変化に起因する包括的なクロマチンアクセシビリティ領域の変動による、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節機構である。菌周炎においては、臨床サンプルを用いた DNA メチル化解析がなされているものの、クロマチンアクセシビリティの変化はほとんど解明されていない。そこで本研究では、マウス実験的菌周炎—菌周組織再生モデルを用いて、菌周組織破壊期から菌周組織再生期に至る一連の過程における菌周組織エピゲノム変化を解析した。

【材料と方法】マウス上顎臼歯周囲を 14 日間細菌結紮し菌周炎を誘導した。その後、抜糸により最長 28 日間 (菌周組織破壊開始から起算して 42 日目) 菌周組織再生を誘導した。菌周組織破壊開始から起算して 0, 14, 28, 42 日目に菌周組織サンプルを回収した。回収組織をコラゲナーゼ処理により単一細胞化した後に血球系細胞と接着系細胞画分に分離した。各回収日目の各画分において ATAC-seq 用サンプルを調製し、クロマチンアクセシビリティ解析、各オープンクロマチン領域近傍遺伝子座 Gene Ontology 解析を行った。

【結果】菌周組織破壊期から菌周組織再生初期における Rho GTPase と Circadian Clock 関連遺伝子座、さらには全過程における TNF-p65 signal 関連遺伝子座においてクロマチンアクセシビリティが上昇した状態で維持されていた。

【結論】菌周炎及び菌周組織再生における菌周組織構成細胞のエピゲノム変化を解析し再生指向型エピゲノムを同定することで、菌周組織再生に有用な標的の探索や治療効果の予測判定が可能となりうる。

O-06

菌周病の病態形成過程における Annexin A1-FPR2 シグナルの炎症制御機能

村田 真里

キーワード：菌周病, アネキシン A1 (ANXA1), N-ホルミルペプチド受容体 2 (FPR2), 細菌結紮マウス菌周病モデル, ヒト歯根膜細胞 (HDPL)

【目的】菌周病の病態形成過程における歯根膜の炎症反応制御機構を解明するために、我々の研究室ではこれまでに細菌結紮マウス菌周病モデルの歯根膜に発現する分子を網羅的に解析し、非結紮側に比べ結紮側の歯根膜において発現が有意に上昇する分子として ANXA1 を見出した。ANXA1 は FPR2 を介して炎症反応に関与することが知られているが菌周病における ANXA1-FPR2 シグナルの役割は不明である。そこで本研究では、同シグナルの菌周病の病態形成における役割について明らかとすることを目的とした。

【材料と方法】細菌結紮マウス菌周病モデルを用いて、結紮 7 日後の ANXA1 及び FPR2 の発現を組織学的に解析した。また同モデルに FPR2 選択的阻害薬 WRW4 あるいは ANXA1 N 末端模倣ペプチド Ac2-26 を連日投与し、 μ CT 撮影および組織学的解析により菌周組織破壊に及ぼす影響を検討した。一方で HPDL を WRW4 で前処理後、IL-1 β 存在下で HPDL に発現する炎症メディエーターを解析した。また ANXA1 及び FPR2 発現抑制 HPDL を作製し、IL-1 β 存在下での IL-8 及び GM-CSF の産生を解析した。

【結果と考察】細菌結紮 7 日後に歯肉あるいは歯根膜に ANXA1 及び FPR2 の発現上昇を認めた。また WRW4 投与は歯槽骨吸収を有意に亢進する一方、Ac2-26 投与は歯槽骨吸収を抑制した。一方で HPDL における IL-1 β 誘導性の IL-8 及び GM-CSF の産生は WRW4 存在下で有意に亢進し、ANXA1 及び FPR2 発現抑制 HPDL においても IL-1 β 誘導性の IL-8 産生が有意に亢進した。このことは HPDL において ANXA1-FPR2 シグナルが内因性の炎症制御機構として機能することを示唆している。

【結論】ANXA1-FPR2 シグナルは歯根膜の炎症反応制御を介して、菌周病の病態形成を負に制御する役割を担うことが示唆された。

O-08

ビーグル犬における Er:YAG レーザー照射歯根面に対する菌周組織付着の組織学的解析

宮田 和樹

キーワード：Er:YAG レーザー, 上皮性付着, 結合組織性付着, 熱変化層

【目的】近年 Er:YAG レーザーは根面のデブリドメントに応用されている。レーザー照射根面にはわずかな熱変化層を生じるが、臨床的に問題は報告されていない。しかし菌周組織の付着について組織学的には十分に検討されていない。そこで本研究では歯根象牙質面への照射後の菌周組織の付着様式と程度について検討した。

