

レチノイン酸はヒト歯肉上皮細胞からの 抗菌ペプチド産生を誘導する

渡辺 敦¹ 福井和徳¹ 廣瀬 公治²

Retinoic Acid Induces Antimicrobial Peptide from Human Gingival Epithelial Cells

Atsushi WATANABE¹, Kazunori FUKUI¹ and Kimiharu HIROSE²

The aim of the present study was to investigate the effects of retinoic acid on gingival epithelial cells by measuring the level of an antimicrobial peptide, an innate immunocompetent factor in human gingival epithelial cells.

The human gingival epithelial cell line Ca9-22 was used. Ca9-22 cells were cultured until a monolayer was formed. After adding all-trans retinoic acid (ATRA) at pre-determined concentration, culturing was continued. When culturing was complete, total RNA was collected from the cells and reverse transcription was performed. LL-37 mRNA expression was determined using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and real time PCR assays, with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) utilized as an internal control. LL-37 expression was evaluated by ELISA.

ATRA stimulated LL-37 production and mRNA expression in Ca9-22 cells increased. In addition, mRNA expressions of retinoic acid receptor (RAR α , β) and retinoid X receptor (RXR β), were induced.

These findings indicate that ATRA activates the intraoral innate immune system by promoting mRNA expression and peptide production of LL-37, an antimicrobial peptide, in gingival epithelial cells. Furthermore, these effects of ATRA might be induced by acceleration of the expression of the nuclear receptors RAR and RXR.

Key words : Ca9-22, LL-37, all-trans retinoic acid

緒 言

レチノイン酸はビタミンAの活性代謝物であり、レチノイドとも呼ばれる。レチノイン酸は生

体内において、細胞の増殖・分化、生体の恒常性維持、形態形成に関わる重要な脂溶性ビタミンで¹⁾、抗体産生やT細胞の活性化を促進するなど²⁾、免疫機能に対し多彩な機能を発揮していることが知

受付：平成26年9月30日，受理：平成27年1月8日
奥羽大学歯学部成長発育歯学講座歯科矯正学分野¹
奥羽大学歯学部口腔衛生学講座²
(指導：廣瀬公治教授)

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,
Department of Oral Growth and Development, Ohu
University School of Dentistry¹
Department of Preventive Dentistry, Ohu University
School of Dentistry²
(Director : Prof. Kimiharu HIROSE)

られている。現在、レチノイドは急性前骨髄球性白血病の分化誘導療法剤としてレチノイン酸（医薬一般名トレチノイン）が用いられるほか、その異性体や類似の活性を持つ合成化合物が、乾癬、角化症、重篤なニキビなど、皮膚の炎症性、増殖性疾患の治療に用いられている^{1,2)}。

ビタミンAの摂取不足による夜盲症や免疫力の低下、さらに乳幼児の発育不良や栄養失調は深刻な問題とされている^{4,5)}。その一方で、ビタミンA過剰症による全身倦怠感、頭痛や吐き気などの脳圧亢進などの症状も見られ⁶⁾、特に妊婦の場合には、胎児奇形が問題になっている⁷⁾。また、ヒトがビタミンを補給することによって免疫能が変化するか否かに関する介入試験の報告も増えてきており、ビタミンA摂取による免疫能改善に関しては Villamor ら⁸⁾によって報告されている。しかし、レチノイン酸の口腔に及ぼす作用については欠乏症のような症状に関する研究はみられるものの、口腔の免疫能に与えるレチノイン酸の作用についての検討は少ない。

