

北海道大学歯学部 42 期生研究実習の概要

研究実習実施期間： 平成 24 年 9 月～平成 25 年 8 月
(5 年次 2 学期～6 年次 1 学期)

研究実習発表会： 平成 25 年 6 月 14 日(金)13:00～16:40
17 日(月)13:00～16:40
21 日(金)13:00～16:40

実施組織：

歯学部長	鈴木 邦明(細胞分子薬理学教室)
研究実習連絡会委員長	船橋 誠 (口腔生理学教室)
研究実習連絡会委員	高橋 茂 (口腔機能解剖学教室)
	山本恒之 (硬組織発生生物学教室)
	前澤仁志 (口腔生理学教室)
	藤沢隆一 (口腔分子生化学教室)
	赤坂 司 (生体理工学教室)
	東野史裕 (口腔病理病態学教室)
	安田元昭 (口腔分子微生物学教室)
	出山義昭 (細胞分子薬理学教室)

目次

< 口腔機能学講座 >

口腔解剖学第一

1-13

メッケル軟骨後方部の形態学的特徴

060018 鎌 口 真由美

(指導教員 井上貴一朗)

顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

080024 栗 原 加奈子

(指導教員 土門卓文)

口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

080032 ジョン ミギョン

(指導教員 土門卓文)

顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

080035 田 川 博 英

(指導教員 土門卓文)

エタノール浸漬固定における固定液濃度が組織標本に与える影響

080038 谷 脇 裕 人

(指導教員 高橋 茂)

舌神経に関する形態学的研究

080055 宗 山 昂 史

(指導教員 土門卓文)

エタノール浸漬固定における固定時間が組織標本に与える影響

080059 山 田 実 生

(指導教員 高橋 茂)

口腔生理学

14-23

体位が咀嚼能率に与える影響

080001 阿 部 一 博

(指導教員 船橋 誠)

咬合がバランス感覚に及ぼす影響

080013 小 倉 弘 之

(指導教員 船橋 誠)

軟口蓋と舌尖における苦味閾値の違い

070008 加 藤 純 也

(指導教員 前澤仁志・船橋 誠)

食事、ガム咀嚼、コーヒー摂取が集中力に及ぼす影響

080020 木 村 慧

(指導教員 船橋 誠)

匂い刺激が安静時の閉口筋活動に及ぼす影響

080029 澤 み な み

(指導教員 前澤仁志・船橋 誠)

刺激時唾液分泌量と咀嚼値との関係

070026 知 野 圭 佑

(指導教員 船橋 誠)

手指の巧緻運動タスクに対する作業前の指運動と眼球運動の影響

080050 藤原 なおみ (指導教員 船橋 誠)

質量認識が重量物持ち上げ時の筋活動に与える影響

070052 安元 行徳 (指導教員 平井喜幸・船橋 誠)

<口腔健康科学学講座>

口腔生化学

24-31

BMP を付着させたチタン微細繊維不織布上での骨髄間質細胞の培養

080008 入澤 明子 (指導教員 滝田裕子)

I 型コラーゲンが Enamel Matrix Derivatives(EMD)の有する骨芽細胞増殖促進効果を制御するメカニズムの検討

080011 大歳 祐生 (指導教員 藤澤隆一)

骨髄間質細胞培養に対する BMP の影響

080012 大西 奈々 (指導教員 滝田裕子)

アミノ酸配列分析を利用したエナメルタンパク質であるタフテリンの機能に関する研究

070037 新阜 宏平 (指導教員 藤澤隆一)

マウス未分化間葉系細胞 Kusa-O 細胞における骨芽細胞分化に伴う miR-34c 発現量の変化

080042 西谷 淳 (指導教員 田村正人)

Wnt3a の添加に伴う C2C12 細胞における miR-34c 発現の変化

080040 塚本 豊浩 (指導教員 田村正人)

Enamel Matrix Derivatives (EMD) の骨芽細胞増殖促進効果に及ぼす Ascorbic acid の影響についての研究

080051 降旗 友和 (指導教員 水野守道)

エナメルタンパク質アメロブラスチンの進化の流れについて

080061 盧山 晨 (指導教員 藤澤隆一)

口腔解剖学第二

32-43

下顎第二小臼歯の咬合面形態について

080015 片岡 茉耶 (指導教員 山本恒之)

下顎第一大臼歯の咬合面形態について

080030 沢崎 俊太郎 (指導教員 山本恒之)

NaPi II シグナルによる骨組織異常

070024 瀬川 憂樹 (指導教員 網塚憲生)

上顎第一小臼歯の根管形態について

080033 楚 南 は る か (指導教員 山本恒之)

下顎第二大臼歯槌状根の根管形態について

080053 南 川 彰 (指導教員 山本恒之)

RANKL 遺伝子欠損マウスにおける組織化学解析ーRANKL 遺伝子欠損マウスに存在する破骨細胞様大型細胞についてー

070051 宮 本 幸 奈 (指導教員 網塚憲生)

歯科理工学

44-48

炎症性の少ない生分解性ポリ乳酸の試作

080003 石 田 雄 大 (指導教員 亘理文夫)

義歯床用レジンによるマイクロ・ナノパターンの作製

080019 金 井 香央梨 (指導教員 赤坂 司)

多孔質ナノ材料ハスクレイを利用したリチャージャブル歯科用充填材の試作

080037 田 中 秀 典 (指導教員 亘理文夫)

アパタイトでできたマイクロ・ナノパターンの細胞接着性

080043 野 江 未 史 (指導教員 赤坂 司)

歯根吸収抑制のための水酸化カルシウム製剤の象牙質内拡散評価

080049 藤 井 瑞 季 (指導教員 八若 保孝、亘理文夫)

< 口腔病態学講座 >

口腔病理学

49-59

疣贅癌とその境界病変の病理学的解析Ⅱ

080002 安 倍 嘉 彦 (指導教員 進藤正信、北村哲也)

ARE-mRNA 安定化とアデノウイルス増殖(ウイルス生産効率検討)

080004 磯 島 慧 悟 (指導教員 東野史裕)

疣贅癌とその境界病変の病理学的解析Ⅰ

080018 加 藤 寛 史 (指導教員 進藤正信、北村哲也)

ARE-mRNA の安定化に影響を及ぼすアデノウイルスの遺伝子の検索

080021 桐 越 晶 子 (指導教員 東野史裕)

PTHrP 産生咽頭がんの剖検例

080018 小 西 絵里奈 (指導教員 進藤正信、北村哲也)

剖検によって明らかになった悪性リンパ腫の1例

080048 福 島 祐 介 (指導教員 進藤正信、北村哲也)

活性酸素種(ROS)が血管内皮細胞に及ぼす影響

080056 森 谷 康 人 (指導教員 樋田京子、秋山廣輔)

アデノウイルス感染による ARE-mRNA の核外輸送と安定化

080058 八 幡 美星子 (指導教員 東野史裕)

アデノウイルスの複製における ARE-mRNA の役割 II

0800600 山 本 茉 実 (指導教員 東野史裕)

口腔細菌学

60-70

口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化: NOD-like receptor は何か

080006 井 上 昌 平 (指導教員 柴田 健一郎、佐伯 歩)

Hypoxia inducible factor 1 α 5' 非翻訳配列がタンパク質合成メカニズムに与える影響

080005 磯 部 由佳利 (指導教員 安田元昭)

E4 タンパク質はアデノウイルスの後期遺伝子発現に必須である

0800225 河 野 通 俊 (指導教員 安田元昭)

口腔レンサ球菌による細胞内センサーとしてのインフラマゾームの活性化: IL-1 β の産生とピロ
プトーシスの誘導

070015 近 藤 絵 (指導教員 柴田 健一郎、佐伯 歩)

インフラマゾームの活性化による IL-1 β 産生誘導能の違い

080034 高 田 亮 (指導教員 長谷部 晃)

口腔レンサ球菌による細胞内センサーとしてのインフラマゾームの活性化: 活性物質は何か

080039 千 種 達 也 (指導教員 柴田健一郎)

5' 非翻訳領域が Hexon タンパクの発現に与える影響

080052 前 田 正 名 (指導教員 安田元昭)

Candida albicans によるマクロファージ系 細胞への IL-1 β 産生誘導のメカニズム

080054 三 好 太 郎 (指導教員 長谷部 晃)

歯科薬理学

71-80

骨芽細胞様 MMC3T3-E1 細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ活性の TRK による阻害

080009 上 田 慶 大 (指導教員 鈴木邦明)

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ活性の risedronate による阻害

080010 大 崎 晃 嗣 (指導教員 鈴木邦明)

暗算作業効率に及ぼすカフェインの効果

080014 尾 立 卓 弥

(指導教員 吉村善隆)

暗算作業効率に及ぼす各種飲料の効果

080016 片 山 修 平

(指導教員 吉村善隆)

エナメル質に対する飲料の影響に関する研究1

080017 加 藤 亜 美

(指導教員 出山義昭、中村光一)

エナメル質に対する飲料の影響に関する研究2

080028 酒 井 安佳里

(指導教員 出山義昭、中村光一)

低価格線量計を用いた放射線量の測定(1)

080045 波多野 貴 一

(指導教員 西方 眞)

低価格線量計を用いた放射線量の測定(2)

040051 森 義 倫

(指導教員 西方 眞)

メッケル軟骨後方部の形態学的特徴

43060018 鎌口 真由美

指導教官：井上貴一朗
(口腔機能解剖学)

Morphological study of posterior region of Meckel's cartilage

43060018 Mayumi KAMAGUCHI

Directed by Inoue K.
(Oral Functional Anatomy)

キーワード：メッケル軟骨後方部、透明骨格標本、軟骨内骨化、
Keywords: posterior region of Meckel's cartilage, endochondral ossification, cleared and stained skeletal specimens

緒 言

メッケル軟骨は第1鰓弓軟骨で、その外側に下顎骨が発生するため歯科学者に馴染み深いものであるが、消失・骨化過程に関する知識は十分とは言えない。またメッケル軟骨の研究では、胎生期における前方の消失・骨化がほとんどで、後半部に関するものは極めて少なく、メッケル軟骨全体の理解には至っていない。そこでメッケル軟骨後半部(後方部)の形態学・発生学的特徴の理解を目的として検討を行った。

材料と方法

ヒトでは出生時までメッケル軟骨は消失するが、マウスでは出生直後も後半部分が残存していることから、出生直後のマウス4匹を用い、軟骨をアルシアンブルー、骨をアリザリンレッドで染色した透明骨格標本、およびメッケル軟骨後方部の組織標本(HE染色、アルシアンブルー染色)を作成した。

結 果

透明標本(図1)から、出生直後のメッケル軟骨は、前端が第3臼歯歯胚部からツチ骨頭まで直線的な棒状で、下顎骨内面では顎舌骨筋線の直下を骨に沿って走り、その前端は下顎骨内に侵入していた。その骨への侵入部ではアルシアンブルー



図1 出生直後マウスの透明骨格標本

に染色されない構造が観察され、その部を組織標本で確認した。中間部は図2の右図のように円形の断面は軟骨組織であるが、侵入部(左図)では軟骨基質が消失して軟骨膜細胞様細胞が集まった円形(断面)の細胞塊が観察された。この部で破軟骨細胞の軟骨基質分解への関与は確認できなかった。

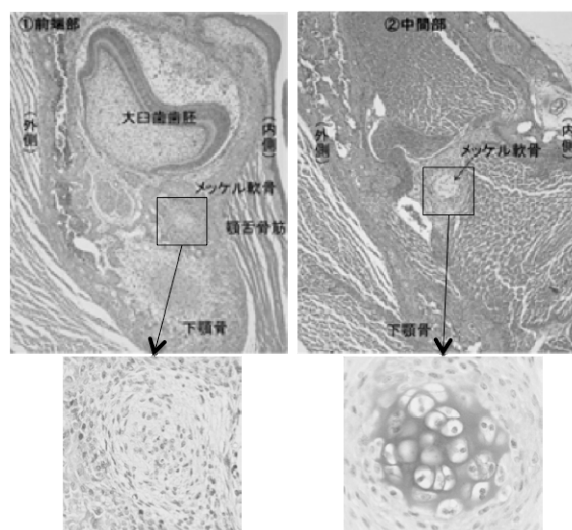


図2 侵入部(左)および中間部(右)

耳小骨となる後端部(図3)では、左図の錐体鼓室裂部でツチ骨前方部(前突起)の骨組織が膜内骨化によりメッケル軟骨の下外側に結合するように発生するのが観察され、右図のツチ骨柄後面では中央部分より破軟骨細胞により軟骨基質が分解され、続いて骨に置換する軟骨内骨化が観察された。

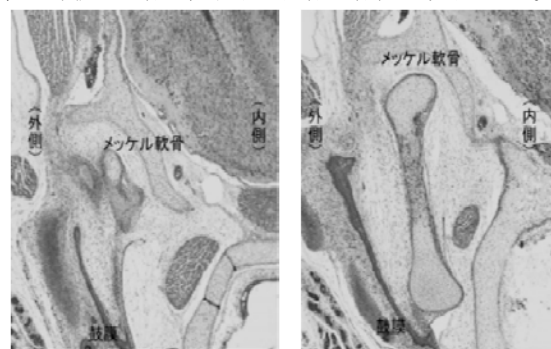


図3 後端部 錐体鼓室裂部(左)、ツチ骨柄後面部(右)

考 察

従来、メッケル軟骨は軟骨内骨化によって消失・骨化するとされてきたが、前方部分の一部においては軟骨内骨化とやや異なるとの報告¹⁾がある。また後半部を検討した本研究の結果でも、骨への侵入部(骨から後方に出てくる部)は、軟骨基質が破軟骨細胞の関与なしに消失し細胞塊となるなど軟骨内骨化とは異なる消失様相が確認された。さらに後端部のツチ骨前方部では膜内骨化、ツチ骨柄後面では破軟骨細胞の関与する軟骨内骨化など、部位によって異なった様式の消失・骨化が同時に起きていると考えられる。メッケル軟骨は、下顎骨、耳小骨、靭帯など部位によって異なった組織になることから、それぞれの領域に適した様式で消失し、その領域に必要な組織に変化・再分化できる特殊な組織であると考えられる。

文 献

- 1) Y.Sakakura et al. : Immunolocalization of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in Meckel's cartilage compared with developing endochondral bones in mice. Anat., vol.207 : 325-337,2005.

顔面動脈の屈曲と走行に関する 形態学的研究

43080024 栗原 加奈子

指導教員：土門卓文（口腔解剖学第一）

A Morphological Study of Curve and

Direction of Human Facial Artery

43080024 Kanako Kurihara

Directed by T. Domon (Oral Anatomy)

キーワード：顔面動脈、屈曲、走行

Keywords: human facial artery, curve, direction

緒 言

顔面動脈の屈曲と走行は様々である。山本¹⁾は顔面動脈の屈曲と走行の形態について、屈曲を直型、軽屈型、屈型、強屈型の4つに分類した。小林ら²⁾は顔面動脈の走行に関して、走行を眼角部に達していないもの、眼角部に達するもの、上下唇動脈までのもの、下唇動脈までのものの4つに分類した。

山本¹⁾は屈曲に関して、加齢とともに、屈型、強屈型が多く見られるようになると報告している。小林ら²⁾は走行について、加齢に関わらず、眼角部に達していないものが多く見られると報告している。しかしながら、顔面動脈の屈曲や走行が年齢の違いによりどのような分布を示すかについては未だよく理解されていない。市川³⁾は解剖体2体の左・右側4例を用いて顔面動脈の屈曲と走行の形態について観察を行い、山本¹⁾の報告と比較したが、その観察数は十分なものではない。今回、著者は解剖体4体の左・右側8例を用いて顔面動脈の屈曲と走行の形態について観察し、山本¹⁾の報告と比較し、検討を行った。

方 法

北海道大学大学院歯学研究科・口腔機能学講座・口腔機能解剖学教室に保管されていた解剖体4体（男性：86歳、82歳、女性：77歳、93歳）の左・右側の頭頸部、計8例を用いた。

顔面動脈剖出後、各解剖体においてそれぞれ左右側8面の顔面動脈の屈曲と走行の形態を目視下で観察した。顔面動脈の屈曲の分類は山本¹⁾に、走行は小林ら²⁾の分類に従った。

屈曲は、直型（顔面部全長が真っ直ぐ）、軽屈型（顔面部全長がわずかに弯曲）、屈型（顔面部全長が強く

屈している）、強屈型（顔面部全長の変化が更に強度なもの）に分類した（図1）。

走行は、1型（眼角部に達しないもの）、2型（眼角部に達するもの）、3型（上下唇動脈まで達するもの）、4型（下唇動脈まで達するもの）に分類した（図2）。

分類された顔面動脈の屈曲と走行の型は左・右側別に整理され、その後、集計した（表1）。得られた結果は、屈曲（直、軽屈、屈、強屈）と走行（1、2、3、4型）の2つに分け、左・右側8面におけるそれらの頻度について検索した。

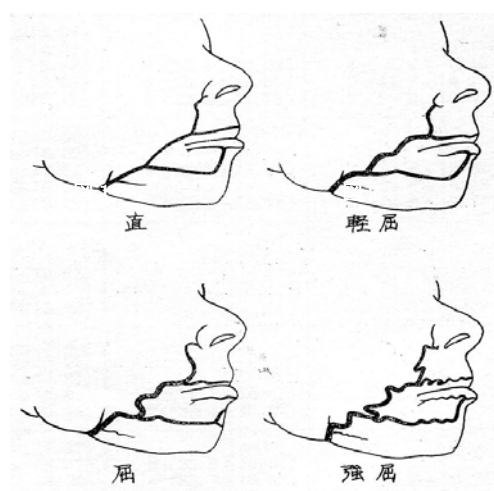


図1： 顔面動脈の屈曲型

- 直 型（顔面部全長が真っ直ぐなもの）
- 軽屈型（顔面部全長がわずかに弯曲しているもの）
- 屈 型（顔面部全長が強く屈しているもの）
- 強屈型（顔面部全長の変化が更に強度なもの）

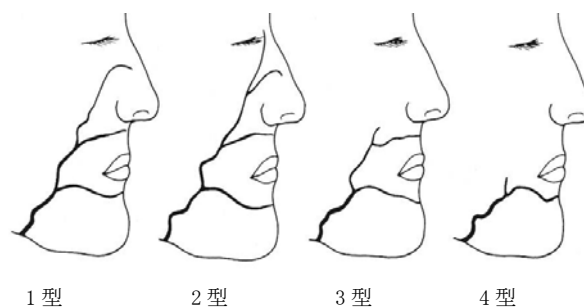


図2： 顔面動脈の走向型

- 1型（眼角部に達しないもの）
- 2型（眼角部に達するもの）
- 3型（上下唇動脈まで達するもの）
- 4型（下唇動脈まで達するもの）

結 果

各側面における顔面動脈の屈曲型と走行型を表 1、表 2 に示す。

直型は 82 男・左側、屈型は 77 女・右側、強屈型は 86 男・左・右側、77 女・左側、82 男・右側、93 女・左・右側で観察された。

走行型では 1 型(眼角部に達しないもの)は 77 女・左側、82 男・左側で、2 型(眼角部に達するもの)は 86 男・左・右側、77 女・右側、93 女・左側で、3 型(上・下唇動脈まで達するもの)は 82 男・右側、93 女・右側で、観察された。

	直型	軽屈型	屈型	強屈型
右側	n=0	n=0	n=1	n=3
左側	n=1	n=0	n=0	n=3

n = 8

表 1：左右側における屈曲型数

	1 型	2 型	3 型	4 型
右側	n=0	n=2	n=2	n=0
左側	n=2	n=2	n=0	n=0

n =8

表 2：左右側における走行型数

考 察

本研究において、顔面動脈の屈曲型については、直型が左側で 1 例、屈型が右側で 1 例、強屈型が右側で 3 例、左側で 3 例観察された。これらの結果より強屈型が全側面において高頻度で観察されたことになる。山本¹⁾は、加齢に伴い屈型～強屈型が多く見られると報告している。本研究で観察した解剖体の年齢は 70 歳以上であり、この結果は山本¹⁾の研究の結果と同様であり、このことは加齢に伴い(特に 70 歳以上で)顔面動脈は屈曲し、屈型～強屈型が多く見られるようになることを示唆している。

顔面動脈の走行型について、小林ら²⁾は 1 型(眼角部に達しないもの)が 65%と半数以上の頻度で見られると報告している。本研究では 1 型が 2 例、2 型が 4 例、3 型が 2 例観察され、小林ら²⁾の報告とは異なった結果が得られた。この要因の 1 つとして観察数が 8 例と非常に少ないことが考えられる。今後、症例数を増やして 1 型の出現頻度について調査すべきと思われる。

結 論

1. 70 歳以上の解剖体では顔面動脈の屈曲は屈型や強屈型が観察された。
2. 顔面動脈の走行は個体により様々であった。

引 用 文 献

- 1) 山本 章. 顔面動脈浅側頭動脈の解剖学的研究. 第 2 編 年齢学的形態変化並びに弾性変化に就て, 歯科学報 57: 1~23, 1957.
- 2) 小林茂夫, 池野谷達雄, 北川 正, 太田義邦. 歯学生のための解剖学実習, 南光堂, 1990.
- 3) 市川真理子. 顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究, 北海道大学歯学部 6 年生 41 期生(平成 23/24 年度)研究実習論文報告集 13: 5-6, 2013

口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

43080032 ジョン ミギョン

指導教員：土門卓文（口腔解剖学第一）

Anatomical Study of the Direction
of the Palatine Nerves

43080032 Mikyung Jung

Directed by T. Domon (Oral Anatomy)

キーワード：大口蓋神経、口蓋棘

Keywords: greater palatine nerves, palatine spine

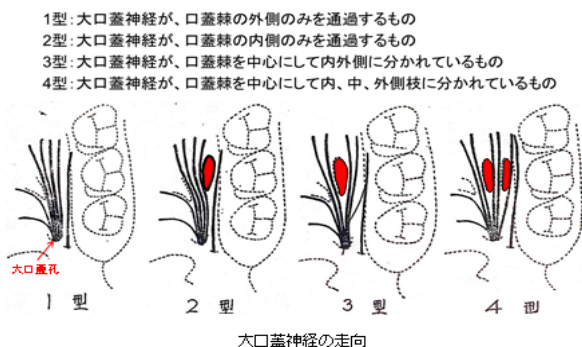


図1 大口蓋神経の走行の諸型

緒言

口蓋領域は歯科臨床において日常診療の対象となる部位であり、疾患等の診断に際して、解剖学的に豊富な知識が求められる領域である。口蓋神経、特に硬口蓋の知覚を支配する大口蓋神経の走行に関しては、国島¹⁾はその走行を4つに分類し、それらの出現頻度について報告している。中富²⁾は解剖体2体の左・右側の大口蓋神経の走行4例について観察し、その走行は様々であったと報告している。しかしながら、この観察数は十分な数ではない。今回、著者は解剖体4体の左・右側8例を用いて口蓋領域を詳細に剖出し、大口蓋神経の走行について肉眼的に観察し、過去の報告と比較・検討を行った。

方法

北海道大学大学院歯学研究科・口腔機能学講座・口腔機能解剖学教室に保管されていた解剖体4体（男性：86歳、82歳、女性：77歳、93歳）の左・右側の頭頸部、計8例を用いて、大口蓋神経の走向について観察した。

大口蓋神経は大口蓋孔を出た後、硬口蓋を前走する。その際、大口蓋孔の前方にある口蓋棘（骨の隆起部）によって2分されることが多い。今回、国島¹⁾の分類に従い、1～4型に分類した。

結果

大口蓋神経の走行に関しては、88歳男性の左側は口蓋棘の外側のみを通過する1型を、93歳女性左・右側、82歳男性右側は口蓋棘の内側のみを通過する2型を、77歳女性の左・右側は口蓋棘を中心に内側と外側に分かれる3型を。86歳男性左・右側は口蓋棘を中心に内、中、外側に分かれる4型を示した(表1)。

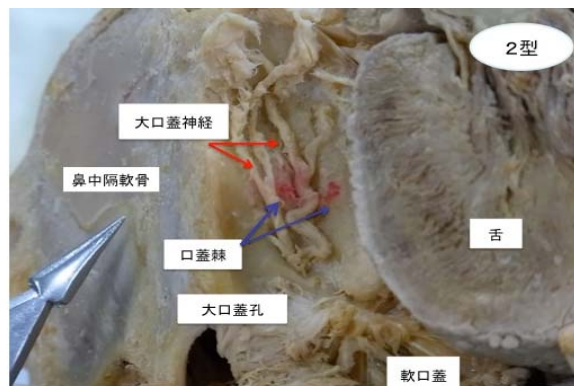


図2 大口蓋神経の走行 93歳女性右側顔面部

大口蓋神経は口蓋棘の内側のみを通過する2型を示している。

国島の報告	男 性		女 性		%
	右側	左側	右側	左側	
1型	5.4	6.1	25.0	0	
2型	0	3.0	0	0	
3型	89.2	81.8	50.0	83.3	
4型	5.4	9.1	25.0	16.7	

今回の結果	男 性		女 性	
	右側	左側	右側	左側
1型		◎		
2型	◎		◎	◎
3型			◎	◎
4型	◎	◎		

表 1 : 大口蓋神経の走行

考 察

大口蓋神経の走行について、国島¹⁾は男性・女性ともに左・右側において3型が半数以上の高頻度で観察されると報告している。今回の結果では、3型に関しては女性の左・右側2例しか観察されず、他は1型から4型まで様々であった。この結果は男性・女性ともに国島¹⁾の報告とは異なる結果を示している(表1)。この要因の1つとして観察数が8例と非常に少ないことが考えられる。今後、症例数を増やして3型の出現頻度について調査すべきと思われる。

本研究で観察した口蓋棘の解剖学的名称を記載する解剖学の教科書は少なく、本邦においては、脇田・山下³⁾の「口腔解剖学」において、その名称が記載されているが、その意義については不明な点が多い。大口蓋神経が通る骨口蓋の口蓋溝に連続して上顎骨の表面では口蓋棘が棘状または稜状に隆起し、この間を大口蓋神経が走行している。それゆえ、このような骨で神経が保護されているような構造は上顎骨の眼窩下管、下顎骨の下顎管に相当するものと思われ、咀嚼による神経障害を防ぐ役割をもつものと推測される。

結 論

1. 大口蓋神経の走行は、性別、年齢に関わらず、様々な走行を示した。

引 用 文 献

- 1) 国島義郎. 口蓋神経の解剖学的研究、歯科学報 58 : 1-13, 1958
- 2) 中富貴大. 口蓋神経の走行に関する解剖学的研究. 北海道大学歯学部6年生41期生(平成23/24年度)研究実習論文報告集13 : 9-10, 2013
- 3) 脇田 稔、山下靖雄 監修. 口腔解剖学、医歯薬出版、2009.

顎動脈と下歯槽動脈に関する 形態学的研究

43080035 田川 博英

指導教員：土門卓文（口腔解剖学第一）

A Morphological Study of Maxillary
and Inferior Alveolar Artery

43080035 Hakuei Tagawa

Directed by T. Domon (Oral Anatomy)

キーワード：顎動脈、下歯槽神経

Keywords: maxillary artery, inferior alveolar artery

緒 言

宝田¹⁾は顎動脈と下歯槽動脈に関する研究として、顎動脈の起始部と下顎枝後縁との位置関係、下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係について詳細に報告した。吉田²⁾は解剖体2体（左・右側、合計4例）を用いて、それらの位置関係について宝田の報告と比較・検討し報告したが、その症例数は十分なものではない。今回、著者は解剖体4体（左・右側、合計8例）を用いて、宝田の報告と比較し、検討を行った。

方 法

北海道大学大学院歯学研究科・口腔機能学講座・口腔機能解剖学教室に保管されていた解剖体4体（82歳男性、86歳男性、77歳女性、93歳女性）のそれぞれ左右の頭頸部、計8例を用い、外顎動脈からの顎動脈の起始部と下顎枝後縁との位置関係、顎動脈の枝である下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係の2項目について観察した。

位置関係の分類は宝田¹⁾の報告に従い、顎動脈の起始部と下顎枝後縁との位置関係を1型（下顎枝後縁の上1/5部分で起こるもの）、2型（下顎枝後縁の上2/5部分で起こるもの）、3型（下顎枝後縁の

ほぼ中央で起こるもの）、4型（下顎枝後縁の下2/5部分で起こるもの）に分類した（図1）。

下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係の分類も宝田¹⁾の報告に従い、前方型（下歯槽動脈が下歯槽神経の前方にあるもの）、外側型（下歯槽動脈が下歯槽神経の外側にあるもの）、後方型（下歯槽動脈が下歯槽神経の後方にあるもの）に分類した（図2）。

解剖体において顎動脈と下歯槽動脈を剖出し、上記の分類中、どの型に当てはまるかを観察した。

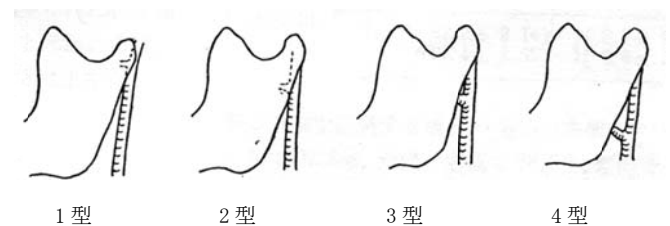


図1：顎動脈の下顎枝後縁に対する位置関係

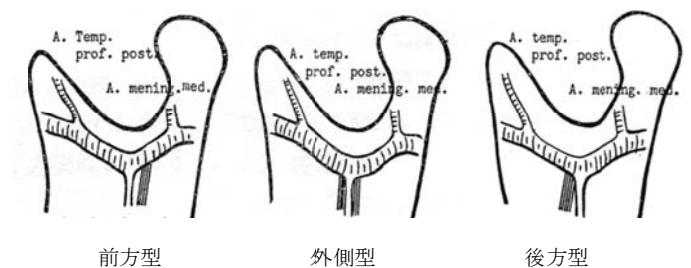


図2：下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係

結 果

顎動脈と下顎枝後縁との位置関係では、82歳男性と86歳男性が両側とも2型、93歳女性では左側が1型で右側が2型、77歳女性は両側とも3型が観察された（表1）。

下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係は、86歳男性と93歳女性では両側とも後方型、77歳女性右側と82歳男性左側が外側型、77歳女性左側と82歳男性右側は前方型が観察された（表2）。

考 察

表 1 は顎動脈と下顎枝後縁との位置関係について、宝田¹⁾の報告と今回の結果を表にして示したものである。宝田¹⁾は男性、女性ともに 2 型が 70%以上の頻度で観察されると報告している。今回の結果は 82 歳男性と 86 歳男性では両側とも 2 型、77 歳女性では両側とも 3 型、93 歳女性は左側が 1 型で右側が 2 型が観察された。男性では宝田¹⁾の報告と同様の結果が得られたが、女性では異なる結果となった。

宝 田 (1958)	男 性		女 性		%
	右側	左側	右側	左側	
1 型	7.7	21.2	11.1	14.3	
2 型	84.6	73.1	77.8	71.4	
3 型	7.7	3.8	11.1	14.3	
4 型	0	1.9	0	0	

今回の結果	男 性		女 性	
	右側	左側	右側	左側
1 型				⊙
2 型	⊙ ⊙	⊙ ⊙	⊙	
3 型			⊙	⊙
4 型				

表 1：顎動脈と下顎枝後縁との位置関係

上段は宝田の結果を、下段は本研究の結果を示す。

n = 8

宝田 (1958)	男 性		女 性		%
	右側	左側	右側	左側	
前方型	57.7	50.0	55.6	42.9	
外側型	17.5	22.0	22.2	42.9	
後方型	25.0	25.0	22.2	14.3	

今回の結果	男 性		女 性	
	右側	左側	右側	左側
前方型	⊙			⊙
外側型		⊙	⊙	
後方型	⊙	⊙	⊙	⊙

表 2：下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係

上段は宝田の結果を、下段は本研究の結果を示す。

n = 8

表 2 は下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係について、宝田¹⁾の報告と今回の結果を表にして示したものである。宝田¹⁾は男性、女性ともに前方型が約 50%の頻度で観察されると報告している。今回の結

果は 82 歳男性は右側が前方型で左側が外側型、86 歳男性は両側とも後方型、77 歳女性は右側が外側型で左側が前方型、93 歳女性は両側とも後方型が観察され、ばらつきがみられた。

本研究において、顎動脈と下顎枝後縁との位置関係、並びに下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係について、宝田¹⁾の報告と異なる結果が得られた。その原因の一つとして、本研究では 4 体の解剖体、左右計 8 例しか観察しておらず、症例数が少ないことが考えられる。今後症例数を増やし、どのような分布になるかを調査していきたい。

結 論

1. 顎動脈と下顎枝後縁との位置関係は男性では 2 型が多く観察されたが、女性では様々であった。
2. 下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係は個体により様々であった。

引 用 文 献

- 1) 宝田 忠. 日本人顎動脈の解剖学的研究. 歯科学報、58：1-19、1958.
- 2) 吉田 昂司. 顎動脈に関する形態学的研究. 北海道大学歯学部 6 年生 41 期生 (平成 23/24 年度) 研究実習論文報告集 13：15-16、2013

エタノール浸漬固定における 固定液濃度が組織標本に与える影響

43080038 谷 脇 裕 人

指導教員：高橋 茂(口腔解剖学第一)

Effect of Ethanol Fixation under Various Concentration

43080038 Hiroto TANIWAKI

Directed by Takahashi.S

(Oral Anatomy 1)

キーワード：エタノール浸漬固定、固定液濃度

Key word: Ethanol fixation, Concentration of ethanol

緒 言

固定の目的は、組織や細胞の自家融解による腐敗をおさえて、生きていた状態になるべく近い状態の組織や細胞の種々の構造をとらえることである¹⁾。固定液は濃度、温度、固定時間といった様々な条件より固定効果が左右される¹⁾。今回の実験では、組織化学の代表的固定液であるエタノールを用いて、固定液濃度と得られる組織標本との関係について検討した。

材料と方法

実験動物には、Wistar 系雄性ラット(8週齢)を2匹用いた。

ジエチルエーテル吸入による全身麻酔下にてラットから肝、顎下腺を摘出し、1, 10, 50, 100%のエタノール溶液に浸漬固定した。固定時間は2時間、24時間とした。固定が終了したのち、切り出しを行い、上昇エタノール系列による脱水、クロロホルムによる置換をし、パラフィンブロックを作製した。次にミトクロームを用いて4 μ m 厚に薄切した。その後、HE染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。

結 果

I 肝

2時間固定の標本は、どの濃度でも不良であった。標本内に大きな裂隙が不規則に生じ(1%)、肝細胞索が収縮し、類洞が拡張し(10%、50%)(図1)、三つ組には、強い収縮傾向が認められ、周囲組織との間に空隙が生じていた(100%)。低濃度で24時間固定したものも不良

で、基本的には上記と同様の像を示していた。一方、高濃度で固定したものでは、三つ組の収縮が軽度であり(50%)、肝細胞索や肝類洞の構造が保たれていた(100%)。

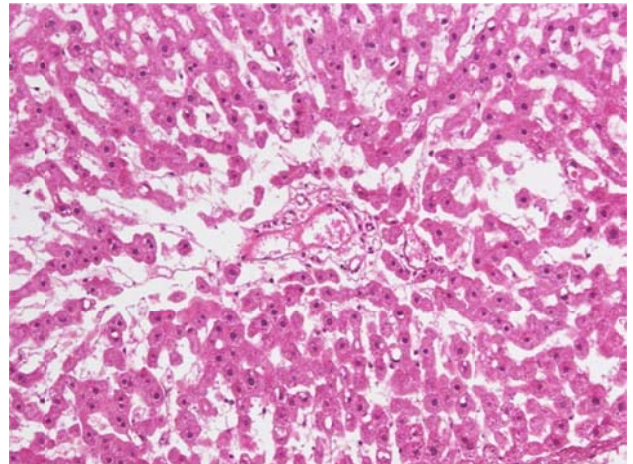


図1：50%エタノールで2時間固定した肝

II 顎下腺

低濃度で固定した標本は、固定時間にかかわらず不良であった。2時間では、腺房細胞内の分泌顆粒はほとんど消失しており(1%)、導管の線条部を構成する細胞のほとんどは崩壊していた(10%)。24時間では、ほとんどの構造がほぼ崩壊し、外形が痕跡的にみられるに過ぎなかった。(1%、10%)(図2)。高濃度で固定した標本で、2時間で固定したものは、腺房細胞内の分泌顆粒の量が認められ(50%)、腺房や導管の収縮が軽度となり、空隙が目立たなくなった(100%)。24時間50%で固定したものは、腺房、導管、顆粒管といった組織を構成する細胞の外形が保存されており、比較的良好な標本であった(図3)。

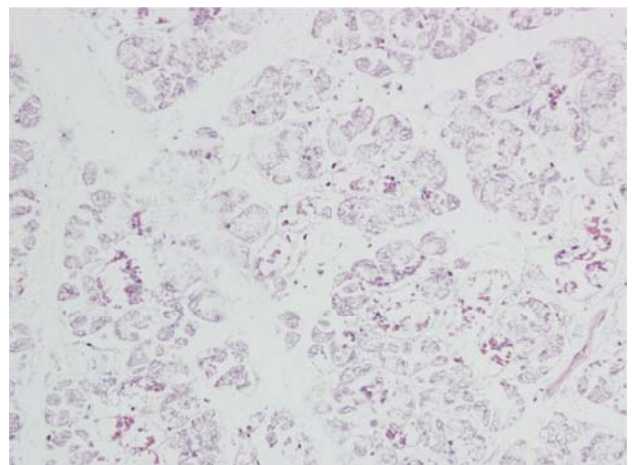


図2：10%エタノールで24時間固定した顎下腺

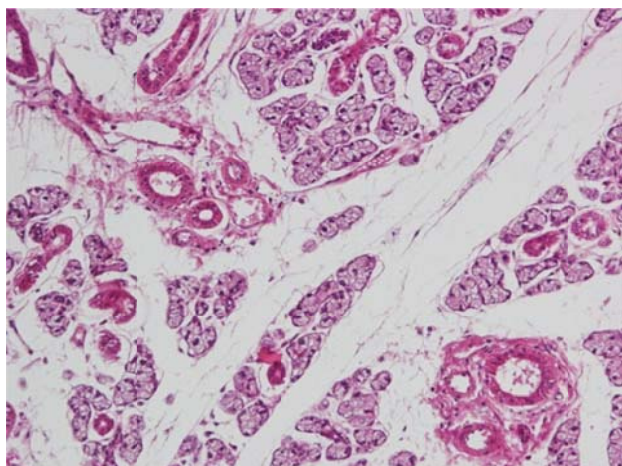


図3：50%エタノールで24時間固定した顎下腺

以上の所見をまとめたのが、表1である。

肝

	2時間	24時間
1%	×	×
10%	×	×
50%	×	△
100%	×	△

顎下腺

	2時間	24時間
1%	×	×
10%	×	×
50%	△	○
100%	△	△

表1：組織学的所見

◎：良い ○：やや良い △：やや悪い ×：悪い

考 察

本研究では低濃度の固定液では収縮傾向の強い標本ができた。これまでに、アルコール濃度が低いほど、組織が収縮するという報告²⁾があるが、本研究の結果はこれに一致している。アルコールを固定液とした場合、組織に含まれる水分と脂質が溶出することによって強い収縮と硬化が起こる²⁾。固定液の濃度が低い場合には、含まれる水分が多いため、組織内の水分が早く溶出しやすく、収縮傾向が強くなったのであろうと考えられる。また、低濃度エタノールより高濃度エタノールで固定した標本のほうが、いくらか良好ではあったが、顎下腺の50%24時間の条

件でしか比較的良好な標本が得られなかった。このことは、エタノール固定では形態良好な標本を得ることが困難であることを示していると考えられる。その原因には、先に述べたアルコールの固定機序、すなわち水分と脂質の溶出が関係しているかもしれない。

固定時間の違いに着目してみると、2時間より24時間の方が組織の種類にかかわらず良い標本を得られる傾向にあった。浸漬固定においては、固定液は組織片の表面から次第に浸透していくと言われており²⁾、短時間の固定ではアルコールの浸透性が不十分であったためにこのような結果が得られたと考えられる。また、組織の辺縁と中央部の組織像の違いがあったのも同様な理由であると考えられる。

今回の研究では実質臓器である顎下腺と肝を用いて標本作製したが、肝よりも、顎下腺の方が比較的良好な標本が得られる場合が多かった。この結果、固定効果は対象組織によって異なるであろうということを示している。本研究で用いた2つの組織についてその理由を考察してみる。顎下腺は、比較的疎な結合組織で覆われているが、肝の表面は結合組織と単層扁平の中皮細胞が表層を覆っている³⁾。この組織構造の違いからこのような差が生じたのではないかと考えられる。疎な結合組織のみでは固定液が組織内に浸潤しやすく、また組織に含まれる水分と脂質の溶出も比較的起こりやすかったのであろうと推測される。

本研究の結論として、エタノール固定では形態の良好な標本を得るのは難しいが、エタノール固定をする場合において、固定液濃度が薄い場合は良好な標本は得られないが、濃い場合には比較的良好な標本を得られる傾向にあると考えられる。

参考文献

- 1) 三友 善夫、高山 昇二郎：臨床検査講座12病理学第2版、医歯薬出版、東京、1979、167-171項
- 2) 佐野 豊：組織学研究法 第6版、南山堂、1985、64-65項
- 3) 藤田 尚男、藤田恒夫：標準組織学 第3版、医学書院、2010、104-109、149項

舌神経に関する形態学的研究

43080055 宗山 昂史

指導教員：土門卓文（口腔解剖学第一）

Morphological Studies of Lingual Nerve

43080055 Takafumi Muneyama

Directed by T. Domon (Oral Anatomy)

キーワード：舌神経、鼓索神経

Keywords: lingual nerve, chorda tympani



図 1： 舌神経の起始、鼓索神経との吻合位置の諸型
舌神経の起始型(上)
舌神経と鼓索神経の吻合位置型(下)

緒 言

下顎神経の枝である舌神経に関して、矢木ら¹⁾は、舌神経の起始、舌神経と鼓索神経の吻合位置について詳細に報告している。南²⁾は解剖体 2 体（左・右側頭頸部、計 4 例）を用いて舌神経の起始、舌神経と鼓索神経の吻合位置を観察し、それらの走行や形態について矢木ら¹⁾の報告と比較し検討を行ったが、その観察数は十分なものではない。今回、著者は解剖体 4 体の左・右側 8 例を用いてそれらの検討を行った。

方 法

北海道大学大学院歯学研究科・口腔機能学講座・口腔機能解剖学教室に保管されていた解剖体 4 体（男性 86、82 歳、女性 77、93 歳、左・右側、計 8 例）を用いた。解剖体の観察は舌神経の起始、舌神経と鼓索神経の吻合位置について行った。

舌神経の起始は矢木ら (1961)¹⁾ の分類型に従い、下顎神経から下歯槽神経と舌神経が分かれる起始を上方型（耳神経節付近）、中間型（耳神経節と下顎孔間の上 1/3）、下方型（耳神経節と下顎孔間の中 1/3）の 3 型に分類した（図 1）。

舌神経と鼓索神経の吻合位置は矢木ら (1961)¹⁾ の分類型に従い、上 1/3 型（耳神経節と下顎孔間の上 1/3）、中 1/3 型（耳神経節と下顎孔間の中 1/3）、下 1/3 型（耳神経節と下顎孔間の下 1/3）の 3 型に分類した（図 1）。

今回観察した 8 例は矢木ら¹⁾ の報告に従い分類し、比較・検討した。

結 果

舌神経の起始に関しては、86 歳の男性左・右側、82 歳男性左・右側、93 歳女性左・右側、77 歳女性左側の 7 例が上方型を示し、77 歳女性左側は下方型を示し、中間型は 1 例も観察されなかった（表 1）。