【材料と方法】ビーグル犬 4 頭において全身麻酔下で各 8 歯 (上下顎両側前臼歯) の歯肉弁の切開・剥離を行い、各歯近心根に深さ 6mm の裂開型骨欠損を作製し、根面のセメント質を削除した後、以下の 4 群、(1)SRP, (2)Er:YAG レーザー照射 (Erwin Adverl prototype, モリタ), (3)レーザー照射 + SRP, および (4)レーザー照射 + テトラサイクリン塩酸塩 (TC) 綿球によるポリッシング、のいずれかの処置を行った。その後歯肉弁を復位縫合し、3 か月後に安楽死させた。通法に準じ非脱灰研磨標本を作製し、組織学的観察と歯根面における①欠損長、②上皮性付着長、③結合組織性付着長、④新生骨長、および⑤新生セメント質長について組織形態計測を行った。

【結果と考察】結合組織性付着について、レーザー群は SRP 群と同等で、上皮性付着について有意差はないがレーザー群でやや増大していた。結合組織性付着部位では照射後の熱変化層は吸収され消失していたが、上皮性付着部位では残存していた。照射後の追加の SRP や TC 処理による付着の増加は認められなかった。

【結論】Er:YAG レーザーを根面のデブリドメントに用いた場合、本実験の条件下では照射対象質に対して SRP と同程度の菌周組織付着が得られ、明らかな付着阻害は認められなかった。

O-09

リン酸オクタカルシウム/コラーゲン複合材料の歯周組織再生効果：イヌ1壁性骨欠損モデル

山木 大地

キーワード：リン酸オクタカルシウム/コラーゲン複合材料、骨補填材、歯周組織再生

【目的】歯周炎による歯槽骨吸収に対して、歯周組織再生療法による骨欠損形態の改善が一部では可能となってきた。口腔外科領域ではリン酸オクタカルシウム/コラーゲン複合材料が歯槽骨の骨欠損部に対する骨補填材として使用されているが、歯周組織再生効果に関する報告は未だ存在しない。本研究ではリン酸オクタカルシウム/コラーゲン複合材料の歯周組織再生療法における効果について、イヌ1壁性骨欠損モデルを用いて検討した。

【材料と方法】実験は1歳齢ビーグル雄成犬6頭を用いて行った。下顎両側第3前臼歯を先立って抜歯し、12週の治癒期間の後、第2前臼歯遠心及び第4前臼歯近心にそれぞれ頬舌幅4mm×深さ5mmの1壁性骨欠損を外科的に作製した。骨欠損内には実験群としてリン酸オクタカルシウム/コラーゲン複合材料（OCP/Col；Bonarc®）、対照群として欠損作製のみ（Sham）をそれぞれ無作為に割り付けた。術後8週で標本採取を行なった。その後、デンタルX線、micro-CT画像による形態学的解析、また組織学的解析を行なった（東京医科歯科大学実験動物委員会承認番号 A2021-243C4）。

【結果】2群の全ての部位において術後合併症・治癒不全は認められなかった。micro-CTから得られた二次元、三次元画像上で、両群ともに新生骨形成を認めた。対照群の新生骨形成は限定的であり、軟組織の陥凹が認められた。組織学的解析では新生骨高さ、新生骨高さ割合、新生骨面積に関して実験群は対照群と比較し、有意に良好な結果を示した（ $p < 0.05$ ）。

【結論】本実験の結果から、イヌ1壁性骨欠損モデルにおいてOCP/Colは良好な歯周組織再生効果を示した。

O-11

歯髄の疼痛抑制に対するレゾルビンD2の効果

米田 光宏

キーワード：レゾルビンD2、歯髄疼痛、根面知覚過敏症

【目的】歯は生存率の向上のため、近年では歯髄保存療法が注目されている。我々は、遊離脂肪酸群の一つであるレゾルビンD2（RvD2）が、断髄面での抗炎症作用と硬組織形成作用を報告した（歯科保存学会第156回学術大会）。本研究では、歯髄保存療法におけるRvD2の歯髄疼痛に及ぼす影響を調べ、歯周治療後の根面知覚過敏症への対応などの応用を考察した。

【材料と方法】

1. SD系ラット（8週齢、雄）を用いて上顎第一大臼歯の断髄モデルを作製した。覆髄剤としてRvD2（1, 10 μ g/mL）、水酸化カルシウム製剤（陽性対照）、またはリン酸緩衝生理食塩水（陰性対照）を断髄面に塗布した。4週後に上顎骨を回収して、末梢神経では冷覚や炎症時の痛みを受容するイオンチャネルであるtransient receptor potential ankyrin 1（TRPA1）を酵素免疫組織化学染色で検出した。

2. ラット歯髄培養細胞をlipopolysaccharide（*E. coli*：1 μ g/mL）で刺激し、RvD2（1, 10, 100nM）を添加した。1日と2日後に、TRPA1のタンパク発現を蛍光免疫染色で、遺伝子発現量をRT-PCR法で調べた。

【結果】

1. RvD2を塗布した断髄面の歯髄組織では、TRPA1陽性細胞数が減少した。

2. 歯髄培養細胞では、RvD2存在下でTRPA1陽性細胞数と*Trpa1*遺伝子発現量が減少した。

【考察】RvD2は歯髄組織の疼痛を抑制する可能性がある。これは、根面の知覚過敏症へも応用できるかもしれない。今後は動物モデルにおいて歯髄や露出根面への刺激による行動に変化があるかを調べたい。

