

学会発表

第1研究班 口腔組織再生医学研究班

TNF $\alpha$  Stimulates IL-8 Expression in Synovial Cells from Human TMJ  
M. Tobe<sup>1\*</sup>, N. Ogura<sup>1</sup>, H. Sakamaki<sup>1</sup>, S. Akiba<sup>2</sup>, Y. Abiko<sup>1</sup>, H. Nagura<sup>1</sup>.  
(Nihon University School of Dentistry at Matsudo<sup>1</sup>, Asahi General  
Hospital<sup>2</sup>, Chiba, Japan)

Synovitis in Temporomandibular joint (TMJ) disorders show is characterized by increased infiltration of inflammatory cells. However, the mechanism by which these inflammatory cells are recruited into synovial tissues is not completely understood. Recently, chemokines, important mediators of leukocyte activation and chemotaxis in inflammation, have become a focus of investigation. IL-8 is a chemokine that is synthesized by monocytes/macrophages, endothelial cells, and fibroblasts. It also has important roles in chemotaxis with neutrophils and T cell subsets, and stimulates a variety of neutrophil functions. Further, IL-8 has been detected in increased levels in the synovial fluid of TMJ disorder patient, though the source has not been elucidated. In the present study, we established a primary culture of synovial cells from human TMJ and then examined the production of IL-8 in the conditioned medium treated with TNF $\alpha$ . IL-8 levels were measured by ELISA, and found to be increased in both time- and dose-dependent manners by TNF $\alpha$  stimulation. These results suggest that IL-8 produced in synovial cells may play an important role in the recruitment of leukocytes during inflammation associated with TMJ disorders. Supported by a Grant-in aid for Scientific Research (c) (11672017) from the Japan Society for the Promotion of Science.

IL-1 $\beta$  production in gingival fibroblasts from Down syndrome patients  
Y. OTSUKA\*, M. ITO, M. YAMAGUCHI, Y. ABIKO, J. MEGA  
(Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan )

Down syndrome (DS) have a high prevalence of periodontal disease. We reported that the levels of PGE<sub>2</sub> and plasminogen activator (PA) challenged with LPS from periodontal pathogen in gingival fibroblasts of DS patients were higher than those in non-DS patients. IL-1 $\beta$  is a key mediator involved in immune and inflammatory responses. In this study, since it is known that IL-1 $\beta$  stimulates PGE<sub>2</sub> and PA production, and a high level of IL-1 $\beta$  was identified in the gingiva of periodontitis, LPS-stimulated IL-1 $\beta$  production levels in gingival fibroblasts from DS patients were examined and compared with those from non-DS patients. Gingival fibroblasts were primary cultured from clinically non-inflamed tissue sites of 6 DS patients (mean: 22.0 y, 17-41 y) and 8 non- DS patients (mean: 24.5 y, 19-38 y), and were challenged with *Actinobacillus actinomycetemcomitans* LPS. The level of IL-1 $\beta$  in the cultured medium was measured by radioimmunoassay. The level of IL-1 $\beta$  without challenge of LPS was low and there were no significant differences between two groups. However, the level of LPS stimulated IL-1 $\beta$  release from gingival fibroblasts from DS patients was significantly higher ( $p < 0.001$ ) than that in non-DS patients. These findings suggest that IL-1 $\beta$  may have an important role to induced extensive and rapid inflammation in periodontal diseases of DS patients. ykboo@mascat.nihon-u.ac.jp

EFFECT OF CAFFEINE ON OSTEOLASTS DERIVED FROM FETAL RAT CALVARIA.  
K. Ide, M. Ohta, H. Sasahara, Y. Abiko and T. Nakamoto, Nihon Univ.  
School Dent. At Matsudo, Japan and LSUHSC, New Orleans, LA 70119

We have previously reported that caffeine(C) inhibits the proliferation and bone nodule formation (BNF) of osteoblast cells in vitro. The purpose of the present study is to investigate to what extent maternal C intake affects fetal growth and BNF of osteoblasts derived from the fetus whose dams were fed a diet with C. Pregnant rats were fed with either 20% protein diet or a diet supplemented with C (10,20,and 25mg/100g BW) upon fertilization. At day 19 of gestation, fetuses were removed and examined. The number of fetuses were decreased in 10 and 20 mg C groups However, in the 25mg C group there was a significant decrease (87%) of fetal number compared to noncaffeine control group ( $P < 0.05$ ). Furthermore, resorptions of embryos were increased as the dose of C increased. Osteoblasts of fetal calvarias were extracted by collagenase. The cells were cultured in a 10% fetal bovine serum and added ascorbic acid and  $\alpha$ -glycerophosphate to the medium for BNF study. The BNF was examined at days 21. BNF was decreased as the concentration of maternal C intake increased. These results indicate that if fetuses are exposed to C through maternal intake of C during pregnancy, the ability of BNF by osteoblasts derived from fetal calvaria apparently not only decreased, but also its effects are dose dependent of maternal C intake.

Supported by Suzuki Memorial Grant of Nihon University School of Dentistry at Matsudo (No. 01-2026).

ヒト歯肉由来の上皮細胞と線維芽細胞における  
発現遺伝子のマイクロアレイ解析

○安孫子 宜光<sup>1,2</sup>、岸川 道子<sup>1,2</sup>、平塚 浩  
一<sup>1,2</sup> (<sup>1</sup> 日本大学 松戸歯 生化、<sup>2</sup> 口腔科学  
研)

【目的】 歯肉の上皮細胞と線維芽細胞は、それぞれ特異的な役割をもつとともに、両細胞が相互作用をもって生体防御あるいは組織再生に働いている。しかし、そのメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、cDNA マイクロアレイを利用して、両細胞における発現遺伝子のトランスクリプトーム解析を試みた。【方法】 健常なヒト歯肉組織から両細胞を初代培養し、コンフルエント時に mRNA を分離精製して、それぞれ蛍光色素 Cy3、Cy5 の標識 cDNA を合成、混合後、マイクロアレイ (UniGEM V, Incyte Genomics、約 8,000 遺伝子) にハイブリダイズさせ、蛍光強度による相対的な各遺伝子発現量をモニターした。【結果】 2.1 倍以上高く発現している上皮細胞 590 遺伝子、線維芽細胞 440 遺伝子を同定した。これらの遺伝子から発現量の差の大きい遺伝子を選び RT-PCR 法で確かめたところ desmocollin, typell keratin, VAC-beta (上皮細胞) ; vimentin, gp130, caveolin-2 (線維芽細胞) などが確認できた。【考察】 RT-PCR 分析の mRNA レベルはアレイ分析結果と一致する結果が得られ、マイクロアレイ法の有用性が示唆された。発現差の大きい遺伝子に EST 遺伝子も多く、これら未知遺伝子の研究推進によって両細胞の相互作用を含めた細胞機能特異性の発見が期待できよう。

## バイオサイエンス応用による未来の歯科医療

安孫子 宜光

日本大学松戸歯学部生化学教室

Future Dental Therapy Utilizing Bioscience

Yoshimitsu Abiko

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

歯科材料と治療技術の飛躍的な発展により 20 世紀の歯科医療の高度な歯科医療が支えられてきた。さらなる開発が必要であり重要課題であることは当然であるが、21 世紀を迎え、生命科学的アプローチを応用した歯科医療体系の構築も必要であると指摘されている。近年、口腔感染症が心筋梗塞、肺炎、糖尿病、出産児の体重減少、骨粗鬆症肥満など種々の全身疾患のリスク因子であることが明らかにされつつある。先進的なバイオテクノロジー技術や細胞工学技術を応用した口腔感染症の制御への戦略について、口腔常在菌を味方にするう蝕のリプレイスメント療法、安全性の高い歯周病の免疫療法の開発について紹介する。また、ヒトゲノムプロジェクトなどバイオサイエンス研究は驚異的な発展をみせ、ゲノムデータベースの蓄積が進展している。近い将来、新生児の少量の血液試料からヒトの生死に関わる遺伝子疾患を遺伝子チップを用いて解析し、生活習慣の指導、化学療法、遺伝子治療などによってカスタムメイド療法を行うことで、ほとんどのヒトが寿命をまっとうできると予想されている。一般に、老化により口腔の創傷治癒能の低下や口腔感染症が増大するといわれている。また、咬合機能の低下が記憶学習能に影響すると信じられている。歯科医学にとってこれら重要なテーマについての実証科学が求められている。これらの現象の解明に向けて動物実験系を用いて遺伝子発現チップを応用した研究アプローチについても解説したい。

# バイオサイエンス応用による歯周治療の未来

日本大学松戸歯学部生化学講座

安孫子 宜光

近年、歯周病が心不全、肺炎、糖尿病、低体重出産、骨粗鬆症、などの全身疾患の重要なリスク因子であることが明らかになりつつある。20世紀の歯科医療は、薬物療法、歯科材料、歯科技術の進歩により高度な歯科医療が支えられてきた。今後とも、さらなる改善が必要であり重要な課題であることはいうまでもないが、生命科学的なアプローチを応用した歯科医療体系の構築も必要であり、その実践が急務であると思われる。

歯周病の疾病特性、生活習慣病としての認識、そして歯周治療の現状を想うと、対症療法への依存による歯周病治療には限界があることを認めざるを得ない。新たな発想によって、創物主が与えてくれた口腔組織の環境を改善し、またEBMに立脚した歯周病の診断、予防、治療法を開発し実用化に向けて推進する必要があるだろう。

ヒトゲノム計画のドラフトシーケンスが終了し、今年中にもヒトゲノムの全容が明らかにされ、人類の知的財産としてゲノムデータベース情報を共有できると期待されている。ヒト遺伝子数は40,000程度であるらしいが、一遺伝子の転写 mRNA は複数種存在し得る、また翻訳されたタンパク質が修飾を受けてさらに膨大な数の機能タンパク質種が合成される。ゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、そしてメタロボームの統合的なバイオインフォマティクス応用研究が歯周病研究にも導入されて、患者個々の歯周病リスク因子の診断、新たな治療法の開発が飛躍的に進展するのは疑いがない。将来、これらの研究成果によって、生活習慣の指導、ゲノム創薬、遺伝子治療などによる歯周病のカスタムメイド医療もいずれは可能になるだろう。本講演では、当研究室で推進している、バイオサイエンス技術を応用した新たな歯周病予防、治療アプローチの戦略について紹介したい。

1. 口腔常在菌を味方にしてプラーク形成を抑制
2. 歯周病原細菌の病原因子に対する受動免疫療法
3. 歯周病原細菌の病原性因子遺伝子発現の診断
4. Gene チップ/マイクロアレイを応用した病態解明

## 低出力レーザー照射の骨芽細胞における オステオグリシン遺伝子発現に与える影響

日本大学松戸歯学部・生化学\*

日本大学松戸歯学部・口腔診断学\*\*

日本大学松戸歯学部・口腔科学研\*\*\*

○ 浜島 進\*, 多田 充裕\*\*, \*\*\*, 笹原 広重\*\*, \*\*\*, 安孫子 宜光\*, \*\*\*

低出力レーザー照射による骨形成促進作用の機序を解明する目的で、マウス骨芽細胞様株 MC3T3-E1 細胞へレーザー照射し、経時的に mRNA を回収して、遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイで解析した。

その結果、早期発現誘導される遺伝子群中、オステオグリシン遺伝子が照射後 2 時間で 2.3 倍上昇することを見出した。

オステオグリシンは、骨より抽出された osteoinductive factor の中の骨誘導作用を示す BMP を除去した残りの画分を占める proteoglycan で、細胞外マトリックスの small leucine-rich proteoglycan (SLRP) ファミリーに属する。生体内で SLRP は主に骨マトリックス、軟骨細胞や結合組織に多く含まれ、コラーゲンや他の多くの増殖因子などと緊密に連携して、細胞増殖や分化、接着を制御していると考えられている。

また近年、オステオグリシン遺伝子欠損マウスでは、コラーゲン線維の異常が報告されている。本研究ではオステオグリシン遺伝子のレーザー照射による時間的な発現変動について更に精査する為に、realtime PCR 法を用いて検索した。

その結果、2 -4 時間後に、非照射群に比べて 1.5 -2 倍の上昇を確認した。これらのことから、低出力レーザー照射による培養骨芽細胞の増殖期初期のオステオグリシン遺伝子の発現上昇は、骨形成因子と協調して骨形成促進に対して重要な働きをしていることが示唆される。

# 機械的刺激が培養ヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす遺伝子発現変化のマイクロアレイ解析

岡山大学大学院医歯学総合研究科歯周病態学分野<sup>1</sup>、日本大学松戸歯学部生化学講座<sup>2</sup>

○山城圭介<sup>1</sup>、平塚浩一<sup>2</sup>、明貝文夫<sup>1</sup>、妹尾京子<sup>1</sup>、高柴正悟<sup>1</sup>、安孫子宜光<sup>2</sup>

## Microarray Analysis of Gene Expression Changes in Cultured Human Periodontal Ligament Fibroblasts by Mechanical Stress

Department of Pathophysiology-Periodontal Science, Okayama University Graduate School of Medicine and Dentistry<sup>1</sup>,

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo<sup>2</sup>

○Keisuke Yamashiro<sup>1</sup>, Koichi Hiratsuka<sup>2</sup>, Fumio Myokai<sup>1</sup>, Kyoko Senoo<sup>1</sup>, Shogo Takashiba<sup>1</sup>, Yoshimitsu Abiko<sup>2</sup>

キーワード: マイクロアレイ, 機械的刺激, 歯根膜線維芽細胞

### 【目的】

歯根膜は再生治療を成功させる上で必須の組織であるとともに、そこには未分化間葉細胞や前駆細胞が存在すると考えられている。歯根膜線維芽細胞は、石灰化関連因子、成長因子そして炎症性サイトカインを産生することが *in vitro* の研究で明らかにされてきた。しかしながら、この組織は口腔内では咬合力などの機械的刺激を常に受けているので、歯根膜線維芽細胞が有する特徴は、このような生理的環境で調べることが不可欠である。本研究は、機械的刺激が培養ヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす遺伝子発現変化を、マイクロアレイを用いて網羅的に解析するものである。

### 【材料と方法】

#### 1. ヒト歯根膜線維芽細胞の培養および RNA の抽出

臨床的に健康な歯周組織を有するドナー（24歳女性）から智歯を抜去し、その歯根膜を採取した。Nishimura<sup>1</sup>らの方法でヒト歯根膜線維芽細胞を単離して培養した。7回継代した細胞に、Myokai<sup>2</sup>らの方法に従って Flexercell Strain Unit (Flexcell Corporation) を用いて機械的刺激を与えた。刺激は1分間に6回の割合に5秒間ずつの緊張と弛緩を、繰り返し1時間行った。細胞からの全 RNA の抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて行った。なお、刺激を与えないものをコントロールとした。

#### 2. マイクロアレイ解析

機械的刺激が細胞に及ぼす遺伝子発現変化を、得られた全 RNA を用いてマイクロアレイで解析した。すなわち、Hiratsuka<sup>3</sup>らの方法に従い、Human Genome Focus Array (Affymetrix; 約8,500遺伝子) を用いて、標的遺伝子の mRNA 発現量を調べた。得られたデータは GeneChip Expression Analysis software (Affymetrix) と GeneSpring software (Silicone Genetics) で解析した。

#### 3. 発現を変化する標的遺伝子の抽出とその機能

上記の解析の後、機械的刺激による発現量の変化が2倍以上を示した標的遺伝子として抽出した。それらの既知の機能を GeneSpring databases (Silicone Genetics) で調べ、系統別に分類した。

#### 4. 標的遺伝子 mRNA の定量

上記遺伝子のいくつかについて、刺激を与えた細胞とコントロールの細胞における mRNA を、リアルタイム PCR で定量した。なお、用いたプライマーは標的遺伝子の cDNA 配列から設計し、定量が行えるような PCR の条件を、予め実験的に決定した。

### 【結果と考察】

#### 1. 標的遺伝子の抽出とその機能

ヒト歯根膜線維芽細胞の mRNA 発現を、3,530種の遺伝子について検出した。機械的刺激によってその発現量が2倍以上変化するものは63であった。これらの標的遺伝子の中には、細胞増殖・代謝に関係するものが約26%で最も多く、次いで細胞表面での刺激伝達に関わるものが約11%を占めていた。ヒト歯根膜線維芽細胞においては、これらの遺伝子は機械的刺激直後に転写のレベルが変化しているものと考えられる。また、これらのなかには、刺激による発現誘導が過去には報告されていない遺伝子が含まれていた。機械的刺激に対するその遺伝子の発現変化は、ヒト歯根膜線維芽細胞の特徴であるのかも知れない。

#### 2. mRNA の定量

標的遺伝子として同定した MRGX について、その mRNA 発現量が機械的刺激によって2倍以上増加していることを、リアルタイム PCR で検出した。このことは、マイクロアレイによる mRNA 量の解析データが定量性を持っていることを確認したことになる。

### 【結論】

ヒト歯根膜線維芽細胞において、機械的刺激直後にその mRNA 発現を変化する遺伝子には、細胞増殖・代謝、そして細胞表面での刺激伝達に関わるものが多いという傾向があった。

### 【文献】

1. Nishimura F et al. *J Dent Res* 74: 1303-1309, 1995.
2. Myokai F et al. *J Periodont Res* 38: 255-261, 2003.
3. Hiratsuka K et al. *J Dent Res* 81: 679-682, 2002.



## DNA マイクロアレイを用いた口腔扁平苔癬上皮細胞層の遺伝子発現解析

○市村 真奈<sup>1</sup>、平塚 浩一<sup>2</sup>、小倉 直美<sup>3</sup>、岡田 裕之<sup>4</sup>、酒巻 裕之<sup>3</sup>、小泉 由起子<sup>1</sup>、近藤 壽郎<sup>3</sup>、安孫子 宜光<sup>2</sup>、山本 正文<sup>1</sup>、大竹 繁雄<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日大 松戸歯 総合口腔医学、<sup>2</sup>日大 松戸歯 生化学、<sup>3</sup>日大 松戸歯 口腔外科学、<sup>4</sup>日大 松戸歯 病理学)

【目的】口腔扁平苔癬 (OLP) の上皮細胞層の遺伝子発現プロファイルを解析することにより、OLPの発症及び進行のメカニズムを明らかにする。【方法】コントロール3症例、OLP2症例の凍結組織切片より Laser captured microdissection systemを用いて上皮細胞層を採取し、RNA抽出、cDNA合成及びIVT増幅を施した。得られたcRNAをAffymetrix社のGeneChip® ; Expression Analysis Systemを用いて解析を行った。【結果と考察】Human Genome Focus Array上の8,793遺伝子のうち、コントロールに比べてOLPで2倍以上の発現増加が認められたのは213遺伝子、減少は1,035遺伝子であった。本遺伝子群のGene ontology解析の結果、増加遺伝子はImmunity Protein 31 (14.6%)、Structural Protein 73 (34.3%)であった。一方、減少遺伝子はNucleic Acid Binding 258 (24.9%)、Transport Protein 172 (16.6%)であった。現在、Immunity Proteinを中心に変化の著しい遺伝子について解析を加えている。

## 骨芽細胞様細胞に対する静磁場刺激の影響

日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 生化学講座, 口腔科学研究所

○新井政人, 中嶋祐, 中山洋平, 加藤直子, 高井英樹, 金東淳, 岡野総一郎,  
柴田恭子, 清水映美, 安孫子宜光, 小方頼昌

Effects of static magnetic fields on osteoblast like cells.

Department of Periodontology, Biochemistry and Research Institute of Oral Science,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Masato Arai, Yu Nakajima, Youhei Nakayama, Naoko Kato, Hideki Takai, Tonsun Kim,  
Soichiro Okano, Yasuko Shibata, Emi Shimizu, Yoshimitsu Abiko and Yorimasa Ogata

キーワード: 骨芽細胞様細胞, 静磁場, 転写調節

### 【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は, 石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有することから, 初期の石灰化における役割が注目されている非コラーゲン性タンパク質である。無重力空間を経験した宇宙飛行士で骨量の減少が報告されていることから, メカニカルストレスは, 骨の細胞機能に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。今回我々は, 磁石による静磁場の骨芽細胞様細胞への影響について, 主に BSP の転写調節に関して検索を行った。

### 【材料および方法】

- 1) ラット骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞に, 静磁場 (300 および 800 gauss ; 24 h) を作用させた後に全 RNA を抽出し, BSP mRNA 発現への効果を Real-time PCR 法を用いて検索した。
- 2) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞および骨髄由来未分化間葉細胞である SBMC 細胞に導入し, 静磁場の BSP の転写に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。
- 3) BSP 遺伝子プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

### 【結果】

- 1) Real-time PCR の結果, BSP mRNA 量は静磁場刺激により上昇した。
- 2) BSP の転写活性に対する静磁場の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した結果, UMR106 および SBMC 両細胞において, 転写開始点より-116 塩基対上流を含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC3) で転写活性が上昇した。さらに, その転写活性の上昇は, チロシンキナーゼ阻害剤により抑制された。
- 3) ゲルシフトアッセイの結果, 静磁場刺激 (300 および 800 gauss ; 24 h) により FGF2 応答配列 (FRE) への核内タンパク質の結合の増加および下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1) への核内タンパク質の結合の減少が認められた。

### 【考察および結論】

静磁場刺激により, 骨芽細胞様細胞において BSP mRNA 量の増加と転写活性の上昇が認められた。この作用は, BSP 遺伝子プロモーターに存在する FRE 配列への転写因子の結合増加と, Pit-1 配列への結合の減少によるものと考えられた。今後は, 静磁場作用による BSP の転写調節に関わる転写因子およびその情報伝達に関与するタンパク質, その他細胞機能に関与するタンパク質の変化をプロテオーム解析を含めて検索する予定である。

骨芽細胞様細胞に対するメカニカルストレスの影響のプロテオーム解析

○新井 政人<sup>1</sup>, 岡野 総一郎<sup>2</sup>, 柴田 恭子<sup>2,3</sup>, 安孫子 宜光<sup>2,3</sup>, 小方 頼昌<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>日大・松戸歯・歯周病, <sup>2</sup>日大・松戸歯・生化, <sup>3</sup>日大・松戸歯・口科研)

Proteome analysis of osteoblast like cell during mechanical stress

○Masato Arai<sup>1</sup>, Soichiro Okano<sup>2</sup>, Yasuko Shibata<sup>2,3</sup>, Yosimitsu Abiko<sup>2,3</sup>, Yorimasa Ogata<sup>1,3</sup>

(<sup>1</sup>Dept. Periodontol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, <sup>2</sup>Dept. Biochem., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, <sup>3</sup>Res. Inst, Oral Sci., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo)

【目的】 骨代謝は様々な因子によって調節されているが、その中でもメカニカルストレスは、宇宙空間を経験した宇宙飛行士で骨塩量の減少が認められることなどから、骨のリモデリングに重要な役割を果たすと考えられる。静磁場はメカニカルストレスの一つであり、静磁場を作用させることで外科的侵襲等による骨塩量の減少が抑えられたという報告がある。我々は、骨芽細胞様細胞に対する静磁場刺激により、石灰化結合組織特異的に発現する、骨シアロタンパク質(BSP)の転写が促進されることを報告した(J Cell Biochem, 2004, 91,1183-1196)。今回我々は、磁石による静磁場の骨芽細胞様細胞への影響について、プロテオーム解析を行った。

【材料および方法】 ヒト骨肉腫由来細胞であるHOS細胞を、コンフルエントになるまで  $\alpha$ -MEM培地(10%ウシ胎児血清含)にて培養した。刺激12時間前より無血清培地に交換し、刺激前に1%ウシ胎児血清を含む培地に交換し、800 gaussの静磁場を作用させた。刺激後、細胞を回収し、10% TCAおよびアセトン処理後、細胞溶解剤を加えて超音波処理し、2次元電気泳動を行った。コントロールと比較して変化の見られたタンパク質に関してXcise (島津製作所) を用いて抽出、ゲル内消化、ペプチド精製を行い、MALDI TOF-MS (島津製作所) にて質量分析を行った。得られたペプチドマスデータからヒトタンパク質データベースを用い、Mascot検索エンジンでタンパク質の同定を行った。

【結果および考察】 800 gauss の静磁場を作用させたことにより、変化の見られたタンパク質を中心に、検出されたタンパク質について網羅的解析をし、同定を行った結果、HSP, Ubiquitin-Proteasome 関連タンパク質, DNA helicase 等に変化が認められた。

## 低出力レーザー照射ヒト骨芽細胞の Gene Chip による遺伝子発現モニタリング Gene Expression Monitoring in Human Osteoblasts by low Level Laser Irradiation using Gene Chip

日本大学松戸歯学部、生化学<sup>1)</sup>、口腔診断学<sup>2)</sup>、口腔科学研究所<sup>3)</sup>

○ 浜島 進<sup>1)</sup>、多田充裕<sup>2,3)</sup>、笹原広重<sup>2,3)</sup>、安孫子宜光<sup>1,3)</sup>

低出力レーザー照射の骨形成促進の生物学的効果が知られているが、分子レベルでの作用機序については不明な点が多い。ゲノム科学研究の進展に伴ってゲノムデータベースを利用した遺伝子発現の網羅的解析技術が開発されている。本研究では、ヒト骨芽細胞へのレーザー照射によって発現が変化する遺伝子のトランスクリプトーム解析を試みた。

ヒト骨芽細胞の培養系に Ga-Al-As ダイオードレーザー(Matsushita 社; 波長 830 nm)を用いて照射し、照射群、非照射群の細胞から RNA 画分を回収して cRNA を調製し Affymetrix Gene Chip (Human Genome Focus Array 8500) を用いて解析した。解析データを Gene Spring を用いて K-mean, Gene Tree 解析し、さらに情報伝達系データベースを基盤とする網羅的解析を Ingenuity Pathway Analysis システムを用いて行なった。

レーザー照射によって遺伝子発現が変動する遺伝子群をオントロジー解析した結果、細胞分裂、シグナル伝達関連遺伝子、成長因子、成長因子受容体、イオンチャネル関連因子、Ca 調節因子など多数の遺伝子の発現が変動していた。また、レーザー照射によって細胞の増殖、機能発現に関与するシグナル伝達系に統合的な変化がみられた。ゲノムデータベースを基盤とするトランスクリプトーム解析は、低出力レーザー照射の生物学的効果の機序解明に有用であることが示唆された。

# **3567 IL-6 mRNA expression in gingival fibroblasts from Down syndrome**

**Y. TANAKA-OTSUKA**, T. FUJITA, J. MEGA, and Y. ABIKO, Nihon University, Matsudo, Chiba, Japan

**Objective:** Down syndrome (DS), one of the premature ageing syndromes, is a genetic abnormality resulting from trisomy of the 21st chromosome. DS have a high prevalence of periodontal disease. Periodontal disease of DS develops earlier, and proceeds more rapidly and extensively than that of non DS. We reported that the production of prostaglandin E2, Plasminogen activator and Interleukin-1 $\beta$  challenged with LPS derived from periodontal pathogen in gingival fibroblasts of DS were higher than those in non-DS. Interleukin-6 (IL-6) is a key mediator involved in immune and inflammatory responses. IL-6 also activates osteoclasts in vitro. The aim of this study is to clarify a specific mechanism concerning the onset and progress of periodontal disease in DS by examining biological responses such as the productions of IL-6 in DGF when stimulated with LPS. **Materials and Methods:** LPS-stimulated IL-6 production and mRNA expression in gingival fibroblasts from DS and non-DS were examined. Gingival fibroblasts were primary cultured from clinically non-inflamed tissue sites of 3 DS (8-25 years old) and 3 non- DS (15-35 years old), and were challenged with LPS derived from gram-negative bacteria, *Campyrobacter.rectus*(*C.rectus*). The cells were incubated 12 hrs with 0.05  $\mu$ g/ml LPS derived from *C.rectus*. . The IL-6 production in the cultured medium was measured by ELISA and mRNA expression was analyzed by using RT-PCR. **Results:** The production of LPS stimulated IL-6 release from gingival fibroblasts from DS was significantly higher ( $p<0.001$ ) than that in non-DS. In addition, IL-6 mRNA expression was also higher in DS than that in non-DS. **Conclusion:** These findings suggest that IL-6 may have an important role to induced extensive and rapid inflammation in periodontal diseases of DS. ykboo@mascat.nihon-u.ac.jp

Seq #372 - Periodontal Research Pathogenesis 6

2:00 PM-4:00 PM, Saturday, 12 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

Back to the Periodontal Research - Pathogenesis Program

Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session (March 9-12, 2005)

[Top Level Search](#)

## **3322 The Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-derived free radical on bone nodule formation**

**T. SATO**<sup>1</sup>, Y. TANAKA<sup>2</sup>, Y. ABIKO<sup>3</sup>, and J. MEGA<sup>2, 1</sup> Nihon University Graduate School of Dentistry at Matudo, Matudo, Chiba, Japan, <sup>2</sup> Research Institute of Oral Science, Matsudo, Chiba, Japan, <sup>3</sup> Research Institute of Oral Science, Matsudo Chiba, Japan

**Objectives:** The ability of bone formation in osteoblasts is greatly diminished during the aging process. Oxygen free radicals or reactive oxygen species (ROS) might be major contributors to the aging process. The decline of bone formation with aging might be due to the rise of oxygen-derived free radical formation. The aim of this study is to elucidate the effects of oxygen stress to the osteogenesis by osteoblasts like cells (MC3T3-E1). **Methods:** MC3T3-E1 cells were plated and grown in  $\alpha$ -MEM containing 10% fetal bovine serum (FBS) and antibiotics. Confluent cells were treated with  $\alpha$ -MEM containing 400  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Mitsubishi chemical, Japan) for 3 hr. Followed by the treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Day0), cells were incubated with the culture medium supplemented with the mineral inducing factors; 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid and 10 mM Na  $\beta$ -glycerol-phosphate. Mineral deposition was detected by Alizarin Red and von Kossa staining. Bone nodule formation was evaluated by NIH image software. Gene expressions of osterix (Osx) alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) were detected by the RT-PCR analysis. **Results:** Bone nodule formation was reduced on days 21, 30, 40 and 50 by the treatment of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Furthermore, there were significant differences in NIH image between the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated group and the control ( $p < 0.05$ ). The Osx, ALP and OCN mRNA expressions levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells were lower than those of the control. **Conclusion:** These results suggest that osteoblast damaged by the oxygen free radicals produced by the aging process may cause decline of bone nodule formation through inhibition of the differentiation and calcification processes.