口腔内唾液成分には、酵素、ホルモン、抗菌ペプチド、抗体などの成分が含まれている。このうち、口腔の感染防御因子である抗菌物質としては、リゾチーム、ペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、免疫グロブリンなどがある。しかし最近では、自然免疫の抗菌ペプチドファミリーであるディフェンシンやカテリシジンが注目されている⁹⁾。LL-37は唯一のカテリシジンファミリーであり¹⁰⁾、歯肉炎、歯周炎などの歯周病原性細菌に特に強い抗菌活性のあることが示されている^{11,12)}。また、グラム陰性菌のリポ多糖の中和作用や、好中球、単球、T細胞などの細胞遊走能の活性化、血管新生促進による創傷治癒に関与し、細菌によって引き起こされた炎症反応を軽減すると同時に好中球の機能を補助するなど、LL-37は口腔における防御反応に重要な役割を果たしているものと考えられる¹³⁻¹⁹⁾。

そこで本研究では、レチノイン酸の持つ口腔の自然免疫に及ぼす作用を検索するために、口腔上皮細胞を用いLL-37を指標とし、その影響を検討した。さらに、その作用発現の機構を調べるために、レチノイン酸の作用発現に関わる核内レセ

プターであるレチノイン酸受容体 (RAR) とレチノイド X 受容体 (RXR) についても併せて検討を行った。

材料と方法

1. 試薬

Fetal Bovine Serum (FBS, SIGMA, St.Louis, MO, USA), Tris-EDTA buffer (TE, 和光純薬, 大阪), Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, SIGMA, St. Louis, MO, USA), PBS-Tween buffer (PBS-T, 日本製薬, 東京), ISOGEN-LS (和光純薬, 大阪) を用いた。レチノイン酸として *all-trans*-Retinoic Acid (ATRA, 和光純薬) を用いた。

2. 培養細胞

細胞はヒト歯肉上皮癌細胞株 Ca9-22²⁰⁾ を用いた。Ca9-22は直径60mmのプラスチックシャーレ (IWAKI, 東京) を用い、10% FBS 添加 D-MEM にて通法に従い培養した。単層を形成した Ca9-22は、1% FBS 添加50mM-HEPES 含有 D-MEM に培地を置換し、1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ M の ATRA をそれぞれに添加し、1時間および24時間培養後、Ca9-22から total RNA を回収した。なお、全実験系について ATRA を添加していない培地で培養した細胞をコントロールとした。

3. RNA 回収と RT-PCR, リアルタイム PCR

Ca9-22からの total RNA は ISOGEN-LS を用い通法に従い回収した²¹⁾。同 RNA は ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, 大阪) を用いて逆転写を行った。逆転写により得られた cDNA から LL-37 をターゲットとし RT-PCR を行った。RT-PCR は増幅過程を27サイクル行った。PCR の生成物は1.5% アガロースゲルを用いて展開し、ethidium bromid で染色した後、観察を行った。また、リアルタイム PCR は SYBR[®] Green Real time PCR Master Mix-Plus- (TOYOBO) を用い、95 $^{\circ}$ C 60秒, 95 $^{\circ}$ C 15秒, 60 $^{\circ}$ C 15秒, 72 $^{\circ}$ C 45秒の増幅過程を Applied Biosystems 7500 system (Applied Biosystems by Life Technologies, 東京) を用いて40サイクル行った。なお、インターナルコントロールは G3PDH を用いた。LL-37と

Table 1 RT-PCR, リアルタイム PCR に用いた各種プライマーの塩基配列

		Primer sequence	Reference
RT-PCR	LL-37	Forward: CAGGACGACACAGCAGTCAC Reverse: CAGCAGGGCAAATCTCTTGT	22
	G3PDH	Forward: TGAAGGTCCGAGTCAACGGATTT Reverse: CATGTGGGCCATGAGGTCCACCA	23
Real-time PCR	LL-37	Forward: CATCATTGCCAGGTCTCAGCT Reverse: AGGTTAGCATCCGAGGACCGCTG	
	G3PDH	Forward: TGGCATTGCCCTCAACGACCACTT Reverse: CCACCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCG	