O-10

*Porphyromonas gingivalis*由来のLPSによる交感神経系活性化メカニズムの解明

松尾 一朗

キーワード：交感神経系、内毒素（LPS）

【目的】歯周病罹患患者は心拍変動（Heart rate variability；HRV）の異常を示す割合が高いことが疫学的研究により示唆されている。これらの結果から歯周病は交感神経系の異常亢進による全身疾患発症（特に心疾患発症）に関与する可能性が示唆されるが詳細なメカニズムは不明な点が多い。本研究では*Porphyromonas gingivalis*由来リポポリサッカライド（PG-LPS）をマウスに持続投与を行い「PG-LPSの持続的刺激は交感神経系の異常亢進状態を引き起こす」という仮説を立て検証を行った。

【方法】マウス（C57BL6/J、雄性12週齢）を用いてPBS投与群、PG-LPS投与群（0.8mg/kg/day）を作成し1日1回7日間、連続投与を行った。投与開始1週間前にテレメトリ心電図計装置をインフルラン麻酔下にてマウス体内に設置した。1週間投与終了後に24時間HRV解析を実施。その後心臓を摘出し組織学的評価として心筋線維化領域をMasson-trichrome染色、アポトーシス陽性細胞率をTUNEL染色により評価を行った。更にウェスタンブロッティング法による分子生物学的評価も行った。

【結果】1) 24時間HRV解析から交感神経機能の指標であるLF（交感神経成分）/HF（副交感神経成分）値がControl群と比較してLPS投与群で有意に高値を示した。2) 組織学的評価から心筋線維化領域・アポトーシス陽性細胞率はLPS群で有意に増加した。3) ウェスタンブロッティング法による評価から交感神経系活性化の指標であるPKA・CaMKIIのリン酸化レベルは有意に増加した。

【結論】PG-LPSは交感神経系の異常亢進状態を惹起することが示された。併せて心疾患発症メカニズムに関与する可能性も示唆された。

O-12

低出力Er:YAGレーザー照射の血管内皮細胞への影響

竹村 修

キーワード：Er:YAGレーザー、低出力レーザー照射、血管内皮細胞、血管新生

【背景・目的】低出力レーザー照射が創傷治癒を促進することが知られているが、その機序は不明な点が多い。本研究は低出力Er:YAGレーザー照射が血管新生に及ぼす影響について検討することを目的とした。

【材料・方法】ヒト臍帯静脈内皮細胞（Human umbilical vein endothelial cells: HUVEC）に対してEr:YAGレーザーを1.5J/cm²でDefocus照射を行った。照射後に細胞増殖能をcell counting assayを用いて評価した。また血管新生を評価するために血管内皮細胞増殖因子（VEGF）のmRNA発現をリアルタイムPCR法にて、培養上清中のタンパク濃度をELISA法にて定量し、tube formation assayを行った。さらにレーザー照射前にCa²⁺チャネルであるtransient receptor potential vanilloid 1（TRPV1）の選択的阻害薬のcapsazepine（CPZ）を添加し、同様の実験を行った。

【結果】レーザー照射群は非照射群と比較して、細胞増殖能が有意に促進された。VEGFの発現量は、mRNAとタンパク質の両者においてレーザー照射群で有意に増加した。さらにtube formation assayより血管新生の有意な促進が観察された。またCPZを添加してレーザー照射した群では、未処理のレーザー照射群と比較してVEGFの培養上清中のタンパク濃度が有意に抑制された。

【結論】低出力Er:YAGレーザー照射は、HUVECの増殖能と血管新生を促進させ、TRPV1が関与していることが明らかとなった。

O-13

*Porphyromonas gingivalis*由来LPSによる高血糖状態でのメサンギウム細胞の線維化への影響

坂庭 愛理

キーワード：糖尿病性腎症、高血糖、メサンギウム細胞

【背景・目的】歯周病は、糖尿病の主要な合併症の一つである糖尿病性腎症のリスク因子であることが知られている。本研究では糖尿病性腎症と歯周病の関連機序を明らかにするため、高血糖状態で培養した糸球体構成細胞であるメサンギウム細胞の線維化に対して、歯周病が与える影響を解析することを目的とした。

【材料・方法】C57BL/6J×SJL/Jの4週齢マウスの糸球体から採取したメサンギウム細胞を使用した。通常培地（グルコース濃度5mM）と高血糖培地（25mM）にて24時間培養を行ったメサンギウム細胞に *Porphyromonas gingivalis* (Pg) 菌 ATCC33277株から抽出した Lipopolysaccharide (LPS) 100ng/ml, 1000ng/ml を添加した。Pg菌由来 LPS 刺激の後、炎症性マーカーとして interleukin (IL)-6 の mRNA 発現を、線維化の経路を検索するマーカーとして bone morphogenetic protein (BMP) 4, transforming growth factor (TGF)- β 1 の mRNA 発現をリアルタイムPCR法にて定量した。

