

第35回 奥羽大学歯学会例会講演抄録

(平成15年6月14日)

一般講演

1) *Porphyromonas gingivalis*の病原性に関する研究

— マウス腹腔内滲出炎症性細胞群中のTh1/Th2バランスに及ぼす影響 —

○田代 俊男

(奥羽大・歯・診科学)

(目的) 歯周疾患の原因菌であることが示唆されている *Porphyromonas gingivalis* は、宿主防御機構を回避することが知られている。本研究では、*P. gingivalis* のマウス腹腔内滲出炎症性細胞群 (PECs) 中のTh1/Th2バランスに及ぼす影響を調べた。

(材料と方法) 実験動物：C3H/HeN系マウスの雄6週齢を用いた。使用菌株：*P. gingivalis* ATCC 33277株および対照として *Escherichia coli* O-127株を用いた。菌株の培養と集菌：*P. gingivalis* は変法GAMブイヨンにて37℃、2日間嫌気培養した。*E. coli* は変法GAMブイヨンにて37℃、1日間好気培養した。培養後 *P. gingivalis* および *E. coli* をともに10,000 g で10分間遠心し、滅菌生理食塩水で数回洗浄し、凍結乾燥したものをを用いた (*P. g.* 菌体, *E. coli* 菌体)。菌体内毒素 (LPS)：*P. gingivalis* および *E. coli* より Westphal 法によって抽出精製したものをを用いた (LPS-*P. g.*, LPS-*E. coli*)。Tリンパ球群：*P. g.* 菌体, *E. coli* 菌体, LPS-*P. g.*, LPS-*E. coli* それぞれをマウス腹腔内に投与し、プロテオースペプトンで誘導したPECs中のT細胞群 (PEC-T) をを用いた。細胞培養：10%に牛胎児血清を加えたRPMI-1640培地を用い5%CO₂空気中37℃の条件下で2日間培養した。サイトカイン産生量の測定：ELISA法によって細胞培養液中のIFN- γ およびIL-4の産生量を測定した。

(結果) *P. g.* 菌体投与群において、IFN- γ

およびIL-4双方の産生量は、他群と比べ著しく少なかった。

(考察と結論) *P. gingivalis* の菌体はマウス腹腔内滲出炎症性細胞群中のTh1およびTh2双方の滲出を抑制する作用を認めた。すなわち *P. gingivalis* は細胞性免疫および液性免疫の双方を抑制することによって宿主の防御機構を回避することが示唆された。

2) 破骨細胞分化におけるCyclooxygenase-2 選択的阻害剤投与の影響について

○小坂橋 勉

(奥羽大・大学院・口外)

(目的) ラット下顎臼歯部では対合歯である上顎臼歯を抜歯し、咬合機能を喪失させると、頬側歯槽骨に一過性の骨吸収が生じる。これを実験モデルとし、プロスタグランジンを誘導する酵素Cyclooxygenase-2 (以下COX-2) を阻害することにより、*in vivo*での破骨細胞分化過程にどのような影響が現れるか組織化学的に検討した。

(材料) 7週齢、体重約250 gの雄Wistar系ラットを使用。

(方法) COX-2選択的阻害剤Nimesulide 400ppmを投与した群を実験群、含まない群を対照群とした。上顎臼歯抜歯し0, 1, 2, 3, 4, 5, 6日後に下顎骨を採取。固定、脱灰、パラフィン包埋し連続切片を作製。1) 免疫組織化学染色 (ED-1) にて破骨細胞前駆細胞・破骨細胞を含む全マクロファージ系細胞を同定し核数を計測した。2) 酒石酸耐性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色にて破骨細胞前駆細胞・破骨細胞を同定し核数を計測した。3) TRAP陽性破骨細胞核数/TRAP陽性細胞総核数の比率を求め破骨細胞への分化程度を検討した。4) 破骨細胞の骨吸収能を検討するため歯槽骨吸収窩底面長を測定した。t検定により両群間での有意差を統計学的に検定した。

