

(MS) である *Streptococcus mutans* と *S. sobrinus* はともに (デンタル) ブラークを主要生息部位とする細菌で, 小児齲蝕の主たる原因細菌と考えられている。MS による齲蝕発症機序の詳細についてはこれまで, 測定法の問題もあり, MS が小児の口腔/ブラークに定着しているか否か, すなわち MS 感染の有無から小児齲蝕との関連性を検討したものがほとんどであった。しかし最近では, クオラムセンシングを含むブラーク細菌間のコミュニケーション機構の存在や局所 pH をはじめとするブラークの局所環境も, MS 感染とともに齲蝕発症機序に深く関与することが示唆されている。そこで本研究では, それらの結果としての, ブラーク中での MS の定着量および存在比率と齲蝕罹患率との関連性について, 菌種特異的 PCR 法 (c-PCR) および定量的リアルタイム PCR 法 (q-PCR) を併用して検討を行った。さらに, 全ブラーク細菌叢中および全ブラークレンサ球菌中での MS の存在比率についても検討を行った。

方法: インフォームド・コンセントの得られた小児患者 98 名を被験者とし, 口腔内診査後, 歯肉縁上ブラークを採取した。サンプルより DNA を精製し, MS の c-PCR による定性分析を行った。また c-PCR で陽性となったサンプルに関しては q-PCR による定量解析を行った。全ブラーク細菌叢中および全ブラークレンサ球菌中での MS の存在比率は, 16S rRNA および Elongation factor Tu の塩基配列をもとに設計したプライマーを用いた q-PCR 値を用いて算出した。齲蝕罹患率は df 歯率を用いた。

結果: c-PCR は q-PCR と比較してその感度は約 10 倍高かった。c-PCR による MS の定性解析では, 全 98 例中 60 例 (61.2%) に *S. mutans* が, 12 例 (12.2%) に *S. sobrinus* が検出された。c-PCR で *S. mutans* (+)-*S. sobrinus* (-) となった 49 例については q-PCR を併用することにより *S. mutans*^{high}-*S. sobrinus*^{negative} 群 ($Sm^{high}-Ss^{-}$; 30/49) および *S. mutans*^{low}-*S. sobrinus*^{negative} 群 ($Sm^{low}-Ss^{-}$; 19/49) に群分けされ, *S. mutans*^{high}-*S. sobrinus*^{high} 群 ($Sm^{high}-Ss^{high}$) および *S. mutans*^{negative}-*S. sobrinus*^{negative} 群 ($Sm^{-}-Ss^{-}$) を加えた 4 群間で齲蝕罹患率との関連性を検討した。その結果, df 歯率は $Sm^{high}-Ss^{high}$ 群で最も有意に高く, ついで $Sm^{high}-Ss^{-}$ 群も有意に高かった。また全細菌および全レンサ球菌

中における *S. mutans* の構成比率も $Sm^{high}-Ss^{high}$ 群で最も高かった。しかし, $Sm^{low}-Ss^{-}$ 群と $Sm^{-}-Ss^{-}$ 群の間には df 歯率の有意な差は認められなかった。

考察及びまとめ: 小児ブラークへの MS, 特に *S. mutans* の定着量が小児齲蝕の発症に深い関連性を有することが明らかとなり, MS の定量解析が小児における齲蝕リスクの効果的な予測手段となり得る可能性が示唆された。

14. ラット上頸神経節 (SCG) における脳下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (PACAP) 受容体の発現及び反応機構の解明

○磯部可奈子, 久慈 昭慶, 齋野 朝幸*, 横山 拓矢*

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: 下垂体アデニル酸シクラーゼ活性化ポリペプチド (Pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide: PACAP) には 38 アミノ酸からなる PACAP38 と, その N 末の 27 アミノ酸からなる PACAP27 の 2 種類がある。現在, ホルモン作用の他に, 神経伝達物質・調節因子としても働いていると考えられ, 中枢神経系においては神経保護作用が報告されている。しかしながら, 自律神経系, 特に交感神経節に対する研究はほとんどない。交感神経節である上頸神経節 (SCG) は, 歯科麻酔領域においても疼痛治療の際の標的器官であり, 上頸神経節において PACAP に対する反応性を解明することはきわめて臨床的意義が大きいと考えられる。本研究では, ラットの SCG での PACAP 受容体の発現の有無, 及び, その反応機構を細胞内 Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) 変動を指標として検討することを目的とした。

方法: 雄ラット (Wistar 8-12W) を炭酸ガスにて屠殺し, SCG を摘出した。標本を 3~4 分割し, 純化コラゲナーゼ 100 U/ml と Ca^{2+} 指示薬 Indo-1/AM 10 μ M 存在下で 37°C, 1 時間反応させた。その後, 標本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) を用い画像解析を行った。受容体の発現については, 色素付加前の検体か

ら mRNA を採取し、RT-PCR を行った。また、免疫組織化学法を用いて受容体の局在について確認した。

結果：RT-PCR の結果から、SCG に PACAP の 3 種の受容体 (PAC1, VPAC1, VPAC2) が発現している事が確認され、このうち PAC1 が優位であった。画像解析では、PACAP38 投与によって最初に衛星細胞、次いで神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ が上昇することが確認された。これは電子顕微鏡的解析により、神経細胞が密に衛星細胞によって取り囲まれているためではないかと考えられた。細胞外からの Ca^{2+} 流入を除いた状態では、衛星細胞の反応はほとんど阻害されず、神経細胞は部分的に阻害された。これにより、衛星細胞では細胞内ストアからの Ca^{2+} 動員が優位に働く事が示唆された。これに対し、神経細胞には何らかの Ca^{2+} 流入機構が存在する事が示唆された。細胞内ストアを枯渇させる事で、衛星細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇が完全阻害されることから、衛星細胞は IP_3 依存的な経路が優位に働いている可能性が高い。PKA を抑制すると衛星細胞はわずかに反応が阻害されたが、神経細胞は反応が阻害されなかった。VIP と VPAC1/VPAC2 アゴニストをそれぞれ SCG に作用させると、衛星細胞のみ反応を認めた。免疫組織化学法では PAC1 受容体の発現を認めた。

考察及びまとめ：SCG での PACAP38 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ 上昇機構において、衛星細胞と神経細胞の双方で IP_3 系が主に働いている事が示唆された。衛星細胞は cAMP 系も協調して働いている事が考えられ、神経細胞では cAMP 依存的な Ca^{2+} 流入経路の存在が示唆された。免疫組織化学法では PAC1 受容体のみを発現を認めたが、これは他の報告でも同様であった。RT-PCR の結果から、3 種の受容体が存在することを確認し、受容体の直接証明はできなかったが、今回の全ての結果をふまえると SCG で PAC1, VPAC1, VPAC2 すべての受容体が存在し衛星細胞と神経細胞でその分布が異なる可能性が示唆された。