

歯周炎発症メカニズム研究 - 実験的歯周炎モデルの確立 -

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病学分野¹⁾

花王株式会社 パーソナルヘルスケア研究所²⁾

○吉永泰周¹⁾, 藏本明子¹⁾, 鶴飼孝¹⁾, 金子高士¹⁾, 中村弘隆¹⁾, 白石千秋¹⁾, 小野山美穂¹⁾, 市村育久²⁾, 押野一志²⁾, 原宜興¹⁾

A study on the onset mechanism of periodontitis -Establishment of experimental periodontitis-

Department of Periodontology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences¹⁾

Global R&D - Personal Health Care, Kao Corporation²⁾

○YOSHINAGA Yasunori¹⁾, KURAMOTO Akiko¹⁾, UKAI Takashi¹⁾, KANEKO Takashi¹⁾, NAKAMURA Hiroataka¹⁾, SHIRAIISHI Chiaki¹⁾, ONOYAMA Miho¹⁾, ICHIMURA Ikuhisa²⁾, OSHINO Kazushi²⁾, HARA Yoshitaka¹⁾

【研究目的】

歯周炎は歯周ポケット形成と歯槽骨吸収を特徴とする炎症性疾患であり、発症には細菌と免疫系が関与するとされている。これまで実験的に歯周組織の破壊を誘導した報告は、歯頸部を絹糸などで結紮する方法のみである。しかし、この方法は外傷を与えて炎症と組織破壊を誘導したもので、細菌と免疫系の関与は薄く、通常の歯周炎発症メカニズムとは異なると考えられる。細菌と免疫系が関与する実験的歯周炎モデルを確立することができれば、歯周炎の発症のメカニズム解明や発症の予防も可能になるものと思われる。今回われわれは、細菌菌体成分であるリポ多糖 (LPS) で腹腔免疫しておいたラットの歯肉溝に LPS を滴下し、歯周ポケット形成 (アタッチメントロス) と歯槽骨吸収が誘導された実験的歯周炎モデルを確立したので、報告する。

【材料および方法】

- 1) **実験的歯周炎モデルの作製**: 50 匹の雄性Lewis系ラットを2つのグループに分けた。一方の群は、*E. coli*由来LPSを Freund's complete adjuvant とともに腹腔内投与し、28日後に再度LPSを Freund's incomplete adjuvant とともに腹腔内投与を行い、感作群とした。もう一方の群には、PBSのみを腹腔内に2度投与してこれを非感作群とした。両群ともに2回目の腹腔内投与後、上顎両側第一臼歯の口蓋側歯肉溝にLPS (50mg/ml)を30分間 (5分おきに3ulずつ)、24時間毎に滴下した。0、5、10、20、30日間滴下した24時間後に、両群のラットを屠殺して上顎骨を摘出し、AmEx法を用いてパラフィン包埋を行い、病理組織標本作製して光学顕微鏡的観察を行った。
- 2) **血清抗体価の測定**: LPS感作の状態を確認するために、0、5、10、20、30日間LPSを滴下し、24時間後に各ラットの眼窩下静脈から血液を採取、血清を分離し、ELISA法により*E. coli*LPSに対するIgG抗体価を測定した。
- 3) **形態学的評価**: HE染色を行った切片を用いて、アタッチメントロスすなわちセメント・エナメル境 (CEJ) から根面に接した接合上皮 (JE) の歯冠側端までの距離をPCソフトImageJにて測定した。そのほかにも、JE周囲結合組織またはJE内へ浸潤した炎症性細胞数、JEの根尖側移動距離すなわちCEJから根面に接したJEの根尖側端までの距離を計測し、感作群と非感作群を比較した。

【結果】

血清抗体価は、非感作群では20日目においてわずかな上昇が観察された。一方感作群では、5日目にはすでに上昇しており、その後も上昇した値は維持されていた。

JE内やJE周囲の結合組織へ浸潤した炎症性細胞数、およびJEの根尖側移動距離は感作群の方が非感作群と比較して有意に高かった。さらに歯周ポケット形成においても、感作群では10日目に形成され、アタッチメントロスが徐々に大きくなっていくのに対し、非感作群では10日目には形成されておらず、20日目以降にわずかに形成されていた。また感作群の30日では明らかな破骨細胞性の歯槽骨吸収が観察された。

【結論および考察】

今回の実験結果より、LPSによる全身的な感作は局所的歯周ポケット形成と歯槽骨吸収を促進することが示された。抗体価が上昇している感作群では、T・B細胞系の活性化が起こっており、また非感作群と同量のLPS滴下でもLPSと抗体による免疫複合体が形成されやすくなっていると考えられる。このような状況下における歯周ポケット形成や歯槽骨吸収のメカニズムを解析することは、歯周炎の発症メカニズムの解明やその予防法の確立に有用と思われる。

炎症抑制効果を有するエナメルタンパクの成分

鶴見大学歯学部第二歯科保存学教室
○山口 貴央 白川 哲 長野 孝俊 五味 一博 新井 高

Anti-inflammatory Property Components in Enamel Proteins
Department of Periodontics and Endodontics, School of Dental Medicine, Tsurumi University
○Yamaguchi Takao, Shirakawa Satoshi, Nagano Takatoshi, Gomi Kazuhiro, Arai Takashi