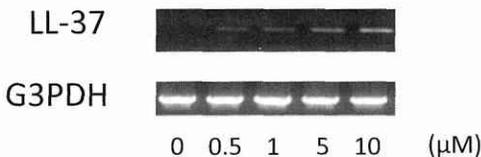


Fig. 1 ATRA添加濃度におけるCa9-22からのLL-37mRNA発現の促進

Ca9-22からのLL-37のmRNAはATRA添加濃度依存的にその発現が促進された。

G3PDHのプライマーのシークエンスをTable 1に示す^{22,23)}。リアルタイムPCRに用いたプライマーはABI Primer Express (Applied Biosystems by Life Technologies)によりゲノムDNA由来の増幅が起こらないように設計を行った。PCR産物は、融解曲線の分析によって、単一ターゲット産物であることにより確認した。

4. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Ca9-22培養上清中におけるLL-37の産生量はHuman LL-37 ELISA kit (Hycult Biotechnology, Uden, Netherlands)を用いて、付属の取扱説明書に記載された方法に従い測定した。

5. 統計処理

有意差検定には、Paired *t*-testを行い、有意水準5%で統計学的有意差があると判定した。

結 果

1. ATRAを添加したヒト歯肉上皮細胞からのLL-37のmRNA発現

Ca9-22からのLL-37のmRNAはATRA添加濃度依存的にその発現が促進された (Fig. 1)。次に、ATRAによるCa9-22からのLL-37の産生動態を、その時間経過について検討した。すなわ

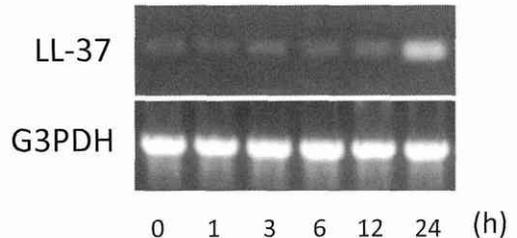


Fig. 2 ATRA添加時間におけるCa9-22からのLL-37mRNA発現の促進

ATRAによるCa9-22からのLL-37の産生動態を、その時間経過について検討した。LL-37のmRNAは時間依存的に促進された。

ち、10 μ MのATRAをCa9-22に添加し、1時間から24時間培養継続したCa9-22におけるLL-37のmRNA発現を検討した。その結果、LL-37のmRNAは時間依存的に促進され、24時間で最大となった (Fig. 2)。

2. ATRAを添加したヒト歯肉上皮細胞からのLL-37の産生

ATRAがCa9-22からのLL-37mRNA発現を促進することが認められたことから、LL-37のタンパクの産生も促進しているかを確認するため、ELISAにより検討した。Ca9-22の培養上清中におけるLL-37の産生は、ATRA 1 μ M添加後1時間で、促進されることが示された (Fig. 3)。

一方、ATRA添加後24時間についても同様に検討したところ、ATRAの濃度10 μ Mで有意なLL-37の産生促進が認められた (Fig. 4)。

3. ATRAが及ぼすCa9-22の核内レセプターのmRNA発現

ATRAによるヒト歯肉上皮細胞からのLL-37の産生促進が、どのような経路を介しているかを検討するために、レチノイン酸受容体である

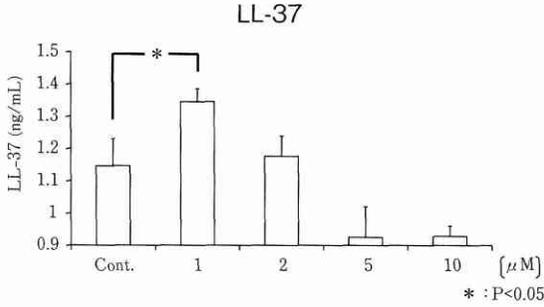


Fig. 3 ATRA添加1時間後のLL-37産生量
Ca9-22に各濃度のATRA添加1時間で、LL-37産生量をELISAにより定量した。グラフは平均値±SDを表している。