Seq #355 - Bone Biology

2:00 PM-4:00 PM, Saturday, 12 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

Back to the Mineralized Tissue Program

Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session (March 9-12, 2005)

[Top Level Search](#)

# **2803 Mechanical Stress-induced Gene Expression Essential for HPLF Growth**

**K. YAMASHIRO**<sup>1</sup>, F. MYOKAI<sup>1</sup>, K. HIRATSUKA<sup>2</sup>, K. SENOO<sup>1</sup>, F. NISHIMURA<sup>1</sup>, Y. ABIKO<sup>2</sup>, and S. TAKASHIBA<sup>1</sup>, <sup>1</sup> Okayama University, Japan, <sup>2</sup> Nihon University, Chiba, Japan

**Objectives:** Differential expression of genes in human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) under physiological stress such as occlusal force is thought to be associated not only with the remodeling of ligament itself but also with the repair or regeneration of periodontal tissues. We aimed to reveal the changes of gene expression induced by mechanical stress in cultured HPLF. **Methods:** The cells were isolated from the periodontal ligaments of three donors, and subjected to 18% elongation at 6 cycles per minute for 0.5, 1, 2, and 16 hours using the Flexercell Strain Unit. Total RNA was recovered from the mechanical stress-applied and from stress-free cells as a control, and analyzed for gene expression using the oligonucleotide arrays spotted about 8,500 known human genes. The analysis and its data mining were performed as described previously (J Dent Res, 81: 679-682, 2003), and an ANOVA and k-means clustering analyses were performed. **Results:** The 122 genes changed their expression significantly. They were assigned into 8 clusters of unique gene regulation patterns including the up-regulation between 0.5 and 2 hours and the down-regulation at 16 hours of the deleted in liver cancer 1, dual specificity phosphatase 6, and tribbles homolog 1; and the up-regulation at 1 and 2 hours of the cytochrome c and TGF- $\beta$  inducible early growth response. These genes belonged to Cell Growth and Maintenance category based on the GeneSpring Database. In the other clusters, many genes, whose expressions were up-regulated in either period, belonged to the category. **Conclusion:** These results indicate that the differentially expressed genes by mechanical stress may be essential for HPLF growth because these genes are related to the cell growth and maintenance. This study was supported by a Grant-in-Aid for Exploratory Research (No. 16659579) and a Grant-in-Aid for Scientific Research A (No. 16209063) from the JSPS.

Seq #312 - IADR Hatton Senior Category

2:00 PM-4:00 PM, Saturday, 12 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

Back to the IADR/Unilever Hatton Awards Program

Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session (March 9-12, 2005)

[Top Level Search](#)

培養ヒト顎関節滑膜細胞のIL-6産生および  
遺伝子発現におけるIL-1 $\beta$ の影響  
Effect of IL-1 $\beta$  on IL-6 Production and Gene  
Expression in Cultured Synovial Cells from Human  
TMJ

日本大学松戸歯学部第1口腔外科学教室<sup>1</sup>、  
日本大学松戸歯学部生化学教室<sup>2</sup>、  
総合病院国保旭中央病院歯科口腔外科<sup>3</sup>

○小倉直美<sup>1</sup>、戸邊真希子<sup>1</sup>、酒巻裕之<sup>1</sup>、  
鯨岡裕晃<sup>3</sup>、秋葉正一<sup>3</sup>、安孫子宜光<sup>2</sup>、  
名倉英明<sup>1</sup>

ヒト顎関節滑膜細胞の分子生物学的検索を目的として、培養ヒト顎関節滑膜細胞に顎関節症患者の滑液中で上昇しているIL-1 $\beta$ を作用させ、IL-6の産生と遺伝子発現を検索した。

＜方法＞インフォームド・コンセントを行った患者の顎関節滑膜からout growth法にて培養ヒト顎関節滑膜細胞を得た。10%牛胎児血清(FCS)を添加したHam F12培地にて初代および継代培養を行い、Confluent stageの滑膜細胞にIL-1 $\beta$ を作用させた。培養上清中のIL-6量をELISA法にて、滑膜細胞は免疫染色法にてIL-6を検索した。また、IL-6の遺伝子発現はRT-PCR法にて検索した。

＜結果および考察＞滑膜細胞培養上清中のIL-6量は、IL-1 $\beta$ の作用時間・作用濃度に応じて上昇した。免疫染色ではIL-1 $\beta$ を作用していないすべての細胞はIL-6陰性であったが、IL-1 $\beta$ を作用した細胞はIL-6強陽性、弱陽性、陰性の細胞が混在していた。また、IL-6の遺伝子発現を調べたところ、IL-1 $\beta$ 刺激により、IL-6 mRNA量が増加していた。以上の結果から、滑膜細胞はIL-1 $\beta$ 刺激によりIL-6産生が上昇すること、IL-6産生の上昇はIL-6 mRNAの増加によるものと示唆された。また、IL-1 $\beta$ 刺激によりIL-6産生に差が認められたが、今後IL-1 $\beta$ のレセプターやシグナル伝達系について調べていく必要がある。



## 培養ヒト顎関節滑膜細胞の MCP-1 産生における TNF- $\alpha$ の影響

○戸辺 真希子<sup>1</sup>、小倉 直美<sup>1</sup>、酒巻 裕之<sup>1</sup>、鶴見 徹<sup>3</sup>、秋葉 正一<sup>3</sup>、安孫子 宜光<sup>2</sup>、名倉 英明<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 日本大学 松戸歯学部 口腔外科 1、<sup>2</sup> 日本大学 松戸歯学部 生化学、<sup>3</sup> 総合病院 国保 旭中央病院 歯科口腔外科

**【目的】** Monocyte chemoattractant protein (MCP) -1 は、単球の走化・活性化に関与するケモカインである。MCP-1は、慢性関節リウマチ患者の滑液中で検出され、関節疾患との関連が示唆されている。一方、TNF- $\alpha$  は、顎関節症患者の滑液中で検出され、痛みをもつ患者で高値を示すと報告されている。そこで本研究では、培養ヒト顎関節滑膜細胞を分離・培養し、TNF- $\alpha$  で作用した時の MCP-1 産生と遺伝子発現を検索した。

**【方法】** インフォームドコンセントを充分に行った、顎関節症患者の関節鏡視下手術および、関節突起骨折患者の観血的手術施行時に採取した滑膜から、outgrowth 法にて得た滑膜細胞を、20% FCS 添加 HamF12 培地で初代培養を行い、10% FCS 添加 HamF12培地で継代培養した。confluent stage の細胞に TNF- $\alpha$  を作用させ、培養上清中の MCP-1 量を ELISA 法にて測定し、細胞は免疫染色を行った。さらに、MCP-1の遺伝子発現は RT-PCR法にて検討した。

**【結果および考察】** 培養上清中の MCP-1 量は TNF- $\alpha$  作用時間および作用濃度に依存して増加した。免疫染色において control では陰性であったが、TNF- $\alpha$  作用時では MCP-1 陽性と陰性の細胞が混在していた。また、MCP-1 の mRNA 量は TNF- $\alpha$  作用により増加していた。以上の結果から、TNF- $\alpha$  による滑膜細胞の MCP-1 産生の増加は、MCP-1 遺伝子発現の亢進によることが示唆された。今後は、TNF- $\alpha$  レセプターや情報伝達系について検討する必要があると思われる。

## ヒト神経膠細胞の増殖能に対する静脈麻酔薬の影響

日本大学松戸歯学部歯科麻酔学教室

\*日本大学松戸歯学部生化学教室

○下坂典立・渋谷 鉦・安孫子宜光\*

麻酔薬の中樞神経系への作用機序については、諸説が挙げられているが解明には至っていない。また、中樞神経細胞の増殖能に及ぼす影響も報告が少なく不明である点が多い。今回、我々はヒト神経膠細胞を用い、静脈麻酔薬である propofol の増殖能に及ぼす影響について検討した。

(方法) 48 穴の培養プレートにヒト神経膠細胞 (CCF-STTG1) を約  $2.0 \times 10^4$  個/穴となるよう分注し、5% CO<sub>2</sub>、95% air、37°C の条件下で 12 時間静置後、静脈麻酔薬である propofol を 0.3、3.0 および 30  $\mu$ g/ml となるよう培地を調整し、それぞれ 12 時間作用させた。propofol を作用させない群をコントロールとした。作用後各群で作用直後、12、24、48、72 および 96 時間後 1 穴中の全細胞数をカウントし、細胞の増殖能をコントロール群と比較した。また、alamarBlue®を用いて viability を測定し、コントロール群と比較した。測定は蛍光分光光度計を用い excitation 560nm、emission 590nm にて測定した。

(結果および考察) propofol を 0.3  $\mu$ g/ml 作用させた群では作用直後および 48 時間後においてコントロール群と比較し、増殖能および viability の有意な低下が認められた。3.0  $\mu$ g/ml 群では 48 時間後において、増殖能および viability の有意な低下が、30  $\mu$ g/ml 群では測定時間の全てにおいて、増殖能および viability の有意な低下が認められた。

今回の結果から静脈麻酔薬 propofol によって神経膠細胞の増殖能が抑制される可能性が示唆された。

(文献)

小高光晴ら：麻酔、49(2)、130-138、2000

## ヒト神経膠細胞のアポトーシスに対するプロポフォール，チオペンタールの影響

下坂 典立<sup>1</sup>、安孫子 宜光<sup>2</sup>、渋谷 鉦<sup>1</sup>

<sup>1</sup>日本大学 松戸歯学部 歯科麻酔学講座、<sup>2</sup>日本大学 松戸歯学部 生化学講座

【目的】プロポフォール (PPF)，チオペンタール (Thio) は脳保護作用を認めることが示唆される報告もあるが，アポトーシスに関するものについては不明な点が多い。そこで，今回ヒト神経膠腫瘍細胞 (CCF-STTG1) を用いて，抗 Fas 抗体によりアポトーシスを誘導し，両薬剤の影響の探索を目的とした。【方法】CCF-STTG1 を 48 穴プレートに約 25% コンフルエントにて，アポトーシス前処置として培地へ IFN- $\gamma$  を 100 単位/ml に調整し培養した。培養条件は 5% CO<sub>2</sub>，95% air，37°C，各穴培地は 200  $\mu$ l とした。24 時間後，抗 Fas 抗体を 250ng/ml の濃度にて細胞のアポトーシスを誘導した。そして，PPF (5  $\mu$ g/ml) 群，Thio (10  $\mu$ g/ml) 群およびコントロール(C)群の 3 群に分類した。なお，IFN- $\gamma$  は 24 時間の前処置および常時作用させなければ，十分アポトーシスが誘導できないことを予備実験にて確認している。各群，経時的 (24h、48h、72h 後) にアポトーシスの影響をカスパーゼ 3/7 の発現により確認した。カスパーゼ 3/7 の発現は Apo-ONE (プロメガ社製) を用いて行い，蛍光測定装置で励起波長 485nm，測定波長 520nm にて測定した。【結果・考察】 PPF 群では C 群に比べ，各時間アポトーシスの有意な抑制が認められた。Thio 群では C 群に比べ，48 時間後において有意なアポトーシスの誘導が認められた。以上より，抗 Fas 抗体によりアポトーシスが誘導された CCF-STTG1 において PPF はアポトーシス抑制傾向に，Thio はアポトーシス誘導傾向に作用することが示唆された。謝辞：本研究は平成 14 年度松戸歯学部鈴木研究費及び平成 15 年度日本大学学術研究助成金によった。【参考文献】下坂典立ら：日歯麻誌，29(4)，P554，2001

## Gene Expression Profiles in LPS Stimulated Human PDL cells

A. KASAMATSU<sup>\*1</sup>, K. UZAWA<sup>1</sup>, K. SHIMADA<sup>1</sup>, M. SHIIBA<sup>1</sup>, H. BUKAWA<sup>2</sup>, H. YOKOE<sup>2</sup>, Y. OTSUKA<sup>3</sup>, Y. ABIKO<sup>3</sup>, M. KATO<sup>4</sup>, N. SEKI<sup>4</sup>, and H. TANZAWA<sup>1</sup>, <sup>1</sup> Chiba University, Graduate School of Medicine, Japan, <sup>2</sup> Chiba University Hospital, Japan, <sup>3</sup> Nihon University, Chiba, Japan, <sup>4</sup> Chiba University, Graduate school of Medicine, Japan

**Objective:** The mechanism of tissue destruction is considered in various factors in the severe periodontal disease. The purpose of this study is to determine the direct effects of lipopolysaccharide (LPS) in PDL cells. **Methods:** PDL cells were stimulated with LPS and performed expression profiling using in-house cDNA microarrays corresponding to approximately 2304 genes derived from normal oral tissue and oral SCC. We chose a gene (ID: HOR022F05) according to the results of microarray analysis. Expression of HOR022F05 mRNA and protein were examined by Real-time PCR, Western blot and Immunohistochemistry. **Results:** Although there were 8 genes whose expression was more than 2-fold up-regulated in this result of microarray analysis, 5 genes, including cytokine, were confirmed by semiquantitative RT-PCR. From this result, it investigated about HOR022F05. Real-time PCR and Western blot analyses revealed that both mRNA and protein in PDL cells were up-regulated by LPS stimulation. And immunohistochemistry, HOR022F05 protein was identified in the periodontal tissue. **Conclusion:** It has confirmed that LPS was found to enhance the HOR022F05 expression in time-dependent manners. We conclude that PDL cells produce HOR022F05 in response to the stimulation with LPS, and this may contribute to inflammatory reactions in the periodontal region.

[Seq #241 - Inflammatory Cells](#)

10:15 AM-11:30 AM, Friday, 12 March 2004

Hawaii Convention Center Exhibit Hall 1-2

---

[Back to the Periodontal Research - Pathogenesis Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 82nd General Session Program listing with access to abstracts](#)

## 周辺性エナメル上皮腫の病理組織学的検討

日本大学松戸歯学部病理学教室

小泉 康之、岡田 裕之、山本 浩嗣

エナメル上皮腫は、歯胚のエナメル器に類似した組織構造をもつ歯原性腫瘍で、その多くが顎骨中心性に発生し、軟組織に発生する周辺性のものはまれである。周辺性エナメル上皮腫は歯堤の遺残あるいは口腔粘膜上皮の基底層に由来するとされているが、未だその組織発生には不明な点が多い。また、これまでに本腫瘍に関する研究がなされているが、顎骨中心性エナメル上皮腫との比較検討はあまり行われていない。今回われわれは本腫瘍の2例を経験し、病理組織学的および免疫組織化学的にサイトケラチンや細胞増殖能などの特性を検索すると共に、顎骨中心性のものとの比較検討を行い若干の知見を得たので、文献的考察を併せて報告する。【症例1】53歳女性。1999年9月2日、エプーリスの臨床診断のもと、下顎臼歯部歯肉腫瘍の摘出術施行。【症例2】23歳女性。2001年10月9日、下顎前歯部歯肉エプーリスの臨床診断のもと、腫瘍摘出術を施行。【病理組織所見】両症例とも、歯肉粘膜に連続してエナメル上皮類似の円柱形細胞が、その内側に星状網類似の多角形細胞が濾胞状ないし叢状に配列していた。細胞増殖能において、顎骨中心性に比してやや高い値を示した。

<p>演題名 エナメル上皮腫：若年者および高齢者症例の増殖能比較</p>
<p>氏名・所属  ○小泉康之<sup>1</sup>, 久山佳代<sup>1</sup>, 岡田裕之<sup>1</sup>, 福本雅彦<sup>2</sup>, 山本浩嗣<sup>1</sup>  日本大学松戸歯学部<sup>1</sup>病理学講座<sup>2</sup>総合歯科診療学講座</p>
<p>Title A Comparative Study of the Proliferative Activity of Ameloblastoma between Younger and Elderly Patients.</p>
<p>Author's Name(s) and Institution(s) : Koizumi Yasuyuki<sup>1</sup>, Kuyama Kayo<sup>1</sup>, Okada Hiroyuki<sup>1</sup>, Fukumoto Masahiko<sup>2</sup>, Yamamoto Hirotsugu<sup>1</sup>  Depts of <sup>1</sup>Pathology and <sup>2</sup>Comprehensive Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo</p>
<p>Abstract  We compared the proliferative activity of ameloblastoma between 3 younger cases and 11 older cases. Immunohistochemically, the MIB-1 positive cell rate of the younger cases was higher than that of the older ones.</p>
<p>本文  【目的】エナメル上皮腫は20歳代に好発する良性の菌原性腫瘍であり、現在まで種々の観点からの検索が行われている。しかし若年者症例と高齢者症例の細胞増殖能を比較検討した検索は比較的乏しい。そこで今回、若年者および高齢者の症例について、病理組織学的に検索し、免疫組織化学的に細胞増殖能について比較検討したので報告する。  【材料と方法】検索材料は日本大学松戸歯学部病理学講座にて保存、エナメル上皮腫と診断された10歳以下の3症例(平均9.0歳)、60歳以上の11症例(平均67.9歳)を用いた。免疫組織化学的にMIB-1に対する抗体をDextran Polymer法にて染色、陽性細胞率を計測、有意差をStudentのt-検定にて行った。  【結果および考察】組織学的亜分類では若年者症例では濾胞型2、叢状型1症例、高齢者症例では濾胞型8、叢状型3症例であった。免疫組織化学的に、若年者症例が高齢者症例よりも、その増殖能が有意に高かった。以上の結果から、若年者症例は高齢者症例よりも、細胞増殖能が高いため、臨床的にはより留意して手術、経過観察、その他に対応すべきと考える。</p>

**AMELOBLASTOMA: COMPARISON OF HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOSTOCHEMICAL FEATURES BETWEEN YOUNG AND OLD CASES. ESPECIALLY CELL PROLIFERATION AND INTRATUMOR MICROVESSEL RATE.** Y. Koizumi., A. Kauzman., K. Kuvama., H. Okada., J. McComb, H. Yamamoto. Department of Pathology, Nihon U. School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan and Department of Oral Pathology, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Canada **Objectives:** The aim of this study was to compare young and old cases of ameloblastoma in terms of proliferative activity and intratumor microvessel density (IMVD) and area (IMVA) and to identify factors that could be implicated in determining the growth pattern (plexiform vs. follicular) of ameloblastoma.

**Materials and Methods:** A total of 23 cases were included in the study. Cases were divided into 2 groups according to age: group A  $\leq 15$  years (12 cases), and group B  $\geq 60$  years (11 cases). Each case was assessed for the predominant histological pattern (plexiform vs. follicular) and for immunoreactivity with 2 monoclonal antibodies: Ki-67 and CD-31. Ki-67 labeling index (LI), IMVD and IMVA were calculated in each case.

**Results:** Plexiform pattern was more common in group A, while follicular pattern was more frequently seen in group B. Ki-67 LI, IMVD and IMVA were significantly higher in group A. When the 2 histological patterns of ameloblastoma were compared, only IMVD and IMVA showed statistically significant differences.

**Conclusions:** Ameloblastomas in the young tend to be of the plexiform pattern and generally have a higher Ki-67 LI than those seen in older patients. Similarly, our results suggest that angiogenesis as determined by intratumor IMVD and IMVA might play an important role in determining the growth pattern of ameloblastoma.

歯肉由来線維芽細胞における PGE<sub>2</sub> 産生におよぼす PDGF の役割  
日本大学松戸歯学部薬理学講座<sup>1</sup>, 歯周病学講座<sup>2</sup>, 生理学講座<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>  
○中尾寿美<sup>1,4</sup>, 小方頼昌<sup>2,4</sup>, 古山俊介<sup>3,4</sup>, 杉谷博士<sup>3,4</sup>

*Role of PDGF on PGE<sub>2</sub> synthesis in human gingival fibroblasts*  
*Departments of Pharmacology<sup>1</sup>, Periodontology<sup>2</sup>, Physiology<sup>3</sup>, Research Institute*  
*of Oral Science<sup>4</sup>, Nihon University School of Dentistry at Matsudo*  
*Sumi Nakao<sup>1,4</sup>, Yorimasa Ogata<sup>2,4</sup>, Shunsuke Furuyama<sup>3,4</sup> and Hiroshi Sugiya<sup>3,4</sup>*

キーワード：PDGF、プロスタグランジン E<sub>2</sub>、歯肉由来線維芽細胞

【目的】

血小板由来成長因子 (PDGF) は、血小板が生成する間葉系細胞に対する増殖活性を持つ因子として報告されたが、最近では様々な細胞から産生分泌されることがわかり、細胞分化、細胞内マトリックス産生など多様な生理活性作用が明らかにされている。我々はこれまでヒト歯肉由来線維芽細胞における PDGF の効果について検討を行い、細胞内カルシウムイオン濃度の上昇を介してアラキドン酸遊離を起すことを報告している。本研究では歯肉線維芽細胞におけるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 産生に対する PDGF の役割について検討を行った。

【材料および方法】

1. 歯肉由来線維芽細胞は、臨床的に健康な歯周組織を有する患者から得られた歯肉を採取し、10% FCS 含有  $\alpha$ -MEM 培地を用いて 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養したものを使用した。
2. PGE<sub>2</sub> 量は、細胞に各種刺激を与え培養液中に遊離された PGE<sub>2</sub> 量を酵素抗体法を用いて測定した。
3. シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) mRNA 発現は、細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法により検出した。

【結果・考察】

1. 歯肉由来線維芽細胞に PDGF を単独で作用させた場合、アラキドン酸遊離は認められたが PGE<sub>2</sub> 遊離はほとんど認められなかった。IL-1 $\beta$  を 6 時間作用した細胞においては、PDGF の 30 分間刺激により、IL-1 $\beta$  単独時と比較して PGE<sub>2</sub> 遊離は明らかに増加した。この PDGF による PGE<sub>2</sub> 遊離増加は、チロシンキナーゼ阻害剤や培養液中のカルシウムイオンを除くことによって抑制された。
2. アラキドン酸単独刺激では PGE<sub>2</sub> 遊離はわずかであったが、IL-1 $\beta$  で 6 時間作用した細胞においては、PDGF と同様に、アラキドン酸により PGE<sub>2</sub> 遊離は増強された。
3. PDGF およびアラキドン酸による COX-2 mRNA 発現はほとんど認められなかったが、IL-1 $\beta$  を 6 時間作用させた細胞に PDGF およびアラキドン酸の 30 分間刺激を行うと、IL-1 $\beta$  による COX-2 mRNA 発現は増強された。

以上の結果より、IL-1 $\beta$  により priming を受けた歯肉由来線維芽細胞においては、PDGF により遊離されたアラキドン酸は COX-2 mRNA 発現増強を介し PGE<sub>2</sub> 産生を亢進することが示唆された。

【結論】

IL-1 $\beta$  により刺激を受けた歯肉由来線維芽細胞において、PDGF はアラキドン酸を介した PGE<sub>2</sub> 産生に関与することが明らかとなった。



## 骨シアロタンパク質の転写に対するリポポリサッカライドの効果

日本大学松戸歯学部保存学Ⅱ講座（歯周病学），保存学Ⅲ講座（歯内療法学）\*

○加藤直子，中山洋平，中嶋祐，齋藤綾一朗\*，佐本博，清水映美，小方頼昌

### Effects of Lipopolysaccharide on Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription .

Departments of Periodontology and Endodontics \*, Nihon Univ. School of Dent.. at Matsudo

○Naoko Kato, Youhei Nakayama, Yu Nakajima, Ryoichiro Saito\*, Hiroshi Samoto, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

#### 【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は，リン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質であり，石灰化組織特異的に発現し，アパタイト結晶形成能を有することから，初期の石灰化部位で，結晶形成に関与すると考えられている。内毒素性リポ多糖 (LPS)は，グラム陰性菌外膜の構成成分であり，ヒト単球においてPGE<sub>2</sub>およびIL-1 $\beta$ 産生を誘導すること，ヒト歯肉線維芽細胞においてIL-6産生，プラスミンおよびプラスミノゲンアクチベーター活性を上昇させることから，歯周病に進行に深く関与すると考えられる。今回我々は，LPSのBSPの転写に対する影響を検索した。

#### 【材料および方法】

- 1) 骨芽細胞様細胞であるROS17/2.8細胞を，0.01, 0.1 および1  $\mu$ g/ml のLPS (*Escherichia Coli* 0111:B4由来) にて24時間刺激を行った。また1  $\mu$ g/ml のLPSにて刺激後，経時的に全RNAを抽出し，BSPmRNA量の変化をノーザンブロット法により解析した。
- 2) 種々の長さに調節したBSPプロモーター領域を挿入したルシフェラーゼプラスミをROS17/2.8に導入し，LPS (1  $\mu$ g/ml) 刺激後のBSPの転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した。
- 3) LPSにて刺激したROS17/2.8細胞から核内タンパク質を抽出し，プロモーター配列との結合をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

#### 【結果および考察】

- 1) ノーザンブロットの結果，BSPmRNA量は経時的に24時間後まで減少し，その効果は1  $\mu$ g/mlのLPSで最大であった。
- 2) ルシフェラーゼアッセイの結果，転写開始点から-116塩基対上流およびそれよりも上流のBSPプロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクトにおいて，LPSによる転写活性の抑制効果が認められた。
- 3) ゲルシフトアッセイにて，BSPプロモーター配列と核内タンパク質との結合状態がLPS刺激前後でどの様に変化するかを検索する予定である。

#### 【結論】

ROS17/2.8細胞において，LPS刺激によりBSPmRNA量の減少およびBSPの転写活性の減少が認められた。現在，LPSによる転写の抑制に関与するBSPプロモーター配列および転写因子に関して検索を進めている。

## インシュリン様成長因子 I (IGF-I) による骨シアロタンパク質の転写の調節

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

○中山洋平, 高井英樹, 金東淳, 新井政人, 加藤直子, 中嶋祐, 清水映美, 小方頼昌

### Regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription by IGF-I.

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○ Youhei Nakayama, Hideki Takai, Tonsun Kim, Masato Arai, Naoko Kato,  
Yu Nakajima, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

キーワード：骨シアロタンパク質, インシュリン様成長因子 I, 転写調節

#### 【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は石灰化初期に硬組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質で、アパタイト結晶形成能を有することから、初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられている。IGF-I はコラーゲン合成の促進, アポトーシス抑制作用を有し, 骨芽細胞の増殖を促進することから, その作用は細胞外マトリックスの合成と石灰化の維持に関係すると考えられる。今回我々は, BSP の転写に対する IGF-I の影響を検索した。

#### 【材料および方法】

1) ヒト骨芽細胞様細胞である Saos2 細胞を用いて, BSP およびオステオポンチン(OPN)mRNA 発現をノーザンブロットにて検索を行った。2) Saos2 細胞を用いて, BSP, Cbfa-1 および Osterix mRNA 発現を RT-PCR 法にて検索を行った。3) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドをラット骨髄由来未分化間葉細胞である SBMC 細胞に導入し, IGF-I 刺激による, BSP の転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。4) BSP 遺伝子プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

#### 【結果】

1) ノーザンブロット解析の結果, BSP および OPNmRNA の発現は IGF-I (50 ng/ml) 刺激により経時的に上昇した。2) RT-PCR の結果, BSP および Cbfa-1 mRNA 量は IGF-I 刺激により経時的に上昇した。3) BSP の転写活性に対する IGF-I の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した結果, 転写開始位置より -116 塩基対上流を含む配列 (pLUC3) およびそれよりも長い配列にて転写活性の上昇が認められた。4) ゲルシフトアッセイの結果, IGF-I 刺激により FGF 応答配列(FRE)およびホメオボックス応答配列(HOX)への転写因子の結合の増加が認められた。

#### 【考察および結論】

IGF-I 刺激により BSP, OPN および Cbfa-1 mRNA 量の増加および BSP プロモーター活性の上昇が認められ, これは FRE および HOX 配列に対する転写因子の結合が増加したためと考えられた。どのような情報伝達系を介するかは今後検討する予定である。

## 骨シアロタンパク質の転写に対するメカニカルストレスの影響

日本大学松戸歯学部歯周病学教室

○中嶋祐, 金東淳, 高井英樹, 新井政人, 加藤直子, 中山洋平, 清水映美, 小方頼昌

**Effects of Mechanical Stress on Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription.**

**Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matudo.**

○Yu Nakajima, Tonsun Kim, Hideki Takai, Masato Arai, Naoko Kato,

Youhei Nakayama, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

キーワード：骨シアロタンパク質, メカニカルストレス, 転写調節

### 【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は石灰化結合組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有すること, 初期の石灰化部位で発現することなどから石灰化における役割が注目されているタンパク質である。クロルプロマジン(Chlorpromazine)は向精神薬として用いられており, 培養細胞に用いることにより細胞に浸透圧によるメカニカルストレスを加えることが知られている。今回我々は, クロルプロマジンによるメカニカルストレスが BSP の転写に対する影響について検索を行った。

### 【材料及び方法】

(1)骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞に, 10, 100 ng, 1, 10  $\mu\text{g/ml}$  の各濃度のクロルプロマジンを作用させた。また, クロルプロマジン作用後経時的に細胞を回収し, 全 RNA を抽出後ノーザンブロット解析を行い, BSPmRNA 発現に対するクロルプロマジンの効果を検討した。(2)種々の長さの BSP プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを用い, BSP の転写に対するクロルプロマジンの影響を, ルシフェラーゼアッセイにより検索した。(3) BSP 遺伝子プロモーター配列と ROS17/2.8 細胞の核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにより検索した。

### 【結果】

(1)ノーザンブロット解析の結果, クロルプロマジンは, 濃度依存的に BSPmRNA 量を減少させ, 10  $\mu\text{g/ml}$  の濃度では, 経時的に BSPmRNA 量を減少させた。(2)クロルプロマジン刺激 24 時間後に, -116 塩基対上流までの BSP プロモーター領域を含むコンストラクト(pLUC3)で, BSP の転写活性の抑制が認められた。(3)ゲルシフトアッセイの結果, FGF 応答配列(FRE)において経時的に核内タンパク質との結合が抑制された。

### 【考察および結論】

クロルプロマジン刺激により BSPmRNA 量の減少及び BSP の転写の抑制 (10  $\mu\text{g/ml}$ , 24h) が認められた, これは FRE に結合する核内転写因子を介していることが示唆された。今後の展望としては, より未分化な細胞などを用いて同様の実験を行い, クロルプロマジンによるメカニカルストレスが骨芽細胞に影響について検索を行っていく予定である。

## 骨シアラタンパク質遺伝子プロモーターにおける 副甲状腺ホルモン応答配列の同定

日本大学松戸歯学部保存学3 講座 (歯内療法学), 保存学2 講座 (歯周病学) \*

○齋藤綾一朗, 清水映美\*, 山崎宗与, 小方頼昌\*

Identification of Parathyroid Hormone Response Element in the Bone Sialoprotein Gene Promoter  
Departments of Endodontics and Periodontology\*, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Ryoichiro Saito, Emi Shimizu\*, Muneyoshi Yamazaki and Yorimasa Ogata\*,

### 【目的】

骨シアラタンパク質 (BSP) は, 石灰化結合組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有することから, 初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられている非コラーゲン性タンパク質である。今回我々は, 骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を用いて骨代謝に重要なホルモンである副甲状腺ホルモン (PTH) の BSP の遺伝子発現に対する影響を検索した。

### 【材料および方法】

1) 骨芽細胞様細胞である UMR 106 細胞を  $10^{-8}$ M の PTH にて刺激後, 経時的に全 RNA を抽出し, BSP mRNA 量の変化をノーザンブロット法により解析した。2) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞に導入し, PTH 刺激による BSP の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) PTH 刺激後の UMR 106 細胞から核内タンパク質を抽出し, プロモーター配列との結合をゲルシフトアッセイにて検索を行った。4) 同核内タンパク質を用いて, 転写因子の同定および結合の変化をウエスタンブロット法にて解析した。

### 【結果および考察】

1) PTH 刺激により BSP mRNA 量はコントロールに比べ3 時間後に減少し, 6 時間後に再び増加した。2) ルシフェラーゼアッセイの結果, 転写開始点より-116 塩基対上流までのプロモーター配列およびそれよりも長い配列を含むコンストラクト(pLUC3, 4, 5)で PTH 刺激による転写活性の上昇が認められた。3) ハービマイシン A (チロシンキナーゼ阻害剤) および H89 (A キナーゼ阻害剤) により, PTH 刺激による転写活性の上昇が抑制された。4) pLUC3 のプロモーター配列を一部変化させたプラスミドを用いて PTH の効果を検索した結果, 下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1) が PTH の作用に関与すると考えられた。5) Pit-1 配列に結合する核内タンパク質が, PTH 刺激によりどのように変化するかは現在検索中である。6) PTH 刺激による転写因子の結合変化に関して現在検索中である。

### 【結論】

PTH 刺激により BSP mRNA 量の増加および BSP の転写活性の上昇が認められた。PTH による転写の調節は Pit-1 配列を介すると考えられた。現在, 同配列に結合する核内タンパク質の検索を行っている。

### 13. 乳癌細胞に対するエストロゲン及び塩基性線維芽細胞成長因子 (FGF2) の影響

歯周病学講座

○金 東淳, 高井英樹, 中山洋平  
新井政人, 加藤直子, 中嶋 祐  
清水映美, 小方頼昌

【目的】骨シアロタンパク質 (BSP) は石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であるが, 近年, 骨に高頻度に転移する乳癌, 肺癌及び前立腺癌病巣での異所性発現が報告されている。

今回我々は, 乳癌細胞における BSP 及び骨関連転写因子 (Runx2) の発現に対する, エストロゲン及び FGF2 の影響について検索を行なった。

【材料及び方法】ヒト乳癌細胞である MCF7 及び MDA-MB-453 細胞を,  $10^{-8}$  M のエストロゲンまたは 10 ng/ml の FGF2 にて刺激後, 経時的に細胞を回収し全 RNA を抽出した。RT-PCR 法にて BSP 及び Runx2 mRNA 発現に対するエストロゲン及び FGF2 の効果を検討した。

さらに, 経時的に細胞を回収後, 細胞内及び核内タンパク質を抽出し, BSP と Runx2 のタンパク質発現をウェスタンブロット法にて検索した。また, ラット BSP 遺伝子プロモーター配列と上記細胞の核内タンパク質との結合の変化を, ゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果】RT-PCR の結果, BSP mRNA は上記細胞で検出されなかった。MCF7 細胞の Runx2 mRNA はエストロゲン刺激で経時的に減少し, FGF2 刺激で増加した。

MDA-MB-453 細胞では, エストロゲン, FGF2 刺激ともに Runx2 mRNA は検出されなかった。ゲルシフトアッセイの結果, 両細胞の核内タンパク質と FGF2 応答配列 (FRE; -90 塩基対上流) との結合は, 経時的に上昇した。

ウェスタンブロット法の結果, Runx2 のタンパク質発現は, 上記刺激後, MCF7 細胞で減少し, MDA-MB-453 細胞で増加した。

【結論】エストロゲン及び FGF2 刺激により, 両細胞で BSP mRNA は検出されなかった。しかし, 骨芽細胞の分化に重要な転写因子である Runx2 の mRNA 及びタンパク質が乳癌細胞において検出され, エストロゲン及び FGF2 によりその発現が調節されていることは, Runx2 の乳癌細胞におけるなんらかの役割を示唆していた。今後, Runx2 が BSP の発現に対してどのような役割を担っているかを検索する予定である。

## 骨芽細胞様細胞に対するエストロゲンおよびアンドロゲンの効果

日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 口腔科学研究所

○高井英樹, 金東淳, 新井政人, 加藤直子, 中嶋祐, 中山洋平, 清水映美, 小方頼昌

Effects of Estrogen and Androgen on Osteoblast Like Cells.

