

北海道大学歯学部 43 期生研究実習の概要

研究実習実施期間：平成 25 年 9 月～平成 26 年 8 月
(5 年次 2 学期～6 年次 1 学期)

研究実習発表会：平成 26 年 6 月 16 日(月)13:00～16:40
20 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)

平成 25 年 9 月～26 年 3 月

横山 敦郎(口腔機能補綴学教室)

平成 26 年 4 月～

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)

吉村善隆 (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		1-9
下顎体領域前方部メッケル軟骨の軟骨内骨化様式による消失範囲について		
080047	樋口 ゆみ	(指導教員 井上貴一郎)
口蓋神経の走行に関する解剖学的研究		
090006	今多 将	(指導教員 土門卓文)
下顎体領域後半部の骨化様式について		
090014	影近 史也	(指導教員 井上貴一郎)
顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究		
090025	小谷地 雅秀	(指導教員 土門卓文)
ホルマリンへ試料を浸漬するまでの放置時間が組織標本へ与える影響		
090030	竹 渕 壘	(指導教員 高橋 茂)
顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究		
090048	堀 江 恵	(指導教員 土門卓文)
舌神経に関する形態学的研究		
090057	柳 あさこ	(指導教員 土門卓文)
口腔生理学		10-15
手指の巧緻運動に対して作業前のタスクが与える影響について		
090004	井手 健太郎	(指導教員 船橋 誠・平井喜幸)
舌と硬口蓋刺激により誘発される 20Hz 帯域の律動性脳活動の舌運動による変調		
090010	大西 香織	(指導教員 前澤仁志・船橋 誠)
脂肪酸の味覚閾値とBMI の関連性		
090033	玉野 真里果	(指導教員 船橋 誠)
食物の色による味覚閾値の変化		
090035	槌本 愛巳	(指導教員 船橋 誠)
ベンチプレス時における大胸筋活動に対する下顎位の影響		
090043	平井 慎之介	(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

16-22

継代培養骨髄間質細胞におけるサイトカインの効果 II

080044 橋本比呂志 (指導教員 滝田裕子)

過酸化水素を産生する殺菌性レジンの特徴

090019 木下裕貴 (指導教員 水野守道)

過酸化水素を産生する殺菌性レジンの殺菌活性

090022 蔵野弘基 (指導教員 水野守道)

継代培養骨髄間質細胞におけるサイトカインの効果 I

090026 齋藤大嗣 (指導教員 滝田裕子)

Is the bone the second brain?

090028 志波智樹 (指導教員 田村正人・佐藤真理)

アメロジェニンの遺伝子配列の相同領域とマイクロ RNA について

090058 山内美智子 (指導教員 藤沢隆一)

アメロジェニンのプロモーター内における転写因子結合領域について

090060 余冠楠 (指導教員 藤沢隆一)

口腔解剖学第二

23-28

下顎中切歯と側切歯の根管形態について

090003 有田恵利奈 (指導教員 山本恒之)

下顎中切歯・側切歯の側枝と根尖分岐について

090011 岡崎史枝 (指導教員 山本恒之)

下顎犬歯の根管形態について

090020 木村萌美 (指導教員 山本恒之)

上顎第二大臼歯の近心頬側根の根管形態について

090021 木村雄太郎 (指導教員 山本恒之)

上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について

090034 千葉彩乃 (指導教員 山本恒之)

上顎第二小臼歯の根管形態について

090041 浜谷絵里 (指導教員 山本恒之)

歯根吸収抑制のための水酸化カルシウムの象牙質内拡散評価

090039 西澤 秀一 (指導教員 八若 保孝、赤坂 司)

高分子接着剤と非貴金属との直接接着に与える大気圧低温プラズマ照射の効果

090053 宮西 華子 (指導教員 山方 秀一)

SEM-EDS を用いたガラスアイオノマーセメントのフッ素徐放挙動の観察

090054 武藤 和子 (指導教員 阿部 薫明)

コラーゲンでできたマイクロ・ナノパターンの作製とその細胞接着性

090055 森 祐貴 (指導教員 赤坂 司)

石膏への硬化調整剤添加による結晶形状変化の観察

090059 ユウ カ (指導教員 赤坂 司)

< 口腔病態学講座 >

アデノウイルス感染細胞での HuR の発現

090015 加藤 郁子 (指導教員 東野史裕)

アデノウイルス感染細胞での pp32 の発現 II

090016 加藤 泰史 (指導教員 東野史裕)

アデノウイルス感染細胞での pp32 の発現 I

090042 林 葉子 (指導教員 東野史裕)

アデノウイルス感染細胞での pp32r1 の発現

090052 水谷 友美 (指導教員 東野史裕)

腫瘍血管内皮マーカー Biglycan の発現制御システムに関する検討

090056 安永 賢史 (指導教員 間石奈湖、樋田京子、進藤正信)

放射線照射による“マイとファジー誘導”とその遺伝子変化について

090007 梅津 幹也 (指導教員 安田元昭)

Candida albicans によるマクロファージと樹状細胞への IL-1 β 産生誘導メカニズムの違い

090012 尾崎 公哉 (指導教員 長谷部 晃)

Candida albicans によるマクロファージ/樹状細胞への IL-1 β 産生誘導について

090023 小池 和茂 (指導教員 長谷部 晃)

放射線照射によるミトコンドリア数の変化

090039 堂前翔史 (指導教員 安田元昭)

Streptococcus sanguinis 菌体による NLRP3 インフラマゾームの活性化

090040 長谷川裕規 (指導教員 柴田健一郎、佐伯歩)

Mycoplasma salivarium によるインフラマゾームの活性化

090049 前川翠 (指導教員 柴田健一郎、佐伯歩)

歯科薬理学

52-59

薬学系論文の翻訳

080046 早坂博喜 (指導教員 鈴木邦明)

エナメル質に対するキシリトールの影響に関する研究

090013 小田若菜 (指導教員 出山義昭、中村光一)

エナメル質に対するリン酸オリゴ糖カルシウムに関する研究

090018 岸宏美 (指導教員 出山義昭、中村光一)

線量計の作製と自動計測

090029 高橋弘祥 (指導教員 西方眞)

暗算作業効率に及ぼすドリンク剤の効果

090032 玉木宏典 (指導教員 吉村善隆)

アルカリ性ホスファターゼの酵素活性の性質と解析の一例

090036 寺崎恵美 (指導教員 鈴木邦明)

暗算作業効率に及ぼすカフェインの影響

090046 古田誉之 (指導教員 吉村善隆)

下顎体領域前方部メッケル軟骨の軟骨内骨化様式による消失範囲について

43080047 樋口 ゆみ

指導教員:井上貴一朗(口腔機能解剖学教室)

キーワード: メッケル軟骨、軟骨内骨化

緒言

第1鰓弓軟骨であるメッケル軟骨は、後半部分では蝶下顎靭帯および耳小骨となるが、前半部分ではメッケル軟骨の外側に膜内骨化によって下顎骨体部が形成され、その骨に包囲されメッケル軟骨は消失骨化するとされている¹⁾。このような下顎体領域メッケル軟骨前方部では、軟骨内骨化に準ずる様式で消失骨化すると考えられているが、その範囲は明確になっていない。そこで前方部メッケル軟骨の軟骨内骨化様式により吸収消失する範囲(後方位置)を明らかにすることを目的に検討を行った。

方法

材料として、胎生 14、16、18 日、生後 0、2 日のマウスを用い、組織学的、免疫組織化学的に検討を行った。試料作製は、屠殺 1 時間前に BrdU (プロモデオキシウリジン) を腹腔内投与 (2.5 μ g/100g) し、胎生 14、16 日は 4% パラホルムアルデヒドにて浸漬固定、胎生 18 日、生後 0、2 日は灌流固定した後、通常に従いパラフィン・ブロックを作製し、5 μ m で薄切した。

染色は、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE)、破骨細胞の局在を知るために TRAP 染色 (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ)、基質のプロテオグリカンを染めるためにアルシアンブルーおよびトリジンブルー染色、石灰化基質の染色に Von Kossa 染色、細胞分裂活性を知るために BrdU 染色、そして軟骨内骨化のマーカーである X 型コラーゲン染色を行った。

結果

胎生 14 日 (E14) では、メッケル軟骨は全体に一樣な硝子軟骨様組織 (図 1-a,b) で、ややバラツキが認められるが全体的に軟骨細胞の分裂活性が確認できる (図 1-c)。この段階ではメッケル軟骨の消失は、連続切片において確認したところ認められなかった。

E16 になると、前方部分で細胞分裂停止と肥大分化、X 型コラーゲン産生、基質石灰化、軟骨膜断裂と破骨細胞が確認でき (図 2-a-c)、軟骨内骨化様の吸収が始まっていると考えられる。しかし基質のアルシアンブルー染色性に変化は認められなかった。(図 2-d)。

E18 では、メッケル軟骨はオトガイ孔付近 (下顎臼歯槽骨部の前端) まで消失し、メッケル軟骨の前端と下顎切歯根尖が向い合う状態になっている (図 3-a,b)。メッケル軟骨前端部では基質が石灰化し、X 型コラーゲンは石灰化部位の後方まで分泌されており (図 3-c,d)、メッケル軟骨の吸収はさらに後方まで進行すると考えられる。また基質中のプロテオグリカン量には、この段階でも大きな変化はみられない (図 3-d)。

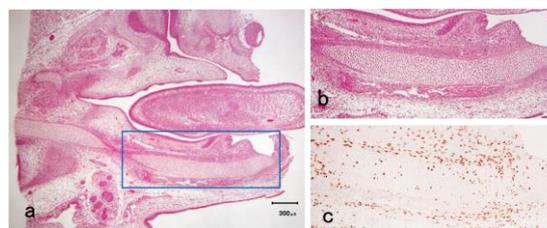


図 1 胎生 14 日
a,b:HE 染色、c:BrdU 染色

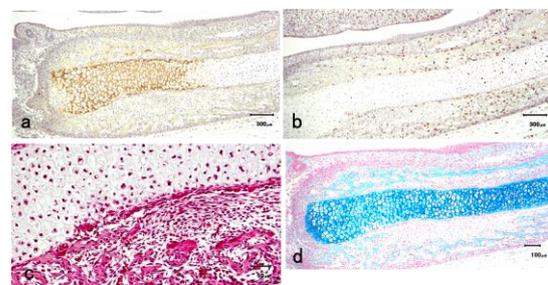


図 2 胎生 16 日
a:X 型コラーゲン、b:BrdU 染色、c:HE 染色、メッケル軟骨下縁に破骨細胞を確認できる、d:アルシアンブルー染色

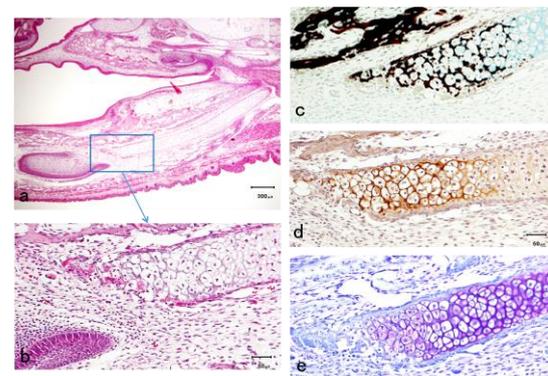


図 3 胎生 18 日
a,b:HE 染色、c:Von Kossa 染色、d:X 型コラーゲン、e:トリジンブルー染色

生後 0 日 (P0) では、メッケル軟骨の吸収が下顎第 1 臼歯歯胚まで進行していた (図 4-a,b)。この段階でも X 型コラーゲンが確認でき、その分泌範囲から、吸収は少しだけ後方に進行すると思われ、前端部にはまだ多数の破骨細胞が認められる (d,e)。また P0 でも基質のプロテオグリカン量には変化が認められない (c)。

P2 におけるメッケル軟骨の先端は下顎第 1 臼歯歯胚中央直下 (図 5-a,b) で、メッケル軟骨には破骨細胞 (d)、X 型コラーゲンは確認できなかった。したがって前方部で認められた軟骨内骨化様の吸収は、下顎第