【結果】高血糖培地で培養したメサンギウム細胞において、Pg菌由来 LPS 100ng/ml, 1000ng/ml 刺激により IL-6 の mRNA 発現が有意に上昇した。さらに、TGF- β 1 の mRNA 発現が有意に上昇した一方で、BMP4 の発現には有意な影響は与えなかった。

【考察・結論】高血糖状態のメサンギウム細胞においてPg菌由来LPSは炎症を亢進させた。高血糖状態におけるメサンギウム細胞の線維化にはTGF- β を介する経路とBMP4を介する経路が知られているが、本研究よりPg菌由来LPSはTGF- β の亢進を介してメサンギウム細胞の形質転換を促進し、糸球体基底膜の線維化を促進していることが示唆された。

O-15

ヒト歯肉上皮細胞株Ca9-22細胞の上皮バリア機能に及ぼすAGEsの影響

市川 理沙

キーワード：終末糖化産物、CLDN、タイトジャンクション

【目的】我が国では、いくつかの疫学調査で糖尿病患者における歯周病重症度が有意に高いことが示されている。また、1970～2003年までの報告を調査したメタ解析でも同様な見解が得られている。そこで演者らは、糖尿病患者の血中で検出される終末糖化産物（Advanced Glycation Endproducts: AGEs）が歯肉上皮のバリアを破壊し、歯周病原菌が歯周組織に侵襲を加えることが、糖尿病患者における歯周病の重症化の要因の一つではないかと考え、本研究を企図した。具体的には、歯肉上皮癌由来細胞（Ca9-22）をAGEsで刺激して、細胞間結合様式の1つであるタイトジャンクションを形成する主要なタンパク質Claudin (CLDN) およびOccludin (OCLDN) の遺伝子発現に及ぼすAGEsの影響を調べた。

【材料および方法】Ca9-22細胞を60mm dishに 4.0×10^4 cells/cm²の密度で播種し、AGEs（50 μ g/ml, および100 μ g/ml）を添加し培養した。培養3, 7, 10および14日目それぞれ細胞を回収しRNAを抽出した後、CLDN1, CLDN3, CLDN4, CLDN5およびOCLDNの遺伝子発現をreal-time PCR法を用いて調べた。

【結果】培養14日目において、50または100 μ g/ml AGEs添加群は、非添加群と比較して、CLDN1, 3, 4, 5およびOCLDNの遺伝子発現の有意な低下が認められた。

【結論】AGEsは歯肉上皮のタイトジャンクションの形成を低下させることで、歯肉上皮のバリア機能を破壊する可能性が示唆された。

O-14

血管内皮細胞におけるインスリン抵抗性は、インスリン作用によるPI3K-Akt-FoxO1経路を介した炎症誘導性VCAM-1発現を破綻させることで歯周炎の増悪に寄与する

瀬々 起剛

キーワード：血管内皮細胞、糖尿病関連歯周炎、VCAM-1、FoxO1

【目的】我々は、これまでに血管内皮細胞のインスリン作用は、PI3K-Akt経路活性化を介して炎症誘導性のVCAM-1発現を抑制的に制御し、インスリン抵抗性状態ではその制御が破綻するために歯周炎が増悪することを報告した（第64回秋季歯周病学会）。一方、PI3K-Akt経路のどの下流分子が炎症下でのVCAM-1発現制御に関与し、歯周炎増悪に寄与するかは明らかでない。そこで、Aktの下流分子であるFoxO1に注目し、検討を重ねた。

【材料】通常血糖（5.5mM:LG）・高血糖（25mM:HG）処理したマウス血管内皮細胞株（TKD2）、血管内皮細胞特異的インスリン受容体欠損（KO）マウスと同腹仔野生型（WT）マウスより単離した肺胞内皮細胞、およびFoxO1とインスリン刺激によるリン酸化部位を不活性化した変異型FoxO1を過剰発現させたTKD2細胞を用いて、インスリン刺激によるAktおよびFoxO1リン酸化、炎症誘導性VCAM-1発現、ならびにヒト単球細胞株THP-1との細胞接着に及ぼす影響を検討した。

【結果】HG処理TKD2、KOマウスの肺胞内皮細胞、変異型FoxO1過剰発現したTKD2では、LG処理TKD2、WTマウスの肺胞内皮細胞、FoxO1過剰発現したTKD2と比較して、インスリン刺激によるAktおよびFoxO1リン酸化が有意に低下し、炎症誘導性VCAM-1発現の抑制が解除され、THP-1との接着が増大した。

