

Vol. 99 No. 2 December 2025

日大歯学

Nihon University Dental Journal

日本大学歯学会

NIHON UNIVERSITY SOCIETY OF DENTISTRY

日大歯学
Nihon Univ.
Dent. J.

ISSN 0385-0102

日 大 歯 学

第 99 卷 2 号 令和 7 年 12 月

目 次

特別依頼原稿

第77回日本大学歯学会特別講演寄稿

難治性根尖性歯周疾患へのマクロとミクロのアプローチ

武 市 収 46

原 著

Leptin receptor陽性細胞のlow-density lipoprotein receptor-related protein 1欠損が骨形成に与える影響

飯 谷 仁 志 54

IL-1 receptor type 1によるIL-1 α の細胞内分解調節に関する研究

保 坂 万 智 63

歯学部付属歯科病院における患者動向および診療体制にCOVID-19流行が及ぼした影響

武 内 伸 賢 69

接着性舌側リテーナーのワイヤーと接着材に及ぼす大気圧窒素プラズマ処理の影響

高 田 麻 希ほか 78

拘束性ストレスと卵巣摘出による口腔内灼熱症候群モデルマウス作製の試み

米 本 真実子ほか 83

歯髄炎に起因した顔面部異所性疼痛に対する三叉神経節内Nav1.7阻害の有効性

北 條 泰ほか 93

その他

第77回日本大学歯学会総会・学術大会

〔抄録〕

99

〔議事録〕

108

第99巻総目次

Nihon University Dental Journal

Vol.99, No.2

December 2025

CONTENTS

Special Contribution Paper

The 77th Nihon University Society of Dentistry Special Lecture

Macroscopic and microscopic approaches for persistent apical periodontitis Osamu Takeichi 46

Original Article

Effect of leptin receptor-positive cells lacking low-density lipoprotein receptor-related protein 1 on the bone formation Hitoshi Kariya 54

Regulation of intercellular degradation of IL-1 α by IL-1 receptor type 1 Machi Hosaka 63

Effect of the COVID-19 on visit patient trends and treatment system at the dental hospital Nobumasa Takeuchi 69

Effect of atmospheric pressure nitrogen plasma on wires and adhesive in bonded lingual retainers Maki Takata and others 78

Experimental establishment of restraint stress and ovariectomy-induced mouse model for burning mouth syndrome Mamiko Yonemoto and others 83

Efficacy of intra-trigeminal Nav1.7 inhibition for orofacial ectopic pain caused by pulpitis Yasushi Hojo and others 93

Others

The 77th General Meeting and Scientific Meeting of Nihon University Society of Dentistry

[Meeting Abstract] 99

[Meeting Minutes] 108

Index to Vol. 99, 2025

第 77 回日本大学歯学会特別講演寄稿

難治性根尖性歯周疾患へのマクロとミクロのアプローチ

武 市 収

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座

要旨：根尖性歯周炎は根尖歯周組織の破壊を伴う炎症性疾患であり、咬合痛、自発痛や歯肉腫脹などの症状を誘発する。口腔内常在菌の根管感染によって生じることから、一般的に根管内感染細菌や感染象牙質などを除去する目的で感染根管治療（以下根管治療）が実施される。根管治療によって多くの根尖性歯周炎は治癒するが、根管治療は複雑な根管系に対する治療であり、簡単な治療ではない。そのため、根管治療を繰り返してもなかなか治癒せず、難治化する症例も少なくない。また、根管治療の偶発症として知られる根管形態の破壊、根管壁への穿孔および根管内でのファイル破折などを生じた症例では、十分な治療ができず、最終的に抜歯が適応と判断されることもある。近年、手術用顕微鏡が歯内治療に応用されるようになり、これまで手探りでやってきた根管治療が明視下で精密に実施できるようになってきた。これによって抜歯と判断された根尖性歯周炎患者であっても、保存可能な症例が格段に増えている。しかし、治癒したようでも突然疼痛や歯肉腫脹を生じるフェニックス膿瘍は、身体の不調により生じるとされているが、難治性根尖性歯周炎に限らず、感染細菌だけを病因として捉えるだけでは十分な説明がつかないこともある。

Epstein-Barr ウイルス（以下 EBV）はヒトヘルペスウイルスの一つであり、バーキットリンパ腫患者から検出・同定された。興味深いことに、ヒトに感染すると潜伏性を示すが、再活性化することにより炎症を惹起する。仮に、根尖性歯周炎が EBV に感染していると仮定すると、潜伏感染した EBV が再活性化することで根尖性歯周炎を誘発している可能性が示唆される。しかし、根尖性歯周炎は細菌感染によって生じることがスタンダードな考えとなっており、ウイルスが関与する可能性について検索された研究は少なく、未だに不明な点が多い。難治性根尖性歯周炎に対する EBV の関与が明らかにされれば、根管治療で治癒しない、あるいはフェニックス膿瘍を生じる原因が明らかになり、根尖性歯周炎の治癒や再発を生じないようにするための治療法が確立されるものと思われる。

本稿では、抜歯が適応とされた難治性根尖性歯周炎患者に対する治療例および難治性根尖性歯周炎患者の根尖病変組織を用いた EBV 研究に関する最新の知見を紹介し、難治性根尖性歯周炎に対する臨床的（マクロ）および基礎研究的（ミクロ）アプローチについて概説する。

キーワード：難治性根尖性歯周炎、フェニックス膿瘍、手術用顕微鏡、Epstein-Barr ウイルス、炎症性サイトカイン

Macroscopic and microscopic approaches for persistent apical periodontitis

Osamu Takeichi

Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry

Abstract : Apical periodontitis (AP) is an inflammatory disease with an alveolar bone resorption. Clinically, the patients complain occlusal pain, throbbing pain, or swelling of mucous membranes around the apex. AP is caused by bacteria commonly found in the oral cavity, and root canal treatment is performed to eliminate the bacteria from the root canal. The root canal treatment is effective for most AP patients; however, some AP patients are not well healed with the treatment because of complicated root canal systems. In addition, procedural accidents such as apical transportation, perforation, or breakage of root canal instruments are very difficult to recover, and dentists sometimes decide to extract the teeth. Recently, operative microscopes were introduced to endodontic treatments, and we can perform precise treatments with bright and enlarged fields in root canals. We can save teeth by means of operative microscopes, even if patients are diagnosed with tooth extraction. On the other hand, a phoenix abscess is an acute exacerbation of a chronic AP, and throbbing pain or swelling of mucous membranes around the apex are typically caused. The reason for occurring the disease is related to the patient's condition; however, the pathogenesis is not well understood.

Epstein-Barr virus (EBV) is one of herpesviruses and were established from Burkitt lymphoma patients. Interestingly, EBV stays latency after infection to human and does not cause inflammation; however, once the EBV is reactivated, the EBV causes inflammation. It is hypothesized that reactivated EBV infected AP patients could be related to apical inflammation. Pathogenesis of AP is thought to be bacterial infections, and viral infections to AP are not well examined yet. Thus, the study of EBV associations to AP gives us useful information for the pathogenesis and treatment procedures of persistent AP and a phoenix abscess.

This manuscript summarizes clinical approaches to persistent AP with the usage of operative microscopes. In addition, current findings of reactivated EBV in AP and novel clinical approaches of persistent AP are introduced.

Keywords: persistent apical periodontitis, a phoenix abscess, operative microscopes, Epstein-Barr virus, inflammatory cytokines

(受付：令和 7 年 9 月 26 日)

責任著者連絡先：武市 収

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8132

FAX : 03-3219-8348

E-mail : takeichi.osamu@nihon-u.ac.jp

はじめに

歯科の一般臨床において根尖性歯周炎患者の治療を行わない日はない。根尖性歯周炎患者が多い理由は様々であるが、複雑な根管系に対する治療は難しく、また手探りで行うため、同じように治療を行っているようでも、治ったり治らなかったりする。事実、抜髄や感染根管治療などのイニシャルトリートメントにおける成功率は85%であるが、再根管治療症例の成功率は30~50%程度であり¹⁾、治療が終了したにも関わらず、再発してしまった症例は負のループのように再発を繰り返すことになる。

近年、手術用実体顕微鏡（マイクロスコープ）が歯内療法に応用されるようになってきた。マイクロスコープの使用により、手探りで行ってきた根管内の探索と治療を明視下で行うことが可能となり、抜髄あるいは抜歯が適応と診断された症例であっても、歯髄や歯の保存を図ることが可能な症例が増えてきた。

著者が歯内療法学講座に入局し、大学院生として研究を行いつつ臨床も行っていた際、臨床症状を示さない無症候性根尖性歯周炎患者が急に咬合痛、自発痛、歯肉腫脹を生じることを目の当たりにした。教科書では、無症候性であっても何らかの理由で細菌性刺激が有意となり、症状を生じるようになることとされている²⁾。これは、当時も今も変わらず記載されているが、これに多くの疑問を感じていた。そこで当時、根尖性歯周炎の病因として、自身を攻撃してしまう自己免疫疾患説とウイルス感染説の二つの仮説を立てた。自己免疫疾患説を思い立った理由は、外科的に摘出した根尖病変組織にCD5陽性B細胞の割合が多かったことに起因する。

著者は、これまでマイクロスコープを用いて数多くの患者の治療を手掛け、また難治性根尖性歯周炎の病態を解明する一助としてEpstein-Barrウイルス（以下EBV）に関する研究を行ってきた。EBVは自己免疫疾患に関与することが報告されており、著者が長年抱えてきた仮説に大きく関連するものがある。そこで、臨床と研究を融合した難治性根尖性歯周炎に対するアプローチについて紹介したい。

1. Modern Endodontic Therapy

一口に根管治療といっても、その手技は検査、根管形成、根管清掃、根管貼薬、根管充填と様々なステップで構成されている。近年、この全てのステップで歯内療法に関する新しい機器、材料や治療法が応用されるようになってきた（表1）。特に、マイクロスコープ、歯科用コーンビームCT（CBCT）およびニッケルチタンファイルは歯内療法の三種の神器と言われ、これにMineral Trioxide Aggregate（MTA）といったバイオセラミックス系材料を加えると、難治症例を含めた非常に幅広い症例に対する

治療を可能にする。また、これらの機器や材料は日々進歩を遂げており、より使いやすく、安価になっている。

2. マイクロスコープの応用

マイクロスコープが具備すべき条件は拡大、照明、記録である。すなわち、狭く、暗い根管内の検査、探索、治療を行う際、手探りで行っていた歯内療法が、明るい視野下で根管内を拡大し、手に取るように根管内の状況を把握しつつ治療が行える。いわゆる、エンドの可視化を可能とした。

1) 拡大

視野拡大装置にはマイクロスコープの他、双眼ルーペがある。双眼ルーペの拡大率は2~8倍程度、あるいは10倍のものもある。一方、マイクロスコープの拡大率は40倍までと双眼ルーペに比較して格段に高い倍率を誇る。ただし、マイクロスコープの使用法としてchecking view（観察時倍率）とworking view（治療時倍率）があり、checking viewでは5~20倍程度で使用するが、working viewでは5~10倍程度の弱拡大で使った方が画像の揺れが少なく、使いやすい。

対物レンズはマイクロスコープの性能を決定づける重要なパーツである。焦点距離は200 mmあるいは250 mmであるが、バリオスコープを装着することで200~300 mmの範囲で焦点を合わせることが可能となる。電動フォーカス装着機種では、焦点距離が200~450 mmと長くなるため、さらに使いやすくなる。

2) 照明

一般的にハロゲンライトが使用されるが、光源としては暗く、根尖孔付近の観察時にストレスを感じてしまう。高輝度の光源として、キセノンやLEDがオプション設定されている。対物レンズから光が照射されるため、同軸と思われがちであるが、鏡筒内に二つの穴を有するビームスプリッターが装着されており、それぞれ観察用と照明・録画用として使用している。そのため、照明や録画時の範囲は視野と比較して若干のズレが生じる。

表1 Modern endodontic therapy

治療のステップ	使用機器・薬剤・方法 など
検査・治療	マイクロスコープ
	歯科用コーンビームCT
根管形成	ニッケルチタンファイル
根管洗浄・清掃	根管清掃用機器
根管貼薬	水酸化カルシウム製剤
根管充填	CWCT法 Hydraulic condensation technique
失活根未完成歯の治療	再生歯内療法(Revascularization)
直接覆髄法 生活歯髄切断法	Vital pulp therapy 低位断髄法

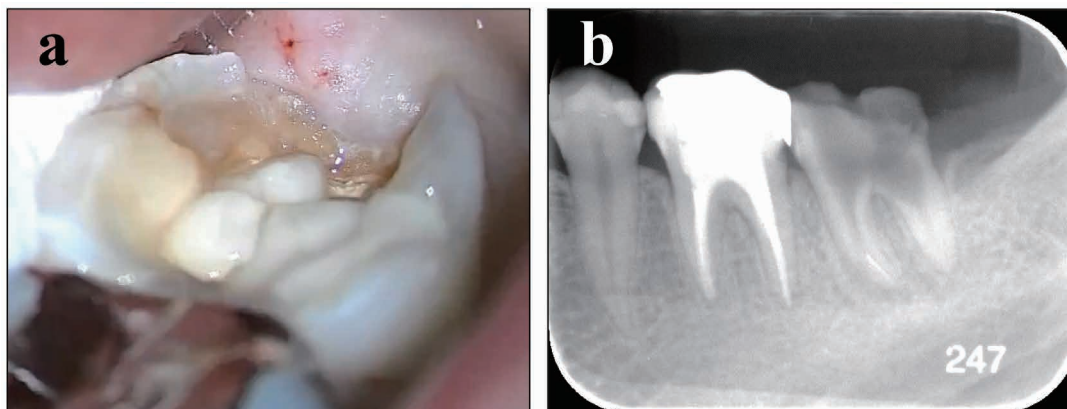


図1 術前口腔内写真およびエックス線写真
a 術前口腔内写真, b 術前エックス線写真

3) 記録

静止画とビデオ動画が記録可能である。静止画の記録にはデジタルカメラ、動画の記録には家庭用ビデオカメラを使用することが可能である。録画装置がマイクロスコープに内蔵されているものもあれば、カメラなどを後付けできるものもある。ハイビジョン化しており、録画装置の進歩と共に画質は年々向上している。

コロナ禍においては、第5学年院内実習生が診療ユニットから離れて実習見学を行っていた。術者の背中を見るだけの実習で、治療の実際を一切見ることができなかった。一方、マイクロスコープにカメラを装着することにより、術野をモニターに映し出すことが可能であることから、コロナ禍においても院内実習生は術者が行っている治療を見て学ぶことができ、教育効果の向上に大きく寄与した。

3. 難治性根尖性歯周炎患者に対するマイクロスコープの臨床応用

—根管ファイル破折と根管側壁穿孔を同時に生じた症例—

1) 患者および患歯の情報

主 訴：左下奥歯の神経を取ってもらったが、いつまでも痛みが消えない

患 者：38歳、女性

現病歴：3年前に下顎左側第二大臼歯の齲蝕処置を受け、その後疼痛もなく経過良好であった。4か月前に拍動性自発痛を生じたため近医を受診したところ、抜髄処置を受けた。その後、何回受診しても痛みが取れず、歯内療法専門医による治療の必要性を説明され、紹介された。

既往歴：特記事項なし

現症の診査：

視 診：仮封は脱落しており、歯冠部遠心歯質の欠損および欠損部辺縁歯質を覆う増殖歯肉を認める（図1 a）。

咬合痛、打診痛および根尖部歯肉の圧痛あり。

エックス線検査：近心根の根尖付近にファイルが残留しており、その部分に一致して近心側歯槽骨にJ字のびまん性透過像を認める（図1 b）。

2) 治療経過

(1) 初診時

エックス線撮影後に、その読影所見と治療計画について説明を行い、コーンビームCTを撮影した。

(2) 2回目来院時

遠心欠損部の隔壁を行ったのち、破折ファイルと根管歯質の間にスペースを作るよう、CPR超音波チップ（Obtura Spartan, Fenton, MO, USA）を用いて根管象牙質の切削を行った。その後、超音波チップを用いて破折器具の除去を実施した（図2 a, b）。続いて、穿孔部に入り込んだ肉芽組織をNd：YAGレーザーで除去し、ProRoot MTA（デンツプライシロナ, Charlotte, NC）を用いて穿孔部の封鎖を行った（図2 c）。

(3) 3回目来院時

根管のネゴシエーションを行い、作業長の決定を行った（図2 d, e）。ニッケルチタンファイル（Hy-Flex EDM：Coltene, Altstätten, Switzerland）を用いて根管形成を行い、19% EDTA（ファイリーズJ）を用いてスミヤー層の除去を行った。カルシペックスを根管内に貼薬したのち、二重仮封を行った。

(4) 4回目来院時

症状が消失したのを確認し、Continuous wave condensation techniqueを用いて垂直加圧根管充填を行った。紹介元で補綴処置を行ってもらおう依頼した。

(5) 5回目来院時

3ヶ月後の来院時にエックス線検査を行ったところ、根尖部透過像は縮小しており、経過良好で

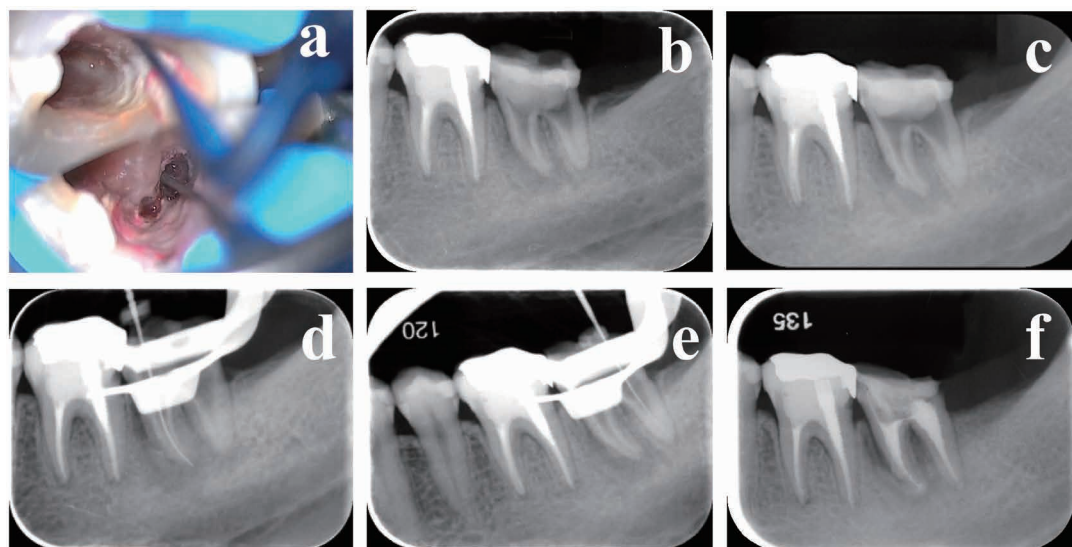


図2 術中口腔内写真およびエックス線写真

a 超音波チップを用いたファイル除去, b ファイル除去後の確認, c 穿孔部封鎖後の確認, d, e 近心および遠心根へのファイル試適, f 根充後5か月経過

あった(図2f)。仮封の状態のまま経過していたため、紹介元には直ちに築造処置を行うよう依頼した。

3) マイクロスコープを用いた歯内治療

複雑な根管系に対して行う根管治療は、高度なテクニックを要する難しい治療である。そのため、根管内ファイル破折や穿孔といった偶発事故を生じることは少なくない。重要なポイントは、偶発事故に対して的確な治療を行えるかということにある。これまで手探りでやってきた治療であっても、マイクロスコープを用いることで手に取るように治療が行える、いわゆるエンドの可視化が実践できるようになった。マイクロスコープを用いることで歯内療法における予知性の高い治療を可能にした。

4. EBV による根尖歯周組織の破壊

1) EBV の特徴

- (1) 1963年、Epstein 博士と Barr 博士により、バーキットリンパ腫患者から検出された。ヒトヘルペスウイルス(表2)のうちの4型である³⁾。
- (2) 日本に限らず、世界的にも人口の90%以上に感染しており、伝染性単核球症(kissing disease)を誘発することで知られている⁴⁾。
- (3) B細胞や上皮細胞に特異的に感染する。感染後は持続的に感染しており、生涯に渡って体内から排除されることはない⁵⁾。潜伏性を示すが、再活性化すると炎症を誘発する。
- (4) 潜伏感染EBVは、B細胞からlatent membrane protein-1(LMP-1)タンパクやEBV-encoded small RNA(EBER)遺伝子の発現を誘導する⁶⁾。

- (5) 潜伏感染EBVが再活性化すると、感染細胞からBamHI Z fragment leftward open reading frame 1(BZLF-1)遺伝子およびその遺伝子産物であるBamHI Z Epstein-Barr virus replication activator(ZEBRA)タンパクの発現を誘導する^{7,8)}。
- (6) バーキットリンパ腫やホジキンリンパ腫などの悪性腫瘍の病因と考えられている⁹⁾。
- (7) シェーグレン症候群や関節リウマチなどの自己免疫疾患の誘発に関与する¹⁰⁾。
- (8) 慢性活動性EBウイルス感染症では、4.3年の平均生存期間で死亡する¹¹⁾。

2) 根尖性歯周炎とEBV感染の研究

これまで、根尖性歯周炎とEBVの関連を検索した研究はあるものの、そのほとんどは根尖病変組織を試料とし、PCR法でEBVの検出を行った研究ばかりである(表2)。しかし、外科的に摘出した病変組織は唾液の汚染があることから、PCR法を用いたDNA解析結果が根尖病変由来と結論付けるのは難しい。そのため、著者らは潜伏感染EBVのマーカーであるEBERの*in situ* hybridization法とLMP-1免疫染色法を行い、根尖病変中に浸潤したB細胞にEBVが潜伏感染していることを明らかにした(図3)¹²⁾。

3) 難治性根尖性歯周炎におけるEBVの再活性化

EBVはヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の関与により潜伏性を示す。そのため、HDAC阻害薬の作用により、EBVは再活性化する¹³⁾。HDAC阻害薬にはn-酪酸、トリコスタチンA(抗真菌薬)およびバルプロ酸ナトリウム(抗てんかん薬)がある。その中でもn-酪酸は酪酸産生菌によって産生されるため、難治性根尖性歯周炎関連細菌の中で酪酸を産生する細菌が存在すれば、難治性根尖

表2 ヒトヘルペスウイルスの分類

ウイルスのタイプ		亜科	感染部位・細胞	関連する疾患
HHV-1	単純ヘルペスウイルス1型	<i>a</i>	神経節, 皮膚, 粘膜	口唇ヘルペス, ヘルペス性歯肉口内炎
HHV-2	単純ヘルペスウイルス2型	<i>a</i>	神経節, 皮膚, 粘膜	性器ヘルペス
HHV-3	水痘・帯状疱疹ウイルス	<i>a</i>	三叉神経などの神経細胞	水痘, 帯状疱疹
HHV-4	エプスタイン・バーウイルス	<i>γ</i>	B細胞, 上皮細胞	伝染性単核球症
HHV-5	サイトメガロウイルス	<i>β</i>	単球, マクロファージ	先天性CMV感染症, 間質性肺炎
HHV-6A	ヒトベータヘルペスウイルス6A	<i>β</i>	単核球, 唾液腺	成人由来
HHV-6B	ヒトベータヘルペスウイルス6B	<i>β</i>	単核球, 唾液腺	乳幼児由来, 突発性発疹, 脳炎
HHV-7	ヒトヘルペスウイルス7	<i>β</i>	単核球, 唾液腺	突発性発疹
HHV-8	カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス	<i>γ</i>	B細胞, 血管内皮細胞	カポジ肉腫

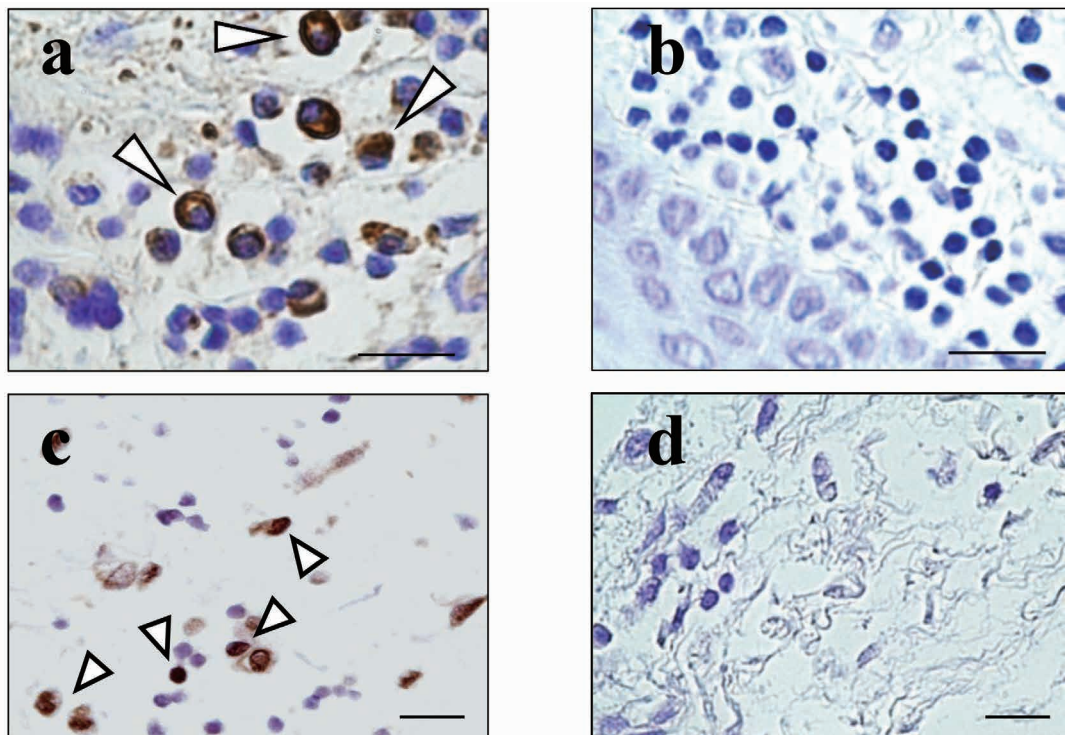


図3 潜伏感染EBVの検出

a, b *in situ* hybridization 法 (a 歯根肉芽腫, b 健常歯肉)

c, d LMP-1免疫染色法 (c 歯根肉芽腫, d 健常歯肉)

矢頭: 陽性細胞, Scale bars = 25 μ m

性歯周炎の病変中で潜伏感染したEBVが再活性化される可能性がある。

そこで、難治性根尖性歯周炎関連細菌の培養液を用いて、高速液体クロマトグラフィーによる短鎖脂肪酸の定量を行ったところ、*Porphyromonas endodontalis*, *Fusobacterium nucleatum* や *Pseudoramibacter alactolyticus* から高濃度のn-酪酸が産生されることを確認した(図4)¹⁴⁻¹⁶⁾。再活性化EBVは、感染したB細胞からBZLF-1遺伝子およびその生成タンパクであるZEBRAの発現を誘導する。そこで、BZLF-1ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、*F. nucleatum* や *P. alactolyticus* が産生したn-酪酸がルシフェラーゼ活性を上昇させた(図5)。すなわち、*F.*

nucleatum や *P. alactolyticus* がEBVを再活性化することが明らかとなった。

4) 難治性根尖性歯周炎における再活性化EBVとサイトカイン発現

F. nucleatum の培養液からLPSを除去したのち、その培養液をDaudi細胞(EBV潜伏感染B細胞cell line)に添加したところ、Daudi細胞はBZLF-1遺伝子とZABRAタンパクを発現した(図6)。また、インターロイキン(IL)1 β , IL-6およびRANKLの遺伝子およびタンパク発現を誘導した(図7)。すなわち、B細胞に潜伏感染したEBVは*F. nucleatum* が産生したn-酪酸により再活性化し、骨吸収性サイトカインを発現させることが明らかと

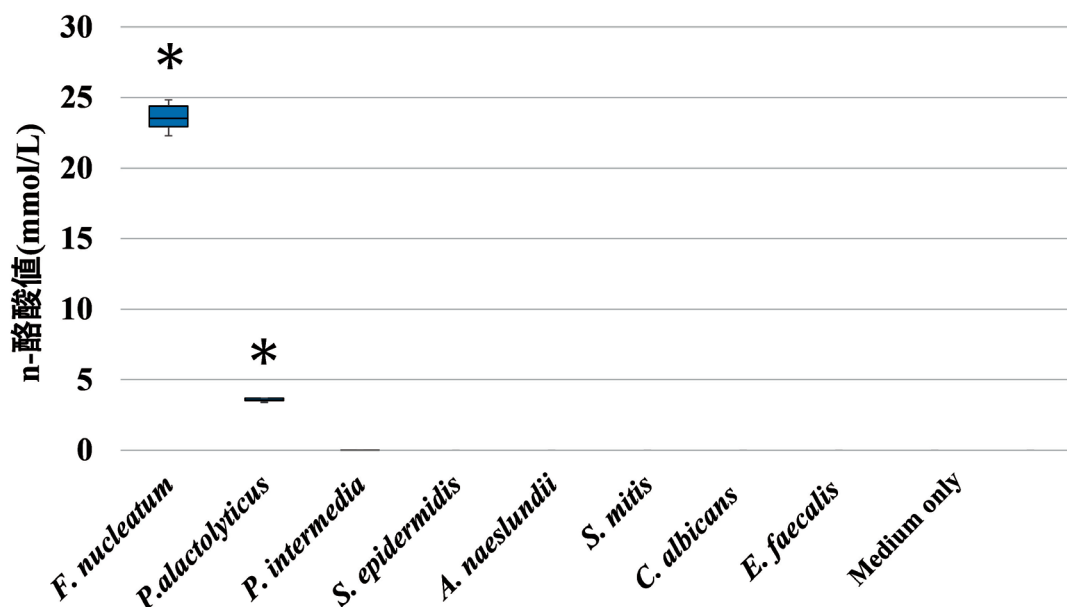


図4 難治性根尖性歯周炎関連細菌による n-酪酸産生量
Steel test (n = 6), *: $p < 0.05$

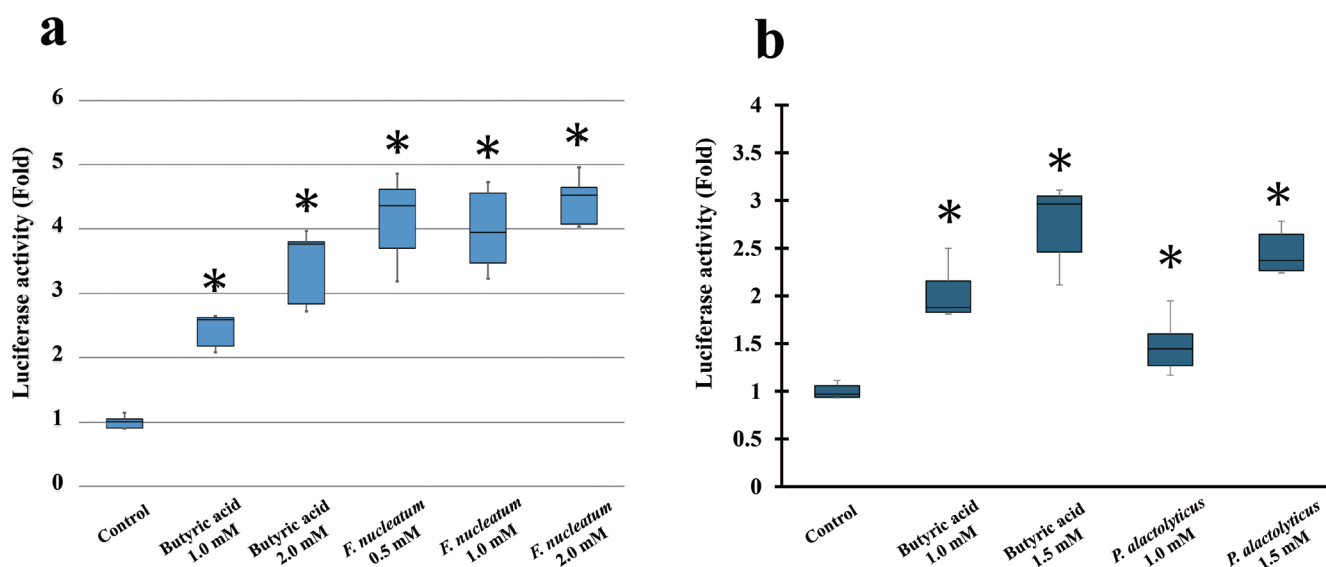


図5 BZLF-1ルシフェラーゼアッセイ
a *F. nucleatum* の培養液, b *P. alactolyticus* の培養液
24時間培養, Steel test (n = 6), *: $p < 0.05$

なった¹⁵⁾。

また、難治性根尖性歯周炎患者から摘出した根尖病変組織を解析したところ、病変中のB細胞がZEBRAおよびIL-1、IL-6またはRANKLタンパクを共発現していた(図8)。すなわち、難治性根尖性歯周炎局所においても潜伏感染したEBVが再活性化し、B細胞からサイトカインを発現させることで根尖性歯周炎を惹起する可能性が示唆された。なお、完全埋伏智歯を抜去する際に摘出した健全歯肉組織中のB細胞は、BZLF-1遺伝子のみならず、ZEBRA、IL-1、およびIL-6タンパクを発現しなかった。

5) フェニックス膿瘍の病因

HDAC阻害薬にはトリコスタチンA(抗真菌薬)およびバルプロ酸ナトリウム(抗てんかん薬)があることから、真菌感染症患者やてんかん患者がこれらの治療薬を服用したことによって、根尖性歯周炎を引き起こし、フェニックス膿瘍を発症させる可能性が示唆された。

6) 根尖性歯周炎再発の予防

EBVが再活性化することにより、炎症が惹起される。そのため、EBVの再活性化を防止することで根尖性歯周炎の再発を予防する可能性が示唆される。現在、EBVの

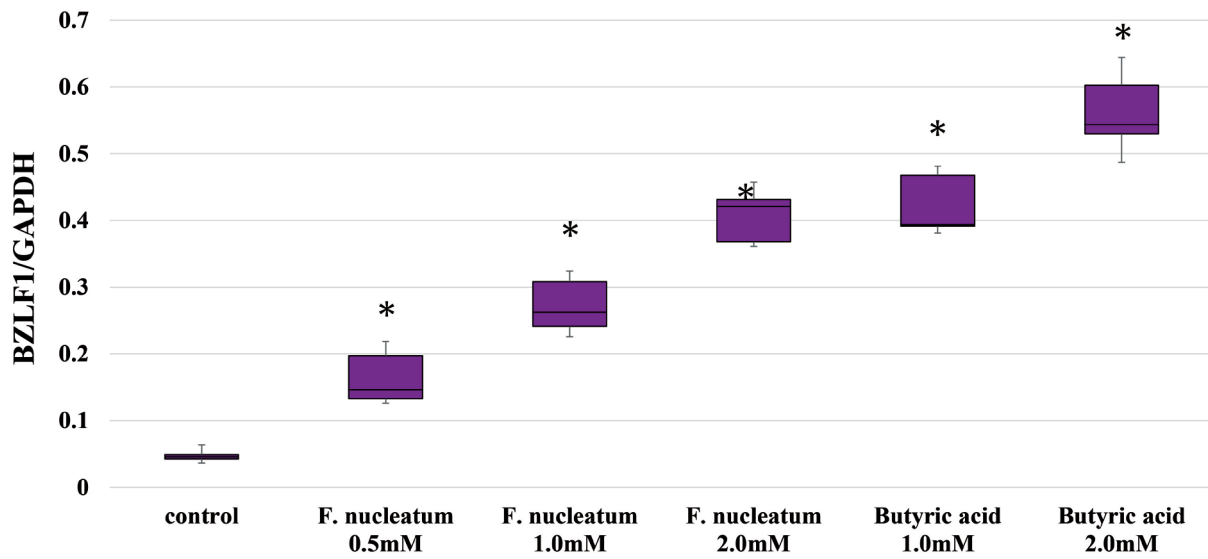


図6 *F. nucleatum* による Daudi 細胞からの BZLF-1 遺伝子発現誘導
12時間培養, Steel test (n = 6), *: $p < 0.05$

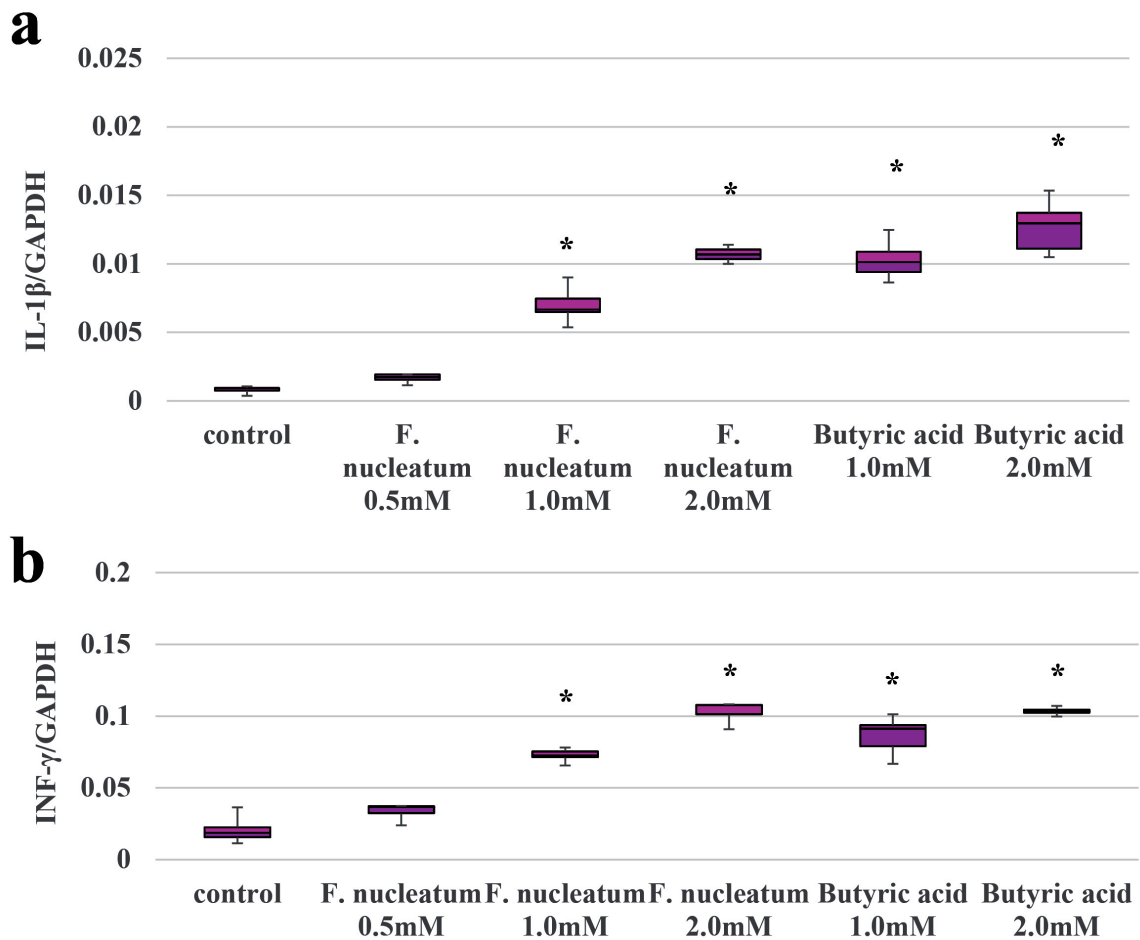


図7 *F. nucleatum* による Daudi 細胞からのサイトカイン遺伝子発現誘導

a IL-1β 発現量 b INF-γ 発現量

12時間培養, Steel test (n = 6), *: $p < 0.05$

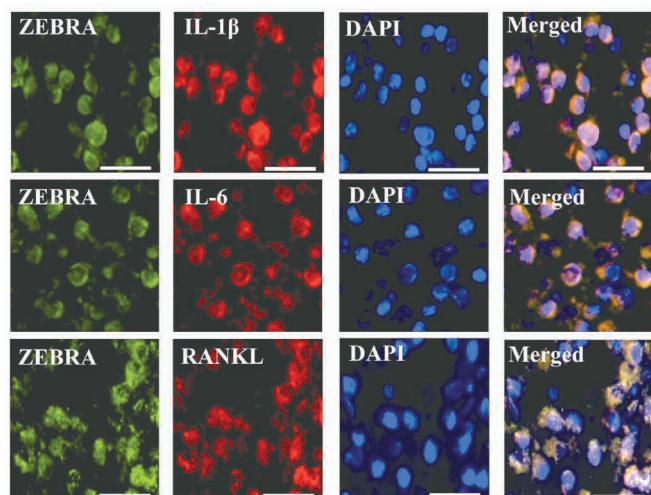


図8 歯根肉芽腫中の潜伏感染 EBV とサイトカインの共発現
Scale bars = 50 μ m

再活性化を防止するための方策を検討しており、得られる結果は根尖性歯周炎の再発を防止するなど、患者や歯科医師にとって朗報となるであろう。

まとめ

根管治療を繰り返しても治癒しない難治性根尖性歯周炎および根管内器具破折や穿孔を生じたために抜歯が適応とされた根尖性歯周炎であっても、適切にマイクロスコープを使用することで治癒させることが可能な症例も少なくない。

根尖性歯周炎は細菌感染によって生じるとされるが、難治性根尖性歯周炎においては病変中の B 細胞に EBV が感染している。感染後は潜伏性を示し、直ちに炎症を引き起こすことはない。しかし、難治性根尖性歯周炎関連細菌である *F. nucleatum* や *P. alactolyticus* が産生する n-酪酸により潜伏感染 EBV は再活性化し、IL-1 β 、IL-6 および RANKL の発現を誘導する。そのため、EBV の再活性化を防止することで根尖病変を予防することが可能となることが示唆される。

当科で行っている治療と基礎研究により、難治性根尖性歯周炎は治癒させることが可能であることが示唆された。

本論文に関連し、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS (2011) A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 112, 825-842
- 2) 興地隆史 (2022) 根尖性歯周疾患. エンドドンティクス, 第 6 版, 興地隆史, 石井信之, 北村知昭, 林美加子 編, 永末書店, 京都, 55.
- 3) Küppers R (2003) B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812
- 4) Johansen EC, Kaye KM (2015) Epstein-Barr Virus (Infectious Mononucleosis, Epstein-Barr virus-associated malignant diseases, and other disease) in Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed, Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ ed, Churchill Livingstone, Philadelphia, 1754-1771
- 5) Amon W, Farrell PJ (2005) Reactivation of Epstein-Barr virus from latency. *Rev Med Virol* 15, 149-156
- 6) Chang KL, Chen YY, Shibata D, Weiss LM (1992) Description of an *in situ* hybridization methodology for detection of Epstein-Barr virus RNA in paraffin-embedded tissues, with a survey of normal and neoplastic tissues. *Diagn Mol Pathol* 1, 246-255
- 7) Schwarzmann F, Jäger M, Hornef M, Prang N, Wolf H (1998) Epstein-Barr viral gene expression in B-lymphocytes. *Leuk Lymphoma* 30, 123-129
- 8) Tedeschi R, Pin E, Martorelli D, Bidoli E, Marus A, Pratesi C, Bortolin MT, Zanussi S, Vaccher E, Dolcetti R, De Paoli P (2007) Serum antibody response to lytic and latent Epstein-Barr virus antigens in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma patients from an area of nonendemicity. *Clin Vaccine Immunol* 14, 435-441
- 9) Maeda E, Akahane M, Kiryu S, Kato N, Yoshikawa T, Hayashi N, Aoki S, Minami M, Uozaki H, Fukayama M, Ohtomo K (2009) Spectrum of Epstein-Barr virus-related diseases: a pictorial review. *Jpn J Radiol* 27, 4-19
- 10) Pender MP (2012) CD8⁺ T-cell deficiency, Epstein-Barr virus infection, vitamin D deficiency, and steps to autoimmunity: a unifying hypothesis. *Autoimmune Dis*, 189096
- 11) Kimura H, Morishima T, Kanegane H, Ohga S, Hoshino Y, Maeda A, Imai S, Okano M, Morio T, Yokota S, Tsuchiya S, Yachie A, Imashuku S, Kawa K, Wakiguchi H (2003) Prognostic factors for chronic active Epstein-Barr virus infection. *J Infect Dis* 187, 527-533
- 12) Makino K, Takeichi O, Hatori K, Imai K, Ochiai K, Ogiso B (2015) Epstein-Barr virus infection in chronically inflamed periapical granulomas. *PLoS One* 10, e0121548
- 13) Tsai PF, Lin SJ, Weng PL, Tsai SC, Lin JH, Chou YC, Tsai CH (2011) Interplay between PKC δ and Spl on histone deacetylase inhibitor-mediated Epstein-Barr virus reactivation. *J Virol* 85, 2373-2385
- 14) Makino K, Takeichi O, Imai K, Inoue H, Hatori K, Himi K, Saito I, Ochiai K, Ogiso B (2018) *Porphyromonas endodontalis* reactivates latent Epstein-Barr virus. *Int Endod J* 51, 1410-1419
- 15) Himi K, Takeichi O, Imai K, Hatori K, Tamura T, Ogiso B (2020) Epstein-Barr virus reactivation by persistent apical periodontal pathogens. *Int Endod J* 53, 492-505
- 16) Miyata T, Takeichi O, Imai K, Okano M, Inoue S, Yasukawa T, Suzuki (2025) Reactivation of Epstein-Barr virus by n-butyric acid from *Pseudoramibacter alactolyticus* induces inflammatory cytokines in periapical granulomas. *J Oral Biosci* 67, 100569

Leptin receptor 陽性細胞の low-density lipoprotein receptor-related protein 1 欠損が骨形成に与える影響

仮 谷 仁 志

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻口腔構造機能学分野

日本大学歯学部歯科矯正学講座

(指導: 本吉 満 教授, 二宮 禎 准教授)

要旨

【目的】 レプチン受容体 (leptin receptor, LepR) は、骨芽細胞分化能を有する間葉系幹細胞のマーカーの一つとして注目されている。いっぽう、LepR 陽性間葉系幹細胞 (LepR⁺ 細胞) が発現する low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) は、その発現抑制によって破骨細胞分化が促進し、骨量減少や骨粗鬆症を誘導することが報告されているが、LRP1の役割と骨形成との関係については不明な点が多い。本研究では、LepR⁺ 細胞に発現する LRP1を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウト (KO) マウスを作製し、頭頂骨および大腿骨における骨形成能、骨芽細胞分化能、およびリン酸化 receptor-regulated Smad (p-R-Smad) の発現について野生型 (WT) マウスと比較検討した。

【方法】 マウスの頭頂骨と大腿骨をマイクロ CT で撮影し、骨量と骨微細構造を骨形態計測によって評価するとともに、カルセイン標識によって骨形成能を調べた。また、大腿骨における osterix (Osx) と p-R-Smad 発現を免疫組織化学染色によって検討した。

【結果】 KO マウスは、WT マウスと比べて頭頂骨の非薄化、および頭頂骨と大腿骨の骨量減少と骨石灰化速度の低下が示された。また、KO マウスは WT マウスよりも Osx と p-R-Smad の陽性細胞が減少した。

【結論】 LepR⁺ 細胞に発現している LRP1を欠損させた場合、p-R-Smad の発現が阻害され、骨芽細胞分化の抑制、頭頂骨および大腿骨の骨量と骨形成の低下が生じることが明らかになった。

キーワード: low-density lipoprotein receptor-related protein 1, leptin receptor-positive cell, 骨芽細胞分化, 骨形成, 受容体調節型 Smad

Effect of leptin receptor-positive cells lacking low-density lipoprotein receptor-related protein 1 on the bone formation

Hitoshi Kariya

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral structural and Functional Biology

Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Mitsuru Motoyoshi and Assoc. Prof. Tadashi Ninomiya)

Abstract

【Purpose】 Leptin receptor (LepR) is a marker of mesenchymal stem cells (MSCs) that differentiate into osteoblasts. Recent studies have indicated that LepR-positive MSCs (LepR⁺ cells) expressing low-density lipoprotein-related protein 1 (LRP1) are required for bone formation, mineral deposition and bone mass development in the skeleton. A dysfunction of LRP1 causes bone loss and osteoporosis with the enhancement of osteoclast activity. However, the role of LRP1 on osteoblast differentiation remains unclear. In this study, conditional knockout (KO) mice expressing LepR⁺ cells lacking LRP1 were established, and bone forming activity in parietal bone and femur was examined.

