

背景・目的：近年、Bisphosphonate (BP) 製剤の投与歴のある患者が侵襲的歯科治療を契機に顎骨壊死 (Bisphosphonate-Related Osteonecrosis of the jaw ; BRONJ) を生じたとの報告が相次いでいる (米田俊之他：ビスフォスフォネート関連顎骨壊死に対するポジションペーパー, 日本骨代謝学会他)。BRONJ の臨床所見のひとつである骨壊死の発症機序は未だ不明で、有効な治療法も確立されていない。

我々は抜歯後の創傷治癒において血球細胞の遊走を促すとともに、創閉鎖に働く歯肉線維芽細胞に着目した。これまで、歯肉線維芽細胞を含む間葉系の細胞においては、BP 製剤の投与によって増殖能が抑制されたとの報告があるが (Matthew J *et al*, Arch Oral Biol, 2011), 臨床適応時の最高血中濃度を上回る薬剤濃度での報告であり、その増殖抑制の機序は解明されていない。

そこで、本実験では最高血中濃度において、歯肉線維芽細胞への BP 製剤の影響を分子レベルで明らかにすることで、BRONJ 発症の一因を見つけることを目的とした。

方法：まず、初代培養したヒト歯肉線維芽細胞を限界希釈法により Single Cell-Derived Culture (SCDC) 細胞として単離・培養した。獲得した SCDC 細胞を形態ごとに分類し、実験に使用する細胞を選別した。次に、BP 製剤への反応性を探索するため、BP 製剤存在下で各 SCDC 細胞の増殖実験を行った。本実験には主に抗悪性腫瘍薬として臨床応用され、BRONJ 発症のリスクが高い BP 製剤のひとつであるゾレドロン酸水和物 (ゾメタ®) を用い、薬剤濃度はヒトの最高血中濃度 (Cmax) を基準とした。結果：1. 24 種類の SCDC 細胞を単離・培養し、実験に使用する 2 種類の細胞 (SCDC-1, 2) を獲得した。2. SCDC-2 に BP 製剤を 48 時間作用させた際に、Cmax での細胞増殖抑制を認めた。考察及びまとめ：本実験より、歯肉線維芽細胞には BP 製剤に強い反応性を示す細胞が存在し、このことが BRONJ 発症に関与している可能性が考えられた。今後、BP により引き起こされた増殖抑制の、分子レベルでの作用点を探っていくたい。将来的には口腔由来細胞を起点とした BRONJ 発症機序が解明されることで、創部細胞を標的とした新たな治療法の開発

に飛躍することが期待される。

4. スンクス口蓋のリンパ管構築

○畠山 慧, 三浦 廣行, 藤村 朗*, 佐藤 和朗

岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座
歯科矯正学分野, 解剖学講座機能形態学
分野*

背景・目的：口腔領域において、歯周疾患のような炎症性疾患や口腔癌に対する薬剤投与経路、さらに組織からの排導路の観点からリンパ管の機能は無視できない。しかし、脈管系のうち血管系については既に様々な観点と方法で報告が行われているが、リンパ管系についての報告は少ない。さらに、それらの多くは齧歯類を用いたものである。本研究では、有胎盤哺乳類の原型を保持していると言われているスンクス (*Suncus murinus*) を試料として用いる。スンクス口蓋粘膜下及び骨膜上のリンパ管の三次元的な構築を作成し、明確にする。そして、口蓋のリンパ管構築を検索することにより、薬剤の投与部位および経路の解明の基礎データとすることを目的とする。

方法：本研究には成体のスンクスを用いる。頸椎脱臼により屠殺後、頭頸部を採取する。組織構造精査のため、10%ホルマリンで固定、プランクリクロで脱灰し、アルコール上昇系列にて脱水、キシレンで透徹後、パラフィン包埋する。滑走式マイクロトームを用いて前額方向および矢状方向の 5 μ m 厚のパラフィン切片を作製する。リンパ管構築の検索のため、同じく摘出した試料を液体窒素にて冷却されたヘキサン液中で 5%カルボキシメチルセルロースにて凍結包埋する。クリオスタットを用いて Film transfer 法 (川本法) により前額方向および矢状方向の 10 μ m 厚の非脱灰凍結連続切片を作製する。パラフィン切片には HE 染色、凍結切片には酵素組織化学染色 (5'-Nucleotidase) を施し、パラフィン切片は光学顕微鏡にて観察、撮影する。凍結切片は同じく光学顕微鏡にて観察、撮影した後、コンピューター上で切片画像の軸合わせ、リンパ管の抽出を行い、三次元再構築像の作成を行う。