【目的】

エムドゲイン®ゲルを用いた歯周組織再生療法は、術後の炎症反応が弱く治癒機転も良好である。そのため、エムドゲイン®ゲルに炎症の抑制に有効な成分が含まれると考えられる。我々は LPS で刺激したヒト歯肉線維芽細胞(hGF)の培養系に、ブタ歯胚基質形成期エナメル質から抽出したタンパク抽出物(EMD)を添加し、炎症性反応が抑制されることを確認した。しかしながら、EMD は複数のタンパク質とその分解産物から構成されるため、効果を有する成分は明らかとなっていない。そこで、多成分系の EMD を分画・精製して hGF の培養系に添加し、炎症性反応を指標として効果を有する成分を検討した。

【材料および方法】

〔エナメルタンパクの抽出と精製〕ブタ下顎骨から摘出した永久切歯歯胚から基質形成期エナメル質を採取した。これを 50mM 炭酸緩衝液(pH 10.8) 中でホモジナイズしてエナメルタンパクを可溶化して分離し、エナメルタンパク粗抽出物を得た。この粗抽出物を 50mM 炭酸緩衝液(pH 10.8) 中でゲル濾過 HPLC を行い分画した。各画分は限外濾過を行い、濃縮・脱塩して凍結乾燥し、各画分の試料とした。そのうち、抑制効果を示した画分を 4M グアニジン溶液(pH 7.4)中でゲル濾過 HPLC を行い精製した。

〔細胞培養〕鶴見大学歯学部倫理委員会の規定に基づき、本実験の趣旨に同意の得られた患者の抜歯時に歯肉組織を採取して培養し、out growth した細胞をヒト歯肉線維芽細胞(hGF)として使用した。hGF は 10%FBS、2%Pn-St 含有 α -MEM を用いて 37°C、5% CO₂ の環境下で 2 日おきに新鮮な培地に交換してコンフルエントになるまで培養した。コンフルエントになったところで血清無添加の培地に交換して 24 時間経過後にプレインキュベートした各試料(LPS:10 μ g/ml, エナメルタンパク抽出物:50、100 μ g/ml)を加えて培養し、IL-6、IL-8、COX2 の遺伝子発現を RT-PCR 法で、また NF- κ B とそのリン酸化の状態をウエスタンブロット法で調べた。

〔エナメルタンパクの検出〕LPS による hGF の炎症性反応を抑制したエナメルタンパク画分の構成タンパクを明らかにするために、これらの画分についてアミノ酸配列解析、質量分析、ウエスタンブロット法を行った。

【結果】

培地への LPS 添加により、IL-6、IL-8、COX2 の遺伝子発現の増強と NF- κ B のリン酸化が亢進した。この実験系にエナメルタンパク粗抽出物を添加するとこれらの反応が抑制された。エナメルタンパク粗抽出物の分画のうち、特定の画分に同様の効果が観察されたことから、さらに分画して検討した。その結果、エナメルタンパクの 17kDa から 13kDa のタンパクが多く溶出していると考えられる画分に抑制効果が観察された。この画分の構成成分を分析したところ、アメロゲンとシーспロテインを検出した。

【考察】

エナメルタンパク粗抽出物の添加により炎症性反応の抑制が観察された。エナメルタンパク粗抽出物を分画して同様に調べると、画分ごとに炎症性反応抑制効果に違いが生じた。炎症性反応抑制の傾向と画分ごとのアメロゲンおよびシーспロテインの増減を比較すると、シーспロテインの増減に一致した炎症性反応の抑制を認めた。このことから、シーспロテインに炎症性反応抑制効果があると考えられた。

【結論】

多成分系のエナメルタンパクの主成分はアメロゲンであるが、歯周外科処置後の炎症反応の軽減はシーспロテインによることが示唆された。

歯周病原細菌による潜伏感染HIV-1の活性化

名古屋市立大学 大学院医学研究科 細胞分子生物¹⁾ 日本大学 歯学部 細菌学²⁾
今井 健一¹⁾、落合 邦康²⁾、岡本 尚¹⁾

Reactivation of latent HIV-1 infection by the periodontopathic bacterium

Porphyromonas gingivalis involves histone modification.

Dept. of Mol and Cell Biol. Nagoya City Univ. Graduate School of Medical Sciences¹⁾, Dept. of Microbiology,
Nihon Univ. School of Dentistry²⁾

Kenichi Imai¹⁾, Kuniyasu Ochiai²⁾, and Takashi Okamoto¹⁾

【緒言】

世界の HIV 感染者は 4000 万人を越え、1 年間に 410 万人が新たに HIV に感染し年間約 210 万人もの人が亡くなっている。近年特に中国やインドなどを中心に感染の蔓延が進み世界的な問題となっているが、我が国は先進国のなかで感染者が増え続けている唯一の国でもあり、早急な対策が必要とされる。エイズの治療を困難なものとしている最大の理由に HIV の潜伏感染がある。最近、ヒストン修飾を介する転写サイレンシングによる潜伏感染機構が明らかになった。転写抑制因子によって HIV promoter (LTR) 周辺に呼び込まれた HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) は近傍のヒストンを脱アセチル化することにより抑制型のクロマチンを形成し、HIV の転写複製を積極的に阻止して潜伏感染を維持する。一方で、感染者体内においてこの潜伏感染がどのような状況で破綻し、ウイルスの複製が開始されるのかという問題が残されているが、潜伏感染の再活性化はヒトを死に至らしめるため、多くの研究者の注目を集めるところであるにも関わらず、これまで解明されていない。

