

# **INTERNATIONAL SYMPOSIUM**

## **Reconstruction of Oral Function by Advanced Dental Material and Technology**

**Supported by a Grant from the Ministry of  
Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan  
to Promote Multi-disciplinary Research Projects**

**November 6, 2004  
at Matsudo Citizens' Theater**

# Opening of Internatinal Symposium

---

Shigeo Otake

Dean and Professor  
Nihon University School of Dentistry at Matsudo

We are now in the 4th year of our research project titled "Reconstruction of Oral Function using Advanced Dental Materials and Technology," which is being supported by the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to promote Multi-disciplinary Research Projects by private universities. The purpose of the scientific projects is to improve and reach a high standard in research results through collaboration within institutions and with other graduate schools and/or research institutes, including those in foreign countries. This grant is given in particular for the support of private universities and encourages the further promotion of scientific technology in Japan. Our Research Institute of Oral Science at Nihon University School of Dentistry at Matsudo applied for this scientific grant from the Japanese government and was chosen in April 2001. In September 2003, we reported our research progress and result in a mid-term evaluation, and submitted the official reports to the Japanese government agency. Fortunately, in April of this year, we received the highest score of "AA" from that evaluation.

Based on our very successful research results, we held a citizen extension lecture on May 15th of this year on the theme of "Do you know? Advanced Dentistry Medical Treatment," as a means to introduce to the general public.

Now, as we face the 4th year of this scientific project, we are holding this International Symposium to encourage additional joint research collaboration. We have invited researchers from inside and outside of Japan who are playing an active part leading each research project and expect to discuss future joint research projects at this symposium.

On behalf of all our research project members, I would like to sincerely express my thanks to my colleagues who have associated with us on these research projects as well as to the Japanese government for their support.

# INTERNATIONAL SYMPOSIUM

## Reconstruction of Oral Function by Advanced Dental Material and Technology

Supported by a Grant from the Ministry of  
Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan  
to Promote Multi-disciplinary Research Projects

14 : 00~14 : 10    Opening Address

**Shigeo Otake**  
Dean and Professor  
Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Plenary Lecture    Chairperson : Y. Abiko, Y. Ogata

14 : 10~15 : 10    “Design and Examination of a Stability-Detecting Device  
for Dental Implants Using Resonance Frequency Method”  
**Sheng-Yang Lee** ..... 4  
Graduate Institute of Oral Rehabilitation Sciences, Taipei Medical University

15 : 10~16 : 10    “Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells”  
**Hidemi Kurihara** ..... 6  
Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science<sup>1</sup> and  
Department of Dental and Medical Biochemistry, Hiroshima University

16 : 10~16 : 20    Intermission

16 : 20~17 : 20    “The Role of Bone Sialoproteins in the Formation, Remodelling and  
Reconstruction of Alveolar Bone.”  
**Jaro Sodek**..... 8  
CIHR Group in Matrix Dynamics, Faculty of Dentistry and the Department of  
Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Toronto

General Lecture    Chairperson : S. Kobayashi

17 : 20~17 : 50    “Development of Novel Adjuvants for Mucosal vaccines”  
**Masafumi Yamamoto** ..... 10  
Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

17 : 50~18 : 20    “Approach to causative genes of oral disease and anomalies”  
**Takahide Maeda** ..... 12  
Department of Pediatric Dentistry , Nihon University School of Dentistry at Matsudo

18 : 20~            Closing Address

# Design and examination of a stability-detecting device for dental implants using resonance frequency method

Sheng-Yang Lee<sup>1</sup>, Wei-Jen Chang<sup>1,2</sup>, Haw-Ming Hwang<sup>1</sup>, Yoshimitsu Abiko<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduate Institute Of Oral Rehabilitation Sciences, Taipei medical University, Taipei, Taiwan

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



Although development and research regarding root from dental implants have advanced to the mature stage, there are not many devices or methods available at present for the accurate detection of implant stability after placement. The use of resonance frequency (RF) values for detecting the degree of bone healing with orthopedic treatment has been studied by many scholars. However, due to problems with the soft tissue covering, the clinical use of such techniques is still unavailable. Recently, there have been several dental research reports concerning this topic. Their results showed that the principle of RF can be used to monitor the process of osseointegration after dental implant emplacement. In 2000, a commercially available RF detecting device (OSSTELL, Integration Diagnostics, Göteborgsvägen, Sweden) was introduced for dental implant status monitoring. The basic principle adopted by Ostell is the harmonic response method. For clinical application, a connector is attached to the free end of the fixed implant. The connector is triggered to vibrate by means of sinusoidal waves. The RF value obtained is used to analyze implant stability.

The impulse force triggering method is another type of RF analysis. After a series of both in vivo and in vitro experiments, the impulse force method was proven to be useful in detecting dental implant stability. In our lab, the capability of an experimental RF detecting device to monitor

dental implant stability was tested using the concept of the impulse force method. This device was designed to be compact and easily installed and disassembled, with the trigger and signal-collecting components contained within the device. To validate the experimental device for determining implant stability, a series of in vivo tests was performed.

The device uses a miniature-sized electromagnetic triggering rod to trigger dental implant into vibration. Vibrational signals were collected via an acoustic receiver. Implants were placed in the left tibias of twelve rabbits using a general surgical procedure. Standard 3.2 x 8 mm implants were placed in test tibia with pre-tapping cavities of 3.2 mm (Group I) and 3.7 mm (Group II) diameters for simulating well-fitted and loosely fitted conditions, respectively. The RF values of the test implants were detected by the newly developed device which was directly mounted on the healing abutments of the implants.

All rabbits in group I remained in excellent health throughout the course of the experiment. However, no group II rabbits were tested throughout the experiment. However, our results showed no statistic difference when compared to the initial values in Group I. All of the final RF values of these rabbits increased significantly ( $p < 0.05$ ) when compared to their initial values. The average healing period of the six animals in group I was 6.2570.39 weeks. Meanwhile, we

found a linear relationship existed between the initial RF value of the test implants and the corresponding time needed for healing ( $y = -1583.9x + 12260$ ,  $R^2 = 0.6587$ ,  $p < 0.05$ ).