Department of Periodontology and Research Institute of Oral Science,

Nihon University School of Dentistry at Matudo.

○Hideki Takai, Tonsun Kim, Masato Arai, Naoko kato, Yu Nakajima,

Youhei Nakayama, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

キーワード: 骨芽細胞様細胞, エストロゲン, アンドロゲン

### 【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質で, アパタイト結晶形成能を有することから, 初期の石灰化において重要な役割を果たすと考えられている。エストロゲンは骨芽細胞の機能を直接または間接的に刺激し, 破骨細胞の機能を抑制する。またそのレセプターはラットやヒトの骨芽細胞に存在することが明らかにされている。アンドロゲンは, 加齢とともに男女ともに著減するホルモンであることから, アンドロゲンと骨粗鬆症の関係が注目されている。今回我々は, BSP の転写に対するエストロゲンおよびアンドロゲンの効果について検索を行った。

### 【材料および方法】

1) ラット骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を用いて, BSP mRNA 発現に対するエストロゲンおよびアンドロゲンの効果をノーザンブロットにて検索を行った。2) 様々の長さの BSP プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを用い, BSP の転写に対するエストロゲン及びアンドロゲンの効果をルシフェラーゼアッセイにより検索した。3) ROS17/2.8 細胞からタンパク質を抽出し, ウェスタンブロットにてステロイドレセプターの検索を行った。4) BSP 遺伝子プロモーター配列と ROS17/2.8 細胞の核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにより検索した。

### 【結果】

1) ノーザンブロットの結果, エストロゲン及びアンドロゲンは, 経時的に BSP mRNA 量を減少させた。2) エストロゲン及びアンドロゲン刺激 24 時間後に, 転写開始位置より -938 塩基対上流を含む配列 (pLUC6) にて転写活性の抑制が認められた。3) ウェスタンブロットの結果, ROS17/2.8 細胞でエストロゲンレセプター (ER  $\alpha$ ), アンドロゲンレセプター (AR) が認められた。4) ゲルシフトアッセイの結果, グルココルチコイド応答配列 (GRE) において経時的に核内タンパク質との結合が上昇した。

### 【考察および結論】

エストロゲンおよびアンドロゲン刺激により BSP mRNA 量の減少及び BSP の転写の抑制が認められた。以上の結果は, GRE 配列に対する転写因子の作用によるものと考えられた。今後の展望としては, GRE に対するステロイドレセプターの関与について検討する予定である。

乳癌細胞における BSP および Runx2 の発現に対する  
エストロゲンおよび FGF2 の影響

日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 口腔科学研究所

○金 東淳, 高井 英樹, 中山 洋平, 新井 政人, 加藤 直子,  
中嶋 祐, 清水 映美, 小方 頼昌

Effects of Estrogen and FGF2 on the expression of BSP and Runx2 in breast cancer cells.

Department of Periodontology and Research Institute of Oral Science,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Tonsun Kim, Hideki Takai, Youhei Nakayama, Masato Arai, Naoko Kato,  
Yu Nakajima, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

キーワード: 乳癌細胞, 骨シアロタンパク質, Runx2

【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は石灰化結合組織特異的に発現するが, 骨に高頻度に転移する乳癌, 肺癌, 前立腺癌病巣で異所性に発現することが報告されている。Runx2 は骨芽細胞の分化, 成熟に必要な転写因子であり, そのノックアウトマウスでは骨形成が完全に抑制される。今回我々は, 乳癌細胞における BSP と Runx2 の発現に対する, エストロゲンと FGF2 の影響について検索した。

【材料及び方法】

ヒト乳癌細胞 (MCF7 および MDA-MB-453 細胞) を, エストロゲン ( $10^{-8}M$ ) または FGF2 (10 ng/ml) にて刺激後, 経時的に細胞を回収して全 RNA を抽出した。RT-PCR 法にて BSP および Runx2 mRNA 発現を検討した。また, BSP と Runx2 のタンパク質発現をウェスタンブロット法にて検索した。さらに, ラット BSP 遺伝子プロモーター配列中の FGF2 応答配列 (FRE; -90 塩基対上流) と上記細胞の核内タンパク質との結合を, ゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果】

RT-PCR の結果, MCF7 細胞で BSP mRNA の発現が認められた。同細胞での Runx2 mRNA 発現はエストロゲン刺激で経時的に減少し, FGF2 刺激で増加した。MDA-MB-453 細胞では, エストロゲン, FGF2 刺激ともに Runx2 mRNA は検出されなかった。ゲルシフトアッセイの結果, 両細胞の核内タンパク質と FRE との結合は, 経時的に上昇した。Runx2 タンパク質発現は, 両因子にて刺激後, MCF7 細胞で減少し, MDA-MB-453 細胞で増加した。BSP のタンパク質発現は, 両細胞で検出された。

【結論】

MCF7 および MDA-MB-453 細胞において BSP タンパク質の発現が認められた。骨芽細胞の分化に重要な転写因子である Runx2 mRNA とタンパク質の発現が乳癌細胞で認められ, エストロゲンおよび FGF2 によりその発現が調節されていることは, Runx2 の乳癌細胞におけるなんらかの役割を示唆していた。今後, Runx2 が BSP の発現に対してどのような役割を担っているかを検索する予定である。

## 骨芽細胞様細胞に対する静磁場刺激の影響

日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 生化学講座, 口腔科学研究所

○新井政人, 中嶋祐, 中山洋平, 加藤直子, 高井英樹, 金東淳, 岡野総一郎,  
柴田恭子, 清水映美, 安孫子宜光, 小方頼昌

Effects of static magnetic fields on osteoblast like cells.

Department of Periodontology, Biochemistry and Research Institute of Oral Science,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Masato Arai, Yu Nakajima, Youhei Nakayama, Naoko Kato, Hideki Takai, Tonsun Kim,  
Soichiro Okano, Yasuko Shibata, Emi Shimizu, Yoshimitsu Abiko and Yorimasa Ogata

キーワード: 骨芽細胞様細胞, 静磁場, 転写調節

### 【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は, 石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有することから, 初期の石灰化における役割が注目されている非コラーゲン性タンパク質である。無重力空間を経験した宇宙飛行士で骨量の減少が報告されていることから, メカニカルストレスは, 骨の細胞機能に何らかの影響を及ぼしていると考えられる。今回我々は, 磁石による静磁場の骨芽細胞様細胞への影響について, 主に BSP の転写調節に関して検索を行った。

### 【材料および方法】

- 1) ラット骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞に, 静磁場 (300 および 800 gauss ; 24 h) を作用させた後に全 RNA を抽出し, BSP mRNA 発現への効果を Real-time PCR 法を用いて検索した。
- 2) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞および骨髄由来未分化間葉細胞である SBMC 細胞に導入し, 静磁場の BSP の転写に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。
- 3) BSP 遺伝子プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

### 【結果】

- 1) Real-time PCR の結果, BSP mRNA 量は静磁場刺激により上昇した。
- 2) BSP の転写活性に対する静磁場の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した結果, UMR106 および SBMC 両細胞において, 転写開始点より-116 塩基対上流を含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC3) で転写活性が上昇した。さらに, その転写活性の上昇は, チロシンキナーゼ阻害剤により抑制された。
- 3) ゲルシフトアッセイの結果, 静磁場刺激 (300 および 800 gauss ; 24 h) により FGF2 応答配列 (FRE) への核内タンパク質の結合の増加および下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1) への核内タンパク質の結合の減少が認められた。

### 【考察および結論】

静磁場刺激により, 骨芽細胞様細胞において BSP mRNA 量の増加と転写活性の上昇が認められた。この作用は, BSP 遺伝子プロモーターに存在する FRE 配列への転写因子の結合増加と, Pit-1 配列への結合の減少によるものと考えられた。今後は, 静磁場作用による BSP の転写調節に関わる転写因子およびその情報伝達に関与するタンパク質, その他細胞機能に関与するタンパク質の変化をプロテオーム解析を含めて検索する予定である。



### **IGF-I Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription.**

Youhei Nakayama, Naoko Kato, Yu Nakajima, Hideki Takai, Tonsun Kim, Masato Arai, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata. Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

**Introduction:** Insulin-like growth factor I (IGF-I) has been reported to act as a modulator of the synthesis of collagen and to stimulate osteoblast proliferation by inhibition of apoptosis. Several studies have demonstrated association of the expression of mRNA transcripts for IGF-I and the type I IGF receptor with areas of osteogenesis by *in situ* hybridization. These indicate that this mediator may play important roles in the synthesis of the extracellular matrix and maintaining bone metabolism. Bone sialoprotein (BSP) is a mineralized tissue-specific and a noncollagenous protein expressed by differentiated osteoblasts that appears to function in the initial mineralization of bone, and the ability of BSP to nucleate hydroxyapatite crystal formation indicates a potential role for BSP in the initial mineralization of bone. **Purpose:** To examine the molecular mechanism of IGF-I regulation of osteogenesis, we analyzed the effects of IGF-I on the expression of BSP in human osteoblast-like Saos2 and rat stromal bone marrow cells (SBMC). **Approaches:** To determine the molecular basis of the transcriptional regulation of BSP gene transcription by IGF-I, we conducted Northern hybridization and RT-PCR, transient transfection analyses with chimeric constructs of the rat BSP gene promoter linked to a luciferase reporter gene and gel mobility shift assays using recombinant IGF-I. **Results:** IGF-I at 50 ng/ml increased BSP and Cbfa1 mRNA. The stimulation was first evident at 3 h and reached maximal levels at 24 h, but the level of the Osterix mRNA did not alter. Transient transcription analyses revealed that IGF-I (50 ng/ml) increased luciferase activities ~1.7-fold in the construct pLUC3 (nts -116 to +60), as well as in longer constructs (pLUC4; -425 to +60, pLUC5; -801 to +60) transfected into SBMC cells. These results were supported by gel mobility shift assays using radiolabeled double-stranded FGF2 response element (FRE; nts -92 to -85, GGTGAGAA) and homeodomain binding element (HOX; nts -199 to -192 TCAATTAAA) oligonucleotides, which revealed increased binding of nuclear proteins from IGF-I-stimulated Saos2 and SBMC cells. These DNA-protein complexes representing specific interactions were demonstrated by competition experiments in which 40-fold molar excess of FRE and HOX double-stranded oligonucleotides reduced the amount of complexes formation. **Conclusions:** These studies show that IGF-I induces BSP transcription in Saos2 and SBMC cells through FRE and HOX elements in the proximal promoter of BSP gene.

### Effect of Chlorpromazine on Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription

Yu Nakajima, Naoko Kato, Youhei Nakayama, Tonsun Kim, Hideki Takai, Masato Arai, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata. Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan.

**Introduction:** Chlorpromazine, a phenothiazine derivative, is a potent tranquillizing agent for treatment of psychiatric disorders. Chlorpromazine inhibits the hyperproduction of dopamine by reducing intracerebral insulin secretion. However, Chlorpromazine is known to occasionally cause toxic reactions such as hepatitis with jaundice, hypoplastic anemia and dermatitis. Moreover, growth retardation and malformation have been reported in the offspring of chlorpromazine treated pregnant animals. Chlorpromazine functions by mimicking hypotonic stress and causes deformation of cells *in vivo*. Bone Sialoprotein (BSP) is a mineralized tissue-specific protein that appears to function in the initial mineralization on bone. Previous studies have demonstrated that BSP mRNA expression is essentially restricted to fully-differentiated cells of mineralized connective tissues and that the expression of BSP is developmentally regulated. Mechanical stress may play a fundamental role in the regulation of cell function in bone, but little is known about how cells are able to sense mechanical stress and signal transduction. **Purpose:** To examine the effects of chlorpromazine on BSP gene transcription. **Approaches:** To determine the molecular basis of the transcriptional regulation of BSP gene transcription by chlorpromazine, we conducted Northern hybridization, transient transfection analyses with chimeric constructs of the rat BSP gene promoter linked to a luciferase reporter gene and gel mobility shift assays after stimulation by chlorpromazine. **Results:** Chlorpromazine (0.01~10 $\mu$ g/ml) decreased BSP mRNA levels in osteoblast-like ROS17/2.8 cells dose dependent manner with a maximal effect at 10 $\mu$ g/ml after 24 h stimulation. Transient transcription analyses revealed that chlorpromazine (10 $\mu$ g/ml) decreased luciferase activities ~0.56-fold in the construct pLUC3 (nts -116 to +60) transfected into ROS17/2.8 cells. Within the DNA sequence that is unique to pLUC3, an inverted CCAAT box, a cAMP response element (CRE), a fibroblast growth factor 2 response element (FRE) and a pituitary-specific transcription factor-1 motif were present. Gel mobility shift assays with radiolabelled CRE and FRE oligonucleotides revealed decreased binding of nuclear proteins from chlorpromazine (10 $\mu$ g/ml) treated ROS17/2.8 cells. **Conclusions:** These results show that Chlorpromazine decreases BSP transcription in osteoblast-like cells through juxtaposed CRE and FRE elements in the proximal promoter of the BSP gene.

**Parathyroid Hormone Regulation of Bone Sialoprotein Gene Transcription is Mediated through a Pit-1 Element.**  
Ryoichiro Saito, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata. Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan

**Introduction:** Bone sialoprotein (BSP) is a sulfated and phospholyated glycoprotein found almost exclusively in mineralized connective tissues. BSP is also expressed in osteotropic cancers, suggesting that BSP might play a role in the pathogenesis of bone metastasis. Parathyroid hormone (PTH) is a major mediator of bone remodeling and is an essential regulator of calcium homeostasis. We have previously demonstrated that human 1-34 PTH increases BSP transcription in the osteoblastic cell line ROS 17/2.8 (Ogata et al., *Matrix Biol.*, 19:395-407, 2000). To further characterize the regulation of BSP we have analyzed the effects of PTH on UMR106 cells, which represent a less mature osteoblastic phenotype compared to ROS 17/2/8 cells. **Purpose:** To study the regulation of BSP expression by PTH we used UMR 106 cells, which have been shown to have osteoblastic characteristics and to express BSP mRNA constitutively. **Approaches:** UMR 106 cells were treated with human 1-34 PTH and changes in mRNA analyzed by Northern hybridization. Effects of PTH on transcriptional activity were measured by transient transfection assays using chimeric constructs of the rat BSP gene promoter linked to a luciferase reporter gene, and nuclear protein binding analyzed by gel mobility shift assays. **Results:** BSP mRNA expression in response to 10 nM PTH was first reduced at 3h, then increased at 6 h, after which expression slowly returned to basal levels. These effects were abrogated by cycloheximide, indicating that PTH indirectly regulates BSP gene transcription. Constructs that included the promoter sequence nts -116 to -43 (pLUC3) were found to enhance transcriptional activity ~4-fold in UMR 106 cells treated with PTH (10 nM) for 6 h. Moreover, transcriptional activity induced by PTH was inhibited by protein kinase A and tyrosine kinase inhibitors. Within the DNA sequence that is unique to this region (pLUC3; between nt -116 and +60) are an inverted CCAAT box (between nt -50 and -46), a cAMP response element (CRE; between nt -75 and -68), a FGF2 response element (FRE; between nt -92 and -85) and a pituitary-specific transcription factor-1 motif (Pit-1; between nts -111 to -105). 2 bp mutation within a Pit-1 increased basal promoter activity and abrogated PTH-induced transcription. Gel mobility shift assays with a radiolabelled Pit-1 oligonucleotide revealed increased binding of nuclear proteins at 3 h, and decreased Pit-1 DNA-protein complex formation thereafter. **Conclusions:** These results indicate that PTH regulates BSP transcription mediated through a Pit-1 suppressor element in the BSP gene promoter.

メカニカルストレスに対する歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞の反応性の違い

日本大学松戸歯学部歯周病講座

○中嶋祐, 金東淳, 高井英樹, 新井政人, 加藤直子, 中山洋平,

齋藤綾一朗, 清水映美, 小方頼昌

**Differential Responsiveness against Mechanical Stress of  
Periodontal Ligament Cells and Gingival Fibroblasts.**

Department of Periodontology Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Yu Nakjima, Dong-Soon Kim, Hideki Takai, Masato Arai, Naoko Kato,

Youhei Nakayama, Ryoichiro Saito, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

【目的】

歯根膜は咬合等の様々なメカニカルストレスを緩衝し、歯周組織の恒常性を維持する組織である。また、歯根膜を構成する線維芽細胞の機能は、他の組織の線維芽細胞とは異なる性質を有することが示されている。向精神薬であるクロルプロマジンを経時的に細胞に作用させると、浸透圧に類似したメカニカルストレスが細胞に加わることが報告されている。今回我々は、ヒト歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞にクロルプロマジンを経時的に作用させ、その影響を両細胞で比較検討を行った。

【材料及び方法】

(1) ヒト歯根膜細胞(HPDL)および歯肉線維芽細胞(HGF)は、矯正学的理由にて便宜抜歯を行った歯周組織から採取し、10%FCSを含む $\alpha$ -MEM培地で培養した。(2) 両細胞に0.01, 0.1, 1, 10  $\mu$ g/mlのクロルプロマジンを経時的に作用させ、また、刺激後経時的に細胞を回収し、全RNAを抽出後、RT-PCRを行い、COX-2, MMP-1 および TIMP-1 mRNA の発現量の変化を検討した。(3) COX-2 および MMP-1 遺伝子プロモーター配列と HPDL および HGF の核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにより検索した。

【結果】

(1) 濃度依存的にクロルプロマジン刺激を行った結果、COX-2 および MMP-1 mRNA の発現変化が HPDL と HGF において異なった。また、1  $\mu$ g/ml のクロルプロマジンを用いて経時的に刺激をすると、HGF では COX-2 mRNA の発現が経時的に上昇したが、HPDL では COX-2 mRNA の発現が認められなかった。(2) ゲルシフトアッセイの結果、COX-2 遺伝子プロモーター配列中の cAMP 応答配列(CRE), nuclear factor- $\kappa$ B 応答配列(NF- $\kappa$ B)および MMP-1 遺伝子プロモーター配列中の activator protein-1 応答配列(AP-1)において経時的に核内タンパク質との結合に変化が認められた。

【考察および結論】

HGF と比較して HPDL ではメカニカルストレスに対する炎症性サイトカインの産生量が少なかった。COX-2 プロモーター中の CRE および NF- $\kappa$ B, MMP-1 プロモーターの AP-1 で経時的に核内タンパク質の結合に変化が生じたことから、クロルプロマジンによるメカニカルストレスはこれらの応答配列を介して、COX-2 および MMP-1 の転写を調節していると考えられた。今後は、メカニカルストレスが、COX-2 および MMP-1 の転写調節に関与する転写因子におよぼす影響を検索し、歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞の機能および性質の違いについて検索を行っていく予定である。

骨シアロタンパク質の転写に対する  
ステロイドホルモンおよびステロイドレセプターの影響

日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 口腔科学研究所

○高井英樹, 金東淳, 新井政人, 加藤直子, 中嶋祐, 中山洋平, 清水映美, 小方頼昌

Effects of Steroid hormone and Steroid receptors on Bone Sialoprotein Gene Transcription

Departments of Periodontology and Research Institute of Oral Science,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Hideki Takai, Dong-Soon Kim, Masato Arai, Naoko Kato, Yu Nakajima,

Youhei Nakayama, Emi Shimizu and Yorimasa Ogata

【目的】

骨シアロタンパク質 (BSP) は, 石灰化初期に硬組織特異的に発現し, アパタイト結晶形成能を有することから, 石灰化における役割が注目されている非コラーゲン性タンパク質である。ステロイドホルモンと骨代謝の関連は, 閉経後の女性ホルモン (エストロゲン) の低下により骨粗鬆症の発症率が著しく増加すること, 生理活性を持つエストロゲンレセプターが, ラットやヒトの骨芽細胞に存在することなどから, エストロゲンは骨芽細胞に直接作用すると考えられる。一方, 男性ホルモンであるアンドロゲンは, 骨芽細胞の分化や増殖を促進することが報告されている。今回我々は, エストロゲンおよびアンドロゲンの BSP の転写に対する影響, およびエストロゲンレセプター(ER $\alpha$ )とアンドロゲンレセプター(AR)の関与について検索した。

【材料および方法】

1) ラット骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞に ER $\alpha$ および AR を過剰発現させ, 核内および細胞質内タンパク質を抽出し, ウェスタンブロットにて ER $\alpha$ および AR の検索を行った。2) ROS17/2.8 細胞に ER $\alpha$ および AR を過剰発現させ, エストロゲン(10<sup>-8</sup>M)およびアンドロゲン(10<sup>-8</sup>M)にて 24 時間刺激後, 全 RNA を抽出し, BSPmRNA 量の変化をノーザンブロットにて検索を行った。3) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドおよび PMCV-AR プラスミドを, ROS17/2.8 細胞にリポフェクタミンを用いて導入した。同細胞をアンドロゲン(10<sup>-8</sup>M)にて 24 時間刺激後, 転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索を行った。4) BSP 遺伝子プロモーター配列と ROS17/2.8 細胞および SBMC 細胞のタンパク質との結合をゲルシフトアッセイにより検索した。

【結果】

1) ウェスタンブロットの結果, ROS17/2.8 細胞で ER $\alpha$ および AR の増加が認められた。2) ノーザンブロットの結果, AR を細胞内に発現させることで, BSPmRNA 量を増加させた。3) AR を発現させると転写開始点より-116 塩基対上流(pLUC3)および-931 塩基対上流(pLUC6)までの BSP プロモーター配列を含むルシフェラーゼコントラストで転写活性の上昇が認められた。4) ゲルシフトアッセイの結果, cAMP 応答配列(CRE), グルコルチコイド応答配列(GRE)への転写因子の結合は, コントロールおよびアンドロゲン(10<sup>-8</sup>M, 24h)刺激に比べて AR を発現させた核内タンパク質で増加した。

【考察及び結論】

AR を細胞内に発現させることで, BSPmRNA 量の増加が認められたことから, CRE および GRE 配列に対する転写因子の結合の結果, BSP の転写が促進されたと考えられた。今後の展望として, CRE および GRE に対する転写因子とステロイドレセプターの関係についてさらに検討する予定である。

## CLINICOPATHOLOGICAL AND CYTOLOGICAL STUDY OF ENTAMOEBA GINGIVALIS

Okada H<sup>1)</sup>, Matsumoto T<sup>2)</sup>, Morikawa M<sup>1)</sup> and Yamamoto H<sup>1)</sup> Departments of <sup>1)</sup>Pathology and <sup>2)</sup>Clinical Laboratory Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

**Objectives:** We investigated the cytological characteristics with ultrastructure of *Entamoeba gingivalis* and discussed about clinico-statistical features of these cases.

**Methods:** The subjects were oral smears from 28 cases in which entamoeba gingivalis was observed.

**Results:** *Entamoeba gingivalis* had small round nucleus with a central karyosome and fine granular cytoplasm. The granules showed pale blue on Papanicolaou staining and revealed positive reaction with PAS staining. In Giemsa staining, the ectoplasm, dark blue in color, was clearly distinguish from the endoplasm. The Entamoeba had some food vacuoles containing erythrocytes and leukocytes, and was mostly associated with Actinomyces. In cytomorphometric analysis, it ranged 9.3- 37.5 $\mu\text{m}$  (average: 8.25.0 $\mu\text{m}$ ) in diameter, and 51.0- 360.1 $\mu\text{m}^2$  (average: 175.668.3 $\mu\text{m}^2$ ) in area. Ultrastructurally, the distinction between the endoplasm and the ectoplasm was clearly done. The former had few organelles and many projections, and the latter had numerous glycogen granules and many food vacuoles which were varied in size and contained amorphous materials and degenerated cells with nucleus.

**Conclusions:** In 28 cases of *entamoeba gingivalis*, clinico-statistically, over a half (18cases, 64%) were in the 60- and 50-year group, and most (24cases, 86%) were associated with Actinomyces. Cytological and ultrastructural findings revealed the Entamoeba were 8.25.0 $\mu\text{m}$  in diameter and had food vacuoles with erythrocytes and leukocytes.

## 骨形成性エプーリスの病理組織学的および細胞増殖能に関する研究

<sup>1</sup>日本大学 松戸歯学部 病理学講座, <sup>2</sup>千葉西総合病院 病理科

岡田 裕之<sup>1</sup>, 齋藤 隆明<sup>2</sup>, 大村 光浩<sup>2</sup>, 山本 浩嗣<sup>1</sup>

骨形成性エプーリスは比較的まれなエプーリスの一型であり、欧米において周辺性骨形成性線維腫とよばれ、その病因が未だ不明である。本研究は病理組織学的特徴と細胞増殖能を検討する目的にて、27例の骨形成性エプーリスを検索した。本病変は線維性結合織と石灰化物により構成され、石灰沈着が梁状骨および緻密骨、セメント粒あるいは骨粒、および異栄養性石灰化に分類された。石灰化物の種類、量および大きさは症例内および症例間で様々であった。潰瘍性病変は石灰化物の周囲に、高細胞密度の線維芽細胞領域を高頻度に有し、異栄養性石灰化がその領域にのみ観察された。Ag-NOR染色およびPCNA免疫染色において、骨形成性エプーリスの線維芽細胞の増殖能は各々0.91と41.1%を示し、それらが対照のセメント質骨形成性線維腫の数値(1.70; 51.5%)よりも低く、各値の両者には優位差が認められた。本研究より、骨形成性エプーリスが非腫瘍性病変ではあるが、高い増殖能を有することが示唆された。それゆえ、本病変に対して適切な外科切除が必要とされる。

演題番号 2

一般演題 (1 - 2)

演題名： 口腔粘膜白色病変に対する擦過細胞診症例の臨床病理的および細胞学的検討

所属・氏名：

日本大学松戸歯学部 病理学講座，同 検査室\*

○岡田裕之，松本 敬\*，久山佳代，宇都宮忠彦，森川美雪，フィフィタ・シシリア，山本浩嗣

**Title :** A clinicopathological and cytological study of smear cytological cases of oral mucosal white lesions

**Author's name(s) and Institution(s) :** ○Hiroyuki Okada, Takashi Matsumoto\*, Kayo Kuyama, Tadahiko Utsunomiya, Miyuki Morikawa, Sisilia Fifita, Hirotsugu Yamamoto

Departments of Pathology and Clinical Laboratory, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**Abstract :**

We report clinicopathological and cytological characteristics of oral mucosal white lesions smears. Large mount of cases have been received in our department from general practitioners. It is thought that *Candida* is recognized in considerable number of clinical oral mucosal white lesions.