近年、HIV 感染に関する口腔および歯周病の興味深い知見が報告されている：(1) エイズ患者では歯周病が進行しており、歯周ポケットや唾液、血清中の HIV 量と歯周病の進行度が相関する。(2) エイズ患者の歯周ポケットには健常者より多くの歯周病菌が認められる。(3) エイズ患者の口腔内細胞では HIV レセプターの発現が亢進しており、その発現には歯周病菌が関与している。(4) CD4 を持たない口腔上皮や唾液腺細胞にケモカインレセプターなどを介して HIV が感染する。これらの事実は、HIV 感染により重症の口腔疾患が発症するという従来の視点とは大きく異なり、口腔が HIV 初感染・伝播・潜伏感染部位となり、更に、歯周病および他の口腔疾患がエイズ発症に深く関与している可能性を強く示唆している。

今回、*P. gingivalis* が潜伏感染 HIV を転写レベルで活性化することを見出したので報告する。

【方法と結果】

HIV 潜伏感染 T 細胞および単球に、*P. g* 菌体や LPS、線毛などを作用させても HIV の活性化は認められなかったが、*P. g* の培養上清処理により HIV の複製は強く活性化された。*P. g* 培養上清による HIV 活性化には、炎症性サイトカインやジンジバインも関与していなかったこと、また上清のカラム処理により、HIV 活性化能を有する分画が低分子であることが示唆されたので低分子脂肪酸に着目した。ガスクロマトグラフィーによる定量の結果、*P. g* 培養上清中には種々の短鎖脂肪酸が認められたが、解析を進めたところ HIV の活性化には酪酸が必須であった。実際に酪酸を除いた培養上清では HIV の活性化は認められなかった。酪酸が強力な HDAC 阻害作用を有することが知られているので、転写レベルでの詳細な分子機構を検討した。その結果、*P. g* 上清はヒストンのアセチル化を促進することにより HIV を転写レベルで活性化した。実際に ChIP assay の結果、*P. g* 上清処理により HADC と転写抑制因子の LTR からの遊離が促進された一方、アセチル化ヒストンや Pol II の LTR へのリクルートが認められた。

【結論と考察】

歯周病原菌が潜伏感染状態にある HIV を再活性化することで、エイズ発症の隠れた危険因子となりうる可能性を示した。すでに分子レベルでの研究から、酪酸および TNF- α は HIV の最も強力な活性化因子であることが解明されている。歯周病の進行と歯周ポケット内や血清中の HIV 量が相関していること。歯周病患者の歯垢や歯肉溝には HIV を再活性化するのに十分な酪酸が検出されること。更に、歯周病患者血清中には高濃度の TNF- α 存在し、糖尿病や早産などの全身疾患に関与していること。以上の事実を集約すると、歯周病は AIDS 発症に深く関与している可能性が示唆される。また我々は、EB ウイルスなど他のウイルスも活性化することを認めている。歯周病が糖尿病や動脈硬化などの全身疾患のみならず、ウイルス感染症にも影響を及ぼす可能性を示した本研究は、広く歯周病予防の重要性を再認識すると共に、新たな AIDS の予防や治療対策、また啓蒙のための重要な手がかりとなる可能性がある。

歯周病細菌感染に起因したと考えられる化膿性肝膿瘍の1剖検例

兵庫医科大学 病理学講座 機能病理部門¹⁾, 大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座²⁾,
広島大学 大学院医歯薬学総合研究科 顎口腔頸部医科学講座 健康増進歯学³⁾
○大山秀樹¹⁾, 野杻由一郎²⁾, 小越菜保子¹⁾, 西村英紀³⁾, 恵比須繁之²⁾

An autopsy case of pyogenic liver abscess with periodontal bacteria : implication of the potential association of periodontal infection

Department of Pathology, Hyogo College of Medicine¹⁾, Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry²⁾, Department of Dental Science for Health Promotion, Division of Cervico-Gnathostomatology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences³⁾
Hideki Ohyama¹⁾, Yuichiro Noiri²⁾, Nahoko Kogoe¹⁾, Fusanori Nishimura³⁾, Shigeyuki Ebisu²⁾

【はじめに】化膿性肝膿瘍は、肝組織内にグラム陰性桿菌を主とする細菌が侵入・増殖することによって発症する比較的まれな疾患である。その起因菌の多くは、*K. pneumoniae* と *E. coli* であり、両者で約43%を占める。感染経路は、経胆道性、経門脈性、経動脈性であるとされているが、原病巣および感染経路が同定できない例が1/3~1/2存在することが知られている。また、その誘因として、悪性腫瘍、敗血症、慢性肉芽腫性疾患、慢性炎症性腸疾患（憩室炎）などの疾患が挙げられており、近年では歯科疾患の関与についても示唆されている。我々は、過去において感染経路不明である化膿性肝膿瘍の1剖検例を経験した。その後行ったレトロスペクティブな解析により、歯周病細菌感染を同疾患形成の原因のひとつとして考えなければならない結果を得るに至ったので、ここに報告する。

【症例】59歳、女性。死亡18日前から発熱および右側腹部痛を自覚するも放置。自宅にて心肺機能停止状態で発見され、本院救急救命部に搬入された。CT検査を行なうことによって、肝右葉の大型mass、および右心房内の血栓様病変の存在がそれぞれ確認された。さらに、肝穿刺によって茶褐色混濁かつ悪臭を伴う膿汁が採取されたことから、肝右葉のmassは肝膿瘍である可能性が高いことが臨床的に診断された。しかし、搬入後間もなく死亡の確認が行われ、死因究明を目的に病理解剖が行われた。

