

日本人上顎第一大臼歯の根尖側 3-6mm の形態分類と観察：マイクロ CT を用いた研究

東京歯科大学 歯科保存学講座¹⁾、解剖学講座²⁾

○山田雅司¹⁾、関谷紗世¹⁾、宮吉教仁¹⁾、藤井理絵¹⁾、松永智²⁾、森永一喜¹⁾、村松敬¹⁾、古澤成博¹⁾

The classification and observation of isthmus in the sections 3-6mm from the apex of Japanese maxillary first molar: a micro-computed tomographic study

Department of Endodontics and Clinical Cariology¹⁾, Department of Anatomy²⁾, Tokyo Dental College

○YAMADA MASASHI¹⁾, MIYAYOSHI NORIHITO¹⁾, SEKIYA SAYO¹⁾, FUJII RIE¹⁾,
MATSUNAGA SATORU²⁾, MORINAGA KAZUKI¹⁾, MURAMATSU TAKASHI¹⁾, FURUSAWA MASAHIRO¹⁾

目 的：現代の歯根端切除術においては、根尖側 3mm で根尖の切除を行い、逆根管充填窩洞を 3mm 形成するのが一般的である。しかしながら、その切断面には多くの場合、根管間に側枝、根尖分岐、イスマスが存在し、それら応じた処置をしなければならない。イスマスは扁平根では高頻度で観察され、特に上顎第一大臼歯近心根では、根尖側 3mm において 6~64%存在すると報告されている。また、イスマスの好発部位は根尖から 4-6mm に存在するとも報告されており、逆根管充填窩洞は根尖側 3mm での切断面だけでなく、その上部の形態も考慮して設計する必要がある。今回我々は、日本人の上顎第一大臼歯の根尖側 3-6mm での根管とイスマスとの関係を、マイクロ CT を用いて観察して分類し、その発現率を調査し、必要とされる逆根管充填窩洞の設計についての検討を行った。

方 法：検索には日本人の抜去歯 100 本を用い、マイクロ CT (HMX225-ACTIS 4 TESCO, Inc.) にて、管電圧 100kV、管電流 75 μ A、倍率 10 倍、スライス幅 50 μ m の条件下で撮影した。得られたスライスデータより、近心頬側根 (MB 根)、遠心頬側根 (DB 根)、口蓋根 (P 根) の根尖より 3, 4, 5, 6, mm の部位の断面形態を観察した。また、Kim ら (2001) のイスマスの分類を参考にして断面形態を分類し、各形態の発現率を計測した。またイスマスが観察された場合、完全イスマスか不完全イスマスかを選別した上で発現率を計測した。

結 果：いずれの根においても Type1 (単根管でイスマスが存在しないもの) が多く観察された。MB 根では根尖側より上方になるにつれて Type2 (2つの根管間にイスマスが存在するもの) と Type5 (2根管、それ以上の根管でイスマスが存在しないもの) が増加していた。DB 根と P 根ではいずれのレベルでも Type1 が多く観察された。また、MB 根で 3mm での形態と上位の形態が不一致となる場合が著明であった (74%)。イスマスは MB で最も発現率が高く (44.8%)、3mm では不完全イスマスが多く観察されたが、それより上方では完全イスマスの方が多く観察された。DB 根、P 根ではイスマスの発現は少なく (DB: 8.3%, P: 4.2%)、いずれも完全イスマスが多数観察された。

考 察：マイクロ CT を用いることにより、非破壊的で正確に、根管やイスマスなどの構造物を調査することが可能であった。その結果、視認が困難なイスマスや、根管の検出が可能となり、今回、全ての断面レベルにおいて、約半数のイスマスが観察された。また従来の報告の様に、特に MB 根において、3mm より上位のレベルほど、形態が圧偏され複数の根管が観察されたが、特に根尖側 3mm でのイスマスは不完全イスマスであることが多く、この部で狭窄が強いことが明らかとなった。また切断面と上位の形態が一致しないことが多いことから、従来通り根尖側 3mm で切断した場合においても、その上方に不完全イスマスが存在する可能性が高く、適切な機械的拡大と封鎖の為に、逆根管充填窩洞の形成には副根管やイスマスを考慮した上で、最小限の予防拡大が必要と考えられた。

健全な若年成人における局所麻酔時の音楽鎮静の効果 — 心拍変動解析を用いた自律神経活動による評価 —

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座歯周・歯内療法学教室

○小田中 瞳, 下地伸司, 竹生寛恵, 大寫理紗, 菅谷 勉, 川浪雅光

Effect of music sedation on psychological stress due to local anesthesia in healthy young adults : Evaluation by autonomic nervous activity using heart rate variability

Department of periodontology and endodontology, Division of oral health science, Hokkaido
university graduate school of dental medicine

○Hitomi Odanaka, Shinji Shimoji, Hiroe Takefu, Risa Oshima, Tsutomu Sugaya and Masamitsu Kawanami

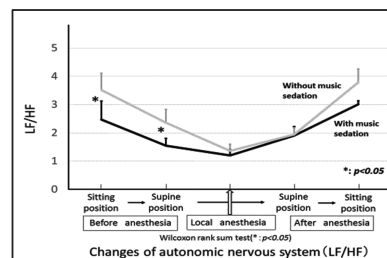
【研究目的】安心・安全な歯科治療を行うためには歯科治療時の全身状態を把握することが重要である。心電図の R-R 間隔を高周波成分 (HF) と低周波成分 (LF) に周波数解析 (心拍変動解析) することで自律神経活動を評価する方法は、全身状態の瞬間的な変化をリアルタイムかつ精度良く捉えることができるため、我々は歯科治療の影響を解明するための自律神経活動モニターシステムを開発した。これを使ってこれまでに健全な若年成人に対して局所麻酔や超音波スケーラーを用いたスケーリングを行った際には、実際の歯科治療時よりもその開始前にストレスを感じている可能性を明らかにして、治療前にストレスを減少させることの必要性を示した (日本歯科保存学会学術大会 2011 秋季, 2014 春季, 秋季)。リラクゼーション効果が高いと考えられている音楽を聴いてもらう音楽鎮静はストレスを減少させる効果が高いとされ、医科領域では手術時の全身麻酔前などに用いられることがあるが、歯科領域ではまだ十分には評価されていない。本研究では、健全な 20 歳代の若年成人に対して、局所麻酔を行った際の音楽鎮静の効果を評価した。

【対象と方法】本研究は北海道大学病院自主臨床研究審査委員会 (承認番号 自 012-0212) の承認を受けて行った。被験者は全身的基礎疾患を有しないボランティア 16 名 (北海道大学病院歯科診療センター所属の歯科医師, 男性 8 名, 女性 8 名, 25.6 ± 3.3 歳) とした。全身状態の評価は、本モニターシステムを用いて、(A) 音楽鎮静無しの局所麻酔時、(B) 音楽鎮静を行った局所麻酔時の 2 項目をそれぞれ別の日にに行った。また最初に被験者の歯科治療に対する恐怖心および不安感を評価するために質問票 (Dental Anxiety Scale: DAS, Dental Fear Survey: DFS, Visual Analog Scale: VAS) への回答を別の日にに行った。(A) では最初に不安感に対する質問票 (VAS のみ) への回答を行い、次に麻酔前の安静時 (座位および仰臥位それぞれ 5 分間)、仰臥位で歯科用キシロカインカートリッジを用いた局所麻酔時 (2 分間)、麻酔後の安静時 (仰臥位 5 分間) のそれぞれについて収縮期・拡張期血圧、心拍数および自律神経活動の測定を行った。(B) では携帯型音楽プレーヤーを用いて音楽を聴いてもらった状態から (A) と同様の測定を行った。(A) および (B) の測定を行う順序は、中央割付法でランダム化して行った。血圧は 5 分置き、心拍数および自律神経活動 (交感神経活動の指標となる LF/HF) は連続的に測定を行い平均値および標準誤差を算出して変動特性について検討を行った。群間の比較には Wilcoxon の符号付順位検定を行った ($p < 0.05$)。

【結果】質問票の結果から歯科治療に強い恐怖心を有する被験者はいなかった。血圧および心拍数は測定期間中、大きな変化はなかった。自律神経活動の変化: LF/HF の平均値は (A) の麻酔前 (座位) で 3.59 ± 0.59 , 麻酔前 (仰臥位) で 2.36 ± 0.46 , 局所麻酔時で 1.37 ± 0.23 , 麻酔後 (仰臥位) で 1.95 ± 0.23 だった。(B) の麻酔前 (座位) で 2.47 ± 0.65 , 麻酔前 (仰臥位) で 1.55 ± 0.26 , 局所麻酔時で 1.21 ± 0.21 , 麻酔後 (仰臥位) で 1.90 ± 0.33 だった。麻酔前の座位および仰臥位で (A) に比べて (B) は有意に低い値を示した。

【考察】血圧および心拍数は測定期間を通して大きな変化は認められなかったが、交感神経活動の指標となる LF/HF は、局所麻酔中よりも、麻酔開始前、特に座位時に高い値を示した。局所麻酔時の侵害刺激よりも精神的ストレスの方が交感神経活動を高めることが確認され、麻酔開始前の座位時に音楽鎮静を行わなかった場合と行った場合を比較すると行った場合の方が LF/HF が低い値を示したことから、音楽鎮静が精神緊張緩和に有効であることが示唆された。

【結論】健全な若年成人に局所麻酔時に音楽鎮静を行うことで治療開始前の交感神経活動を低下させることができる。



唾液マーカーを用いたストレスと喫煙の関連性についての研究

¹⁾福岡歯科大学 総合歯科学講座 総合歯科学分野, ²⁾仲西歯科医院

³⁾福岡歯科大学 口腔保健学講座 口腔健康科学分野

○仲西宏介 ^{1,2)}, 谷口奈央 ¹⁾, 米田雅裕 ¹⁾, 梶尾陽介 ¹⁾, 藤本暁江 ¹⁾, 萩尾佳那子 ¹⁾, 埴岡 隆 ³⁾, 廣藤卓雄 ¹⁾

The relationship between smoking habit and stress markers in saliva

¹⁾Section of General Dentistry, Department of General Dentistry, Fukuoka Dental College

²⁾Nakanishi Dental Clinic

³⁾Department of Preventive and Public Health Dentistry, Fukuoka Dental College

○Nakanishi K^{1,2)}, Taniguchi N¹⁾, Yoneda M¹⁾, Masuo Y¹⁾, Fujimoto A¹⁾, Hagio K¹⁾, Hanioka T³⁾, Hirofuji T¹⁾

【目的】

喫煙習慣に関連する因子として、生活環境やストレスが考えられる。これまでに、福岡歯科大学口腔歯学部 6 年生を対象に、生活習慣に関するアンケート調査および心理検査を実施したところ、喫煙は、食習慣の乱れや疲労に関係することがわかった。本研究では、唾液中のストレス応答物質として知られる Cortisol, 分泌型免疫グロブリン A (S-IgA), IL-1 β , IL-6, TNF- α を定量し、喫煙習慣との関連性について調べた。

【方法】

本研究は、福岡歯科大学・福岡医療短期大学倫理委員会の承認を得て行った (第 249 号)。研究対象者は本学口腔歯学部 6 年生 51 名であり、そのうち研究への参加に同意しなかった 1 名と解析に必要な唾液量を回収できなかった 1 名を除く 49 名 (男 39 名、女 10 名、平均年齢 25.6 $\pm$ 2.1 歳) を分析対象者とした。被験者全員について、治療を要する口腔疾患を持たないこと、過去 3 ヶ月間に抗菌薬の服用がないことを確認した。飲食、喫煙から少なくとも 2 時間半経過した同時刻 (15:30) に安静時唾液 3 mL を回収し、すぐに-30 $^{\circ}$ C の冷蔵庫に保存した。唾液マーカーの定量には ELISA 法 (Salivary EIA Kit for Cortisol and S-IgA (Salimetrics), ヒトサイトカイン定量用 ELISA Kit for IL-1 β , IL-6, and TNF- α (Dialclone)) を利用した。喫煙量の評価にはブリンクマン指数を用いた。