本文：

目的：口腔粘膜病変の擦過細胞診を行っている施設は比較的少なく，その臨床統計学的な報告は散見されるのみである。われわれは，口腔粘膜病変，特に白色病変に対する擦過細胞診症例を臨床病理学および細胞学的に検討したので報告する。

方法：2002年以降の口腔粘膜病変に対する擦過細胞診症例を用いた。

結果：全検体は800例で，179例(22%)が外部の歯科開業医からのものであった。臨床的に白色病変と診断されたものは250例(白板症140例，扁平苔癬70例，カンジダ症32例，白斑8例)で，全検体の31%を占めていた。細胞診にて，臨床的に白板症22例および扁平苔癬4例がClass IIIに分類され，生検が施行された白板症7例のうち5例が病理組織学的にも上皮異形成であった。Class Vに分類された臨床的白板症1例は扁平上皮癌と病理組織診断された。また，臨床的に白色病変とされた51例(20%) (白板症13例，扁平苔癬22例，カンジダ症13例，白斑3例)にカンジダ菌が観察された。

結論：当講座を取り巻く環境において，開業医を含め口腔粘膜病変に対する擦過細胞診の需要は増加しており，細胞診断能力の更なる向上が求められるものと考ええる。臨床的白色病変の相当数にカンジダ菌が認められると思われ，本病変の治療方針の決定に細胞診によるカンジダ症の検索が有用と考えられる。



## 口腔粘膜病変における擦過細胞診と病理組織診との比較検討

日本大学松戸歯学部病理学講座<sup>1)</sup>, 日本大学松戸歯学部検査室<sup>2)</sup>, 日本大学松戸歯学部歯周病学講座<sup>3)</sup>, サンリツ病理事業部<sup>4)</sup>, 千葉西総合病院検査部病理<sup>5)</sup>

○岡田裕之(DDS)<sup>1)</sup>, 松本 敬(CT)<sup>2)</sup>, 遠藤弘康(DDS)<sup>3)</sup>, 中平隆志(CT)<sup>4)</sup>, 齋藤隆明(DDS)<sup>5)</sup>, 大村光浩(MD)<sup>5)</sup>, 山本浩嗣(DDS)<sup>1)</sup>

目的：口腔粘膜病変は直視できるために、比較的容易に生検を行うことができる。さらには歯科・口腔外科医など臨床医の口腔細胞診に関する認識の弱さ、および口腔粘膜上皮の特殊性と細胞診断の困難さゆえ、口腔粘膜病変への擦過細胞診の応用が少なく、その細胞像に関する報告・研究は散見されるのみである。今回われわれは、口腔粘膜病変の細胞像と病理組織像との比較検討を行ったので報告する。

方法：2002年以降、擦過細胞診が行われた口腔粘膜病変のうち、病理組織学的診断がなされた66例を用いた。

結果：細胞診にてClassIあるいはClassII, ClassIIIおよびClassVと分類したものは、それぞれ32例, 22例および12例であった。そのうち病理組織診断との隔たりが11例に認められ、病理組織学的に良性病変をClassIII・異形成病変と推定したものは8例、異形成病変をClassV・SCCとしたものが1例およびSCCをClassIII・異形成病変としたものは2例であった。

総括：軽度から中等度の細胞異型を示す表層型の角化性扁平細胞が多数観察される場合、特に細菌や炎症性背景が強く伴う症例で細胞診断が困難であった。口腔粘膜病変の擦過細胞診において構造異型を伴い集塊状に採取される細胞はほとんどなく、細胞異型の強さと数が重要であった。病理組織学的SCCをClassIIIと診断したものを中心に症例を呈示し考察する。

## セメント質形成性病変の病理組織学的および細胞増殖能に関する研究

<sup>1</sup>日本大学 松戸歯学部 病理学講座, <sup>2</sup>日本大学 松戸歯学部 口腔外科学講座, <sup>3</sup>千葉西総合病院 病理科

岡田 裕之<sup>1</sup>, 北村 英二<sup>2</sup>, 齋藤 隆明<sup>3</sup>, 大村 光浩<sup>3</sup>, 山本 浩嗣<sup>1</sup>

セメント質増生病変の細胞増殖能に関する研究報告は少なく, その詳細について不明な点が多い。本研究は病理組織学的特徴および細胞増殖能を検討する目的にて, 良性セメント芽細胞腫 3 例, 根尖性セメント質異形成症およびセメント質肥大各 4 例, および対照として歯のセメント質 3 例を用いた。セメント芽細胞における PCNA 陽性率, 平均 Ag-NORs 顆粒数ともに, 良性セメント芽細胞腫 (38.6%, 1.95) は高い細胞増殖能を有し, 根尖性セメント質異形成症 (20.2%, 1.64) が対照 (18.9%, 1.55) とほぼ同様の値を示した。この増殖能の差異は良性セメント芽細胞腫が腫瘍, 根尖性セメント質異形成症が非腫瘍性病変との疾病本態を裏付ける証左と思われた。セメント質肥大 (0%, 1.58) の PCNA 陽性率は対照よりも低値を示し, ある程度までしか増殖しない進行性病変の性格を反映していた。良性セメント芽細胞腫および根尖性セメント質異形成症にのみ封入細胞の増殖能が認められたが, 石灰化最前線に位置するセメント芽細胞がより高い細胞増殖活性を有することが明示された。(本研究の一部は日本大学松戸歯学部 鈴木研究費 (03-1004) および文部科学省 平成 13 年度学術フロンティア推進事業の補助を受けた。)

演題番号 1	一般演題 (I-1)
演題名： 海綿状血管腫に起因したと思われる上唇の粘液貯留嚢胞の1例	
所属・氏名： (口演者の名前の前に○をつけて下さい) 日本大学松戸歯学部病理学講座 <sup>1</sup> , 口腔外科学講座 <sup>2</sup> , 放射線学講座 <sup>3</sup> ○岡田裕之 <sup>1</sup> , 渋谷 諄 <sup>2</sup> , 梶田理絵 <sup>2</sup> , 秋元芳明 <sup>2</sup> , 金田 隆 <sup>3</sup> , 山本浩嗣 <sup>1</sup>	
Title : Mucous retention cyst caused by cavernous hemangioma of the upper lip	
Author's name(s) and Institution(s) ○Hiroyuki Okada <sup>1</sup> , Jun Shibutani <sup>2</sup> , Rie Kajita <sup>2</sup> , Yoshiaki Akimoto <sup>2</sup> , Takashi Kaneda <sup>3</sup> , Hirotsugu Yamamoto <sup>1</sup> Departments of Pathology <sup>1</sup> , Oral Surgery <sup>2</sup> and Radiology <sup>3</sup> , Nihon University School of Dentistry at Matsudo	
Abstract : ( <i>less than 100 words</i> ) Mucous retention cyst is generally considered to be due to obstructions of the ducts. However, there has been no report which has found a cause of the obstruction. We report a case of mucous retention cyst of the upper lip occurred in a 74-year-old man. Clinically, small labial glands like lesions were recognized beneath cavernous hemangioma. Histopathologically, the small lesions were composed of the formation of mucous retention cysts with flatted or cuboidal epithelial lining forming double layers. It could be explained that the mucous cysts was caused by the duct obstructions due to the hemangioma.	
本文： (400字以内で目的、材料・方法、結果、結論の順に書いて下さい) 目的: 粘液貯留嚢胞は一般に導管の閉塞により発生すると考えられているが、その原因を明確にし得た報告が稀有である。今回われわれは閉塞の原因を説明しうる本症を経験したので報告する。 症例: 74歳の男性。約10年前より自覚のある上唇腫瘍の精査目的にて来院した。初診時、同部に1.5×1.0×0.5 cm大、弾性軟、波動を触れない腫瘍を認めた。同部の口唇粘膜はほぼ正常色を呈していた。超音波検査にて小さな高エコー域を内部に伴う1.6×0.6 cm大の境界明瞭な低エコー域が認められ、カラードプラ法にて血流は観察されなかった。良性病変の臨床診断にて、腫瘍切除術が施行された。術中、腫瘍の下に口唇腺様の小腫瘍がみられ、追加切除された。肉眼的に、切除物は1.4×0.8×0.7 cm大、表面が凹凸不整で、不整球形、灰褐色を呈する充実性腫瘍、および直径0.5 cmまでの、表面が滑沢で、楕円球形、黄褐色を呈し、内容液を有する嚢胞様の3つの小腫瘍であった。 病理組織所見: 大腫瘍は海綿状血管の増殖により構成され、血管腔内には赤血球の充満や器質化をみる陳旧性ないし新鮮血栓が認められた。小腫瘍には扁平ないし立方形で2層性を示す上皮裏層をみる嚢胞形成が観察され、内腔に粘液物質を有していた。 結論: 海綿状血管腫による導管の閉塞に起因して粘液貯留嚢胞が発生したものと推察された。	

## 石灰化歯原性嚢胞における幽霊細胞の免疫組織化学的および微細構造学的研究

<sup>1</sup>日本大学松戸歯学部病理学講座, <sup>2</sup>千葉西総合病院病理科

岡田 裕之<sup>1</sup>, 齋藤 隆明<sup>2</sup>, 大村 光浩<sup>2</sup>, 山本 浩嗣<sup>1</sup>

石灰化歯原性嚢胞はまれな歯原性病変で, 石灰化を示す幽霊細胞を伴う歯原性上皮の嚢胞性増殖により特徴づけられる. 本研究は裏装上皮の免疫組織化学的および微細構造学的特徴と幽霊細胞の組織発生を検討する目的にて, 7例の本病変を検索した. 本病変の上皮は基底細胞, 星状網様細胞, 幽霊細胞および幽霊細胞様細胞の4種類の細胞で構成されていた. 免疫組織化学的に基底細胞および星状網様細胞が種々の程度に keratin, cytokeratin (CK) 7, CK 17, CK 19 および high-molecular-weight (HMW) CK に陽性を呈した. 幽霊細胞様細胞はこれらの抗体のほかに, CK 10/13 にも種々の程度に陽性であった. 一部の幽霊細胞が HMW CK にのみ陽性を示した. 電顕的に幽霊細胞は細胞小器官に乏しく, トノフィラメントの束で満たされていた. その束は融合し, 大きな無構造の塊状物を形成していた. 巨大で球形, 無線維性の無構造な塊状物を有し, 硝子様変性を呈しているものも観察された. デスモゾームと細胞質突起は4種類全ての細胞に観察された. これらの結果に基づいて, 幽霊細胞は異常な角化により出現し, 更に硝子変性が生じることが推察された.

## 石灰化歯原性嚢胞の免疫組織化学的および電顕的研究

日本大学松戸歯学部 口腔病理学講座<sup>1</sup>、

日本大学松戸歯学部 口腔外科学講座<sup>2</sup>

日本大学松戸歯学部 顎顔面外科学講座<sup>3</sup>、

日本大学松戸歯学部 放射線学講座<sup>4</sup>、

口腔科学研究所<sup>5</sup>

○岡田裕之<sup>1,5</sup>、秋元芳明<sup>2,5</sup>、近藤壽郎<sup>3,5</sup>、金田隆<sup>4,5</sup>、山本浩嗣<sup>1,5</sup>

石灰化歯原性嚢胞はまれな歯原性病変で、石灰化を示す幽霊細胞を伴う上皮の増殖により特徴づけられる。本研究は幽霊細胞の組織発生を検討する目的にて、8例の本病変を検索した。本病変の上皮は基底細胞、星状網様細胞、幽霊細胞および幽霊細胞様細胞の4種類の細胞で構成されていた。免疫組織化学的に、幽霊細胞のいくつかは high-molecular-weight (HMW) cytokeratin (CK) に陽性を示した。他の3種類の細胞は HMW を含む CK に対してほぼ同様の陽性反応を呈した。電顕的に、幽霊細胞は細胞質に多数のトノフィラメント (TF) の束やこれらの融合物を有していた。巨大で、円形、無線維性の無構造な塊状物を有する幽霊細胞も認められた。幽霊細胞様細胞は多数の TF を有し、デスモゾームと細胞質突起が4種類全ての細胞に観察された。これらの結果より、幽霊細胞は異常な角化により出現し、更に硝子様変性が生じることが推察された。(本研究の一部は文部科学省 H13 学術フロンティア推進事業による。)

---

Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription by PGE<sub>2</sub>.  
E.Shimizu-Sasaki\*, Y.Matsuda, M.Yamazaki, S.Furuyama, H.Sugiya, J.Sodek and  
Y.Ogata Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo, Chiba, Japan, MRC Group in Periodontal  
Physiology, Faculty of Dentistry, Univ. Toronto, Ont. Canada.

Bone sialoprotein (BSP) is a mineralized tissue-specific protein that appears to function in the initial mineralization of bone. Our previous studies have demonstrated that BSP mRNA expression is essentially restricted to fully-differentiated cells of mineralized connective tissues and that the expression of BSP is developmentally regulated. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) have anabolic effects on proliferation and differentiation of osteoblasts via diverse signal transduction systems. PGE<sub>2</sub> increases the proportion of functional osteoblasts that can produce mineralized bone nodules in fetal rat calvarial cells. PGE<sub>2</sub> also regulates the differentiation and function of osteoclasts. To determine the molecular mechanism of PGE<sub>2</sub> regulation of BSP, we have analyzed the effects of PGE<sub>2</sub> on the expression of BSP in the rat osteosarcoma cell line UMR106. To identify the site of transcriptional regulation by PGE<sub>2</sub>, transient transfection analyses were performed using various sized BSP gene promoter constructs linked to a luciferase reporter gene. Constructs including the promoter sequence nts -116 to -43 (pLUC3) were found to enhance transcriptional activity ~2-fold in UMR 106 cells treated with PGE<sub>2</sub> (3 x 10<sup>-8</sup>M). Transcriptional activity induced by PGE<sub>2</sub> was inhibited by the tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A. 2bp mutations were made in an inverted CCAAT box (ATTGG; between nts -50 and -46), a putative cAMP response element (CRE; between nts -75 and -68) and a pituitary-specific transcription factor-1 motif (Pit-1; between nts -111 and -105) within pLUC3 construct. Transcriptional stimulation by PGE<sub>2</sub> was almost completely abrogated in constructs that included 2bp mutations in the inverted CCAAT and CRE boxes. These data suggest that the inverted CCAAT and CRE elements play crucial roles in the PGE<sub>2</sub>-induced BSP expression in UMR 106 cells.

## FGF2 による骨シアロタンパク質の転写調節機構の解析

○清水 映美<sup>1</sup>、古山 俊介<sup>2</sup>、杉谷 博士<sup>2</sup>、小方 頼昌<sup>3</sup> <sup>1</sup> 日本大学 松戸歯学部 歯内療法学講座 <sup>2</sup> 日本大学 松戸歯学部 生理学講座 <sup>3</sup> 日本大学 松戸歯学部 歯周病学講座

【目的】骨シアロタンパク質(BSP)は、石灰化初期に硬組織特異的に発現し、アパタイト結晶の形成能を持つことなどから石灰化における役割が注目されている。我々は、BSP 遺伝子プロモーター領域のクローニングを行い、転写開始点より約 3,000 塩基対上流までの塩基配列を決定した。本研究では、成長因子の 1 つである塩基性線維芽細胞成長因子(FGF2)による BSP の転写調節機構の解析を行った。【方法】骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を用い、FGF2 刺激による BSPmRNA 量の変化をノーザンブロット法により解析した。BSP 遺伝子プロモーターを種々の長さに切断後、ルシフェラーゼプラスミドに挿入し、転写活性の検索(ルシフェラーゼアッセイ)を行った。さらに核内タンパク質と BSP プロモーター中の DNA 配列との結合性をゲルシフトアッセイにて検討した。【結果】FGF2 刺激により容量および時間依存的に BSPmRNA 量は増加した。ルシフェラーゼアッセイの結果、転写開始位置より-116~-43 塩基対上流を含む配列で FGF2 刺激により転写活性の上昇が認められた。同配列中に変異を導入したところ、-92~-85 塩基対の間に FGF 応答配列を同定した。ゲルシフトアッセイの結果、FGF2 刺激により FGF 応答配列結合タンパク質の増加が認められた。【結論】FGF2 刺激により BSP プロモーターの-92~-85 塩基対上流に存在する FGF 応答配列を介して、BSP の転写が調節されていることが明らかになった。

フラボノイドによる骨シアロタンパク質の転写の調節

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座， \* 歯周病学講座

○清水映美， 小方頼昌\*

**Flavonoids regulation of Bone Sialoprotein Gene Transcription.**

**Dept. Endo. and \*Perio., Nihon University School of Dentistry at Matsudo.**

○Emi Shimizu and Yorimasa Ogata\*

キーワード：骨シアロタンパク質， フラボノイド， 転写調節

【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は，硬組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であり，アパタイト結晶の形成能を有すること，ガン細胞で発現が認められることなどから，石灰化およびガンの骨転移との関係が注目されている。我々は，ヒトおよびラット BSP 遺伝子プロモーター領域をクローニングし，転写開始位置より約 3,000 塩基対上流までの塩基配列の決定を行った。今回我々は，BSP の転写に対するフラボノイドの効果を検討した。

【材料および方法】

1)ラット BSP 遺伝子プロモーター領域を種々の長さに切断後，ルシフェラーゼプラスミドに挿入した。 2)骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞に，上記プラスミドをトランスフェクションし，フラボノイドの BSP の転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。

【結果】

BSP の転写活性に対するフラボノイドの効果をルシフェラーゼアッセイで検討したところ，イソフラボンである genistein (50 $\mu$ M, 12 h) で転写活性の上昇が認められた。Genistein はチロシンのリン酸化を阻害することから，他のチロシンリン酸化阻害剤である herbimycin A および lavendustin A を用いたところ，転写活性に変化は認められなかった。genistein の不活性型である daidzein は BSP の転写を上昇させ，さらに flavone および flavanone は BSP の転写を上昇させた。

【考察】

フラボノイドの BSP の転写活性に対する効果は，チロシンのリン酸化阻害効果よりもむしろその構造によるものと考えられた。現在そのメカニズムに関して検討を進めている。

【結論】

BSP の転写活性は，チロシンキナーゼ阻害剤である genistein およびその不活性型である daidzein で上昇した。また flavone および flavanone によっても活性の上昇が認められた。以上のことからフラボン構造が BSP の転写を促進していると考えられた。



## PROSTAGLANDIN E<sub>2</sub> REGULATION OF RAT BONE SIALOPROTEIN (BSP) GENE

EXPRESSION. Y. Matsuda, E. Shimizu-Sasaki, H. Samoto, K. Kasai, M. Yamazaki, S.

Furuyama, H. Sugiya, J. Sodek and Y. Ogata Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo, Chiba, Japan,

CIHR Group in Periodontal Physiology, Faculty of Dentistry, Univ. Toronto, Ont. Canada.

Bone sialoprotein (BSP) is a sulfated and phosphorylated glycoprotein found almost exclusively in mineralized connective tissues. Recent studies on the developmental expression of BSP mRNA and temporo-spatial appearance of the protein during bone formation *in vivo* and *in vitro* have demonstrated that BSP is expressed by differentiated osteoblasts and that it may function in the initial nucleation of hydroxyapatite crystals in *de novo* bone formation. Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) has anabolic effects on proliferation and differentiation of osteoblasts via diverse signal transduction systems. PGE<sub>2</sub> increases the proportion of functional osteoblasts that can produce mineralized bone nodules in fetal rat calvarial cells. To determine whether PGE<sub>2</sub> might regulate the transcription of the BSP gene, transient transfection analyses were performed using various sized BSP promoter constructs linked to a luciferase reporter gene. Constructs that included nts -116 to -43 (pLUC3) of the promoter sequence were found to enhance transcriptional activity ~2-fold in UMR 106 cells treated with PGE<sub>2</sub> ( $3 \times 10^{-8}$ M). Transcriptional activity induced by PGE<sub>2</sub> was inhibited by the tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A and PKA inhibitor, H89. 2bp mutations were made in an inverted CCAAT box (ATTGG; between nts -50 and -46), a putative cAMP response element (CRE; between nts -75 and -68) and a pituitary-specific transcription factor-1 motif (Pit-1; between nts -111 and -105) within pLUC3 construct. Transcriptional stimulation by PGE<sub>2</sub> was almost completely abrogated in constructs that included mutations in the inverted CCAAT and CRE boxes. The results suggest that the inverted CCAAT and CRE elements may mediate the effects of PGE<sub>2</sub> on BSP gene transcription.

## フラボノイドが骨シアロタンパク質の転写に及ぼす効果

○清水 映美<sup>1</sup>, 佐本 博<sup>2</sup>, 齋藤 綾一郎<sup>3</sup>  
加藤 直子<sup>1</sup>, 中嶋 祐<sup>1</sup>, 中山 洋平<sup>1</sup>  
山崎 宗与<sup>3</sup>, 葛西 一貴<sup>2</sup>, 小方 頼昌<sup>1</sup>  
(日本大学松戸歯学部 歯周病学講座<sup>1</sup>  
日本大学松戸歯学部 矯正学講座<sup>2</sup>  
日本大学松戸歯学部 歯内療法学講座<sup>3</sup>)

【目的】骨シアロタンパク質(BSP)は石灰化組織特異的に発現するタンパク質であり、アパタイト結晶形成能を有することから石灰化における役割が研究されている。今回我々は、フラボノイドによる BSP の転写調節機構に関して検索を行った。

【材料および方法】1) 骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を用いて BSPmRNA の発現をノーザンブロット法で検索した。フラボノイドは、50  $\mu$ M の genistein, daidzein, flavone および flavanone を使用した。2) 長さを調節したラット BSP 遺伝子プロモーターを挿入したルシフェラーゼプラスミドを細胞に導入後、BSP の転写に対するフラボノイドの影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) BSP 遺伝子プロモーターの塩基配列を変異させたルシフェラーゼプラスミドを作製し、同様にルシフェラーゼアッセイを行った。4) BSP 遺伝子のプロモーター配列と核内タンパク質との結合

をゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果】1) フラボノイドで 12 時間刺激した結果、BSPmRNA 量の増加が認められた。2) フラボノイドで刺激後、-116 塩基対上流までのコンストラクト(pLUC3)で BSP の転写活性の上昇が認められた。3) pLUC3 の塩基配列を 2 塩基対だけ変化させたプラスミドを用いた結果、逆方向の CCAAT 配列に変異を挿入したコンストラクトで、genistein による転写活性の上昇が抑制された。4) ゲルシフトアッセイにて検索を行った結果、逆方向の CCAAT 配列と転写因子との結合が、フラボノイド刺激前後で変化が認められなかった。

【考察および結論】フラボノイド刺激により BSPmRNA 量の増加および BSP の転写の上昇が認められ、これは逆方向の CCAAT 配列に結合する核内転写因子を介していることが示唆された。情報伝達系に関しては今後さらに検討する予定である。

骨シアロタンパク質プロモーターにおけるフラボノイド応答配列の同定

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

○清水映美, 加藤直子, 中嶋祐, 中山洋平, 小方頼昌

Identification of a flavonoid response element in the bone sialoprotein (BSP) gene promoter.

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Emi Shimizu, Naoko Kato, Nakajima Yu, Nakayama Youhei and Yorimasa Ogata

キーワード: 骨シアロタンパク質, フラボノイド, 転写調節

#### 【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は石灰化初期に硬組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であり, アパタイト結晶能を有することから石灰化に重要なタンパク質である。最近では BSP がガン組織に多量に認められることから, BSP とガンの骨転移との関係も注目されている。今回我々は, フラボノイドによる BSP の転写調節機構の解析を行った。

#### 【材料および方法】

1)ラット骨芽細胞様細胞 ROS17/2.8 細胞を用いて BSPmRNA 発現をノーザンブロットおよび RT-PCR 法にて検索を行った。2)ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを ROS17/2.8 細胞に導入し, フラボノイド刺激による BSP の転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3)塩基配列を一部変化させたミューテーションルシフェラーゼプラスミドを作製し, フラボノイドによる影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。4)BSP 遺伝子プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

#### 【結果】

1)ノーザンブロットおよび RT-PCR にて検索を行った結果, BSPmRNA はイソフラボンである genistein および daidzein による刺激(50 $\mu$ M, 12h)で上昇が認められた。また flavone 刺激でも同様に BSPmRNA 量の増加が認められた。2)BSP の転写活性に対するフラボノイドの影響をルシフェラーゼアッセイで検索した結果, genistein 刺激で転写開始位置より-116 塩基対上流を含む配列(pLUC3)およびそれよりも長い配列にて転写活性の上昇が認められた。同様に Daidzein, flavone および flavanone 刺激で pLUC3 の転写活性の上昇が認められた。3)pLUC3 の配列を一部変化させたミューテーションルシフェラーゼプラスミドを用いてフラボノイドによる影響を検索した結果, 逆方向の CCAAT 配列のミューテーション配列で genistein による転写活性の上昇が抑制された。4)ゲルシフトアッセイにて逆方向の CCAAT 配列と転写因子との結合を検索した結果, フラボノイド刺激による影響は認められなかった。

#### 【考察および結論】

フラボノイド刺激により BSPmRNA 量の増加および BSP の転写の上昇が認められ, これは逆方向の CCAAT 配列に結合する NF-Y 転写因子を介していることが示唆された。どの様な情報伝達系を介するかは今後検討する予定である。

## 骨シアロタンパク質の転写に対するエナメルマトリックスタンパク質の効果

日本大学松戸歯学部歯周学講座  
○清水映美、小方頼昌

### 【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は、石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し、アパタイト結晶の結成能を有すること、骨転移を生ずるガン細胞で発現が認められることから、石灰化およびガンの骨転移との関係が注目されている。今回我々は、エナメルマトリックスタンパク質の BSP の転写に対する効果を検索した。

### 【材料および方法】

ラット骨芽細胞様細胞である ROS17/2.8 細胞を用いて、BSPmRNA の発現をノーザンブロット法にて、BSP の転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて、BSP プロモーター中の塩基配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

### 【結果】

ノーザンブロット解析の結果、エナメルマトリックスタンパク質は BSPmRNA の発現を上昇させた。ルシフェラーゼアッセイの結果、エナメルマトリックスタンパク質は BSP の転写活性を変化させなかった。現在、ゲルシフトアッセイにて転写因子とプロモーター配列との結合の変化を検索中である。

### 【結論】

BSP 遺伝子の発現は、エナメルマトリックスタンパク質により調節されていると考えられたが、ノーザンブロット解析の結果とルシフェラーゼアッセイの結果が一致しないため、現在その原因を検索している。

## 副甲状腺ホルモンによる骨シアロタンパク質の転写の調節

日本大学松戸歯学部保存学Ⅲ講座（歯内療法学）、保存学Ⅱ講座（歯周病学）\*

○齋藤綾一郎、清水映美\*、佐本博\*、山崎宗与、小方頼昌\*

### Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription by Parathyroid Hormone

Departments of Endodontics and Periodontology\*, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Ryoichiro Saito, Emi Shimizu\*, Hiroshi Samoto\*, Muneyoshi Yamazaki and Yorimasa Ogata\*

#### 【目的】

骨シアロタンパク質（BSP）は、石灰化初期に石灰化組織特異的に発現し、アパタイト結晶形成能を有することなどから、初期の石灰化部位で結晶形成に関与すると考えられている非コラーゲン性タンパク質である。今回我々は、骨代謝に重要なホルモンである副甲状腺ホルモン（PTH）によるBSPの転写調節機構の検索を行った。

#### 【材料および方法】

1) 骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を  $10^{-8}$ M の PTH にて刺激後、経時的に全 RNA を抽出し、BSPmRNA 量の変化をノーザンブロット法により解析した。2) ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞に導入し、PTH 刺激による BSP の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) PTH 刺激後の UMR106 細胞から核内タンパク質を抽出し、プロモーター配列との結合をゲルシフトアッセイにて検索を行った。

#### 【結果および考察】

1) PTH 刺激により BSPmRNA 量はコントロールに比べ 3 時間後に減少し、6 時間後再び増加した。2) ルシフェラーゼアッセイの結果、転写開始点より -116 塩基対上流までのプロモーター配列およびそれよりも長い配列を含むコンストラクト(pLUC 3, 4, 5)で PTH 刺激による転写活性の上昇が認められた。3) ハービマイシン A (チロシンキナーゼ阻害剤) および H89 (A キナーゼ阻害剤) により、PTH 刺激による転写活性の上昇が抑制された。4) pLUC 3 のプロモーター配列を一部変化させたプラスミドを用いて PTH の効果を検索した結果、下垂体特異的転写因子結合配列 (Pit-1) が PTH の作用に関与すると考えられた。5) Pit-1 配列に結合する核内タンパク質が PTH 刺激によりどのように変化するかは現在検索中である。

#### 【結論】

PTH 刺激により BSPmRNA 量の増加および BSP の転写活性の上昇が認められた。PTH による転写の調節は Pit-1 配列を介すると考えられた。現在、同配列に結合する核内タンパク質の検索を行っている。

エナメルマトリックスタンパク質による骨シアロタンパク質の転写の調節  
日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 歯内療法学講座\*

○ 清水映美, 中嶋祐, 加藤直子, 中山洋平, 高井英樹, 金東淳, 新井政人,  
齋藤綾一朗\*, 佐本博, 小方頼昌

Regulation of bone sialoprotein (BSP) gene transcription by enamel matrix derivative.  
Dept. of Periodontology and \*Endodontics, Nihon Univ. School of Dent. at Matsudo.