〈搬入時主要検査データ〉 CRP:42.2 ↑ NHs:214 ↑ GOT:606 ↑ GPT:360 ↑ BUN:50 ↑ クレアチニン:1.73 ↑

〈非開放膿培養試験結果〉 1. *Prevotella melaninogenica* 2. *Fusobacterium varium* 3. *Bacteroides vulgatus*

〈患者既往歴〉

死亡24年前：右卵巣粘液性嚢胞腺癌（子宮全摘＋両側付属器切除）

死亡14年前：虫垂腫瘍・虫垂炎（虫垂・瘻孔部摘出・掻爬、腺癌再発なし）

死亡3年前：重度歯周炎（本院歯科口腔外科において治療を開始するも、その後中断・放置）

【病理解剖所見】1. 肉眼的所見：肝臓右葉後区域に単発性多房性（φ7cm）の灰褐色混濁液状の膿汁を含む膿瘍の形成が認められた。また、右心房腔内には充満性の感染性血栓の形成を認め、両肺の肺動脈内においても広範に感染性血栓の形成が見られた。2. 組織学的所見：肝膿瘍部の多くは、好中球を中心とした高度な炎症細胞浸潤を伴う壊死組織からなり、細菌塊の形成が多数見られた。また、膿瘍部に限らず肝全域の肝静脈枝内において感染性血栓の形成が見られたが、肝内門脈枝内には、その血栓形成が見られなかった。さらに、右心房腔内および両肺肺動脈内の感染性血栓、腎臓の糸球体内および間質内毛細血管、脾臓、胆嚢の毛細血管においても、同様の菌塊が見られた。これら菌塊に対してグラム染色を行った結果、その多数がグラム陰性桿菌からなることが分かった。これら細菌塊に対して*F. nucleatum*, *T. denticola*, *P. intermedia*, *P. gingivalis*, *C. rectus*のそれぞれを特異的に認識する抗体を用いた免疫染色を行った結果、これらの菌の存在を各臓器における感染性血栓および血管内において確認した。

【考察】肝右葉にグラム陰性菌感染による多房性の肝膿瘍を認めた。得られた所見から、本例肝膿瘍の成因は以下のように考えられる。①肝外胆道系に狭窄・閉塞は認めなかったことから閉塞性黄疸の関与は否定される。②門脈支配領域に化膿性感染病巣を認めなかったこと、および肝膿瘍周囲の門脈枝に化膿性門脈炎像を認めなかったから経門脈性感染は否定的である。③経動脈性に関しては、心・肺には感染源となる病変は認めなかったが、本例では病歴に既述したように歯周病の急性発作の治療歴が複数回あることから経動脈性原因病巣のとしての可能性を考慮する必要がある。今後、原病巣および感染経路を特定することができない化膿性肝膿瘍症例を対象として、歯周医学的観点から解析を行うことによって、歯周病細菌感染の病態への関与をさらに明らかにできるものとする。

【非会員共同演者】中正恵二, 山根木康嗣, 久原彩子, 寺田信行（兵庫医科大学病理学講座機能病理部門）

歯周炎に罹患した2型糖尿病患者における歯周治療および糖尿病治療による多施設介入試験
東京医科歯科大学大学院歯周病学分野¹ 同歯科医療行動科学分野² 同GCOEプログラム³ 愛知学院大学短期大学部歯科衛生学科⁴ 愛知学院大学歯学部歯周病学講座⁵ 東京女子医科大学先端生命医学研究所⁶

○片桐さやか¹ 新田 浩² 長澤敏行¹ 稲垣幸司⁴ 黒須康成⁵ 川瀬仁史⁵ 野口俊英⁵ 石川 烈⁶ 和泉雄一^{1,3}
Multi-center intervention study by periodontal treatment and diabetic treatment in type 2 diabetes patients with periodontitis.
Section of Periodontology¹, Section of Behavioral Dentistry², GCOE program³, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University, Department of Dental Hygiene, Aichi-Gakuin University Junior College⁴, Department of Periodontology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University⁵, Institute of Advanced Biomedical Engineering and Science, Tokyo Women's Medical University⁶

○Sayaka Katagiri¹, Hiroshi Nitta², Toshiyuki Nagasawa¹, Koji Inagaki⁴, Yasunari Kurosu⁵, Hitoshi Kawase⁵, Toshihide Noguchi⁵, Isao Ishikawa⁶ and Yuichi Izumi^{1,3}

【背景と目的】これまで、歯周炎と糖尿病は相互に影響し合うことが明らかになっている。糖尿病患者における歯周治療の介入の影響については、血糖コントロールが改善した、あるいは変化はなかったという報告があり、結論には至っていない。一方、糖尿病の改善による歯周組織への影響に対しては、縦断研究での報告はあるものの、糖尿病の改善による影響を直接みた介入研究の報告はまだない。本研究の目的は、2型糖尿病患者において、歯周治療の介入がHbA_{1c}を変化させるかどうか、糖尿病治療の介入が歯周炎の状態を変化させるかどうかを調べることである。