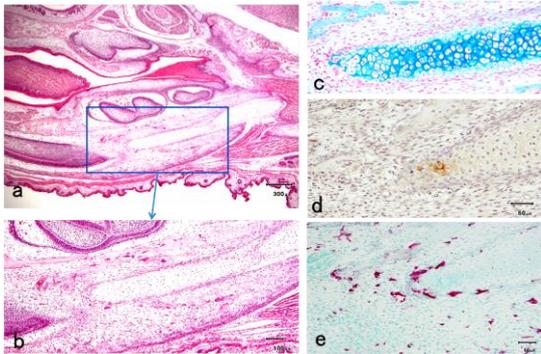


図4 生後0日

a, b: HE 染色, c: アルシアンブルー染色, d: X型コラーゲン、e: TRAP 染色

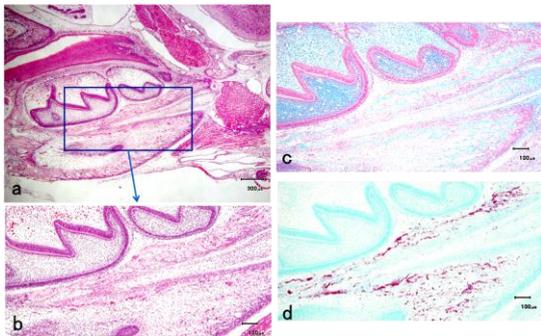


図5 生後2日

a, b: HE 染色, c: アルシアンブルー染色, d: TRAP 染色

1臼歯歯胚中央直下で終了していると考えられる。また、図5-cのようにメッケル軟骨基質はアルシアンブルー染色性を失っており、基質内のプロテオグリカンが分解・消失していると考えられる。

考察

下顎体領域のメッケル軟骨は、マウスでは吻側の一部(下顎間軟骨結合)を残し消失したように見えるため、非石灰化軟骨であると広く認識されていたが、1953年 Bhaskarら²⁾によってオトガイ孔より前方では軟骨内骨化に準ずる様式で消失することが発見され、1999年 Ishizekiら³⁾はオトガイ孔より後方のメッケル軟骨後方も軟骨内骨化と考えられると報告した。しかし同じ後方部と表現される部位のメッケル軟骨に関して、アポトーシスによる分解、プロテアーゼ等による溶解、マクロファージ等による貪食、線維芽細胞等への形質転換など様々な報告がなされおり、下顎体領域後方部の消失様式は統一見解に至っていない。

そこで本研究では、どの位置から後方部とすべきかを考える上で、まず前方の軟骨内骨化様の吸収範囲を特定することが必要と考え検討を行っている。

下顎体領域前方部メッケル軟骨が軟骨内骨化によって消失するかについて検証すると、Bhaskarら²⁾と同様に本研究においてもE16の段階(図2)でメッケル軟骨細胞の分裂停止、肥大軟骨細胞への分化、X型コラーゲンの分泌、破骨細胞の侵入など軟骨内骨化様の特徴が認められ軟骨内骨化に準ずる様式と考えられる。そして軟骨内骨化によって、E18では大きくメッケル軟骨の消失が進行し、その前端の位置はほぼオト

ガイ孔付近であった。その前端部ではX型コラーゲンの分泌、基質の石灰化など、さらに後方まで軟骨内骨化が進行すると考えられ状態が確認され、Ishizekiら³⁾の報告のようにオトガイ孔の後方も軟骨内骨化と考えられる。

しかしE18で見られるようにマウスの場合、切歯成長の影響を受けるため、軟骨内骨化によってメッケル軟骨が下顎骨に置換されるのではなく、軟骨内骨化様の様式で吸収消失している状態のように思われる。しかし歯根がメッケルの下方に移動する出生直後(図4)に形成された部分では置換骨と考えられる部位が確認できる。またヒトでも下顎体領域のメッケル軟骨は軟骨内骨化するとの報告⁴⁾があり、下顎切歯の成長とメッケル軟骨の前方部の軟骨内骨化との関係に関する結論は、後の研究成果を待つ必要がある。

生後になると、P0の段階で切歯歯根がさらに下方に移動し、メッケル軟骨の最前方部(下顎第1臼歯歯胚前方直下)に僅かにX型コラーゲンが確認できる程度となり、P2の段階では軟骨内骨化様の吸収は確認できなくなる。またP0まで基質内に認められたプロテオグリカンが、P2では染色性を失いプロテアーゼ等により基質が分解されたと考えられることや、基質への破骨細胞の侵入が認められなくなるなど、これより後方では軟骨内骨化と異なる消失様式と思われる。

これらのことから下顎体領域前方部の軟骨内骨化の後方範囲は下顎第1臼歯歯胚中央直下と考えられる。

参考文献

- 1) 頭蓋顔面の発生学、後藤仁敏、140-144、(1976)、書林、東京
- 2) Bhaskar S, Weeinmann J et al., Role of Meckel's cartilage in the development and growth of the rat Mandible, J Dent Res 32, 398-410. (1953)
- 3) Ishizeki K, Saitoh H et al., Histochemical and immunohistochemical analysis of the mechanism of calcification of Meckel's cartilage during mandible development in rodents. J Anat 194, 265-77, 1999
- 4) Richany S, Bast T, et al., The development of the first branchial arch in man and the fate of Meckel's cartilage. Quarterly Bulletin of the Northwestern University Medical School 30, 331-355, (1956)

口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

43090006 今多 将

指導教員：土門卓文（口腔機能解剖学）

キーワード：大口蓋神経、口蓋棘

緒言

口蓋領域は歯科臨床において義歯作成・調整等で日常診療の対象となる部位であり、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正確な解剖学的知識が求められる部位である。国島¹⁾は大口蓋神経の走行を4つに分類し、それらの出現頻度について報告している。この報告例をもとに中富²⁾は解剖体2体を、ジョン³⁾は解剖体4体を用いて大口蓋神経の走行について剖出・観察を行っている。しかしながら、これら観察数は決して十分なものではない。今回、著者は解剖体6体の左・右側12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6体解剖体6体（男性73、82、86歳、女性77、84、93歳、左・右側、計12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、硬口蓋を前走する際に、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、大口蓋神経の走行を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。

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。この要因の1つとして観察数が12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については記載している書籍

は少なく、本邦では脇田・山下⁴⁾の「口腔解剖学」においてその記載がされている。しかしながら、この中でもその意義については記載がなく、口蓋棘に関しては不明な点が多い。口蓋棘は大口蓋神経が通る骨口蓋の口蓋溝に連続して上顎骨表面で棘状または稜状に隆起した形態を呈し、この溝の間を大口蓋神経が走行している。このような形態では神経の両側が骨壁で保護された形になっている。これは上顎骨の眼窩下溝・管、下顎骨の下顎管に類似する形態であることから、口蓋棘が咀嚼による外力から大口蓋神経を保護し、神経への障害を防ぐ役割をもつものと推測される。

参考文献

- 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) ジョン ミギョン. 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42期生（平成24/25年度）研究実習論文報告集 14 : 4-5, 2014
- 4) 脇田 稔、山下靖雄 監修. 口腔解剖学、医歯薬出版、2009.

下顎体領域後半部の骨化様式について

43009014 影近 史也

指導教員:井上貴一郎(口腔機能解剖学教室)

キーワード:メッケル軟骨、膜内骨化、

トランスフォーメーション(形質転換)

緒言

下顎体領域のメッケル軟骨は胎生期に出現する第一鰓弓由来の軟骨¹⁾で下顎骨の形成とともに前方から後方に向かって消失・骨化する。また前半部と後半部で骨化様式が異なり、前半部では軟骨内骨化と考えられる²⁾が、後半部ではそれとは異なるとされながらも統一見解には至っていない。そこで下顎体領域後半部メッケル軟骨の消失骨化様式を明らかにすることを目的とした。

方法

材料として、メッケル軟骨の後方部分が残存する生後2日のマウスを用いた。光学顕微鏡試料は、屠殺 1 時間前に BrdU (プロモデオキシウリジン)を腹腔内投与(2.5 μ g/100g)し、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、通法に従いパラフィン・ブロックを作製、5 μ m で薄切した。細胞分裂活性を見るために BrdU 染色、アポトーシスを起こしている細胞を確認するためにカスパーゼ3染色を行った。電子顕微鏡試料はカルノフスキー液にて灌流固定後、通法に従い試料作製し、メッケル軟骨の構造が残る後方(図1の④)から前方(①)の骨化している部分までを、70nm で超薄切し透過型電子顕微鏡にて観察した。

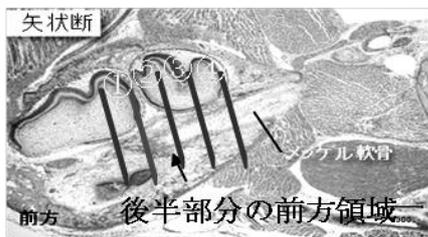


図1 メッケル軟骨切断部位

結果

a. 光学顕微鏡所見

下顎体領域後半部メッケル軟骨における細胞分裂活性(BrdU)は軟骨膜細胞に僅かに認められる程度(図2-左図)で、アポトーシス(カスパーゼ3)による細胞数の減少は全体にはほとんど確認できない(図2-右図)が、基質が完全消失する直前の位置のみに複数の軟骨細胞のアポトーシスが認められた。

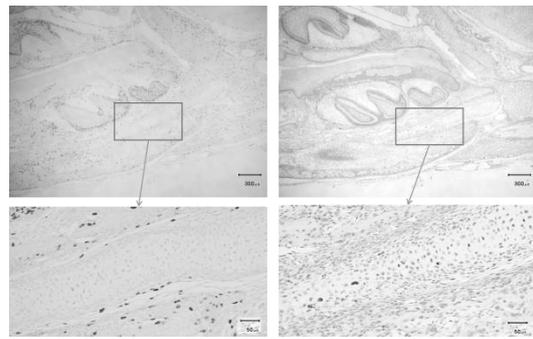


図2 左図:BrdU 染色 右図:カスパーゼ3染色

b. 電子顕微鏡所見

後方部(図1-④の位置)において、メッケル軟骨細胞は明瞭な核を持ち、小胞体などの小器官の割合が少なく、細胞質内は分泌物と思われる物質で満たされていた。また軟骨膜細胞は扁平な形状で、細胞質は細胞小器官で満たされており、分泌物は認められないなど、最も基本的なメッケル軟骨の構造を留めていた(図3)。

少し前方(図1-③の位置)では、軟骨細胞は小器官の割合が後方の④の位置に比べ増加し、基質は線維構造が疎となり消失し始めていると考えられる(図4)。

より前方(図1-②の位置)では、軟骨細胞は小器官の割合がさらに増加し、また軟骨膜細胞は極端な扁平からやや楕円形に変化している。そして軟骨細胞は周囲に突起を伸ばしているような、間葉系細胞様細胞に形質転換(トランスフォーメーション)していると考えられる。しかし軟骨膜細胞層と思われる部位には血管および破骨細胞の侵入は認められない(図5)。

さらに前方の基質がほとんど失われた骨化位置近傍の部位(図6)では、軟骨細胞も軟骨膜細胞も間葉系細胞様の形態に変化し、小器官の割合がさらに増加し多数の突起が認められる。またここでも血管および破骨細胞の侵入は認めなかった。またこの部位では、骨芽細胞様細胞の特徴を示す細胞も認められた。

メッケル軟骨最先端部位(図1-①の位置)では、基質は痕跡程度まで消失し、軟骨細胞と軟骨膜細胞はトランスフォーメーションし骨芽細胞になり骨形成を行っていることが確認できる。

