

な研究から明確になり、骨細胞の機能が注目されている。しかし、骨細胞の培養法についての報告はいくつかあるが、骨細胞としての機能を検索している報告はほとんど見られないのが現状である。このような背景から本研究は、骨再生療法の発展に寄与すべく、骨細胞の機能を分析するために、骨組織から骨細胞を分離培養する方法を確立することを目的とした。

【材料と方法】動物は2日齢の新生SDラットを使用し、頭蓋骨を摘出し、骨細胞を分離した。骨細胞の分離法はコラゲナーゼの酵素液とEDTAの脱灰液を交互に処理する方法を用いた。対照実験のために、ラット骨肉腫から分離された骨芽細胞株であるROS細胞を使用した。細胞の培養法は、10%牛血清を含んだ α -MEMを用いて5%CO₂環境の下、7日間の培養を行った。培養後の骨細胞のphenotypeの検索にはAlikaline phosphatase(ALP)染色、抗Sclerostin抗体、抗DMP-1抗体を用いた免疫組織化学的染色、real time PCRを用いたALP、Sclerostin、type I collagen、DMP-1、Osteocalcin、Osteopontin、PTH/PTHrP receptorのmRNA発現を調べ、骨芽細胞と比較検討した。

【結果と考察】培養7日目の細胞のALP染色では、細胞の集団の中に細胞突起を有したALP陰性の細胞が認められた。これら細胞には免疫組織化学的染色法により、骨細胞の特異的マーカーであるSclerostin、DMP-1の局在が認められた。Real time PCRの結果では、骨芽細胞の代表的な遺伝子発現として知られるALPとType I collagen mRNAの発現については、骨芽細胞の発現に比較して骨細胞様細胞での発現は約1/10だった。一方、骨細胞に特有に発現するSclerostinとDMP-1のmRNA発現では骨芽細胞の発現に比較して骨細胞様細胞での発現は約10倍だった。Osteocalcin、ostopontin、PTH/PTHrP receptorのmRNA発現は骨芽細胞および骨細胞様細胞の両者で同様に認められた。

以上の結果から骨組織から分離した細胞は、骨細胞特有の細胞突起を有する形態を示し、骨細胞特有の遺伝子発現を示した。

【結論】本実験で確立した細胞分離方法は、骨

細胞を研究する上で有用な方法であることが示された。

9) ヒト歯肉線維芽細胞からの炎症性サイトカイン産生に対するamphotericin Bの修飾作用

○小林 良志¹、玉井利代子^{1,2}、清浦 有祐^{1,2}
(奥羽大・大学院・口腔感染症¹
奥羽大・歯・口腔病態解析制御²)

【目的】抗真菌薬であるamphotericin B(AmB)は真菌に対して直接の殺菌作用を示すだけでなく、宿主の免疫担当細胞の免疫機能を亢進させる作用を持つことが報告されている。免疫機能の亢進時には、宿主に傷害作用をもたらす場合がある。本研究では、口腔常在細菌であるFusobacterium nucleatum (F. nucleatum)に対するヒト歯肉線維芽細胞の宿主応答に及ぼすAmBの影響を炎症性サイトカインの産生を中心にして明らかにすることを試みた。

【材料と方法】ヒト歯肉線維芽細胞は、96 wellマイクロプレートを使用して培養した。任意の濃度に調整したAmB溶液とF. nucleatum菌液を線維芽細胞に加えて、37°C条件下で24時間培養した。培養終了後に培養上清中のサイトカイン含有量をヒトELISAキットを使用して測定した。

【結果】1. AmBおよびF. nucleatumによるIL-6産生誘導作用

2.5 μ g/mlの濃度のAmBをF. nucleatumと同時に加えた場合は、F. nucleatum単独よりもIL-6の産生が有意に増強した。

2. AmBおよびF. nucleatumによるIL-8産生誘導作用

IL-8もIL-6と同様に2.5 μ g/mlの濃度のAmBをF. nucleatumと共に加えた場合に、IL-8の産生がF. nucleatum単独よりも有意に増加した。