【材料及び方法】対象：東京医科歯科大学医学部附属病院および歯学部附属病院、愛知学院大学歯学部附属病院、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院、東京医科大学付属病院、京都府立医科大学附属病院、帝京大学医学部付属病院、慈恵会医科大学付属病院、東京通信病院を受診で本研究の趣旨に同意の得られた2型糖尿病患者を被験者とした。歯科からの介入群（歯科介入群）として、過去2か月間、糖尿病の治療法を変えていない2型糖尿病患者80名、内科からの介入群（内科介入群）としてHbA_{1c}が7.0%以上の2型糖尿病患者21名、対照群として歯科治療を行わず、内科治療は変更しない2型糖尿病患者21名とした。除外基準は、過去3か月以内の抗菌剤を服用した者、過去6か月以内に歯周治療を受けた者および喫煙者とした。なお、本研究は各施設の倫理委員会の承認を得て行った。

実験方法：歯周治療および糖尿病治療の開始前、さらに同治療終了2か月後、6か月後に、歯周組織の評価として、Probing Pocket Depth (PPD)、Bleeding on Probing (BOP)を測定した。代謝コントロールの指標としてHbA_{1c}、炎症のマーカーとして血清中の高感度CRPを測定した。

治療介入方法：歯周治療は2か月間に4回の歯周治療を行った。口腔衛生指導と超音波スケーラーを用いた歯肉縁上、歯肉縁下のデブライドメント、および各回治療後には口腔内全体の歯周ポケットに対して抗生物質（ペリオフィール®）を局所投与した。糖尿病治療は、専門医による診断の下、経口血糖降下薬、インスリンの投与が行われた。

統計分析：治療前後の比較にはWilcoxon signed ranked test、介入群と非介入群の比較には、Mann-Whitney testを用いて解析し、 $p < 0.05$ を有意水準とした。

【結果】

1. 歯科介入群では、歯周治療後にPPD、BOPの有意な改善が認められ、HbA_{1c}が有意に減少した。
2. 高感度CRPが減少した歯科介入群の被験者では、より大きなHbA_{1c}の減少が認められた。
3. 内科介入群ではHbA_{1c}の有意な減少が認められ、BOPの有意な減少が認められた。

【考察】本研究では、2型糖尿病患者に歯周治療を行うことによりHbA_{1c}が改善した。サブ解析により、CRPが減少した被験者では、より大きなHbA_{1c}の減少が認められた。CRPレベルが2型糖尿病の発症・進行や、インスリン抵抗性に関与していることが報告されており、また、歯周炎患者では全身のCRPレベルが有意に上昇しており、抗菌剤を併用した歯周治療によってCRPレベルが減少することが報告されている。このことから、CRPの減少を伴うより確実な歯周治療が血糖コントロールの改善に寄与すると考えられる。また、糖尿病治療の介入により有意なBOPの減少が認められたことから、糖尿病の改善によって細小血管障害が緩和され、BOPの減少が観察された可能性が考えられる。

【結論】歯周治療の介入により、血糖コントロールが改善することが示唆された。特に顕著に歯周炎の改善が認められた際に、HbA_{1c}が改善する可能性が示された。また、糖尿病の改善により歯周炎が改善することが示唆された。歯周病と糖尿病の相関関係を明らかにするために、さらに被験者を増やし、検討する必要がある。

会員外共同研究者 内村 功, 泉山 肇 (東京医科歯科大学内分泌代謝内科) 成瀬桂子, 松原達昭 (愛知学院大学歯学部内科学講座) 菊池 毅 (同歯周病学講座) 金澤真雄 (東京医科大学第3内科) 井上修二 (共立女子大学家政学部)

BP_s 誘導顎骨壊死ラットモデルの顎骨形態解析に関する研究

神奈川歯科大学 口腔治療学講座歯内療法学分野¹ 顎顔面診断科学講座放射線学分野²

○武藤徳子¹, 千枝桂子¹, 三壁信洋¹, 渡部弘隆¹, 佐藤武則¹, 川股亮太², 鹿島 勇², 石井信之¹

Morphological characterization of experimental ONJ rat model by bisphosphonate

Department of Endodontics¹, Department of Radiology², Kanagawa Dental College

○Noriko Mutoh¹, Keiko Chieda¹, Nobuhiro Mikabe¹, Hirotaka Watabe¹, Takenori Sato¹,

Ryota Kawamata², Isamu Kashima², Nobuyuki Tani-ishii¹

【研究目的】

ビスフォスフォネート製剤 (BP_s) による顎骨壊死 (ONJ) 発症患者は毎年増加傾向を示し、社会問題になりつつある。歯科治療時に BP_s の服用患者による BP_s 誘発性と考えられる ONJ の発症件数は、2002 年に初めて報告されてから現在に至るまで毎年増加傾向を示しているが、ONJ に対する決定的な治療法は未だ確立されていない。現在、BP_s 服用患者に対する外科処置は禁忌と考えられており、歯科保存処置の重要性がクローズアップされている。今回我々は、BP_s による ONJ 発症メカニズムを解析することを目的とし、ONJ 実験モデルの作製を試みるとともに BP_s による歯槽骨変化を組織学的に検討した。

【材料及び方法】

4 週齢 Wistar 系ラット ♂ (n=20) に対して BP_s (Alendronate: フォサマック錠[®]) を選択し、0.5mg/kg を 1 回/2 日間隔で 6 週間 (n=5) 及び 8 週間 (n=5) 経口投与を行った。ONJ 誘導法として上顎第一臼歯咬合面を露髄させ、P.gingivalis33277 株混合液 500µl を口腔内に接種し感染の誘導を行った後、顎骨の形態学的変化を解析した。6 および 8 週間の BP_s 経口投与群ともに P.gingivalis 感染 2 週間後に深麻酔下にて 4% paraformaldehyde で灌流固定後、顎骨を採取し 14% EDTA にて 4 週間脱灰し、パラフィン切片を作製後、HE 染色を行い組織学的解析を行った。なお、未処置群、BP_s 非投与群の組織をコントロールとして実験群と比較した。