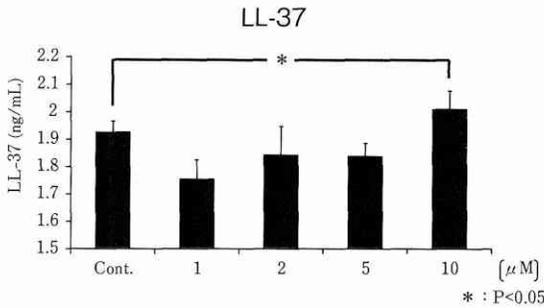


Fig. 4 ATRA添加24時間後のLL-37産生量
Ca9-22に各濃度のATRA添加24時間で、LL-37産生量をELISAにより定量した。グラフは平均値±SDを表している。

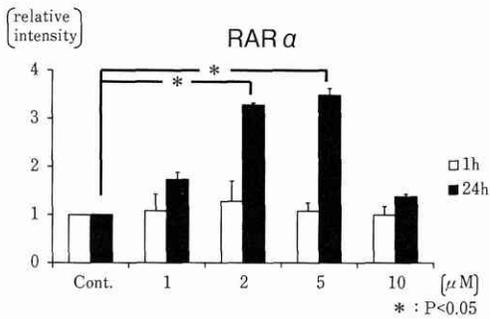


Fig. 5 RAR α mRNAの発現
Ca9-22は、各濃度のATRAを添加し、1時間、24時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しRAR αをターゲットとしたリアルタイムPCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

RARとRXRを指標としてリアルタイムPCRによりその状況を検討した。

その結果、ATRA添加後24時間では2 μMおよび5 μMでRAR αのmRNA発現が促進された(Fig. 5)。同様にRAR βについて検討した。その結果、ATRA添加後1時間では有意な差は認め

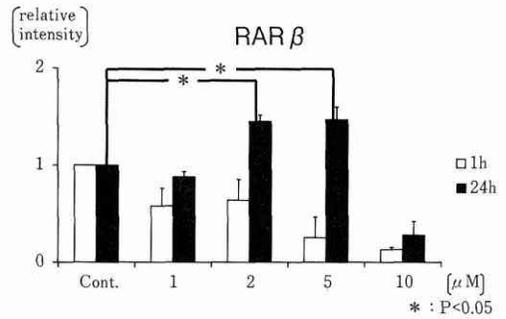


Fig. 6 RAR β mRNAの発現
Ca9-22は、各濃度のATRAを添加し、1時間、24時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しRAR βをターゲットとしたリアルタイムPCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

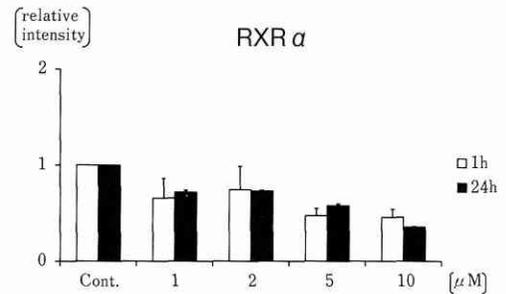


Fig. 7 RXR α mRNAの発現
Ca9-22は、各濃度のATRAを添加し、1時間、24時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しRXR αをターゲットとしたリアルタイムPCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

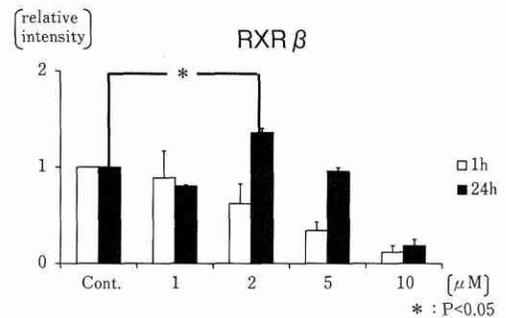


Fig. 8 RXR β mRNAの発現
Ca9-22は、各濃度のATRAを添加し、1時間、24時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しRXR βをターゲットとしたリアルタイムPCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

