

Clの濃度が低い結果となった。しかし、各サンプリング法の間で、定量値に大きな差はなかった。いずれの試料においてもサンプリング法によりスペクトルの結合エネルギーの値に違いは認められなかった。これらの結果か

ら、今回検討したサンプリング法により、リン酸カルシウムの化学状態は変化せず、定量性もサンプリング法の違いにより影響されないことが明らかとなった。

### 19. 共焦点レーザー顕微鏡によるヒト耳下腺培養細胞 (HSY cell) の細胞内カルシウム貯蔵部位のイメージング

○谷村 明彦<sup>1)</sup>, 東城 庸介<sup>1)</sup>, 松本 仁人<sup>1)</sup>,  
矢嶋 俊彦<sup>2)</sup>  
(<sup>1)</sup>歯科薬理学講座<sup>1)</sup>, <sup>2)</sup>口腔解剖学第一講座<sup>2)</sup>)

様々な細胞機能の調節にカルシウムが関与する事が知られている。受容体刺激などによって生成されるイノシトール3リン酸(IP<sub>3</sub>)は、細胞内Ca<sup>2+</sup>貯蔵部位(Ca<sup>2+</sup>ストア)のCa<sup>2+</sup>チャンネルを開きCa<sup>2+</sup>を細胞質に放出する。細胞内でCa<sup>2+</sup>ストアとして機能するオルガネラは小胞体であると考えられているが、機能的、形態的に異なるタイプのCa<sup>2+</sup>ストアが存在する可能性も指摘されている。本研究ではHSY cellを用いて、オルガネラ内のCa<sup>2+</sup>濃度の変化を解析する事により、Ca<sup>2+</sup>ストアとして機能するオルガネラの形態を解析する方法を確立したので報告する。

カバーガラス上で培養したHSY cellにカルシウム感受性蛍光色素mag-fura-redを取り込ませた後、細胞膜をサポニン(70μg/ml)で穿孔し細胞質中の蛍光色素を除去した。穿孔細胞をIP<sub>3</sub>(10μM)で刺激し、オルガネラ

内のmag-fura-redの蛍光強度の変化を共焦点レーザー顕微鏡(TCS4D)を用いて解析した。

IP<sub>3</sub>は核膜腔と細胞質全体に分布する網状のオルガネラ内に取り込まれたmag-fura-redの蛍光強度を増加させた。Mag-fura-redはCa<sup>2+</sup>濃度の低下により蛍光強度が増加する色素である事から、これらのオルガネラはIP<sub>3</sub>によってCa<sup>2+</sup>を放出するCa<sup>2+</sup>ストアであると考えられた。この網状のオルガネラは、非特異的オルガネラ・プローブ(DiOC<sub>6</sub>)で染色されたが、MitoTracker-green(ミトコンドリア・プローブ)やBODIPY-ceramide(ゴルジ体・プローブ)では染色されなかった。また電子顕微鏡による観察から、これが小胞体である事が明らかにされた。これらの結果からHSY cellでは核膜腔と小胞体全体がIP<sub>3</sub>感受性Ca<sup>2+</sup>ストアとして機能する事が明らかにされた。

### 20. 細胞外カルシウム濃度がヒト骨芽細胞のBMPsの遺伝子発現に及ぼす影響

○高橋 香苗, 中出 修, 賀来 亨  
(<sup>1)</sup>口腔病理学講座)

〈目的〉近年、細胞外カルシウムの上昇はヒト骨芽細胞の増殖を促進させ、その作用機序の一部はIGF-IIのup-regulationを介したものであることが報告されている。しかしながら、他の因子に及ぼす影響については未だ解明されていない。本研究は細胞外カルシウム濃度がヒト骨芽細胞のBMPs(Bone Morphogenetic Proteins)の遺伝子発現に及ぼす影響について調べた。

〈方法〉1. 細胞はヒト下顎骨由来正常骨芽細胞(HOB-M)を用いた。2. 細胞外カルシウム濃度の上昇(CaCl<sub>2</sub>・0~1.2mM)がHOB-Mの細胞増殖に及ぼす影響を [<sup>3</sup>H] thymidineの取り込みを指標とした細胞増

殖アッセイにより検索した。3. 同様に細胞外カルシウム濃度がHOB-Mの細胞アルカリフォスファターゼ(ALP)活性に及ぼす影響を濃度依存性に調べた。4. 同様に細胞外カルシウム濃度がHOB-MのBMPs(BMP-1~7)のmRNAの遺伝子発現に与える影響をRT-PCR法により、時間依存性(0, 5, 24h)に調べた。

〈結果〉1. 0.1~1.2mMの細胞外のCaの上昇は [<sup>3</sup>H] thymidineの取り込みを有意に増加させたがALP活性を刺激する効果は認められなかった。2. 細胞外のCaの上昇(最適濃度0.1~0.4mM)は0.5hおよび24hにおいてBMP-2, -4, -5のmRNAの発現を著しく増加させ