【結果】

喫煙群は 18 名、非喫煙群は 31 名であった。男女差はなく、喫煙群は非喫煙群に比較して年齢が有意に高かった。唾液マーカーの濃度を 2 群間で比較したところ、喫煙群>非喫煙群だったものは S-IgA, IL-1 β , TNF- α であり、IL-1 β について 2 群間に有意差がみられた。Cortisol と IL-6 は喫煙群<非喫煙群だったが、2 群間に有意差はみられなかった。続いて非喫煙群のブリンクマン指数を 0 とし唾液マーカーとブリンクマン指数の相関を調べたところ、Cortisol, S-IgA, IL-1 β , TNF- α において正の相関が認められ、TNF- α で有意差がみられた。IL-6 とブリンクマン指数との間に相関は認められなかった。

【考察】

唾液中の IL-1 β は、疲労時のストレス負荷で有意に上昇することや歯周炎患者で高値を示すことが報告されている。TNF- α は、喫煙者の歯肉溝浸出液中で濃度が増加することが知られている。肥満患者を対象とした研究では、TNF- α は喫煙者の血清中で濃度が高く、インスリン抵抗性とも相関を示すと報告されている。さらにマウスの実験で TNF- α および IL-1 β は、睡眠・覚醒サイクルを乱すことにより疲労を誘発する可能性が示唆されている。前回の調査で、喫煙群は非喫煙群に比較して活気が低く疲労が高かった。喫煙群に高濃度にみられる IL-1 β や TNF- α は、疲労の誘発に関与している可能性がある。

唾液中の S-IgA は一過性、慢性のどちらのストレスにも反応するマーカーであり、慢性ストレス下で減少し、急性ストレス下ではストレスの種類により一過性に増加する場合と減少する場合があると考えられている。喫煙者における唾液中の S-IgA 濃度については、高いという報告と低いという報告が混在する。本研究で唾液中の S-IgA とブリンクマン指数は正の相関傾向を示した。唾液採取を 15:30 に実施したため、喫煙者は昼食後に喫煙をした可能性が高い。そのため、急性的な粘膜の防御反応として S-IgA 濃度が増加したことも考えられる。

【結論】

喫煙者は非喫煙者に比べて唾液中の IL-1 β 濃度が高く、喫煙量と TNF- α は正の相関を示した。これらの炎症性サイトカインは口腔内環境だけでなく、喫煙者に強くみられる疲労感にも影響している可能性がある。

殺菌消毒液としてのプラズマ処理水

¹⁾ 大阪大学大学院工学研究科アトミックデザイン研究センター、²⁾ 大阪府立産業技術総合研究所、³⁾ 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座、⁴⁾ 鶴見大学歯学部保存修復学講座、⁵⁾ 鶴見大学歯学部歯内療法学講座
○北野勝久^{1,3)}、井川聡²⁾、山崎弘光³⁾、臼井エミ⁴⁾、田崎達也⁴⁾、大島朋子^{3,1)}、山本要⁵⁾、細矢哲康⁵⁾、前田伸子³⁾、桃井保子⁴⁾

Plasma treated water (PTW) for disinfecting agent

¹⁾ Graduate School of Engineering, Osaka Univ., ²⁾ Technology Research Institute of Osaka Pref., ³⁾ Department of Oral Microbiology, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine, ⁴⁾ Department of Operative Dentistry, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine, ⁵⁾ Department of Endodontology, Tsurumi Univ. School of Dental Medicine
○KITANO Katsuhisa¹⁾³⁾, IKAWA Satoshi²⁾, YAMAZAKI Hiromitsu³⁾, USUI Emi⁴⁾, TASAKI Tatsuya⁴⁾, OHSHIMA Tomoko^{3, 1)}, YAMAMOTO Kaname⁵⁾, HOSOYA Noriyasu⁵⁾, MAEDA Nobuko³⁾, MOMOI Yasuko⁴⁾

大気圧低温プラズマ： “プラズマ”とは固体、液体、気体に次ぐ物質の第4の状態の事であり、物質は非常に高温になることでイオンと電子に解離し、電離した状態のプラズマになる。高電圧の印加により生成されたプラズマは、化学的・物理的な活性が高く、半導体製作プロセス等で必須の技術として産業利用されている。一般的には真空圧力下で生成されるが、近年の技術開発により真空容器を必要としない大気圧下のプラズマ生成が容易となってきた。その中でも、大気圧低温プラズマは適用範囲が広く、著者らは LF (Low Frequency) プラズマジェット (Fig. 1) と呼ばれる新しい大気圧プラズマ生成方法を開発し[1]、各種のバイオ応用を進めている。

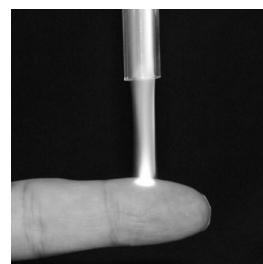


Fig. 1 LF plasmajet.

低 pH 法による効果的プラズマ殺菌法： 大気圧プラズマを人体へ照射して医療行為を行う Plasma Medicine と呼ばれる研究分野は世界的に高い注目を集めており、我々はその中でも生成した化学活性種により人体に付着した有害微生物を不活化するプラズマ消毒の研究を進めている。この領域では患部へ直接プラズマを照射する *in vivo* 研究が大半であるが、人体はぬれ環境であるために液中殺菌が重要である。これまで、液中の殺菌において pH を 4.7 以下に調整することで D 値 (Decimal Reduction Time) が 1/100 と劇的に効果が高まる「低 pH 法」を開発し[2]、歯科[3]や外科への臨床応用に向けた研究を進めているが、体液の pH が中性であるためにプラズマ消毒ではこの低 pH 法は必須の技術である。さらに、プラズマを照射した液体であるプラズマ処理水でも低 pH 法が有効であることが判明し、殺菌力のみならず化学反応速度論的な観点からも研究を進めている。プラズマ処理水の殺菌活性の半減時間は氷冷するなど温度が低い場合に伸張するために[4]、十分な照射により高い殺菌活性が残存するプラズマ処理水の生成も可能である。

殺菌消毒液としてのプラズマ処理水： 段階希釈したプラズマ処理水に菌液を混合することで殺菌力を評価したところ、計算上、100%のプラズマ処理水では、*B. subtilis* (芽胞) の菌数を 10^{-22} に、*E. coli* では 10^{-3000} にまで減少させる画期的な殺菌力があることが判明しており、滅菌も可能である。*B. subtilis* に対する化学薬液との殺菌力と比較したところ、次亜塩素酸 14%、過酸化水素 65%、過酢酸 0.33% 程度の殺菌力と同程度であった。このように高い殺菌活性を有するにも関わらず (Fig. 2)、体温程度の温度上昇で速やかに失活する (半減時間が短くなる) という特徴を有しており、消毒で用いる際、残留毒性が低いと考えられる。同程度の殺菌力を得るためには上記のような劇薬が必要だが、体温で速やかに失活するため、生体の表面のみを殺菌する消毒薬として生体為害性の少ない理想的な液体と期待できる。プラズマ処理水には複数の成分が含まれているが、殺菌活性をもたらす有効成分の分離、精製にも成功しており、薬事申請を行うために必要となる様々な作用機序の解明も進めている。

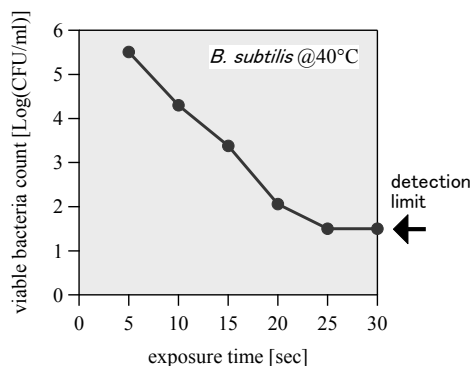


Fig. 2 Inactivation of *B. subtilis* (spore type) by the plasma treated water.

参考文献

- [1] 北野勝久ら、応用物理学会誌、77(4)、pp383、(2008). 日本国特許第 4677530 号. 米国特許 US8232729 号.
- [2] S. Ikawa. et al., Plasma Process Polymers, 7, 1, pp. 33, (2010). 日本国特許第 4408957 号.
- [3] H. Yamazaki et al., 30 (3), pp. 384, (2011). 臼井ら、日本歯科保存学会、(2015) (受理済).
- [4] 特願 2012-103800. 特願 2013-109827.

プラズマ処理水のう蝕感染象牙質に対する殺菌効果

— ヒト抜去歯を用いた感染象牙質モデルでの検討 —

¹⁾ 鶴見大学歯学部保存修復学講座, ²⁾ 鶴見大学歯学部歯内療法学講座, ³⁾ 鶴見大学歯学部口腔微生物学講座,
⁴⁾ 大阪府立産業技術総合研究所, ⁵⁾ 大阪大学大学院工学研究科アトムックデザイン研究センター
○田崎達也¹⁾, 臼井エミ¹⁾, 山本 要²⁾, 大島朋子^{3,5)}, 井川 聡⁴⁾, 北野勝久^{5,3)}, 前田伸子³⁾, 桃井保子¹⁾

Sterilization effect of the plasma treated water on the carious infected dentin

- with the infected dentin-models using extracted human teeth -

¹⁾ Department of Operative Dentistry, ²⁾ Department of Endodontology, ³⁾ Department of Oral Microbiology,
Tsurumi University School of Dental Medicine,

⁴⁾ Technology Research Institute of Osaka Prefecture,

⁵⁾ Center for Atomic and Molecular Technologies, Graduate School of Engineering, Osaka University
○TASAKI Tatsuya¹⁾, USUI Emi¹⁾, YAMAMOTO Kaname²⁾, OHSHIMA Tomoko^{3,5)}, IKAWA Satoshi⁴⁾, KITANO Katsuhisa^{5,3)},
MAEDA Nobuko³⁾, MOMOI Yasuko¹⁾

【目 的】

我々は、歯髄温存療法 (AIPC) において露髄を回避するため意図的に残置させた感染象牙質を、非侵襲的に 1 回で無菌化する新たな治療技術を模索する中で、大気圧低温プラズマによる殺菌方法に着目した。先の本学会においては、120～180 秒のプラズマ照射が、ヒト抜去歯象牙質感染モデルに対し著明な殺菌効果を示すことを報告した¹⁾。しかし臨床応用するには、特別なプラズマ発生装置が必要なことや、殺菌に要する照射時間が 180 秒と長いことが阻害要因となる。そこで本研究では、これらの課題の改善を目的とし、口腔外でプラズマ照射し活性種を高濃度に含有させたプラズマ処理水を作製し、これをヒト抜去歯う蝕感染象牙質モデルの窩洞に応用した場合の殺菌効果を検討した。

【材料と方法】

ヒト抜去大臼歯の咬合面に直径 3 mm、深さ 3 mm の円柱窩洞を形成後、歯を蒸留水中に浸漬し、オートクレーブ滅菌 (121 °C, 15 分間) した。その後、窩洞内を乳酸で 2 日間脱灰後、*Streptococcus mutans* (ATCC25175, 10^{6-7} CFU/30 μ L, グルコース添加 Tryptic Soy Broth で調整) を 1 週間毎日窩洞内に接種し、37 °C 湿潤下で培養し、感染象牙質モデルを作製した。プラズマ処理水は、大気中で純水に数分間プラズマ照射することで生成した。