舌神経と鼓索神経の吻合位置については、86 歳の男性左・右側、82 歳男性左・右側、93 歳女性左・右側、77 歳女性右側の 7 例が上 1/3 型を示し、77 歳女性右側は下 1/3 型で、中 1/3 型は 1 例も観察されなかった（表 2）。

上段に矢木らの結果、下段に今回の結果を示す

矢木ら (1961)

上方型	48.4%
中間型	46.9%
下方型	4.7%

今回の結果

上方型	7
中間型	0
下方型	1

(n=8)

表 1：舌神経の起始

上段に矢木らの結果、下段に今回の結果を示す

矢木ら (1961)

上 1/3 型	55.7%
中 1/3 型	39.4%
下 1/3 型	4.9%

今回の結果

上 1/3 型	7
中 1/3 型	0
下 1/3 型	1

(n=8)

表 2：舌神経と鼓索神経の吻合位置

上段に矢木らの結果、下段に今回の結果を示す

考 察

本研究において舌神経の起始については上方型が 8 例中 7 例に観察され、中間型は観察されなかった。舌神経の起始について、矢木ら¹⁾は上方型と中間型が同程度に、約半数程度の頻度で観察されると報告している(表 1)。本研究の結果は上方型のみが多く観察され、中間型が観察されなかったことから矢木ら¹⁾の報告とは異なる結果となった。

本研究における舌神経と鼓索神経の吻合位置は上 1/3 型が 8 例中 7 例に観察され、中 1/3 型は観察されなかった。矢木ら¹⁾は、上 1/3 型が 55.7%、中 1/3 型が 39.4%で観察されると報告しており(表 2)、本研究の結果は上 1/3 型のみが多く観察され、中間型が観察されなかったことから、矢木ら¹⁾の報告とは異なる結果となった。

以上の本研究における結果は、矢木ら¹⁾の結果とは大きく異なっている。その原因の一つとして解剖体の被検体数が 8 例と少なかったことが挙げられる。今後、被検体数を増やしてデーターを正確にしていけることを今後の検討課題としたい。

結 論

1. 舌神経の起始は上方型が多く観察された
2. 舌神経と鼓索神経の吻合位置は上 1/3 型が多く観察された

引 用 文 献

- 1) 矢木庄司、渡辺 裕、柳 義文、風馬照太郎.
日本人下歯槽神経・舌神経の解剖学的研究、口腔解剖研究、19：1961.
- 2) 南 季未恵. 下顎神経に関する形態学的研究、北海道大学歯学部 6 年生 41 期生(平成 23/24 年度)研究実習論文報告集 13：13-14, 2013

エタノール浸漬固定における固定時間が 組織標本に与える影響

43080059 山田 実生

指導教員：高橋 茂（口腔解剖学第一）

Effects of Ethanol Fixation under Various Fixation Time

43080059 Miki YAMADA

Directed by Takahashi S

(Oral Anatomy I)

キーワード：エタノール浸漬固定、固定時間、組織標本
Key Words: Ethanol, Fixation time, Histological specimen

諸言

標本作製において固定は組織や細胞の自己融解による腐敗を抑えるために行われる重要な過程である¹⁾。今日20種類ほどの固定液が使用されていて、それぞれに最適固定時間・温度・濃度があり、これにより固定の効果が左右されるとされている²⁾。

本研究では固定液としてもっとも古くから使われている³⁾エタノールを用いて浸漬固定を行ったとき、固定時間が組織標本に与える影響を検討した。

材料と方法

本研究では実験動物として、8週齢のWistar系雄性ラットを2匹用いた。

エーテルによる全身麻酔下にて、ラットより肝、顎下腺を摘出した。固定液は50%、100%のエタノールを用意し、それぞれに各試料を1, 2, 6あるいは24時間浸漬した。その後上昇エタノール系列による脱水、クロロホルムによる置換を経て、パラフィンに包埋した。次にマイクロトームを用いて4μm厚の切片を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色後、光学顕微鏡にて観察した。

結果

(I) 肝について

50%エタノールでは6時間以内の固定において形態不良となった。肝細胞索が収縮し類洞が拡張しており、肝細胞の核は収縮し大小不揃いとなっていた。三つ組みは比較的保たれているが収縮しており周囲組織との間に空隙を生じていた。また、肝細胞が希薄で個々の細胞が分離して

索状構造を保っていない部分が認められた(図1)。24時間固定でも形態不良の部分が多かったが、細胞が希薄な部分がなく、全体に肝細胞索が保たれていた。

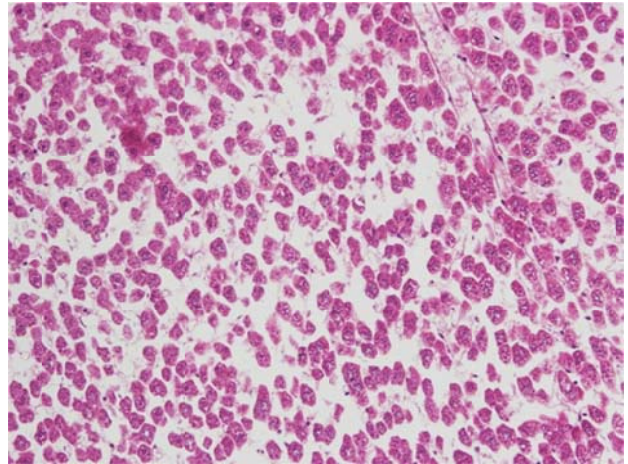


図1：50%エタノールで1時間固定した肝

100%エタノールでは2時間以内の固定において形態不良で50%の短時間固定と同様の組織像が見られた。一方6時間では肝細胞が希薄な部位が見られず、全体に肝細胞索や小葉間導管の管腔構造が保たれていた。24時間でも標本内部は均一に染色されており、三つ組みと周囲の肝細胞との間の空隙が減少していた(図2)。

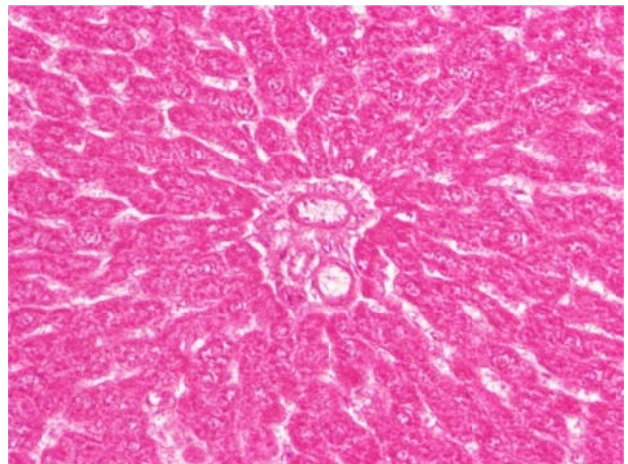


図2：100%エタノールで24時間固定した肝

(II) 顎下腺について

50%エタノールでは2時間以内の固定において形態不良となった。標本全体に強く収縮し、漿液性腺房細胞の分泌顆粒が消失し、核も痕跡的にしか認められなかった(1時間)。また、各種導管も崩壊し断裂していた(2時間)。一方6時間以上では形態不良の部分が多いものの、小葉間導管の形態が比較的保たれているものも認められ(6時間)、腺房細胞の分泌顆粒が保存されていた(24時間)。

100%エタノールでは6時間以内の固定において形態不

良であった。漿液腺房細胞は収縮し、細胞質の内容物は消失し、細胞質内は空隙となっていた（1時間）（図3）。線条部は外形を保っているものもあるが断裂しているものが多かった（2、6時間）。一方24時間では各構造に大きな変形は見られず、腺房細胞の外形や核は比較的保たれていた。小葉間導管などの大きい構造も比較的形態良好であった。

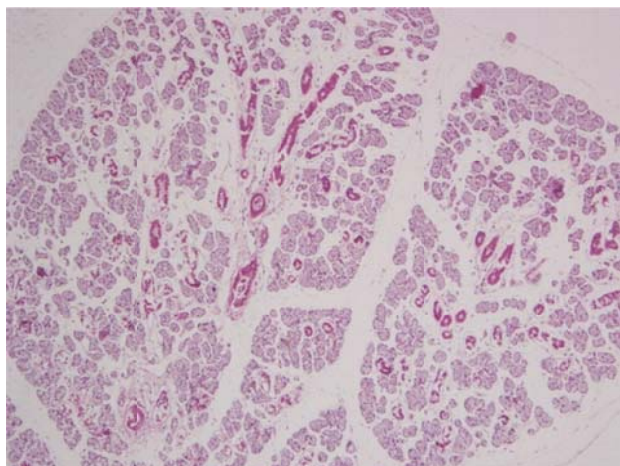


図3：100%エタノールで1時間固定した顎下腺

以上の所見をまとめたものが表1である。

	肝		顎下腺	
	50%	100%	50%	100%
1時間	×	×	×	×
2時間	×	×	×	×
6時間	×	△	△	×
24時間	△	△	△	△

表1 組織学的所見

◎：良好 ○：やや良好 △：やや不良 ×：不良

考察と結論

アルコールによる固定は親水性の蛋白質についている水が脱水作用を受けて離れ、蛋白質分子そのものには重大な変化が起こらずに互いに付き合うことによって起こる。したがってエタノールを固定液として用いると強力な脱水と脂質の溶解がおこり組織や細胞に強い収縮が発生するとされている⁴⁾。本研究で作製した組織標本でも程度の差はあるもののすべての条件において収縮がみられ、上記のことが確認された。

本研究では、エタノール固定においては固定時間は長いほうがより良好な組織像が得られるという結果がとなっ

た。これは組織内部までエタノールが浸透するまでに時間がかかったためではないかと考えられる。一方で横瀬によると、エタノール固定において形態良好な標本を得る浸漬固定時間は2～4時間であるという⁵⁾。浸漬固定を行う場合、組織の厚みによって適切な固定時間が異なる⁴⁾ので横瀬の研究で使用した組織より今回使用した標本が厚かったためではないかと考えられる。

また長時間固定において肝では100%、顎下腺では50%のほうが良い結果が得られた。中谷の考察⁶⁾によると50%以上の濃度では比較的良好的な標本が得られたが組織の種類によっては高濃度アルコールは不適切なのかもしれないとしている。本研究の結果はこれを支持するものと考えられる。この理由は明らかでないが、顎下腺は分泌組織であり肝に比べ組織内に水分を多く含んでいる。すなわち組織内に水を多く含む組織において高濃度アルコールは不適切なのかもしれない。

本研究の結論としてエタノール浸漬固定では浸漬時間が長いほど良い標本が得られることが示された。

参考文献

- 1) 春日 孟：新編 臨床検査講座 20 病理学・病理組織細胞学、第1版、医歯薬出版、東京、1987、233項
- 2) 山田 和順：組織化学 初心者のための基礎と実際 南江堂、東京、1987、23項
- 3) 高川 博敏：臨床検査講座 12 病理学、第2版、医歯薬出版、1979、東京、161項
- 4) 佐野 豊：組織学研究法、第6版、南山堂、東京、1985、65項
- 5) 横瀬 かおる：アルコール浸漬固定における固定時間の影響について 32 期生研究実習論文報告集、北海道大学、2002-2003、63～64項
- 6) 中谷 清美：アルコール浸漬固定における固定濃度の影響について 32 期生研究実習論文報告集、北海道大学、2002-2003、61～62項

体位が咀嚼能率に与える影響

43080001 阿部 一博

指導教官：舩橋 誠

(口腔生理学教室)

Effects of body positions on masticatory performance

43080001 Kazuhiro Abe

Directed by Makoto Funahashi

(Oral Physiology)

キーワード：体位、咀嚼能率、篩分法

Key words : body position, masticatory performance,
sieve method

目的

食事の際に誤嚥しにくい体位として、教科書的にも経験的にも 30 度仰臥位、頭部前屈姿勢が推奨されているが、体位と咀嚼能力の関係については不明である。そこで、本研究においては、体位が咀嚼能率に与える影響について検証し、咀嚼に適した体位を明らかにすることを目的とした。

実験方法

<実験 1>

1. 被験者

健康な成人男女 20 名（男性 19 名、女性 1 名、23～35 歳）を被験者とした。

2. 測定方法

① 体位の設定

リクライニングチェアの背もたれの角度を 90、120、135、150、180（度）とした時の体位をそれぞれ 90、60、45、30、0 度体位とした。なお、被験者の後頭部は背もたれにつけることとした。

② 咀嚼能率の測定（篩分法）

ピーナッツ（3.0g）を 20 秒間咀嚼後、ピーナッツ小片を口腔内に残留がないように吐き出し、10 メッシュ標準ふるいを通過させたものを乾燥させ、重量を計測した（ふるい残留量）。90 度体位において口腔内から回収した全試料の乾燥重量に対する、各体位において計測したふるい残留量の割合を咀嚼値とし、Tukey 法により比較を行った。

<実験 2>

1. 被験者

健康な成人男性（23～35 歳）を被験者とした。

2. 測定方法

非咀嚼側の第一大臼歯に、常温重合レジンで 1mm 程度の厚さになるように筆積みで盛り上げ、90 度体位と 45 度体位におけるふるい残留量を測定、90 度体位において口腔内から回収した全試料の乾燥重量から咀嚼値を測定し、t 検定により比較を行った。

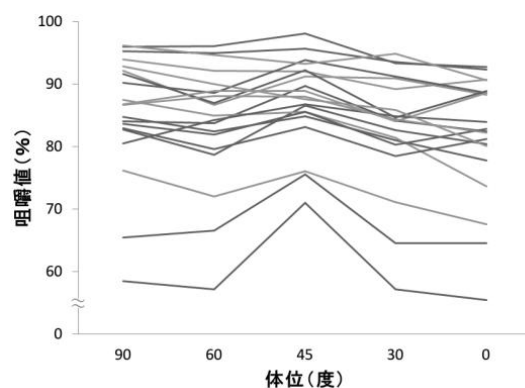


図 1 被験者別の各体位における咀嚼値

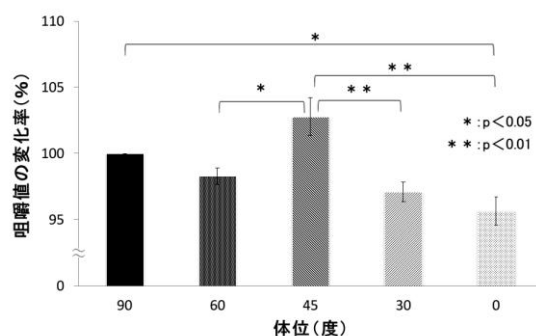


図 2 体位別の咀嚼値の変化率

結果

<実験 1>

20 名中 12 名において、45 度体位における咀嚼値が最大となった。90 度体位を基準とした時の咀嚼値の変化率（各体位における咀嚼値/90 度体位における咀嚼値）は、60 度体位：98.3±0.6%、45 度体位：102.8±1.4%、30 度体位：97.1±0.7%、0 度体位：95.6±1.1%であった（すべて n=20）（図 1、2）。

60、30、0 度体位と比較して、45 度体位時の咀嚼値において有意な増加が認められた。0 度体位と比較して 90 度体位時でも有意な増加がみられた。また、咀嚼値の低い被験者ほど 45 度体位における咀嚼値の向上は顕著であり、90 度体位における咀嚼値と 45 度体位における咀嚼値の変化率との間に負の相関関係があることが示唆された。

<実験 2>

12 名 10 名で咬合挙上により 45 度体位における咀嚼値の増加が認められた。咬合挙上を行っていない場合の 45 度体位における咀嚼値の変化率が 102.8±1.4%（n=20）であるのに対し、咬合挙上を行った場合の変化率は 117.5±5.6%（n=12）であった（図 3）。

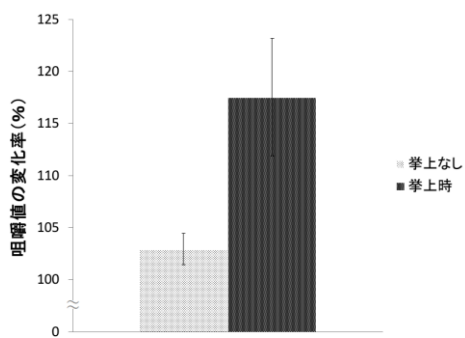


図3 45度体位における咀嚼値の変化率

実験1および2の結果から、90度体位における咀嚼値と45度体位における咀嚼値の変化率との関係をグラフに表した(図4)。Spearmanの順位相関分析より、90度体位における咀嚼値と45度体位における咀嚼値の変化率の間に負の相関関係が認められた($p<0.01$)。

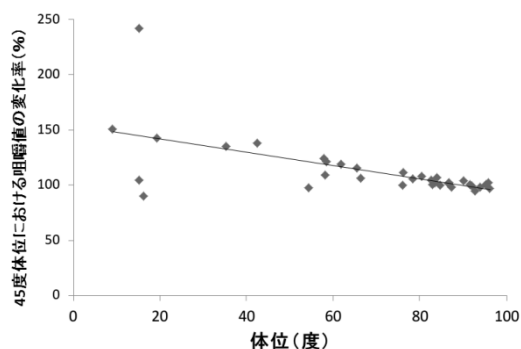


図4 90度体位における咀嚼値と45度体位における咀嚼値の変化率との相関

考察

今回設定した体位のうち、45度体位で咀嚼能率が最も高くなることが示された。また、90度体位における咀嚼能率が低いほど、45度体位において咀嚼能率が高くなる傾向が認められた。これらのことから、45度体位は何らかの形で咀嚼運動を円滑化するのではないかと推察された。

なお、各体位において反復唾液嚥下テストを行い、嚥下能力の測定・比較も行ったが、各体位における嚥下能力に関しては有意差が認められず、咀嚼能率と嚥下能力について相関関係は認められなかった。

今回の実験においては、後頭部を背もたれにつけるよう体位を設定した。一方、誤嚥しにくい体位として臨床的に用いられている30度仰臥位・頭部前屈体位では、背もたれの角度を30度として、顎下に3~4横指が入る程度の頭部を前屈する。今回設定した45度体位と30度仰臥位・頭部前屈体位は、図5に示す通りであった。2つの体位を比較

してみると、45度体位における頭部の角度と30度仰臥位・頭部前屈位の頭部の角度が近似していた。したがって、30度仰臥位・頭部前屈体位は誤嚥しにくいという点のみならず、咀嚼能率の観点からも優れた体位ではないかと推測することができた。

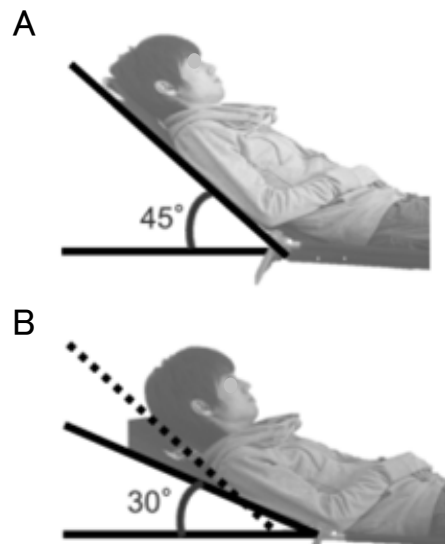


図5 体位の比較

A: 本実験で用いた45度体位

B: 誤嚥しにくい体位として用いられている30度仰臥位・頭部前屈体位

結論

本研究において、咀嚼に最も適した体位は45度体位であり、かつ咀嚼能率の低い者ほど45度体位が効果的であることがわかった。また、45度体位と頭部の角度が近いことから、30度仰臥位・頭部前屈体位が咀嚼に適していることも示された。しかしながら、頭部前屈が咀嚼に及ぼす影響については不明であり、今後明らかにしていきたい。

参考文献

- よくわかる嚥下障害 改訂第3版 藤島一郎 監修: 永井書店
- 摂食・嚥下リハビリテーション 第2版 才藤栄一、向井美恵 監修: 医歯薬出版株式会社
- 基礎歯科生理学 第5版 森本俊文、山田好秋 編: 医歯薬出版株式会社
- 歯科生理学実習 岩田幸一、三枝木泰丈、泰羅雅登、西川泰央 編: 医歯薬出版株式会社

咬合がバランス感覚に及ぼす影響

43080013 小倉 弘之

指導教官：船橋 誠（口腔生理学教室）

Effects of dental occlusion on a sense of balance

43080013 Hiroyuki Ogura

Directed by Makoto Funahashi

キーワード：下顎位，バランス

Key words: dental occlusion, a sense of balance

諸言

咬合あるいは下顎位の変化によって背筋や握力の測定値が上昇することが報告されている。また、上下顎の水平的位置関係が前後左右にずれることでバランス感覚が低下することもよく知られている。

しかし咬合あるいは下顎位の変化とバランスの関係は不明な点が多く、これを明らかにするために実験を行った。

実験方法

被験者は健常人 15 名とし、咬合と下顎位を下顎安静位、最大開口位、噛み締め時、臼歯部 2 mm 拳上時の 4 種の異なる状態に変化させ、それぞれの条件下において両目を閉眼し左脚拳上の姿勢を保持できる時間を測定した。そして各状態における姿勢保持時間を 5 回ずつ計測し平均値を求め、その平均値を下顎安静位における姿勢保持時間の平均値で割った値である変化率を算出し、比較した。

結果

被験者 15 名において、噛み締め時に保持時間が最大となった人が 9 人、2mm 拳上時に最大となった人が 5 人、安静時で最大となった人が 1 人であった。

噛み締め時は下顎安静位、最大開口位に比べて保持時間の変化率が有意に大きくなった。また、2mm 拳上時の保持時間の変化率は最大開口位に比べて有意に大きくなった。安静時と各咬合と下顎位の状態における姿勢保持時間の比較を図 1 に示す。

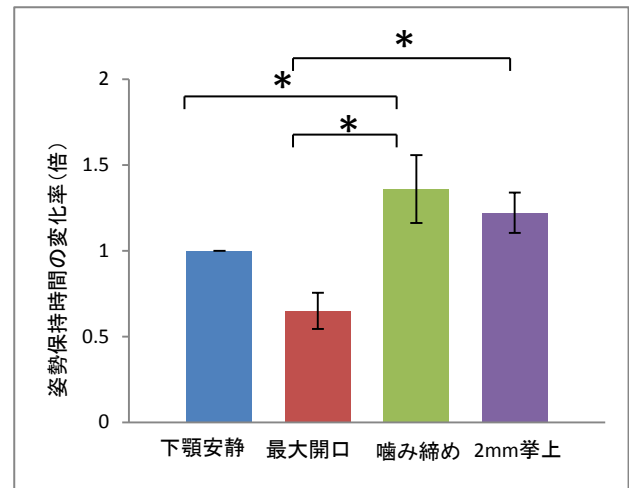


図 1 安静時と各咬合と下顎位の状態における姿勢保持時間の比較

また、アンケートより 2mm 拳上時に成績が向上した 5 人中 4 人が運動時または力を入れる際にクレンチングをする癖があるということが分かった。

考察

結果より、噛み締めることのできる健全歯列が運動時のバランス感覚に重要であると考えられる。また、アンケートより、運動時または力を入れる際にクレンチングをする癖がある場合には咬合を拳上することでバランス感覚が向上すると推察される。よって、運動時にマウスピースを用いて咬合拳上することが運動時または力を入れる際にクレンチングをする癖がある人のバランス感覚を向上させることに有効であるということが示唆された。

参考文献

- 1) スポーツ歯科臨床マニュアル 大山喬史 日本スポーツ歯科学会編集 医学情報社
- 2) 小林義典 咬合と全身の機能との関係 日本補綴歯科学会
- 3) 星野 浩之 顎口腔系の状態と全身状態との関連に関する研究：水平的顎間関係位の変化が背筋力に及ぼす影響 日本補綴歯科学会

軟口蓋と舌尖における苦味閾値の違い

43070008 加藤 純也

指導教官:前澤仁志、舩橋 誠

(口腔機能学講座 口腔生理学教室)

Difference of bitter taste threshold
between soft palate and tip of tongue

43070008 Junya Kato

Directed by Hitoshi Maezawa, Makoto Funahashi

キーワード:軟口蓋、舌尖、苦味

Key words: soft palate, tip of tongue, bitter taste

【緒言】

基本味のうち、塩味、甘味、酸味に関しては、舌尖より軟口蓋の閾値が高いという見解が得られている。しかし、舌尖と軟口蓋の苦み閾値の違いに関しては一定の見解が得られていない^{1), 2)}。本研究では、軟口蓋と舌尖の苦味に対する検知閾値と認知閾値の違いを明らかにする。

【材料・方法】

健常成人 35 名 (男 25 名、女 10 名、20~48 歳) を対象とした。苦味刺激には塩酸キニーネ (30mM) を用いた。濾紙ディスク法 (7×7mm) により、舌尖と軟口蓋の検知閾値と認知閾値を倍々希釈した 9 段階の溶液を用いて計測した。計測部位以外への濾紙の接触を避けるため舌を突出した状態で計測を行なった。被験者を軟口蓋から測定するグループと舌尖から測定するグループの 2 つに分けた。統計解析にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。

【結果】

苦味の検知閾値は、舌尖が 0.57 ± 0.87 (平均値 ± 標準偏差)、軟口蓋が 3.71 ± 2.91 。認知閾値は舌尖が 1.89 ± 1.89 、軟口蓋が 5.17 ± 2.47 であった (図 1)。

軟口蓋の苦味閾値が舌尖より低かったのは検知閾値では 1 人、認知閾値では 3 人であった。検知閾値、認知閾値ともに舌尖が軟口蓋よりも有意に低かった (図 2)。検知閾値、認知閾値ともに性別や測定順序による有意差は認められなかった (図 3)。

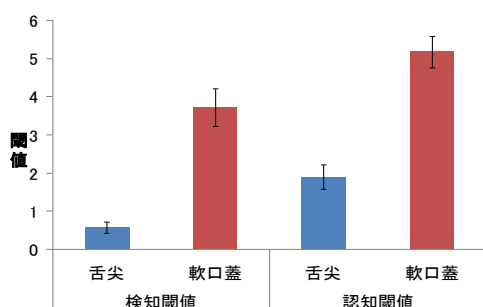


図1 舌尖と軟口蓋における苦味閾値の平均値

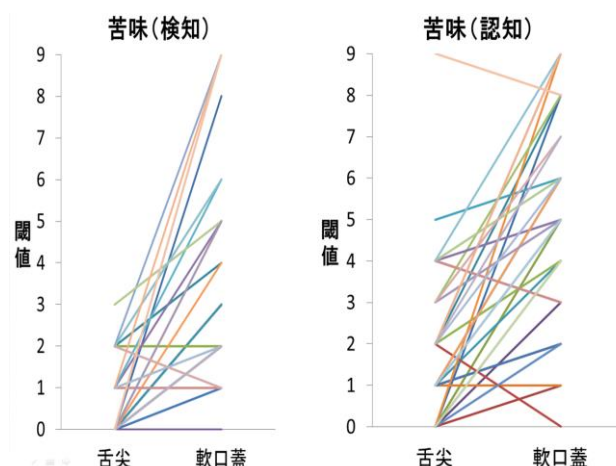


図2 各被験者における苦味閾値

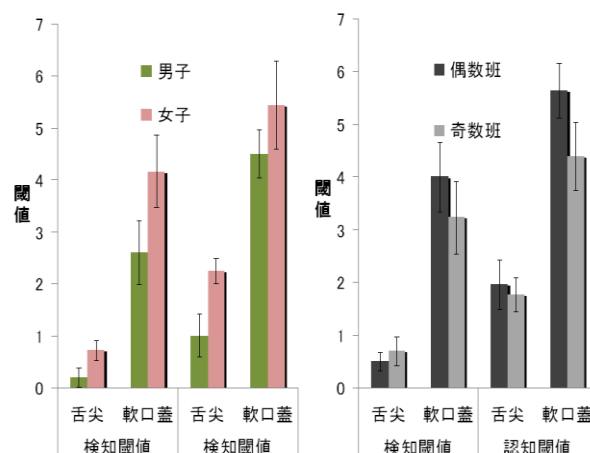


図3 性別、測定順序による閾値の違い

【考察】

本研究により、舌尖が軟口蓋よりも苦味閾値が低いことが明らかになった。平成 23、24 年度の学生実習の結果では 78 人の被験者において、軟口蓋の苦味閾値が舌尖より低かったのは、検知閾値で 8 人、認知閾値 9 人であった。舌尖が軟口蓋よりも有意に苦味閾値が低いという本研究の結果と矛盾しなかった。一方、過去には軟口蓋の苦味閾値が舌尖より低いという実験結果もある。結果が異なる要因としては人種間の味覚閾値の差や濾紙の大きさの違いによる影響が考えられる。

【参考文献】

- 1) 標準生理学 第 7 版 医学書院
- 2) VIRGINIA B, COLLINGS, (1974). Human taste response as a function of locus of stimulation on the tongue and soft palate. Perception & Psychophysics 16:169-174

食事、ガム咀嚼、コーヒー摂取が 集中力に及ぼす影響

43080020 木村 慧

指導教官：船橋 誠

(口腔生理学講座)

Effects of meals, gum chewing and taking in coffee
on the ability to concentrate

43080020 Kei Kimura

Directed by Makoto Funahashi

キーワード：ガム咀嚼、コーヒー摂取

Key words: gum chewing, taking in coffee

諸言

仕事や学習、スポーツを行う際、集中して行えるかどうかによって得られる成果は大きく左右される。本実験では、集中力の日内変化と、一般に集中力が向上するとされるガム咀嚼、コーヒー摂取による影響を実測することを目的とした。

実験方法

健康な男性 7 名女性 4 名(20～22 歳)を被験者とした。

パソコンの画面上に 10 種の文字(赤、青、黄、黒、白、紫、桃、茶、灰、緑)を一定の間隔でランダムに 12 回表示し、被験者に記憶させた。1 つの文字が表示されるのは最大 2 回までとした。映像の表示直後、用紙に表示した順番を記入させ、正答数を記録した。

実験①：上記テストを 8:30, 10:15, 12:40, 14:30, 16:15 に行った。実験当日は朝食非摂取、12:40 では全員が昼食後、テストを行った。

実験②：実験①の結果から、食事の影響がないと考えられる 16:15 に、無刺激時、運動負荷直後、ガム咀嚼時、コーヒー摂取後にテストを行った。

統計は、ANOVA による分散分析及び、ライアンの方法による多重比較を行った。

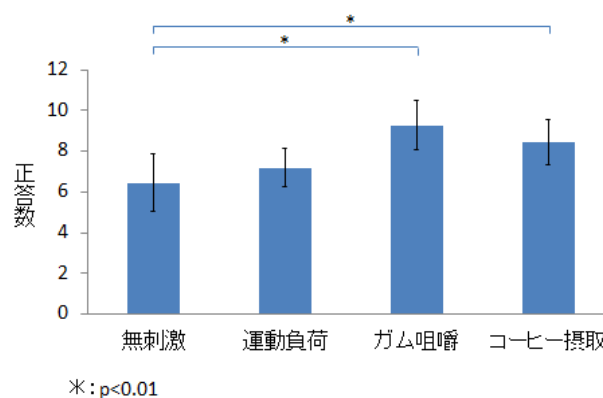


図 1 実験①におけるテスト結果の平均値

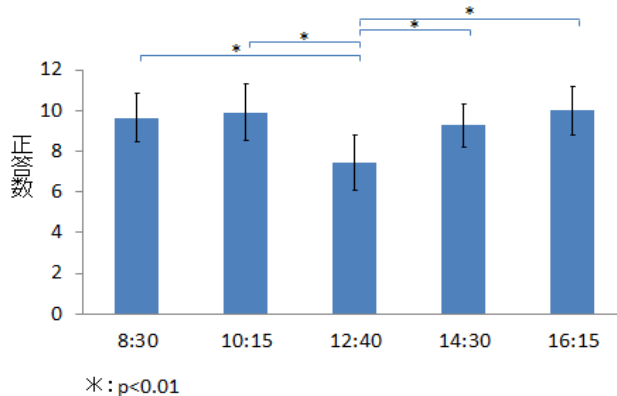


図 2 実験②におけるテスト結果の平均値

結果

実験①：正答数の平均値の変化を図 1 に示す。12:40 において正答数の有意な低下がみられた($p < 0.01$)。

実験②：正答数の平均値の変化を図 2 に示す。無刺激時と比較して、ガム咀嚼、コーヒー摂取において正答数の有意な増加がみられた($p < 0.01$)。

考察

今回行ったテストは、高い正答数を得るために集中力が求められる内容であったと考えられる。実験①において昼食後に正答数の有意な低下がみられたことから、食後は集中力が低下することが示唆された。実験②においてガム咀嚼、コーヒー摂取によって正答数の有意な増加がみられたことから、これらの刺激が集中力に対して好影響を及ぼしていることが示唆された。

匂い刺激が安静時の閉口筋活動に及ぼす影響

43080029 澤 みなみ

指導教官：前澤 仁志、松橋 誠

(口腔生理学教室)

Effects of smell stimulation
on jaw-closing muscle activity at rest

430800029 Minami Sawa

Directed by Hitoshi Maezawa, Makoto Funahashi

キーワード：匂い刺激、筋電図

Key words: smell stimulation, electromyography

諸言

聴覚刺激により安静時の閉口筋活動に変化が生じることは報告されているが、匂い刺激の筋活動に及ぼす影響に関しては不明な点が多い。そこで匂い刺激が安静時閉口筋活動に及ぼす影響を検討した。

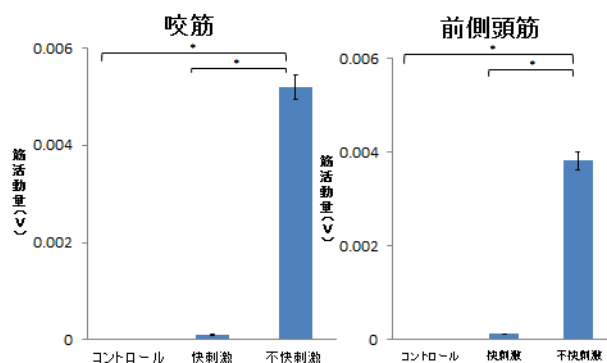
方法

健康成人 10 名 (男 1 名、女 9 名、平均 23.8 歳) を被験者とした。匂い刺激には 2 種のアロマオイル (ヤキニク、石鹸) を用いた。Visual Analog Scale (VAS) 評価により、すべての被験者において評価が高かった石鹸臭を快刺激、評価が低かったヤキニク臭を不快刺激とした。各アロマオイル (2ml) を浸漬させたコットンを入れた袋の開口部を鼻にあて匂い刺激を与えた。匂い刺激を座位にて 3 分間与えた時の、両側の咬筋と前側頭筋の筋活動を筋電図を用いて計測した。筋電計のローカットフィルターを 0.1Hz、ハイカットフィルターを 500Hz に設定した。匂い刺激を与えない状態をコントロールとした。表情筋の動きは制限せず、目視にて表情筋の動きの有無を確認した。刺激直後の 30 秒間の筋電図波形を用いて 1 秒あたりの平均振幅を算出し解析した。統計解析には ANOVA、Pearson の積率相関係数 ($P < 0.05$) を用いた。

結果

快刺激により咬筋活動が認められた者が 3 名 (平均振幅 0.13 ± 0.23 mV)、前側頭筋活動が認められた者が 4 名 (平均振幅 0.31 ± 0.49 mV)、一方、不快刺激により咬筋活動が認められた者が 7 名 (平均振幅 3.40 ± 3.17 mV)、前側頭筋活動が認められた者が 9 名 (平均振幅 2.77 ± 1.98 mV) であった。コントロールではすべての被験者で筋活動は認められなかった。不快刺激ではコントロールに比べ咬筋、側頭筋ともに著明な閉口筋活動の増加が認められた。快刺激はサンプルサイズが少ないため統計学的有意差は不明であるが、不快刺激ほど著明な筋活動は認められなかった。

刺激直後の 30 秒



不快刺激時 3 名の被験者において表情筋の動きを認めたが、快刺激では表情筋の動きを認めなかった。VAS 評価による匂いの不快度と咬筋活動量との間には有意な相関は認められなかった。

考察

不快な匂い刺激により安静時の閉口筋活動が増加する現象が観察されたが、不快刺激時には刺激がストレスとなりクレンチングが起こり、閉口筋活動が生じた可能性が考えられた。また、表情筋の動きが閉口筋の筋電図へ影響を与えた可能性も考えられた。多くの被験者が快刺激に対して反応を示さなかったのは、快刺激はストレスとはならず、閉口筋活動に影響を及ぼさなかったためと考えられた。

刺激時唾液分泌量と咀嚼値との関係

43070026 知野 圭佑

指導教官：松橋 誠

(口腔生理学教室)

Relation between masticatory performance and
salivary secretion

43070026 Keisuke Chino

Directed by Makoto Funahashi

キーワード：唾液分泌，咀嚼値

Key words: salivary secretion, masticatory
performance

諸言

□ 実験的に唾液分泌量を低下させると咀嚼値は低下するということが報告されている^{1,2)}。しかし、健康な20代成人の刺激時唾液分泌量と咀嚼値との関連については不明でありこれを明らかにするために本研究を行った。

□実験方法

本学歯学部3年生24名(20～25歳、男性18名女性6名)を対象とした。咀嚼値の測定に際しては、Manly & Braley³⁾の方法を参考にピーナッツを試験食品とした篩分法を用いた。3gのピーナッツを習慣性咀嚼側で20回咀嚼させた後、口腔内から採取し、10Mesh標準篩で篩分けした。口腔内から採取したピーナッツの乾燥重量に対する10mesh通過のピーナッツ乾燥重量の百分率を咀嚼値として算出した。刺激時唾液分泌量の測定に際してはガムテストを用いた。測定開始時点で口腔内に貯留している唾液を嚥下させた。その後10分間パラフィンペレット(ivoclar製)を咀嚼させ、分泌された唾液を紙コップに吐出させた。10分間経過時点で、口腔内に残留している唾液を全量吐出させ、回収された唾液全量の重量を測定し、唾液の比重を1.00g/1mlとして刺激時唾液分泌量を算出した。刺激時唾液分泌量と咀嚼値との間の相関については、スピアマンの順位相関係数を用いて無相関検定を行った。

結果

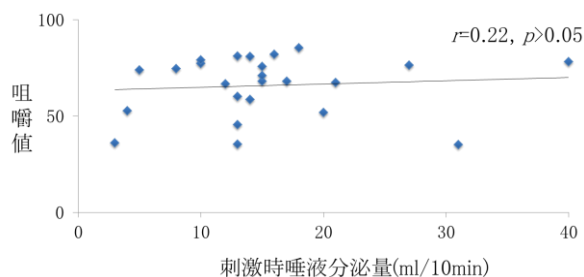


図1 刺激時唾液分泌量と咀嚼値

刺激時唾液分泌量は 15.3 ± 8.3 ml(平均値 $\pm$ S.D.)咀嚼値は 65.8 ± 15.6 (平均値 $\pm$ S.D.)であり、これらの値の間に統計学的に有意な相関はみられなかった($r=0.22, p>0.05, n=24$)。

考察

本研究実習のデータでは統計学的に有意な相関がみられず、ガムテストにおける刺激時唾液分泌量と咀嚼値との間の相関について推定することはできなかった。咀嚼値に影響を与える因子は咬合接触面積⁴⁾、最大咬合力⁵⁾などが報告されており、それらの因子の影響を除外できなかったために、刺激時唾液分泌量が咀嚼値に与える影響のみを調査することができなかったことが原因と考えられた。あるいは、元々の刺激時唾液分泌量と咀嚼値の間には相関がないということも考えられる。実験的に唾液分泌量を低下させた場合には咀嚼値は低下する^{1,2)}のにも関わらず、元々の唾液分泌量が少ない被験者では唾液分泌量の多い被験者と比べ咀嚼値に差がないこととなり、元々の唾液分泌量が少ない被験者では何らかの代償が働いていることが示唆された。

研究実習を通してテーマ設定の難しさ、実験の条件設定の難しさ、統計学的分析を学んだ。テーマ設定に際し、研究したい事柄に関する文献を検索することで興味が深まり、教科書だけではなく文献を検索することの重要性を学んだ。実験の条件設定についての議論によって、文献の抄録だけではなく、全体を吟味することの必要性を学んだ。統計学的分析については、データの種類、解析法の選択、第二種の過誤を起こさないためのサンプルサイズの設定について学んだ。文献の内容を吟味するために有用なことを身に付けることができた研究実習であった。今後研究に臨む機会には本研究実習で学んだことを生かしたい。

参考文献

- 1) Liedberg, Birgitta. "Masticatory ability in experimentally induced xerostomia." *Dysphagia* 6.4 (1991): 211-213.
- 2) Ishijima, T., et al. "The relationship between salivary secretion rate and masticatory efficiency." *Journal of oral rehabilitation* 31.1 (2004): 3-6.
- 3) Manly, R. S., and Louise C. Braley. "Masticatory performance and efficiency." *Journal of Dental Research* 29.4 (1950): 448-462.
- 4) Manly, R. S. "Factors affecting masticatory performance and efficiency among young adults." *Journal of dental research* 30.6 (1951): 874-882.
- 5) Okiyama, S., K. Ikebe, and T. Nokubi. "Association between masticatory performance and maximal occlusal force in young men." *Journal of oral rehabilitation* 30.3 (2003): 278-282.

手指の巧緻運動タスクに対する 作業前の指運動と眼球運動の影響

43080050 藤原 なおみ

指導教官：船橋 誠

(口腔生理学教室)

Effects of finger and eye movement on
the skilled motor activity of fingers.