【成績】

Alendronate (YM175) および Alendronate (フォサマック錠[®]) 投与ラット顎骨の組織学的解析において、顎骨皮質骨における骨小腔内骨細胞の形態学的変化を日本歯科保存学会 第 128 回春季学術大会にて報告した。本研究は、より詳細な形態解析を行うために 0.5mg/kg の Alendronate による ONJ 実験モデルの作製を試みると共にその歯槽骨変化を組織学的に検討した。その結果、歯根部セメント質の外部吸収、歯根膜線維の変性、歯槽骨吸収のほか、歯肉上皮の肥厚及び上皮脚の伸長が認められ、その延長は歯肉溝底部に及んでいた。また、歯槽骨頂部は炎症性細胞の集積が認められた。根尖周囲の歯槽骨には、骨吸収部位の破骨細胞は形態が不明瞭であった。歯槽骨内の血管と骨小腔が減少し、骨小腔内に存在する骨細胞が萎縮および欠損していた。

【考察および結論】

本研究の結果より Alendronate 経口投与により、歯槽骨表層に存在する破骨細胞および骨芽細胞の分化抑制による骨代謝停止と骨髄内の抗血管新生効果による血液循環抑制によって骨細胞機能不全が誘導されていることが示唆された。

種々の *Porphyromonas gingivalis* 菌株が形成する バイオフィームに対する抗生物質の影響

大阪大学歯学研究科口腔分子感染制御学講座 (歯科保存学教室)
○前菌葉月、野杵由一郎、朝日陽子、薮根敏晃、上田未央、恵比須繁之

Effects of antibiotics on biofilms formed by various strains of *Porphyromonas gingivalis*
Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Hazuki Maezono, Yuichiro Noiri, Yoko Asahi, Toshiaki Yabune, Mio Ueda, Shigeyuki Ebisu

【目的】

Porphyromonas gingivalis はヒトの歯周ポケット全域に分布し、辺縁性歯周炎に関わっているほか¹⁾、根尖孔外バイオフィームにから高頻度に検出され、根尖性歯周炎の難治化に関与している²⁾。一般的にバイオフィームは抗生物質に抵抗性を示すが、15員環のマクロライド系抗生物質であるアジスロマイシンは、緑膿菌に対しては最小発育阻止濃度 (MIC) 以下の濃度 (sub-MIC) でクオラムセンシングを担うオートインデューサーや、菌体外マトリックスの成分であるアルギン酸の産生を抑制することによりバイオフィーム形成を抑制する。本研究では、アジスロマイシンを含む各種抗生物質が、種々の *P. gingivalis* 菌株のバイオフィームに及ぼす影響を浮遊系 *P. gingivalis* の最小発育阻止濃度と比較検討した。

【材料および方法】

供試菌株として *P. gingivalis* 381 株、6/26 株、ならびに W83 株を用い、抗生物質はアジスロマイシン (AZM)、エリスロマイシン (EM)、アンピシリン (ABPC)、オフロキサシン (OFX)、ゲンタマイシン (GM) を使用した。各種 *P. gingivalis* 菌株に対する上記抗生物質の MIC を連続希釈法により測定した。次に 96 穴マイクロプレートに各菌株を 3 日間培養し、バイオフィームを形成し、各種抗生物質 (0.0003-640 μg/ml) を添加し、3 日間培養した。バイオフィーム細菌の定量は、1% クリスタルバイオレットで 30 分間染色した後、エタノール抽出し、吸光度 (OD) を 595 nm で測定することにより行った。

【結果】

MIC 測定の結果を以下の表に示す。

菌株 \ 抗生物質	AZM	EM	ABPC	OFX	GM
<i>P. gingivalis</i> 381	0.5	0.5	0.0781	0.5	>640
<i>P. gingivalis</i> 6/26	5	1.25	0.0781	1.25	10
<i>P. gingivalis</i> W83	0.625	0.156	640	0.313	320

(μg/ml)

P. gingivalis 381 株、6/26 株、ならびに W83 株のバイオフィームは、アジスロマイシンとエリスロマイシン添加群では、MIC 以下の濃度で抗生物質非添加のコントロール群と比べ有意に OD 値が減少した (Student's t-test, $p < 0.01$)。アンピシリン添加群では、381 株、6/26 株、W83 株においてそれぞれ 1.0、80、160 μg/ml 以上の濃度で有意な抑制が認められた。オフロキサシン添加群では、381 株と W83 株において各々 20 および 1.25 μg/ml 以上の濃度で有意差を認めたが、6/26 株では有意差を認めなかった。また、ゲンタマイシン添加群は、全菌株のバイオフィームに対しいずれの濃度においても有意な抑制は示さなかった。

【考察および結論】

供試した *P. gingivalis* 各菌株のバイオフィームに対して、アンピシリンは MIC の 64-256 倍、オフロキサシンは 2-4 倍の濃度で抑制し、これらの抗生物質はバイオフィーム細菌に抵抗性を示すということが改めて示唆された。一方、マクロライド系抗生物質であるアジスロマイシンは MIC の 1/2-1/8 倍、エリスロマイシンは 1/2-1/4 倍の濃度でバイオフィームを有意に抑制した。本研究ではバイオフィーム形成後に抗生物質を作用させたため、マクロライド系抗生物質のバイオフィーム抑制メカニズムとして、バイオフィームの剥離あるいは遊離を促進し抗菌的に作用した可能性が推察された。

【参考文献】

1. Noiri Y, Li L, Ebisu S : J Dent Res 80: 1930-1934, 2001.
2. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S : Appl Environ Microbiol 71: 8738-8743, 2005.