Based on these findings, we concluded that the idea of using the current designed device for detecting the degree of bone healing during the osseointegration process seems feasible.

---

1985 Doctor of Dental Surgery (D.D.S.), School of Dentistry, Taipei Medical College, Taipei, Taiwan

1992 M.S. Biomaterials, Northwestern University

1994 Ph.D Biomaterials, Northwestern University

Professor and Dean, School of Dentistry and Graduate Institute of Oral Rehabilitation Sciences, Taipei Medical University

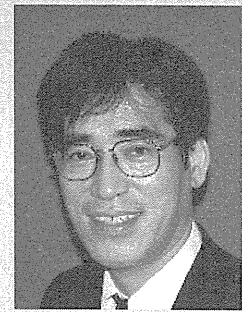
President, Taiwan Association for Dental Research (TADR)

Executive Councilor, Association for Dental Sciences of the Republic of China, and Chairman for Dental Material and Instruments Committee

## Periodontal Tissue Regeneration with Mesenchymal Stem Cells

Hidemi Kurihara<sup>1</sup>, Hiroyuki Kawaguchi<sup>1</sup>, Hideaki Hayashi<sup>1</sup>,  
Akio Hirachi<sup>1</sup>, Naohiko Hasegawa<sup>1</sup>, Kouichiro Tsuji<sup>3</sup>, Yukio Kato<sup>2,3</sup>

Department of Periodontal Medicine, Division of Frontier Medical Science<sup>1</sup> and  
Department of Dental and Medical Biochemistry, Division of Molecular Medical Science<sup>2</sup>;  
Hiroshima University, Graduate School of Biomedical Science and Two Cells, Co. Ltd.<sup>3</sup>



“Cells”, “Signaling molecule” and “Scaffold” are key factors for tissue regeneration. Periodontal tissue regeneration with “new attachment” has been firstly achieved with “Guided Tissue Regeneration (GTR)” method. Recently, many signaling molecules such as basic fibroblast growth factor, transforming growth factor, platelet-derived growth factor, were introduced as candidate for the medicine of periodontal tissue regeneration. However, these methods, GTR and topical application of signaling molecule, are depends on the cells that have potential for periodontal tissue regeneration in local periodontal region, it is very difficult to induce adequate cells into the lesion to reach the complete regeneration.

“Cells” might be the most important key for tissue regeneration. Mesenchymal stem cells have a potential for multilineage differentiations. Since mesenchymal stem cells obtained from bone marrow can differentiate to various cells, osteoblasts, chondrocytes, tenocytes, adipocytes, muscle cells or nerve cells, bone marrow mesenchymal stem cells (MSC) might be useful for periodontal tissue regeneration. Because periodontal tissue is mainly composed with three different tissues, cementum, periodontal ligament and alveolar bone. Although there are not many enough numbers of MSC for auto-transplantation in adult bone marrow, we recently succeeded to develop new culture system to expand MSC number with remaining a potential for multilineage

differentiations. MSC isolated from bone marrow of beagle dogs and humans and cultured with our system can be differentiated into osteoblasts, chondrocytes, adipocytes and neuron like cells.

For the basic animal studies, MSC was isolated from beagle dogs and expanded in vitro. The expanded MSC was stored in liquid nitrogen until use. The MSC was re-cultured to obtain enough cell number for transplantation and mixed with 2% atelocollagen gel in various concentration ( $2 \times 10^6$  to  $2 \times 10^7$  cells/ml) and auto-transplanted to experimental class III furcation defects. At one month after the implantation, the defects were almost completely regenerated with alveolar bone, periodontal ligament and cementum in histological analyses with hematoxylen-eosin staining ( $2 \times 10^7$  cells/ml) and the abundant collagen fibers from newly formed cementum were observed after Azan staining. For further evaluations, the green fluorescens protein (GFP) gene was transfected into the MSC and the MSC was implanted into the same defects. GFP positive cells were found in and on the newly formed cementum, in and surrounding the alveolar bone, and in the periodontal ligament. These findings are suggesting that the implanted MSC has been differentiated into cementblasts, osteoblasts, and periodontal ligament fibroblasts and regenerated the periodontal tissues. Therefore we concluded that the auto-transplantation of MSC was effective for periodontal tissue regeneration in dog.

Based on these animal studies, we have developed new systems for auto-transplantation of MSC for clinical research of periodontal regeneration. Patients aged 20 to 65 years old with class II furcation involvement or 2- to 3-wall bone defects were participated. The informed consent was obtained from the patients through the clinical research coordinator. The patients were screened under the clinical research criteria including viral infections. The clinical periodontal conditions were evaluated by probing (pocket depth, attachment level and probing on probing), standardized dental X-ray photo, dental computerized tomography and oral photos. The patient's MSC was isolated from bone marrow aspirates of mandible, maxilla or illium. The cells in bone marrow were cultured in DMEM supplemented with patient own serum to isolate MSC and the isolated MSC was further cultured in DMEM supplemented

with patient serum and fibroblasts growth factor-2. When enough number of MSC was obtained, the MSC was suspended into 2% atelocollagen gel to prepare the graft material. Bacterial and viral contaminations were monitored before the graft material preparation. Flap operation was performed to remove the inflamed granulation tissue, periodontal pocket epithelium completely. The complete debridement was performed on the infected root surface and the graft material with MSC was transplanted into the defect and the flaps were repositioned. We are following the clinical conditions after the MSC transplantation.

We need more clinical trials to conclude the effectiveness of MSC transplantation for periodontal tissue regeneration. When we will succeed to establish a new system for periodontal tissue regeneration with MSC transplantation, we could open the new era of periodontal treatment.

