

平成13年度 私立大学学術研究高度化推進事業

「歯科先端材料・先進技法による口腔機能の再構築」

学術フロンティア**H13**推進事業  
平成**13**・**14**年度 研究経過報告会

日 時：平成15年1月18日（土） 13:00～18:00

場 所：校舎棟1階 102教室

日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

学術フロンティアH13推進事業  
平成13・14年度 研究経過報告会

場 所 校舎棟1階 102教室

平成15年1月18日(土)

開会の挨拶	13:00
研究経過報告	
1. 口腔組織再生医学研究班	13:10~13:55
2. 新規代替埋入材料の開発と応用研究班	14:00~14:40
3. 歯科先進材料・技術の開発と応用研究	14:45~15:50
4. 先進診断技術の開発と応用研究班	15:55~16:55
5. 全身機能を基盤とする口腔環境の再構築研究班	17:00~17:45
閉会の挨拶	17:45

目 次

研究組織	座 長	発 表 者	時 間
<b>1. 口腔組織再生医学研究班</b>			
① 口腔組織の分化・誘導に関する研究グループ	安孫子宜光		
(1) 歯髄・歯周組織細胞の再生に関与する遺伝子の探索と組織再生への応用	松島 潔	13:10	
(2) 骨芽細胞系ヒストローマの細胞操作による骨組織の再生	小倉直美	13:15	
(3) 細胞の再生に関与する分化・誘導の探索	下坂典立	13:20	
② 骨タンパク質に関する研究グループ	小方頼昌		
(4) 培養骨芽細胞における骨形成および骨蛋白の局在についての病理組織学的研究	岡田裕之	13:25	
(5) BMPの化学構造と骨形成促進効果の研究	西山典宏	13:30	
(6) 歯周組織再生過程での骨芽細胞内転写因子の発現変化	小方頼昌	13:35	
(7) 歯周組織（特に骨組織）再生過程における骨シアロタンパク質発現調節機構	清水映美	13:40	
③ 歯の形態形成に関する研究グループ	三島弘幸		
(8) 歯と歯周組織の形態発現に関わる制御機構	三島弘幸	13:45	
(9) 歯の形態形成に関する幹細胞の基礎的研究	小澤幸重	13:50	
休 憩			13:55~14:00
<b>2. 新規代替埋入材料の開発と応用研究班</b>			
① 細胞・組織応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ	寒河江登志朗		
(10) 多能性幹細胞由来アパタイトP産生細胞による硬組織結晶の物理化学的性質の制御	寒河江登志朗	14:00	
(11) 代替材料を用いた歯牙再植の研究	松根健介	14:05	
② 機能タンパク応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ	早川 徹		
(12) 歯根再建医療用人工細胞外マトリックス代替材の開発	安孫子宜光	14:10	
(13) 傾斜機能生体材料の開発	早川 徹	14:15	
(14) 代替え埋入材としてのリコンビナント成長因子の開発	小方頼昌	14:20	
③ 生体親和性物質応用系代替埋入材料の開発と応用研究グループ	山崎宗与		
(15) リン酸カルシウムセメントの歯科臨床応用への試み	平山聡司	14:25	
(16) 硬組織形成誘導能を有する根管封鎖材料の開発	辻本恭久	14:30	
(17) 歯牙保存に対する代替生体材料の研究	松根健介	14:35	
休 憩			14:40~14:45
<b>3. 歯科先進材料・技術の開発と応用研究班</b>			
① 歯科先端材料開発研究グループ	會田雅啓		
(18) 清掃容易な義歯床用レジンの開発	妻鹿純一	14:45	
(19) 傾斜機能を付与したハイブリッド義歯の開発	谷本安浩	14:50	
(20) 歯科用セラミック基複合材料の開発	谷本安浩	14:55	
(21) CAD/CAMによる補綴物の臨床的評価および長期的評価	渡辺 官	15:00	
(22) セラミックラミネートの開発	若見昌信	15:05	
(23) 快削チタン材の開発	根本君也	15:10	
(24) 生体適合性に優れた新チタン合金の開発	真辺剛史	15:15	
② 歯科先進技術開発と応用研究グループ	會田雅啓		

目 次

研究組織	座 長	発 表 者	時 間
(25) 骨・歯周組織の炎症抑制および再生へのレーザー応用		安孫子宜光	15:20
(26) 新規小窩裂溝填塞システムの開発		早川 徹	15:25
(27) 新規矯正用接着システムの開発		早川 徹	15:30
(28) レーザー照射による修復処置法と歯質耐酸性の向上		飯田浩雅	15:35
(29) 粉体噴射装置の歯質削除ならびに歯面清掃への応用		熱田 互	15:40
(30) 顎顔面疼痛の除痛と機能回復への直線偏光近赤外線照射の応用に関する研究		渋谷 敏	15:45
休 憩			15:50~15:55
<b>4. 先進診断技術の開発と応用研究班</b>			
① 歯科疾患の遺伝子診断の開発と応用研究グループ		前田隆秀	
(31) カスタムメイドDNAチップを応用した歯科診断		平塚浩一	15:55
(32) 齲蝕感受性決定遺伝子の構造解析		前田隆秀	16:00
(33) マウス口蓋裂発症に関与する遺伝子の特定		清水武彦	16:05
(34) 骨格性不正咬合のDNA診断の開発		清水邦彦	16:10
② 生体機能からみた顎口腔機能の診断と応用研究グループ		笹原廣重	
(35) 体幹四肢の筋力発揮時における下顎動態と咀嚼筋活動様相		川良美佐雄	16:15
(36) 歯科遠隔医療システムの開発		斎藤孝親	16:20
(37) 生体振動を利用した顎口腔機能の診断		吉野祥一	16:25
(38) 上顎洞サイナスリフトの解剖学的基礎に関する研究		松野昌展	16:30
(39) 咀嚼と脳の認知機能の解明		青木伸一郎	16:35
(40) 小児顎運動の診断技法の開発		三好克実	16:40
③ 初期う蝕検出装置による診断法の開発研究グループ		根本君也	
(41) 非破壊的方法による前臨床う蝕の診断法を確立		後藤田宏也	16:45
(42) レーザーを応用した新規初期齲蝕検出装置の開発		根本君也	16:50
休 憩			16:55~17:00
<b>5. 全身機能を基盤とする口腔環境の再構築研究班</b>			
① 咀嚼・嚥下・唾液腺機能回復に関する介護予防の研究グループ		前田隆秀	
(43) 口腔内環境と嚥下性肺炎の病態変化機構の解明		久山佳代	17:00
(44) 唾液および唾液腺機能の再構築		杉谷博士	17:05
(45) ヒト顎口腔機能の感覚と運動に関する中枢制御		成田紀之	17:10
(46) デジタル画像による口腔領域再構築の評価		金田 隆	17:15
② 遺伝子導入法による口腔機能の促進の研究グループ		城座映明	
(47) 口腔常在菌有用物質産生系を応用した口腔機能の促進		城座映明	17:20
(48) 唾液腺への遺伝子導入による口腔機能の促進		早川光央	17:25
③ 免疫応用とフッ化物応用による宿主強化法の研究グループ		小林清吾	
(49) Bioavailabilityを考慮したフッ素測定法の開発		小林清吾	17:30
(50) 粘膜免疫を応用したう蝕と歯周病のワクチン開発		浪越 順	17:35
(51) 安全な受動免疫抗体の開発による口腔感染症の抑制		柴田恭子	17:40

1  
1-1-1

## 歯髄、歯周組織細胞の再生に関与する遺伝子の探索と組織再生への応用 — Emdogain 刺激によるヒト歯髄由来線維芽細胞の遺伝子発現変動 —

安孫子直光<sup>1,4</sup>, ○松島潔<sup>2,4</sup>, 岸川道子<sup>1,4</sup>, 村上伸也<sup>4</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>, 保存療法学<sup>2</sup>, 大阪大学大学院歯学研究科口腔治療学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】組織再生のプロセスにおける細胞の増殖、機能発現に関与する遺伝子の発現をモニターすることは、具体的な組織再生の手段を模索するにあたって多くの示唆を与える。本研究では、組織再生を促進する成長因子の作用機序を解明することを目指して、歯髄細胞に組織再生能、石灰化促進作用があると考えられている Emdogain を作用させ、cDNA マイクロアレイ法を応用して、発現が変動する遺伝子群を同定することを試みた。一方、組織再生医療を考えたとき、当然ながら炎症過程における組織破壊プロセスに関連する遺伝子の発現プロファイルを調べることも重要である。そこで、歯周組織細胞の細胞培養実験モデルとしてヒト歯肉線維芽細胞を設定し、炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  を作用させて細胞外マトリックス代謝の鍵を握るといわれている プラスミノゲン活性化因子/プラスミン システム、とくに近年、注目されている ウロ型 プラスミノゲン活性化因子とその受容体の遺伝子発現の変化についても調べた。

【方法】歯髄細胞に 50  $\mu$ g/ml Emdogain を作用させ、3, 12, 24, 72 時間後に mRNA を回収した。コントロール群の mRNA を逆転写酵素を用いて cDNA を合成するとともに蛍光色素 cy3 で標識し、一方、Emdogain を作用させた実験群の mRNA には cy5 標識 cDNA を合成した。両者を混合して約 1100 のヒト遺伝子カスタムメイド マイクロアレイにハイブリダイズさせ、スキャナーで蛍光密度を測定した。測定データは Gene Spring 遺伝子解析システムを用いて解析した。歯肉線維芽細胞には 1 ng/ml TNF- $\alpha$  を作用させて、培養上清および膜結合性の プラスミノゲン活性化因子活性の変動を測定した。またウロ型 プラスミノゲン活性化因子とその受容体の遺伝子発現を RT-PCR 法により解析した。

【結果・考察】Emdogain による歯髄細胞の遺伝子発現変動の解析結果から、serum inducible kinase, cyclin dependent kinase 2, IGF-1 を含む種々の遺伝子発現の上昇が認められた。これらのトランスクリプトーム情報は歯髄の再生あるいは石灰化促進に役立つと考えられる。歯根膜細胞も同様に Emdogain を作用させ、各作用時間で mRNA を回収し、マイクロアレイ解析の準備が終了しており、今後、歯髄細胞、歯根膜細胞への Emdogain 作用による遺伝子発現変化の比較による組織特異性あるいは組織再生に関与する共通の必須遺伝子の同定が期待される。一方、TNF- $\alpha$  は、歯肉線維芽細胞の培養液中および細胞ライセート中の プラスミノゲン活性化因子活性を増大させた。そして、細胞膜をホスファチジルイノシトール ホスホリパーゼ C 消化した遊離画分中の プラスミノゲン活性化因子活性も増大していた。さらに、TNF- $\alpha$  は、ウロ型 プラスミノゲン因子とその受容体の mRNA レベルを増大させた。ウロ型 プラスミノゲン活性化因子受容体は、活性化因子を細胞周辺に濃縮して細胞外マトリックス破壊を促進すると考えられていることから、受容体を介するウロ型 プラスミノゲン活性化因子/プラスミン システムの制御が組織再生を成功させるのに重要であることが示唆された。

1  
1-1-2

## 骨芽細胞系ヒトストローマの細胞操作による骨組織の再生

早川光央<sup>1,4</sup>, 安孫子直光<sup>1,4</sup>, 平塚浩一<sup>1,4</sup>, ○小倉直美<sup>2,4</sup>, Tetsuo Nakamoto<sup>3</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>3</sup>, 口腔外科学<sup>2</sup>, ルイジアナ州立大学歯学部生理学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】哺乳類の初期胚から由来する胚性多能性幹細胞は、すべての組織細胞へ分化することが可能であり、再生医療を飛躍的に進展させると期待されている。この胚性多能性幹細胞に対して体性幹細胞にも多能性幹細胞として種々の組織細胞を誘導させることが報告されている。一方、骨組織の再生に向けて、骨欠損組織への有用な分化因子、成長因子の投与方法と、未分化な間葉系幹細胞を患者から採取し、分化誘導因子の存在下で骨芽細胞に分化させてから骨欠損部に移植する方法、が期待されている。いずれの方法にしても間葉系幹細胞を骨芽細胞に分化させ得る有用な分化、成長因子の同定が成功の鍵となる。本研究では、体性多能性幹細胞として正常ヒト骨髄間葉系幹細胞を選び、細胞培養系で骨芽細胞に分化誘導させる手段として、骨誘導因子として知られている BMP 2, 4, 7、およびデキサメタゾン を添加し、ヒト骨髄細胞中の多能性幹細胞から硬組織産生細胞への誘導を試みた。

【方法】正常ヒト骨髄間葉系幹細胞は、常に mesenchymal stem cell basal medium で 60% コンフルエントまで培養することで、細胞密度による種々の細胞への分化が始まることを防ぎ、骨芽細胞誘導の実験用細胞として、あるいは cell stock の細胞として調製した。骨芽細胞系への誘導には osteogenesis induce medium (デキサメタゾン、アスコルビン酸、 $\beta$ -グリセロリン酸添加) 培養系に、BMP カクテル、遺伝子組換え BMP 2, 4, 7 (25 ng/ml) 単独、BMP 2, 4 混合系、BMP 2, 7 混合系、BMP 4, 7 混合系、BMP 2, 4, 7 混合系を添加して、培養後、von Kossa, alizarin 染色を行って骨形成誘導能を調べた。

【結果・考察】体性幹細胞 (組織幹細胞) は、生体の多くの臓器に存在し、骨髄移植は体性幹細胞を応用した再生医療として、とくに有用性が高いといわれている。本研究で、正常ヒト骨髄間葉系幹細胞を用いて、骨芽細胞誘導培養系の培養で、1-2 日で紡錘形から敷石状に形態変化した。デキサメタゾンを除いた培養系では紡錘形の細胞形態のままであった。BMP カクテル (1 mg/ml) の添加では、骨形成能に有意差は認められなかった。遺伝子組換え BMP 2, 4, 7 の影響については、BMP 4 の単独投与では dexamethasone 添加下に 100 ng/ml で alizarin 染色での骨形成能が認められた。そして、dexamethasone 添加下で BMP 2, 4, 7 の 3 種の混合系がもっとも石灰化を増大させ、von Kossa, 染色によっても骨結節の形成が確認できた。BMP 4, 200 ng/ml の添加によって軽度ではあるが Kossa, 染色で確認できる骨結節が認められた。これらの結果から、ヒト骨髄間葉系幹細胞に対して、高濃度の BMP 4 単独でも軽度の骨形成が期待されるが、BMP 2, 4, 7 が、骨芽細胞への分化、石灰化能の発現に効果が高いと示唆された。一方、BMP カクテルには BMP 2, 4, 7 の存在が明らかになっているにもかかわらず、著明な骨形成誘導能が認められなかったことについては、カクテル中に未同定成分が存在し、BMP 2, 4, 7 の骨形成促進作用を阻害している可能性が示唆された。

1  
1-1-3

細胞の再生に関与する分化・誘導の探索  
—ヒト神経膠腫瘍細胞のアポトーシスに静脈麻酔薬が及ぼす影響について—

○下坂典立<sup>1,3</sup>, 神野良一<sup>2,3</sup>, 渋谷 敏<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部歯科麻酔学<sup>1</sup>, 口腔外科学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】神経再生学的研究や神経アポトーシス関連の研究を先進的にかつ総合的に推進するには、神経関連細胞の分化・増殖・アポトーシスに関与する条件、遺伝子産物の同定が必要と考えられる。特に麻酔薬に関連したものについては、脳保護作用を認めることが示唆される薬物の報告もあるが、傷害された神経細胞の再生やアポトーシスに関するものについては不明である点が多い。全身麻酔に関連する場合、神経の損傷、再生は術後を占う上で重要なファクターとなる可能性が高く、手術の成功を左右すると言っても過言ではない。そこで、今回はヒト神経膠腫瘍細胞 (CCF-STTG1) を用いて、Fas抗体によりアポトーシスを誘導し、静脈麻酔薬の影響の探索を目的とした。

【方法】CCF-STTG1細胞を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、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。このアポトーシス誘導法は我々が実験により、考案したものである。そして、プロポフォール (5  $\mu$ g/ml) 群、チオペンタール (10  $\mu$ g/ml) 群、ミダゾラム (0.5  $\mu$ g/ml) 群の3群に分類した。この時、各穴の培地は交換し、新培地へ各麻酔薬を作用させ、また、再度IFN- $\gamma$  100単位/mlを作用させた。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。各静脈麻酔薬の濃度は臨床使用時の血中濃度とした。各群、24h、48h、72h後に静脈麻酔薬のアポトーシスへ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、蛍光測定装置にて励起波長485nm、測定波長520nmにて測定した。測定は各群6穴を測定し、その平均とした。コントロールはFas抗体によるアポトーシスを誘導した群とした。

【結果・考察】プロポフォール群ではコントロールに比べ、アポトーシスの抑制傾向が認められ、72時間後においては有意に抑制が認められた。チオペンタール群ではコントロールに比べ、48時間後において有意にアポトーシスの誘導が認められた。ミダゾラム群においてはコントロールに比べ、特に変化は認められなかった。以上より、Fas抗体によりアポトーシスが誘導されたCCF-STTG1細胞においてプロポフォールはアポトーシス抑制傾向に作用し、チオペンタールはアポトーシス誘導傾向に作用することが示唆された。

1  
1-2-4

培養骨芽細胞における骨形成および骨蛋白の局在についての病理組織的研究  
—骨形成性エプーリスにおける硬組織形成機序および細胞増殖能に関する研究—

○岡田裕之<sup>1,3</sup>, 神野良一<sup>2,3</sup>, 山本浩嗣<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部病理学<sup>1</sup>, 口腔外科学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】骨形成性エプーリスは周辺性骨形成性線維腫ともよばれる比較的まれなエプーリスの一型であり、腫瘍内に硬組織の形成を伴うことをその特徴とするが、それらの病態および病因に不明な点が多い。本研究は、本病変における硬組織形成機序および細胞増殖能について検討を行った。

【方法】日本大学松戸歯学部病理学講座において、病理組織学的に骨形成性エプーリスないしはセメント質形成性エプーリスと診断された27症例を用いた。患者のプライバシーの保護などについては十分に注意を払った。通法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色、アザン・マロリー染色などを行い検鏡した。細胞増殖能の検討にはAg-NOR染色およびPCNA免疫染色を用い、線維芽細胞について検討した。対照にはセメント質骨形成性線維腫および歯肉炎組織を用いた。