象牙芽細胞膜の撓みが細胞間カルシウム移動に及ぼす影響

東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科 摂食機能保存学講座 歯髄生物学分野
○池田英治、須田英明

Influence of mechanical distortion of human odontoblast membrane on transjunctional Ca conductance
Pulp Biology and Endodontics, Department of Restorative Sciences, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University
IKEDA Hideharu, SUDA Hideaki

研究目的

象牙芽細胞は象牙質産生細胞であり、その単極性突起を外側に向けて象牙細管内容液中に浮かべながら、細胞体を象牙質直下の歯髄最外層に整列させている。これらの事実はその細胞突起が刺激センサーとして働く可能性を強く示唆している。しかしながら、技術的な困難性がこの分野の研究をこれまで妨げてきた。我々はこれまで、象牙芽細胞の細胞膜の持つ弾性、象牙芽細胞間および象牙芽細胞と下層細胞間の dye-、electrical-coupling による機能複合体としての特性について精査し、本学会においてもその一部を報告してきた。また、gap-junction は 1000Da 以下の分子、例えば細胞内カルシウム濃度を変化させるカルシウムイオンやイノシトール 3 リン酸といったセカンドメッセンジャーの経路であることもよく知られている。そこで本研究では、電気現象としてとらえてきたこれまでの結果も踏まえて、細胞膜に与えた機械的刺激が引き起こす細胞間カルシウムイオン伝播の様式を明らかにすることである。

材料および方法

研究内容について説明を行い、歯の提供に同意の得られた患者から矯正治療目的で抜去された 6 本のヒト新鮮小白歯から単離した、長さ 80 μ m を越す単極性突起を有する細胞を用いた。クラスター中の単一細胞への機械的刺激として、細胞膜にパッチクランプ用ガラス電極を付着させ、陽圧あるいは陰圧をかけながら、経時的に細胞内カルシウムの変化をモニターした。また、ガラス電極を用いて単一象牙芽細胞にイノシトール 3 リン酸を注入し、ハロセンの有無によって、周囲細胞へのカルシウムイオン伝播の影響をみた。

成績

- ① 細胞膜に加わった圧力によって被刺激象牙芽細胞にカルシウムイオンの増加が認められ、それが隣接細胞へと伝播した。
- ② 細胞内に注入したイノシトール 3 リン酸によっても同様のカルシウムイオン量の変化が確認された。
- ③ このイノシトール 3 リン酸依存性の変化はハロセンによって抑制された。

考察

我々はこれまでヒト象牙芽細胞膜が弾性に富み機械的刺激に応じて形態を変えうること、象牙芽細胞層に広範囲の細胞間カップリング網が存在することを報告した。本研究の結果は、細胞外から加えられた機械的刺激をトリガーにして、細胞内伝達物質としてのカルシウムイオンが、このカップリング網を介して象牙芽細胞間を広く伝播することを示している。

結論

ヒト象牙芽細胞間にはカルシウムイオンの伝播系が存在し、細胞膜に及んだ機械的刺激によって活性化されることが明らかになった。

ヒト歯髄組織における Fibrillin-1 の局在に関する免疫組織化学的研究 -石灰化および細胞分化との関連性について-

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座う蝕学分野, ²松本歯科大学 口腔解剖学第二講座
○吉羽永子¹, 吉羽邦彦¹, 重谷佳見¹, 細矢明宏², 中村浩彰², 興地隆史¹

Involvement of fibrillin-1 in the dental pulp mineralization and cyto-differentiation

¹Division of Cariology, Operative Dentistry and Endodontics, Department of Oral Health Science,
Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences;

²Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University

○ YOSHIBA Nagako¹, YOSHIBA Kunihiko¹, SHIGETANI Yoshimi¹, HOSOYA Akihiro²,
NAKAMURA Hiroaki², OKIJI Takashi¹

【研究目的】

Fibrillin-1(FBN1) はマイクロフィブリルの構成成分である一方で, transforming growth factor- β 1(TGF β 1)の活性を制御していることが知られている。すなわち, FBN1 は matrix metalloproteinases (MMPs) などにより分解を受けるが, それにより FBN1 に結合していた TGF β 1 が放出され活性型 TGF β 1 となる機構が示されている。また, ヒト歯髄線維芽細胞では TGF β 1 刺激により α -smooth muscle actin (α SMA)を高発現することも知られている。一方, ヒト歯髄組織に MTA で直接覆髄を施すと被蓋硬組織が形成されるが, 演者らはこの過程で覆髄面直下の FBN1 が早期に分解されるとともに, その FBN1 陰性領域が石灰化と細胞分化の場となっている可能性を見だし, 第127回本学会で報告した。FBN1 を分解する MMPs として数種が報告されているが, アルカリ性を示す MTA 下でも作用できるものとしては MMP-3 が考えられる。そこで本研究では, ヒト歯髄組織の創傷治癒過程で展開される石灰化と細胞分化に FBN1 が関与する可能性を追究することを目的として, FBN1, MMP-3, α SMA について in vivo および in vitro での局在の変化を観察した。