- 
- 1980 Doctor of Dental Surgery (D.D.S.), School of Dentistry, Hiroshima University  
1992 Ph. D. (Dentistry), School of Dentistry, Hiroshima University  
1994 Professor, School of Dentistry, Hiroshima University  
Department of Periodontal Medicine  
2004 Dean, School of Dentistry, Hiroshima University

## The Role of Bone Sialoproteins in the Formation, Remodelling and Reconstruction of Alveolar Bone.

Jaro Sodek

CIHR Group in Matrix Dynamics, Faculty of Dentistry and the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Toronto



Alveolar bone is a specialized tissue of the mandibular and maxillary jaws that provides the primary support for teeth and implanted oral prostheses. Rapid remodelling of alveolar bone is a characteristic that allows tooth movement during eruption, in response to functional demands and positional adaptation. Thus, the formation and remodelling of alveolar bone is both a prerequisite for normal tooth function and an important consideration in oral tissue reconstruction. Formation of alveolar bone involves recruitment and osteogenic differentiation of paravascular precursor cells, while remodelling of alveolar bone is mediated by osteoclasts derived from cells of the myeloid lineage. Two major sialoproteins in the alveolar bone matrix, bone sialoprotein (BSP) and osteopontin (OPN), have particularly important roles in bone formation and remodelling. While sharing similar physicochemical properties, BSP and OPN have distinctly different functions and expression patterns. During bone formation, OPN is produced in different forms at three stages of osteogenic differentiation. In undifferentiated cells, OPN is expressed in a low phosphorylated-form and also as an intracellular form, while highly-phosphorylated forms are produced by osteogenic precursor cells, which produce a connecting cement layer on existing bone or implant surfaces, and by osteoblasts after the onset of bone matrix mineralization. Intracellular and secreted forms of OPN

are also produced by osteoclasts and regulate their formation and resorptive activity. In contrast to OPN, which is expressed in a variety of tissues, BSP is expressed almost exclusively by osteoblasts at the onset of mineralization. However, BSP may also be involved in the regulation of osteoclast-mediated bone remodelling.

The diverse activities of OPN, which include important roles in cellular immunity, tumourigenesis and cancer metastasis, involve a number of highly conserved structural motifs. A polyaspartate sequence in co-operation with phosphorylated serines confers mineral-binding properties through which OPN regulates the formation and growth of mineral crystals during bone formation. In addition, there are several sites that recognize cell surface CD44 and integrin receptors that mediate a range of cellular activities, including chemotaxis, attachment and cell survival, which are important for osteogenesis and osteoclastic resorption. BSP is characterized by the presence of a collagen-binding region near the amino-terminus and several polyglutamate sequences, which in combination are believed to initiate hydroxyapatite crystal formation in bone and also in pathological mineralization. BSP also has an integrin-binding cell-attachment motif, which has the potential to modulate osteoblast and osteoclast activities.

Because OPN and BSP regulate critical aspects of bone formation and remodelling in alveolar



bone, there is considerable potential for regulating their activities using peptidomimetics and site-specific antibodies in procedures aimed at

the reconstruction of diseased and damaged periodontal tissues.

- 
- 1970 Ph.D. (Biochemistry) Tronto University
  - 1978 Associate Professor, Biochemistry, University of Tronto
  - 1983 Director, MRC Group in Periodontal Physiology, Faculty of Dentistry, University of Tronto
  - 2002 Professor, CIHR Group in Matrix Dynamics, Faculty of Dentistry, University of Tronto

# Development of Novel Adjuvants for Mucosal Vaccine

Masafumi Yamamoto

Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo



The mucosal surface areas including an oral cavity where most pathogens enter the host are protected by antibodies of the secretory IgA (S-IgA). This isotype constitutes more than 80 % of all antibodies produced in mucosal-associated tissues, and S-IgA antibodies are induced, transported, and regulated by a unique mechanism of mucosal intransit consisting of T helper (Th) 1/Th2 cells, IgA committed B cells and dendritic cells that is completely different from those involved in systemic antibody responses. To this end, mucosal vaccination becomes an attractive approach since it possesses a capability of maximally generating antigen-specific immune responses at both mucosal and systemic compartments of the host. To accomplish this goal, different forms of mucosal adjuvant, vector, and delivery system are being investigated for their ability to induce well-defined immune responses to protect individuals from mucosal pathogens.

Cholera toxin (CT) and heat-labile toxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* (LT) act as adjuvants for the enhancement of mucosal and serum antibody responses to the mucosally co-administered protein antigen. Our previous studies have shown that CT acts as an adjuvant by inducing IL-4-dependent Th2 cytokine responses, which provide help for antigen-specific S-IgA as well as serum IgG1, IgA and IgE antibody responses, while LT induces Th1- and partly IL-4-independent Th2-type cells with subsequent serum IgG1,

IgG2a and mucosal S-IgA responses. To address the roles played by the A or B subunits in their adjuvant activity, chimeras of CT-A/LT-B and LT-A/CT-B were constructed. Mice nasally immunized with CT-A/LT-B or LT-A/CT-B and ovalbumin (OVA) as antigen developed OVA-specific serum IgG antibody titers that were similar to those induced by either native CT or LT. Both CT-A/LT-B and LT-A/CT-B promoted mucosal S-IgA anti-OVA antibodies, which confirmed their retention of adjuvant activity. The CT-A/LT-B chimera, like LT, induced OVA-specific mucosal and peripheral Th1 and Th2-type responses with serum IgG1 and IgG2a antibodies. On the other hand, LT-A/CT-B, like CT, promoted systemic IgG1 and IgE antibodies and OVA-specific Th2 responses. The LT-A/CT-B chimera and CT, but not the CT-A/LT-B chimera or LT, suppressed IL-12R expression and IFN- $\gamma$  production by activated T cells. These results suggest that the B subunits regulate IL-12R expression and subsequent Th cell subset responses.