られなかったが、24時間ではmRNAの発現が促進された(Fig. 6)。さらに、RARとヘテロダイマーを構成するRXRについても同様に検討したとこ

る、RXR α の mRNA 発現に対し、ATRA は何ら影響を与えなかった (Fig. 7)。一方、RXR β においては ATRA 添加後24時間において、その mRNA 発現が有意に促進することが示された (Fig. 8)。なお、リアルタイム PCR の図では ATRA 添加後 1 時間と24時間のコントロールを 1とした時の、各濃度における mRNA の発現比で表している (Fig. 5~8)。

考 察

脂溶性ビタミンであるビタミン A は、多彩な機能を有している。そのうち、Villamor ら⁸⁾は適切なビタミン A の摂取は小児における重度感染症の治療に有用であるなど、免疫機能に対する機能も有していると報告している。しかしながら、口腔の免疫機能に重要な役割を果たしている自然免疫に対するビタミン A の効果を検証した報告はない。

口腔の自然免疫を掌る液性因子のひとつに、カテリシジンファミリーの抗菌ペプチド LL-37があることが知られている²⁴⁾。この LL-37は主に好中球から産生されるが、口腔の上皮系細胞からも産生される²⁵⁾。さらに、LL-37は口腔内細菌、とりわけ歯周病原性細菌に対し強い抗菌活性を持つことが示されている^{10,11,12)}。そこで、本研究ではヒト歯肉上皮細胞である Ca9-22を用い、ビタミン A の持つ自然免疫への影響について抗菌ペプチドである LL-37を指標として検討を行った。

まず初めに、Ca9-22に0.5~10 μ Mの各種濃度の ATRA を添加し、LL-37mRNA の発現が誘導されるかについて検討した。その結果、Ca9-22からの LL-37mRNA は ATRA 添加濃度および添加時間依存的にその発現が促進された。このことからビタミン A は口腔内のバリア機構である自然免疫を賦活する可能性が示された。

ATRA は、T細胞の活性や抗体産生を修飾するなど、抗菌ペプチド以外の自然免疫系にも作用することが示されている^{2,20)}。一方、ATRA と同様の脂溶性ビタミンである1, 25(OH) $_2$ D $_3$ がヒト口腔内の角化細胞である OKF6/TERT からの LL-37mRNA の発現を誘導することが示されている²⁶⁾。これらのことをあわせ考えると上皮系細胞にお

る LL-37の mRNA 発現促進は、脂溶性ビタミンにより制御されている可能性が示唆された。

このように、ATRA は Ca9-22における LL-37mRNA 発現を促進したことから、そのプロダクトである LL-37タンパク質が培養上清中に実際に産生されているかを ELISA にて検討を行った。その結果、ATRA の濃度が低濃度の場合では添加後 1 時間、高濃度の場合では24時間でその産生が有意に増加した。ATRA は熱や酸性環境下において不安定であることが知られている²⁷⁾。また、ATRA 濃度5 μ M以上ではコントロールと比較し、LL-37の産生が減少していることから、Ca9-22の活性が抑制されている可能性が示された。よって、低濃度の ATRA 添加後 1 時間で有意に LL-37の産生が促進されたことは ATRA の early phase の作用と考える。

レチノイン酸は RAR および RXR とヘテロダイマーを形成し、様々な遺伝子発現を制御していることが知られている²⁸⁾。そこで、ATRA によるヒト歯肉上皮細胞からの LL-37の産生促進が、RAR および RXR のどのサブタイプの系を介しているかを検討するために、これら RAR と RXR をターゲットとしたリアルタイム PCR により検討を行った。その結果、ATRA は Ca9-22の RAR α と β の mRNA 発現を誘導し、特に RAR α において顕著であった。一方、RXR では β においてのみ、その発現促進が認められた (Fig. 7, 8)。このことから、Ca9-22における ATRA の作用発現は RAR α 、 β と RXR β とのヘテロダイマーが LL-37遺伝子のプロモーター領域に結合することにより、発現されている可能性が示された。詳細については今後の検討が必要である。