【結果・考察】本病変は20歳代から60歳代、女性、および前歯部から小臼歯部に好発していた。病理組織学的に本病変は種々の程度に線維芽細胞増生を示す結合織と石灰化物により構成され、石灰化物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。潰瘍性病変の近傍には高細胞密度の線維芽細胞領域を認めることが多く、異栄養性石灰化はこ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、本病変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、歯肉炎の数値(0.62:23.6%)よりも高く、本病変と対照の各値の両者間には有意差が認められた。細胞増殖能の結果からは、骨形成性エプーリスは腫瘍と炎症の中間に位置し、非腫瘍性の病変ではあるが、高い増殖能を有することが示唆された。

1  
1-2-5

## 歯周組織再生過程での骨芽細胞内転写因子の発現変化 — 石灰化過程での骨芽細胞内転写因子の発現変化—

○小方頼昌<sup>1,4</sup>, 清水映美<sup>1,4</sup>, Jaro Sodek<sup>2</sup>, 古山俊介<sup>3,4</sup>

日本大学松戸歯学部歯周病学<sup>1</sup>, CIHR Group in Matrix Dynamics, University of Toronto<sup>2</sup>,  
生理学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】骨シアロタンパク質は石灰化初期に発現し、初期の石灰化部位でのアパタイト結晶形成に関与すると考えられているタンパク質である。我々は、石灰化組織特異的に発現する骨シアロタンパク質が、グルココルチコイド、ビタミンD3、副甲状腺ホルモンや、様々な成長因子およびサイトカインによりその発現の調節を受けることをすでに報告した。またそのシグナル伝達系やリン酸化の関与についても研究を行っている。骨の石灰化の過程および歯槽骨の再生（治癒）と骨シアロタンパク質の発現を検索することは重要であると考えられることから、骨シアロタンパク質の転写調節とそれに関連する転写因子の発現に関し研究を行った。

【方法】ラット骨芽細胞様細胞であるROS17/2.8およびUMR106細胞を用いて、BSPmRNAの発現をノーザンハイブリダイゼーション法またはRT-PCR法にて、ホルモンおよび成長因子の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、ラット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・考察】ノーザンプロット解析の結果、ROS17/2.8細胞において副甲状腺ホルモン(PTH)、TGF-beta、FGF2およびフラボノイドによりBSPmRNAの発現上昇が、TNF- $\alpha$ で発現の抑制が認められた。UMR106細胞においてはPTH、静磁場およびPGE2によりBSPmRNA量の増加が認められた。リン酸化阻害剤を使用したルシフェラーゼアッセイの結果、BSPの転写はcAMP依存性プロテインキナーゼAおよびチロシキナーゼにより調節されていると考えられた。現在硬組織特異的発現を調節するプロモーター配列の検索を行っている。ルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイの結果から、BSPの転写調節に深く関わる転写因子は、逆方向のCCAAT配列に結合するNF-Y転写因子、cAMP応答配列に結合するCREB、PTHの作用を介する Pit-1転写因子および未同定のFGF応答配列結合転写因子であると考えられた。

1  
1-2-6

## 成長因子による骨シアロタンパク質発現調節機構

○清水映美<sup>1,5</sup>, 佐本 博<sup>2</sup>, 齋藤綾一朗<sup>3</sup>, 葛西一貴<sup>2,5</sup>, 山崎宗与<sup>3,5</sup>, 古山俊介<sup>4,5</sup>, 小方頼昌<sup>1,5</sup>

日本大学松戸歯学部歯周病学<sup>1</sup>, 矯正学<sup>2</sup>, 歯内療法学<sup>3</sup>, 生理学<sup>4</sup>, 口腔科学研究所<sup>5</sup>

【目的】骨シアロタンパク質(BSP)は、骨に特異的な非コラーゲンタンパク質であり、石灰化初期の骨芽細胞で多量に発現されること、試験管内で骨の主要構成要素である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。BSPは石灰化の調節因子であると考えられるため、歯周組織再生過程におけるBSPの発現を究明することは、骨粗鬆症や歯周疾患への臨床応用の可能性に繋がると考えられる。そこで我々は、成長因子による骨シアロタンパク質の転写調節機構を解明する目的で解析を行った。

【方法】分化程度の異なる2種類の骨芽細胞様細胞(分化程度の若いUMR106細胞および成熟した骨芽細胞であるROS17/2.8細胞)を用い、骨形成および再生に重要な役割を果たすと考えられる成長因子である塩基性線維芽細胞成長因子(FGF2)およびプロスタグランジンE2(PGE2)のBSPの発現に対する効果を検討した。BSPmRNAの発現をノーザンハイブリダイゼーション法またはRT-PCR法にて、成長因子の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、ラット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・考察】UMR106細胞およびROS17/2.8細胞に対するFGF2およびPGE2の作用を検討した結果、FGF2はROS17/2.8細胞の転写を促進するが、UMR106細胞の転写には全く影響を与えなかった。一方、PGE2はUMR106細胞の転写を促進するが、ROS17/2.8細胞の転写には影響を与えなかった。以上の結果は、同じ因子であっても分化程度が異なる細胞に対し、異なった作用を表す可能性があることを示している。ルシフェラーゼアッセイとゲルシフトアッセイの結果、FGF2は新規のFGF応答配列を、PGE2はcAMP応答配列とFGF応答配列を介してBSPの転写を調節していると考えられた。以上の結果から、FGF2とPGE2は、BSPの転写を調節する重要な因子であると考えられた。

1  
1-2-7

## 歯と歯周組織の形態発現に関わる制御機構 — 歯と硬組織の組織構造に関する研究 —

○三島弘幸<sup>1,8</sup>, 横田ルミ<sup>1,8</sup>, 鈴木久仁博<sup>1,8</sup>, 小澤幸重<sup>1,8</sup>, 脇田 稔<sup>2</sup>, 前田健康<sup>3</sup>, 山下靖雄<sup>4</sup>,  
内田 隆<sup>5</sup>, 田畑 純<sup>6</sup>, Elsey, RM<sup>7</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅱ解剖学<sup>1</sup>, 北海道大学<sup>2</sup>, 新潟大学<sup>3</sup>, 東京医科歯科大学<sup>4</sup>, 広島大学<sup>5</sup>, 鹿児島大学<sup>6</sup>,  
ロックフェラー野生動物保護ルイジアナ地区研究室<sup>7</sup>, 口腔科学研究所<sup>8</sup>

【目的】歯と歯周組織の形態を形成する機構を解明し、再生機構を明らかにする目的で、本研究ユニットは研究を行っている。歯と歯周組織の形態形成の解明のためには、系統発生的な観点が必要であり、魚類、爬虫類、哺乳類の各種の動物の歯及び歯胚を用いて、解析を行っている。

【方法】材料を実験用の哺乳類に限らず原始的有胎盤類（食虫類など）、有袋類、爬虫類、両生類、魚類などにも求め、形態形成の発生初期段階からの解析を比較解剖学的に追求している。試料は、組織学的手法や免疫組織化学的手法を用い、X線回折法、分析電顕、免疫電顕等の装置を用いて解析してきた。

【結果・考察】エナメル質の起源とされるエナメロイドは系統発生的研究から魚類に特有であり、両生類に於いて初めて歯冠エナメル質が形成されることが判明し、両者を再定義することができた。象牙質の結晶配列は歯の部位や形態、形成機構と関連する。多生歯性のワニの歯では、歯冠部で成長線が明瞭に認められ、結晶の配向性が認められ、その方向は成長線に平行であった。結晶の配向は歯の形成機構と関連性があることが示唆された。象牙質の成長線の周期性は基質及び石灰化の両者の形成機構リズムの相互作用により形成されることが判明し、バイオリズム自体が成長と共に変化することが明らかになった。象牙質形態、構造形成にも象牙芽細胞のグループ化とダンシングがあることが推定され、この細胞の動きをコントロールする要因を解明する必要が出てきた。エナメル質の結晶形成において、特にAmelogeninはエナメル質の形態に関与し、enamelinがアパタイト結晶の形成に関連することが解明された。今後、歯周組織の形成と歯の形態形成の相互関与を解明していきたい。

1  
1-3-8

## 歯の形態形成に関する幹細胞の基礎的研究

○小澤幸重<sup>1,9</sup>, 鈴木久仁博<sup>1,9</sup>, 三島弘幸<sup>1,9</sup>, 横田ルミ<sup>1,9</sup>, 内田隆<sup>2</sup>, 田畑純<sup>3</sup>, 笹川一郎<sup>4</sup>, 西川純雄<sup>5</sup>,  
原田英光<sup>6</sup>, 藤原尚樹<sup>7</sup>, H. Jung<sup>8</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅱ解剖学<sup>1</sup>, 広島大学<sup>2</sup>, 鹿児島大学<sup>3</sup>, 日本歯科大学<sup>4</sup>, 鶴見大学<sup>5</sup>, 大阪大学<sup>6</sup>, 岩手医科大学<sup>7</sup>,  
ヨンセイ大学<sup>8</sup>, 口腔科学研究所<sup>9</sup>

【目的】歯の形態形成に関わる多くの遺伝子が同定され、発現を調節する諸因子の解明が進んできている。しかし、正常な発生を遂行し、発生過程での組織構造の変化をもたらす形態形成細胞の分化機構は十分に解明されていない。本研究において、特に歯冠形成に関わる細胞の動的な変化をその微細構造から検索し、完成された歯にみられる組織構造と形態形成細胞の関係について検討を加えるものである。

【方法】形態形成細胞の動態を検索するために免疫組織化学的な染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡、走査型および透過型電子顕微鏡によって組織構造と微細構造を観察する。系統発生的な検索のために同様の方法を用いて下等動物からヒトまでの歯の発生様式を比較検討する。

【結果・考察】初期エナメル質形成における基質の発現と結晶形成には形態形成細胞である象牙芽細胞とエナメル芽細胞の双方が関わっているが、遺伝子レベルで追求されている物質の変化が、免疫組織化学的手法による細胞内の物質分布と電顕観察による細胞の立体構造と微細構造の変化との関連でも検索が可能となった。一方、エナメル質の組織構造の形成については、歯胚幹細胞から分化したエナメル芽細胞と中間層細胞のうちエナメル芽細胞のグループ化とダンシングと呼ばれる運動によるエナメル小柱の複雑な走行・配列がシュレーゲルの条紋を形成することが明らかとなった。これらの分化を制御する遺伝子も解明されてきている。また、発生過程におけるこの運動の制御は基本的には中間層細胞との相互作用によっておこなわれるが、動物の種によって違いが認められ、この差異を比較検討することによってヒトの歯冠形成のしくみを細胞の構造と運動の視点から解明することが可能となった。歯根形成においても形成細胞の分化と運動機構が同様に想定され、このことから、歯の形態形成を包括的に議論する基盤を提供することができ、遺伝子、分子レベルの現象と細胞の構造と動態がようやく融合することとなった。



1  
1-3-9

## 多能性幹細胞由来アパタイトTP産生細胞による硬組織結晶の物理化学的性質の制御 —骨芽細胞系培養細胞によって形成された初期沈着物質の結晶学的検索—

○寒河江登志朗<sup>1,4</sup>, 早川 徹<sup>2,4</sup>, 安孫子宜光<sup>3,4</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅱ解剖学<sup>1</sup>, 歯科理工学<sup>2</sup>, 生化学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】骨形成・骨再生において骨芽細胞が産生・形成する沈着物質について、細胞外マトリックスECMとの関連性ならびにECMにおける石灰化機序について従来の画一的なモデルから一歩進めて、その場その場のマイクロエンバィロメント別の形成機序を追及する。これらの未解明な問題点について硬組織形成に関与する細胞系列を用いて、in vitroにおける硬組織形成の機構解明と形成された硬組織の性状評価を行う。

【方法】石灰化物形成能が既に証明されている細胞系列を用いて、in vitroにおける細胞培養技術を用い、培養液中に石灰化形成を促進すると考えられる種々の要素の構成を変化させた。実験に使ったwellはVon Kossa染色を施し、通常の顕微鏡観察を行った。形成された物質の性状をX線回折法(XRD)、フーリエ変換赤外吸収スペクトル分析法(FTIR)、熱重量・示差熱分析法(TG-DTA)、走査型電子顕微鏡観察・元素分析法(SEM-EDS)、原子間力顕微鏡観察(AFM)を用いて解析した。X線回折法としては100nmfから30nmfの部分解析できるRINT PSPC微小X線回折装置、結晶学的性質を精査できるRINT 2500粉末・薄膜X線回折装置を用いた。FTIRはホリバFT530顕微赤外吸収測定装置を用い、最小10mm<sup>2</sup>の微小領域分析を行った。熱分析はRIGAKU TG8120-DSC8230を用いた。SEM-EDSはJeol TAS-100を用いた。AFMはJeol を用いた。

【結果・考察】In vitro細胞培養実験でwellに形成された沈着物はvon Kossa染色濃度で少なくとも2通りに分類できた。ここでは a) 染色の薄いグループと、b) 染色の濃いグループに2分して、分析を行った。RINT2500によるX線回折法ではグループb)からはアパタイト様結晶の存在が確認できた。しかし、回折ピークはブロードニングを呈し結晶性が低いためアパタイトの性質の詳細は不明である。グループ a)のX線回折実験の結果は結晶性物質の存在を見出せなかった。このことはグループ a)の沈着物が非晶質物質あるいは結晶学的に極めて微細な結晶粒子であることを示唆している。RINT PSPC微小X線回折法による結果もこれらのことを裏付けている。これらの沈着物についての他の分析法の結果と合わせて報告する。

2  
2-1-10

## 代替材料を用いた歯牙再植の研究

前田隆秀<sup>1,2</sup>, 鈴木康弘<sup>1,2</sup>, ○松根健介<sup>1,2</sup>, 鶴山賢太郎<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部小児歯科学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】歯牙再植の成功を決定する事項には、歯根膜の活性化、歯根の成長等が挙げられる。再植後に歯根膜の再生・活性が認められなければ、歯根が骨に置換され、いずれは再植歯牙は脱落してしまう。また、根未完成歯の再植においては、歯根が成長の方向か吸収の方向かで再植の成否が分かると考えられる。本研究は、乳歯または永久歯の歯根膜細胞が再生し、正常にセメント質と付着し根周囲の歯槽骨との正常な関係を維持するための条件を検討すると同時に、歯根未完成歯の歯冠・歯根形態を観察し、歯根の成長様式を検討することを目的としている。

【方法】歯根未完成歯の歯冠形態、歯根形態の特徴を調べるために、保護者より研究に同意を得られた患児より摘出した乳中切歯および正中過剰埋伏歯を試料とした。試料は、生理食塩水にて洗浄後、中性ホルマリンにて保存後、金-パラジウム蒸着した。走査型電子顕微鏡(SEM:S-2150, 日立社製)を使用し、歯冠および根尖部形態を観察した。

【結果・考察】現在、歯根形成量の違う試料を集め歯冠部、根尖部の形態の特徴を検討している。また、最近臨床応用されている3DXを使用し歯根の成長を経時的に観察する予定である。歯牙再植のもう一つの問題点である、歯根膜の再生についても検討し、歯牙再植時における周囲組織および歯根膜の状態に対し組織学的検討を加えていく予定である。

2  
2-1-11

## 歯根再建医療用人工細胞外マトリックス代替材の開発 —フィブロネクチンによるヒト骨髄間葉系幹細胞の付着能への影響— —Glow Discharge法によるコラーゲンコートチタンへの骨芽細胞の定着促進—

○安孫子宜光<sup>1,4</sup>, 平塚浩一<sup>1,4</sup>, 神野良一<sup>2,4</sup>, 小倉直美<sup>2,4</sup>, 張維仁<sup>3</sup>, 李勝揚<sup>3</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>, 口腔外科学<sup>2</sup>, 台北医学大学口腔医学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】歯根再建医療については人工代替材の顎骨への埋入後、代替材の顎骨への初期固定期間の治癒成績が予後に大きく影響する。骨内インプラント埋入後の骨の修復過程において、積極的に骨形成促進処置を行い、骨内インプラントの初期固定期間を短縮させ、いかに周囲組織細胞を短時間に定着させられるかが重要である。本研究の目的は、いかに早く骨形成能を有する骨芽細胞の未分化細胞を代替埋入材料、すなわちインプラント体に定着させるか目的とした人工細胞外マトリックス付加代替材の開発にある。一般に血球系細胞を除く細胞の多くは、細胞マトリックスに接着、定着し、自ら細胞マトリックスを合成分泌して、始めてその細胞機能を発揮し始めることから、骨髄間葉系幹細胞(human mesenchymal stem cell)の定着に有用な細胞マトリックス成分として骨芽細胞の機能誘導に有用なフィブロネクチンに注目して正常ヒト骨髄間葉系幹細胞のフィブロネクチンをコーティングした培養プレートに対する初期付着能を調べた。また、コラーゲンも骨芽細胞の定着、機能発現促進する重要な細胞マトリックス成分であることから、チタンプレートにGlow Discharge法でコラーゲンをコーティングし、骨芽細胞の付着、細胞マトリックス成分の合成への影響について調べた。

【方法】フィブロネクチンをコーティングした培養プレート上で培養し、定時的に定着細胞数を測定し、比較検討した。チタンプレートをアルゴンバガスで洗浄後、アルキルアミンガスに置換し、Glow DischargeすることでNH-基をチタンプレート表面に固定した。ついでBis suberate またはグルタルアルデヒドでコラーゲンをNH-基固定したチタンプレートにI型コラーゲンをクロスリンクさせた。コラーゲンコーティングの証明は、Scanning electron microscopy-energy dispersive spectroscopy(SEM-EDS) 法および走査電顕で確認した。次いでヒト骨芽細胞株MG63 をコラーゲンコーティングチタンプレート上で培養し、定時的に走査電顕観察を行った。

