

4. ヒト歯髄における骨芽細胞転写因子cbfa1/Pebp2 α A遺伝子発現の LightCyclerによる定量的評価

○西村 学子, 安彦 善裕, 三田村治朗,
村田 勝*, 柴田 敏之*, 有末 眞*,
賀来 亨

(北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・口腔外科学第二講座*)

(**緒言**) cbfa1/Pebp2 α Aは、骨芽細胞に必須の転写因子として最近発見された遺伝子であり、筋芽細胞へのMyoD、脂肪細胞へのPPAR γ 2と並んで、未分化間葉系細胞の分化方向を決定づける重要な因子である。歯髄組織中には生理的な状態で多数の未分化間葉系細胞が存在しており、必要に応じて象牙芽細胞へと分化し、象牙質の形成を行う。本研究では、ヒト歯髄組織におけるcbfa1/Pebp2 α A mRNAの発現を、最近開発されたLightCyclerを用いることにより定量的に評価した。

(**材料および方法**) 材料には、歯周炎や智歯、便宜的な理由などで抜去された歯牙で、明らかなう蝕のないものを用いた。歯牙を切断し、歯髄組織を摘出してtotal RNAを抽出した。Oligo (dT) primerによる逆転写の後、ヒトcbfa1/Pebp2 α Aおよびosteocalcinに対するprimerを用いたRT-PCRを行った。また、同じprimerを用い、SYBR

Green I でLightCyclerによる定量的RT-PCR法を行った。

(**結果**) 今回用いた歯髄組織の大半で、発現の強弱はあるものの、cbfa1/Pebp2 α A primerによりシングルバンドが得られ、そのmRNAの発現していることが確認された。LightCyclerによる定量的RT-PCR法により発現の強弱を数値化すると、年齢分布と発現との間に相関関係が認められた。すなわち、若年者の方が老年者に比べ明らかに発現が増強していた。また、cbfa1/Pebp2 α Aの発現が強いものではosteocalcinの発現も増強していた。

(**考察および結論**) 以上の結果から、歯髄組織中の未分化間葉系細胞の象牙芽細胞への分化にもcbfa1/Pebp2 α Aが関与しており、その発現は年齢と共に減少していくことが示唆された。

5. Prevotella属からのバクテリオファージの誘発

○宮川 博史, 寺山 千恵, 鎌口 有秀,
馬場 久衛

(北海道医療大学歯学部口腔細菌学講座)

宿主である細菌染色体に組み込まれたファージ遺伝子は宿主の病原性や性状に関連することが知られている。また、このようなファージ遺伝子は紫外線や化学誘発物質処理することで誘発され増殖する。我々はこれまでに歯周病原性細菌の中でPrevotella (*P*) *intermedia*において、このようなファージが存在していることを明らかにしてきた。一般に口腔内にはその他にもPrevotella属の菌種が常在していることが知られているが、これらPrevotella属菌種と歯周疾患との関連性については明らかになっていない。今回我々は、Prevotella属におけるファージの存在と病原性との関連性について調べるために*P. intermedia*で誘発されるバクテリオファージが他のPrevotella属菌種からも誘発されるかどうか検討した。

Prevotella属7菌種を早期対数増殖期まで培養し、UV照射またはマイトマイシンC添加処理し、その後、培養液

の濁度を経時的に測定して溶菌の有無を調べた。誘発実験の結果、各菌種でUV照射やマイトマイシンC添加処理によって程度の違いはあるものの濁度の減少が見られた。

こうした濁度の減少がみられた試料をクロロフォルム処理後、低速遠心、濾過により菌体を除去し、さらに超遠心によりバクテリオファージを集め、滅菌水で懸濁後、リンタンングステン酸によりネガティブ染色して透過型電子顕微鏡にて観察した。その結果、*P. oris*と*P. loeschei*においてバクテリオファージが誘発されていることがわかった。また、ファージの大きさも誘発した菌種により違いが見られた。しかし、その他の5つの菌種ではバクテリオファージは観察できず、これらの菌種での濁度の減少は、autolysisによるものと考えられた。今後、これらPrevotella属におけるバクテリオファージ遺伝子を調