3. F. nucleatumによるMCP-1産生誘導に対するAmBの抑制作用

2.5 μ g/ml濃度のAmBをF. nucleatumと同時に添加した場合は、F. nucleatum単独よりもMCP-1の産生が有意に抑制された。

以上のことから、AmBはIL-6やIL-8の場合とは異なり、歯肉線維芽細胞からのMCP-1の産

生を抑制することが明らかとなった。

【考察】*F. nucleatum* の刺激によって歯肉線維芽細胞からの IL-6, IL-8, MCP-1 の産生が誘導された。その中で MCP-1 のみが AmB によって産生が抑制され、その他のサイトカインは産生が増加した。この結果は、AmB によって歯肉線維芽細胞の Smad3 が活性化される可能性を示唆している。

10) *Candida albicans* のマクロファージ様細胞からの選択的サイトカイン産生誘導作用

○呂 正仁¹, 玉井利代子^{1,2}, 清浦 有祐^{1,2}

(奥羽大・大学院・口腔感染症¹

奥羽大・歯・口腔病態解析制御²)

【目的】本研究では、*Candida albicans* (*C. albicans*) の感染に伴って起こる宿主応答を明らかにするために産生が誘導されるサイトカインを *in vitro* の実験系で調べた。

【材料と方法】マウスマクロファージ様細胞である J774.1 細胞を 96 well マイクロプレートを使用して、37°C 条件下で、*C. albicans* 加熱死菌液を加えて 24 時間培養した。*C. albicans* の菌量は MOI1, MOI10, MOI100 の 3 種類の濃度になるようにした。J774.1 細胞の培養終了後に培養上清中の含有されるサイトカイン量をマウス ELISA キットで測定した。測定したサイトカインは IL-6, IL-1 β , MCP-1 の 3 種類であった。

【結果】

1. *C. albicans* によるサイトカイン産生の誘導

C. albicans 加熱死菌を J774.1 細胞に MOI10 以上の濃度で添加して 24 時間培養すると、加熱死菌を加えない場合と比較して IL-6 と MCP-1 の産生量が有意に増加した。しかし、IL-1 β は産生が認められなかった。また、MCP-1 は IL-6 よりも著しく多く産生された。

2. LipidA によるサイトカイン産生の誘導

グラム陰性細菌の細胞壁に存在する内毒素の構成成分である lipid A を J774.1 細胞に 100ng/ml の濃度で添加して、24 時間培養した。IL-6, MCP-1 および IL-1 β は有意に高い産生が認められた。

【考察】今回の結果から、*C. albicans* 菌体に

よる MCP-1 の高い産生誘導作用はカンジダ症の病態を特徴づける要因の一つとなることが示唆された。また、lipid A では有意に高い産生が認められた IL-1 β の産生が *C. albicans* では認められなかった。また、*C. albicans* では lipid A に比較して MCP-1 が IL-6 よりも多く産生されていた。このように、細菌と真菌では産生が誘導されるサイトカインの種類と量が大きく異なっていた。このようなサイトカイン産生の違いが、カンジダ感染症の病態の形成に大きな影響を与えている可能性が考えられた。特に今回、MCP-1 の産生が非常に強く認められたことは、*C. albicans* で感染防御の主体となる細胞性免疫が抑制されている可能性を示唆するものである。

11) *Candida albicans* によって誘導されるサイトカイン産生に対する alendronate の増強作用

○伊藤 榮一¹, 玉井利代子^{1,2}, 清浦 有祐^{1,2}

(奥羽大・大学院・口腔感染症¹

奥羽大・歯・口腔病態解析制御²)

【目的】*Candida albicans* (*C. albicans*) においても歯周病原性細菌で認められたような窒素含有ビスフォスフォネートの alendronate による炎症性サイトカインの産生増強が、同様に認められるかをマウスマクロファージ様細胞である J774.1 細胞を使用して調べた。

【材料および方法】J774.1 細胞を 96well マイクロプレートを使用して、37°C 条件下で各種濃度の alendronate を加えて 24 時間培養した。その後、*C. albicans* 菌液を各 well に 200 μ l ずつ加えて、さらに 24 時間培養した。*C. albicans* の菌量は MOI 1, MOI 10, MOI 100 の 3 種類の濃度になるようにした。J774.1 細胞の培養終了後、培養上清中の IL-6 と MCP-1 量をマウス ELISA キットで測定した。

【結果】

1. J774.1 細胞の IL-6 産生に及ぼす alendronate の影響

Alendronate を 100 μ M の濃度で添加後に *C. albicans* 加熱死菌を MOI10 の濃度で添加して 24 時間培養すると、死菌のみを加えた場合よりも有