【結果・考察】ヒト骨髄間葉系幹細胞の定着実験では、血清存在下で、フィブロネクチンは有意に細胞定着を促進しないが、血清無添加の条件下ではコントロール群のアルブミンコーティング群に比べて短時間では骨髄間葉系幹細胞は、有意の細胞定着を促進した。これらの結果から、フィブロネクチンは、ヒト骨髄間葉系幹細胞の定着にも有用な人工細胞外マトリックス成分になることが示唆された。一方、コラーゲンコーティングチタンプレート実験では、SEM-EDS 分析によって、チタンプレート上にC, S, O, N 元素の確認ができた。走査電顕観察でも球形上のコラーゲンと思われる付着物が観察された。コラーゲンコーティングしていないコントロールチタンプレート上には、いっさいこれらの現象は認められなかった。また、MG63 細胞の定着実験では、培養4 時間後の観察で、グルタルアルデヒドクロスリンクチタンプレートで、すでにMG63 細胞は定着し、細胞周辺には自ら合成、分泌したと思われるコラーゲン線維が観察された。Bis suberateクロスリンクチタンプレートでは、コラーゲン線維は明確でなく、不定形の細胞外マトリックス様物質が細胞表面を覆っているように見えた。今後この不定形の物質がプロテオグリカンなどの細胞外マトリックス成分であるかを確認するために、遺伝子発現レベルでマイクロアレイ解析を行う予定である。これらの結果から、Glow Discharge法による、I型コラーゲンクロスリンクチタンプレートは、骨内インプラント埋入後の骨芽細胞の定着を促進し、積極的に骨形成促進が期待できると考えられる。

2  
2-2-12

## 傾斜機能生体材料の開発 —細胞接着タンパク質のチタン表面への固定化—

○早川 徹<sup>1,4</sup>, 根本君也<sup>1,4</sup>, 安孫子宜光<sup>2,4</sup>, 會田雅啓<sup>3,4</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 生化学<sup>2</sup>, 第II補綴学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】現在、チタンまたはチタン合金は歯科用インプラント材料として多用されているが、骨形成速度や骨との固着力などに未だ問題を有している。これらを解決するために、今までにプラスティング処理や酸処理あるいはリン酸カルシウムによるコーティング処理などが報告されている。演者らは、細胞接着タンパク質をチタンに固定化する事によってより生体適合性に優れた歯科用インプラント材料が開発できるものと考えた。本研究では、まず、細胞接着タンパク質のチタン表面への固定化方法について検討した。

【方法】チタンディスクをコロイダルシリカ溶液 (pH9.8) により鏡面研磨した。トレシルクロリド (CF<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>Cl) を鏡面研磨チタン表面に塗布し、37℃にて2日間反応させた。水/アセトン混合溶液にて洗浄、乾燥後、トレシル化チタンをpH7.4のフィブロネクチン/リン酸緩衝溶液 (0.1mg/ml) に37℃で1日間浸漬した。トレシル化およびフィブロネクチン固定化の確認はX線光電子分光 (XPS, ESCA750, 島津) を使用し、F1s, N1s, O1sおよびCl1sのスペクトルを測定して行った。

【結果・考察】トレシルクロリド反応後のXPS測定では、トレシルクロリド由来と思われるF1sのピークが688.6eV付近に観察された。また、530.3eV付近にTiO<sub>2</sub>の酸素原子由来のO1sピークが観察され、532eV付近にトレシルクロリドの付加によって生成した有機酸素原子に由来するO1sピークが観測された。以上の結果から、トレシルクロリドがチタン表面に反応した事が推定できる。トレシル化チタンにフィブロネクチンを固定化し、その後、純水で洗浄した試料のXPS測定ではF1sのピークは観測されなかったことから、トレシルクロリドはすべてタンパク質固定化反応で消費されたことが分かる。それに代わって、フィブロネクチン由来するN1sのピークが399.9eV付近に観察された。このピークは60秒間のエッチングによっても消失しなかった。また、フィブロネクチン由来のCl1sのピークは286.4eV付近に観察された。O1sのスペクトルにおいても、532eV付近にフィブロネクチン由来のO1sピークが大きく観察され、TiO<sub>2</sub>由来のピークの強度は非常に低かった。フィブロネクチン固定化後、60分間超音波洗浄した場合でも、同様にフィブロネクチン由来のN1s, Cl1s, O1sのピークが観察できた。以上の結果から、トレシルクロリドを用いた反応によってチタン表面に簡便にフィブロネクチンが固定化できることが判明した。現在、プラズマ重合を用いたチタンの表面改質についても検討中である。

2  
2-2-13

## 代替埋入材としてのリコンビナント成長因子の開発 －歯周組織再生を促進する因子に関する研究－

○小方頼昌<sup>1,5</sup>, 清水映美<sup>1,5</sup>, 佐本 博<sup>2</sup>, 齋藤綾一朗<sup>3</sup>, 葛西一貴<sup>2,5</sup>, 古山俊介<sup>4,5</sup>, 山崎宗与<sup>3,5</sup>

日本大学松戸歯学部歯周病学<sup>1</sup>, 矯正学<sup>2</sup>, 歯内療法学<sup>3</sup>, 生理学<sup>4</sup>, 口腔科学研究所<sup>5</sup>

【目的】歯周疾患や整形外科領域で生じた骨欠損部への埋入材として、ハイドロキシアパタイトなどの無機材料が使用されてきたが、近年成長因子の骨欠損部への応用が注目されている。我々は、様々なホルモン、成長因子およびサイトカインの骨芽細胞に対する影響に関して研究を行い、骨芽細胞で多量に発現しているタンパク質のうち、骨シアロタンパク質(BSP)とオステオポンチン(OPN)の遺伝子発現に注目して研究を進めている。これらのタンパク質の発現に対する成長因子の効果は、ほとんどが単独の成長因子の結果であり、生体内での創傷治癒における複数の成長因子の効果を反映していないと考えられる。そこで我々は、上記タンパク質に対する、単独の成長因子の効果と組み合わせ効果に関して研究を行う予定である。

【方法】ROS17/2.8およびUMR106骨芽細胞様細胞を用い、骨形成および再生に重要な役割を果たすと考えられる成長因子のBSPの発現に対する効果を検討するために、BSPmRNAの発現をノーザンハイブリダイゼーション法またはRT-PCR法にて、成長因子の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、ラット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・考察】まず第一に、BSP遺伝子の発現が2種類以上の成長因子によりどの様に調節されているかを検索する前段階として、骨芽細胞様細胞に各種ホルモン、成長因子またはサイトカインを単独で作用させ、その濃度依存性および作用時間等をRT-PCR法またはノーザンブロット法で確認を行った。ROS17/2.8細胞において副甲状腺ホルモン(PTH), TGF-beta, FGF2およびフラボノイドによりBSPmRNAの発現上昇が認められた。UMR106細胞においてはPTHおよびPGE2によりBSPmRNA量の増加が認められた。次に骨折治癒等の骨の創傷治癒部位で、どのようなホルモン、成長因子またはサイトカインが発現しているかを、文献検索的に検討する予定である。その結果をふまえて、それぞれの因子単独ではなく、複数個(初期段階としては2種類)の効果に関して検索を行う予定である。

2  
2-2-14

## BMPの化学構造と骨形成促進効果の研究

○西山典宏<sup>1,8</sup>, 木場秀夫<sup>2,8</sup>, 久保山 昇<sup>3,8</sup>, 早川光央<sup>4,8</sup>, 安孫子宜光<sup>4,8</sup>, 小方頼昌<sup>5,8</sup>, 前田隆秀<sup>6,8</sup>, 石崎 勉<sup>7</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 病理学<sup>2</sup>, 薬理学<sup>3</sup>, 生化学<sup>4</sup>, 歯周病学<sup>5</sup>, 小児歯科学<sup>6</sup>, (株)サンギ<sup>7</sup>, 口腔科学研究所<sup>8</sup>

【目的】歯周組織再生誘導能を有するエムドゲイン/アルジネートゲルを多孔性ヒドロキシアパタイト担体に保持し、高齢ウサギ(生後1.5年)大腿骨の内側顆および外側顆に埋入して動物実験を行ない、エムドゲインが骨再生効果に及ぼす影響を検討し、インプラント表面の修飾剤としての可能性を追究する。すなわち、多孔質アパタイトに保持したエムドゲイン/アルジネートゲルを高齢ウサギ(生後1.5年)大腿骨の内側顆または外側顆に埋没し、2週、7週経過後に試料と周囲組織を取り出し、大腿骨の内側顆および外側顆のperipheral quantitative computed tomography (pQCT) 及び組織学的観察により組織内における試料の新生骨形成を検討する。

【方法】ウサギを麻酔下で、常法に従って無菌手術で大腿骨の内側顆および外側顆を露出し、海綿骨に直径2.5 mmの歯科用エンジンで2個の穴をあける。それぞれの穴に、試料を挿入して、皮膚を閉鎖する。ただし、試料2個に対して、1個の同様に偽手術を施し偽手術群とする。実験終了後、動物を屠殺し、大腿骨顆部を摘出し周囲の軟組織を除去した後、試料の周囲組織の肉眼的観察する。また、pQCTによる骨密度の測定も行なう。さらに、病理組織学的標本を作成するために、大腿骨下顆をEDTAで10日間脱灰し、脱灰試料のパラフィン切片を作製した後、ヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行い光学顕微鏡で観察し、各群の新生骨量を比較検討する。

【結果・考察】現在、大腿骨株を摘出し、試料周囲の組織の脱灰パラフィン組織標本を作製・顕微鏡観察し、エムドゲインの骨再生効果および基材に使用したアルジネートの影響を検討中である。

リン酸カルシウムセメントの歯科臨床応用への試み  
—球状化四リン酸カルシウムの合成—

○平山聡司<sup>1,4</sup>, 石崎 勉<sup>3</sup>, 根本君也<sup>2,4</sup>, 池見宅司<sup>1,4</sup>

日本大学松戸歯学部保存修復学<sup>1</sup>, 歯科理工学<sup>2</sup>, (株) サンギ<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】四リン酸カルシウム (TTCP) と二リン酸カルシウム (DCPA) からなるリン酸カルシウムセメント (CPC) は、水との練和により自己硬化し、骨や歯牙硬組織の主成分であるハイドロキシアパタイト (HAP) に転化する生体親和性材料である。したがって、その応用範囲は広く顎顔面領域における骨欠損の修復や歯髄覆髄材などとして臨床使用が期待される。その中でも根管充填材や根管充填用シーラーとして用いる場合、良好な流動性が必要となるが、現在のCPCは必ずしも十分なそれを有するとは言えない。そのためプレミックスタ입として充填用シリンジを用いて注入する場合、CPCをグリセリンなどと練和しなければならず、流動性を求めるあまり粉液比が小さくなれば機械的強さの低下が懸念される。そこで、本研究はCPCの流動性と機械的強さを向上させることを目的として、CPCの主成分であるTTCPの粒子形状を球状化させることを試みた。

【方法】球状TTCPの合成に必要なDCPAと炭酸カルシウム (CaCO<sub>3</sub>) は、ダイノームル (KDL A型、Willy A. Bachofen AG) を用いてそれぞれ粉砕した (中位粒子径: DCPA=0.36 μm、CaCO<sub>3</sub>=0.38 μm)。次に粉砕したDCPAとCaCO<sub>3</sub>を等モルになるよう混和・攪拌し、この溶液をスプレードライヤー (LT-8型、大川原化工機) を用いて、アトマイザー回転数35,000rpmにて噴霧した。これによって得られたTTCP原料粒子をSEM観察し、球状化を確認した。次に球状原料粉末を電気炉 (スーパーマックス2024-17V、丸祥電気製) を用いて焼成し、1,500°C、6時間保留した後、速やかに炉より取り出し、デシケーター中に移動させ室温中で放冷させた。焼成後、粉末X線回折装置 (管電圧: 45Kv、管電流: 300mA、測定角度: 20~40°、走査速度: 4°/min、M18XHF22、マックサイエンス製) を用いて焼成品の組成確認を行い、形状についてはSEM観察を行った。

【結果・考察】焼成品のSEM観察結果から、焼成前の球状原料粒子径が小さいものでは、焼成後は球状化したTTCP粒子は存在しなかった。しかし、焼成前の球状原料粒子径が大きいものでは球状化したTTCP粒子が確認された。粉末X線分析の結果から、焼成品はTTCPであることが確認されたが、HAPやCaOの回折ピークも微量ながら認められた。以上のことからTTCPの球状化に当たっては、スプレードライヤーの送風温度によるピロリン酸の生成防止やクエンチング速度の更なる検討を行わなければならないことが示唆された。

硬組織形成誘導能を有する根管封鎖材料の開発

○辻本恭久<sup>1,2</sup>, 川島 正<sup>1,2</sup>, 小塚昌宏<sup>1,2</sup>, 松島 潔<sup>1,2</sup>, 山崎宗与<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部歯内療法学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】硬組織誘導能を有する根管封鎖材料を開発するために、現存する材料の中で最も優れていると考えられるmineral trioxide aggregate (MTA) の基礎的研究を行うこと。次に、ビタミンCとビタミンEのリン酸ジエステル結合によって水溶性に調整されたEPC-K1のもつ抗酸化作用の生体に対する影響の検索を行うこと。

【方法】MTAを混和し、厚さ約1mmに調整し硬化させた後に表面をデジタルマイクロスコープ、走査型電子顕微鏡で観察した。さらに、根管洗浄剤等 (3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、5% NaClO、15% EDTA) を1、2、3週間各時間作用した後のMTAの構造変化を検索するために同様の観察を行った。次に、LPSを作用させた歯髄培養細胞にEPC-K1を添加し、8時間培養後、培養上清中のInterleukin1-β (IL-1β) の産生量をELISA Kitを用いて測定した。これらの細胞からmRNAを抽出しRT-PCR法でIL-1β、converting enzyme (ICE) の遺伝子発現を観察した。

【結果・考察】MTAが硬化した表面は、結晶構造が見られない平坦な部分が多く見られた。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を作用させた場合には、1週間後では約2.5 μmのやじりに似た三角形の粒子と1辺約15 μmの立方体の構造物が認められ、2、3週間後では時間の経過と共に立方体がいくつも重なったような構造物が増加していく傾向が見られた。5% NaClOを作用させた場合は、1週間後では表面に1辺約2.5 μmの立方体の構造物が多数見られ、2、3週間後では時間経過と共に立方体が消失し、微細な顆粒状構造物が観察された。15% EDTAを作用させた場合は、1週間後では所々に間隙を認め、針状結晶構造物が多数見られ、2、3週間後では針状構造物が消失し、微細な顆粒状構造物が観察された。一方、EPC-K1については、LPSを作用させた歯髄培養細胞 (HDP) にEPC-K1を添加すると、LPSを作用させEPC-K1を作用させないHDPに比較して、炎症性サイトカインの一つであるIL-1βの産出を抑制した。さらにEPC-K1を添加することによってHDPのIL-1βおよびICEの遺伝子発現を減少させた。このことから、EPC-K1は抗炎症効果を持つことが示唆され、組織の石灰化機転を誘導するためには炎症の消失が不可欠であることから、歯科臨床で多く遭遇する炎症を起こしている組織の石灰化誘導に有効な薬剤であることが期待できると思われた。

前田隆秀<sup>1,5</sup>, 根本君也<sup>2,5</sup>, ○松根健介<sup>1,5</sup>, 鶴山賢太郎<sup>1,5</sup>, 石崎 勉<sup>3</sup>, 明石俊和<sup>4</sup>, 鶴町 保<sup>4</sup>

日本大学松戸歯学部小児歯科学<sup>1</sup>, 歯科理工学<sup>2</sup>, サンギ中央研究所<sup>3</sup>, 日本大学歯学部<sup>4</sup>, 口腔科学研究所<sup>5</sup>

【目的】

本研究の目的は、最近臨床応用されている $\alpha$ -TCPを使用し、乳歯および根未完成永久歯における根管充填材を作製することである。さらに、乳歯における直接覆髄および生活歯髄切断、未完成永久歯のアペキソゲネシス、アペキシフィケーションへの応用の有効性についても同時に検討することである。

【方法】

通常では抜髄処置を行う乳歯および根未完成歯の深部う蝕に対して $\alpha$ -TCP(抗菌薬添加)を使用し、歯髄を残存させ予後観察を行った。なお、本研究には抗菌薬を使用した歯髄保護処置について説明を行い了承を得られた3歳から9歳までの患児109名を対象とし、172歯(乳歯132歯、永久歯40歯)を試料とした。

【結果・考察】

予後観察を行った結果、臨床成功率は95.3%であった。予後不良例では、直接覆髄がその大部分を占めていた。今後、アペキソゲネシス、アペキシフィケーションに使用すると同時に、根管充填剤として使用するための条件を検討し、臨床応用可能な条件を決定後、実験動物に用い組織学的検討を加える予定である。

○妻鹿純<sup>1,3</sup>, 林 龍介<sup>1</sup>, 久保田俊夫<sup>2</sup>

日本大学松戸歯学部障害者歯科学<sup>1</sup>, 茨城大学工学部物質工学科<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】有床義歯を装着する要介護者の口腔ケアを改善する一環として、床用レジンを改質することを目的として本研究に着手した。特に、口腔細菌との床用材料との親和性を低下させるための一つの方法として、床用レジンの表面エネルギーを低下させることが挙げられる。有床義歯の表面エネルギーを低下させるためには、フッ素化合物を応用することが考えられるが、最近、我々が行った研究では、汎用されている床用加熱重合レジンの液部にフッ素系モノマーを添加するだけでは、当初期待した表面性状の改質を達成することはできなかった。しかし、PTFE粉末を用いた検討によって、フッ素系モノマーを用い、フィラー用ポリマーを創製することができれば表面性状を改質できる可能性のあることが示唆された。本報告では、フッ素系モノマーを用いてポリマービーズを創製し、同ビーズを用い試作した試料の物性および細菌の付着性について検討したので報告する。

【方法】MMAにPerfluorooctylethyl acrylate (C8F)を液重量比25%で添加し、懸濁重合により球形ビーズを創製した。液部も同比率でC8Fを添加し、通法に準じて加熱重合を行い試料片を作製した。物性については、接触角、フッ素の深さ方向への分布、ガラス転移温度、ヌーブ硬さ、および引っ張り強さについて検討した。さらにC. albicansを用い振蕩培養下における細菌の付着性について検討を行い、コントロール(PMMA/MMA)と比較検討した。

【結果・考察】コントロールと比較してC8F添加試料は表面硬さおよび引っ張り強度において若干、低下したが、水に対する接触角は顕著に増加した。以前の研究では、液部へのC8F添加では表面性状に変化を与えることができなかったが、本研究ではC8Fをフィラー用ポリマーに導入することによって試作レジンを疎水性に変化させることができた。さらに、C8F添加試料表面ではC. albicansの付着量は明らかな減少を示した。以上のことからC8Fのポリマービーズへの導入によって床用レジンへの細菌付着を抑制できることが示唆された。