考察

下顎体領域後半部メッケル軟骨において、変化の進行とともに基質は徐々に疎となり骨化位置

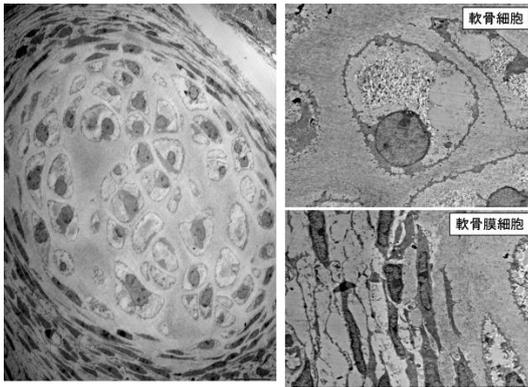


図3 ④の位置 後方部
左図 ×500 、右図 ×3000

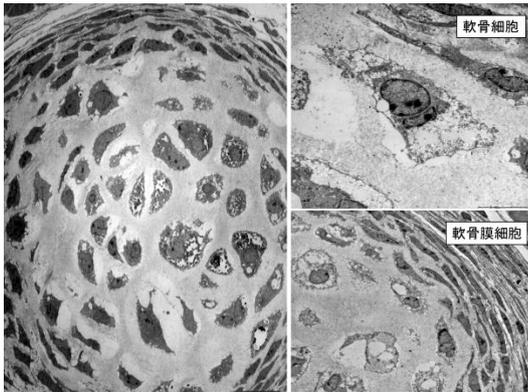


図4 ③の位置 ④より少し前方の位置
左図 ×500 、右図 ×3000

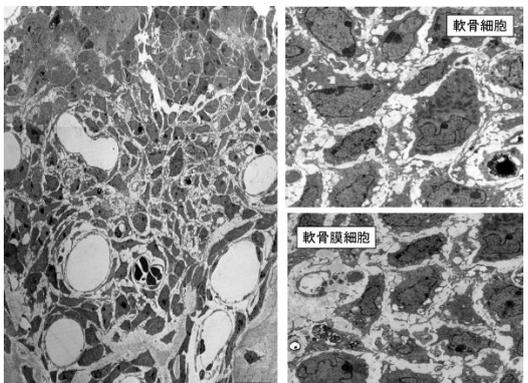


図5 ②の位置 骨形成部位に近い位置
左図 ×1000 、右図 ×4000

では完全に消失するが、その消失過程の細胞数を見ると、軟骨膜での細胞分裂による増加と、軟骨細胞と軟骨膜細胞のアポトーシスによる減少数は同程度であり、メッケル軟骨における細胞数にはほとんど変化がないと考えられる。また血管および破骨細胞等は骨形成している直前の位置まで侵入は認められない。そのためメッケル軟骨細胞と軟骨膜細胞が骨形成に関与している可能性が考えられる。電顕所見では、メッケル軟骨細胞・軟骨膜細胞は徐々にトランスフォーメーションによって脱分化したと考えられる間葉系細胞様細胞への変化を起こし、最終的に再分化により骨芽細胞にトランスフォーメーションし骨形成を行っていると考えられる。このようなメッケル軟骨の変化について、下顎体領域より後方の蝶下顎靭帯となる部位での報告³⁾では、メッケル軟骨細胞が繊維芽細胞にト

ランスフォーメーションすると述べられており、メッケル軟骨が神経堤由来であることを考え合わせると、メッケル軟骨が下顎体の骨となる部位では、メッケル軟骨の細胞が骨芽細胞に変化し骨形成を行っている可能性は十分にある。

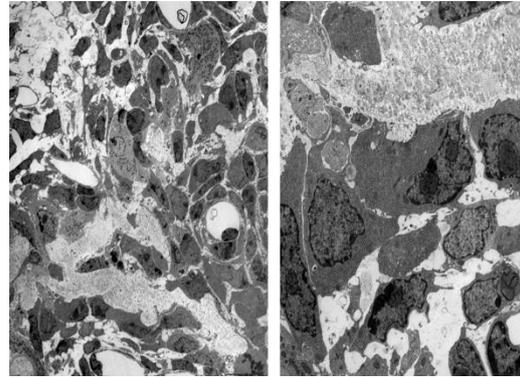


図7 ①の位置 骨形成を行っている位置
左図 ×1000 、右図 ×4000

これらのことより、下顎体領域のメッケル軟骨前半部では軟骨内骨化²⁾とされているが、後半部メッケルの骨化は膜内骨化に準じた様式であると考えられる。

謝辞

本研究に際し、透過型電子顕微鏡の試料作成から操作まで様々なご指導を頂きました学術支援部の牛島夏未先生、大学院生の上北広樹先生に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 頭蓋顔面の発生学、後藤仁敏、140-144、(1976)、書林、東京
- 2) Bhaskar S, Weeinmann J et al., Role of Meckel's cartilage in the development and growth of the rat Mandible, J Dent Res 32, 398-410. (1953)
- 3) Harada Y and Ishizeki K, Evidence for transformation of chondrocytes and site-specific resorption during the degradation of Meckel's cartilage, Anat Embryol 197, 439-450, (1998)

顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

43090025 小谷地 雅秀

指導教員：土門卓文（口腔機能解剖学教室）

キーワード：顎動脈、下歯槽神経

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体を、田川³⁾は解剖体4体を用いて、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6体を用いて、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6体(82歳男性、86歳男性、73歳男性、77歳女性、93歳女性、84歳女性)のそれぞれ左・右側の頭頸部、計12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。

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。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。

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、73歳男性では両側とも1型、93歳女性では左側が1型で右側が2型、77歳女性と84歳女性では両側とも3型が観察された。

下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係は、86歳男性と93歳女性と84歳女性では両側とも後方型、77歳女性右側と82歳男性左側と73歳男性両側が外側型、77歳女性左側と82歳男性右側は前方型が観察された。

考察

顎動脈と下顎枝後縁との位置関係について、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。今回の結果は男性も女性も2型は70%を超えておらず、宝田¹⁾の報告と異なる結果となった。

下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係について、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。今回の結果では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。

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、吉田²⁾、田川³⁾と類似した結果が得られた。その原因の一つとして、本研究では6体の解剖体、左右計12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。

参考文献

- 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
- 3) 田川 博英. 顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究. 北海道大学歯学部6年生42期(平成24/25年度)研究実習論文報告集14: 6-7, 2014

ホルマリンへ試料を浸漬するまでの放置時間が組織標本へ与える影響

43090030 竹瀧 壘

指導教員：高橋 茂(口腔機能解剖学教室)

キーワード：ホルマリン固定、放置時間、組織標本

緒言

組織標本を作製する過程で、採取した組織片を速やかに固定液に浸漬させることは、良好な標本を得るために必要であるといわれている¹⁾。本研究は、固定の操作前に組織片が放置された場合、放置時間により組織標本にどのような影響が出るのかを知ることを目的として行った。

材料と方法

8週齢 Wistar 系雄性ラット3匹を用い、エーテル麻酔下にて肝と顎下腺を摘出した。摘出後、蒸留水中に各試料^{時間}を0, 1, 3, 6, 24時間放置した。続いて10%中性緩衝ホルマリンによる固定(3日間)、エタノールによる脱水、クロロホルムによる置換を行い、パラフィンへ包埋した。包埋終了後、試料を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・エオジン染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察した。

結果

肝の0hの標本では、標本全体の細胞の配列の密度はほぼ均一で、肝3つ組や類洞といった肝特有の構造も崩壊することなく観察された。1hの標本では標本辺縁部に裂隙が見られるようになり、3, 6hでは裂隙が見られる範囲は拡大した。これらの標本では、標本中心部では肝細胞の正常構造が観察できたが、24hの標本では中心部まで裂隙が広がり、正常構造の観察は難しかった。

顎下腺の0hの標本では、細胞の配列の密度はほぼ均一で、腺房細胞や導管部などそれぞれの正常構造が明瞭に観察された。1hの標本では標本辺縁部に裂隙が生じているが、中心部では0hと同様に正常な細胞構造が観察された。3h, 6hの標本では標本中心部の細胞にも裂隙や細胞の崩壊が生じ、0hや1hの標本で見られた構造の観察は難しかった。24hの標本では裂隙や腺房細胞内の空気が組織全体に見られ、導管構造も崩壊していた(図1)。

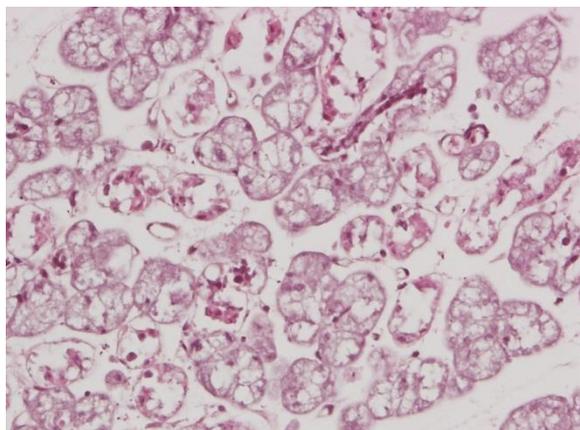


図1：24時間放置した顎下腺の組織像

以上の所見を表1にまとめた。

◎：良い ○：やや良い △：やや悪い ×：悪い

表1：放置時間と組織別の標本の評価

考察

本研究では、試料を採取してから固定液へ浸漬するまでの時間が長いほど、標本への影響は大きく組織形態は悪くなることが観察された。生体から切り離された組織は、時間の経過とともに自家融解をおこして腐敗するとされており、自家融解を停止させ一定の組織成分を凝固、沈殿させて不溶性にするのが固定である¹⁾。つまり放置時間が長いほど自家融解が進行し、組織形態が破壊されたと考えられる。同様の実験を舌上皮、舌筋、肝を用いて行った田幡²⁾も、放置時間が長くなるほど標本の形態が悪くなることを報告しており、本研究の結果を支持するものである。

組織	肝	顎下腺
0 h	◎	◎
1 h	○	○
3 h	○	△
6 h	○	△
24 h	△	×

以上から、採取した組織片をホルマリン固定の前に放置する時間が長いほど、組織の自家融解が進行し標本の形態が不良になると考えられた。

参考文献

- 1) 佐野 豊：組織学研究法 第6版 南山堂 1985 55-59頁
- 2) 田幡千尋：ホルマリンへ試料を浸漬するまでの放置時間が組織標本へ与える影響 36期生研究実習論文集 北海道大学 2007 49-50頁

顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

43090048 堀江 恵

指導教員：土門卓文（口腔機能解剖学教室）

キーワード：顔面動脈、屈曲、走行

緒言

顔面動脈の屈曲と走行は様々である。山本¹⁾は顔面動脈の屈曲形態について4つに分類し、小林ら²⁾はその走行に関して4つに分類している。

山本¹⁾は屈曲に関しては加齢とともに屈型・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⁾は走行について眼角部に達してないものが多いと報告している。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市川³⁾は解剖体2体を、栗原⁴⁾は解剖体4体を用いて観察しているが、その症例数は少ない。今回、著者は解剖体6体の左・右側12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⁾と小林ら²⁾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6体（男性73、82、86歳、女性77、84、93歳）の左・右側の頭頸部12例を観察した。

顔面動脈剖出後、各解剖体において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。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。

得られた結果は、屈曲と走行の2つに分け、左・右側12面におけるそれらの頻度について検索した。

結果

屈曲型では直型は82男左側、屈型は77,84女右側、強屈型は86,73男左右側、77,84女左側、82男右側、93女左右側で観察された。

走行型では1型は77女左側、82男左側、73男右側、84女左右側で、2型は86男左右側、77女右側、93女左側、73男左側で、3型は82男右側、93女右側で観察された。

考察

70歳以上の解剖体を用いた本研究において、顔面動脈の屈曲型については、強屈型が12例中9例と、高頻度で観察された。この結果は、山本¹⁾、市川³⁾、栗原⁴⁾による加齢に伴い屈型～強屈型が多く見られるという報告と

同様である。このことは、加齢に伴い（特に70歳以上）顔面動脈は屈曲した形態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5例、2型が5例、3型が2例観察され市川³⁾、栗原⁴⁾による報告と類似していたが、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12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さらなる調査が必要と思われる。

参考文献

- 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 41 期生(平成 24 年度) 研究実習論文報告集 13: 5-6, 2013.
- 4) 栗原 加奈子. 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 42 期生(平成 25 年度) 研究実習論文報告集 14: 2-3, 2014.