【Methods】 Bone mass and bone microstructure of parietal bone and femur were examined by bone morphometric analysis using micro-CT imaging. The ability of bone forming activity was also evaluated by calcein labeling assay. Furthermore, osterix (Osx) and phosphorylated receptor-regulated Smad (p-R-Smad)-positive cells in a distal portion of femoral metaphysis were determined by immunohistochemical staining.

【Results】 In comparison with wild type (WT) mice, KO mice expressed depressive bone forming activities including thinned parietal bone, decreased bone mass and low mineral apposition rate in parietal bone and femur. Lower number of Osx- and p-R-Smad-positive cells in femur were also detected in KO mice.

【Conclusion】 LepR⁺ cells lacking LRP1 reduces osteogenic potential and osteoblast differentiation through decreasing p-R-Smad expression.

Keywords: low-density lipoprotein receptor-related protein 1, leptin receptor-positive cell, osteoblast differentiation, bone formation, receptor-regulated Smad

(受付: 令和 7 年 1 月 27 日)

責任著者: 仮谷仁志

日本大学歯学部歯科矯正学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8105

FAX: 03-3219-8312

E-mail: dehi21007@g.nihon-u.ac.jp

緒 言

骨組織では生涯を通して骨吸収と骨形成が繰り返され、骨量のバランスが適切に維持されている^{1,2)}。リモデリングと呼ばれているこうした骨の改造現象には、骨芽細胞や破骨細胞から分泌される様々なサイトカインや成長因子が関わっている¹⁾。例えば、骨芽細胞は破骨細胞分化を活性化する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) や Wnt5a を分泌するが、同時に破骨細胞前駆細胞に発現する receptor activator of NF- κ B (RANK) に結合して破骨細胞分化を抑制する osteoprotegerin (OPG) も放出する²⁾。いっぽう破骨細胞は semaphorin 4D を分泌することで、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制し³⁾、間葉系幹細胞もまた、破骨細胞分化に関わるサイトカインの macrophage colony-stimulating factor, RANKL, さらに OPG を産生することによって骨吸収を調節している⁴⁾。

マスト細胞から分泌されるペプチドホルモンであるレプチンは、視床下部の弓状核に発現するレプチン受容体 (leptin receptor, LepR) に結合し、糖脂質代謝と食欲を抑制することが知られている⁵⁾。LepR は骨髄間葉系幹細胞に発現することも報告されており、マウスへのレプチン投与によって大腿骨と脛骨の骨形成が促進することが実験的に示されている⁶⁾。また、LepR 陽性間葉系幹細胞 (LepR⁺細胞) は骨形成を担う骨芽細胞の主要な供給源と考えられており、bone morphogenetic protein (BMP) の作用によって骨芽細胞へ分化することが報告されている^{7,8)}。この場合、LepR⁺細胞内で機能する receptor regulated (R)-Smad である Smad1, 5, 9 のリン酸化と核内移行が促進し、様々な標的遺伝子の転写を活性化する^{9,10)}。この R-Smad のリン酸化を介したシグナルの下流には runt-related transcription factor 2 (Runx2) や osterix (Osx) などの骨芽細胞分化関連転写因子が同定されているため、R-Smad のリン酸化は LepR⁺細胞の骨芽細胞分化に深く関わっていると考えられている^{1,9-11)}。

膜貫通型低密度リポタンパク質受容体ファミリーに属する low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) はエンドサイトーシス受容体の一つであり、transforming growth factor- β , fibronectin, および lactoferrin などの複数のリガンドと結合し、細胞内シグナルを活性化する¹²⁾。LRP1の役割と骨形成との関係については不明な点が多かったが、最近の研究によって、LRP1 遺伝子の欠損が破骨細胞を活性化させ、骨量減少に密接に関係していることが明らかにされた。例えば、骨芽細胞と破骨細胞に発現する LRP1 を欠損させたマウスは、脛骨、大腿骨、および椎骨において破骨細胞数の増加と著しい骨吸収が観察されている^{13,14)}。また、歯根膜幹細胞に発現する LRP1 を欠損させたマウスは、歯槽骨の骨量減少と破骨細胞数の増加に加えて骨形成の阻害が示されている¹⁵⁾。

しかし、これらの研究は、主に LRP1 欠損によって誘導される骨量減少の分子メカニズムについて探索したものであり、LepR⁺細胞の骨芽細胞への分化過程において LRP1 が果たす役割については詳しく調べられていない。そこで、本研究では、LepR⁺細胞において LRP1 を特異的に欠損させたマウスを作製し、頭頂骨と大腿骨における骨形成能、骨芽細胞分化能、およびリン酸化 (phosphorylated) R-Smad (p-R-Smad) の発現について野生型マウスと比較検討した。

材料および方法

1. 実験動物

LRP1遺伝子が欠損した LepR⁺細胞をもつコンディショナルノックアウトマウスは、cre recombinase (Cre) / locus of X-over P1 (loxP) システムを用いて作成した。B6.129-*LepR^{tm2(Cre)Rck}/J* (LepR^{Cre}) マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)¹⁶⁾ と LRP1遺伝子座に flanked by loxP (floxed) 配列を持った B6.129S7-*Lrp1^{tm2Her}/J* (Lrp1^{flox/+}) マウス (Jackson Laboratory)¹⁷⁾ の雄雌を交配させ LepR^{Cre} Lrp1^{flox/+} マウスを作成した後、再度、雌雄の LepR^{Cre} Lrp1^{flox/+} マウスと Lrp1^{flox/+} マウスの交配によって、LepR⁺細胞の LRP1が欠損した雄性 LepR^{Cre} Lrp1^{flox/flox} (コンディショナルノックアウト, KO) マウスを得た。また、対照群として同じく交配によって得られた雄性 Lrp1^{+/+} (野生型, WT) マウスを使用した。これらの遺伝子改変マウスの Cre と loxP の有無は、マウスの耳介から抽出した DNA を鋳型にした polymerase chain reaction (PCR) によって確認した。Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 使用して、2つの loxP を挟む5'側と3'側の塩基配列は、5'-CAT ACC CTC TTC AAA CCC CTT CCT G-3' と 5'-GCA AGC TCT CCT GCT CAG ACC TGG A-3' をプライマーとして用いて、94℃で2分間の処理後、94℃で20秒、60℃で15秒、さらに72℃で10秒の反応を35回繰り返すことで増幅した。また、Cre の塩基配列は、5'-AAC ATG CTT CAT CGT CGG-3' と 5'-TTC GGA TCA TCA GCT ACA CC-3' を用いて、94℃で3分間の処理後、94℃で30秒、53.5℃で30秒、さらに72℃で60秒の反応を35回繰り返した。反応産物は、臭化エチジウム含有2% アガロースゲルで電気泳動後、UV トランスイルミネーター (BioDoc-It, UVP, Jena, Germany) で可視化した。図1に示すように、Cre と loxP の塩基配列を検出し、マウスの遺伝子型を判別した (図1)。KO マウスと WT マウスの出生率は、それぞれ約15%であった。マウスの飼育期間は、12時間の明暗サイクルを調整できる恒温室 (23℃) で飼育し、ラット・マウス MF 固形飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) と水を自由に摂取させた。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (承認番号:

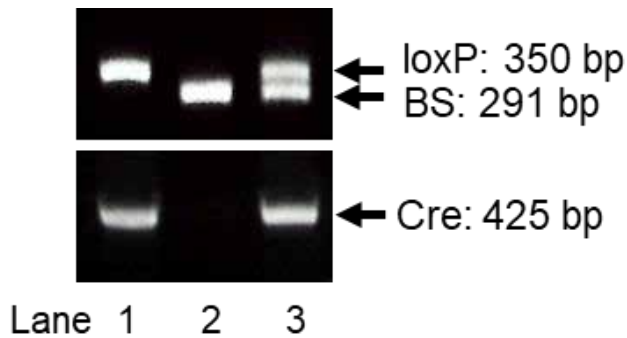


図1 遺伝子改変マウスの判別

マウスの耳介から抽出したDNAを鋳型にしてCreの塩基配列 (Cre: 425 bp) と2つのloxPを挟んだ5'と3'側を含む塩基配列 (loxP: 350 bp) をそれぞれのプライマーを使用したPCRで増幅した。Lane1: LepR^{Cre} Lrp1^{flox/flox} マウス (KO マウス) はCreとloxPをもつ。Lane2: Lrp1^{+/+} マウス (WT マウス) はCreとloxPが除かれたB6.129マウス由来の塩基配列 (B6 sequence, BS: 291 bp) をもつ。Lane3: ヘテロ体であるLepR^{Cre} Lrp1^{flox/+} マウスはCreとloxPの他にloxPが除かれた塩基配列 (BS: 291 bp) をもつ。

AP21DEN022-5, AP21DEN023-5) を得て, 米国国立予防衛生研究所および国際疼痛学会のガイドライン¹⁸⁾ に従って, 動物の処置を行った。また, 全ての実験において, 実験動物の苦痛軽減と使用動物数の低減に努めた。

2. 頭頂骨由来細胞と骨髄間質細胞の採取

4 mg/kg midazolam (サンド, 東京), 0.3 mg/kg medetomidine hydrochloride (ゼノアック, 福島), および 5 mg/kg butorphanol tartrate (明治製薬ファルマ, 東京) からなる三種混合麻酔薬を使用した過麻酔によって安楽死させた6~8週齢雄性のKOマウスとWTマウス (それぞれ3頭/グループ) から頭頂骨と大腿骨を採取した。頭頂骨を細切後, 2 mg/ml collagenase (富士フィルム和光純薬, 大阪) と0.25% trypsin (Invitrogen, Waltham, MA, USA) を含んだ α minimal essential medium (α MEM, 富士フィルム和光純薬) で, 37°C, 30分間, その後, 37°C, 20分間の酵素処理を4回繰り返して頭頂骨由来細胞 (calvaria 細胞) を回収した¹⁹⁾。骨髄間質細胞 (BMSCs) は, 大腿骨の両端を切断後, シリンジを用いて骨切断面から α MEM を注入して骨髄細胞を回収した¹⁹⁾。ピペッティングによって分散した骨髄細胞を ACK Lysing buffer (ThermoFisher Scientific) で24°C, 5分間の処理を行い, 溶血を確認後, 遠心分離によってBMSCsを回収した。

Calvaria細胞とBMSCsは10% fetal bovine serum (FBS, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) と1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を含む α MEM を用いて培養シャーレに播種し, 37°C, 5% 炭酸ガス存在下で培養した。培養液は2~3日毎に交換し, 5日間培養した細胞を実験に供した。

3. Calvaria細胞とBMSCsからのLepR⁺細胞の分離

培養したcalvaria細胞とBMSCsを0.05% trypsin 処理によってシャーレから回収した後, 0.5%FBS および 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁させ, ウサギ抗ヒトLepRポリクローナル抗体 (100倍希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA) で4°C, 30分間, インキュベートした。PBSでの洗浄後, ヤギ抗ウサギIgG microbeads (5倍希釈, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を加えて, 4°Cで30分間の反応後, 細胞を磁気ビーズで標識した。PBSで洗浄後, 細胞浮遊液は, 磁石に設置した分離カラム (MACS MS, Miltenyi Biotec) へアプライし, calvaria細胞とBMSCsに含まれるLepR⁺細胞をカラムに吸着させた。分離カラムはPBSで洗浄後, 磁石から取り外し, 吸着したLepR⁺細胞をシリンジで押し出した。回収したLepR⁺細胞からRNAとタンパクを抽出し, LRP1の発現について調べた。

4. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

RNAの抽出は, NucleoSpin RNA Plus kit (タカラバイオ, 滋賀) を使用した。1 μ gのRNAを鋳型にして, iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて, cDNA合成を行った。RT-PCRはThermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を利用し, GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) と混合したcDNAから次の条件で遺伝子を増幅した。LRP1は, 94°Cで5分間の処理後, 94°Cで30秒, 58°Cで30秒, さらに72°Cで30秒の反応を35回, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は94°Cで5分間の処理後, 94°Cで30秒, 58°Cで45秒, さらに72°Cで60秒の反応を23回繰り返した。使用したプライマーの塩基配列は, LRP1: Forward 5'-CTG AAG GCT CCG AGT ACC AG-3', Reverse 5'-GTA GGA GAT TGT GCC CGT GT-3', GAPDH: Forward 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3', Reverse 5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3'であり, 反応産物は, 臭化エチジウム含有2% アガロースゲルで電気泳動後, UVトランスイルミネーターで可視化した。

5. Western blot

タンパクの抽出は, 細胞をRIPA buffer (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) で処理して, 14,000 \times gで15分間の遠心分離後に上清を回収した。得られた上清のタンパク量は, protein assay rapid kit Wako II (富士フィルム和光純薬) を利用して定量した。1 μ gの細胞抽出物は, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories) にアプライし, 電気泳動した後,

nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) に転写した。その後、PVDF blocking reagent (東洋紡, 東京) に浸漬させることで非特異的反応のブロッキングを行った。PBSで洗浄後、membraneはCan Get Signal溶液 (東洋紡) で希釈したウサギ抗ヒトLRP1ポリクロナール抗体 (2,000倍希釈, Abcam, Cambridge, UK), またはマウス抗 β -actin抗体 (2,000倍希釈, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と、4℃で16時間反応させた。PBSで洗浄後、membraneはCan Get Signal溶液で希釈したhorseradish peroxidase (HRP) 標識2次抗体 (10,000倍希釈, Bio-Rad Laboratories) と24℃で1時間の反応後、chemiluminescence溶液 (GE Healthcare Life Sciences) に浸し、抗体との反応性をImageQuant 800 system (サイティバ, 東京) で可視化した。

6. マイクロCT撮影

三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって6週齢雄性KOマウスとWTマウス (それぞれ8頭/グループ) を麻酔し、頭頂骨と大腿骨をマイクロCT (R_mCT, リガク, 東京) で撮影した。撮影条件は、管電流90 μ A, 管電圧110 kV, 撮影時間2分, 撮影倍率10倍とした。撮影データは、画像解析ソフトウェア (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京) で分析した。頭頂骨においては、頭頂骨の中央部ROI (5×5×2 mm) の骨量と冠状縫合の後方5 mmの部位における骨の厚さを測定した。いっぽう、大腿骨は遠位骨幹端の海綿骨領域における成長板の近位1.0~4.0 mmの部位ROI (1×1×3 mm) の骨量 (BV/TV), 骨梁表面積 (BS/BV), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁数 (Tb.N), および骨梁間距離 (Tb.Sp) の値²⁰⁾ を算出した。

7. カルセイン標識による骨形成能評価

6週齢雄性KOマウスとWTマウス (それぞれ8頭/グループ) に、カルセイン (10 mg/kg bw, 富士フィルム和光純薬) を2回にわたって腹腔内投与した (初回の投与42日齢, 2回目投与49日齢)。2回目の投与後, 3日後に、三種混合麻酔薬の過麻酔によってマウスを安楽死させ、頭頂骨と大腿骨を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬) で4℃, 16時間の固定後、凍結包埋剤 (Section-Lab, 横浜) で包埋した。クライオフィルム IIc (Section-Lab) を使用して、厚さ10 μ mの非脱灰凍結切片を作製し、カルセイン標識部の分布を蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) で観察し、骨石灰化速度 (mineral apposition rate : MAR) をImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して算出した。ランダムに選択した頭頂骨の冠状縫合から後方5.0 mmに位置する平坦部上面 (flat area, FA, 図2) と矢状縫合の両側隆起部 (sagittal colliculus, SC, 図2), および大腿骨の遠位骨幹端の海綿骨 (trabecular bone, TB) と骨幹部の骨髓

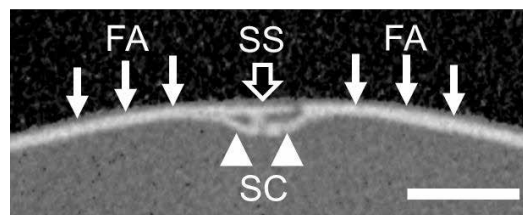


図2 頭頂骨の計測部位

冠状縫合から後方5.0 mmに位置する前頭断面像から、頭頂骨の平坦部上面 (白矢印: flat area, FA) と矢状縫合 (黒抜き矢印: sagittal suture, SS) の両側に位置する隆起部 (矢頭: sagittal colliculus, SC) をカルセインによる二重線状標識の測定対象とした。(スケールバー: 1 mm)

を囲む皮質骨の骨内膜面 (cortical bone, CB) のカルセイン標識間距離をそれぞれ10か所測定し、平均値として算出した。

8. 免疫組織化学染色

6週齢雄性KOマウスとWTマウス (それぞれ5頭/グループ) から大腿骨を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して4℃で16時間固定した。PBSで洗浄後、10% EDTA (pH 7.4) に2週間浸漬して脱灰後、パラフィンで包埋し、厚さ4 μ mの切片を作製した。切片は、キシレンで脱パラフィンを行い、下降エタノールで親水化した後、BLOXALL (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で24℃, 30分間の処理によって内因性ペルオキシターゼを不活化した。PBSで洗浄後、切片に3% bovine serum albumin (富士フィルム和光純薬) を滴下して、24℃で60分間のブロッキングを行い、ウサギ抗マウスOsxモノクロナール抗体 (200倍希釈, Abcam), またはウサギ抗ヒトp-Smad1/5/9モノクロナール抗体 (100倍希釈, Abcam) と4℃で16時間の反応を行った。PBSで洗浄後、二次抗体であるhorseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギIgG (ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO, ニチレイバイオサイエンス, 東京) を滴下して24℃で1時間、反応させた。洗浄後、ヒストファインDAB基質キット (ニチレイバイオサイエンス) によって、LRP1の反応性を可視化し、ヘマトキシリン溶液 (武藤化学, 東京) で対比染色を施した。スライドは水洗後、上昇エタノールに浸漬させて脱水し、キシレンで透徹後、標本用封入剤 (MGK-S, 松浪硝子工業, 東京) で封入した。遠位骨幹端の海綿骨領域において無作為に10視野 (1視野あたり380×213 μ m) を撮影し、拡大した画像下でImageJを使用して単位面積あたりのOsx陽性 (Osx⁺) 細胞とp-R-Smad陽性 (p-R-Smad⁺) 細胞の割合を計測した。

9. 統計解析

得られたデータの統計分析は、GraphPad Prism 8

(GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を使用した。Shapiro-Wilk test によって、実験データの正規性が検定され、正規分布に従っていることが確認された。2つのグループ間の比較には、unpaired Student t-test を使用した。実験は、少なくとも 3 回繰り返し、結果を平均値と標準偏差で示し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. Calvaria 細胞と BMSCs から分離した LepR⁺ 細胞の LRP1 発現

KO マウスと WT マウスの calvaria 細胞と BMSCs から分離した LepR⁺ 細胞において、LRP1 遺伝子とタンパク発現を確認した (図 3 A, B)。WT マウスでは calvaria 細胞と BMSCs から分離した LepR⁺ 細胞のいずれにおいても、

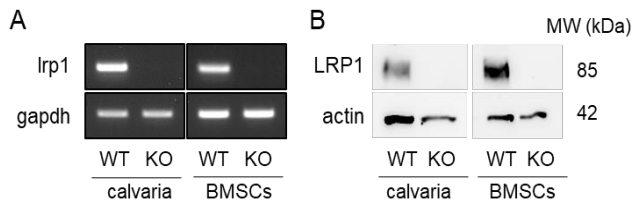


図3 Calvaria 細胞 (calvaria) と骨髄間質細胞 (BMSCs) から分離した LepR⁺ 細胞の LRP1 発現
KO マウスと WT マウスから分離した LepR⁺ 細胞における LRP1 発現。抗 LepR 抗体を用いて MACS システムによって calvaria 細胞と BMSCs から LepR⁺ 細胞を分離して、mRNA 発現 (A) とタンパク発現 (B) を調べた。

LRP1 の遺伝子とタンパク発現を示す明瞭なバンドが観察できた。いっぽう、KO マウスの LepR⁺ 細胞では LRP1 遺伝子とタンパク発現は検出できなかった。

2. 頭頂骨と大腿骨の形態計測的評価

LepR⁺ 細胞の LRP1 欠損が骨形態に及ぼす影響を調べるために、KO マウスと WT マウスの頭頂骨と大腿骨の構造を比較した。マイクロ CT 画像を用いた形態計測によって、KO マウスは WT マウスよりも頭頂骨の菲薄化 (KO: $90.0 \pm 6.2 \mu\text{m}$, WT: $115.3 \pm 12.9 \mu\text{m}$, $p < 0.005$, 図 4 A, B) と骨量の減少 (KO: $2.83 \pm 0.20 \text{ mm}^3$, WT: $3.64 \pm 0.38 \text{ mm}^3$, $p < 0.005$, 図 4 B) が認められた。大腿骨でも同様に、KO マウスは WT マウスと比べて遠位骨幹端部の骨量 (BV/TV) が低下していた (KO: $28.7 \pm 4.54\%$, WT: $36.2 \pm 4.09\%$, $p < 0.005$, 図 4 C, D)。KO マウスと WT マウスの骨表面積 (BS/BV) に有意な差は認められなかったが、WT マウスと比べて KO マウスの骨梁幅 (Tb.Th) の縮小 (KO: $45.5 \pm 2.34 \mu\text{m}$, WT: $51.3 \pm 4.69 \mu\text{m}$, $p < 0.01$, 図 4 D) と骨梁数 (Tb.N) の減少 (KO: $6.22 \pm 0.50 /\text{mm}$, WT: $6.85 \pm 0.56 /\text{mm}$, $p < 0.05$, 図 4 D) がみられ、逆に骨梁間隙 (Tb.Sp) は KO マウスの方が WT マウスより高い値を示した (KO: $109.7 \pm 15.7 \mu\text{m}$, WT: $89.4 \pm 11.7 \mu\text{m}$, $p < 0.01$, 図 4 D)。

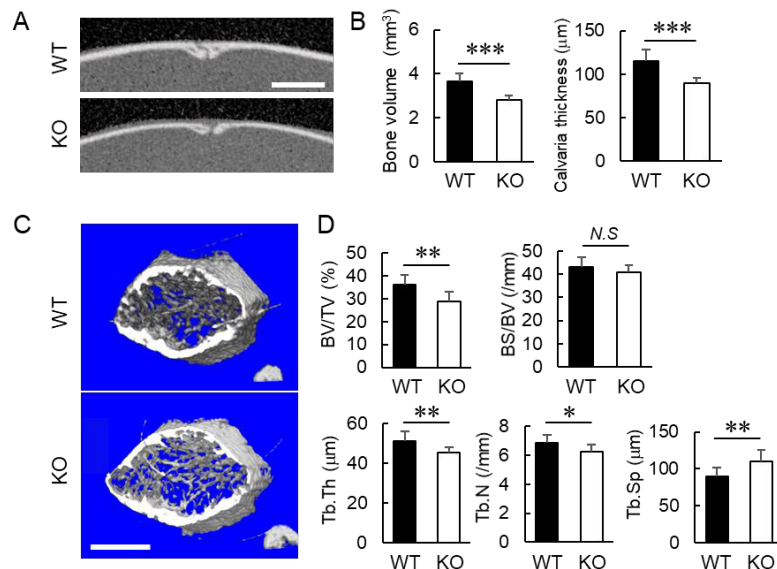


図4 KO マウスと WT マウスの頭頂骨と大腿骨の骨形態計測

マイクロ CT で、KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の頭頂骨と大腿骨を撮影し、骨形態を評価した。A: 頭頂骨の冠状縫合後方 5.0 mm に位置するマイクロ CT の前頭断面像 (スケールバー: $1,000 \mu\text{m}$)。B: 頭頂骨の骨量 (bone volume) と頭頂骨厚 (calvaria thickness)。C: 大腿骨遠位骨幹端部の三次元画像 (スケールバー: $1,000 \mu\text{m}$)。D: 骨微細構造のパラメータ。骨量 (BV/TV)、骨表面積 (BS/BV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N)、および骨梁間隙 (Tb.Sp)。統計学解析は、unpaired Student t-test を行った。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$ (versus WT, $n = 8$, in each)

3. 頭頂骨と大腿骨における骨石灰化速度 (MAR) の評価

KO マウスと WT マウスの骨形成を比較するために、腹腔内にカルセインを2回投与して、二重の線状標識部間を新生骨とし、これを7日で除することで MAR 値を求めた。頭頂骨では、冠状縫合から後方5.0 mm に位置する平坦部上面 (FA) と矢状縫合の両側隆起部 (SC) に、カルセインの二重標識が観察できた (図5A)。図5B に示すように、MAR 値は WT マウスに比べて KO マウスの FA で減少し (KO: $1.44 \pm 0.12 \mu\text{m/day}$, WT: $1.76 \pm 0.17 \mu\text{m/day}$, $p < 0.05$, 図5B), SC でも低値を示した (KO: $1.56 \pm 0.19 \mu\text{m/day}$, WT: $1.86 \pm 0.12 \mu\text{m/day}$, $p < 0.05$, 図5B)。また、大腿骨では、KO マウスと WT マウスの遠位骨幹端の海綿骨 (TB) と骨幹部の骨髓を囲む皮質骨 (CB) にカルセインの二重の線状標識が検出できた (図5C)。MAR 値は、WT マウスと比較して KO マウスでは TB で減少し (KO: $2.42 \pm 0.14 \mu\text{m/day}$, WT: $3.02 \pm 0.16 \mu\text{m/day}$, $p < 0.005$, 図5D), CB でも低値を示した (KO: $3.65 \pm 0.16 \mu\text{m/day}$, WT: $4.34 \pm 0.33 \mu\text{m/day}$, $p < 0.01$, 図5D)。

4. Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の分布

KO マウスと WT マウスの大腿骨遠位骨幹端部における骨芽細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の分布を免疫組織化学染色によって評価した。骨芽細胞である Osx^+ 細胞は、肥大軟骨細胞の遠位端に位置する成長板の近く、海綿骨領域に認められたが、KO マウスの Osx^+ 細胞の数は WT マウスに比べて約70% にまで減少していた (KO: $1.46 \pm 0.20 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, WT: $2.08 \pm 0.19 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, $p < 0.005$, 図6A, B)。また、p-R-Smad⁺ 細胞は両マウスともに Osx^+ 細胞の分布と一致して、海綿骨領域に確認できたが、KO マウスの p-R-Smad⁺ 細胞数は、WT マウスよりも少なく78% ほどに減少した (KO: $1.44 \pm 0.13 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, WT: $1.84 \pm 0.18 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, $p < 0.005$, 図6C, D)。

考 察

本研究では、 LepR^+ 細胞に発現する LRP1 を特異的に欠損させた KO マウスを作製し、LRP1 発現の有無が骨形成に与える影響を検討した。その結果、WT マウスと比較して LRP1 の KO マウスでは骨量、骨石灰化速度、および Osx^+ 細胞数の減少とともに、LRP1 が欠損している骨芽細胞の R-Smad のリン酸化が抑制されていることが明らかになった。つまり、 LepR^+ 細胞の LRP1 は骨芽細胞分化を促進することによって、骨量を調節していることが考えられた。

LRP1 の機能解明についての研究は、主に Cre/loxP システムを用いて作製したコンディショナルノックアウトマウスを利用して進められており、特定の細胞での LRP1 の欠

損が脛骨、大腿骨、および椎骨における破骨細胞分化を促進し、骨量を減少させることが示されている^{13, 14)}。例えば、Runx2 陽性細胞の LRP1 を欠損させたマウスでは、血小板由来成長因子の投与によって RANKL の発現が誘導され、骨吸収の促進と脛骨および椎骨の骨量を減少させることが報告されている¹⁴⁾。また、今回と同じ LepR^+ 細胞の LRP1 を欠損させた KO マウスでは、歯槽骨の骨吸収が促進し、歯槽骨量の減少が認められている¹⁵⁾。本研究で得られた KO マウスの頭頂骨の菲薄化や大腿骨の骨量低下などの骨形成を阻害する所見と照らし合わせると、 LepR^+ 細胞に発現する LRP1 が全身の骨格形成に影響を及ぼすと考えられた。

KO マウスの骨形成能をカルセイン標識によって調べると、WT マウスと同様に、FA と SC、および TB と CB にカルセインの二重標識が観察できたが、その間隙は WT マウスに比べて狭く、MAR の低下が認められた。これらの所見は、 LepR^+ 細胞の LRP1 が LepR^+ 細胞の骨芽細胞分化と骨形成に密接に関わることを裏付けるものである。しかし、これまでの報告によれば、骨芽細胞に発現する LRP1 を欠損させたマウスは、脛骨と椎骨に骨量低下が生じるが、これは破骨細胞の活性化による骨吸収促進に起因するもので、骨芽細胞の機能には影響がないことが示されている¹⁴⁾。つまり LRP1 は成熟骨芽細胞の骨形成機能に影響を及ぼさず、むしろ間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化過程に作用するため、LRP1 を欠損させることで、間接的に骨芽細胞の骨形成を阻害している可能性が考えられた。したがって LRP1 は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進する因子の一つであると考えるのが妥当であろう。

骨芽細胞である Osx^+ 細胞の分布を免疫組織化学的に調べた結果、WT マウスに比べて KO マウスの Osx^+ 細胞数の減少がみられた。 Osx は成熟した骨芽細胞に強く発現する²¹⁾ ことから、 LepR^+ 細胞の LRP1 を欠損させることで、骨芽細胞分化が抑制されることが裏付けられた。また、KO マウスでは、大腿骨遠位成長板の肥大軟骨細胞周囲に、 Osx^+ 細胞数が減少していたことから、石灰化軟骨の吸収後に骨形成阻害が生じて、軟骨内骨化が抑制されている可能性が示唆された。さらに、 Osx^+ 細胞数の減少とともに p-R-Smad⁺ 細胞数も減少していたことから、 LepR^+ 細胞の LRP1 は、 LepR^+ 細胞の BMP 分泌^{22, 23)} を促進し、R-Smad のリン酸化を誘導することで Runx2、続いて Osx の発現を誘導し、骨芽細胞分化を促進することが考えられた。

LepR^+ 細胞と免疫組織化学染色で検出された Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の関係については、今後、さらなる検討が必要ではあるが、大腿骨遠位骨幹端の海綿骨領域には LepR^+ 細胞が存在し、この細胞が骨芽細胞に分化すること⁷⁾ が示されていることから、本実験の WT マウスで観

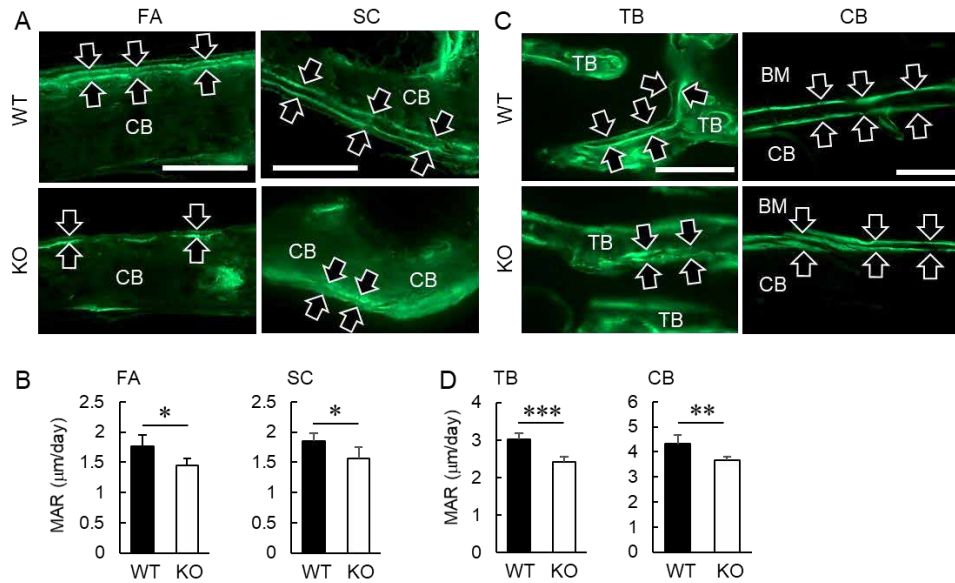


図5 KO マウスと WT マウスの頭頂骨と大腿骨におけるカルセイン二重標識

A: カルセインの二重線状標識によって KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の骨形成能を評価した。カルセインは1回目の腹腔内投与後、8日後に2回目を投与した。2回の投与でそれぞれ標識された骨組織を矢印で示す。頭頂骨の冠状縫合後方5.0 mmの平坦部 (flat area, FA) と矢状縫合両側の隆起部 (sagittal colliculus, SC) におけるカルセインの二重線状標識像を示す (皮質骨: cortical bone, CB), (スケールバー: $100\mu\text{m}$)。B: カルセインの二重線状標識像において測定した FA と SC の MAR を示す。C: 大腿骨の遠位骨幹端部海綿骨 (trabecular bone, TB) と骨幹部骨髓 (bone marrow, BM) の皮質骨面 (CB) にみられるカルセイン二重標識像を示す (スケールバー: 左図, $100\mu\text{m}$, 右図, $200\mu\text{m}$)。D: TB と CB の MAR は、カルセイン二重標識像から測定した。統計学解析は, unpaired Student *t*-test を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (versus WT, $n = 8$, in each)

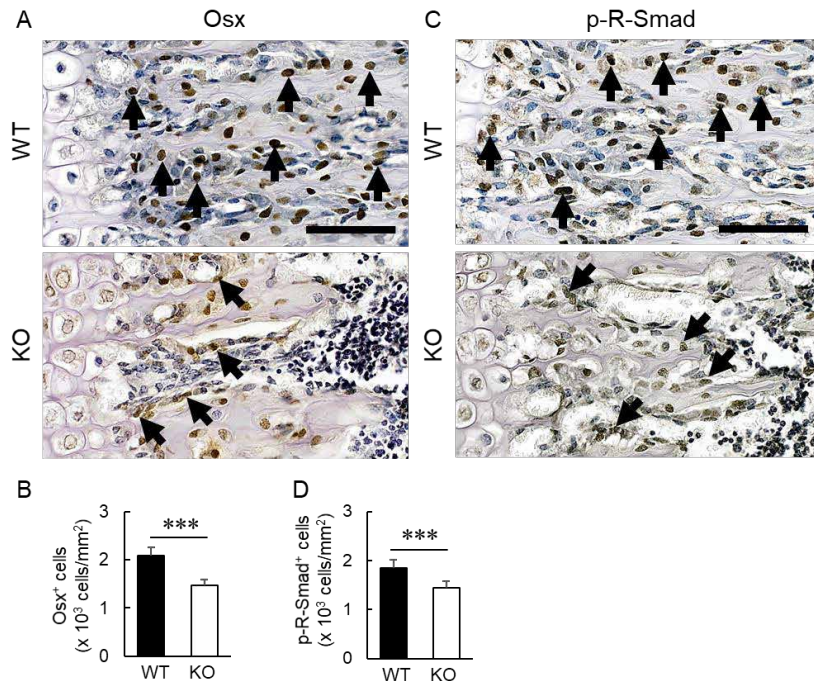


図6 大腿骨における Osx⁺ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の発現

A: KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の Osx⁺ 細胞 (スケールバー: $50\mu\text{m}$), 矢印は Osx⁺ 細胞を示す。B: Osx⁺ 細胞の数は ImageJ ソフトウェアを用いて計測した。C: KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の p-R-Smad⁺ 細胞 (スケールバー: $50\mu\text{m}$), 矢印は p-R-Smad⁺ 細胞を示す。D: p-R-Smad⁺ 細胞の数は ImageJ ソフトウェアを用いて計測した。統計学解析は, unpaired Student *t*-test を行った。*** $p < 0.005$ (versus WT, $n = 8$, in each)

察された Osx^+ 細胞は, $LepR^+$ 細胞から分化した骨芽細胞と考えるのが妥当である。つまり KO マウスでは LRP1 の欠損によって, $LepR^+$ 細胞は骨芽細胞分化能を失い, その結果 Osx^+ 細胞が減少したと推察できる。いっぽう, p-R-Smad⁺ 細胞の検出は, リン酸化 Smad1, 5, 9 に反応する抗体を使用した。これらの p-R-Smad は, BMP2 や BMP4 が骨芽細胞の分化過程に発現している BMP 受容体への結合によって誘導される^{10, 11)} ため, Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞は密接な関係性があり, KO マウスで観察された Osx^+ 細胞数の減少は p-R-Smad の発現抑制によるものと考えられる。

今回の結果に示すように, $LepR^+$ 細胞に発現している LRP1 を欠損させることで頭頂骨と大腿骨の骨量が減少した。いっぽう, $LepR^+$ 細胞を完全に欠失させたラットでは, 頭頂骨や長管骨に骨量減少をともなう重篤な骨格異常が報告されている²⁴⁾。これらの所見から, $LepR^+$ 細胞は骨芽細胞の供給と骨形成に必要な細胞ソースの一つと推測できる。その反面, $LepR^+$ 細胞の LRP1 が骨芽細胞分化に必須であれば, KO マウスで Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞は消失すると考えられる。しかし, それらの細胞数は WT マウスと比べて有意に減少したものの, 多くの Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞が認められた。間葉系幹細胞のポピュレーションには, $LepR^+$ 細胞以外に C-X-C motif chemokine ligand 12 陽性細胞²⁵⁾, platelet-derived growth factor receptor α 陽性細胞²⁶⁾, および paired related homeobox 1 陽性細胞^{27, 28)} などが知られている。これらの細胞も $LepR^+$ 細胞と同様に, 骨芽細胞や軟骨細胞などに分化し, 骨損傷修復に寄与するとされる²⁵⁻²⁸⁾。つまり, LRP1 のコンディショナルノックアウトマウスでは, $LepR^+$ 細胞以外の間葉系幹細胞も骨芽細胞分化能を有しているため, Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞として検出された可能性が考えられる。

$LepR^+$ 細胞に発現している LRP1 を欠損させただけでは, $LepR^+$ 細胞を完全に欠損させた動物で認められる長管骨の短縮化²⁴⁾を確認することができず, 骨形成の抑制は軽度であった。LRP1 の他に様々な因子によって間葉系幹細胞の骨芽細胞分化が制御されていると考えられ, 今後は YAP²⁹⁾ や ERK5³⁰⁾ などの $LepR^+$ 細胞を含む間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に必要な因子と LRP1 との関係について検討する必要がある。

結 論

$LepR^+$ 細胞に発現する LRP1 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し, 骨形成と骨芽細胞分化に与える影響について検討した。その結果, 以下の結論を得た。

1. 頭頂骨の骨量と厚さが減少した。
2. 大腿骨の BV/TV, Tb.Th, および Tb.N は減少し,

Tb.Sp は増加した。

3. 頭頂骨の平坦部と隆起部, 大腿骨の遠位骨幹端部と骨幹部で計測された MAR 値は減少した。
4. Osx^+ 細胞および p-R-Smad⁺ 細胞は, 大腿骨遠位骨幹端の成長板付近で観察されたが, その細胞数は WT マウスに比較して, それぞれ 70% と 78% ほどにまで減少した。

以上のことから, $LepR^+$ 細胞に発現している LRP1 を欠損させた場合, p-R-Smad の発現が阻害され, 骨芽細胞分化の抑制, 頭頂骨および大腿骨の骨量と骨形成の低下が生じることが明らかになった。

研究の推進にあたり日本大学歯学部歯科矯正学講座 本吉満教授および同学部解剖学第 I 講座 二宮 禎准教授にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表する。また、本研究に対して多大なご協力を頂いた歯科矯正学講座ならびに解剖学第 I 講座の皆様は心より感謝申し上げます。

本研究に関する利益相反はない。

文 献

- 1) Hojo H, Chung UI, Ohba S (2017) Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration. *Regen Ther* 6, 100-107.
- 2) Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E (2021) Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab* 39, 19-26.
- 3) Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H (2011) Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 17, 1473-1480.
- 4) Ma QL, Fang L, Jiang N, Zhang L, Wang Y, Zhang YM, Chen LH (2018) Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces. *Biomaterials* 154, 234-247.
- 5) Prasad P, Cancelas JA (2024) From marrow to bone and fat: exploring the multifaceted roles of leptin receptor positive bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cells* 13, 910.
- 6) Reid IR, Baldock PA, Cornish J (2018) Effects of leptin on the skeleton. *Endocr Rev* 39, 938-959.
- 7) Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, Ono N, Kronenberg HM, Frenette PS (2014) Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell* 29, 340-349.
- 8) Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ (2014) Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15, 154-168.
- 9) Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, Kokkalis KD, Mercier F, Tabaka

- M, Hofree M, Dionne D, Papazian A, Lee D, Ashenberg O, Subramanian A, Vaishnav ED, Rozenblatt-Rosen O, Regev A, Scadden DT (2019) A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell* 177, 1915-1932.e16.
- 10) Wu M, Wu S, Chen W, Li YP (2024) The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease. *Cell Res* 34, 101-123.
 - 11) Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T (2012) Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem* 151, 247-254.
 - 12) Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK (2008) LDL receptor related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 88, 887-918.
 - 13) Lu D, Li J, Liu H, Foxa GE, Weaver K, Li J, Williams BO, Yang T (2018) LRP1 suppresses bone resorption in mice by inhibiting the RANKL-stimulated NF- κ B and p38 pathways during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 33, 1773-1784.
 - 14) Bartelt A, Behler-Janbeck F, Beil FT, Koehne T, Müller B, Schmidt T, Heine M, Ochs L, Yilmaz T, Dietrich M, Tuckermann JP, Amling M, Herz J, Schinke T, Heeren J, Niemeier A (2018) Lrp1 in osteoblasts controls osteoclast activity and protects against osteoporosis by limiting PDGF-RANKL signaling. *Bone Res* 6, 1-10.
 - 15) Nishimura S, Kariya H, Gakiya Y, Shinohara R, Nakamura Y, Mizoguchi T, Ohashi A, Motoyoshi M, Ninomiya T (2024) LRP1-deficient leptin receptor-positive cells in periodontal ligament tissue reduce alveolar bone mass by inhibiting bone formation. *Arch Oral Biol* 158, 105853.
 - 16) DeFalco J, Tomishima M, Liu H, Zhao C, Cai X, Marth JD, Enquist L, Friedman JM (2001) Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science* 291, 2608-2613.
 - 17) Rohlmann A, Gotthardt M, Willnow TE, Hammer RE, Herz J (1996) Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase. *Nat Biotechnol* 14, 1562-1565.
 - 18) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
 - 19) Nagashima T, Ninomiya T, Nakamura Y, Nishimura S, Ohashi A, Aoki J, Mizoguchi T, Tonogi M, Takahashi T (2022) p53 deficiency promotes bone regeneration by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 40, 434-447.
 - 20) Dempster WD, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28, 1-16.
 - 21) Blumer MJF (2021) Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Ann Anat* 235, 151704.
 - 22) Zhang B, Yang L, Zeng Z, Feng Y, Wang X, Wu X, Luo H, Zhang J, Zhang M, Pakvasa M, Wagstaff W, He F, Mao Y, Qin K, Ding H, Zhang Y, Niu C, Wu M, Zhao X, Wang H, Huang L, Shi D, Liu Q, Ni N, Fu K, Athiviraham A, Wolf JM, Lee MJ, Hynes K, Strelzow J, Dafrawy ME, Xia Y, He TC (2020) Leptin potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the activation of JAK/STAT signaling. *Stem Cell Dev* 29, 498-510.
 - 23) 中村純基 (2022) マウス歯根膜における leptin receptor 陽性細胞の幹細胞性と LRP1 陽性細胞の役割について. *日大歯学* 96, 35-44.
 - 24) Micheletti C, Jolic M, Grandfield K, Shah FA, Palmquist A (2023) Bone structure and composition in a hyperglycemic, obese, and leptin receptor-deficient rat: Microscale characterization of femur and calvarium. *Bone* 172, 116747.
 - 25) Matsushita Y, Nagata M, Kozloff KM, Welch JD, Mizuhashi K, Tokovanich N, Hallett SA, Link DC, Nagasawa T, Ono W, Ono N (2020) A Wnt-mediated transformation of the bone marrow stromal cell identity orchestrates skeletal regeneration. *Nat Commun* 11, 332.
 - 26) Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y (2009) Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206, 2483-2496.
 - 27) Schiffer C, Tariverdian G, Schiesser M, Thomas MC, Sergi C (2002) Agnathia-otocephaly complex: report of three cases with involvement of two different Carnegie stages. *Am J Med Genet* 112, 203-208.
 - 28) Esposito A, Wang L, Li T, Miranda M, Spagnoli A (2020) Role of Prx-1-expressing skeletal cells and Prx-1-expression in fracture repair. *Bone* 139, 115521.
 - 29) Zhu S, Chen W, Masson A, Li YP (2024) Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discov* 10, 71.
 - 30) Horie T, Fukasawa K, Yamada T, Mizuno S, Iezaki T, Tokumura K, Iwahashi S, Sakai S, Suzuki A, Kubo T, Osumi R, Tomizawa A, Ochi H, Sato S, Kaneda K, Takahashi S, Hinoi E (2022) Erk5 in bone marrow mesenchymal stem cells regulates bone homeostasis by preventing osteogenesis in adulthood. *Stem Cells* 40, 411-422.