Although CT and LT are effective mucosal adjuvants, both enterotoxins cause severe diarrhea and are thus unsuitable for use in humans. Thus, we have constructed a novel nontoxic mucosal adjuvant that combines A subunit of mutant cholera toxin E112K and B subunits of heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli* (mCTA/LTB). The mCTA/LTB did not possess toxic properties. Nasal immuniza-

tion of mice with tetanus toxoid (TT) plus mCTA/LTB elicited significant TT-specific S-IgA antibodies in saliva and in nasal secretions that are comparable with those induced by native CT (nCT) as adjuvant. Furthermore, high levels of

TT-specific serum IgG antibodies were induced. These results show that mCTA/LTB is potentially an effective and practical novel mucosal adjuvant when administered nasally.

---

1988 Doctor of Dental Surgery (D.D.S) Nihon University School of Dentistry at Matsudo  
1996 Ph.D. (Medicine), Osaka University  
2003 Professor, Nihon University  
Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

# Approach to Causative Genes of Oral Disease and Anomalies



Takahide Maeda

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

In pediatric dentistry, the investigation of oral disease and anomalies is important to predict the state of oral health and occlusion in adulthood. The main causative factor of developing dental caries is an environmental like sugar intake, brushing habit and salivary flow etc. However, it is known that genetic factor influence to occurrence of dental caries.

Dental caries is a multifactorial, infectious disease with little known about the host genetic factor influencing susceptibility for it. This study aimed to identify the major candidate chromosomes for dental caries susceptibility and to detect the regions within it. Quantitative trait loci (QTL) analysis was performed on genetic crosses of C3H/HeJ (caries-resistant strain) and C57BL/6J (caries-susceptible strain) inoculated with *Streptococcus mutans* serotype c. In a genomewide scan, two suggestive QTLs, one significant QTL, and one highly significant QTL were detected on chromosomes 1, 2, 7 and 8, respectively. The likelihood ratio statistic (LRS) showed a higher than suggestive level around the marker D1Mit21 in the middle region of the chromosome 1, between D2Mit255 and D2Mit311 in the distal region of the chromosome 2, and the distal region from D7Mit31 of the chromosome 7. A significant QTL was locat-

ed between the markers D2Mit237 and D2Mit101. The LRS showed a higher than significant level between markers D8Mit208 and D8Mit280, and especially exceeded a highly significant level between markers D8Mit211 and D8Mit280. These results suggest that the major gene(s) responsible for dental caries susceptibility are located in these regions. Some of genes located those region were confirmed to be related immune response and salivary secretion by genechip.

The other hand, congenital missing tooth is quiet affect mastication ability and occlusion, and to detect the genes related absent tooth is quit important in pediatric dentistry.

EL/Sea mice have 100% incidence of absence of the third molars. Our previous linkage analysis using F2 intercross between EL/Sea and MSM/Msf mouse strains provides statistical evidence of a major locus for absence of the third molars, designated am3, of EL/Sea with a recessive effect at the middle region of chromosome 3. To obtain independent evidence for linkage and more precisely determine the location of the am3 locus, we generated EL/Sea congenic strains for am3 in which the restricted interval of chromosome 3 of EL/Sea was replaced by a MSM/Msf-

derived homologue. EL/Sea congenic mice that were either heterozygous or homozygous for the MSM/Msf-derived interval exhibited a significant decrease in the incidence of absence of the third molars, confirming previous genome scan results. This

congenic breeding tests definitely confined the am3 locus to an approximately 4.4-cM region flanked by D3Mit13 and D3Mit125 microsatellite loci, indicating Lef1 and Egf as candidate genes.

---

1973 Doctor of Dental Surgery (D.D.S), Nihon University School of Dentistry

1977 Ph.D (Dentistry), Nihon University

1995 Professor, Nihon University

Department of Pedodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**国際シンポジウム**  
**歯科先端材料・先進技法による**  
**口腔機能の再構築**

文部科学省選定  
私立大学学術研究高度化推進事業  
平成13年度学術フロンティア

平成16年11月6日  
松戸市民劇場

# 国際シンポジウムの開催にあたって

日本大学松戸歯学部  
学部長 大竹 繁雄 教授

文部科学省から、私立大学学術研究高度化推進事業の学術フロンティア推進拠点としての選定を受けた本学部口腔科学研究所の共同研究プロジェクトが、4年目を迎えました。私立大学学術研究高度化推進事業の目的は、私立大学の大学院研究科、研究所の中から重点的研究領域ごとに優れた研究実績を上げ、将来の研究発展が期待される卓越した研究組織を選定し、国内外の研究機関との共同研究を推進することで、私立大学の研究基盤を強化し、我が国の科学技術の推進を図ることにあります。本学部でも口腔科学研究所が中心となって「歯科先端材料・先進技法による口腔機能の再構築」を申請し、平成13年4月にフロンティア推進拠点の選定を受けました。昨年9月には中間評価のための研究進捗状況報告書を提出し、本年4月に「A A」の研究成果の評価を受けました。

また、この研究成果を踏まえて、本年5月15日（土）に一般市民にも広く紹介する目的で、「ご存知ですか？先進歯科医療」をテーマとして市民公開講座を開催いたしました。

今回、更なる共同研究体制の充実ならびに若手研究者の育成を目的として、国際シンポジウムを開催する運びとなりました。シンポジウムでは、それぞれの研究領域の第一線で活躍されている先生方を国内外からお招きして、最新の研究成果についてご講演していただきます。このシンポジウムを足がかりとして、新たな研究テーマが発掘され、本学部口腔科学研究所を中心とした更なる共同研究体制が確立していくことを期待しています。