結果：スキンスの口蓋粘膜は角化した重層扁平上皮で覆われ、錯角化した部位は確認されなかった。上皮下に結合組織乳頭は殆ど見られず、わずかに見られる乳頭も丈が短い。硬口蓋後方や軟口蓋の上皮下には口蓋腺が確認された。上皮下結合組織には、上皮下から骨膜へ向かって走行する毛細リンパ管が見られた。現時点では切片上での二次元的観察に止まるが、樹枝状を呈した毛細リンパ管が散見され、隣り合うリンパ管が連絡し、リンパ管網を一層形成していることが推測される。また結合組織乳頭が殆ど存在しないために、リンパ管の盲端が乳頭部に入り込むような派出は見られなかった。

考察及びまとめ：今回の結果から口蓋の上皮下結合組織には盲端の派出が見られないリンパ管網が一層走行していることが判明した。今後は、この上皮下リンパ管網と骨膜上を走行する集合リンパ管の連絡状況、さらに同じ脈管である血管系との関連を明らかにし、炎症性疾患や口腔癌に対する薬剤投与部位、経路を探索する予定である。

5. シェーグレン症候群モデルマウスにおける耳下腺分泌障害機構の解明および正常 ICR マウスにおけるプリン受容体の解析

○守口 霞, 齋野 朝幸*

岩手医科大学歯学部口腔保健育成学講座
小児歯科学・障害者歯科学分野, 解剖学
講座細胞生物学分野*

背景・目的：シェーグレン症候群とは涙腺、唾液腺の分泌障害による乾燥性症状を主とし、外分泌腺の慢性炎症を引き起こす自己免疫疾患である。現在、ドライマウスに対しての治療法は人工唾液やアズレンなどによる口腔粘膜保護があるが、直接唾液腺からの唾液分泌を促す薬剤は使用されていない。

シェーグレン症候群の発生機序についてはまだ未知の点が多く、どの分泌機構に障害があるか詳細に調べられた報告はない。本研究ではモデルマウスを用いて各種分泌機構についてどの過程が障害されているかを明らかにし、シェーグレン症候群発症・進行の機序解明の第一歩になることを期待する。

あわせて、交感神経終末からノルアドレナリンと共に放出される他に、物理的刺激や傷害を受けた細胞から逸脱する Adenosine-5'-triphosphate (ATP) は、生体内伝達物質としての意義が注目されている。多細胞生物の組織・細胞の多様性に立脚すると、ATP に対する反応性が一様とは思われない。ATP が耳下腺の刺激-放出連関にどのように寄与するかを解明することは、上記疾患の検討のためにも臨床的にも極めて重要である。マウス耳下腺腺房細胞に及ぼす ATP の効果も、上記と同様に細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 変化を指標として検討した。

方法：雌マウス (NOD/ShiJcl 及び ICR 19-30W) を CO_2 ガスにて屠殺し、耳下腺を摘出した。摘出標本を HEPES バッファー中で純化コラゲナーゼ 100 U/ml を用い 37°C、1 時間消化した。その際に 15 分ごとに O_2 ガスを吹き付けた。消化後、100 メッシュフィルターを用いて細胞をろ過し、 Ca^{2+} 感受性色素 Indo-1/AM を付加した。その後、細胞をカバーガラスに固着させ、リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon RCM/Ab) によって $[Ca^{2+}]_i$ の画像解析を行った。併せて、Indo-1/AM 付加前の検体から mRNA を採取し、RT-PCR を行った。

結果：(1) シェーグレンモデルマウス (NOD/ShiJcl) と正常マウス (ICR) の比較

ノルアドレナリン (NA)・カルバコール (CCh)・ATP・PAR-2AP など様々な刺激を行い、 $[Ca^{2+}]_i$ 変化を指標として検討した。両群に比較的顕著に差が見られたのは、NA および ATP 刺激であり、NOD 群で $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が部分的に抑えられた。しかしながら、思ったほどの差とはならないためモデルマウスを再検討した方が良いと考え、新たに NOD/ShiLtg の導入を検討している。病気発症の確率を上げるために 20 週近い個体を用いるため実験に期間がかかる。

(2) 正常 ICR マウスでのプリン受容体の検討
ATP は正常 ICR マウス耳下腺腺房細胞において $[Ca^{2+}]_i$ の増加を引き起こした。細胞外 Ca^{2+} 除去、及び Ca^{2+} チャネルブロッカー投与によってもこの反応は消失しなかった。一方、ホスホリパーゼ C 特異的阻害薬の U73122 によって IP_3 産生を抑制してもこの反応は完全には消失しなかった。従って、細胞内からの Ca^{2+} 動員の他に、細胞外から Ca^{2+} 流入の機転が考えられ