舌神経に関する形態学的研究

43090057 柳 あさこ

指導教員：土門卓文（口腔機能解剖学）

キーワード：舌神経、鼓索神経

緒言

下顎神経の枝である舌神経に関して矢木ら¹⁾はその起始、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体を、宗山³⁾は解剖体4体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、矢木ら¹⁾の報告と比較し検討を行っているが、その観察数は十分なものではない。今回、著者は解剖体6体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6体（男性73、82、86歳、女性77、84、93歳、左・右側、計12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。

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

今回観察した12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、73歳男左・右、82歳男左・右、86歳男左・右、77歳女右、84歳女左・右、93歳女左・右の11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。

舌神経と鼓索神経の吻合位置については、73歳男左・右、82歳男左・右、86歳男左・右、77歳女右、84歳女左・右、93歳女左・右の11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。

考察

本研究において舌神経の起始については上方型が12例中11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。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12例中11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、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12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を正確にしていくことを今後の検討課題としたい。

参考文献

- 5) 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.
- 6) 南 希未恵. 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
- 7) 宗山 昂史. 舌神経に関する形態学的研究、北海道大学歯学部6年生42期生（平成24/25年度）研究実習論文報告集14：10-11、2014

手指の巧緻運動に対して作業前のタスクが与える影響について

43090004 井手 健太郎

指導教員：船橋誠，平井喜幸（口腔生理学教室）

キーワード：巧緻運動，手指，作業前タスク

緒言

反復練習により技術が向上することは知られているが、手先の器用さに個人差があることは多くの歯学生が感ずるところであろう。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。本研究では、歯科治療等の口腔内での緻密な作業が求められる人に対して、短期間で手指運動技能を向上させるために効果的な方法を見出すことを目的として実験を行った。

方法

実験 1

健康な成人男性 7 名、女性 4 名（19～26 才）を被験者とした。手指の巧緻運動を計測するために、図 1 に示す器具を用いて、アクリル板の小さな穴に糸通し作業を行わせ、作業完了に要する時間を測定した。ナイロン製の釣り糸（直径 0.5 mm、長さ 10 cm）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、糸を抜き取った時点で作業完了とした。

10 本の糸を通す作業を 1 セットとして作業時間を測定した。セット間を 1 分半として、3 セット行わせた。セット間の 1 分半の間に、1) 眼球運動を行わせる群（眼球運動群）、2) 豆を 30 cm 離れた皿に移させる群（豆群）、3) 折り紙を折らせる群（折り紙群）、4) 指の運動をさせる群（指運動群）を設定した（図 2、3）。糸通し作業に慣れさせるために、実際の測定を行う前に、セットの糸通し作業を行わせた。実験データは第 1 セットをコントロールとし、第 2、3 セットの変化率を算出し、分散分析（ANOVA）とフリードマン検定を用いて統計学的に比較した。

s

実験 2

実験 1 を行った被験者 11 人に、眼球運動群と折り紙群に



図 1：糸通し作業測定装置
装置中央に立つアクリル板の 3 箇所、直径 1.2 mm の左右に貫通した穴を付与してある。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。

において、上述の糸通し作業を 5 セット行った。3 週間にわたり、各週合計 3 回計測し、得られたデータの平均値について、第 1 セットをコントロールとし、第 4 と第 5 セットの変化率を算出し実験 1 と同様に統計学的に比較した。

結果

実験 1

コントロールである第 1 セットと、第 2、第 3 セット作業時間の変化率について比較した（図 4、5）。眼球運動群におけるコントロールの平均値は 45.6 ± 15.3 秒、第 3 セットの平均値は 39.8 ± 11.9 秒であり、第 3 セットの眼球運動群において有意に早いことが認められた（図 6）。また、折り紙群におけるコントロールの平均値は 43.1 ± 14.6 秒、第 2 セットの折り紙群の平均値は 36.2 ± 9.3 秒となり、第 2 セットの眼球運動群において有意に早くなった（図 7）。他の群においては、有意に早くなることは認められなかった。そのため、第 4 セットと第 5 セットを行うと、これらの二つの群における作業時間の変化がどのようになるか調べるために実験 2 を行った。

実験 2

コントロールである第 1 セットと、第 4、5 セットの作業時間の平均値について比較した。眼球運動群におけるコントロールの平均値は 41.4 ± 7.1 秒、第 4 セットにおける平均値は 40.2 ± 9.3 秒、第 5 セットにおける平均値は 38.5 ± 7.7 秒となった（図 8）。折り紙群におけるコントロールの平均値は 39.0 ± 7.5 秒、第 4 セットにおける平均値は

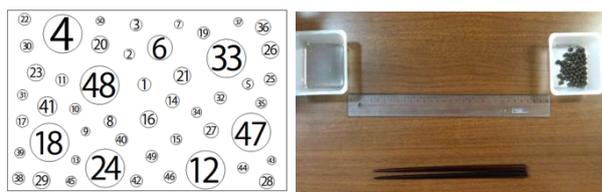


図 2 眼球運動および豆タスク

左図：眼球運動タスク、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。右図：豆タスク、直径約 6.5 mm の豆を箸を用いて、30cm 離れた皿に移す。



図 3 折り紙および指運動タスク

左図：折り紙タスク、 $3.75 \text{ cm} \times 3.75 \text{ cm}$ の折り紙を 90 秒間で鶴の形に折る。90 秒よりも完成した場合はその時点で終了し、途中の場合は 90 秒で終了する。右図：指運動タスク、左右の同名指の周囲を 5 回転した後、逆方向に 5 回転する運動を 5 対の指について順に繰り返す。

40.2±10.1 秒、第 5 セットにおける平均値は 37.5±9.5 秒となった(図 9)。眼球運動群と折り紙群の両方において、第 4, 5 セットともに有意に早くなることは認められなかった。

考察

本研究より、眼球運動および折り紙を折る運動が、糸通

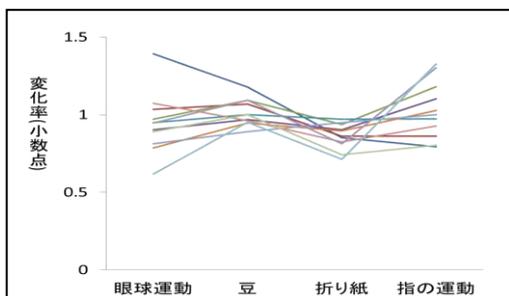


図 4 : 第 2 セット作業時間の変化率

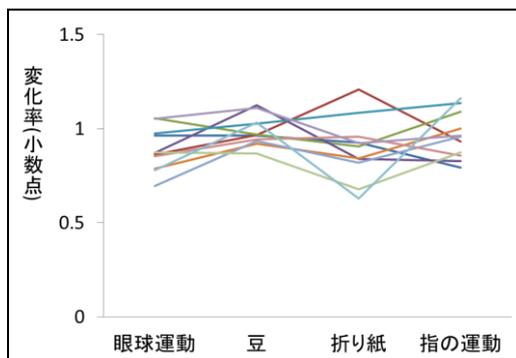


図 5 : 第 3 セット作業時間の変化率

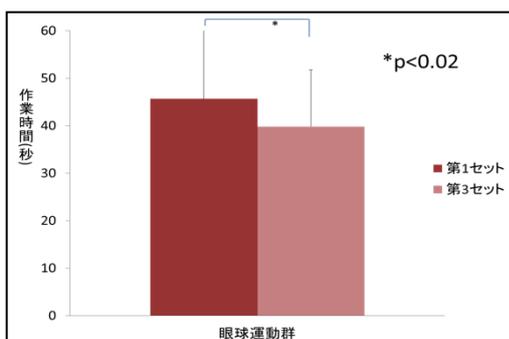


図 6 : 眼球運動群第 1 セットと第 3 セットの平均値

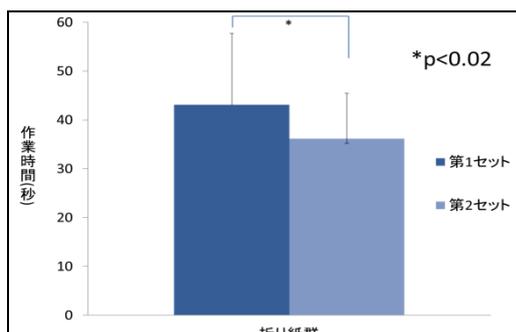


図 7 : 折り紙群第 1 セットと第 2 セットの平均値

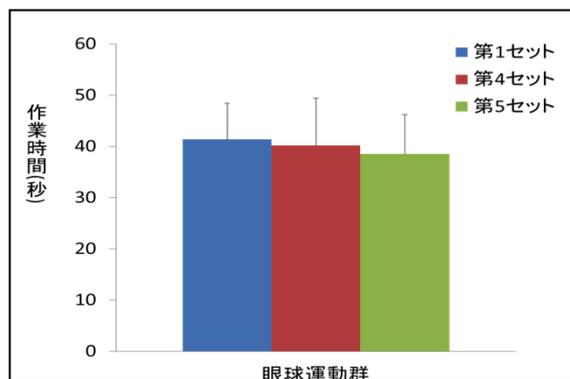


図 8 : 眼球運動群第 1, 4, 5 セット作業時間の平均値

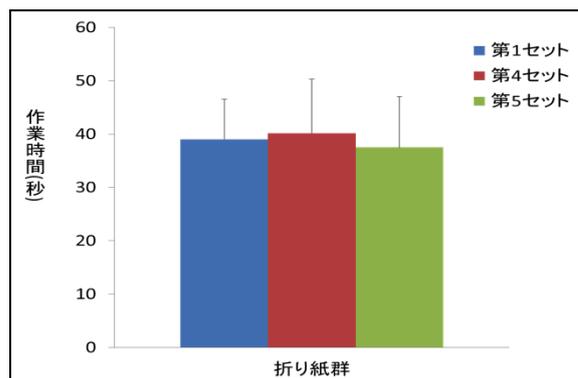


図 9 : 折り紙群第 1, 4, 5 セット作業時間の平均値

し作業時間を開始した始めの方では、作業時間を有意に短縮して有効であることが示された。しかし、作業を続けて行ってゆくと共に、その効果は無くなっていくことも分かった。これらは、長時間の作業においては疲労の影響があるのではないかと推測している。また、豆を運ぶ運動、指運動によっては手指の巧緻性を向上させる効果は認められなかった。

今後も短期間で手指の巧緻性を有意に向上させる作業を探していきたい。

参考文献

- 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)

舌と硬口蓋刺激により誘発される 20Hz 帯域の律動性脳活動の舌運動による変調

43090010 大西 香織

指導教員：前澤 仁志, 船橋 誠 (口腔生理学教室)

キーワード：誘発脳磁場反応, 事象関連同期化, 事象関連脱同期化

緒言

正中神経刺激により大脳皮質に 20Hz 帯域の律動性脳活動が誘発され、その律動性脳活動が手指の運動により抑制されることが知られている。このような末梢からの感覚入力により運動野に刺激誘発される 20Hz 帯域の律動性脳活動は、運動野のアイドリング状態を示すと考えられている。¹⁾

一方、口腔領域からの感覚入力によっても、20Hz 帯域の律動性脳活動が誘発され、これが顎舌顔面の運動により変調をきたすか否かに関しては不明であった。そこで、1. 舌と硬口蓋の電気刺激による 20Hz 帯域の律動性脳活動誘発の有無、2. 舌の反復運動による 20Hz 帯域の律動性脳活動抑制の有無、について検討した。