文部科学省選定

平成13年度学術フロンティア推進事業 国際シンポジウム

14:00~14:10 開会の辞 日本大学松戸歯学部長 大竹 繁雄 教授

特別講演

座長：安孫子 宜光 教授，小方頼 昌 教授

14:10~15:10 “共鳴周波数法を用いた歯科用インプラントの安定性検出デバイスの設計と評価”  
台北医学大学口腔復建医学研究所 Sheng-Yang Lee 教授 ..... 18

15:10~16:10 “骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生”  
広島大学大学院医歯薬学研究科 栗原 英見 教授 ..... 20

16:10~16:20 休 憩

16:20~17:20 “顎骨の形成およびリモデリング，再構築における骨シアロタンパクの役割”  
トロント大学歯学部 Jaro Sodek 教授 ..... 22

一般講演

座長：小林清吾 教授

17:20~17:50 “粘膜ワクチンのための新規アジュバントの開発”  
日本大学松戸歯学部 山本 正文 教授 ..... 23

17:50~18:20 “口腔疾患の原因遺伝子の解明への道”  
日本大学松戸歯学部 前田 隆秀 教授 ..... 24

18:20~ 閉会の辞



# 共鳴周波数法を用いた歯科用インプラントの安定性検出デバイスの設計と評価

Sheng-Yang Lee<sup>1</sup>, Wei-Jen Chang<sup>1,2</sup>, Haw-Ming Hwang<sup>1</sup>, 安孫子 宜光<sup>2</sup>  
台北医学大学口腔復建医学研究所<sup>1</sup>, 日本大学松戸歯学部生化学講座<sup>2</sup>

歯科用インプラントの基礎についての開発と研究は、今までに十分行われてきたが、埋入後のインプラントの安定性を正確に分析するための利用可能な装置や方法は現時点では数少ない。整形外科処置で骨治癒の程度を分析するための共振周波数 (Resonance frequency: RF) 値の応用は、多くの学者によって研究されてきた。しかしながら、軟組織が周囲を覆っているために、歯科用インプラントの分野において、このようなテクニックの臨床応用はまだ行われていなかった。最近、このトピックに関するいくつかの歯科領域での調査報告がある。これらの結果は、RF測定概念が、歯科用インプラント埋入後のオッセオインテグレーション獲得のプロセスを捉えるために利用できることを示している。そして2000年に、歯科用インプラントの固定度を捉えるために、共鳴振動周波数分析装置 (OSSTELL Integration Diagnostics, Göteborgsvägen, Sweden) が市販された。Osstellによって取り入れられた基本的な概念は調和振動法である。臨床応用する際には、トランスデューサーを植立インプラントのフィクスチャーあるいはアバットメントに取り付ける。トランスデューサーは正弦波によって振動するように励起する。得られたRF値はインプラントの安定性を分析するために使われる。

インパルス加振法はRF分析のもう一つの手段である。過去のin vivoおよびin vitroの一連の実験から、歯科用インプラントの安定性を調べるために、インパルス加振法が有用であることが確認されている。私たちの研究室においては、歯科用インプラントの安定性を捉えるために試作RF分析装置の機能をインパルス加振法概念を使ってテストした。本装置

は、トリガーとシグナル集積部は装置内に装着することでコンパクトになり、容易にインストールさらには分解できるよう設計されている。インプラントの安定性を調べるための試作RF分析装置の妥当性を評価するために、in vivoの一連の実験を行った。

本装置は歯科用インプラントを振動させるためにミニチュアサイズの電磁形加振棒を使う。共振反応は音響レシーバーにより集めた。インプラントを通常の外科手術によって12羽のウサギの左脛骨に埋入した。適合性の良好な場合と不良な場合とを想定して、脛骨に3.2 mm (グループI) と3.7 mm (グループII) の穿孔を行い、3.2 x 8 mmの標準型インプラントをそれぞれ埋入した。インプラント体のRF値は、インプラントのヒーリングアバットメント上に直接取り付けられた新しく開発された装置によって分析した。

グループIのすべてのウサギは、実験期間中、非常に健康に生存していた。しかしながら、グループIIのウサギは、実験期間中に測定することが出来なかった。しかしながら、私たちの結果は、グループIの初期値と比較した場合、有意差はなかった。これらのウサギの最終RF値のすべては、それらの初期値と比較した場合、有意に増加した ( $p < 0.05$ )。グループIの6羽のウサギの平均的な治癒期間は $6.25 \pm 0.39$ 週であった。またインプラント体の初期RF値と治癒期間との間に直線関係 ( $y = -1583.9x + 12260$ ,  $R^2 = 0.6587$ ,  $p < 0.05$ ) があることが明らかになった。

以上の結果から、骨治癒の程度を分析するために、新たに設計された本装置の使用が可能であると結論を得た。

履 歴 1985 台湾, 台北医科大学歯学部卒業  
1992 米国, ノースウエスタン大学 修士  
1993 米国, ノースウエスタン大学 博士

現 職 台湾, 台北医学大学歯学部 学部長, 口腔復健医学研究所 (大学院), 所長  
国際研究学会 (IADR) 台湾部会 (TADR), 会長  
中華民国歯科医学会 常任理事, 歯科材料機器委員会, 委員長

# 骨髄間葉系幹細胞移植による歯周組織再生

栗原 英見<sup>1</sup>, 河口 浩之<sup>1</sup>, 林 秀昭<sup>1</sup>, 平地 昭雄<sup>1</sup>, 長谷川 直彦<sup>1</sup>, 辻 紘一郎<sup>3</sup>,  
加藤 幸夫<sup>2,3</sup>

広島大学大学院医歯薬学総合研究科先進医療開発科学講座歯周病態学分野<sup>1</sup>, 生化学講座<sup>2</sup>,  
(株)ソーセル<sup>3</sup>