43080050 Naomi Fujiwara

Directed by Makoto Funahashi

(Oral Physiology)

キーワード：巧緻運動、手指、歯科医師

Key words: skill movement, fingers, dentist

【目的】

歯科医師の臨床においては、口腔内での緻密な作業が求められる。反復練習により技術が向上することは知られているが、数々の実習をこなしていく中で、元々の手先の器用さに個人差があることは多くの歯学生が感じていることと思う。運動麻痺患者のリハビリテーションのための作業療法として、手指の運動トレーニングを行った報告はあるが、健常者が手指の巧緻性をより向上させるためにトレーニング等を行った報告は殆ど無い。本研究は、短期間で複雑な手指運動技能を獲得するために効果的な方法を検討することを目的とした。

【対象と方法】

健康な成人男性 11 名、女性 9 名（22～35 才）を被験者とした。手指の巧緻糸運動タスクとして糸通し作業を用いた。糸通し作業に要する時間を一定条件下にて測定するために、アクリル板を用いて装置を自作した（図 1）。この装置の中心に立てられたアクリル板の中心部とその上下部の 3 箇所、直径 1.2mm の左右に貫通した穴を付与した。ナイロン製の釣り糸（直径 0.5mm、長さ 10cm）を用いて、最上部の穴の右から糸通しを開始し、次に左から真ん中の穴に糸の先を通し、最後に右から最下部の穴に糸の先を通したのち、右から糸を抜き取った時点で作業完了とした。

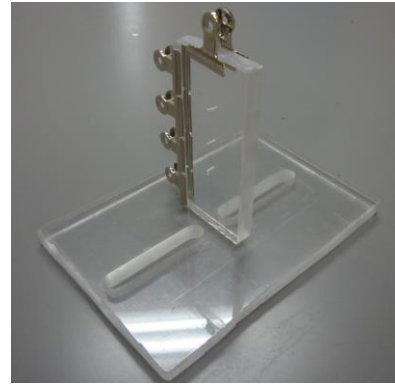


図 1：糸通し作業測定装置

クリップは 10 本の糸を取りやすくセットするために用いた。

10 本の糸を通す作業を 1 セットとして、このタスクの開始から終了までの時間を測定した。セット間の休憩時間を 1 分半として、上述の 1 セットを 3 回行わせた。測定直前に指運動を行わせた場合と、眼球運動を行わせた場合について 1 セットのタスクに要する時間を計測し、コントロールと比較した（図 2）。



図 2：指運動と眼球運動

A: 指運動，対になった左右 1 本ずつの指を 5 回転した後，逆方向に 5 回転する運動を繰り返し 90 秒行う。

B: 眼球運動，頭を固定した状態で，表中の①から昇順に数字の場所を目で追う。これを 90 秒間行う。

統計学的解析には ANOVA による分散分析と Ryan の方法を用いた。

【結果】

コントロール群、指運動群および眼球運動群における各セットごとの作業時間の平均値をグラフに示す（図 3）。コントロール群の 1 回目の結果は他の全ての結果に対して作業時間が有意に長いことが認められた ($p < 0.01$)。これは反復による慣れが生じたためと考えられた。そこで、図 4 に示すように、各群間比較は 3 回目の作業時間の平均値を用いて比較した（図 4）。コントロールと指運動群、コントロールと眼球運動群にそれぞれ有意差が認められた ($p < 0.01$)。指運動群と眼球運動群には有意差は認められなかった。また、男女差は認

められなかった。

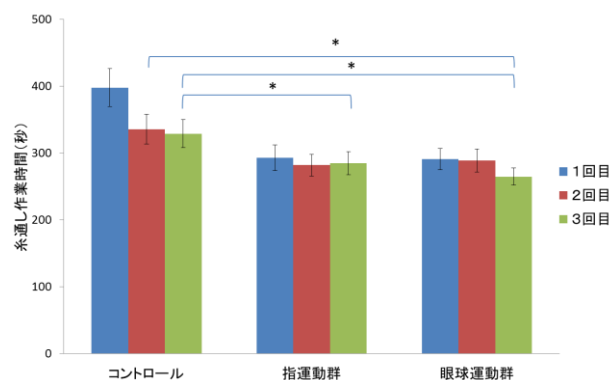


図 3：糸通し作業時間の平均値

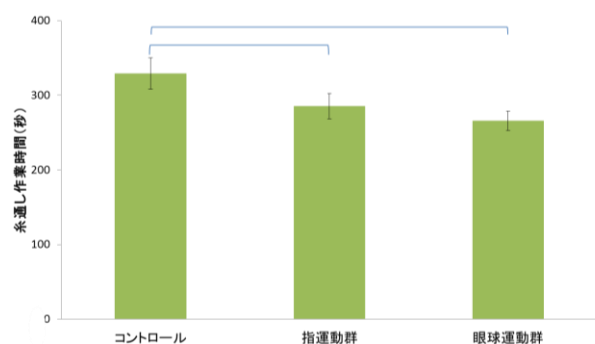


図 4：糸通し作業時間（3回目）の平均値

平均値の比較では有意差は認められなかったが、個人データから、コントロールで作業時間の長い人ほど眼球運動後の作業時間が短縮する傾向が認められたため、眼球運動後の作業時間の変化率を散布図にし、解析を行った（図 5）。相関係数は 0.60 で統計的に有意な負の相関がみられた。指運動群においても同様の解析を行ったが、相関関係は認められなかった（図 6）。

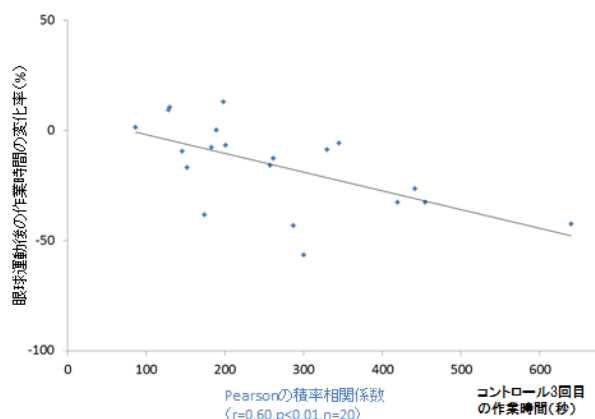


図 5：眼球運動による作業時間短縮率とコントロールの作業時間（3回目）との相関関係を示す散布図

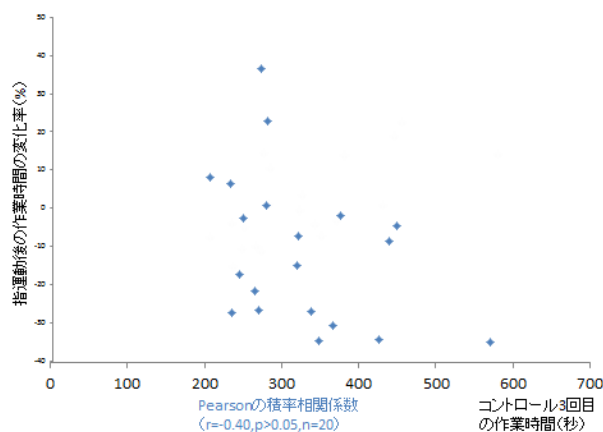


図 6：指運動による作業時間短縮率とコントロールの作業時間（3回目）との相関関係を示す散布図

【考察・結論】

指運動と眼球運動は、手指の巧緻性の向上に有効であることが示された。また、コントロールにおいて作業時間の長かった人、つまり手先が器用でない人には、眼球運動がより効果的であったことが示され、視覚情報と手指の運動が連動していることが示唆された。

眼球運動が糸通し作業時間に対して短縮効果が認められたことについて、外眼筋の血行促進や衝動性眼球運動の持続時間の増大などにより、装置の穴や糸先をより正確にとらえることが可能になったのではないかと推察されるが、その詳しいメカニズムについては今後さらに研究を要する。

本研究より、歯科技工等の臨床実習において、作業前に指運動と眼球運動を行うことは、技術の習得の効率化のために有効であると考えられたので、是非試してみられたい。

【文献】

1) Yamada Minoru, Effect of Perceptual Learning on Motor Skills of Hands: A Functional Magnetic Resonance Imaging Study. Kobe Journal of Medical Sciences(0023-2513)56 巻 1 号 PageE29-E37(2010.02)

質量認識が重量物持ち上げ時の筋活動に与える影響

43070052 安元 行徳

指導教官：平井 喜幸、舩橋 誠

口腔生理学

Effects of weight recognition lifting objects on
muscle activity during lifting tasks

43070052 Yukinori Yasumoto

Directed by Y. Hirai, M. Funahashi

キーワード：筋電図

Key words: electromyogram (EMG)

【目的】

ヒトは物体を持ち上げる際、経験や記憶によって無意識にその物体の重さを予測し、物体を持ち上げる¹⁾²⁾。誤った予測情報を与えた場合、ヒトの持ち上げ動作にどのような変化がおこるのか、筋収縮に伴う生体電気現象を利用して検証した。

【方法】

右腕を利き腕とする健康な成人男性 9 名を被験者とした。被験者を座位にし、右肘を肘かけに固定し、肘屈曲動作をしてもらった。まず、250 g の重りを持ち、屈曲動作を行った。次に 1 kg の重りを持ち、屈曲動作を行った。被験者にそれぞれ重りの重さを記憶させ、実験を行った。筋電図は表面電極を用いて双極誘導にて測定した。導出筋は肘関節屈曲に関わる上腕二頭筋とした。表面電極の貼付位置は右腕上腕二頭筋の走行に沿って筋腹部に貼り付けた。250 g の重りを持ち、合図した後に屈曲動作を行った (Cont 群)。視覚を遮断し、1 kg の重りを持っていると被験者に伝え、250 g の重りを持ち、合図した後に屈曲動作を行った (Exp 群)。その後、被験者に重さの違和感の有無を確認した。なお被験者は屈曲動作を行うまで重さを感じることはないようにした。Cont 群、Exp 群で得られた筋電図を筋活動開始時から屈曲動作を終了までを全波整流化し、ウィルコクソンの符号順位検定を用いて統計処理を行った。

【結果】

Cont 群、Exp 群で得られた筋電図を図 1 に示す。最大振幅までの積分値の平均値は Cont 群では 0.024 ± 0.008 $v \cdot s$ 、Exp 群では 0.030 ± 0.009 $v \cdot s$ であった (図 1a)。最大振幅の平均値は Cont 群では 0.078 ± 0.057 v 、Exp 群では 0.135 ± 0.112 v (図 1b)、最大振幅に至るまでの時間は Cont 群では 0.618 ± 0.314 s 、Exp 群では 0.884

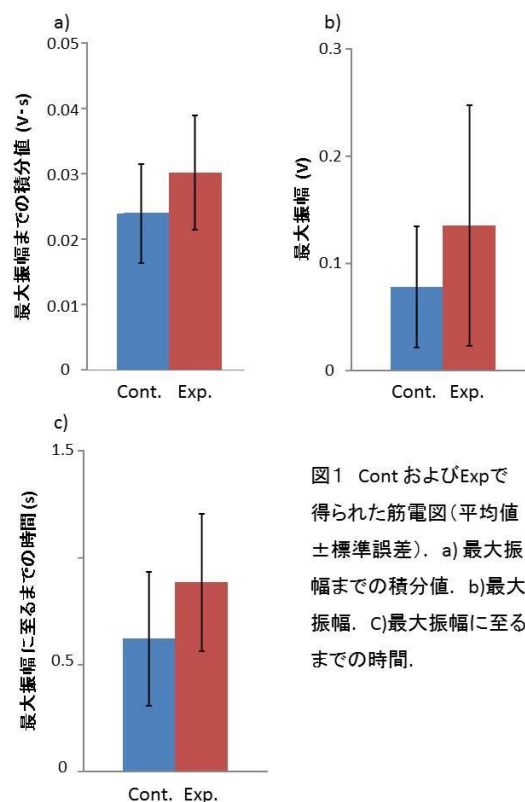


図1 ContおよびExpで得られた筋電図(平均値±標準誤差)。a)最大振幅までの積分値。b)最大振幅。c)最大振幅に至るまでの時間。

± 0.321 s (図 1c) であった。最大振幅までの積分値、最大振幅、最大振幅に至るまでの時間は 2 群間で有意差は認められなかった。

【考察】

今回の実験からは思い違いが起こった時に、筋活動に変化は認められなかった。思い違いが起こった場合、脳が瞬時に情報を修正し、末梢へと情報を伝達することによって、筋活動は影響を受けなかった可能性がある。しかし、今回の実験は条件の均一化に関し不備が存在したため、筋活動に変化が生じなかったことが考えられる。脳での情報処理については今後の検討課題にしたい。

【参考文献】

- 1) 森岡周、太場岡英利、片岡保憲、越智亮、八木文雄 持ち上げ運動制御過程に影響を及ぼす物体の大きさ知覚とその内部モデル 理学療法学第 32 巻第 6 号 2005
- 2) 藤村昌彦、波之平 重量物の質量表示が持ち上げ動作に与える影響 日本職業・災害医学会会誌 JJOMT Vol. 60, No. 4 2012

BMP を付着させたチタン微細繊維不織布上での

骨髄間質細胞の培養

43080008 入澤 明子

指導教官：滝田裕子

(口腔分子生化学教室)

Influence of rhBMP-2 on rat bone marrow stromal cells cultured
on titanium fiber mesh

43080008 Akiko Irisawa

Directed by Hiroko Takita

(Oral Biochemistry and Molecular Biology)

キーワード：チタン繊維不織布、骨髄間質細胞、rhBMP-2

Keywords : titanium fiber mesh, bone marrow stromal cell, rhBMP-2

緒言

BMP は骨の再生に必要な骨誘導因子であり、異所性、たとえば筋肉組織など骨のない部位に骨形成を誘導させる。しかし、BMP はそれ自体を組織に注入すればよいわけではなく、生体内で BMP の効果を得るためには担体が必要となる。BMP 担体として、チタン、ハイドロキシアパタイトや β -TCP が用いられるが、その中でもチタン微細繊維からなる不織布(Titanium-web:TW)は、機械的強度をもった BMP 担体として機能することが報告されている¹⁾。

本実験では、ラット骨髄間質細胞の培養において、BMP が付着した TW を培養担体として用いた場合、骨芽細胞への分化・増殖にどのような影響を及ぼすかを検討した。

実験方法

実験材料として、ラットの骨髄間質細胞と TW を用いた。TW は、直径 6 mm、厚さ 1.5 mm、繊維径 8 μ m、気孔率 87%、密度 900mg/cm³で、500℃にて加熱処理した。ラットの大腿骨から Maniapolis の方法に従って骨髄細胞を採取した。骨髄細胞には、接着性の骨髄間質細胞と非接着性の造血幹細胞などが含まれているため培地交換の際、PBS で洗浄することにより非接着性の細胞を取り除き、骨髄間質細胞のみを培養した。TW に rhBMP-2 100 ng を付着させ、48well のディッシュに静置した。BMP 無しの TW をコントロールとした。その上に骨髄間質細胞を 5x10⁴ 個、播種し 1 週間と 2 週間培養した。また、TW 無しの 48well ディッシュで上記と同様の実験をおこなった。その際、rhBMP-2 は細胞播種時のみ 1 回添加した。培養後に DNA 量、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム (Ca) 量、オステオカルシン (OCN) 量を定量した。

結果

TW を用いた培養において DNA 量は 1 週から 2 週にかけて増加したが、BMP の有無による差は認められなかった (図 1)。ALP 活性は BMP 付着 TW において 1 週、2 週においてコントロールと比べて有意に高値を示し、骨髄間質細胞から骨芽細胞への分化が促進されていることが示唆された (図 2)。

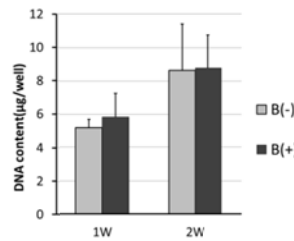


図 1 TW(+) DNA 含有量

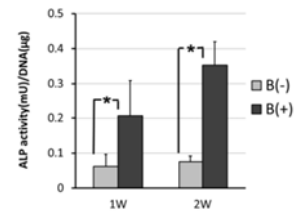


図 2 TW(+) ALP 活性

さらに、骨芽細胞への分化の度合いを確認する為に、Ca 量と OCN 量を測定した。Ca、OCN は 1 週目では BMP の有無にかかわらず検出されなかった。2 週目ではともに検出され、特に BMP 付着 TW において、高い傾向を示した (図 3 と 4)。

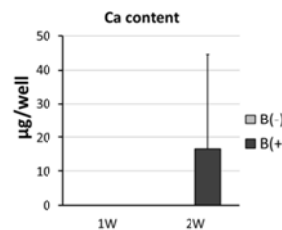


図 3 TW(+) Ca 量

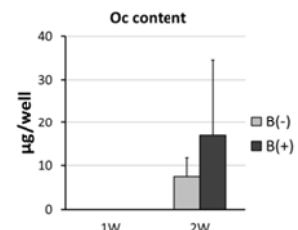


図 4 TW(+) OCN 量

TW を用いない培養において DNA 量、ALP 活性はともに 1 週から 2 週目にかけて増加したが、BMP の有無による差異は見られなかった (図 5 と 6)。また Ca 量と OCN 量は BMP の有無にかかわらず 1 週と 2 週で検出されなかった (図無し)。

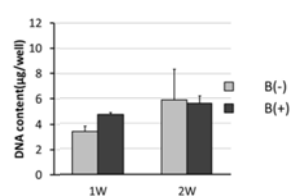


図 5 TW(-) DNA 含有量

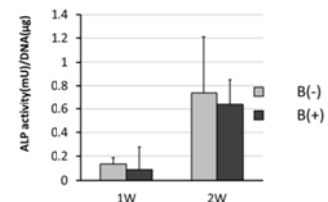


図 6 TW(-) ALP 活性

考察

TW 担体の有無に関わらず、骨髄間質細胞の増殖には BMP は影響を及ぼさなかった。TW 担体培養において、ALP 活性、Ca 量、OCN 量は BMP 添加によって、高値を示した。TW 担体を用いた培養と用いない培養で、播種した細胞数と添加した BMP 量は等しいが、骨髄間質細胞の分化速度が異なり TW 担体を用いた方が、骨髄間質細胞から骨芽細胞へ早く分化したことがわかった。これより、TW 担体からの BMP の徐放性が骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を制御している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) J.W.M. Vehof, et al.: Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with Bone Morphogenetic Protein and coated with calcium phosphate. *Plast. Reconstr. Surg.* 108: 434-443, 2001.

I 型コラーゲンが Enamel Matrix Derivatives(EMD)の有する骨芽細胞増殖促進効果を制御するメカニズムの検討

43080011 大歳 祐生
指導教員：水野 守道
(口腔分子生化学教室)

A study of the regulatory mechanism by type I collagen on the osteoblastic proliferation induced by Enamel Matrix Derivatives (EMD)

43080011 Yuki Otoshi
Directed by M.Mizuno
(Oral Biochemistry and Molecular Biology)

キーワード：EMD、骨芽細胞
keywords：EMD、osteoblast

諸 言

Enamel Matrix Derivatives (EMD)中には複数の成長因子が含まれており、特に TGF β は骨芽細胞を始めとする各種細胞の細胞増殖を制御する等歯周組織再生に重要な役割を果たしている。これまで EMD の骨芽細胞に対する細胞増殖促進効果はコラーゲン合成と密接に関わっていることが示唆されたがその詳細なメカニズムは不明である。本研究実習ではコラーゲンが EMD の細胞増殖促進効果にどのような影響を与えるかを調べ、EMD による細胞増殖促進をコラーゲンがどのように制御するのか、そのメカニズムを考察した。

材料と方法

マウス骨芽細胞用細胞 MC3T3-E1 を以下の三条件の下 30mm ディッシュに播種し、無血清培地(Ascorbic acid 不含)中で 5 日間培養した。培養条件は、1.骨芽細胞を無血清培地中で培養した無処理群、2.骨芽細胞を EMD(100 μ g/ml)を含む無血清培地中で培養したコントロール群、3. I 型コラーゲンマトリックスをコーティングしたディッシュ上で骨芽細胞を EMD(100 μ g/ml)を含む無血清培地中で培養した実験群、である。培養終了後ディッシュに付着している生細胞数を計測し、さらに I 型コラーゲン遺伝子発現量を定量 PCR 法で

測定した。

結 果

	無処理群	Control	実験群
接着細胞数 ($\times 10^4$ 個)	3.3	2.2	2.4
倍率	1	0.68	0.72

図は実験を三度行った後の平均値である。無処理群に比べ、コントロール、実験群とも細胞の増殖数は抑えられており、無処理群に比べコントロール・実験群はそれぞれ 68%、72%となっていた。また I 型コラーゲン遺伝子発現量をコントロール群と実験群で比べると有意な差は認められなかった。以上の結果は I 型コラーゲンマトリックスは EMD の効果に影響を与えなかった事を示す物である。

考 察

I 型コラーゲンマトリックス上で培養した骨芽細胞では EMD による細胞増殖並びに I 型コラーゲン遺伝子発現の促進は認められなかった。この結果は I 型コラーゲンマトリックスの骨芽細胞周囲への蓄積が EMD による細胞増殖促進効果と密接に関わっている可能性は低いことを示している。EMD 中に存在する TGF β は細胞膜の TGF β 受容体と結合した後、細胞内の Smad タンパク群がリン酸化されて最終的に遺伝子の転写を制御している。これまで C-propeptide が直接遺伝子発現を制御することが報告されている¹⁾と共に、近年 I 型プロコラーゲン由来の C-propeptide が Smad7 と結合することが明らかとなった²⁾。以上の知見より今回の結果は、細胞内で合成された I 型プロコラーゲン分子が細胞外へ分泌された後切断された C-propeptide が、細胞質内に再度取り込まれ Smad タンパクと結合することにより TGF β の機能を制御している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Nakata et al., Ann. N. Y. Acad. Sci., 785:307, 199
- 2) Ellis LR, Warner DR, Greene RM, Pisano MM. Biochem Biophys Res Commun. 310:1117, 2003

骨髄間質細胞培養に対する BMP の影響

43080012 大西 奈々

指導教官：滝田裕子

(口腔分子生化学教室)

Influence of rhBMP-2 on rat bone marrow stromal cells
cultured with low or high cell density

43080012 Nana Onishi

Directed by Hiroko Takita

(Oral Biochemistry and Molecular Biology)

キーワード：骨髄間質細胞、骨芽細胞、rhBMP-2

Keywords: bone marrow stromal cell, osteoblast, rhBMP-2

緒言

BMP は未分化間葉系細胞に働きかけ骨芽細胞に分化させる骨誘導因子であり、臨床応用が期待されている。これまで培養実験において未分化間葉系細胞に BMP を連続的に投与し、骨芽細胞分化への影響を調べるという研究が行われてきた。その結果、BMP は分化を促進するということが明らかになった¹⁾。また、分化した骨芽細胞を生体に戻すという実験も行われてきた。

本研究では、骨髄間質細胞の播種時に BMP を 1 回添加することにより細胞の増殖・分化にどのような影響をおよぼすかを調べることを目的とした。

実験方法

ラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、接着性の間質細胞のみを Maniaticolus の方法に従って培養した。低密度培養は 5×10^4 cells/well、高密度培養は 15×10^4 cells/well を播種した。播種時に BMP を 100 ng 加えた。BMP 無添加のものをコントロールとした。2～3 日毎に培地交換を行い 1 週間と 2 週間培養した。培養後、DNA、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、カルシウム、オステオカルシンを定量した。

結果

低密度培養において DNA 量は 1 週から 2 週にかけて増加し、細胞が増殖していることがわかった。しかし、BMP の有無による差は認められなかった (図 1)。

低密度培養において ALP 活性値は 1 週から 2 週にかけて増加したが、BMP の有無による差は認められなかった (図 2)。ALP 活性は骨芽細胞に分化する初期に高い値を示し、成熟するに伴い減少することが報告されている。カルシウムとオステオカルシンは BMP の有無にかかわらず、1 週および 2 週において検出されなかった (図無し)。

以上の測定結果から、低密度培養において BMP の効果は認められなかった。

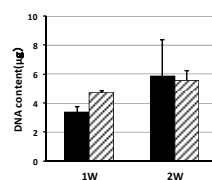


図 1 低密度培養の DNA 量

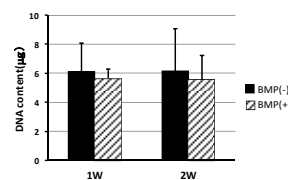


図 2 低密度培養の ALP 活性

高密度培養において DNA 量は 1 週と 2 週で差が認められなかった。BMP の有無による変化も認められず、1 週ですでにコンフルエントの状態になったと考えられる (図 3)。高密度培養において ALP 活性は BMP を加えたほうが、加えていないものに比べ有意に高い値を 1 週で示した。2 週では、BMP 有無による差は認められなかった (図 4)。この結果から、BMP を加えたものは加えていないものに比べ、骨芽細胞への分化が促進されていると考えられる。

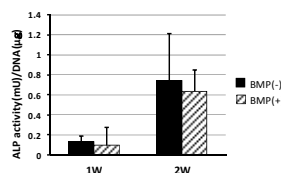


図 3 高密度培養の DNA 量

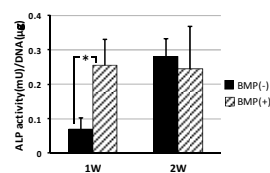


図 4 高密度培養の ALP 活性

高密度培養においてカルシウムとオステオカルシンは BMP を加え 2 週間培養したもののみで検出された (図 5)。

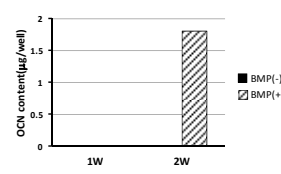
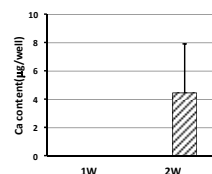


図 5 高密度培養のカルシウム量とオステオカルシン量

考察

低密度培養の DNA 量において BMP の有無による差は認められず、BMP 1 回投与ではラット骨髄間質細胞の増殖に影響を与えなかった。

高密度培養において、BMP を加えたものは 1 週で高い ALP 活性を示し、2 週でカルシウムやオステオカルシンが検出され、BMP は骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を促進することが示された。低密度培養では BMP による分化の促進が認められず、高密度培養で分化が促進されたことから、BMP は細胞がある程度増殖し、分化の方向に向かい始めた細胞に効果を示すと考えられる。

以上のことから、BMP は細胞がある程度増殖したところに作用させることで、1 回投与でも骨髄間質細胞の分化の過程を促進することができると考えられる。

参考文献

- 1) J.W.M. Vehof, et al.: Ectopic bone formation in titanium mesh loaded with Bone Morphogenetic Protein and coated with calcium phosphate. *Plast. Reconstr. Surg.* 108: 434-443, 2001.

アミノ酸配列分析を利用した エナメルタンパク質であるタフテリンの 機能に関する研究

43070037 新阜 宏平

指導教官：藤沢 隆一

(口腔分子生化学教室)

Characterization of tuftelin, an enamel protein, with
analysis of amino acid sequences

43070037 Kohei Nioka

Directed by Ryuichi Fujisawa

(Oral Biochemistry and Molecular Biology)

キーワード：タフテリン、エナメルタンパク質、エナメル質

Keywords: Tuftelin, Enamel protein, Enamel

諸言

タフテリン(Tuftelin)はエナメル質に存在するエナメルタンパク質であり、特に幼若エナメル質中に多く含まれ、成熟エナメル質中には低分子状態でエナメル叢に存在していることが知られている。エナメルタンパク質にはタフテリンの他にアメロゲン、エナメルリン等があり、これらのタンパク質はエナメル質の石灰化と成熟に関与することが知られている。一方タフテリンはエナメル質以外に精巣や腎臓等の軟組織にも存在することが知られており、その機能については不明な点が多い。本研究では、タフテリンのアミノ酸配列を異種生物間や他のタンパク質との間で比較することでタフテリンの機能について考察した。

方法

国立遺伝学研究所が運営する DNA 塩基配列のデータベースである DDBJ(DNA Data Bank of Japan)を中心に NCBI, uniprot, ensemble の 4 つのデータベースを用いてタフテリン、アメロゲン、エナメルリンのアミノ酸配列データを検索した。

使用したツール

ARSA: タンパク質のアミノ酸配列、DNA 配列を検索する。

ClustalW: 複数のタンパク質のアミノ酸配列を比較(多重配列)し系統解析を行う。系統樹の作成。

Blast: あるタンパク質のアミノ酸配列について、相同性のあるタンパク質の検索を行う。

Protein Hydrophobicity Plots: タンパク質のアミノ酸配列の親水性領域、疎水性領域を調べる。

結果

データベースで検索したところ、哺乳類 9 種類、爬虫類 1 種、鳥類 2 種、魚類 5 種類(計 17 種)のタフテリンの配列が見つかった。この内、鳥類 2 種はニワトリ、フィンチであり、どちらも歯を持たない動物であった。次に、ヒト、マウス、コウモリ、ト

カゲ、ニワトリ、フグ、メダカのタフテリンについてアミノ酸配列比較をしたところ、4 つの相同領域が見つかった。この相同領域を N 末端から順に第 1、第 2、第 3、第 4 領域と呼ぶことにすると、第 3 領域が最も大きな領域であった(図 1)。



図 1: 哺乳類、鳥類、爬虫類、魚類の間でよく保存されて

いた領域

次に、ヒトのタフテリンとアメロゲニンのアミノ酸配列を比較したところ、配列に類似性は見られなかった。また、タフテリン、アメロゲニン、エナメルリンの親水性領域、疎水性領域について調べたところ、アメロゲニン、エナメルリンには N 末端部に疎水性アミノ酸が多く集まった領域(シグナル配列)が見られたが、タフテリンにはそのような領域は見られなかった。

ヒトのタフテリンに似た配列を持つタンパク質としては、Grin11a が見つかった。Grin11a の配列には第 2 相同領域と第 3 相同領域が存在することが分かった。

さらに最も領域の大きい第 3 相同領域について、類似配列を持つタンパク質を検索したところ、TRAF-6 (TNF receptor associated factor6) が見つかった。Grin11a は、グルタミン酸神経伝達の調節因子であり、TRAF6 は CD40 や RANK を介するシグナル伝達に関与するタンパク質であり、共に細胞内タンパク質であることがわかった。

考察

アメロゲニンやエナメルリン等は分泌タンパク質であり、アミノ酸配列の前半にシグナル配列を持つことが知られている。一方で、タフテリンにはシグナル配列は見られず、分泌タンパク質の特徴を持っていなかった。しかし、タフテリンはエナメル質のエナメル叢から見つかっていることから、何らかの機序でエナメル芽細胞から分泌されていることが考えられ、そしてその機序はアメロゲニン等とは異なるものであることが考えられる。

また、タフテリンが精巣や腎臓などの軟組織から見つかっていること、歯を持たない鳥類にも存在していたことから、エナメル質の石灰化とは異なる役割を担っていることが示唆された。さらに、類似タンパク質として細胞内タンパク質である Grin11a と TRAF6 が見つかり、どちらのタンパク質もシグナル伝達に関与するタンパク質であったことから、その役割は細胞内のシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。

参考文献

早川太郎他著：口腔生化学第 4 版、医歯薬出版株式会社、東京、2005

池尾竜他著：スタンダード生化学口腔生化学第 2 版、学建書院、東京、2009

マウス未分化間葉系細胞 Kusa-O 細胞における骨芽細胞分化に伴う

miR-34c 発現量の変化

43080042 西谷 淳

指導教員：田村正人

(口腔分子生化学教室)

Regulation of miR-34c expression during osteoblastic differentiation in Kusa-O cells

43080042 Jun Nishitani

Directed by Tamura M.

(Oral Biochemistry)

キーワード：マイクロ RNA、リアルタイム PCR、骨芽細胞

Key word : microRNA, real time PCR, osteoblast

緒 言

マイクロ RNA (miRNA) は 19~24 塩基の翻訳されない一本鎖の小さな機能性 RNA 分子である。この miRNA はヒトではこれまで 800 種以上報告されており、発生・分化、がんの発症など広範囲の生命現象に関与していると考えられており現在注目されている。miRNA の発現と骨芽細胞分化に関しては既に多くの報告があり、骨芽細胞分化に伴って減少するものとして miR-1, miR-206, miR-141, miR-200a, 増加するものとして miR29b などが報告されている。これまで骨芽細胞分化を誘導する BMP-2 やある種のプロテオソーム阻害剤 (ボルテゾミブ) で骨芽細胞分化に伴って miR-34c の発現が増加することが報告されている¹⁾。そこで本研究では、骨髄由来のマウス未分化間葉系細胞において骨芽細胞分化に伴う miR34c の発現量の変化を測定することを目的とした。

材料と方法

マウス未分化間葉系細胞である Kusa-O 細胞を培養した。この細胞にアスコルビン酸および β -glycerophosphate を加え、引き続き 1 週間培養した。コントロールとしては何も加えず 1 週間培養した。これらの細胞より ISOGEN (NipponGene, Toyama) を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて specific RT primer および Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。これらの cDNA と Taqman MicroRNA Assay (ABI) を用いて StepOne Real-time PCR system にて miR-34c の発現量を測定した。miR-34c の発現量は、コントロールの sno-234 の発現量を基準とし $\Delta\Delta Ct$ 値を算出し定量した。

結 果

何も加えずに培養した Kusa-O 細胞に比べてアスコルビン酸および β -glycerophosphate を加えて培養した Kusa-O 細胞では、約 1.35 倍の miR-34c の発現量であった (図 1)。

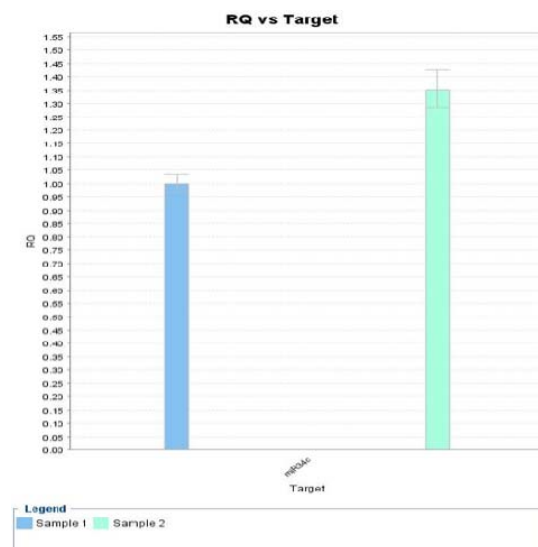


図1 Kusa-O 細胞の miR-34c の発現量。左 sample1:何も加えないで1週間培養したKusa-O細胞。右 Sample2: アスコルビン酸および β -glycerophosphate を加えて培養した Kusa-O 細胞。

考察

マウス未分化間葉系細胞である Kusa-O 細胞はアスコルビン酸および β -glycerophosphate を加えて培養すると骨芽細胞に分化することが知られている。本研究では、アスコルビン酸などを加えて培養したところ、miR-34c の発現量が増加したことから、骨芽細胞分化に伴って miR34c の発現が増加した可能性が考えられた。2012 年、Karsenty らは miR-34c はオステオカルシン遺伝子の発現調節に関与すると報告した²⁾。おそらく骨芽細胞分化において発現が増加するオステオカルシンやアルカリフォスファターゼの発現量調節にこの miR-34c が関与しているものと考えられた。miR-34c はマウス未分化間葉系細胞の骨芽細胞への分化においても、オステオカルシン遺伝子の発現を調節する重要な役割をはたしていることが考えられた。

結論

miR-34c は骨芽細胞分化の過程で重要な役割を演じている可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Uyama M, Sato MM, Kawanami M, Tamura M. Regulation of osteoblastic differentiation by the proteasome inhibitor bortezomib. Genes Cells. 17:548-558, 2012.
- 2) Wei J, Shi Y, Karsenty G et al. miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2. J Cell Biol. 197: 509-521, 2012.

Wnt3a の添加に伴う C2C12 細胞における miR-34c 発現の変化

43080040 塚本 豊浩

指導教員：田村正人

(口腔分子生化学教室)

Regulation of miR-34c expression by Wnt3a in C2C12 cells

43080040 Toyohiro Tsukamoto

Directed by Tamura M.

(Oral Biochemistry)

キーワード：マイクロ RNA, リアルタイム PCR

Wnt3a

key word : microRNA, real-time PCR

Wnt3a

緒 言

マイクロ RNA (miRNA) は、19~24 塩基の翻訳されない一本鎖の小さな機能性 RNA 分子である。ゲノム DNA からの転写後、細胞質に輸送され二本鎖 miRNA となる。そのうちの 1 本鎖が RISC に取り込まれ Argonaute との複合体がターゲットの mRNA の塩基配列に相補的に作用して翻訳を制御することで標的 mRNA の発現を制御し、タンパク質の産生を抑制することが知られている。miRNA は、これまでヒトで 800 種類以上報告されており、一つの miRNA で数百の遺伝子の発現調節を行っており、発生・分化やがんの発症など、極めて広範囲の高次生命現象への関連が明らかになりつつある。近年の研究により、ある種の miRNA が骨芽細胞分化に機能する可能性が考えられているが、骨芽細胞分化に伴って発現量が上昇する miRNA は、いまだ報告例が少ない。本研究では、骨芽細胞分化に伴う miRNA 発現量の変化を調べ、古典的 Wnt シグナルの miR-34c の発現調節を明らかにすることを目的とした。

材料と方法

マウス筋芽細胞株である C2C12 細胞を培養し、この細胞に Wnt3a を産生する L 細胞の培養上清もしくは Wnt3a を産生しない L 細胞の培養上清を加え 48 時間培養した。これらの細胞より ISOGEN (NipponGene, Toyama) を用いて total RNA を抽出し濃度を測定した。抽出した RNA を用いて specific RT primer および Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (ABI) を用いて逆転写反応を行い cDNA を合成した。これらの cDNA と Taqman MicroRNA Assay (ABI) を用いて StepOne Real-time PCR system にて miR-34c の発現量の測定を行った。コントロールとしては sno-234 を用いた。miR-34c の発現量は、コントロールの sno-234 の発現量を基準とし $\Delta\Delta Ct$ 値を算出し定量した。

結 果

Wnt3a を産生する L 細胞の培養上清を加えた場合の C2C12 細胞の miR34c の発現量は、コントロールの L 細胞の培養上清を加えた場合の C2C12 細胞の miR34c の発現量は 2 倍以上高い値であった (図 1)。

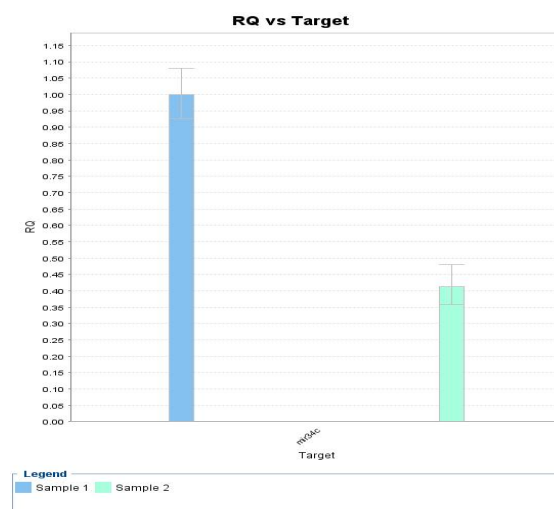


図1 C2C12 細胞の miR-34c の発現量. 左 sample1: Wnt3a を産生する L 細胞の培養上清を加えた. 右 Sample2: コントロールの L 細胞の培養上清を加えた。

考察

Wnt3a といった古典的 Wnt シグナルの活性化は骨芽細胞への分化を促進すると考えられている。本研究において Wnt3a-L 細胞の培養上清によって miR-34c 量が増加したことから、古典的 Wnt シグナルの活性化は miR-34c の発現を調節していると考えられた。2012 年、Karsenty らは骨芽細胞特異的にこの miR34c の発現をノックアウトしたマウスを作成したところ骨量が増加し、反対に miR34c の発現を増加させたマウスを作成したところ骨量が減少したと報告した¹⁾。また、これまで骨芽細胞分化を誘導する BMP-2 やある種のプロテオソーム阻害剤 (ボルテゾミブ) で骨芽細胞分化に伴って miR-34c の発現が増加することが報告されている。本研究から、Wnt3a も miR34c の発現を増加させたことから、miR34c は、骨芽細胞分化の過程で何らかの重要な役割を演じている可能性が考えられた。

結論

miR-34c は骨芽細胞分化の過程で重要な役割を演じている可能性が考えられた。

参考文献

- 1) Wei J, Shi Y, Zheng L, Zhou B, Inose H, Wang J, Guo XE, Grosschedl R, Karsenty G. miR-34s inhibit osteoblast proliferation and differentiation in the mouse by targeting SATB2. J Cell Biol. 197: 509-521, 2012.

Enamel Matrix Derivatives (EMD) の骨芽細胞増殖促進効果に及ぼす Ascorbic acid の影響についての研究

43080051 降旗 友和

指導教官：水野 守道 (口腔生化学教室)

A study on the effects of Ascorbic acid on the osteoblast proliferation induced by Enamel Matrix Derivatives (EMD)

43080051 Tomokazu Furihata

Directed by Mizuno M. (Oral Biochemistry)

キーワード：EMD, アスコルビン酸, コラーゲン

key word: EMD, ascorbic acid, collagen

諸 言

Enamel Matrix Derivatives (以下 EMD) は近年歯周病治療のための生物製剤として広く用いられている。しかし EMD による歯周組織再生のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

これまでチタン上で培養した骨芽細胞に対し EMD は細胞増殖を促進すると同時にコラーゲン合成も促進することが明らかとなり、この知見は EMD による骨芽細胞の増殖促進効果とコラーゲン合成は密接に関わっていることを示唆するものである。本研究実習では EMD の効果は細胞の支持体への接着条件により影響を受けるかを明らかにした後、Ascorbic acid を利用して EMD による細胞増殖促進効果がどのような影響を受けるか検討した。

材料と方法

マウス骨芽細胞用細胞 MC3T3-E1 を 30mm ディッシュに播種し、EMD (100 μ g/ml) を含む無血清培地 (Ascorbic acid 不含あるいは 50 μ g/ml を含む) で 5 日間培養した。培養終了後ディッシュに付着している生細胞数を計測し、さらに I 型コラーゲン遺伝子発現量を定量 PCR 法で測定した。

結 果

① EMD の効果に対する細胞支持体の影響

マウス骨芽細胞を 5 日間通常の 30mm ディッシュにおいて培養した結果 EMD 処理群では無処理に比べ細胞数は約 4.9 倍増加していた。また PCR 法により I 型コラーゲン遺伝子発現を解析した結果、EMD 処理した骨芽細胞では無処理群に比べ約 2.4 倍の I 型コラーゲン遺伝子発現が認められた (図 1)。

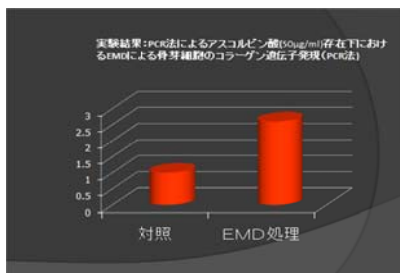


図 1 Ascorbic acid (50 μ g/ml) 存在下における EMD による骨芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現 (通常の培養ディッシュで培養)

② EMD の骨芽細胞に及ぼす効果に対する Ascorbic acid の影響

EMD による骨芽細胞に対する増殖促進効果は Ascorbic acid が共存する場合に認められたが (EMD 無処理に比べ約 1.69 倍増加)、Ascorbic acid を含まない条件では EMD の効果は見られなかった。また PCR 法により EMD による骨芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現に及ぼす効果を解析した結果、Ascorbic acid 存在下では約 1.6 倍のコラーゲン遺伝子発現が認められた (図 2)。しかし Ascorbic acid 非存在下では EMD の効果は認められなかった (図 2)。

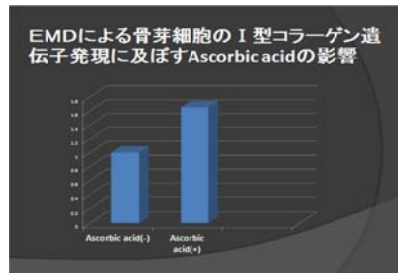


図 2 EMD による骨芽細胞の I 型コラーゲン遺伝子発現に及ぼす Ascorbic acid の影響

考 察

まず EMD による骨芽細胞に対する細胞増殖並びに I 型コラーゲン遺伝子発現の促進は細胞の支持体への接着条件により影響を受けないことが明らかになった。次いで、骨芽細胞は Ascorbic acid を含まない条件では EMD による細胞増殖並びにコラーゲン遺伝子発現の促進は認められなかったが、Ascorbic acid を培地へ添加すると EMD は骨芽細胞の細胞増殖並びにコラーゲン合成を促進した。この実験結果は EMD による骨芽細胞の増殖促進はコラーゲン合成が促進した条件で起こることを示しており、コラーゲン合成が EMD による細胞増殖の促進効果発現と深く関わっていることが明らかになった。

結 論

本研究の結果から EMD の効果は細胞の支持体への接着条件により影響を受けず、また EMD の作用は Ascorbic acid の存在により促進されることが示唆された。

参考文献

Kishimoto Y, Saito N, Kurita K, Shimokado K, Maruyama N, Ishigami A. Ascorbic acid enhances the expression of type 1 and type 4 collagen and SVCT2 in cultured human skin fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun. 430:579, 2013

エナメルタンパク質アメロブラスチンの 進化の流れについて

43080061 盧山 晨
指導教官：藤澤 隆一
(口腔分子生物学教室)

Evolution of ameloblastin, an enamel protein

43080061 Shin Rozan
Directed by Ryuichi Fujisawa
(Oral Biochemistry and Molecular Biology)

キーワード：アメロブラスチン、アメロジェニン、相同性
Keywords: ameloblastin, amelogenin, homology

【諸言】

エナメル質はエナメル芽細胞によって合成され、その形成期の幼若エナメル質ではタンパク質が約 20% を占め、石灰化につれて減少し成熟エナメル質では 0.2~0.3% に低下する。そのエナメルタンパク質にはアメロジェニン(amg)、エナメルリンおよびアメロブラスチン(amb)がある。

amb とは、分子量約 65000 の糖タンパク質で、エナメル芽細胞により合成・分泌後、プロテアーゼによる分解を受けるため、成熟エナメル質には存在しない。

本研究は amb の進化の流れを明らかにし、そのタンパク質が歯の発生においてどのような役割を果たしているのかを解明することを目的とする。

【方法】

DDBJ という DNA の塩基配列の配列データベースと UniProt というタンパク質のアミノ酸配列のデータベースを使用した。また、キーワード検索として ARSA を使い、それぞれ調べた配列を ClustalW と tree view を用いて、塩基配列・アミノ酸配列の多重整列と系統樹作成を行った。さらに、アメロブラスチンの配列の相同性検索に BLAST も使用した。

【結果】

ヒト amb は 447 残基からなり、N 末端から始まる signal peptide 26 残基は疎水性が多い。N 末端部位約 1/4 に proline rich domain があり、親水性領域が 3 か所あることが解り、それらを親水性領域①~③とした。また、推定分子量が 48271、等電点は 4.85 となった。

amb は両生類、爬虫類、哺乳類で見つかり、硬骨魚類(ゼブラフィッシュ、メダカ、フグ)と鳥類(鶏)では見つからなかった。両生類、爬虫類、哺乳類の amb のアミノ酸配列は約 450 残基あり、proline rich domain も持つ。ヒトからカエルまでの amb の比較を行うと、特に似ている領域が 3 つあり、それを相同領域①~③とした。相同領域①は N 末端付近にあり、signal peptide 切断部位を含む。つまり、これは分泌タンパク質 N 末端に相当する領域であることが解った。②は 50~90 残基ぐらいの位置にあり、proline rich domain と一部重なり、親水性領域①を含む。また、③は 270~290 残基ぐらいの位置で、これは比較的親水性が高い。

ヒト amg と amb のアミノ酸配列の比較を同様にを行い、相同領域

①~③とした。相同領域①は 10~120 残基ぐらいの位置で、②は 160~240 残基ぐらいにある。また、③は 290~320 残基ぐらいにある。

相同領域①~③と相同領域①~③を比較すると(下図)、①の中に①と②が含まれており、③と③が重なっている。amb は amg より長い分子であり、さらに amb の前半約 2/3 は amg の全長と似ており、後半約 1/3 は他のエナメルタンパク質と似ていない独自のタンパク質と解った。

相同領域①の範囲で amg と amb について系統樹を作成した。相同領域①の系統樹では、動物種間での分散の度合いは amg の方が小さかった。同様にして、相同領域②と③においても系統樹を作成してみると、相同領域②の系統樹では動物種間での分散の度合いは amb の方が小さかった。また、相同領域③の系統樹では amg、amb の動物種間での分散の度合いは同程度であった。さらに相同領域③の amg 内を考えると、哺乳類間では分散の度合いは小さかった。

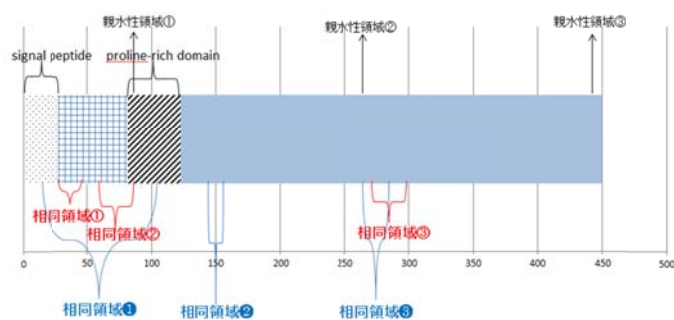
【考察】

amb 遺伝子は両生類、爬虫類、哺乳類で見つかり、硬骨魚類と鳥類では見つからなかった。魚類にはエナメル質の代わりとなるエナメロイドが存在する。エナメロイドはエナメル芽細胞と間葉由来の象牙芽細胞の両方によって形成されることから、魚類には amb 遺伝子が検出されなかったことも納得できる。

鳥類は爬虫類から進化したと言われていて、鳥類の祖先がくちばしを獲得し歯を失ったと考えられる。進化の中で、一度失った形質はたとえ進化を重ねても戻らないので、amb は、鳥類にとって必要でなくなったため喪失してしまったことがわかる。また、amg 遺伝子も鳥類では失われていることも知られていることから、amb や amg は歯の形成に特有の遺伝子であることがわかる。

amb の起源について考察してみると、amg と amb 相同性の高さから、両タンパク質は同じ先祖遺伝子から進化したと考えられる。これより、以下の二通りが考えられ、amb 遺伝子と同じ長さのある先祖遺伝子の一部分が切れて、amg 遺伝子ができた。もう一つは、amg 遺伝子と同じ長さのある先祖遺伝子に他からの遺伝子が癒合して amb 遺伝子ができたという二つである。

amb が amg と同じ長さの部分は amg と似た機能を持ち、amg より長い部分は amb 特有の機能を持っていると思われる。amg の機能として、アパタイト結晶の発育・成長に関与していることが想定されている。また、amg 分子は集合してナノ・スフェアを作り、エナメル質の石灰化とともに分解・除去される。amb もこれらの性質を共有する可能性がある。



相同領域①~③と相同領域①~③の比較グラフ

下顎第二小臼歯の咬合面形態について

43080015 片岡茉耶

指導教官 山本恒之

(口腔解剖学第二講座)

Occlusal Surface Morphology of Mandibular Second Premolars.