【考察】血管内皮細胞におけるインスリン刺激による炎症誘導性VCAM-1発現抑制は、PI3K-Akt-FoxO1経路を介することが明らかとなった。

O-16

歯周炎組織においてADAM17が破骨細胞分化に与える影響

本行 令奈

キーワード：Notchシグナル、ADAM17、破骨細胞

【目的】歯周病は、細菌感染に起因する一連の免疫応答によって、破骨細胞が歯槽骨を吸収する疾患である。破骨細胞の分化にはNotchシグナル伝達経路とその活性化物質のA Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 10と17の関与が報告されているが、その関与の詳細は不明である。我々は、ADAM17によるNotchシグナル伝達経路の活性化が、破骨細胞の分化の極初期に生じることを*in vitro*で示している（第155回日本歯科保存学会）。今回は、歯周炎組織中でADAM17と破骨細胞分化の関連を検討した（承認番号：OKU-2021866）。

【材料と方法】12週齢の雄性C57BL/6Jマウスの上顎第二大臼歯に5-0絹糸を結紮し、歯周炎モデルを作製した。炎症部の口蓋側歯肉にKP-457 (ADAM 17 inhibitor) を投与し、4日後に歯肉を採取して、破骨細胞関連遺伝子である nuclear factor of activated T cells 1 (*Nfatc1*) と tartrate-resistant acid phosphatase (*Trap*) の発現量をRT-PCR法で定量した。組織切片をTRAP染色して陽性細胞数を計測した。対照群（溶媒のみ）と比較して、One-way ANOVAとTukey-Kramer法で統計解析を行った。

【結果と考察】

KP-457投与群では対照群と比較して、

・遺伝子発現量は、*Nfatc1*が有意に減少し、*Trap*が減少傾向だった。

・TRAP陽性細胞数は、有意に減少した。

本結果から、歯周炎組織中でADAM17は破骨細胞の分化を促進する可能性がある。

O-17

Porphyromonas gingivalis LPSとメカニカルストレスによる骨吸収におけるPiezo1の関与

内沼 真吹

キーワード：Piezo1, メカニカルストレス, 歯周炎

【目的】歯周炎の存在下で外傷性咬合が加わると、歯槽骨吸収が急速に進行することが知られているが、その分子メカニズムには未だ不明な点が多い。本研究では機械刺激受容性カルシウムイオンチャネルPiezo1に注目し、*Porphyromonas gingivalis*由来LPS (*P.g*-LPS)存在下で培養した細胞にメカニカルストレスを負荷した際のRANKL/OPG比の変化に対するPiezo1の関与を検討した。

【材料と方法】マウス骨芽細胞様細胞MC3T3-E1を*P.g*-LPS (1 μ g/mL)を添加した培地で3日間培養後、小型卓上振とう機を用いて流水せん断応力を負荷した。次に、培地にPiezo1アンタゴニストGsMTx4添加またはPiezo1 siRNAを導入した細胞に同条件でメカニカルストレスを負荷した。Piezo1, RanklおよびOpg mRNA発現量をリアルタイムRT-PCRにより定量的に評価した。

【結果と考察】*P.g*-LPS添加、メカニカルストレス負荷によりPiezo1 mRNA発現量の有意な変化はみられなかったが、RANKL/OPG比は*P.g*-LPS添加により有意に上昇し、メカニカルストレスを加えると、*P.g*-LPS単独と比較して更なる上昇がみられた。一方で、このRANKL/OPG比の上昇は、GsMTx4添加またはPiezo1 siRNA導入によって有意に抑制された。以上より、Piezo1は*P.g*-LPS存在下でMC3T3-E1にメカニカルストレスを負荷した際のRANKL/OPG比の上昇に関与していることが示唆された。

O-18

扁平上皮癌におけるLPS誘導オートファジーの役割

土持 那菜子

キーワード：歯周病原菌, 扁平上皮癌, オートファジー

【目的】癌細胞はオートファジーを利用し、抗がん剤への治療抵抗性を示している。また、歯周病に罹患している口腔癌患者は癌悪性度が高いことが示唆されている。しかしながら、歯周病と癌の関連性については明らかにされていない。本研究では、歯周病原菌*P.g*-LPSに着目し、LPS誘導オートファジーの扁平上皮癌での役割を検索した。

【材料と方法】HSC細胞 (Human oral squamous carcinoma-3, ヒト口腔扁平上皮癌)を*P.g*-LPSで刺激した。刺激細胞でのオートファジー誘導はWestern Blotting (WB) 法および免疫染色 (LCC) によるLC3およびGABARAPの発現で確認した。TLR4経路の関与は、scratch assay法によるHSC-3細胞遊走で評価をした。

【結果と考察】WBおよび免疫染色から、LPS濃度依存的にオートファジー・マーカーGABARAPおよびLC3-IIの発現が亢進した。これらの発現はオートファジー阻害剤である5mM NAC (抗酸化物質)の作用により減弱した。scratch assayによる遊走性はLPS刺激群で最も強かった。この結果は、LPSはオートファジーを亢進し、癌細胞の活性化に関与すると考えられた。LPS刺激群とオートファジー抑制群 (LPS+NAC) でのTLR4経路を検索すると、TLR4下流のMyD88およびpSTAT3の発現が抑制群と比較してLPS刺激で有意に亢進した。