“細胞 (cells)”, “増殖・分化促進因子 (signaling molecules)”, “足場 (scaffold)” が組織再生に必須の3要素と考えられている。新付着を伴う歯周組織の再生は組織誘導再生法 (GTR法) によって初めて達成された。それ以来, 線維芽細胞増殖因子, 血小板由来増殖因子などの多くの“増殖・分化促進因子”が歯周組織再生治療薬の候補として研究されている。しかしながら, GTR法や増殖因子の局所投与法は, 歯周局所に存在する歯周組織再生の潜在能力を有する細胞に依存しているため, 完全な歯周組織再生を達成するために必要な細胞を誘導することは極めて困難であると考えられる。

“細胞”は組織再生の上で最も重要な要素と考えられる。間葉系幹細胞は多分化能を有している。骨髄由来間葉系幹細胞は骨芽細胞, 軟骨細胞, 腱細胞, 脂肪細胞, 筋細胞, 神経細胞など様々な細胞に分化することが出来るので, 骨髄由来間葉系幹細胞は主にセメント質, 歯槽骨, 歯周靱帯という三つの異なる組織によって構成される歯周組織再生にも有効であろうと考えられる。成人の骨髄には移植に用いるだけの十分な量の間葉系幹細胞が存在しないことが知られているが, 私どもは近年, 多分化能を維持したまま間葉系幹細胞を増殖させる新しい細胞培養法を開発した。この方法によってイヌあるいはヒトの骨髄から分離・増殖させた間葉系幹細胞は骨芽細胞, 軟骨細胞, 脂肪細胞, ニューロン様細胞に分化する。

動物を用いた基礎実験のために, 間葉系幹細胞をビーグル犬から分離・増殖させた。分離・増殖させた間葉系幹細胞は一旦液体窒素中で凍結保存し, その後, 移植に必要な細胞数が得られるまで再度培

養し, 2%アテロコラーゲンゲルと混和し (2X106から2X107 cells/ml), 実験的に作製したクラスIIIの分岐部欠損に自家移植した。移植1ヶ月後のヘマトキシリンエオジン染色の組織学的観察では歯周組織欠損はほぼ完全に再生されており (2X107 cells/ml), アザン染色では新生したセメント質中に一端が含まれる大量のコラーゲン線維が観察された。さらに詳細な検討を行うために, green fluorescent protein (GFP) 遺伝子の間葉系幹細胞に移入したのちに同様の分岐部欠損に移植した。GFP陽性細胞は新生セメント質の中と上, 新生歯槽骨の中と周囲さらに歯周靱帯の中に検出された。これらの結果は移植した間葉系幹細胞がセメント芽細胞, 骨芽細胞, 歯周靱帯線維芽細胞に分化して歯周組織を再生したことを示唆している。したがって, イヌの動物実験においては間葉系幹細胞の自家移植は歯周組織再生に有効であると結論した。この基礎実験の結果を元に間葉系幹細胞を用いた歯周組織再生の臨床研究の新しいシステムを構築した。20歳から65歳までのクラスIIの分岐部病変あるいは2壁性か3壁性の歯槽骨欠損を有する患者を対象とした。患者からのインフォームドコンセントはクリニカルリサーチコーディネーターによって得た。その後, 患者はウイルス感染を含めた臨床的選択基準に合致するかをスクリーニングした。歯周組織の状態はプロービング (歯周ポケットの深さ, アタッチメントレベル, プロービング時の出血), 規格エックス線写真, 歯科用CTおよび口腔内写真で評価した。患者の間葉系幹細胞は下顎骨, 上顎骨あるいは腸骨の骨髄穿刺液から分離した。間葉系幹細胞を分離するために, 骨髄液中の細胞は患者血清を

添加したDMEMで培養し、分離した間葉系幹細胞は患者血清とFGF-2を添加したDMEMでさらに増殖させた。必要な細胞数が得られた時点で、間葉系幹細胞を2%アテロコラーゲンゲルに懸濁して移植材料とした。細菌あるいはウイルスの感染の検査は移植材料調製前に行った。炎症性肉芽組織、歯周ポケット上皮を完全に除去するためにフラップ手術を行い、感染した歯根表面を完全に滑沢にした後

に、間葉系幹細胞を含む移植材料を歯周組織欠損部に移植し、フラップを復位した。現在、移植後の臨床的経過を観察中である。

間葉系幹細胞移植が歯周組織再生治療に有効であるかどうか結論付けるためには、さらに症例数を増やす必要がある。将来、間葉系幹細胞移植による歯周組織再生に成功すれば、歯周治療の新しい時代の幕が開かれるであろう。

- 
- 履 歴** 1980 広島大学歯学部卒業  
1980 大阪大学研究生、歯学部口腔治療学講座  
1983 岡山大学助手、歯学部歯科保存学第二講座  
1984 岡山大学講師、歯学部付属病院 第二保存科  
1989 米国エモリー大学、Eastman Dental Center 留学  
1992 Ph.D. (歯学博士)  
1992 岡山大学助教授、歯学部歯科保存学第二講座  
1994 広島大学教授、歯学部歯科保存学第二講座
- 現 職** 1994 広島大学教授、歯学部歯科保存学第二講座  
2004 広島大学歯学部 学部長

# 顎骨の形成, リモデリング, および再建における骨シアロタンパク質の役割

Jaro Sodek

トロント大学歯学部CIHRグループマトリックスダイナミクス, トロント大学医学部生化学講座

顎骨は、下顎骨と上顎骨から構成され、歯やインプラントの支持に関与する特殊な組織である。顎骨のリモデリングは比較的早い期間で生じることから、萌出時期の歯の移動に伴う歯の機能や位置の回復は早期に終了する。この様に、顎骨の形成とリモデリングは、正常な歯の機能および口腔組織の再建に必要な重要な役割である。顎骨の形成においては、血管周囲の前駆細胞が増殖し、骨芽細胞へ分化する。一方、顎骨のリモデリングは、骨髄由来の細胞から分化した破骨細胞を介して行われる。顎骨の細胞外マトリックスには2つのシアロタンパク質が存在する。1つは骨シアロタンパク質 (BSP)、もう1つはオステオポンチン (OPN) であり、骨の形成とリモデリングにきわめて重要な役割を果たしている。BSPとOPNは非常に類似した生化学的な性質を有するが、全く異なった機能と発現パターンを示す。骨形成期に、OPNは3つの骨芽細胞の分化期に応じた異なる形で合成分泌される。未分化な細胞では、OPNは低リン酸化型 (細胞内型) である。一方、骨表面やインプラント表面にセメント層を形成する骨芽細胞前駆細胞や、マトリックスの石灰化が生じた後の骨芽細胞ではOPNは高リン酸化型 (分泌型) になる。さらに、細胞内型と分泌型