IL-1 receptor type 1 による IL-1 α の細胞内分解調節に関する研究

保坂 万智

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻口腔構造機能学分野
日本大学歯学部 口腔外科学第Ⅱ講座
(指導: 米原啓之 教授, 浅野正岳 教授)

要旨

【目的】IL-1 α は傷害を受けた細胞から放出される DAMPs の代表的分子であり, 標的細胞の細胞膜上の IL-1R1 に結合することでシグナルを伝達する。しかし, これまでの研究で, IL-1R1 おもに細胞核内に局在していることが明らかとなっていることから, IL-1R1 にはこれまで知られていない機能があるのではないかとこの着想を得た。本研究では IL-1R1 の未知なる機能について探求した。

【方法】ヒト子宮頸癌由来の HeLa と CRISPR/Cas9 システムを用いて IL-1R1 を欠失させた HeLa 細胞株 (CR-R1-4) を用いた。それぞれの細胞から, total RNA を抽出し, cDNA を作製し RT-PCR によって IL-1 α 遺伝子発現を観察した。細胞における IL-1 α および IL-1R1 の強制発現は, PEI 試薬を用いた transfection により行い, タンパク質の発現は western blot により確認した。また, IL-1R1 の STOP コドンの直上に HiBiT タグを挿入した plasmid を C-R1 として transfection し, 免疫蛍光染色により細胞内局在を観察した。Transfectant の細胞溶解液を回収した後, サンプル中の IL-1 α 濃度を ELISA 法により測定した。

【結果】IL-1R1 の欠失自体が IL-1 α の遺伝子発現に及ぼす影響について検討したところ, CR-R1-4 では, HeLa に比較して, IL-1 α mRNA 発現が増強されていることが判明した。IL-1 α の transfection 48 時間後に actinomycin D を作用させることによって transgene 由来の IL-1 α mRNA 発現を停止させ, 細胞内での IL-1 α の分解について検討したところ, HeLa では CR-R1-4 に比較して, 細胞溶解液中の IL-1 α 量が少ないことが判明した。いっぽう, CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection により再発現させたところ, IL-1 α の細胞内分解は増強されることが明らかとなった。そこで, 免疫蛍光法により両分子の細胞内局在を観察したところ, 細胞質内に分散する小胞様構造体において IL-1 α と IL-1R1 が共局在していることが明らかとなった。

【結論】本研究の結果は, IL-1R1 が細胞内で IL-1 α と結合することで IL-1 α の細胞質内分解を促進させている可能性を示唆するものであった。

キーワード: IL-1 α , IL-1R1, 細胞内タンパク質分解, actinomycin D, CRISPR/Cas9

Regulation of intercellular degradation of IL-1 α by IL-1 receptor type 1

Machi Hosaka

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Structural and Functional Biology
Department of Oral and Maxillofacial Surgery II, Nihon University School of Dentistry
(Director: Prof. Yoshiyuki Yonehara and Prof. Masatake Asano)

Abstract

【Purpose】IL-1 α is a representative of the danger-associated molecular patterns released from damaged cells. It transduced signals by binding to IL-1R1 on the plasma membrane of target cells. However, previous studies have shown that IL-1R1 is mainly localized in the cell nucleus, indicating that IL-1R1 may have a previously unknown function. In this study, I explored the unknown function of IL-1R1.

【Methods】HeLa and its derivative cell (CR-R1-4) in which IL-1R1 was deleted using the CRISPR/Cas9 system were used. Total RNA was extracted from each cell, cDNA was prepared, and IL-1 α gene expression was observed by RT-PCR. Forced expression of IL-1 α and IL-1R1 in cells was performed by transfection using PEI reagent, and protein expression was confirmed by western blotting. After collecting cell lysates from the transfectants, the concentration of IL-1 α in the samples was measured by ELISA method.

【Results】The effect of IL-1R1 deletion itself on IL-1 α gene expression was examined, and it was found that IL-1 α mRNA expression was enhanced in CR-R1-4 cells compared to HeLa cells. In IL-1 α transfectants, the amount of IL-1 α in the cell lysate of HeLa cells was lower than that of CR-R1-4 cells. On the other hand, when IL-1R1 was re-expressed in CR-R1-4 by transfection, the intracellular degradation of IL-1 α was enhanced. Subcellular localization of IL-1 α and IL-1R1 was observed by immunofluorescence, and it was found that IL-1 α and IL-1R1 were co-localized in vesicle-like structures dispersed in the cytoplasm.

【Conclusion】The results of this study suggest that IL-1R1 may promote intracellular degradation of IL-1 α in the cytoplasm by binding to IL-1 α intracellularly.

Keywords: IL-1 α , IL-1R1, intracellular proteolysis, actinomycin D, CRISPR/Cas9

(受付: 令和 7 年 1 月 29 日)

責任著者: 保坂万智

日本大学歯学部 口腔外科学第Ⅱ講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8355

FAX: 03-3219-8356

E-mail: dema21019@g.nihon-u.ac.jp

緒 言

細胞の壊死などに際して細胞外に放出される物質を danger-associated molecular patterns (DAMPs) と総称する¹⁾。Interleukin-1 α (IL-1 α) は代表的な DAMPs であり、細胞内で前駆体 (precursor: pIL-1 α) として産生されたのち、種々の酵素により切断され、N-末端側の propiece (pp) IL-1 α と C-末端側の mature (m) IL-1 α に分断される。このうち、pIL-1 α と mIL-1 α は細胞外に分泌され、標的細胞の細胞膜上に発現する IL-1 receptor 1 (IL-1R1) に結合することによりシグナル伝達する^{2,3)}。

IL-1R1は、細胞質内に toll/IL-1 receptor (TIR) domain を有しており^{3,4)}、IL-1R1の細胞外領域に、リガンドである pIL-1 α または mIL-1 α が結合すると、IL-1R3と会合し、IL-1R1およびIL-1R3両レセプターの TIR domain が結合することにより、シグナルが伝達される。いっぽう、IL-1R2は細胞質内に TIR domain を有しないため^{4,6)}、リガンドである IL-1 α に結合することはできても、シグナルを伝達できないことから decoy receptor とされている。したがって IL-1R1は、IL-1 α のシグナル伝達に必須の分子であるが、細胞膜表面に表出されている IL-1R1の数は少なく、市販の抗体などによる検出は極めて困難である⁶⁾。いっぽう、これまでの研究から、IL-1R1のC末端に、HiBiTタグを付与することによって、検出感度が顕著に上昇することが明らかとなった⁷⁾。これを用いた検索により、IL-1R1が細胞内ではおもに核に局在することが免疫蛍光染色によって明らかとなった。このことは、IL-1R1に未知の機能がある可能性を示唆するものである。そこで、本研究ではIL-1R1がそのリガンドである pIL-1 α に対して、細胞内でどのような機能を有しているのか検討することとした。

材料および方法

1. 細胞

実験には、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞 (HeLa) (JCRB 細胞バンク, 大阪) および CRISPR/Cas9 システムを用いて HeLa における IL-1R1 を欠失した細胞 CR-R1-4⁸⁾ を用いた。両細胞は、10% ウシ胎児血清 (fetal calf serum; FCS), 50 μ g/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50 U/ml ペニシリン (Sigma-Aldrich) を添加した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。また、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞 HSC3 (JCRB 細胞バンク) の培養は、10% FCS 添加 Rosewell Park Memorial Institute medium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いた。

2. Transfection

pIL-1 α および IL-1R1 の発現 plasmid および IL-1R1 の C 末端の STOP コドン直上に HiBiT タグを挿入した plasmid (C'-R1) は Moriyama ら⁷⁾ の作製したものをを用いた。細胞への transfection は、各 plasmid (250 ng) とポリエチレンジイミン溶液 (1 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1 μ l を混和し、室温で 30 分間反応させたのち、細胞に添加し 37°C で 18 時間培養し、transfection を行った。

3. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

細胞からの RNA 抽出は、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いた。complementary DNA は、Superscript III 逆転写酵素 (Thermo Fisher) を用いて合成した。PCR は、CFX 96 real-time system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ, 草津) を用いて行った。本研究で使用した pIL-1 α プライマー配列は以下のとおりである (forward 5'-CAA GCC TAG GTC AGC ACC TT -3' reverse 5'-ATG TAA TGC AGC AGC CGT GA-3')。

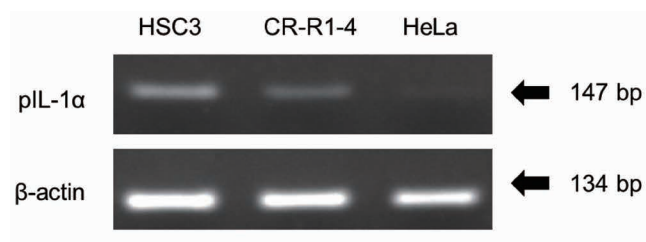
得られた PCR 産物を、臭化エチジウム (0.5 μ g/ml) 添加 1.2% アガロースゲルを用いた電気泳動で展開し、iBright1500 (Thermo Fisher Scientific) によって撮影した。また内在性コントロールとして β -actin (forward 5'-CAA CAT TGG CAA TGA GCG GTT C-3' reverse 5'-AGG TCT TTG CGG ATG TCC ACG T-3') を用いた。

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による IL-1 α の定量

それぞれの細胞 (5 \times 10⁴ cell/24-well plate) を播種し、18 時間後に transfection を行った。その後 24 時間培養し、細胞溶解液を回収した。遠心分離後 (16,900 \times g, 1 分間) の上清中の IL-1 α 濃度を ELISA kit (BioLegend San Diego, CA, USA) を用いて測定した。

5. 免疫蛍光染色

CR-R1-4 (5 \times 10⁴ cell/well) を 24 well プレートに入れた cover slip (直径 10 mm, マツナミ, 東京) 上に播種し、上記の通り transfectant を作製した。transfectant をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline; PBS) で洗浄し、4% パラホルムアルデヒドで固定した。1% triton X-100 処理を室温で 10 分間 permeabilization した後に、1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin; BSA) 添加 PBS (1% BSA-PBS) でブロッキングを行った。免疫染色には、マウス抗 HiBiT 抗体 (\times 100 希釈, PROMEGA, Madison, WI, USA) およびウサギ抗ヒト IL-1 α 抗体 (\times 100 希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA) を 1% BSA-

図1 CR-R1-4における IL-1 α の発現増強

Positive control である HSC3, CR-R1-4 および HeLa から total RNA を抽出し, cDNA 作製後, PCR により IL-1 α mRNA の発現を確認した。PCR 産物をエチブロミド添加1.2% アガロースゲル電気泳動により展開し, IL-1 α (147 bp) および internal control である β -actin (134 bp) のバンドの検出を行った。独立した3回の実験を行った, 代表的な泳動結果を示した。

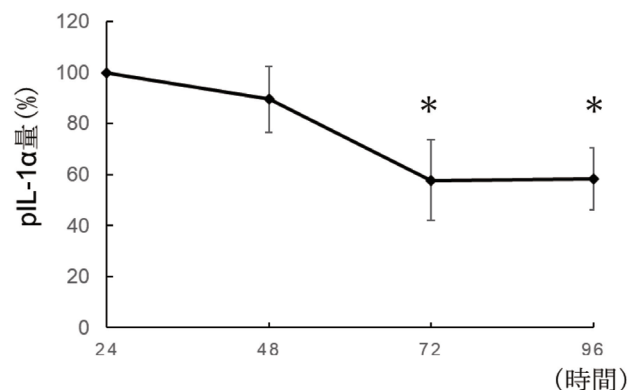
PBS で希釈し, 室温で24時間反応させた。2次抗体として FITC 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 ($\times 100$ 希釈, Proteintech) または RITC 標識ヤギ抗ウサギ抗体 ($\times 100$ 希釈, Proteintech) を用い, 遮光し室温で1時間反応させた。さらに PBS で洗浄後, DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) を用いてスライドガラスに封入した。観察および画像の撮影には, オールインワン蛍光顕微鏡 (BZ-X810, キーエンス, 大阪) を使用した。

6. Western blot (WB)

Transfectant を PBS で2回洗浄した後, 100 μ l の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100) を用いて溶解しサンプルとした。溶解サンプルを12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を用いて電気泳動した。WB は Hanayama らの方法⁸⁾ に従って行った。一次抗体として, マウス抗 HiBiT 抗体 (PROMEGA, Madison, WI, USA) を1% BSA-PBS で希釈 ($\times 1,000$) し, 室温で1時間反応させた。2次抗体として, horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) 抗体 ($\times 5,000$ 希釈, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) を用い, 室温で1時間反応させた。内在性コントロールには Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。1次抗体としてウサギ抗ヒト GAPDH 抗体 ($\times 10,000$ 希釈, Proteintech) および2次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG (H+L) 抗体 ($\times 6,000$ 希釈, Jackson ImmunoResearch) を使用した。

7. 統計

データの正規性を Kolmogorov-Smirnov 検定, 等分散性を F 検定で確認した。IL-1 α の経時的発現変化は t 検定を用いて, IL-1 α の細胞内分解の比較と IL-1R1 発現による IL-1 α の細胞内分解促進は Wilcoxon rank sum 検定を用いて有意差を検定した。p < 0.05 を有意差ありとした。す

図2 Transgene 由来 IL-1 α の経時的発現変化

HeLa に IL-1 α を transfection し, 24, 48, 72 および96時間後に, transfectant の細胞溶解液を回収した。細胞溶解液中の IL-1 α 濃度を ELISA により測定した。Transfection 24時間後の濃度を100%として, 各時間の濃度を計算した。Transfection 実験を5回行い, 平均値 \pm 標準偏差値を示した。* p < 0.05

すべてのデータは平均値 \pm 標準偏差で示した。

結 果

1. CR-R1-4における pIL-1 α 遺伝子発現の上昇

初めに, IL-1R1 を欠失させた CR-R1-4 において, pIL-1 α の遺伝子発現に変化があるか否か, PCR によって検討した。その結果, positive control である HSC3 においては明瞭な147bp のバンドを検出できたのに対し, HeLa ではバンドは検出できなかった。いっぽう, CR-R1-4 では, HSC3 と比較して発現は弱い, バンドを検出することができた (図1)。さらに ELISA によりタンパク質レベルでの発現についても確認したところ, CR-R1-4 および HeLa とともに pIL-1 α 発現を確認することができなかった。

2. Transgene 由来の pIL-1 α 発現変化

つぎに, IL-1R1 の欠失が, 細胞内での pIL-1 α 分解にどのような影響を及ぼすか検討することを目的として, transfection によって強制発現させた pIL-1 α の経時的な発現変化について検討した。Transfection 24時間後に細胞溶解液中に見られた pIL-1 α 量を100%とした時, transfection 48時間後には, 発現量の減少は見られたが, 統計的に有意差は無かった。また, transfection 72時間後には発現が著しく低下する傾向にあった (図2)。また, この傾向は HeLa と CR-R1-4 両者において変化が無かった。このことから, transfection 48時間以降の transfectant における pIL-1 α の細胞内分解に与える IL-1R1 の影響について検討することとした。

3. IL-1R1 による pIL-1 α 細胞内分解調節

HeLa および CR-R1-4 に pIL-1 α を transfection し, 48時間培養後に actinomycin D の存在下または非存在下で3

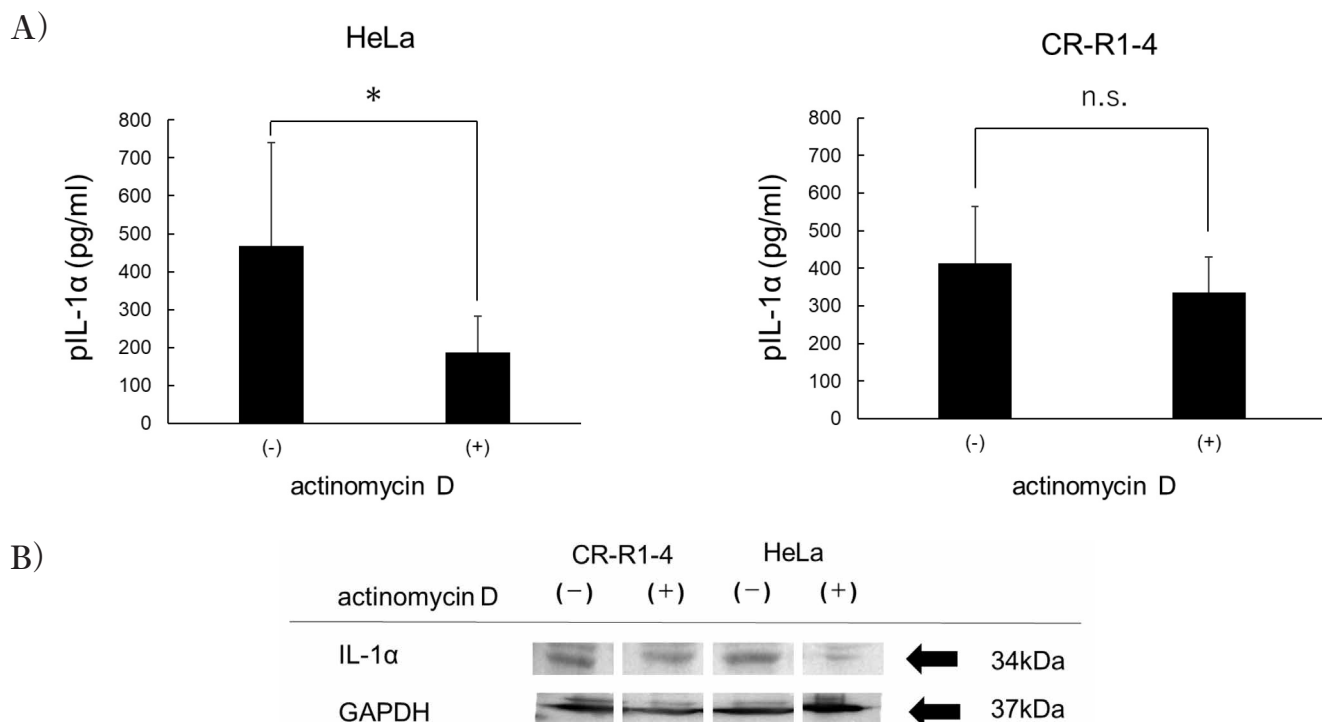


図 3 IL-1α の細胞内分解の比較

HeLa (左図) および CR-R1-4 (右図) に IL-1α を transfection し, 48 時間後に actinomycin D (1 μg/ml) 非存在下 (-) および存在下 (+) で 3 時間培養した。A) 培養後の細胞溶解液中の IL-1α 濃度を ELISA により測定した。独立した実験を 6 回行い, 平均値 ± 標準偏差により結果を示した。* p < 0.05, n.s.: 有意差なし

B) A) と同様に細胞を処理し, 回収した細胞溶解液を 12% SDS-PAGE により展開した。Western blot には, 1 次抗体としてウサギ抗ヒト IL-1α 抗体 (×1,000 希釈) を, 2 次抗体として HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (×5,000 希釈) を用いた。発色は ECL substrate (BioRad) を用いた。独立した実験を 4 回行い, 代表的なデータを示した。

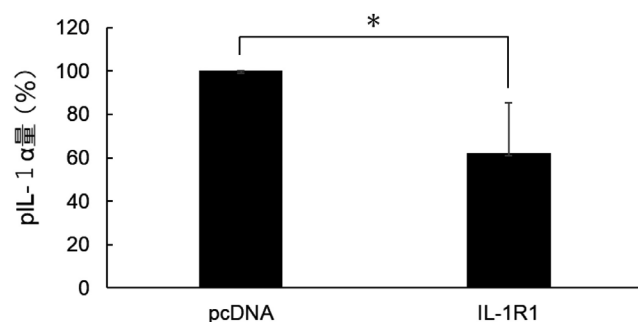


図 4 IL-1R1 発現による IL-1α の細胞内分解促進

CR-R1-4 に IL-1α と共に, pcDNA (左, コントロール) または IL-1R1 (右) を transfection した。図 3 と同様に処理し, 細胞溶解液中の IL-1α 濃度を ELISA により測定した。独立した 7 回の実験の平均値 ± 標準偏差により結果を示した。* p < 0.05

時間培養し, 細胞質内の pIL-1α 量を ELISA により測定した。その結果, HeLa では未処理群で 467.9 ± 272.9 pg/ml あり, actinomycin D 処理群では 186.1 ± 96.1 pg/ml であった (図 3)。いっぽう, CR-R1-4 では, 未処理群で 413.1 ± 150.6 pg/ml, 処理群で 335.9 ± 93.6 pg/ml を示した。このことから, CR-R1-4 では, 細胞内 pIL-1α の分解が, HeLa に比較して軽度であることが明らかになった (図 3)。

そこで, CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection することによって, pIL-1α の分解が HeLa レベルにまで回復するかどうか検討した。その結果, IL-1R1 を CR-R1-4 に発現させることによって, pIL-1α の分解は, pcDNA transfectant の 62.0% まで低下し, HeLa における分解までには至らなかったが統計学的に優位な低下を示した (図 4)。

4. IL-1R1 と pIL-1α の細胞内局在

以上の結果から, pIL-1α と IL-1R1 を transfection した CR-R1-4 において pIL-1α と IL-1R1 が結合していることが示唆された。そこで, 両分子の会合の可能性を免疫蛍光染色によって検討した。図 5 に示した通り, pIL-1α と IL-1R1 は細胞質全体に拡散して存在する小胞状造物において共局在した。以上のことから, IL-1R1 は細胞質内で pIL-1α と結合し, pIL-1α の細胞質内分解を促進している可能性が示唆された。

考 察

IL-1R1 の C 末端に HiBiT-tag を挿入することによって, 従来の手法と比べて IL-1R1 の検出感度が格段に高まった⁷⁾。これを用いて行った IL-1R1 の細胞内局在に関するこれまでの検討から, IL-1R1 はおもに核に局在することが

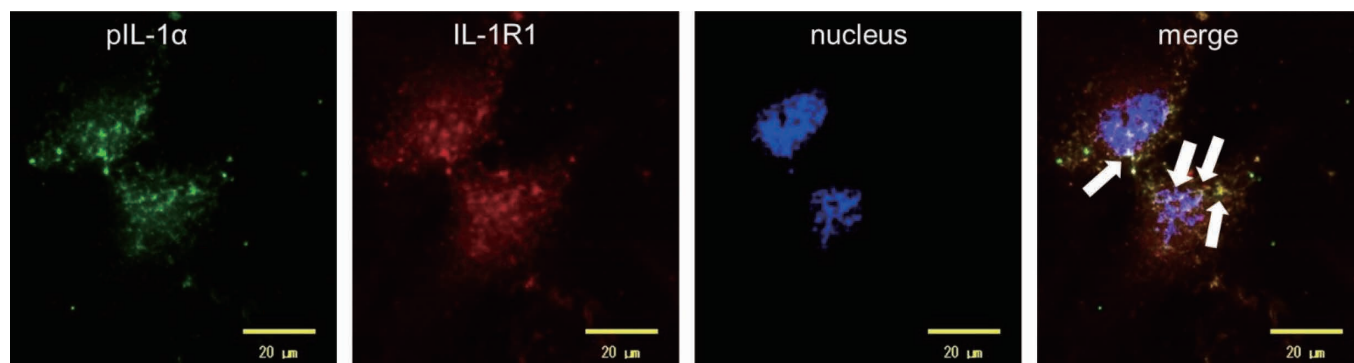


図5 CR-R1-4における IL-1 α と IL-1R1の共局在

CR-R1-4に IL-1 α と IL-1R を co-transfection し、免疫蛍光染色により両分子の細胞内局在を観察した。矢印は両分子が共局在した細胞内の小胞状構造物を示した。独立した3回の実験の代表的結果を示した。

明らかとなっている⁷⁾。また、IL-1R1には、シグナル伝達に必要な TIR ドメインが存在するのに加え、Box 1, 2, 3 という機能的な領域に分かれていることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。そしてこれらドメインには従来から報告されている、核移行シグナル配列に類似したアミノ酸配列が複数存在している。これらの事実は、本研究を企図する極めて重要な根拠となった。

初めに HeLa と CR-R1-4 における IL-1 α の発現量の違いについて検討したところ、CR-R1-4 においては mRNA レベルで IL-1 α の発現が増強されていることが明らかとなった。この結果は、IL-1R1 が IL-1 α 発現を負にコントロールしている可能性を示すものであったが、IL-1R1 が遺伝子発現に寄与するという報告はこれまでになく、そのメカニズムについては今後検討する必要がある。

いっぽう、IL-1 α の細胞内分解に関する IL-1R1 の効果について検討することを目的として、HeLa および CR-R1-4 における transgene 由来の IL-1 α 発現の経時的变化について検討した。その結果、transfection 24 時間後に発現レベルのピークがあり、48 時間後までは同等のレベルが維持されることが明らかとなった。しかしその後、暫時減少する傾向にあり、transfection 48 時間後の時点で mRNA への転写を actinomycin D によって遮断すること¹²⁾で、細胞内 IL-1 α 分解速度を比較し得ると判断した。そこで、HeLa および CR-R1-4 に pIL-1 α を transfection し、さらに actinomycin D を作用させて IL-1 α の細胞内分解を比較した。すると、HeLa では actinomycin D 作用後に、細胞質内 IL-1 α の有意な減少が確認できたのに対して、CR-R1-4 では IL-1 α の減少を確認することができなかった。いっぽう、CR-R1-4 に IL-1R1 を transfection することによって、細胞内 IL-1 α 濃度が減少することが明らかとなった。このことは IL-1R1 が細胞における IL-1 α 分解を促進している可能性を示唆するものであった。前述の IL-1 α mRNA 発現に関する検討で、IL-1R1 が IL-1 α の遺伝子発現を抑制している可能性があり、この結果は IL-1R1 が IL-1 α の分

解を促進するという結果と同じ方向性を示すものであると考える。すなわち、IL-1R1 は細胞内の IL-1 α 量を抑制する働きを有すると予想される。

そこで、どのようなメカニズムによって IL-1 α の発現を抑制するかを調べるため、HeLa に pIL-1 α および IL-1R1 を co-transfection し、それぞれの細胞内局在について検討したところ、両分子は細胞内に分散して局在する小胞状構造物において共局在することが解った。一般的に、細胞内におけるタンパク質分解は、プロテアソーム系ないしオートファジー系でコントロールされている¹³⁾。このうち、プロテアソーム阻害剤である MG132 を作用させた実験では、IL-1R1 の発現強度に何ら変化が無いことをこれまでの実験で確認しており、メカニズムは不明である。また、IL-1 β mRNA の安定性に寄与するものとして、tristetraprolin (TTP) という分子の存在が知られており、TTP knockout cell を用いた実験では、IL-1R1 と mRNA の安定性には何ら変化は認められていない。前述のように、pIL-1 α と IL-1R1 が共局在する細胞内コンパートメントの同定は、IL-1R1 の機能解明には不可欠なものと考えている。

結 論

本研究では、HeLa および CR-R1-4 を用いて IL-1R1 の未知の機能について検討し、以下の結論を得た。

1. CR-R1-4 においては、HeLa と比較して、IL-1 α mRNA の発現が増強されていた。
2. HeLa および CR-R1-4 においては transgene 由来の IL-1 α 発現は、transfection 24 時間後にピークがあり、48 時間後までは同等のレベルが維持され、その後、暫時減少する傾向にあった。
3. HeLa では、IL-1 α は actinomycin D 作用後 3 時間で 39.8% にまで分解されたが、CR-R1-4 では、pIL-1 α の分解は統計学的に優位なレベルの分解は認められなかった。

4. CR-R1-4に IL-1R1を transfection すると, pIL-1 α の分解は促進した。
5. 免疫蛍光法にて pIL-1 α と IL-1R1は, 細胞質全体に拡散して存在する小胞状構造物において共局在していた。

以上より, IL-1R1 は pIL-1 α の細胞内分解に関与していることが明らかとなり, IL-1R1が IL-1 α の分解を介して, 炎症を負にコントロールしている可能性が示唆された。

本研究の推進にあたり, 日本大学歯学部口腔外科学第Ⅱ講座 米原啓之教授, 日本大学歯学部病理学講座 浅野正岳教授および両講座の皆様にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表する。

本論文に関して, 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Oppenheim JJ, Yang D (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr Opin Immunol* 17, 359-365.
- 2) Di Paolo NC, Shayakhmetov DM (2016) Interleukin 1 α and the inflammatory process. *Nat Immunol* 17, 906-913.
- 3) Boraschi D, Italiani P, Weil S, Martin MU (2018) The family of the interleukin-1 receptors. *Immunol Rev* 281, 197-232.
- 4) Curtis BM, Gallis B, Overell RW, McMahan CJ, DeRoos P, Ireland R, Eisenman J, Dower SK, Sims JE (1989) T-cell interleukin 1 receptor cDNA expressed in chinese hamster ovary cells regulates functional responses to interleukin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 3045-3049.
- 5) Muñoz E, Zubiaga AM, Sims JE, Huber BT (1991) IL-1 signal transduction pathways. I. Two functional IL-1 receptors are expressed in T cells. *J Immunol* 146, 136-143.
- 6) Sims JE, Gayle MA, Slack JL, Alderson MR, Bird TA, Giri JG, Colotta F, Re F, Mantovani A, Shanebeck K, Grabstein KH, Dower SK (1993) Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6155-6159.
- 7) Moriyama A, Imaoka S, Sasagawa T, Hosaka M, Kato I, Tamura H, Takeuchi R, Tsunoda M, Asano M (2024) C-terminal tagging enhances the detection sensitivity of interleukin receptor type 1. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 70, 43-48.
- 8) Hanayama M, Ishiyama Y, Sadamura M, Moriyama A, Imaoka S, Tsunoda M, Asano M (2022) Establishment of interleukin-1 receptor type 1 knockout Hela strain by CRISP/Cas9 system. *J Biomed Sci Res* 4, doi:10.36266/JBSR161.
- 9) Vigers GP, Anderson LJ, Caffes P, Brandhuber BJ (1997) Crystal structure of the type-I interleukin-1 receptor complexed with interleukin-1beta. *Nature* 386, 190-194.
- 10) Slack JL, Schooley K, Bonnert TP, Mitcham JL, Qwarnstrom E, Sims JE, Dower SK (2000) Identification of two major sites in the type I interleukin-1 receptor cytoplasmic region responsible for coupling to pro-inflammatory signaling pathways. *J Biol Chem* 275, 4670-4678.
- 11) Radons J, Falk W, Dove S (2015) Identification of critical regions within the TIR domain of IL-1 receptor type I. *Int J Biochem Cell Biol* 68, 15-20.
- 12) Hollstein U (1974) Actinomycin, chemistry and mechanism of action. *Chem Rev* 74, 625-652.
- 13) Li Y, Li S, Wu H (2022) Ubiquitination-proteasome system (UPS) and autophagy two main protein degradation machineries in response to cell stress. *Cells* 11, doi: 10.3390/cells11050851.

歯学部附属歯科病院における患者動向および診療体制に COVID-19 流行が及ぼした影響

武内 伸賢

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野

日本大学歯学部 口腔外科学第Ⅱ講座

(指導: 米原啓之 教授, 白玉博司 助教)

要旨

【目的】 2019年12月に中国で確認された新型コロナウイルス感染症 (corona virus disease 2019: 以下 COVID-19) は全世界での蔓延をみせた。本邦では、2020年3月～5月にかけての期間をはじめとして、2023年1月までに周期的な8つの大きな流行期 (第1波～第8波) が生じ、感染対策の一環として多くの医療機関で診療体制の見直しや外来患者数の調整などが行われた。本研究では、2019年4月～2024年3月までの5年間に日本大学歯学部附属歯科病院を受診した患者の動向ならびに当院での診療体制に起こった変容を調査し、感染流行と歯科受診および入院手術実施にCOVID-19流行が及ぼした影響を究明することを目的とした。

【方法】 2019年4月～2024年3月まで5年間の当院における集計結果を調査対象とした。受診患者数についてその年度ごとおよび月別推移の2つの観点からデータ収集を行った。年次推移は2019年度～2023年度の期間で調査を行い、外来患者数、外来初診患者数、口腔外科外来患者数、入院患者数、入院手術件数をその対象とした。月別推移は2019年4月～2024年3月までの期間において、外来患者数、外来初診患者数、口腔外科外来患者数、入院患者数、入院手術件数について調査を行い、東京都内のCOVID-19罹患患者数は2020年4月～2023年3月について調査した。

【結果】 年間の累計患者数は、外来患者数、外来初診患者数、口腔外科外来患者数、入院患者数、入院手術件数の全てで、2020年度が最も少なかった。入院患者数、入院手術件数の推移は2019年度と2023年度がほぼ同数であった。月別の累計患者数は、外来患者数について、2020年4月および5月で、それ以外の期間と比較して大幅な減少がみられた。外来初診患者数、口腔外科外来患者数、入院患者数、入院手術件数にもそれと同様な傾向がみられた。これら患者数などの減少は2020年6月以降に増加に転じており、2ヶ月ではほぼ流行前と同数に回復した。

【結論】 呼吸器感染症であるCOVID-19においては、歯科病院における患者数などに対する影響は外出制限や入院制限などによる限局的なものであった。医療業務維持については、勤務体制の変更、院内感染予防対策の徹底、ワクチン接種などにより人的資源を確保していくことが重要であると考えられた。

キーワード: 歯科病院, COVID-19, 動向調査, SARS-CoV-2

Effect of the COVID-19 on visit patient trends and treatment system at the dental hospital

Nobumasa Takeuchi

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral Structural and Functional Biology

Department of Oral and Maxillofacial Surgery II Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Yoshiyuki Yonehara and Assistant Prof. Hiroshi Shiratsuchi)

Abstract

【Purpose】 The novel coronavirus disease 2019 (COVID-19), which was confirmed in China in December 2019, has spread throughout the world. In Japan, eight large periodic epidemic periods (waves 1 to 8) occurred starting from March 2020 to May 2020 and ending in January 2023. This study investigated the trends of patients who visited the Nihon University School of Dentistry Dental Hospital over the five-year period from April 2019 to March 2024, as well as the changes that occurred in the medical treatment system at the dental hospital. The purpose of this study was to investigate the impact of the COVID-19 pandemic on the performance of inpatient surgery.

【Methods】 The subjects were patients who visited Nihon University School of Dentistry Dental Hospital during the five-year period from April 2019 to March 2024. Data were collected on the number of patients seen from two perspectives: annual trends and monthly trends. Annual trends were investigated from 2019 to 2023, and included the total number of outpatients, first-visit outpatient patients, and oral surgery outpatients, number of inpatients, and number of inpatient surgeries. For the monthly trends from April 2019 to March 2024, this study investigated the total number of outpatients, first-visit outpatient patients, oral surgery outpatients, inpatients, and inpatient surgeries. The number of affected patients was surveyed from April 2020 to March 2023.

【Results】 The amount of patients per year tended to be the lowest in 2020. The trends in the amount of inpatients and inpatient surgeries were almost the same in 2019 and 2023. For the cumulative number of patients by month, the total number of outpatients was significantly lower in April and May 2020 compared to other periods. Similar trends were observed in the amount of the first visit outpatients, outpatients for oral surgery, inpatients, and inpatient surgeries. The number of inpatients was significantly lower from April to June 2020 compared to other periods. The same trend was observed in the number of inpatient surgeries, with a significant decrease from April to June in 2020.

(受付: 令和7年1月31日)

責任著者連絡先: 武内伸賢

日本大学歯学部口腔外科学第Ⅱ講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL: 03-3219-8355

FAX: 03-3219-8356

E-mail: deno21013@g.nihon-u.ac.jp

【Conclusion】 Due to the respiratory infection COVID-19, the impact on the number of patients at dental hospitals was limited due to restrictions on going out and hospital admissions. In order to maintain the continuity of medical operations, it was considered important to secure human resources by changing work systems, thoroughly implementing measures to prevent hospital-acquired infections, and administering vaccinations.