生成したプラズマ処理水をバッファー (クエン酸ナトリウム, pH 3.5) とともに 30 μ L、窩洞内に滴下し、10 秒、20 秒、30 秒間静置した。バッファーのみを窩洞内に滴下し 30 秒間静置したものをコントロールとした。プラズマ処理水を窩洞に応用する前後に、スチールバーで窩洞内から象牙質を採取し、その切片を BHI 培地に懸濁し、懸濁液を寒天培地に塗抹して 2 日間培養後 CFU を算出した。結果は、Kruskal Wallis 検定と Wilcoxon 検定 ($\alpha = 0.01$) で統計解析した。

【結 果】

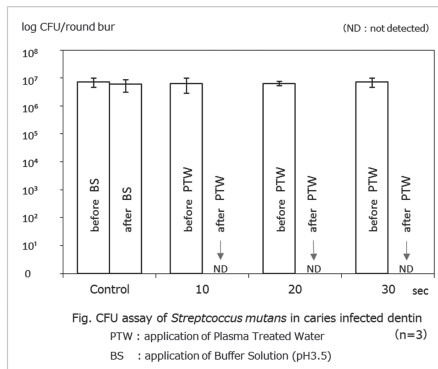
プラズマ処理水を窩洞に応用する前の *Streptococcus mutans* 生菌数は、 10^{6-7} CFU/mL であった。プラズマ処理水を応用した後の生菌数は、10 秒、20 秒、30 秒処理群とも検出限界以下であった。また、Control では 10^{6-7} CFU/mL であった。

【考 察】

プラズマの直接照射を用いた殺菌方法¹⁾よりも短時間での無菌化が実現できた。これはあらかじめ純水にプラズマを長時間照射することによって、プラズマ処理水中に高濃度で殺菌活性種が蓄積されたことによると考えられる。つまり、プラズマ処理水を用いる事は、事前にプラズマを照射した時間内に生成されるのと同程度の量の殺菌性活性種を一気に供給するという活性種濃縮方法とも言える。事前にプラズマ処理水を生成・保存しておく必要はあるものの、患者の処置時間が短くなるという利点があるため、本手法は臨床面においてきわめて有用である。

【結 論】

口腔外でプラズマ照射し活性種を高濃度に含有させたプラズマ処理水を、う蝕感染象牙質窩洞内に応用したところ、10 秒間の応用で窩洞内の *Streptococcus mutans* の生菌数は検出限界以下となった。



文献: 1) E Usui, *et al.*, Plasma Sterilization of Caries-infected Dentin Model with Reduced pH Method, 2015 日本歯科保存学会雑誌に受理 (第 58 巻 2 号に掲載予定)。

カキタンニンのポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する増殖抑制効果

神奈川歯科大学大学院歯学研究科 う蝕制御修復学講座¹, 微生物感染学講座², 神経組織発生学講座³, クリニカル・バイオマテリアル講座⁴, リリース科学工業株式会社⁵, 東北大学大学院歯学研究科 口腔修復学講座 歯科保存学分野⁶

○富山 潔¹, 長谷川晴彦¹, 椎谷 亨¹, 渡辺清子², 河田 亮³, 東 一善³, 二瓶智太郎⁴,
中村健一⁵, 奥原正國⁵, 邊見篤史⁵, 齋藤正寛⁶, 高橋 理³, 浜田信城², 寺中敏夫¹, 向井義晴¹

Growth suppression effect of condensed tannin extracted from astringent persimmon on polymicrobial biofilms

¹Dept. of Cariology and Restorative Dent, ²Dept. of Microbiology, ³Dept. of Histology, Embryology and Neuroanatomy,

⁴Dept. of Dental Materials Science, Graduate School of Dentistry, Kanagawa Dental University, ⁵Rilis Co., Ltd,

⁶Dept. of Restorative Dentistry, Div. of Operative Dentistry, Tohoku University Graduate School of Dentistry.

○TOMIYAMA Kiyoshi¹, HASEGAWA Haruhiko¹, SHIYA Toru¹, WATANABE Kiyoko², KAWATA Akira³, HIGASHI Kazuyoshi³,

NIHEI Tomotaro⁴, NAKAMURA Kenichi⁵, OKUHARA Masakuni⁵, HENMI Atsushi⁵,

SAITO Masahiro⁶, TAKAHASHI Osamu³, HAMADA Nobushiro², TERANAKA Toshio¹, MUKAI Yoshiharu¹

【研究目的】口腔バイオフィルムは齲蝕、歯周病のみならず誤嚥性肺炎の原因ともなるとされており、生体に害を及ぼさずに、持続的にバイオフィルム形成の抑制効果を発揮することができる抗菌薬の開発は重要である。

縮合型タンニンは口腔レンサ球菌の中でも *S. mutans* に吸着し易く、発育阻止や歯質および修復物への付着抑制能の高いことが指摘されている。我々は第 138, 139, 140 回本学会において、渋柿由来の縮合型タンニンを含有させた食品・化粧品等の原料 (Pancil PS-M: リリース科学工業株式会社) が濃度依存的に短期および長期培養ポリマイクロバイアルバイオフィルム構造を破壊することを報告した。今回、ポリマイクロバイアルバイオフィルムに対する渋柿由来縮合型タンニンのバイオフィルム増殖抑制効果を分析する目的で処理後の生菌数の分析を行った。

【材料および方法】ポリマイクロバイアルバイオフィルム形成用材料には直径 12 mm 厚さ 150 μ m のカバーガラス (Menzel, Braunschweig, Germany) を用いた。処理剤には、4%Pancil PS-M, Corsodyl (0.2 vol%グルコン酸クロロヘキシジン, GlaxoSmithKline), およびタンニン含有量を 4%Pancil PS-M と同量に調整した緑茶抽出物 (リリース科学工業株式会社) を用いた。実験群は、(1) 非処理群 (cont), (2) 4.0 vol% Pancil PS-M 群 (4P), (3) 0.2%グルコン酸クロロヘキシジン群 (0.2C), および (4) 緑茶抽出液 (G) の 4 群とした (n=6)。ポリマイクロバイアルバイオフィルムの培養には一被験者から採取した刺激唾液を用いた。培養液には unbuffered McBain 2005 (0.2%スクロース含有) 培養液を用い、50 倍希釈となるように刺激唾液を混入した。培養液の交換は 10 時間、14 時間のサイクルで行ない、培養 24 時間の時点で各処理剤 (4P, 0.2C, G) あるいは滅菌脱イオン水 (cont) に 5 分間浸漬後、72 時間まで嫌気条件下 (CO₂: 10.0%, H₂: 10.0%, N₂: 80.0%, 37°C) で培養した。その後、円盤状ガラス試片を除去し、形成されたバイオフィルムを超音波で剥離、Cysteine Peptone Water で段階希釈後、血液寒天培地に 4 日間培養し、生菌数の算定を行なった。算出した生菌数は One-way ANOVA および Tukey の検定により有意水準 5%にて統計学的分析を行ない、ポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果を比較検討した。

【結 果】24 時間培養したポリマイクロバイアルバイオフィルムに Pancil PS-M, グルコン酸クロロヘキシジンおよび緑茶抽出物を用いて薬液処理を行い、その後、バイオフィルム培養を継続して行った結果、すべての処理群における生菌数 (CFU/ml) は非処理群と比較して有意に低かった (cont = 7.80×10^8 , 4P = 1.26×10^7 , 0.2C = 1.09×10^8 , G = 1.10×10^8 , $p < 0.05$)。グルコン酸クロロヘキシジンと緑茶抽出物は、同等のポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果を示したが、Pancil PS-M 処理のポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果はグルコン酸クロロヘキシジンおよび緑茶抽出物に比較し有意に高かった ($p < 0.05$)。

【考 察】抗菌剤処理後に大部分の口腔内バイオフィルム構造が破壊されたとしても、細胞外多糖体で構成される基質構造が残存し、これを再形成の起点として口腔内バイオフィルムの再形成が生じることが報告されている。本研究において Pancil PS-M は、グルコン酸クロロヘキシジンおよび緑茶抽出物に比較して高いポリマイクロバイアルバイオフィルムの増殖抑制効果を示したことから、Pancil PS-M 処理は、広い抗菌スペクトル、ならびに *S. mutans* の持続的発育阻止効果が報告されているグルコン酸クロロヘキシジンや緑茶以上の抗菌効果を期待できるだけでなく、バイオフィルム残存構造を除去できる可能性を有することが示唆された。

【結 論】Pancil PS-M は口腔バイオフィルム構造を破壊するだけでなく、その後に生じるバイオフィルムの増殖も抑制することから、持続性を兼ね備えた抗菌作用を有する可能性が示唆された。

金および白金ナノ粒子の MMP-1 抑制効果と線維芽細胞に対する毒性作用

大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座歯科理工学教室

○橋本正則, 佐々木淳一, 山口 哲, 今里 聡

MMP-1 inhibition and cytotoxicity to fibroblast cells of gold and platinum nanoparticles

Department of Biomaterials Science, Osaka University, Graduate School of Dentistry

○HASHIMOTO Masanori, SASAKI Jun-ichi, YAMAGUCHI Satoshi, IMAZATO Satoshi

【緒言】

レジン/象牙質接着構造の象牙質基質から放出されるごく微量の matrix metalloproteinase (MMP)は、樹脂含浸層内のコラーゲン線維の加水分解を引き起こし、修復物の劣化をもたらす。そのため、接着界面の長期耐久性向上を目的に、各種 MMP 阻害剤に関する研究が数多く行われている。われわれは、これまで、ポリビニルピロリドン (PVP) で表面被覆された金および白金ナノ粒子が、MMP-8, 9 を効果的に抑制することを報告した。本研究では、これらのナノ粒子の MMP-1 活性抑制効果を検討するとともに、線維芽細胞様細胞に与える毒性を評価した。

【材料および方法】

1. 粒子キャラクタリゼーション: PVP を表面被覆材とする金ナノ粒子(AuPVPs)および白金ナノ粒子(PtPVPs) (ミヨシ油脂) を実験に供した。AuPVPs および PtPVPs のキャラクタリゼーションをゼータ電位測定装置 (Zetasizer Nano ZS, マルバーン) および透過型電子顕微鏡(TEM) (H-7100, 日立) を用いて行った。
2. MMP-1 アッセイ: MMP-1 活性の評価は MMP assay kit (SensoLyte kit, アナスペック) を使用した。
3. 細胞毒性試験: 試験細胞として線維芽細胞様細胞である L929 細胞 (理研) を使用した。96-well plate に 1×10^4 cells/well (α -MEM 培地) の細胞を播種して 72 時間培養後、ナノ粒子を 0 (コントロール), 1, 10, 100 または 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように調整し、さらに 24 時間培養した。24 時間後、各条件における細胞毒性を WST-8 アッセイ (CCK-8, 同仁化学) および LDH リリースアッセイ (LDH cytotoxicity detection kit, タカラバイオ) にて評価した。
4. RT-qPCR および形態観察: 各条件下での mRNA 発現 (TNF- α および IL-6) を RT-qPCR (アンピオン) により定量した。さらに、形態観察を蛍光顕微鏡 (TS1200-E, ニコン) ならびに TEM (H-7100, 日立) を用いて行った。
5. 統計処理: 実験結果は、ANOVA および Kruskal-Wallis ($p < 0.05$) にて評価した。