のOPNは、破骨細胞においても合成され、骨吸収活性を調節している。OPNは、様々な組織において発現するが、BSPは石灰化初期の骨芽細胞でのみ発現する。さらに、BSPは破骨細胞を介した骨のリモデリングにも関与する。

OPNは、免疫、ガン化、ガンの転移等に関与する等、幅広い機能を有し、その配列中のアスパラギン酸連続配列がリン酸化セリン残基と共同してミネラルに結合し、骨形成期における結晶成長を調節する。さらに、OPNには骨形成や骨吸収に重要な走化性、細胞接着、細胞の生存に関与する細胞表面のCD44とインテグリン受容体を認識する部位が数カ所存在する。BSPは、そのN端にコラーゲン結合部位と、グルタミン酸連続配列を有し、同部位を介して骨の結晶形成および病理的石灰化に関与すると考えられている。BSPはまた、インテグリン結合細胞接着配列を有し、骨芽細胞と破骨細胞の機能を調節する。

OPNとBSPは、顎骨の形成とリモデリングに重要な役割を果たすことから、両者の活性を合成ペプチドを用いて模倣したり、逆に、両タンパク質の部位特異的抗体を用いることにより、顎骨の再建や歯周疾患の治療に応用できる可能性がある。

- 履 歴    1970    Ph.D. (生化学) カナダ トロント大学  
          1978    カナダ トロント大学助教授 生化学講座  
          1983    カナダ トロント大学MRC 歯周生理学MRC グループ, 所長  
          2002    カナダ トロント大学マトリックス動力学CIHRグループ, 教授
- 現 職    カナダ トロント大学マトリックス動力学CIHRグループ, 教授

# 粘膜ワクチンのための新規アジュバントの開発

山本 正文

日本大学松戸歯学部総合口腔医学講座

口腔を含む粘膜組織は病原性微生物の侵入経路であり、分泌型IgAによって防御バリアが形成されている。分泌型IgAは粘膜組織で分泌される抗体の80%以上を占めるアイソタイプであり、分泌型IgAの誘導にはTヘルパー(Th)1/Th2型細胞, IgA前駆B細胞, 樹状細胞等から構成されるユニークな粘膜免疫ネットワークによって制御されている。つまり、粘膜組織は全身系免疫システムとは独立した免疫システムを持つということである。したがって、感染症防御のためには全身系免疫応答と粘膜系免疫応答の両方を誘導できる粘膜ワクチンが非常に有効になってくる。

コレラ毒素(CT)と毒素原性大腸菌の易熱性毒素(LT)は効果的なアジュバントであり、粘膜を介して共投与したタンパク抗原に対する抗体応答を粘膜系および全身系組織に誘導する。これまでの報告で、CTはIL-4依存性のTh2型サイトカイン反応により、分泌型IgA抗体および血清中にIgG1, IgA, IgE抗体を誘導することが示されている。一方、LTはTh1型とIL-4非依存性Th2型反応により、分泌型IgAおよび血清IgG1, IgG2a抗体を誘導する。そこで、CTとLTのアジュバント誘導メカニズムの違いが何に起因するかを明らかにするために、CT-AサブユニットとLT-Bサブユニットのキメラ分子(CT-A/LT-B)およびLT-AサブユニットとCT-Bサブユニットのキメラ分子(LT-A/CT-B)を作製し、鶏卵アルブミン(OVA)を抗原として、CT-A/LT-BまたはLT-A/CT-Bとともにマウスに経鼻免疫し、免疫応答を測定した。その結果、CT-A/LT-B, LT-A/CT-Bともに強いアジュバント効果を示し、血清中、分泌液中の両方にOVA特異的抗体応答を誘導した。CT-

A/LT-BはLTに類似したサイトカイン産生パターン(Th1/Th2混合型)を示し、LT-A/CT-BはCTに類似した産生パターン(Th2型)を示した。また、LT-A/CT-BおよびCTは活性化T細胞によるIL-12レセプター発現を抑制したが、CT-A/LT-BおよびCTに抑制作用は認められなかった。以上の結果より、CTおよびLTはそれぞれのBサブユニットを介するシグナルによってIL-12レセプターの発現とそれに続くTヘルパーサイトカイン応答を制御していることが示唆された。

CTとLTは効果的な粘膜アジュバントであるが、下痢原性を有するため、ヒトへの応用は不可能である。また、CTはアレルギーの原因となるIgE抗体応答を誘導する。そこで、無毒化変異型CT(mCT)のAサブユニットとLT-Bサブユニットのキメラ分子(mCT-A/LT-B)を作製することにより、無毒であり、かつIgEの産生を抑えたアジュバントの開発を試みた。mCT-A/LT-BはADP-ribosyltransferase活性は検出されず、マウスの腸管を用いたileal loop試験においても下痢誘導効果は認められなかった。次にmCT-A/LT-Bを破傷風類毒素(TT)とともに経鼻免疫した結果、高いレベルのTT特異的な分泌型IgA, 血清IgGおよびIgA抗体応答が誘導された。しかしながら、IgE抗体はほとんど検出されなかった。さらに、インフルエンザワクチンをmCT-A/LT-Bとともに経鼻免疫したマウスはインフルエンザウイルス感染を防御した。以上の結果から、mCT-A/LT-Bはそのアジュバント作用誘導に際して、下痢誘導効果およびIgE産生応答を示さないことが示され、安全で有効な粘膜アジュバントであることが示唆された。