Keywords: dental hospital, COVID-19, trend survey, SARS-CoV-2

緒 言

2019年12月に中国において確認された新型コロナウイルス感染症（corona virus disease 2019：COVID-19）は、全世界での蔓延をみせた¹⁾。COVID-19とは、当時新型コロナウイルスと称された SARS-coronavirus-2感染によるものであり、2020年1月には、世界保健機関（WHO）によって「国際的に懸念される公衆衛生上の緊急事態（PHEIC）」が宣言された。2023年12月の時点で、COVID-19の世界累積感染者数は約7億7,000万人となり、700万近くの死亡が確認されている²⁾。

本邦においては、いわゆる第1波といわれた2020年3月から5月にかけての期間をはじめとして、2023年1月までに周期的な8つの大きな流行期（第1波～第8波）が生じた。本感染症の拡大は政府から発出された4度の緊急事態宣言（1回目：2020年4月7日～5月25日、2回目：2021年1月8日～2021年3月21日、3回目：2021年4月25日～2021年6月20日、4回目：2021年7月12日～9月30日）を契機に、国民の社会生活に大きな影響を及ぼし、不要不急の外出自粛、イベント開催の自粛、テレワークの推進などが生じ、個人の行動や就業に大きな変化をもたらした³⁾。とくにCOVID-19の影響下では感染対策の一環として、多くの医療機関で診療体制の見直しや外来患者数の調整などが行われた⁴⁾。

歯学部付属歯科病院などの専門医療機関は、先端医療の開発・研究・実践、地域医療への貢献を果たすべく機能しており、来院患者数の激減はそれらの役割に大きな影響を及ぼすと考えられる。一般の総合病院ではCOVID-19罹患患者の治療と並行して、一般疾患の対応が必要となり、医療の逼迫が生じた。日本大学歯学部付属歯科病院はわが国では数少ない歯科専門病院であり、総合病院とは異なる患者変化が生じたと考えられ、今後類似の状況が起きた場合の資料として当院の統計は重要であると考えられる。

本調査研究では、COVID-19パンデミック前後の2019年4月～2024年3月までの5年間に当院を受診した患者の動向ならびに診療体制に起こった変容を調査し、感染流行が歯科受診および入院手術実施に及ぼした影響を検討した。

対象および方法

調査方法

1. 病院管理課において集計されているデータ（病院データ）をもとに2019年度～2023年度の下記事項の比較検

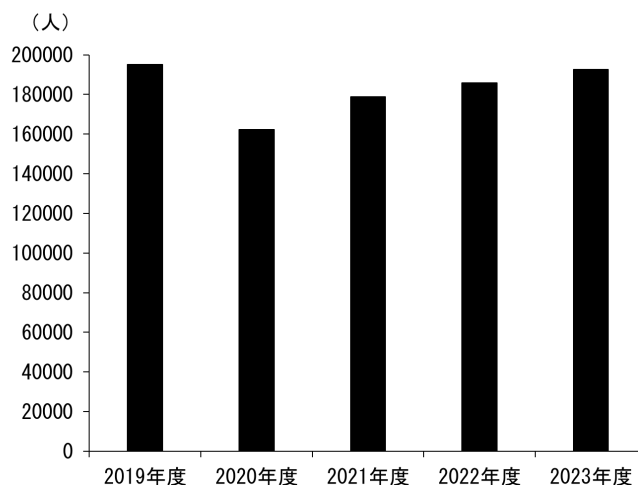


図1 外来患者数の年次推移
外来患者数の年次推移を示す。

討を行った。

- 1) 外来患者数の年次推移
 - 2) 外来患者数の月別推移
 - 3) 外来初診患者数の年次推移
 - 4) 外来初診患者数の月別推移
 - 5) 口腔外科外来患者数の年次推移
 - 6) 口腔外科外来患者数の月別推移
 - 7) 入院患者数の年次推移
 - 8) 入院患者数の月別推移
 - 9) 入院手術件数の年次推移
 - 10) 入院手術件数の月別推移
2. 東京都が示しているパブリックデータ⁵⁾を基に下記の事項に関する検討を行った。
 - 1) 東京都内のCOVID-19罹患患者数の月次推移（2020年4月～2023年3月）
 3. 当院におけるCOVID-19における各種対策について検討を行った。
 - 1) 日本大学歯学部におけるCOVID-19ワクチン接種
 - 2) 緊急事態宣言後の当院の対応
 - 3) 受診患者に対する検温
 - 4) 受付・待合スペースでの対応
 - 5) 標準予防策
 - 6) 外来手術
 - 7) 入院手術症例

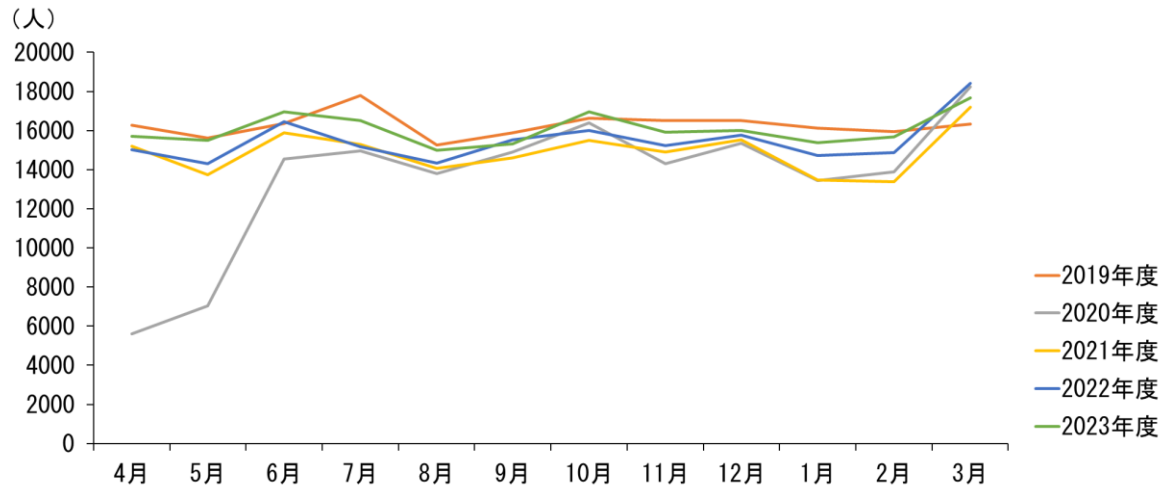


図2 外来患者数の月別推移
外来患者数の月別推移を示す。

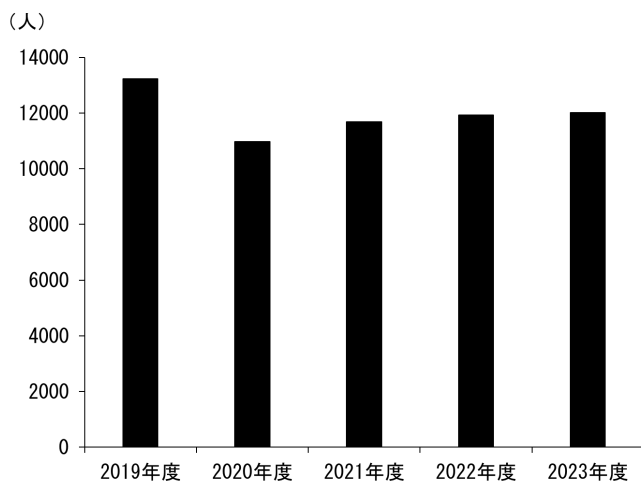


図3 外来初診患者数の年次推移
外来初診患者数の年次推移を示す。

- 8) インфекションコントロールチーム (ICT) による院内ラウンド
- 9) 勤務者の人数制限
- 10) 勤務者の健康管理

本研究は、病院管理課が集計した情報および東京都が集計した情報だけを用いた研究であるため、人を対象とする生命科学・医学研究に関する倫理指針の対象外である。

結 果

1. 病院データ

1) 外来患者数の年次推移

外来患者数は2019年度が195,261人、2020年度が162,442人、2021年度が178,810人、2022年度が185,934人、2023年度が192,619人であり、2020年度が最も少なかった(図1)。

2) 外来患者数の月別推移

月別の外来患者数は、2020年4月～8月について、他の

調査年同期間と比較して減少している傾向がみられた。とくに2020年4月と5月の患者数は2019年の同月と比較して大幅な減少がみられ、4月は5,595人と最も少なく、5月には増加傾向となり、7月以降は他の調査年と同様の水準にまで回復した(図2)。

3) 外来初診患者数の年次推移

外来初診患者数は2019年度が13,237人、2020年度が10,970人、2021年度が11,693人、2022年度が11,937人、2023年度が12,010人であり、2020年度が最も少なかった(図3)。

4) 外来初診患者数の月別推移

月別の外来初診患者数は、2020年4月が最も少なく、4月と5月の患者数は2019年の同月と比較して大幅な減少がみられた。6月には回復して以降は他の調査年と同様な水準であった(図4)。

5) 口腔外科外来患者数の年次推移

口腔外科外来患者数は2019年度が44,842人、2020年度が37,399人、2021年度41,755人、2022年度が44,115人、2023年度が45,626人であり、2020年度が最も少なかった(図5)。

6) 口腔外科外来患者数の月別推移

月別の外来患者数は、2020年4月～8月について、他の調査年同期間と比較して減少している傾向がみられた。とくに2020年4月と5月の患者数は2019年の同月と比較して大幅な減少がみられ、とくに5月が最も少なかった。6月には2019年の75%にまで回復して、この増加は7月から8月も継続して、9月にはCOVID-19流行前と同様な水準となっていた(図6)。

7) 入院患者数の年次推移

入院患者数は2019年度が3,753人、2020年度が2,332人、2021年度が2,858人、2022年度が2,910人、2023年度が3,369人であり、2020年度が最も少なかった(図7)。

8) 入院患者数の月別推移

月別の入院患者数は、2020年4月～7月について、他の

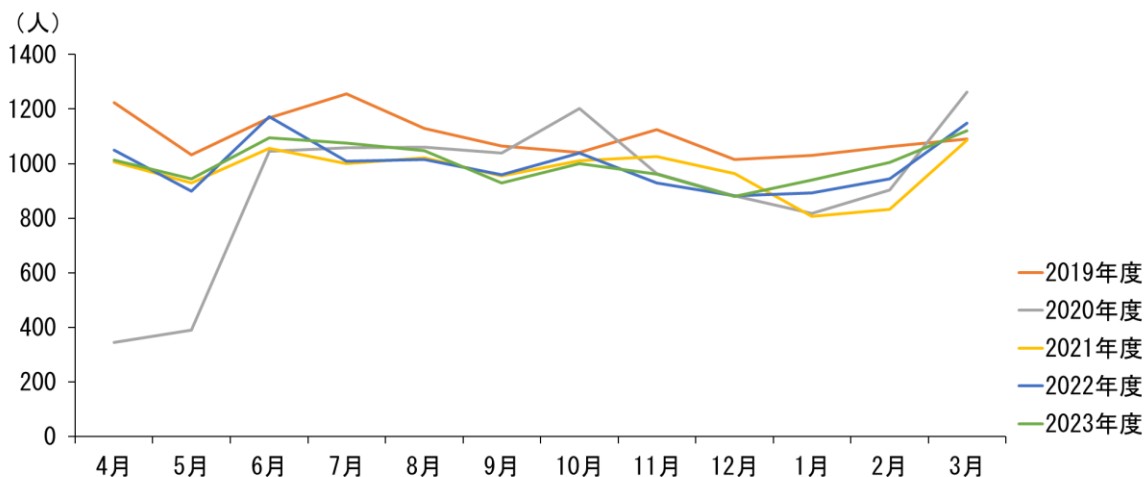


図4 外来初診患者数の月別推移
外来初診患者数の月別推移を示す。

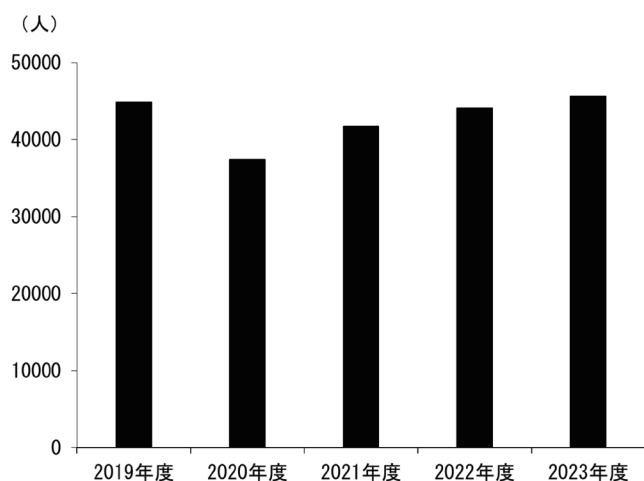


図5 口腔外科外来患者数の年次推移
口腔外科外来患者数の年次推移を示す。

調査年の同期間と比較して減少がみられた。とくに2020年4月～6月の患者数は2019年の同月と比較して大幅な減少がみられた。5月が最も少なく6月以降増加傾向となり、8月には他の調査年と同様な水準となっていた(図8)。

9) 入院手術件数の年次推移

入院手術件数は2019年度が476件、2020年度が317件、2021年度が386件、2022年度が385件、2023年度が464件であり、2020年度が最も少なかった(図9)。

10) 入院手術件数の月別推移

月別の入院手術件数は、2020年4月～6月について、他の調査年同期間と比較して減少がみられた。とくに2020年4月～6月の患者数は5月を最低として2019年の同月と比較して大幅な減少がみられた。6月から増加傾向となり7月に他の調査年と同程度にまで回復していた(図10)。

2. パブリックデータ

1) 東京都内でのCOVID-19罹患者数の月別推移

東京都内でのCOVID-19罹患者数は、2020年は4月が2,219人、5月が300人、6月が1,065人、7月が5,152人、8月が4,310人、9月が2,869人、10月が3,302人、11月が6,743人、12月が14,228人、2021年は1月が24,274人、2月が5,971人、3月が6,703人、4月が14,003人、5月が13,879人、6月が9,287人、7月が39,896人、8月が92,710人、9月が15,557人、10月が1,036人、11月が375人、12月が1,070人、2022年は1月が229,663人、2月が325,784人、3月が210,380人、4月が188,021人、5月が101,664人、6月が58,556人、7月が567,728人、8月が757,621人、9月が244,023人、10月が100,143人、11月が257,031人、12月が462,603人、2023年は1月が279,887人、2月が47,190人、3月が23,072人であった(図11-13)。

3. 当院における対応

1) 日本大学歯学部におけるCOVID-19ワクチン接種

日本大学歯学部においてCOVID-19に対するワクチン接種は、まず医療従事者先行接種として2021年4月28日～5月10日、5月19日～31日および6月14日～15日の期間で実施された。ついで、歯学部教職員およびその同居家族、歯学部学生・大学院生を対象として2021年8月30日～31日、9月3日、9月24日、2022年2月7日～10日、2月22日～3月4日、4月19日～20日、4月22日、5月13日、5月19～20日、5月24日、6月17日、8月16日、8月23日、8月29日～30日の期間で実施された。

2) 緊急事態宣言後の当院の対応

緊急を要しない外来患者の診療は延期し、不急の観血的処置、入院手術も延期とした。また、使用出来る診療ユニット数の制限を設け、可能な限りエアロゾルの発生するエアタービンや超音波スケーラーに使用は避けて業務を実

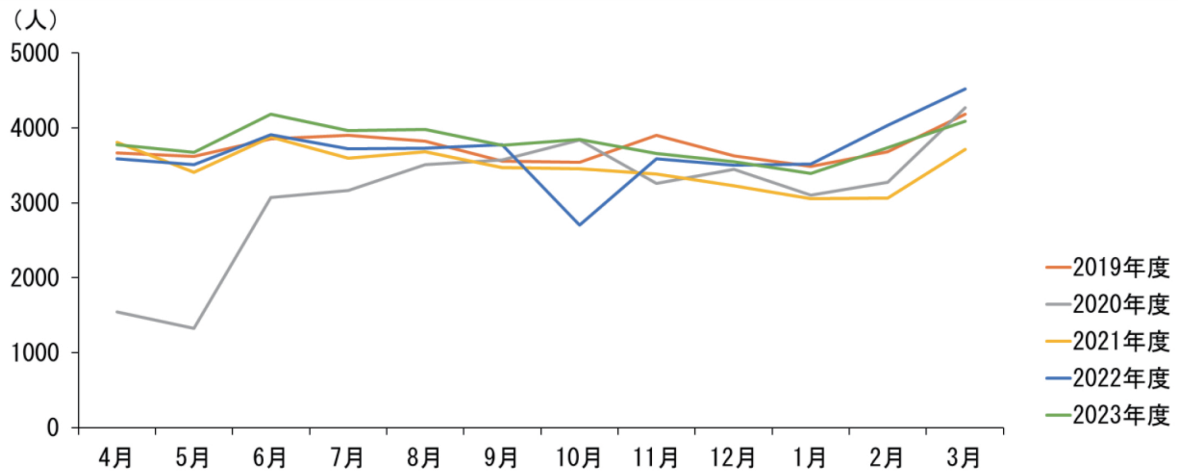


図6 口腔外科外来患者数の月別推移
口腔外科外来患者数の月別推移を示す。

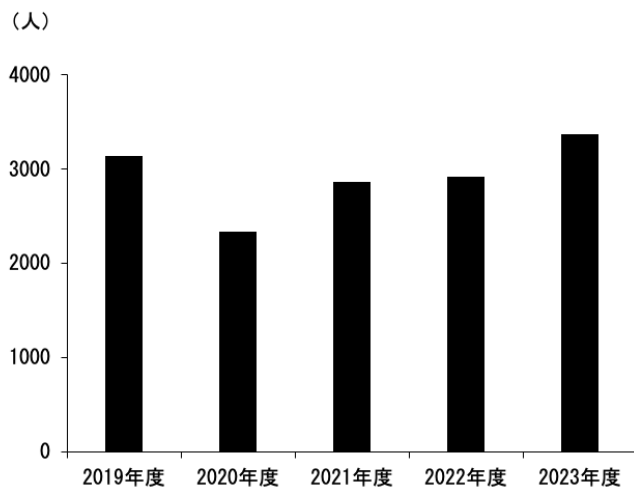


図7 入院患者数の年次推移
入院患者数の年次推移を示す。

施した。診療時間については初診受付時間を短縮し、始業時と終業時に感染予防対策の時間を設定した。

3) 受診患者に対する検温

当院ではAI体温検知システム(DG-T104S, ダイワ通信, 金沢)を病院エントランスに設置し、受診患者全員に対して入館前検温を実施した。このシステムはカメラに顔をかざすと体温を自動測定ができ、体温と合わせて、マスクの着用も自動で検知する。入館時のチェックにおいて体温37.5℃以上の場合には、当院での治療を行う前に発熱外来などを受診するように促した。

4) 受付・待合スペースでの対応

受付にはビニールシートを設置し、飛沫感染の対策を行い、このビニールシートは毎日清拭消毒して使用した。待合スペースでは、1席おきに着席するまたは椅子の間隔を空ける様にして座席数を限定して運用した。

5) 標準予防策

手指消毒はすべての医療行為の基本となるため、全教職員に対し徹底した標準予防策に関する指導を行った。個人用防護(personal protective equipment: PPE)は日本大学歯学部院内感染対策マニュアルに従い、手袋、ビニールエプロン、マスク、ゴーグル・フェイスシールドを使用することとした⁶⁾。マスクはN95マスクが推奨されているが、医療逼迫の状況下では歯科専門病院である当院での入手が困難であったため、サージカルマスクを使用した。眼の防護にはゴーグルあるいはフェイスシールドを使用するように規定した。診療器具の滅菌は、新型コロナウイルスについては特別な対策は行わず、従前通りの中央管理による中央滅菌室で滅菌・消毒を行った。

6) 外来手術

外来で観血的処置を行う場合は、飛沫感染予防の目的で個室を使用し、口腔外バキュームを使用した。口腔外バキュームの使用は、観血的処置のみならずエアロゾルが発生する処置に用いることを推奨した。PPEに加えて、処置の内容によっては長袖のアイソレーションガウンを使用し、術前後に十分な手指および前腕部の手洗い・消毒を行った。

7) 入院手術症例

2020年4月7日～6月30日まで、入院手術は緊急を要する症例に限定して実施した。また、2020年6月1日～2023年3月17日の期間で、入院手術患者に対し全例入院前検査としてPCR検査を行った。また、同期間で入院する患者には術前2週間の自宅待機要請と毎日の検温と健康状態をチェックする健康観察日記の記載を依頼して、感染を疑う症状がある場合やPCR検査陽性の場合には手術を延期した。

8) ICTによる院内ラウンド

従来より、院内感染予防対策委員会内にあるICTが、院内ラウンドを毎月1度のペースで行っている。緊急事態

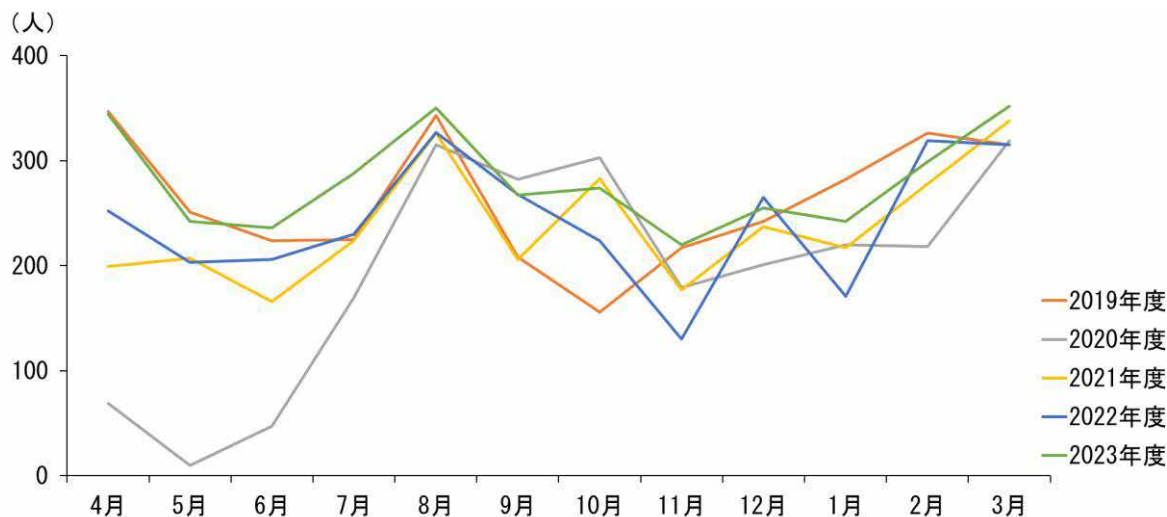


図8 入院患者数の月別推移
入院患者数の月別推移を示す。

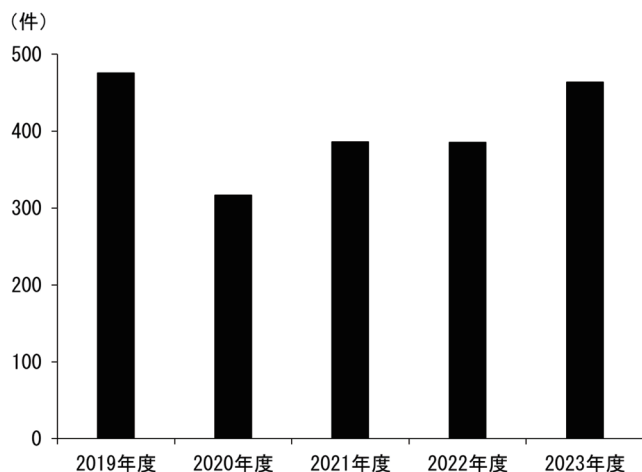


図9 入院手術件数の年次推移
入院手術件数の年次推移を示す。

宣言発出から2020年6月中旬までは、PPE および手指消毒に特化した毎週1度のペースでの院内ラウンドを実施した。

9) 勤務者の人数制限

2020年4月7日に政府から発出された緊急事態宣言を受けて、同年5月6日までは不要不急の出勤を回避する目的で在宅勤務体制を整え、延期不能な診療以外は休診とした。同年5月7日～6月6日まで、部署ごとに約半数に出勤人数を限定し、外来ユニットの使用を可動率50%程度に限定した業務を遂行した。ついで、同年6月8日～6月20日では、外来ユニットの使用を稼働率67%程度に限定した業務とした。同年6月22日以降はユニット稼働率の制限を解除して診療を実施した。また土曜日初診の受け入れは緊急事態宣言発出直後から2021年10月30日まで停止とした。

10) 勤務者の健康管理

当院に勤務する教職員は、2020年4月7日～2022年3月31日の期間で、各人ごとにメディカルチェック記録簿の作成を行うこととした。その内容は、毎朝、自宅で検温を行い、記録簿に健康状態（咳、倦怠感など）と合わせて記載することとした。37.5℃以上の発熱がある場合は、出勤せず自宅待機することとし、発熱や咳などの症状があった場合は、発熱外来などを受診するようにした。

考 察

COVID-19の流行は本邦において、いわゆる第1波といわれた2020年3月～5月にかけての期間をはじめとして、2023年1月までに周期的な8つの大きな流行期（第1波～第8波）が生じた。本感染症の拡大は政府から発出された4度の緊急事態宣言を契機に、国民の社会生活に大きな影響を及ぼし、不要不急の外出自粛、イベント開催の自粛、テレワークの推進などが生じ、個人行動や医療機関の業務に大きな変化をもたらした³⁾。

今回の調査において年次推移について観察すると、外来患者数、外来初診患者数、口腔外科外来患者数、入院患者数、入院手術件数の全てで、2020年度が最も少ない傾向がみられた。その詳細を把握するために、月別推移について観察すると、外来患者数は、1回目の緊急事態宣言発出時である2020年4月が最も少なく、以後増加して7月以降はほぼ他の調査年と同数まで回復していた。外来初診患者数も同様に4月の減少が最も大きく、5月は大きく変化せずに6月で他の調査年と同様な状態にまで急激に回復していた。口腔外科外来患者数、入院患者数、入院手術件数では3項目とも4月より5月の減少が大きく、6月からは回復傾向を示し、8月には2019年と同水準となっていた。歯科病院全体で見ると、4月に緊急事態宣言発出による外出制限およびユニットの使用制限などが影響して受診患者数が

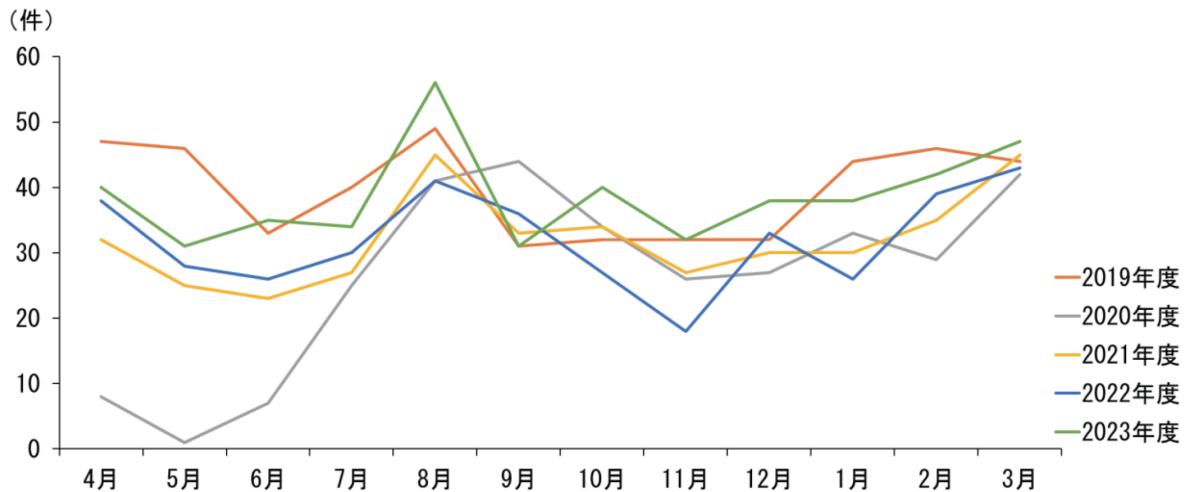


図10 入院手術件数の月別推移
入院手術件数の月別推移を示す。

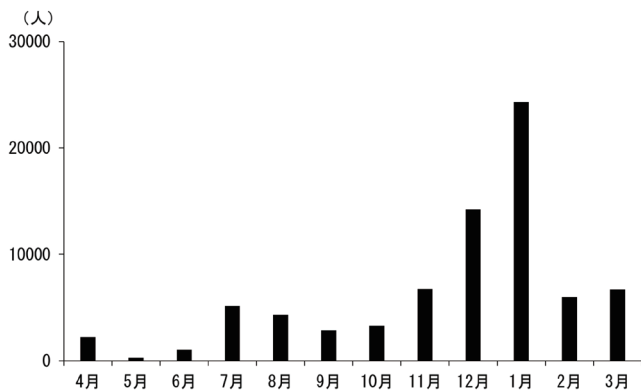


図11 2020年度東京都内でのCOVID-19罹患者数の月別推移
2020年度の月別推移を示す。5月が最小で300人、1月が最大で27,274人であった。

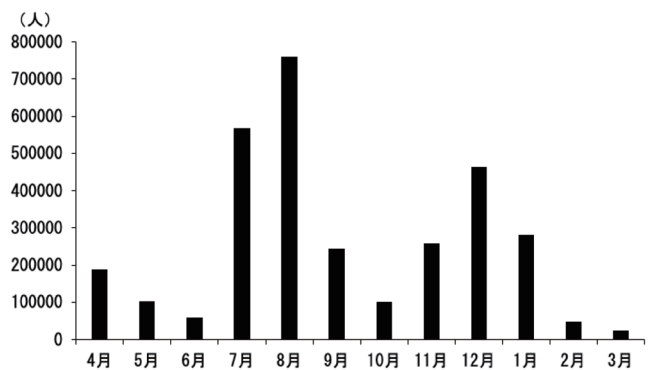


図13 2022年度東京都内でのCOVID-19罹患者数の月別推移
2022年度の月別推移を示す。3月が最小で23,072人、8月が最大で757,621人であった。

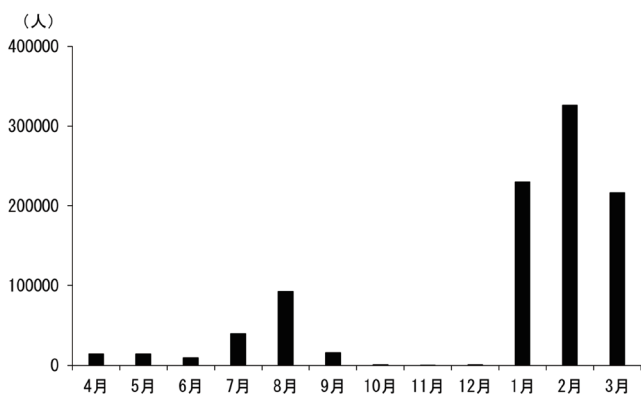


図12 2021年度東京都内でのCOVID-19罹患者数の月別推移
2021年度の月別推移を示す。11月が最小で375人、2月が最大で325,784人であった。

減少したと考えられるが、口腔外科外来および入院手術については、外出制限の影響に加え感染予防対策としての手術件数制限や入院前自宅待機による影響が5月まで大き

かったものと考えられる。この3項目の回復については、歯科病院と同様に緊急事態宣言終了後の6月から回復してくるが、感染予防対策での手術件数制限や入院前自宅待機の影響が残り6月以降も回復に時間がかかったものと考えられる。

当院における、2020年4月および5月の外来患者数の減少は、緊急事態宣言発出に伴う外出制限およびユニットの使用制限に起因するものと考えられたが、2回目以降の緊急事態宣言発出においてはユニットの使用制限などは行わなかったため、1回目のような明確な変化は患者数など調査項目において認められなかった。これは緊急事態宣言に対して各自が対応に慣れてきて、大きな変化を生活に与えることなく宣言下での生活の維持が出来るようになった可能性が考えられる。また、市中感染者の増減が受診患者数などに与える影響は認められなかった。川田ら⁴⁾は、他県の歯学部附属病院において、2020年4月と5月の病院初診患者数は2018年および2019年の同期間と比較して減少して

いたと報告しており、当院の動向と同傾向であった。さらに今回の年次変化において、入院患者数・入院手術件数の推移は2019年度と2023年度がほぼ同数という集計結果であった。これは、2023年5月8日にCOVID-19の感染症法上の位置づけが、新型インフルエンザ等感染症（2類相当）から5類感染症へと変更になったことを契機に、患者数の回復が得られたものと推察される。今回の調査から歯科専門病院においては、緊急事態宣言などにより外出制限などが出されると、その期間患者数などの減少がみられるが、外出制限などが解除されると2ヶ月程度の比較的短期間に患者数が回復してきていた。このことから、呼吸器感染症であるCOVID-19においては、歯科専門病院に対する患者数の減少などの影響は長期に及ぶものではないと考えられた。

緊急事態宣言発出後、当院では感染拡大を防止する目的で、初診受付は土曜日を除いた曜日で時間を短縮して受け入れを行った。いっぽうで予約診療については、2020年6月20日までは緊急を要する症例に限定して診療を実施し、6月21日以降は感染対策に留意しつつ通常通りの診療を継続した。東京都の月別COVID-19罹患者数は2回目の緊急事態宣言発出前後である、2020年12月～2021年3月の期間で急増したが、当院の外来受診総患者数は同期間で2019年度の患者数と比較して減少することはなかった。受診患者に対する入口での検温や、待合スペースでのいわゆる3密（換気の悪い密閉空間、多数が集まる密集場所、間近で会話や発声をする密接場面）を回避するための方策などが奏功し、大規模な院内感染を惹起することなく、専門医療機関としての責務を果たせたものと考えられる。また、初回の緊急事態宣言発出中でも、外来診療は次の様に規模を変更して継続した。まず、2020年5月6日までは不要不急の出勤を回避するために在宅勤務体制を整え、延期不能な診療以外は休診とし、その後部署ごとに出勤人数を約半数にするなど限定し、外来ユニットの使用も6月21日まではユニット制限して診療を実施した。このことにより外来での院内感染を防ぐとともに、各部署の機能が維持できたと考えられる。入院手術についても、2020年4月7日から2020年6月30日まで、入院手術は緊急を要する症例に限定して実施し、7月1日以降は緊急症例に限定せず手術を実施した。PCR検査と患者自身の健康状態チェックにより、病棟内でのCOVID-19の院内感染を防ぎ安全な病棟運営を行うことができたと考えられる。

東京都内でのコロナワクチン接種は、2021年4月21日にまず高齢者を対象として開始となった。以後、同年5月24日に対象者が拡大された。2021年9月13日に、人口の50%が2回目接種を完了したと報告されている。当院では、一般接種に先駆けて、病院勤務医療従事者先行接種を日本大学病院との連携のもと、2021年4月28日～5月10日、5月19日～31日および6月14日～15日の期間で実施し、この期

間で医療従事者は2回の接種を完了することができた。ワクチン接種と並行して、勤務者には各人ごとに毎朝、自宅で検温を行うことを指導し、健康状態（咳、倦怠感など）と合わせてそれを記載するメディカルチェック記録簿の作成を励行した。その結果、医療従事者間でのクラスター発生を回避することができた。兼古ら⁷⁾は新興感染症と遭遇した際、院内感染を防止する方策として重要なのは医療従事者が全身ならびに手指の健康を保持することであると報告しており、当院のメディカルチェック記録簿作成が有用であったことを示唆している。また、土方ら⁸⁾は、医療従事者の90%が2021年6月末には2回接種を完了し第5波発生時の重症例や死亡例の抑制につながったと報告しており、当院の方策はこれに寄与できたものと考えられる。さらに、安原ら⁹⁾は、COVID-19感染流行下での診療活動の制限に影響を与えた因子として、人的資源不足による医療機器の稼働状況制限を重要な要素として報告している。当院では院内クラスター発生を回避することができたため、人的資源不足に陥ることなく感染症流行下でも病院機能を保持することができたものと考えられた。

人的資源不足を回避するための方略として、出勤する医療従事者を制限して各部署がそれぞれ機能不全になることを避けるとともに、各個人による健康管理の他に、医療機関では診療室内などでの感染対策に留意する必要がある。当院では、診療前後での手指消毒の徹底、標準予防策に則ったPPEの着用、エアロゾル飛散に配慮した口腔外吸引装置ならびに個室診療室の利用を中心とした方策に則り、診療体制を構築した。兼古ら⁷⁾はCOVID-19流行下の歯科口腔外科診療において、エアロゾルへの対応が必須であると述べている。また加藤¹⁰⁾は、COVID-19対策として、浮遊するエアロゾルの密度を下げることで、曝露する時間と量を軽減することの重要性を述べている。公益社団法人日本口腔外科学会は、処置中の口腔内吸引に加えて口腔外吸引装置を併用することで、術野、術者、介助者の飛沫汚染が減少されると述べている¹¹⁾。これらの報告は当院で行った感染対策が有効であったことを示唆している。

今回の調査から、呼吸器感染症であるCOVID-19の場合には、歯科専門病院における影響は外出制限などによる期間が限定されたものであり、減少した患者数の回復も早期にみられた。医療業務の維持においては、日常的な感染予防対策に加え、勤務体制変更、各自の健康管理およびワクチン集団接種により人的資源不足を回避できたことが、COVID-19流行下でも歯科病院の機能を保全できた最も大きな要因であると考えられる。

結 論

本調査研究では、COVID-19パンデミック前後の2019年4月～2024年3月までの5年間に当院を受診した患者の動向ならびに当院での診療体制に起こった変容を調査し、以

下の結論を得た。

1. 外来受診患者数の減少は外出制限およびユニット使用制限の影響による2ヶ月程度の短期間で限定的なものであった。
2. 入院患者数の回復は、感染予防対策の影響により、外来患者数に比べ時間を要した。
3. 日常的な感染予防対策に加え、勤務体制変更、各自の健康管理およびワクチン集団接種により人的資源不足を回避できたと考えられる。
4. 感染予防対策による人的資源の確保が病院機能の保全には重要であると考えられる。

本研究の推進にあたり、口腔外科学第Ⅱ講座 米原啓之教授、白土博司助教および講座員の皆様にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表する。

本論文に関して開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 関みつ子 (2021) 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を理解する. 小児口外 31, 13-26.
- 2) 関みつ子, 金森 大, 小口寛子 (2024) 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を理解する -3. 小児口外 34, 2-12.
- 3) 関みつ子, 飯島孝太, 金森 大 (2022) 新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) を理解する -2. 小児口外 32, 228-235.
- 4) 川田朗史, 松村華穂, 菱川暁弘, 尾島健斗, 井上瑛弘, 三木朱里, 香村亜希子, 村上幸生, 長谷川彰彦, 鈴木正二 (2023) 明海大学病院口腔診断科における過去3年間の初診患者動向に及ぼしたCOVID-19パンデミックの影響. 日口誌 36, 115-120.
- 5) 東京都. 東京都新型コロナウイルス感染症新規陽性者数. <https://catalog.data.metro.tokyo.lg.jp/dataset/t000055d0000000397> (2025年1月31日アクセス).
- 6) 生木俊輔 (2020) 在京5大学における新型コロナウイルス感染予防対策後編 日本大学歯学部附属歯科病院. 東京歯医師会誌 68, 358-359.
- 7) 兼古晃輔, 関谷秀樹 (2023) シリーズバイオセーフティ 歯科診療室内感染防止に係る標準予防策および新興感染症に対する対策. バムサジャーナル 35, 3-9.
- 8) 土方奈々, 村上邦仁子, 植原昭治, 渋谷克彦, 福田吉治 (2024) 第1波から第5波までのCOVID-19感染者の特徴と経過: 東京都一行政区のデータより. 日本公衛誌 71, 117-123.
- 9) 安原 洋, 矢富 裕, 高階雅紀, 南 正人, 白杵尚志, 中島章夫, 美代賢吾, 新 秀直, 本田宏志 (2023) 病院の医療機器と職員の体制が新型コロナウイルス患者受入れに与える影響. 医機学 93, 585-593.
- 10) 加藤英明 (2024) コロナ禍以前に戻した取り組み, 変化した取り組みを徹底解説! 感染対策の最前線2024. INFECT CONTROL 33, 30-32.
- 11) 日本口腔外科学会. 新型コロナウイルス感染症流行下における口腔外科手術に関する指針. https://www.jsoms.or.jp/medical/pdf/2022/0127_01.pdf (2025年1月31日アクセス).

接着性舌側リテーナーのワイヤーと接着材に及ぼす大気圧窒素プラズマ処理の影響

高田 麻希¹, 栗栖 有希², 鶴見 春乃², 稲葉 瑞樹^{1,3},
内田 靖紀^{1,3}, 納村 泰弘^{1,3}¹ 日本大学歯学部歯科矯正学講座² 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻口腔構造機能学分野³ 日本大学歯学部総合歯学研究所臨床研究部門

要旨

【目的】大気圧プラズマは、様々な接合場面で接着力向上に貢献しているが、フレキシブルでらせんの形状を持つ接着性リテーナーのワイヤーとコンポジットレジン接着材との接着性が向上するかは不明である。そこで本研究の目的は、大気圧プラズマ処理の有無による接着性舌側リテーナーのワイヤーと接着材との脱離力を調べ、接着性舌側リテーナーの保持について大気圧プラズマ処理の影響を検討することである。

【方法】接着性リテーナーのワイヤーとして6本巻きマルチストランドステンレス鋼線と単線ステンレス鋼線を2種類使用した。大気圧窒素プラズマ処理したワイヤー側面方向に対して保定用コンポジットレジン接着材を接着する試料とワイヤーを垂直にコンポジットレジン接着材に埋め込む試料を作製した。引張試験にて脱離力を測定し、大気圧プラズマ未処理群と比較した。また、垂直にワイヤー植立した試料について、走査電子顕微鏡（SEM）にてワイヤー横断面のコンポジットレジン接合部を観察し検討を行った。

【結果】マルチストランドワイヤーでは、垂直方向の脱離力はプラズマ照射によって1.3倍有意に増加した。単線ワイヤーは、脱離力がプラズマ照射によって2.5倍有意に増加した。ワイヤー側面方向での脱離力は、マルチストランドワイヤーにおいて有意な増加はみられなかったが、単線ワイヤーについてはプラズマ照射によって1.5倍有意に増加した。SEM像では、マルチストランドワイヤーの表面においてコンポジットレジン接着材との接合の解離がみられたが、プラズマ照射では密着して見られた。

【結論】大気圧プラズマ処理によって接着性リテーナーのワイヤーとコンポジットレジン接着材の接着保持性は向上することが示唆された。

キーワード：大気圧プラズマ、接着性舌側リテーナー、歯科矯正、接着、引張試験

Effect of atmospheric pressure nitrogen plasma on wires and adhesive in bonded lingual retainers

Maki Takata¹, Yuuki Kurisu², Haruno Tsurumi²
Mizuki Inaba^{1,3}, Yasuki Uchida^{1,3}, Yasuhiro Namura^{1,3}¹ Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry² Major in Oral Structural and Functional Biology, Nihon University Graduate School of Dentistry³ Division of Clinical Research, Dental Research Center, Nihon University School of Dentistry

Abstract

【Purpose】Atmospheric pressure plasma contributes to improving adhesive strengths in bonding situations, but it is unclear whether it improves the adhesive strength of multistrand retainer wires that are flexible and spiral-shaped. Therefore, the purpose of this study was to investigate the removal force between the wire and adhesive of bonded lingual retainers with the plasma treatment, and to examine the effect of the plasma treatment on the retention of the bonded retainers.

【Methods】Two types of bonded retainer wires were used: a six-stranded stainless steel wire and a solid stainless steel wire. Specimens in which a composite resin adhesive for retainers was bonded to the side of the wire treated with atmospheric pressure nitrogen plasma and a plasma-treated wire embedded vertically in the composite resin adhesive were prepared. Removal forces were measured by tensile test and compared with the group without the plasma treatment. In addition, the cross-section of the wire touching the adhesive was observed using a scanning electron microscope (SEM) for samples with the wire embedded vertically.

【Results】For the multistrand wires, the removal force in the vertical direction with plasma treatment was significantly greater by 1.3 times than that without plasma treatment. For solid wires, the removal force was significantly greater than that without plasma treatment by 2.5 times with plasma treatment. No significant increase in removal force in the lateral direction of the wire was observed for multi-strand wires, but plasma treatment was significantly greater force by 1.5 times for the solid wires.

SEM images showed dissociation of the bond with the composite resin adhesive on the surface of the multi-strand wire, but plasma treatment observed to obtain close adhesion.

【Conclusion】These findings suggest that atmospheric pressure plasma treatment improves the adhesive retention between the wire of bonded retainers and the composite resin adhesive.