【結果】

1. 粒子キャラクタリゼーション: 平均粒径とゼータ電位は AuPVPs (36.3 nm, -49.4 mV) および PtPVPs (7.2 nm, -35.0 mV) であり、TEM 観察より粒子の凝集性は AuPVPs の方が強かった。
2. MMP-1 アッセイ: 両ナノ粒子において 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で MMP-1 活性が有意に抑制された。
3. 細胞毒性試験: WST-8 アッセイでは PtPVPs は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で有意な細胞毒性を示したが、AuPVPs においては全ての濃度で細胞毒性は認められなかった。LDH リリースアッセイでも WST-8 アッセイと同様な結果を得た。
4. RT-qPCR と形態観察: 本実験条件では、炎症性反応のマーカーである mRNA 発現量 (TNF- α および IL-6) の増加は認められなかった。TEM による形態観察の結果、ライソゾーム内における NPs の局在が顕著であった。しかし、NPs の核、ミトコンドリアおよび粗面小胞体などへの侵入は認められなかった。また、ライソゾーム内での粒子の凝集は AuPVPs の方が大きかった。

【考察】

MMP-1 活性の抑制はナノ粒子の PVP のカルボキシル基が MMP の酵素活性部位である亜鉛イオンとキレート結合することにより起こると考えられる。同様な結果は MMP-8, 9 でも得られている。一方、細胞毒性の発現は、粒子コア金属の細胞内でのイオン化に起因する。その細胞毒性は粒子径および凝集性が小さい PtPVPs でより強いと推測される。しかし、AuPVPs は生体安全性が高いため、各種歯科材料への応用に有用であると考えられる。

カルシウムを混和した 4-META/MMA-TBB レジン上への新生骨の接触

北海道大学大学院歯学研究科歯周・歯内療法学教室

○柳澤 剛 菅谷 勉 工藤 愛 佐藤 賢人 猪股 慶久 川浪 雅光

New bone contact on 4-META/MMA-TBB resin containing calcium

Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine

○YANAGISAWA Go, SUGAYA Tsutomu, KUDOU Megumi, SATOU Takahito, INOMATA Yoshihisa
and KAWANAMI Masamitsu

【諸言】

4-META/MMA-TBB レジンは優れた接着性と生体親和性を有することから、歯根端切除術や垂直歯根破折の接着治療、髄床底穿孔部の封鎖などに応用されてきた。しかし、レジン上に硬組織は形成されないため、歯頸部付近に大きな穿孔が生じていたり、垂直歯根破折の破折間隙が広い場合などでは、歯周ポケットが形成されることがある。そこで 4-META/MMA-TBB レジンに α -TCP および炭酸カルシウムを複合化させてカルシウムイオンを溶出させることで、レジン上への硬組織形成を促進することが可能であるかを検討した。

【材料と方法】

スーパーボンド（クリア）をポリプロピレン製チューブ内で硬化させ、直径 1mm、長さ 5mm の円柱形試料を作製した。10 週齢の Wistar 系雄性ラットの左右の大腿骨に、直径 1mm のフィッシャーバーで 2 か所穿孔した。炭酸カルシウムまたは α -TCP を 0, 40, 60wt% で混和したスーパーボンドポリマー粉末を、モノマー液 4 滴、キャタリスト 1 滴に混和し、円柱形試料表面に塗布、それぞれ 0% 群、40% 群、60% 群として直ちに埋植した。埋植は各試料の底面が骨髓腔内に位置するようにして、試料を骨表面にスーパーボンドで固定し、切開部を縫合した。術後 2, 8 週で大腿骨を採取、脱灰薄切標本を作製して H-E 染色し、試料底部の骨形成状態を光学顕微鏡で観察し、骨基質形成率、試料と骨基質間の距離、試料と骨基質との接触率を計測した。

【結果と考察】

2, 8 週ともすべての群で試料周囲に炎症性細胞浸潤は認められなかった。このことから、炭酸カルシウムや α -TCP を 60% 複合化しても、十分な重合率が得られていたと思われた。

試料周囲の新生骨形成は、5 群とも 2 週後には軟組織を介してほぼ試料全体を取り囲んでおり、骨基質形成率は高い値を示した。2, 8 週とも各群間に有意差はなく、また、各群の 2 週後と 8 週後を比較しても有意差はなかった。

試料と骨基質との接触率は、2 週後には 5 群とも有意差は認められなかったが、8 週後には α -TCP 60% 群が他の群に比べて有意に高い値を示した。したがって、 α -TCP の含有量を多くすることは、骨基質と試料との距離を近接させ、骨基質と試料が直接接する面積を増加させるのに有効であると思われた。

また、術後 2 週ではレジンと骨との間に 1~数層の類円形あるいは扁平な細胞が認められたが、術後 8 週ではこれらの細胞は減少または消失して、骨基質が試料に近接あるいは直接接している部分が観察された。しかし、骨基質の形成は骨面側からのみ生じており、レジン表面側から骨基質が形成される所見はなかった。このことから、術後 2 週で新生骨表面およびレジン表面に存在した細胞の多くは、骨芽細胞や骨芽細胞に分化し得る間葉系幹細胞であったと思われるが、試料から溶出されるカルシウムやリンは、レジン表面に存在する細胞よりも、骨基質に接していた細胞が骨基質や骨細胞との相互作用によって骨基質を産生することを促進したと考えられた。

【結論】

4-META/MMA-TBB レジンに α -TCP を 60wt% で複合化することが、レジンと骨の接触率向上に最も有効であった。

***Porphyromonas gingivalis* 口腔感染は関節リウマチモデルマウスにおいて
関節破壊を増悪する**

広島大学大学院 医歯薬保健学研究院 歯周病態学研究室

○宗永修一 應原一久 山川真宏 加治屋幹人 武田克浩

内田雄士 竹下慶 水野智仁 藤田剛 栗原英見

**The oral infection of *Porphyromonas gingivalis* exacerbates the joint destruction
in the model mice of rheumatoid arthritis**

Department of Periodontal Medicine, Division of Applied Life Science,

Institute of Biomedical & Health Sciences, Hiroshima University

○Syuichi Munenaga Kazuhisa Ouhara Masahiro Yamakawa Mikihiro Kajiya Katsuhiro Takeda

Yushi Uchida Kei Takeshita Noriyoshi Mizuno Tsuyoshi Fujita Kurihara Hidemi

【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り、近年全身疾患との関連が多数報告されている。関節リウマチ (rheumatoid arthritis, RA) は関節に腫脹、疼痛を伴う炎症性の自己免疫疾患であり、RA 患者の歯周炎罹患率は高いことが報告されている。歯周炎と RA は病因、病態で共通点が多いことに加え、歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は現在知られている細菌の中で唯一、シトルリン化酵素 (Peptidylarginine Deiminase, PAD) を産生する菌であることが注目されている。RA ではシトルリン化タンパク (CP) に対する抗体 (抗 CCP 抗体) が診断や重症度の予測において重要なマーカーとなっている。CP は内因性の PAD によって生成されるだけでなく、Pg が産生する PAD によって生成されることで RA の発症、増悪に関与していると考えられる。そのメカニズムを明らかにすることは今後の歯周炎治療ならびに RA 治療を行う上で大変重要である。そこで、本研究では Pg 感染が RA の増悪に与える影響について RA モデルマウスを用いて検討した。

【材料及び方法】

RA モデルマウスとして SKG マウス (日本クレア) の 6~8 週齢を用いた。実験群には①Pg 感染群【2%carboxymethyl cellulose (CMC) 含有 PBS 50μl 中に Pg W83 10⁸ CFU を懸濁後、綿球に含ませ 3 日おきに口腔内に留置】、②Laminarin (LA) 投与群 (10mg/100μl/mouse を腹腔内投与)、③Pg 感染かつ LA 投与群 (Pg+LA 群)、ならびに対照群として④CMC 投与群の 4 群を設定し、実験開始後 42 日目に、血清ならびに足の膝関節を採取、以下の項目について検討した。A) Pg の感染を確認するために Pg に対する血清抗体価を ELISA 法にて解析した。B) 関節炎は手足の関節を Arthritis score (坂口の分類) を用いて評価した。C) 関節リウマチの臨床マーカーである抗 CCP 抗体価、MMP-3 産生量を ELISA 法にて解析した。D) また近年、RA の治療に生物学的製剤の使用が有効であるが、炎症マーカーである CRP の発現を抑制してしまうため、CRP が疾患活動性のマーカーとして機能しないことが問題となっていた。その中で、生物学的製剤の使用に影響されない新規炎症マーカーとして報告された leucine rich alpha 2 glycoprotein (LRG1) 産生を Western Blotting 法にて解析した。E) 足の膝関節における硬組織の変化を micro CT にて解析した。F) 足の膝関節を 4%パラホルムアルデヒド固定、10%EDTA 脱灰し、HE 染色、Toluidine Blue 染色、TRAP 染色にて RA 病変部の炎症軟骨および骨破壊について組織学的に解析した。

【結果】

A) Pg の血清抗体価は①Pg 投与群ならびに③Pg+LA 群において有意に増加した。B) Arthritis score は、③Pg+LA 群は他群と比較し有意に高値を示した。C) 臨床マーカーである、MMP-3 産生量は③Pg+LA 群では他群と比較し有意に増加した。抗 CCP 抗体価は③Pg+LA 群で④CMC 群と比較し増加傾向を示した。D) 新規炎症マーカー LRG1 の産生量は③Pg+LA 群で他群と比較し有意に増加し、その産生量は Arthritis score と正の相関を示した。E) Micro CT による解析では③Pg+LA 群においてのみ骨吸収像を認めた。F) 膝関節組織は②LA 投与群では少数の炎症細胞浸潤を認めた。③Pg+LA 群においては高度な炎症細胞浸潤、骨破壊像、軟骨細胞の染色性低下を認めた。また、TRAP 陽性細胞数の増加を認めた。

【結論】

本研究の結果から、RA 病態の評価項目いずれにおいても③Pg+LA 群では他群と比較し高いことから、Pg 感染が RA の増悪に関与していることが示唆された。

カルシニューリン阻害剤に誘導される歯肉増殖症の病態解明

広島大学大学院 医歯薬保健学研究所 応用生命科学部門 歯周病態学研究室

○岡信 愛、松田真司、加治屋幹人、水野智仁、藤田 剛、栗原英見

Elucidation of the mechanisms of calcineurin inhibitors-induced gingival hyperplasia.

Department of Periodontal Medicine Division of Applied Life sciences Institute of Biomedical & Health Sciences

○Ai Okanobu, Shinji Matsuda, Mikihiro Kajiya, Noriyoshi Mizuno, Tsuyoshi Fujita, Hidemi Kurihara

目的

薬物性歯肉増殖症（以下増殖症）はヒダントイン系抗けいれん薬のフェニトイン、ジヒドロピリジン系カルシウム拮抗薬のニフェジピン、免疫抑制薬のシクロスポリンA（CsA）等によって誘導され、病理学的に上皮脚の伸長、結合組織中のコラーゲン線維の増生などを特徴とする。増殖症は歯列不正や審美性の問題だけではなく、プラークの停滞、歯周炎の悪化の誘因となり、高齢化や免疫力の低下した患者には深刻な疾患である。CsA、タクロリムス（FK506）は、カルシニューリン阻害剤（CNI）で、臓器移植患者の移植片対宿主病を予防する目的で使用される。現在増殖症の対処法は薬剤の変更・減量や歯肉切除術があるが、免疫抑制剤の変更や中止は難しく、外科処置も困難な場合が多い。これらの問題点を解決するためには増殖症を根本的に解決する治療法の開発が望まれる。そのためには増殖症の詳細なメカニズムの解明が不可欠である。ヒトにおけるFK506による増殖症は稀であるが、CsAとの違いについて詳細には検討されていない。またCsAに誘導される増殖症の発症、増悪にプラークが関与しているという報告もある。そこで、本研究では新規マウスモデルを作製して、2つの免疫抑制剤および細菌感染がどのように増殖症に関与しているかを解明し、新しい治療法開発の基盤とすることを目的とした。