方法

健常者 8 名 (男性 5 名, 女性 3 名, 年齢 20~38 才, 平均年齢 25.4 才) を被験者とし、電気刺激時の大脳皮質脳磁場反応を脳磁図 (VectorView, Neuromag, Finland) を用いて計測した。右側舌背と右側硬口蓋に電気刺激 (刺激間隔: 2-2.5s, 刺激強度: 感覚閾値の 3 倍) を行った。1 名は口蓋隆起を認めたため、舌背刺激のみを行った。安静時と舌運動時における脳磁場反応について、サンプリング周波数 1000Hz, バンドパスフィルター (0.1-330Hz), 1 セッションの計測時間 5 分にて計測を行った。舌運動タスクとして、舌を 1 秒に 1 回の頻度で左右側に運動させた。解析方法は過去の文献^{2,3)} に従い、18~23Hz 帯域の成分を抽出し、整流化して、加算平均した後、最大振幅チャンネルの 500~1000ms における平均振幅を評価した。脳磁場反応計測時の条件項目は以下の通りである。

- ①安静状態における舌刺激時 (安静 - 舌刺激)
- ②運動時における舌刺激時 (舌運動 - 舌刺激)
- ③安静状態における口蓋刺激時 (安静 - 口蓋刺激)
- ④舌運動時における口蓋刺激時 (舌運動 - 口蓋刺激)

結果

安静時 - 舌刺激時には、全ての被験者で 20Hz 帯域の律動性脳活動が誘発され、振幅の平均値 (標準偏差) は対側半球 12.5 ± 4.5 fT/cm, 同側半球 12.4 ± 3.8 fT/cm であった。舌運動 - 舌刺激時 (8 名) の全てにおいて 20Hz 帯域の律動性活動の抑制が認められ、平均振幅は対側半球 10.2 ± 3.0 fT/cm, 同側半球 10.8 ± 3.3 fT/cm であった。全ての被

験者において両側半球ともに、安静時よりも運動時で 20Hz 帯域の律動性脳活動の低下が認められた。

安静 - 口蓋刺激時には、全ての被験者において 20Hz 帯域の律動性脳活動が誘発され、振幅の平均値 (標準偏差) は対側半球 14.4 ± 5.7 fT/cm, 同側半球 11.3 ± 2.8 fT/cm であった。舌運動 - 口蓋刺激時 (7 名) の全被験者において 20Hz 帯域の律動性活動が抑制され、平均振幅は対側半球 12.1 ± 5.0 fT/cm, 同側半球 9.6 ± 2.2 fT/cm であった。舌運動時における 20Hz 帯域の律動性脳活動の低下は両側半球に生じることが、全被験者のデータから検出された。

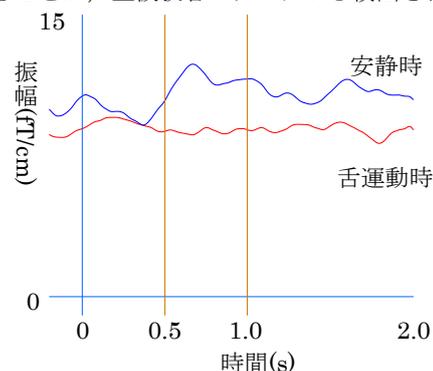


図 1 代表的な被験者の舌刺激時の対側半球における 20Hz 帯域の律動性脳活動

考察

安静状態では舌刺激により 20Hz 帯域の律動性脳活動が誘発されたことから、手指と同様に口腔領域の刺激においても運動野がアイドリング状態になることが示唆された。

また、舌運動時に律動性脳活動が抑制されたことから、舌運動と舌からの感覚入力との間に連関があることが示唆された。舌運動は口蓋刺激時の律動性脳活動も抑制することから、舌運動と口蓋からの感覚入力との間に連関があることが示唆された。

参考文献

- 1) Riita Salmelin, Riita Hari. Spatiotemporal characteristics of sensorimotor neuromagnetic rhythms related to thumb movement *Neuroscience* 60 (1994) 537-550
- 2) Ayako Ichikawa, Haruka Yamamoto and 5 others Stimulus-related 20-Hz activity of human cortex modulated by the way of presenting hand action *Neuroscience Research* 64 (2009) 335-337
- 3) Takahiro Kinai, Jun Matsubayashi and 8 others. Modulation of stimulus-induced 20-Hz activity during lower extremity motor imagery *Neuroscience Research* 58 (2007) 285-290

脂肪酸の味覚閾値と BMI の関連性

43090033 玉野 真里果

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：味覚，脂肪酸，BMI

緒言

甘味，塩味，酸味，苦味，旨味は5基本味とされる。これらに加えて，オーストラリア Deakin 大学の研究者らによって，脂肪酸の味は第6番目の味覚であることが提唱されており，脂肪酸の味覚閾値には個人差があり，脂肪酸の味覚閾値と Body Mass Index (BMI) には正の相関関係があることも報告されている^{1,2}。これらは欧米人を対象にした研究であり，日本人における脂肪酸に対する感受性や，脂肪酸の味覚閾値と BMI との関連性については不明であった。日本人の食生活が欧米化して久しいため，欧米と同様の状況が推測されるが，詳細は全く不明であった。そこで本研究では，日本人における脂肪酸の味覚閾値を測定し，脂肪酸の味覚閾値と BMI との関連性を明らかにすることを目的として実験を行った。

方法

健康な男女 11 名(日本人，20～54 歳)を被験者とした。脂肪酸溶液は実験当日に作成し，無脂肪牛乳を溶媒として，アラビアガム(0.5%)，EDTA(0.01%)，オレイン酸(0.35～179.2mM，10種類，順次倍希釈)を加えたものを30秒間攪拌して均質化し，直後に味覚閾値測定実験に供した。味覚閾値は全口腔法(5mL，10秒間口に含む)により測定した。被験者には最初に水で含嗽させ，次にオレイン酸を添加していない無脂肪牛乳を口に含ませて，その時の味覚を基準として，以後オレイン酸添加溶液を濃度の低い方から順に口に含ませて，基準と違う味を感じる濃度を脂肪酸の味覚閾値とした。嗅覚による影響を考慮するため，普通に嗅覚を伴う状態に加えて，鼻孔を閉鎖して嗅覚を遮断した状態においても同様の測定を行った。また，各被験者がオレイン酸の味覚閾値に達した溶液の味について，美味しいまたは不味のいずれに感じたかについてアンケート調査を行った。

結果

今回の実験では BMI とオレイン酸の味覚閾値には正の相関関係は認められなかった(図1)。嗅覚有りの場合は味覚閾値に被験者間の差はあまりみられず全員味覚閾値は 11.2mM 以下であり，嗅覚無しの場合は人によって味覚閾値の差が有意に認められ，嗅覚有りと比べて高い傾向があった。オレイン酸の閾値に達した時にその溶液についてのアンケートでは，11 名中 2 名が美味しいと答え，残り 9 名が不味いと答えた。多くの被験者(10名)は脂肪酸溶液に対して“甘い”または“苦い”と感じたというが，美味しいと答えた 2 名のうち 1 名は，“豚骨の味がする”と答えた。

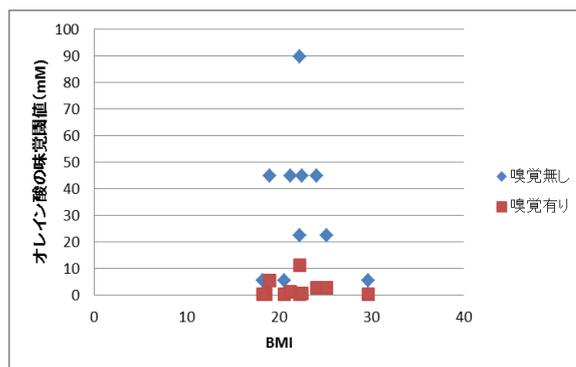


図1 BMI とオレイン酸の味覚閾値の相関関係

考察

結果より，BMI とオレイン酸の味覚閾値に正の相関関係は認められず，日本人の場合 BMI はオレイン酸の味覚感受性と関係があるとは言えなかった。オレイン酸溶液の味を豚骨の味と答えた 1 名の被験者は脂肪の味を自覚していたと推測される。しかし，その被験者の BMI は 29.7 で肥満であり，かつ嗅覚無しのオレイン酸の味覚閾値が 0.35mM と低く，脂肪酸の味覚閾値と BMI は負の相関関係を示し，欧米人とは逆の結果を示すものであった。Stewart らはオレイン酸の味覚閾値が低い肥満の被験者は誰もいなかったとし，これと違う結果を示した¹。

オレイン酸の味覚閾値は嗅覚情報によって大きく影響を受けることが分かった。被験者全員が嗅覚無しでオレイン酸の味を感じたが，ヒトの口腔内におけるオレイン酸に対する味覚受容体の存在は未だに証明されていない。Stewart らは嗅覚無しで 50%の人がオレイン酸の味を感じる濃度を 1.4mM としているが，今回の被験者では 11 人中 10 人の嗅覚無しの味覚閾値が 1.4mM を超えていた¹。しかし，欧米人個々の味覚閾値を表したデータは示されておらず，欧米人・日本人の脂肪酸の味覚閾値を比較して有意差があるかどうか判定することはできなかった。欧米人に対してオレイン酸が美味しいか不味いかのアンケート調査はなされていないが，Stewart らはオレイン酸の味覚閾値が低いほど食事の脂肪分の摂取量が低いという結果が示されているので，欧米人もオレイン酸の味を好まないことが推測された^{1,2}。よって，日本人も欧米人もオレイン酸の味は基本的に不味いと感じる傾向にあり，食生活は違っても脂肪酸の味に対する嗜好性には大差が無いと推察された。

参考文献

1. Stewart JE, Feinle-Bisset C and 4 others, Oral sensitivity to fatty acids, food consumption and BMI in human subjects, *Br J Nutr* (2010), 104, 145-52
2. Stewart JE, Newman LP and 2 others, Oral sensitivity to oleic acid is associated with fat intake and body mass index. *Clin Nutr* 30(2011) 838-44

食物の色による味覚閾値の変化

43090035 榎本 愛巳

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：味覚，視覚

緒言

ヒトは食物の色を無意識のうちに受容し味覚を受容しているが、色が味覚閾値を変化させるか否かについては不明である。色が味覚閾値に与える影響について明らかにするため実験を行った。

方法

健康な成人男女 22 人（男 13 名，女 9 名，19～86 歳）を被験者とした。透明，赤色，黄色，緑色に着色した 4 基本味溶液（スクロース，食塩，キニーネ，クエン酸）を作成し，被験者に対して，全口腔法（5ml/回）による味覚閾値測定を行った。4 基本味に対する味覚閾値には個人差があるため，目隠しをして測定した各被験者の味覚の認知閾値を基準として，色覚の影響を統計学的に比較した。また，各被験者が 4 基本味から連想する色と，本実験で用いた溶液の各色から連想する味覚について，全ての被験者から聴取した。

結果

被験者 22 名全員において，視覚情報があると少なくともいずれか一つの 4 基本味の閾値に有意な増減が生じた。各基本味の結果を右のグラフで示す（図 1～4）。色による閾値の変化を認めた味で最も変化した味はキニーネであり，キニーネの赤色では味覚閾値が低下した被験者は 16 人，上昇した被験者は 3 人であった。一方キニーネの緑色では味覚閾値が低下した被験者 12 人，上昇した被験者は 7 人であった。また，赤色，透明，緑色，黄色の順に閾値が低下する傾向が認められ，緑色，黄色，透明，赤色の順に閾値が上昇する傾向が認められた。

アンケートから，4 基本味から連想する色のイメージには著しい個人差が認められた。黄色のイメージは酸味，赤色のイメージは甘味と答えた被験者が多かったが，黄色は酸味の味覚閾値を著しく変化させない一方，赤色は甘味において閾値を上昇させやすいという結果が出た。緑色のイメージは苦味と答えた被験者と甘味と答えた被験者がいたが，苦味の閾値も同様に低下した被験者と上昇した被験者が存在した。