履 歴	1988	日本大学松戸歯学部卒業
	1996	博士(医学), 大阪大学
現 職	2003	日本大学教授 日本大学松戸歯学部総合口腔医学講座

# 口腔疾患の原因遺伝子の解明への道

前田 隆秀

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座

小児歯科学において口腔疾患・口腔奇形の原因遺伝子の解明は治療にとってだけでなく成人期の口腔健康ならびに咬合を予測する上でも重要である。

齲蝕発症の主要因は蔗糖の摂取、歯ブラシ習慣、唾液分泌などの環境要因であるが、遺伝要因も関与していることが明らかにされている。

齲蝕症は多因子疾患であるが、その感受性に関与する宿主の遺伝因子についてはほとんど知られていない。本研究では齲蝕感受性が低いC3H/HeJマウスと齲蝕感受性が高いC57BL/6Jマウスを用いて交雑種を作成して齲蝕実験を行い、連鎖解析法を用い、さらにQTL解析から齲蝕感受性を決定する遺伝子が存在する候補染色体として1, 2, 7, 8が統計的に有意に選出された。そこで詳細な連鎖解析をこれらの染色体で行ったところ、D2Mit237とD2Mit101ならびにD8Mit208とD8Mit280の領域に高いLRS値を得たことから、これらの領域に齲蝕感受性決定遺伝子が存在することが強く示唆された。また、これらの領域には免疫反応ならびに唾液分泌に関与する遺伝子があったことから、顎下腺組織で

の遺伝子発現をGenechipでみたところ同様な知見が含まれていた。

一方、小児歯科臨床において歯の先天欠如に伴う歯列不正に遭遇する機会は多く、歯の先天欠如の遺伝要因を探求することは大変意義深い。

第三臼歯の先天欠如を100%有する近交系マウスEL/Sea (EL) と野生型マウスMSM/Ms (MSM) の遺伝的交配によりF1, F2マウスを作製し、遺伝様式が常染色体劣性遺伝性であること、また連鎖解析により第三臼歯欠損の遺伝要因をマウス染色体3番の中間領域に位置付けたことを報告してきた。さらにELおよびMSMを用い、MSMをドナーとし、MSMの染色体3番の中間領域を、レシピエントであるELに導入するコンジュニックマウスを作製した。N9世代マウスにおいて、染色体3番のD3Mit13とD3Mit125に挟まれた領域がヘテロ型とMSMホモ型では第三臼歯が存在し、ELホモ型では歯が欠如したという結果を得ることができ、この約4 c Mの領域に原因遺伝子が存在することを証明した。この領域内に存在する候補遺伝子としてLef 1 とEgfが考えられた。

- 履 歴    1973  日本大学歯学部卒業  
          1977  Ph.D (歯学博士), 日本大学
- 現 職    1995  日本大学教授  
          日本大学松戸歯学部小児歯科学講座

# Transportation

To the Matsudo Citizens' Theater

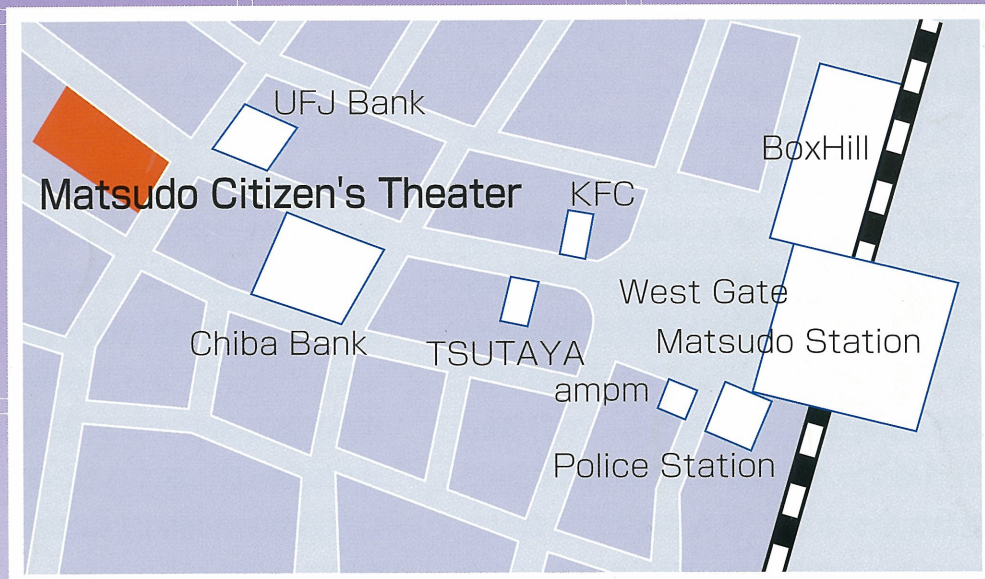
Approx. 2 minutes walk from Matsudo Station (west gate)

To Matsudo Station (JR Joban Line)

Approx. 20 minutes from Ueno Station (JR Joban Express Line)

Approx. 25 minutes from Shin-Ochanomizu (Subway Chiyoda Line)

## Map



### Sponsorship

Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Research Institute of Oral Science

Nihon University Society of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at  
Matsudo 870-1, Sakaecho, Nishi-2, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

### Inquiry

Phone : 047-360-9274 E-mail : kenkyuj@ml.mascats.nihon-u.ac.jp



2004年11月6日(土) 国際シンポジウム



講演者 Sheng-Yang Lee 教授



講演者 栗原英見教授



講演者 Jaro Sodek 教授



講演者 山本正文教授



講演者 前田隆秀教授



座長 安孫子宜光教授



座長 小方頼昌教授



座長 小林清吾教授