た。

〈結論および考察〉 ヒト骨芽細胞において細胞外カルシウムの上昇は、細胞増殖作用促進に働き、細胞分化を促進する効果はほとんど認められないが、BMP-2, -4, -5のmRNAレベルを上昇させる作用は有する。これらの

結果は骨吸収後あるいは合成ハイドロキシアパタイト埋入後の骨形成促進作用にカルシウム濃度上昇が関与し、その作用のメカニズムの一つとして骨芽細胞におけるBMP-2, -4, -5の産生上昇が関与する可能性が示唆された。

## 21. 歯肉線維芽細胞に対するPorphyromonas gingivalis由来プロテアーゼの影響

○森 修二<sup>1)</sup>, 大井戸真理<sup>1)</sup>, 河合 治<sup>1)</sup>,  
加藤 幸紀<sup>1)</sup>, 上原いずみ<sup>1)</sup>, 澤田 圭子<sup>1)</sup>,  
王 宝禮<sup>2)</sup>, 小鷲 悠典<sup>1)</sup>

(歯科保存学第一講座<sup>1)</sup>, 大阪歯科大学 薬理学講座<sup>2)</sup>)

これまで我々は、歯周組織の主要な構成細胞である歯肉線維芽細胞が*Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*)由来LPS刺激によりInterleukin-6 (IL-6)を産生することを報告した(日歯保誌 38:1280-1289, 1995)。さらに我々は、歯周病原性因子として重要と考えられる*P. g.*プロテアーゼがこのLPS刺激によるIL-6の産生を抑制し、それは*P. g.*プロテアーゼが歯肉線維芽細胞膜上のLPSレセプターと考えられるCD14分子を破壊するためであることを明らかにした(J Dent Res, 75:274, 1996)。今回我々は、歯周病発症における*P. g.*プロテアーゼの病原性発現のメカニズムを解明するために、ヒト歯肉線維芽細胞の細胞間マトリックスであるフィブロネクチン、および接着分子であるICAM-1, VCAM-1, VLA-4の発現に対する*P. g.*プロテアーゼの影響について検討した。*P. g.* 381株培養上清からアセトン分画・ゲル濾過し、分子量44kDaのプロテアーゼを抽出精製した。無血清条件下にて*P. g.*

プロテアーゼでヒト歯肉線維芽細胞を刺激する実験系を確立した。細胞の形態観察は位相差顕微鏡により行い、生細胞数はMTT発色試薬を用い測定した。さらにフィブロネクチン量はELISA法にて測定した。線維芽細胞膜上のICAM-1, VCAM-1, VLA-4の発現は、フローサイトメーターを用い調べた。

その結果、*P. g.*プロテアーゼはフィブロネクチンを急速に破壊し、細胞を死に至らせた。しかし細胞死に至る過程において、ある一定期間細胞膜上の接着分子の発現が亢進した。この理由として、生存を維持しようとする細胞自身の防御機能が働いていることも考えられた。

*P. g.*プロテアーゼは、少なくとも感染初期においては、細胞膜上の生体防御に重要なレセプターや細胞接着分子を早期に破壊することによりその病原性を発現し、歯周病発症の関与している可能性が示唆された。

## 22. 歯周炎におけるfilm gelatinase法によるin situ gelatinase活性解析

沓澤 政幸<sup>1)</sup>, 安彦 善裕<sup>2)</sup>, 加藤 賀史<sup>1)</sup>,  
小鷲 悠典<sup>1)</sup>, 賀来 亨<sup>2)</sup>

(歯科保存学第一講座<sup>1)</sup>, 口腔病理学講座<sup>2)</sup>)

細胞外matrix成分の分解酵素であるmatrix metalloproteinases (MMPs)の存在は、歯周疾患の進行に大きく関わっていると考えられる。特にgelatinase(MMP-2, MMP-9)は、歯周組織の構成成分であるtypeIV-collagen, laminin, fibronectinおよびproteoglycanなどを破壊する作用を有し、歯周疾患の進行において重要な役割を担っていると考えられる。歯周組織におけるgelatinaseの同定は、これまで主に生化学的にgelatinase

蛋白およびその活性化の程度の評価が行われ、組織学的には、その蛋白およびmRNAの発現部位についての検索が行われてきた。しかしながら、活性化の程度を組織切片上で解析した研究は未だ行われていない。そこで今回我々は、新たに開発されたgelatin filmを用い、歯周疾患罹患組織中の活性型gelatinaseの分布状況について検索を行い、興味ある知見が得られたので報告する。sampleは、当大学附属病院を受診し、成人性歯周炎または智歯