【材料と方法】

材料には研究の趣旨に同意を得られた患者の矯正治療上要抜去と診断された健全小臼歯ならびに第三大臼歯を用いた。浸潤麻酔下に I 級窩洞形成を行ない, 歯髄の一部を露出させ, MTA あるいは Ca(OH)2 による直接覆髄を施しコンポジットレジン修復を行った。術後 1~8 週で抜去し, 4%パラホルムアルデヒドにて浸漬固定後, 10%EDTA にて脱灰し 8 μ m の凍結切片を作製した。また in vitro の実験では, 健全抜去歯から摘出した歯髄を厚さ約 1.5mm の組織片とし, 石灰化を誘導するために 5 ないし 10 mM β -glycerophosphate (β GP)を添加し, さらに一部には MMP-3 阻害剤を同時に添加して 2~4 週間培養後, 凍結切片とした。以上の試料に対して MMP-3, FBN1, α SMA の局在を酵素抗体法にて観察するとともに, 培養組織では石灰化をアリザリンレッド S 染色で観察した。

【結果と考察】

術後 2 週において, MTA 覆髄下では細胞分化が活発となり, Ca(OH)2 覆髄例では基質の形成が開始されていた。FBN1 の陽性反応は, 健全歯では歯髄組織全体に認められたが, 術後 2 週では MTA 及び Ca(OH)2 覆髄例共に覆髄部直下で消失しており, この FBN1 陰性部に強い MMP-3 の陽性反応が観察された。また, α SMA 陽性反応は, 健全歯髄では血管に沿ってのみ認められたが, 覆髄後 2 週例では, 覆髄部近傍に分布する線維芽細胞や新生硬組織形成細胞にも観察された。被蓋組織の石灰化が明らかとなる術後 6 週では, FBN1 の陽性反応は, 硬組織とその直下の軟組織では消失したままであったが, 同部に MMP-3 の陽性反応は認められなかった。 α SMA の局在は, 再び血管に沿ってのみ観察されるようになった。また培養歯髄組織においては, β GP 添加群では組織の石灰化が亢進しており, FBN1 の陽性反応が消失する一方で α SMA 陽性を示す線維芽細胞が多数観察された。ところが, MMP-3 阻害剤を添加した条件では, FBN1 の免疫染色像は観察されたが α SMA 陽性細胞はほとんど認められなかった。

以上の結果より, 歯髄組織における FBN1 は, MMP-3 により分解を受け, 歯髄組織の石灰化と細胞分化に関与していることが推測された。

半導体レーザーの象牙質知覚過敏への効果

鶴見大学歯学部附属病院総合歯科2、第二歯科保存学教室*

○矢作保澄、山口博康、新井高*、高水正明

The efficacy of semiconductor laser for dentin hypersensitivity

Department of General Dentistry and Clinical Education, Department of Periodontics and Endodontics*,

Tsurumi University School of Dental Medicine

○Yahagi Hozumi, Yamaguchi Hiroyasu, Arai Takashi* and Takamizu Masaaki

【目的】

象牙質知覚過敏症は冷温刺激、接触などにより痛みが発現し症例により疼痛発現状態が異なる。本研究では象牙質知覚過敏症における疼痛の発現状態について簡略版マクギルの質問票により診査後、半導体レーザーを用いて歯頸部象牙質に照射し、術後の疼痛発現状態について評価した。

【対象】

鶴見大学歯学部附属病院総合歯科2に来院した患者の中で象牙質知覚過敏症を有する11歯を対象とした。尚患者には予めレーザー照射の説明と同意を得た。

術前診査としてマクギルの疼痛質問票を用いた。痛みを表す表現については0:全くない、1:いくらかある、2:かなりある、3:強くある、の4段階の程度で術前後について記録し、この15項目の合計点を15で割った点数を評価(以下:平均評価値)した。疼痛緩和には、半導体レーザーP-Laser(パナソニックデンタル社製)を用い1W、RPT、Duty比10%出力を用いた。

レーザー照射後、術前と同様に診査を行い術前後の臨床症状の評価ポイントについて統計学的解析(Wilcoxon signed-rank test)を行った。

【結果】

各個人の術前の痛み比較して術後では平均評価値では有意な疼痛効果が得られた($p < 0.05$)。象牙質知覚過敏の痛みの質としてはポイントの高い順から、④鋭い痛み(9ポイント)、⑩さわると痛い(8ポイント)、②ギクッと走するような痛み(6ポイント)、⑧うずくような痛み(5ポイント)、⑫心身ともうんざりするような痛み(5ポイント)と続いた。各痛みに対するレーザー照射術前後の疼痛の変化について有意差は認められなかった。

【考察および結論】本結果より、半導体レーザー照射により平均評価値で有意な疼痛効果が得られた。また、知覚過敏による痛みの種類はA線維に起因する④鋭い痛み、C線維により起因する⑧うずくような痛み、の両神経線維が起因することが推測される。半導体レーザーは歯質を透過し、歯髄組織の閾値の低下している部位の神経線維に作用し、中枢側に作用し中枢側のニューロンにおいて興奮の鎮痛作用が生じる結果、誘発痛、自発痛の緩和が生じると考えられている。半導体レーザーの象牙質知覚過敏の疼痛緩和のメカニズムは、下顎切歯歯頸部にレーザー照射によりC線維の興奮抑制が生じていることから、本症例においても半導体レーザー照射による象牙質知覚過敏の疼痛抑制のメカニズムと考察される。また、マクギルによる疼痛の指標は疼痛の質について検索する方法であり、今後症例数を増やし術前後の疼痛緩和効果について検索する予定である。