今回、ビタミン A の活性代謝物である ATRA が口腔の自然免疫を賦活することが示唆された。歯科矯正治療では、マルチブラケットなどの矯正装置を装着すると口腔内環境が大きく変化する²⁹⁾。その際、口腔衛生状態が不良になり、歯肉炎やう蝕の発症を認める症例がある。よって、歯科矯正治療中の口腔内環境を良好に維持すること、特に細菌に対する対策は重要である。その対策の主な方法は、ブラッシングに代表されるような歯口清掃が挙げられる。しかしながら、本研究において、

栄養素の一つであるビタミンAの活性代謝物が口腔上皮からの抗菌ペプチドの産生を促進させる可能性が示された。よって、歯科矯正治療中の口腔内環境を良好に維持するために従来のブラッシングに加えて、適正な栄養素摂取もその補完要因であると考えられる。

結 論

レチノイン酸は、ヒト歯肉上皮細胞からの抗菌ペプチドLL-37産生を誘導することが示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご専門の立場からご校閲を賜りました奥羽大学歯学部口腔病態解析制御学講座口腔細菌学分野清浦有祐教授に衷心より感謝申し上げます。また本研究を遂行するにあたりご協力いただきました本学歯学部成長発育歯学講座歯科矯正学分野ならびに本学歯学部口腔衛生学講座の皆様にも深く感謝申し上げます。

本論文の要旨は第56回奥羽大学歯学会（平成25年11月9日 郡山市）において発表した。

文 献

- 1) Chambon, P. : A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB. J.* **10** ; 940-954 1996.
- 2) Ross, A. C. : Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity. *Am. J. Clin. Nutr.* **96** ; 1166S-1172S 2012.
- 3) Fisher, G. J. and Voorhees, J. J. : Molecular mechanisms of retinoid actions in skin. *FASEB. J.* **10** ; 1002-1013 1996.
- 4) Miller, M., Humphrey, J., Johnson, E., Marina, E., Brookmeyer, R. and Katz, J. : Why do children become vitamin A deficient?. *J. Nutr.* **132** ; 2867S-2880S 2002.
- 5) Sommer, A. and Davidson, F. R. : Assessment and control of vitamin A deficiency : the Anancy Accords. *J. Nutr.* **132** ; 2845S-2850S 2002.
- 6) Silverman, A. K., Ellis, C. N. and Voorhees, J. J. : Hypervitaminosis A syndrome : a paradigm of retinoid side effects. *J. Am. Acad. Dermatol.* **16** ; 1027-1039 1987.
- 7) Rothman, K. J., Moore, L. L., Singer, M. R., Nguyen, U. S., Mannino, S. and Milunsky, A. : Teratogenicity of high vitamin A intake. *N. Engl. J. Med.* **333** ; 1369-1373 1995.
- 8) Villamor, E. and Fawzi, W. W. : Effects of vita-

- min a supplementation on immune responses and correlation with clinical outcomes. *Clin. Microbiol. Rev.* **18** ; 446-464 2005.
- 9) De, Smet, K. and Contreras, R. : Human antimicrobial peptides : defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol. Lett.* **27** ; 1337-1347 2005.
- 10) Doss, M., White, M. R., Teclé, T. and Harts-horn, K. L. : Human defensins and LL-37 in mucosal immunity. *J. Leukoc. Biol.* **87** : 79-92 2010.
- 11) Hosokawa, I., Hosokawa, Y., Komatsuzawa, H., Goncalves, R. B., Karimbux, N., Napimoga, M. H., Seki, M., Ouhara, K., Sugai, M., Taubman, M. A. and Kawai, T. : Innate immune peptide LL-37 displays distinct expression pattern from beta-defensins in inflamed gingival tissue. *Clin. Exp. Immunol.* **146** ; 218-225 2006.
- 12) Ouhara, K., Komatsuzawa, H., Yamada, S., Shiba, H., Fujiwara, T., Ohara, M., Sayama, K., Hashimoto, K., Kurihara, H. and Sugai, M. : Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, β -defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J. Antimicrob. Chemother.* **55** ; 888-896 2005.
- 13) Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D. and Oppenheim, J. J. : Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **271** ; 2935-2940 1996.
- 14) Ciornei, C. D., Sigurdardóttir, T., Schmidtchen, A. and Bodelsson, M. : Antimicrobial and chemoattractant activity, lipopolysaccharide neutralization, cytotoxicity, and inhibition by serum of analogs of human cathelicidin LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49** ; 2845-2850 2005.
- 15) Kocuzulla, R., Von, Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C., Gallo, R. L., Clauss, M. and Bals, R. : An angiogenic role for the human peptide antibiotic LL-37/hCAP-18. *J. Clin. Invest.* **111** ; 1665-1772 2003.
- 16) Lee, S. H., Jun, H. K., Lee, H. R., Chung, C. P. and Choi, B. K. : Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int. J. Antimicrob.*