○Emi Shimizu, Yu Nakajima, Naoko Kato, Youhei Nakayama, Hideki Takai, Tonsun Kim,  
Masato Arai, Ryoichiro Saito, Hiroshi Samoto and Yorimasa Ogata

キーワード: 骨シアロタンパク質, エナメルマトリックスタンパク質, 転写調節

【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は、石灰化初期に石灰化組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であり、アパタイト結晶形成能を有すること、骨転移を生ずるガン細胞で発現が認められることから、石灰化およびガンの骨転移との関係が注目されている。今回我々は、エナメルマトリックスタンパク質(エムドゲイン; EMD)の作用機序を検索する目的で、BSPの転写調節機構の解析を行った。

【材料および方法】

1) ラット骨芽細胞様細胞 ROS17/2.8 細胞を用い、BSPmRNA 量の変化をノーザンブロット法にて検索した。2) BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを ROS17/2.8 細胞に導入し、BSP の転写活性に対する EMD の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。3) BSP 遺伝子のプロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

【結果】

1) ノーザンブロット法にて検索を行った結果、EMD (50 および 200 $\mu$ g/ml) は BSPmRNA 量を 12 時間後に約 2.8 倍上昇させた。その上昇は、50 および 200 $\mu$ g/ml EMD で同程度であった。2) BSP の転写活性に対する EMD (50  $\mu$ g/ml)の影響をルシフェラーゼアッセイで検索した結果、転写開始位置より -424 塩基対上流を含む配列 (pLUC4) および -801 塩基対上流を含む配列 (pLUC5)にて転写活性の上昇が認められた。3) -116 から -801 塩基対までに含まれるホメオボックス (Hox) 配列とアクチベータープロテイン 2(AP2)と重複して TGF $\beta$ 応答配列が存在するため、ゲルシフトアッセイにてそれぞれの DNA 配列と骨芽細胞核内タンパク質との結合を検索した結果、50 $\mu$ g/ml EMD 刺激によりそれぞれの結合が上昇した。

【考察および結論】

EMD 刺激により BSPmRNA 量の増加が認められ、転写開始位置より -424 および -801 塩基対上流を含むプロモーター配列が EMD による転写調節に関与していると考えられた。この転写活性の上昇は、Hox 配列および TGF $\beta$ 応答配列に結合する転写因子の結合の上昇を介していることが示唆された。どの様な情報伝達系を介するかは今後検討する予定である。

咬合崩壊を伴った重度慢性歯周炎に対して包括的歯周治療を行った1症例

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

○清水映美, 小方頼昌

A case report of severe chronic periodontitis with bite collapse treated  
by comprehensive periodontal treatment

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Emi Shimizu, Yorimasa Ogata

キーワード: 慢性歯周炎, 歯周外科処置, 補綴処置

1. はじめに

重度の歯周炎患者は歯の動揺, 欠損などにより咬合のバランスが崩壊し, 歯周治療と伴に咬合不調和を改善する治療が必要になるケースが多い。荷重負担による咬合性外傷を除去し, 適切な暫間補綴処置と歯周外科処置を平行して行うことにより, 骨欠損部位の歯槽骨の改善が認められた症例を報告する。

2. 初診

患者: 54歳, 女性

初診日: 平成12年2月3日

主訴: 右側上顎前歯部の歯肉腫脹

既往歴: 特記事項なし

現病歴: 平成11年9月頃から開業医にて歯周治療を行っていた。上顎右側の腫脹が著しく抗生剤, 鎮痛剤を服用していたが, 疼痛がおさまらず, 当科を紹介され来院した。

3. 診査・検査所見

1) 口腔内所見: 初診時, 53に顕著な歯肉の発赤, 腫脹が認められた。3の頬側遠心の歯周ポケットから排膿が認められ, 3の近心頬側と遠心口蓋側, 5の近心口蓋側に10mmの歯周ポケットが認められた。7の頬側近心に10mmの歯周ポケットが認められた。歯垢付着は, 歯頸部に多く認められ, PCRは23%で全類的に口腔清掃状態は不良であった。動揺度は3が1度で, その他は認められなかった。

2) X線所見: 65367に水平および垂直性の歯槽骨吸収が認められた。特に3は根尖付近に達する歯槽骨の吸収が認められた。

4. 診断

限局型重度慢性歯周炎

5. 治療計画

1) 歯周基本治療

2) 根管処置: 65367

3) 暫間補綴処置, 咬合調整: 65367

4) 再評価

5) 歯周外科処置:

653 歯肉剥離搔爬手術+結合組織移植

567 歯肉剥離搔爬手術

6) 再評価

7) 最終補綴

8) メインテナンス

6. 治療経過

平成12年2月~口腔清掃指導, スケーリングおよびルートプレーニングを行った。

平成12年6月~53は咬合調整後, 653は暫間固定を行った。

平成12年9月~653は歯肉剥離搔爬手術と自家骨移植および結合組織移植を同時に行った。

平成13年10月~67は暫間補綴処置を行った後, 567は歯肉剥離搔爬手術と自家骨移植を行った。

再評価後, 最終補綴物を作製し, 平成14年3月にメインテナンスを開始した。

7. 考察・まとめ

今回の症例は, 下顎左側臼歯部欠損で咬合のバランスが右側に偏っていたことが53の咬合性外傷の誘因になったと考えられる。咬合調整, 暫間補綴処置を行い, 咬合のバランスが回復した状態で歯周外科処置を行ったことから, 53は歯槽骨の再生が顕著に認められた。本症例は, メインテナンスに移行して1年10ヶ月経過しており予後良好である。今後は炎症性および咬合性因子を含むリスクファクターのコントロールを長期的に確認し, メインテナンスを慎重に行っていく予定である。

### FGF2 and cAMP Synergistically Activate Bone Sialoprotein Gene Expression.

Emi Shimizu<sup>1</sup>, Jaro Sodek<sup>2</sup> and Yorimasa Ogata<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan, and the <sup>2</sup>CIHR Group in Matrix Dynamics, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, ON, Canada.

**Introduction:** Bone sialoprotein (BSP) is a major noncollagenous protein of the mineralized bone extracellular matrix that has been implicated in the nucleation of hydroxyapatite. Previously, we have identified a fibroblast growth factor 2 (FGF2) response element (FRE) in the proximal promoter of the BSP gene that mediates both constitutive and FGF2-induced BSP transcription (Shimizu-Sasaki et al., *J. Biol. Chem.*, 276: 5459-5466, 2001). In this study, we report that FGF2 and cAMP act synergistically to stimulate BSP gene expression. **Purpose:** To examine the synergistic effects of FGF2 and cAMP on BSP transcription in osteoblast-like cells. **Approaches:** Rat osteoblastic ROS 17/2.8 cells were treated with FGF2 and forskolin (FSK) alone or in combination (FGF2+FSK) and changes in mRNA analyzed by real-time PCR. Effects FGF and FSK on transcription activity were measured using transient transfection analyses with chimeric rat BSP gene promoter constructs linked to a luciferase reporter gene, and transcription factor binding assessed by gel mobility shift assays. **Results:** Treatment of ROS 17/2.8 cells with either 10 ng/ml FGF2 or 1  $\mu$ M FSK for 6 h resulted in 5.4- and 8.2-fold increases, respectively, in the levels of BSP mRNA. However, in the presence of both FGF2 and forskolin (FGF2+FSK), BSP mRNA levels were increased synergistically by 20.4-fold. With the construct pLUC3, encompassing BSP promoter nucleotides -116 to +60, transcription was also increased synergistically by 15-fold after 6 h with FGF2/FSK, compared to stimulations of 2.6- and 5.2-fold, respectively, for FGF2 and FSK alone. A series of 5' deletion constructs between nts -116 and -43 were used to show that the FSK response is mediated by a region between nts -60 and -43 of the promoter. Transcriptional stimulation by FGF2/FSK was abrogated in constructs that included 2bp mutations in the inverted CCAAT, FRE and Pit1 elements. Whereas the FRE DNA-protein complex was increased by FGF2 and FGF2/FSK, and the Pit1 DNA-protein complex was decreased by FSK and FGF2/FSK, the CCAAT DNA protein complex did not change after FGF2, FSK or FGF2/FSK stimulation. Notably, transcriptional activity induced by FGF2/FSK was inhibited by protein kinase A (PKA), tyrosine kinase and MEK inhibitors. **Conclusions:** These studies indicate that FSK/FGF2 act through PKA, tyrosine kinase and MAP kinase-dependent pathways, which target the inverted CCAAT, FRE and Pit-1 promoter elements in the BSP gene, to synergistically increase BSP expression.



Regulation of Bone Sialoprotein (BSP) Gene Transcription by TNF $\alpha$ .  
H.Samoto\*, Y.Ogata , E.Shimizu-Sasaki, M.Yamazaki, J.Sodek and K.Kasai  
Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo, Chiba, Japan, CIHR Group in Periodontal  
Physiology, Faculty of Dentistry, Univ. Toronto, Ont. Canada.

Bone sialoprotein (BSP) is a sulfated and phosphorylated glycoprotein found almost exclusively in mineralized connective tissues. Recent studies on the developmental expression of BSP mRNA and temporo-spatial appearance of the protein during bone formation *in vivo* and *in vitro* have demonstrated that BSP is expressed by differentiated osteoblasts and that it may function in the initial nucleation of hydroxyapatite crystals in *de novo* bone formation. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is a major mediator of inflammatory responses in many diseases. TNF $\alpha$  decreases the synthesis of bone matrix proteins, inhibits bone formation and stimulates bone resorption. Treatment of rat osteosarcoma ROS 17/2.8 cells with TNF $\alpha$  (10ng/ml) for 24 h caused a marked reduction in BSP mRNA levels. To determine the molecular mechanism of TNF $\alpha$  regulation of BSP, we first using various sized BSP gene promoter constructs linked to a luciferase reporter gene to identify the site of transcriptional regulation by TNF $\alpha$  in transient transfection assays. Constructs including the promoter sequence nts -84 to -60 were found to reduce transcriptional activity ~0.6-fold in ROS 17/2.8 cells treated with 10ng/ml TNF $\alpha$ . The effects of TNF $\alpha$  on transcriptional activity were inhibited by the tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A. These studies indicate that TNF $\alpha$  suppresses BSP gene transcription through a tyrosine kinase-dependent pathway that targets a sequence between nts -84 and -60 in the BSP promoter.

## 骨シアロタンパク質 (BSP) の転写に対する腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の効果 Tumor necrosis factor-alpha regulation of bone sialoprotein gene transcription

日本大学松戸歯学部矯正学講座<sup>1</sup>  
日本大学松戸歯学部歯内療法学講座<sup>2</sup>  
日本大学松戸歯学部歯周病学講座<sup>3</sup>

佐本 博<sup>1</sup>, 清水 映美<sup>2</sup>, 小方 頼昌<sup>3</sup>  
葛西 一貴<sup>1</sup>

SAMOTO H., SIMIZU E., OGATA Y.,  
KASAI K.

【目的】骨シアロタンパク質 (BSP) は、石灰化初期に石灰化結合組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質で、生理的なカルシウム、リン濃度の準安定溶液中でアパタイト結晶の形成能を持つことから、初期の石灰化における役割が注目されている。TNF- $\alpha$  は多くの炎症性疾患に関与し、その作用は極めて多彩で、骨芽細胞や破骨細胞に作用して骨のリモデリングに関与すると考えられる。本研究は炎症時における BSP の発現を調節する因子を明らかにし、石灰化のコントロールを究明することにより将来の臨床応用を図ることである。今回我々は、骨芽細胞様細胞である ROS 17/2.8 細胞を用い、TNF- $\alpha$  による BSP 転写調節機構を解析することを目的に検索を行った。【資料および方法】ROS 17/2.8 細胞を無血清下、TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) により刺激後、経時的に全 RNA を抽出し、BSP mRNA 量の変化をノーザンプロット法により解析を行った。次に、ラット BSP プロモーター中に存在する TNF- $\alpha$  応答配列を検索する目的で、種々の長さに調節した BSP プロモーター領域を挿入したルシフェラーゼプラスミドを用いルシフェラーゼアッセイを行った。ルシフェラーゼアッセイの結果から、TNF- $\alpha$  に応答すると考えられる配列を合成し、TNF- $\alpha$  刺激後の核内タンパク質との結合状態をゲルシフトアッセイにて検索を行った。【結果および考察】TNF- $\alpha$  刺激により、BSP mRNA 量は 24 時間後に減少した。ルシフェラーゼアッセイの結果、BSP プロモーター中の -84~-43 塩基対上流に TNF 応答配列が存在すると考えられた。ゲルシフトアッセイの結果、サイクリック AMP 応答配列に結合する核内タンパク質の結合が TNF- $\alpha$  刺激により減少することが判明した。【結論】以上の結果、TNF- $\alpha$  刺激によりサイクリック AMP 応答配列に結合する核内転写因子が BSP の発現の抑制に関与し、石灰化をコントロールしている可能性が示唆された。

## **TNF $\alpha$ SUPPRESSES BONE SIALOPROTEIN (BSP) EXPRESSION IN ROS17/2.8 CELLS.**

H. Samoto, Y. Ogata, E. Shimizu-Sasaki, Y. Matsuda, M. Yamazaki, J. Sodek and K. Kasai  
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan, CIHR Group in Periodontal  
Physiology, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Ont. Canada.

Bone sialoprotein (BSP) is a mineralized tissue-specific protein that appears to function in the initial mineralization of bone. Our previous studies have demonstrated that BSP mRNA expression is essentially restricted to fully-differentiated cells of mineralized connective tissues and that the expression of BSP is developmentally regulated. Tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) is a major mediator of inflammatory responses in many diseases. TNF $\alpha$  decreases the synthesis of bone matrix proteins, inhibits bone formation and stimulates bone resorption. Treatment of rat osteosarcoma ROS 17/2.8 cells with TNF $\alpha$  (10ng/ml) for 24 h caused a marked reduction in BSP mRNA levels. To determine the molecular mechanism of TNF $\alpha$  directed regulation of BSP gene transcription, we conducted transient\_transfection analyses using chimeric constructs of the rat BSP gene promoter linked to a luciferase reporter gene. TNF $\alpha$  (10ng/ml) suppressed expression in all constructs (~0.6-fold), including a short construct (pLUC 3; nts -116 to +60) transfected into ROS17/2.8 cells. Further deletion analysis of the BSP promoter showed that constructs including the promoter sequence nts -108 to -43 reduced transcriptional activity ~0.6-fold when treated with 10ng/ml TNF $\alpha$ . The effects of TNF $\alpha$  on transcriptional activity were inhibited by the tyrosine kinase inhibitor, herbimycin A. Gel mobility shift assays using a radiolabeled ds-oligonucleotide (nts -92 to -73) revealed decreased binding of a nuclear protein from TNF $\alpha$ -stimulated ROS 17/2.8 cells. These studies indicate TNF $\alpha$  suppresses BSP gene transcription through a tyrosine kinase-dependent pathway that targets a sequence between nts -92 and -73 in the BSP gene promoter.

骨シアロタンパク質プロモーターにおける PGE<sub>2</sub> 応答配列の同定  
日本大学松戸歯学部歯周病学講座, 歯内療法学講座\*, 薬理学講座\*\*

○ 佐本博, 清水映美, 本城祐子, 斎藤綾一朗\*, 中尾寿美\*\*, 加藤直子,  
中嶋祐, 中山洋平, 小方頼昌

Identification of PGE<sub>2</sub> response elements in the bone sialoprotein (BSP) gene promoter.

Department of Periodontology, \*Endodontics and \*\*Pharmacology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

○Hiroshi Samoto, Emi Shimizu, Yuko Honjyo, Ryoichiro Saito, Sumi Nakao, Naoko Kato, Yu Nakajima, Youhei Nakayama and Yorimasa Ogata

キーワード: 骨シアロタンパク質, PGE<sub>2</sub>, 転写調節

#### 【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は石灰化組織特異的に発現するリン酸化および硫酸化を受けた糖タンパク質であり, アパタイト結晶形成能を有し, 初期の石灰化部位で多く発現することから, 初期の石灰化に重要な役割を果たすと考えられる。今回我々は, 骨のリモデリングに深く関与すると考えられるプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) による BSP の転写調節機構の解析を行った。

#### 【材料および方法】

1)骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を用い, BSPmRNA の発現を RT-PCR 法にて検索を行った。2)ラット BSP 遺伝子プロモーター領域の長さを調節したルシフェラーゼプラスミドを UMR106 細胞に導入し, PGE<sub>2</sub> 刺激による BSP の転写活性に対する影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。4)BSP 遺伝子プロモーター配列と核内タンパク質との結合をゲルシフトアッセイにて検索した。

#### 【結果】

1) BSPmRNA 量は 3μM および 30nM PGE<sub>2</sub> により 12 時間後に増加した。2)BSP の転写活性に対する PGE<sub>2</sub> の影響をルシフェラーゼアッセイで検索した結果, 転写開始位置より -116 塩基対上流を含む配列(pLUC3)およびそれよりも長い配列にて転写活性の上昇が認められた。3)pLUC3 の配列を一部変化させたプラスミドを用いて PGE<sub>2</sub> による影響を検索した結果, cAMP 応答配列および FGF 応答配列が PGE<sub>2</sub> の作用に関与すると考えられた。4)ゲルシフトアッセイの結果, cAMP および FGF 応答配列に結合する核内タンパク質は PGE<sub>2</sub> 刺激により増加することが明らかになった。

#### 【考察および結論】

PGE<sub>2</sub> 刺激により BSP の転写の上昇が認められ, この転写の調節は cAMP および FGF 応答配列を介すると考えられた。現在, 両配列に結合する転写因子の検索を行っている。

PGE<sub>2</sub>は骨シアロタンパク質の発現を cAMP および FGF2 応答配列  
を介して上昇させる

日本大学松戸歯学部保存学Ⅱ講座（歯周病学）、薬理学講座\*\*、  
保存学Ⅲ講座（歯内療法学）\*

○佐本博，清水映美，本城祐子，齋藤綾一朗\*，中尾寿美\*\*，山崎宗与\*，小方頼昌

**Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) Stimulates Bone Sialoprotein (BSP) Expression through cAMP and  
Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) Response Elements**

Departments of Periodontology, Pharmacology and Endodontics, Nihon University School of  
Dentistry at Matsudo.

○Hiroshi Samoto, Emi Shimizu, Yuko Matsuda-Honjo, Ryoichiro Saito\*, Sumi Nakao\*\*,  
Muneyoshi Yamazaki\*, Yorimasa Ogata

【目的】

骨シアロタンパク質(BSP)は、石灰化初期に、石灰化結合組織特異的に発現する非コラーゲン性タンパク質であり、試験管内でアパタイト結晶形成能を有することから、石灰化における役割が注目されている。今回我々は骨のリモデリングに密接に関与すると考えられるプロスタグランジンE<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) による BSP の転写調節機構の検索を行った。

【材料および方法】

ラット骨芽細胞様細胞である UMR106 細胞を用い、PGE<sub>2</sub> 刺激後の BSPmRNA 量の変化を RT-PCR および real-time PCR にて検索した。また、BSP の転写活性に対する PGE<sub>2</sub> の影響をルシフェラーゼアッセイにて検索した。さらに BSP プロモーター配列と核内タンパク質との結合が PGE<sub>2</sub> 刺激により変化するか否か、また BSP プロモーター配列中のどの部分が PGE<sub>2</sub> 刺激に反応するかを検索する目的でゲルシフトアッセイを行った。

【結果および考察】

UMR106 細胞において、BSPmRNA 量は PGE<sub>2</sub> (3 μM, 300 nM および 30 nM) 刺激により 12 時間後に上昇した。

ルシフェラーゼアッセイの結果、転写開始点より-116 塩基対上流およびそれよりも上流の BSP プロモーター配列を含むルシフェラーゼコンストラクト (pLUC3-7) で、PGE<sub>2</sub> 刺激により転写活性が上昇した。pLUC3 のプロモーター配列を 2 塩基変化させたルシフェラーゼプラスミドを用いて PGE<sub>2</sub> の効果を検索したところ、cAMP および FGF2 応答配列が PGE<sub>2</sub> 刺激に反応する配列であると考えられた。

ゲルシフトアッセイの結果、cAMP および FGF2 応答配列への核内タンパク質の結合量が PGE<sub>2</sub> 刺激により増加し、cAMP 応答配列結合タンパク質 (CREB) は、PGE<sub>2</sub> 刺激によりリン酸化されることが判明した。

【結論】

PGE<sub>2</sub> 刺激により BSP mRNA 量の増加および BSP の転写活性の上昇が認められた。この転写の促進は BSP プロモーター中の cAMP および FGF2 応答配列を介することが明らかとなった。cAMP 応答配列に結合する転写因子は CREB であり、現在未同定の FGF2 応答配列結合タンパク質の同定を行っている。

**Dentition of *Desmostylus* cheek teeth.** K. SUZUKI\* and Y. KOZAWA  
(Dept. of Anatomy, Nihon Univ. Sch. of Dentistry at Matsudo, SakaeCho  
Nishi2, Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan).

E-mail: kuniq@mascat.nihon-u.ac.jp

*Desmostylus* is a fossil mammal inhabited in the Miocene in the North Pacific region. *Desmostylus* has a large lacuna like a crater with a central cone and a thick enamel rim on each molar cusp. Ijiri (1939) indicated that the structure was the crestal pit which was reported by Tokoro in 1937 as a small pit on the tooth crown in mammalia.

In our previous study (1999), developmental process of the crestal pit of *Desmostylus* molar were demonstrated by the incremental lines of immature and mature columns. Deciduous molar and molar (first dentition) had the crestal pit and intense incremental line corresponding to formation of the crestal pit but premolar had not them. These histological features of the cheek teeth suggest that the crestal pit is considered a characteristics of the first generation of dentition to which molars and milk molars belong and that the first dentition mineralized simultaneously in the jaws. It is concluded that these pattern of molar development of *Desmostylus* is unique in mammalia. The intense incremental line corresponding to crestal pit formation is shown as a big metabolic damage, for example by birth or by dynamic changes of life mode. These results also suggest that the previous dental formula (0.1.3.3/1.1.3.3) may be changed to (0.1.3.2/1.1.3.2).

## Arrangement of Enamel Prisms and Pattern of Hunter-Schreger Bands in Mammalian Tooth Enamel

K. Suzuki and Y. Kozawa

Department of Anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

The enamel prism and the Hunter-Schreger bands(HSB) have been known as the main microstructure of mammalian tooth enamel. The degree of assemblage of prism groups and the moving of prisms constitute the characteristic feature of HSB. In this study, details of arrangement of prisms in the HSB of *Rhinoceros* have been researched and compared with the HSB of *Desmostylus*. They have been considered as different types of HSB according to the direction of the bands and the relationship between a band and the included prisms. The HSB of *Rhinoceros* run vertically along with the axis of tooth and two or three lines of prisms composed the boundary between bands in the tangential section. The arrangement of the prisms belonging to each band was in the opposite direction. They indicated the existence of different arrangements of prisms in the bands. The HSB of *Desmostylus* run horizontally and the prisms changed gradually their inclinations on their way. The border between bands was not so clear by means of shifting to adjacent bands. In our detailed SEM observation of *Rhinoceros* enamel, the course of each prism was not straight but undulated strongly at the border of the bands. The appearance of changing direction of prisms to the adjacent bands could be perceived in fracture surfaces. HSB may imply the arrangement and motion of ameloblasts during enamel development. There is in need of reconsideration of relationship between the types of HSB.

## 歯式についての一考察 - *Desmostylus*類歯について -

○鈴木 久仁博、寒河江 登志朗、小澤 幸重  
(日本大学 松戸歯学部 第2解剖学教室)

*Desmostylus*臼歯に特徴的な頂窩の形成様式を歯の組織構造から検討し、頂窩が第一世代(乳臼歯と大臼歯)の臼歯に限られる形態であることを明らかにしてきた。その考察過程で大臼歯といわれるものの数に疑問を抱いてきたので、植立歯をもつ頭蓋から歯式に検討を加えた。これまで歯の植立した頭蓋骨は日本から3標本(戸狩標本NSM-PV 5600, 気屯標本UHR 18466, 歌登標本GSJ-F 7743)が報告されているが、これらはすべて顎骨内に未萌出の大臼歯を持っている。気屯標本は未萌出歯も含めて上顎に3本の大臼歯が植立するとされているが、第一大臼歯とされる歯は両側ともに形態が不明確であり、それ以外の2標本においては大臼歯は2本である。今回、気屯標本の第一大臼歯とされている歯の形態から、歯種、臼歯の萌出様式を検討した結果、気屯標本の破損した臼歯は現時点では最遠心の小白歯に交換する乳臼歯であると仮定できる。未萌出の大臼歯の遠心には歯胚が存在しないことから、気屯標本の大臼歯は未萌出を含めて2本となる。すなわち、本標本の上顎の歯種は近心からP3, d P4, M1, M2となり、乳臼歯の脱落と最遠心の小白歯(P4)の萌出を控えた個体であったと推定される。これまで認められてきた*Desmostylus*の歯式(0.1.3.3/1.1.3.3)については、(0.1.3.2/1.1.3.2)と考えられよう。



## 気屯標本の再検討－*Desmostylus* の歯式に関して

鈴木久仁博<sup>○</sup>・小澤幸重（日本大・松戸歯学部）

これまで歯の植立した頭蓋骨は日本から3標本（戸狩標本 NSM-PV 5600，気屯標本 UHR 18466，歌登標本 GSJ-F 7743）が報告されている。これらの標本はすべて顎骨内に未萌出の大臼歯を持っている。気屯標本は未萌出歯も含めて上顎に3本の大臼歯が植立するとされているが，第一大臼歯とされる歯は両側ともに形態が不明確であり，それ以外の2標本においては大臼歯は2本である。今回，気屯標本の第一大臼歯とされている歯の形態を検討した結果，気屯標本の破損した臼歯は，現時点では近遠心径の大きさ等から最遠心の小臼歯に交換する乳臼歯であると推定された。未萌出の大臼歯の遠心には歯胚が存在しないことから，気屯標本の大臼歯は未萌出を含めて2本となる。すなわち，本標本の上顎の歯種は近心から P3, m3, M1, M2, (P3, d P4, M1, M2) となり，乳臼歯の脱落と最遠心の小臼歯 (P4) の萌出を控えた個体であったと推定される。これまで，*Desmostylus* 臼歯に特徴的な頂窩の形成様式を歯の組織構造から検討し，頂窩が第一世代（乳臼歯と大臼歯）の臼歯に限られる形態であることを明らかにしてきたが，その考察過程で大臼歯の数に疑問を抱いてきた。今回の研究により，これまで認められてきた *Desmostylus* の歯式 (0.1.3.3/1.1.3.3) は，大臼歯を変更し，(0.1.3.2/1.1.3.2) になると考えられよう。

SUZUKI Kunihiro (Nihon Univ. Sch. of Dent. at Matsudo)・KOZAWA Yukishige (Nihon Univ. Sch. of Dent. at Matsudo) : Restudy of the Keton Specimen-On the Dental formula of *Desmostylus*-

## DEVELOPMENT AND DENTITION OF *DESMOSTYLUS* CHEEK TEETH (*MAMMALIA: DESMOSTYLIA*)

K. Suzuki (\*), Y. Kozawa

Department of Anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan

The purpose of this study was to address the question of dental formula of *Desmostylus* cheek teeth. *Desmostylus* is a fossil mammal that lived in the Miocene in the North Pacific region. Molars of *Desmostylus* exhibit a special feature, a large crater-like depression with a central cone and a thick enamel rim on the tip of each columnar cusp. In our previous studies, the developmental process of *Desmostylus* molar and the formation of the crestal pit have been clarified by investigation of the incremental lines in the enamel. Each cusp of the deciduous molar had the crestal pit and also exhibited intense incremental lines comparable to those of molar. However, the premolar, which has been considered by size and feature, had not crater-like crestal pit on the cusp. It is concluded that crestal pit probably was a characteristic feature of deciduous molars and molars, which may be the first generation. Mineralization of all the first generation of cheek teeth occurred in the same period in the jaw, because the intense incremental line converged at the base of crestal pit. It was probably that the line was formed at birth. The Utanobori specimen (GSJ-F7743) exhibited one premolar and two molars, one of which was unerupted in each jaw half. The Togari specimen (NSM-PV5600) also had one premolar and two molars in the upper jaw half, one of which was unerupted molar in the jaw. The erupted premolar indicated the deciduous molars already shed. It has been proposed that the number of molars has to be changed logically to two from three molars in each jaw half of jaws of *Desmostylus* owing to our histological and developmental studies. The only specimen is the Keton specimen (UHR18466) from Sakhalin that reported to have three molars. However, there has been an argument about tooth class of the most proximal tooth of the three molars, because each of which has badly broken crown. In this study, it was reinvestigated and evaluated the teeth of the Keton specimen to determine the dentition. Based on the size of the most proximal tooth of the three molars probably belonged to the third deciduous molar. These results suggest that *Desmostylus* had two molars in each jaw half, therefore, previous dental formula (0.1.3.3/1.1.3.3) should be changed to (0.1.3.2/1.1.3.2).

This study was supported in part by Grants-in-aid for the Frontier Science from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan for 2001, and Suzuki Memorial Grant of Nihon University School of Dentistry at Matsudo General Individual Research Grant for 2001 (01-1001), Nihon University General Joint research Grant for 2001 (01-015) and Grant-in-Aid for Scientific Research (C-12671387).

## **Relationship between ameloblasts and Hunter-Schreger bands in developing enamel of dog molar.**

SUZUKI Kunihiro and KOZAWA Yukishige

Department of Anatomy II

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Key words: ameloblast, Hunter-Schreger bands, enamel prism, dog

The purpose of this study is to understand how the Hunter-Schreger bands (HS bands) are formed during enamel formation. The enamel prism and the HS bands are the basic structures of tooth enamel. It is necessary for discussion the HS bands formation to examine the ameloblast morphology and the ameloblast movement in relation to enamel structure. In this study, characteristics of structure of the ameloblasts and morphology of the Tomes' processes were examined in the developing tooth germs of dog (*Canis familiaris*) molars. In order to observe both enamel surface and ameloblasts simultaneously, organic materials of the samples were removed and the cellular elements were macerated if needed.

In tooth germs of the dogs, the size of Tomes' processes increased during amelogenesis, the three-dimensional structure of the of Tomes' process pits changed from the early stage of enamel formation to the late stage until near completion. The belt-like zones of HS bands consisted of groups of the pits oriented in almost the same direction, whereas those in the neighboring zones were oriented in opposite direction. The exposed surface of developing enamel showed an undulating surface and formation of HS bands. Ameloblasts appeared to form groups and the groups of ameloblasts inclined in different directions, corresponding to the planes of inclination of the ridges on the undulating surface. Gaps between groups were observed at the proximal site of ameloblasts. Ameloblasts of adjacent rows of HS bands had C- or S-shaped inclination oriented in opposite directions, and had fulcrums at the distal and proximal terminal bars. Our results showed that the HS bands appeared differently according to the patterns of ameloblast groups (grouping), and corresponded to morphological changes of ameloblasts (dancing) during enamel formation. It is necessary to examine the factors of grouping and dancing of ameloblasts at the various stages during amelogenesis.

This study was supported in part by Grants-in-aid for the Frontier Science from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan for 2001, and Suzuki Memorial Grant of Nihon University School of Dentistry at Matsudo General Individual Research Grant for 2001 (01-1001), Nihon University General Joint research Grant for 2001 (01-015) and Grant-in-Aid for Scientific Research (C-12671387).

## Dentition of extinct mammals- In case of *Desmostylus* cheek teeth (Mammalia: Desmostylia).

SUZUKI Kunihiro and KOZAWA Yukishige

Department of AnatomyII, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo.  
870-1, Sakae-cho Nishi 2, Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan

The purpose of this study was to apply histological observation of tooth to developmental research of dentition and to address the question of the dental formula of *Desmostylus* cheek teeth. *Desmostylus* is a fossil mammal that lived in the Miocene in the North Pacific region. Molars and deciduous molars of *Desmostylus* exhibit a special feature: the occlusal surfaces contain a large crater-like depression with a central cone and a thick enamel rim on the tip of each columnar cusp. However, the premolars had no crater-like crestal pit on the cusp. It is concluded that the crestal pit was a characteristic feature of deciduous molars and molars, which may be teeth of the first generation. In our previous studies, the developmental process of *Desmostylus* molars and the formation of the crestal pit have been clarified by investigation of the incremental lines in the enamel. Mineralization of all first generation cheek teeth occurred in the same period in the jaw, because the intense incremental line converged at the base of crestal pit. It was probable that the line was formed at birth.

There are three specimens of jaws with teeth. The Utanobori specimen (GSJ-F7743) and Togari specimen (NSM-PV5600) had one premolar and two molars in the upper jaw half, one of which was an unerupted molar in the jaw. The erupted premolar indicated that the deciduous molars had already shed. This implies that the third molar with the crestal pits could not be formed. Owing to our histological and developmental studies it is proposed that the number of molars of *Desmostylus* was two in each jaw half. However, the only specimen reported to have three molars is Keton specimen (UHR18466). There has been an argument about the tooth class of the most mesial tooth of the three molars, because the tooth had badly broken crown. In this study, the teeth of the Keton specimen were reinvestigated and evaluated to determine the dentition. Based on the size of the most mesial tooth of the three molars of the Keton specimen, this tooth probably represented the third deciduous molar. These results suggest that *Desmostylus* had two molars in each jaw half, and therefore the previous dental formula (0.1.3.3/1.1.3.3) should be changed to (0.1.3.2/1.1.3.2).