【結論】歯周病原菌*P.g*-LPSによる刺激はオートファジーを介したTLR4経路により扁平上皮癌を活性化させる可能性が示唆された。

O-19

Lysosome-mitochondria interactions mediate mineralization

Phan Bhongsatiern

Keywords: Bone mineralization, Matrix vesicle, Lysosome, Organelle isolation

Mineralization is the fundamental process in formation of hard tissue such as bone and cementum. During the initial stage, it is essential for hard tissue-forming cells to secrete matrix vesicles (MVs). Previously, we have shown that MVs were formed in lysosomes in mineralizing osteoblasts and secreted to the extracellular matrix *in vitro*. This finding suggests that lysosomes play a crucial role in MV formation and trafficking in osteoblasts. To clarify the molecular mechanism, we aimed to analyze osteoblastic lysosomes. We applied lysosome immunopurification (LysoIP) to efficiently and rapidly isolate lysosomes from osteoblasts. Lysosome enrichment was validated by immunoblot and β -hexosaminidase assay. Whole-cell lysates and isolated lysosomes were obtained from mineralizing osteoblasts. Differential expression analysis of shotgun proteomic data of these samples showed upregulated lysosome-specific proteins in isolated lysosomes, as compared to whole cell lysates. 718 proteins were enriched in osteogenic lysosomes, as compared to wild-type lysosomes. Collagens and exosome-associated proteins were most significantly enriched, together with other proteins with unknown functions. Further, GO term analysis revealed that most proteins are mitochondria-associated. These results suggest that interactions between lysosomes and mitochondria play a role in MV-mediated mineralization.

O-20

ハブラシコンセイエ®の認定と病院職員の意識の向上

青山 典生

キーワード：口腔衛生, 口腔ケア, ハブラシコンセイエ

【背景】歯周病をはじめとする口腔疾患の予防の基本は口腔清掃である。口腔清掃のためさまざまな用品が市販され、開発と改良が進められている。一方、歯科臨床に携わるスタッフの清掃用品に対する知識の深さは、個人の意識にゆだねられる部分が多い。神奈川歯科大学附属病院では2020年から口腔清掃用品への一定の理解を有する職員に対し、「ハブラシコンセイエ®」の認定を開始した。この認定制度が病院職員の意識に変化をもたらしたかを評価する目的で、本調査を実施した。

【方法】2021年までに神奈川歯科大学附属病院ハブラシコンセイエ®登用試験を受けて合格した診療に携わる病院職員を対象とし、2022年10月にオンライン無記名アンケートにて口腔清掃に関する意識の変化などを調査した。また、患者さんに適切な清掃用品を指定するための新書式「口腔ケアお勧め処方箋」の使用状況を調査した。なお、本研究は倫理審査の必要はないことを、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会に確認済みである。

【結果】ハブラシコンセイエ® 80名から回答を得た。本認定により清掃用品への意識が向上したという回答は全体の83%、自身の知識の向上につながったという回答が85%、本制度は病院職員に対する教育効果があるという回答が63%認められた。口腔ケアお勧め処方箋の使用は開始時から増加傾向にあり、2022年1-9月の平均は262枚/月であった。同処方箋は便利だという回答は74%であった。

【結論】ハブラシコンセイエ®の認定にともない、病院職員の口腔清掃用品に対する意識の向上が認められた。本制度により、職員の知識や意欲の増進につながった可能性がある。

O-21

長崎県五島市住民を対象とした唾液中の *Porphyromonas gingivalis* レベルとヘモグロビンA1c値の関連についての横断的研究

大平 真之

キーワード：歯周病, 糖尿病, *Porphyromonas gingivalis*, HbA1c
【目的】 歯周病が血糖コントロールに影響を及ぼすメカニズムについて多くの研究がある。歯周病により産生されたTNF- α 等がインスリン抵抗性を増加させること、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* がインスリン分泌を阻害すること、歯周病による咀嚼機能の低下により食生活が変化することなどが報告されているが、詳細は不明な点も多い。本研究では、長崎県五島市住民の健診検査結果から、糖尿病と関連する項目について検討した。

【対象と方法】 長崎県五島市で、平成29年度に実施した健診結果から、全身の所見として、性別、年齢、肥満度指数 (BMI)、運動習慣、HbA1c値を記録した。歯科の所見として、プロービング値、アタッチメントレベル、プロービング時の出血、Debris Index, Calculus Index, 現在歯数、機能的咬合単位を測定した。受診者から唾液を採取し、リアルタイムPCR法にて *P. gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の菌量を測定した。これらの検査項目とHbA1c値との関連を統計学的に解析した。

【結果】 二変量分析において、性別、年齢、BMI、機能的咬合単位、唾液 *P. gingivalis* レベル、プロービング値とHbA1cの間に有意な関連が認められた。重回帰分析の結果、年齢、BMI、唾液中の *P. gingivalis* レベルとHbA1c値の間に有意な関連がみられたが、他の項目との関連はみられなかった。