Keywords: atmospheric pressure plasma, bonded lingual retainer, orthodontics, adhesion, tensile testing

(受付：令和7年4月11日)

責任著者：高田麻希

日本大学歯学部 歯科矯正学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL：03-3219-8105

FAX：03-3219-8365

E-mail：takata.maki@nihon-u.ac.jp

緒 言

矯正歯科治療終了後には、治療によって整列した歯列を保つため保定が行われる。保定には、主に可撤式保定装置（リテーナー）が用いられる。しかし、可撤式リテーナーは、患者の協力が大きく影響することから、舌側歯面にワイヤーを接着固定するリテーナーが用いられるようになってきた。いっぽうで、接着性舌側リテーナーは脱離のリスクがあり、脱離が生じた場合には歯の後戻りが生じるため、再治療が必要となる。Arqub ら¹⁾は、対象患者の42.9%が脱離の経験があると報告している。

接着性舌側リテーナーの脱離に関して、ワイヤーの種類や接着面積が関連する²⁾との報告があり、様々な脱離防止に関する研究が、行われている報告がされている^{3, 4)}。また、保定期間の初期においては接着部での脱離が多くみられ、これは歯質とコンポジットレジン接着材間だけでなく、ワイヤーと接コンポジットレジン接着材間でも起こるため、歯列の後戻りに耐えられる強力な接着力は、歯質表面だけでなくワイヤー表面にも必要となる。

大気圧プラズマは、様々な接合場面において接着力の向上に寄与している^{5, 6)}。しかし、これまでの研究の多くは、歯面と接着材との結合力や、接着材とジルコニア内面との結合力に焦点が当てられており⁷⁻¹⁰⁾、フレキシブルでらせんの形状を持つワイヤーとの接着性が向上するかどうかについては明らかになっていない。そこで本研究は、大気圧プラズマ処理の有無によって、接着性舌側リテーナーのワイヤーと接着材との脱離力を調べ、大気圧プラズマ処理が接着性舌側リテーナーの保持に及ぼす影響を検討することを目的とした。

材料および方法

1. 材料

接着性リテーナーのワイヤーについて、形状が6本巻きマルチストランドステンレス鋼線（レスポンドワイヤー, Ormco, Brea, CA, USA; 直径0.017インチ）（マルチストランドワイヤー）と単線ステンレス鋼線（ステンレスストレートワイヤー, トミーインターナショナル, 東京; 直径0.018インチ）（単線ワイヤー）を使用した。

2. 試料作製

接着性を評価するため、ワイヤー側面方向に対して保定用コンポジットレジン接着材（Transbond LR, 3M Unitek, Monrovia, CA, USA）を接着する試料とワイヤーを垂直にコンポジットレジン接着材に埋め込む試料を作製した。すなわち、ワイヤー側面では、直径4 mm 高さ3 mm のポリプロピレン製円柱モールドの下端をワイヤーの側面にのせ、ワイヤーと反対のモールド上端からコンポジットレジンを充填し、モールドが被さっているワイヤー

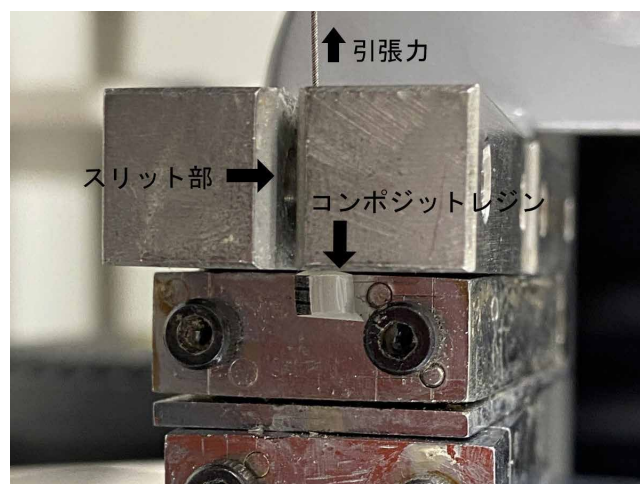


図1 引張試験の固定部
コンポジットレジンに植立されたワイヤーをスリット部に差し込み
上方に引張力を加えた。

両端から接合面に向かって各20秒間、光照射器にて光照射し重合硬化させ試料とした。いっぽう、垂直方向では、直径4 mm 高さ3 mm のポリプロピレン製円柱モールド中央にワイヤー末端から2 mm 植立し、植立部に向かって左右方向より各20秒間、光照射し重合硬化させ試料とした。プラズマ照射をする場合は、ワイヤーのコンポジットレジン接着部分に大気圧プラズマ発生装置（Damage-Free Multi-Gas Plasma Jet, Plasma Factory, 横浜）を用いて10秒間窒素プラズマ処理を行い、同様に試料作製した。試料は、24時間37℃蒸留水中に試験まで保管された。

3. 試験

それぞれの試料について引張試験を行った。引張試験は、万能試験機（Type 5567, Instron, Norwood, MA, USA）を使用しクロスヘッドの治具からワイヤーを結び、接着材は固定された治具スリットに挟み込むように固定した（図1）。ワイヤー側面にコンポジットレジン接着材を接着した試料は、円柱モールド両端のワイヤーを上方に垂直に曲げクロスヘッドの治具と結び、同様に固定した。そして、被着接着材面に対して垂直方向にクロスヘッドスピード1.0 mm/min で牽引し、ワイヤー脱離までの最大力を測定し脱離力とした。試料は各群10個測定された。

4. 走査電子顕微鏡（SEM）観察

ワイヤーとコンポジットレジン間の空間を確認するため、コンポジットレジンに垂直にワイヤーを2 mm 埋めて植立した試料について、アクリル樹脂にて包埋し、植立部を平坦に研削後、イオンコーター（Quick Coater Type SC 201, サンヨー電子, 東京）で金蒸着を実施した。SEM（ERA-8800FE, エリオニクス, 東京）を用いて、加速電圧10 kV, 拡大倍率200倍, 1,000倍の条件下で、試料

表1 垂直方向の引き抜き脱離力 (N)

	平均 (標準偏差)	Sig*
マルチストランドワイヤー プラズマ照射	68.4(7.3)	A
マルチストランドワイヤー プラズマ非照射	51.4(5.3)	B
単線ワイヤー プラズマ照射	58.5(16.1)	AB
単線ワイヤー プラズマ非照射	23.1(7.8)	C

*異なる文字間では有意差 ($p<0.05$) があることを示す

表2 側面方向の引張脱離力 (N)

	平均 (標準偏差)	Sig*
マルチストランドワイヤー プラズマ照射	13.4(2.3)	B
マルチストランドワイヤー プラズマ非照射	12.8(5.7)	B
単線ワイヤー プラズマ照射	19.7(4.3)	A
単線ワイヤー プラズマ非照射	12.6(4.2)	B

*異なる文字間では有意差 ($p<0.05$) があることを示す

のワイヤー横断面のコンポジットレジン接合部を観察した。

5. 統計分析

本研究のサンプルサイズは、統計解析ソフト (G*Power Version 3.1.9.6, Kiel University, Kiel, Germany) を用いて同様の実験系の脱離力を計測した研究文献¹¹⁾ を参考にして検出力95%で求めた。その結果、サンプルサイズはグループ毎で6が得られ、それ以上のサンプルサイズで10とした。すべての分析は統計解析ソフト (EZR on R Commander, 自治医科大学, 埼玉) を用いて行った。Kolmogorov-Smirnov 検定で正規性が認められ、Bartlett 検定で等分散性が認められたため、Tukey's HSD にて各群間の多重比較を行った。検定は有意水準 5% で判定した。

成 績

1. ワイヤーの脱離力

ワイヤーの垂直方向の引き抜き脱離力を表1に示す。マルチストランドワイヤーは、51.4 Nであった脱離力が、プラズマ照射によって68.4 Nと1.3倍有意に増加した。単線ワイヤーは、23.1 Nの脱離力がプラズマ照射によって58.5 Nに2.5倍有意に増加した。また、プラズマ非照射のマルチストランドワイヤーはプラズマ非照射の単線ワイヤーと比べて脱離力が有意に大きく、プラズマ照射すると両ワイヤーの脱離力に有意な差はみられなかった。ワイヤー側面方向での脱離力は、マルチストランドワイヤーにおいて12.8 Nの脱離力であったがプラズマ照射によって13.4 Nであり有意な増加はみられなかった。いっぽう単線ワイヤーについては12.6 Nの脱離力がプラズマ照射によって19.7 Nと1.5倍有意に増加した。また、プラズマ非照射のマルチストランドワイヤーはプラズマ非照射の単線ワイ

ヤーと比べて有意な差はなかったが、プラズマ照射した単線ワイヤーはプラズマ照射したマルチストランドワイヤーより1.5倍有意に増加した (表2)。

2. SEM 画像での比較

コンポジットレジン接着材に垂直に包埋された各ワイヤーの横断面 SEM 画像を図2および3に示す。マルチストランドワイヤーの表面やツイストされたワイヤー内側において、コンポジットレジンとの接合の乖離や空洞が所々みられた。そして、プラズマ照射群ではワイヤー周囲とコンポジットレジン接着材の間に空間がないことが観察された。単線ワイヤーについては、プラズマ照射およびコントロール群においてコンポジットレジン接着材とワイヤーとの接合が乖離している部分は観察できず、全体的にワイヤー周囲とコンポジットレジン接着材の間には空間がないことが観察された。

考 察

近年、ジルコニアクラウンやセラミッククラウン内面にプラズマ照射することで接着材との接合強度が向上するという報告がある^{8-10, 12)}。これは、プラズマ照射により表面改質が行われ、表面ぬれ性が向上するためであると考えられている¹³⁾。そこで本研究では、接着性舌側リテーナーで用いられるワイヤーにおいても、プラズマ照射によるコンポジットレジン接着材との接合力が向上するかどうか検討した。具体的には、臨床でワイヤーが脱離する時に想定される、ワイヤーに対して水平側方向にかかる脱離力と純粋な引き抜く方向の垂直側方向にかかる脱離力について計測を行った。その結果、プラズマ照射を行うことで、ワイヤーと接着材との保持力、とくに垂直方向の力に対する保持力が向上することが明らかになった。いっぽう、水平側方向の脱離力については弾性の低い単線ワイヤーで保持力が向上された。したがって、臨床上接着されているワイヤーは弾性の低いワイヤーの方がプラズマ処理の効果は高いのかもしれない。

Bearn ら¹¹⁾ は、垂直的なワイヤーの引き抜き試験で、0.0175インチの2種類のスリーストランドタイプワイヤーを用いて、63.4 Nと72.2 Nの脱離力をそれぞれ報告している。いっぽう、本研究におけるプラズマ非照射のマルチストランドワイヤーでは、52.44 NとBearn ら¹¹⁾ の研究と比較してやや低い値を示した。しかし、同時にBearn ら¹¹⁾ の研究では同一のワイヤーを用いて各接着材での水平方向の引張脱離力も測定しており、今回我々が用いた接着材と同じ接着材を使用した場合には13.8 Nと報告した。本研究では、12.8N とほぼ同等の結果が得られており、接着材の違いが脱離力に影響することが再確認された。

プラズマ処理により、金属表面の接触角は大幅に低下し、表面ぬれ性が向上することが報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。ま

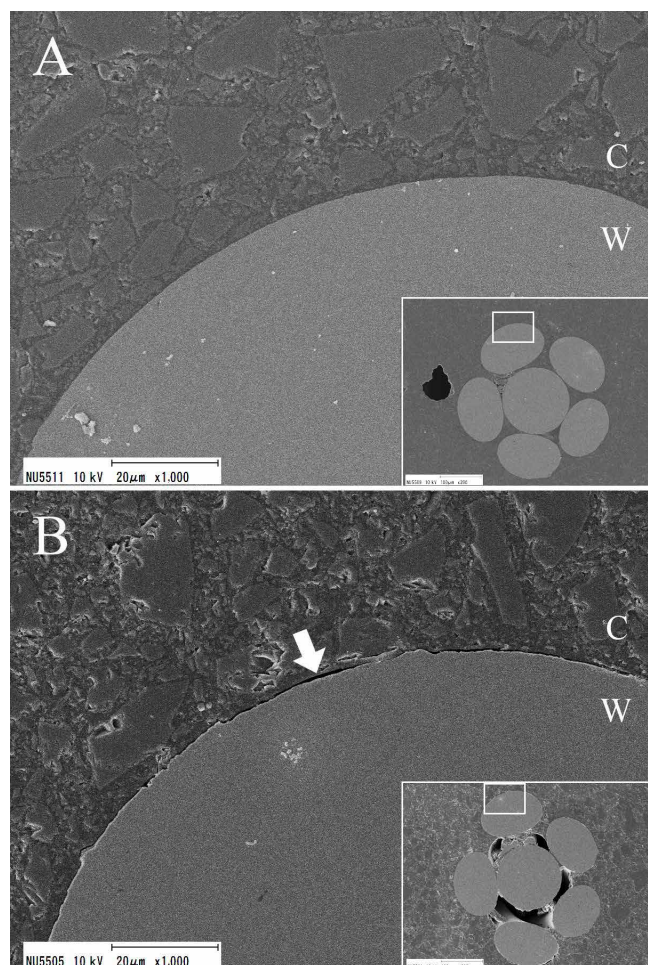


図2 コンポジットレジン接着材に埋め込まれたマルチストランドワイヤーの横断像

A) プラズマ処理したワイヤーの200倍と1,000倍拡大像, B) プラズマ未処理のワイヤーの200倍と1,000倍拡大像。コンポジットレジンとワイヤーの境界で間隙が観察される。(C: コンポジットレジン, W: ワイヤー) 矢印は乖離した境界部を示す。

た、プラズマガスのイオン化により、ジルコニア表面では酸素量の増加と炭素量の減少が生じるとの報告がある¹⁷⁾。本研究のSEM画像からも、プラズマ処理したストランドワイヤーの方がコンポジットレジン接着材との間に空間がなく密着した部分が多いことが確認された。これらの結果は、プラズマ処理によってワイヤー表面の有機汚染物の除去が行われ、接着材のぬれ性が向上した結果によるものと考えられる。

本研究では、マルチストランドワイヤーでの水平方向の脱離力に対して、プラズマ照射の効果は検出されなかった。マルチストランドワイヤーは単線ワイヤーに比べ柔軟性が高く変形しやすいため、引張脱離力に加えてワイヤー両端から上方へ引っ張られ剥離するような力も加わったことにより、プラズマ処理の効果が明確に検出されなかった原因と推測される。そのため、今後は試験方法の影響も検

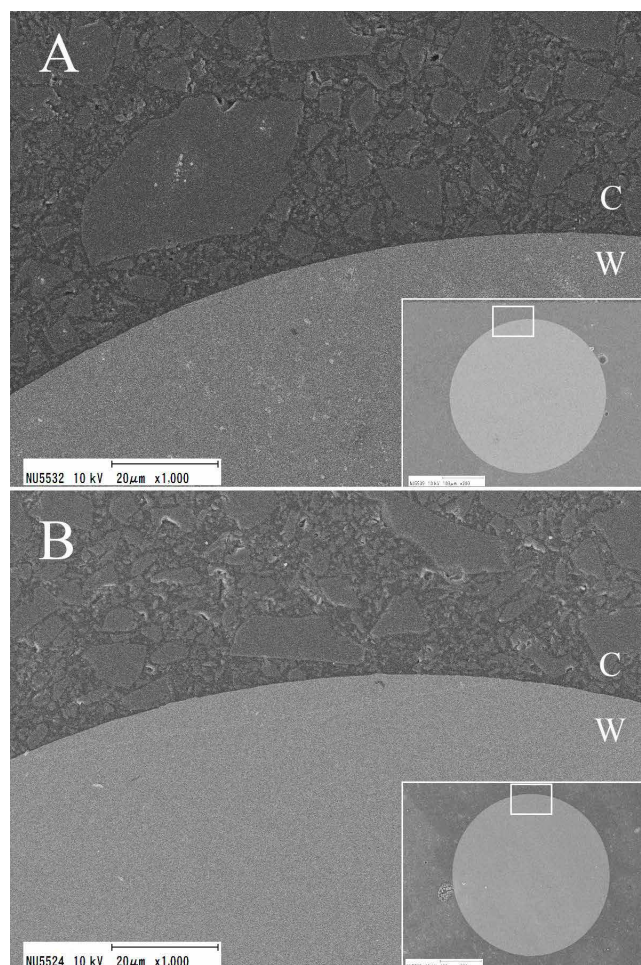


図3 コンポジットレジン接着材に埋め込まれた単線ワイヤーの横断像

A) プラズマ処理したワイヤーの200倍と1,000倍拡大像, B) プラズマ未処理のワイヤーの200倍と1,000倍拡大像。コンポジットレジンとワイヤーの境界で間隙は観察されなかった。(C: コンポジットレジン, W: ワイヤー)

討する必要があると考えられる。

結 論

本研究では、保定装置として用いられる接着性リテーナーについて、大気圧プラズマ処理がワイヤーとコンポジットレジン接着材との保持力の増加に効果があるかを検討し、以下の結論を得た。

1. 大気圧プラズマ処理により、ワイヤーの種類にかかわらずワイヤーとコンポジットレジン接着材間の垂直引き抜き方向における保持力が有意に増加した。
2. ワイヤーの側面方向における引張脱離力については、ワイヤーの種類によって大気圧プラズマ処理の効果に差が認められた。
3. マルチストランドワイヤーとコンポジットレジン接着材の接合部を比較した結果、プラズマ処理によって密

着性の向上が認められた。

以上の結果から、大気圧プラズマ処理は、接着性リテーナーにおけるワイヤーとコンポジットレジン接着材の接着保持性を向上させることが示唆された。

本研究の一部は、令和6年度日本大学歯学部佐藤研究費(SATO-2024-18)の助成を受けて行われた。

本研究に関して、開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Arquib SA, Bashir R, Obeng K, Godoy LDC, Kuo CL, Upadhyay M, Yadav S (2023) Survival and failure rate of lower lingual bonded retainers: A retrospective cohort evaluation. *Orthod Craniofac Res* 26, 256-264.
- 2) Paolone MG, Kaitsas R, Obach P, Kaitsas V, Benedicenti S, Sorrenti E, Barberis F (2015) Tensile test and interface retention forces between wires and composites in lingual fixed retainers. *Int Orthod* 13, 210-220.
- 3) Butler J, Dowling P (2005) Orthodontic bonded retainers. *J Ir Dent Assoc* 51, 29-32.
- 4) Cakmak Ozlu F, Yazıcıoğlu S (2022) Effect of self-etch primer application on the bond failure rate of a mandibular bonded lingual retainer. *BMC Oral Health* 22, 653.
- 5) Zhang H, Fang J, Hu Z, Ma J, Han Y, Bian J (2010) Effect of Oxygen plasma treatment on the bonding of a soft liner to an acrylic resin denture material. *Dent Mater J* 29, 398-402.
- 6) Kim JH, Han GJ, Kim CK, Oh KH, Chung SN, Chun BH, Cho BH (2016) Promotion of adhesive penetration and resin bond strength to dentin using non-thermal atmospheric pressure plasma. *Eur J Oral Sci* 124, 89-95.
- 7) Dong X, Ritts AC, Staller C, Yu Q, Chen M, Wang Y (2013) Evaluation of plasma treatment effects on improving adhesive-dentin bonding by using the same tooth controls and varying cross-sectional surface areas. *Eur J Oral Sci* 121, 355-362.
- 8) Canullo L, Micarelli C, Bettazzoni L, Koçi B, Baldissara P (2014) Zirconia-composite bonding after plasma of argon treatment. *Int J Prosthodont* 27, 267-269.
- 9) Ito Y, Okawa T, Fukumoto T, Tsurumi A, Tatsuta M, Fujii T, Tanaka J, Tanaka M (2016) Influence of atmospheric pressure low-temperature plasma treatment on the shear bond strength between zirconia and resin cement. *J Prosthodont Res* 60, 289-293.
- 10) Tabari K, Hosseinpour S, Mohammad-Rahimi H (2017) The impact of plasma treatment of cercon zirconia ceramics on adhesion to resin composite cements and surface properties. *J Lasers Med Sci* 8, 56-61.
- 11) Bearn DR, McCabe JF, Gordon PH, Aird JC (1997) Bonded orthodontic retainers: the wire-composite interface. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 111, 67-74.
- 12) Sevilla P, Gseibat M, Peláez J, Suárez MJ, López-Suárez C (2023) Effect of surface treatments with low-pressure plasma on the adhesion of zirconia. *Materials Basel* 16, 6055.
- 13) Vilas Boas Fernandes Júnior V, Barbosa Dantas DC, Bresciani E, Rocha Lima Huhtala MF (2018) Evaluation of the bond strength and characteristics of zirconia after different surface treatments. *J Prosthet Dent* 120, 955-959.
- 14) Chen M, Zhang Y, Sky Driver M, Caruso AN, Yu Q, Wang Y (2013) Surface modification of several dental substrates by non-thermal, atmospheric plasma brush. *Dent Mater* 29, 871-880.
- 15) Prado M, Menezes MSO, Gomes BPFA, Barbosa CAM, Athias L, Simão RA (2016) Surface modification of gutta-percha cones by non-thermal plasma. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 68, 343-349.
- 16) Kaimal A, Ramdev P, Shruthi CS (2017) Evaluation of effect of zirconia surface treatment, using plasma of argon and silane, on the shear bond strength of two composite resin cements. *J Clin Diagn Res* 11, ZC39-ZC43.
- 17) Piest C, Wille S, Strunskus T, Polonskyi O, Kern M (2018) Efficacy of Plasma Treatment for Decontaminating Zirconia. *J Adhes Dent* 20, 289-297.

拘束性ストレスと卵巣摘出による口腔内灼熱症候群モデルマウス作製の試み

米本真実子^{1,2} 坪井美行^{1,2} 海津彰弘¹ 須永美希^{1,3} 篠田雅路^{1,2}¹ 日本大学歯学部生理学講座² 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野³ 日本歯科大学附属病院 総合診療科2

要旨

【目的】口腔内灼熱症候群（BMS）は舌に器質的な異常がないにもかかわらず、舌に異常疼痛が生じる疾患である。現在、適切なBMSモデル動物が存在せず、BMSの病態解明が進んでいないのが現状である。本研究では、BMS発症に関連があると考えられる女性ホルモン異常とストレス負荷によるBMSモデルマウス作製の可能性を検討することを目的とした。

【方法】実験にはICR系マウスを使用した。雄性マウスに対して6時間/日の体動制限を行う拘束ストレス負荷（RS群）または6時間/日の食餌飲水制限（nFnW群）を21日間行った。RS負荷および食餌飲水制限のない群をFree群とした。雌性マウスに対して卵巣摘出（OVX）または偽手術（Sham）を施行した後、RS負荷、nFnW処置またはFree処置を21日間行った。浅麻酔下で舌への機械刺激または温度刺激による頭部引込み反射が誘発された最小の刺激強度を頭部逃避反射閾値（HWRT）とし、各処置開始前と開始後21日目に測定した。各処置開始前から開始後21日目まで、体重は毎日測定した。各処置開始後21日目、血漿コルチコステロン濃度を測定した。

【結果】雄性マウスおよび雌性マウスにおいて、21日間のRS負荷は血漿コルチコステロン濃度を増加させ、舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTおよび体重を低下させた。OVXを施した雌性マウスでは、Free処置、nFnW処置およびRS負荷群において舌のHWRTが低下した。雌性マウスにおいて、RS負荷により生じる舌のHWRT低下はOVXの影響を受けなかった。

【結論】雄性マウスおよび雌性マウスに対するRS負荷および雌性マウスに対するOVXは舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を惹起させたことから、BMSモデルとして有用であることが示唆された。

キーワード：口腔内灼熱症候群、マウス、卵巣摘出、拘束ストレス

Experimental establishment of restraint stress and ovariectomy-induced mouse model for burning mouth syndrome

Mamiko Yonemoto^{1,2}, Yoshiyuki Tsuboi^{1,2}, Akihiro Kaizu¹,
Miki Sunaga^{1,3}, Masamichi Shinoda^{1,2}¹ Department of Physiology, Nihon University School of Dentistry² Division of Oral structural and Functional Biology, Nihon University Graduate School of Dentistry³ General Dentistry Department 2, Nippon Dental University Hospital

Abstract

【Purpose】 Burning mouth syndrome (BMS) is a condition characterized by abnormal pain in the tongue despite the absence of any structural abnormalities. Currently, no appropriate animal model for BMS exists, which has hindered progress in understanding its pathophysiology. This study aimed to investigate the possibility of developing a BMS mouse model induced by hormonal imbalance and stress exposure, which are presumed to be potential factors associated with BMS onset.

【Methods】 Institute of cancer research mice were used in the study. Male mice were subjected to restraint stress (RS group, 6 hours/day) or restricted access to food and water (nFnW group, 6 hours/day) for 21 days. A control group (Free group) was not subjected to RS or nFnW conditions. Female mice underwent either ovariectomy (OVX) or sham surgery, followed by exposure to RS, nFnW, or Free conditions for 21 days. The head withdrawal reflex threshold (HWRT) was defined as the minimum intensity of mechanical or thermal stimulation applied to the tongue that elicited a head withdrawal response. HWRT measurements were conducted under light anesthesia prior to the initiation of treatment and again on day 21 following the commencement of treatment. Body weights were measured daily from before each treatment initiation until day 21. Plasma corticosterone concentration (PCC) was assessed on day 21 after each treatment initiation.

【Results】 In both male and female mice, 21 days of RS led to an increase in PCC and a decrease in HWRT in response to mechanical and heat tongue stimulation, as well as a reduction in body weight. In OVX female mice, HWRTs were reduced in Free, nFnW, and RS groups. Furthermore, in female mice, the RS-induced reduction in HWRT was unaffected by OVX.

【Conclusion】 RS exposure in both male and female mice, as well as OVX in female mice, induced mechanical allodynia and heat hyperalgesia in the tongue, suggesting the potential utility of these models for studying BMS pathophysiology.

Keywords: burning mouth syndrome, mouse, ovariectomy, restraint stress

(受付：令和7年6月4日)

責任著者連絡先：坪井美行

日本大学歯学部生理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

TEL：03-3219-8122

FAX：03-3219-8341

E-mail：tsuboi.yoshiyuki@nihon-u.ac.jp

緒 言

口腔内灼熱症候群 (BMS) 患者は舌に器質的な変化が認められないにもかかわらず、1 日に 2 時間以上、3 カ月以上続く舌痛またはピリピリした不快な舌異常感覚を訴え¹⁾、食事の際に香辛料や熱いものが痛いと感じることが知られている²⁾。BMS は全人口の 0.7-3% に発症するとされており、患者の男女比は 1:8-1:10 で、特に更年期の女性に多く発症する³⁻⁷⁾。また、過去の強い心理的ストレスは BMS の発症率を増加させる¹⁾。したがって、BMS の発症には閉経とストレスが深く関与すると考えられるが、その発症機構に関しては不明な点が多い。

閉経はエストロゲンの分泌を減少させ、骨密度の低下を惹き起こすことはよく知られている⁸⁾。興味深いことに、血漿または局所エストロゲンが痛覚感受性を調節していることが報告されている⁹⁻¹⁵⁾。例えば、卵巣摘出によるエストロゲンの枯渇は体性痛および内臓痛を惹き起こすが、その体性痛および内臓痛はエストラジオール (E2) 投与によって抑制される¹⁶⁻¹⁹⁾。したがって、閉経によるエストロゲンの分泌低下が BMS 発症の一因であることが示唆される。

ストレス反応は、恐怖や安全性に対する脅威を認識することによって惹き起こされる。ストレス刺激によって交感神経-副腎髄質系と視床下部-下垂体-副腎皮質 (HPA) 系が活性化される。この活性化によって、血中のエピネフリンやノルエピネフリンといったカテコールアミン濃度が上昇し²⁰⁾、副腎皮質より糖質コルチコイド (主にコルチゾール [ヒト] およびコルチコステロン [げっ歯類]) が分泌される²¹⁾。コルチゾールは糖新生、抗炎症、免疫抑制、タンパク質や脂肪の代謝など、生体維持に不可欠な作用をもつ²²⁻²⁴⁾。一方、ストレスによってコルチゾール分泌が亢進され、交感神経系を刺激することにより、自律神経失調症、頭痛、不眠、過敏性腸症候群などが発症すると報告されている^{22, 25, 26)}。

舌神経の圧迫による舌神経損傷後の舌への機械刺激および熱刺激による頭部逃避反射閾値 (HWRT) 低下の性差には、上行性痛覚伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆されている²⁷⁾。しかしながら、閉経やストレスが誘因となって発症すると考えられている BMS における舌痛発現機構の性差については、不明な点が多い。その一因に閉経やストレスなどに起因した BMS モデル動物が確立されていないことが挙げられる。これまでも BMS モデル動物の作製を試みた報告は存在する²⁸⁾。しかし、多くの研究では雄性個体のみを用いている²⁹⁻³¹⁾、あるいは末梢神経損傷モデルを採用している点で³²⁾、BMS の疫学的特徴、特に女性の発症率が高いことや末梢神経損傷非依存性の疼痛様症状を十分に反映しているとは言いがたい。

そこで本研究では、雄性および雌性マウスを用いて、雄性および雌性マウスへの拘束によるストレス負荷³³⁾ および雌性マウスへの卵巣摘出が舌の侵害受容の変調にどのような影響を及ぼしているかを解明し、BMS のモデル動物を作製することを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

ICR 系マウス (雄性マウス: $n = 22$, 7-12 週齢; 雌性マウス: $n = 48$, 7-12 週齢, 日本エスエルシー, 浜松) を実験に用いた。明 (7 時 - 19 時) / 暗 (19 時 - 7 時) サイクルの環境下で、自由に水・餌が摂取できる状態で飼育されたマウスを使用した。雌性マウスにおいては、全身麻酔下 (導入: 4%, 維持: 2.5% イソフルラン吸入, ヴィアトリス製薬, 東京) でインピーダンスチェッカー (MK-11, 室町機械, 東京) のプローブを膣に挿入して測定したインピーダンスにより性周期を判断し、性周期に偏りがないように実験開始時期を設定した。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会による審査および学部長の承認を得て行われた (承認日: 2022 年 5 月 27 日, 最終承認番号: AP22DEN017-4)。日本大学動物実験実施規定に従って実験を行い、被験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

2. 舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT の測定

マウスに十分な全身麻酔 (導入: 4%, 維持: 2%, イソフルラン吸入) を行った後、0.5% イソフルラン吸入を維持した。足底に対する 200 g 以下の Rodent pincher - Analgesia meter (BIOSEB, Vitrolles, France) によるピンチ刺激で足ひっこめ反射が起こり、呼吸数が毎分 180 ~ 200 回となる麻酔レベルに達したことを確認した後すぐに、舌尖より 3 mm の左側舌部を Rodent pincher - Analgesia meter を用いて漸増機械刺激 (0 - 110 g, 5 g/sec, cut off: 110 g) または接触型温度刺激装置 (刺激領域: 6 × 6 mm, インタークロス, 東京) を用いて漸増温度刺激 (30 - 52 °C, 1 °C /sec, cut off: 52 °C) した。舌への上記の機械刺激または温度刺激により頭部引っ込め反射が誘発された最小の刺激強度を HWRT とした。それぞれのマウスに対して HWRT を 2 回測定し、その平均値を各マウスの HWRT とした。各刺激間隔は 3 分以上とした。

3. 拘束ストレス負荷

拘束ストレスとして、十分な全身麻酔 (導入: 4%, 維持: 1%, イソフルラン吸入) を行った後、Mouse DecapiCone (MDC-200; Braintree Scientific, Braintree, MA, USA) にマウスを入れて拘束した。イソフルラン吸入を停止した後、1 日 6 時間 (9 時 - 15 時) 拘束を維持した (Restraint Stress 群, 以下 RS 群とする)³³⁾。RS 群では体動だけではなく食餌および飲水が制限される。したがって、

RS 群のコントロールとして1日6時間（9時 - 15時）食餌および飲水を制限する群を no-Food no-Water (nFnW) 群とした。また、自由に食餌および飲水が可能で、RS を受けないマウスを Free 群とした。

4. 卵巣摘出

全身麻酔（導入：4%，維持：2%，イソフルラン吸入）下にて、側腹部より腎臓の位置を確認後、腹臥位にして背面に約1cmの皮膚切開を加え、筋層を剥離し、卵管を脂肪組織とともに6-0絹糸で結紮した後、卵巣を両側とも卵管部から完全に摘出した（Ovariectomy 群、以下 OVX 群とする）。同様に全身麻酔下にて皮膚切開を加え筋層剥離し、卵管の明示のみ施行して皮膚を縫合した群を Sham 群とした。

5. 血漿コルチコステロン濃度の測定

RS, nFnW または Free 処置開始後21日目、全身麻酔（導入：4%，維持：2%，イソフルラン吸入）下にて、ヘパリン付きヘマトクリット管（HIRSCHMANN, Hirschmann Laborgerate GmbH & Co. KG, Eberstadt, Germany）を使用し、尾の根元から3分の1の部位を剃刀（PERSONNA, Shelton, CT, USA）にて1-2 mm 程度切開し、創出血を0.05 ml 採取した。採血した血液を4℃で3,000 rpm, 30 分で遠心分離し、上清のコルチコステロン濃度を AssayMax Corticosterone ELISA kit（AssayPro, St. Charles, MI, USA）を用いて定量した。Free 処置された雄性マウスから無作為に選んだ1頭の値を1として、血漿コルチコステロン濃度（Plasma corticosterone concentration：PCC）の相対値を解析した。

6. 実験タイムコース

1) 雄性マウス

RS, nFnW または Free 処置開始前 (Pre) に HWRT および体重測定を行い、その翌日 (Day 1) から各処置を開始し、各処置開始後21日目 (Day 21) に HWRT を測定した (図1 A)。体重は Pre から Day 21まで毎日測定した。

2) 雌性マウス

RS, nFnW または Free 処置開始前 (Pre) に HWRT および体重を測定した後、OVX または sham 処置を行った。OVX または sham 手術後5日目 (Day 1) より各処置を開始し、各処置開始後21日目 (Day 21) に HWRT を測定した (図1 B)。体重は Pre から Day 21まで毎日測定した。

7. 統計学的解析

各群の体重および HWRT 値は、正規性を持つことを Shapiro-Wilk test を用いて確認した。測定値は平均値 ± 標準誤差で表した。体重は、繰り返しのある二元配置分散

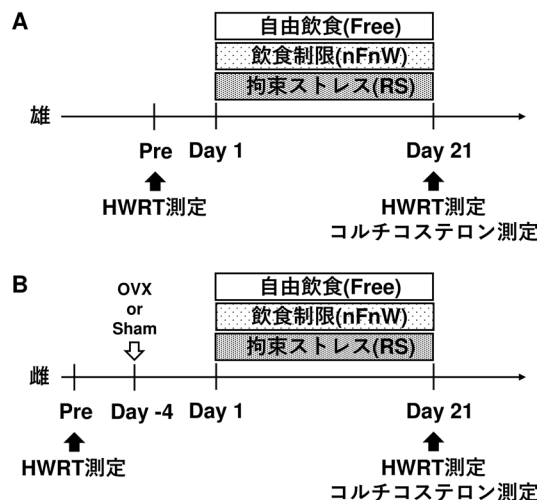


図1 実験タイムコース

A: 雄マウス実験タイムコース B: 雌マウスの実験タイムコース
OVX: 卵巣摘出, Sham: 卵巣摘出の sham 手術, HWRT: 頭部逃避反射閾値

分析を用いて検定した。HWRT 値は、paired *t*-test を用いて検定した。PCC の相対値は、正規性を持たなかったため、Kruskal-Wallis test を用いて検定を行った。統計学的解析には、SigmaPlot version 14.0 (Systat Software, Palo Alto, CA, USA) を使用した。有意水準は $\alpha = 0.05$ とした。

結 果

1. 体重および PCC の変化

雄性マウスにおいて、nFnW 群および RS 群の体重は Free 群と比較して減少した (図2 Aa)。RS 群では RS 開始後4日から13日間、Pre と比較して体重が減少した。nFnW 群の体重増加量は Free 群と比較して有意に減少した ($p < 0.01$)。図2 Ab に sham 手術された雌性マウスの、図2 Ac に OVX 手術されたマウスの体重増減を示す。sham 手術後、RS 群の体重は Free 群や nFnW 群と比較して有意に減少した ($p < 0.001$)。sham 手術された RS 群では、RS 開始2日目から21日目まで Pre と比較して体重が減少した。OVX 手術された RS 群の体重は Free 群や nFnW 群と比較して有意に減少した ($p < 0.001$)。OVX 手術された RS 群では、RS 開始後21日目まで Pre と比較して体重が減少した。さらに、OVX 手術した RS 群と sham 手術した RS 群の体重減少に差はなかった。

雄性マウスでは、RS 群の PCC が Free 群や nFnW 群と比較して高かった (図2 Ba)。sham 手術された雌性マウスでは、RS 群の PCC が Free 群と比較して高かった (図2 Bb)。OVX 手術された雌性マウスでは、Free 群、nFnW 群および RS 群間で PCC に差は見られなかった (図2 Bc)。

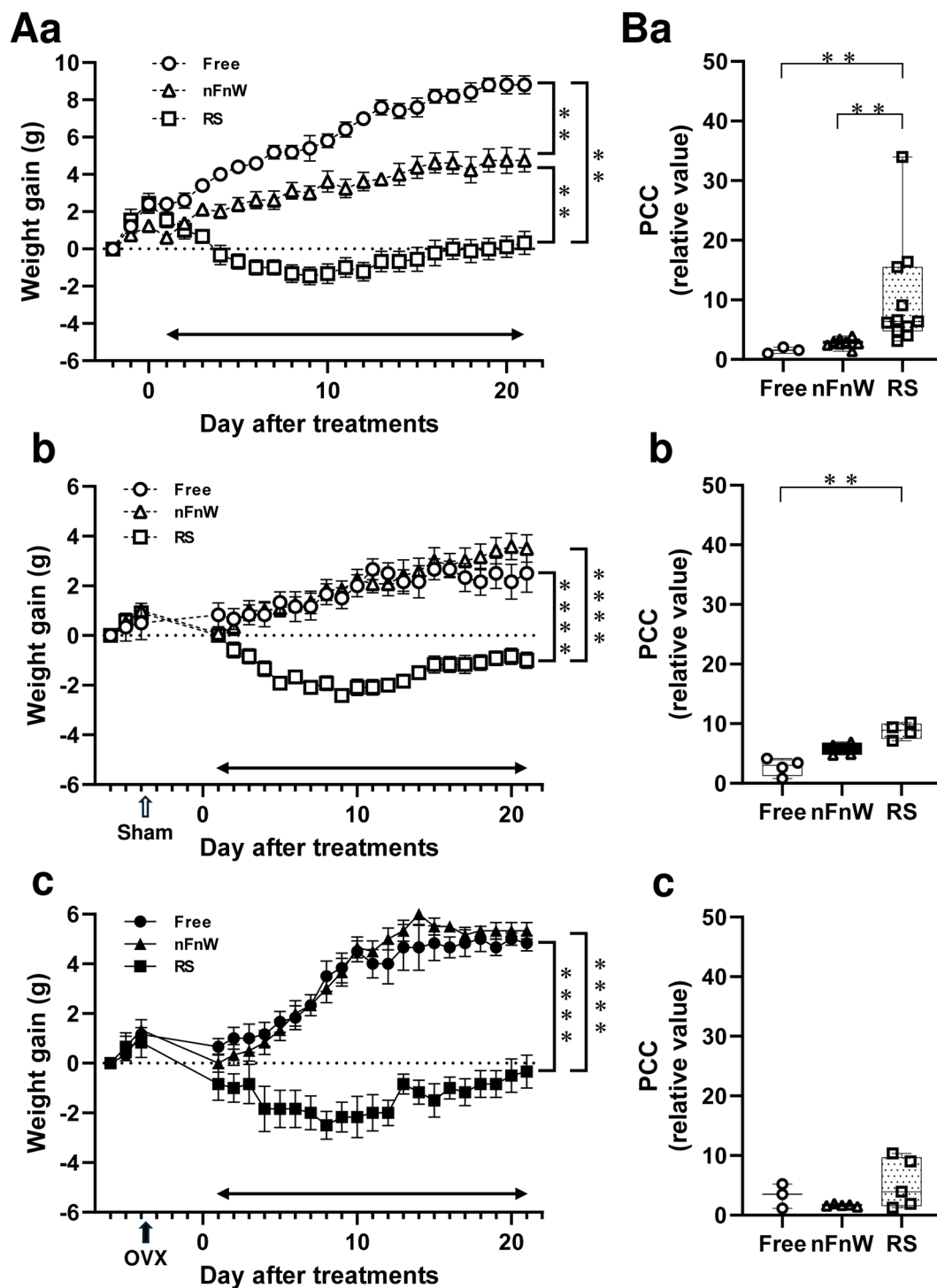


図2 体重と血漿コルチコステロン量の変化

A: 雄性 (Aa) および雌性 (Ab: Sham 群, Ac: OVX 群) マウスの体重変化。 B: 雄性 (Ba) および雌性 (Bb: Sham 群, Bc: OVX 群) マウスの血漿コルチコステロン濃度 (PCC: Plasma corticosterone concentration) の変化。両矢印は Free, nFnW または RS の期間を示す。

** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 。

2. 雄性マウスへのストレス負荷による HWRT の変化

Pre と比較して Day 21 において, RS 群の舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT は有意に低下した (機械刺激, Pre: 109.4 ± 0.4 g, Day 21: 68.3 ± 6.2 g; 熱刺激,

Pre: 50.7 ± 0.4 °C, Day 21: 45.8 ± 0.8 °C, $n = 9$ in each) (図 3 A, B)。一方, Free 群および nFnW 群では, 舌への機械刺激または熱刺激に対する HWRT に変化は見られなかった (図 3 A, B)。

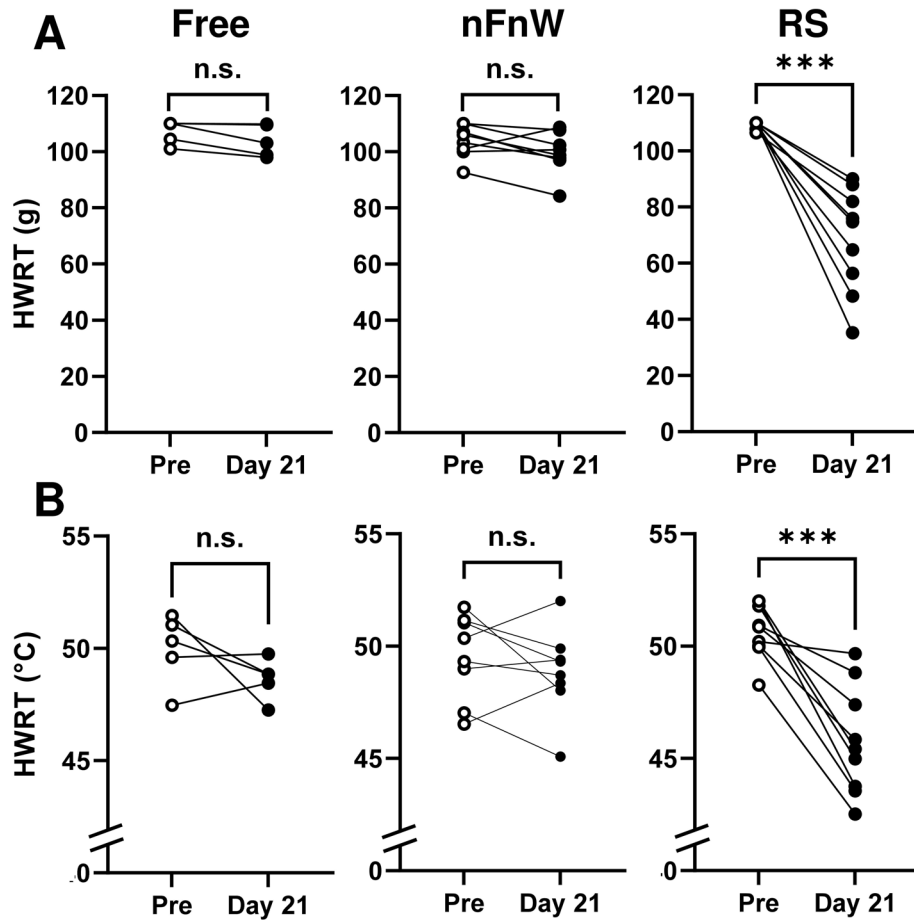


図3 雄性マウスへのRS負荷によるHWRT変化

PreおよびDay 21における舌への機械刺激 (A) または熱刺激 (B) に対するHWRT。n.s.: not significant. *** $p < 0.005$ 。