This study was supported in part by Grants-in-aid for the Frontier Science from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan for 2001, and Suzuki Memorial Grant of Nihon University School of Dentistry at Matsudo General Individual Research Grant for 2001 (01-1001), Nihon University General Joint research Grant for 2001 (01-015) and Grant-in-Aid for Scientific Research (C-12671387).

# Characterized crown and the relation of the root –In the case of *Desmostylus* molar

SUZUKI Kunihiro and KOZAWA Yukishige

Department of Anatomy II, Research Institute of Oral Science  
Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

*Desmostylus* is a fossil mammal that lived in the north Pacific region in the middle Miocene. It is characterized by columnar multi cusp with thick enamel of large molar.

There are 8–9 cusps on the upper molar, and 3 roots exist in the part corresponding to mesiobuccal cusps(2), mesiolingual cusps(2) and distobuccal cusps (3). Mesiobuccal root is like a stalk and the other two roots are fused to the vicinity of apex. There are 6–7 cusps on the lower molar, and 2 roots exist in the part corresponding to almost at the center of mesial cusps(2) and in the distal part. The distal root has elongate outline. There is a difference in the position of distal root, which is in the second row of cusps or the third row. There is a meandering occlusal wear on the upper molar, and mesiodistal wear on the center of lower molar. There is variation in the position of roots, and it is related to the condition of attrition in each molar.

It is thought that the basic arrangement of the roots is decided by the relation with the cusps of crown, and the formation of the root is decided by development of the jawbone and a minute environment by the occlusal pressure.

## エナメル質形成不全症における過剰埋伏歯の組織構造

○鈴木 久仁博<sup>1</sup>、松根 健介<sup>2</sup>、岩佐 由香<sup>1</sup>、小澤 幸重<sup>1</sup>、前田 隆秀<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 日本大学 松戸歯学部 第 II 解剖学講座、<sup>2</sup> 日本大学 松戸歯学部 小児歯科学講座)

エナメル質形成不全症(AI)の正中過剰埋伏歯を観察し、エナメル質の組織構造について検討した。試料の表面は無処理、断面は1/20N塩酸による腐食処理で観察した。エナメル質表面は形成不全や吸収による凹凸が著しく、試料の一つには明瞭な周波条が観察された。また、層状の剥離や球状、茸状の隆起、大小の陥凹が認められ、石灰化が不規則に進行したことを示していた。トームス突起の陥凹が観察される部位と陥凹の認められない平滑な面をもつ部位が混在し、隆起の頂部をトームス突起の陥凹をもつ破片が覆う部位もあった。縦断面の観察では不定形の膜状構造やエナメル小柱が融合したような像により有機成分が多いことが推定された。シュレーゲル条は認められず、小柱の形態や大きさは様々であり、走向は複雑で捻転する部位もみられた。また、エナメル小柱が大きく屈曲し、明瞭で幅の広い成長線が認められたが、対応する象牙質にはこのような像は観察されなかった。エナメル質のほぼ中層には複雑な形態の空洞が配列し、形成中においてもエナメル芽細胞の退縮と形成不全のあることを示していた。AIの組織学的研究においては表面構造の報告が多いが、本研究の結果は、エナメル小柱の形態の多様性はエナメル芽細胞の形態と機能の著しい変化を示し、エナメル質の形成過程において、エナメル芽細胞はシュレーゲル条を構成する正常な集団化と規則的な運動が阻害されていることが推定される。

齒冠とその齒根の關係—特殊化した齒冠を持つ  
*Desmostylus* を例として

○鈴木 久仁博<sup>1</sup>、小澤 幸重<sup>1</sup>(<sup>1</sup>日大 松戸齒 解剖II 口科研)

*Desmostylus*(デスモスチルス)は特徴的な円柱状の多咬頭大型臼齒をもつ、第三紀中新世の日本列島やアメリカ西海岸に生息した化石哺乳類である。特殊化した形態の齒冠では咬頭が明瞭に齒根と対応するため、臼齒を支える齒根と咬頭との関連性を検討した。*Desmostylus* は基本的に上顎の臼齒に3本、下顎に2本の齒根を持つ。上顎臼齒には8~9個の咬頭があり、齒根は近心頬側咬頭(2咬頭)に対応する部位と近心舌側(2咬頭)、遠心頬側(3咬頭)の各咬頭に対応する部位に存在していた。近心頬側の齒根は独立した太い茎状であり、他の2根は根尖近くまで癒合していた。下顎臼齒は6~7咬頭であり、齒根は近心2咬頭のほぼ中央にある近心根と、遠心部の頬側から舌側にかけて板状となった遠心根が認められる。遠心根の位置は近心から第2列目の咬頭にあるものと第3列目の咬頭にあるものがあつた。咬合面の形状は基本的には上顎では近心舌側から遠心頬側にかけて蛇行する帯状の咬耗があり、下顎ではほぼ中央を近遠心方向に走る帯状の咬耗があつた。個々の臼齒における齒根の部位の変異は、それぞれの咬耗状態と関連していると考えられる。すなわち、齒根形態の形成は、まず咬頭との対応關係で基本的な部位が決まり、顎骨の発生と咬合圧による微小環境によって決まるものと推定される。

## RELATIONSHIP BETWEEN THE ROOT AND THE CROWN OF *DESMOSTYLUS* MOLAR

K. Suzuki, Y. Iwasa, H. Chisaka, Y. Kozawa  
Dept. Anat., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo  
[kuniq@mascat.nihon-u.ac.jp]

*Desmostylus* is a fossil mammal that lived in the north Pacific region in the middle Miocene. It is characterized by columnar and multicuspid large molar with thick enamel. It has been thought that *Desmostylus* had horizontal replacement of molars. In this study, morphological and spatial relation between crown and root is represented. There were 8-9 cusps on the upper molar, and 3 roots existed in the part corresponding to mesiobuccal cusps (2), mesiolingual cusps (2) and distobuccal cusps (3). Mesiobuccal root was like a stalk and the other two roots were fused to the vicinity of apex. There was a variety of spatial relationship between three roots. There were 6-7 cusps on the lower molar, and 2 roots existed in the part corresponding to almost at the center of mesial cusps (2) and in the distal part. The distal root had elongate outline. There was a variety of the position of distal root, which corresponded in the second row or the third row of cusps. There was a meandering occlusal wear on the upper molar, and mesiodistal wear on the center in the lower molar. It is thought that the position of the cusps of crown determines the basic arrangement of the roots genetically. There was variation in the position of roots related to the condition of attrition in each molar. It is considered that development of the jawbone during the root formation and minute environment by the occlusal condition give rise to spatial variation of roots.



**OROFACIAL DEVELOPMENT  
AND REGENERATION  
COST B23**



**COST**



**WG 2 AND 4 MEETING  
DEBRECEN  
2004**



**K. SUZUKI, Y. KOZAWA**

***IDENTIFICATION OF DENTITION AND TOOTH REPLACEMENT OF  
EXTINCT MAMMALS. - IN CASE OF DESMOSTYLUS CHEEK TEETH  
(MAMMALIA: DESMOSTYLIA)***

Department of Anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo. 870-1, Sakae-cho Nishi 2, Matsudo, Chiba, 271-8587, Japan

*Desmostylus* is a fossil mammal that lived in the Miocene in the North Pacific region. The molar consists of columnar cusps with a large crater-like depression of each. The molars have been thought to be horizontal replacement. In our previous studies, the developmental process of the molar has been clarified by the incremental lines and proposed that *Desmostylus* had two molars in each jaw half. Thus the previous dental formula (0.1.3.3/1.1.3.3) should be changed to (0.1.3.2/1.1.3.2). Indeed, the Utanobori specimens (I:GSJ-F7743, III:GSJ-F7745) and the Togari specimen (NSM-PV5600) exhibited in each jaw half one premolar and two molars. However, the Keton specimen (UHR18466) is reported to have three molars. Based on our measurement of the teeth, the most mesial molar should be determined to be a deciduous molar. The diastema between premolar and molar has been observed in those specimens. Upper jaw of the Utanobori III specimen had a plate-like substance between premolar and molar. In our observation on roots of molars and deciduous molars in upper jaw, disto-buccal root and lingual root fused and bifurcated close to apex and the horizontal section of the root showed long oval feature. The substance was determined to be the rest of root of the deciduous molar. It is confirmed that *Desmostylus* had two molars in each jaw half and deciduous molars were vertical replacement, owing to reinvestigation the molars and the diastema between premolar and molar.

**Keywords:** *Desmostylus*, dentition, replacement

**References:** Suzuki, K., Kozawa, Y. (1999) Crestal pit of *Desmostylus* molar. J. Fossil Research 31; 44-51. Suzuki, K., Kozawa, Y. (2003) Dentition of extinct mammals-In case of *Desmostylus* cheek teeth (Mammalia: Desmostylia). Arch. Comp. Boil. Tooth Enamel 8; 76-82.

**Acknowledgements:** This study was supported in part by Grant from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture to promote Multidisciplinary Research Projects (in 2001-2005, 2003-2007).

***Suzuki Kunihiro, Kozawa Yukishige***

*Department of Anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan; Suzuki Kunihiro: kuniq@mascat.nihon-u.ac.jp*

## **RELATIONSHIP BETWEEN TOOTH CROWN AND ROOT – IN CASE OF EXTINCT MAMMAL, *DESMOSTYLUS* (MAMMALIA: DESMOSTYLIA)**

Relationship between tooth crown and root in mammalian dentition is not well known. The aim of this study is to clarify the issue from viewpoint of fossil evidence.

**Material:** *Desmostylus* is an extinct mammal that lived in the north Pacific region in the Middle Miocene. It is characterized by columnar and multi-cusped large molars with thick enamel. The homology of the cusps and root development are not well understood.

**Results:** There were 8 cusps with accessory cusps on the upper molar. 3 roots existed in the part of upper molar corresponding to mesiobuccal two cusps, mesiolingual two cusps and distobuccal three cusps. Mesiobuccal root was like a stalk and the other two roots were fused to the vicinity of apex. There was a variety of spatial relationship between three roots. There were 6 cusps on the lower molar with accessory cusps. Two roots existed in the part of lower molar corresponding approximately to the center of mesial two cusps and the other at the distal row of cusps. The distal root had elongated outline. Each of their inner side concaved longitudinally. There was a variety of positions of distal root, which corresponded to the second row or the third row of cusps.

**Conclusion:** *Desmostylus* molar has been thought to be effective material concerning morphological relationship between tooth crown and root. Accurate special correspondence between cusps and roots is difficult to observe in these mature specimens due to developmental change of molar formation. It is thought that the position of the cusps of crown determines the basic arrangement of the roots genetically. It is considered that development of the jawbone and occlusal condition during the root formation and eruption of molar gives rise to spatial variation of roots.

**Acknowledgements.** This study was supported in part by Grant from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture to promote Multidisciplinary Research Projects in 2001–2005, 2003–2007.

### **References**

Suzuki, K., Kozawa, Y. (2003) Dentition of extinct mammals-In case of *Desmostylus* cheek teeth (Mammalia: Desmostylia). Arch. Comp. Boil. Tooth Enamel 8; 76–82.

## 新生児インドゾウの上・下顎の解剖

○鈴木 久仁博<sup>1</sup>、小澤 幸重<sup>1</sup>、寒河江 登志朗<sup>1</sup>、山本 仁<sup>1</sup>、横田 ルミ<sup>1</sup>、千坂 英輝<sup>1</sup> (日本大学 松戸歯 組織・発生・解剖学)

現在のゾウの歯は上顎（片側）に切歯1，臼歯6，下顎は臼歯のみで，ヒトに比較して著しく減少している．この発生機構の解明は歯の退縮の要因を明らかにする事に繋がる．今回インドゾウ (*Elephas indicus*) の出産直後の新生児の解剖を行う機会を得たので，歯を中心とした上下顎の所見を報告する．標本は一部破損していたが，上顎切歯骨内に石灰化した切歯歯胚（長さ7cm，太さ1.5cm）が一对，その内側に未石灰化歯胚が一对存在していた．この石灰化歯胚は吸収途中の先行歯であることが確認された．上顎骨及び下顎骨には石灰化した臼歯歯胚が三対，最遠心に未石灰化臼歯歯胚が一对認められた．最初の臼歯（近遠心2cm，幅1cm）は歯冠歯根が完成し，歯冠にはセメント質の沈着，エナメル質の吸収が起こっていた．最遠心の臼歯は未石灰化で13-16の咬板状のヒダを認めた．近心の歯胚は顎骨中にあったが，後続歯胚は顎骨中の空洞に存在した．口腔面は厚い歯肉に覆われ，その内面に歯堤が近心から遠心に伸長し，4番目の臼歯で止まっていた．歯胚は硬膜によって遠心から包むように覆われ，硬膜の中を神経，血管が近心へ走向していた．石灰化が開始した歯胚には神経が著しく侵入していた．歯胚を取り囲む硬膜には歯嚢骨の形成が観察された．しかしこの時期には，遠心の歯式2本の臼歯については歯堤の発生をも確認できなかった．本研究はチェンマイ大学との共同研究であり，正式な報告は研究完成後出される．

## 象牙質の成長線の周期性－ワニ類を例として－

三島弘幸<sup>1</sup>, 岩佐由香, 横田ルミ, E.M.Ruth<sup>2</sup>, 小澤幸重

(<sup>1</sup>日本大学松戸歯学部, <sup>2</sup>Louisiana Dept. of Wildlife and Fishes, Rockefeller Refuge.)

ワニ類の孵化前の歯の象牙質の成長線に関する知見は知られていない。本研究の目的はワニ類の象牙質において孵化前と孵化後の成長線の周期性に違いがあるどうかを検索することである。

用いた材料は、孵化後の象牙質の観察においては、3種のワニ、即ちメガネカイマン、クチヒロカイマン、及びアメリカアリゲーター (*Caiman crocodilus*, *Caiman latirostris*, *Alligator mississippiensis*) を用いた。孵化前の象牙質の観察においては、アメリカアリゲーター (*Alligator mississippiensis*) を用いた。歯及び顎骨は中性ホルマリンにて固定後、縦断研磨標本や脱灰標本にし、脱灰標本は H・E 染色や銀染色を施し、それぞれ光学顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。成長線の間隔は画像解析装置にて計測した。

孵化後のワニ類の象牙質では、周期性の異なる成長線が観察された。長周期のものでは、約一ヶ月周期があり、この成長線はより低石灰化であった。その次の周期は約2週間周期のものであった。研磨標本による共焦点レーザー顕微鏡の観察では約2日間隔の細かな成長線 (平均  $10\mu\text{m}$ ) が認められた。脱灰標本による銀染色像や H・E 染色像、あるいは共焦点レーザー顕微鏡による脱灰標本の観察では、さらに細かい周期の成長線が観察され、その周期は平均  $5\mu\text{m}$  であった。TC 投与による時刻描記法から、最も細かな成長線 (平均  $5\mu\text{m}$  周期) は、一日周期の成長線と同定される。成長線の形成において、有機質による成長線の周期性と石灰化による成長線の周期性が異なることが示唆された。

孵化前の歯の象牙質において、成長線は観察された。しかし、孵化後の成長線とは異なり、染色性に濃淡はなく、細かな周期であった。その周期の間隔は平均  $4\mu\text{m}$  であった。

孵化前と孵化後で成長線の周期性に変化が見られた。このことは象牙質の成長線の周期性は外界の環境の影響が強く関与しているものと考察される。

**The change of incremental lines in dentin of Alligator teeth on before and after hatching.** H. MISHIMA<sup>1\*</sup>, Y. IWASA<sup>1</sup>, R. YOKOTA<sup>1</sup>, R.M. ELSEY<sup>2</sup> and Y. KOZAWA<sup>1</sup> (Dept of Anatomy, Nihon Univ Sch of Dent at Matsudo, Matsudo, Japan<sup>1</sup>; Fur and Refuge Wildlife Biologist, Louisiana Dept. of Wildlife and Fishers, Rockefeller Wildlife Refuge, Grand Chenier, USA<sup>2</sup>).

.....  
E-mail: mishima@mascat.nihon-u.ac.jp

The various types of incremental lines in mammalian dentin have been debated for many years ago. Short-period incremental lines are considered to be daily markings, indicating of circadian rhythms. However, there has been little report on the incremental lines of dentin in the Alligator teeth. The present study was designed to examine the difference of the incremental lines regarding before and after hatching. Alligator (*Alligator mississippiensis*) teeth were used in this study. The teeth were fixed in 10% neutral formalin. After fixation, the teeth were ground parallel to their longitudinal axis. The ground sections were observed by light microscopy, polarized light microscopy, scanning electron microscopy, microradiography, and confocal laser scanning microscopy. Some specimens were decalcified with 10 % EDTA (pH 7.4). The decalcification sections were stained with hematoxylin and eosin staining, and silver staining. On ground section, the periodicities of incremental line in dentin are about 2 days, about 14 days, and about 28 days apart after hatching. The incremental lines of about 28 days period was more hypocalcified than the incremental lines of both about 2 and 14 days period. The average width of incremental lines in about 2days apart was 10  $\mu\text{m}$ . On decalcified section, the narrower incremental lines observed in dentin. The average width was 5 $\mu\text{m}$ . It is considered that the 5  $\mu\text{m}$  period incremental lines are the circadian increments. Before hatching, the incremental lines were uniformity, and the average width was 4 $\mu\text{m}$ . It is assumed that the periodicity of incremental lines after hatching may be related to the influence of environment.

## Morphological and Chemical Analyses of Calcospherites of Dentin in Man and Other Animals

H. Mishima, Y. Iwasa, T. Yamazoe and Y. Kozawa

Department of Anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

There are great differences in the size and shape of the calcospherites at the mineralization front of enamel-covered labial dentin and cementum-covered lingual dentin of rat and rabbit incisors. LINDE & GOLDBERG (1993) reported that dentin species seem to fall into two main groups, the dentin of continuously growing rodent teeth forming one group and the dentin of teeth in which dentinogenesis occurs during a limited period of time, such as human and bovine dentin, forming the other group. The present study was designed to characterize the morphology and chemical composition of the calcospherites in the predentin between continuously growing teeth and uncontinuously growing teeth using scanning electron microscopy (SEM). Incisors from Wistar-strain rats and Japanese white rabbits, human permanent teeth, bovine permanent incisors, opossum (*Monodelphis domestica*) teeth, and crocodilian (*Caiman crocodilus*) teeth were used in this study. The pulpal surfaces were observed from the horn region of the pulp chamber to the apical region of the pulp chamber with a Hitachi S-2700 SEM operated at accelerating voltage of 15-20 kV.

In rat labial dentin the calcospherites were large and globular form, but the calcospherites in rat lingual dentin were small and oval. In the rabbit lingual dentin, small granular calcospherites were present at the root apex, increasing in size toward the intermediate region. The incisal pulp horn of both labial and lingual dentin in rabbit contained micro-calcospherites. The shape and size of rabbit calcospherites varied from the pulp horn to the root apex. Calcospherites in human and bovine were globular and 6-32  $\mu$  m in diameter at the coronal dentin. The size of the calcospherites decreased at the root dentin, and their shape changed. The polygonal calcospherites and stellate calcospherites were observed in the intermediate region of the root dentin in human teeth. At the apical region of the human root dentin, calcospherites rarely existed. Calcified matrix fibers were observed at the apical region of the root dentin. In the opossum dentin of premolar and molar, the calcospherites were only observed at the cervical region. Calcospherites in opossum dentin were globular and 15-22  $\mu$  m in diameter. No calcospherites were observed at both pulp horn of coronal dentin and apex of root dentin in opossum. Calcospherites in crocodilian dentin were small and under 10  $\mu$  m in diameter. No globular calcospherites were observed at the apical region of crocodilian root dentin. The shape, size and chemical composition of crocodilian calcospherites differed from that of mammalian calcospherites. The Ca/P ratio in crocodilian crown calcospherites was  $1.93 \pm 0.30$ , and that in

## The Incremental Lines in Dentin of Alligator Teeth

H. Mishima<sup>1</sup>, Y. Iwasa<sup>1</sup>, R. Yokota<sup>1</sup>, R.M. Elsey<sup>2</sup> and Y. Kozawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

<sup>2</sup>Fur and Refuge Wildlife Biologist, Louisiana Dept. of Wildlife and Fishers, Rockefeller Wildlife Refuge, Grand Chenier, Louisiana, USA

The present study was designed to examine the difference of the incremental lines regarding before and after hatching and the periodicity of the short-period and long period incremental lines. Alligator (*Alligator mississippiensis*) teeth of before and after hatching were used in this study. Before hatching, the incremental lines were uniformity, the circadian incremental lines, and the average width was 4  $\mu\text{m}$ . After hatching, the periodicities of incremental line in dentin are daily, 2-3 days, about 14 days, and about 28 days apart. The lunar incremental lines are due to the rhythmic deposition of mineralization and organic matrix. The half-lunar incremental lines are due to the rhythmic deposition of mineralization and organic matrix, but depend on the mineralization strongly. The 2-3 days apart incremental lines are due to the rhythmic deposition of mineralization. The circadian incremental lines are due to the rhythmic deposition of organic matrix. The rhythm of matrix formation may not correspond to the rhythm of calcification formation. These intervals of incremental lines may be related to the rhythm of the odontoblast function, the fundamental biorhythm of the animals and the influence of environment.

## 数種の動物の象牙質における石灰化球と石灰化機序との関連

○三島 弘幸、岩佐 由香、山添 友子、横田 ルミ、小澤 幸重  
(日本大学 松戸歯学部 第2解剖学教室)

【目的】本研究は、無根歯であるラットやウサギの切歯および有根歯であるヒト、ウシ、オポッサムの歯、さらに多生歯性のワニの歯を用いて、象牙質の石灰化球を比較し、石灰化球の形態や組成と石灰化様式との関連性について検討した。

【方法】用いた材料はラットやウサギの切歯およびヒト、ウシ、オポッサム、ワニの歯である。歯は10%中性ホルマリンにて固定後、歯科用デンタルエンジンにて歯を切断し、5%NaClOにて脱有機処理を行い、石灰化球をSEMにて観察し、さらにEDS分析を行った。

【成績・結論】歯冠部において、球状の石灰化球が認められ、ヒトやウシでは6-32  $\mu\text{m}$ の直径であった。オポッサムでは15-22  $\mu\text{m}$ の直径であった。ワニの石灰化球は4-10  $\mu\text{m}$ の直径であった。歯根部の根尖側では、石灰化球は認められず、石灰化したコラーゲン線維が観察された。ヒトやオポッサムにおいて、石灰化球のCa/Pでは歯冠部と歯根部で有意の差が見出された。球状石灰化は歯冠象牙質でみられ、板状石灰化は歯根象牙質でみられる。石灰化球の有無や化学組成の違いは石灰化様式と関連すると考えられる。セメント質が覆う象牙質において、無根歯であるラットやウサギと有根歯であるヒトやウシにおいて、石灰化球の形態や大きさが異なっていた。この差は歯の形成機構と関連があり、象牙芽細胞の活性やその周囲の微小環境の違いによると推定される



---

---

## 象牙質アパタイト結晶の配向性と組織構造

三島弘幸・寒河江登志朗・小澤幸重

(日本大学松戸歯学部)

---

---

一生歯性，二生歯性，多生歯性という歯の形成機構と結晶の配向性との関連性を検索するために，イメージングプレートを用いた微小部X線回折装置で検討した．用いた材料は，無根歯のラット切歯，ウサギ切歯，あるいは有根歯のヒト，ウシ，シカの切歯，多生歯性のワニの歯を用いた．各試料は50～100 $\mu$ mの縦断研磨標本とし，湾曲IPX線回折装置（理学製）で100 $\mu$ m径のコリメーターを用い，管電圧60kV，管電流30mA，露光時間30分の条件で，透過法により象牙質中層の結晶の配向性を検索した．ヒト，ウシ，シカの切歯において，エナメル質が覆う歯冠象牙質では無配向であり，無根歯のエナメル質が覆う唇側象牙質と同様の結果であった．これらの結果は，歯冠象牙質では結晶の配向性が球状石灰化により不規則になると考察される．一方セメント質が覆う歯根象牙質では配向性が認められたが，無根歯のセメント質が覆う舌側象牙質の方がデバイ環の分布が狭く，より配向度が良かった．多生歯性のワニの歯では，エナメル質が覆う歯冠部象牙質で結晶の配向性が認められた．これらの結果は歯の形成機構と象牙質結晶の配向性との関連性があることが示唆される．

## THE RHYTHM OF INCREMENTAL LINES IN DENTIN OF ALLIGATOR (*ALLIGATOR MISSISSIPPIENSIS*)

H. Mishima (1\*), R. Yokota (1), Y. Iwasa (1), R.M. Elsey (2), Y. Kozawa (1)

(1) Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan,

(2) Fur and Refuge Wildlife Biologist, Louisiana Department of Wildlife and Fishers, Rockefeller Wildlife Refuge, Grand Chenier, Louisiana, USA

The various periodicity of incremental lines in tooth dentin have been discussed for many years. The short-period incremental lines are considered to be circadian rhythms. The circadian increments and the ultradian increments coexisted in rat incisor dentin. However, there is little report on the incremental lines in the dentin of the alligator teeth. The purpose of the present study is to examine the rhythm of the incremental lines in the dentin of alligator (*Alligator mississippiensis*) teeth. Embryos of alligators before hatching and alligators after hatching were used in this study. The teeth of specimens were fixed in 10% neutral formalin solution. After fixation, the teeth were ground parallel to the longitudinal axis. The ground sections were observed using light microscopy and scanning electron microscopy. Some of specimens were decalcified with 10% EDTA (pH 7.4). The decalcified sections were stained with hematoxylin and eosin staining and Bodian protein silver impregnation. Before hatching, the incremental lines in the dentin were uniform and the average width of these lines was 4  $\mu\text{m}$ . These incremental lines had a circadian rhythm. After hatching, incremental lines of four kinds of rhythm were observed in the dentin. Darker and wider incremental lines were observed at approximately 28-day intervals. The lunar incremental lines (approximately 28-day interval) are due to the rhythmic deposition of both minerals and organic matrix. The semi-lunar incremental lines (approximately 14-day interval) are due to the rhythmic deposition of minerals and organic matrix, but these incremental lines strongly depend on mineralization. The incremental lines of approximately 2 to 3-day interval are due to the rhythmic deposition of mineralization. The circadian incremental lines are due to the rhythmic deposition of organic matrix. The intervals of incremental lines may be related to the rhythm of the odontoblast function and the fundamental biorhythm of the animals.

This work was supported by the Nihon University General Joint Research Grant for 2001 (01-015), a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to Promotion Multidisciplinary Research Projects 1998-2003 and 2001-2005, and Grant-in-Aid for Scientific Research (C. 13671914 and C. 12671787) from Japan Society for the Promotion of Science.

## **Orientation of apatite crystal in dentin from human and some animal teeth.**

MISHIMA Hiroyuki, SAKAE Toshiro, KOZAWA Yukishige

Department of Anatomy, Nihon University School of dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan

Dentins of human, bovine, deer, rat, rabbit and alligator teeth were studied to investigate the crystal organization of dentin, and the relationship between crystal orientation and the mechanism of tooth formation, using a curve IP X-ray Laue system (RINT RAPID, Rigaku). The crystal orientation was very poorly orientated in the enamel-covered crown dentin of human, bovine and deer teeth. The results were similar to the enamel-covered labial dentin of rat and rabbit incisors. In the enamel-covered dentin, the calcospherites were present. With the presence of calcospherites, the crystal orientation was arranged radially. The crystals were orientated indistinctly in the cementum-covered root dentin of human, bovine, and deer teeth. No calcospherites were observed in the cementum-covered root and lingual dentin. In the cementum-covered dentin, the axis of crystal orientation was almost parallel to the tooth axis and almost to the direction of the collagen fibers. In the cementum-covered dentin of rat and rabbit incisors, the distribution of Debye ring of apatite (002) was narrower. The degree of orientation of continuously growing teeth was better than that of diphyodont teeth. In the enamel-covered crown dentin from alligator's polyphyodont teeth, the crystal orientation was recognized as similar to the cementum-covered root dentin. The incremental lines were clearly observed in the crown dentin in alligator. It is assumed that collagen-orientated crystals run nearly parallel to the orientation of incremental lines. It is suggested that the relationship was observed between the mechanism of the tooth formation and the orientation characteristic of dentine crystal. A part of this work was supported by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to Promotion Multidisciplinary Research Projects 1998-2003 and 2001-2005, and Grant-in-Aid for Scientific Research (C. 13671914 and C. 12671787) from Japan Society for the Promotion of Science.