43080015 Maya Kataoka

Directed by Yamamoto T.

(Oral Anatomy II)

キーワード：咬合面形態, 下顎第二小臼歯, ヒト歯

key words: Occlusal Surface Morphology, Mandibular Second
Premolars, Human teeth

「緒言」

歯科医は咬合面の形態について十分な知識を有していなければならない。咬合面形態を十分に理解し、その多様性や個々の形態の出現頻度を知ることは、大いに治療に役立つと考えられる。しかしながら、多くの歯の解剖学の本は、咬合面形態を説明するために写真ではなく図を用いているためにイメージがわきづらい。

歯の解剖学の授業では上顎第一小臼歯と上顎第二小臼歯、上顎第一大臼歯と上顎第二大臼歯、下顎第一大臼歯と下顎第二大臼歯ではそれぞれの咬合面形態は似ているが下顎第一小臼歯と下顎第二小臼歯の咬合面形態は似ておらず、かつ下顎第二小臼歯は特に個体により変異が大きいと学んだ。そこで下顎第二小臼歯を選び、同歯にどのような頻度でどのような咬合面形態が出現するかを実際に確かめたいという目的で本研究を行った。

「材料と方法」

北海道大学歯学部旧口腔解剖学第二講座所有の 10%ホルマリン溶液に保存されていた、咬合面にう蝕がない完成した下顎第二小臼歯 56 本を材料とした。60℃、30%の水酸化カリウム水溶液で、30 分程度処理し歯牙表面の軟組織を化学的に除去した。

「結果」

下顎第二小臼歯の咬合面形態を以下の 3 種類に分類する

ことができた。

①H 字型

頬側と舌側に一つずつ咬頭があり咬合面溝が<H>の形をしているもの(写真 1)

②Y 字型

頬側に 1 咬頭、舌側に主咬頭と発達した副咬頭の 2 咬頭があり咬合面溝が<Y>の形をしているもの(写真 2)

③U 字型

頬側に 1 咬頭、舌側に主咬頭とあまり発達していない副咬頭があり咬合面溝が<U>の形をしているもの(写真 3)



写真 1：H 字型



写真 2：Y 字型



写真 3：U 字型

H 字型, Y 字型, U 字型のそれぞれの咬合面形態の本数

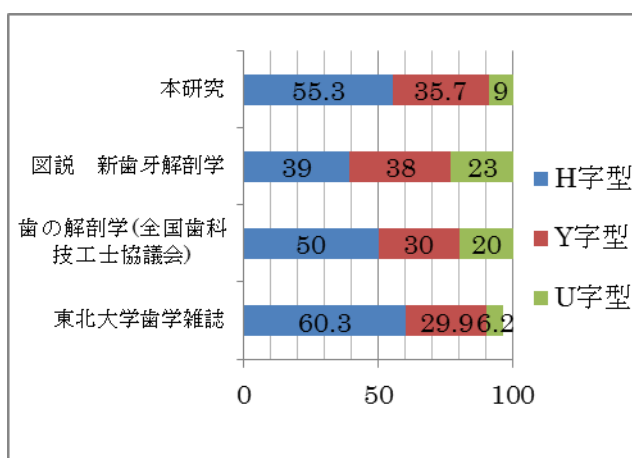
と出現頻度を以下の表で示した。

	H 字型	Y 字型	U 字型
本数(本)	31	20	5
出現頻度(%)	55.3	35.7	9.0

「考察」

下顎第二小臼歯の咬合面形態について、今回の結果とともに他の文献の結果を下に示す。

	H 字型	Y 字型	U 字型
本研究	55.3%	35.7%	9.0%
図説 新歯 牙解剖学	39%	38%	23%
歯の解剖学 (全国歯科技 工士協議会)	50%	30%	20%
東北大学歯 学雑誌	60.3%	29.9%	6.2%



小西（東北大学歯学雑誌）は、上記3種類以外にH字型とY字型の間であるHS型という4種類を用いている。本研究ではHS型をH字型として分類したため、小西の結果も再計算してH字型60.34%、Y字型29.86%、U字型6.17%とした。

本研究でH字型が一番多く、ついでY字型、一番少ないのがU字型であり、この順番は過去の文献と同じであった。しかし、本研究はU字型の割合がかなり低くH字型が高めという点が他の文献とは異なっている。この原因として考えられることは、本研究では使用した歯牙の本数が56

本と少ない点、その他に中間的な形の分類法の違い、などがあげられる。本研究でも咬合面形態をH字型、Y字型、U字型に分類はしたが、実際はどっちに分類していいか迷うものも多数見受けられた。また下顎第二小臼歯の咬合面形態の研究自体が予想したよりは少なく、もっとたくさんの研究データがあればより正確な数字が現れてくるであろう。

同じ下顎第二小臼歯であるのに、どのようにしてH字型、Y字型、U字型と形に差が出てくるのかを調べた。これには舌側副咬頭の発達度が大きく関わってくる。副咬頭がほとんど発達しなければ最も頻度が高いH字型となる。副咬頭が発達しついに主咬頭と肩を並べるくらいになると両者間に溝ができてY字型となる。U字型はその中間形といえる。小臼歯の進化の過程と関連付けようと歯の比較解剖学の本を読んだが、詳細は分からなかった。

今回の研究実習により同歯種（下顎第二小臼歯）であっても一つとして同じものがないという、咬合面形態の複雑性、多様性を学んだ。研究実習で得たこれらのことをなんらかの形で臨床の場でも役立てていきたいと考えている。

「文献」

1. 藤田恒太郎：歯の解剖学. 第22版, 金原出版
2. 井出吉信：図説新歯牙解剖学, わかば出版
3. 高橋常男 小林繁 副島泰子：歯の解剖学. (全国歯科技工士協議会) 医歯薬出版
4. 小西通雄：東北大学歯学雑誌 7 : 129-149, 1988

下顎第一大臼歯の咬合面形態について

43080030 沢崎俊太郎

指導教官：山本恒之(口腔解剖学第二講座)

Occlusal Surface Morphology of Mandibular First Molars

43080030 Shuntaro SAWAZAKI

Directed by Yamamoto T.

(Oral Anatomy II)

キーワード：咬合面形態，下顎第一大臼歯，ドリオピテクス型

key words: Occlusal Surface Morphology, Mandibular First Molars, Dryopithecus pattern

諸 言

歯科臨床においては咬合面形態の理解は治療を行う上で不可欠なものである。しかし、私達学生は咬合面形態、とくにその多様性、変異性に関してはあまり実感できていないように思う。特に下顎第一大臼歯は最も大きな咬合力を負担する臨床上重要な歯であるとともに、その咬合面形態は霊長類の比較発生学においても貴重な研究対象である。多くの教科書で同歯の咬合面形態には大きく3種類（Y字型，+型，X字型）あることが記載されている。さまざまな観点から重要な下顎第一大臼歯の咬合面に、実際にどの形態がどの程度の頻度で出現するかを自分自身で確かめたくて本研究を行った。

材料と方法

北海道大学歯学部旧口腔解剖学第二講座所有の10%ホルマリン溶液に保存されていた5咬頭の下顎第一大臼歯59本を材料とした。60℃、30%の水酸化カリウムで30分程度処理し歯牙表面の軟組織を化学的に除去した。その後、流水下で付着していた軟組織を歯ブラシで機械的に除去した。

結 果

下顎第一大臼歯の咬合面形態を咬合面溝の形態から以下の三種類に分類した。

- ①Y字型(写真1)：頬側溝と中心溝の交点が舌側溝と中心溝との交点より近心にずれており、近心頬側咬頭と遠心舌側咬頭は接触しないもの(ドリオピテクス型)
- ②+型(写真2)：中心溝と頬側溝が+型に交差するもの
- ③X字型(写真3)：頬側溝と中心溝の交点が舌側溝と中心溝との交点より遠心にあり、遠心頬側咬頭と近心舌側咬頭は接触しないもの



写真1：Y字型



写真2：+型



写真3：X字型

三種類の咬合面形態の出現頻度を以下の表で示す。

	Y字型	+型	X字型	計
本研究	32本	9本	4本	45本
	71.1%	20.0%	8.90%	100%

※59本のうち咬合面に齧蝕や充填物があり形態が確認できない14本は研究対象から除外した。

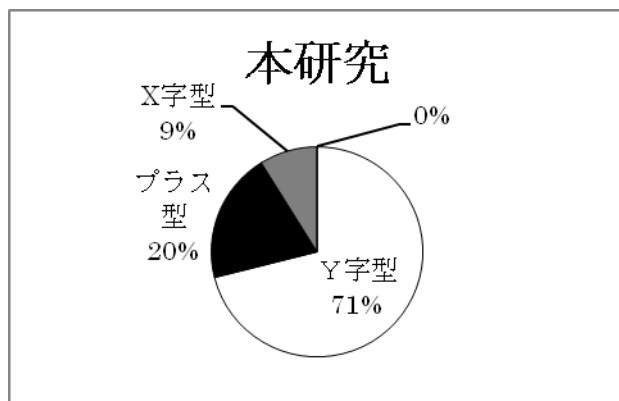
考 察

本研究結果と過去の文献データを以下の表に示す。

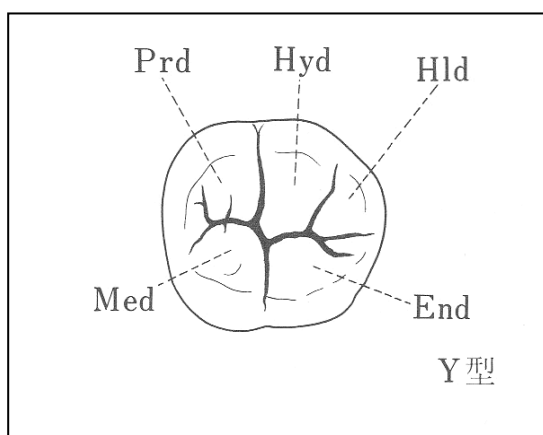
	Y字型	+型	X字型	計
研究1	64.0%	35.0%	0%	100%
研究2	65.0%	30%	5%	100%
研究3	約65%	約33%	約2%	100%
研究4	70%	26%	5%	100%
本研究	71.1%	20.0%	8.90%	100%

※研究1 参考文献1)より引用
研究2 " 2)より引用
研究3 " 3)より引用
研究4 " 4)より引用

本研究結果のグラフ



・下顎大臼歯咬合面形態



※参考文献5)より引用

オランウータン科およびヒト科の下顎大臼歯咬合面形態の基本型では、頬側に protoconid(Prd), hypoconid(Hyd)および hypoconulid (Hld)の 3 咬頭、舌側に metaconid(Med)と entoconid(End)の 2 咬頭、計 5 咬頭があり、Med は Prd の舌側に、Hyd は Med と End の間に存在する。そのため基本型では Hyd と舌側の Med および End との間に作られる溝は Y 字型をなす。

基本型は進化とともに二次的な変化を生ずる。現生人類ではドリオピテクスパターン(Y字型)を示すことが多いが、第二および第三大臼歯では咬頭の相対的大きさの変化に伴って、溝の位置も異なってくる。5つの咬頭のうち Hld が二次的に縮小し、Prd と Hyd の間の溝が遠心に移動し、その結果 Med と End の間にある溝が十字型に交わるようになる。これが+型である。

さらに Hld の縮小が進むと End と Med の間の舌側溝よりも Prd と Hyd の間にある頬側溝が遠心に移動して Prd と End が接触するようになる。これが X 字型である。

これまでの研究では、表の示す通りに Y 字型が約三分の二、+型が約三分の一、X 字型が少数の割合で出現する。本研究においてもほぼ同様の結果が得られたが、比較的+型が少なく X 型が多い結果となった。本研究

では 5 咬頭持つ歯のみを材料としたためこのような差が生じたのであろう。調査歯数を多くし、4 咬頭性の歯も加えれば+型の出現頻度がより高まるものと思われる。

さまざまな咬合面形態を観察し、またいろいろな文献で歯の進化についての知識を得た。これから歯科医師として一生付き合うことになる歯は、小さいながらも古代から脈々と進化、変化していることを実感した。これをつねに忘れずに臨床に望もうと強く思っている。

参考文献

- 1)『歯の解剖学』高橋常男 小林繁 副島泰子著 全国歯科技工士協議会 医歯薬出版
- 2)『解剖学、組織発生学、口腔解剖学』 全国歯科衛生士教育協議会編
- 3)『歯の解剖学』編著 三好作一郎 医歯薬出版
- 4)『歯の解剖学』佐伯政友 瀬尾次郎著 全国歯科技工士教育協議会
- 5)『歯の形態と進化』酒井琢朗著 医歯薬出版

43070024 瀬川 憂樹

指導教員：網塚憲生

Histological alteration caused by disrupted NaPi II
signaling in bone

43070024 Yuki Segawa

Supervised by Norio Amizuka (Oral Histology)

キーワード：腎臓、ナトリウム/リン共輸送体、骨芽細胞、破骨細胞

Key words: kidney, sodium/phosphate co-transporter, osetoblast, osteoclast

【緒言】

血中リン濃度は腎臓によって調節されているが、骨細胞から分泌される fibroblast growth factor (FGF) 23 が循環系によって腎臓の近位尿細管に作用し、ナトリウム/リン共輸送担体 II 型 (NaPi II : sodium / phosphate co-transporter II) を抑制することで、リンの再吸収を抑制し、血中リン濃度を低下させることが知られている。腎臓の近位尿細管におけるナトリウム/リン共輸送担体 II 型 (NaPi II) はリンの再吸収を担う重要な膜貫通型タンパクであり、マウスには NaPi II a および NaPi II c のサブタイプが存在するが、マウスの場合、NaPi II a が主に機能することが知られている。さらに、血中リン濃度が低下すると骨軟化症が発症する事が知られている。本研究実習では、NaPi II a 遺伝子欠損 (NaPi II a^{-/-}) マウスにおける骨組織の異常を形態学的に検索した。

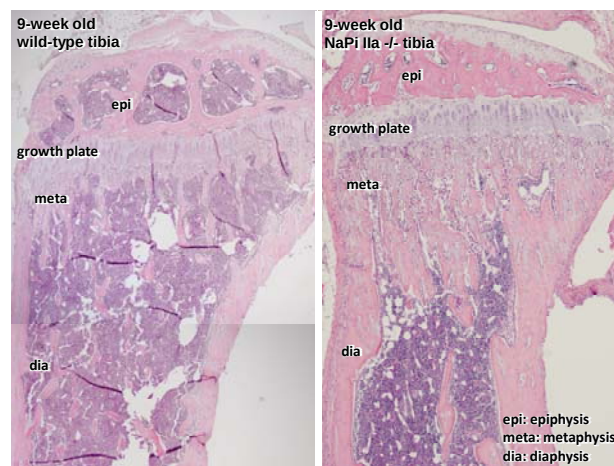
【材料と方法】

生後 9 週齢の野生型マウスならびに NaPi II a^{-/-} マウスをアルデヒド灌流固定後、大腿骨・脛骨を摘出し同固定液に 2 4 時間浸漬固定した。10%EDTA 溶液にて脱灰したあと、通法にてパラフィン包埋を行った。パラフィン切片を用いて、H-E およびアリュンシアンブルー染色、組織非特異型アルカリフォスファターゼ (ALP) およびカタプシン K の間接法による免疫染色、ならびにアゾ色素法による酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP) の酵素組織化学といった組織化学を行った。

【結果】

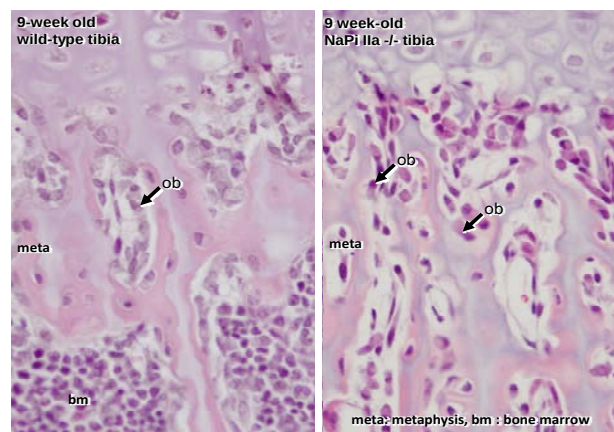
①H-E 染色

以下に、野生型マウスならびに NaPi II a^{-/-} マウスの脛骨の HE 染色像を示す。NaPi II a^{-/-} マウスでは野生型マウスに比較して、骨端ならびに骨幹端において、多数の太い骨梁を認めた。



(野生型マウス：左図、NaPi II a^{-/-}マウス：右図)

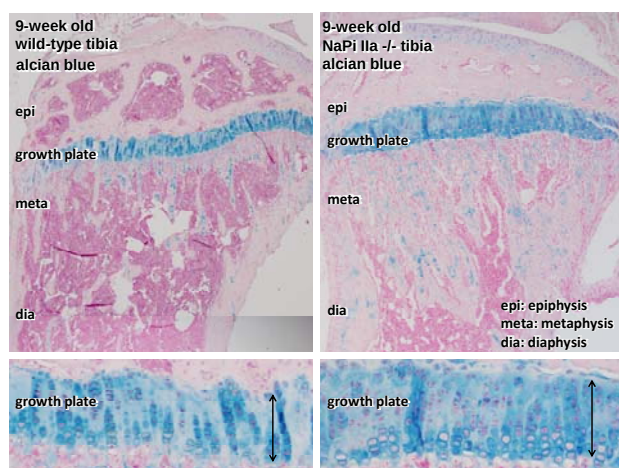
次に骨幹端の拡大像を観察すると、野生型マウスおよび NaPi II a^{-/-} マウスともに、矢印で示したように、骨梁表面には細胞体の豊かな多数の活性型骨芽細胞、すなわち、骨基質を活発に行っていると思われる骨芽細胞を認めた。



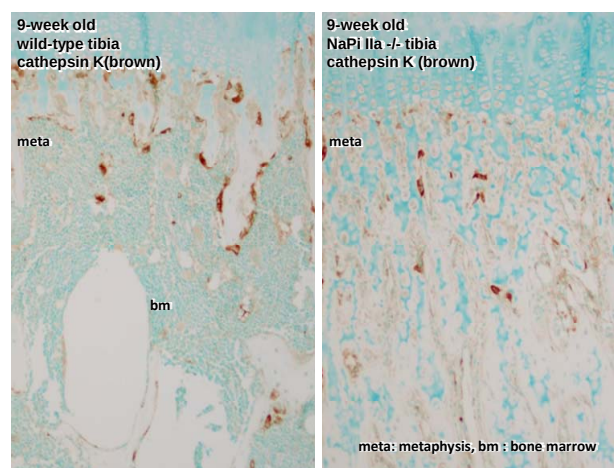
(野生型：左図、NaPi II a^{-/-}マウス：右図)

②アルシアンブルー染色

野生型マウスならびに NaPi II a^{-/-} マウスの脛骨において、アルシアンブルー染色を行うと、NaPi II a^{-/-} マウスでは青色に染色された連続した軟骨基質を含む骨梁が存在することから、骨幹端部の骨梁は、必ずしも、破骨細胞と骨芽細胞との骨改造により二次骨梁に置き換わっていないと思われた。また、野生型マウスに比べて NaPi II a^{-/-} マウスでは、成長板軟骨がやや肥厚しているように認められた。



(野生型：左図、NaPi II a^{-/-}マウス：右図、下段は成長板軟骨の拡大像)

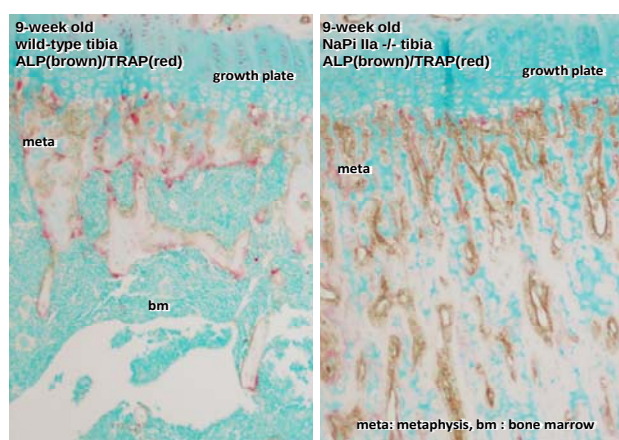


(野生型：左図、NaPi II a^{-/-}マウス：右図)

【考察ならびに結論】

③組織非特異型アルカリフォスファターゼ (ALP) と酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 染色

野生型マウスならびに NaPi II a^{-/-}マウスの脛骨・骨幹端の ALP と TRAP の二重染色を行ったところ、NaPi II a^{-/-}マウスでは多数の ALP 陽性骨芽細胞を認めた。一方、NaPi II a^{-/-}マウスでは、骨表面に対する TRAP 陽性破骨細胞はそれほど多くなかった。



(野生型：左図、NaPi II a^{-/-}マウス：右図)

④カテプシン K 免疫染色

破骨細胞のもう一つのマーカーとして、コラーゲン線維分解酵素であるカテプシン K があげられる。そこで、カテプシン K の免疫染色を行ったところ、NaPi II a^{-/-}マウスでは、発達した骨梁に比べてカテプシン K 陽性破骨細胞数が少なかった。拡大を上げて観察すると、NaPi II a^{-/-}マウスの破骨細胞はやや小型であり、骨基質にしっかりと定着していない破骨細胞も認められた。

NaPi II a 欠損環境では、骨端の骨梁は肥厚し骨幹端に多数の骨梁を認めた。また、アルシアンブルー染色を行うと、骨梁内には、酸性ムコ多糖類を含む連続した軟骨基質を認めた。このことは、NaPi II a が欠損すると、活発な骨改造が行われていない可能性を示唆するものと思われる。そこで、TRAP 陽性ならびにカテプシン K 陽性破骨細胞を組織化学的に検索すると、破骨細胞の数が減少していることが示唆された。一方、多数の ALP 陽性骨芽細胞を認めた。以上のことから、NaPi II a^{-/-}マウスでは、破骨細胞による骨吸収よりも骨芽細胞による骨形成が優位な状態が誘導されていると考えられた。事実、NaPi II a^{-/-}マウスでは、多数の太い骨梁を観察することができた。しかし、NaPi II a^{-/-}マウスでは低リン血症を示すことから、多量に形成されている骨基質は低石灰化を示す可能性があり、今後、骨基質石灰化を検索する必要があると考えられた。

上顎第一小臼歯の根管形態について

43080033 楚南 はるか

指導教官：山本 恒之
(口腔解剖学第二講座)

The Root Canal Morphology of
Maxillary First Premolars
43080033 Haruka SONAN
Directed by Yamamoto T.
(Oral Anatomy II)

キーワード：透明標本、根管、上顎第一小臼歯

Key words: Transparent Teeth, Root Canals,
Maxillary First Premolars

緒言

根管治療は歯科臨床において基本的で重要な治療分野である。根管治療を的確に行うためには根管形態を十分に把握する必要がある。多くの根管形態を論じた文献は同時に写真を載せているものは少なく、根管形態は多様であることは理解できても実感はわきづらい。

上顎第一小臼歯は近遠心方向に圧平されるため、単根管と二根管の両方が出現しやすく、とりわけ複雑な根管形態を示すといわれる。そこで本研究では同歯を選び、根管の分岐状態を実際に観察して明らかにすることを目的とした。

第30期生の研究実習において透明性を失わせることなく透明標本をレジン包埋する方法が考案されたため、観察には同方法を利用した。

材料と方法

北海道大学歯学部旧口腔解剖学第二講座所有の10%ホルマリン溶液に保存されていた、根面にう蝕のない完成した上顎第一小臼歯、左48本、右59本、計107本を材料とした。60℃、30%の水酸化カリウム水溶液で1時間程度処理し歯牙表面の軟組織を化学的に除去した。流水下で清掃後、5%蟻酸水溶液で3週間脱灰し墨汁とともに真空容器に入れて陰圧を利用して根管内に墨汁を浸透させた。70、80、90、100%、無水アルコールで1日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルⅠ、Ⅱに一日ずつ浸漬して標本を透明にした。次いでスチレンモノマーに1日、スチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1：1混合液に1日、純ポリエステルレジン（触媒入り）に5日間標本を入れレジンを浸透させた。重合前に余剰なレジンを筆で拭き取り紫外線重合器で1日間重合した。

結果

上顎第一小臼歯根管形態は分岐の状態から以下の3種類に分類できた。

① 単純根管（図1）

一本の根管が一つの根尖孔に開孔する

② 完全分岐根管（図2）

二本の根管が二つ以上の根尖孔に開孔する

③ 不完全分岐根管（図3）

二本の根管が合わさって一つの根尖孔に開孔する



図1 単純根管



図2 完全分岐根管



図3 不完全分岐根管

根管形態の出現歯数と頻度は以下ようになった。

	左	右	計
単純根管	12 本 (25.0%)	13 本 (22.0%)	25 本 (23.4%)
不完全分岐根管	16 本 (33.3%)	27 本 (45.8%)	43 本 (40.2%)
完全分岐根管	20 本 (41.7%)	19 本 (32.2%)	39 本 (36.4%)
計	48 本	59 本	107 本

考察

上顎第一小臼歯の根管形態について、今回の結果と共に以前の研究者の結果を示す。以前の研究は単根管と複根管（2根管）を合わせた上顎第一小臼歯全体での頻度を算出しているため、本研究結果もそれに合わせて計算しなおした。再計算には以下の三つを前提とした。

1. 単根と2根の出現率は単根 40%, 2根 60%である(藤田)。
2. 3根以上は出現しない。
3. 2根のものはすべて完全分岐根管とする

研究者	年	歯数	方法	単純根管	不完全分岐根管	完全分岐根管
Pineda and Kuttler	1972	259	抜去歯 X 線写真	33.9%	23.9%	41.7%
Green	1973	50	抜去歯切片	8.0%	26.0%	66.0%
Carns and Skidmore	1973	100	抜去歯レジン法	9.0%	13.0%	72.0%
Vertucci and Gegauf	1979	400	抜去歯透明および染色切片	15.0%	18.0%	62.0%
Bellizzi and Hartwell	1985	514	口腔内 X 線写真	6.2%	—	90.5%
岡田	2010	90	レジン透明標本	12.0%	16.0%	72.0%
本研究	2013	107	レジン透明標本	9.4%	16.1%	74.5%

再計算の結果, 上顎第一小臼歯全体において単純根管は 9.4%, 不完全分岐根管は 16.1%, 完全分岐根管は 74.5%の頻度で現れると算出された。

完全分岐根管の頻度については加齢による影響は考えにくいものの, 単純根管と不完全分岐根管の頻度は加齢によって変化する。経年的に象牙質が形成され次第に歯髄腔は狭窄し, 単純根管はついには不完全分岐根管になるからである。本研究を含めた全ての研究で提供者の年齢の記載がないため, 単純根管と不完全分岐根管の個別の比較はあまり意味がない。そこで, 単純根管+不完全分岐根管の出現頻度(本研究では 25.5%)と完全分岐根管の出現頻度(本研究では 74.5%)の二つを過去の文献と比較したところ, Carns と Skidmore および岡田の結果とほぼ一致した。根管形態の観察法として透明標本が最も信頼されている。日本人歯牙の透明標本を使った岡田の結果とほぼ数値が同じであったということで, 日本人の上顎第一小臼歯のほぼ 70~75%程度が完全分岐根管で, 残りはそれ以外の根管形態を持つ, と結論付けてもよいであろう。

本研究と差が見られた研究は, 1) 日本人以外の歯牙を材料としている, 2) 透明標本以外の, あるいは透明標本とその他の方法を組合せている, ものである。観察法あるいは人種の違いにより結果に違いが出たと思われるものの, これ以上の考察はできなかった。

今回の研究実習において, 同一歯種においても異なる根管形態が存在すること, 根管の中には非常に複雑なものも存在すること, などを実際に自分の目で見て実感することができた。上顎第一小臼歯のみではあるが, 根管形態についての大まかな指標を得ることができた。この指標は今後歯科治療を行う際に役立つものであると確信している。

参考文献

1. 櫻場 一郎 (2001): 歯牙透明標本のレジン包埋について 30 期生 (平成 12/13 年度) 研究実習論文報告集
2. 岡田 壮平 (2010): 単根の上顎第一小臼歯の根管形態について 39 期生 (平成 21 /22 年度) 研究実習論文報告集
3. L.I.Grossman, Seymour Oliet, Carlos E.del Rio (1992): グロスマン エンドドンティックス第 4 版、医歯薬出版
4. 藤田 恒太郎 (1995): 歯の解剖学第 22 版、金原出版

下顎第二大臼歯樋状根の 根管形態について

43080053 南川 彰

指導教官：山本恒之（口腔解剖学第二講座）

Root Canal Morphology in Gutter Shaped Root of Mandibular Second Molars.

43080053 Akira Minamikawa

Directed by Yamamoto T. (Oral Anatomy II)

キーワード：下顎第二大臼歯、根管形態、透明標本

Key words: Gutter Shaped Root, Mandibular Second
Molars, Transparent Teeth

緒言

根管治療は歯科臨床においてきわめて基本的で重要な治療分野である。根管治療を的確に行うためには根管形態を十分に把握する必要がある。下顎第二大臼歯には約30%の割合で近・遠心根の頰側半が癒合する樋状根が現れる。樋状根の根管形態についての記載は、調べた限り32期生以上の研究実習報告書以外にはなかった。そこで個人的興味もあり、本研究では再度、透明標本を用いて3次元的に下顎第二大臼歯樋状根の根管形態について調べることにした。透明標本法は根尖分岐や細かい側枝も観察できるため、根管形態を調べる上で最も信頼度が高い。透明標本については第30期生の研究実習において考案されたレジン包埋法を利用した。

材料と方法

北海道大学歯学部旧口腔解剖学第二講座所有の10%ホルマリン溶液に保存されていた、根面にう蝕のない完成した樋状根を持つ下顎第二大臼歯、右17本、左14本、計31本を材料とした。60℃、30%の水酸化カリウム水溶液で1時間程度処理し歯牙表面の軟組織を化学的に除去した。流水下で清掃後、5%蟻酸水溶液で3週間脱灰し、墨汁とともに真空容器に入れて陰圧を利用して根管内に墨汁を浸透させた。31本のうち2本からはおよそ幅1mm程の連続スライスをカミソリで作成した。残りを70%、80%、90%、100%、無水アルコールで1日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルⅠ、Ⅱに1日ずつ浸漬して標本を透明にした。次いで、スチレンモノマーに1日、スチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1：1混合液に1日、純ポリエステルレジン（触媒入り）に5日間標本を入れレジンを浸透させた。重合前に余剰なレジンを筆で拭き取り紫外線重合器で1日間重合した。

結果

樋状根の根管形態を分岐の状態から以下の3種類に分類できた。

- ① 【単純根管】
一本の根管が一つの根尖孔に開孔する（写真1）
- ② 【完全分岐根管】
二本の根管が二つ以上の根尖孔に開孔する（写真2）

- ③ 【不完全分岐根管】
二本の根管が合わさり一つの根尖孔に開孔する（写真3）



写真1：単純根管



写真2：完全分岐根管



写真3：不完全分岐根管

連続スライスは、墨汁が浸透していない部位が、実際に象牙質で遮断されているのか、それとも墨汁が単に浸透しなかっただけなのか、を確認するために使用した。墨汁が浸透していない部位は実際に象牙質で封鎖され根管の連続性が失われていることを確認できた（写真4矢印）。

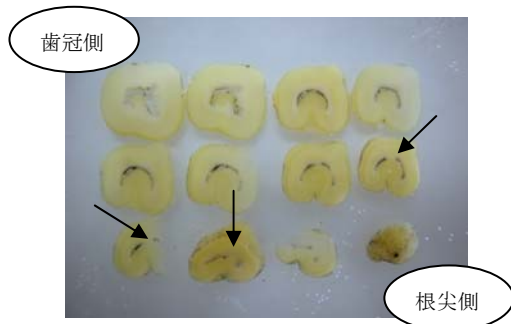


写真4：歯根の連続切断像

本研究での3種類の根管形態の出現歯数と頻度を以下の表に示す。

南川	右	左	計
単純根管	5本 (29.4%)	3本 (21.4%)	8本 (25.8%)
不完全分岐根管	6本 (35.3%)	7本 (50%)	13本 (41.9%)
完全分岐根管	6本 (35.3%)	4本 (28.6%)	10本 (32.3%)
計	17本	14本	31本

以下に今上のデータを示す。

今上	右	左	計
単純根管	12本 (41.4%)	7本 (26.9%)	19本 (34.5%)
不完全分岐根管	9本 (31%)	11本 (42.3%)	20本 (36.4%)
完全分岐根管	8本 (27.6%)	8本 (30.8%)	16本 (29.1%)
計	29本	26本	55本

考察

不完全分岐根管は単純根管から派生するといわれている。つまり、単純根管が経年的に二次象牙質あるいは修復象牙質により狭窄し、ついには不完全分岐根管となるのである。本研究も今上の研究も歯の提供者の年齢はわからない。したがって、単純根管と不完全根管とを別々に比べてもそれほど意味はない。単純根管＋不完全分岐根管の頻度、および完全分岐根管の頻度、の二つの数値を比べるのが妥当であろう。これに従えば、本研究では単純根管＋不完全分岐根管は67.7%、完全分岐根管は32.3%、今上の研究では単純根管＋不完全分岐根管は70.9%、完全分岐根管は29.1%となりかなり近似した値となった。今上の研究も本研究も透明標本を使っていることから信頼性は高い。両者の結果を合わせると、計86本中で単純根管＋不完全分岐根管は69.8%、完全分岐根管は30.2%となる。例数は少ないものの、この数字は概ね日本人下顎第二大臼歯槌状根における根管形態の平均値となるものと考ええる。

既述したように本研究では、年齢の要素が考慮されていない。より正確な出現頻度を求めるならば、年齢の把握とともにより厳密な分類の規格化が必要であろう。

今回の研究実習から槌状根の根管形態が複雑であり、ひいては精密な根管治療が難しいことを痛感させられ

た。緊密な根管充填を施すにどうすればいいのか、を考える契機となった。レントゲン撮影により、あるいは根管口を明示した時点で槌状根と分かったならば、今回の研究実習を大いに参考にして治療を行なって行きたい。

文献

- 1) 藤田 恒太郎 (1995)：歯の解剖学第22版、金原出版
- 2) 須田 英明 戸田 忠夫 (2000)：エンドドンティック21、永末書店
- 3) 櫻場 一郎 (2001)：歯牙透明標本のレジン包埋について 30期生（平成12/13年度）研究実習論文報告集
- 4) 今上 修一 (2003)：歯牙透明標本のレジン包埋について 32期生（平成14/15年度）研究実習論文報告集

RANKL 遺伝子欠損マウスにおける組織化学解析
—RANKL 遺伝子欠損マウスに存在する
破骨細胞様大型細胞について—

43070051 宮本 幸奈

指導教官: 網塚 憲生
(硬組織発生生物学)

Histochemical assessment in long bones of RANKL
deficient mice

43070051 Yukina Miyamoto

Supervised by Norio Amizuka (Oral Histology)

キーワード: RANKL、破骨細胞
Key words: RANKL, osteoclast

【緒 言】

破骨細胞の分化形成には様々な因子が作用することが知られている。破骨細胞・マクロファージ共通の前駆細胞への分化には M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) が重要であり、マクロファージと分化経路を異にした破骨細胞分化初期には c-fos が関与する。さらに、破骨細胞の最終分化ならびに形成後の骨吸収活性については、破骨細胞・破骨細胞前駆細胞が有する RANK と骨芽細胞系細胞が有する RANKL とが結合し、RANKL シグナルが伝達される必要がある。従って、c-fos 遺伝子および RANKL 遺伝子を欠損したマウスには破骨細胞は存在せず骨硬化像を示す。

本研究実習では、RANKL 遺伝子欠損 (RANKL^{-/-}) マウスの骨組織を、c-fos 遺伝子欠損 (c-fos^{-/-}) マウスとの比較のもとで観察したところ、これまでに学術論文では報告されていない破骨細胞様大型細胞の存在が認められたのでその組織化学・微細構造学的検索を行った。

【材料と方法】

c-fos^{-/-} マウス、RANKL^{-/-} マウスおよび野生型マウスをアルデヒド灌流固定し、大腿骨・脛骨を摘出した (動物固定は許可されていないため、指導教官の見学とさせて頂いた)。これらのサンプルは EDTA 溶液で脱灰した後、パラフィンと epoxy 樹脂に包埋し、組織化学用と準超薄樹脂切片を作成するとともに、ダイヤモンドナイフを用いて超薄樹脂切片を作成した。超薄樹脂切片は酢酸ウランとクエン酸鉛で電子染色を行い、透過型電子顕微鏡で観察した。一方、パラフィン切片では下記の組織解析を行った。

〈パラフィン切片での解析項目〉

1) H-E 染色

2) 免疫組織化学

- alkaline phosphatase (ALP: 骨芽細胞系細胞の同定)
- cathepsin K (破骨細胞産生コラゲナーゼ)
- MMP-9 (破骨細胞産生ゼラチナーゼ)
- vacuolar-type proton pump (H⁺-ATPase)
- F4/80 (マウス単球・マクロファージマーカー)
- MA1 (マウスマクロファージマーカー)
- Mac2 (S-レクチンファミリー: マクロファージ系マーカー)

3) 酵素組織化学

酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP: 破骨細胞のマーカー酵素)

【結 果】

① H-E 染色

野生型マウス、c-fos^{-/-} マウスおよび RANKL^{-/-} マウスの頸骨のパラフィン切片について H-E 染色を行った (図1)。野生型マウスの骨幹端では明瞭な骨梁と骨髄が観察されたが (図1左)、c-fos^{-/-} マウスの骨幹端は骨梁で満たされており、矢印で示すように扁平な細胞が骨表面を覆っていた (図1中央)。ところが、RANKL^{-/-} マウスでは骨硬化像を示すものの、黄色の矢頭で示すような丸い核をもった細胞が骨梁上に局在していた (図1右)。

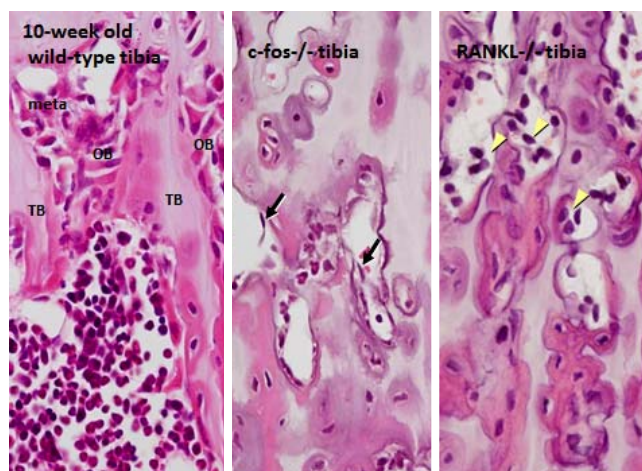


図1: 左は野生型(wild-type)、中央は c-fos^{-/-}、右は RANKL^{-/-} マウス脛骨の組織像を示す。c-fos^{-/-} マウスおよび RANKL^{-/-} マウスは骨梁が骨幹端を満たすが、c-fos^{-/-} マウスでは扁平な細胞 (黒矢印) が骨表面に局在する。一方、RANKL^{-/-} マウスでは楕円形状の細胞が骨表面に観察される (黄色矢頭)

② ALP・TRAP 染色

野生型マウス、c-fos^{-/-} マウスならびに RANKL^{-/-} マウスの脛骨パラフィン切片で ALP・TRAP 染色を行った結果、野生型マウスでは、赤く染まる多数の TRAP 陽性破骨細胞と茶色に染まる ALP 陽性骨芽細胞が観察された (図2)。一方、c-fos^{-/-} マウスでは、ALP・TRAP とともに陽性反応は観察されなかった。つまり、破骨細胞が存在しないため骨芽細胞へのカップリングが成立せず、骨芽細胞の活性が低下してい

ると推測された。ところが、RANKL^{-/-}マウスで TRAP 陽性の破骨細胞は存在しないにもかかわらず、ALP 強陽性を示す多数の骨芽細胞が観察された。

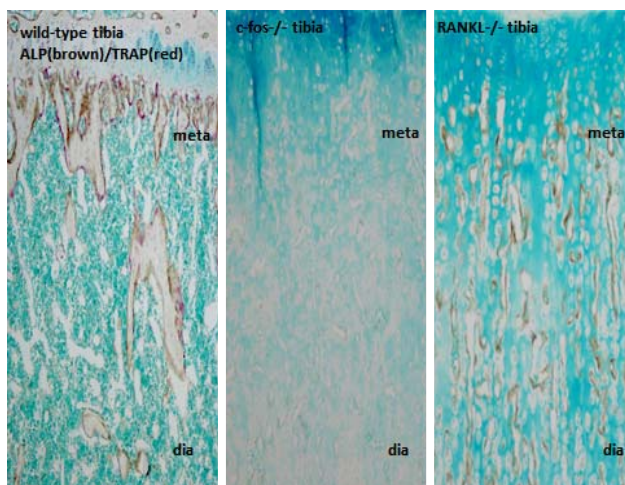


図2: 左は野生型(wild-type)、中央は c-fos^{-/-}、右は RANKL^{-/-}マウス脛骨のALP/TRAP染色像を示す。野生型マウスではTRAP(赤)陽性破骨細胞とALP(茶色)陽性骨芽細胞が骨梁上に局在する(左)。一方、c-fos^{-/-}マウスではALP陽性・TRAP陽性細胞は観察されない(中央)。RANKL^{-/-}マウスではTRAP陽性細胞が存在しないにもかかわらず、ALP陽性細胞を認める(右)

③ トルイジンブルー染色

RANKL^{-/-}マウスの頸骨 epoxy 樹脂切片のトルイジンブルー染色では、破骨細胞に類似した大型の細胞が細胞外基質を取り込んでいる像が観察された(図3)。また、その大型細胞の周囲には、細胞体の豊かな多数の活性型骨芽細胞が存在していた。このことから、基質を取り込む破骨細胞様大型細胞は骨芽細胞の活性化に何らかの影響を与えていることが示唆された。

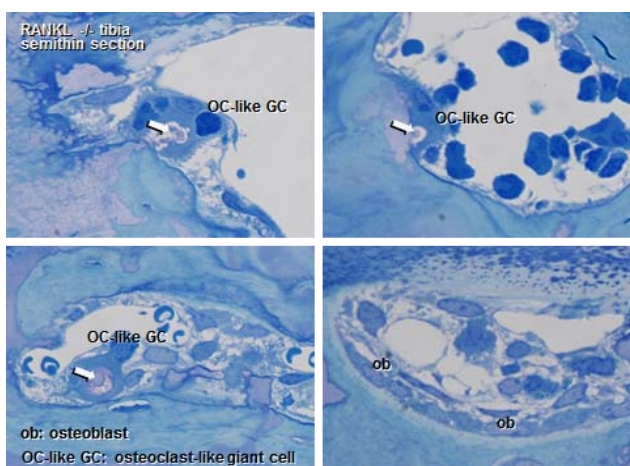


図3: RANKL^{-/-}マウスで観察された破骨細胞様大型細胞(左上、右上、左下)および活性型骨芽細胞の組織学所見(右下)。破骨細胞様大型細胞は2~3個の核を有し、細胞外基質を取り込む像を示す(白矢印)。また、その周囲には活性型骨芽細胞が存在する(右下)。

④ 透過型電子顕微鏡観察

RANKL^{-/-}マウスで認められた基質を取り込む細胞を電子顕微鏡で観察すると(図4)、破骨細胞様大型細胞は、波状縁を有さず、複雑な細胞突起で細胞外基質(多くは石灰化軟

骨基質)を取り込む像を示した。この大型細胞の内部には、多数のミトコンドリアと大小の空胞が認められた。細胞外基質と接する部分は、細胞内小器官に乏しく、破骨細胞の明帯に類似した構造を持つことが示唆された。

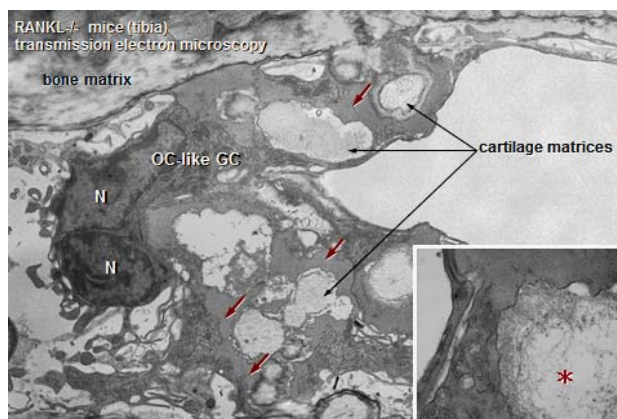


図4: 破骨細胞様大型細胞(OC-like GC)の透過型電子顕微鏡像。ここでは2つの核(N)を確認でき、骨基質と接着している領域は明帯に類似した微細構造を示す(赤矢印)。内部には軟骨基質様の構造物(*)が取り込まれている(枠内は一部拡大)

⑤ 免疫組織化学(cathepsin K, MMP-9, H⁺-ATPase, Mac2, F4/80, MA1)

RANKL^{-/-}マウスに認められた破骨細胞様大型細胞とマクロファージとの異同を明らかにするため、各細胞マーカーの免疫組織化学を行った。RANKL^{-/-}マウスで見つかった大型細胞は破骨細胞とマクロファージの両方に共通したマーカーに陽性反応を認めた。

	破骨細胞が有する性質			共通の性質		マクロファージが有する性質	
	TRAP	cathepsin K	MMP-9	H-ATP	Mac2	F4/80	MA1
破骨細胞	+	+	+	+	+	-	-
破骨細胞様大型細胞	-	-	-	+	+	-	-

【考察および結論】

RANKL^{-/-}マウスでは石灰化軟骨基質を取り込む破骨細胞様大型細胞が存在すること、また、骨基質合成を行っている多数の活性型骨芽細胞が存在することが示された。破骨細胞様細胞は破骨細胞とマクロファージに共通した性質を持ち、活発に軟骨基質の取り込みと分解を行っていることが示唆された。以上から、RANKL^{-/-}マウスにはRANKLが作用する前段階まで分化が進んだ破骨細胞前駆細胞が存在し、それらは2, 3個の核を持ち、発達した波状縁を形成しないが石灰化基質を取り込む能力をすでに獲得していると考えられた。

【参考文献】

宮本幸奈: 学生優秀ポスター発表賞 第 53 回歯科基礎医学会学術大会 RANKL 遺伝子欠損マウスの破骨細胞様大型細胞における組織化学的検索. 岐阜 2011 年 9 月 30 日 -10 月 2 日

炎症性の少ない生分解性ポリ乳酸の試作

43080003 石田 雄大

指導教員 亘理 文夫

(生体理工学教室)

Preperation of low inflammatory biodegradable polylactic acid

43080003 Takehiro Ishida

Directed by Fumio Watari

キーワード: ポリ乳酸 (PLA)、アルギニン、生分解性、炎症性

Keywords: polylactic acid, arginine

biodegradable, inflammatory

【緒言】

ポリ乳酸 (PLA) を原料とした生分解性ポリマーやプレートは口腔領域の手術でもよく使用されているが、吸収される過程でのモノマー化 (分子量 $M \approx 90$) で起こる炎症が問題になっている。炎症の原因は PLA の分解過程で起こる pH の低下による酸性化と考えられる (図 1a)。本研究では生体内で無害で代謝される塩基性アミノ酸のアルギニン (図 1b) を使用し、PLA と混合し中和を図ることで pH の低下を抑制し、組織炎症性の少ない生分解性ポリマーを試作することを目的とした。

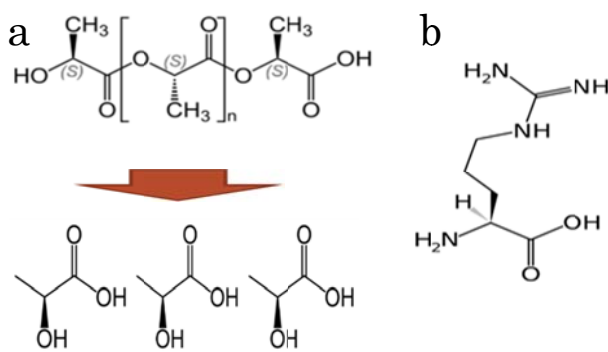


図1 a: ポリ乳酸と分解された乳酸モノマー ($n=1$ の場合)
b: アルギニンの構造式

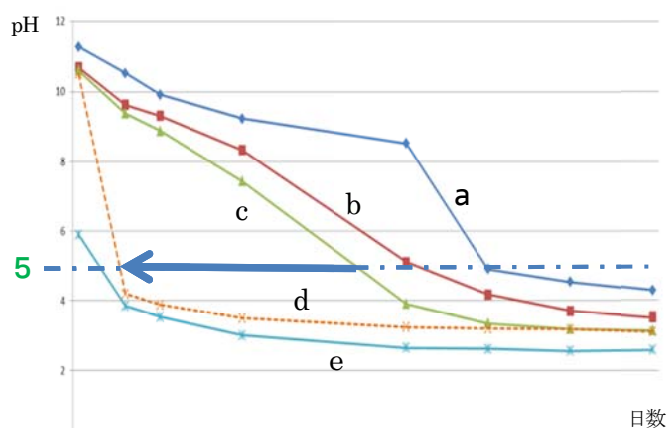


図2 37°Cおよび67°Cにおける pH 変化 (粉末混合体)

a. 重量比 1 : 1, b. 重量比 1 : 0.5, c. 重量比 1 : 0.25
d. 重量比 1 : 0.25, e. PLA のみ
(d のみ 67°C, 他は 37°C)

【材料と方法】

①材料: PLA 粉末 ($M \approx 5000$) とアルギニン粉末

($M \approx 174$, (株) ヘルシーベスト) を用いた。

②方法: PLA 粉末とアルギニン粉末を 1 : 0.25~2 の割合で混合し、粉末混合体およびコンポジット成形体を試作した (図 3)。生理食塩水に浸漬した時、その pH の挙動を温度 37°C および 67°C で pH メーター、および pH 指示薬 (BTB 液) を用いて 10~30 日測定した (図 2, 4)。

【結果と考察】

37°C では PLA の分解完了に 40 日間以上要するため (図 2a,b,c, e)、pH 低下速度が約 20 倍になる 67°C での加速度試験を採用した (図 2c→d)。PLA のみでは pH は 2.8 まで低下したが (図 2e)、アルギニン添加量を増加するとともに、pH の低下の抑制が可能になった。しかし、一般に炎症を引き起こすといわれている pH5 以上でコントロールすることはできなかった (図 2a,b,c,d)。

そこで PLA とアルギニンのコンポジット体を成形することにより同一重量比の粉末混合体と比べ、初期段階での pH の上昇を抑制し (図 4a→b)、かつ分解過程でも pH 5 以上の時間を 3 倍長くすることができた (重量比 1 : 1, 図 4a→b)。さらに重量比 1 : 2 のコンポジット体になると、炎症を引き起こすとされる pH5 以上でコントロールすることが可能になった (図 4c)。モル比からは、1 : 2 ではほぼ中和状態になると予想される。

【結論】

本試作体により、PLA 使用時の患部の炎症を低減し、QOL 向上に寄与する生分解性ポリマーとしての可能性が示された。

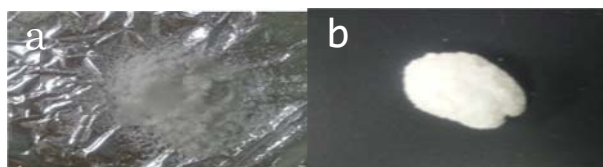


図3 コンポジット体の成形

a. 融解状態 (222°C), b. 冷却凝固し得たコンポジット体

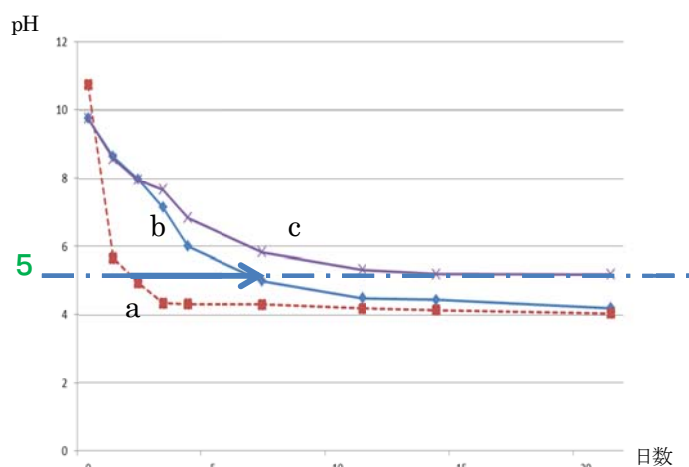


図4: 粉末混合体とコンポジット体の pH 比較 (温度 67°C)

a. 粉末混合体 (重量比 1 : 1), b. コンポジット体 (重量比 1 : 1),
c. コンポジット体 (重量比 1 : 2)

義歯床用レジンによる
マイクロ・ナノパターンの作製
43080019 金井 香央梨
指導教員：赤坂 司
(口腔健康科学講座 生体理工学)
Fabrication of micro/nano-pattern with
denture base resin
43080019 Kaori KANAI
Directed by Tsukasa AKASAKA

(Biomedical, Dental Materials and Engineering)
キーワード：マイクロ・ナノパターン、義歯床用レジン、接触角
角
Keyword: Micro/nano pattern, denture base resin, contact angle

【諸言】

義歯床用レジンに、マイクロ・ナノ構造体を付与し、形態観察、ぬれ性、細胞付着性を検討した。

【材料と方法】

①マイクロ・ナノ構造観察：

義歯床用レジン (FIT RESIN®) と既成モールドを用いて、粉液比の異なるマイクロ・ナノパターンを作製し、光学顕微鏡下、走査型電子顕微鏡下で構造の観察を行い、比較を行った。

②接触角測定試験：

ぬれ性を評価するために、0.5/1.0/2 μm グループ付与パターン、コントロールとして模様の付与されていない平面パターンに蒸留水を滴下し、接触角を測定した。

③細胞付着性試験：

マイクロ・ナノパターン表面上で細胞培養を行い、表面への細胞付着状態を光学顕微鏡で観察した。また細胞の形を扁平形・球形に分類し、それぞれの細胞数の測定を行った。

【結果と考察】

①マイクロ・ナノ構造観察の結果

光学顕微鏡下で作製したナノ・マイクロパターンを観察すると、検討した粉液比内でホール、ピラー、グループの各パターンが観察できた (図1)。また、粉液比を大きくすると、パターンに粒子が多く存在し、パターンが変形することがわかった (図2)。

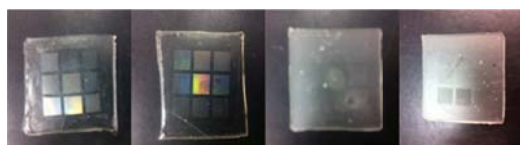


図1 液 1.0ml に対し、左から粉 0.6, 0.8, 1.2, 1.8g のパターン

②接触角測定試験の結果

接触角は、ピラーの 0.5 μm 間隔付与のものが模様の付与され

ていないコントロールとほぼ同等の値であり、最もぬれ性が良好であることがわかった (図3)。

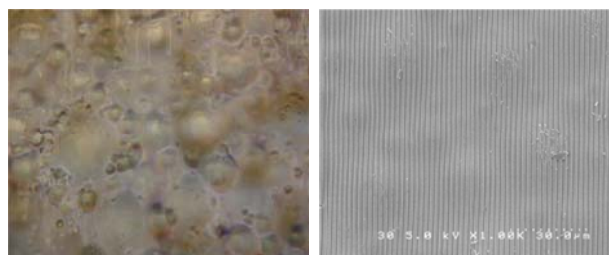


図2 粉 1.2g/液 1.0ml のマイクロ・ナノパターン
光学顕微鏡像 (左) SEM 像 (右)

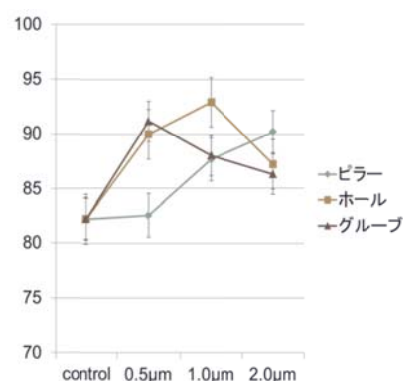


図3 各パターンの接触角

③細胞付着性試験の結果

細胞が付着したグループ表面とピラー表面を観察すると、グループ表面では細胞が同一方向を向き、ピラー表面では様々な方向に細胞が伸展する様子が観察できた。さらに、ぬれ性が良いほど細胞の形状に広がりがある (扁平な形状になる) ことがわかった。(図4)

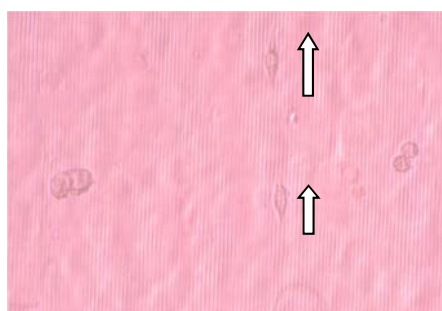


図4 グループ模様 (図中矢印) に沿って伸展した細胞

【結論】

以上の結果から、マイクロ・ナノパターンの形状によって細胞の機能を制御できる可能性があることが考えられた。この結果を生かし、細菌の付着性についても実験を行うことで、歯科応用へ繋がると期待される。

多孔質ナノ材料ハスクレイを利用したリチャージابل歯科用充填材の試作

43080037 田中 秀典 Hidenori Tanaka

指導教員 亘理 文夫 Directed by Fumio Watari
(生体理工学教室)

Preperation of rechargeable dental filling material composed of HAS-Clay

キーワード: ハスクレイ、吸着性、生体親和性、フッ素徐放性

Keywords: HAS-Clay, adsorption, biocompatibility, fluoro-release

目的: ハスクレイは非晶質アルミニウムケイ酸塩と低結晶性粘土の複合体で、ナノ構造を有する高吸湿性の新材料である。本研究では薬剤や成長因子等のリチャージおよび徐放が可能な歯科用充填材の開発に向け、吸着・徐放性などの基礎的特性評価とセメント硬化体試作を行い、さらに生体適合性を調べた。

材料と方法: 材料としてハスクレイおよびハスクレイ前駆体(産総研 鈴木正哉博士より提供)を用い、以下の実験を行った。
①電界放射型走査型電子顕微鏡(SEM:日立 S4000)による観察
②水蒸気吸着性試験: 130℃, 60 分間乾燥させた試料を湿度 90~100%の密閉容器中に保持し、24 時間後に重量を測定
③色素吸着性試験: コーヒー(BOSS シルキーブラック・SUNTORY)、清涼飲料水(アミノサプリ C・KIRIN)、ポピドンヨード(ハピトップ®うがい薬・岩城製薬)各 20ml にハスクレイ前駆体 1.0g を添加し 10 分間静置
④セメント試作: P/L=0.43 でハスクレイと 0.02mol/l ポリアクリル酸水溶液を 30 秒間練和して円柱試験片(φ6×12mm)を作製し(n=4)、37℃で湿度 30%・24 時間、次に湿度 100%・48 時間保持し、万能試験機(Instron model1000)で圧縮強さを測定
⑤フッ素徐放性試験: 蒸留水に 7 日間保持した円柱試験片を 0.2%NaF 溶液に 1 分間浸漬し、洗浄・乾燥後蒸留水中に 1 日間放置し、溶出した F イオン濃度をフッ素イオンメータ(TOKO TIN-5101)で測定
⑥*S.mutans*を用いた毒性試験: 4.0×10⁶CFU/ml の *S.mutans* 培養液から 3μl 取り出し PBS20ml で希釈した菌液にハスクレイを加え(ハスクレイ濃度 0~0.1%の 4 種)、30 分後寒天培地に 3μl ずつスポットし、37℃で 24 時間培養後コロニー数を計測

結果と考察: 図 1 はハスクレイの SEM 像である。100nm 以下の一次粒子と、それらが凝集した二次粒子で構成されていた。図 2 は水蒸気吸着性試験の結果である。22℃において 1g あたり 0.99g の水蒸気が吸着した。図 3 は色素吸着性試験で、ハスクレイ無添加(左)に比べ、添加(右)ではいずれの液体に対しても色素吸着能が認められた。図 4 は圧縮試験の結果である。ハスクレイセメントの圧縮強さは同条件で練和・保存した市販の歯科用ガラスイオノマーセメント(以下、GIC)2 種と比較して 50~70%程度であった。図 5 はフッ素徐放性試験の結果である。粉末自体がフッ化物を含む GIC と異なり F を含有せず、かつ練和時の P/L 比が小さく硬化体中の粉末量が少ないにも関わらず、GIC とほぼ同等の F イオン徐放性を示した。図 6 はハスクレイ濃度 0~0.1%添加時の細菌コロニー形成(左)とコロニー数のグラフ(右)である。コントロールに比べ、添加量を増してもコロニー数はほとんど変化せず、*S.mutans* に対する為害性は認められなかった。

結論: ハスクレイおよびその前駆体は高い吸着性とリチャージ後の徐放性を示し、細菌を用いた細胞毒性評価試験では細胞毒性は認められなかった。これらからフッ素徐放や各種成長因子徐放性インプラント等の医療応用状況の可能性が示唆された。

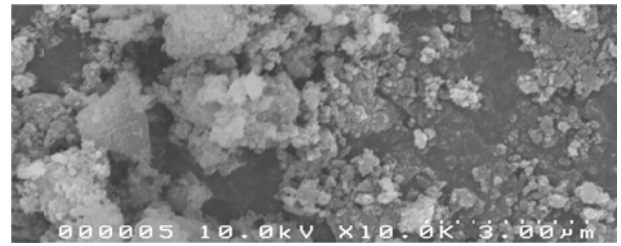


図1 ハスクレイのSEM像

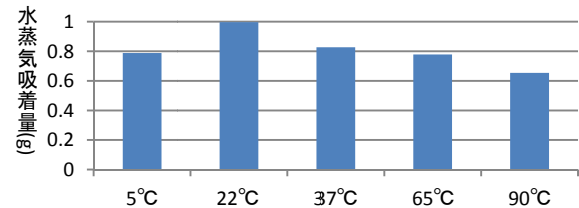
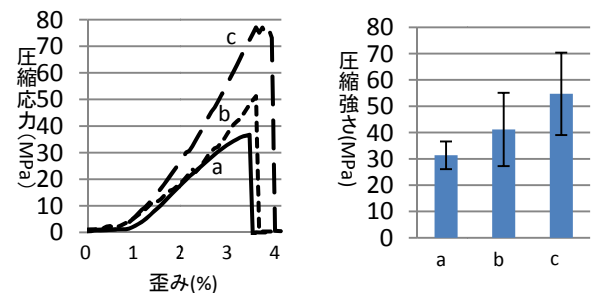


図2 水蒸気吸着性試験



a. コーヒー b. 清涼飲料水 c. ポピドンヨード

図3 色素吸着性試験



a. ハスクレイ b. Fuji I c. Fuji IXGP

図4 ハスクレイセメントの圧縮試験

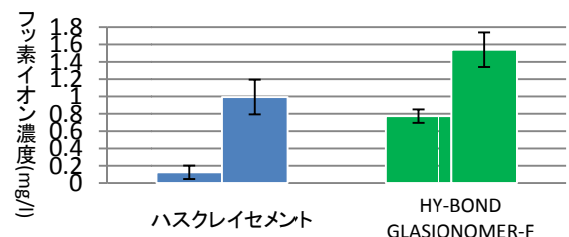


図5 フッ素徐放性試験 (左)F処理なし (右)F処理あ

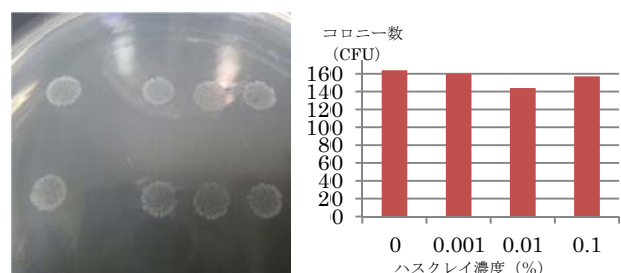


図6 細胞毒性試験 (左: コロニー計量 右: コロニー数)

アパタイトでできたマイクロ・ナノパターン
の細胞接着性

43080043 野江 未史

指導教員：生体理工学教室 赤坂 司

Cell adhesion of micro/nano-patterned apatite

43080043 Michika Noe

Directed by Tsukasa Akasaka

キーワード：アパタイト、マイクロ・ナノパターン

Keywords: Apatite, micro/nano-pattern

【諸言】

アパタイトは、インプラント治療において人工歯根と顎骨の強固な結合を促すため、チタン製の人工歯根にコーティングされる場合などに利用されているが、それでもインプラントと骨との固定には時間がかかる問題が指摘されている。一方で、微細な凹凸には細胞の接着性に影響を与えている。そこで本研究では、インプラントと骨との接着を短縮することを目的として、(1) ナノインプリントを用いてアパタイトセメントによるマイクロ・ナノパターンの作製、および(2) 作製したアパタイトセメントを用いて接触角や細胞接着性を検討した。

【材料と方法】

- ・ α -TCP (α -リン酸三カルシウム)、・リン酸
- ・マイクロ・ナノマスターモールド

α -TCP (1g) とリン酸溶液 (0.65ml) を混ぜ合わ、アパタイトペーストを作製した。その後、マイクロ・ナノパターンのマスターモールド上へペースト滴下し、室温で1日静置することにより固化させた。固化したアパタイトを慎重に剥離し、その後の検討に用いた。次に、パターン化アパタイトセメントの各パターン上へ水滴 (0.7 μ l) を滴下し、接触角を測定した。また、パターン化アパタイトセメント上へ、骨芽細胞様細胞 (Saos-2) を播種し、3時間後の細胞形態を走査型電子顕微鏡で観察した。

【結果と考察】

アパタイトセメントのSEM観察の結果(図1)、モールドに対応したマイクロ・ナノパターンが形成できることが判明した。このことは、ナノインプリントによりアパタイトのパターン化が可能であることを示している。

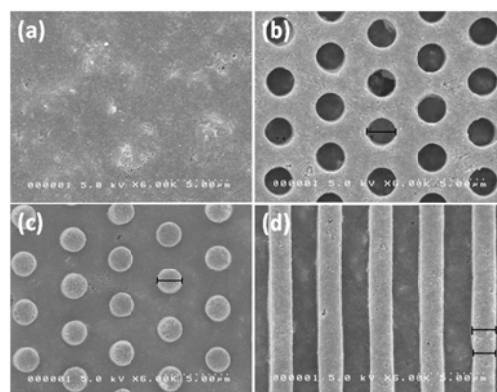


図1 アパタイトセメント上の各パターンのSEM像
(a) 平面、(b) ホール、(c) ピラー、(d) グループ

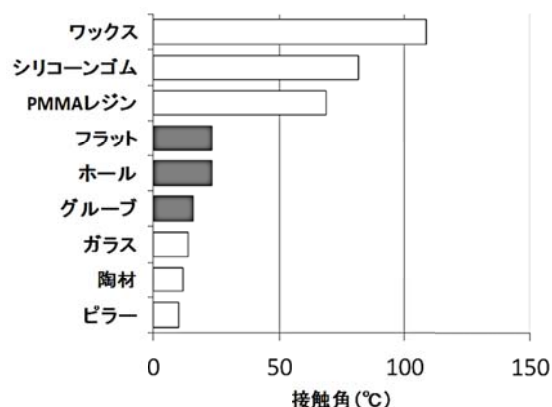


図2 各種材料とパターンの接触角

接触角測定の結果(図2)、ピラー>グループ>ホール>フラットの順にぬれ性が高いことが分かった。

	フラット	ホール	ピラー	グループ
球形	35	31.4	24.2	24.8
扁平	13.6	13.2	28	19
総数	48.6	44.6	52.2	43.8

図3 パターン化アパタイトセメントへの細胞接着数と形態

接着試験の結果(図3)、パターンの違いが細胞接着数および細胞形態へ影響することが分かった。この結果は、各パターンの接触角と関係し、ぬれ性が高いほど扁平になり、よりよく細胞接着していると推測された。

以上より、ナノインプリント法によりアパタイトによるマイクロ・ナノパターンの作製が可能であることが分かった。また、パターン付与により細胞接着性を向上できることが分かった。将来的にはアパタイトパターンのインプラント治療への応用の可能性が示唆された。

歯根吸収抑制のための 水酸化カルシウム製剤の象牙質内拡散評価

43080049 藤井瑞季

指導教員：八若保孝(小児・障害者歯科学)
亘理文夫(生体理工学)

Diffusion of calcium hydroxide in root dentin for control of root resorption

43080049 Mizuki Fujii

Directed by Yasutaka YAWAKA and Fumio WATARI

キーワード：歯根吸収、根管洗浄、スメア層、
超音波洗浄、水酸化カルシウム

Keywords: root resorption, root canal irrigation,
smear layer, ultrasonic irrigation,
calcium hydroxide

緒 言

破歯細胞は歯根表面で酸と酵素を分泌して、無機質の脱灰と有機質の溶解により歯根を吸収する。水酸化カルシウム製剤は、象牙細管を經由した塩基性イオンの拡散により、歯細胞の産生する酸の中和と病的歯根吸収の抑制を期待し臨床応用されている。リーミング、ファイリングによるスメア層の形成は象牙細管を閉塞し、根管貼薬剤の歯根外表面への浸透を阻害すると考えられる。本研究では、1)効率的なスメア層除去の方法を検討し、2)水酸化カルシウム製剤による塩基性イオンの象牙質内拡散を評価した。

材 料 と 方 法

1) 根管洗浄方法の検討

ヒト永久歯(単根・単根管)の抜去歯をKファイルで#80まで根管拡大・形成を行い、4歯ずつ、以下の4通りの洗浄方法で根管洗浄を行った。

G1: 交互洗浄(シリンジ,5%NaOCl, 31%H₂O₂ 使用)

G2: 5%NaOCl(超音波洗浄)後、交互洗浄

G3: 5%EDTA(超音波洗浄)後、交互洗浄

G4: 5%EDTA→5%NaOCl(各超音波洗浄)後、交互洗浄

洗浄後、歯軸に沿って二分割し、無作為に選択した根中央部、根尖部の各4ヶ所を走査型電子顕微鏡(SEM:日立S-4000)で観察した。

2) 水酸化カルシウム製剤の象牙質内拡散評価

G1, G4の方法で洗浄し、歯根表面中央部に人工的に吸収窩を2ヶ所形成した。水酸化カルシウム製剤3種類(カルシペックス、ビタペックス、水酸化カルシウム単体)を4歯ずつ根管充填した。1%フェノールフタレイン含有寒天培地に封入し、歯根外部の色調変化観察およびpHメーターによる吸収窩周囲のpH変化を4週間測定した。その後歯根を切断し、象牙質内の吸収窩方向への塩基性イオンの拡散をpH指示薬の着色から計測し比較した。(図1)

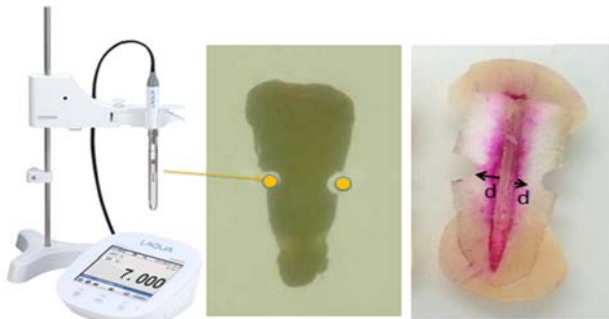


図1 a:pHメーター b:吸収窩測定部位(O) c:pH指示薬滴下による塩基性拡散の様子(矢印)

結 果

1) 根管洗浄方法の検討

SEMによる観察から、G1、G2よりG3、G4の方が多くの象牙細管が観察された。いずれも、根尖部より根中央部でより多く象牙細管が観察された。

2) 水酸化カルシウム剤の象牙質内拡散評価

4週後、カルシペックスと水酸化カルシウム単体において約半数の資料に塩基性イオンの拡散が寒天培地内に及んでおり(図2a)、根管内の製剤は部分的に消失していた(図2c)。ビタペックスでは、拡散は吸収窩表面に限局し(図2b)、根管内の製剤はほぼ残存していた(図2d)。

pH測定結果ではどの洗浄法、どの水酸化カルシウム製剤でも経時的に上昇傾向を示し、脂溶性のビタペックスはpH上昇程度が小さかった(図3)。

拡散距離計測では、いずれも塩基性は認められたものの、洗浄法や製剤による明確な依存性は認められなかった(図4)。

結 論

水酸化カルシウム製剤の根管充填後の吸収窩方向への塩基性拡散は、洗浄方法や親水性・疎水性の違いも含めた製剤種類への依存性を示したが、いずれも吸収窩近傍の酸性を中和し、歯根吸収抑制効果に寄与すると考えられた。

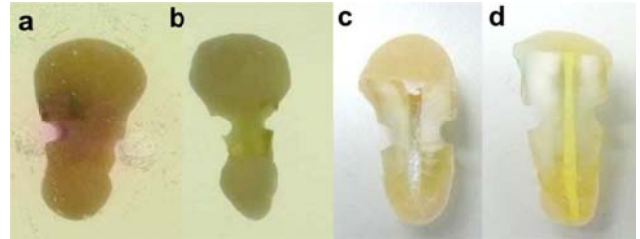


図2 4週後の吸収窩近傍における寒天培地の塩基性発現(a,b)と断面(c,d)

a,c:カルシペックス、水酸化カルシウム単体(水溶性)
b,d:ビタペックス(脂溶性)

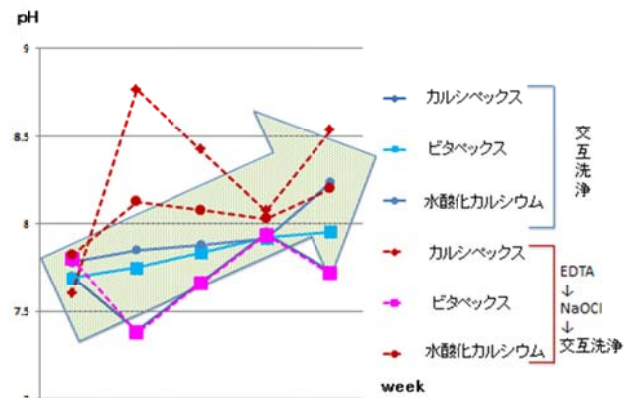


図3 吸収窩におけるpHの時間変化

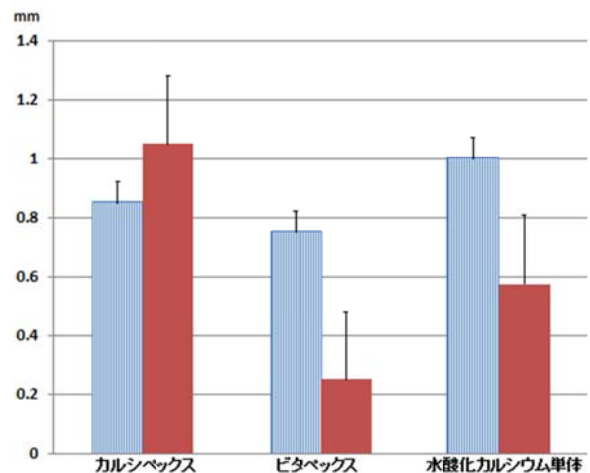


図4 4週後の象牙細管内塩基性拡散距離(各製剤とも洗浄方法 左:G1、右:G4)

疣贅癌とその境界病変の病理学的解析 II

43080002 安倍嘉彦

指導教官：北村哲也、進藤正信

(口腔病理病態学教室)

キーワード：疣贅癌、境界病変、HuR

【緒言】

AU-rich element(ARE)は癌遺伝子などの、細胞増殖や生存に関連する遺伝子から転写される mRNA の主に 3'側非翻訳領域に存在し、通常では転写後すぐに分解されているが、細胞にストレスが加わると HuR が ARE-mRNA に結合し、ARE-mRNA の安定化や翻訳が行われる。HuR の過剰発現や細胞質への局在変化は、癌の悪性度と相関することが指摘されており、口腔癌細胞では HuR の過剰発現や細胞質発現が亢進することを報告してきた。今回、口腔領域に発症する疣贅状病変での HuR の発現を検索し、境界病変における HuR 発現の意義について検討した。

【方法】

口腔癌細胞株 (HSC3、Ca9.22) と正常細胞 (HGF) で HuR タンパクの発現量を Western blot で検索した。正常粘膜組織、扁平上皮癌、疣贅状過形成、疣贅癌、疣贅状境界病変の病理組織標本を用いて病理形態学的に検索するとともに免疫染色を行い検索した。重層扁平上皮を 3 つの区域に分け、基底層側 1/3 をレベル 1、中層をレベル 2、表層をレベル 3 とし、HuR の細胞質発現がどの層にまで認められたのかを疣贅状過形成、境界病変、疣贅癌について検討した。さらに、基底層側 1/3 (レベル 1) において、任意の高倍率 3 視野で、細胞 1000 個中に HuR が細胞質発現している細胞をカウントしてラベリングインデックス (HuR-RI) とし、疣贅状過形成、境界病変、疣贅癌について検討した。次いで、25 例の疣贅状境界病変症例の年齢、性別、発生部位、HuR-RI と発現レベル、そして予後を比較検討した。

【結果】

口腔癌細胞株と正常細胞で HuR タンパクの発現量を Western blot で検索したところ、口腔がん細胞癌細胞株では正常線維芽細胞株に比べ 3 倍以上のタンパク発現がみられ、正常細胞では HuR は核に局在し細胞質にはほとんど発現が見られないのに対して、口腔がん細胞株では核に加えて細胞質に HuR が発現していることが示された。さらに、細胞から核と細胞質に分画してタンパクを抽出し Western blot を行った結果、HGF に比べ 10 倍程度多い HuR が口腔癌細胞の細胞質で発現していた。

病理標本を用いた免疫染色でも、正常粘膜上皮ではほとんど核のみに

発現している HuR タンパクが、癌細胞では細胞質にも発現していた。疣贅状過形成症例では表面が不規則な凹凸を示す重層扁平上皮の増生と基底細胞の多層化が見られたが、細胞異型は認められなかった。また、HuR の発現はごく少数の基底細胞の細胞質に陽性所見が見られたが、大部分は核にのみ陽性所見が認められた。これに対して疣贅癌では、外向性に増殖する扁平上皮の多層化した基底細胞は細胞異型を示し、HuR の細胞質発現も増加していた。疣贅癌との境界病変では HuR の発現がほとんど核のみに見られる症例から、多くの細胞の細胞質に HuR 発現が見られるものまで多様であることが明らかになった。HuR の発現分布では、疣贅状過形成 6 例は全てレベル 1 のみに発現が見られたのに対し、境界病変では 25 例中レベル 1 のみで HuR の発現がみられたものは 16 例、レベル 2 まで達していたものが 9 例あり、疣贅癌ではレベル 1 のみに留まっていたものはなく、レベル 2 が 6 例、表層までの発現 (レベル 3) が 11 例と、悪性度に比例して表層近くまで HuR の細胞質発現が認められることが明らかになった。HuR LI の検索結果では、疣贅状過形成では平均 6%と少なく、疣贅癌では平均 68%と有意に多いことが示された。一方、境界病変では発現に多様性がみられたため、中間値より HuR-RI の高い high と低い low の 2 群に分け、予後との相関をみたところ、HuR-RI が高かった 8 症例中 5 例は経過観察中に疣贅癌あるいは浸潤癌に移行した。これに対して HuR-RI の低かった 16 例では悪性化したのは 1 例のみだった。

【結論と考察】

HuR が細胞質に発現している細胞数が多いほど、また HuR 細胞質発現細胞がより表層まで分布するほど、境界病変の悪性転換率は高くなることが示され、これは疣贅状境界病変の外科的切除の適否や切除範囲の判断に有用な指標となることが示唆された。

ARE-mRNA 安定化と アデノウイルス増殖 (ウイルス生産効率検討)

43080004 磯島慧悟

指導教官 東野史裕
(口腔病理病態学教室)

Role of ARE-mRNA for adenovirus replication

43080004 Keigo Isoshima

Directed by Fumihiko HIGASHINO

緒言

アデノウイルスはげっ歯類の細胞をがん化でき、古くから細胞がん化のモデルとして多くの研究がなされてきた¹⁾。E4orf6 (E4 open reading frame 6)は、感染時にウイルス及び宿主細胞の mRNA の輸送を介してウイルスの複製に寄与することが知られており、最近げっ歯類の細胞をがん化する能力もあることが見出されたウイルスタンパクである。東野らは E4orf6 に結合する宿主細胞のタンパクを解析し、E4orf6 が pp32 との結合を介して、*c-fos* や *c-myc* など ARE (AU-rich element)を持つ mRNA を核外輸送・安定化することを明らかにした²⁾。さらに、E4orf6 はこの ARE-mRNA の安定化を介して細胞のがん化を誘導することを見出した³⁾。

目的

ARE-mRNA の安定化がアデノウイルスの複製に必須であるか解明するため、ARE-mRNA が安定化しているがん細胞と、安定化されていない正常細胞を用いてアデノウイルスの生産効率を解析した。

材料

1. HeLa 細胞、BJ 細胞、HEK293 細胞、W162 細胞
2. アデノウイルス wt300、dl355
3. 培地：DMEM 8% serum

4. PBS 溶液 (細胞洗浄用)

方法

1. HeLa 細胞、BJ 細胞に野生型アデノウイルス (wt300)、E4 領域を欠失したアデノウイルス (Adinorf3)を感染させる(MOI:20)
2. 24 時間後にウイルス溶液を回収
3. 液体窒素でウイルス溶液を凍結融解
4. HeLa (wt300),BJ(wt300)中のウイルスには、HEK293 細胞を、HeLa(Adinorf3),BJ(Adinorf3)中のウイルスには W162 細胞を感染させ、titer 測定

結果

がん細胞、正常細胞共に野生型アデノウイルス WT300の方が、E4orf6 を欠失したアデノウイルス dl355 より生産効率は高かった。

次に、dl355 のタイターを WT300 で補正した値を求め、がん細胞と正常細胞との生産効率を比較したところ、がん細胞の HeLa 細胞での生産効率は正常細胞 BJ のそれに比べて 6 倍程度高いことが明らかになった。

考察

dl355 は正常細胞よりも、ARE-mRNA が安定化されているがん細胞でより生産効率が高いことを示しており、自力で ARE-mRNA を安定化できない dl355 でもあらかじめ ARE-mRNA が安定化されているがん細胞では増殖可能であることを示している。また、これらの結果は、ARE-mRNA の安定化はアデノウイルスの複製に重要であることを示唆している。

参考文献

1. FUNDAMENTAL VIROLOGY Fourth Edition 2001 (p1053-1088) Thomas E. Shenk LIPPINCOTT WILLIAMS&WILKINS.
2. Higashino et al., J Cell Biol., 170, 15-20, 2005.
3. Kuroshima et al., Oncogene, 30, 2912-2920, 2011.

疣贅癌とその境界病変の病理学的解析 I

43080018 :加藤寛史

指導教官：北村哲也、進藤正信

(口腔病理病態学教室)

キーワード：疣贅癌, p53, Ki-67

Key words: Verrucous carcinoma, p53, Ki-67

【諸言】

疣贅癌は外向性増殖を示す扁平上皮癌の亜系で、組織学的に表面が不規則の凹凸を示し、細胞異型を伴う重層扁平上皮の外向性乳頭状増殖、上皮脚の伸長は見られるが深部への浸潤傾向がほとんどみられない腫瘍で、疣贅状過形成との鑑別が問題になる。今回、疣贅癌と疣贅状過形成の境界病変について病理学的な検討を加えた。

【材料と方法】

免疫染色で疣贅癌、境界病変、疣贅状過形成それぞれについて病理形態学的に検討するとともに p53, Ki-67 の発現を免疫染色により検索した。

【結果と考察】

疣贅状過形成では扁平上皮の肥厚・増生がみられたが、多層化した基底細胞に細胞異型はみられず、免疫染色で p53, Ki-67 陽性細胞は基底層～傍基底層のごく一部に発現がみられるにすぎなかった。p53 は細胞周期の停止、遺伝子修復、アポトーシスの誘導にはたらく下流の遺伝の転写を活性化する転写因子だが、がん細胞では変異することが多く、すべてのがんの 50% 変異や欠失という遺伝子異常があることが報告されている。変異した p53 はユビキチンプロテアゾーム系による分解を受けずに蓄積するため、p53 の免疫染色で発現細胞が増加するものは p53 に変異が生じている可能性があるため細胞がん化の指標となっている。Ki-67 は G0 以外で発現の見られるタンパクで、細胞が悪性化の際のマーカータンパクである。一方、疣贅癌では外向性に疣贅状増殖を示す扁平上皮の著しく多層化した基底細胞に細胞異型がみられ、上皮下にリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤も著明だった。p53, Ki-67 陽性細胞は著しく増加し、基底層や傍基底層だけでなく上皮中層～表層近くにも陽性細胞が分布していた。このように病理形態像および免疫染色により疣贅状過形成と疣贅癌は鑑別診断され、疣贅癌症例は摘出手術をうけることになる。しかし、実際の標本では疣贅状過形成と疣贅癌との鑑別が難しく、疣贅状病変と診断せざるを得ない境界病変が存在する。このような境界病変を経過中に悪性転換するポテンシャルがあるかどうかを判定する

ことは治療においても重要である。

境界病変の HE 像を観察してみると多層化した基底細胞に細胞異型がみられるが、疣贅癌に比べると異型は軽度で、p53 と Ki-67 陽性細胞の増加がみられるが、疣贅癌に比べ少なく、陽性細胞の分布も上皮基底側に局限していた。疣贅状過形成、境界病変、疣贅癌における p53 と Ki-67 陽性細胞数を比較してみると境界病変では p53 陽性細胞数、Ki-67 陽性細胞数は疣贅状過形成に比べ有意に増加しているが、疣贅癌に比べると少ない傾向がみられた。

【結論】

今回、疣贅癌とその前がん病変について病理的な検討したところ以下のような諸点が明らかになった。疣贅状過形成では上皮の乳頭状増殖はみられるが、細胞異型はなく p53 陽性細胞、Ki-67 陽性細胞は基底層～傍基底層に局限していた。これに対して、疣贅癌では多層化した基底細胞が細胞異型を示し、p53 と Ki-67 陽性細胞は増加し上皮中層まで分布する傾向がみられた。境界病変では多層化した基底細胞に異型がみられたが、その程度は疣贅癌に比べ軽度で、p53 と Ki-67 陽性細胞も増加はみられたが基底側に局限し、境界病変が悪性転換するかどうかについての鑑別は困難だった。

ARE-mRNA の安定化に影響を及ぼすアデノウイルスの遺伝子の検索

43080021 桐越 晶子

指導教官 東野史裕

(口腔病理病態学教室)

Searching for adenovirus genes
required for the stabilization of ARE-mRNA

43080021 Shoko KIRIKOSHI

Directed by Fumihiko HIGASHINO

(Department of Oral Pathology and biology)

キーワード: アデノウイルス, ARE-mRNA, E4orf6, E4orf3

緒言

アデノウイルスはげっ歯類の細胞をがん化でき、細胞がん化のモデルとして古くから研究されている¹⁾。E4orf6 はアデノウイルスゲノムの E4 領域に存在するウイルスタンパクであり、pp32 や HuR と結合し、ARE-mRNA の核外輸送・安定化に寄与している²⁾。また、同じ E4 領域に存在する E4orf3 は、ARE-mRNA を分解する場である P-body を不活化させる機能を持つことが明らかになっている。

目的

本研究は、ウイルス感染系において、ARE-mRNA の安定化に E4orf3 が関与しているか解明することを目的とした。

材料

細胞: HeLa (ヒト子宮頸がん細胞)

アデノウイルス: wt300 (wild type)

inorf3 (E4orf3 欠失)

培地: DMEM (10% serum 1%serum)

方法

I 感染

HeLa 細胞を播種後、細胞が 70-90%コンフルエントになるまで培養した。wt300 と inorf3 をそれぞれ、MOI=10pfu/cell となるように感染させた。37°Cのインキュベーター中で静置し一時間培養した後、10%serum のメディウムを 10ml 加えた。24 時間後感染細胞を回収した。

II RNA 精製

TRI-Reagent で細胞を回収し、抽出液を遠心分離後、chloroform、isopropanol、70% ethanol を用いて RNA 溶液を作成した。

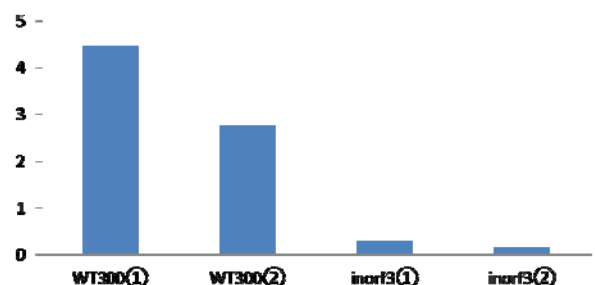
III RT 反応

RNA 溶液の濃度を測定し、5 μ g相当の RNA 溶液に random primer、5 $\times$ Buffer、DDW、ReverTra Ace、2.5mM dNTP を加えた。このサンプルを Thermal cycler で反応させ、cDNA 溶液を作成した。

IV real-time PCR

1/100 に希釈した cDNA 溶液、Master mix、Plas sol、Primer (*c-myc*, *GAPDH* それぞれ Fw,Rv)、DDW を混合し real-time PCR 装置にて反応、解析を行った。

結果



結果を上図に示す。上図は *c-myc* の蓄積量を相対量で表したものである。細胞数の誤差を補正するため、*GAPDH* 量の数値で *c-myc* 量の数値を割ったものを *c-myc* の蓄積量とした。

inorf3 感染細胞は wt300 感染細胞に比べ *c-myc* の蓄積量が 1/10 以下となった。

考察

E4orf3 を欠失したアデノウイルスを感染させると、野生型アデノウイルスを感染させた場合に比べ、宿主細胞の ARE-mRNA の蓄積量が減少した。このことは E4orf3 が宿主細胞の ARE-mRNA の安定化に重要であるということを示唆している。今後さらに ARE-mRNA の安定化を検討するために、E4orf3 欠失時の ARE-mRNA の半減期を調べる必要がある。

参考文献

1. FUNDAMENTAL VIROLOGY Fourth Edition 2001 (p1053-1088) Thomas E. Shenk LIPPINCOTT WILLIAMS&WILKINS.
2. Higashino et al., J Cell Biol., 170, 15-20, 2005.

PTHrP 産生咽頭がんの剖検例

43080018 小西絵里奈

指導教官：北村哲也、進藤正信

(口腔病理病態学教室)

キーワード：咽頭がん、PTHrP、多発転移、剖検

PTHrP は PTH と同様の生理活性を示すホルモン様タンパクだが、PTH が副甲状腺のみで発現するのに対して、PTHrP は様々な臓器・組織で発現することが知られている。乳がんや前立腺がんは骨転移の多い腫瘍であり、これらのがん細胞が産生する PTHrP が RANKL/RANK の活性化に伴って骨吸収を誘導し、高カルシウム血症をきたすことも報告されている。



今回、PTHrP 産生咽頭がんの剖検例を経験した。症例は 58 歳・女性で下咽頭分化型扁平上皮がんに対して放射線・化学療法を行い、臨床的に寛解が得られていた。しかし、術後 4 ヶ月目に微熱、全身倦怠感が出現し、画像診断で肺に多発性結節影、気管支鏡生検により扁平上皮癌がみられ原発性肺癌と診断し検査を継続したが、全身多臓器への転移が認められ、化学療法にも反応せず、全身倦怠感出現後 3 ヶ月で永眠となった。

剖検時、下咽頭粘膜上皮は正常で腫瘍の露出はみられなかったが、粘膜下に白色結節が認められた。腫瘍細胞は分化の方向性に乏しく異型の目立つ低分化型扁平上皮癌で免疫染色でほとんどの腫瘍細胞に PTHrP 陽性所見が認められた。

剖検 8 ヶ月前に生検した下咽頭がんは角化傾向のみられる分化型扁平上皮がんであったが、この標本に対して PTHrP 免疫染色を行ったところ、部分的に PTHrP 陽性所見を示す腫瘍細胞が認められた。

左右肺の剖検時断面所見で、右肺は 864g、左肺は 582g と重量増加がみられ、右肺上葉、中葉、下葉に数ミリメートルから最大径 75x60mm 大までの多数の腫瘍結節がみられ、左肺上葉、下葉にも径数 mm の腫瘍結節が散在していた。腫瘍細胞は一部に角化がみられるが、全般的には分化程度の低い扁平上皮癌でほとんどの腫瘍細胞に PTHrP 陽性所見がみられた。

肉眼的に腫瘍結節のみられない部分では、軽度の炎症細胞浸潤と硝子膜の形成がみられるが、このような部分でも脈管内および肺胞壁に近接して小型の腫瘍包巣が認められた。肝臓も 2246g と著しく腫大し、右葉に最大径 70x65mm 大の転移性腫瘍がみられた。この他にも多数の転移性腫瘍結節が右葉、左葉に認められた。腫瘍細胞は咽頭部や肺でみられたものと同様の低分化型扁平上皮癌で小型の包巣を形成しながら浸潤性で増殖し、類洞内にも浸潤する腫瘍がみられた。

心臓は 332g で外表面に著変はみられないが、断面で左心室や乳頭筋その他の転移巣と同様に分化傾向に乏しい腫瘍細胞の転移が認められた。心房にも転移結節がみられた。この他、腎臓、椎骨、脊髄などにも腫瘍の転移がみられた。

まとめと考察

下咽頭高分化型扁平上皮癌に対して放射線療法・化学療法を施行、CR が得られた後に広範な転移をきたし死亡した 58 歳・女性の剖検例を経験した。剖検時、下咽頭粘膜表面に腫瘍はみられなかったが、咽頭粘膜下に低分化型扁平上皮がんが認められ、腫瘍細胞は PTHrP 陽性を呈していた。腫瘍は左右肺・肝・心・左右腎、骨髄、頭部皮下、脊髄に広範に転移。腫瘍の転移による多臓器不全により死に至ったと考えられた。

以上の所見は、術前治療に抵抗性を示す PTHrP 産生がん細胞クローンが残存し、多臓器転移をもたらしたものと思われた。

剖検によって明らかになった悪性リンパ腫 の 1 例

43080048 福島祐介

指導教官：北村哲也、進藤正信

(口腔病理病態学教室)

キーワード：悪性リンパ腫、病理解剖、

悪性リンパ腫は、基本的にはリンパ節の病変だが、口腔領域でも圧倒的な多数を占める扁平上皮癌を除くと唾液腺悪性腫瘍と同等の発症頻度があり、その病態を把握することは重要である。悪性リンパ腫はB細胞性リンパ腫、T/NK細胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫に大別されるが日本ではホジキンリンパ腫は少なく成人T細胞性白血病/リンパ腫発生と関連するHTLV-1ウイルス保有者の多い地域を除くと悪性リンパ腫の約90%はB細胞性リンパ腫であることが知られている。

今回、急激な経過で死に至り、剖検により悪性リンパ腫が証明された1例を経験した。症例は、高血圧、咽頭悪性腫瘍、大動脈瘤ステント置換術の既往がある87歳・男性。亡くなる2日前に急性硬膜下血腫と肺炎のため某病院に入院となった。その際の検査所見ではWBC異常高値(WBC 52800)、高LDH血症、高尿酸血症(UA 17.3)があり、出血傾向(鼻出血、硬膜下血腫)を認めたため、血液悪性腫瘍を疑い骨髓穿刺を予定していたが、翌日、CVカテーテル挿入中に意識レベルの低下、SpO2低下および血圧低下。大量補液+輸血、非侵襲的陽圧換気(NIPPV)、昇圧剤投与で集中治療を行ったが、徐々に血圧低下し入院から三日目で永眠した。剖検時の舌～縦隔の肉眼像では、傍大動脈周囲リンパ節の著しい腫大が見られた。病理所見では、リンパ節固有の構造は消失し、びまん性に増殖する腫瘍細胞が認められた。腫瘍細胞はクロマチンが核縁に粗に分布した大型で切れ込みのみられる核と比較的豊富な細胞質をもつ大型細胞からなり、多数の分裂像もみられた。このような腫瘍細胞はCD20陽性でB細胞

の形質を発現し、Diffuse large B-cell lymphoma の組織像でした。肝臓は2570gと著しく腫大し剖面所見で明らかな結節形成はみられないが、門脈域を中心に肝実質細胞を圧排しながら増殖する腫瘍が認められた。腫瘍細胞は縦隔リンパ節にみられたものと同様の形態を示す大型異型細胞からなり、CD20陽性、B細胞リンパ腫だった。脾臓も515gと正常の5～7倍に肥大し、腫瘍細胞のびまん性増殖が認められた。腫瘍以外の剖検所見を以下に示す。脳の肉眼像では、左前頭葉から頭頂葉にかけて硬膜下血腫がみられた。右肺は600g、左肺は925gと重量増加がみられ、炭粉沈着をともなうcoal noduleの形成と出血性炎が認められた。心臓は635gと通常の2倍の重量で、心室剖面で右室の拡張がみられた。組織学的に左室側壁を中心にpatchy fibrosisがみられ、右室には脂肪組織の増生もみられた。腎臓は表面が顆粒状を呈し、糸球体の軽度の硬化像と炎症細胞浸潤がみられた。以上から、急性硬膜下血腫で入院後、急激な全身症状悪化により死に至った87歳・男性の剖検例。剖検時、大動脈周囲リンパ節、胃周囲リンパ節の肥大と肝脾腫がみられ、組織学的に大型でB細胞の形質を発現する腫瘍細胞のびまん性増殖が認められ、Diffuse large B-cell lymphoma の多臓器転移と診断。脳は左前頭葉～頭頂葉にかけて硬膜下血腫、肺は塵肺結節および肺炎像がみられた。末梢血で白血球の異常高値を示したことから、リンパ節に発症した悪性リンパ腫の肝・脾への播種に加えて白血化をきたし、全身状態悪化により死に至ったものと考えた。

活性酸素種 (ROS) が血管内皮細胞に及ぼす影響

43080056 森谷 康人

指導教官: 秋山廣輔、樋田京子

口腔病態学講座 血管生物学教室

Reactive oxygen species affect on
endothelial cell phenotype change.

Directed by Akiyama Kosuke, Hida Kyoko

Department of Vascular Biology

キーワード: 腫瘍血管新生、腫瘍血管内皮細胞、腫瘍微小環境、
活性酸素種

Key Words: Tumor angiogenesis, Tumor endothelial cell,
Tumor microenvironment, reactive oxygen species

【緒言】

腫瘍組織において、血管は腫瘍細胞への栄養・酸素の供給や老廃物・代謝産物の排出といった重要な役割を担っており、血管新生は腫瘍の進展・転移に必要不可欠である。近年、腫瘍血管と正常血管の間には、形態学的・病理組織学的な違いが存在することが報告されている。腫瘍血管は正常血管に比べ、走行が無秩序であること、血管内皮細胞とペリサイトとの結合が疎であり血管透過性が亢進していることなどがある。また腫瘍血管内皮細胞は (Tumor endothelial cell: TEC) は正常血管内皮細胞 (Normal endothelial cell: NEC) と比較して血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF) の発現が高く、生存能が高いこと、血管新生能が高いことなどを報告してきたが TEC がこれらの特異性を獲得するメカニズムは未だ完全には解明されていない。腫瘍組織では組織間圧の亢進により血管の蛇行や屈曲などが生じ、血流が不十分になり低栄養状態になっていることが多い。このような低栄養環境では細胞内に活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) が蓄積することが知られている。ROS は低栄養の他に、低酸素、紫外線などのストレスで細胞内に生じ、様々なシグナル伝達経路を活性化する。腫瘍細胞における ROS の蓄積は VEGF の産生を亢進し、血管新生を促進することが知られており、腫瘍細胞は ROS を生存に利用していると考えられている。そこで我々は腫瘍血管内皮細胞の特異性の一つである VEGF の発現亢進のメカニズムに ROS の蓄積が関わっているのではないかと考え、本研究では ROS の蓄積が血管内皮細胞に及ぼす影響について解析を行なった。

【材料・方法】

NEC をマウス正常皮膚から、TEC をヒトメラノーマ移植腫瘍塊から磁気ビーズ法により分離培養した。培地は血管内

皮細胞専用培養液として 5%FBS 含有 EBM2 を、低血清血管内皮細胞基礎培養液として 0.5%FBS 含有 EBM-2 を用いた。

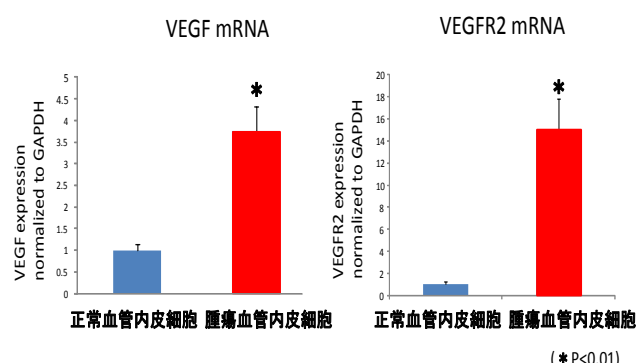
ROS の蓄積を誘導する ROS 誘導剤には pyocyanin を、VEGF receptor 2 のキナーゼ阻害剤には Ki8751 を実験に用いた。

遺伝子発現は real-time PCR 法により行った。ROS 蓄積の検出は、Total ROS/Superoxide Detection kit を用い、アポトーシス細胞の割合は PI 染色により FACS (フローサイトメトリー) を用いて解析した。

【結果】

① NEC と TEC における VEGF とその受容体である VEGFR2 の発現解析

(図 1)

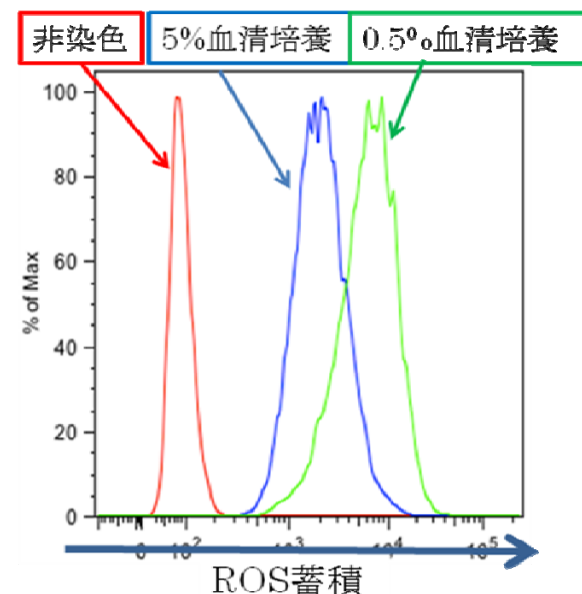


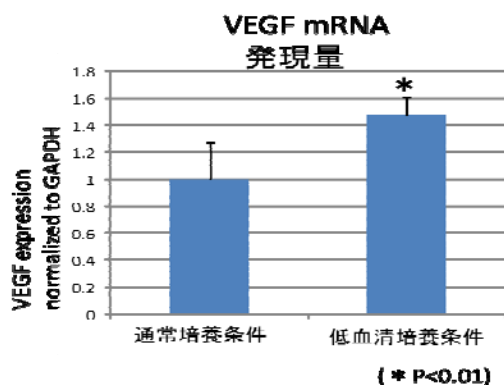
VEGF、VEGFR2 ともに TEC で発現が有意に亢進していた。TEC では血管新生因子の発現が亢進していることを確認できた。

② 血清飢餓による ROS の蓄積

NEC を血清飢餓条件 (0.5%FBS 含有 EBM-2)、通常血清量条件 (5%FBS 含有 EBM-2) 下で 48 時間培養し、ROS 蓄積の検出及び VEGF-A 発現量を調べた。

(図 2)





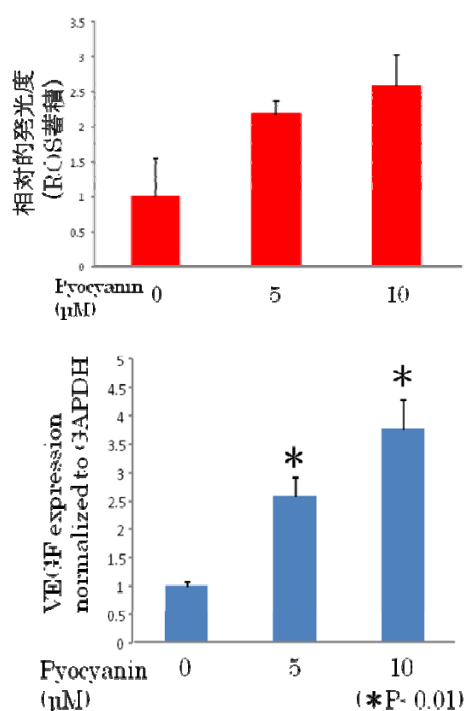
血清飢餓状態におかれた血管内皮細胞は ROS を蓄積し、VEGF の発現も亢進していた。

このことから血清飢餓状態では血管内皮細胞は ROS を蓄積することにより VEGF を発現している可能性が考えられた。

③ ROS 蓄積による VEGF 発現量の変化

NEC を ROS 誘導剤 pyocyanin (0, 5, 10 μ M) で処理した。

(図 3)

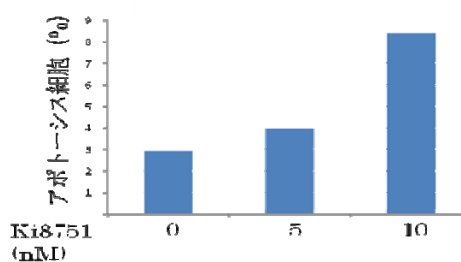


pyocyanin 用量依存的に ROS の蓄積が誘導された。また、VEGF の発現量も pyocyanin 用量依存的に上昇した。これらのことから、血管内皮細胞では ROS の蓄積量により VEGF の発現が制御されていることがわかった。

④ ROS 蓄積における VEGF/VEGFR 経路の関与

血清飢餓状態におかれた血管内皮細胞は VEGF の発現を亢進し、自らの生存に利用していると考えた。そこで、VEGFR2 のキナーゼ阻害剤である Ki8751 を用いて、血管内皮細胞の血清飢餓に対するアポトーシス細胞の割合を解析した。

(図 4)

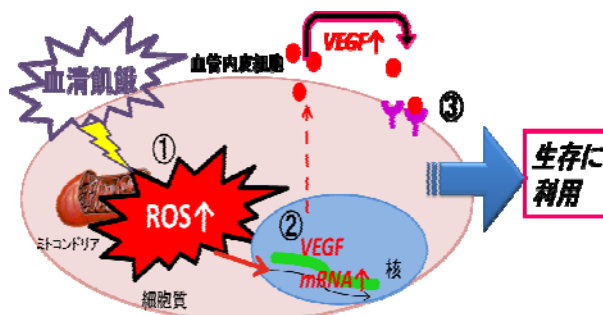


Ki8751 用量依存的にアポトーシス細胞が増加した。このことから血管内皮細胞は、血清飢餓状態において VEGF をオートクライン機構により自らの生存に利用している可能性が考えられた。

[まとめと考察]

血管内皮細胞において

- ・血清飢餓環境下で ROS が蓄積した (①)。
- ・血清飢餓環境下で VEGF の発現が亢進した (②)。
- ・ROS の蓄積により、VEGF の発現が亢進した (②)。
- ・血清飢餓環境下で VEGF をオートクラインで生存に利用していた (③)。



以上のことから、低栄養状態に陥っている腫瘍微小環境において血管内皮細胞が示す高い生存能、血管新生能の獲得には、ROS の蓄積による VEGF の発現亢進が関与していることが示唆された。

[参考文献]

- 1) Hida K., Hida Y., Amin D., Flint A., Panigrahy D., Morton C. and Klagsbrun M.: Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.*, 64(22), 8249-8255, 2004
- 2) 樋田京子、樋田泰浩：腫瘍血管内皮細胞の特異性—理想的な血管新生阻害剤の開発を目指して、総説 実験医学増刊号「急速進展する血管研究」、羊土社、24(18)、152-157、2006
- 3) Ushio-Fukai M., Nakamura Y.: Reactive oxygen species and angiogenesis: NADPH oxidase as a target for therapy. *Cancer Letters*, 266, 37-39, 2008

アデノウイルス感染による ARE-mRNA の核外輸送と安定化

43080058 八幡 美星子

指導教官 東野史裕

(口腔病理病態学教室)

Nuclear export and stabilization of ARE-mRNA in adenovirus infected cells

43080058 Mihoko YAHATA

Directed by Fumihiko HIGASHINO

(Department of Oral Pathology and biology)

キーワード: アデノウイルス、ARE-mRNA、E4orf6

Key words: Adenovirus, ARE-mRNA, E4orf6

緒言

アデノウイルスはげっ歯類の細胞をがん化でき、細胞がん化のモデルとして古くから研究されている¹⁾。E4orf6 はアデノウイルスゲノムのE4領域に存在し、ウイルス及び宿主細胞のmRNAの輸送を介してウイルスの複製に寄与し、げっ歯類の細胞をがん化させる機能も持つウイルスタンパクである。また、E4orf6 は、pp32 や HuR と結合し、AU-rich element (ARE) をもつ mRNA を核外輸送・安定化する機能も持ち²⁾、ARE-mRNA の輸送・安定化が細胞のがん化を誘導することも明らかになっている³⁾。

目的

本研究は、ウイルス感染系での ARE-mRNA の輸送・安定化を検討するため、ARE-mRNA の核外輸送および安定化を検討することを目的とした。

HeLa 細胞に wt300 を感染させ、細胞質の ARE-mRNA を定量し、非感染 HeLa 細胞との比較検討を行った。また、細胞の全 RNA を抽出し ARE-mRNA の定量を行い、それらの蓄積を非感染 HeLa 細胞と比較した。

材料

細胞: HeLa (ヒト子宮頸がん細胞)

アデノウイルス: wt300 (wild type)

培地: DMEM (Dulbecco modified eagle medium)10%serum

方法

実験1. HeLa 細胞にアデノウイルスを感染させ、感染から 2 4

時間後、細胞を細胞質と核に分離。細胞質中の ARE-mRNA (c-myc,c-fos,cox-2) を real-time RT-PCR 法にて定量を行った。

実験2. HeLa 細胞にアデノウイルスを感染させ、感染から 2 4 時間後細胞を回収し、細胞全体の ARE-mRNA (c-myc,c-fos,cox2) の量を real-time RT-PCR 法にて定量を行った。

結果

実験1

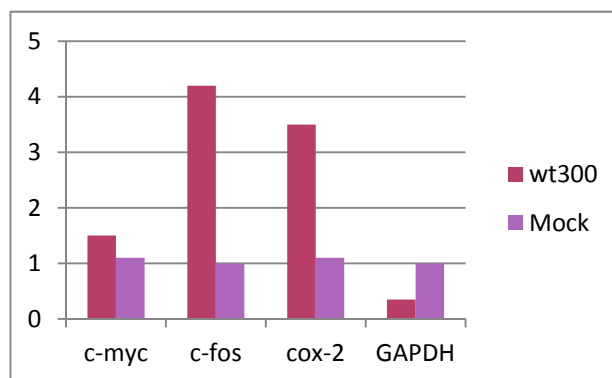


図1、細胞質中の ARE-mRNA 量

アデノウイルス感染細胞の細胞質には、非感染細胞に比べ ARE-mRNA 量が多く、ウイルス感染によって ARE-mRNA が核外輸送されていることがわかった。

実験2

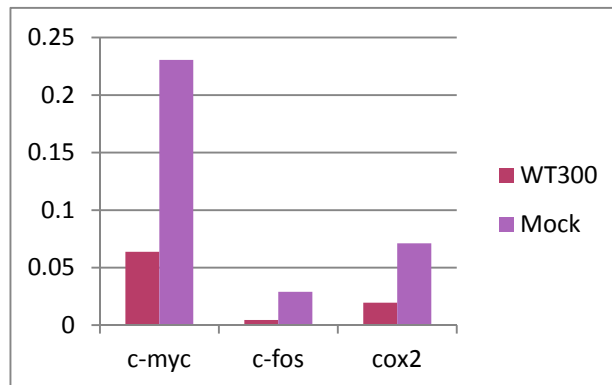


図2、細胞の全 ARE-mRNA 量

アデノウイルス感染細胞の全体では、非感染細胞に比べ ARE-mRNA の量が少なかった。

考察

実験1と実験2の結果、ARE-mRNA が細胞質に核外輸送されることが示されたが、蓄積されていないことが示された。

実験1に従えば、感染細胞で核外輸送されている ARE-mRNA は E4orf6 の影響を受けて安定化されるはずであるので、本来は

感染細胞全体のARE-mRNAは非感染細胞のARE-mRNAに比べて多く蓄積されるはずである。しかし実験 2 では、感染細胞の方がARE-mRNAは少なく定量された。

この矛盾点に関しては以下のように考える。アデノウイルスは、宿主細胞に感染すると一部の宿主細胞の転写を抑制する。従って、宿主細胞の転写レベルは非感染細胞に比べて低くなったと考えられる。その結果、細胞質と核を一緒に定量した実験 2 では、宿主細胞の転写が通常と同じように起こった Mock のほうが、ARE-mRNA の全体量は多く定量された。

本研究では、核外輸送された ARE-mRNA の蓄積を、細胞全体の ARE-mRNA 量で検討しようとした。今後は感染細胞と非感染細胞の核外輸送された ARE-mRNA の半減期を調べ、アデノウイルスを感染させても転写量の減少しない ARE-mRNA の安定化をより深く検討したい。

参考文献

1. FUNDAMENTAL VIROLOGY Fourth Edition 2001 (p1053-1088) Thomas E. Shenk LIPPINCOTT WILLIAMS&WILKINS.
2. Higashino et al., J Cell Biol., 170, 15-20, 2005.
3. Kuroshima et al., Oncogene, 30, 2912-2920, 2011.

アデノウイルスの複製における ARE-mRNA の役割 II

43080060 山本 茉実

指導教官 東野史裕

(口腔病理病態学教室)

Role of ARE-mRNA for adenovirus replication

43080030 Mami YAMAMOTO

Directed by Fumihiko HIGASHINO

(Department of Oral Pathology and biology)

キーワード: アデノウイルス、ARE-mRNA、E4orf6

Key words: Adenovirus, ARE-mRNA, E4orf6

緒言

アデノウイルスはげっ歯類の細胞をがん化でき、古くから細胞がん化のモデルとして多くの研究がなされてきた。E4orf6 (E4 open reading frame 6) は、感染時にウイルス及び宿主細胞の mRNA の輸送を介してウイルスの複製に寄与することが知られており、最近げっ歯類の細胞をがん化する能力もあることが見出されたウイルスタンパクである。東野らは E4orf6 が、pp32 や HuR との結合を介して、*c-fos* や *c-myc* など AU-rich element (ARE) をもつ mRNA を核外輸送・安定化することを、E4orf6 によってがん化された細胞を用いて明らかにし、安定化された ARE-mRNA が細胞のがん化を誘導することを見出した³⁾。また、アデノウイルス感染細胞でも E4orf6 により ARE-mRNA が核外輸送されることを解明した。

目的

本研究は、アデノウイルス感染細胞での ARE-mRNA の核外輸送・安定化がアデノウイルスの複製に必須であるか解明するために、ARE-mRNA が安定化されているがん細胞と安定化されていない正常細胞でアデノウイルス複製による細胞の溶解を検討した。

材料

細胞: HeLa MRC5

アデノウイルス: wt300 dl355 in orf3

培地: DMEM (Dulbecco modified eagle medium) 10% serum

CBB 染色液 CBB 脱色液 固定液

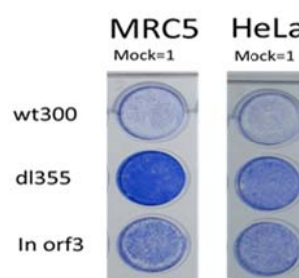
方法

ARE-mRNA が常時核外輸送されているがん細胞とほとんど輸送されていない正常細胞を用いてこれらの細胞に E4 領域を欠失したアデノウイルスを感染させ、CPE (cytopathic effect)

assay により、増殖による宿主の溶解を検討した。

結果

図1 MOI1 における結果



ウイルス濃度が高い場合、ディッシュ全体を比較すると MRC5 の方がより細胞が死んでいるように見えたため、MOI1 (1 pfu/cells) で感染させ細胞死を比較した。dl355・in orf3 の場合、元々 ARE-mRNA 安定化されている HeLa の方が、共に細胞がより溶解していた。

また同じウイルス濃度下での MRC5 と HeLa を比較した際、最も細胞溶解に有意差がでたのは dl355 であった。

また、各ウイルスの細胞溶解活性を比較したところ、高い方から wt300・in orf3・dl355 となり、この順は HeLa・MRC5 共に一致していた。

考察

dl355・in orf3 の各ウイルスにおいて、がん細胞の方が正常細胞よりも細胞溶解効率が高かった。

したがって、ARE-mRNA の安定化の度合いと細胞溶解効率が比例関係にあるといえるため、ARE-mRNA の核外輸送・安定化が、アデノウイルスの複製に必須であるといえる。

3 つのウイルスの内、最も細胞溶解に有意差がでたのは dl355 であったことから、dl355 が最もがん細胞を特異的に溶解できるといえる。

また各ウイルスの細胞溶解活性が、高い方から wt300 in orf3 dl355 であったことから、ARE-mRNA を安定化させる力は、E4orf3 よりも E4orf6 の方が強いことを示唆している。

口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化：NOD-like receptor は何か

43080006 井上 昌平

指導教官：柴田 健一郎、佐伯 歩

(口腔分子微生物学教室)

Activation of inflammasome as an intracellular sensor by oral streptococci.—What is NOD-like receptor?

43080006 Syouhei Inoue

Directed by Ken-ichi Shibata

キーワード：Streptococcus sanguinis, NALP3, ROS

Key words：Streptococcus sanguinis, NALP3, ROS

緒言

我々は、*Streptococcus sanguinis* 菌体が XS106 細胞に対して強い IL-1 β 産生ならびに pyroptosis 誘導活性を有していることを明らかにした (1)。IL-1 β 産生はインフラマゾームの活性化で誘導され、また、インフラマゾームの活性化には種々の NLR (nucleotide-binding oligomerization domain receptor) が関与していることが明らかにされている (2)。

そこで、本研究では *S. sanguinis* によるインフラマゾームの活性化にどのような NLR が関与しているかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

【細菌と標的細胞】

S. sanguinis ATCC10556 (Ss) をブレインハートインフュージョン培地で培養し、PBS で洗浄した菌体を用いた。インフラマゾームの活性化を調べる細胞は A/J マウス由来の樹状細胞である XS-106 細胞を用いた。

【IL-1 β の測定】

6×10^5 個の XS-106 細胞に、Ss の生菌あるいは 100°C で 5 分間処理した菌体をそれぞれ、 2.4×10^5 、 2.4×10^6 個、 2.4×10^7 個を加え、24 時間刺激した後、反応上清に含まれる IL-1 β の産生量を ELISA 法ならびに Western blotting 法で測定した。なお、生菌による刺激はペニシリンとストレプトマイシン存在下で行った。

【NALP3 (NACHT, LRR-and PYRIN-domain-containing protein 3) の mRNA の発現】

6×10^5 個の XS-106 細胞に、生菌 2.4×10^6 個あるいは 2.4×10^7 個を加え、7 時間刺激した後、NALP3 の mRNA の発現を real time-PCR 法 (ABI 社) で測定した。

【Reactive oxygen species (ROS)の関与】

IL-1 β 産生における ROS の関与を調べるために、ROS の阻害剤である N-acetylcysteine (NAC) 存在下で 6×10^5 個の XS-106 細胞に、Ss の生菌 2.4×10^6 個あるいは 2.4×10^7 個を加え、24 時

間刺激し IL-1 β の産生を ELISA 法で測定した。ROS の産生は、 6×10^5 個の XS-106 細胞に、Ss の生菌あるいは 100°C で 5 分間処理した Ss 菌体をそれぞれ 2.4×10^7 個を加え刺激し、1、3、5、7、24 時間後に、dihydrorhodamine123 を用いてフローサイトメーターで解析した。

結果ならびに考察

XS-106 細胞を Ss 菌体で刺激することにより、NALP3 の mRNA の発現が MOI 依存的に上昇し、NALP3 インフラマゾームの関与が示唆された。そこで、NALP3 の関与を明らかにするために、NALP3 特異的な siRNA の導入を試みたが、うまく導入できなかった。NALP3 インフラマゾームの活性化に ROS が関与していることが報告されているので、IL-1 β の産生に及ぼす NAC の影響を調べた。その結果、NAC は濃度依存的に Ss 菌体

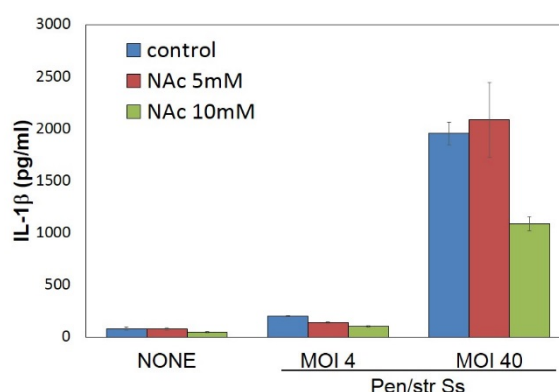


図1. ROS阻害剤 (NAC) の影響

刺激による IL-1 β の産生を低下させた(図1)。さらに、XS-106 細胞を Ss 菌体で刺激することにより、実際に ROS が産生されることを確認した。

以上の結果から、XS-106 細胞の Ss 菌体刺激による IL-1 β の産生には NLRP3 インフラマゾームの関与が強く示唆された。

引用文献

1. 近藤 絵. 口腔レンサ球菌による細胞内センサーとしてのインフラマゾームの活性化：IL-1 β の産生とピロプトーシスの誘導. 研究実習報告書 2013
2. S. Mariathasan and D M. Onack. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. Nat Rev Immunol 7: 31-40, 2007.

Hypoxia inducible factor 1α 5'非翻訳配列がタンパク質合成メカニズムに与える影響

43080005 磯部 由佳利

指導教員：安田元昭

(口腔分子微生物学教室)

5'UTR of Hypoxia inducible factor 1α enhances the cellular translational mechanism.

43080005 Yukari Isobe

Directed by Motoaki Yasuda

(Oral Molecular Microbiology)

キーワード：UTR, アデノウイルス, Luciferase

Key words：UTR, HIF-1α, Luciferase

目的

Hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α)の5'非翻訳配列がタンパク質発現に及ぼす影響を検討した。

材料・方法

1、細胞培養およびWestern blotting

遺伝子導入にはヒト肺がん細胞 H1299 を用い、タンパク質発現を Western blotting 法にて確認した。

2、デュアルルシフェラーゼアッセイ

各細胞に HIF-1αの5'非翻訳配列を組み込んだホタルルシフェラーゼプラスミドをトランスフェクションし、デュアルルシフェラーゼアッセイキットにて解析した。

3、RT-PCR

Luciferase 及び、5UTR-Luciferase をリポフェクション法にてト

ランスフェクションしたプラスミドを H1299 細胞に導入し培養した後、RNA を抽出した。これを鋳型 RNA とし、通法に従い RT-PCR を行った。

4、in vitro translation

TNT®・T7 を用いて作製した Luciferase にリポーターアッセイを行った。

結果

図1に H1299 細胞でのルシフェラーゼアッセイ結果を示す。

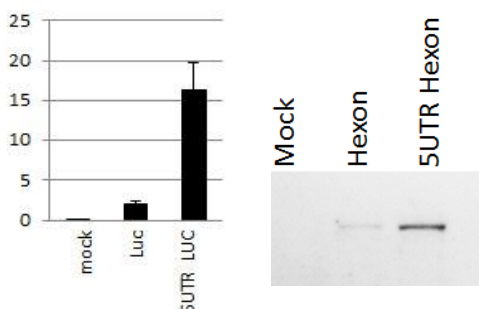


図1：5UTRの有無によるタンパク質の比較

図1より Hexon、Luciferase の両方で 5'非翻訳配列の存在下にタンパク質発現量が増加することがわかった。次に 5UTR が宿主細胞のタンパク質合成メカニズムに影響を与える機構を検証するため実験を行った。まず転写される mRNA 量の増加に影響をあたえるのではないかと疑い RT-PCR を行った。その結果を図2に示す。

図2：RT-PCRにより増幅した Luciferase

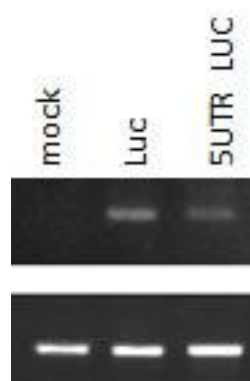
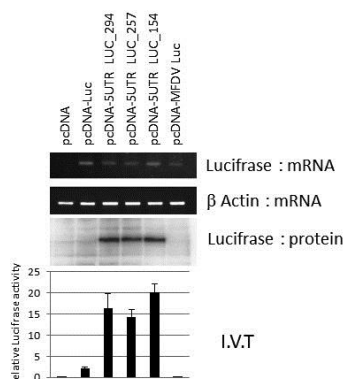


図2より 5UTRの有無によって mRNA 量に変化は見られなかった。次いで翻訳効率に与える影響について in vitro translation により調べた。この実験は無細胞系であるので、転写後翻訳が行われるまでの mRNA の局在を考慮する必要がなくなる。それにより、リボソームによる翻訳効率の

変化を単純に検証することができると考えた。

図3：IVTによる Luciferase 合成量の比較



Luciferase は含まないものに比べ 10 倍も合成量が増加した。5UTR は mRNA の局在変化に関わらず、翻訳効率を上昇させるということが分かった。

考察

5UTR は Hexon 特異的に作用するのではない (図1)。また 5UTR は mRNA 転写量を増加しない (図2)。さらに mRNA の局在によらず、翻訳効率を上昇させる (図3)。

以上のことから、5UTR はタンパク質の種類に関わらずその合成量を増加させ、また宿主の翻訳機構を利用し、自身のタンパク質を優先的に合成していることが考えられる。

結論

5UTR は細胞の翻訳効率を上昇させる作用がある。ある種の 5UTR をもつ遺伝子配列はそれを持たないタンパク質よりも効率的に翻訳される。

参考文献

生命科学を推進する分子ウイルス学 蛋白質 核酸 酵素
Vol. 37 No. 14、共立出版株式会社、1992

E4 タンパク質はアデノウイルスの後期遺伝子発現に必須である

43080025 河野 通俊

指導教員：安田元昭

(口腔分子微生物学教室)

Adenovirus E4 proteins are and late gene expression.

43080025 Michitoshi Kouno

Directed by Motoaki Yasuda

(Oral Molecular Microbiology)

キーワード：5'UTR, E4, E4orf4

Keyword: Translation, E4orf4

目的

アデノウイルス E4 領域がウイルス後期遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

材料・方法

1 細胞株

Vero 細胞を 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地にて培養した。

2 ウイルス

ヒト 5 型アデノウイルス株：野生型、dl366

3 プラスミド

E4 領域を pBLvector に挿入した pBL-E4 とした。

pcDNA に E4orf6 を導入し pcDNAorf6 とした。

4 ウェスタンブロッティング

抗 L 領域抗体を一次抗体として使用した。

結果

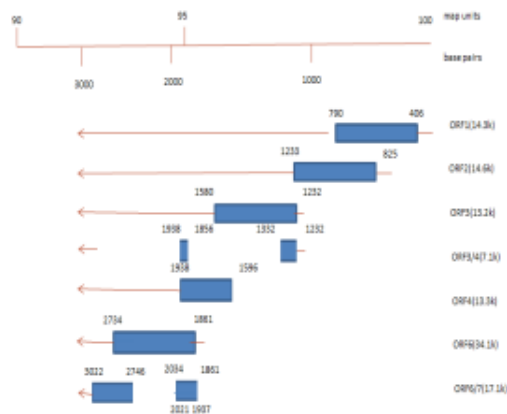


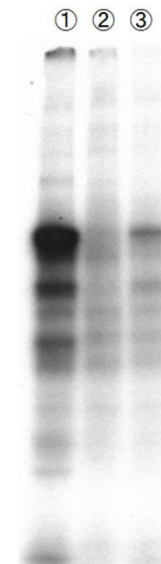
図 1 は E4 領域の遺伝子地図を示す。E4 領域には orf1 から orf6/7 まで全部で七種類のタンパク質が存在する (図 1)。E4 領域のタンパク質はアデノウイルスの後期タンパク質の転写、翻訳に関して大きな役割を持っているが、その詳しいメカニズムは分かっていない。

Vero 細胞に pBL あるいは pBL-E4 を導入し、24 時間後にアデノウイルスを感染させ、感染 24 時間後に後期タンパク質発現量をウェスタンブ

ロティングにより調べた。

この結果を図 2 に示す。

図 2



①は野生型アデノウイルス感染細胞、②は E4 を欠損した dl366 と pBL、③は dl366 と pBL-E4 を導入した細胞の細胞抽出液のウェスタンブロッティングである。

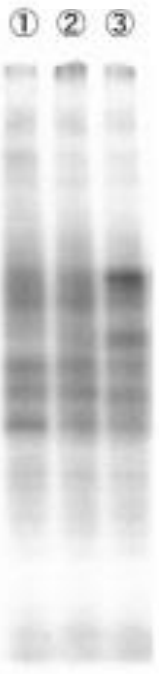
図より、dl366 のみでは後期タンパク質がみれなかったが、E4 を共導入した場合には後期タンパク質が発現していた。

次に、E4 のうち orf6 のみを導入し、同様の実験を行った。結果を図 3 に示す。

①は陰性対照、②は dl366 と pcDNA orf6 ③は dl366 と pBL-E4 を導入したサンプルのウェスタンブロッティングである。

図より、orf6 単独では後期タンパク質の発現は誘導できなかった。

図 3



考察

E4 領域はアデノウイルス後期タンパク質発現に必須であることが確認された。E4orf6 を欠損したアデノウイルスは複製効率が著しく低くなることが報告されているが、今回の実験から少なくとも E4orf6 単独ではこの現象の説明は困難であると考えられた。

結論

あでのウイルスの後期タンパク質はすべてのアデノウイルス構造タンパク質を含んでおり、後期遺伝子発現制御がウイルス増殖に大きな役割を果たしていると考えられる。今回の実験から E4 が重要な役割を果たしていること、orf6 以外の E4 タンパク質がこれに関わっている可能性が示された。

参考文献

生命科学を推進する分子ウイルス学 蛋白質 核酸 酵素 vol.37
No.14 1992 共立出版株式会社

口腔レンサ球菌による細胞内センサーとしてのインフラマゾームの活性化 : IL-1 β の産生とピロプトローシスの誘導

43070015 近藤 絵

指導教官：柴田 健一郎、佐伯 歩

(口腔分子微生物学)

Activation of inflammasome as an intracellular sensor by oral streptococci: IL-1 β production and pyroptosis

43070015 Kai Kondo

Directed by Ken-ichiro Shibata Ayumi Saeki

キーワード：インフラマゾーム、IL-1 β 、ピロプトローシス

Key words: Inflammasome, IL-1 β , Pyroptosis

諸言

一部の口腔レンサ球菌、特に *Streptococcus sanguinis* は血行性に心臓に達し、亜急性心内膜炎を誘導することが知られているが、その病因論についてはほとんど明らかにされていない。しかしながら、最近、炎症性サイトカインである IL-1 β が病態形成に重要な役割を果たしていることが報告された(1, 2)。IL-1 β は IL-18 と同様に細胞内センサーであるインフラマゾームの活性化で産生される(3)。

そこで、本研究では、*S. sanguinis* がインフラマゾームを活性化するかどうかを、マウス樹状細胞を用いて検証し、亜急性心内膜炎の病因論の一つを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

【細菌と標的細胞】

Streptococcus sanguinis ATCC10556 (Ss) をブレインハートインフュージョン培地で培養し、対数増殖期の末期で遠心により菌体を集め、PBS で洗浄した。インフラマゾームの活性化を調べる細胞は A/J マウス由来の樹状細胞である XS-106 細胞を用いた。

【IL-1 β の測定】

6×10^5 個の XS-106 細胞に、Ss の生菌あるいは 100°C で 5 分間処理した菌体をそれぞれ、 2.4×10^5 、 2.4×10^6 個、 2.4×10^7 個を加え、24 時間刺激した後、反応上清中に含まれる IL-1 β の産生量を ELISA 法ならびに Western blotting 法で測定した。なお、生菌による刺激はペニシリンとストレプトマイシン存在下で行った。

【IL-1 β 産生の caspase-1 依存性】

1) caspase-1 阻害薬

種々の濃度の caspase-1 阻害薬である z-YVAD-FMK の存在下で XS-106 細胞を Ss で刺激し、反応上清中の IL-1 β

の産生量を ELISA 法で測定した。

2) RNA 干渉

caspase-1 に特異的な siRNA をエレクトロポレーションで XS-106 細胞に導入した後、反応上清中の IL-1 β の産生量を ELISA 法で測定した。なお、caspase-1 の mRNA の発現抑制は real-time RT-PCR 法で確認した。

【細胞死の測定】

XS-106 細胞に Ss を加えて 24 時間後の細胞死の測定は PI と Annexin V で 2 重染色し、フローサイトメーターで解析した。

結果

XS-106 細胞に Ss を加えると、菌体濃度依存的に IL-1 β が産生された (図 1A)。しかしながら、ELISA 法では pro-IL-1 β と IL-1 β を区別できないために、mature IL-1 β が産生されているかどうかを Western blotting で確認した。その結果、分子量 17.5 kDa の mature IL-1 β の産生が確認された (図 1B)。

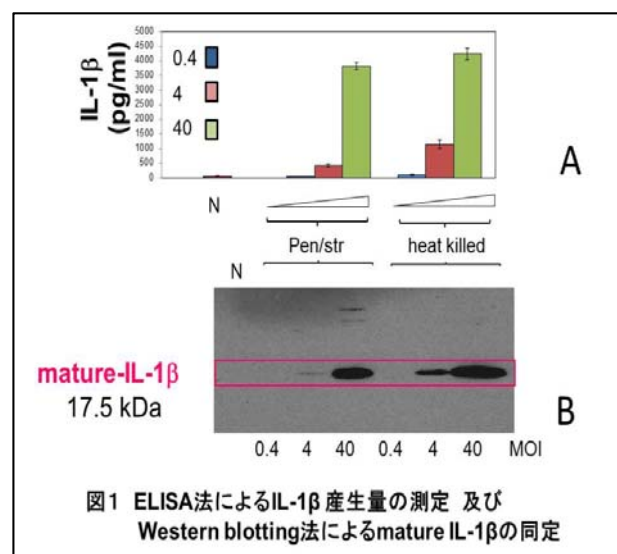
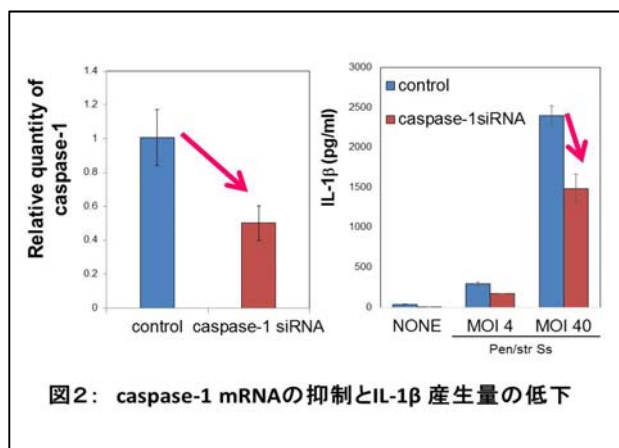


図1 ELISA法によるIL-1 β 産生量の測定及び Western blotting法によるmature IL-1 β の同定

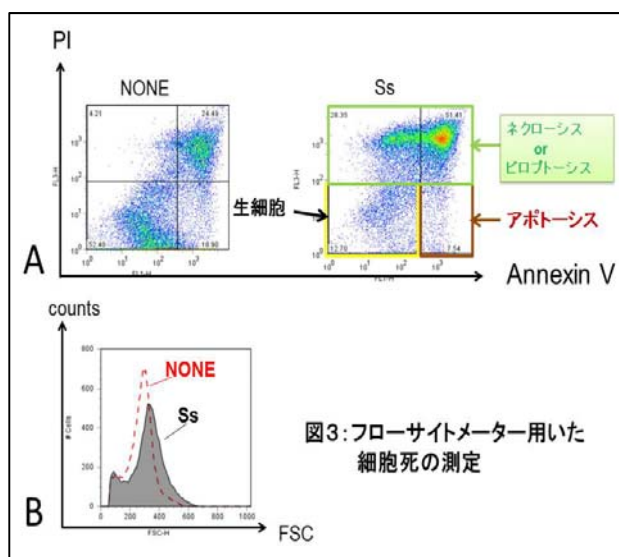
Ss の IL-1 β 産生誘導活性は caspase-1 阻害薬である z-YVAD-FMK で濃度依存的に抑制された。さらに、RNA 干渉により caspase-1 mRNA の発現を抑制すると、IL-1 β 産生誘導活性は約 30% 低下した。(図 2)

以上のことから、Ss 刺激によって XS-106 細胞に誘導される IL-1 β の産生は caspase-1 依存的事であることが示された。

インフラマゾームの活性化による IL-1 β の産生はピロプトローシスという細胞死を伴うことが知られている (3)。そこで、XS-106 細胞を Ss で刺激した後、PI ならびに Annexin V で二重染色し、どのような細胞死が誘導されているかを解析した。その結果、ネクローシス様の細胞死が誘導され



ていることがわかった (図3A)。ピロプトーシスは炎症性サイトカインである IL-18 や IL-1 β の産生を伴うネクローシス様の細胞死であることから、Ss は XS-106 細胞にピロプトーシスを誘導していることがわかった。



考察

Ss 菌体は XS-106 細胞に対して強い IL-1 β 産生誘導活性を有し、また、本活性はインフラマゾームの活性化で誘導される caspase-1 依存的であった。さらに、Ss 菌体は XS-106 細胞にピロプトーシスという細胞死を誘導した。IL-1 β が亜急性心内膜炎の病態形成に重要な役割を果たしていることから、Ss が IL-1 β 産生誘導活性とピロプトーシスの誘導活性を有するという本研究結果は、Ss による亜急性心内膜炎の病因論の一部を明らかにしたものと推測される。

引用文献

1. Deviri E and Glenville BE. Inflammatory response in infective endocarditis. Eur J Inflamm 5:57-63, 2007

2. Veltrop MH, Beekhuizen H, Thompson J. Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells. Infect Immun 67:6130-6138, 1999.
3. Sanjeev Mariathasan and Denise M. Onack. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. Nat Rev Immunol 7: 31-40, 2007.

インフラマソームの活性化による IL-1 β 産生誘導能の違い

43080034 高田 亮

指導教官 長谷部 晃

(北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座
口腔分子微生物学教室)

The difference of IL-1 β -inducing property in cells by
inflammasome activation

43080034 Ryo Takata

Directed by Akira Hasebe

Hokkaido University Graduate of school of Dental
Medicine Department of Oral Pathobiological Science

Laboratory of Oral molecular microbiology

キーワード: カンジダ・アルビカンス, IL-1 β

keywords: *C. albicans*, IL-1 β

[諸言]

*Candida albicans*はヒトのカンジダ症を引き起こす病原体として知られている。インフラマソームは炎症において中心的な役割を果たしており、種々の細胞において、炎症誘導性のサイトカインである IL-1 β の産生誘導がインフラマソームの活性化によって引き起こされることが知られている。本研究では、*C. albicans*によるインフラマソーム活性化のメカニズムを調べることを目的とし、マクロファージ系ならびに樹状細胞系の細胞を用いて様々な条件下における *C. albicans* の IL-1 β 産生誘導活性を調べた。

[材料と方法]

細胞は、単球・マクロファージ系細胞である THP-1、樹状細胞系細胞である XS106 ならびに DC2.4 を使用した。*C. albicans*はアバディーン大学の A. J. Brown 教授より分与された緑色蛍光色素 (GFP)を発現する *C. albicans* pACT-GFP を使用し、グルコース 2%を含む SD 培地で一晚好気的に培養し、生理食塩水に懸濁して使用時まで -80°C に保存した。IL-1 β 産生量の測定は細胞の培養上清から Biolegend 社の human IL-1 β 用 ELISA キットを使用し ELISA 法で調べた。THP-1 による *C. albicans* の取り込みはフローサイトメーターで測定した。

[結果と考察]

THP-1 ならびに XS106, DC2.4 を *C. albicans* で刺激し、培養上清中の IL-1 β 産生量を測定したところ、THP-1 においてのみ IL-1 β の産生誘導が見られた(図1)。また、熱処理した *C. albicans*による刺激では IL-1 β の産生誘導が見られなかった。

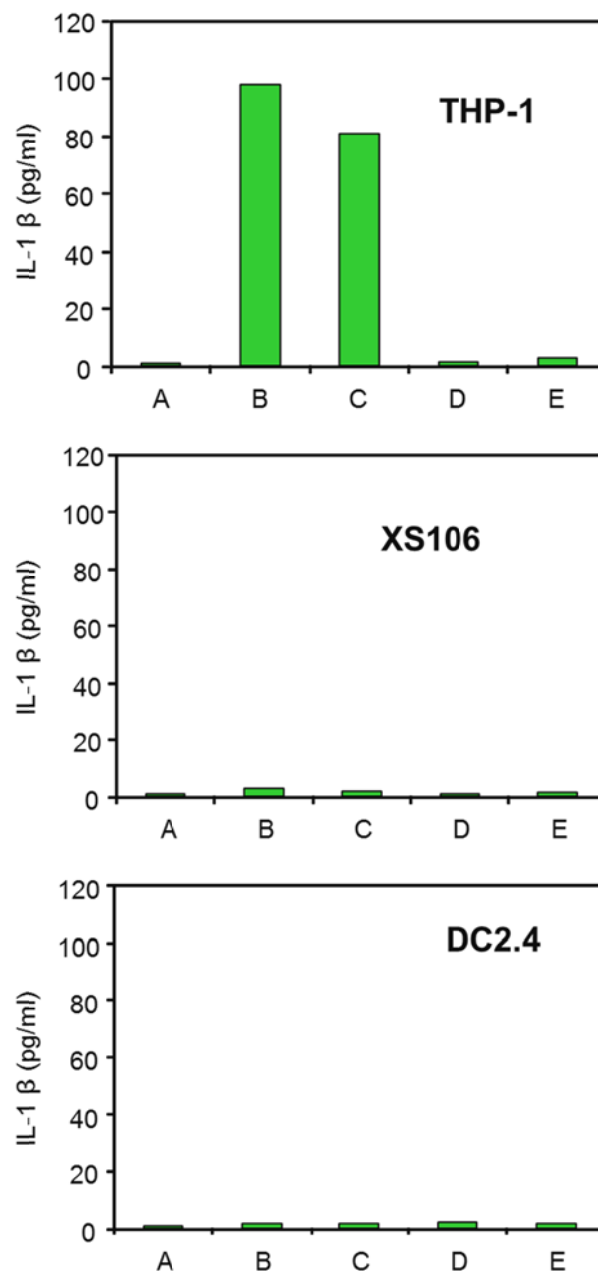


図1. *C. albicans* で刺激された THP-1, XS106, DC2.4 の培養上清中の IL-1 産生量。A: 無刺激コントロール, B: live *C. albicans* MOI=10, C: 生 *C. albicans* MOI=20, D: heat-killed *C. albicans* MOI=10, E: heat-killed *C. albicans* MOI=20,

したがって、本活性成分はタンパク性であることか、

IL-18の誘導には *C. albicans* が生きていることが必要であることが推測された。

次に、マクロファージならびに樹状細胞は貪食細胞であるので、IL-18 産生誘導活性と *C. albicans* の細胞内への取り込みとの関係を調べた (図 2)。

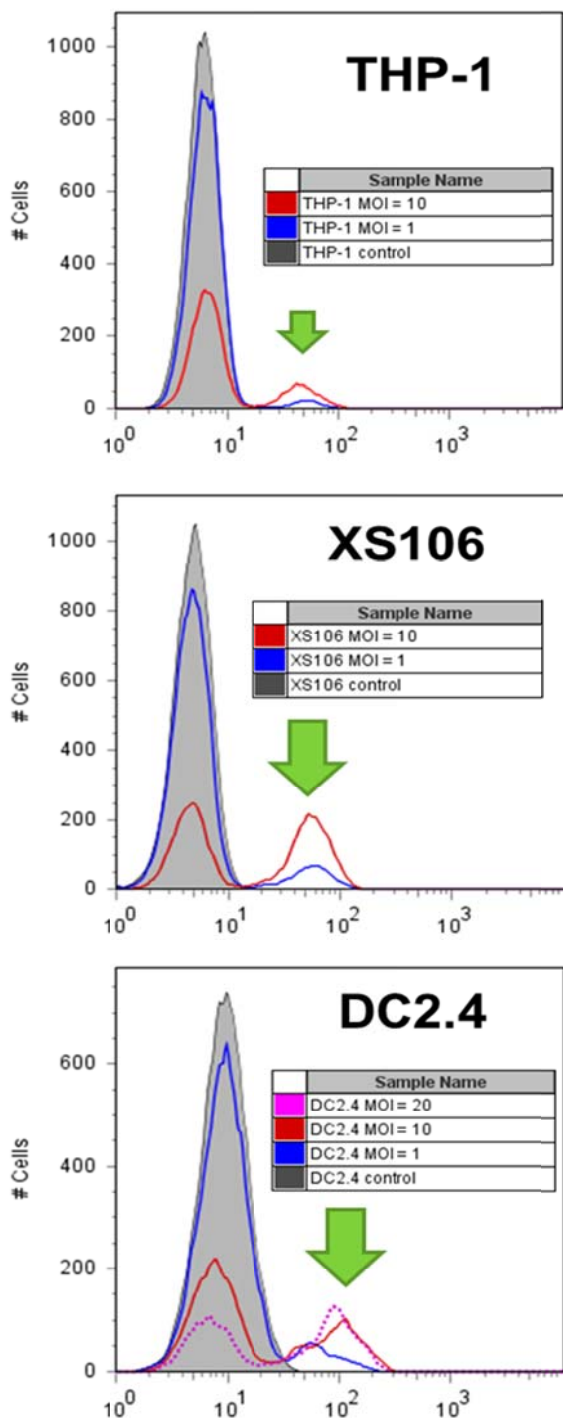


図 2. THP-1, XS106 ならびに DC2.4 による *C. albicans* の取り込み。矢印部分が *C. albicans* を取り込んだ細胞を表す。

その結果、どの細胞においても MOI 依存的に *C.*

albicans の取り込みがあることがわかった。そこで、次に活性化されたマクロファージに対する *C. albicans* による IL-18 産生誘導を調べた。マクロファージを phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で活性化し、*C. albicans* で刺激した (図 3)。

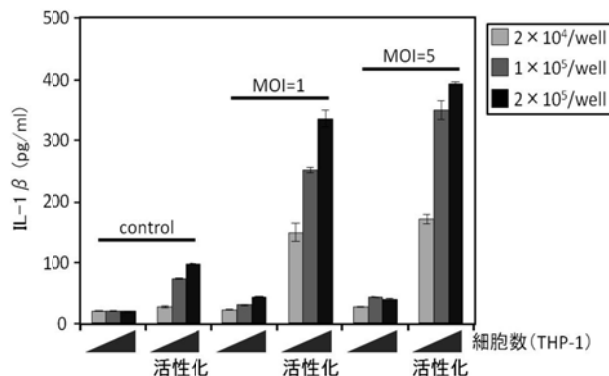


図 3. PMA で活性化した THP-1 の *C. albicans* 刺激により培養上清中に産生された IL-18 の測定。

その結果、PMA で活性化された THP-1 と活性化されていない THP-1 では、活性化された THP-1 において *C. albicans* 刺激で IL-18 産生が多く見られた。

以上のことから、*C. albicans* はマクロファージ系細胞には IL-18 の産生を誘導するが、樹状細胞系の細胞には誘導せず、また、これらの細胞における IL-18 産生誘導と、カンジダの取り込みとは無関係であることがわかった。さらに、マクロファージの活性化により、カンジダによる IL-18 産生誘導は増強することが確認された。したがって、今後はマクロファージと樹状細胞における細胞表面に発現している分子の違いなどを調べる必要があると思われる。

口腔レンサ球菌による細胞内センサーとしてのインフラマゾームの活性化：活性物質は何か

43080039 千種 達也

指導教官：柴田 健一郎

(口腔分子微生物学教室)

Activation of inflammasome as an intracellular sensor by *Streptococcus sanguinis*: What are the activate entities ?

43080039 Tatsuya Chigusa

Directed by Kenichiro Shibata

キーワード： *Streptococcus sanguinis*, インフラマゾーム, IL-1 β

Key words: *Streptococcus sanguinis*, Inflammasome, IL-1 β

諸言

我々は、*Streptococcus sanguinis* 菌体がマウス樹状細胞である XS106 細胞に対して強い IL-1 β 産生ならびに pyroptosis 誘導活性を有していることを明らかにした (1)。さらに、井上等 (2) は *S. sanguinis* の IL-1 β 産生誘導活性には NLRP3 インフラマゾームの活性化が関与していることを示唆している。そこで、本研究では、XS106 細胞に IL-1 β 産生を誘導する *S. sanguinis* の活性物質を同定することを目的とした。

材料と方法

【レンサ球菌】

S. sanguinis ATCC10556 (Ss) をブレインハートインフュージョン培地で培養し、対数増殖期後期の培養液を遠心し、菌体と培養上清に分離した。さらに、*S. gordonii* ならびに *S. mutans* の野生株 (WT 株) ならびにリボタンパク質欠失株 (dLP 株) を用いた。

【標的細胞】

A/J マウス由来の樹状細胞である XS-106 細胞を用いた。

【IL-1 β 産生誘導活性】

二つの反応系を用いた。一つは Ss 菌体と XS106 細胞との接触する系で、もう一つは Transwell を用いて菌体との接触をなくした系である (図 1)。IL-1 β は近藤、井上等の方法と同様な方法で測定した (1, 2)。

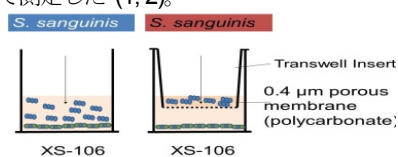


図 1

【各種酵素処理】

活性化物質の性質を調べるため、Ss の培養上清を DNA 分解酵素 (DNase)、RNA 分解酵素 (RNase)、リゾチームあるいは Proteinase K を加え、37°C で 1 時間処理した後、XS106 細胞を 24 時間刺激し、IL-1 β 産生誘導活性を調べた。

【菌体成分の IL-1 β 産生誘導活性】

市販されている *S. aureus* 由来のペプチドグリカン (PGN)、合成ムラムルジペプチド (Sigma-Aldrich 社) ならびに *M. salivarium* 由来リボペプチド (FSL-1) の IL-1 β 産生誘導活性を調べた。

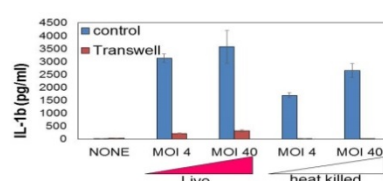
結果ならびに考察

Ss 菌体と XS-106 細胞との接触がある系では、非常に強い

IL-1 β 産生誘導活性がみられるが、接触がない系でも、弱いながらも IL-1 β の産生誘導が見られ、培養上清に活性物質が存在することが示唆された (図 2)。

そこで、Ss の培養上清の IL-1 β 産生誘導活性を検証したところ、強い IL-1 β の産生誘導活性が確認された。また、培養上清を分子量 3000 でカットするフィルターで濃縮したところ、濃縮外液には活性がみられなかった。さらに、培養上清の IL-1 β 産生誘導活性は DNase ならびに Lysozyme で約 30%、そして Proteinase K で約 60% 抑制された (図 3)。

このことから、培養上清中には複数の活性化物質が存在し、タンパク質、DNA、ペプチドグリカンが活性物質の本体であることが示唆された。実際に、菌体成分である PGN やリボタンパク質の活性部位である FSL-1 でも IL-1 β の産生誘導活性が確認された。さらに、*S. gordonii* ならびに *S. mutans* の dLP 株の培養上清には活性は見られなかった。ことから、リボタンパク質が IL-1 β



生菌が存在・放出する何らかの物質が活性化能を有している可能性

図 2 活性化度の比較

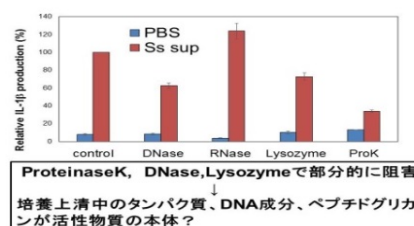


図 3 酵素処理した培養上清による活性化能

の産生に関わっていることが示唆された。

以上のことから、Ss 培養上清にはリボタンパク質、DNA、PGN などの複数の活性化物質が存在するということが示唆された。特に、dLP 株の培養上清に活性物質が存在しないことから、リボタンパク質がインフラマゾームの活性化に大きく関わっているものと推測される。今後の研究ではこれらの物質を精製し、その構造を明らかにしていく予定である。

引用文献

1. 近藤 絵. 口腔レンサ球菌による細胞内センサーとしてのインフラマゾームの活性化：IL-1 β の産生とピロプトシスの誘導. 研究実習報告書 2013
2. 井上 昌平. 口腔レンサ球菌によるインフラマゾームの活性化：NOD-like receptor は何か. 研究実習報告書 2013

5'非翻訳領域が Hexon タンパクの発現に与える影響

43080052 前田 正名

指導教官：安田元昭

(口腔分子微生物学教室)

5' UTR dependent expression of Hexon protein

43080052 masana maeda

Directed by Motoaki Yasuda

(Oral Molecular Microbiology)

キーワード：構造タンパク質

後期タンパク質, Hexon

Key words : Tripartite Leader, adenovirus, Late protein, Hexon

緒言

がんの完治は現代医学における最大の目標である。がんがなぜこれほどまでに恐れられる病気なのか、それはその進行の速さと転移にある。そのため、進行と転移を抑制することは、がんの完治への大きな進歩となるだろう。今までの研究で、がん関連遺伝子の5' UTR が発現に大きな影響を与えていることが明らかになっている。

本研究では後期タンパク質の一つである Hexon に注目し、5' UTR の有無によるタンパク質の発現量の変化について Western blotting 法にて検討した。

材料・方法

1、細胞株

ヒト肺がん細胞 H1299 を 10% ウシ胎児血清を含む DMEM 培地にて培養した。

2、ウイルス

ヒトアデノウイルス 5 型

3、メタボリックラベリング法

単層培養した H1299 細胞を 35S メチオニンでメタボリックラベリングした。この細胞からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE にて分離しオートラジオグラフィーを行った。

4、Western blotting 法

タンパク質を含むサンプルを SDS 電気泳動し、分離されたタンパク質を電気的膜に転写した後、免疫的に目的のタンパク質を検出した。

5、リポフェクション法

リポフェクション法により、目的の核酸を真核細胞に導入した。培地で Lipofectamine2000 と目的となる核酸を希釈し、これらを反応させた。反応後、導入する細胞を加え、目的とする核酸を細胞に導入させた。

結果

細胞にアデノウイルスを感染させた場合と、感染させていない場合とでそのタンパク質の発現量についてメタボリックラベリング法にて比較した。以下に示す図がその結果である。

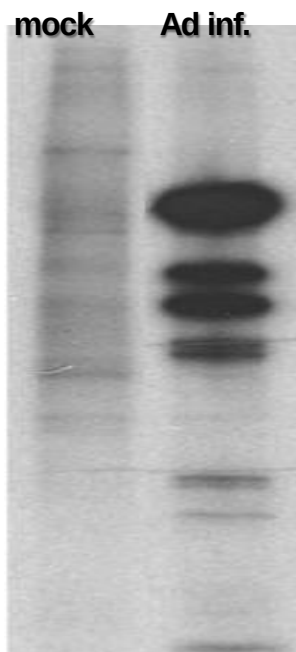
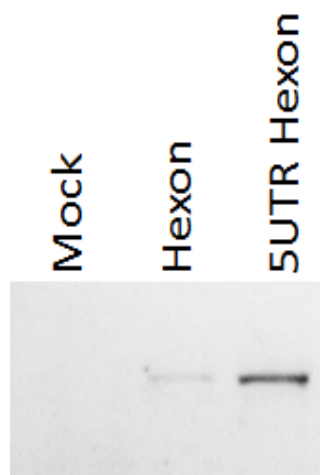


図1：左のレーンには未感染の場合のタンパク質発現量を示し、右のレーンにはアデノウイルスに感染させた場合のタンパク質発現量を示したものである。右のレーンに見えるバンドは後期タンパク質を示している。この結果から、アデノウイルスを感染させた場合には、後期タンパク質(L1～L5)が優先的に発現しているのがわかる。同様な効果が H1F1a 5' UTR にあるか否かを確認するため後期タンパク質 (HEXON) の上流に同配列を導入し発現量を比較した。

タンパク質の発現量については Western blotting 法にて比較を行った。以下に示す図がその結果である。



下

図2：pcDNA ベクターに Hexon、5'UTR-Hexon をそれぞれ導入し、ヒト肺がん細胞 H1299 細胞に感染させた。

結果から、Hexon に加えて 5' UTR を組み込んだ場合の方が、Hexon のみを組み込んだ場合よりも太いバンドが観察された。

考察

5' UTR を組み込むことで、Hexon タンパクの発現量が著しく増加した。このことから、5' UTR 導入によりアデノウイルスの後期タンパク質の優先的発現を再現することができた。

参考文献

- (1) 生命科学を推進する分子ウイルス学 蛋白質 核酸 酵素 vol. 37 No. 14 1992

Candida albicans によるマクロファージ系細胞への IL-1 β 産生誘導のメカニズム

43080054 三好 太郎
指導教員 長谷部 晃
口腔分子微生物学講座

IL-18 production mechanism in macrophages induced
by *Candida albicans*

43080054 Taro Miyoshi
Directed by Akira Hasebe

Hokkaido University Graduate of school of Dental
Medicine Department of Oral Pathobiological Science
Laboratory of Oral molecular microbiology

キーワード : *C. albicans*, IL-18,
マクロファージ

keywords : *C. albicans*, IL-18, macrophages

諸言

Candida albicans はマクロファージ系細胞に IL-18 産生を誘導するが、その詳細なメカニズムは不明のままである。したがって、本研究ではマクロファージ系細胞を用いて、*C. albicans* による IL-18 産生誘導のメカニズムを明らかにすることを目的として種々の実験を行った。

材料・方法

細胞は単球・マクロファージ系細胞 THP-1 を phorbol myristate acetate (PMA) 処理で活性化させて使用した。*C. albicans* は、緑色蛍光タンパク質 (GFP) を恒常的に発現する遺伝子を有する株である *C. albicans* pACT-GFP を用いた。抗真菌薬としてアンホテリシン B、THP-1 による *C. albicans* の取り込み阻害剤としてサイトカラシン D を使用した。IL-18 産生量は ELISA 法で

測定し、成熟型 IL-18 の検出は、Cell signaling 社の anti IL-18 を用いてウェスタンブロッティング法で行った。THP-1 による *C. albicans* の取り込みはフローサイトメーターで調べた。

結果と考察

IL-18 は、NF- κ B の活性化により細胞内で IL-18 前駆体が合成され、これがさらにインフラマソームの活性化により活性化される caspase-1 で切断されることで成熟型になることが知られている。これまでの実験で *C. albicans* はマクロファージ系細胞に IL-18 の産生を誘導することがわかっているが、その IL-18 が成熟型であるかどうかは不明のままであったので、*C. albicans* で刺激された THP-1 の培養上清を用いてウェスタンブロッティング法で調べた。その結果、*C. albicans* による刺激で THP-1 に成熟型の IL-18 が誘導されることが分かった (図 1)。

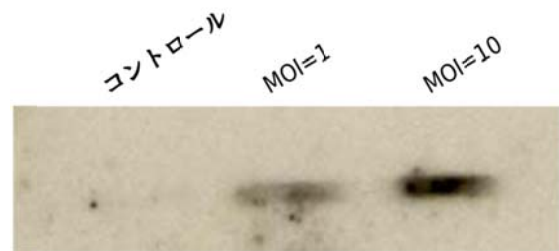


図 1. THP-1 培養上清中の成熟型 IL-18 の検出。コントロールは *C. albicans* を含まない培養上清、MOI は細胞ひとつに対する *C. albicans* の数を表す。

また、これまでの実験で、熱処理により *C. albicans* は IL-18 産生誘導活性を消失するがわかっていたが、これは熱処理により活性物質が変性することによる消失なのか、*C. albicans* 自体が死ぬことによる消失なのかは不明であった。そこで、抗真菌薬存在下における *C. albicans* の IL-18 産生誘導活性を調べた。THP-1 をアンホテリシン B 存在下で培養し、そこに *C. albicans* を加えて THP-1 による IL-18 産生を調べると、*C. albicans* による IL-18 産生誘導はアンホテリシン B 存在下では減少することがわかった (図 2)。アンホテリシン B は NF- κ B を活性化するため、高濃度のアンホテリシン B

存在下ではコントロールにおいても IL-18 の産生が誘導されていた。したがって、*C. albicans* による IL-18 産生誘導の減少が、アンホテリシン B の濃度依存的ではないのは、アンホテリシン B 自体が NF- κ B を活性化することによるものと思われる。

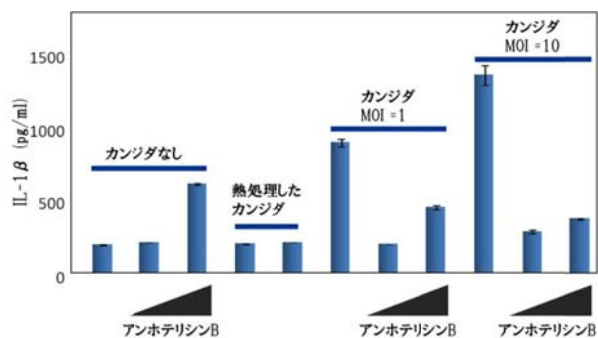


図 2. アンホテリシン B 存在下での *C. albicans* の IL-18 産生誘導活性。

マクロファージは代表的な貪食細胞であることから、アクチンの再構成による細胞の異物の取り込みを阻害するサイトカラシン D が IL-18 産生誘導に及ぼす影響を調べた。サイトカラシン D の貪食阻害薬としての効果を確かめたうえで、THP-1 の *C. albicans* の取り込み阻害が IL-18 産生誘導に及ぼす影響を調べたところ、サイトカラシン D の濃度依存的に *C. albicans* による IL-18 産生誘導が減少した (図 3)。したがって、THP-1 による IL-18 の誘導には、*C. albicans* の取り込みが重要であることがわかった。

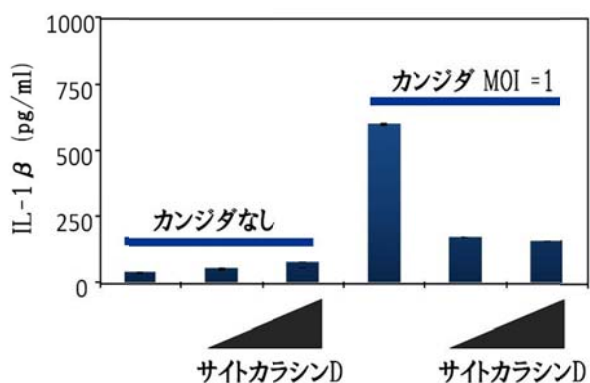


図 3. あらかじめサイトカラシン D 処理した THP-1 における *C. albicans* による IL-18 産生誘導

以上のことから、本研究により、i) *C. albicans* により THP-1 細胞には成熟型の IL-18 が誘導されるということ、

ii) THP-1 細胞への IL-18 の産生誘導では、*C. albicans* が活着していることが重要であるということ、また、iii) 本活性には THP-1 が *C. albicans* の取り込むことが重要であること、などが明らかになった。

骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ活性の TRK による阻害

43080009 上田 慶大

指導教員 鈴木 邦明

(細胞分子薬理学教室)

Hydrolysis activity of *p*-nitro phenyl phosphate by alkaline phosphatase of osteoblast-like MC3T3-E1 cell and its inhibition by TRK

キーワード：アルカリ性ホスファターゼ、パラニトロフェニルリン酸、TRK

keywords : alkaline phosphatase, *p*-nitro phenyl phosphate, TRK

諸言

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) は生体内に存在する、アルカリ性条件下でリン酸エステル化合物を加水分解する酵素であり、骨形成を阻害するピロリン酸を分解し、材料となるリンを生成することによって骨形成を促進するとされている。そこで、骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞の ALP が実際に、一般的な ALP 活性の基質である、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) が分解されるか確かめた。次にビスホスホネートは破骨細胞活性を抑えることで骨吸収を阻害し骨を強化するが、ビスホスホネートである TRK が ALP 活性を阻害するかについて調べた。

材料と方法

MC3T3-E1 細胞のミクロソームを使用し、基質が分解されて生じたリンを Chifflet 法で定量して、活性を求めた。また、基質として pNPP を使用した。

結果と考察

1. 基質分解の反応時間依存性を測定すると図 1 のように pNPP は反応時間に比例して分解され、生成されるリンの量は増加した。

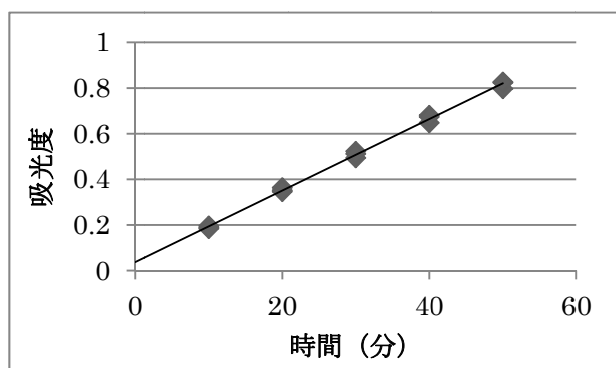


図 1 反応時間依存性

2. pNPP 分解の pH 依存性を測定すると、図 2 のようにアルカリ性で最大活性を示し、最適 pH は 10.13 であった。

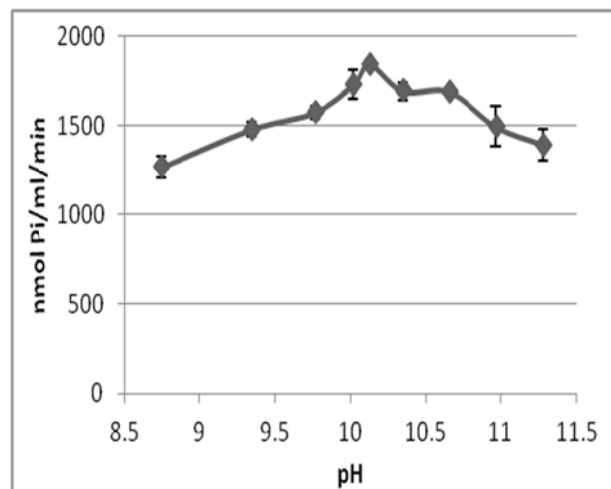


図 2 pH 依存性

3. 活性の基質濃度依存性を測定すると、図 3 のように pNPP 濃度が高くなるにつれて活性が上がり、4 mM で最大活性を示したが 8 mM では活性が低下し、基質阻害という現象が観察された。

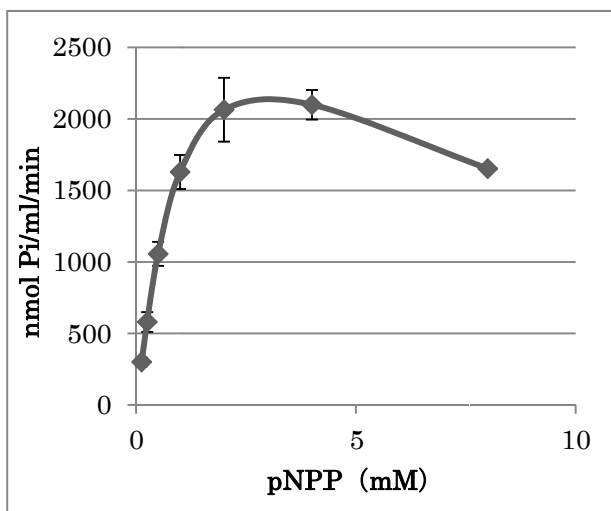


図 3 基質濃度依存性

4. ALP が TRK を分解するかを調べるために、基質 (pNPP) を加えずに TRK の濃度を変えて、リンの量を測定したところ、TRK の濃度によらずリンの量はバックグラウンドレベルであり、ALP は TRK を分解しないと考えた。

5. pNPP を基質として ALP 活性阻害の TRK 濃度依存性を測定すると、図 4 のように低濃度ではほとんど阻害されなかったが、濃度が高いほど活性は阻害され、0.31 mM と 1.25 mM の間で急激に活性が低下した。

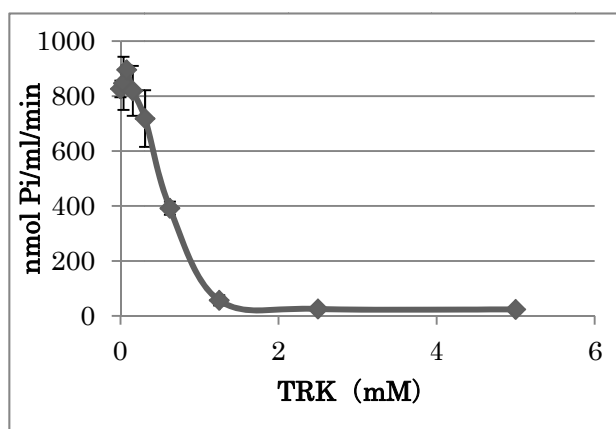


図4 TRKによるALP活性阻害の濃度依存性

6. 種々濃度のTRK存在下でALP活性のpNPP濃度依存性を調べた。図5から低濃度TRKから高濃度TRKにつれて最大活性は低下した。この結果から、pNPPの50%活性化濃度をHillプロットにより計算すると表1のようになった。

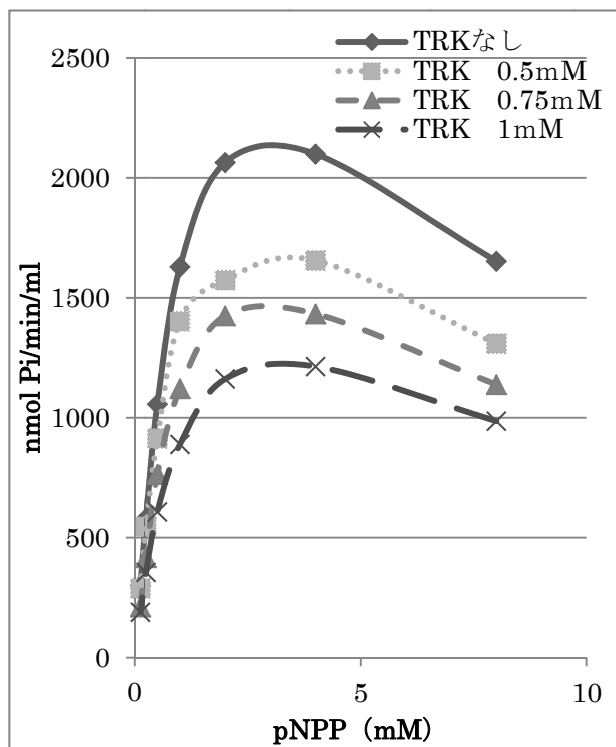


図5 様々なTRK濃度におけるALP活性の基質濃度依存性

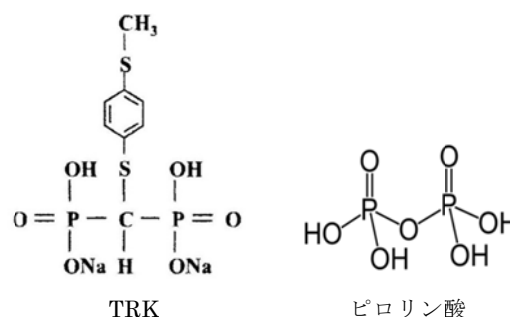
表1: 様々なTRK濃度における基質の50%活性化濃度およびALPの最大活性

TRKの濃度 (mM)	基質の50%活性化濃度 (mM)	ALPの最大活性 (nmol Pi/ml/min)
0	0.45	2099
0.5	0.36	1655
0.75	0.36	1433
1	0.41	1213

7. 表1から、ALPの最大活性は存在するTRKの濃度に依存して低下したが、基質の50%活性化濃度はほぼ一定であった。これはTRKがALP活性を非拮抗的に阻害することを示唆する。

本実験によりMC3T3-E1細胞のALPはpNPPを加水分解しリンを生成すると考えられる。

これらの結果および昨年度菊池が行ったpNPPとピロリン酸との比較実験から、同様にピロリン酸も加水分解しリンを生成することも推測できる。またTRKはピロリン酸と似た化学構造であることから、拮抗的に阻害すると推測していたが、結果はALP活性を非拮抗的に阻害するというものであった。その理由としてTRKはALPの活性部位以外の部位にも結合しているからと考えられる。



またTRKは、第一世代であるビスホスホネートのetidronateと同様にALP活性を非拮抗的に阻害することを示しているため、TRKは骨の石灰化も阻害する可能性がある。

これより、ビスホスホネートは骨吸収を阻害するだけでなく、骨の石灰化も阻害することで骨のリモデリングを抑制する可能性がある。そのためBRONJを誘発する一因となっていることが考えられる。

結論

TRKは、ALP活性を非拮抗的に阻害する。

参考文献

菊池均(2012): 骨芽細胞様MC3T3-E1細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ活性によるピロリン酸加水分解活性とetidronateによる阻害 41期生(平成23/24年度)) 研究実習論文報告集【第13号】

骨芽細胞様MC3T3-E1細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ活性の risedronate による阻害

43080010 大崎 晃嗣

指導教員 鈴木 邦明

(細胞分子薬理学教室)

Hydrolysis activity by alkaline phosphatase of osteoblast-like MC3T3-E1 cell and its inhibition by risedronate

43080010 Koji Osaki

Directed by Kuniaki Suzuki

キーワード：アルカリ性ホスファターゼ、リセドロネート

Keywords：alkaline phosphatase、risedronate

諸言

アルカリ性ホスファターゼ (ALP) は生体内に存在する、アルカリ性条件下でリン酸エステル化合物を加水分解する酵素であり、骨形成を阻害するピロリン酸を分解し、材料となるリンを生成することによって骨形成を促進するとされている。そこで、骨芽細胞様MC3T3-E1細胞のALPが実際に、一般的なALP活性の基質である、パラニトロフェニルリン酸 (pNPP) をどのように分解するかを確かめた。次にビスホスホネートは破骨細胞活性を抑えることで骨吸収を阻害し骨を強化するが、第一世代のビスホスホネートであるetidronateはALP活性を非拮抗的に阻害するということが知られている。そこで第三世代のビスホスホネートである risedronate はALP活性にどのような影響を及ぼすかについて調べた。

材料と方法

MC3T3-E1細胞のミクロソームを使用し、基質が分解されて生じたリンを Chifflet 法で定量して、活性を求めた。また基質として pNPP を使用した。

結果と考察

1. 基質分解の反応時間依存性を測定すると図1のように反応時間に比例して生成されるリンの量は増加した。

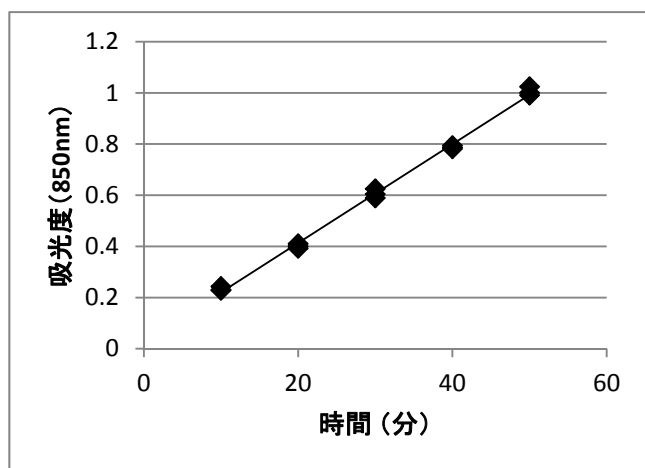


図1 反応時間依存性

2. pNPP 分解の pH 依存性を測定すると、図2のようにアルカリ性で最大活性を示し、最適 pH は 10.13 であった。

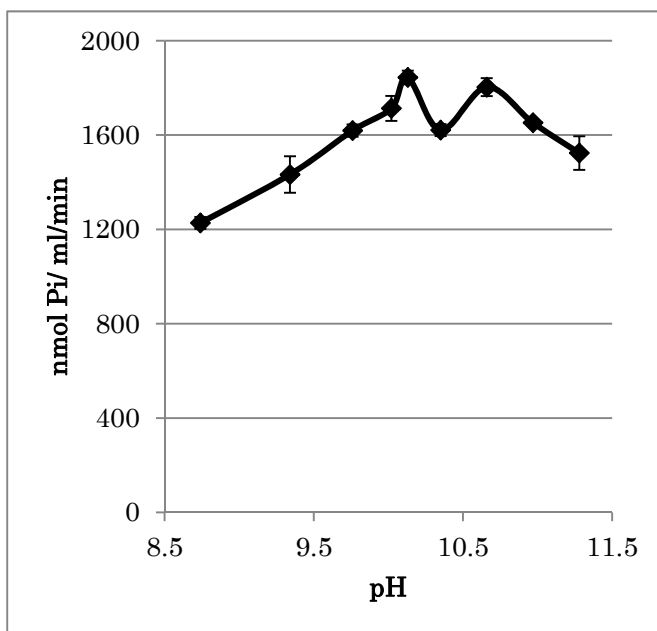


図2 pH 依存性

3. 活性の基質濃度依存性を測定すると、図3のように基質濃度が高くなるにつれて活性が上がり、4 mM で最大活性を示したが 8 mM では活性が低下し、基質阻害という現象が観察された。

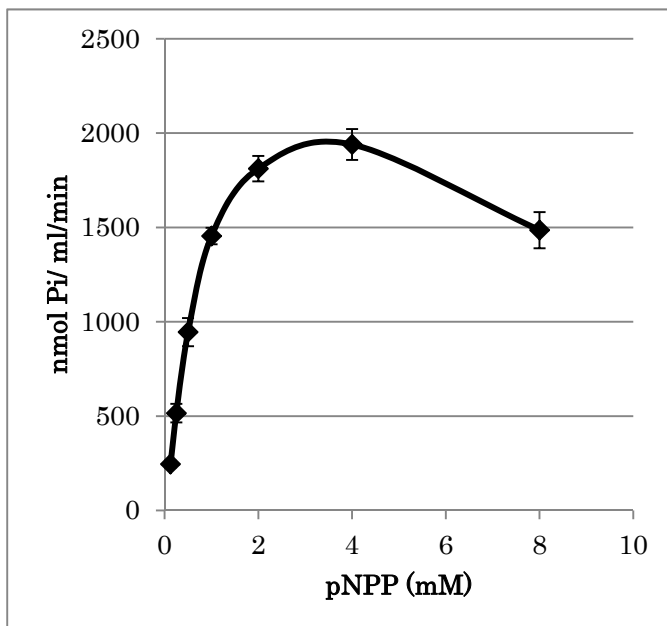


図3 基質濃度依存性

4. ALP が risedronate を分解するかを調べるために、基質を加えない状態で risedronate の濃度を変えて反応させ、リンの量を測定したところ risedronate の濃度によらずリンの量はバックグラウンドレベルであり、ALP は risedronate を分解しないと考えた。

5. pNPP を基質として ALP 活性阻害の risedronate 濃度依存性を測定すると、図 4 のように低濃度ではほとんど阻害されなかったが、濃度が高いほど活性は阻害され、1.25 と 2.5 mM の間で急激に活性が低下した。

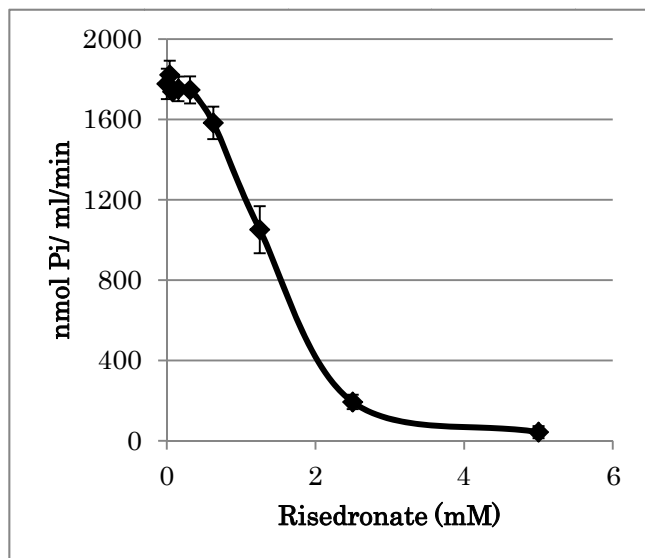


図 4 risedronate による ALP 活性阻害の濃度依存性

6. 種々濃度の risedronate 存在下で ALP 活性の pNPP 濃度依存性を調べた。図 5 から高濃度になるにつれ、最大活性は低下した。この結果から、pNPP の 50%活性化濃度を Hill プロットにより計算すると表 1 のようになった。

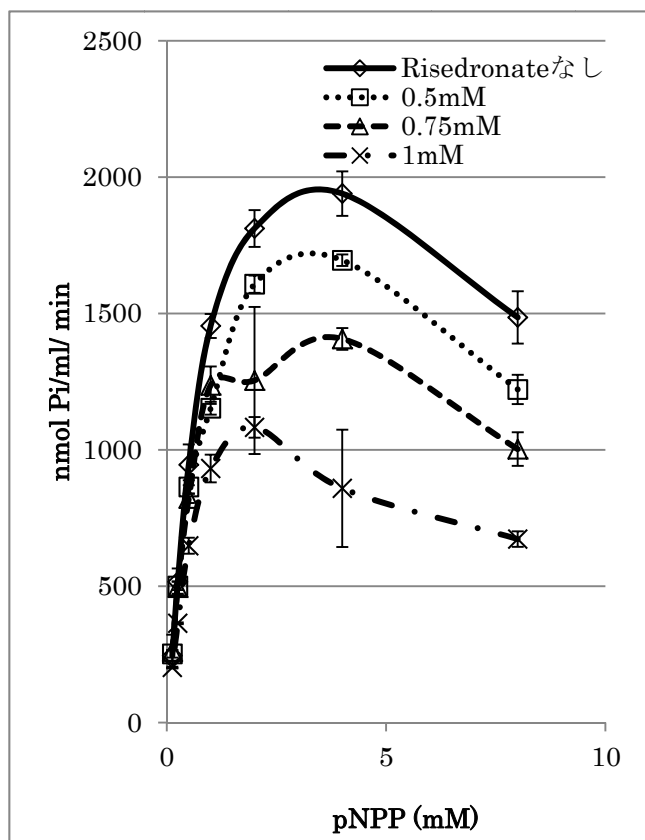


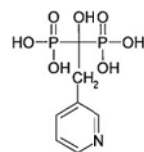
図 5 様々な risedronate 濃度における ALP 活性の基質濃度依存性

表 1 様々な risedronate 濃度における基質の 50%活性化濃度および ALP の最大活性

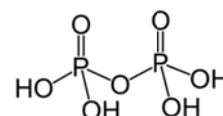
risedronate の濃度 (mM)	基質の 50%活性化濃 度(mM)	ALP の最大活性 (nmol Pi/ml/min)
0	0.42	1939
0.5	0.41	1695
0.75	0.36	1406
1	0.35	1082

7. 表 1 から、ALP の最大活性は存在する risedronate の濃度に依存して低下したが、基質の 50%活性化濃度はほぼ一定であった。これは、risedronate は ALP 活性を非拮抗的に阻害することを示唆する。

本実験により MC3T3-E1 細胞の ALP は pNPP を加水分解しリンを生成すると考えられる。そしてそのことおよび昨年度の pNPP とピロリン酸との比較実験から、同様にピロリン酸も加水分解しリンを生成することも推測できる。また risedronate はピロリン酸と似た化学構造であることから、ALP 活性を拮抗的に阻害すると推測していたが、結果は ALP 活性を非拮抗的に阻害するというものであった。その理由として risedronate は ALP の活性部位以外の部位にも結合しているからと考えられる。



risedronate



ピロリン酸

また、この risedronate が ALP 活性を非拮抗的に阻害するという実験結果から、risedronate は骨の石灰化を阻害する場合があることが予想され、そのことがビスホスホネート剤の使用が原因として起こる顎骨壊死 (BRONJ) に関連しているということが推測される。

結論

risedronate は ALP 活性を非拮抗的に阻害する。

参考文献

菊池均 (2012): 骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞におけるアルカリ性ホスファターゼ活性によるピロリン酸加水分解活性と etidronate による阻害 41 期生 (平成 23/24 年度) 研究実習論文報告集 [第 13 号]

暗算作業効率に及ぼすカフェインの効果

43080014 尾 立 卓 弥

指導教員：吉村 善隆
(細胞分子薬理学教室)

Effect of caffeine on mental
calculation work efficiency

43080014 Takuya ODACHI
Directed by YOSHIMURA, Y.
(Molecular Cell Pharmacology)

キーワード：内田クレペリン検査、暗算作業効率、カフェイン、
コーヒー

Keywords：Uchida-Kraepelin Test, Mental calculation work
efficiency, caffeine, coffee

結 言

カフェインは大脳皮質に作用して、精神、運動、知覚機能を高めることが知られている。薬理学実習ではクレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標とし、コーヒー摂取後の短時間における効果を検討している。そこで過去の実習結果を解析し、カフェインの精神運動亢進作用を評価した。

材料と方法

平成 18～24 年度の歯学部三年生のうち、実習内容に同意し、実習を行った学生 284 名（カフェイン含有コーヒー 148 名、非含有コーヒー 136 名）に対して、コーヒー摂取前後に内田クレペリン検査を行った結果を解析した。検査は二人一組で一名が監督者、もう一名が受検者として交互に行い、一人目が開始してから 7 分 30 秒後に二人目が開始し、検査時間が重ならないようにした（図 1）。作業慣れによる影響を排除するため、第 2 時点の中央値をパーセント回答数 100% とし、第 2 時点と第 3 時点との間にコーヒーを摂取した。

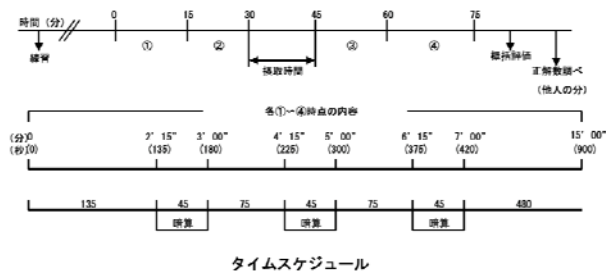


図 1 測定タイムスケジュール

また、平成 19 から平成 24 年度に行われた研究実習に参加した学生 13 名に対して、カフェイン含有コーヒー摂取前後に内田クレペリン検査を行った結果を解析した。学生実習とは異なり、4 から 6 週間、十分に練習を行ってから内田クレペリン検査を行った。

結果と考察

コーヒー摂取前のデータに対してジャック-ベラ検定を行い、有意水準を 5% として正規分布と認められた。そこでパラメトリックな検定が可能であると考えられ、二項目間では t 検定、多項目間ではダネット検定を行った。

第 1、2 時点間に有意な差が認められ、作業慣れが原因と考えられた。そこで、コーヒーを摂取する前の第 2 時点の中央値を 100% 回答数として用いた。カフェイン含有群および非含有群ともに、第 2 時点と第 3 および第 4 時点との間に有意な差は認められなかった。これは、作業の慣れの影響を排除できたと考えられた。また、カフェイン含有群と非含有群とを、第 3 および第 4 時点において比較した結果、有意な差は認められなかった。従って、学生実習においては、カフェインの効果は認められないことが示唆された。

文献的には認められているカフェインの効果が学生実習において認められなかった理由として、被験者の実習に対する態度、すなわち、やる気、意識、および、作業の慣れなどが作業効率に与える影響が大きく、文献的には認められているカフェインの効果が反映されない可能性が示唆された。そこで、過去の研究実習において、カフェインの効果が認められるかどうかを検討した。第 2、第 4 時点間で、カフェインの効果が認められた（図 2）。カフェインの作用発現時間は 15～30 分と報告されており、今回の結果はコーヒー摂取後 15～30 分の第 4 時点に、作用が発現したことと一致した。

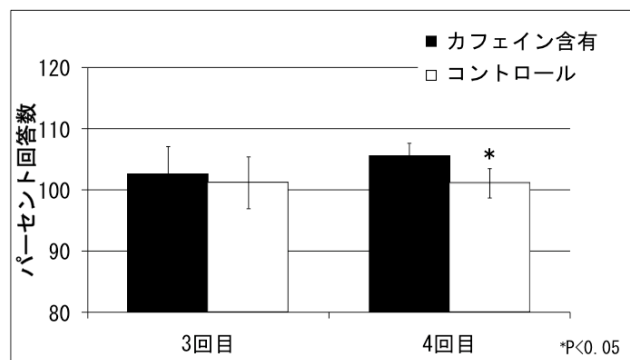


図 2 コーヒー摂取後の結果

これらの結果は、クレペリン検査を用いて精神運動亢進作用を検討する場合、実習に対する態度を高め、十分な練習を行い、慣れによる影響を排除しなければならないことを示唆している。

参考文献

- 1) 田中千賀子、加藤隆一 編集：NEW 薬理学 改訂第 6 版。南江堂、東京、2011。
- 2) 加藤有三、篠田壽 監修：現代歯科薬理学 第 5 版。医歯薬出版社、東京、2012。
- 3) 日本私立薬科大学協会薬理学関連教科検討委員会 編：薬理学実習の実際とデータの見方。南山堂、東京、1999。
- 4) リクルーティング・セミナー 編：内田クレペリン検査。土屋書店、東京、2007。

暗算作業効率に及ぼす各種飲料の効果

43080016 片山 修平

指導教員：吉村 善隆
(細胞分子薬理学教室)

Effect of the drinks on mental
calculation work efficiency

43080016 Shuhei KATAYAMA

Directed by YOSHIMURA, Y.
(Molecular Cell Pharmacology)

キーワード：内田クレペリン検査、暗算作業効率、カフェイン、
ドリンク剤

Keywords：Uchida-Kraepelin Test, Mental calculation work
efficiency, caffeine, drinks

結 言

国家試験に向けて勉強を行う際には、気分転換が重要である。気分転換の際に各種飲料を摂取することが多いが、その効果についての報告はほとんどない。そこで本実験では、クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として、短時間における各種飲料の効果について検討した。

材料と方法

健康な被験者 A および B 二名を、各種飲料の摂取前後に内田クレペリン検査を行った。検査は二人一組で一名が監督者、もう一名が受検者として交互に行い、一人目が開始してから 7 分 30 秒後に二人目が開始し、検査時間が重ならないようにした (図 1)。この摂取前後の暗算作業効率の変化から各種飲料の効果と比較検討した。

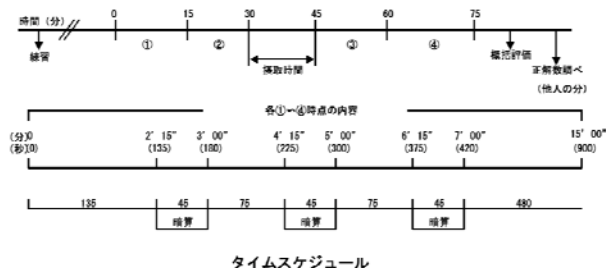


図 1 測定タイムスケジュール

各種飲料として、カフェイン含有のコーヒー(175ml: ティーズコーヒー)、紅茶(175ml: リプトンイエローラベル)、レッドブル(185ml: レッドブル)、リポビタンゴールド(50ml: 大正製薬)、コカコーラゼロ(250ml: コカコーラ)、カフェイン非含有のカプサイシン(唐辛子の力 100ml: ハウス)を用いた。

結果と考察

被験者 A においては、コーヒー(図 2)、レッドブル(図 3)、リポビタンゴールドの第 4 セットで作業効率の向上が認められ、紅茶、カプサイシン、コカコーラゼロにおいて

は認められなかった。

被験者 B においては、コーヒー(図 2)、紅茶以外のカフェイン含有飲料で作業効率の向上が認められ、特に、リポビタンゴールド、コカコーラゼロでは、第 3、第 4 時点で作業効率の向上が認められた。カフェイン非含有のカプサイシンでは認められなかった。

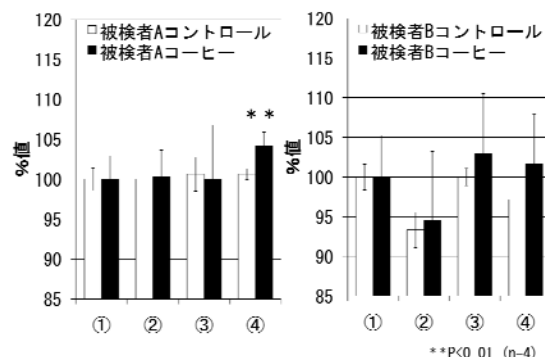


図 2 コーヒー

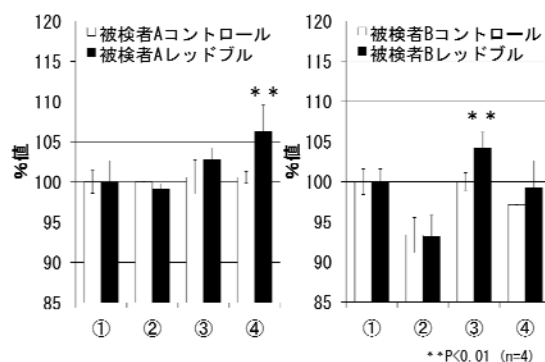


図 3 レッドブル

過去の研究実習の結果、および、被験者 A と B の嗜好から、今回の結果はカフェインによる作業効率の向上とはい切れず、さらに被験者 A、B の好むレッドブルの摂取による気分転換だけでは、十分な時間の作業効率の向上は難しいことが示唆された。

今回の結果は、プラセボを用いた二重盲検試験ではなく、また、被験者も二名であることから一般的な効果を示すことはできないが、国家試験に向けて勉強する際は、劇的に作業効率の上がる飲料は無いと考え、地道に勉強を行う必要があることが示唆された。

参考文献

- 1) 田中千賀子、加藤隆一 編集：NEW 薬理学 改訂第 6 版。南江堂、東京、2011。
- 2) 加藤有三、篠田壽 監修：現代歯科薬理学 第 5 版。医歯薬出版社、東京、2012。
- 3) 日本私立薬科大学協会薬理学関連教科検討委員会 編：薬理学実習の実際とデータの見方。南山堂、東京、1999。
- 4) リクルーティング・セミナー 編：内田クレペリン検査。土屋書店、東京、2007。

エナメル質に対する飲料の影響に関する研究 1

43080017 加藤 亜美

指導教員：出山 義昭/中村 光一

(細胞分子薬理学教室/小児・障害者歯科学教室)

Influence of beverages on enamel caries part1

080017 Ami Kato

Directed by Y.Deyama K.Nakamura

(Molecular Cell Pharmacology/Department of Dentistry

for Children and Disabled Person)

キーワード：飲料、エナメル質、脱灰、

keywords：beverage、enamel、decalcification

緒 言

フッ素は齲蝕予防に効果的であることは広く知られている。日常的に飲用している飲料が歯の齲蝕予防に効果があるのか、それとも悪影響があるのかについて検討した。

材料及び方法

【材料】

試料は2 mm角に切り出したヒト大臼歯を用いた。試料の脱灰には0.2M 乳酸(pH4.0)を用いた。歯牙に作用させるNaF はフルオールゼリー 歯科用 2% ((株)BEE BRAND MEDICO DENTAL)を用いた。

【測定】

試料をそれぞれ各種飲料に4週間浸漬させた後、0.2M 乳酸溶液 (pH4.0) に1時間、37℃で浸漬した。乳酸中に溶出したCa量を、ICP(Inductive Coupled Plasma)を用いて測定した。

結果と考察

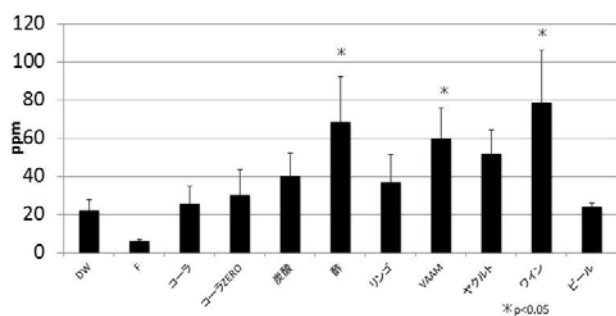


図1 各飲料に4週間浸漬した後に乳酸に1時間浸漬した時のCa溶出量

乳酸に溶出したCa量は、今回用いた飲料では、蒸留水と比較してビール以外のすべての飲料で増加傾向を示し、酢、スポーツ飲料、ワインで有意に増加した(図1)。

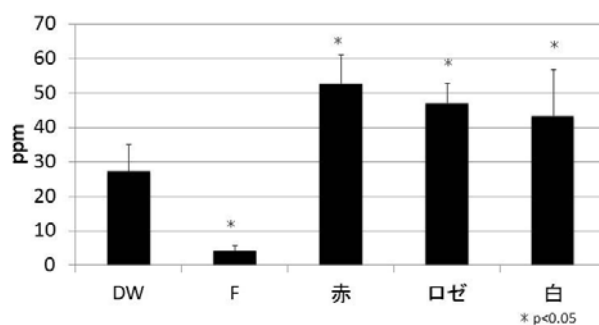


図2 フッ素ならびに各種ワインに4週間浸漬後乳酸に溶出したCa量

Ca溶出量の有意な増加が認められた飲料のうち、ワインについて種類別に調べた。その結果、乳酸中に溶出したCa量は、赤、白およびロゼでは有意差は認められなかった(図2)。

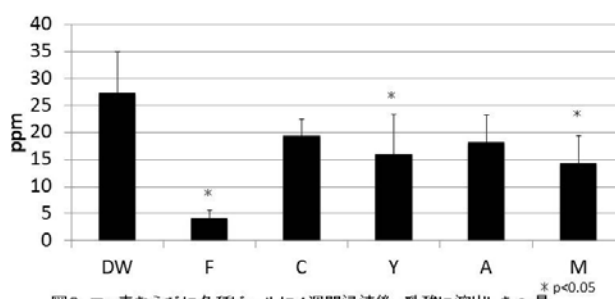


図3 フッ素ならびに各種ビールに4週間浸漬後、乳酸に溶出したCa量

ビールは蒸留水と比較して乳酸中へのCa溶出量が同程度であったので、銘柄による相違を調べた。その結果、銘柄によらずすべてのビールで有意差は認められなかった。

本研究においてビールに浸漬しても乳酸中のCa溶出量に変化は認められなかった。ビールにはフッ素が含まれており、フッ素により耐酸性が向上した可能性が推測される。

結 論

ビールは、含有するフッ素により歯の耐酸性を向上させ、脱灰を抑制する可能性があり、一方、ワインは歯の耐酸性を低下させることが示唆された。

参 考 文 献

好川 正、川崎 浩二、飯島 洋一、高木 興氏：エナメル質の脱灰におよぼす0.1M乳酸のpHならびに作用時間の影響、口腔衛生学会雑誌, 40:671-677(1990)

緒 言

日常的に飲用している飲料は歯の耐酸性に影響を及ぼすことが報告されているが、どの成分が歯質に影響を及ぼすのかは不明である。本研究では酒類に含有するエタノールと糖によるエナメル質の脱灰に対する影響について検討した。

材料及び方法

【材料】

ヒト大白歯を用い、5～15%のエタノールあるいは砂糖水を歯牙に作用させた。試料の脱灰には0.2M 乳酸(pH4.0)を用いた。

【脱灰と測定】

試料を各種濃度のエタノールあるいは砂糖水に4週間浸漬させた後に乳酸に1時間浸漬させた。各種溶液中ならびに乳酸に溶出したCa量をICP(Inductive Coupled Plasma)で測定し、各試料の耐酸性について比較検討をした。

結果と考察

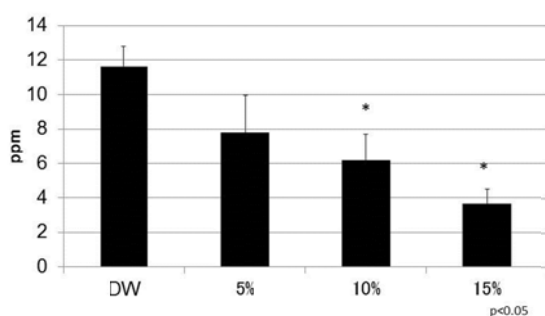


図1 エタノールに4週間浸漬、エタノール中に溶出したCa量

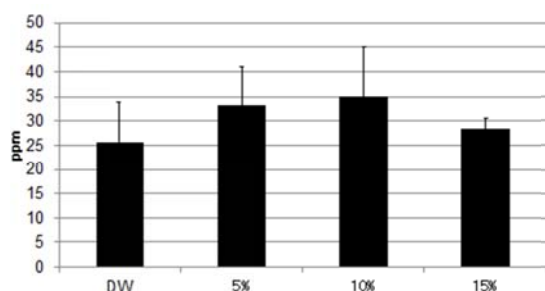


図2 エタノールに4週間浸漬した後、乳酸に溶出したCa量

浸漬したエタノール中に溶出されたCa量はエタノールの濃度が高くなるにつれて低下した。(図1)エタノールに浸漬した後に乳酸中に溶出したCa量は、10%までは濃度依存的に増加し、15%では低下傾向を示した。(図2)

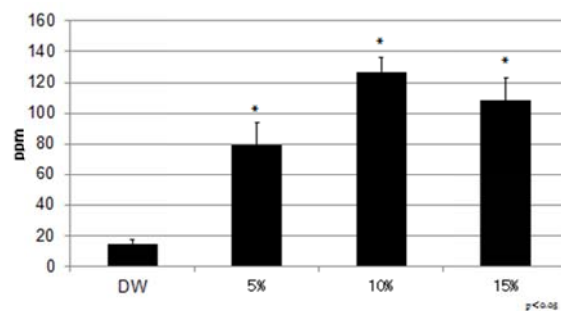


図3 砂糖水に4週間浸漬、砂糖水中に溶出したCa量

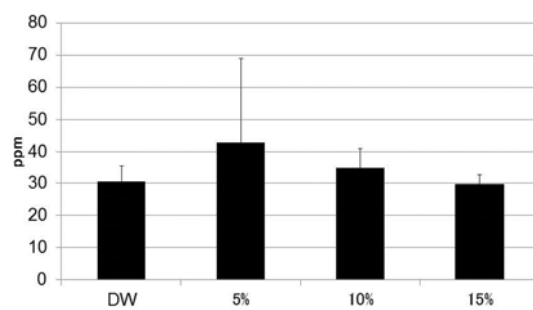


図4 砂糖水に4週間浸漬した後、乳酸に溶出したCa量

浸漬した砂糖水中に溶出したCa量は10%までは濃度依存的に増加し、15%では低下した(図3)。砂糖水に浸漬した後に、乳酸中に溶出したCa量は砂糖の濃度による有意な増加は認められなかったが、15%においては対照群である蒸留水とは同程度になった(図4)。

以上の結果は、歯に*S.mutans*が残存しており、砂糖水では砂糖を基質とした酸の産生、エタノールではその消毒作用により、起きた可能性が考えられる。また、高濃度の砂糖による溶出Ca量の低下は、浸透圧によって*S.mutans*への影響が生じたと推測される。

結 論

歯質維持の観点からも飲酒に際してその糖度に注意すべきであることが明らかになった。

参 考 文 献

好川 正、川崎 浩二、飯島 洋一、高木 興氏:エナメル質の脱灰におよぼす0.1M 乳酸のpHならびに作用時間の影響, 口腔衛生学会雑誌, 40:671-677(1990)

低価格線量計を用いた放射線量の測定(1)

43080045 波多野 貴一

指導教員：西方 眞

(細胞分子薬理学・学術支援部)

Radiation Measurement with Low Cost Dosimeter (1)

43080045 Kiichi HATANO

Directed by NISHIKATA, M

(Molecular Cell Pharmacology / Support Section for
Education and Research)

キーワード：線量計、放射線

Keywords: Dosimeter, Radiation Measurement

【目的】

福島第一原発の事故をきっかけとし、自ら線量計を入手して環境の放射線量を測定する個人が増えている。本研究では、個人が比較的入手しやすい低価格の線量計でも正確に放射線量を測定できるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】

低価格線量計として、2012年発売のエステー株式会社のアエカウンターEX(定価19,800円)を用いた。この線量計の測定値が正しいかどうか確かめるために、校正済みの線量計(アロカ日立メディカル株式会社 シンチレーションサーベイメータ TCS-161、定価588,000円)の値(真の値とした)と比較した。両線量計とも放射線測定原理はシンチレーション方式であり、放射線量は外部被ばく線量($\mu\text{Sv/h}$)として表示される。

性能を確かめる際の線源としてラジウム226とトリウム232の密封線源を用いた。環境には α 線、 β 線、 γ 線が存在するが、 α 線と β 線は皮膚を完全には通過しない。更に皮膚は放射線に対する感受性が他の臓器と比べ非常に低いので、外部被ばくを評価するためには透過性の高い γ 線のみを測定することが要求される。アエカウンターEXがこの条件を満たしているかは、線源と線量計の間に γ 線のみが透過できる厚さ2mmのアルミニウム板を置き測定を行った。

【結果と考察】

密封線源からの放射線量をアエカウンターEXとTCS-161で測定し値を比較した。アルミニウム板による遮蔽の効果にも注目して調べた(表1)。

アエカウンターの値はアルミニウム板によって値が変わらなかった。このことは、アエカウンターがガンマ線の

みを検出していることを意味する。勿論、TCS-161でも同じ結論が得られた。アエカウンターとTCS-161で測定値を同じ条件下で比べてみると、両者において違いはほとんど無かった。このことは、アエカウンターの値は真の値に極めて近く、信頼できるものと考えられる。

線源	遮蔽	アエカウンター	TCS-161
^{226}Ra	なし	0.44~0.46	0.45~0.47
	あり	0.44~0.46	0.45~0.47
^{232}Th	なし	0.64~0.68	0.63~0.64
	あり	0.62~0.67	0.59~0.60

表1 エアカウンターとTCS-161の測定値の比較

アエカウンターを用いて札幌及び周辺地域の各所の放射線量を測定した。本線量計の検出限界である $0.01\mu\text{Sv/h}$ から高いところでは $0.18\mu\text{Sv/h}$ まで、場所により大きな違いがみられた。比較的高い値である $0.08\mu\text{Sv/h}$ 以上の場所にはほぼ例外なく花崗岩が床材などに使用されていた。最も高い値であった $0.18\mu\text{Sv/h}$ は北海道大学理学部1階入り口付近で得られたが、床材として茶色の花崗岩が使用されていた。花崗岩に含まれる放射性同位元素については、阿部が研究実習中に明らかにした¹⁾。水による遮蔽を受ける川や池の上では検出限界である $0.01\mu\text{Sv/h}$ と特に値が低かった。一般的な建物内部では、花崗岩の影響がなければ $0.04\sim 0.06\mu\text{Sv/h}$ であった。

JR列車内(札幌から新千歳空港)と地下鉄車両内(北12条から真駒内)でも測定を行った。新千歳空港手前で列車が地下に入る際に値が大きく上昇した。地下鉄南平岸駅手前で車両が地上に出る際に値が減少した。地下では、地下の岩石から出る放射線の影響があることがわかった。

【結語】

今回使用した低価格線量計はガンマ線のみを検出し、被ばく線量として測定した値は真の値に非常に近かった。小型の線量計でもあるので容易に持ち運びしながら環境の放射線量を測定するのに適していると考えられる。

【文献】

- 1) 阿部圭吾：研究実習論文報告集[第7号], 97-98 (2006)

低価格線量計を用いた放射線量の測定(2)

43040051 森 義倫

指導教員：西方 眞

(細胞分子薬理学・学術支援部)

Radiation Measurement with Low Cost Dosimeter (2)

43040051 Yoshitomo MORI

Directed by NISHIKATA, M.

(Molecular Cell Pharmacology / Support Section for
Education and Research)

キーワード：線量計、放射線

keywords：Dosimeter, Radiation Measurement

【諸言】

福島第一原発の事故をきっかけとして、自ら線量計を入手して環境の放射線量を測定する個人が増えている。そこで、本研究では個人が比較的入手しやすい低価格の線量計のひとつを用いて、色々な場所や物の放射線量を測定した。また、本研究の測定は主に広島市内を中心として行った。広島市は原子爆弾が投下された歴史を持ち、この時放出された放射性物質が現在も残存し、放射線を出し続けているのかということを調べることを目的としたのである。

【材料と方法】

低価格線量計として、外部被ばく線量を比較的正确に測定できるエアーカウンターEX (エステー株式会社、定価 19,800 円) を用いた。この線量計は波多野の研究¹⁾により、放射線量を正しく測定できることが確かめられている。また、手の平に乗るサイズで色々なところに持ち運ぶことができるため、この線量計を採用した。放射線量は、外部被ばく線量 ($\mu\text{Sv/h}$, マイクロシーベルト毎時) として測定した。本線量計の検出限界は $0.01 \mu\text{Sv/h}$ である。

【結果】

1) 飛行機内での測定

新千歳空港から広島空港まで機内で放射線量を測定した。離陸して高度が増すに従って放射線量が増え、着陸体勢に入ると低下した (図1)。上空の線量が高いところでは地上の20倍程度だった。滑走路上の $0.01 \sim 0.02 \mu\text{Sv/h}$ に対し、高度 12,000m では $0.3 \mu\text{Sv/h}$ 前後であった。

2) 広島市内での測定

原爆ドームを囲む柵から線量計をドームに向けて測ると $0.07 \mu\text{Sv/h}$ だった。付近の噴水上では $0.04 \mu\text{Sv/h}$ 、付近の花崗岩と思われる石畳上では $0.09 \sim 0.11 \mu\text{Sv/h}$ だった。花崗岩でできた橋の欄干上では $0.12 \mu\text{Sv/h}$ だった。

原爆資料館内の展示品を測定した結果、最も高い計測値は「人影の石」で $0.13 \mu\text{Sv/h}$ だった。他の展示物からは $0.05 \sim 0.09 \mu\text{Sv/h}$ の測定値が得られた。

広島市の地下街では $0.06 \sim 0.1 \mu\text{Sv/h}$ 、繁華街では $0.07 \sim 0.1 \mu\text{Sv/h}$ 、原爆ドーム付近の百貨店内では $0.05 \sim 0.06 \mu\text{Sv/h}$ だった。

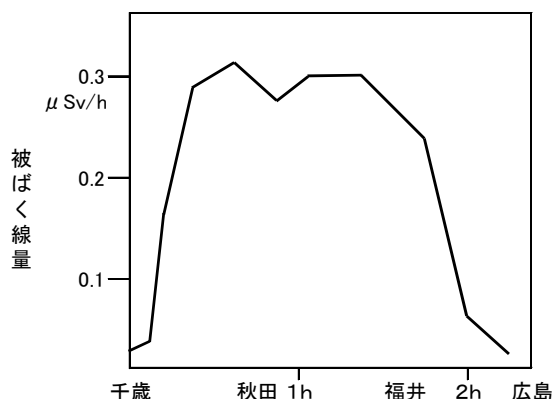


図1 航空機内での測定

【考察】

航空機内で測定した際、高度が増すにしたがって放射線量が増加したが、上空では、宇宙線由来のベータ線、ガンマ線、中性子線、素粒子などが飛び交っており、その影響と思われる。

広島市内での測定では、原爆ドーム付近の値、原爆資料館の展示品の値、広島市中心街の値を比較しても、特に大きな違いは見られなかった。そして、その測定値は札幌での測定値¹⁾と比較しても大差ないものであった。原爆資料館展示品の「人影の石」は $0.13 \mu\text{Sv/h}$ とやや高い値が得られたが、これはこの石に含まれる花崗岩の影響と考えられる。その他でも $0.10 \mu\text{Sv/h}$ を超えるやや高い値が得られた場所は近くに花崗岩と思われる石が存在する場所であった。よって、現在の広島においては、原爆の残留放射能の影響はほとんどないものといえる。

広島に投下された原爆には50kgのウラン235が搭載されており、そのうち800gのウラン235が核分裂を起こしたと言われている。ウラン235が核分裂して新たに生じた放射性核種や核分裂しないが残ったウラン235がどこへ行ったのかは以下のように考えられている。原爆が上空600mで爆発した瞬間、中心温度100万℃を超える火球が生じ、これにより爆心地付近の空気は一気に膨張し、数秒後に火球が消えると、爆心地付近は一瞬真空状態となり、今度は周りの空気その真空地帯に逆流し、強烈な上昇気流となってキノコ雲を形成した。原爆で生じた放射性物質はこの上昇気流によって成層圏近くまで上昇し、そこで拡散したと考えられる。そのため、地上にはあまり降ってこなかったとされている。

【文献】

1) 波多野貴一：研究実習論文報告集 [第14号] (2013) 準備中