【考察】 唾液中の *P. gingivalis* レベルが一定値を超えると糖尿病の病態へ影響を及ぼす可能性が示された。

O-23

rhFGF-2製剤と脱タンパクウシ骨ミネラルを併用した歯周組織再生療法：ランダム化比較試験術後4年の臨床成績

勢島 典

キーワード：歯周組織再生療法, rhFGF-2, 脱タンパクウシ骨ミネラル

【目的】 本研究の目的は、歯周炎患者の垂直性骨欠損に対し、rhFGF-2製剤単独と脱タンパクウシ骨ミネラル (DBBM) を併用した歯周組織再生療法の効果に関するランダム化比較試験の術後4年の臨床成績を評価することである。

【材料と方法】 歯周基本治療後に、深さ3mm以上の垂直性骨欠損を有する者を対象とした。rhFGF-2製剤単独 (対照群), rhFGF-2製剤+DBBM (実験群) をランダムに割り当てた。術後4年までの歯周パラメーターとエックス線画像上での骨欠損改善率 (RBF)、口腔関連QOLの評価を行なった。本研究は、本学倫理審査委員会の承認 (No.747) を受け、インフォームドコンセントを得て行なった。

【結果と考察】 実験群、対照群あわせて32部位を解析対象とした。術後4年で両群ともにベースライン時と比較して、臨床的アタッチメントレベル (CAL) およびプロービングポケットデプスに有意な改善が認められた。CALゲインは実験群で 3.5 ± 1.4 mm, 対照群で 2.7 ± 1.4 mmであり、群間に有意差は認められなかった。RBFは時間の経過とともに増加を示した。術後4年でのRBFは実験群で62%, 対照群で42%であり、実験群で有意に高い値が認められた。また、1-2壁性の骨欠損では実験群で対照群より有意に高い値を示した。口腔関連QOLは、基本治療終了後と比較し術後4年で両群ともに改善傾向を示したが、各タイムポイントにおける群間差は認められなかった。

【結論】 rhFGF-2製剤を用いた垂直性骨欠損への歯周組織再生療法は、DBBM併用の有無に関わらず、術後4年でCALゲインの値に有意差は認められなかったが、併用療法は有意に高いRBFを示した。実験群対照群ともに、臨床成績および口腔関連QOLの良好な結果が、少なくとも4年間は持続することが示唆された。

O-22

全身性疾患への影響を考慮した新たな歯周病重症度検査項目の策定～学会主導型多施設臨床研究～ 第二報

松田 真司

キーワード：PISA, 多施設臨床研究, IL6, 歯周病原細菌血清抗体価
【目的】 歯周病は多くの全身疾患の増悪リスクであるが、どの歯周疾患検査項目が全身疾患への影響の評価に適しているか検討が必要である。第64回秋季学術大会で、初診時のPISA値がIL6値に影響しており、歯周基本治療でIL6値が減少することを報告した。この度、歯周病原細菌の血清抗体価を用いて、感染の影響を加えて評価した。

【方法】 研究対象者は、20歳以上の歯周炎患者で、20本以上残存歯がある者を選定した。初診時、及び基本治療後のPISA値、咀嚼能率値、血清抗体価、血清IL6値、高感度 (Hs) CRP値を用いて、全身炎症検査値と歯周疾患検査項目の関係、および歯周治療の効果を評価した。歯周治療の効果は、PISA減少幅の中央値で分け、低効果群、高効果群として評価した。

【結果】 初診時のPISA値はPg血清抗体価と有意に関連していた ($p < 0.01$)。単変量解析および多変量解析で、初診時の血清IL6値とPISA値が正の関連を持つことが示されたが ($p < 0.05$)、咀嚼能率値や血清抗体価と血清IL6値には関連が認められなかった。歯周治療の効果と各検査値との関連を多変量分散分析で評価した結果、高効果群においてIL6値が有意に減少したが ($p < 0.05$)、HsCRPと血清抗体価は治療前後で差がなかった。また、IL6値の減少と関連する要因を反復測定分析を用いて解析した結果、PISA値の減少量がIL6値の減少と強い関連を持つことが分かった ($p < 0.05$)。

【結論】 本研究の結果から、PISA値とIL6値に正の相関があり、歯周基本治療によるPISA値の減少はIL6値減少と密接に関連することが見出された。このことは、PISA値が全身炎症の評価に有用な検査項目であることを示唆する。

O-24

rhFGF-2製剤と炭酸アパタイトを併用した歯周組織再生療法の臨床成績：ランダム化比較試験による術後12ヶ月での検討

今村 健太郎

キーワード：歯周組織再生療法, 塩基性線維芽細胞増殖因子, 炭酸アパタイト

【目的】 本研究の目的は、歯周炎患者の垂直性骨欠損に対する塩基性線維芽細胞増殖因子 (rhFGF-2) 製剤単独と炭酸アパタイト (CO₃Ap) を併用した歯周組織再生療法の臨床成績をランダム化比較試験にて評価することである。