(結果) 1) 抜歯後4, 5日では実験群では対

照群に比べED-1陽性細胞数が少なく有意差が認められた。2) 抜歯後4, 5日で実験群では対照群に比べTRAP陽性細胞数が少なく有意差が認められた。3) 抜歯後4, 5日の実験群で対照群に比べ比率が高く有意差が認められた。4) 実験群では対照群に比べ吸収窩底面長が長い傾向にあり、抜歯後2, 3, 4, 5日で有意差が認められた。

(考察) 1), 2)より破骨細胞前駆細胞を含む全マクロファージ系細胞の出現は抑制されているが, 3), 4)より破骨細胞の分化および機能は促進されていることが推察された。

(結論) COX-2を選択的に阻害すると, 破骨細胞前駆細胞の出現は抑制されるが, 破骨細胞の分化および機能には促進的に作用することが示唆された。

3) コレステロール合成阻害剤(スタチン)による骨芽細胞分化制御に関する研究

○前田 豊信

(奥羽大・大学院・生化)

(目的) スタチンは, HMG-CoA還元酵素の基質拮抗阻害剤であり, メバロン酸経路をブロックして, 肝でのコレステロール合成を阻害するため, 高脂血症治療剤として臨床的に広く用いられている。最近, このスタチンがコレステロール産生抑制以外の多面的効果(pleiotropic effect)を持つことが分かった。この効果には, 骨芽細胞分化制御能もあり, 注目されている。しかし, 依然としてメカニズムには不明なものも多いのが現状である。そこで, 本学でクローニングされた, マウス骨芽細胞株であるMC3T3-E1細胞を用いて, スタチンの1つであるシンバスタチンの骨代謝能について詳細に検討した。

(方法) MC3T3-E1細胞を10%FBSを含む α -MEM培地で培養した。コンフルエントになった細胞に, 50 μ g/ μ lアスコルビン酸と100mM β -クリセロホスフェートを加えて, シンバスタチン, あるいはインヒビターを添加して経時的に細胞をハーベスト後, 石灰化量をアニザリンレッドS法で, ノーザンブロット法・サザンブロット法で Bone morphogenetic protein(BMP)-2, BMP-4, Osteocalcin(OCN), Osteopontin(OCP), Type I

collagen(Col-1), Matrix metalloproteinase(MMP)-1, MMP-13のmRNA量を測定した。また, [3H]ラベルしたprolineでIn vitro Bone formation assayを行い, コラーゲンの合成量を調べた。

(結果と考察) MC3T3-E1細胞は10⁻⁷Mのシンバスタチンの添加により, Vehicle添加に比べ有意にBMP-2, OCN, Col-1の遺伝子転写は促進された。一方, MMP-1, MMP-13の遺伝子転写は抑制された。また, In vitro Bone formation assayでもコラーゲンの合成は促進されており, さらに非コラーゲン性蛋白も合成促進が見られた。そして10⁻⁶Mシンバスタチン添加では, 培養14日目でmineralized nodule形成はVehicle添加に比べて有意に促進した。しかし, この促進はコレステロール中間代謝産物であるメバロン酸やゲラニルゲラニルピロリン酸を加えることで消失した。また, Rho kinaseのインヒビターであるY-27632の単独添加でも同様の石灰化促進が起こった。シンバスタチンのMC3T3-E1細胞に対する石灰化促進作用は, メバロン酸代謝経路のブロックにより, ゲラニルゲラニルピロリン酸の合成を抑制し, Rhoなどの, Small GTP蛋白のプレニレーションが抑制する事が原因だと推察できる。これにより, BMP-2, OCN, Col-1のmRNA発現は促進されたと考えられる。これらの結果シンバスタチンは骨芽細胞において, 骨形成促進作用を有することが示唆された。

4) 骨芽細胞におけるスタチンのVEGF発現促進の解析

○松沼 礼子, 前田 豊信, 川根 徹也

阿部 匡聡, 堀内 登

(奥羽大・歯・生化)

(目的) コレステロール合成の律速酵素であるHMG-CoA還元酵素の特異的阻害剤であるスタチンは, 高コレステロール血症の治療薬として広く用いられている。最近, 私たちはスタチン類の一つであるシンバスタチンが骨芽細胞の分化を促進させることを見いだした。スタチンの骨芽細胞分化促進作用は骨形成因子の一つであるBMP-2の発現促進によることが知られている。