○谷本安浩<sup>1,2</sup>, 根本君也<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】 歯冠用硬質レジン<sup>1</sup>は審美歯冠修復材料として歯科臨床に広く使用されているが、機械的強度を補うために金属で裏装して使用されるのがほとんどである。そのためメタルフリーを目指すために金属に代わる高強度な歯科材料として、ガラス繊維による歯科用レジン<sup>2</sup>の補強が考えられる。さらにはガラス繊維の含有率を厚さ方向に変化させ、“傾斜機能”を付与させることによって、口腔内の複雑な咬合運動との調和が可能である。しかしガラス繊維で補強したレジン<sup>3</sup>の最適なガラス繊維の挿入位置や含有量などを明らかにする必要がある。そこで本研究では、ガラス繊維強化レジン (GFRR) を試作し、GFRRの曲げ試験および有限要素法 (FEM) を用いた数値解析を行い、GFRRの曲げ特性について検討した。

【方法】 試作したGFRRのマトリックスレジンモノマーは、UDMA (根上) とTEGDMA (新中村化学) を60 : 40 mol%の割合で混合し、光増感剤としてCQ (アルドリッチ) および助触媒としてDMAEMA (和光純薬) をそれぞれ0.5wt%、1.0wt%添加して調製した。2wt%シランカップリング剤 $\gamma$ -MPTS (信越化学) で処理した不定形フィラー (龍森) をマトリックスレジンに70wt%の割合で混入して硬質レジンとした。さらに試作した硬質レジン<sup>4</sup>の中立軸、上部、下部の位置にそれぞれ厚さ0.15mmのガラス繊維クロス (ニトポー) を一枚挿入することによって三種類のGFRRを作製した。三点曲げ試験では、長さ40mm×幅4mm×厚さ2.1mmの試験片を三点曲げ治具 (支点間距離30mm) に設置し、インストロン万能試験を用いて負荷速度2mm/minで曲げ荷重を与えることにより三点曲げ試験を行った。またGFRRの曲げ特性を予測するため、FEMによる三点曲げ損傷進展解析を行った。その際、ガラス繊維クロスとフィラーの損傷判定にはTsai-Hill則を、マトリックスレジン<sup>5</sup>の損傷判定にはVon-Mises則を適用した。

【結果・考察】 GFRRのいずれの場合においても、ガラス繊維で強化されていない硬質レジン<sup>6</sup>と比べて曲げ強度および曲げ弾性率は優れた結果を示した。またこれらの実験値と、FEMにより得られた解析値はいずれの場合も精度の良い一致が見られたことから、本研究で提案した数値モデルを用いることにより、ガラス繊維強化レジン<sup>7</sup>の曲げ強度および損傷進展過程の予測が可能であることが示された。以上の知見をもとに、今後は材料の厚さ方向に繊維含有率を調整することによって、複合素材の割合が徐々に変化した傾斜機能材料の開発とその効果を明らかにする。

○谷本安浩<sup>1,3</sup>, 根本君也<sup>1,3</sup>, 會田雅啓<sup>2,3</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 第II補綴学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】 歯科用セラミックスは、オールセラミックスクラウン、ポーセレンインレーなど臨床に多く用いられているが、非常に脆いという欠点を有する。セラミックス基複合材料は、既存の歯科用セラミックスの欠点を改善しうる高比強度、高靱性材料として期待される。そこで本研究ではプリプレグを積層することにより繊維強化セラミックス (FRC) を作製した。さらにFRC成形体の収縮率を測定するとともに、引張、曲げ、破壊靱性試験を行い、作製したFRCの機械的性質について検討した。

【方法】 本研究で作製したFRCの強化材には、SiC繊維 (日本カーボン) 、マトリックスにはSiC (昭和電工) を用いた。本研究では、ドクターブレード法によりSiCスラリーにSiC繊維を含浸させ、プリプレグシートを作製した。成形した厚さ0.5mmの一方向繊維プリプレグを任意の枚数積層した後に常圧成形し、FRCを成形した。また比較対象として、繊維強化されていないSiC単体の試供体も同様に作製した。成形体の評価法として、長手および幅方向の収縮率を測定し焼結度合いの検討を行った。引張試験では、インストロン万能試験 (インストロン社) により、長さ60mm×幅10mm×厚さ1mmの試験片を用いて、ゲージ部長さ30mm、負荷速度0.5mm/minの条件下において引張試験を行った。三点曲げ試験では、長さ40mm×幅4mm×厚さ3mmの試験片を三点曲げ治具 (支点間距離30mm) に設置し、インストロン万能試験を用いて負荷速度0.5mm/minで曲げ荷重を与えることにより三点曲げ試験を行った。破壊靱性試験は、曲げ試験と同様寸法の試験片下面の中央部に0.6mmのダイヤモンドカッターで予き裂を導入し、インストロン万能試験を用いて行った。

【結果・考察】 FRCの長手 (繊維) 方向の収縮率は幅方向に比べて極端に小さく、このことはマトリックスの収縮が繊維によって制御されたためと考えられる。またFRCはSiC単体と比べて、引張特性、曲げ特性、破壊靱性のすべてにおいて優れた結果が得られた。特に破壊靱性値に関しては、約5.7倍増加し、繊維補強効果が顕著に見られた。以上の結果からFRCのマトリックスにかかる負荷を強化繊維が担うことにより強度が向上し、またマトリックスに発生した亀裂の拡大が繊維により阻止され靱性が向上したものと考えられる。本研究で作製したFRCはプリプレグを積層する方法であるため、操作性にも非常に優れており、新しい歯科用セラミックスとしての応用が期待できる。

會田雅啓<sup>1,4</sup>, 池見宅司<sup>2,4</sup>, 根本君也<sup>3,4</sup>, ○渡辺 官<sup>1,4</sup>, 後藤治彦<sup>1,4</sup>, 桜田俊彦<sup>1</sup>, 増田美樹子<sup>1</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅱ補綴学<sup>1</sup>, 保存修復学<sup>2</sup>, 歯科理工学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】歯科金属アレルギーの予防から、セラミックやチタンが有効であることが近年明らかにされた。これらの材料での補綴物の製作には、焼成収縮や強度、鑄造特性などからCAD/CAMを利用したブロックからの削り出しが適している。しかし、口腔内での長期的な観察は行われていない。また、これらの材料は硬いため、20個のブロックの切削で専用の切削用のバーの切削効率が低下してしまい、経済的な負担が大きい。そこで、現在使用されているセラミックおよびチタンブロックを用いて歯冠補綴物を製作し、口腔内に装着し、5年間における長期的観察による評価を行うとともに、当学部理工学教室で開発中の快削セラミックや快削チタン材料の物性や生体親和性など、種々な方向から評価を行う。

【方法】大白歯のオールセラミッククラウンを想定した支台歯の金型模型（テーパ角 $10^\circ$ ）を、18-8ステンレス鋼（SUS-303）にて作製し、印象採得後、CAD/CAM用超硬石膏で石膏模型を作製した。計測機を用い5軸計測（計測ピッチ0.1 mm）により計測し、設計デザインソフトを用いてコーピングの設計を行った。設定条件は外形モデルをType I、オフセット値1.0 mmとし、セメントスペースを50および90  $\mu\text{m}$ 、開始点高さを1.0、2.0、5.0mmとした。加工機にてコンポジットブロックの切削加工を行った。コーピングの石膏模型への装着はレジンセメントを用いて接着（荷重条件1.5kg, 1min）、適合させシアノアクリレートで固定の2種類の条件で行った。包埋を行った後、正中方向から縦断、デジタル顕微鏡を用いて間隙の測定（計測点7点）を行った。

【結果・考察】セメント合着せず適合させた場合、セメントスペース90  $\mu\text{m}$ 、開始点高さ1.0mmの設定条件ではマージン部で支台歯と良好に適合し、軸面での間隙は70~120  $\mu\text{m}$ とほぼ設定条件の通りに観察された。咬合面部的間隙は約80  $\mu\text{m}$ であった。開始点高さ5mmでの間隙はマージン部で約80  $\mu\text{m}$ 、軸面で最も近接し咬合面部的で約200  $\mu\text{m}$ であった。セメントスペース50  $\mu\text{m}$ の設定条件の場合すべての開始点高さでマージン部の浮き上がり認められ、軸面での近接が観察された。以上の結果から、セメントスペース50  $\mu\text{m}$ の設定では適切なセメントスペースが軸面部内面に付与されていないと考えられる。これは切削バーの形成誤差が50  $\mu\text{m}$ 以上あるものと考えられ、良好な適合を得るためにはセメントスペースの設定が重要であることが示唆された。

會田雅啓<sup>1,3</sup>, 田中孝明<sup>1,3</sup>, 大村祐史<sup>1,3</sup>, 渡辺 官<sup>1,3</sup>, 谷本安浩<sup>2,3</sup>, ○若見昌信<sup>1,3</sup>, 後藤治彦<sup>1,3</sup>, 桜田俊彦<sup>1</sup>, 増田美樹子<sup>1</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅱ補綴学<sup>1</sup>, 歯科理工学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】切削をエナメル質にとどめるため、歯質や歯髄に対する侵襲が少なく、審美性や形態異常の治療に効果的なセラミックラミネートベニアが臨床で用いられている。しかし、現在のシステムでは象牙質が露出しやすく、そのため、歯質との接着性は完全ではなく、長期的な効果に疑問がもたれる。また、臨床における長期観察において、マージン部におけるレジンセメントの欠落が認められている。原因については検討中であるが、適合性と接着性が大きな理由と思われる。現在の製法では陶材の焼成に伴う収縮から適合性に問題がある。そこで、ラミネートの製作にCAD/CAMシステムを応用することによる適合性の向上を行うとともに、マージン部に生じた間隙のリペアー法の確立を行う。

【方法】ラミネートの厚みが唇側中央部で1mmおよび2mmとなるようにワックスアップを行い、切削の試料とした。この計測を元に陶材のブロックからラミネートベニアを作製し、適合性の検討を行った。試料数はそれぞれ5とした。ベニアをエポキシ上にシアノアクリレートにて固定後包埋し、正中部から矢状断を行いマイクロデジタル顕微鏡にて観察を行った。

【結果・考察】厚みが1mmとなるようにワックスアップをし、計測後切削を行った場合、5試料のうち、3試料は切削時に破折を起こした。切削が行えた2試料について観察を行った結果、歯頸部および切縁部のマージンにおいて適合は良好であったが、辺縁部でのチッピングが認められた。2mmでは切削時に破折は生じなかったが、辺縁部のチッピングが認められた。この破折およびチッピングの原因は、切削バーのダイヤモンド粒子の粗さや切削スピードに起因しているものと考えられる。今後の課題として専用のバーの開発および切削条件の設定を検討する必要がある。

3  
3-1-23

### 放電プラズマ法による快削チタン材料の開発

○根本君也<sup>1,5</sup>, 奥野 攻<sup>2</sup>, 西山典宏<sup>1,5</sup>, 會田雅啓<sup>3,5</sup>, 出井 裕<sup>4</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 東北大学大学院歯学研究科・歯科生体材料<sup>2</sup>, 第Ⅱ補綴学<sup>3</sup>,  
日本大学理工学部<sup>4</sup>, 口腔科学研究所<sup>5</sup>

【目的】チタンは生体安全性の高い金属であることから、医用材料として用いられるようになり、歯科においてもインプラント埋入体、クラウンブリッジや床用材料として用いられつつあるが、酸化しやすく湯流れが悪いために铸造するにはアルゴン気流中で行なうなど特殊な铸造器と技術を要することが難点である。

そこで、最近CAD/CAMの普及に伴ってチタンを機械加工することが注目され、歯科用装置も開発がなされて加工精度など種々検討がなされている。铸造が困難なチタンを切削加工することは合理的であるが、切削性が悪いために精度が铸造体におよばず切削に長時間を要するなど種々の欠点が指摘されているが、加工が困難である欠点を解決するに至っていない。また、エナメル質より耐磨耗性が良い材料は咬頭干渉の原因になるとも言われている。

快削性を始めとする機械的性質の向上はS, Va, Al, Taなど他の金属との合金化が研究され、新しい材料が医用として用いられつつあるが、毒性や生体安全性の低下などの問題も生じている。

本研究は、焼結合金の特性と生体安全性の高い銀を添加することに着目し、融点の大きく異なる金属を放電プラズマ焼結法を用いることにより、快削性のチタン材料の開発を試みた。

【方法】純チタンの球状粒子（直径10 $\mu$ m, ）と銀粒子（直径10 $\mu$ m, ）を任意の割合で混合し、カーボン製ダイス（内径15mm）に充填した後、放電プラズマ焼結装置に設置して真空中で加圧通電し、焼結をおこなった。温度制御は室温から700℃まで7分・3分保留・800℃5分保留を基準とした。

物理的・機械的性質は1.5mm, 幅3.6mmに成型した試料を用い、理論密度、摩擦摩耗、曲げ試験および硬さの測定を行なった。

【結果・考察】合金は直径15mm厚さ4mmの円盤状で得られた。

○理論密度はおよそ97%であった。

○摩擦摩耗はチタン成形板と焼結チタンがほぼ同じ傾向で高い数値を示し、20%銀を添加した焼結チタンが低く、10~30分間の平均値は順に0.29, 0.30, 0.25であった。

○曲げ強さは順に800, 874, 681Mpaで銀の添加によって低下した。

○硬さは450, 465, 578Hvで銀の添加によって上昇した。

焼結条件によって合金の機械的性質が異なると考えられるので、組成、焼結温度・圧力などの条件を変えた実験を準備中である。

3

3-1-24

### 生体適合性に優れた新チタン合金の開発 —ラット脛骨に埋入された金属系インプラントの新生骨形成に関する 病理組織学的検討—

○真辺剛史<sup>1,3</sup>, 中田浩史<sup>1,3</sup>, 小林喜平<sup>1,3</sup>, 岡崎義光<sup>2</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅰ補綴学<sup>1</sup>, 独立行政法人産業技術総合研究所<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】高齢化社会の到来および疾病の低年齢化の傾向により、長期間安全に埋入（インプラント）できるインプラント材料の開発が求められている。本研究は、様々な金属系インプラント周囲に形成される新生骨の病理組織学的特徴を明らかにすることおよびインプラント材料の評価方法の技術開発を目的として、Ti-15Zr-4Nb-4Ta合金をはじめ、歯科および整形外科領域で用いられているSUS316L ステンレス鋼、Co-Cr-Mo合金およびTi-6Al-4V 合金をラット脛骨に6~48週間埋入し、インプラント周囲に形成された新生骨の生成に関して、インプラント周囲の骨接触率および骨成熟の観点から病理組織学的検討をおこなった。

【方法】実験動物は、Wister系ラットを48匹使用し、左右脛骨に2本ずつインプラントを埋入した。6週, 12週, 24週, 48週間埋入後左右脛骨を取り出し、非脱灰標本および脱灰標本を作製した。非脱灰標本はトルイジンブルー染色し、インプラント周囲に形成された新生骨の病理組織学的観察および新生骨とインプラントとの接触率を測定した。脱灰標本はazan Mallory染色により、新生骨の病理組織学的観察および骨成熟度の測定をおこなった。

【結果・考察】SUS316L ステンレス鋼およびCo-Cr-Mo合金インプラントは、チタン系合金に比較して長期間埋入において低い骨接触率を示した。両合金とも埋入24週目に骨接触のピークを迎え、その後の長期間埋入では骨接触率が低下していた。成熟骨の割合の変化は、48週の長期間埋入で、SUS316L ステンレス鋼およびCo-Cr-Mo合金周囲の新生骨は不規則な構造を示し、幼若骨が散在していた。両合金は48週の長期埋入で、線維性結合組織によるカプセル化が観察され、長期間骨との強固な接合を必要としているインプラント用合金としての利用は困難であることが示唆された。Ti-6-4合金およびTi-15-4-4合金インプラントは、SUS316L ステンレス鋼およびCo-Cr-Mo合金インプラントに比較して、高い骨接触率を示し、Ti-15-4-4合金においては48週の長期間埋入で100%近い骨接触率を示していた。また、新生骨は既存皮質骨と同様な成熟骨となっていた。成熟骨の割合の変化は、48週の長期間埋入で、Ti-6-4合金およびTi-15-4-4合金周囲の新生骨は、既存皮質骨と同様な層板骨となっていた。Ti-6-4合金およびTi-15-4-4合金インプラントは、長期間埋入においても新生骨との界面に線維性結合組織の介在が認められず、インプラントに接する新生骨部分でリモデリングが行われていることが示唆された。以上より、Ti-6-4合金およびTi-15-4-4合金インプラントの周囲に形成された新生骨は、長期間埋入しても層板骨を形成し、密に接していることがわかった。また、Ti-15-4-4合金はTi-6-4合金に比較して、やや高い骨接触率を示し、生体用チタン合金として利用可能であることが示唆された。



3  
3-2-25

### 骨・歯周組織の炎症抑制および再生へのレーザー応用 ー低出力レーザー照射による骨芽細胞のトランスクリプトーム解析ー

○安孫子宜光<sup>1,2</sup>, 平塚浩一<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】低出力レーザー照射の抗炎症作用、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く、とくに分子レベルでの実証科学的な解明は遅れている。歯科医学領域にも積極的な応用が期待されているなかで、レーザー医療をさらに推進させるためには、有用性の高いレーザー照射の機種、照射法を開発するとともに、生物学的効果を実証科学的に解明していく必要があると考えられる。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可能になりつつある。本研究では、マウス骨芽細胞株MC3T3-E1細胞へのレーザー照射によって発現が変化する遺伝子差分化法およびcDNA マイクロアレイを応用して同定することを試みた。

【方法】骨形成能を有する骨芽細胞MC3T3-E1に低出力半導体レーザー（松下産業機器製、Ga-Al-As 半導体レーザーPanalas-1000、波長 830 nm）を細胞表面から5 cmの距離に照射部を設定し、500 mWで培養ディッシュ75 cm<sup>2</sup>に対して20分間照射した。この照射条件で、エネルギー密度は7.6 J/cm<sup>2</sup>になる。照射したMC3T3-E1のcDNAライブラリーから非照射細胞のmRNAを用いて得られた差分遺伝子ライブラリーから、プラスミドDNAを抽出、精製し制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動を行い、挿入断片を調べた。300bp以上の挿入断片をもち、かつ制限酵素消化パターンが異なる88遺伝子クローンを選び、挿入断片の塩基配列を解読し、NCBIのDNAデータベースとホモロジー検索を行った。一方、非レーザー照射、レーザー照射MC3T3-E1細胞から経時的にmRNAを回収して、それぞれをcy3, cy5蛍光色素で標識し、約3,800遺伝子のマイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルモニターした。発現変動した遺伝子については、さらにRT-PCR法、リアルタイムPCR法によって確認を試みた。