材料と方法

マウスはC57BL/6（広島動物実験研究所、広島）、6-8週齢を使用した。歯頸部の細菌感染は上顎第二臼歯に絹糸を結紮することで誘導した。結紮1週間後にCsA（50 mg/kg/day）、FK506（30 mg/kg/day）の投与を開始し、4週間連続で腹腔内に投与した。免疫抑制作用そのものが増殖症に及ぼす影響を検討するため、カルシニューリン阻害作用と異なる機序を持つ免疫抑制剤のミゾリピン（MZR、15 mg/kg/day）を用いて同様に解析した。増殖症の程度は歯冠幅径に対する歯肉幅径の割合（Gingival Hyperplasia Degree）および組織のHE染色で評価した。また、細菌感染の増殖症に対する影響を明らかにするために絹糸の結紮と同時に全実験期間に抗菌薬（Ampicillin、Neomycin、Metronidazole、Vancomycin）を投与（抗菌薬前投与群）、またはCsA、FK506投与開始4週間後から2週間抗菌薬を投与（抗菌薬後投与群）してGingival Hyperplasia Degreeを用いて評価した。さらに、CsA投与中止による増殖症への影響を明らかにするためにCsA投与を4週間行った後にCsAの投与を2週間中止してGingival Hyperplasia Degreeで検討した。

結果と考察

CNI投与群のGingival Hyperplasia Degreeは、対照群と比較して有意に増加した。組織学的観察でCNI投与群の歯肉結合組織の肥厚、コラーゲン線維の増生が観察された。またMZR投与群ではGingival Hyperplasia Degreeは変化しなかった。抗菌薬前投与群では歯肉肥厚が抑制されたが、抗菌薬後投与群では歯肉肥厚が抑制されなかった。また、CsA投与中止によって歯肉肥厚は軽減した。

以上の結果から、細菌感染がCNI誘導性の増殖症発症に関与していることが示唆された。また、CNI以外の免疫抑制作用では歯肉増殖が発現しなかったことから、増殖症の発症にカルシニューリンシグナルが関与している可能性がある。また、CsA投与中止によって増殖症が改善することから、CsA濃度が保持されることによって増殖症の発症、増悪が生じることが示唆された。

マルファン症候群モデルマウスにおける歯周炎の組織破壊機構に関する研究

東北大学大学院歯学研究科口腔修復学講座歯科保存学分野
○半田 慶介、折本 愛、小林 洋子、齋藤 正寛

Tissue destruction mechanism of periodontal disease in Marfan syndrome model mouse
Tohoku University, Graduate School of Dentistry,
Department of Restorative Dentistry,
Division of Operative Dentistry
○Keisuke HANDA, Ai ORIMOTO, Yoko KOBAYASHI and Masahiro SAITO

【背景】

マルファン症候群(MFS)は Fibrillin-1(FBN-1)の常染色体優性変異によってカルシウム結合能を失い FBN-1 の不安定化と機能不全による微細線維形成機序の崩壊を起こす遺伝子性疾患である。FBN-1 を中心とする細胞外マトリックスのネットワークは微細線維形成を介して結合組織における弾性機能を担っている。そのため、MFS における FBN-1 の発現量低下による微細線維形成不全が、結合組織の脆弱化を原因とする大動脈解離、歯周炎を引き起こすと考えられている。しかし、微細線維形成不全による組織崩壊機構は未解明な部分が多く、FBN-1 を標的とした予防治療技術は開発されていない。そこで本研究では、MFS における炎症性組織崩壊亢進のメカニズムを明らかにするために、MFS モデルマウス(C1039G+/-)に歯周炎モデルマウス実験を施し、歯周組織の破壊と創傷治癒に及ぼす影響を解析することとした。

【方法】

1. 歯周病モデル;歯周炎モデルマウスを作製するために、Kawai らの方法に従い、野生型(WT)マウスおよび C1039G+/- の第二臼歯を絹糸で結紮し経時的 (3 日、7 日、14 日) に観察を行った。そして 2 週間後に結紮糸を除去し、さらに 2 週間飼育し歯周組織の治癒過程を比較検討した。
2. μ CT 解析; 通法に従い顎骨を摘出し、4 %パラホルムアルデヒドで固定後、 μ CT にて多断面層画像からの三次元画像構築し解析を行った。
3. 組織解析; および免疫組織学的に解析を行った。組織破壊のマーカーとして MMP-9、TNF- α 、Ly6G、創傷治癒のマーカーとして type I collagen (ColI) および FBN-1 の発現を蛍光免疫学的染色し共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

【結果】

歯周病モデル実験で組織崩壊を μ CT で解析した結果、結紮後 7 日以降で持続的な歯槽骨吸収の促進が観察されるが 14 日目以降では歯槽骨の再生が認められた。この過程における炎症状態を解析した結果、結紮後 3 日をピークに 7 日目まで Ly6G 陽性の好中球およびマクロファージの浸潤に伴い MMP-9、TNF- α が一過性に発現の上昇が認められた。一方、創傷治癒過程になると炎症マーカーの発現は低下し、ColI の発現が誘導されている事が示された。次に C1039G+/- に歯周病モデル実験を施すと、結紮 14 日目で歯周組織の破壊は WT と比較して有意な差は得られなかったが、結紮除去後 14 日目では骨再生に遅延が観察された。そこで C1039G+/- の創傷過程における組織変化を解析すると、WT と比較して MMP-9、TNF- α および FBN-1 の発現が上昇しており、一方 ColI の発現低下が観察された。

【考察】

歯周病モデル実験の解析結果より、結紮糸の挿入により一過性に炎症性細胞の浸潤および TNF シグナルが活性化され、また結紮糸を取り除く事で創傷治癒が誘導されることから、本モデルでは急性炎症から創傷治癒までの過程を観出する事が示された。本モデルにおいて C1039G+/- では、炎症状態の改善が遅れるため創傷治癒不全を起こしている可能性が示された。

【結論】

以上の結果から、MFS における微細線維形成不全は、歯周炎による炎症性組織崩壊には影響を及ぼさないが、ColI を含む結合組織の再構築に必須な細胞外マトリックスの合成阻害による創傷治癒不全が起きている可能性が示唆された。今後、MFS モデルにおける歯周炎増悪の分子メカニズムが解明されることで、創傷治癒改善を図る新規治療技術の開発が期待される。

ゲノムワイドアプローチによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)

○宮内静香、北垣次郎太、山下元三、山田聡、北村正博、村上伸也

Identification of responsible gene of aggressive periodontitis in Japanese population

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Shizuka Miyauchi, Jirouta Kitagaki, Motozo Yamashita, Satoru Yamada, Masahiro Kitamura,
Shinya Murakami

<目的>

侵襲性歯周炎は、若年者に発症し急速な歯周組織破壊を認める歯周炎で、その罹患率は 1000-2000 人に 1 人程度である。慢性歯周炎とは異なり侵襲性歯周炎の発症には遺伝的要因の関与が高いと考えられており、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示唆されているが、詳細は依然として不明である。これまでの侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索は、炎症等に関与することが既に報告されている単一遺伝子の遺伝子多型解析をサングー法によるシーケンシングを用いて行っているにとどまり、網羅的な遺伝子多型解析を行っていないことが本疾患の疾患関連遺伝子の解明に至っていない原因と考えられる。本研究では、次世代シーケンサーを用いて、日本人侵襲性歯周炎患者のエクソーム解析を行い、ゲノムワイドアプローチによる日本人侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索を行った。

<方法>

大阪大学歯学部附属病院を受診し侵襲性歯周炎と診断された患者のうち、本研究に対するインフォームドコンセントが得られた患者 13 名の血液を採取し、ゲノム DNA 抽出後にエクソーム解析を実施した。エクソーム解析によって得られたデータベースを基に遺伝子多型解析を行い、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子の探索を行った。さらに当該遺伝子の、骨芽細胞の分化に対する効果を検討するために、石灰化誘導培地で長期培養したヒト骨芽細胞株 (HAOB: Human Adult Osteoblast) から RNA を回収し、当該遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。

<結果>

侵襲性歯周炎患者 13 名の平均年齢は 31.37 歳、平均歯周ポケット値は 4.38mm、歯周組織の平均炎症面積 (PISA: Periodontal Inflamed Surface Area) は 1484.76mm² であった。エクソーム解析の結果、平均深度は 130.74、深度 50 以上のカバー率が 81.25% で、1 検体あたりの平均 SNP 数は 77747 であった。エクソーム解析により得られたデータベースを用いて、以下のスクリーニング方法により侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子探索を行った。1) 侵襲性歯周炎の発症に性差がないことから、X/Y 染色体は除く。2) 1000Genome データベースにおいて、マイナー対立遺伝子頻度 (MAF: Minor allele frequency) が 5% 以下である。3) *in silico* 解析の結果、タンパク質の構造の変化が *damaging* と判断される。スクリーニングの結果、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として、G protein-coupled receptor 126 (GPR126) の新規 SNP (c.3086G>A, p.Arg1029Gln) を同定した。侵襲性歯周炎疾患群での MAF が 1.724% であったのに対し、日本人の遺伝子ライブラリーデータベースにおけるコントロール群での MAF は 0.274% であり、p 値は 0.0147、オッズ比は 6.38、95% 信頼区間は 1.16~35.19 となり、SNP の出現頻度に統計学的有意差を認めた。GPR126 ノックアウトゼブラフィッシュでは椎骨の骨化が遅延し成長障害が見られることや、ゲノムワイドアプローチにより、GPR126 が思春期特発性側弯症の原因遺伝子であることが報告されており、GPR126 が骨・軟骨形成に重要な役割を担っていることが推測される。そこで、HAOB における GPR126 の発現を検討したところ、HAOB の分化が誘導されるのに伴い、GPR126 の発現が上昇することが明らかとなった。

<結論>

日本人侵襲性歯周炎患者のゲノム DNA を用いてエクソーム解析を行い、侵襲性歯周炎の疾患関連遺伝子として GPR126 を同定した。また、*in vitro* 実験の結果、GPR126 が骨芽細胞の分化に関与していることが示唆された。

副甲状腺ホルモンの間欠投与と根尖性歯周炎

¹福岡歯科大学咬合修復学講座口腔インプラント科

²ミシガン大学歯学部生物材料科学講座補綴科

○大多和昌人^{1,2}, 城戸寛史¹

Intermittent injection of Parathyroid Hormone and periapical periodontitis

¹Section of Oral Implantology, Department of Oral Rehabilitation, Fukuoka Dental College

²University of Michigan School of Dentistry

○Masato Otawa^{1,2}, Hirofumi Kido¹

I. 目的

根尖性歯周炎の治療では、根管内に存在する感染根管象牙質を物理的に除去すると同時に貼薬によって薬理的にも感染源の細菌を殺菌する方法が効果的であり広く受け入れられている。しかしながら、このような治療方法でも根尖病巣の消失が得られない難治性の根尖性歯周炎は、通常慢性的であり大きな症状を示さない。しかし、生体の抵抗力が低下したときには急性の症状を発現する。これらの事実は、生体に備わる抵抗力・治癒能力を最大限に活用することで難治性根尖性歯周炎を治療に導くことができることを意味する。演者は副甲状腺ホルモン (PTH) の間欠投与が骨改築亢進・骨折治癒促進に効果があることに着目し、PTH投与が根尖病巣の治療に有効であると考えた。本研究の目的は、PTHの間欠投与が細菌感染により引き起こされた根尖病巣の縮小に効果があるかを明らかにすることである。