【材料と方法】 中等度～重度歯周炎患者のうち、歯周基本治療後の再評価で、深さ3mm以上の垂直性骨欠損を有する者を対象とした。rhFGF-2製剤+CO₃Ap (実験群), rhFGF-2製剤単独 (対照群) をランダムに割り当てた。術後6, 12ヶ月時点で、臨床パラメーターの評価を行った。本研究は、本学倫理審査委員会の承認 (No. 997) を受け、患者にインフォームドコンセントを得て行った。

【結果と考察】 ベースラインにおける臨床的アタッチメントレベル (CAL) および骨欠損深さはそれぞれ、実験群で 7.4 ± 1.6 mm, 5.3 ± 1.9 mm, 対照群で 7.3 ± 1.6 mm, 5.0 ± 1.5 mmであり、有意差は認められなかった。実験群と対照群の各24部位に手術を行った。特記すべき有害事象はみられなかった。術後6, 12ヶ月で両群ともにベースラインよりCALおよびプロービングデプスに有意な改善が認められた。術後12ヶ月においてCALゲイン (主要評価項目) は実験群で 3.3 ± 1.4 mm, 対照群で 3.3 ± 1.0 mmであり、群間で有意な差は認められなかった。

【結論】 今回の被験者においては、rhFGF-2製剤を用いた再生療法は、CO₃Ap併用の有無にかかわらず、ベースラインと比較して臨床的な改善を示した。今後、更に詳細かつ長期間の評価を行う予定である。

O-25

腸内細菌の多様性が低いと歯周病の状態が悪化している

谷口 健太郎

キーワード：腸内細菌，次世代シーケンサー

【目的】これまで腸内細菌叢のディスバイオーシスが病理学的変化を誘導することで様々な全身疾患に影響することが分かっている。また口腔疾病である歯周病とも関連していることが示されてきている。近年、細菌検査手法も発達し詳細な細菌叢の検査が可能になっている。本研究の目的は腸内細菌叢と臨床的な歯周病状態との関連を明らかにすることである。

【方法】被験者は、2018年から2021年まで、神奈川歯科大学附属病院・医科歯科連携センターを受診し、説明と同意が得られた患者179名(平均年齢65.9歳、女性112名、男性67名)を対象とした。本研究は、神奈川歯科大学研究倫理審査委員会に承認を受け、実施された(第801番)。口腔検査として臨床歯周病検査(PISA, PESA, 菌数)を行った。腸内細菌叢は、検便をサンプルとし、次世代シーケンサーを用いた16S rRNA アンプリコンシーケンス解析を用いて評価した。臨床歯周病検査と腸内細菌叢との関連について分析した。

【結果と考察】解析結果から、腸内細菌の多様性が高いと血清中の*p.gingivalis*抗体価、PESAともに低くなることがわかった。腸内細菌の多様性を2群に分け評価したところ、多様性が低い群ではPISAの値が高いことが分かった。PISAと特定の腸内細菌群についても相関がみられた。また、糖尿病の臨床指標であるHbA1cを2群にわけ評価したところHbA1cが高い群で腸内細菌叢から検出される*Fusobacteria*が多いことが分かった。今後、腸内細菌の詳細な菌群と歯周病、全身疾患との関連性についてさらに調査を進めていきたいと考えている。

O-26

歯肉溝滲出液中バイオマーカーとPISAに基づく歯周病態に準じた客観的評価

清水 雄太

キーワード：歯肉溝滲出液，PISA，サイトカイン

【背景と目的】ヒト歯肉溝滲出液(GCF)は、組織破壊因子や炎症性サイトカインなどの生理活性物質を含有しており、歯周病検査の診断材料の一つとして注目されている。また、PISAは歯周病の炎症面積を定量的に評価できる注目すべき指標である。そこで、本研究では歯周病新分類の病態(ステージ)ごとにGCF量、総タンパク質量、発現因子とPISA、BOP率といった臨床プロファイルとの相関性を評価し、GCF検査による歯周病態スクリーニングの有用性を明らかにする。

【方法】朝日大学医科歯科医療センターを受診した慢性歯周炎患者約100名を総被験者とし、初診時エックス線写真と歯周組織検査からステージ分類した。GCF量を測定後、150μlのPBS中に浸漬、攪拌、遠心した。各ステージごとにGCF中の成分を溶出させ、総タンパク質量およびメンブレン抗体アレイ、ELISAによるサイトカイン発現を評価した。また、PISA、BOP率との相関関係も評価した(朝日大学倫理委員会承認番号34001)。

【結果と考察】歯周病のステージIからIVへと重症化するにつれ、GCF量および総タンパク質量が増加し、組織破壊因子であるMMP-9の発現もステージIIとIIIを境に亢進した。さらに、GCF量、総タンパク質量、PISAおよびBOP率それぞれを比較した際、正の相関関係を示した。本研究から、GCFパラメータを評価することにより各ステージごとの客観的評価に対応できる可能性が示唆された。今後は、他の組織破壊因子との比較や治療に伴うGCFパラメータの変化について検討を行う予定である。