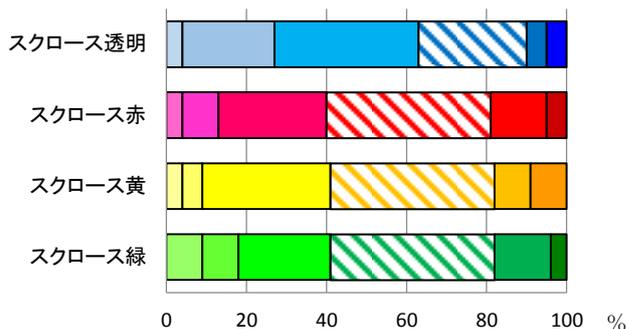


図 1 色情報による甘味閾値の変化

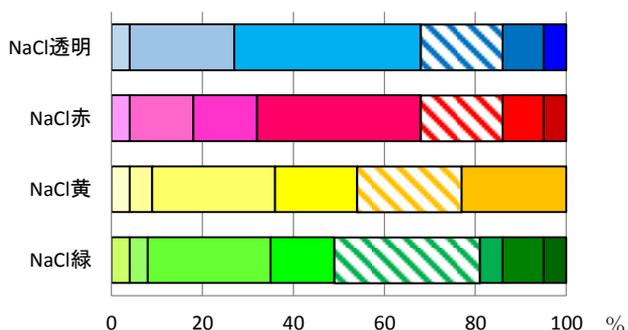


図 2 色情報による塩味閾値の変化

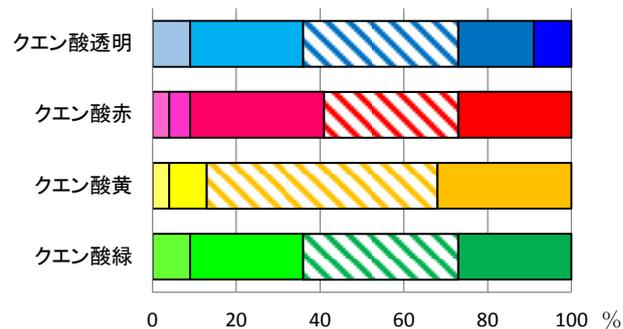


図 3 色情報による酸味閾値の変化

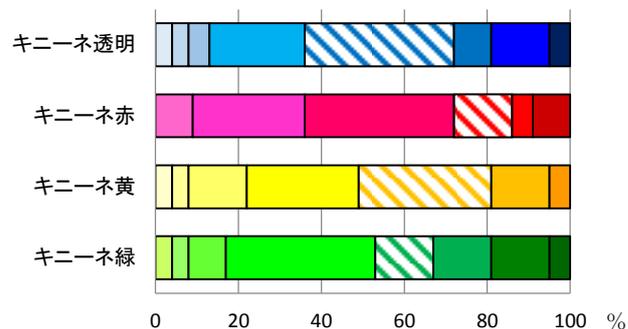


図 4 色情報による苦味閾値の変化

考察

色覚により味覚閾値が変化することが明らかとなった。色覚と味覚の記憶は共に個々の異なる食経験によって影響を受けて形成されており，味覚閾値の変化に多様性を与えたのではないかと考えられた。

ベンチプレス時における大胸筋活動に対する下顎位の影響

43090043 平井 慎之介

指導教員：平井 喜幸，船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：筋電図，ベンチプレス

諸言

噛みしめにより筋力が増加することが報告がされている⁽¹⁾。負荷重量の増加に伴い筋活動量が増加することも知られている⁽²⁾。しかし、一定量の負荷（各被験者が1回に拳上が可能な最大の重量の挙上）を与えた時の筋活動量に対する噛みしめ等の下顎位の影響については不明であった。そこで本研究ではベンチプレスを用いて、開口時と噛みしめ時における大胸筋筋活動量について比較検討を行った。

実験方法

健常男性成人 8 名（22～24 歳）を対象とした。被験者利き手側の大胸筋の表面筋電図を双極誘導にて測定した。筋電図導出部をアルコールで清掃し、電解質ペーストを塗布した皿電極を皮膚表面にテープで固定した。

始めにベンチプレスの最大挙上重量（1RM：Repetition Maximum）を測定した。自己申告の 1RM の 50% の重量で 8 回ベンチプレスを行った。2 分間の休息ののち、片側 1.25kg のプレートを両側に 1 枚ずつ加えて再度バーベルの下降と挙上の運動を 1 回行わせ、挙上できなくなるまでプレートを加えていき、挙上できなくなった重量の 1 つ前に上げた重量を 1RM とした。

次に 1RM の 80% の重量を用いて、開口状態（切歯間距離 50mm）と臼歯部で割り箸を噛みしめ状態においてベンチプレスを行わせ、大胸筋の筋活動量を測定した。バーベルを 2 秒で下げて、2 秒で上げる一定のリズムで 3 回行わせ、これを 1 セットとした。開口状態と割り箸を噛みしめ状態のベンチプレスの順番はランダムで行い、セット間は 10 分の休息を行った。また、統計解析には Paired T-test を用いた。

結果

開口状態における大胸筋の筋活動は $1.55 \pm 0.22 \text{ mV} \cdot \text{sec}$ （平均値 \pm S. D.），割り箸の最大噛みしめ状態における大

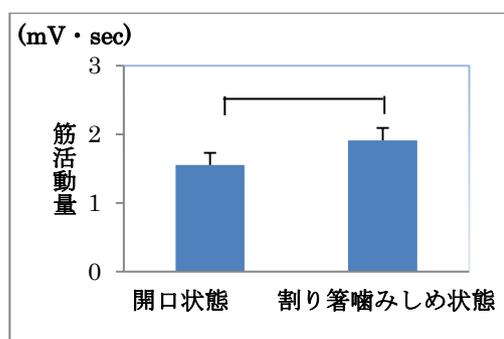


図1 大胸筋の筋活動量の平均値

* $P < 0.05$

胸筋の筋活動量は $1.91 \pm 0.18 \text{ mV} \cdot \text{sec}$ だった。これらの値の間に統計学的有意差がみられた ($P=0.048, n=8$)。

また、アンケートより 8 人中 8 人が割り箸噛みしめ状態の方が力が入ると回答した。

考察

負荷重量と筋活動量は相関するという報告があり、重い重量を拳上するほど大胸筋の筋活動量は増加する⁽²⁾。今回の実験では挙上する重量は変化させなかったが、開口状態、割り箸噛みしめ状態ともに挙上することができた。しかし開口状態の方が割り箸の噛みしめ状態に比べ大胸筋の筋活動量が減少した。このことは、挙上可能な最大重量の 80% の重量のベンチプレスを行う際は開口状態の方が、割り箸噛みしめ状態よりも少ない大胸筋の筋活動量でベンチプレスを拳上できるということである。つまり、一定量の負荷を与えた時、開口状態の方が割り箸噛みしめ状態よりも筋負担が少ないということである。アンケート結果でもあるように、噛みしめることでベンチプレスを拳上するために必要な筋活動量以上の余分な力がかかったのだと推測される。逆に、筋肉トレーニングのために筋負担を大きくしたいのであれば、噛みしめ状態で行えば開口状態で行うよりも効果的な筋肉トレーニングが行えることが推察される。

引用文献

- 1) 稲水惇. マウスガードが筋力発揮に及ぼす影響に関する研究. 広島大学保健学ジャーナル 4(1), 14-19, 2004-2012.
- 2) 島野敬四郎, 内藤謙, 湯浅景元. (1994) ハーフスクワットとベンチプレスにおける負荷重量と筋活動量の関係. 中京大学体育学論叢 35(2):75-85.

継代培養骨髄間質細胞におけるサイトカインの効果 II

43080044 橋本 比呂志

指導教員：滝田 裕子（口腔分子生化学教室（学術支援部））

キーワード：骨髄間質細胞、継代、FGF-2、BMP-2

緒言

骨髄間質細胞が骨芽細胞に分化することを利用して、骨関節疾患などの治療への臨床応用が試みられている。骨髄中に含まれる間質細胞の割合は非常に低く、また継代により分化能が低下することから、多分化能を有した骨髄間質細胞を大量に確保するのは難しいと考えられている。そこで分化能を有した骨髄間質細胞を継代により大量に確保することを目指して、継代培養系に線維芽細胞増殖因子（FGF-2）と骨形成蛋白質（BMP-2）を添加し、各継代細胞の分化増殖能について検討した。

実験方法

ラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、骨髄間質細胞を分離した。コンフルエント後、トリプシンにより細胞を剥がし、一部を48 well ディッシュに 1×10^4 個ずつ播種し、分析用として1週間、2週間、培養を行った。残りを継代し、F6まで継代を続けた。コントロール、BMP-2投与群、FGF-2投与群、BMP-2とFGF-2両投与群という4群において培養をおこなった。BMP-2はwellあたり100 ng投与した。FGF-2は0.5 ng投与した。すべての培地にデキサメタゾン、ベータグリセロフォスフェート、アスコルビン酸を加えた。培養後、DNA量、ALP活性、カルシウム(Ca)量を測定した。

結果

培養1週後のDNA量は各群において継代回数に伴い減少する傾向にあった。4群を比較するとFGF-2投与群において最もDNA量が高く、細胞増殖が促進されていた。しかしBMP-2とFGF-2を同時に投与するとFGF-2単独での細胞増殖がBMP-2により阻害されることがわかった（図1）。

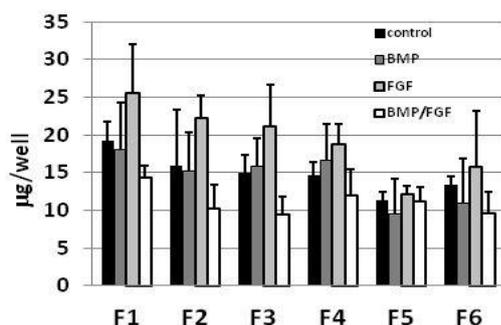


図1 各継代培養におけるDNA量

培養1週におけるALP活性はコントロール群において継代とともに低下した。そこにBMP-2を投与するとコントロール群に比べ、継代を繰り返しても有意にALP活性が上昇した。BMP-2とFGF-2を同時に投与した群ではさらにALP活性が高い傾向にあった。しかしFGF-2単独投与群ではコントロール群に比べて有意なALP活性の上昇は認められなかった（図2）。

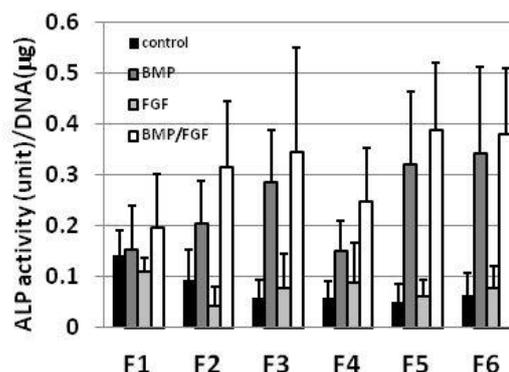


図2 各継代培養におけるALP活性

さらに骨芽細胞への分化の度合いを確認するため培養2週後のCa量を測定した。コントロール群においてCa量は継代とともに低下した。BMP-2投与群とFGF-2とBMP-2を同時に投与した群ではコントロール群に比べ、継代を繰り返しても有意にCa量が上昇した。F2, F4, F5においてはFGF-2とBMP-2を同時に投与した群がより高い値を示した。FGF-2単独投与群ではコントロール群に比べて有意なCa量の上昇は認められなかった（図3）。

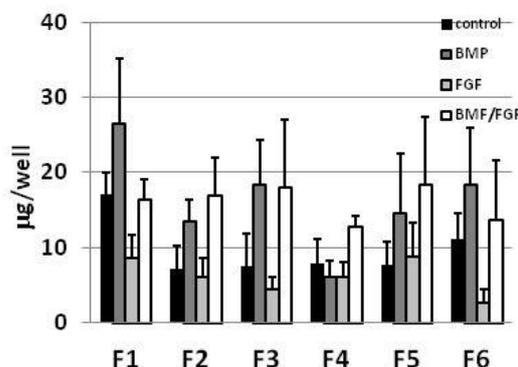


図3 各継代培養におけるCa量

考察

培養1週目のALP活性はF1-F7においてBMP-2群が高く、BMP-2/FGF-2投与群はそれよりもさらに高い傾向にあった。培養2週におけるCa量はBMP-2群とBMP-2/FGF-2投与群において高値を示し、F2, F4, F5においてはBMP-2/FGF-2群がより高い値を示した。以上より、継代を繰り返した骨髄間質細胞においてBMP-2とFGF-2を同時に添加することにより、骨芽細胞への分化が促進される傾向が示された。FGF-2の投与時期、投与量をさらに検討することにより、BMP-2による骨形成の促進が期待される。

参考文献

- 1) F. Sugiura, H. Kitoh, N. Ishiguro: Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 233-239, 2004.