3. 雌性マウスへのストレス負荷によるHWRTの変化

Preと比較してDay 21において、sham手術されたRS群の舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTは有意に低下した(機械刺激, Pre: 108.1 ± 1.0 g, Day 21: 69.7 ± 5.0 g; 熱刺激: Pre: 50.0 ± 0.4 °C, Day 21: 46.3 ± 0.7 °C; $n = 12$ in each) (図4 A, B)。一方, sham手術されたFree群およびnFnW群では, 舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTに変化は見られなかった(図4 A, B)。

Preと比較してDay 21において, OVX手術されたFree群(機械刺激, Pre: 103.7 ± 3.5 g, Day 21: 94.9 ± 4.5 g; 熱刺激, Pre: 50.9 ± 0.6 °C, Day 21: 48.4 ± 0.5 °C, $n = 6$ in each), nFnW群(機械刺激, Pre: 107.8 ± 0.4 g, Day 21: 94.9 ± 4.0 g; 熱刺激, Pre: 40.4 ± 0.3 °C, Day 21: 47.3 ± 0.9 °C, $n = 6$ in each) およびRS群(機械刺激, Pre: 107.0 ± 1.6 g, Day 21: 64.0 ± 5.2 g; 熱刺激, Pre: 50.4 ± 0.5 °C, Day 21: 45.4 ± 0.7 °C, $n = 6$ in each) の舌への機械刺激または熱刺激に対するHWRTは有意に低下した(図5 A, B)。

Sham手術またはOVX手術された各処置群において,

PreとDay 21での舌への機械刺激(図6 A)および熱刺激(図6 B)に対するHWRTの差を示す。Free群では, OVX手術された雌性マウスにおける舌への機械刺激および熱刺激に対するHWRTがsham手術されたものと比較して有意に低かった(機械刺激, Sham: 3.1 ± 4.0 g, OVX: -8.8 ± 2.6 g; 熱刺激, Sham: 0.3 ± 0.6 °C, OVX: -2.4 ± 0.8 °C, $n = 6$ in each)。nFnW群では, OVX手術された雌性マウスにおける舌への機械刺激に対するHWRTがsham手術されたものと比較して有意に低かったが(Sham: 2.2 ± 2.0 g, $n = 12$; OVX: -12.9 ± 4.2 g, $n = 6$), 舌への熱刺激に対するHWRTに有意な差は認められなかった(Sham: -0.7 ± 0.6 g, $n = 12$; OVX: -1.5 ± 0.5 g, $n = 6$, $p = 0.321$)。RS群では, Day 21におけるOVX手術された雌性マウスとsham手術された雌性マウスの舌への機械刺激および熱刺激に対するHWRTは低下傾向にあったが, 有意差は認められなかった(機械刺激, Sham: -38.4 ± 5.3 g, $n = 12$; OVX: -43.0 ± 6.3 g, $n = 6$, $p = 0.978$; 熱刺激, Sham: -3.7 ± 0.7 °C, $n = 12$, OVX: -5.0 ± 0.8 °C, $n = 6$, $p = 0.248$)。

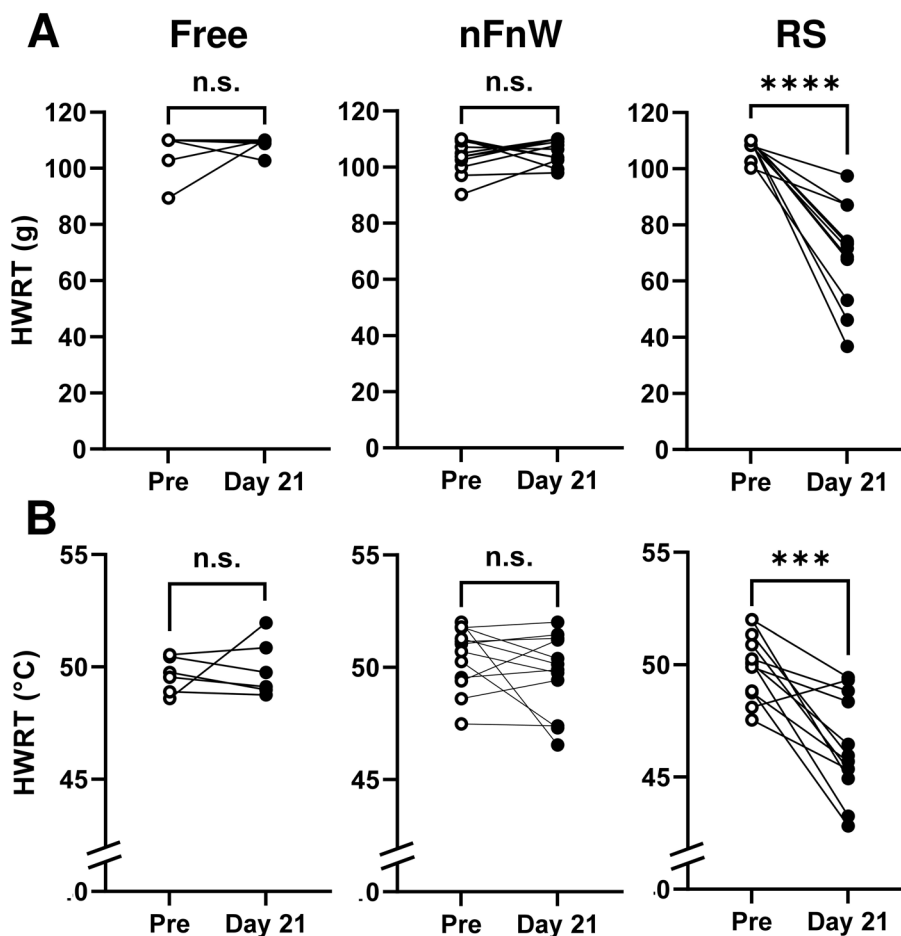


図4 Sham手術された雌性マウスへのPS負荷によるHWRT変化

Free群, nFnW群およびRS群の舌への機械刺激(A)または熱刺激(B)に対するHWRT。n.s.: not significant. *** $p < 0.005$. **** $p < 0.001$ 。

考 察

BMSモデル動物として, 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid 処置により舌に熱痛覚過敏が発症するモデル²⁹⁾や麻酔下で舌を乾燥させることで舌に機械アロディニアが発症するモデル^{30, 31)}が報告されている。しかし, それらの研究では雌は使用しておらず, また実際のBMS患者では観察されない舌の表層の萎縮などの器質的変化が観察されている。本研究では閉経には卵巣摘出, ストレスにはRSを用いて舌のHWRTの変化を解析したもので, BMSの疫学的特徴を反映したモデルと考えられる。

本研究で用いたRS負荷を行った他の研究においても, 体重の増加抑制が報告されている³³⁾。さらに, チューブを使った強い拘束ストレス負荷は著しい体重減少を惹き起こすことが知られている^{34, 35)}。おそらく, 拘束ストレス負荷の強度は体動制限程度に依存的であると考えられる。本研究では, 雄性マウスは未処置, 雌性マウスはshamまたはOVX処置後にRS負荷を行ったため, RS負荷による影響の性差を直接的に比較することはできない。しかしなが

ら, 雄性マウスと雌性マウスともにRS負荷後に体重が減少したことから, 本研究で用いたRS負荷により両性マウスにストレスが負荷されたことは間違いないと考えられる。

卵巣摘出は体重を増加させること³⁶⁾, エストロゲンまたはエストロゲンとプロゲステロンの投与によって卵巣摘出による体重増加が抑制されることが知られている^{37, 38)}。さらに, エストロゲン³⁹⁾やプロゲステロン⁴⁰⁾は脂肪細胞に作用して, 食欲抑制ホルモンであるレプチンの分泌を促進することから³⁹⁾, 卵巣摘出によるエストロゲンやプロゲステロンの分泌停止が体重増加を惹き起こすと考えられている。本研究では, 雄性マウスと比較して, 雌性マウスの方がRS負荷によって体重が減少した。これは雌性マウスの方がストレスの影響を受けやすいことを示唆している。さらに, OVX手術したRS群とsham手術したRS群の体重減少に差はなかった。したがって, RS負荷による体重減少にエストロゲンやプロゲステロンは関与しないことが示唆された。

ヒトではストレスが生体に負荷されると, 交感神経-副

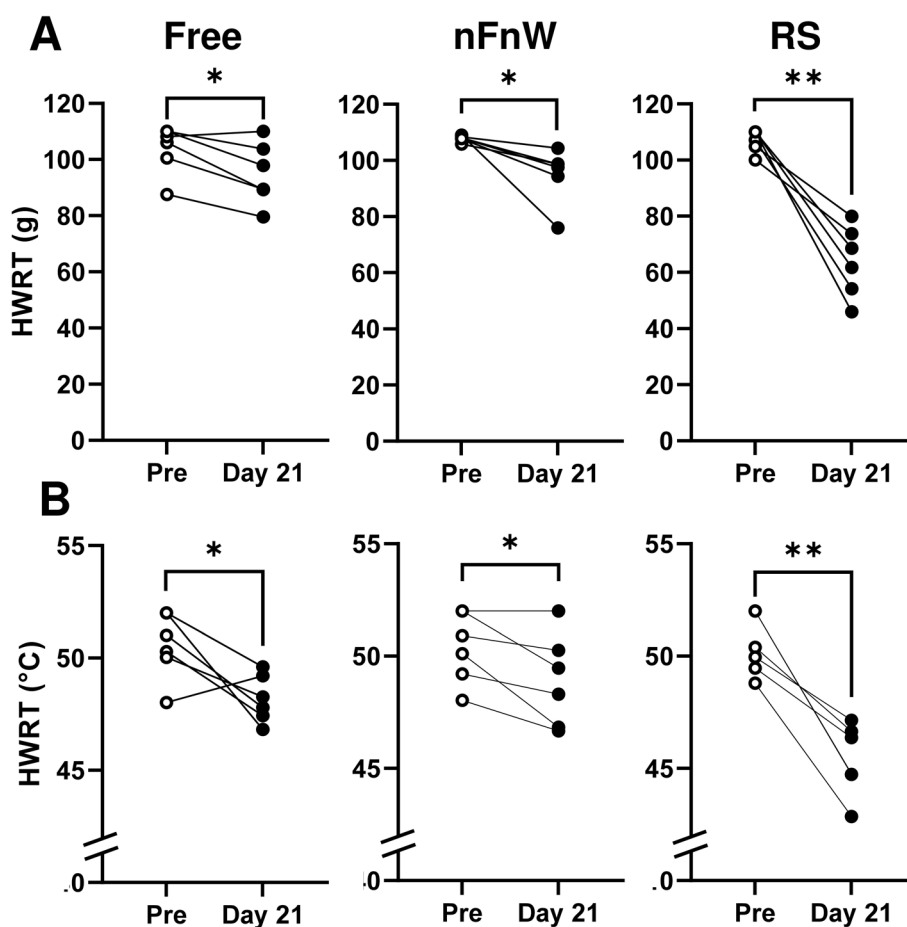


図5 OVX手術された雌性マウスへのRS負荷によるHWRT変化

Free群, nFnW群およびRS群それぞれの舌への機械刺激(A)または熱刺激(B)に対するHWRTの変化。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

腎髄質系やHPA系が活性化し、血中カテコールアミン(アドレナリンとノルアドレナリン)濃度の上昇や副腎皮質から糖質コルチコイド(主にコルチゾール)の分泌が起こり、全身性のストレス反応を惹き起こす⁴¹⁾。コルチコステロンはげっ歯類のコルチゾールに相当する。1時間の強い拘束による急性ストレスを負荷した雄性ラットでは、非ストレス群と比較して副腎皮質刺激ホルモン(adrenocorticotrophic hormone: ACTH)およびPCCが増加した⁴²⁾。一方、長期の拘束ストレス負荷後のACTHの血清濃度に差がなく、PCCは上昇したとの報告がある⁴³⁾。さらに、強制水泳ストレス、水回避ストレスや拘束ストレスといった異なる種類のストレスを交互に組み合わせ、21日間にわたりストレス負荷した場合、非ストレス群と比較してPCCは2倍以上増加していることが報告されている⁴⁴⁾。また、長期の拘束ストレス負荷はACTHの分泌量を減少させるとの報告もあり、この減少にはストレスに対する慣れが関与すると考えられている⁴⁵⁾。本研究では、RS負荷した雄性マウスと雌性マウスともに、Free群と比較してPCCが2倍以上に上昇した。この結果は、本研究で用いたRSにより十分なストレスが負荷されたことを示

唆している。PCCは拘束ストレス負荷により増加するが、OVX後の拘束ストレス負荷はPCCを変化させないことが報告されている⁴⁶⁾。一方で、OVX後のストレス負荷の有無によるPCCを比較したところ、ストレス負荷群においてPCCが低下したとの報告もある⁴⁷⁾。本研究では、OVX後のRS負荷の有無によるPCCに変化は認められなかった。この結果は、OVXによりHPA系の活性化に何らかの変調が生じた可能性を示唆しており、さらなる検討が必要である。

慢性的なストレスが痛覚異常を引き起こすメカニズムには、複数の因子が関与している可能性がある。例えば、長期にわたる寒冷ストレスによって誘発される痛覚過敏には、ペプチド含有一次求心性ニューロンが関与していることが報告されている⁴⁸⁾。また、強制水泳ストレス後に発症する痛覚過敏は、セロトニン作動性ニューロンの変調によって惹起される⁴⁹⁾。拘束ストレス負荷は、顎関節炎に起因した顎関節痛に対するモルヒネによる鎮痛効果を減弱し、延髄へのセロトニン選択的再取り込み阻害薬投与による鎮痛効果を増強した^{42, 43)}。これらの報告より、RS負荷は下行性疼痛抑制系を司るセロトニン作動性ニューロンや

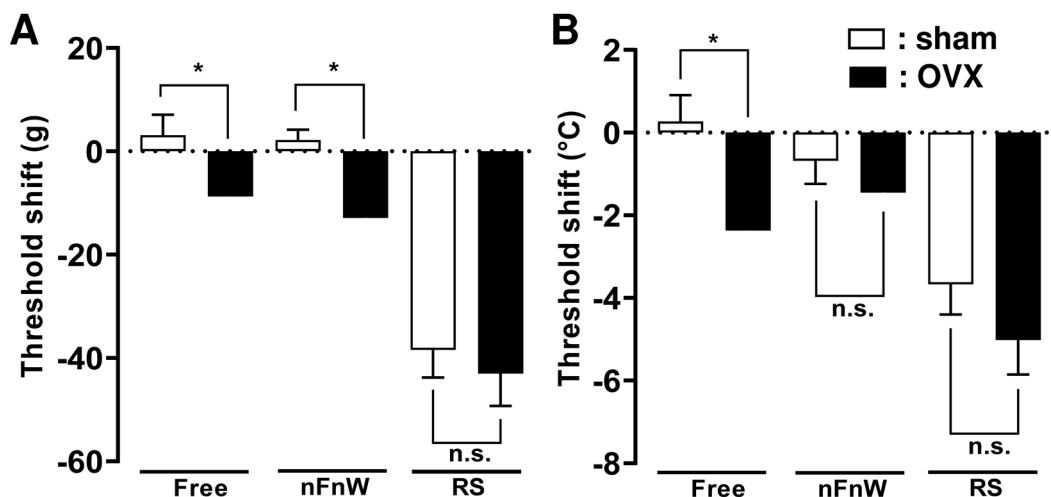


図6 Shams手術とOVX手術雌マウスのHWRTの変化の比較

舌への機械刺激 (A) および熱刺激 (B) に対する HWRT の変化 (Threshold shift) は, Day 21 の HWRT から Pre の HWRT を引いた値とした。n.s.: not significant. * $p < 0.05$ 。

内因性オピオイド系を変調させて疼痛強度を調節させることが示唆された。

一次ニューロンにおいてエストロゲン受容体は侵害受容に重要な Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) や Purinergic receptor 3 (P2X₃) と共存することから, エストロゲンのシグナルは侵害受容機構の調節に関与すると考えられる⁵⁰⁾。エストロゲンは, 神経成長因子 (NGF) やその受容体である Tropomyosin-related kinase A (TrkA) の機能を抑制するが, OVX によりエストロゲンの分泌が低下すると, この抑制が解除されて NGF-TrkA シグナル伝達が促進される。NGF-TrkA シグナルは TRPV1 の Ca²⁺透過性を上昇させ, 一次ニューロンの興奮性が増強すると考えられる⁵⁰⁾。また, OVX は口腔顔面領域に投射する一次ニューロンの P2X₃機能を増強させ, 顔面痛を惹起することが報告されている⁵¹⁾。通常, エストロゲンは P2X₃機能の増強を抑制しているが, OVX はエストロゲンの枯渇によって P2X₃機能を増強させ, 一次ニューロンの興奮性を上げると考えられる⁵²⁾。本研究では, OVX により顔面部への機械刺激や熱刺激に対する HWRT は低下した。したがって, OVX によるエストロゲンの分泌低下に起因した一次ニューロンに発現する TRPV1 や P2X₃の興奮性増強が, 舌の侵害受容の異常に関与することが示唆される。

結 論

末梢組織に器質的変化が見られないとされる BMS のモデルマウス作製を目指し, OVX による女性ホルモンの枯渇および 6 時間の体動制限による RS を行い, PCC および舌への機械刺激および熱刺激に対する HWRT 変化を解析した。その結果, 以下の結論を得た。

1. 雄性マウスおよび雌性マウスにおいて, 21 日間の RS

負荷は PCC を増加させ, 舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を惹起した。

2. OVX を施した雌性マウスでは, Free, nFnW および RS 処置群において舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏が生じた。

3. 雌性マウスにおいて, RS 負荷により生じる舌の機械アロディニアおよび熱痛覚過敏は OVX の影響を受けなかった。

以上より, 雄性マウスおよび雌性マウスに対する RS 負荷および雌性マウスに対する OVX は舌に機械アロディニアおよび熱痛覚過敏を惹起させたことから, BMS モデルとして有用であると考えられた。

本論文作成にあたり, 的確な助言を頂いた日本大学歯学部生理学講座の皆様と丁寧な動物飼育管理を行っていただいた三協ラボサービスの方々に深く感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費 (基盤研究 (C) 20K07746) の助成を受けて行われた。

本論文に関して, 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) 日本頭痛学会・国際頭痛分類委員会 (2018) 国際頭痛分類. 日本語版第 3 版, 医学書院, 東京, 181.
- 2) Coculescu EC, Radu A, Coculescu BI (2014) Burning mouth syndrome: a review on diagnosis and treatment. J Med Life 7, 512-515.
- 3) Bergdahl J, Anneroth G, Perris H (1995) Personality characteristics of patients with resistant burning mouth syndrome. Acta Odontol Scand 53, 7-11.
- 4) Scala A, Checchi L, Montevecchi M, Marini I, Giamberardino MA (2003) Update on burning mouth syndrome: overview and patient management. Crit Rev Oral Biol Med 14, 275-291.
- 5) Suarez P, Clark GT (2006) Burning mouth syndrome: an update on diagnosis and treatment methods. J Calif Dent

- Assoc 34, 611-622.
- 6) Netto FOG, Diniz IMA, Grossmann SMC, de Abreu MH, do Carmo MA, Aguiar MC (2011) Risk factors in burning mouth syndrome: a case-control study based on patient records. *Clin Oral Investig* 15, 571-575.
 - 7) Imamura Y, Shinozaki T, Okada-Ogawa A, Noma N, Shinoda M, Iwata K, Wada A, Abe O, Wang K, Svensson P (2019) An updated review on pathophysiology and management of burning mouth syndrome with endocrinological, psychological and neuropathic perspectives. *J Oral Rehabil* 46, 574-587.
 - 8) 坂井建雄, 宮本賢一, 小西真人, 工藤宏幸 (2017) カラー図解 人体の正常構造と機能. 第3版, 坂井建雄, 河原克雅, 日本医事新報社, 東京, 751.
 - 9) Kayser V, Berkley KJ, Keita H, Gautron M, Guilbaud G (1996) Estrous and sex variations in vocalization thresholds to hindpaw and tail pressure stimulation in the rat. *Brain Res* 742, 352-354.
 - 10) Bradshaw HB, Berkley KJ (2000) Estrous changes in responses of rat gracile nucleus neurons to stimulation of skin and pelvic viscera. *J Neurosci* 20, 7722-7727.
 - 11) Bereiter DA (2001) Sex differences in brainstem neural activation after injury to the TMJ region. *Cells Tissues Organs* 169, 226-237.
 - 12) Liu B, Eisenach JC, Tong C (2005) Chronic estrogen sensitizes a subset of mechanosensitive afferents innervating the uterine cervix. *J Neurophysiol* 93, 2167-2173.
 - 13) Allen AL, McCarron KE (2005) Estrogen increases nociception-evoked brain-derived neurotrophic factor gene expression in the female rat. *Neuroendocrinology* 81, 193-199.
 - 14) Bereiter DA, Okamoto K, Bereiter DF (2005) Effect of persistent monoarthritis of the temporomandibular joint region on acute mustard oil-induced excitation of trigeminal subnucleus caudalis neurons in male and female rats. *Pain* 117, 58-67.
 - 15) Evrard HC (2006) Estrogen synthesis in the spinal dorsal horn: a new central mechanism for the hormonal regulation of pain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 291, R291-R299.
 - 16) Stoffel EC, Ulibarri CM, Craft RM (2003) Gonadal steroid hormone modulation of nociception, morphine antinociception and reproductive indices in male and female rats. *Pain* 103, 285-302.
 - 17) Sanoja R, Cervero F (2005) Estrogen-dependent abdominal hyperalgesia induced by ovariectomy in adult mice: A model of functional abdominal pain. *Pain* 118, 243-253.
 - 18) Mannino CA, South SM, Quinones-Jenab V, Inturrisi CE (2007) Estradiol replacement in ovariectomized rats is antihyperalgesic in the formalin test. *J Pain* 8, 334-342.
 - 19) Sanoja R, Cervero F (2008) Estrogen modulation of ovariectomy-induced hyperalgesia in adult mice. *Eur J Pain* 12, 573-581.
 - 20) Vinik AI, Maser RE, Ziegler D (2011) Autonomic imbalance: prophet of doom or scope for hope? *Diabet Med* 28, 643-651.
 - 21) Blackburn-Munro G, Blackburn-Munro R (2003) Pain in the brain: are hormones to blame? *Trends Endocrinol Metab* 14, 20-27.
 - 22) Heim C, Ehlert U, Hellhammer DH (2000) The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology* 25, 1-35.
 - 23) Ehlert U, Gaab J, Heinrichs M (2001) Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Biol Psychol* 57, 141-152.
 - 24) Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 53, 865-871.
 - 25) Jankord R, Herman JP (2008) Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci* 1148, 64-73.
 - 26) McEwen BS (2008) Central effects of stress hormones in health and disease: Understanding the protective and damaging effects of stress and stress mediators. *Eur J Pharmacol* 583, 174-185.
 - 27) 坂梨公亮 (2024) マウス舌神経損傷による舌神経障害性疼痛の性差に対する中枢神経系免疫細胞の役割. *日大歯学* 98, 10-17.
 - 28) Sangalli L, Prakapenka AV, Chaurasia A, Miller CS (2024) A review of animal models for burning mouth syndrome: Mechanistic insights and knowledge gaps. *Oral Dis* 30, 3761-3770.
 - 29) Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K (2015) Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain* 156, 2528-2537.
 - 30) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K (2016) ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain* 12, 1744806916641680.
 - 31) Chen JY, Kubo A, Shinoda M, Okada-Ogawa A, Imamura Y, Iwata K (2020) Involvement of TRPV4 ionotropic channel in tongue mechanical hypersensitivity in dry-tongue rats. *J Oral Sci* 62, 13-17.
 - 32) Boucher Y, Simons CT, Carstens MI, Carstens E (2014) Effects of gustatory nerve transection and/or ovariectomy on oral capsaicin avoidance in rats. *Pain* 155, 814-820.
 - 33) Shoji H, Miyakawa T (2020) Differential effects of stress exposure via two types of restraint apparatuses on behavior and plasma corticosterone level in inbred male BALB/cAJcl mice. *Neuropsychopharmacol Rep* 40, 73-84.
 - 34) Christiansen SH, Olesen MV, Wörtwein G, Woldbye DP (2011) Fluoxetine reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour and increases neuropeptide Y and galanin expression in mice. *Behav Brain Res* 216, 585-591.
 - 35) Sadler AM, Bailey SJ (2016) Repeated daily restraint stress induces adaptive behavioural changes in both adult and juvenile mice. *Physiol Behav* 167, 313-323.
 - 36) Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ (2008) Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor alpha agonist, propylpyrazoletriol. *Am J Obstet Gynecol* 199, e1-5.
 - 37) Roesch DM (2006) Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 87, 39-44.
 - 38) Ko SH, Jung Y (2021) Energy metabolism changes and dysregulated lipid metabolism in postmenopausal women.

- Nutrients 13, 4556.
- 39) Childs GV, Odle AK, MacNicol MC, MacNicol AM (2021) The importance of leptin to reproduction. *Endocrinology* 162, bqaa204.
 - 40) Uchishiba M, Yamamoto S, Takeda A, Arakaki R, Arata M, Noguchi H, Aoki H, Tamura K, Maeda T, Minato S, Nii M, Inui H, Kamada S, Kinouchi R, Yamamoto Y, Yoshida K, Yagi S, Kato T, Kaji T, Nishimura M, Ino K, Iwasa T (2024) Progesterone treatment reduces food intake and body weight in ovariectomized female rats. *Steroids* 203, 109367.
 - 41) 松村譲児, 多久和陽 (2017) カラー図解 人体の正常構造と機能. 第3版, 坂井建雄, 河原克雅, 日本医事新報社, 東京, 564-569.
 - 42) Gameiro GH, Gameiro PH, Andrade Ada S, Pereira LF, Arthuri MT, Marcondes FK, Veiga MC (2006) Nociception and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav* 87, 643-649.
 - 43) Gameiro GH, Andrade Ada S, de Castro M, Pereira LF, Tambeli CH, Veiga MC (2005) The effects of restraint stress on nociceptive responses induced by formalin injected in rat's TMJ. *Pharmacol Biochem Behav* 82, 338-344.
 - 44) Li JH, Zhao SJ, Guo Y, Chen F, Traub RJ, Wei F, Cao DY (2024) Chronic stress induces wide-spread hyperalgesia: The involvement of spinal CCK1 receptors. *Neuropharmacology* 258, 110067.
 - 45) Martí O, Armario A (1998) Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int J Dev Neurosci* 16, 241-260.
 - 46) Ge F, Yang H, Lu W, Shi H, Chen Q, Luo Y, Liu L, Yan J (2020) Ovariectomy induces microglial cell activation and inflammatory response in rat prefrontal cortices to accelerate the chronic unpredictable stress-mediated anxiety and depression. *Biomed Res Int* 2020, 3609758.
 - 47) Larco DO, Cruthirds DF, Weiser MJ, Handa RJ, Wu TJ (2012) The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat. *Endocrine* 42, 717-725.
 - 48) Satoh M, Kuraishi Y, Kawamura M (1992) Effects of intrathecal antibodies to substance P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia: comparison with carrageenan-induced hyperalgesia. *Pain* 49, 273-278.
 - 49) Quintero L, Moreno M, Avila C, Arcaya J, Maixner W, Suarez-Roca H (2000) Long-lasting delayed hyperalgesia after subchronic swim stress. *Pharmacol Biochem Behav* 67, 449-458.
 - 50) Seol SH, Chung G (2022) Estrogen-dependent regulation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) and P2X purinoceptor 3 (P2X3): Implication in burning mouth syndrome. *J Dent Sci* 17, 8-13.
 - 51) Yu LH, Li N, Liu CY, Ma B (2011) Estrogen altered facial mechanical pain threshold and trigeminal P2X3 receptor expression. *Neuro Endocrinol Lett* 32, 811-815.
 - 52) Chaban VV, Mayer EA, Ennes HS, Micevych PE (2003) Estradiol inhibits atp-induced intracellular calcium concentration increase in dorsal root ganglia neurons. *Neuroscience* 118, 941-948.

歯髄炎に起因した顔面部異所性疼痛に対する三叉神経節内 Nav1.7 阻害の有効性

北 條 泰^{1,2} 坪 井 美 行^{1,2} 須 永 美 希^{1,3} 海 津 彰 弘¹ 篠 田 雅 路^{1,2}¹ 日本大学歯学部生理学講座² 日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野³ 日本歯科大学附属病院 総合診療科 2

要旨

【目的】歯髄炎によって口腔顔面領域に異所性疼痛が発症することが知られている。このような異所性疼痛の発症メカニズムは不明な点が多く、有効な治療薬が存在しない。本研究では、露髄による歯髄炎によって口髭部に機械アロディニアが発症する顔面部異所性疼痛モデルラットを用いて、顔面部異所性疼痛に対する三叉神経節（TG）への電位依存性ナトリウムチャンネル1.7（Nav1.7）阻害薬投与の鎮痛効果を検討することを目的とした。

【方法】全身麻酔下にて、右上顎第一臼歯と第二臼歯を露髄させることにより歯髄炎を発症させた。エナメル質の表面のわずかな切削を sham 処置とした。露髄または sham 処置 1 時間前、処置後 1, 3, 4 および 5 日目、右側の口髭部皮膚への機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値（HWT）を測定した。露髄または sham 処置後 3 日目および 4 日目の HWT 測定後、Nav1.7 選択的阻害薬である DS-1971a の低濃度（134 μ M）溶液、高濃度（268 μ M）溶液または 0.01M リン酸緩衝食塩水（PBS）を TG 内に 2 μ l 投与した。また、DS-1971a の HWT に対する急性効果を解析するために、露髄処置後 3 日目の HWT 測定後、134 μ M 溶液、268 μ M 溶液または PBS を TG 内へ投与し、投与 30 分、1 時間および 2 時間後に HWT を測定した。露髄処置後 5 日目、TG 内の Nav1.7 の局在を免疫組織化学的手法により同定した。

【結果】露髄処置後 3 日目より、露髄処置前と比較して口髭部への機械刺激に対する HWT に有意な低下が認められた。DS-1971a の TG 内投与開始後 1 日目より、濃度依存的に HWT 低下が有意に抑制された。DS-1971a の TG 内投与による HWT の低下抑制は、投与 30 分後から生じた。露髄処置後 5 日目、TG ニューロンに Nav1.7 が発現した。

【結論】TG に発現する Nav1.7 陽性ニューロン活動の阻害が、口髭部に生じる異所性機械アロディニアを抑制した。したがって、歯髄炎に起因した顔面部異所性疼痛に対して、TG 内 Nav1.7 阻害が奏功する可能性が示唆された。

キーワード：Nav1.7, 歯髄炎, 異所性疼痛, ラット

Efficacy of intra-trigeminal Nav1.7 inhibition for orofacial ectopic pain caused by pulpitis

Yasushi Hojo^{1,2}, Yoshiyuki Tsuboi^{1,2}, Miki Sunaga^{1,3},
Akihiro Kaizu¹, Masamichi Shinoda^{1,2}¹ Department of Physiology, Nihon University School of Dentistry² Division of Oral structural and Functional Biology, Nihon University Graduate School of Dentistry³ General Dentistry Department 2, Nippon Dental University Hospital

Abstract

【Purpose】Ectopic pain in the orofacial region is a known complication of pulpitis, yet its underlying mechanisms remain largely unclear, and effective treatments are currently lacking. This study aimed to investigate the analgesic effects of voltage-gated sodium channel 1.7 (Nav1.7) inhibition in the trigeminal ganglion (TG) using a rat model of ectopic facial pain induced by pulpitis.

【Methods】Pulpitis was induced under general anesthesia by exposing the pulp of the right maxillary first and second molars. Minimal enamel surface drilling was defined as sham treatment. Mechanical allodynia in the right whisker pad skin was assessed by head withdrawal threshold (HWT) measurements taken 1 hour before and on days 1, 3, 4, and 5 post-procedures. On days 3 and 4, following HWT assessment, selective Nav1.7 inhibitor DS-1971a (low concentration: 134 μ M; high concentration: 268 μ M) or phosphate-buffered saline (PBS) was injected (2 μ l) into the TG. Additionally, to evaluate acute effects, DS-1971a or PBS was administered on day 3, followed by HWT measurements at 30 minutes, 1 hour, and 2 hours post-injection. On day 5, immunohistochemical analysis was performed to determine Nav1.7 localization in TG.

【Results】The level of HWT dropped substantially after the third day following exposure to the pulp. Nav1.7 inhibition in the TG significantly attenuated HWT reduction in a dose-dependent manner from day 1 post-injection. The analgesic effect of DS-1971a was observed as early as 30 minutes post-injection. On day 5, immunohistochemical analysis confirmed Nav1.7 expression in TG neurons.

【Conclusion】Inhibition of Nav1.7-positive neuronal activity in the TG suppressed ectopic mechanical allodynia in the whisker pad skin. These findings suggest that Nav1.7 inhibition in the TG may serve as a potential therapeutic strategy for managing pulpitis-induced ectopic orofacial pain.

Keywords: Nav1.7, pulpitis, ectopic pain, rat

(受付: 令和 7 年 6 月 11 日)

責任著者連絡先: 坪井美行

日本大学歯学部生理学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL: 03-3219-8122

FAX: 03-3219-8341

E-mail: tsuboi.yoshiyuki@nihon-u.ac.jp

緒 言

電位依存性ナトリウムチャネル (Nav) は1つの α サブユニットと2つの β サブユニットで構成される¹⁾。 α サブユニットをコードする遺伝子の違いによって哺乳類では9種類のアイソフォーム (Nav1.1~Nav1.9) まだが同定されており、それぞれの分布および特性が異なることが報告されている¹⁻³⁾。特に、テトロドトキシン (TTX) 非感受性の Nav1.8と Nav1.9は比較的小型の感覚神経節ニューロンに発現しており、痛覚情報の伝導に関与していることが知られている^{4, 5)}。カラゲニンを用いた炎症性疼痛モデルにおける感覚神経節ニューロンでは、TTX 非感受性の Navに加え、TTX 感受性の Nav1.3や Nav1.7の発現が増加し、これに伴い TTX 感受性 Na 電流が増大することが報告されている⁶⁾。末梢神経損傷後、神経損傷を受けた側と同側の感覚神経節ニューロンにおける Nav1.8や Nav1.9の発現は低下し、Nav1.3の発現が増加する一方^{7, 8)}、反対側の感覚神経節ニューロンでは Nav1.8の発現が増加する⁹⁾。歯髄炎により、感覚神経節ニューロンの一つである三叉神経節 (TG) ニューロンにおいて Nav1.7の発現が増加し、口髭部に機械アロディニアが生じることが報告されている^{10, 11)}。これらの知見は、Nav1.7が神経障害性疼痛よりも炎症性疼痛に関与する可能性を示唆している。

近年、Nav1.7選択的阻害薬の開発が進展し、一部は臨床試験が実施されている¹²⁾。Nav1.7選択的阻害薬である DS-1971a は、坐骨神経傷害後の神経障害性疼痛に対して濃度依存的に鎮痛効果を示した¹³⁾。しかし、歯髄炎による口腔顔面領域の異所性疼痛に対する有効性については、未だ明らかではない。本研究では、歯髄開放による歯髄炎によって誘発される口髭部の機械アロディニアに対する DS-1971a の TG 内投与による閾値低下の抑制効果を評価し、歯髄炎に起因した顔面部異所性感覚異常に対する三叉神経節内 Nav1.7の役割を解明することを目的とした。

材料および方法

1. 実験動物

Sprague-Dawley 系雄性ラット (n = 54, 7 週齢, 日本エスエルシー, 浜松) を実験に用いた。明 (7 - 19時) / 暗 (19 - 7 時) サイクルの環境下で、自由に水・餌が摂取できる状態で飼育された。本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の審査・学部長の承認を得て行われた (承認番号: AP21DEN026-2)。「日本大学動物実験実施規程」に従って実験を行い、被験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

2. 歯髄炎モデルラットの作製

Sunaga ら¹¹⁾ の方法を参考にし、以下のように歯髄炎を発症させた。イソフルラン (導入 4%, 維持 2%; Mylan,

Canonsburg, PA, USA) 吸入麻酔下で、ブトルファノール (2.5 mg/kg; Meiji Seika ファルマ, 東京), メデトミジン (0.375 mg/kg; ゼノアック, 郡山), ミダゾラム (2.0 mg/kg; 丸石製薬, 大阪) を 0.9% 生理食塩水で溶解した三種混合麻酔液を腹腔内に注射し、全身麻酔を施した。低速回転させたラウンドバー (#1, 日本歯科商社, 東京) を用いて、生理食塩水を注水しながら右上顎第一臼歯と第二臼歯を露髄させた (歯髄炎群)。両臼歯のエナメル質の表面をわずかに切削した群を Sham 群とした。

3. 頭部引っ込め閾値の測定

異所性疼痛の評価として、右口髭部への機械刺激に対する頭部引っ込め閾値 (HWT) を用いた¹⁴⁾。まず、一方の端に 16 mm の穴が開いている直径 5 cm の黒く塗られたプラスチックチューブにラットが自発的に入り、穴から吻部を出す姿勢を 30 分保てるように慣れさせた。Von Frey filaments (0.4, 0.6, 1, 1.4, 2, 4, 6, 8, 10, 16, 26, 60 g, North Coast Medical, Morgan Hill, CA, USA; 45 g は自作) を用いて、露髄または sham 処置を行った右側の口髭部皮膚へ漸増的に機械刺激を行った。刺激強度が弱い順に各 von Frey filament による機械刺激を 10 秒間隔で 5 回行い、1 回でも頭部を引っ込めた最小の刺激強度を HWT とした。HWT の測定を 3 回行い、3 回の HWT の中央値を各ラットの HWT とした¹¹⁾。露髄または sham 処置 1 時間前 (Pre), 処置後 1, 3, 4 および 5 日目に HWT 測定を行った。なお、露髄または sham 処置後 3 日目および 4 日目の HWT 測定は後述の TG 内薬物投与前に行った。

4. 三叉神経節 (TG) 内投与

露髄または sham 処置 1 週間前、三種混合麻酔液にて全身麻酔を施した。ラット頭部を脳定位固定装置 (中澤製作所, 東京) で固定後、キシロカイン注射液「2%」エピレナミン (1 : 80,000) 含有 (サンド, 東京) を頭頂部皮下に 2 ml 注射し、局所麻酔を行った。メス (#10, フェザー, 大阪) にて頭頂部皮膚を切開し、頭蓋骨を露出した。カニューレ (外径 : 0.5 mm, 長さ : 9 mm) の植立の詳細は Kubo ら¹⁵⁾ や Katagiri ら¹⁶⁾ の方法を参考にした。ラムダ縫合から前方 3.1 mm, 右側 2.6 mm の位置に #1 ラウンドバーにて穴をあけ、カニューレを骨表面から深さ 9 mm まで刺入して三叉神経節 (TG) 上に設置し、歯科用レジン (ユニファストⅢ, ジーシー, 東京) にてカニューレを頭蓋骨に固定した。

露髄または sham 処置後 3 日目と 4 日目の HWT 測定後、Nav1.7 選択的阻害薬 (DS-1971a, MedChemExpress, Monmouth Junction, NJ, USA) の 134 μ M 溶液 (low-DS), 268 μ M 溶液 (high-DS) または 0.01M リン酸緩衝食塩水 (PBS) をガイドカニューレに挿入した 31G 針を用いて 10 μ l

ハミルトンシリンジ (HAMILTON, Giarmata, Romania) にて TG 内に 2 μ l 投与した。

DS-1971a の HWT に対する短期的効果を解析するために、露髄後 3 日目の HWT 測定後、low-DS, high-DS または PBS を TG 内投与し、投与 30 分、1 時間および 2 時間後に HWT を測定した。

5. 免疫組織化学染色

露髄後 5 日目に三種混合麻酔薬による全身麻酔下にて、0.9% 生理食塩水で経心的に脱血安楽死させた後、0.1% リン酸緩衝液で希釈された 4% パラホルムアルデヒド溶液 (PFA 溶液) で灌流固定した。灌流固定後に右側 TG を摘出し、24 時間 PFA 溶液に浸漬した後、凍結保護のため 0.01M PBS で希釈された 20% スクロース溶液に 12 時間浸した。その後、TG を TissueTek (サクラファインテックジャパン, 東京) に包埋し、クライオスタット (サクラファインテックジャパン) にて 12 μ m の厚さに薄切し、切片を MAS コートスライドガラス (松浪硝子工業, 東京) に貼付した。TG の切片を一次抗体である anti-SCN9A/Nav1.7 rabbit polyclonal antibody (1:50 diluted in 0.01M PBS containing 0.3% Triton X-100 and 4% normal goat serum, 20257-1-AP; Proteintech, Rosemont, IL, USA) に 4 $^{\circ}$ C で 3 日間浸漬した。その後、二次抗体である Alexa Fluor 488-conjugating donkey anti-rabbit IgG (1:200 in 0.01M PBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) に室温で 2 時間反応させた。次いで、0.01M PBS にて洗浄後に切片を封入し、BZ-9000 system (キーエンス, 大阪) を用いて Nav1.7 陽性 TG ニューロンを観察した。

6. 統計学的解析

測定した各群における HWT が、正規性を満たしていないことを Shapiro-Wilk test を用いて確認し、各群のデータを箱ひげ図で示した。箱ひげ図は中央値、第一四分位数 (Q1)、第三四分位数 (Q3) を示し、lower whisker は Q1 から最小値までを示し、upper whisker は Q3 から最大値を示す。また、個々の測定値を箱ひげ図にプロットした。箱ひげ図は GraphPad Prism (version 9.5.1, GraphPad Prism Software, San Diego, CA, USA) で作成した。統計学的解析に SigmaPlot version 14.0 (Systat Software, Palo Alto, CA, USA) を用い、有意差検定には Kruskal-Wallis 検定にて群間比較を行い、その後 Dunn の多重比較検定を適用した。有意水準は $\alpha = 0.05$ とした。

結 果

1. 歯髄炎発症後の口髭部皮膚 HWT の変化と Nav1.7 選択的阻害の影響

歯髄炎発症後 3, 4, 5 日目、同側の口髭部皮膚への機

械刺激に対する HWT は歯髄炎発症前と比較して有意に低下した (図 1)。露髄または sham 処置後 4 日目および 5 日目において、high-DS 投与歯髄炎群の HWT は PBS 投与歯髄炎群と比較して有意に上昇し、high-DS 投与歯髄炎群の HWT は low-DS 投与歯髄炎群と比較して有意に高かった (中央値 [25% 値, 75% 値] で示す。Day 4, high-DS 投与 Sham 群: 45 g [45 g, 45 g], $n = 8$; low-DS 投与歯髄炎群: 6 g [6 g, 10 g], $n = 10$; high-DS 投与歯髄炎群: 10 g [10 g, 15 g], $n = 11$; PBS 投与歯髄炎群: 1 g [0.4 g, 6 g], $n = 11$; Day 5, high-DS 投与 Sham 群: 45 g [45 g, 45 g], $n = 8$; low-DS 投与歯髄炎群: 10 g [9.5 g, 11.25 g], $n = 10$; high-DS 投与歯髄炎群: 26 g [15 g, 26 g], $n = 11$; PBS 投与歯髄炎群: 0.6 g [0.4 g, 4.0 g], $n = 11$)。high-DS 投与 Sham 群では、HWT の変化はなかった。

2. 歯髄炎発症後の HWT 低下に対する Nav1.7 選択的阻害の短期的効果

歯髄炎発症後 3 日目、同側の口髭部皮膚への機械刺激に対する HWT の有意な低下を認めた。そこで口髭部皮膚 HWT 低下に対する Nav1.7 選択的阻害の短期的効果を解析するために、歯髄炎発症後 3 日目、low-DS, high-DS または PBS の TG 内投与 30 分後、1 時間後および 2 時間後、HWT を測定した (図 2)。PBS の TG 内投与と比較して high-DS の TG 内投与 30 分後、1 時間後および 2 時間後の HWT は有意に上昇した。さらに、high-DS の TG 内投与 30 分後、1 時間後および 2 時間後の HWT は、low-DS の TG 内投与と比較して有意に高かった (30 分後, low-DS 投与歯髄炎群: 10 g [10 g, 15 g], $n = 8$; high-DS 投与歯髄炎群: 26 g [26 g, 45 g], $n = 8$; PBS 投与歯髄炎群: 4.0 g [2.5 g, 4.0 g], $n = 8$; 1 時間後, low-DS 投与歯髄炎群: 10 g [10 g, 15 g], $n = 8$; high-DS 投与歯髄炎群: 45 g [30.75 g, 45 g], $n = 8$; PBS 投与歯髄炎群: 4.0 g [2.0 g, 4.0 g], $n = 8$). 2 時間後, low-DS 投与歯髄炎群: 15 g [10 g, 15 g], $n = 8$; high-DS 投与歯髄炎群: 45 g [45 g, 45 g], $n = 8$; PBS 投与歯髄炎群: 4.0 g [2.0 g, 4.0 g], $n = 8$)。

3. 歯髄炎発症後の TG における Nav1.7 陽性ニューロン

歯髄炎発症後 5 日目、歯髄炎が発症した歯の同側 TG に Nav1.7 陽性ニューロンが発現した (図 3)。

考 察

本研究では、歯髄炎発症後 3 日目より口髭部皮膚への機械刺激に対する HWT の低下が認められた。同様のモデル動物を用いた先行研究においても、同様の結果が報告されている¹¹⁾。露髄後、歯冠部歯髄において好中球の浸潤を伴う歯髄炎が発症し、同側の口髭部を支配する TG ニューロンの細胞体周囲に存在するマクロファージ数が増加したと報告された¹¹⁾。さらに、TG にマクロファージ枯渇剤を投

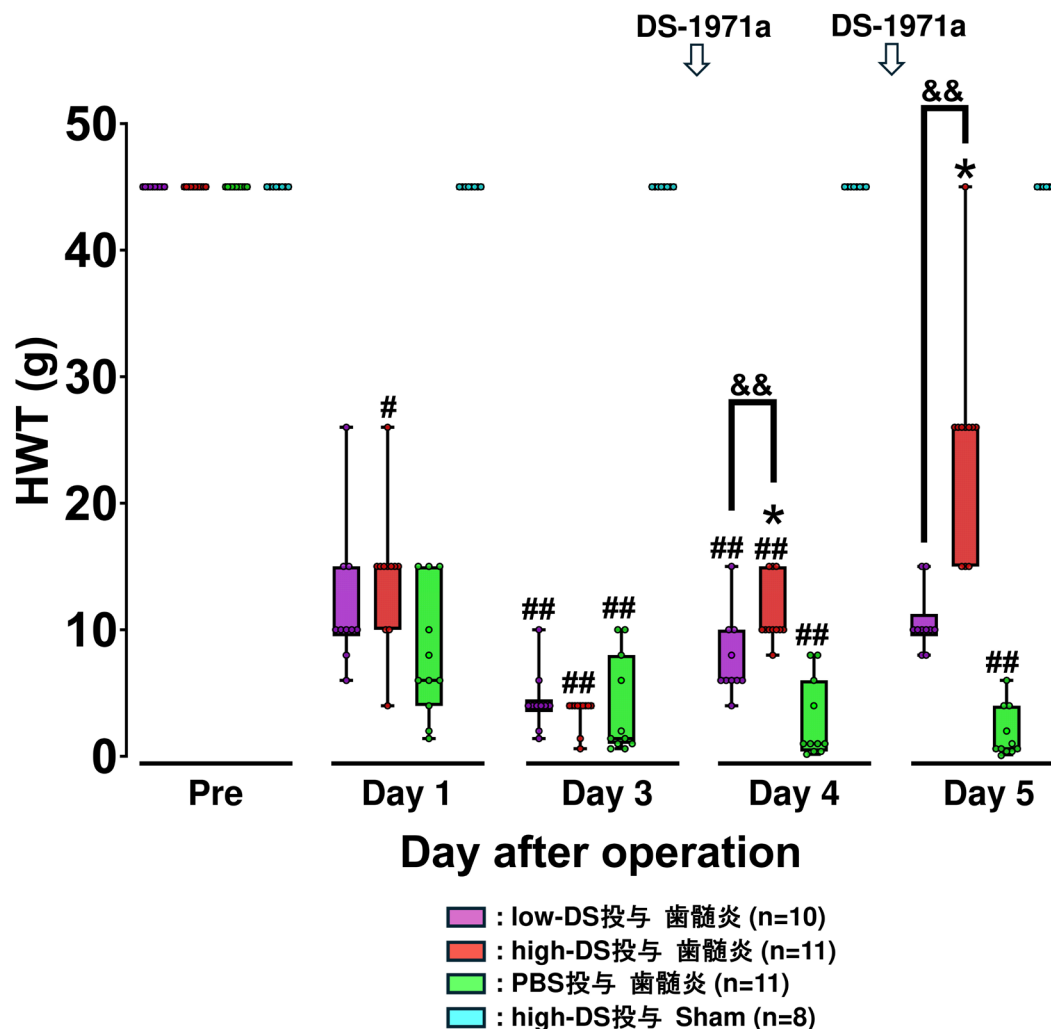


図1 歯髄炎発症後の口髭部 HWT の変化と TG 内 DS-1971a 投与の影響。↓ は DS-1971a 投与のタイミングを示す。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HWT on Pre. && $p < 0.01$ low-DS vs. high-DS. * $p < 0.05$ vs. PBS 投与歯髄炎群の HWT。

与することで、口髭部への機械刺激に対する HWT 低下が抑制されることを示した。また、口髭部を支配する Nav1.7陽性 TG ニューロン数の増加および TG ニューロンの細胞体周囲におけるマクロファージ数の増加が抑制されたことから、マクロファージの活性化が HWT 低下に関与している可能性が示唆される¹¹⁾。

Nav1.7は侵害受容ニューロンに発現し、活動電位の発生に必須のイオンチャネルであり、Nav1.7の機能変化は侵害受容機構の変調を惹き起こし、異常疼痛発症に関与することが知られている^{17, 18)}。本研究において、歯髄炎発症側と同側 TG に Nav1.7陽性ニューロンの発現が確認され、TG への Nav1.7阻害薬投与は歯髄炎発症後の口髭部への機械刺激に対する HWT 低下を濃度依存的に抑制した。さらに、TG への Nav1.7阻害薬投与による口髭部皮膚の HWT 低下抑制は2時間以上持続した。この結果は、TG における Nav1.7阻害は歯髄炎により惹き起こされる異所性疼痛の抑制効果が高いことを強く示唆している。口腔顔面領域

においては、歯髄炎発症後 TG において phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) や Nav1.7 発現の増加が認められたと報告している¹⁰⁾。Nav1.7を強制発現させた培養細胞を用いた研究において、pERK の存在下では Nav1.7リン酸化が促進され、Nav1.7の興奮性を増強することを示した¹⁹⁾。本研究において、観察された口髭部皮膚の異所性疼痛に対する TG におけるマクロファージや pERK の関与は不明であるが、歯髄炎発症後に TG への活性化マクロファージ浸潤や ERK リン酸化を介した口髭部投射 TG ニューロンにおける Nav1.7のリン酸化が亢進したことにより、口髭部の異所性疼痛が惹き起こされたのかもしれない。今後、Nav1.7のリン酸化がもたらす病態生理学的意義について、さらなる検討が必要である。

近年、多くの基礎研究および臨床研究において Nav1.7 阻害薬による鎮痛効果が評価されている¹²⁾。しかし、両者の対象には乖離が見られる。基礎研究では、若齢の雄げっ歯類が主な対象とされており、臨床研究における患者集団

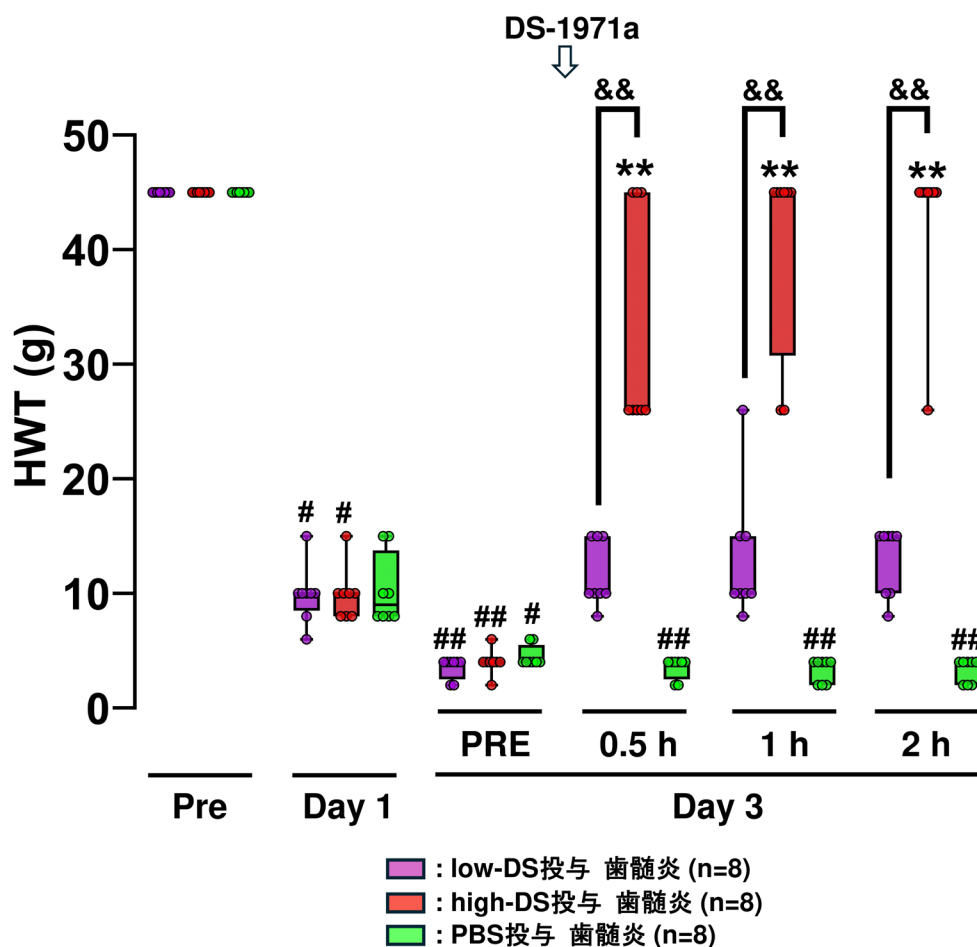


図2 DS-1971aのTG内投与によるHWTの短期的変化。↓はTG内DS-1971a投与のタイミングを示す。# $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. HWT on Pre. ** $p < 0.01$ vs. PBS投与歯髄炎群HW。&& $p < 0.01$ low-DS vs. high-DS。

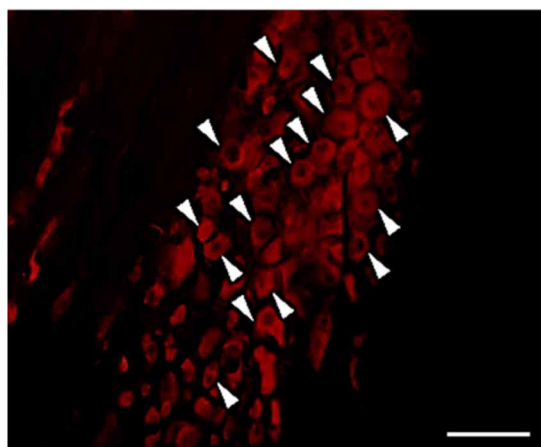


図3 歯髄炎発症側と同側のTGにおけるNav1.7陽性ニューロンの発現。矢頭：Nav1.7陽性ニューロン。スケールバー：50 μm

とは整合性を欠いている。さらに、Nav1.7阻害薬の鎮痛効果に関する研究において、基礎研究では約40%が炎症性疼痛に対する評価、臨床研究では約90%が神経障害性疼痛患者に対する評価であった。このような乖離は、基礎研

究で見出された侵害情報伝達機構におけるNav1.7の役割に関する新たな知見が、臨床応用に結びつかない可能性がある。実際、神経障害性疼痛モデル動物を用いた研究では、神経傷害後のNav1.7メッセンジャーRNAレベルの低下が報告されており、Nav1.7が神経障害性疼痛の発症に重要ではないことが示唆されている^{20, 21)}。また、本研究で使用するDS-1971aの経口投与は、雄マウスの坐骨神経傷害後の神経障害性疼痛に対して濃度依存的に鎮痛効果が認められている¹³⁾。本研究においても、雄性ラットのみ用いたが、今後は性差を加味した研究が必要となると考えられる。さらに、臨床応用に繋げるために、薬物投与方法もより簡便な方法を試す必要があると考えられる。

結 論

露髄による歯髄炎発症後に生じる口髭部への機械アロディニアに対するNav1.7陽性TGニューロンの役割について、行動薬理学的および免疫組織化学的手法を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. 歯髄炎によって口髭部への機械刺激に対するHWTは

有意に低下した。

2. 歯髄炎による口髭部の HWT 低下は, TG への DS-1971a 投与により抑制された。その HWT 低下の抑制効果は濃度依存的であった。
3. TG への DS-1971a 投与30分後から口髭部の HWT 低下が抑制された。その HWT 低下の抑制効果は濃度依存的であった。
4. 歯髄炎が発症した歯の同側 TG に Nav1.7陽性ニューロンが発現した。

以上より, TG に発現する Nav1.7陽性ニューロン活動の阻害が, 口髭部に生じる異所性機械アロディニアを抑制した。したがって, 歯髄炎による口髭部の機械アロディニアは, TG 内 Nav1.7阻害により抑制できる可能性が示唆された。

本論文作成にあたり, 的確な助言を頂いた日本大学歯学部生理学講座の皆様と丁寧な動物飼育管理を行っていただいた三協ラボサービスの方々に深く感謝いたします。

本研究は JSPS 科研費 (基盤研究 (C) 20K07746) および令和 4 年度日本大学歯学部総合歯学研究所研究費 (B, # 3) の助成を受けて行われた。

本論文に関して, 開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Goldin AL (1999) Diversity of mammalian voltage-gated sodium channels. *Ann N Y Acad Sci* 868, 38-50.
- 2) Wood JN, Baker M (2001) Voltage-gated sodium channels. *Curr Opin Pharmacol* 1, 17-21.
- 3) Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG (2005) International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev* 57, 397-409.
- 4) Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG (2001) Contribution of Na (v) 1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons. *J Neurophysiol* 86, 629-640.
- 5) Eriksson J, Fried K (2003) Expression of the sodium channel transcripts Na (v) 1.8 and Na (v) 1.9 in injured dorsal root ganglion neurons of interferon-gamma or interferon-gamma receptor deficient mice. *Neurosci Lett* 338, 242-246.
- 6) Black JA, Liu S, Tanaka M, Cummins TR, Waxman SG (2004) Changes in the expression of tetrodotoxin-sensitive sodium channels within dorsal root ganglia neurons in inflammatory pain. *Pain* 108, 237-247.
- 7) Black JA, Cummins TR, Plumpton C, Chen YH, Hormuzdiar W, Clare JJ, Waxman SG (1999) Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central, nerve injury in DRG neurons. *J Neurophysiol* 82, 2776-2785.
- 8) Decosterd I, Ji RR, Abdi S, Tate S, Woolf CJ (2002) The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v) 1.8 and Na (v) 1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. *Pain* 96, 269-277.
- 9) Gold MS, Weinreich D, Kim CS, Wang R, Treanor J, Porreca F, Lai J (2003) Redistribution of Na (V) 1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J Neurosci* 23, 158-166.
- 10) Sun S, Sun J, Jiang W, Wang W, Ni L. (2019) Nav1.7 via promotion of ERK in the trigeminal ganglion plays an important role in the induction of pulpitis inflammatory pain. *Biomed Res Int* 2019, 6973932.
- 11) Sunaga M, Tsuboi Y, Kaizu A, Shinoda M (2024) Role of macrophages in trigeminal ganglia in ectopic orofacial pain associated with pulpitis. *J Oral Biosci* 66, 145-150.
- 12) Yang J, Xie YF, Smith R, Ratté S, Prescott SA (2025) Discordance between preclinical and clinical testing of Nav1.7-selective inhibitors for pain. *Pain* 166, 481-501.
- 13) Shinozuka T, Kobayashi H, Suzuki S, Tanaka K, Karanjule N, Hayashi N, Tsuda T, Tokumaru E, Inoue M, Ueda K, Kimoto H, Domon Y, Takahashi S, Kubota K, Yokoyama T, Shimizugawa A, Koishi R, Fujiwara C, Asano D, Sakakura T, Takasuna K, Abe Y, Watanabe T, Kitano Y (2020) Discovery of DS-1971a, a potent, selective Nav1.7 inhibitor. *J Med Chem* 63, 10204-10220.
- 14) Tsuboi Y, Iwata K, Dostrovsky JO, Chiang CY, Sessle BJ, Hu JW (2011) Modulation of astroglial glutamine synthetase activity affects nociceptive behaviour and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. *Eur J Neurosci* 34, 292-302.
- 15) Kubo A, Shinoda M, Katagiri A, Takeda M, Suzuki T, Asaka J, Yeomans DC, Iwata K (2017) Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury through vasopressin-1A receptors of the rat trigeminal ganglia. *Pain* 158, 649-659.
- 16) Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K (2012) Satellite glial cell P2Y12 receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats. *Mol Pain* 8, 23.
- 17) Dib-Hajj SD, Rush AM, Cummins TR, Hisama FM, Novella S, Tyrrell L, Marshall L, Waxman SG (2005) Gain-of-function mutation in Nav1.7 in familial erythromelalgia induces bursting of sensory neurons. *Brain* 128, 1847-1854.
- 18) Deng L, Dourado M, Reese RM, Huang K, Shields SD, Stark KL, Maksymetz J, Lin H, Kaminker JS, Jung M, Foreman O, Tao J, Ngu H, Joseph V, Roose-Girma M, Tam L, Lardell S, Orrhult LS, Karila P, Allard J, Hackos DH (2023) Nav1.7 is essential for nociceptor action potentials in the mouse in a manner independent of endogenous opioids. *Neuron* 111, 2642-2659.
- 19) Stamboulian S, Choi JS, Ahn HS, Chang YW, Tyrrell L, Black JA, Waxman SG, Dib-Hajj SD (2010) ERK1/2 mitogen-activated protein kinase phosphorylates sodium channel Na(v) 1.7 and alters its gating properties. *J Neurosci* 30, 1637-1647.
- 20) Cummins TR, Waxman SG (1997) Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 17, 3503-3514.
- 21) Kim CH, Oh Y, Chung JM, Chung K (2002) Changes in three subtypes of tetrodotoxin sensitive sodium channel expression in the axotomized dorsal root ganglion in the rat. *Neurosci Lett* 323, 125-128.

第 77 回 日本大学歯学会総会・学術大会

期日 令和 7 年 5 月 18 日(日)

会場 日本大学歯学部 創設百周年記念講堂

《特別講演》

難治性根尖性歯周疾患へのマクロとミクロのアプローチ

武市 収 日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座

根尖性歯周疾患は口腔内常在菌によって発症すると考えられている。そのため、治療法のポイントは根管内に感染した細菌を徹底的に除去し、その状態を維持することにある。しかし、根管治療を繰り返しても治癒せず難治化する症例や、根管治療が終了したにも関わらず再発する症例も多く、根尖性歯周疾患の治療は簡単ではない。

リーマーやファイルを使用した根管治療はゴールドスタンダードであるが、ニッケルチタンロータリーファイルは複雑な根管系に対する機械切削を実現し、根管形成の能率化を図ることを可能にした。また、mineral trioxide aggregate (MTA) に代表される歯内治療に関連した様々な材料や機器が開発され、歯内治療は大きな進化を遂げつつ、今なお進化を続けている。中でも、マイクロスコープやコーンビーム CT を応用した検査や治療法はとても有用で、歯内治療の成功率向上に大きく寄与し、要抜去と判断された歯であっても保存するに至った症例も少なくない。これらの機器を使用することで、手探りの根管治療を回避し、「エンドの可視化」を可能とした。

難治性根尖性歯周疾患の発症には細菌感染と複雑な根管系が関係しているのは周知の事実であるが、それ以外の要因としてヒトヘルペスウイルスの関与が考えられる。特に、Epstein-Barr ウイルス (EBV) はバーキットリンパ腫などの悪性腫瘍やシェーグレン症候群などの自己免疫疾患発症に関与し、炎症や骨吸収を促すことなどが知られている。

我々はこれまで、根尖病変中に EBV が潜伏感染しており、難治性根尖性歯周疾患関連細菌が産生する酪酸の関与で EBV が再活性化することや、再活性化した EBV が骨吸収関連サイトカインの発現を誘導することなどを明らかにした。すなわち、細菌感染で生じると考えられていた根尖性歯周疾患には、ウイルス感染が大きく関わっている可能性が示唆され、根尖性歯周疾患に関するこれまでの常識を覆すこととなった。本講演では、難治性根尖性歯周疾患に対する歯内治療の実際と EBV に関するこれまでの研究成果について解説したい。

《一般講演》

1. 喫煙が ELOVL2 のメチル化に及ぼす影響—初代培養口腔粘膜線維芽細胞を用いた解析

○西澤英里佳^{1,2}, 小方彩乃^{3,4}, 古川明彦^{2,5}, 岡野雅春^{3,4}, 生木俊輔^{2,5}, 近藤真啓^{3,4}, 米原啓之²

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部口腔外科学第Ⅱ講座²

日本大学歯学部法医学講座³

日本大学大学院総合歯学研究所 社会歯学研究部門⁴

日本大学大学院総合歯学研究所 生体防御部門⁵

目的

加齢や生活習慣、疾患などの要因は、種々の遺伝子の CpG メチル化を変化させる。最近、長鎖脂肪酸伸長酵素をコードする ELOVL2 のメチル化が、年齢（加齢）と強い相関を示すことが明らかにされ注目を集めている。一方喫煙習慣は老化を促進させると考えられているが、喫煙がこのような年齢依存的なメチル化変化を示す遺伝子の CpG に及ぼす影響は明らかにされていない。そこで、両者の関連性を解析するための手段としてヒト口腔粘膜線維芽細胞 (HOMF) の初代培養実験系を立ち上げ、本研究ではニコチン刺激および酸化ストレスが ELOVL2 のメチル化に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

HOMF を 10%FBS 加 DMEM 培養液にて、5%CO₂, 37℃ 条件下で継代培養を行った。継代 11 回 (P11) および 34 回 (P34) の HOMF に 100 µg/ml ニコチンまたは 100 µM 過酸化水素を添加し、3 日間培養を継続した。その後、NucleoSpin Tissue Kit を用いてゲノム DNA を抽出し、バイサルファイト処理を実施した。そして、リアルタイムメチル化特異的 PCR を行い、ELOVL2 のメチル化率を算出した。また、Cellular Senescence Detection Kit を用いて、各群の老化状態を解析した。

成績および考察

ELOVL2 のメチル化が、HOMF の継代回数に伴い増加することを確認した。P11 HOMF へのニコチンまたは過酸化水素の添加は、ELOVL2 のメチル化率に影響を与えなかった。一方、過酸化水素を添加した P34 HOMF における ELOVL2 のメチル化率は、対照群と比べて高値を示した。また、ニコチンあるいは過酸化水素を添加した P34 HOMF では、senescence-associated β-galactosidase 活性が対照群と比べて増加傾向を示した。以上の結果から、酸化ストレスは細胞の老化を促進させ、ELOVL2 のメチル化状態を変化させる可能性が示唆された。

2. 肋軟骨由来軟骨細胞を用いた顎骨欠損の修復

○西川昂佑^{1,2}, 二宮 禎^{3,4}, 髭内美穂^{2,5}, 生木俊輔^{2,5},
高橋富久^{3,4}, 米原啓之^{2,5}

日本大学大学院歯学研究科歯科学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部口腔外科学第Ⅱ講座²

日本大学歯学部解剖学第Ⅰ講座³

日本大学歯学部総合歯学研究 機能形態学部門⁴

日本大学歯学部総合歯学研究 生体防御部門⁵

目的

顎骨欠損や歯槽骨欠損の再建では、自家骨を移植することで良好な予後が得られるが、自家骨は採取できる骨量が制限される。これまでに、軟骨片を骨欠損部に移植することで骨再生が得られており、また培養軟骨細胞を用いることで必要量が確保できるため、軟骨を用いた骨欠損治療が期待されている。本研究では、新たな骨再生法を開発するため、ラットの肋軟骨から採取した軟骨細胞の顎骨欠損部修復能について検討した。

材料および方法

深麻酔下で5週齢雄性 Wistar ラットから肋軟骨を摘出し、酵素処理によって軟骨細胞を採取した。同時に、頭頂骨から骨芽細胞を採取した。培養後、細胞から RNA を抽出して、qPCR によって、aggrecan (AGN), typeII collagen (Col II), および typeX collagen (Col X) の遺伝子発現を調べた。また、免疫染色によって、それぞれの細胞における AGN と Col II の発現を比較した。移植実験では、下顎骨に 4 mm 径の骨欠損を作製し、培養した軟骨細胞をスキャホールド (PCL) とともに自家移植 (CPCL 群) した。移植後、7 日ごとにマイクロ CT で骨欠損部を撮影し、非移植群 (control 群) と細胞を含まない PCL 移植群 (PCL 群) を比較した。

結果および考察

採取した軟骨細胞は骨芽細胞よりも AGN, Col II, および Col X の発現が高いことが示された。また、免疫染色からも、軟骨細胞に AGN と Col II の発現が認められた。CPCL 群と control 群では、移植 2 週目に骨欠損部辺縁に硬組織形成が認められた。移植 3 週目になると、CPCL 群に硬組織が広範囲に形成され、control 群や PCL 群よりも骨欠損修復が促進した。以上の結果から、ラット肋軟骨細胞の移植は、顎骨欠損治療に有用であることが示唆された。

3. 三叉神経痛発症に対する三叉神経節における好中球の役割

○Zhou Yue^{1,2}, 人見涼露^{2,3}, 岩田幸一^{2,3}, 篠田雅路^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯科学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部生理学講座²

日本大学歯学部総合歯学研究 機能形態部門³

目的

三叉神経痛は、激しい顔面痛発作を惹起する神経障害性疼痛の一つである。周囲の血管による三叉神経根の圧迫が主な病因であると考えられているが、その詳細なメカニズムは不明である。本研究では、三叉神経根を持続的に圧迫することで作製した三叉神経痛モデルラットを用いて、三叉神経痛発症に対する三叉神経節における好中球の役割を検討した。

方法

雄性 SD ラットの左側三叉神経根をガラス管で持続的に圧迫する群を TNC 群、圧迫しない群を Sham 群とした。TNC または sham 処置後、口髭部皮膚への機械刺激に対する逃避閾値 (MHWT) を測定した。Activating transcription factor 3 (ATF-3) 免疫組織化学的染色により三叉神経節 (TG) ニューロンの損傷を評価した。また、処置後 7 日目、三叉神経根における好中球エラスターゼ (ELA2) 陽性細胞数と TG における ELA2 と ELA2 受容体である protease-activated receptor-2 (PAR2) の局在を免疫組織化学的に解析し、western blotting 法にて TG の ELA2 量を測定した。また、ELA2 拮抗薬 (Sivelestat) および PAR2 拮抗薬 (FSLRLY-NH2) を TG 内に処置後 7 日目まで持続投与し、処置後 3, 5, 7 日目に MHWT を測定した。

結果

処置後 3 日目より TNC 群の MHWT は低下した。処置後 3, 7 日目において、TNC 群では ATF-3 陽性 TG ニューロンが認められた。処置後 7 日目、TNC 群において三叉神経根の ELA2 陽性好中球数が増加し、TG の ELA2 発現量も増加した。PAR2 は両群の TG ニューロンに発現した。また、Sivelestat および FSLRLY-NH2 の TG 内持続投与により、TNC による MHWT の低下が抑制された。

考察

TNC による TG ニューロンの損傷後、TG に集積した好中球からの ELA2 分泌が増加し、その ELA2 が TG ニューロンの PAR2 に作用することで口腔顔面部に機械アロディニアが発症する可能性が示された。

4. 未切削エナメル質への歯面処理剤の使用がユニバーサルアドヒーズブ応用型 2 ステップ接着システムの初期接着性に及ぼす影響

○武藤 玲^{1,2}, 庄司元音², 須田駿一^{2,3}, 柴崎 翔^{2,3},
石井 亮^{2,3}, 黒川弘康^{2,3}, 陸田明智^{2,3}, 高見澤俊樹^{2,3},
宮崎真至^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科保存学第 I 講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 生体工学研究部門³

目的

近年、ユニバーサルアドヒーズブをプライマーとして用いる 2 ステップ接着システムが臨床使用されている。しかし、ユニバーサルアドヒーズブ応用型 2 ステップ接着システムの未切削エナメル質への接着性について、異なるエッチング剤を使用した際の接着性については不明点が多い。そこで、異なるエッチング剤を用いた際の接着強さ、エナメル質処理面の表面自由エネルギー測定とともに走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察することで検討を加えた。

材料および方法

接着システムとして、ユニバーサルアドヒーズブ応用型 2 ステップ接着システムの G2 Bond Universal (GC) を使用した。対照として、ユニバーサルアドヒーズブの Scotchbond Universal Plus Adhesive (Solventum) および 2 ステップ接着システムの OptiBond eXtra (Kerr) を用いた。また、エッチング剤として 35% リン酸エッチング剤の UltraEtch (UE, Ultradent Products), 接着性リン酸モノマーを含有した Multi Etchant (ME, YAMAKIN) および有機酸を含有した Enamel Conditioner (EC, 松風) を用いた。接着試験に際しては、歯冠部中央が平坦なヒト抜去上顎前歯を用いた。唇側エナメル質を SiC ペーパーの #320 まで研削を行ったものと、未切削なエナメル質とを、それぞれ被着面とした。アドヒーズブの塗布条件としては、エッチ&リンスモードおよびセルフエッチングモードの 2 条件とした。次いで、ISO 29022 に準じて接着試験用試片を製作し、24 時間後に剪断接着強さを測定した。さらに、通法に従って、エナメル質処理面の SEM 観察を行った。

結果および考察

いずれの条件においても切削エナメル質は、未切削条件に比較して接着強さが高くなる傾向を示した。切削・未切削エナメル質にかかわらず、いずれの接着システムにおいても UE は他のエッチング剤に比較して高い値を示した。EC の切削エナメル質では、UE と同等の接着強さを 2 ステップシステムでは示したが、未切削エナメル質では UE に比較して有意に低い値を示した。ME は、いずれの条件にかかわらず他のエッチング剤に比較して低い値を示した。これらの成績は、SEM 像の観察とも一致するものであった。

5. 異なる混和条件によるバイオセラミックス系シーラーの骨芽細胞における石灰化および生体親和性への影響

○岡野真之^{1,2}, 安川拓也^{2,3}, 田邊奈津子⁴, 津田啓方⁴,
林 誠^{2,3}, 武市 収^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科保存学第 II 講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門³

日本大学歯学部生化学講座⁴

目的

近年、歯内療法領域においてバイオセラミックスを含む歯科材料が臨床応用されており、そのなかでもバイオセラミックス系シーラーの普及は著しい。MTA マルチシーラー (クラーク) およびニシカキャナルシーラー BG multi (日本歯科薬品) は広く臨床で使用されており、2 つのシーラーの特徴として付属する粉末成分の量を調整することで、クリーム状やパテ状など性状を変えることが可能であるが、その比率の変化による骨芽細胞への影響は明らかにされていない。本研究の目的は、異なる混和比で作成した試料が骨芽細胞にどのような影響を与えるかを明らかにすることである。

材料および方法

被験試料は MTA マルチシーラー (以下、MMS) とニシカキャナルシーラー BG multi (以下、NBG) で、対照試料として ProRoot MTA (Dentsply Sirona) を用いた。また、使用細胞はマウス頭蓋冠由来株化骨芽細胞である MC3T3-E1 細胞を用いた。

MMS は粉液比 1:1 および 2:1 の条件にて混和、NBG はペースト / パウダー重量比 10:0 および 10:6 の条件にて混和した。ProRoot MTA は製造者の指示通りに混和した。これらの混和物を直径 9 mm, 厚さ 3 mm の型枠に填入し、37℃, 相対湿度 100%, 5%CO₂ の条件下で 24 時間静置し硬化させ、 α -minimum essential medium (α -MEM) 中に 3 日間浸漬した。その後、MC3T3-E1 細胞を播種した細胞培養用プレート上の cell culture insert に被験試料を静置し、試料を設置しないものを陰性コントロールとした。

実験 1. 被験試料の骨芽細胞に対する生体親和性について、Cell counting kit-8 (同仁化学) を用いて 1, 2 および 3 日目の細胞数を測定した。

実験 2. 本実験条件における被験材料より遊離する Ca²⁺ 濃度を Calcium E-test Wako (和光純薬) を用いて 7 日目まで測定した。

実験 3. 本実験条件における ALP 活性を QuantiChrom Alkaline Phosphatase Assay Kit (Funakoshi) を用いて 7 日目まで測定した。

結果および考察

MMS は ProRoot MTA と同程度の Ca²⁺ を放出し、陰性コントロールと同程度の細胞数および ALP 活性の増加を認めたことから、MMS は混和条件に関わらず骨芽細胞の増殖に影響が少ないシーラーである可能性が示唆された。

6. 象牙細管封鎖を促すハイドロキシアパタイト様結晶の生成：均一二相性リン酸カルシウムセメント（Biphasic Calcium Phosphate Cement）の新規応用

○井上聖也^{1,2}, 鈴木裕介^{2,3}, 林 誠^{2,3}, 武市 収^{2,3}
日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹
日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座²
日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門³

目的

均一二相性リン酸カルシウムセメント（BCPC）は、同一粒子内に α -リン酸三カルシウムおよびリン酸四カルシウムを分散させることで、効率的にハイドロキシアパタイト（HA）を生成する特性を有する。そのため、HA は象牙質面に塗布すると象牙細管の物理的封鎖、歯質の耐酸性向上や再石灰化促進効果を示すことが報告されており、BCPC の適応は高齢者の根面う蝕や象牙質知覚過敏症に対する新たな治療法となり得ると考えた。そこで本研究では、BCPC が生成する HA によるウシ抜去歯象牙細管の物理的封鎖性を走査型電子顕微鏡（SEM）により観察し、象牙質知覚過敏症抑制材としての有用性を評価することを目的とした。

材料および方法

①供試材料

Powder BCP 粉末 (Median Diam 8.2 μm) +1.5M クエン酸 3 ナトリウム
Liquid 2.5M 酸性リン酸カルシウム溶液

②牛歯試片の作製

ウシ下顎前歯歯頸部象牙質をモデルトリマー（MT 10, モリタ東京製作所）および自動研削機（Buehler Minitech, Presi）を用いて、4 × 4 × 1 mm のブロック体に調整した。その後、耐水シリコンカーバイドペーパー #800, #1,200, #2,500 の順で研磨し、超音波洗浄したものを象牙細管開口モデルとした。

③BCPC の塗布

BCPC を 10 秒混和後、30, 40, 50 秒の 3 条件で塗布。24 時間水中保管後、SEM 観察（ERA-8800FE; Elionix）を行った。

④SEM 観察

塗布面および象牙細管方向に切断した縦断面を観察し、象牙細管封鎖性を評価した。

成績および考察

BCPC の塗布により、象牙細管表面は HA 様結晶構造により覆われており、塗布条件の違いによる影響は認められなかった。縦断面観察では、象牙細管内に BCPC が浸透し、HA 様結晶構造によるタグ様構造が形成されていた。すなわち、水中保管後も BCPC がウォッシュアウトされていないことから、口腔内環境下においても安定した HA 様結晶構造の生成が可能であると考えられる。

7. FGF-2 添加コラーゲンメンブレンの歯槽堤保存術への応用

○鬼澤 崇¹, 高山忠裕^{2,3}, 磯部俊介¹, 新井嘉則^{3,4}, 佐藤秀一^{2,4}
日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹
日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座²
日本大学歯学部歯科放射線学講座³
日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門⁴

目的

近年、欠損部への歯科インプラント治療を応用する機会が多くなってきている。しかしながら、抜歯後の歯槽骨吸収により、インプラント体埋入に必要な骨の幅や高さが不足している場合が多く存在する。歯槽骨吸収を最小限に抑えるために歯槽堤保存術（alveolar ridge preservation; RP）という術式が考案される。RP では、骨移植材とバリアメンブレンが使用される。代表的なバリアメンブレンとしてコラーゲンメンブレン（collagen membranes; CM）が知られている。本研究では、ラットの上顎第一臼歯の抜歯を行い、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor; FGF-2）を CM に添加した再生ユニット（CM/FGF-2）を応用し、抜歯窩の治療に及ぼす影響について検討した。

材料と方法

雄性近交系ラット（F344/jcl）8 週齢を用い、上顎第一臼歯の抜歯を行った。抜歯のみの群を control 群とし、抜歯窩を CM で被覆した群を CM 群、CM に FGF-2 を低用量 0.5 μg 添加した群を FGF-2[L] 群、高用量 2.0 μg 添加した群を FGF-2[H] 群とし 4 群に分けた。CM を設置後、ポリプロピレン糸で縫合を行った。実験動物用 3D マイクロ CT（マイクロ CT）を用い、エックス線学的に抜歯窩治癒過程の観察と骨形態変化の計測を術後 4 週までの隔週において行った。

結果

術後 1, 2 週は control 群と比べ FGF-2[H] 群で骨増加量は顕著な増加を認めた。また、術後 4 週で頬側骨の減少量は control 群と比較して、CM 群、FGF-2[L] 群、FGF-2[H] 群で抑制された。

結論

CM/FGF-2 を抜歯窩に応用することで、術後早期における抜歯窩の治癒機転が認められ、頬側骨の吸収を抑制できることが示唆された。

8. ラット下顎角骨欠損モデルにおける BMP-2 添加コラーゲンメンブレンの骨造成に及ぼす効果

○磯部俊介¹, 高山忠裕^{2,3}, 鬼澤 崇¹, 新井嘉則³, 佐藤秀一^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科保存学第Ⅲ講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門³

目的

インプラント体埋入の際に十分な骨幅や骨の高さが不足した欠損部に対する歯科インプラント治療では骨再生誘導法を検討する必要がある。術中にスペースの確保を目的としてバリアメンブレンを使用する場合があります, その代表例としてコラーゲンメンブレン (collagen membrane; CM) が知られている。我々の研究グループでは以前より CM に生体為害性のない成長因子を添加する新規再生ユニットを考案し研究を遂行し, 歯槽骨再生量の更なる改善や歯槽骨再生に要する治癒期間短縮の必要性を探索してきた。そこで本研究では, 新たな成長因子である骨形成タンパク (bone morphogenetic protein; BMP-2) を CM に添加した再生ユニット (CM/BMP-2) を考案し, 骨に及ぼす影響についてラット下顎角骨欠損モデルを用いて検討した。

材料と方法

雄性近交系ラット (F344/jcl) 8 週齢の下顎角に, 内径 4.0 mm のトレファインバーで下顎角骨欠損モデルを作製した。欠損のみ (control 群), 欠損を CM で被覆 (CM 群), CM に BMP-2 を低用量 0.5 μ g 添加 (BMP-2[L] 群), 高用量 2.0 μ g 添加 (BMP-2[H] 群) し被覆した 4 群に分けた。実験動物用 3D マイクロ CT (マイクロ CT) によるエックス線学的観察と HE 染色による組織学的評価を, 術後 6 週において行った。

結果と考察

エックス線学的観察から, control 群, CM 群と比較し, CM/BMP-2 群で骨欠損部に骨様組織の再生を認めた。また, BMP-2[L] 群と比較した際に BMP-2[H] 群の方が欠損部に骨様組織の再生を認めた。組織学的評価では生体為害性を示す組織像は認められなかった。以上から, CM/BMP-2 群は骨造成を顕著に促すことが示唆された。

結論

CM/BMP-2 群は, control 群および CM 群と比較して, 骨欠損部に骨様組織の再生を認めたことから, 新規骨造成ユニットとして応用される可能性が考えられる。

9. 歯肉線維芽細胞の FGF-2 発現に及ぼす LIPUS 刺激の影響

○林みに彩^{1,2}, 中井久美子^{2,3}, 田中秀樹^{2,3}, 川戸貴行^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部衛生学講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態学部門³

目的

Low Intensity Pulsed Ultra Sound (LIPUS) は, 骨芽細胞の機能を賦活化することから骨折治療などに臨床応用されている。また, Fibroblast Growth Factor (FGF)-2 は成長因子の 1 つであり, 歯肉線維芽細胞が産生する FGF-2 は歯周組織のリモデリングや創傷治癒に関与することが知られている。本研究では, セルフケアに用いられる刷毛部から LIPUS を発する電動歯ブラシ (超音波歯ブラシ) の使用を想定して, 歯肉線維芽細胞 (HGnF) に LIPUS 刺激を加え, FGF-2 発現に及ぼす影響を調べた。

材料および方法

HGnF を 6-well 培養プレートに播種し, 2% ウシ胎児血清, 1% 線維芽細胞サプリメントおよび 1% 抗生物質溶液を含む培地で培養した。細胞がコンフルエントに達した時点で, オステオトロン V (伊藤超短波株式会社) の発振器を培養プレート底面にゲルを介して密着させ, 3 分間, 細胞に LIPUS 刺激を加えた。LIPUS による刺激条件は, 超音波歯ブラシ (伊藤超短波株式会社) の仕様を参照して, 出力 15 mW/cm², 周波数 1.5 MHz とした。刺激から 12 時間後に回収した細胞溶解液中の FGF-2 タンパク発現を, Western blotting 法で調べた。得られたタンパクバンドは, 画像解析ソフトを用いて半定量化した。

結果および考察

Western blotting 像において, 分子量マーカーの 15~31 KDa 付近に抗ヒト FGF-2 抗体に反応を示す複数のタンパクバンドが認められた。また, これらのタンパクバンドは, 未刺激の細胞に比べて LIPUS 刺激を受けた細胞において強く認められた。

FGF-2 には低分子量と高分子量のアイソフォームが存在し, 前者は 18 KDa, 後者は 22~34 KDa の分子量と推定されている。また, 低分子量の FGF-2 は細胞外に分泌後, 細胞膜上の受容体に結合する一方で, 高分子量の FGF-2 は核内に移行することが知られている。これらの知見と本研究の結果から, 超音波歯ブラシの使用を想定したレベルの LIPUS の刺激は, 低分子量と高分子量の両方の FGF-2 の発現を誘導し, 歯肉線維芽細胞の機能に影響を及ぼす可能性が示唆された。

10. 二次口蓋癒合時における TGF- β 3 および FGF2 の Cross-talk についての解明

○福増仁知香^{1,2}, 青木三奈², 中嶋 昭^{2,3}, 納村泰弘^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部歯科矯正学講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 臨床研究部門³

目的

Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) は、二次口蓋の正中癒合上皮 (Medial Edge Epithelium: MEE) に強い遺伝子発現を示すことが明らかとなってきた。TGF- β 3^{-/-} mouse では、MEE が上皮癒合せず口蓋裂となることが知られている。一方、Fibroblast growth factor (FGF) シグナル伝達経路もまた、口蓋の発生において重要な役割があることが明らかとなっており、FGF2 は上皮および口蓋中後部の間葉系細胞に発現している。しかし、二次口蓋癒合時における、TGF- β 3 および FGF2 のそれぞれの機能を knockdown および double knockdown した際の cross-talk については、十分に明らかとなっていない。本研究目的は、二次口蓋の organ culture により、TGF- β 3 および FGF2 の機能を siRNA 処理で single knockdown および double knockdown を行い、二次口蓋癒合時における TGF- β 3 および FGF2 との cross-talk signaling の詳細を明らかにすることである。

材料および方法

ICR (Wild type) マウスの胎生 13 日目 (E13) の二次口蓋を摘出し、二次口蓋の器官培養を行う。Control 群については control siRNA, knockdown 群については、500 nM の TGF- β 3, FGF2 の siRNA を含有した培養液にて、37℃, 5% CO₂-air atmosphere の環境下で培養を行った。培養時間は 24 時間 (E14 相当), 48 時間 (E15 相当) および 72 時間 (E16 相当: 口蓋融合期) まで Culture した。免疫染色にて E14 および E13+24h の MEE における TGF- β 3 および FGF2 の二次口蓋発現, mRNA 発現については real-time RT-PCR 法, タンパク発現については Western blot 法により発現量を比較し検討を行った。

成績および考察

Control 群では、72 時間後の二次口蓋は癒合していたが、FGF2, TGF- β 3/FGF2 の siRNA 添加群のいずれにおいても癒合遅延もしくは癒合不全を生じていた。TGF- β 3-FGF2 の Cross talk については TGF- β 3 を knockdown した際の FGF2 の発現は上昇し、siFGF2 を knockdown した場合は、TGF- β 3 の発現は有意に増加していた。したがって、二次口蓋癒合時における TGF- β 3 および FGF2 はそれぞれ発現が減少すると互いに発現を rescue する事が示唆された。

11. 接着性舌側リテーナー再接着時における大気圧プラズマ処理がボンディング材浸入性に及ぼす影響について

○栗栖有希^{1,2}, 木村浮子^{1,2}, 小泉寛恭^{4,5}, 米山隆之^{4,5}, 納村泰弘^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部歯科矯正学講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 臨床研究部門³

日本大学歯学部歯科理工学講座⁴

日本大学歯学部総合歯学研究所 生体工学研究部門⁵

目的

保定時に接着性舌側リテーナーが一部脱離した場合の再接着について、大気圧プラズマ処理が脱離した接着材と歯面との間隙に充填する接着材の浸入性に及ぼす影響を検討した。

試料および方法

試料は、耐水研磨紙 #800 まで削合研磨した牛歯エナメル質平面とコンポジットレジンブロック平面間に 50 μ m, 100 μ m, 150 μ m のテープを介在させ間隙を作り、C 型クランプで固定し作製した。プラズマ照射群には、窒素ガスプラズマ照射をその間隙に 20 秒間行った。その後、直ちにワンステップユニバーサルボンド (スコッチボンド, 3M) を間隙に塗布、浸透させ光照射を実施した。処理後の試料を 37℃ の蒸留水中に 24 時間放置後、牛歯エナメル質とコンポジットレジンとを分離した。光学顕微鏡でボンディングの間隙への浸入距離および面積を測定し、プラズマ照射群とコントロール群 (非照射群) の比較は Mann-Whitney U test で、間隙の厚さは Kruskal-Wallis 検定後 Steel-Dwass test にて多重比較を行った。

結果および考察

プラズマ照射群では、コントロール群と比較し、ボンディング材の浸入距離が最大 2.8 倍、浸入面積が最大 4.1 倍有意に増加した。また、浸入距離については、100 μ m と 150 μ m は、50 μ m と比較し有意 ($p < 0.05$) に大きかった。これらの結果から、プラズマ処理により歯質表面およびコンポジットレジンの表面が改質され、ボンディング材の浸透を促進した可能性が考えられた。

結論

本研究により、プラズマ処理は接着性舌側リテーナーの再接着時、歯面とレジンとの間に接着材を浸入させる有効な手段であることが示唆され、脱離していない装置を撤去する手間を省き、臨床現場のチェアタイム短縮に寄与する可能性を示した。今後は、異なる接着材や、ガス種によるプラズマ処理の効果についても検討する。

12. 関節リウマチが摂食嚥下障害および食生活に及ぼす影響

○小出偉貴^{1,2}, 中山測利^{1,2,3}, 阿部仁子^{1,2,3}, 米永一理^{1,2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部摂食機能療法学講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 臨床研究部門³

目的

リウマチ（RA）は、関節の疼痛や可動域制限、関節の腫れなどの症状が全身に認められ、生活の質にも影響を及ぼす。しかしながら、RA 患者における摂食嚥下障害の実態は十分に明らかになっていない。本研究では、RA 患者における摂食嚥下障害の実態と、それらが食事量や生活全般に与える影響を明らかにすることを目的とした。

方法

2024 年 9 月～12 月まで、共同研究先の医療法人慈誠会にて、RA と診断された成人患者 185 名を対象に調査を実施した。調査項目は、年齢、性別、BMI、RA 罹患期間、現在および過去の症状、食事の際に困っている症状（嚥めない、飲み込みづらい、むせる等）、食事量の変化（現在・発症前・最重症期との比較）、体重変化、運動状況、健康度、精神状態、幸福度等とした。

結果

回答者の平均年齢は 69.0 歳、罹患年数は平均 16.3 年であった。現在の食事の際に困っている症状としては、「あごが痛い」（18.1%）、「時間を要す」（16.7%）、「むせる」（12.1%）、「飲み込みづらい」（10.5%）が主に挙げられた。現在の食事量は、RA 最重症期を 100% とすると平均で 101.1%（ $P>0.05$ ）、RA 発症前を 100% とすると平均で 88.1%（ $P<0.05$ ）であった。また、現在の BMI は 22.0 kg/m^2 であり、体重は発症前と比べると平均で 1.9 kg 減少（ $P<0.05$ ）し、最重症期と比べると 0.5 kg 増加（ $P>0.05$ ）していた（いずれも対応のある t 検定）。またとくに、食事の際に困っている症状を訴える群では、食事量が減少している者が多い傾向にあった。

結論

本研究により、RA が摂食嚥下や食生活にも影響を及ぼし、食事量や体重減少に関与する可能性が示された。今後、RA 患者の摂食嚥下障害と運動状況、健康度、精神状態、幸福度等との関連性を解析し、歯科から RA に対する包括的な介入方法について検討する必要がある。

13. 5 mol% イットリア部分安定化ジルコニアの厚みがレジン系装着材料との接着耐久性に及ぼす影響

○星野恵佑^{1,2}, 窪地 慶^{2,3}, 高田宏起², 新井聡美^{1,2}, 中世大嗣^{2,3}, 小峰 太^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅲ講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門³

目的

5 mol% イットリア部分安定化ジルコニア（5Y-PSZ、以下 PSZ）の厚みが、PSZ とレジン系装着材料との接着耐久性に及ぼす影響を評価することを目的とした。

材料および方法

被着体として 2 種類の異なる厚みの PSZ 円形平板（直径 11.0 mm、厚さ 2.0 mm および 2.5 mm）と直径の異なる PSZ 円形平板（直径 8.0 mm、厚さ 2.5 mm）を用いた。すべての PSZ 被着面に対して、#600 の耐水研磨紙で注水研削後、0.2 MPa の噴射圧で 10 秒間、噴射口からの距離 10 mm でアルミナブラスト処理を行った。それぞれの厚みの PSZ に対して、①デュアルキュア型レジン系装着材料・光照射あり（以下 UI-40）、②直接修復用コンポジットレジン・光照射あり（以下 CM-40）、③デュアルキュア型レジン系装着材料・光照射なし（UI-0）、④化学重合型レジン系装着材料・光照射なし（OP-0）の 4 条件で接着を行った。製作した試料は、37℃ 精製水中に 24 時間保管し、半数の試料に対して繰り返し荷重試験 125,000 回を行った。その後、万能試験機を用いてせん断接着試験を行った。せん断接着試験後、破断面を実体顕微鏡および走査電子顕微鏡を用いて観察した。また、微小硬度計を用いて各レジン系装着材料の重合後の硬度（ヌープ硬さ）を測定した。

成績および考察

繰り返し荷重試験前の UI-40 および CM-40 においては、厚さ 2.0 mm および 2.5 mm でせん断接着強さに有意差は認められなかったが、繰り返し荷重試験後では、厚さ 2.0 mm が 2.5 mm と比較して有意に高いせん断接着強さを示した。また、ヌープ硬さに関しては、光照射の行わなかった UI-0 および OP-0 では、厚さ 2.0 mm および 2.5 mm で有意差は認められなかった。しかし、光照射を行った UI-40 および CM-40 では、厚さ 2.0 mm が 2.5 mm と比較して有意に高いヌープ硬さを示した。以上の結果から、5 mol% イットリア部分安定化ジルコニアの厚みが 2.0 mm の場合には、接着面に対し照射光が到達し、レジン系装着材料が十分に硬化したことで、接着耐久性の獲得に有効であったことが示唆された。

14. 血管形成が歯の矯正移動に及ぼす影響

○篠原理恵^{1,2}, 二宮 禎^{3,4}, 高橋富久^{3,4}, 納村泰弘^{2,5}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野¹

日本大学歯学部歯科矯正学講座²

日本大学歯学部解剖学第 I 講座³

日本大学歯学部総合歯学研究所 機能形態部門⁴

日本大学歯学部総合歯学研究所 臨床研究部門⁵

目的

歯列矯正時の圧迫側では、血流障害が起因して破骨細胞の分化が促進し、活発な歯槽骨吸収が生じる。一方で、破骨細胞は血液中に存在する単球に由来するため、歯を移動させるには血管が必要である。これらのように、歯の移動には血管が深く関わっているのだが、歯の移動を制御する血管の機能については、いまだ十分に解明されていない。本研究では、血管新生を誘導したマウスの歯に矯正力を加えることで、血管形成が歯の矯正移動に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

8週齢雄性 C57BL/6 マウスの腹腔内に 5, 10 mg/kg の血管新生促進剤 (COA-Cl) を投与した後、3, 5 日目に上・下顎を摘出して、qPCR と免疫組織染色によって VEGF の発現を調べた。また、COA-Cl 投与 3 日後に矯正装置 (OTM) を取付けて第 1 臼歯に矯正力を負荷した。その後、マイクロ CT を用いて経日的に歯の移動を観察した。さらに、酵素処理によってマウス臼歯から採取した歯根膜細胞 (PDLs) を培養し、12-well plate に 1×10^5 cells/well の細胞数で播種した。培地に 1, 10, 100 μ M の COA-Cl を添加し、48 時間の培養後 RNA を抽出し、qPCR によって VEGF, RANKL, OPG の発現を調べた。

結果および考察

10 mg/kg COA-Cl 投与群は、3 日目で歯周組織に VEGF の発現が増加し、血管形成が促された。5 mg/kg COA-Cl 投与群は、control (0 mg/kg) 群と比べて歯の移動量に差がみられなかったが、10 mg/kg COA-Cl 投与群では OTM 処置 1 日目から有意な増加が認められた。PDLs の培地に COA-Cl を添加すると、PDLs による VEGF と RANKL の発現が増加する一方で、OPG の発現は減少した。以上の結果から、血管形成が RANKL/OPG 比の増加と歯の移動を促すことが示された。

15. IL-1 α knockout (KO) 細胞における pIL-1 α の細胞内機能の追求

○田村宏貴^{1,2}, 角田麻里子^{3,4}, 浅野正岳^{3,4}, 菊入 崇²

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔健康科学分野¹

日本大学歯学部小児歯科学講座²

日本大学歯学部病理学講座³

日本大学歯学部総合歯学研究所 生体防御部門⁴

目的

IL-1 α は、細胞内で precursor IL-1 α (pIL-1 α) として産生された後に酵素で分断され、核移行配列 (NLS) を有する propeptide IL-1 α (ppIL-1 α) と mature IL-1 α (mIL-1 α) にわかれる。大部分の pIL-1 α は細胞外へ放出されるが、残留した pIL-1 α は NLS を有することから核に移行し遺伝子発現に関与するがその詳細は不明である。本研究は、IL-1 α knockout (KO) 細胞を用いて、pIL-1 α の細胞内機能を追求することを目的とした。

材料および方法

ヒト上皮癌細胞株 (HSC-3) から CRISPR/Cas9 法で、IL-1 α KO 細胞 (a7) を樹立した。HSC-3 と HSC-a7 の IL-6, IL-8 および IL-1 β の発現を real-time PCR と ELISA 法で検索した。HeLa と HSC-3 の IL-1 α 反応性は、recombinant pIL-1 α (rpIL-1 α) を用いて行った。pIL-1 α の細胞内機能に関与する分子内領域の特定は、pIL-1 α , mIL-1 α , ppIL-1 α および pIL-1 α の NLS 欠失変異体 (Δ NLS) で検討した。

結果および考察

HSC-a7 は HSC-3 と比較して IL-6, IL-8, IL-1 β の産生が低下しており、転写レベルで抑制されていることが明らかとなった。一方、HSC-a7 に pIL-1 α を過剰発現させると、IL-6 産生が HSC-3 と同レベルに回復した。また、HSC-3 は rIL-1 α に反応しなかったことから、pIL-1 α は、HSC-3 の核内で IL-6 および IL-8 遺伝子発現を増強させていると考えられた。この効果は、mIL-1 α , ppIL-1 α および Δ NLS では確認されなかった。pIL-1 α はインタラクインとして IL-6 の発現に関与し、この効果は pIL-1 α という分子形態が完全体である場合にのみ発揮されるものと考えられた。

16. CAD/CAM 用歯冠補綴材料で製作した前歯部ハイブリッドアバットメントクラウンの破壊強度

○齊藤丈磨^{1,2}, 本田順一^{2,3}, 小林達朗^{2,3}, 小峰 太^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅲ講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門³

目的

本研究では、チタンベースに異なる CAD/CAM 用歯冠補綴材料で製作された補綴装置を接着した前歯部ハイブリッドアバットメントクラウン (HAC) の破壊強度を比較、検討した。

材料および方法

上顎中切歯欠損症例に対するインプラント治療を想定し、インプラント体を常温重合レジンに埋入した。実験群には、CAD/CAM 用歯冠補綴材料として、高透光性ジルコニア (TZ)、二ケイ酸リチウム含有セラミックス (LD)、およびコンポジットレジン (CR) の3種類を使用した。補綴装置は、チタンベースにワックスパターン形成し、それを口腔内スキャナーでスキャン後、CAD ソフトを用いて同一の形態になるよう設計し、ミリング加工によって製作した。補綴装置の接着前処理として、TZ および CR の内面にはアルミナブラスト処理およびプライマー処理を、LD の内面にはフッ化水素酸処理およびプライマー処理を行った。チタンベースの接着前処理はプライマー処理のみを行った。その後、全ての補綴装置をレジネ系装着材料を用いてチタンベースに接着した。

製作した HAC をインプラント体に締結後、アクセスホールは直接修復用コンポジットレジンにて充填した。全ての試料は 37℃ 精製水中に 24 時間保管後、万能試験機を用いて、水平方向に対して 135° の角度で固定し、破壊強度を測定した。

成績および考察

HAC の破壊強度は TZ が 1.5 ± 0.2 kN, LD が 0.8 ± 0.2 kN, CR が 0.6 ± 0.4 kN であり、全ての群間において統計学的な有意差を認めた ($P > 0.05$)。これは、TZ は LD および CR と比較して高い曲げ強さを有しているため、破壊強度が高くなったと考えられる。また LD は CR と比較して高い曲げ強さを有し、さらに微細な結晶を高密度に析出しているため、アクセスホール周囲の表面性状が安定しており、圧縮荷重に対して抵抗し CR よりも高い破壊強度を示したと推察される。本研究で評価した全ての HAC は、前歯部の生理的咬合力とされる 0.37 kN を越えており、臨床応用の可能性が示唆された。

17. 支台歯形成デザインと使用材料の違いがオクルーザルベニアの適合に及ぼす影響

○西原佑哉^{1,2}, 岩崎太郎^{2,3}, 伊藤恵吾^{2,3}, 小峰 太^{2,3}

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 応用口腔科学分野¹

日本大学歯学部歯科補綴学第Ⅲ講座²

日本大学歯学部総合歯学研究所 高度先端医療研究部門³

目的

支台歯と補綴装置の適合は、補綴装置の予後に影響を与えることが報告されている。本研究では、支台歯形成デザインと使用材料の違いが支台歯とオクルーザルベニアの内面適合に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

下顎右側第一大臼歯に対するオクルーザルベニア (OV) を用いた治療を想定し、レジン製人工歯の支台歯形成を行った。支台歯形成デザインは、フィニッシュラインをバットジョイントとし、咬合面を平坦にしたもの (FP) および FP の近遠心側にボックス形態を付与したもの (BP) の2つとした。咬合面の形成量は 1.5 mm とした。支台歯をスキャニング後、セメントスペースを 90 μ m とし設計した。設計後、二ケイ酸リチウム含有ガラスセラミックス (EM) とジルコニア (M4Y-M5Y, ZR) をミリングし焼成、焼結を行った。内面間隙量の測定は、シリコーンレプリカ法を用いて行った。OV 内面に歯科適合試験用材料 (FC) を塗布し、支台歯に圧接した。硬化後、OV 内面から FC を撤去し、歯科汎用アクリル系レジンを用いて包埋を行い、シリコーンレプリカを製作した。レプリカ試料は精密低速切断機を用いて近遠心方向に均等に3分割した。分割した各試料の内面に対して近心側、中央、遠心側の3点の測定点を設定し測定点近傍を 10 点、計 90 点をデジタルマイクロスコープで測定した。

成績および考察

各測定点の平均値を合計し、内面間隙量を比較した結果、EM 群、ZR 群ともに FP が有意に小さい値を示した。また、いずれの支台歯形成デザインも EM 群は ZR 群に比較して有意に小さい値を示した。この結果から、材料や支台歯形成デザインの違いは内面適合に影響を及ぼすことが示された。また、各測定点の値と設定したセメントスペースとの差は、BP 群 (8.4 ~ 69.8 μ m) と比較し FP 群 (-3.6 ~ 26.3 μ m) が小さい値を示し、設定値に近似した値が得られた。BP におけるボックス形態の付与がスキャニングやミリングのエラーを引き起こし内面適合に影響を及ぼすと考えられる。

〔議事録〕

理事会

令和7年5月8日(木) 17:05~17:25
日本大学歯学部 創設百周年記念講堂(本館7階)

開会の辞

武市総務担当理事が開会の辞を述べ、開会。

会長挨拶

飯沼会長から理事に対して学会活動への協力に対する謝辞が述べられた。また、今後の運営について審議いただきたいとの挨拶がなされた。

報告・審議

〔報告〕

1. 令和6年度庶務報告

武市総務担当理事から本学会の活動状況について、菊入編集担当理事から機関誌発行状況について、次のとおり報告がなされた。

① 現況(令和7年3月31日現在)

(1) 会員数：1,511名

正会員 289名, 学生会員 66名

研究員 1,089名, 名誉会員 67名

(2) 役員：75名

理事 28名(内監事1名), 評議員 47名

② 学会活動状況

(1) 理事会： 令和6年5月9日(木)

(2) 評議員会： 令和6年5月19日(日)

(3) 第76回総会： 令和6年5月19日(日)

特別講演2題(講演者：岡 俊一 教授, 萩原芳幸教授), 一般演題20題の抄録については、日大歯学98巻2号に掲載
第77回総会・学術大会特別講演は武市 収 教授に依頼

③ 機関誌発行状況編集担当

編集委員会2回

日大歯学(98巻1号, 2号)2回発行

〔審議〕

1. 名誉会員の推薦に関する件

武市総務担当理事から、標記のことについて、次のとおり説明がなされ、諮る。

名誉会員候補者(五十音順, 敬称略)	磯川桂太郎
	清水 治
	本吉 満
	米原啓之

審議の結果、原案通り承認。

2. 令和6年度退会者および令和7年度入会者に関する件

武市総務担当理事から、標記のことについて、次のとおり説明がなされ、諮る。

退会者	依頼による退会	20名
	会費未納による強制退会	17名
入会者	正会員	10名

学生会員

19名

審議の結果、原案どおり承認。

3. 令和6年度決算に関する件

野間会計担当理事(令和6年度)から、資料に基づき、当年度収入合計2,233,599円、当年度支出合計2,498,901円である旨報告がなされた。

引き続き、鈴木監事から、4月18日に行われた監査において、本学会の事業ならびに会計処理は、正確かつ適正に処理されていることを確認した旨、報告がなされた。

武市総務担当理事から、資料のとおり、令和6年度決算を承認する旨の提案がなされ、諮る。

審議の結果、原案どおり承認。

4. 令和7年度予算案に関する件

林会計担当理事から、標記のことについて、資料に基づき、収入の部、支出の部における各科目の予算額について報告がなされた。

武市総務担当理事から、資料のとおり、令和7年度予算を承認する旨提案がなされ、諮る。

審議の結果、提案どおり承認。

5. 令和7年度理事および評議員の委嘱に関する件

武市総務担当理事から、今年度新たに3名を理事に、9名を評議員に加え、理事26名、評議員49名を委嘱する旨、提案がなされ、諮る。

審議の結果、提案どおり承認。

なお、任期は令和7年4月1日から令和8年3月31日までとする旨、言及された。

6. 令和8年度常任理事および監事に関する件

武市総務担当理事から、会則第9条に基づき、次年度の常任理事を次のとおり委嘱する旨、提案がなされ、諮る。

副会長	浅野正岳
総務担当理事	野間 昇
集会担当理事	林 誠
会計担当理事	米永一理
編集担当理事	菊入 崇
監 事	鈴木直人

審議の結果、提案どおり承認。

7. 令和8年度日本大学歯学会総会・学術大会開催日程に関する件

武市総務担当理事から、第78回総会・学術大会の日程と特別講演の予定について、次のとおり提案がなされ、諮る。

第78回総会・学術大会
開催日：令和8年5月17日(日)
特別講演者：中野善夫 教授
審議の結果、提案どおり承認。

8. 令和6年度日本大学歯学会奨励賞の選考に関する件

武市総務担当理事から、第76回総会・学術大会で発表された演題に対する評価結果に基づき、次の6名を令和6年度日本大学歯学会奨励賞受賞者とする旨、提案がなされ、諮る。

審議の結果、提案どおり承認。

奨励賞受賞者一覧

演題 番号	所属	氏 名	演 題
8	歯科保存学第Ⅰ講座	青木良太	ユニバーサルアドヒーズへの化学重合触媒の添加がレジメンセメントおよびコア用レジンとのコンタクトキュアに及ぼす影響
9	薬理学講座	北野晃平	アロディニア誘発マウスにおけるバレル皮質でのカルシウム応答の変化
12	歯科保存学第Ⅲ講座	高木朝子	<i>Fusobacterium nucleatum</i> は呼吸器ウイルス活性化因子TMPRSS2の発現を亢進させる
13	歯科保存学第Ⅲ講座	中島由梨佳	スフェロイド培養とHippo経路阻害剤を用いた口腔扁平上皮癌細胞株 - <i>Porphyromonas gingivalis</i> 共培養系の樹立とその応用
14	歯科補綴学第Ⅰ講座	井手唯李加	口腔顔面の神経障害性疼痛発症に対する三叉神経脊髄路核吻側亜核の役割
17	口腔内科学講座	小林桃代	神経障害性疼痛モデルラットの三叉神経節における衛星細胞およびIFN- γ の役割

閉会の辞

武市総務担当理事が閉会の辞を述べ、閉会。

以 上

評議員会

令和7年5月18日(日) 11:40~12:00
日本大学歯学部 121 講義室(本館2階)

閉会の辞

武市担当理事が開会の辞を述べ、閉会。

会長挨拶

飯沼会長から評議員に向けて、学会活動への協力に対する謝辞が述べられた。また今後の議案の審議および学術講演へ御協力いただきたい旨、挨拶がなされた。

報告・審議

〔報告〕

1. 令和6年度庶務報告

武市総務担当理事から本学会の活動状況について、菊入編集担当理事から機関誌発行状況について、報告がなされた。

2. 令和6年度日本大学歯学会奨励賞受賞者について

武市総務担当理事から、標記のことについて、理事会における審議の結果、資料のとおり6名が受賞した旨、報告がなされた。

〔審議〕

1. 令和6年度決算に関する件

野間会計担当理事(令和6年度)から、標記のことについて、資料に基づき、収支決算の状況について報告した後、4月18日に行われた監査において、本学会の事業ならびに会計処理は、

正確かつ適正に処理されていることを確認した旨、鈴木監事による報告がなされた。

武市総務担当理事から、資料のとおり、令和6年度決算を承認する旨の提案がなされ、諮る。

審議の結果、提案どおり承認。

2. 令和7年度予算案に関する件

林会計担当理事から、標記のことについて、資料に基づき、当該予算の説明がなされた。

武市総務担当理事から、資料のとおり、令和7年度予算を承認する旨提案がなされ、諮る。

審議の結果、提案どおり承認。

3. 令和7年度理事および評議員の委嘱に関する件

武市総務担当理事から、標記のことについて、資料に基づき、委嘱する旨の報告がなされ、諮る。

審議の結果、提案どおり承認。

なお、任期は令和7年4月1日から令和8年3月31日までとする旨、言及された。

4. 令和8年度常任理事および監事に関する件

武市総務担当理事から、会則第9条に基づき、次年度の常任理事を次のとおり委嘱する旨、提案がなされ、諮る。

副会長 浅野正岳

総務担当理事 野間 昇

集会担当理事 林 誠

会計担当理事 米永一理

編集担当理事 菊入 崇

監 事 鈴木直人

審議の結果、提案どおり承認。

5. 令和8年度日本大学歯学会総会・学術大会開催日程に関する件

武市総務担当理事から、次のとおり提案がなされ、諮る。

第78回総会・学術大会

開催日：令和8年5月17日(日)

特別講演者：中野善夫 教授

閉会の辞

武市総務担当理事が閉会の辞を述べ、閉会。

以 上

総会

令和7年5月18日(日) 12:20~12:45
日本大学歯学部 創設百周年記念講堂(本館7階)

総会に先立ち、令和6年度日本大学歯学会奨励賞表彰式が挙行され、飯沼会長から受賞者へ表彰状および副賞が授与された。

閉会の辞

武市総務担当理事が開会の辞を述べ、閉会。

会長挨拶

飯沼会長から出席者に向けて学会活動への協力に対する謝辞が述べられた。また、円滑な議事進行に御協力いただきたい旨、挨拶がなされた。

議事

〔報告〕

1. 令和6年度庶務報告

武市総務担当理事から本学会の活動状況について、菊入編集

担当理事から機関誌発行状況について、報告がなされた。

2. 令和6年度決算に関する件

野間会計担当理事（令和6年度）から、標記のことについて、資料に基づき、収支決算の状況について報告した後、4月18日に行われた監査において、本学会の事業ならびに会計処理は、正確かつ適正に処理されていることを確認した旨、鈴木監事より報告がなされた。

3. 令和7年度予算案に関する件

林会計担当理事から、標記のことについて、資料に基づき、当該予算の説明がなされた。

4. 令和7年度理事および評議員の委嘱に関する件

武市総務担当理事から、標記のことについて、資料に基づき、委嘱する旨の報告がなされた。

なお、任期は令和7年4月1日から令和8年3月31日までとする旨が言及された。

5. 令和8年度常任理事および監事に関する件

武市総務担当理事から、会則第9条に基づき、次年度の常任理事を次のとおり委嘱する旨、報告がなされた。

副会長	浅野正岳
総務担当理事	野間 昇
集会担当理事	林 誠
会計担当理事	米永一理
編集担当理事	菊入 崇
監 事	鈴木直人

6. 令和8年度日本大学歯学会総会・学術大会開催日程に関する件

武市総務担当理事から、次のとおり報告がなされた。

第78回総会・学術大会

開催日：令和7年5月17日（日）

特別講演者：中野善夫 教授

閉会の辞

武市総務担当理事が閉会の辞を述べ、閉会。

以 上

日大歯学

第 99 卷 総 目 次

(2025)

日大歯学第99巻(2025)総目次

特別依頼原稿

第77回日本大学歯学会特別講演寄稿

難治性根尖性歯周疾患へのマクロとミクロのアプローチ

武市 収 46

症 例

大きな下顎下縁平面角とガミーフェイスを伴うアングルⅠ級歯性上下顎前突難症例の治療：症例報告

小川 康子ほか 1

原 著

HAX-1 によるpIL-1 α の細胞内局在変化および分泌効率について

今岡 紗耶 8

Alcichthys elongatus の口咽頭歯と鰓耙およびその二次突起

玉木 理一郎 14

終末糖化産物はCa9-22細胞のClaudin3および4発現を抑制する

市川 理沙 24

有限要素法を用いた上顎歯列弓遠心移動時の正中口蓋縫合部スクリュー周囲骨の応力解析

米山 敏弘 30

Interleukin-1 シグナル伝達におけるtoll/interleukin-1 受容体ドメインの重要性

笹川 剛志 39

Leptin receptor陽性細胞のlow-density lipoprotein receptor-related protein 1欠損が骨形成に与える影響

仮谷 仁志 54

IL-1 receptor type 1によるIL-1 α の細胞内分解調節に関する研究

保坂 万智 63

歯学部付属歯科病院における患者動向および診療体制にCOVID-19流行が及ぼした影響

武内 伸賢 69

接着性舌側リテーナーのワイヤーと接着材に及ぼす大気圧窒素プラズマ処理の影響

高田 麻希ほか 78

拘束性ストレスと卵巣摘出による口腔内灼熱症候群モデルマウス作製の試み

米本 真実子ほか 83

歯髄炎に起因した顔面部異所性疼痛に対する三叉神経節内Nav1.7阻害の有効性

北條 泰ほか 93

その他

第77回日本大学歯学会総会・学術大会

〔抄録〕

99

〔議事録〕

108

第99巻総目次

Nihon University Dental Journal

Vol. 99, (2025) Total Table of Contents

Special Contribution Paper

The 77th Nihon University Society of Dentistry Special Lecture

Macroscopic and microscopic approaches for persistent apical periodontitis Osamu Takeichi 46

Case Report

A treatment of Angle Class I bimaxillary protrusion with high mandibular plane angle and a gummy face : A case report

Yasuo Ogawa and others 1

Original Article

Cellular localization changes and secretion efficiency of pIL-1 α by HAX-1 Saya Imaoka 8

Oropharyngeal teeth and gill rakers with their secondary processes in *Alcichthys elongatus* Riichiro Tamaki 14

Advanced glycation end products reduce Claudin 3 and 4 expression in Ca9-22 cells Risa Ichikawa 24

Stress analysis of the bone around the screw during distalization of the maxillary dental arch in the midpalatal area using a finite element method Toshihiro Yoneyama 30

Interleukin-1 signaling importance of the toll/interleukin-1 receptor domain Tsuyoshi Sasagawa 39

Effect of leptin receptor-positive cells lacking low-density lipoprotein receptor-related protein 1 on the bone formation Hitoshi Kariya 54

Regulation of intercellular degradation of IL-1 α by IL-1 receptor type 1 Machi Hosaka 63

Effect of the COVID-19 on visit patient trends and treatment system at the dental hospital Nobumasa Takeuchi 69

Effect of atmospheric pressure nitrogen plasma on wires and adhesive in bonded lingual retainers Maki Takata and others 78

Experimental establishment of restraint stress and ovariectomy-induced mouse model for burning mouth syndrome Mamiko Yonemoto and others 83

Efficacy of intra-trigeminal Nav1.7 inhibition for orofacial ectopic pain caused by pulpitis Yasushi Hojo and others 93

Others

The 77 th General Meeting and Scientific Meeting of Nihon University Society of Dentistry

[Meeting Abstract] 99

[Meeting Minutess] 108

Index to Vol. 99, 2025

令和7年6月30日

各 位

日本大学歯学会事務局

掲載論文の複写複製および転載複製について

日本大学歯学会では、複写複製、転載複製およびAI利用著作権を一般社団法人学術著作権協会に委託しています。

当該利用をご希望の方は、同協会（<https://www.jaacc.org/>）が提供している許諾システムを通じてご申請下さい。但し公益社団法人 日本複写権センター（同協会より権利を再委託）と包括複写許諾契約を締結されている企業の社員による社内利用目的の複写はその必要はありません。（社外頒布用の複写は許諾が必要です。）

権利委託先：一般社団法人 学術著作権協会

<https://www.jaacc.org/>

〒107-0052 東京都港区赤坂9-6-41 乃木坂ビル

なお、著作物の翻訳のような、上記以外の許諾は、学術著作権協会では扱っていませんので、直接発行団体へご連絡ください。

また、アメリカ合衆国において本書を複写したい場合は、次の団体に連絡して下さい。

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

TEL：1-978-750-8400 FAX：1-978-646-8600

以 上

How to Obtain Permission

Nihon University Dental Journal authorized Japan Academic Association For Copyright Clearance (JAC) to license our reproduction rights, reuse rights and AI ML rights of copyrighted works. If you wish to obtain permissions of these rights in the countries or regions outside Japan, please refer to the homepage of JAC (<http://www.jaacc.org/en/>) and confirm appropriate organizations to request permission.

You may reuse a content for non-commercial use, however please contact us directly to obtain the permission for the reuse content in advance.

Japan Academic Association For Copyright Clearance (JAC)

<https://www.jaacc.org/>

Nogizaka Bldg.2F 9-6-41, Akasaka, Minato-Ku, Tokyo 107-0052, Japan

Please note that JAC does not deal with licenses, such as translations of copyrighted works. Please contact the issuing organization directly.

If you would like a copy of this journal in the United States, please contact the following organizations.

Copyright Clearance Center, Inc.

222 Rosewood Drive, Danvers, MA 01923 USA

TEL : 1-978-750-8400 FAX : 1-978-646-8600

日大歯学編集委員会

委員長	菊入 崇	
副委員長	池田貴之	
委員	米山隆之	鈴木直人
	武市 収	岡田明子
	納村泰弘	近藤真啓
	岡崎章悟	土井 茂
幹事	佐藤安希	

日大歯学 第 99 卷 第 2 号
令和 7 年 12 月 30 日 発行

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/nusdj/>

編集兼発行人 飯沼 利光
発行所 日本大学歯学会
〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13
日本大学歯学部内
事務所 日本大学歯学部研究事務課
電話 03 (3219) 8060
印刷所 ヨシダ印刷株式会社
〒130-0014 東京都墨田区亀沢 3-20-14
電話 03 (3626) 1301

Merssage



歯科医院用

メルサーージュ プロフェッショナルケア PMTCPペースト

装いも新たにリニューアル

メルサーージュ プロ ワンペーストを中心に

患者さまの口腔内の状態に合わせてペーストを選択いただけます。



ステイン除去から仕上げまで

メルサーージュ プロ ワンペースト クリーニングペースト

薬用歯磨 医薬部外品 歯科医院用

販売名：メルサーージュ P ワンP
容量：65g 香味：フレッシュシトラス
標準医院価格：¥2,000

天然歯・補綴装置に優しくアプローチ

メルサーージュ プロ TTプラス トリートメントペースト

薬用歯磨 医薬部外品 歯科医院用

販売名：メルサーージュ P TT
容量：40g 香味：オレンジミント
標準医院価格：¥1,800

卵殻由来「ヒドロキシアパタイト*」配合
※清掃剤

メルサーージュ プロ APプラス トリートメントペースト

歯みがき類 口腔化粧品 歯科医院用

販売名：メルサーージュ APプロ
容量：65g 香味：ユズミント
標準医院価格：¥2,900

強固な着色除去に

メルサーージュ プロ ステインオフ ポリッシングペースト

歯面研磨材 一般医療機器
医療機器届出番号 26B1X00004000295

容量：40g 香味：ナチュラルミント
標準医院価格：¥1,800

製品の詳細はこちらまで…



価格は2025年11月現在の標準医院価格(消費税抜き)です。



世界の歯科医療に貢献する

株式会社 松風

●本社：〒605-0983京都市東山区福福上高松町11 お客様サポート窓口(075)778-5482 受付時間8:30~12:00 12:45~17:00(土日祝除く)

www.shofu.co.jp

●支社：東京(03)3832-4366 ●営業所：札幌(011)232-1114/仙台(022)713-9301/名古屋(052)709-7688/京都(075)757-6968/大阪(06)6330-4182/福岡(092)472-7595

Primescanの精度は そのままに リーズナブルモデル登場



株式会社 ジーシー



Primescan connect

Primescanが選ばれ続けている理由。
確固たる実績と進化し続けるテクノロジーとの融合

1985年にデンツプライシロナの口腔内スキャナーが誕生して35年以上。
進化したテクノロジーは精度・スピード・容易な操作を実現します。
スキャンだけにとどまらず、将来を見据えて包括的に診療をサポートします。

実績

35年以上にわたる実績
35年以上の実績を持ち、世界で年間約700万症例以上の修復物がチェアサイドシステムで製作されています。

接続性

DSの総合プラットフォーム “DS Core”

強力なセキュリティを有しGoogleプラットフォームを用いたDS Coreは、ラボと模型レスでシームレスに連携します。

拡張性

Inhouseへ拡張

将来的にはラボソフトウェアやミリングを追加することで院内内製への拡張も可能。

一般的名称：チェアサイド型歯科用コンピュータ支援設計・製造ユニット/
歯科技工室設置型コンピュータ支援設計・製造ユニット/デジタル印象採得装置
販売名：セレック プライムスキャン AC
承認番号：30100BZX00044000 管理医療機器 特定保守管理医療機器



Primescan

研究開発を繰り返し進化したスキャンテクノロジー

広いワンショット撮影範囲

短時間でより多くのデータを収集。
無駄のない、広いガラス有効面積により、最後臼歯までも簡単にアクセス

インテリジェントプロセッシング

取り込まれた膨大な量のデータからコアとなる必要なデータのみを取り込み、
計算の迅速化・最適化を実現

ヒーティング機能

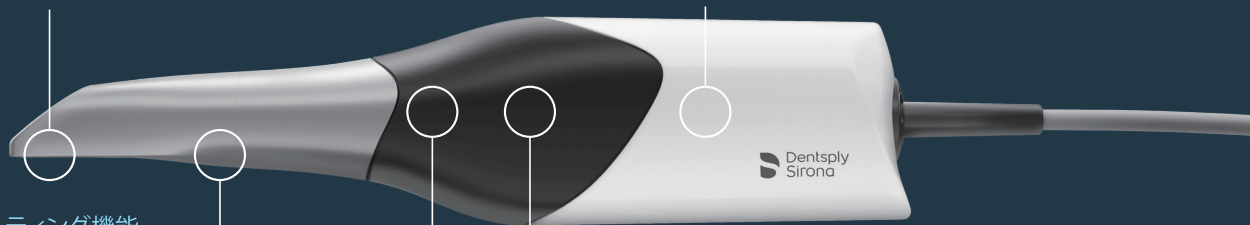
セルフヒーティングにより、
口腔内でカメラが曇らずに
スキャンが可能

ダイナミックレンズ

最大20mmの測定深度でも
シャープさと精度を実現

スマートピクセルセンサー

1秒間に100万を超える3Dポイント进行处理し、写真のようにリアルで正確なデータを作成。
天然歯及び様々なマテリアルの修復物の表面を迅速かつ容易にスキャン



発売元 **株式会社 ジーシー** / 製造販売元
東京都文京区本郷3丁目2番14号

デンツプライシロナ株式会社 www.dentsplysirona.com
〒104-0061 東京都中央区銀座8-21-1 住友不動産汐留浜離宮ビル

カスタマーサービスセンター お客様窓口 ☎ **0120-416480**

受付時間 9:00a.m.~5:00p.m. (土曜日、日曜日、祝日を除く)

※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。

<https://www.gc.dental/japan/>

支店 ●東京 (03)3813-5751 ●大阪 (06)4790-7333

営業所 ●北海道 (011)729-2130 ●東北 (022)785-8040 ●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286

※掲載情報は2025年4月現在のものです。※上記の情報は、デンツプライシロナ(株)のパンフレットに基づく情報です。※ソフトウェア画面写真はハメ込み合成のため実際とは若干異なります。※会社名、製品名等は各社の登録商標または商標です。

日大歯学投稿規定

平成26年12月24日制定

令和7年10月27日施行

1. 本誌

本誌は、研究成果の論文発表による発信を通して、歯科医学の発展に寄与することを目的として、日本大学歯学会が発行する学術雑誌である。

2. 投稿資格

本誌へ投稿する著者（共著者も含む）は、原則として日本大学歯学会の会員に限る。ただし、日大歯学編集委員会（以下、編集委員会という）が特に認めたものはこの限りではない。

3. 投稿論文の種類

原著論文、総説、症例・臨床報告およびその他とし、過去に他誌に掲載のもの、あるいは投稿予定の無いものに限る。ただし、編集委員会が認めた場合はこの限りではない。編集委員会は総説論文等（総説、報告、研究紹介、学会報告、招待論文、特許、社会活動、臨床ノート、フォーラム）の投稿を依頼することができる。

4. 倫理的配慮

投稿論文は、ヒトを対象とする場合はヘルシンキ宣言（以後の改定、補足事項を含む）およびその他の倫理規定を遵守し、動物実験は関係法令や基本指針等を踏まえ、動物実験等の具体的な実施方法等を定めた研究機関内規定に基づいて倫理的に行われたものでなければならない。

5. 利益相反

論文の内容に関する利益相反をすべて申告すること。

6. 投稿論文の採否

投稿論文の査読後、その採否および掲載順序を編集委員会が決定する。なお、編集委員会は文意に変化を来さない範囲において字句の改訂を行うことができる。

7. 投稿論文の形式

投稿論文の作成にあたっては、「投稿の手引き」に従いA4判横書きで作成し、表紙から文献まで通しページをつける。原著論文の形式は、原則として要旨、緒言、材料および方法、結果あるいは成績、考察、結論、文献の順に記載する。原著論文以外の論文も、原則としてこれに準ずる。

8. 校正

著者による校正は、原則再校までとする。その際には、字句の著しい変更、追加あるいは削除などは認めない。

9. 著作権

本誌に掲載された論文、抄録などの著作権は日本大学歯学会に帰属する。

10. 掲載料

著者は掲載料を負担する。掲載料はPDF1ページにつき10,000円とする。編集委員会から依頼する原稿についてはこれを除く。

11. 規定にない事項

この規定にない事項は、別に編集委員会で決定する。

12. 投稿論文の送付先

所定の投稿申込用紙に必要事項を記入のうえ、下記へ送付する。

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台1-8-13

日本大学歯学部研究事務課気付

日大歯学編集委員会

TEL：03-3219-8060，FAX：03-3219-8324

E-mail：de.shigakukai@nihon-u.ac.jp（日本大学歯学会専用のアドレス）

Nihon University Dental Journal

Vol. 99 No. 2 December 2025

特別依頼原稿

第77回日本大学歯学会特別講演寄稿

難治性根尖性歯周疾患へのマクロとミクロのアプローチ

武 市 収 46

原 著

Leptin receptor陽性細胞のlow-density lipoprotein receptor-related protein 1欠損が骨形成に与える影響

仮 谷 仁 志 54

IL-1 receptor type 1によるIL-1 α の細胞内分解調節に関する研究

保 坂 万 智 63

歯学部附属歯科病院における患者動向および診療体制にCOVID-19流行が及ぼした影響

武 内 伸 賢 69

接着性舌側リテーナーのワイヤーと接着材に及ぼす大気圧窒素プラズマ処理の影響

高 田 麻 希ほか 78

拘束性ストレスと卵巣摘出による口腔内灼熱症候群モデルマウス作製の試み

米 本 真実子ほか 83

歯髄炎に起因した顔面部異所性疼痛に対する三叉神経節内Nav1.7阻害の有効性

北 條 泰ほか 93

その他

第77回日本大学歯学会総会・学術大会

〔抄録〕

99

〔議事録〕

108

第99巻総目次



NIHON UNIVERSITY SOCIETY OF DENTISTRY

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/nusdj/zasshi/j-zas00.html>