【結果・考察】88遺伝子クローンについてのホモロジー検索の結果、22クローンがKnown遺伝子、38クローンはESTクローン、30クローンはUnknown遺伝子であった。Known遺伝子のなかには、情報伝達系、タンパク合成系、細胞基質関連遺伝子などに関与する遺伝子が同定された。これらの結果から、低出力レーザー照射は、これら遺伝子の転写促進により、骨芽細胞の増殖、分化に関与している可能性が示唆された。MCL-174遺伝子クローンは、マウスのannxin III 遺伝子と高いホモロジーをもつことが明らかになった。RT-PCR遺伝子増幅法で確かめたところ、照射後、8時間でmRNAレベルが増大することを見いだした。Annxin IIIは、エナメル芽細胞や象牙芽細胞に見いだされており、細胞カルシウムの調節に関与するといわれていることから、低出力レーザー照射による骨芽細胞の骨形成メカニズムに関与する可能性が考えられる。一方、非レーザー照射、レーザー照射MC3T3-E1細胞から経時的にmRNAの3,800遺伝子のマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルのモニター結果から、転写、翻訳関連遺伝子、成長因子など多数の遺伝子の発現が変動が認められ、osteoglycin遺伝子の転写促進、integrin binding protein遺伝子の転写抑制がリアルタイムPCR法によって確認された。これらのことから、ゲノム科学技術を応用した骨芽細胞レーザー照射による遺伝子発現の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。

3  
3-2-26

### 新規小窩裂溝充填システムの開発 ー市販レジン系シーラントの接着性についてー

○早川 徹<sup>1,3</sup>, 前田隆秀<sup>2,3</sup>, 根本君也<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 小児歯科学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】現在、小窩裂溝に対する齲蝕抑制材料として、レジン系シーラントが多用されている。レジン系シーラントは臨床的に高い評価を得ているものの、リン酸エッチングによる前処理が不可欠である。過度のリン酸エッチングによる二次齲蝕発生の危険性や、幼若エナメル質を酸エッチングすることに対する危険性などが指摘されており、リン酸エッチングを使用しないレジン系シーラントシステムの開発が要望されている。本研究では、リン酸エッチングに変わる前処理としてガラスアイオノマー系シーラントで用いられているコンディショナー処理に着目し、レジン系シーラントとエナメル質との接着におけるコンディショナー処理の有効性について検討を行った。

【方法】レジン系シーラントとしてTeethmate-F1（クラレ）を用いた。被着体としては冷凍保存したウシ前歯を使用した。使用前直前に解凍し、注水下でエナメル質を研磨（#800, #1000）し、その後、内径3mmの穴のあいたテープで接着面積を規定した。ガラスアイオノマー系シーラントであるFuji III-LC（GC）付属のコンディショナーで10秒間被着面を処理し、水洗、乾燥後、Teethmate-F1のレジン充填材を充填した。30秒間の可視光線照射によりレジンを硬化させた後、37℃の水中に1日浸漬した。その後、オートグラフを用いて引張速度2mm/minで引張接着強さを測定した。比較としてリン酸エッチング処理した場合の接着強さについても同様に測定した。

【結果・考察】レジン系シーラントのエナメル質に対する引張接着強さを測定したところ、コンディショナー処理で約4 MPa、リン酸エッチング処理では約10 MPaとリン酸エッチング処理の方が有意に高い値が得られた。コンディショナー処理およびエッチング処理後のエナメル質表面を電界放射走査電子顕微鏡（FE-SEM）にて観察すると、コンディショナー処理の方がリン酸エッチングに比べてエナメル質の脱灰が穏やかであった。これは、コンディショナーの主成分がポリアクリル酸であり、リン酸に比較して酸性度が弱いためと思われる。レジン系シーラントとエナメル質との接合状態のFE-SEM観察でも、リン酸エッチング処理の方がコンディショナー処理に比較してシーラントがエナメル質と緊密に接合している様子が観察できた。現在、以上の知見を基に、本学理工学教室で見出された水溶性光重合開始材であるQTXを配合した前処理材を試作し、その効果について検討を行っている。

3  
3-2-27

### 新規矯正用接着システムの開発 — 試作セルフエッチングプライマーの有効性 —

○早川 徹<sup>1,3</sup>, 前田隆秀<sup>2,3</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 小児歯科学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】現在、矯正用ブラケットの接着に4-META/MMA-TBBレジンが臨床で多用されている。このレジンシステムではエナメル質をリン酸でエッチングすることが指示されており、過剰なエッチングによるブラケット周囲の二次齲蝕発生の危険性や、ブラケット撤去時にエナメル質が破壊する可能性があることなどが指摘されている。

そこで、本研究では、リン酸エッチングに変わる前処理材としてセルフエッチングプライマーに着目し、4-META/MMA-TBBレジンとエナメル質との接着におけるセルフエッチングプライマーの有効性について検討を行った。

【方法】リン酸エステル系モノマーであるPhosmer-M（メタクリロイルオキシエチルリン酸）、塩化第二鉄およびHEMA（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）からなる試作セルフエッチングプライマーを調整した。被着体として冷凍保存したウシ前歯を使用した。使用直前に解凍し、注水下でエナメル質を研磨（#800, #1000）し、その後、内径3mmの穴のあいたテープで接着面積を規定した。試作セルフエッチングプライマーで30秒間被着面を処理し、乾燥後、スーパーボンドC&Bを用いてステンレス棒（サンドブラスト処理）を接着させた。レジン硬化後、37℃の水中に1日浸漬した後に、オートグラフを用いて引張速度2mm/minで引張接着強さを測定した。比較としてリン酸エッチング処理した場合の接着強さについても同様に測定した。

【結果・考察】リン酸エッチング処理した場合、約12MPaの引張接着強さが得られた。試作セルフエッチングプライマーで処理した場合には、塩化第二鉄濃度の増加に伴って接着強さは増加し、30% Phosmer-M, 5% 塩化第二鉄, 35% HEMAからなるセルフエッチングプライマーを用いた場合、約18MPaとリン酸エッチング処理よりも統計学的に有意に高い接着強さが得られ、電界放射走査電子顕微鏡による観察ではレジンとエナメル質とが緊密に接合している様子が確認できた。また、4℃の冷水と60℃の温水に交互に浸漬するサーマルサイクル試験を行ったところ、サーマルサイクル5000回後も約13MPaと良好な接着強さが得られた。

以上の結果から、本研究で試作したセルフエッチングプライマーは4-META/MMA-TBBレジンとエナメル質との接着において非常に有効な前処理材であり、リン酸エッチング処理に起因する問題点を解決できる可能性を有していることが判明した。

3  
3-2-28

### レーザーを応用した新規初期齲蝕検出装置の開発

○根本君也<sup>1,4</sup>, 池見宅司<sup>2,4</sup>, 前田隆秀<sup>3,4</sup>

日本大学松戸歯学部歯科理工学<sup>1</sup>, 保存修復学<sup>2</sup>, 小児歯科学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】口腔清掃の認識が高まっている現在、齲蝕発生率が低下しているが、初期の齲蝕を検出して治療を施すことにより、患者の侵襲が少なく予後が良いことは明白である。

そこで、齲蝕によるエナメル質脱灰の現象を光学的に捉え、原理に基づいた簡便な方法で齲蝕を検出する装置の開発を考えた。現在歯にレーザー光を照射して齲蝕部位の蛍光性放射光を励起させ、発生した放射光を検出する装置が使われているが、さらにハイドロキシアパタイト（HAP）結晶の組織的変化による散乱光を解析し、齲蝕部位の特性現象に対応した検出方法を検討し、総合的精度の向上を目指す。

すなわち、唇面や咬合面に発生した齲蝕に対しては反射光として、隣接面に発生した齲蝕には透過光として検出し、光源のレーザー光線を除去して増幅し、多様な臨床の場で使用し易い装置とする。

【方法】ハイドロキシアパタイト（HAP）粉体を放電プラズマ焼結装置で結晶化し、人工エナメル質を作製する。人口唾液や酸に浸漬し、人工初期齲蝕を作製し、各種レーザー光源を照射して波長分析により蛍光を検出し、光量計を用いて反射光量、透過光量を測定する。

【結果・考察】現在各種レーザー光源を準備して照射と検出の装置を試作した。反射光、透過光の光強度を測定する装置を試作した。両装置ともPCに取込んで解析する準備ができた。放電プラズマ焼結装置で結晶化したHAP人工エナメルおよびヒトエナメル質の健全部と齲蝕罹患部に各種光源を照射し、データ収集中である。

○飯田浩雅<sup>1</sup>, 木村 大<sup>1</sup>, 山本憲廣<sup>1,6</sup>, 平山聡司<sup>1,6</sup>, 根本君也<sup>2,6</sup>, 笹原廣重<sup>3,6</sup>, 色川勝己<sup>4</sup>, 黒田晴雄<sup>5</sup>, 池見宅司<sup>1,6</sup>

日本大学松戸歯学部保存修復学<sup>1</sup>, 歯科理工学<sup>2</sup>, 口腔診断学<sup>3</sup>, 東京理科大学工学部<sup>4</sup>, 東京理科大学赤外自由電子レーザー研究センター<sup>5</sup>, 口腔科学研究所<sup>6</sup>

【目的】歯科医療に用いられているレーザーの硬組織への応用に関しては、歯質強化と歯質の削除に関する報告がなされている。しかし、レーザーの波長の違いが健全歯質あるいは脱灰歯質にどのような影響を与えるかについては、特殊な装置を必要とすることから情報が少ない。今回、5 $\mu$ m~15 $\mu$ mの変長を有する赤外自由電子レーザー(IR-FEL)を使用する機会を得たので基礎的な実験を試みた。まず、FT-IRにてヒトエナメルならびに象牙質の赤外線吸収波長を調べて特徴的な波長を選択し、それらの波長の違いが歯質に与える影響について、照射エネルギー密度との関係を検討した。

【方法】1. 試料作成：ヒト抜去歯を用い、それらをレジン(トレーレジ、松風)にて包埋し、No. 2,000の耐水研磨紙で最終研磨した。試料は健全エナメル質と健全象牙質、そして、0.1M乳酸中に1時間浸漬して作成した脱灰エナメル質と脱灰象牙質の4群とした。

2. レーザー照射条件：FELの照射は、ジंकセレンの凸レンズを介し、3PPSの条件で行い、選択した波長と照射エネルギー密度は波長8.5 $\mu$ mにおいて6.2J/mm<sup>2</sup>、9.4 $\mu$ mでは5.8 J/mm<sup>2</sup>、10.6 $\mu$ mでは5.9 J/mm<sup>2</sup>であった。

3. レーザー照射による歯質の構造的変化および蒸散部の深さの測定：照射した試料表面を肉眼ならびにSEMにより観察した。また照射した試料の蒸散深さをKEYENCE (LE4000)にて測定した。

【結果・考察】波長8.5 $\mu$ mで照射した健全エナメル質において肉眼的には照射痕が認められなかったが、SEM観察ではすべての試料に照射痕が認められ、照射痕の周囲には溶岩状に溶けた歯質の状態が観察された。周囲歯質の被害の程度と照射痕の大きさは8.5 $\mu$ mが最も小さく、9.4、10.6 $\mu$ mの順であった。蒸散部の深さは8.5 $\mu$ mで最も浅く、10.5、9.4 $\mu$ mの順であった。また、9.4 $\mu$ mでは蒸散された部分とされなかった部分がそれぞれの歯質に観察され、選択的な蒸散が生じているように推測された。したがって、波長9.4 $\mu$ mの波長は歯質に対して選択的な蒸散を引き起こし、歯質の障害が最も激しいものと判明した。8.5 $\mu$ mでは歯質に障害を与えにくいものと考えられるが、肉眼的に変化の見られない場合でも、本実験条件では歯質に障害が及んでいた。以上の結果から、照射エネルギー密度を考慮すればフッ化物等と併用して歯質の強化を図る場合や硬組織の診断等に応用する際には8.5 $\mu$ mの波長が好ましく、9.4あるいは10.6 $\mu$ mの波長では歯質削除に応用できる可能性が示唆された。

○熱田 亙<sup>1</sup>, 田川剛士<sup>1</sup>, 藤田 光<sup>1,2</sup>, 鈴木英明<sup>1,2</sup>, 岡田珠美<sup>1,2</sup>, 河野善治<sup>1,2</sup>, 池見宅司<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部保存修復学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】齲蝕歯の治療に修復材料としてコンポジットレジンが用いられる頻度が多くなってきた。その理由として歯質接着性を有することが挙げられ、今日ではエナメル質だけでなく象牙質とも15Mpa以上の接着強さが得られている。その結果、窩洞の形態に関しても従来の保持形態等に拘泥することなく、感染歯質のみを除去するminimal interventionの考えが歯科医療に浸透しつつある。このことは、歯質削除の方法にも影響を及ぼし、患者サイドに立った無痛的な歯質削除の方法が論ぜられるようになった。また、齲蝕予防の観点から、齲蝕原因菌のバイオフィーム除去が注目を浴びており、無痛の歯質削除だけでなくバイオフィーム除去に応用可能な粉体噴射装置の使用法の確立が求められている。そこで、粉体の種類を変えて歯質に噴射し、粉体の感染歯質の研削能と非研削能について検討した。

【方法】ウシの前歯唇側面の象牙質面を平坦に露出して近心半面を健全象牙質とし、遠心半面は10%蟻酸に30、60、120分浸漬して人工的な齲蝕を作成した。試料の遠心から近心にかけて1mm/secの速度で移動させながら粉末を噴射した。粉末噴射装置はペインレスジェット(ヨシダ)を使用して、酸化アルミナ粉末(昭和電工)、キトサン粉末(焼津水産加工)、桃種粉末(新東ブレーター)を用いて噴射角度90度、噴射エネルギー0.3Mpa、噴射距離2.0mmで研削した。研削深さの測定は、研削後直ちにシリコーン印象材(エクザハイフレックス、ジーシー)にて印象採得後、高精度表面形状測定器(LE4000, キーエンス)にて測定した。

【結果・考察】健全象牙質の研削深さは、アルミナ粉末で930 $\mu$ m、キトサンで6 $\mu$ m、桃種で3 $\mu$ mを示し、キトサンと桃種ではほとんど健康象牙質を削除しないことが示された。人工軟化象牙質では蟻酸に30分、60分、120分浸漬した試料においてアルミナ粉末で850、780、235 $\mu$ m、キトサンで76、85、137 $\mu$ m、桃種で93、122、143 $\mu$ mを示した。これらの結果から、アルミナ粉末は脱灰時間が長くなるにしたがって研削深さが減少し、キトサンと桃種は逆に研削深さが深くなった。したがって、軟化象牙質を選択的に除去するにはキトサンや桃種の方が優れており、アルミナでは軟化象牙質が除去され健全象牙質が露出してくると急激に深く研削され、露髄等の偶発事故を生ずる可能性が危惧された。また、桃種では窩洞形成後の歯質に着色が観察され、キトサン粉末の有用性が示唆された。

○渋谷 鈺<sup>1,2</sup>, 卯田昭夫<sup>1,2</sup>, 下坂典立<sup>1,2</sup>, 山口秀紀<sup>1,2</sup>, 橋本崇文<sup>1,2</sup>, 石橋 肇<sup>1,2</sup>日本大学松戸歯学部歯科麻酔学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】齲蝕歯の治療に修復材料としてコンポジットレジンが用いられる頻度が多くなってきた。その理由として歯質接着性を有することが挙げられ、今日ではエナメル質だけでなく象牙質とも15Mpa以上の接着強さが得られている。その結果、窩洞の形態に関しても従来の保持形態等に拘泥することなく、感染歯質のみを除去するminimal interventionの考えが歯科医療に浸透しつつある。このことは、歯質削除の方法にも影響を及ぼし、患者サイドに立った無痛の歯質削除の方法が論ぜられるようになった。また、齲蝕予防の観点から、齲蝕原因菌のバイオフィルム除去が注目を浴びており、無痛の歯質削除だけでなくバイオフィルム除去に応用可能な粉体噴射装置の使用法の確立が求められている。そこで、粉体の種類を変えて歯質に噴射し、粉体の感染歯質の研削能と非研削能について検討した。

【方法】ウシの前歯唇側面の象牙質面を平坦に露出して近心半面を健全象牙質とし、遠心半面は10%蟻酸に30、60、120分浸漬して人工的な齲蝕を作成した。試料の遠心から近心にかけて1mm/secの速度で移動させながら粉末を噴射した。粉末噴射装置はペインレスジェット（ヨシダ）を使用して、酸化アルミナ粉末（昭和電工）、キトサン粉末（焼津水産加工）、桃種粉末（新東プレーター）を用いて噴射角度90度、噴射エネルギー0.3Mpa、噴射距離2.0mmで研削した。研削深さの測定は、研削後直ちにシリコーン印象材（エクザハイフレックス、ジーシー）にて印象採得後、高精度表面形状測定器（LE4000, キーエンス）にて測定した。

【結果・考察】健全象牙質の研削深さは、アルミナ粉末で930 $\mu$ m、キトサンで6 $\mu$ m、桃種で3 $\mu$ mを示し、キトサンと桃種ではほとんど健康象牙質を削除しないことが示された。人工軟化象牙質では蟻酸に30分、60分、120分浸漬した試料においてアルミナ粉末で850、780、235 $\mu$ m、キトサンで76、85、137 $\mu$ m、桃種で93、122、143 $\mu$ mを示した。これらの結果から、アルミナ粉末は脱灰時間が長くなるにしたがって研削深さが減少し、キトサンと桃種は逆に研削深さが深くなった。したがって、軟化象牙質を選択的に除去するにはキトサンや桃種の方が優れており、アルミナでは軟化象牙質が除去され健全象牙質が露出してくると急激に深く研削され、露髄等の偶発事故を生ずる可能性が危惧された。また、桃種では窩洞形成後の歯質に着色が観察され、キトサン粉末の有用性が示唆された。