II. 方法

9 週齢雄性マウス (n=7) を用いて全身麻酔下 (ケタミン, キシラジン) で下顎両側第一大臼歯と第二大臼歯歯頸部に歯垢を採取する目的で糸糸を挿入した。5 日後に除去を行い歯垢を抽出。下顎両側第一大臼歯と第二大臼歯を高速切削器具で露髄させ、右側は歯垢を混入したフィブリン糊で被覆し感染させた。反対側は単純解放創とした。4 週間後屠殺を行った。これにより根尖病巣モデルを作った。次に PTH が根尖病巣に与える影響を調べるために、同種マウス (n=14) を用いて、右側下顎第一大臼歯、第二大臼歯を全身麻酔下で露髄後、歯垢を混入したフィブリン糊で覆った。1 週間後より、群の半数のマウスに PTH を 1 日 1 回 40 μ g/kg で 21 日間皮下投与した。残りマウスは生理食塩水を投与した (コントロール)。21 日後、下顎骨と長管骨を採取、固定した。長管骨は、PTH による骨量増大効果を組織形態学的に確認するために用いた。下顎骨は脱灰研磨切片を作製し、根尖性歯周炎の状態をヘマトキシリン-エオジン染色 (H-E)、TRAP 染色で評価した。また、根尖病巣の好中球 (Ly6G 染色) や血管 (CD31) の免疫染色を行い定量した。統計分析には Paired T-test と Students' T-test を用いた。さらに、感染に対して抵抗力が劣る Leukotriene Alpha Null (LTA KO) マウスを用いて同じ実験を行い、生体の抵抗力が低下した状態における PTH の効果も調べた。

III. 結果と考察

- ・単純露髄と比較して、露髄部を歯垢を混入したフィブリン糊で被覆すると、確実に根尖性歯周炎を誘導できた。
- ・PTH を投与すると根尖病巣の進行は有意に抑制された。好中球の浸潤は有意に小さく、破骨細胞による骨吸収も有意に少なかった。
- ・血管形成は好中球の浸潤部位には認められず、根尖病巣が壊死性であることがわかった。
- ・LTA KO マウスでは根尖病巣は有意に大きく、骨吸収の進行が顕著であった。しかしながら、PTH を投与すると根尖病巣の進行は有意に抑制されていた。

従来、マウスに実験的に根尖性歯周炎を誘導する場合、単純露髄法が用いられているが、本実験の結果より、歯垢を混入したフィブリン糊で露髄部を被覆すると、確実に根尖性歯周炎が誘導できることがわかった。また、PTH の間欠投与は、根尖性歯周炎の進行を抑制する効果があることがわかった。本研究より、難治性根尖性歯周炎の治療には、根管内からのアプローチとともに PTH のような生体の治癒能力を高める薬物療法の併用も効果的であることが示唆された。

新規スフィンゴシン-1-リン酸 (S1P) シグナル伝達経路による 骨芽細胞の Smad1/5/8 リン酸化促進

九州大学大学院歯学研究院 歯周病学分野¹

福岡歯科大学口腔治療学講座 歯科保存学分野²

○東 克匡¹、松崎 英津子^{1, 2}、橋本 陽子¹、高野 愛子¹、西村 英紀¹

A novel sphingosine-1-phosphate signaling pathway through RhoA/ROCK induces phosphorylation of Smad1/5/8 in osteoblast-like cells

Department of Periodontology, Faculty of Dental Science, Kyushu University, Fukuoka, Japan¹,
Department of Operative Dentistry and Endodontology, Fukuoka Dental College, Fukuoka, Japan²

○Katsumasa Higashi¹, Etsuko Matsuzaki^{1, 2}, Yoko Hashimoto¹, Aiko Takano¹,
Fusanori Nishimura¹

【研究目的】

スフィンゴシン-1-リン酸(S1P)は血漿中に多く存在し、分化・増殖など多彩な細胞応答を引き起こす脂質メディエーターである。S1P は S1PR1-5 の 5 種類の S1P 受容体と、それに共役する G タンパク質を介して作用することが知られている。これまでに、S1P の破骨細胞前駆細胞の遊走制御を介した骨吸収抑制作用が明らかとなっているが、演者らは、S1P が PI3K/Akt/β-catenin シグナル伝達経路を介して、骨芽細胞分化に重要な alkaline phosphatase (ALP)発現を促進することを明らかにした。

ALP の発現調節には、BMP-2 シグナル伝達経路が関与することが知られており、この経路においては Smad1/5/8 リン酸化が重要な役割を果たしている。演者らは S1P が Smad1/5/8 リン酸化を増加させることを確認した (第 140 回本学会学術大会)。また、S1P による Smad1/5/8 リン酸化の促進には S1PR2 が関与する可能性を示した(第 141 回本学会学術大会)。

S1P は、S1PR2 とそれに共役する G_{12/13} タンパク質を介して RhoA/ROCK 経路を活性化することが知られている。一方、RhoA/ROCK の活性化と Smad1/5/8 リン酸化との関与が報告されていることから、S1P による S1PR2 を介した Smad1/5/8 リン酸化を媒介するシグナルとして RhoA/ROCK に着目し、検討することとした。

【材料および方法】

実験にはマウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 を用いた。細胞をプレートに播種し、翌日無血清培地に交換、さらに 24 時間培養した。その後、S1P (2 μM)を添加した。

S1P 受容体刺激伝達の阻害には、S1PR1、S1PR2 の阻害剤 W146、JTE-013、及び Gi タンパク質阻害剤 PTX を用いた。また、RhoA、ROCK 経路の阻害には、C3 toxin、Y27632 を用いた。

タンパク質発現については Western blot 法を用いて検討した。

【結果および考察】

MC3T3-E1 細胞において、S1P は RhoA/ROCK を活性化した。一方、S1P による Smad1/5/8 リン酸化の促進は、RhoA 及び ROCK 阻害剤の濃度依存性に減少した。また、S1PR2 の阻害により、RhoA/ROCK 活性化ならびに Smad1/5/8 リン酸化は抑制された。すなわち、S1P/S1PR2 による RhoA/ROCK 経路を介した新規シグナルによって、骨芽細胞における Smad1/5/8 リン酸化が促進される可能性が示された。

リン酸化 Smad1/5/8 は Co-Smad である Smad4 と複合体を形成し、細胞質から核内へ移行し転写調節を行う。また、Smad1/5/8 リン酸化や、Smad4 との複合体形成を抑制する Inhibitory (I)-Smad として Smad6/7 が知られている。そこで、S1P が細胞質/核の Smad4 及び Smad6/7 発現に及ぼす影響、またそれに対する S1PR2 や RhoA/ROCK の関与についても現在検討を行っている。

【結論】骨芽細胞様細胞株 MC3T3-E1 において、S1P は S1PR2、RhoA/ROCK を介した新規シグナル伝達経路により Smad1/5/8 リン酸化を促進させ、骨芽細胞分化に関与する可能性がある。

Lipopolysaccharide 刺激後のブタ Malassez 上皮遺残細胞の動態

東京歯科大学歯科保存学講座

○佐古 亮、村松 敬、小林 史枝、杉内 亜紀奈、佐野 陽祐、
月野和 隆、間 奈津子、末原 正崇、古澤 成博

Response of porcine epithelial rests of Malassez stimulated by lipopolysaccharide

Department of Endodontics and Clinical Cariology, Tokyo Dental College

○Ryo Sako, Takashi Muramatsu, Fumie Kobayashi, Akina Sugiuchi, Yousuke Sano,
Takashi Tsukinowa, Natsuko Aida, Masataka Suehara, Masahiro Furusawa

【目 的】

Malassez 上皮遺残細胞は歯根膜中のセメント質側に存在している歯源性上皮であり、刺激がなければ増殖しないと言われている。根尖性歯周炎は細菌感染により生じる炎症性疾患であるが、罹患した際には Malassez 上皮遺残細胞が増生し、時として歯根嚢胞が形成される。しかしながら Malassez 上皮遺残細胞と細菌刺激との関係は不明な点が多い。

本研究では培養したブタ Malassez 上皮遺残細胞をグラム陰性菌の細胞壁成分である lipopolysaccharide (LPS) で刺激し、炎症性サイトカインの発現を Luminex®法を用いて検索した。

【材料および方法】

実験には、ブタ由来 Malassez 上皮遺残細胞（北海道医療大学・安彦善裕教授より供与）を使用した。細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (D-MEM, Life Technologies 社) に 10% FBS を添加して培養した。刺激物質には *E. coli* 由来 LPS (Sigma-Aldrich) を $1\mu\text{g/ml}$ の濃度で使用した。35mm dish に $5\times 10^5\text{cells/ml}$ の密度で播種した後、LPS を添加し、1, 3, 5 日目に培養上清を回収すると共に、プロテアーゼインヒビターを加えた RIPA Buffer を用いてタンパク抽出液を回収した。その後、eBioscience®社の Porcine Chemokine/Cytokine Panel 9Plex を用いて、IFN- γ 、IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IL-12p40 の発現を検索した。

【結 果】

今回の実験では、IFN- γ 、IL-6、IL-8、IL-12p40 の 4 種のサイトカインに関してデータを得た。それらを同一刺激時間において、対照群 (LPS 非添加群) を基準とし LPS 添加群との比較を行った。

タンパク抽出液において、IFN- γ が刺激後 5 日目で約 1.63 倍の発現を示し、IL-6 が 5 日目には約 0.62 倍、IL-12p40 が 5 日目に約 1.53 倍を示した。なかでも、IL-8 は培養上清中からもその存在を検出でき、5 日目で約 0.54 倍の発現を示した。その他の群では、顕著な差は認められなかった。

刺激群、対照群それぞれの経日的な変化を追うと、培養上清中の IL-8 では LPS 添加群および対照群ともに増加傾向が認められた。タンパク抽出液では LPS 添加群および対照群の IL-6、IL-8 で増加を認めた一方、LPS 添加群の IL-12p40 と対照群の IFN- γ 、IL-12p40 は減少傾向を認めた。

【考 察】

今回、LPS 刺激後の Malassez 上皮遺残細胞の経日的変化を追った際、IL-6、IL-8 の発現上昇と IFN- γ 、IL-12p40 の減少を認めた。IL-6、IL-8 の増加が認められることから、Toll 様受容体を介した経路によるサイトカインの産生が考えられる。一方、IL-12 に刺激を受けた NK 細胞や T 細胞から分泌されることが明らかとなっている IFN- γ が減少していること、その分泌の起因となっている IL-12 自体も減少していることから、炎症を抑制する動きがあることも推測される。これらの結果より、細菌刺激に対する免疫防御反応の調節に Malassez 上皮遺残細胞が一役を担っている可能性が考えられた。

今後、本実験で検出されなかったその他のサイトカインの発現動態についても検証を行い、それぞれの相互関係を探る必要があると思われる。

老化歯根膜細胞における細胞外基質蛋白の発現変動

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)

○池上久仁子、山下元三、中村友美、柳田学、野崎剛徳、山田聡、北村正博、村上伸也

Expression profiles of extracellular matrix protein in senescent human periodontal ligament cells.