へ、病原性や性状との関連性について随時明らかにしていきたいと考えている。

6. *Prevotella intermedia*と*Prevotella nigrescens*の溶血因子とその遺伝子についての1検討

○鎌口 有秀, 宮川 博史, 寺山 千恵,
馬場 久衛
(北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室)

*Prevotella intermedia*と*Prevotella nigrescens*は血液寒天培地において*Porphyromonas gingivalis*より強い β -hemolysisの溶血環を生じるが、この溶血因子の歯肉溝内での作用は不明である。我々はこの溶血因子の性状と作用を検討しているが、つい最近*P. intermedia*の溶血因子の遺伝子がcloningされた。そこで、この遺伝子と溶血性の関連について若干の検討を行った。

*P. intermedia*の溶血因子の遺伝子のシーケンスを参考にしてprimerを作製し、*P. intermedia*と*P. nigrescens*のchromosomal DNAをtemplateとしてPCRを行い同遺伝子の検出と血液寒天培地における溶血性、液体法による溶血性を比較した。また各PCR産物のシーケンスを調べ、それらのホモロジーも検討した。

*P. intermedia*の溶血因子の遺伝子は3領域(ORF1, ORF2, ORF3)よりなると報告されている。しかし、PCRの結果用いた両菌種では3領域とも保有する菌株は非常に少なく、他の菌株は2領域(ORF1, ORF2)のみを保有していた。供試した株は血液寒天培地上での溶血環を形成したが、液体法による溶血性は3領域をもつ菌株においては溶血性が殆ど無いか非常に弱かった。一方上記の2領域をもつ菌株においては弱い溶血性を示す株と強い溶血性を示す株があった。これらの溶血性と遺伝子との関係は既に報告されているものと一致がみられなかった。このことより、*P. intermedia*や*P. nigrescens*にはさらに別の溶血因子と遺伝子が存在する可能性が示唆された。

7. 上皮細胞での β ティフェンシン発現の変化

○安彦 善裕, 加藤 幸紀*, 荒川 俊哉**,
三田村治朗, 西村 学子, 中島 啓介*,
溝口 到***, 小鷲 悠典*, 田隈 泰信**,
賀来 亨

(北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・保存学第一講座*・口腔生化学講座**・歯科矯正学講座***)

(緒言) われわれは昨年の本学会において、抗細菌性タンパクである β ティフェンシン(hBD)が口腔上皮細胞およびさまざまな口腔癌細胞で発現していることを発表した。そのなかで、口腔癌細胞株SCC-9ではhBD-1およびhBD-2いずれも発現しているものの、KB細胞ではhBD-2の発現レベルが極めて低いことを実証した。本研究では、これらの細胞のhBDの発現における炎症性サイトカインおよび細菌の影響について検討した。炎症性サイトカインの一種であるIL-1 β , LPS, および若年性歯周炎の原因菌とされている*Actinobacillus actinomycetemcomitance* (AA)による変化について検討した。

(材料および方法) 細胞には、口腔癌細胞株SCC-9細胞およびKB細胞を用いた。hBD mRNAの発現を観察する

ために、total RNA抽出の後、Oligo (dT) プライマーよりcDNAを作製し、hBDに対するプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。定量的な検索は、SYBR Green Iを用いたLightCyclerによる定量的RT-PCR法を行った。炎症性サイトカインとしてIL-1 β , LPS, および細菌には、若年性歯周炎の原因菌とされている*Actinobacillus actinomycetemcomitance* (AA)を用いた。いずれも添加後24時間時にtotal RNAを抽出し、同様に検索を行った。さらに、in situ hybridizationによる検索も行った。

(結果) 通常の培養条件下で、SCC-9でのhBD-2 mRNAの発現は、KB細胞に比へ約5倍であった。SCC-9でのhBD-2 mRNAの発現はIL-1 β 添加により2.5倍に、