過酸化水素を産生する殺菌性レジンの特徴

43090019 木下裕貴

指導教員：水野守道（口腔分子生化学）

キーワード：ウ蝕、歯質の保存、抗菌性

緒言

象牙質には再石灰化能があることから⁽¹⁾感染歯質内の細菌を早期に除去することで象牙質の再石灰化を促し結果的に歯質の削除量を最小限にすることが期待される。そこで本研究実習では歯質の細菌を死滅させる新しい殺菌剤の開発を目指した。

方法

1) 殺菌性高分子化合物を組み込んだ殺菌性レジンの作製

過酸化水素は酸化作用を発現した後酸素と水分子とに分解するので⁽²⁾、従来の殺菌剤に比べ組織障害を回避することができる。本研究実習では1Mの過酸化水素水溶液と多糖体から殺菌性高分子体を作製した後レジンに組み込み殺菌性レジンを作製した。

2) 殺菌性高分子体の物性がレジン中の過酸化水素の安定性に与える影響の検討

まず殺菌性高分子体の粒径がレジン中における過酸化水素の安定性にどのような影響を与えるか検証した。

殺菌性高分子体を100 μ 以下と100から200 μ そして200 μ 以上の3サイズに分類した後、殺菌性高分子体が10%重量になるよう光重合レジン中に混和し、殺菌性レジンを作製した。これらレジンをお口内と同様な条件である37 $^{\circ}$ C、100%湿度下に置き2週間後のレジンに残存する過酸化水素量をFOX法⁽³⁾によって測定した。

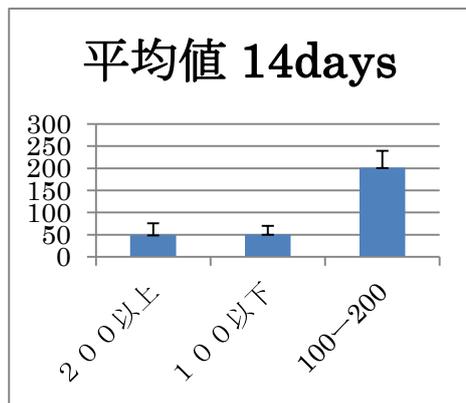
3) 殺菌性レジンの破壊試験

次に殺菌性レジンの物理的強度を調べるため破壊試験を行った。

結果

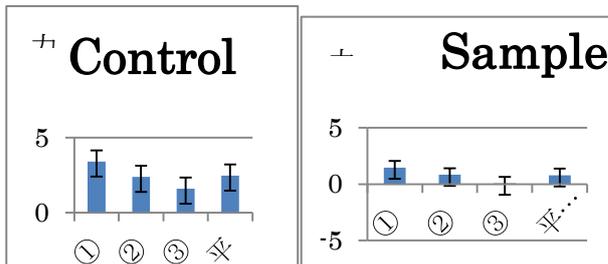
1) 殺菌性高分子体の物性がレジン中の過酸化水素の安定性に与える影響の検討

下図に示されたように100から200 μ の粒径の殺菌性高分子体が最も高い過酸化水素量を示した。この結果から殺菌性高分子体の粒径がレジン中における過酸化水素の安定性に影響していることが判明した。



2) 殺菌性レジンの破壊試験による物理的強度の比較

殺菌性レジンと対照のレジン（殺菌性高分子体を含まない）を比較すると殺菌性レジンの物理的強度は対照のレジンに比べて低下していることが明らかになった。



考察

今回の研究から殺菌性レジンの殺菌活性は殺菌性高分子体の粒径に依存することが明らかになった。この結果は殺菌剤の物理的特性が殺菌剤としての効果に影響することを示唆するものである。しかし殺菌性レジンの物理的強度は低下していたので、隣接面や歯頸部あるいは乳歯のように強い咬合圧がかからない部位での使用が可能と思われる。

参考文献

1. Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A. **Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy** *J Mater Sci Mater Med.* 23:733-42,2012.
2. Linley E, Denyer SP., (他3人) Use of hydrogen peroxide as a biocide: new consideration of its mechanisms of biocidal action *J Antimicrob Chemother.* 67:1589-96,2012.
3. Meisner P, Gebicki JL., **Determination of hydroperoxides in aqueous solutions containing surfactants by the ferrous oxidation-xylenol orange method.** *Acta Biochim Pol.* 56:523-7, 2009.

過酸化水素を産生する殺菌性レジンの殺菌活性

43090022 蔵野 弘基

指導教員：水野 守道（口腔分子生化学教室）

キーワード：レジン 殺菌作用

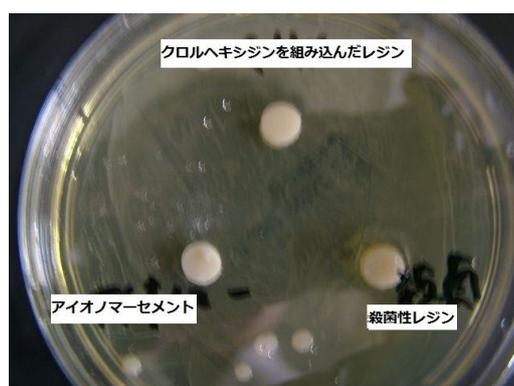
緒言

齲蝕治療は感染象牙質の完全な除去が計られて来たが初期の感染歯質は再石灰可能が十分存在するとの報告¹⁾から、感染象牙質を無菌化することで、象牙質の再生が期待される。具体的には殺菌性充填材による齲蝕治療が考えられるので、本研究実習では殺菌性レジンを作製し、レジンの殺菌性についてクロルヘキシジンと比較した。

実験方法と結果

(1) 殺菌性高分子体を組み込んだ殺菌性レジンの作製
本研究実習では多糖体を利用した殺菌剤の作製を試みた。すなわち1Mの過酸化水素水溶液と多糖体を混和した後、粉碎し、この微粉体化した殺菌剤をレジンに組み込み殺菌性レジンを作製した

(2) 殺菌性レジンと既存殺菌剤における殺菌活性の比較
クロルヘキシジンは口腔内の除菌に使用される代表的な薬剤である。そこで本研究実習で作製した殺菌性レジンとクロルヘキシジンを組み込んだ歯科材料について殺菌活性を比較した。殺菌活性はS.mutansを用いたAgar disc法で評価した²⁾。即ちS.mutansを嫌気性条件下でBHI Agarプレート上でconfluentとなるまで培養した後、Agarプレート上に試料を置き、一定期間嫌気性条件で培養し試料の周囲に形成される溶解斑の有無により殺菌活性を評価した。試料として殺菌性レジン、クロルヘキシジンを組み込んだ光重合レジンとアイオノマーセメントを使用した。結果を以下に示す。



図に示すように殺菌性レジンでは明瞭な溶解斑が認められる一方、クロルヘキシジンを組み込んだ歯科材料では弱い殺菌活性しか認められなかった。本結果から殺菌性レジンにはクロルヘキシジンより強い殺菌活性を示すことが明らかになった。

考察

保存治療における近年の潮流はミニマムインターベンションの概念の普及が挙げられるが³⁾、歯質を保存しようとするあまり感染歯質を残す危険性が高まって来た。其の対応策として抗生物質の象牙質内への塗布が試みられているが⁴⁾、抗菌効果は限定的と考えられる。本研究実習で作製した殺菌性レジンではクロルヘキシジンを組み込んだレジンやアイオノマーセメントより強い殺菌活性を示すことが明らかになった。この事実は本研究実習で作製した殺菌性レジンにはミニマムインターベンションを実現するための有力なツールになりえる事を示すものである。

参考文献

- 1) Zhang X, Neoh KG, Lin CC, Kishen A., Remineralization of partially demineralized dentine substrate based on a biomimetic strategy. **J Mater Sci Mater Med.** 23:733-42,2012.
- 2) Takahashi Y, Imazato S, Kaneshiro AV, Ebisu S, Frencken JE, Tay FR., **Antibacterial effects and physical properties of glass-ionomer cements containing chlorhexidine for the ART approach.** Dent Mater. 22:647-52,2006.
- 3) Molina GF, Faulks D, Frencken JE., **Suitability of ART approach for managing caries lesions in people with disability-Experts' opinion.** Acta Odontol Scand. 71:1430-5,2013.
- 4) Nakornchai S, Banditsing P, Visetratana N., **Clinical evaluation of 3Mix and Vitapex as treatment options for pulpally involved primary molars.** Int J Paediatr Dent. 20:214-21,2010.

継代培養骨髄間質細胞におけるサイトカインの効果 I

43090026 齋藤 大嗣

指導教員：滝田 裕子（口腔分子生化学教室（学術支援部））

キーワード：骨髄間質細胞、継代、BMP-2

緒言

骨髄には造血系幹細胞、間質系幹細胞が存在している。接着性の間質系幹細胞は適切な分化誘導剤を添加することにより骨・軟骨・脂肪・筋肉などに分化することが知られている。現在、骨移植が必要な部位に、自家骨移植の代わりに適切な担体上で培養した骨髄間質細胞を埋入するという臨床応用が試みられている。しかし骨髄間質細胞は継代を繰り返すことにより骨芽細胞への分化能が低下することが知られている¹⁾。そこで継代培養系に骨形成蛋白質 (BMP-2) を添加し、各継代細胞の分化増殖能について調べた。

実験方法

BMP-2 の投与時期を検討するためにラット大腿骨より骨髄細胞を採取し、骨髄間質細胞を分離した。48 well のディッシュに骨髄間質細胞を 2×10^4 個ずつ播種し、以下の条件で BMP-2 を 100 ng 投与した。すべての培地にデキサメタゾン、ベータグリセロフォスフェート、アスコルビン酸を加えた。G1 は BMP-2 を投与しないコントロール群。G2 は 1 日目のみ、G3 は 1 日目と 4 日目、G4 は 1 日目と 4 日目と 7 日目、G5 は 4 日目と 7 日目、G6 は 7 日目のみに BMP-2 を投与した。培養 9 日後にすべてを回収し、DNA 量、ALP 活性、カルシウム(Ca)量を測定した。次に骨髄間質細胞を F1-F7 まで継代した。培養 1 日目と 4 日目と 7 日目に BMP-2 を 100 ng 投与し、9 日間培養した。DNA 量、ALP 活性、Ca 量を測定した。

結果

DNA 量はコントロール群(G1)に比べて G4 で減少した (図 1)。BMP-2 継続投与により骨髄間質細胞の増殖が抑制されていることがわかった。ALP 活性は G1 に比べて G2, 3, 4 で高く、BMP-2 を初期に投与することで、ALP 活性が増加していることが明らかになった (図 2)。

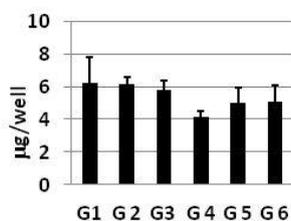


図1 BMP 存在下で培養した骨髄間質細胞の DNA 量

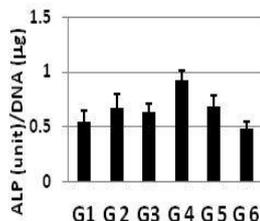


図2 BMP 存在下で培養した骨髄間質細胞の ALP 活性

Ca 量はコントロール群(G1)に比べ、G 2, 3, 4 で高い値を示した (図 3)。G5, 6 は G1 と有意な差がなかったことから、初期に BMP-2 を投与することが望ましいと考えられた。