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry

○Kuniko Ikegami, Motozo Yamashita, Tomomi Nakamura, Manabu Yanagita, Takenori Nozaki,
Satoru Yamada, Masahiro Kitamura and Shinya Murakami

[研究目的]

老齢個体の臓器においては、組織の線維化を伴う退行性病変が認められる。その病態発症に関与するものとして、加齢臓器における細胞レベルでの老化(セネッセンス)、細胞老化が着目されている。細胞老化は、臓器の廃用性萎縮につながるアポトーシスやネクローシスとは異なり、誘導された老化細胞は様々なサイトカインや基質分解酵素並びに核酸を産生する。これらの老化細胞は、加齢組織の慢性炎症、癌化、幹細胞性のエイジングに関与することが明らかとなっている。

歯周組織を構成する歯根膜は、細胞外基質(ECM)蛋白の産生を介して、組織細胞の増殖・分化を誘導することで恒常性を維持するのみならず、炎症細胞の浸潤にも積極的に関与する可能性が示唆されている。一方、歯根膜は細菌感染・メカニカルストレス・活性酸素等の環境ストレスに暴露されることで老化細胞数が増大すると考えられるが、その過程における ECM 蛋白の役割については未だ十分には解明されていない。

そこで、本研究においては、ヒト歯根膜細胞の老化過程における ECM 蛋白の発現の網羅解析を行い、歯根膜細胞の老化メカニズム並びにその恒常性維持に果たす役割について検討した。

[材料と方法]

1. ヒト歯根膜細胞の老化誘導系の樹立

初代培養ヒト歯根膜細胞(ScienCell 社より購入。以下 HPDLs)に継代培養を重ねることで、*in vitro*において複製老化を誘導した。樹立した老化ヒト歯根膜細胞(継代数 30 以上)において、老化マーカーである SA- β GAL (Senescent-associated β -galactosidase) 活性、細胞内の活性酸素(ROS)の蓄積を確認し、細胞周期調節タンパクである p16、p53 の発現をモニタリングすることで細胞老化の誘導について確認した。

2. HPDLs の分泌蛋白の網羅的発現プロファイルの解析

継代数の異なる HPDLs から mRNA を回収し、DNA Microarray (60K chip、Agilent 社)にて遺伝子発現を解析し、GeneSpringGX を用いてその発現プロファイルを検討した。同じサンプルの培養上清を回収し、SDS-PAGE にて蛋白質を展開、酵素処理を行うことでペプチドを回収し、nanoLC-ESI-MS/MS 分析法(Ultimate3000HPLC, Q-Exactive Plus)にてプロテオーム解析を行い、Swiss-Prot (データベース)にて検討した。変動がみられた ECM 蛋白について、mRNA の発現を qRT-PCR 法にて、蛋白発現量を Western Blot 法並びに ELISA 法にて確認した。

[結果および考察]

継代数の増加に伴い、老化歯根膜細胞の I 型コラーゲンやペリオスチンなどの ECM 関連蛋白質の産生量は減少する一方、mRNA レベルにおいては発現量の増加を認めた。さらに、老化歯根膜細胞において、SASP(Senescent-associated secretory phenotype)蛋白である MMPs の産生の増強が認められたことから、MMP による ECM 蛋白の修飾が関与しているものと考えられる。

加齢に伴う ECM 蛋白質の質や量の変化が、歯根膜においては歯周組織の脆弱化を促進することで、歯周組織の自己修復能の低下、生体バリアの破綻に起因した病原性細菌への易感染に関与することが示唆された。

歯根膜細胞における PLAP-1 による低酸素応答の制御

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 歯周病分子病態学 (口腔治療学教室)
○山本智美、竹立匡秀、沢田啓吾、山羽聡子、森本千晶、山田聡、村上伸也

PLAP-1 Regulates Hypoxia Responses in Periodontal Ligament Cells
Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry, Osaka, Japan
○Satomi Yamamoto, Masahide Takedachi, Keigo Sawada, Satoko Yamaba,
Chiaki Morimoto, Satoru Yamada, Shinya Murakami

【研究目的】

低酸素状態における細胞や組織の応答は、低酸素誘導因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF) の活性化を介して制御され、恒常性の維持のみならず炎症や創傷治癒・組織の再生過程において重要な役割を担うことが報告されている。我々の研究室では、歯根膜特異的分子である PLAP-1(Periodontal Ligament Associated Protein-1)が歯根膜細胞の種々の細胞機能を制御することにより歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担う分子の一つであることを明らかにしてきた。本研究では、低酸素状態が PLAP-1 分子の発現に及ぼす影響とその発現制御メカニズム、及び PLAP-1 が低酸素応答に与える影響について明らかにすることを目的とした。

【材料および方法】

1. 低酸素環境での培養がヒト歯根膜細胞 (HPDL) の PLAP-1 発現に及ぼす影響に関する解析

酸素分圧の調整が可能である O₂-CO₂ インキュベーターを用いて、HPDL を低酸素環境 (1%O₂) で 12 時間培養した際の PLAP-1 mRNA 発現を RT-qPCR 法にて検討した。また、同条件にて 48 時間培養した際の培養上清中の PLAP-1 タンパクの発現を抗 PLAP-1 抗体を用いたウエスタンブロット法にて検討した。

2. HIF-1 α が PLAP-1 発現に与える影響に関する解析

HPDL の低酸素環境での HIF-1 α タンパクの発現上昇を抗 HIF-1 α 抗体を用いたウエスタンブロット法にて確認した。低酸素環境での PLAP-1 の発現制御における HIF-1 α の役割について、HIF-1 α 分解阻害剤である Deferoxamine (DFO) あるいは HIF-1 転写活性阻害薬である chetomin を用いて検討した。

3. PLAP-1 が HPDL の低酸素応答に与える影響に関する解析

siRNA 導入により PLAP-1 の発現が抑制された HPDL を作製し、同細胞の低酸素応答を HIF-1 α の発現を指標としてウエスタンブロット法にて検討した。

【結果および考察】

HPDL を低酸素環境で培養することにより、PLAP-1 及び HIF-1 α の発現が上昇することを mRNA 及びタンパクレベルで確認した。また、DFO 添加により HIF-1 α の発現上昇を確認するとともに PLAP-1 の発現上昇を認めた。さらに低酸素誘導性の PLAP-1 発現の上昇は chetomin 存在下で有意に抑制された。PLAP-1 の発現を siRNA 導入により抑制した HPDL を、低酸素環境で培養することにより HIF-1 α タンパクの発現上昇がさらに増大した。

以上の結果より、低酸素環境で HPDL は HIF-1 α 依存性に PLAP-1 の発現を誘導することが明らかとなり、低酸素環境で発現誘導された PLAP-1 は歯根膜細胞の低酸素応答の制御に関与していることが示唆された。

今後 PLAP-1 がいかなる分子機序によって歯根膜細胞の低酸素応答を制御しているのかについて詳細に解析を進めていく予定である。

肥満病態形成に対する PLAP-1 の関与

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 (口腔治療学教室)
○阪下裕美, 山田 聡, 津島賢一朗, 梶川哲宏, 栗田敏仁, 山羽聡子, 竹立匡秀, 村上伸也

Possible involvement of PLAP-1 in obesity

Department of Periodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry
○Hiromi SAKASHITA, Satoru YAMADA, Kenichiro TSUSHIMA, Tetsuhiro KAJIKAWA, Toshihito AWATA,
Satoko YAMABA, Masahide TAKEDACHI, Shinya MURAKAMI

【目的】

近年、歯周病とメタボリックシンドロームとの双方向性の関連が報告されている。近年、肥満病態と歯周病との関連も示唆されているが、これら両病態を結びつけるメカニズムの詳細については、未だ十分には明らかになっていない。一方、PLAP-1 は、歯根膜に特徴的に発現する細胞外基質であり歯根膜細胞の BMP-2 誘導性分化を制御することで歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担っている。興味深いことに、歯根膜だけでなく脂肪組織においてもその発現が認められることが近年明らかとなり、脂肪代謝においても PLAP-1 は何らかの機能を果たしていることが示唆されている。そこで本研究では、当教室で樹立した *PLAP-1* ノックアウト (KO) マウスにおける高脂肪食誘導性の肥満病態を解析することで、同病態における PLAP-1 の関与の一端を明らかにすることを目的とし、実験を行った。

【材料と方法】

C57BL/6 (WT) マウスの各組織から RNA を抽出し、*PLAP-1* の発現をリアルタイム PCR 法にて検討した。次に、WT マウスに普通食または高脂肪食を与え、経時的にグルコース負荷試験、インスリン負荷試験、また脂肪組織における *PLAP-1* の発現動態をリアルタイム PCR 法にて検討した。さらに、上顎骨のマイクロ CT 撮影を行い、セメントーエナメル境と歯槽骨頂間の距離を測定することで骨吸収状態の評価を行った。次に、5 週齢の WT マウスおよび *PLAP-1* KO マウスにグルコース負荷試験、インスリン負荷試験、および上顎骨のマイクロ CT 撮影を行った。そして、これらのマウスに 4 か月間、高脂肪食を与え、同様の試験を行い、体重変化、リアルタイム PCR 法にて精巣上体脂肪におけるマクロファージマーカー遺伝子の発現についても検討を行った。さらに、両者のマウスの血清を用いて生化学検査の比較・検討を行った。

【結果】

WT マウスの各組織を用いたリアルタイム PCR 解析の結果、歯根膜のみならず脂肪組織においても恒常的に *PLAP-1* が発現していた。この WT マウスに高脂肪食を投与することで、耐糖能およびインスリン感受性の低下が認められるようになり、肥満病態が誘導され、上顎骨の吸収が進行することが明らかとなった。一方、高脂肪食を与えた *PLAP-1* KO マウスでは、WT マウスと比較して体重増加は有意に低くなった。さらに、グルコース負荷試験およびインスリン負荷試験の値が 5 週齢では WT マウスと *PLAP-1* KO マウスで差を認めなかったものの、4 ヶ月間の高脂肪食投与の結果、それらの値は *PLAP-1* KO マウスで有意に低く、耐糖能およびインスリン感受性が高くなることが明らかとなった。リアルタイム PCR 解析の結果、精巣上体脂肪においては *PLAP-1* KO マウスでマクロファージマーカー遺伝子の発現が有意に低くなっていることが明らかとなった。また、血清の生化学検査において、*PLAP-1* KO マウスのグルコースおよび総コレステロールの値が WT マウスに比べて低値を示した。さらに上顎骨のマイクロ CT 撮影の結果、*PLAP-1* KO マウスでは高脂肪食誘導性の骨吸収が有意に抑制されていることが明らかとなった。

【結論と考察】

PLAP-1 KO マウスにおいて、高脂肪食誘導性の肥満病態が抑制されることが明らかとなった。この結果より PLAP-1 は、脂肪細胞が増殖・肥大化する過程において何らかの制御機能を果たすことにより、肥満病態の形成に対して促進的に機能している可能性が示唆された。

RabGDI α はインターフェローン-ガンマ誘導性 GTPase による 細胞内寄生性病原体の排除を制御する

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子感染制御学講座(歯科保存学教室)

大阪大学微生物病研究所 感染病態分野²

大阪大学免疫学フロンティアセンター 免疫寄生虫学研究室³

○大嶋 淳^{1,2,3}, 野杵由一郎¹, 山本雅裕^{2,3}, 林 美加子¹

RabGDI α limits interferon-inducible GTPase-promoted cell-autonomous immunity to vacuolar pathogens

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontology, Osaka University Graduate School of Dentistry,

²Department of Immunoparasitology, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

³Laboratory of Immunoparasitology, WPI Immunology Frontier Research Center, Osaka University

○Jun OHSHIMA^{1,2,3}, Yuichiro NOIRI¹, Masahiro YAMAMOTO^{2,3}, Mikako HAYASHI¹

【研究目的】

IFN- γ は細胞内に侵入した病原体の排除にきわめて重要なサイトカインである。IFN- γ は、マクロファージなどの自然免疫担当細胞に作用して約2,000種類にも及ぶ遺伝子の発現を誘導し、これらの誘導された分子群が病原体排除に関わっているものと考えられている。その中でも特に、IFN- γ 誘導性GTPase群は寄生胞膜の破壊を伴う細胞内寄生性病原体の排除にきわめて重要な分子であることが知られているが、その細胞内での動態を制御する機構についてはまだよくわかっていない。そこで本研究では、IFN- γ 誘導性GTPaseの一種であるGBPに結合する候補分子を同定し、その機能の解析を足掛かりにIFN- γ 誘導性GTPase群の細胞内動態の制御機構の解明を試みた。