## ヒトや数種の動物の象牙質における石灰化球

三島 弘幸, 岩佐 由香, 横田 ルミ, 小澤 幸重

日本大・松戸歯・第2解剖

本研究は、無根歯であるラットやウサギの切歯および有根歯であるヒト、ウシ、オポッサムの歯、さらに多生歯性のワニの歯を用いて、象牙質の石灰化球を比較し、石灰化球の形態や組成と石灰化様式との関連性について検討した。用いた材料はラットやウサギの切歯およびヒト、ウシ、オポッサム、ワニの歯である。歯は10%中性ホルマリンにて固定後、歯科用デンタルエンジンにて歯を切断し、5%NaClOにて脱有機処理を行い、石灰化球をSEMにて観察し、さらにEDS分析を行った。歯冠部において、球状の石灰化球が認められ、ヒトやウシでは6-32 $\mu\text{m}$ の直径であった。オポッサムでは15-22 $\mu\text{m}$ の直径であった。ワニの石灰化球は4-10 $\mu\text{m}$ の直径であった。歯根部の根尖側では、石灰化球は認められず、石灰化したコラーゲン線維が観察された。ヒトやオポッサムにおいて、石灰化球のCa/Pでは歯冠部と歯根部で有意の差が見出された。球状石灰化は歯冠象牙質でみられ、板状石灰化は歯根象牙質でみられる。石灰化球の有無や化学組成の違いは石灰化様式と関連すると考えられる。セメント質が覆う象牙質において、無根歯であるラットやウサギと有根歯であるヒトやウシにおいて、石灰化球の形態や大きさが異なっていた。多生歯のワニの歯は哺乳類の石灰化球より小型であり、表面形態が線維状であった。歯の形成機構の違いが石灰化球の形態形成に関与すると考察される。

顕微レーザーラマン分光法による硬組織の解析  
○三島 弘幸<sup>1</sup>、寒河江 登志朗<sup>1</sup>、横山 政昭<sup>2</sup>、岩佐 由香<sup>1</sup>、LeGeros Racquel Z<sup>3</sup>、小澤 幸重<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日本大 松戸歯 第2解剖学、<sup>2</sup>堀場製作所 分析センター、<sup>3</sup>New York Univ Dental Center)

【目的】硬組織中の結晶を解析する手段にX線回折法や電子線回折法が知られている。近年、1  $\mu$ mの微小な領域の物質組成や分子構造を分析できる顕微レーザーラマン分光法が開発されてきた。FT-IRに比較し、前処理の必要が少なく、どのような形状の試料でも短時間に測定できる利点がある。しかし、この手法で硬組織を解析した例は少ない。エナメル質、象牙質などの生体アパタイト結晶の解析に顕微レーザーラマン分光法が有効かどうかを検討する目的で、本研究を行った。

【方法】試料は鉱物 hidroksiapatit 結晶 (HA)、合成アパタイト結晶 (carbonated hydroxyapatite ; CHA)、各種動物の歯のエナメル質と象牙質、そしてエナメル芽細胞、象牙芽細胞を用いた。各試料を堀場ジョバンイボン社製の顕微レーザーラマン分光装置 LabRam Infinity を用い、He-Ne レーザーにて測定した。

【結果・考察】エナメル質や象牙質の生体アパタイト結晶はHAと異なるラマンスペクトルを示した。またHAに比較し結晶性が悪く、CHAと同様なラマンスペクトルであった。これは生体アパタイト結晶がHAより多くのカーボネイトを含んでいるという見解を支持する結果となった。レーザーラマン分光法は硬組織中の微小領域の解析に有効な手段であると考察される。研究経費の一部は日本大学松戸歯学部学術フロンティア推進によった。

# The periodicity of incremental lines by the rhythmic deposition of both the mineral and the organic matrix in dentin

H. Mishima<sup>1</sup>, R. Yokota<sup>1</sup>, Y. Iwasa<sup>1</sup>, R. M. Elsey<sup>2</sup>, Y. Kozawa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan, <sup>2</sup>Fur and Refuge Wildlife Biologist, Louisiana Department of Wildlife and Fishers, Rockefeller Wildlife Refuge, Grand Chenier, Louisiana, 70643, USA

The circadian increments and the ultradian increments coexisted in rat incisor dentin. However, there is little report on the incremental lines in the dentin of the alligator teeth. The purpose of the present study is to examine the rhythm of the incremental lines in the dentin of alligator (*Alligator mississippiensis*, *Caiman latirostris*, *Caiman crocodiles*) teeth. Before hatching, the incremental lines in the dentin were uniform and the average width of these lines was 4 $\mu$ m. These incremental lines had a circadian rhythm. After hatching, incremental lines of four kinds of rhythm were observed in the dentin. Darker, wider and less calcified incremental lines were observed following a lunar cycle of approximately 28-day intervals. The lunar incremental lines (approximately 28-day interval) are due to the rhythmic deposition of both minerals and organic matrix. The semi-lunar incremental lines (approximately 14-day interval) are due to the rhythmic deposition of minerals and organic matrix, but these incremental lines strongly depend on mineralization. The incremental lines of approximately 2 to 3-day interval are due to the rhythmic deposition of mineralization. The circadian incremental lines are due to the rhythmic deposition of organic matrix. The intervals of incremental lines may be related to the rhythm of the odontoblast function and the fundamental biorhythm of the animals.

## 象牙質結晶の配向性の解析

○三島 弘幸、横田 ルミ、寒河江 登志朗、小澤 幸重  
(日本大学 松戸歯学部 第II解剖学講座)

【目的】象牙質結晶の配向性と組織構造との関連については明らかにされていなかった。本研究では高分解能の微小部X線回折装置を用いて、結晶の配向性と象牙質組織構造との関連性及び歯の形成機構との関連性を検索する目的で、解析を行った。

【方法】用いた材料は、一生歯性のマッコウクジラの歯やイッカク切歯、常生歯のラット切歯、ウサギ切歯、ゾウ切歯、あるいは二生歯性のヒト、ウシ、シカの切歯、ヒト小白歯と大白歯、ウマの臼歯、さらに多生歯性のワニの歯を用いた。各試料は50-100 $\mu\text{m}$ の縦断研磨標本とし、湾曲IPX線回折装置(理学製)で100 $\mu\text{m}$ 径のコリメーターを用い、透過法により象牙質の結晶の配向性を検索した。

【成績・結論】ヒト、ウシ、シカの切歯において、歯冠象牙質では無配向であり、ラットのエナメル質が覆う唇側象牙質と同様の結果であった。エナメル質が覆う象牙質では結晶の配向性が球状石灰化により不規則になると考察される。歯根象牙質では配向性が認められたが、ラットやウサギ切歯のセメント質が覆う舌側象牙質の方が配向度が良かった。舌側象牙質では成長線が明瞭に認められ、結晶の配向は成長線の方角やコラーゲン線維の配列と平行であった。ワニの歯では、歯冠部では成長線が明瞭であり、結晶の配向性が認められた。その方向は成長線に平行であった。結晶の配向はコラーゲン線維の方角や石灰化球の構造に制御されると考察される。

## THE DIFFERENCES IN DENTIN BETWEEN CONTINUOUSLY GROWING TEETH AND UNCONTINUOUSLY GROWING TEETH

H. Mishima<sup>1)</sup>, Y. Oono<sup>1)</sup>, Y. Nakaishi<sup>1)</sup>, K. Nomura<sup>1)</sup>, Y. Kozawa<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Dept. Health Sci., Kochi Gakuen Coll., Kochi, Japan, <sup>2)</sup>Dept. Anat., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, Matsudo, Japan

[mishima@kochi-gc.ac.jp]

The present study was designed to examine the property of dentin between continuously growing teeth and uncontinuously growing teeth using the scanning electron microscopy (SEM), the SEM - Energy dispersive X-ray microanalysis (SEM-EDS), the curve IP X-ray Laue system, and the laser Raman microprobe spectrometry. Calcospherites in human and bovine dentin were globular and 2-32  $\mu\text{m}$  in diameter at the enamel-covered crown dentin. At the apical region of the human root dentin, calcified matrix fibers were observed. Calcospherites in the rat cementum-covered lingual dentin were oval and 7-20  $\mu\text{m}$  in diameter. The shape and size of rabbit calcospherites varied extremely from the pulp horn to the root apex in the pre-dentin. The morphology and chemical composition of the calcospherites varied between continuously growing teeth and uncontinuously growing teeth. The crystal orientation was very poorly orientated in the enamel-covered crown dentin of human and bovine incisors. In the enamel-covered labial dentin of rat and rabbit incisors when calcospherites present, the crystal was arranged radially. The crystals were orientated indistinctly in the cementum-covered root dentin of human and bovine incisors. In the cementum-covered dentin, the axis of crystal orientation was almost parallel to the tooth axis and almost to the direction of the collagen fibers. In the cementum-covered lingual dentin of rat and rabbit incisors, the distribution of Debye ring of apatite (002) was narrower. The degree of orientation of continuously growing teeth was better than that of uncontinuously growing teeth. In the Raman spectrum of dentin, the peak of  $1073\text{cm}^{-1}$  in the continuously growing teeth was lower than that of uncontinuously growing teeth. It is suggested that the results show a relationship between the mechanism of the tooth formation and the dentine structure.



## ワニの歯堤と歯胚分化について

小澤幸重、岩佐由香、横田ルミ、寒河江登志朗（日本大学 松戸歯学部 第2解剖学教室）

【目的】爬虫類の多生歯性から哺乳類の二生歯性への進化，単純な咬頭から複雑な歯冠形態への進化については，一般的に認められているが，両者の中間的歯の萌出様式は，とくに歯の交換に関して確認されていないため仮説のままである。本論は，哺乳類に近い歯と歯周組織の形態を持つ，ワニの初期胚を用いて，上記進化の先駆的形質を検討したものである。

【材料と方法】試料は孵化前のワニ (*Alligator mississippiensis*) の27～54日齢までの胚を用いた。胚は10%緩衝ホルマリン液で固定後，一部は脱灰してパラフィン包埋し，吻部より前頭断の4 $\mu$ mの厚さで連続切片を作製し，3枚間隔でHE染色をして三次元復元（ライズ OZ95）した。

【結果】歯堤は顎骨が成長するに従い，口腔上皮から陥入し，一本の堤をなすが，前顎骨領域は次第に独立する。顎骨領域の歯堤はほぼ42日齢頃から口腔上皮と分離し，結合組織中へと遺残する。これが後の索状となって顎骨中に残る歯堤の分化の開始である。

歯胚は27日齢では前顎骨領域で大型，遠心へゆくに従って小型であるが，石灰化は始まっていた。歯堤の分化する領域の口腔上皮はエオジンに濃染するが，やがてこれは索状の歯堤だけの現象となる。歯堤は27日齢ですでに頬側の先行歯胚列が形成され，舌側の後継歯胚列も認められ，第一世代，第二世代が独立分化する。

Biorhythm and hard tissue evolution—on the correlation  
between environment and calcification

バイオリズムと硬組織進化——環境と石灰化について

Yukishige Kozawa・小澤幸重 (Nihon University・日本大学)

はじめに

バイオリズムは生物体の周期的、律動的な運動や代謝であり、体内時計として日周期など遺伝情報として記憶されているものが如何に現れるかという研究が盛んに行われている。その一つに夜の周期をつかさどるメラニンという物質が特定され一般に広く知られている。しかし、生体の周期的な律動や活動、代謝は、元来環境が生物体に影響を及ぼし、長い年月の間に生体に確立し、遺伝情報となり発現すると考えることができる。この環境から生体への反映の過程は、獲得体質と断言して差し支えないと考えられるが、この面での研究や主張は意外と少ないように感じられる。一方、バイオリズムは硬組織によく保存され、このことは古生物と現生生物とを一度に俯瞰して研究できるよい材料である。即ち、系統発生的な事実と現生生物の代謝の事実が同じテーブルで研究でき論議できる。このような視点にもとずいてバイオリズムの証拠としての硬組織の構造、その化石での進化過程、これをもたらす原因について検討したい。演者の研究対象が脊椎動物の硬組織のうち歯であるため、その結果が中心であることはご容赦願いたい。

どのような構造がバイオリズムか

一般的にバイオリズムを示す組織構造としては成長線がある。歯の成長線はよく研究され特徴によって様々な名称が定義されている。エナメル質には横紋、周波条、新産線、象牙質にはオーウェンの外形線、オーウェン線、アンドレーゼン線、石灰化条など、セメント質にはセメント層板、骨には骨層板等々がある。それぞれの成長線には経験的または実験的な結果から年、月、週、日、の周期性が当てはめられている。それはゾウやクジラ等々の年齢査定に使われていることは周知のとおりである。これ以外に線(面)ではないが、周期的な構造としてはエナメル質のシュレーゲルの条紋、象牙質の縞模様を提案したい。これらの組織構造は進化の点から容易に比較できる点で有利である。

周期的組織構造の進化

シュレーゲル条の起源は、爬虫類のエナメル質にある crystal unit に求められる。これは細胞同士が集合する grouping とエナメル質を形成しつつ移動する dancing によって形成される。これらの動きは当初不規則であるが、エナメル質が発達する哺乳類では規則的になり、規則的な

組織構造を生む。その典型が *Desmostylus* のものであり、組織学的な定向進化の一例と考えている。象牙の縞模様も同様に象牙芽細胞の grouping と dancing であると理解できる。ここには産前産後の成長リズムが隠されている。

#### 環境要因について

バイオリズムの原因としては、光がまずあげられる。この意味で日周期は地球環境の上では基本的だり重要といえよう。しかし、動物によってその間隔に多様性があるのはなぜか。それは、原因としての磁力、温度、ガス、他の生物環境等々が多くのものであり、これらに変化と生物体の相互関与によってバイオリズムが作られる、むしろここには生物の代謝の多様性も関係している。それにしても、石灰化機構がいかにかこのような影響を受けやすく、研究対処として優れているかを認識させられる。色々な生物独自のバイオリズムは獲得形質といえよう。

#### バイオリズムは変化する

歯の例としては出産前と後では成長線の間隔が変わる印象を受ける。組織構造は前述のごとく進化し、成長線には様々な影響が認められることは周知のことである。これらは、個体発生の段階でもバイオリズムが変化する可能性を示している。遺伝的に確立したと見える体内時計も時々刻々変化しているのである。

#### 如何に遺伝的に確立されるのか

この明確な答えはまだないが、病的な原因でまたは、細胞に張力を与えたり、圧力を与えたりすると遺伝子に起因する細胞死（アポトーシス）をおこす。これは環境が遺伝子に影響を与えるよい例であるが、果たして遺伝的に確立するか否かは不明である。この点で古生物学と遺伝学との相互作用が必要と思われる。この意味で進化の重要な問題である獲得形質や定向進化の問題を扱うにはますます現代生物の成果と知識が必要となっている。一方、遺伝学や発生学のみで進化を論ずる傾向が強くなっている、これは錯覚の科学といえよう。

**The nerve distribution and development of marsupial molars in *Monodelphis domestica*.** T. YAMAZOE\*, K. SUZUKI, H. CHISAKA and Y. KOZAWA (Dept of anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan).

E-mail: yamazoe@mascat.nihon-u.ac.jp

The aim of study is to clarify the nerve distribution and development in tooth and supporting tissues on *Monodelphis domestica*. The animal belongs to the marsupial, which has the primitive tooth structure such as the tubular enamel. The structure and function of periodontal sensory innervation of the marsupial were reported a little. In this study, the animals are classified into 6 porch-day (PD) stages: PD18, 26, 38, 46, 58, 66 and are examined using histology, immunohistochemistry for PGP 9.5-, S-100 protein. In PD 18, 26, PGP 9.5-, S-100 immunoreactive fibers were observed around the tooth germ mainly enamel organ. When the root formation started, PGP 9.5-, S-100-immunoreactive fibers and beaded like nerve fibers are spread from the root apex on the root surface. The Ruffini endings also formed. As the tooth matured, PGP9.5-, S-100-immunoreactive fibers increases, and the nerve ending of some different type, Ruffini endings and free nerve endings were observed.

the root calcospherites was  $1.89 \pm 0.02$ . The Ca/P ratio in opossum crown calcospherites was  $1.87 \pm 0.13$ , and that in the root calcospherites was  $1.52 \pm 0.14$ . The Ca/P ratio in rabbit labial calcospherites was  $1.89 \pm 0.25$ , and that in the root calcospherites was  $1.94 \pm 0.15$ . The Ca/P ratio in human crown calcospherites was  $1.63 \pm 0.27$  and that in the root calcospherites was  $1.46 \pm 0.28$ . It is considered that the activity of life cycle in odontoblast and the local environment of predentin may decide the variety of the shape, size and chemical composition of calcospherites.

**Tooth development of Alligator and evolution to mammalian tooth.** Y. KOZAWA\*, Y. IWASA, R. YOKOTA and E.M. RUTH (Dept. Anatomy, Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo, Sakaecho-nisi, Matsudo-si, 271-8587, Japan).

E-mail: kozawa@mascad.nihon-u.ac.jp

The aims of this study are to clarify 1) how to reduce the tooth replacement times from polyphyodont to monophyodont, 2) how to establish the tooth kinds or species, such as incisor, canine, molar. The authors examined *Alligator mississippiensis* embryo before hatching series from 27day(27) to 67day(67). The heads of this animal were cut frontally with serial sections and were made 3-D reconstruction. The cell death, so called apoptosis, was plotted on this 3-D reconstruction.

Results: 1) on 27D, the tooth germs developed two generations, outer and inner series. Its dental lamina was separated medial and distal portions. 2) The cell death or autophagocytosis was observed on three regions, the dental lamina, the outer enamel epithelium and stellate reticulum, the enamel knot. 3) The developing dental lamina and labial side oral epithelium were stained deeply stained with Eosin, which showed containing many mitochondria. 4) On 36D, the dental lamina partly destroyed and separated from the oral epithelium. These results suggested that the degeneration of tooth may happen in early generation not only late generation, so that these were reflected to marsupial tooth degeneration in which both deciduous and permanent tooth germs were degenerated (Kozawa 1998). It is concluded that the tooth degeneration pattern arises in each mammalian species. Tooth generation and tooth kinds or species were caused by dental lamina development.

## Types of Grouping and Movement of Ameloblasts and Enamel Prisms Forming Hunter-Schreger Bands During the Evolution of Enamel Structure

*Yukishige Kozawa and Suzuki Kunihiro, Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo 2-870-1, Sakaecho-nisi, Matsudo-si 271-8587, Japan*

1. Ancestral crystal units were observed in some reptilian prismless enamel. The size and form of these units were variable. Based on amelogenesis in *Alligator*, it is concluded that these units were formed by some groups of ameloblasts. 2. Many primitive mammals had tubular enamel similar to reptiles, and enamel prisms were formed mainly by single ameloblasts. 3. Bending of enamel prisms occurs along with the disappearance of enamel tubules. This indicates the beginning of ameloblast movement, which causes the Hunter-Schreger bands. 4. Groups of moving ameloblasts formed island types of H-S bands, which may be the original type found in *Dinotherium* and its relatives. 5. Some ameloblasts diverge from their group, while others converge with the group. Thus, these fusing groups form horizontal or vertical types of H-S bands. 6. Elephant relatives had the irregular type of H-S band, which represents a typical divergent movement of ameloblasts.

A HISTOLOGICAL STUDY OF ENAMEL STRUCTURE FROM THE POINT OF VIEW OF EVOLUTION

Kozawa Y and Suzuki K Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

There are many unknown mammalian enamel structures from the point of view of evolution, such as enamel tufts etc. The aim of this report is to discuss the original structure from the histological evolution of enamel with extinct and living animals.

Results: 1. The origin of mammalian enamel structures is found in the thin prismless amphibian and reptilian enamel, in which initial calcification starts at the crystal mass near the dentino-enamel junction. The crystal mass grows to the crystal unit enclosed by the boundary. It is the clashing surface of growing crystal masses as the crystal arrangement sharply changes. 2. This boundary may be the organic matrix channel as the prism sheath of mammalian enamel. 3. The crystal unit is calcified by the grouped ameloblasts, and develops horizontal and vertical types of Hunter-Schreger (H-S) bands in each mammal. 4. In mammalian enamel, ameloblasts get high active movement to form thick enamel and classified into 4 types of moving. The authors called this ameloblast moving as 'ameloblast dancing'. 5. This dancing and grouping combination to form various types of H-S bands. However the border of bands does not develop into enamel lamellae or tufts, which may be the vestigial structure of the crystal unit boundary, because of the rich organic matrix. 6. The primitive group of early mammalian ameloblasts occurs in the final cell reducing group at the enamel surface, which formed the Perikymata. 7. The prism sheath arises at the sliding surface of Tomes' process of the ameloblast dancing and channels of organic matrix. 8. The spindle is the vestigial sign of tubular enamel, which formed both projections of ameloblasts and odontoblast.



エナメル質構造の発達にみるエナメル芽細胞の集合化(grouping)と運動(dancing)様式

○小澤 幸重<sup>1</sup>、鈴木 久仁博<sup>1</sup>、岩佐 由香<sup>1</sup>、千坂 英輝<sup>1</sup>、三島 弘幸<sup>1</sup>、横田 ルミ<sup>1</sup>、山添 友子<sup>1</sup> <sup>1</sup>日本大学 松戸歯学部 第2解剖学教室

【目的】エナメル質の構造は、基本動物種、歯種によって構造が異なる一方、形成様式が不明なエナメル質組織(例えばエナメル葉)もある。この点をエナメル芽細胞の集合、運動様式の発達によって説明したい。【方法】エナメル質の試料としては、化石及び現生の爬虫類、哺乳類各種、エナメル質組織発生に関してはメガネカイマン、ウサギ、ブタ等を用いた。【結果と結論】化石爬虫類のある種では、大きさ・形が不規則な結晶の集合、即ち crystal unit が存在する。組織発生学的には、複数のエナメル芽細胞がひとつの crystal unit に関連すると考えられ、これを grouping と呼ぶ。group の細胞は変化すると推定された。ミシシッピーワニでは crystal unit がエナメル小柱に相当する。crystal unit の境界がエナメル葉板の起源と推定された。メゾヒップスは、シュレーゲル条の各帯と周波条が一致する。シュレーゲル条は、エナメル芽細胞の grouping によって形成され、退縮期も同じと推定された。エナメル小柱は各帯を横断するもの、各帯の中で運動するもの、各帯の境界を形成するもの等の様式が認められた。このようなエナメル小柱の走向をエナメル芽細胞の dancing と定義すると、いくつかの型に区分された。律動的な dancing によって、様々なシュレーゲル条を形成すると推定される。

## 最初のエナメル質結晶形成

小澤 幸重, 鈴木久仁博, 岩佐 由香, 横田 ルミ

日本大学松戸歯学部第2解剖学教室

エナメル質の最初の結晶形成について検討を加えた。結果: 試料は、胎生1週のジャコウネズミ *Suncus murinus* を 2% tannic acid, 4% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde 混合液 (pH6.8 cacodylate buffer) で前固定し、2% OsO<sub>4</sub> (同 buffer) で後固定し、摘出した歯胚である。

エナメル芽細胞に近い部位には、20-40nm の粒状物質 (かつて stippled material, amorphous material coarse と fine textured material などと呼ばれた構造) が認められ、これ等の構造はエナメル芽細胞より多少離れると連続して、細管状構造を呈し、中に非常に細いリボン状の断続した線維が観察される。この線維は 0.1nm 以下で累線状の最初に出現する結晶であった。artifact として考えられてきたこれ等の粒状物質はその大きさが、AFM などによる観察では、エナメル質形成たんぱく質である amelogenin の大きさに非常に類似しており、同じ物質である可能性が高く、最初のエナメル質結晶は、エナメル芽細胞から分泌した細管状の有機基質、例えば amelogenin 中に形成される長さ 50nm の amorphous 状であり、長軸に沿って融合し、やがて結晶化すると考えられる。

## Initial Crystalization of Enamel

Yukishige Kozawa, Kunihiro Suzuki, Yuka Iwasa, Rumi Yokota

Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

There are many reports on the morphological organic materials on the enamel crystallization. It is called the coarse and fine textured materials, the stippled materials or the amorphous materials. However, there are a few reports between these structures and the organic matrix, such as amelogenin and others. The authors aim to clarify the relationship and observe the initial enamel crystals by TEM. *Suncus murinus* (PD 1 week) were fixed by 2 % tannic acid + 4% paraformaldehyde + 2% glutaraldehyde (pH6.8 cacodylate buffer), and post fixed by OsO<sub>4</sub> (same buffer). Ameloblasts secreted the granular structures about 20-40 nm, which grew to tubular structure about 50 nm diameter at short distance of Tome's processes. The ribbons like structures (about 0.2 nm thick and 500 nm long) were observed in the center of tubules. The atomic lattice images could not be observed in it, but more developed ribbon like crystals, which did not cover tubular structure are the lattice. The ribbons in the center of tubule fused and grew more long structure. It is concluded that the fine fibrils in the granules and tubular structure are the initial apatite structure as amorphous form. It may be grown to apatite crystal in the tubular organic enamel matrix.

## The Development of Ameloblast Grouping and Dancing on the Enamel Structure Evolution

Kozawa Y. and Suzuki K.

Dept. of Anatomy, Nihon Univ. Sch. of Dentistry at Matsudo, Japan

There are any unknown mammalian enamel structures from the point of view of evolution, such as enamel tufts etc. The aims of this report is to discuss the original structure from the histological evolution of enamel with extinct and living animal.

Results: **1**, the origin of mammalian enamel structures is found in the thin prismless amphibian and reptilian enamel, in which initial calcification starts as the crystal mass near the dentino-enamel junction. The crystal mass grows to the crystal unit enclosed by the boundary. It is the clashing surface of growing crystal masses as the crystal arrangement sharply changes. **2**, this boundary may be the organic matrix channel as the prism sheath of mammalian enamel. **3**, the crystal unit is calcified by the grouped ameloblasts, and develops horizontal and vertical types of Hunter-Schreger(H-S) bands in each mammal. **4**, in mammalian enamel, ameloblast get high active movement to form thick enamel and classified into 4 types of moving. The author called this ameloblast moving is 'ameloblast dancing'. **5**, This dancing and grouping combination to form various types of H-S bands. However the border of bands don't develop into enamel lamellae or tufts, which may be the vestigial structure of the crystal unit boundary, because rich organic matrix. **6**, the primitive group of early mammalian ameloblasts occurs the final cell reducing group at the enamel surface, where formed the Perikymata. **7**, the prism sheath arise at the sliding surface of Tomes' process of the ameloblast dancing and channels of organic matrix. **9**, the spindle is the vestigial sign of tubular enamel, which formed both projections of ameloblast and odontoblast.

## The Rhythmical Function of Developing Cells Produce Systematic Structure on the Tooth

Y. Kozawa, H. Mishima and K. Suzuki

Department of Anatomy, Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

The rhythmical function of tooth developing cells, such as ameloblast, odontoblast and others, produce not only the incremental lines but also the enamel and other systematic structure. The ameloblasts, enamel forming cell, show the dancing and grouping movement, which produce the variety arrangement of enamel prisms and its groups. The results of dancing and grouping are many kinds of Hunter-Schreger bands in mammals. On the *Desmostylus*, the grouping and dancing repeat alternatively in thick enamel, as the results the Hunter-schreger bands showed very systematic and beautiful feature. The odontoblasts, dentine forming cells, also play dancing and grouping, which produce the stripe of ivory.

## 哺乳類の歯式進化を発生学的に検索する

\*小澤幸重, 岩佐由香, 佐々木千晴, 横田ルミ, 三島弘幸, 鈴木久仁博, E.M.Ruth  
日本大学松戸歯学部第2解剖学教室

【はじめに】哺乳類の基本歯式は3.1.4.3で、臼歯以外の歯が基本的に交換する二生歯性であると言われる。しかし、各目、又は属、種に於いて特有の歯数、歯式を持ち、歯式は歯の形態と同様、哺乳類分類の大きな特徴のひとつとなっている。この哺乳類の歯式が、爬虫類一般に認められる、何回も交換する多生歯性、多数歯からどのように進化してきたのかは、古生物学的事実、現生哺乳類の比較によって推定されている。しかしながら、多生歯性から二生歯性へ移行過程の動物はこれまでに発見されず、ミッシングリンクと言ってよい状況である。本報は、多生歯性から二生歯性、そして一生歯性へと進化する過程を、退縮する歯胚を発生過程の細胞死から明らかにし、これを痕跡歯胚と仮定することによって歯式進化について考察した。

【方法】爬虫類のワニ (*A. mississippiensis*)、有袋類のオポッサム (*Monodelphis domestica*)、食虫類のジャコウネズミ (*Suncus murinus*) を発生過程によって連続切片を作製し、組織学的に観察した。

【結果】ワニの歯胚は顎の成長に沿って口腔上皮から陥入して歯堤となり、これに歯胚が分化する。最初に形成される歯胚列を第一世代とすると、その間に第二世代が遅れて形成され、第一世代の直下に第三世代が形成される。このようにして第二世代の後に第四世代、第三世代の次に第五世代がと続く、ワニの発生は環境温度によって左右されるが、ほぼ Ferguson stage 25 (孵化前54~60日) 頃に、歯堤は口腔上皮と分離し、顎に骨の中に索状となって残り、そこから歯胚が分化する細胞死は、口腔粘膜上皮、歯堤、各歯胚のエナメル結節やエナメル髓、外エナメル上皮に認められた。オポッサムの歯では、下顎の第一切歯、上顎の第四切歯では最初の第一世代の歯胚(乳歯胚)が退化し、上顎の第一切歯では第二世代(代生歯)歯胚が退化し、それぞれ一生歯化する。スンクスでは、多く第一世代歯胚(乳歯胚)が退化する。臼歯にも先行する退縮歯胚が認められた。細胞死は退縮歯胚の領域に認められたが、他にエナメル結節や歯堤にも散在的に存在していた。

以上の事実は、多生歯性から二生歯性への進化の問題として、歯胚はどの世代からも退化消失が起こる可能性を示し、この進行は哺乳類の種類によって異なるのではないだろうか。また、細胞死は痕跡歯胚に存在したが、これは同時に新形質形成の面からも見直さなければならない。痕跡歯胚や新形質形成の問題は、今後遺伝子レベルと同時に古生物学事実の両面から検索されねばならない。

# Dental formula of elephant by the development of tooth germ

Y. Kozawa<sup>1</sup>, H. Mishima<sup>1</sup>, K. Suzuki<sup>1</sup>, M.W.J. Ferguson<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan

<sup>2</sup> The School of Biological Sciences, The University of Manchester, Manchester, UK

**SUMMARY:** The authors try to clarify the dental formula and morphogenesis of complex molar form of modern elephant molar from the developmental aspect. Four embryos of African elephant (*Loxodonta africana*) between 1 to 4 months old and two Indian elephant (*Elephas maximus*) tooth germs of the fifth molars were examined with the histologic and 3-D methods. The authors propose the following dental formula:

Milk Teeth: i 1/0 c 0/0 m (dm) 3/3. Permanent teeth: I 1/0 C 0/0 P 0/0 M 3/3.

The molar belongs to the first generation teeth, so-called milk molars series. The crown has a very complex form, but the shape fundamentally formed at the early bell stage as other mammals. The accessory factors of crown add on the calcification stage of this fundamental form.

## 1. INTRODUCTION

The aim of this study is to determine the type of tooth and dental formula in the modern elephant with the development aspect, because it is proposed that elephant has two upper incisors (ivory) and 6 molars in each side of each jaw throughout life. The two incisors are composed of milk and permanent replacement tooth. However there are two proposals on the composition of these molars, one is three deciduous and three replacement premolar teeth, other one is three deciduous teeth and three molars. On the molar, crown shape was very complex developed along the Proboscidean evolution. However, there are a few reports on the morphogenesis of the molar and it is not known how to develop the molar crown form (Bolk 1919; Ijiri *et al.* 1949; Kozawa 1978, 1986). These phenomena are examined by the fossil trace, so that the authors try to find out the trace on the tooth developmental aspects.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Four embryos of African elephant (*Loxodonta africana*) between 1 to 4 months

old and two Indian elephant (*Elephas maximus*) tooth germs of the fifth molars were examined with the histological study and discussed.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Dental formula

A bell stage tooth germ was observed on the mesial upper jaw in each side. The tooth germs continued with the oral epithelium with the dental lamina, and also had a succession dental lamina of replacement tooth germ (Fig. 1). On the other hand, there was no tooth germ in lower jaws. It is suggested that the tooth germ was the milk incisor, so called milk tusk, and the permanent continuous tusks might develop on the replacement dental lamina. The dental lamina was observed between these tusk tooth germ and molar tooth germs in 2-3 months early embryo, but could not be found on 4 months stage. Both dental laminae of incisor and molar develop continuously in early embryo stage, but separate in developed stage (Fig. 2). There is no vestige of canine, such as cell death, on the canine position. In each side of jaws, there were two tooth germs, which

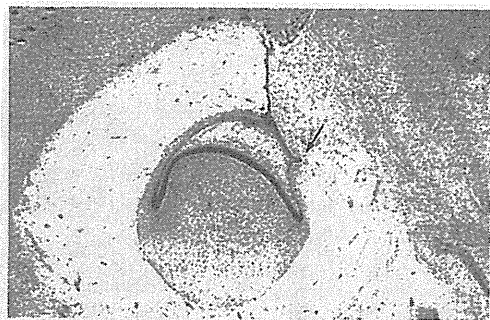


Fig.1 - The tusk tooth germ of bell stage with continuous dental lamina for replacement tooth (arrow).

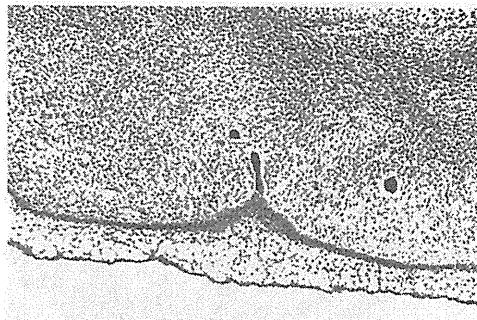


Fig.2 - The dental lamina between incisor (tusk) and molar region of the upper jaw of African elephant.

were early before calcification stage. The dental, which originated from mesial side of oral epithelium, grew to distal side in connective tissue of jaws, and two tooth germs anchors this dental lamina. The distal side of dental lamina grew to distal over the second molar tooth germ (Fig. 3). This distal dental lamina was directly connected to the oral epithelium. There was no replacement dental lamina on the molar tooth germs. It is concluded that this dental lamina come from oral epithelium and grow more distal; new molar tooth germ developed from it. It is suggested that the all molar tooth germs develop from the direct contacted dental lamina and comprise the first generation series, so-called milk or deciduous molar group. There is

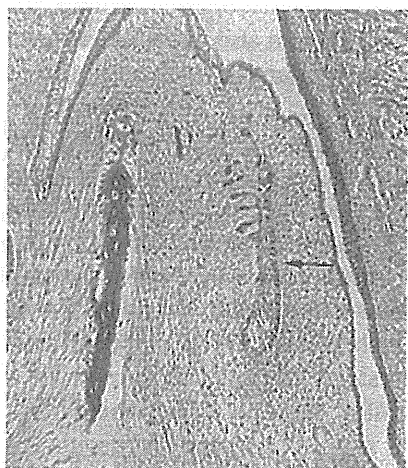


Fig.3 - The distal dental lamina (arrow) of the molar region.

no replacement molar tooth. The authors propose the following dental formula:

Milk Teeth  $i \ 1/0 \ c \ 0/0 \ m \ (dm) \ 3/3$

Permanent teeth  $I \ 1/0 \ C \ 0/0 \ P \ 0/0 \ M \ 3/3$

The molar belongs to the first generation teeth, so-called milk molars series.

### 3.2 Crown development of molars

The inner enamel epithelium already developed the form of papillae and lamellae of mature molar on the second molar tooth germ of 4 month embryo. However, the outer enamel epithelium formed a single dome shape as for human tooth germ (Fig. 4). On the other hand, both the outer and inner enamel epithelium of Indian elephant molar tooth germ (5<sup>th</sup> molar M2, about 2.5 cm long) of before calcification bell stage formed the lamellae and papilla shape same as the mature crown form (Fig.

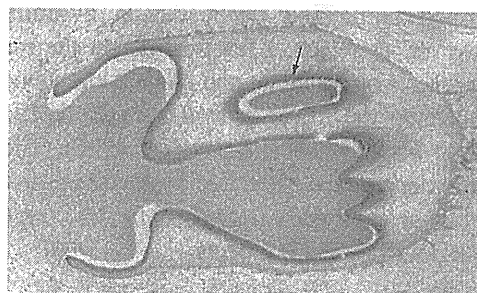


Fig.4 - Horizontal section of the 2<sup>nd</sup> molar tooth germ: the inner enamel epithelium shaped papillae and lamellae form (arrow), but the outer enamel epithelium shows a dome-like shape.

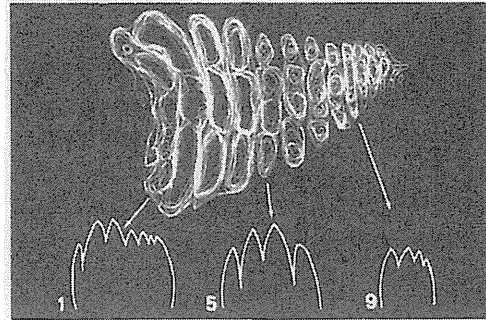
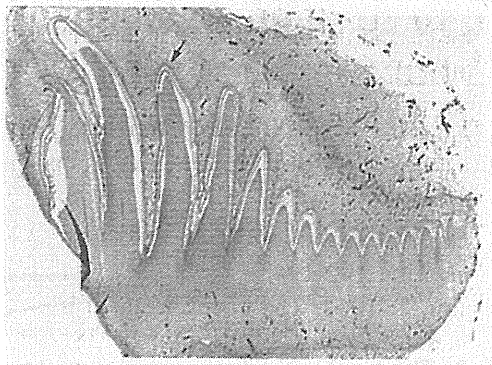


Fig.5 - 5<sup>th</sup> tooth germ of *Elephas maximus*. Both the inner and outer enamel epithelium show complex folding (arrow), about 16 folds, the same as mature molar tooth of lamellae. b: the 3D reconstruction of enamel organ showed the papillae and lamellae already formed in this early bell stage tooth germ before calcification. The number shows the lamellae number from mesial side.

5a, b). The mature 5<sup>th</sup> molar of *Elephas maximus* is about 20 to 30 cm long. The tusk tooth germ showed simple form as incisor of human teeth. These suggest that the complex molar morphogenesis initially started as the human tooth pattern, but later developed to complex form of enamel organ, which makes fundamental type of folding as mature tooth crown. Therefore the fundamental crown shape forms at the early bell stage as other mammalian tooth development. On the calcification stage, the accessory factors of crown add at this fundamental form (Tasumi 1964).

#### 4. CONCLUSION

Recent elephants, such as *Elephas maximus* and *Loxodonta africana*, have 6 molar teeth in each side of each jaw. These molars belong to first generation series, because they develop from direct dental lamina originating from the oral epithelium (Fig. 6). These molars show complex crown form, but the initial developmental patterns are similar to the other mammalian teeth (A part of this report was presented in Dental morphology in Berlin) (Kozawa *et al.* 1995).

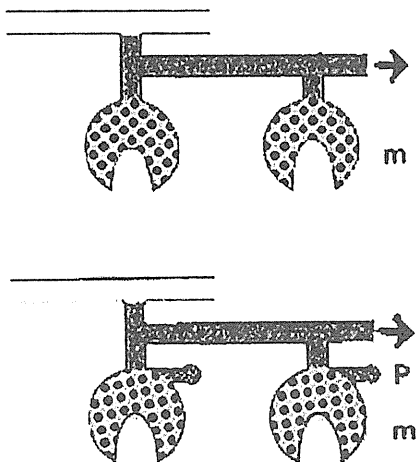


Fig.6 - Conclusion of elephant molar development. It is concluded that all molars may develop from the direct growth dental lamina from oral epithelium (upper side) so that all molars belong to the first generation such as milk molar, and replacement molar disappears along with the evolution. However, the deciduous (milk) molar in many mammals develops the permanent premolar and molars from the direct dental lamina from the oral epithelium (lower side). m shows first generation tooth germ, p shows development of premolar, and arrow shows development direction of dental lamina.



5. REFERENCES

- Bolk, L. 1919. *Zur Ontogenie des Elephantengebisses*. Verlag von Gusta Fischer, Jena.
- Ijiri, S., Suganuma, O., Kawai, N. 1949. Anatomical illustration of the elephant's head. *Bull. Tokyo Sci. Mus.* 24: 1-7, Pl. 1-9.
- Kozawa, Y. 1978. Comparative history of proboscidean molar enamel. *J. Stomat. Soc. Jap.* 45: 585-606.
- Kozawa, Y. 1986. Development of the elephant molar and the evolution of its enamel structure. *Mém. Mus. natn. Hist. Nat., Paris (série C)*, 53: 125-131.
- Kozawa, Y., Kamasaki, N., Mishima, H., Ferguson, M.W.J. 1995. How to develop the elephant teeth. *Proceeding of the 10<sup>th</sup> International Symposium on Dental Morphology*. 192-194.
- Tasumi, T. 1964. The cheek teeth of a young Indian elephant, *Mammalia*, 28: 381-396.

## 歯式と歯種の比較解剖学的と発生学的問題点

○小澤 幸重、岩佐 由香、山添 友子、横田 ルミ  
(日本大学 松戸歯学部 第二解剖学教室)

ヒトの永久歯歯式は、 $2 \cdot 1 \cdot 2 \cdot 3 = 32$ とされる。イルカは $45 \sim 65 = 180 \sim 260$ 、ゾウは $1 \cdot 0 \cdot 3 \cdot 3 = 26$ と書かれるが、その意味は一定していない。ヒトでは、大臼歯は脱落しない第一生歯であり、他は脱落する第一世代（乳歯）をもつ。哺乳類の基本歯式から、退化した歯種を除いて $I_2, I_3 / I_1, I_2, P_3, P_4 / P_3, P_4$ 等と書く。発生学的には、最初に乳歯（第一世代）が、代生歯堤から代生歯（第二世代）が形成される。大臼歯は口腔上皮が遠心に伸び、分化するので第一世代とされ、後継歯や各歯種の近・遠心から退化すると考えられている。ここには永久歯歯式は比較解剖学的に、乳歯は発生学的根拠から示される。これまでスルクス（食虫類）やオポッサム（有袋類）、ゾウ（長鼻類）の歯の発生を胎児や新生児の連続切片で、3D復元で報告してきた。その結果をまとめると、歯の消失は世代によらない、つまり第一世代であろうと第二世代であろうと永久歯になりうる。ゾウの片顎片側6本の臼歯はすべて第一世代に属する。但しこれは、発生で消失する歯を進化的に退化する歯と仮定する場合であり、新形質（新しく進化する歯）である可能性も否定できない。歯式は、現時点では各目毎に意味が異なり、化石、現生の比較解剖に加えて発生学的点からも検討することが必要であろう。

## エナメル質の最初の結晶形成についての形態学的研究

小澤 幸重・岩佐 由香（日本大学松戸歯学部第2解剖）

### はじめに

歯や骨など生体中の正常な硬組織は、それぞれ有機基質と無機基質が有機的に関連して石灰化されたものである。生体硬組織は、結晶の大きさ、配列等々組織によってそれぞれ特徴があるが、そのうちエナメル質は結晶が生体中で最も大きく、かつ一定の規則性をもって配列し特有の構造をつくる組織である。しかし、このような結晶とその配列がどのように形成されるのか、その転機はいまだ不明のままである。

他方、これまでエナメル質形成に関しては膨大な形態学的データが蓄積されてきた。しかし、現今の免疫学、遺伝学的研究は以前のデータの上に十分に立脚していないように思われる。そこで典型的な生体硬組織であるエナメル質の最初の結晶形成について検討を加えた。

### 結果

試料は、胎生一週のジャコウネズミ *Suncus murinus* を 2% tannic acid, 4% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde 混合液 (pH 6.8 cacodylate buffer) で前固定し、2% OsO<sub>4</sub>(同 buffer) で後固定し、摘出した歯胚である。

エナメル芽細胞に近い部位には、20-40nm の粒状物質 (かつて stippled material, amorphous material, coarse と fine textured material などと呼ばれた構造) が認められ、これ等の構造はエナメル芽細胞より多少離れると連続して、細管状構造を呈し、中に非常に細いボン状の断続した線維が観察される。この線維は 0.1nm 以下で累線状の最初に出現する結晶であった。artifact として考えられてきたこれ等の粒状物質はその大きさが、AFM などによるエナメル質形成たんぱく質である amelogenin の大きさに非常に類似しており、同じ物質である可能性が高く、最初のエナメル質結晶は、エナメル芽細胞から分泌した細管状の amelogenin 中に形成されることを示している。

---

---

哺乳類の歯式と歯種の問題について

小澤幸重・岩佐由香・横田ルミ・鈴木久仁博  
(日本大学松戸歯学部第2解剖学教室)

---

---

哺乳類の歯は、3, 1, 4, 3, 合計44本の永久歯が存在することは広く知られていることである。これを歯式で $44=3/3, 1/1, 4/4, 3/3$ と書く。この意味は、1) 片側片顎に永久歯の切歯が3本、犬歯が1本、前(小)臼歯が4本、(大)臼歯が3本あるということ、2) 切歯、犬歯、前臼歯は乳歯と交換した代生歯であること、3) 臼歯は初めて萌出する歯だが乳歯とちがって交換しないこと、4) 歯の数が限定されること、5) このように歯が区別されるのは歯に一定の形態的特徴があることなどの意味が含まれている。歯式は、古生物学的事実、現生哺乳類各種の比較により、哺乳類それぞれに特徴的なものを与えられている。

しかし、歯の発生過程では、他の痕跡器官と同様に、途中で消失する歯の原基(歯胚)がある。また、最初に萌出する乳歯(第1世代)と代生歯(第2世代)を比較すると、隣接する歯との類似性が代生歯より高い場合と逆のこともある。他方、爬虫類などは何世代も交換する多生歯性である。この多生歯性から哺乳類の切歯、犬歯、小臼歯の1回だけ交代する二生歯性へ進化するといわれるが中間的形態が動物には存在しない。これ等の事実は、歯の世代、歯式の成立について改めて検討をする必要を示している。そこで爬虫類(オオトカゲ *Varanus albigularis*, ワニ *Alligator mississippiensis*), 哺乳類(有袋類 オポッサム *Monodelphis domestica*, 食虫類ジャコウネズミ *Suncus murinus*) を試料として歯のなりたちを発生学的に検討した。

オオトカゲは、BolkがZahnreihe等の説を出す際参考にした動物であるが、各機能歯の代生歯系が口腔上皮と連続した歯堤上に一列に配列し、世代の違う歯胚が歯堤上にバラバラに配列する様式から、規則的に配列する様式へと進化したことを想像させる。

ワニは、当初、歯堤が口腔上皮に連続するが、発生が進むと一本の紐状となり顎骨中の管に入り込み、最遠心だけが口腔上皮に接続している。紐状の歯堤のうち、歯槽中の部分から次々に歯胚が形成され、1つの歯槽中に2-3世代の代生歯胚が存在する。マクロ的には、Bolkの説が妥当のようであるが、歯の発生面から検討すると、代生歯系列は認められるが、隣接歯胚との関連に疑問を持たざるを得ない。

オポッサムは有袋類であり、哺乳類の基本歯式より多い歯を持つ。この原因は、1) 最初に形成される歯(第1世代)が永久歯になる場合もあるし、第2世代が永久歯になることもある、2) 第1世代、第2世代ともに、歯胚の時期に退縮(消失すること)があるためである。

ジャコウネズミはオポッサム同様に、歯胚の時期に退化消失する歯があり、これ等の歯を考えると、現在示されている歯式は、大巾に変更しなければならないだろう。

以上の事実は、哺乳類二生歯性の歯式の成立は多様であり、目あるいは属など、各種によってそれぞれ固有であることをひとつの視野に入れるべきである。今後、歯の成立過程の研究に発生学、遺伝子などを大いに利用すべきであることを示している。

## ON THE DEVELOPMENT AND EVOLUTION OF MAMMALIAN TOOTH LINE

Y. Kozawa (1\*), Y. Iwasa (1), R. Yokota (1), K. Suzuki (1), H. Mishima (1),  
E.M. Ruth (2)

(1) Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan,

(2) Fur and Refuge Wildlife Biologist, Louisiana Department of Wildlife and Fisheries, Rockefeller Wildlife Refuge, Grand Chenier, Louisiana, USA

The aims of this study are to discuss 1) how to establish the tooth lines and develop to the tooth species, such as incisor, canine, molar, 2) and next how to reduce the tooth replacement times from polyphyodont to monophyodont and determine the mammalian dental formula. The authors examined the tooth development of the reptiles (Varanus, Alligator) and mammals (Didelphis, Suncus, Elephas). Alligator mississippiensis embryos are before hatching series from 27D (stage 19) to 67D (stage 28). The samples were made serial sections and stained, some species reconstructed 3D. Results were as follows. 1) On the Varanus, three generations of tooth germs were developing on the sheet of dental lamina. These tooth germs associated by three different generations series lined up obliquely. These three tooth germ series formed the tooth lines on the sheet. 2) On 27D of Alligator the tooth germs developed two generations on the sheet of dental lamina. The two generations tooth germs lined up alternately. 3) On 36D of Alligator, the 3<sup>rd</sup> generation developed success to the 1<sup>st</sup> generation, and form a tooth germ series of replacement. 4) On the developed Alligator, the dental lamina isolated from the oral epithelium expect at the most distal point, and formed a cord-like structure in the jaws. The tooth germ develops from the swelled point of the dental cord in every tooth socket. These were the replacement tooth series. 5) The cell death or autophagocytosis was observed on three regions, the dental lamina, the outer enamel epithelium and stellate reticulum, and the enamel knot. 6) On marsupial Opossum and insectivore Suncus, the reduction of tooth germ happen both first and second generation, so the permanent dental formula contains both generation teeth. 7) On recent elephant, all molar tooth germs might belonged to the same generation, because all molars develops from a dental lamina. It is suggested that the degeneration of tooth may happen from both the early generation and the late generation. It depends on each order of mammals as characteristic pattern along with the evolution. The replacement tooth series may develop from the Alligator type, but the reducing pattern to form the dental formula of mammals is variable, and characteristic in each order of mammal.

## **Initial crystal formation of enamel.**

KOZAWA Yukishige

Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
Sakaecho-nisi, Matsudo 271-8587, Japan

Key word: initial enamel crystal, amorphous, tubular enamel matrix

There are many reports on the morphological organic materials on the enamel crystallization. It is called the coarse and fine textured materials, the stippled materials or the amorphous materials. However, there are a few reports between these structures and the organic matrix, such as amelogenin and others. The author aims to clarify the relationship and observe the initial enamel crystals by TEM. *Suncus murinus* (1 week-old) were fixed by 2 % tannic acid + 4% paraformaldehyde + 2% glutaraldehyde (pH6.8 cacodylate buffer), and post fixed by OsO<sub>4</sub> (same buffer). Ameloblasts secreted the granular structures about 20-40 nm. Which grew to tubular structure about 50 nm diameter at short distance of Tome's processes. The ribbon like structures (about 0.2 nm thick and 500 nm long) were observed in the center of tubules. The atomic images of lattice could not be observed in it, but more developed ribbon like crystals, did not covered tubular structure had the lattice. The ribbons in the center of tubule fused and grew more long structure. It is concluded that the fine fibrils in the granules and tubular structure is the initial apatite structure as amorphous form. It may be grow to apatite crystal in the tubular organic enamel matrix.

## Development of mammalian dentition and cytological base of enamel structure.

KOZAWA Yukishige<sup>1\*</sup>, IWASA Yuka<sup>1</sup>, YOKOTA Rumi<sup>1</sup>, SUZUKI Kunihiro<sup>1</sup>, MISHIMA Hiroyuki<sup>1</sup>, RUTH M Elsey<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

<sup>2</sup>Fur and Refuge Wildlife Biologist, Louisiana Department of Wildlife and Fisheries, Rockefeller Wildlife Refuge, Grand Chenier, Louisiana 70643, USA

Key word: dentition, tooth generation, tooth development, enamel structure, ameloblast grouping and dancing, and evolution

The authors discuss two points, the first is the development of mammalian dentition, and the second is the ameloblast dancing and grouping formed complex mammalian enamel structures, from the three axis; the cytology, the comparative anatomy and the paleontology.

### 1 The development of mammalian dentition

The aims of this study are to discuss 1) how to establish the tooth lines and develop to the tooth species, such as incisor, canine, and molar, 2) and next how to reduce the tooth replacement times from polyphyodont to monophyodont and developed mammalian dental formulas along with the evolution. The authors examined the tooth development of the reptiles (*Varanus*, *Alligator*) and mammals (*Didelphis*, *Suncus*, *Elephas*) and compared with fossil mammalia of *Desmostylus*. *Alligator mississippiensis* embryos are before hatching series from 27D (stage 19) to 67D (stage 28). The samples were made serial sections and stained, some species reconstructed 3-D. 1) On the *Varanus*, three generations of tooth germs were developing on the sheet of dental lamina. These tooth germs associated by three different generations series lined up obliquely. These three tooth germ series formed the tooth lines on the sheet. 2) On 27D of *Alligator* the tooth germs developed two generations on the sheet of dental lamina. The two generations tooth germs lined up alternately. 3) On 36D of *Alligator*, the 3rd generation developed success to the 1st generation, and forms a tooth germ series of replacement. 4) On the developed *Alligator*, the dental lamina isolated from the oral epithelium extends at the most distal point, and formed a cord-like structure in the jaws. The tooth germ develops from the swelled point of the dental cord in every tooth socket. These were the replacement tooth series. 5) The cell death or autophagocytosis was observed on three regions, the dental lamina, the outer enamel

epithelium and stellate reticulum, and the enamel knot. 6) On marsupial *Opossum* and insectivore *Suncus*, the reduction of tooth germ happen both first and second generation, so the permanent dental formula contains both generation teeth. 7) On recent elephant, all molar tooth germs might belong to the same generation, because all molars develop from a dental lamina, which continues directly with the oral epithelium. 8) It is known that the fossil *Desmostylus* had unique molar form among mammals. Fossil remains of the animal suggested that it had peculiar pattern of dentition among mammals because there were only two molars in half side of each jaw. It is suggested that the degeneration of tooth may happen from both the early generation and the late generation. It depends on each order of mammals as characteristic pattern along with the evolution. The replacement tooth series may develop from the Alligator type, but the reducing patterns to develop the dental formula of mammals are variable, and characteristics in each order of mammal.

## 2 The ameloblast grouping and dancing

The mammalian tooth form and structure developed along with the evolution of dentition. And the enamel structures, such as Hunter-Schreger bands and the enamel prism shapes and arrangements classified into several patterns, which suggest the “ameloblast grouping and dancing”. The study examined dogs, because it has typical pattern of H-S bands and prism. And the tooth germs were studied immunohistochemically the localization of the actin and cytokeratin, concerning the ameloblast movement. The actin generally located the stratum intermedium cells, and apical and basal cytoplasm of the ameloblast. On the tangential section, the actin showed as island or spotted like pattern of ameloblast groups at the apical and basal cytoplasm of the ameloblast layer and also the stratum intermedium layer. The boundary of these groups lacked of the actin reaction. The cytokeratin reaction was observed in the Tome’s process and the most basal cytoplasm of the ameloblast. This localization pattern suggested that the ameloblast movement, called “grouping and



エナメル芽細胞の動きとエナメル質の構造について

○小澤 幸重<sup>1</sup>、岩佐 由香<sup>1</sup>、鈴木 久仁博<sup>1</sup>、  
横田 ルミ<sup>1</sup>、花泉 好訓<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日本大 松戸歯  
第2解剖)

【目的】 エナメル質の構造は、エナメル芽細胞の Grouping と Dancing に直接的に依存して形成される点を前回の本学会において指摘した。今回は、エナメル芽細胞の動きを具体的に明らかにするため、シュレーゲル条の縦断帯と横断帯がはっきり区別され、エナメル小柱の走行が明瞭な典型的を持つイヌの歯胚を用いて、組織学的、免疫組織学的、並びに電顕的に形成中のエナメル質およびエナメル芽細胞を検討した。【結果と考察】 形成中のエナメル質のシュレーゲル条の各帯を構成するエナメル小柱群に対応して、エナメル芽細胞と中間層細胞は一定の集合、グループをなしていた。各グループのエナメル芽細胞を立体観察すると、集団的に褶曲する、また個々の細胞も集団内でそれぞれに彎曲を示していた。水平断のエナメル芽細胞では、トームスの突起および近位の閉鎖堤と中間層はグループをなしてアクチン等の反応が強く認められた。グループの境界のエナメル芽細胞では反応が弱くなるかあるいは認められないこともあった。これらの結果は、エナメル芽細胞が一定のグループをなして運動し (Grouping) シュレーゲル条を形成すること、グループ内においても個々の細胞が独自に動く (Dancing) ことを示している。この Grouping と Dancing によって、複雑なエナメル小柱の走行、その集合によるシュレーゲル条などのエナメル質構造が形成されることを示す。

The function of the ameloblast and enamel organ that develops the enamel structure of enamel was examined by the cytology and the immuno-histochemistry

Kozawa,Y Yokota,R Iwasa,Y Suzuki,K

Dept. of Anatomy, Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
Sakae-cho nisi, Matsudo, 271, Japan

The antibody used is cytokeratin for cell form, tubulin for cytoskeleton and secretion, actin for cell movement and adhere and desmoplakin and cadhelin for cell adhere, cadhelin, the cell bonding, and the cell, the cytoskeleton, and the secretion and the cell form. Desmoplakin reacted to the stratum intermedium cells and the terminal web of the ameloblast, especially the basal side. The actin reacted to the groups of the stratum intermedium cells and amelobalsts, but some did not reacted. A strong reaction was shown in both terminal web of ameloblast. The cytokeratin reaction was shown in the stratum intermedium cell beside of ameloblast layer and entire ameloblast. The terminal webs, Tomes process and distal cytoplasm beyond of distal terminal web. Tubulin also had the one that the reaction is not shown by other ameloblasts. The reaction was not admitted in terminal webs though it reacted to the stratum intermedium cells and ameloblast cytoplasm overall. There were the one to show the reaction and the others not shown in the Tomes process. The actin reaction of Tomes process also has the one, but the reaction is not shown in others. Tubulin is also similar. It is concluded every ameloblast move independently in a amelobalst group. This movement is dancing. The grouped of stratum intermedium cell combines with ameloblast, and moves as amelobalst grouping happens.

## イヌのエナメル芽細胞の免疫組織学的研究

○横田 ルミ<sup>1</sup>、鈴木 久仁博<sup>1</sup>、三島 弘幸<sup>1</sup>、花泉  
好訓<sup>1</sup>、小澤 幸重<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日大 松戸歯 第2解剖)

【目的】イヌの歯胚を用いて、基質形成期のエナメル器を組織化学的に検索し、エナメル質構造の形成を推定した。臼歯歯胚を 4% Paraformaldehyde 固定し、凍結切片として、アクチン、ケラチン、チュブリン、デスモプラキン等の反応を観察した。【結果】アクチンの反応は、外エナメル上皮からエナメル芽細胞まで局在が認められたが、矢状断面では、一定の間隔のエナメル芽細胞で反応が弱いか、またはほとんど認められないものがあった。その間のエナメル芽細胞群は中間層から外エナメル上皮まで強くアクチン反応が認められた。エナメル芽細胞層の横断では、シュレーゲル条の帯と類似したアクチンの局在による細胞集団の配列が観察された。トームスの突起は TW と細胞膜に強く反応するが、反応が現れない集団が島状に認められた。ケラチンの分布は、エナメル器全体に反応が認められたが、外エナメル上皮の局在がアクチンと異なっていた。トームスの突起は細胞質全体に反応し、アクチンの局在とは異なっていた。チュブリンは TW を除くほぼエナメル芽細胞全体に局在していた。デスモプラキンは中間層とエナメル芽細胞のデスモゾームに関連して局在が認められた。これらの細胞内のタンパクの局在はエナメル芽細胞が周期的に変化し、エナメル芽細胞の集団的動き、および個々の細胞独自の動きを示しており、それがエナメル質の構造を形成すると推定される。

ミシシッピーワニ (*Alligator mississippiensis*)  
の歯列発生過程の三次元復元像観察

○横田 ルミ<sup>1</sup>、岩佐 由香<sup>1</sup>、鈴木 久仁博<sup>1</sup>、  
山本 仁<sup>1</sup>、寒河江 登志朗<sup>1</sup>、三島 弘幸<sup>2</sup>、小  
澤 幸重<sup>1</sup> (<sup>1</sup>日大 松戸歯 解剖<sup>2</sup>、<sup>2</sup>高知学園短  
大 保健)

【目的と方法】多生歯性から二生歯性への解析の一環として、哺乳類に近い歯の構造を成す *A. mississippiensis* の歯列発生過程を三次元立体復元した。日齢18 (Ferguson st. 15)、21 (st. 16)、24 (st. 18) の頭部を4  $\mu$ m連続切片にし、HE染色をして、歯堤、歯胚を取り込み、Register 2001 (株式会社ソリューションシステムズ) ソフトで位置合わせを行い、OZ 3D Reconstruct System (ライズ株式会社) にて復元した。

【結果】st. 15は、歯胚の痕跡らしき口腔上皮がわずかに肥厚し、細胞死が認められ、st. 16では、口腔上皮が肥厚し、歯堤と考えられる上皮の陥入が観察され、歯胚構造や石灰化物が認められた。歯堤は短く、歯胚が口腔側に突出しているような部位もあった。歯胚は蕾状期から帽状期であった。st. 18では、st. 16より形成が進み、帽状期から鐘状期の歯胚であった。この研究には日本大学松戸歯学部4年次生、関根哲子さん、新納舞さん、林倫子さんにご協力いただいたことを感謝いたします。また、この研究はRuth M. Elsey (Rockefeller Wildlife Refuge) との共同研究として進めている。

エナメル芽細胞のダンシングに関する組織学的  
検討—イヌとインドゾウの歯胚を用いて—

○横田 ルミ<sup>1</sup>、花泉 好訓<sup>1</sup>、鈴木 久仁博<sup>1</sup>、  
山本 仁<sup>1</sup>、千坂 英輝<sup>1</sup>、寒河江 登志朗<sup>1</sup>、小  
澤 幸重<sup>1</sup>(<sup>1</sup>日大 松戸歯 組織・発生・解剖学)

【目的】 エナメル質のハンター・シュレーゲル条がエナメル芽細胞の集合（グループ）化と動き（ダンシング）によって形成されることを、イヌやインドゾウの歯胚を用いて、アクチンなどの局在やエナメル芽細胞の変則的配列によって紹介してきた。今回は、エナメル芽細胞の動きについての分化と発達について検討を加えた。【材料と方法】 生後約1ヶ月目の仔イヌ及びインドゾウの臼歯歯胚（第一，第三大臼歯）を用いた。【結果】 イヌの歯胚に於けるアクチンやケラチンの局在はエナメル芽細胞に認められ，中間層や外エナメル上皮までを含むグループを構成していた。このグループはシュレーゲル条の形態と一致していた。インドゾウの歯胚では，内エナメル上皮の一部に他と配列の異なるグループが出現し，次いで渦巻状のエナメル芽細胞のグループが認められた。エナメル芽細胞のグループはエナメル索状構造で外エナメル上皮まで連結していた。他方で，エナメル芽細胞のグループはシュレーゲル条の帯と一致していた。以上のことは，1) エナメル芽細胞のグループ化は内エナメル上皮に開始し，2) 最終的に外エナメル上皮までのエナメル器の全体的連動（groupingとdancing）によってシュレーゲル条を形成すること，3) グループ内ではエナメル芽細胞がねじれ運動（torsional motion）をして，エナメル小柱の走向を決めることを示していた。