○平塚浩一<sup>1,2</sup>, 岸川道子<sup>1,2</sup>, 斉藤重野<sup>1,2</sup>, 安孫子宜光<sup>1,2</sup>日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】ゲノムプロジェクトの進歩に伴い、大量の遺伝子情報を一度に処理、解析する必要性が高まってきた。このようなニーズに答える1つの手法としてDNAマイクロアレイが開発され現在に至っている。DNAマイクロアレイとは、DNAをスライドガラスまたはシリコン基盤の上にスポットしたものの総称で、ハイブリダイゼーション法により、各遺伝子発現量を定性的に解析するといったトランスクリプトーム解析を行うことが可能である。本研究では成人性歯周炎の主要病原細菌である*Porphyromonas gingivalis* 病原性因子用のカスタムメイドアレイを作成し、その有用性を検討することを目的とした。試料として本菌体の各増殖時期での細菌を回収し、そこから抽出したRNAを用いて、各増殖時期において有意に発現量の変化が認められる遺伝子をアレイによりスクリーニングし、リアルタイムPCRにて確認することでアレイの有用性を検討した。

【方法】GenebankおよびTIGR databaseから*P. gingivalis*の病原性遺伝子を主に選択し（約120遺伝子）、各遺伝子の特異的領域をホモロジー検索にて確認後、PCR法によって特異的領域を増幅した。得られたPCR産物をDNAスポットター（GENIII; Molecular Dynamics社）にてアレイ用スライドガラス上に1遺伝子6点づつスポットした。菌体をearly-log (EL), mid-log (ML), late-log (LL)およびstationary phase (ST)まで増殖させ、それぞれのステージから集菌後、total RNAを抽出した。Random primer存在下でRT反応を行い、cDNA合成過程で蛍光色素を取り込ませた。蛍光標識試料を自動ハイブリダイゼーション装置内（ASP; Amersham）でDNAアレイ上にハイブリダイゼーションを行い、洗浄後、アレイスキャナー（GenePix; Molecular Dynamics）を用いて各遺伝子の蛍光強度を測定した。また、発現解析は遺伝子発現解析ソフト（GeneSpring; Slicon Genetics）を用いて行った。解析の結果得られた主な遺伝子はリアルタイムPCRによってその発現量を測定し、アレイデータと比較検討を行った。

【結果・考察】約120の遺伝子を主に選択し、*P. gingivalis*のマイクロアレイの作製を試みた。時系列でみた場合、EL期では遺伝子発現比が比較的増加している遺伝子数が多く認められ、その多くは酸化ストレス応答性のものが多かった。また、ML期に対してLL期では全体また、ST期ではおよそ50%の遺伝子の発現量が大きく減少していることがアレイの結果から見い出された。これらの結果は各菌体増殖期において*P. gingivalis*が代謝・増殖するための環境を整えるために、それぞれ必要な遺伝子発現量を調整しているのであろうと考えられる。また、アレイ解析の結果の一部をリアルタイムPCRで確認したところ、ほぼ同様な結果が確認されたことから、作製した*P. gingivalis*アレイは有用であることが確かめられた。また、このように一度に多数の各遺伝子の発現量を検討可能なDNAアレイは本菌体のトランスクリプトーム解析に強力なツールであることが示唆された。

4  
4-1-33

齶触感受性決定遺伝子の構造解析  
— マウス齶触感受性に関する分子遺伝学的研究 —

○前田隆秀<sup>1,3</sup>、清水邦彦<sup>1,3</sup>、植松晃樹<sup>1</sup>、中村均<sup>1,3</sup>、朝田芳信<sup>2</sup>

日本大学松戸歯学部小児歯科学<sup>1</sup>、鶴見大学歯学部小児歯科学講座<sup>2</sup>、口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】

齶触感受性に遺伝的要因が関与していることが示唆されてから久しい。しかし分子遺伝学的手段を用いて感受性決定遺伝子を解明へのアプローチはない。本研究では齶触感受性を決定する遺伝子が存在する染色体とその局在を明らかにすることである。

【方法】

高齶触感受性マウス(感受性マウス)であるC57BL/6J系統と低齶触感受性マウス(抵抗性マウス)であるC3H/HeJ系統を親系としたF2交雑種の齶触スコアを表現型とした。一方、親系統の遺伝的多型を利用した連鎖解析法によって感受性決定遺伝子の染色体上の局在を検出する。

実験に供されたマウスは離乳後の22日齢から1週間S. mutans (10<sup>9</sup> CFU/mouse)を口腔内に接種させた。屠殺までの49日齢までDiet2000を餌とした。49日齢時の齶触状態を実体顕微鏡下にてスコア化した。また、屠殺時に脾臓からDNAを抽出した。親系に多型を確認した遺伝子マーカーとしてMitマーカーを用いて決定遺伝子が存在する候補染色体をDNA pool法選定にした。

その後、高齶触スコアのF2マウスと低齶触スコアのF2マウス各々のindividual linkage analysisにてrough mappingを行い、その後すべてのF2マウスを用いてdetail mappingを行った。

【結果・考察】

C57BL/6Jマウスの齶触スコアは39.8±12.6であり、C3H/HeJマウスの齶触スコアは3.1±2.6であった。F2マウスの齶触スコアは18.4±16.5であった。DNA pooling法によるQTL解析からマウス染色体2番に有意に高い連鎖が見られとことから候補染色体とした。

rough mappingならびにdetail mappingからMitマーカーのD2Mit463とD2Mit48間に1%以下の優意水準で高い連鎖がみられた。以上の結果から齶触感受性決定遺伝子の一つは、マウス染色体2番のD2Mit463とD2Mit48間に存在することを強く示唆した。

4  
4-1-34  
1)

マウス口蓋裂発症に関与する遺伝子の特定  
— コルチゾン投与により誘導されるマウス口蓋裂発症に対する遺伝学的検討 —

○清水武彦<sup>1,2</sup>、韓 娟<sup>1</sup>、前田隆秀<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部小児歯科学<sup>1</sup>、口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】マウス妊娠中期におけるコルチゾン投与により、多くのマウス系統においてその胎児に口蓋裂が発症し、A系統は他のマウス系統よりも高い頻度で口蓋裂が発症することが報告されている。本研究の目的はA/WySnマウスとC3H/Heマウスとの遺伝的交配実験により、コルチゾンにより誘導される口蓋裂発症に影響する遺伝的要因を検出することである。

【方法】A/WySnとC3H/He、および2系統の交配から得られたF1インタークロスと、F1をA/WySnに戻し交配したN2バッククロスマウスを用いた。A(雌)×A(雄)、C3H×C3H、(A×C3H)F1、(C3H×A)F1、(A×F1)N2、(F1×A)N2をコルチゾン投与の実験群とした。雌雄マウスを交配し、妊娠11.5~14.5日に酢酸コルチゾン100 mg/kg/dayを妊娠マウスに皮下投与し、妊娠18日に胎児を子宮から摘出した。正常、口蓋裂、唇顎口蓋裂の3種類の表現型に分類した。N2胎仔の皮膚から通法に従いDNAを抽出した。コルチゾン誘導口蓋裂発症におけるX連鎖性遺伝の影響を調べるために、XおよびY染色体に特異的なプライマーを用いてN2の胎仔の性別をPCRにて判定した。コルチゾン感受性との関連が示唆されている17番染色体上のH-2領域とコルチゾン誘導口蓋裂の責任遺伝子との連鎖を評価するために、H-2領域に位置するMITプライマーを用いてN2の遺伝子型判定を行った。

【結果・考察】①A/WySnの口蓋裂発症の頻度は65.4%、C3H/Heでは12.1%であった。F1の頻度は13.3%、N2では20.7%であり、劣性遺伝性の遺伝的要因が示唆された。②唇顎口蓋裂の頻度はA/WySnで23.1%、C3H/HeおよびF1では発症が認められず、N2で3.3%であり、劣性遺伝性要因の影響、また口蓋裂単独とは異なる遺伝的要因の付加により発症する可能性が示唆された。③N2の性別をPCRにより判定したところ発症率に性差はなく、常染色体性の遺伝的要因が示唆された。④2系統間のコルチゾン投与による口蓋裂発症率に有意な差があることから、コルチゾンに対する感受性座位のマッピングが連鎖分析により可能であることが示された。そのため、H-2領域と責任遺伝子の連鎖を評価するため、N2のH-2領域での遺伝子型を決定したが、連鎖の証拠は得られず、本実験系ではH-2領域は口蓋裂発症におけるコルチゾン感受性とは関連が低いと考えられ、他の染色体領域に責任遺伝子が存在することが示唆された。

4  
4-1-34  
2)

骨格性不正咬合のDNA診断の開発  
—マウスSMXA Recombinant 近交系を用いた下顎骨近遠心方向の大きさを規定する  
遺伝子のQTL解析—

○清水邦彦<sup>1,2</sup>, 前田隆秀<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部小児歯科学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】小児歯科臨床において、成長発育を予測することは極めて重要である。骨格性不正咬合の発症には遺伝的要因が強く関与していることが知られているが、顎顔面領域の遺伝学的観点からの報告は疫学的な手法によるものが多く、分子遺伝学的解析はほとんど行われていないのが現状である。今回、我々は顎骨の大きさの異なる近交系マウスを交雑することにより得られたSMXAリコンビナント(RI)近交系を用い、下顎骨の近遠心方向の大きさを規定する遺伝子の探索を行ったので報告する。

【方法】今回の研究に使用したマウスは、国立浜松医科大学付属動物実験施設内で系統維持されているSM/J, A/J及びSMXA RI近交系マウス21系統の合計23系統を雌雄おのおの5匹ずつ、合計230匹を用いた。各系統は90日齢まで飼育した後エーテル麻酔下にて屠殺し頭部を摘出した。摘出した頭部は1%KOH下43℃で48時間処理した後、軟組織の除去、水洗・乾燥した。得られた顎骨を1mm目盛りの方眼紙の上に置き、キャノン社製複写機にて2倍に拡大した。得られた像のMentonとGonionとの距離を測定し得られた距離を量的形質とした。SMXA RI近交系全染色体の遺伝型を意味するStrain Distribution Patternはすでに報告されており、先に測定した量的形質とともに、量的遺伝形質解析ソフト、MapManager QTb28を用いてQTL解析を行った。Suggestive linkage及びSignificant Linkageの判定はpermutation testを用い算定したLODスコアを指標に行った。permutation testの結果、Suggestive/Significant Linkageは雄で2.3/3.8, 雌で2.3/4.0となった。

【結果・考察】全染色体を対象にスクリーニングを行った結果、第10番染色体60cM付近にsuggestive, 第11番染色体13cMと16cMにsignificantの値を得た。上顎骨の大きさを指標としてQTL解析を行ったところ、第11番染色体13cMと16cMにsignificantの値を得ることができ、この領域に下顎骨の大きさを規定する遺伝子が存在することが示された。これまでにこの領域にはMor2, Otx1, Cct4, Spnb2, Pelil, Gek1, Asb3, Hba, Mpg, Stk10の遺伝子がマップされておりこれら遺伝子の系統間の違いによって下顎骨の大きさが決められている可能性が示唆された。

4

4-1-35

小児顎運動の診断技法の開発  
—小児に適した顎運動解析装置の開発—

前田隆秀<sup>1,2</sup>, ○三好克実<sup>1</sup>, 倉田康弘<sup>1,2</sup>, 鶴山賢太郎<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部小児歯科学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】近年、小児期においても顎関節症症状を伴い来院する小児も増加し、さらに症状がなくともMRI所見から関節円板転移を発見することがある。顎関節症の発症要因は種々挙げられているが、咬合異常は最も考えられ、強い要因と思われる。咬合異常は顎運動異常を呈することから、顎運動異常の早期発見、早期治療ならびに予防の面からも健常小児ならびに咬合異常・顎関節異常の小児の顎運動について詳細な研究が、ますます重要となろう。そのためには、顎運動解析に際して、小児への負担が少なく、簡便に日常の咀嚼運動に近い状態でわずかな顎運動異常を解析できる3次元6自由度顎運動解析装置の開発を行った。

【方法】開発顎運動解析装置に用いた軸をもって下顎運動を表現する理論を展開すると、運動座標系における剛体の任意点Pの位置ベクトルを $r$ 、同じ点の静止系における位置ベクトルを $r_0$ で表すと、点Pの無限小の変位は慣性中心とともに進行変位と無限小角の回転によって生じる慣性中心に対する変位とから合成される。この原理を利用し、ファントムの下顎にマーカーを設置し、ビデオ撮影を行った。

【結果・考察】ファントムの下顎関節頭の表面形態は、わずかであるが凹凸を呈している。一方、切歯部相当部の運動はモーターに付与された駆動シャフトによって制御されている。そのためナソヘキサグラフで確認すると切歯部相当部に関してはスムーズな開口運動軌跡が確認できるが、左右下顎頭相当部においてはかなり波形の乱れが確認できる。また軸変化を用いて開発した顎運動解析装置で解析すると、わずかな咬合接触時ならびにクリック様運動抑制を画像上で明らかに認識することができた。この事は、咬合時において切歯部ならびに左右下顎頭相当部には変位が確認できないことから、波形を増幅した物ではないことがわかる。以上のことから開発顎運動解析装置は、軸を計測することが出来、肉眼等で検知が難しい微細な運動変化を捉えることが可能で、研究、臨床にあたり大きな期待が持たれると考えられる。

4  
4-2-36

生体振動を利用した顎口腔機能の診断  
—咬合音による歯周初期治療前後の比較—

○吉野祥一<sup>1,2</sup>、斉藤孝親<sup>1,2</sup>、多田充裕<sup>1,2</sup>、大沢聖子<sup>1,2</sup>、大川将彦<sup>1</sup>

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

【目的】 歯周炎の進展に伴う歯周組織の評価については動揺や共振周波数などの機能的な検討が行われているが、歯周治療前後の歯周組織の評価についての報告は少ない。歯周疾患患者の初期治療前後における、歯周組織の変化は、歯根膜の粘弾性などに変化が生じる。この変化が、歯と歯周組織の共振周波数の振動に変化をもたらすものと考え、そこでその振動を解析することにより、歯と歯周組織の評価を機能的側面より客観的に評価できる可能性を、タッピング運動時の咬合音によって生体の振動解析を検討した。

【方法】 歯周組織検査とX線画像診断によって成人性歯周炎と診断された患者で、顎口腔系に歯周病以外、自覚的、他覚的に異常が認められない12名を被検者とした。

(年齢27歳から69歳、平均44.8歳、男性4名、女性8名)被検者には、初期治療(ブラークコントロール、スケーリング、ルートプレーニング)前と初期治療終了2週間後に歯周組織の臨床症状の評価(PD、CAL、GI、PII)および咬合音の測定を行った。咬合音の測定は、患者に咬合音採取用のヘッドギアを装着し、タッピングにより発生した咬合音を頬骨部より採取し、解析はLOVAS-12を用いて咬合音の持続時間、周波数帯域の変化の検討を行った。初期治療の期間は、約3ヶ月である。

【結果・考察】 歯周組織の臨床症状は、PD、CAL、GI、PIIにおいて初期治療前より初期治療後において、減少傾向を示し、PD、GI、PIIでは有意差が認められた。

初診時の咬合音の持続時間は、2.40msecであったのに対し、歯周初期治療後は1.98msecと有意( $P < 0.01$ )に小さな値を示した。

また、周波数帯域の検討においても、初診時に比べ歯周初期治療後の周波数帯域は高周波帯域に変化した。このことから、歯周組織の変化により、咬合音の持続時間、周波数帯域に変化が見られることがわかった。

4  
4-2-37

咀嚼と脳の認知機能の解明  
—咬合圧の違いによるP300の変化—

伊藤孝訓<sup>1,2</sup>、○青木伸一郎<sup>1,2</sup>、井出竜也<sup>1,2</sup>、北原聡子<sup>1</sup>、須藤玲美<sup>1</sup>、笹原廣重<sup>1,2</sup>

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

【目的】 咀嚼機能の指標である「咬合圧」によって、健常者を分類し、心理的負荷をかけた際の事象関連電位(ERP)にどのような変化が現れるかを検討することにより、咀嚼機能と脳の認知機能との関連性について明らかにする。

【方法】 脳に異常のない個性正常咬合を有する健常者の咬合圧を測定し、全被験者の平均値を基準とし平均値よりも高い者を高咬合圧群、低い者を低咬合圧群とした。課題は円、三角、四角の図形を用いた鑑別であり、本実験ではoddball課題に準じ呈示頻度を円20%、三角、四角80%とした。呈示前に標的刺激と非標的刺激および呈示回数について口答で説明しランダムに連続して300回呈示した。ERPは国際10/20法に準じた測定部位により記録した。また反応時間(RT)についても測定した。解析は刺激開始直前100msecの平均電位を0とし刺激開始より1500msecの区間を用いた。300回呈示の最初の100回(開始期)、中間の100回(継続期)、最後の100回(刺激期)を抽出して、被験者ごとに加算平均し加算平均波形を求めた。なお刺激期の前に実験に対する意欲を高めるために促しを行った。今回はPzから導出した加算平均波形を用いてP300潜時、P300振幅およびRTの項目について検討し以下の結果を得た。

【結果・考察】 P300振幅は開始期において高咬合圧群と低咬合圧群の間に有意な差を認めた。

以上の結果より、咬合圧の異なるグループ間においてERP成分の出現傾向に差が認められたことから、咀嚼機能の改善と認知機能の改善の関連性が示唆された。顎口腔機能を診断するにあたり認知機能も含めた検討が重要な意味を持つものと考えられる。

4  
4-2-38

上顎洞サイナスリフトの解剖学的基礎に関する研究構想  
—CT画像による上顎洞の形態計測—

○松野昌展<sup>1,4</sup>, 加藤仁夫<sup>2,4</sup>, 石井達郎<sup>3,4</sup>, 野木隆久<sup>1,4</sup>, 佐竹隆<sup>1,4</sup>, 中村武夫<sup>3,4</sup>, 金澤英作<sup>1,4</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅰ解剖学<sup>1</sup>, 総合歯科診療学<sup>2</sup>, 口腔外科学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】 インプラント治療を希望する患者は年々増加しているが、骨量不足のために不適応となる症例が少なくない。このような症例に対してインプラント治療を行う場合、骨移植は欠くことができない処置である。上顎臼歯部の骨量不足の場合には、上顎洞サイナスリフトを施術し骨量を補うことが多い。上顎洞形態に関する研究はこれまでも歯科、耳鼻科領域で研究の対象とされてきたが、上顎洞サイナスリフトの術式を意識した上顎洞の形態研究は少ない。本研究は上顎洞サイナスリフトの術式を考慮した上で、Computed Tomography (以下CTと略す) 画像から上顎洞全体の一般形態ならびに洞底部の形態計測を行った。