- Agents **35** ; 138-145 2010.
- 17) Nagaoka, I., Hirota, S., Niyonsaba, F., Hirata, M., Adachi, Y., Tamura, H. and Heumann, D. : Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF-alpha by blocking the binding of LPS to CD14(+) cells. *J. Immunol.* **167** ; 3329-3338 2001.
 - 18) Isogai, E., Isogai, H., Matuo, K., Hirose, K., Kowashi, Y., Okumura, K. and Hirata, M. : Sensitivity of genera *Porphyromonas* and *Prevotella* to the bactericidal action of C-terminal domain of human CAP18 and its analogues. *Oral Microbiol. Immunol.* **18** ; 329-332 2003.
 - 19) Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K. and Ogawa, H. : Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *Br. J. Dermatol.* **157** ; 1124-1131 2007.
 - 20) Hirose, K., Isogai, E., Mizugai, H. and Ueda, I. : Adhesion of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae to human gingival cell line Ca9-22. *Oral Microbiol. Immunol.* **11** ; 402-406 1996.
 - 21) 黒田栄子, 廣瀬公治, 佐藤直生, 福井和徳 : 培養環境 pH がおよぼす骨芽細胞のサイトカイン産生についての研究. *奥羽大歯学誌* **39** ; 19-26 2012.
 - 22) McIntosh, R. S., Cade, J. E., Al-Abed, M., Shanmuganathan, V., Gupta, R., Bhan, A., Tighe, P. J. and Dua, H. S. : The spectrum of antimicrobial peptide expression at the ocular surface. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46** ; 1379-1385 2005.
 - 23) Ercolani, L., Florence, B., Denaro, M. and Alexander, M. : Isolation and complete sequence of a functional human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. *J. Biol. Chem.* **263** ; 15335-15341 1988.
 - 24) Burton, M. F. and Steel, P. G. : The chemistry and biology of LL-37. *Nat. Prod. Rep.* **26** ; 1572-1584 2009.
 - 25) 佐藤直生, 廣瀬公治, 大植一樹, 福井和徳 : 歯肉上皮細胞における抗菌タンパク質産生機構に関する研究. *Orthod. Waves* **72** ; 17-24 2013.
 - 26) McMahon, L., Schwartz, K., Yilmaz, O., Brown, E., Ryan, L. K. and Diamond, G. : Vitamin D-Mediated Induction of Innate Immunity in Gingival Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **79** ; 2250-2256 2011.
 - 27) 影近弘之 : ビタミン A の機能とその制御分子. *ビタミン* **77** ; 501-511 2003.
 - 28) 加藤茂明 : 核内レチノイドレセプターの転写調節に関する研究. *ビタミン* **70** ; 217-233 1996.
 - 29) Pandis, N., Papaioannou, W., Kontou, E., Nakou, M., Makou, M. and Eliades, T. : Salivary *Streptococcus mutans* levels in patients with conventional and self-ligating brackets. *Eur. J. Orthod.* **32** ; 94-99 2010.

著者への連絡先：渡辺 敦, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部成長発育歯学講座歯科矯正学分野

Reprint requests : Atsushi WATANABE, Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan