

## 論文の内容の要旨

氏名：遠 藤 智 佳

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Study on factors that affect caries susceptibility in mice

（マウスにおける齲蝕感受性に影響を与える要因の検討）

齲蝕は3大歯科疾患の一つであり、その発生には、宿主（歯）、微生物、基質（糖）、時間の4つの要因が関与している。齲蝕感受性の違いは、環境要因と遺伝因子が複雑に作用しあって生じると考えられる。マウスを用いた研究では環境要因を統一することが可能である。当教室のこれまでの研究では、ヒト遺伝子と相同性の高いマウスを利用し、ヒト齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* を経口接種し齲蝕誘発実験を試みたところ、齲蝕に高感受性マウス C57BL/6CrSlc 系統（B6）と低感受性マウス C3H/HeSlc 系統（C3H）が存在し、齲蝕感受性に遺伝的要因が関与していることを報告した。これらのマウスを用いて齲蝕誘発実験および唾液分泌に関する解析を行なったところ、C3H マウスの齲蝕スコアは B6 マウスより有意に低く、2系統間のピロカルピン刺激唾液の分泌量は、C3H マウスが B6 マウスよりも多いことを報告したが、経時的な唾液分泌量の変化には言及していない。また、2系統のマウスの顎下腺における遺伝子発現を Gene Chip<sup>®</sup>マイクロアレイにて解析し、*Capn3*と *Tmem87a* が唾液腺の水の分泌および輸送に関与している可能性があることを言及している。

本研究では、齲蝕感受性の違いに関与すると考えられる唾液分泌とエナメル質の硬度に焦点を当て、B6、C3H マウスの2系統間における経時的刺激唾液分泌量の比較、顎下腺の組織学的比較、顎下腺におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の遺伝子発現量について比較することとした。さらに、齲蝕発症に関与していると報告されているエナメル質硬度について硬度計を用いて2系統間で違いがあるか検討した。

経時的刺激唾液分泌量の比較のため、生後49日齢のB6マウス雄6頭、C3Hマウス雄5頭に、生理食塩水で10倍希釈したペントバルビタール（0.1ml/10g body weight）を腹腔内投与にて全身麻酔を行った。5分後にイソプロテレノール（0.20  $\mu$ g/100g body weight）とピロカルピン（0.05  $\mu$ g/100g body weight）の腹腔内投与を行った。投与後0～10分、10～20分、20～30分まで10分ごとにマウス口腔内からピペットで唾液の採取を行った。採取した唾液の重量を測定、検討したところ、B6マウスよりもC3Hマウスで分泌量が多く、投与後20～30分までの唾液分泌量と総唾液分泌量で有意差が認められた。

顎下腺の組織学的比較のため、生後49日齢のB6,C3Hマウスの雄各3頭に、生理食塩水で10倍希釈したペントバルビタール（0.1ml/10g body weight）を用いて全身麻酔を行い、1x PBSと4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定を行った。左側顎下腺を採取、パラフィン包埋ブロックを作製し、マイクロームで厚さ4  $\mu$ m に薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（H・E）重染色を行った。オールインワン蛍光顕微鏡（BIOREVO BZ-9000Generation II<sup>®</sup> : KEYENCE）にて400倍で観察、撮影を行った。得られた組織画像上の導管をトレースした。スキャナを用いてトレース像を画像解析度300dpiで再デジタル化を行い、画像解析ソフトImage Jを用いて計測した。計測の方法は、画像上の一定領域の面積を（a）として計測し、（a）に含まれる導管の面積（b）を計測した。一定領域に含まれる導管細胞の割合を（b/a）として求めた。また、その一定領域に含まれる腺房細胞の割合を（a-b）/aとして求めた。各系統のマウス1頭につき、得られた組織画像上の10カ所で面積の測定を行い、その平均を求めた。顎下腺における腺房細胞の割合はB6マウスよりもC3Hマウスで多く、2系統間の平均値に有意差が認められた。

顎下腺におけるムスカリン性アセチルコリン受容体の遺伝子発現量の比較は、生後49日齢のB6、C3Hマウス雄各3頭から組織学的比較と同じ方法で顎下腺を採取した。採取した顎下腺をRNAlater<sup>®</sup>Solutionに浸漬、4℃にて保存した後にRNAを抽出した。Real-Time PCRにて、抽出したRNAのムスカリン性アセチルコリン受容体サブタイプ1～3（M1R、M2R、M3R）の発現量の解析を行った。唾液腺に発現するM3Rの遺伝子発現量は、唾液分泌量の少ないB6マウスと唾液分泌量の多いC3Hマウスにおいて差が認められなかった。

エナメル質の硬度の比較は、生後49日齢のB6、C3Hマウス雄3頭から下顎骨を採取し、2%KOHに浸漬した。42℃で24時間インキュベートを行い軟組織を除去後、下顎骨を切断し、左側下顎骨をスライドガラス上にコンポジットレジンをを用いて固定した。下顎左側第一大臼歯の舌側におけるエナメル質硬度をダイナミック超微小硬度計DUH-211

（Shimazu, Japan）を用いてBerkovich硬度として測定した。各系統のマウス1頭につき、5カ所で第一大臼歯のエナメル硬度の測定を行い、その平均を求めた。結果は、エナメル質のBerkovich硬度はB6マウスよりもC3Hマウスで有意に高い

ことが認められた。

今回の研究の結果、C3H マウスはピロカルピン刺激時から 30 分経過しても B6 マウスと比較して唾液分泌量が多いことから、緩衝能が高く、プラーク pH の回復が早期に起こるため、脱灰の時間を退縮させる可能性があると考えられる。よって、C3H マウスは自浄作用と緩衝作用が高く、歯の脱灰が起こりにくいため、齲蝕感受性に差が出ることが示唆された。C3H マウスの腺房細胞の割合が B6 マウスの腺房細胞の割合のよりも高値であることが確認された。C3H マウスの唾液分泌量は B6 マウスより多いため、腺房細胞が多く存在することで腺房細胞から分泌される高分子物質、水および電解質なども多くなる可能性が考えられる。顎下腺の腺房細胞の割合は唾液分泌量の差に関連することが考えられ、齲蝕感受性に関与する因子となることが示唆された。一方、顎下腺に発現するムスカリン性アセチルコリン受容体 M3R の遺伝子発現量は B6 マウスと C3H マウスで差が認められず、本研究では 2 系統間の唾液分泌量の差とムスカリン性アセチルコリン受容体の遺伝子発現量の関連性は低く、齲蝕発症の感受性に関与している可能性は低いと考えられた。エナメル質の Berkovich 硬度は、B6 マウスよりも C3H マウスで高値を示した。エナメル質硬度は歯の脱灰に関連すると考えられ、齲蝕感受性に関与する因子となることが示唆された。