【方法】 資料は東京大学総合研究博物館所蔵の現代日本人男性乾燥頭蓋骨84体168側(平均年齢37.7歳)を用いた。資料をアクリル製の保定装置で固定し、上顎咬合平面から眼窩上遠までを撮影した。撮影に使用したCT装置はXlead (TOSHIBA Medical System Co.) である。撮影は管電圧120kv、管電流50mA、スライス幅1mm、スライス間隔1mmで、フランクフルト平面に平行にシングルスキャンで行った。得られたCT画像をワークステーションへ転送し画像解析ソフトReal-time Imaging Viewer Pegasus Viewer (Zio software, Inc.) により、上顎洞の前後径、幅、高さ、体積の計測、各歯根尖から上顎洞までの最短距離の計測を行った。

【結果・考察】 無歯顎の上顎洞は有歯顎の上顎洞に比べ有意に大きい値を示した。また、上顎洞底部の形態は大きく3つのタイプ、「ラウンド型」「フラット型」「イレギュラー型」に分けられた。ラウンド型は他のタイプと比べて全体のサイズが小さく、イレギュラー型は大きかった。年齢との相関では上顎洞は加齢とともにその体積を増していった。また、上顎洞底と根尖の距離はすべてのタイプにおいて第2臼歯近心頰側根が一番近かった。また、上顎洞底部のタイプ別に分けた各歯根尖との距離は、ラウンド型ですべての歯において上顎洞から遠い傾向を示した。

上顎洞サイナスリフトの際に、洞底部の形態が強い凹凸であったり、隔壁があると手術に支障をきたすことがある。そこで、上記「イレギュラー型」とは別に洞底部の隔壁に関する観察も行ったので合わせて報告する。

4  
4-2-39

咀嚼と脳の認知機能の解明  
—咬合圧の違いによるP300の変化—

伊藤孝訓<sup>1,2</sup>, ○青木伸一郎<sup>1,2</sup>, 井出宍也<sup>1,2</sup>, 北原聡子<sup>1</sup>, 須藤玲美<sup>1</sup>, 笹原廣重<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部口腔診断学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】 咀嚼機能の指標である「咬合圧」によって、健常者を分類し、心理的負荷をかけた際の事象関連電位(ERP)にどのような変化が現れるかを検討することにより、咀嚼機能と脳の認知機能との関連性について明らかにする。

【方法】 脳に異常のない個性正常咬合を有する健常者の咬合圧を測定し、全被験者の平均値を基準とし平均値よりも高い者を高咬合圧群、低い者を低咬合圧群とした。課題は円、三角、四角の図形を用いた鑑別であり、本実験ではoddball課題に準じ呈示頻度を円20%、三角、四角80%とした。呈示前に標的刺激と非標的刺激および呈示回数について口答で説明しランダムに連続して300回呈示した。ERPは国際10/20法に準じた測定部位により記録した。また反応時間(RT)についても測定した。解析は刺激開始直前100msecの平均電位を0とし刺激開始より1500msecの区間を用いた。300回呈示の最初の100回(開始期)、中間の100回(継続期)、最後の100回(刺激期)を抽出して、被験者ごとに加算平均し加算平均波形を求めた。なお刺激期の前に実験に対する意欲を高めるために促しを行った。今回はPzから導出した加算平均波形を用いてP300潜時、P300振幅およびRTの項目について検討し以下の結果を得た。

【結果・考察】 P300振幅は開始期において高咬合圧群と低咬合圧群の間に有意な差を認めた。以上の結果より、咬合圧の異なるグループ間においてERP成分の出現傾向に差が認められたことから、咀嚼機能の改善と認知機能の改善の関連性が示唆された。顎口腔機能を診断するにあたり認知機能も含めた検討が重要な意味を持つものと考えられる。



○齊藤孝親<sup>1,2</sup>, 内田貴之<sup>1,2</sup>, 多田充裕<sup>1,2</sup>, 吉野祥一<sup>1,2</sup>  
梅田宜承<sup>1,2</sup>, 大関一弥<sup>1,2</sup>, 笹原廣重<sup>1,2</sup>

日本大学松戸歯学部口腔診断学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

#### 【目的】

遠隔医療や電子カルテなどの医療情報システムを支える基盤として、情報交換の統一、すなわち標準化は重要であり、歯科領域では、画像の圧縮伝送フォーマットの規格化や内容伝達のための病名や所見など用語・コードの標準化が進められ、情報交換基盤が構築されつつある。しかし、歯科領域においては、用語・コードの標準化などは未整備な状態で、歯科領域で標準的な国際疾病分類（ICD-10）コードの利用もほとんどなく、一部の病院歯科で使用されているのみとなっている。遠隔歯科医療システムなどで画像等の視覚的情報を伝送する場合も文字情報の添付は必須であり、医療の情報化も考えると、歯科病名との整合性も考慮した歯科用語・コードの標準化が必要と考えられる。

そこで、歯科遠隔診断システムなど、歯科医療情報システムでの情報交換に重要な歯科病名の標準化について検討を行った。

#### 【方法】

日常臨床で頻用されている歯科臨床病名について、国際疾病分類・歯科学及び口腔科学への適用（ICD-DA）によるコード化を試行した。ICD-DAコードは5桁コードすなわち5桁目が歯科的な拡張で重要な意味を持つが、試行では医科標準である財団法人医療情報システム開発センターの医科標準病名マスター（MEDIS標準病名マスター）のコード化に準じ、ICD-10の3桁コード及び4桁コードでコード化した。また、補綴物等の破損や脱落などについてはICD-10およびICD-DAに明確な分類がみられないので、暫定的にMEDIS標準病名マスターに準じてT888でコード化した。

#### 【結果・考察】

歯科臨床病名530のうち、70%の歯科臨床病名についてはICD-DAに明示された病名、または同義の病名としてコード化することができた。しかし、23%の歯科臨床病名では複数候補が考えられ、コードを確定することができず、7%の歯科臨床病名ではICD-DAに明示のない状態表現などのためコード化ができなかった。

コード化の試行によって、日常臨床で記載された病名表記ではコード化のための情報が不足する可能性があること、歯性という概念が医科病名にみられない場合があること、歯科では病名と同一に扱われている補綴物や修復物の破損などの状態表現に該当する詳細なコードがICDのコード体系に存在しないことなどの問題点が明らかとなった。

○後藤田宏也<sup>1,3</sup>, 田口千恵子<sup>1</sup>, 有川量崇<sup>1,3</sup>, 水野恭子<sup>1</sup>, 金田 隆<sup>2,3</sup>, 小林清吾<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部衛生学<sup>1</sup>, 放射線学<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】 現在行われているう蝕診断法は視診・触診法が主流である。しかし、触診ではシャープな歯科用探針を用いるため歯質破壊を生じさせてしまうことが指摘されている。臼歯小窩裂溝部では視診が困難であり、前臨床う蝕の段階はX-ray診断でも困難である。また、視診・触診法は診査者の主観に基づく方法であるため診断の再現性が劣っている。近年開発されたレーザーう蝕診断器（ドイツ、KAVO社製）は、レーザー蛍光線を利用し非破壊的診査法であり、再現性のあるデジタル情報が得られる方法である。本研究の目的は、非破壊的方法による前臨床う蝕の診断法を確立することである。1) レーザーう蝕診断器の特性の把握と臨床診断における適切な条件の確立、2) 視診・触診法とレーザーう蝕診断法との相関性、3) 視診・触診法とレーザーう蝕診断法のう蝕臨床像との対応、4) それぞれの診断法のう蝕検出精度、について検討する。今回この研究の一環として、学童の永久臼歯を対象に、う窩の形成がない小窩裂溝部の臨床診断とレーザー診断器（以下：DIAGNOdent）測定値の関係について、臨床疫学的な比較検討を行った。

【方法】 沖縄県の一地区の学童を対象として視診・触診とDIAGNOdentを用いて診査を行った。小窩裂溝部を視診にてう窩の有無、色調（着色、白濁）について診査を行い、続いてシャープな歯科用探針にてスティッキー感の有無を判定した。続いて歯面の乾燥前、乾燥後、清掃・乾燥後のDIAGNOdentの測定値について比較検討を行った。

【結果・考察】 DIAGNOdent値の乾燥前／乾燥後において有意な差が認められた。また、DIAGNOdent値のcut-off point: 20におけるスティッキー感の有無との対応を検討したところ、kappa値=0.49で中等度の一致率であった。また陽性反応適中率(p. p. v.): 60%、陰性反応適中率(n. p. v.): 87%でn. p. v. が高く、レーザーう蝕診断はスティッキー感の無い歯の検出に有効であることが示唆された。現在、学童を対象として要観察歯に対する視診・触診・レーザーう蝕診断の追跡調査を行い、その結果を分析中である。また、マイクロCT検査結果と病理組織診断の比較を行い、マイクロCTがゴールドスタンダードとして利用できるか検討中である。

5  
5-1-43

### 口腔内環境と嚥下性肺炎の病態変化機構の解明 —高齢者における口腔内環境の研究—

○久山佳代<sup>1,7</sup>, 山本浩嗣<sup>1,7</sup>, 妻鹿純一<sup>2,7</sup>, 落合智子<sup>3,7</sup>, 遠藤弘康<sup>4,7</sup>, 後藤田宏也<sup>5,7</sup>,  
田口千恵子<sup>5</sup>, 有川量崇<sup>5,7</sup>, 泉福英信<sup>6</sup>, 小林清吾<sup>5,7</sup>

日本大学松戸歯学部病理学<sup>1</sup>, 障害者歯科学<sup>2</sup>, 細菌学<sup>3</sup>, 歯周病学<sup>4</sup>, 衛生学<sup>5</sup>, 国立感染症研究所細菌部<sup>6</sup>,  
口腔科学研究所<sup>7</sup>

【目的】嚥下性肺炎は、無菌顎者に比べ有菌顎者で多いとの報告から、口腔内環境が本疾患の発症の一つの誘因になっていると考えられている。それ故口腔内環境に影響を与える因子である口腔微生物に起因する日和見感染症の予防対策が急務である。特にカンジダは嚥下性肺炎の原因菌である嫌気性菌と共凝集しやすいため、その病原性を発揮する環境についての研究が必要である。また口腔内環境および病態に深く関わっている唾液の評価も併せて行うことが重要と考えられる。本研究では高齢者の口腔剥離細胞診標本にみられたカンジダ属の形態計量学的検索、培養同定検査および唾液中EGF濃度の測定を行い、若干の興味ある知見を得たので報告する。

【方法】臨床症状を随伴し、さらに剥離細胞診にて口腔カンジダ症と診断された高齢者(65歳以上,平均71.5歳)70症例のカンジダ属について、臨床病理学および画像解析プログラム(Mac SCOPE ver. 2.55)にて計量学的観察を施した。対照として陰カンジダ症20症例とした。さらにインフォームドコンセントを行った要介護高齢者17名(平均81.1歳)および健康成人20名に対し、舌擦過物の培養同定検査および安静時の唾液採取を行い、ELISA法にて上皮細胞増殖因子(EGF)の定量を行った。

【結果・考察】口腔カンジダ症と診断された高齢者70名の内訳は、部位が舌27名、歯肉15名、頬粘膜13名、口蓋11名、口唇4名であり、主訴が白斑、剥離びらん、刺激痛、発赤および舌乳頭の萎縮の順であった。口腔粘膜で検出されたカンジダ属は、酵母細胞、分芽胞子、仮性菌糸および菌糸のすべての形態がみられる二形性真菌であり、また口腔のカンジダ菌糸は、陰のそれと比較して長さ1.6倍、幅2.2倍と大きく、隔壁が不明瞭であった。その形態変換および成長を誘導する因子として口腔内温度、pH、炭素源および窒素源が関係するものと考えられた。さらに要介護高齢者の舌擦過物培養同定検査の結果、健康成人の5%(*Candida albicans*)、要介護高齢者全員(*Candida albicans*88%, *Candida tropicalis*12%)にコロニー形成が観察された。*Candida tropicalis*は、抗真菌剤に耐性を有するため特に高齢者の口腔内で増殖している菌種であることが報告されており、本調査でもそれを示唆する結果が得られた。唾液腺は種々の増殖因子を合成・分泌することによって口腔環境の維持に関与している。要介護高齢者平均EGF濃度は健康成人のそれと比較して有意に低く、本結果から高齢者における唾液中の細胞分化増殖促進能力の低下が推察された。

5  
5-1-44

### 唾液および唾液腺機能の再構築 —耳下腺分泌顆粒における水チャネルの役割—

○杉谷博士<sup>1,3</sup>, 松木美和子<sup>1,2</sup>, 橋本貞充<sup>2</sup>, 吉垣純子<sup>1,3</sup>, 古山俊介<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部生理学<sup>1</sup>, 東京歯科大学病理学講座<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】アキアポリン(AQP)は多くの上皮性組織の形質膜に存在する水分子の透過を促進するチャネルタンパク質である。AQP5は唾液腺腺房細胞の腺腔側膜に局在する水銀感受性水チャネルである。今回、分泌顆粒膜における水輸送機能を明らかにする目的で、ラット耳下腺の分泌顆粒膜におけるAQP5の存在と機能について検討した。

【方法】分泌顆粒はラット耳下腺よりパーコールを使用して精製した。分泌顆粒の溶解は吸光度540 nmにて測定した。分泌顆粒膜上での局在はイムノプロット、免疫蛍光染色および免疫電顕により行った。

【結果・考察】精製した分泌顆粒膜に抗AQP5抗体と免疫反応を示すバンドが認められた。凍結超薄切片および分離精製した分泌顆粒において、分泌顆粒膜におけるAQP5の局在が免疫電顕で観察された。AQP5の選択的阻害剤として知られる第二塩化水銀は濃度依存的に分泌顆粒の溶解を促進した。この水銀の効果は、メルカプトエタノールの存在下ではほぼ完全に抑制された。抗AQP5抗体によるAQP5機能の抑制は分泌顆粒の溶解を促進した。分泌顆粒の懸濁液からCl<sup>-</sup>イオンを除くと、水銀および抗AQP5抗体による分泌顆粒の溶解は抑制された。以上のことから、ラット耳下腺分泌顆粒膜にはAQP5が局在し、顆粒膜における水輸送の調節に関与することが考えられる。

ヒト顎口腔機能の感覚と運動に関する中枢制御  
一随意性下顎運動の発現にかかわる大脳皮質一次運動野の活動性に関する脳磁場解析一

○成田紀之<sup>1,3</sup>, 遠藤博史<sup>2</sup>, 松本敏彦<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部第Ⅲ補綴学<sup>1</sup>, 産業技術総合研究所 脳神経科学研究部門 感覚認知科学研究グループ<sup>2</sup>,  
口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】 これまでにヒトの顎運動中枢性制御に関する機能的MR画像 (f-MRI) 研究において, 下顎のtapping, clenchingのいずれもが一次感覚運動野, 小脳, 補足運動野, 頭頂弁蓋部の領域に有意な活動性を示し, tappingではさらに前頭弁蓋部が有意に活動することを報告してきた。今回は, 随意性下顎運動の発現にかかわる皮質制御に関する脳磁場解析として, 下顎運動様式と一次運動野の活動性とのかかわりについて検討を行った。

【方法】 被験者はシールド室内の磁界計測専用の椅子に座り, 約5秒に一回のペースで開口, 閉口, 下顎左/右側方運動を, それぞれを100回試行した。また, 対照運動として片側の手指運動を用いた。脳磁界計測は, カナダCTF社製64チャンネル全頭型計測システムを用い, サンプリング250 Hzにて行った。計測データは-800 ms~-500 ms, -500 ms~-300 ms, -300 ms~-200 ms, -200 ms~-100 ms, -100 ms~-40 ms, -40 ms~0 msの6区間を分析対象とし, それぞれにおける皮質活動性の側差 (laterality) の有無ならびに皮質活動性の増加率を検討した。検定法にはOne Way ANOVAあるいはpaired t-testを用い, p < 0.05をもって有意な差異とした。

【結果・考察】 いずれの下顎運動においても, 皮質活動性は一次運動野に推定された。また, その位置は手指運動において示された活動推定部位より外側に位置した。6区間のいずれにも, 開口, 閉口, 下顎左/右側方運動の発現にかかわる一次運動野の活動性に側差は示されなかった。一方, 片側の手指運動においては, 運動開始前 200 ms から対側優位な活動性, lateralityを示した。一次運動野の活動性は, その増加率において, 側方運動が閉口運動に比べて有意に大きい値を示した。また, 開口運動は側方運動と閉口運動との中間的値を示した。

以上のことから, 下顎運動に伴う両側一次運動野の活動性は下顎の両側性運動協調に対応した皮質制御と理解される。また, 一次運動野活動性の増加率には, 下顎運動の方向性と下顎運動にかかわる顎筋の数, あるいは咬合による運動終止の有無が影響すると考えられる。

デジタル画像による口腔領域再構築の評価

○金田 隆<sup>1,5</sup>, 葛西一貴<sup>2,5</sup>, 妻鹿純一<sup>3,5</sup>, 宇都宮忠彦<sup>4,5</sup>, 山本浩嗣<sup>4,5</sup>

日本大学松戸歯学部放射線学<sup>1</sup>, 矯正学<sup>2</sup>, 障害者歯科学<sup>3</sup>, 病理学<sup>4</sup>, 口腔科学研究所<sup>5</sup>

【目的】 近年, 医用画像はコンピュータの発達により, フィルムを用いた従来のアナログ方式からデジタル画像に変貌を遂げつつある。CT, MRIのみならず単純エックス線写真までデジタル画像に変換され, 日常臨床にてフィルムレスの時代になりつつある。しかしながらデジタル画像による口腔領域再構築の応用はいまだ十分に検討されておらず, 臨床応用も十分な検討がなされていない。本検討の目的はCT, MRIのみならず単純エックス線写真を用いて顎口腔領域の 1) 正常デジタル画像の検討, 2) 矯正や顎変形等の診断や治療前後のデジタル画像評価, および疾患として顎骨骨髓炎の画像評価を検討した。