【研究方法と結果】

1. IFN- γ 誘導性GTPase群の機能を制御する分子の同定

まず、GBPに対する免疫沈降および質量分析を行い、Gbp2に結合する候補分子としてRabGDI α を同定した。次に、RabGDI α のミエロイド系細胞特異的欠損マウスを作製し、細胞内寄生性病原体*Toxoplasma gondii* (*T. gondii*)を腹腔内に感染させた。その結果、RabGDI α 欠損マウスでは野生型マウスと比べて*T. gondii*の腹腔内での拡がり有意に抑えられ、*T. gondii*感染に対してより高い抵抗性を示した。

2. RabGDI α 欠損によるGBPの細胞内動態への影響に対する検討

RabGDI α の欠損が、GBPの病原体への集積に影響を及ぼしているかどうかを蛍光免疫染色で検討した。その結果、RabGDI α 欠損によりGbp2の病原体周囲への集積が特異的に増加していた。

3. IFN- γ 依存的な病原体排除におけるGbp2の機能解析

RabGDI α がGbp2と相互作用することでIFN- γ 依存的な細胞内寄生性病原体排除を抑制していることが示されたので、Gbp2の病原体排除における機能についてさらなる詳細な検討を加えた。CRISPR/Cas9を用いてGbp2欠損MEF細胞を作製して*T. gondii*を感染させてみたところ、36時間後の*T. gondii*存在量は野生型と比べてGbp2欠損細胞で有意に低下していた。このことから、Gbp2がIFN- γ 依存的な病原体排除に重要な役割を果たしていることが示された。

4. RabGDI α の非標準的インフラマソームへの関連性の検討

近年、マクロファージにおけるIFN- γ 誘導性GTPase群によるグラム陰性細菌の寄生胞の破壊が、非標準的インフラマソームを活性化する可能性が示されている。そこで次に、非標準的インフラマソームの活性化におけるGbp2の作用に対するRabGDI α の関与について検討した。野生型およびRabGDI α 欠損マクロファージに Δ SPI2 *S. Typhimurium*や*C. koseri*を感染させ、培養上清中のIL-1 α とIL-1 β の濃度についてELISAによって評価したところ、感染したRabGDI α 欠損マクロファージの培養上清におけるIL-1 α とIL-1 β の濃度は、野生型細胞におけるものより有意に高かった。

【考察および結論】

RabGDI α はIFN- γ 誘導性GTPaseの一種であるGbp2と結合して病原体周囲への集積を阻害することにより、IFN- γ 依存的な病原体排除を抑制することが明らかとなった。さらに、RabGDI α の欠損は、*T. gondii*だけでなく*S. Typhimurium*や*C. koseri*といった病原細菌へのGbp2の集積を増強させ、その結果インフラマソームの活性化につながるということがわかった。このことから、RabGDI α が多様な寄生胞形成病原体に対するGbp2依存的な細胞自律的免疫応答の負の制御因子として広く機能していることが示された。歯科・口腔領域においても近年、*P. gingivalis*、*T. forsythensis*など一部の歯周細菌が細胞内に侵入することによって宿主免疫系を回避している可能性が示唆されている。これらの菌種はいずれもグラム陰性細菌であり、そのLPSが細胞質に曝されることにより非標準的インフラマソームを活性化する可能性があることから、これらの細菌に対する細胞内免疫応答の解明が口腔領域疾患のさらなる病態解明につながるかもしれない。

歯周病感染器官培養モデルを用いた抗菌薬の効果に関する研究

九州大学 大学院 歯学研究院 口腔機能修復学講座 歯周病学分野
○竹下 正章、讃井 彰一、福田 隆男、濱地 貴文、西村 英紀

Study on the effects of antibiotics using organ culture periodontal infection model
Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○TAKESHITA MASAOKI, SANUI TERUKAZU, FUKUDA TAKAO, HAMACHI TAKAFUMI,
NISHIMURA FUSANORI

【目的】慢性歯周炎に対する標準治療はスケーリング・ルートプレーニングを中心とした感染源の機械的除去であり、抗菌剤の併用は補助的なものと考えられてきた。しかしながら日本人糖尿病患者の血糖コントロール改善に及ぼす歯周治療の効果を検討したヒロシマスタディで、局所抗菌療法を併用した治療がスケーリング・ルートプレーニングを中心とした機械的除去療法のみ群に比べ、炎症マーカーとして知られる高感度 c-反応性蛋白 (hsCRP) 値がより低下し、それに伴いヘモグロビン A1c の改善効果も大きいことが示された (Munenaga Y *et al.*, Diab Res Clin Pract, 2013)。一方、歯周病菌はポケット内に生息するのみならず、病巣組織内やさらには宿主細胞内にも感染する可能性が指摘されてきた。また、歯科治療により一過性の菌血症が惹起されることもよく知られている。以上から、演者らは機械的除去のみでは生体内に侵入した細菌を完全に除去できず、感染菌が残存する可能性があり、そのため抗菌療法の併用で炎症マーカーがより低下したのではとの仮説を設けた。そこで、各種抗菌薬の組織内への浸透性ならびに組織内歯周病細菌に対する抗菌作用を検討するため、①マウス真皮を用いた感染器官培養モデルを確立させること、②確立したモデルを用いて組織内に浸透する抗菌薬の歯周病細菌に対する作用を検討すること、を目的に本研究を行った。

【材料及び方法】歯周病原細菌として、*Porphyromonas gingivalis* W50、*Prevotella intermedia* ATCC25611、*Fusobacterium nucleatum* ATCC10953 の 3 種類を用いた。また、抗菌薬としてアジスロマイシン、セフジニル、ミノサイクリン、メトロニダゾールの計 4 種を用いた。陽性コントロールとしてペニシリン・ストレプトマイシンを用いた。まず、Brain Heart Infusion 培地中で培養した各歯周病原細菌に対して各抗菌薬 1 µg/ml (ペニシリン・ストレプトマイシンは 100 IU/100 µg) が一定の増殖阻止効果を及ぼすことを確認した。器官培養法の確立には、8 週齢オスの ddY マウスを用い、背面真皮を採取しトリミングした後、一定の濃度に培養した各歯周病原細菌を器官内部にシリンジを用い注入し、各抗菌薬入りの培地で 24 時間培養した。培養後、表面に残存する常在菌を除去するためにペニシリン・ストレプトマイシンを用いて組織表面を処理した後、洗浄しホモジナイズして血液寒天培地に組織内細菌を播種しコロニー形成菌の Colony Forming Unit を計測した。計測したコロニーから DNA を回収後、PCR 法によりコロニー形成菌が用いた歯周病細菌であることを確認した。さらに、各菌種を 2 種類組み合わせ合わせた混合感染モデルの条件を設定し、同様の実験を行うことで混合感染による抗菌効果の変化を見た。一連の検証に関して、常在菌の介入とペニシリン・ストレプトマイシンの作用の確認のために歯周病細菌を注入していないものと、ペニシリン・ストレプトマイシンを使用したものをそれぞれ陰性、陽性コントロールとして用いた。

【結果】器官培養前後にペニシリン・ストレプトマイシン処理を一定時間施すことで、マウス皮膚に常在する菌の繁殖を抑えることが確認できた。そこで、この方法を用いて各種抗菌薬が各歯周病菌単独感染モデルに及ぼす影響を検討した。各歯周病原細菌に対して、液体培地で培養したものに比べ、器官培養を用いた場合、抗菌効果が発揮されにくい薬剤があることが判明した。さらに 2 種類の菌種を組み合わせた混合感染モデルにおいて、抗菌薬の効果が単独培養した場合とは異なることが確認された。

【考察】抗菌効果の違いは組織内に浸透する効果が各抗菌薬で異なることに由来するものと考えられた。2 種類以上の菌種を用いた混合感染の場合には、さらに共培養による細菌間相互作用を考慮する必要がある。また、現在臨床の場でしばしば用いられているミノサイクリンは、今回用いた器官培養モデルでは組織内に浸透する効果としては低い可能性が示唆された。

Spry2 が *Porphyromonas gingivalis* LPS 刺激マクロファージの分化に及ぼす影響について

九州大学大学院歯学研究院口腔機能修復学講座歯周病学分野
○後村亮、讃井彰一、福田隆男、豊田敬介、山道研介、西村英紀

The effects of Spry2 on the differentiation of *Pg* LPS - stimulated macrophages.
Department of Periodontology, Division of Oral Rehabilitation, Faculty of Dental Science, Kyushu University
○Ryo Atomura, Terukazu Sanui, Takao Fukuda, Kyosuke Toyoda, Kensuke Yamamichi, Fusanori Nishimura

【目的】

Sprouty2 (Spry2) とは古典的 MAPK である ERK の抑制因子であり、これまでに発表者らは、歯周病による歯槽骨吸収部位に対して bFGF と EGF、Spry2 阻害剤を使用すると、歯肉上皮の増殖、つまりダウングロースが妨げられ、GTR 法のように物理的なバリアでなく生物学的に再生の空間が維持されつつ、同時に骨芽細胞の細胞増殖・分化および歯根膜細胞の根面遊走が誘導されることから、Spry2 は歯周組織再生の上で格好の標的分子になる可能性を見出した (Sanui *et al.* 2014, J Cell Biochem.)。そこで本研究では、Spry2 の抑制が炎症と再生を制御するマクロファージにどのように影響を及ぼすのかを検討することとした。

【材料及び方法】

マウスマクロファージ様細胞株 J774.1 を用い、リポフェクション法により Control siRNA および Spry2 siRNA を導入した後、歯周病細菌である *P. gingivalis* の LPS と IFN- γ にて刺激し、以下の解析を行った。

- リアルタイム PCR 法による M1 (炎症性) マクロファージのマーカーである iNOS および炎症性サイトカイン IL-6 の mRNA 発現量の比較
- ELISA 法による炎症性サイトカイン IL-12, IL-6, TNF- α および抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生量の比較
- ウェスタンブロッティング法による iNOS と M2 (抗炎症性) 細胞のマーカー Arginase1 のタンパク発現の比較
- マクロファージがアポトーシス細胞を速やかに排除し、生体の恒常性を維持することを efferocytosis という。マウス胸腺細胞を UV によりアポトーシスを誘導し、PI で染色した後、J774.1 細胞に播種し efferocytosis を誘導させ、共焦点レーザー顕微鏡により efferocytosis 効率を比較
- 活性型 Rac1 プルダウンアッセイによる活性型 Rac1 量の比較

【結果】

- 通常、マクロファージは IFN- γ + *Pg* LPS 刺激により M1 細胞の表現型を示すが、siRNA にて Spry2 を抑制すると J774.1 マクロファージでは iNOS の発現が抑制されると同時に Arginase1 の活性化を示した。
- Spry2 抑制マクロファージでは IFN- γ + *Pg* LPS 刺激により炎症性サイトカインである IL-12、IL-6 の産生が減少、抗炎症性サイトカインである IL-10 の産生亢進が確認された。
- アポトーシス細胞の認識と除去 (efferocytosis) の効率を検討したところ、Spry2 を抑制したマクロファージにおいて、アポトーシス胸腺細胞の efferocytosis 促進を確認した。
- J774.1 マクロファージにおいて Spry2 を抑制すると活性型 Rac1 の亢進が確認された。

【考察】

Spry2 の抑制は炎症の収束に関わる可能性があることから、新しい歯周組織再生療法の開発に対して一助を担うことが期待される。また、過去の研究より、マクロファージにおいて Rac1 が活性化されると M2 マクロファージへの分化および efferocytosis を促進させることと、腸管上皮細胞にて Spry2 の強発現が活性型 Rac1 を抑制することが分かっている。したがって、Spry2 抑制による M2 マクロファージへの分化シフトは Rac1 を介して行われる可能性が示唆された。今後はさらに Spry2 の抑制がマクロファージ分化において、どのシグナル伝達分子に作用しているのか、分子生物学的に解明する必要がある。

【結論】

Spry2 を抑制すると、歯周病細菌感染で活性化した M1 マクロファージの表現型が強制的に M2 マクロファージ型へと転換されることが示唆された。