【方法】 顎口腔領域のデジタル画像の正常像の評価, エックス線撮影およびMRI撮像条件を検討するために, ファントム実験を試行した。

- 1) MRIにおいてはファントム実験を用いてSpin echo法およびSTIR法によるTR, TE, IRを変化させ最適な顎骨のMRIの撮像条件を検討した。
- 2) Computed Radiographyにおいてはマルチ周波数処理をおこない, 視覚的評価を施行し, 矯正のセファログラム, パノラマエックス線写真の最適な強調周波数を検討した。

【結果・考察】 1) STIR法にて顎口腔領域の脂肪を抑制する条件は1500-3000/30/100msec (TR/TE/TI) であった。またSTIR法にて正常下顎骨骨髓は162症例にてすべて低信号(100%)を呈し, 下顎皮質骨はすべて無信号(100%)を呈した。下顎骨骨髓炎にて病変部は中信号(4%), 中~高信号(21%), 高信号(75%)を呈した。STIR法は軽度の骨髓の炎症も検出できる有効な撮像法と示唆された。2) Computed Radiographyのマルチ周波数処理においては各項目の評価は中周波数がやや優れるが, 軟組織を含めた総合評価は高周波数が優れていた。またセファログラムおよびパノラマエックス線画像においてすべての評価項目において従来のアナログ処理よりも良好な評価がえられた。マルチ周波数処理によるデジタル画像は口腔領域再構築の評価に有効な画像検査法と示唆された。

5  
5-2-47

口腔常在菌有用物質産生系を応用した口腔機能の促進  
—Resident Plasmid Integration法によるStreptococcus gordonii 形質転換用新規  
プラスミドの構築—

○城座映明<sup>1,3</sup>、桑原紀子<sup>2,3</sup>、安孫子宜光<sup>1,3</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>、細菌学<sup>2</sup>、口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】Streptococcus gordoniiは形質転換可能な口腔内グラム陽性細菌であり、様々なタンパク質を分泌する能力を有する。演者等は先にS. gordoniiを効率良く形質転換する新たな方法としてResident Plasmid Integration法を開発した。本方法は宿主の持つ形質転換能を利用し、目的遺伝子をリガーゼ反応することなく宿主に導入するものである。ベースとなるプラスミドとしてはpVA380-1を使用しているが、宿主中でのコピー数が低いという欠点があった。一方、広宿主領域プラスミドpMV158の誘導体であるpLS5はS. gordoniiを形質転換し、しかもそのコピー数はpVA380-1より高いことを見いだしている。そこで、pLS5をベースとしたResident Plasmid Integration用のプラスミドの構築を試みた。

【方法】pAS30は、pLS5に由来する複製領域を有するシャトルプラスミドである。本プラスミドを制限酵素Sau3AIにより消化し、約1.5kbの複製領域を電気泳動により得た。本断片の両末端を、数段のステップを経てAscIサイトに変更した後、Integration Plasmidの1つであるpMD10Eのカナマイシン耐性遺伝子と交換することによりpLS5の複製領域を有する新たなResident Plasmid、pLS35Eを構築した。

【結果・考察】pLS35EによりS. gordoniiの形質転換を試みたところ、効率良く形質転換体がえられた。予想されたように、pVA380-1をベースとするものよりもそのコピー数が高かったことより、本プラスミドをResident Plasmidとして使用することにより、口腔内常在菌による目的物質の高発現が期待される。

5  
5-2-48

唾液腺への遺伝子導入による口腔機能の促進  
—歯周病原菌抗原タンパク質遺伝子の導入と発現—

○早川光央<sup>1,3</sup>、安孫子宜光<sup>1,3</sup>、平塚浩一<sup>1,3</sup>、神野良一<sup>2,3</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>、口腔外科学<sup>2</sup>、口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】高齢化に伴って、口腔組織の創傷治癒や口腔感染症が増大するといわれている。唾液には、細胞増殖因子や殺菌作用物質などが含まれ多彩な機能を果たしている。すでにGene Chip解析法により高齢マウスで、発現が低下する6500遺伝子を探索し、遺伝子導入に有用な標的を探索してきた。本研究ではGene Chip6500遺伝子と重複しない遺伝子を多数含む8,300遺伝子のDNAマイクロアレイを用いてさらに、マウス顎下腺の老化で発現変化する遺伝子をモニターした。また、口腔組織への遺伝子導入を応用した、口腔感染症への予防法の開発を目的として、安全なDNAワクチン開発を目指して、歯周病原菌であるPorphyromonas gingivalisの共凝集因子である外膜タンパク質(40-kDa OMP)遺伝子のマウスへのDNAワクチンモデルの有効性について検討した。

【方法】SAM-P1マウス、1ヶ月および12ヶ月齢の顎下腺を摘出し、細切後、直ちにTrizol溶液を添加し、Fast Prep (FP120;BI0101, Vista)システムを用いて組織を破壊して総RNA画分を回収した。mRNAを精製後、Cy3で若齢顎下腺サンプル、Cy5で高齢顎下腺サンプルをそれぞれ蛍光標識cDNAを合成した。ついで両蛍光標識cDNAを混合し、8,300種類のマウス遺伝子cDNAプローブを固定化したマイクロアレイ(UniGEM V Microarray GEM Mouse, Incyte Genomics)とハイブリダイズさせ、各遺伝子の蛍光強度データからmRNAレベル比を解析した。蛍光強度の標準化は、グローバルノーマライゼーション手法をもとにした。一方、DNAワクチン研究では、40-kDa OMP遺伝子をテンプレートとしてシグナルペプチドを除いた全遺伝子部分を増幅し、かつ、5'末端側にATGコドン添付し、3'末端側にはstop codonを含む領域を付加して設計した。このPCR産物を哺乳動物細胞内で遺伝子発現可能なプラスミドpcDNA3.1(+); 5.4 kb, のヒトサイトメガロウイルスのプロモーターの下流域に挿入した。40-kDa OMPに対する抗体を用いてリコンビナント大腸菌のウエスタンブロッティングを行い、40-kDa OMPの産生を確認した。そして構築プラスミドをマウス左側大腿四頭筋に注射し、経時的に眼窩静脈叢より採血を行い、抗体価を測定し、あわせてP. gingivalisの共凝集活性の抑制度を調べた。

【結果・考察】マイクロアレイUniGEM Vに含まれ顎下腺中で発現している12成長因子の加齢による遺伝子発現変化では、TGF- $\beta$  遺伝子で2.1倍、インスリン様成長因子1 (IGF-I) 遺伝子で約2倍の低下がみられた。ついでIGFの関連遺伝子(IGF-II, IGF受容体、IGF結合タンパク質遺伝子群、計11遺伝子)についてデータ解析した結果、変動しているのはIGF-Iのみであった。唾液腺組織を含む口腔組織への遺伝子導入による生理機能の回復あるいは改善をIGF-I遺伝子で試みることは意義あるものと考えられる。DNAワクチン研究では、DNAワクチン接種マウス血清で処理したP. gingivalis vesiclesでは、S. gordoniiとの凝集が著明に抑制された。これに対しコントロールプラスミド接種マウス抗血清を作用させた場合、共凝集の阻害は認められなかった。以上のことから40-kDa OMP DNAワクチンは、P. gingivalis vesiclesとS. gordoniiの凝集活性を阻害する歯周病のDNAワクチン療法として有用であることが示唆された。

5  
5-3-49

Bioavailabilityを考慮したフッ化物測定法の開発  
— 独自に開発した換気式微量拡散法によるフッ化物定量法の検討 —

○小林清吾<sup>1,2</sup>, 田口千恵子<sup>1</sup>, 有川量崇<sup>1,2</sup>, 後藤田宏也<sup>1,2</sup>, 水野恭子<sup>1</sup>

日本大学松戸歯学部衛生学<sup>1</sup>, 口腔科学研究所<sup>2</sup>

【目的】 フッ素の存在は結合型もあるが、生体に吸収される代謝の主役と考えられる遊離されたフッ化物(以下、F<sup>-</sup>)に注目した。食品由来のF<sup>-</sup>摂取量を把握し、またフッ化物代謝の研究をするため、食品や生体試料中に含有されるF<sup>-</sup>の定量法について種々の方法が開発されてきた。しかし、わが国における食品中F<sup>-</sup>濃度は報告者により差が見られ、また、食品の性状により生体利用能に差があるとされながら、食品由来F<sup>-</sup>の意義については定量的な評価に至っていない現状にある。そこで我々は、食品の様々な性状に対応でき、また、低濃度でもF<sup>-</sup>を安定して測定でき、さらに拡散速度を把握できる方法の開発に取り組んだ。

【方法】 拡散装置は、拡散液槽、反応槽、捕集槽で構成し、各槽には、市販のシリジ<sup>®</sup>を用いた。拡散液には、HMDS飽和5.0M HClO<sub>4</sub>溶液、捕集液には0.1M NaOHを用いた。試料を入れた反応槽に拡散液を注入し、反応槽側に栓をした後、拡散液槽を除去する。反応槽と捕集槽を接続し、一定の気体を反応槽に引き込んだ状態で、恒温水槽に浸漬する。一定時間(3分、5分または10分)後、反応槽を攪拌し、反応槽内の気体と反応ガスを捕集槽に引き込み、捕集液と気体を攪拌する。その後、捕集槽内の気体を反応槽に引き込む。この換気を2、3回繰り返す。拡散終了後、捕集液をF<sup>-</sup>電極にて測定した。この方法により、標準液のF<sup>-</sup>濃度回収試験、牛乳中のF<sup>-</sup>濃度測定、F<sup>-</sup>添加回収試験、牛乳のF<sup>-</sup>濃度と拡散速度を測定した。各実験の試料数を5とした。

【結果・考察】 標準液(10ppmF<sup>-</sup>×1ml)回収試験において回収率97.1%(SD=2.3%), CV値2.4%であった。牛乳中のF<sup>-</sup>濃度は0.019ppm, CV値1.7%, また、牛乳+標準液(0.02ppmF<sup>-</sup>×5ml)の回収試験では回収率113.5%(SD=1.3%), CV値1.2%であった。牛乳(10ml)を3時間拡散して捕集した平均のF<sup>-</sup>濃度は0.021ppmであった。この全体のF<sup>-</sup>量に対して、各1時間毎で捕集されたF<sup>-</sup>量の割合を算出すると、1時間で91.0%(SD=3.7%), 2時間で6.3%(SD=2.9%), 3時間で2.7%(SD=2.1%)であった。以上の結果より、試料F<sup>-</sup>濃度を2.5倍~10倍にして測定できた。さらに、任意の時間間隔で捕集槽を交換することで、時間毎にF<sup>-</sup>拡散率を測定でき、食品由来F<sup>-</sup>の生体利用能を具体的に検討できる可能性が見出された。今後、装置を自動機械化し、さらなる測定精度(特異性、濃度範囲、再現性)の検討を行う。

5  
5-3-50

粘膜免疫を応用したう蝕と歯周病ワクチン開発  
— *P. gingivalis*の40-kDa表層タンパク抗原を用いた歯周病予防のための経鼻ワクチンの開発 —

○浪越 順<sup>1</sup>, 山本正文<sup>2,4</sup>, 前場智実<sup>1</sup>, 早川光央<sup>3,4</sup>, 安孫子直光<sup>3,4</sup>, 大竹繁雄<sup>1,4</sup>

日本大学松戸歯学部総合歯科診療学<sup>1</sup>, 総合口腔医学<sup>2</sup>, 生化学<sup>3</sup>, 口腔科学研究所<sup>4</sup>

【目的】 *P. gingivalis*は歯周病の主要な病原性細菌であり、*P. gingivalis*に対する抗体応答を唾液および歯肉溝滲出液中に誘導することは歯周病予防に効果的であることが示唆される。本研究では*P. gingivalis*の共凝集活性因子である分子量40-kDaの表層タンパク抗原(40-k-OMP)を経鼻免疫することにより、唾液および歯肉溝滲出液に漏出する血清40-k-OMP特異的抗体応答の誘導を試みた。

【方法】 BALB/Cマウスに40-k-OMPを単独あるいは粘膜アジュバントとしてのコレラ毒素(CT)とともに週1回、計3回経鼻投与した。最終免疫の1週間後に唾液および鼻腔洗浄液中の40-k-OMP特異的IgA抗体価、血清中の40-k-OMP特異的IgM、IgG、IgA抗体価をELISA法にて測定した。さらに、唾液腺、鼻腔粘膜組織、脾臓よりリンパ球を分離し、40-k-OMP特異的IgG、IgA抗体産生細胞数をELISPOT法により検出した。次に抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞応答を測定するために、経鼻免疫したマウスの頸部リンパ節および脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、非免疫マウスの脾臓より分離したフィーダー細胞存在下で40-k-OMPで再刺激した。再刺激後、<sup>3</sup>H-チミジン取り込みによる細胞増殖活性、ELISA法により培養上清中のTh1(IFN- $\gamma$ )およびTh2(IL-4)の産生を測定した。

【結果・考察】 40-k-OMPをCTとともに経鼻免疫することにより、唾液および鼻腔洗浄液中に顕著な40-k-OMP特異的IgA抗体価が検出された。さらに、血清中にも40-k-OMP特異的IgM、IgG、IgA抗体価が検出された。IgGサブクラス応答はIgG1が優位であった。また、抗体産生細胞数を測定した結果、唾液腺、鼻腔粘膜組織に多数の40-k-OMP特異的IgA産生細胞、脾臓にIgM、IgGおよびIgA産生細胞が検出された。一方、40-k-OMPを単独で経鼻免疫したグループでは全身免疫系領域、粘膜免疫系領域の両方で抗原特異的免疫応答はほとんど検出されなかった。以上の結果より、40-k-OMPの経鼻免疫は唾液と歯肉溝滲出液の両方に40-k-OMP特異的抗体応答を効果的に誘導することが示唆された。また、40-k-OMPの経鼻免疫においては粘膜アジュバントの使用が必要不可欠であった。次に抗原特異的CD4<sup>+</sup>T細胞応答を解析するために、40-k-OMPをCTとともに経鼻免疫したマウスの頸部リンパ節および脾臓よりCD4<sup>+</sup>T細胞を分離し、40-k-OMPで再刺激した。その結果、顕著な細胞増殖活性が認められた。また、培養上清のTh1およびTh2サイトカイン産生パターンを解析すると、Th2型サイトカインであるIL-4の産生が顕著に認められた。一方、Th1型サイトカインであるIFN- $\gamma$ はほとんど検出されなかった。以上の結果より、40-k-OMPとCTによる経鼻免疫によりTh2型サイトカイン反応が誘導され、唾液中にIgA抗体、血清中にIgG1を中心とした抗体応答が誘導されることが示された。

安全な受動免疫抗体の開発による口腔感染症の抑制  
 - *Porphyromonas gingivalis* 赤血球凝集活性を中和するヒト型抗体の作製 -

安孫子宜光<sup>1,3</sup>, 早川道央<sup>1,3</sup>, 柴田恭子<sup>1,3</sup>, 久保田 守<sup>2</sup>

日本大学松戸歯学部生化学<sup>1</sup>, 日本たばこ産業株式会社<sup>2</sup>, 口腔科学研究所<sup>3</sup>

【目的】 受動免疫は血清や精製抗体を利用して中和する方法で口腔への投与は安全性が高いとされている。歯周病の重要な原因菌である *Porphyromonas gingivalis* に対する受動免疫療法のターゲットとして共凝集因子である40-kDa 外膜タンパク質、130-kDa 赤血球凝集因子、200-kDa膜関連タンパク質遺伝子をクローニングし、その病原因子のエピトープ部位、機能部位を特定することを目指した。また、これら病原因子活性を中和できる安全な受動免疫抗体として組換え単鎖Fv抗体の開発を行ってきたが、さらに、ヒトB細胞を不死化できる Epstein-Barr Virus (EBV) 感染法を応用して *P. gingivalis* の赤血球凝集因子活性を中和できる安全な受動免疫療法用抗体として、ヒト型抗体の作成を試みた。

【方法】 130-kDa赤血球凝集因子に対する血清抗体価の高いドナーからリンパ球を採取し、Epstein-Barrウイルスを感染して組換え130-kDa赤血球凝集因子でパンニングし、ヒト型抗体 (HuMab-HMGD1) 産生B細胞を選択した。一方、40-kDa 外膜タンパク質遺伝子の解析結果から、DNA/Proteinデータベースを利用して遺伝子産物を特定を試みた。また、共凝集を抑制するモノクローナル抗体を用いた phage display epitope mapping法を用いてエピトープ部位を特定した。さらに合成ペプチドを化学合成し、共凝集に対する影響を調べた。組換え200-kDa膜関連タンパク質に対しては、リシルエンドペプチダーゼで消化後、逆相HPLCで分離し、最小ペプチドのアミノ酸配列を解明し、DNA/Proteinデータベースを利用して遺伝子産物を特定した。また、組換え200-kDa膜関連タンパク質のサブクローンの作成を行った。

【結果・考察】 EBV法で得られたヒト型抗体HuMab-HMGD1は、濃度依存的に *P. gingivalis* vesicleの赤血球凝集活性を阻害し、Western blot分析で、組換え130-kDa赤血球凝集因子および *P. gingivalis* vesicle、菌体の43, 49 kDaタンパクバンドを認識した。また、130-kDa赤血球凝集因子の機能ドメイン合成ペプチドも認識した。40-kDa 外膜タンパク質遺伝子の解析の結果、本遺伝子がヘミン結合タンパク質である可能性が示唆され、実際に組換えタンパク質がヘミンを結合することを、ゲル電気泳動法、ピアコア解析で明らかになった。40-kDa 外膜タンパク質の phage display epitope mapping法および合成ペプチドを用いた competition assayにより、共凝集を抑制するモノクローナル抗体のエピトープ部位を特定した。200-kDa膜関連タンパク質の最小ペプチドのアミノ酸配列のProteinデータベース検索によって、*P. gingivalis* のHagAに関連する遺伝子であることが判明した。HagAは赤血球凝集因子の一つであることが報告されていることから、組換え200-kDa膜関連タンパク質に対する抗血清が *P. gingivalis* の赤血球凝集活性を阻害するか検索したところ実際に阻害することが判明した。200-kDa膜関連タンパク質遺伝子にクローンの組換えタンパク質の産生量は低いのでサブクローンの作成を試み、組換えタンパク質の量産が期待できるクローンを得ることに成功した。これらの結果から、さらに標的を明確にした有効な免疫療法の開発が期待できる。