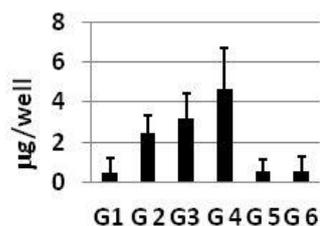


図3 BMP 存在下で培養した骨髄間質細胞の Ca 量

BMP-2 投与群、無投与群において継代に伴い、DNA 量が減少した。また BMP-2 投与群は無投与群に比べて有意に DNA 量が減少し、細胞増殖が抑制されていることがわかった (図 4)。

F1-F7 において BMP-2 投与群では BMP-2 無投与群に比べて、有意に ALP 活性が上昇した。継代を繰り返した細胞においても高い値を示した (図 5)。

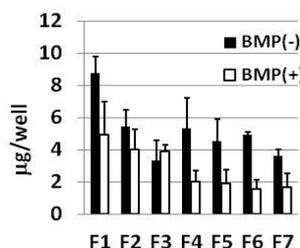


図4 各継代培養の DNA 量

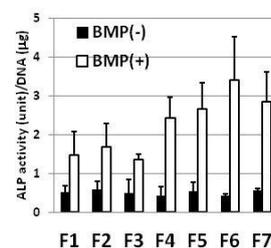


図5 各継代培養の ALP 活性

BMP-2 無投与群では培養 9 日後においても Ca が検出されなかった。しかし BMP-2 投与群では F1-F7 において Ca が検出され、継代を繰り返した細胞でも Ca 量が高い値を示した (図 6)。

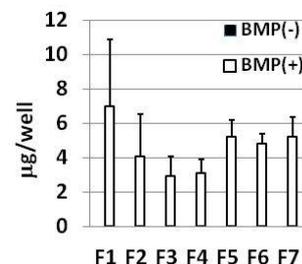


図6 各継代培養の Ca 量

考察

BMP-2 を投与すると無投与群に比べ、F1-F7 において有意に ALP 活性が上昇した。BMP-2 無投与群において Ca は検出されなかったが、BMP-2 を投与すると検出された。継代を繰り返した F5-F7 においても Ca 量が高い値を示した。

以上の結果から継代骨髄間質細胞に BMP-2 を投与することにより骨芽細胞への分化が促進されることが示された。BMP-2 の効果は継代を繰り返した細胞にも有効であると考えられる。

参考文献

- 1) F. Sugiura, H. Kitoh, N Ishiguro: Osteogenic potential of rat mesenchymal stem cells after several passages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316: 233-239, 2004.

Is the bone the second brain?

43090028 志波智樹

指導教員：田村正人、佐藤真理（口腔分子生化学教室）

キーワード：Bone, BDNF, GDNF

Kawano H, Sada A, Ikeda K, Matsui T, Katayama Y. Osteocytes regulate primary lymphoid organs and fat metabolism. Cell Metabolism 18(5): 749-58, 2013.

諸言

近年、骨と全身多臓器の関与が徐々に明らかになってきている。末梢白色脂肪の維持や、骨髄、胸腺における B リンパ球、T リンパ球の分化調節による免疫制御など、骨を頂点とした全く新しい全身制御機構の存在が指摘され、それは神経系を介している可能性が高いとされている¹。実際、骨に埋め込まれた骨細胞は脳のグリア細胞によく似た形態をしていることから、本研究では骨を第二の脳と捉え、脳のグリア細胞で分泌される神経栄養因子とその受容体の遺伝子発現を骨関連細胞株にて確認した。

方法

マウス骨芽細胞株である MC3T3-E1、マウス骨髄ストローマ細胞株である ST-2、マウス骨細胞株である MLO-Y4、マウス軟骨細胞株 ATDC5 を用いて、脳由来神経栄養因子 BDNF とその受容体 TrkB、グリア細胞株由来神経栄養因子 GDNF とその受容体 GFR- α 1、RET の遺伝子発現を RT-PCR 法および Real time PCR 法にて確認した。

結果

発現レベルを含め以下の表にまとめた。

	BDNF	TrkB	GDNF	GFR- α 1	RET
ST-2	++	-	+	+	-
MC3T3-E1	+	-	-	++	-
MLO-Y4	++	-	++	+	+
ATDC5	+	-	+	+	+

考察と結論

結果から以下の可能性が考えられた。

1. 骨の細胞が作る神経栄養因子がオートクラインに働くことにより、骨の細胞自身の機能維持と安定に作用している可能性
2. 骨の細胞が作った神経栄養因子がその受容体をもつ周辺細胞、例えば骨組織の神経細胞などに働き、骨組織全体の機能維持と安定に作用している可能性、
3. 骨の細胞が作る神経栄養因子が血中に放出され、受容体を持つ脳や他の臓器の細胞に遠隔的に作用している可能性

これらのことから、骨組織が産生する神経栄養因子が骨組織または他臓器に作用している可能性が考えられた。

参考文献

1. Sato M, Asada N, Kawano Y, Wakahashi K, Minagawa K,

アメロジェニンの遺伝子配列の相同領域とマイクロ RNA について

43090058 山内美智子

指導教員：藤沢隆一(口腔分子生物学教室)

キーワード：アメロジェニン, マイクロ RNA, インترون

諸言

アメロジェニンは、エナメルマトリックスタンパク質の約90%を占めるタンパク質である。アメロジェニンはエナメル質の石灰化とともに分解され、エナメル質中のアパタイト結晶が成長するスペースを確保している。

今回の研究では、ヒトとその他の動物とのアメロジェニン遺伝子の塩基配列データを比較し、いくつかのデータ間に相同領域がどのように存在するかを調べ、ヒトとその他の動物のエナメル質の発生における、その意義を考える。

方法

塩基配列データベースを専門のサイトから引用し、解析システムを用いて解析し、比較した。利用したサイト、解析ツールは、DDBJ、ARSA、clustalW、BLAST、miRBase、DrKazuなどである。

結果

哺乳類と爬虫類のアメロジェニン遺伝子のアミノ酸配列をいくつか引用し、相同領域の存在を調べた。相同領域とは、アミノ酸の配列が動物間で共通の配列を持っており、それが連続的に密集している部分である。その結果、3つの相同領域があることが分かった。相同領域1はN末端部分にあり、シグナルペプチド上に存在し、相同領域2はリン酸化部位に存在し、相同領域3はC末端部分にあり、親水性領域に存在した。

次に、パンダ、ネコ、フェレット、ヒツジ、オランウータン、ヒトのアメロジェニン遺伝子の塩基配列のデータを引用して比較した。そうすると、エキソン上だけでなく、イントロン上でも相同性は高いことがわかった。イントロンは通常、スプライシングの過程で捨てられてしまう部分であるが、保存されている部分があるということがわかった。また、そのようなイントロン部分での相同性の高い領域では、マイクロ RNA がいくつか見つかった。マイクロ RNA とは、タンパク質に翻訳されず機能する、細胞内に存在する長さ20から25塩基ほどの小さなRNAのことをいい、他の遺伝子の翻訳を調節する。マイクロ RNA はイントロン2の相同領域3に重なっていた。(図)

考察

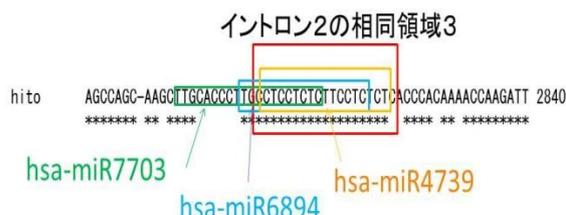
相同領域1はシグナルペプチドに存在しており、アメロジェニンが正常に分泌されるにはシグナルペプチドが重要な役割を担っている。相同領域3は親水性領域にあり、分子集合体であるナノ・スフェア形成やアメロジェニンとエナメル質結晶との吸着反応に必須の存在である。

タンパク質翻訳領域以外で遺伝子配列に相同性が見られることから、タンパク質として翻訳されて機能を行っているのではなく、DNAとして機能している領域があるのかもしれない。

マイクロ RNA 配列がイントロン上での相同領域に重なって見られたのは、miRNAとして機能しているためこの部分も保存されていると考えられる。

参考文献

DDBJの利用法、五條掘 孝、菅原 秀明 編、2005年、共立出版、東京



アメロジェニンのプロモーター内における転写因子結合領域について

43090060 余 冠楠

指導教員：藤沢隆一（口腔分子生化学）

キーワード：アメロジェニン、プロモーター、転写因子、ホメオタンパク質、CdxA

諸言

エナメル質内のタンパク質は、象牙質や骨と異なり、コラーゲン含まず、アメロジェニンやエナメルリンなどであり、エナメル質形成期の構造の形成を助けるという機能がある。それらは石灰化とともに分解される。

本研究では、アメロジェニンのプロモーター領域をヒトといろいろな生物について比較した。そして、転写因子結合領域を通じて、アメロジェニンの発現がどのようにコントロールされているかを明らかにする。

方法

DDBJ (DNA Data Bank of Japan) という塩基配列・アミノ酸配列のデータベースを用いた。ARSA は高速なキーワード検索ツールである。ClustalW は塩基配列・アミノ酸配列の多重配列と系統樹作成のツールである。BLAST は相同性を検索するツールである。DrKazu は転写因子結合部位を調べることができる。

結果

7種類の動物アメロジェニンタンパク質配列内には、3つの相同領域があることが分かった。相同領域1はN末端部分にあり、シグナルペプチド上に存在し、相同領域2はリン酸化部位に存在し、相同領域3はC末端部分にあり、親水性領域に存在している。

ヒトアメロジェニン遺伝子はエキソン1から7、イントロンが1から6まで存在する。エキソン2の始まりからタンパク質開始コドン（メチオニン）が出現し、タンパク質翻訳領域になっている。エキソン6が425塩基と最も多く、主な翻訳領域はエキソン6に存在する。エキソン7の最初にある終止コドンでタンパク質翻訳領域は終了する。これらの性質はすべての動物で共通している。

エキソン1の前の約600塩基のプロモーター領域を調べた結果、ヒト、ウマ、ネズミでほとんどの塩基が相同性を持っているが、エキソン1の35塩基前に存在するTATAboxは特に相同性が確認された。転写因子結合領域で多かったのが、SREBP（脂質合成に関する転写因子）、CdxA（形態形成に関わるホメオタンパク）、SRY（哺乳類において性決定に関わる転写因子）、Oct-1（オクタマーと呼ばれる8塩基を認識する転写因子）の4種類である。（図）

考察

4種類の転写因子の中で歯の形成に関わっているものは、ホメオタンパク質であることが知られている。例えば、顎骨の発生でも、位置ごとに異なる組み合わせのホメオボックス遺伝子が発現し、顎骨の中にできた歯堤を大臼歯や小臼歯、犬歯、切歯にそれぞれ誘導する。

以上のように、CdxAはホメオタンパク質の一つなので、歯の形成にかかわり、アメロジェニンの発現をコントロールしている可能性があると考えられる。



下顎中切歯と側切歯の根管形態について

43090003 有田 恵利奈

指導教官：山本 恒之（硬組織発生物学教室）

キーワード：下顎中切歯、下顎側切歯、根管形態

諸言

根管治療を確実に行う上で根管形態を理解、把握することは非常に重要である。下顎切歯の根管形態は単純であり、比較的根管治療が容易と言われている。研究実習を機会に、単純根管の割合はどのくらいなのか、他の根管形態は出現しないのかなど、同歯の根管形態を実際に把握したいという思いから本研究を行った。方法としては根管形態の観察に最も信頼のおける透明標本を用いた。

材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生物学教室が所有し、10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面にう蝕がない下顎中切歯（右 35 本、左 33 本）、下顎側切歯（右 38 本、左 31 本）の計 138 本を材料とした。なお、提供者の年齢、性別等は不明であった。60℃、30%水酸化カリウムを用いて、歯牙表面の軟組織を化学的に除去した後、5%ギ酸水溶液で3週間脱灰した。墨汁とともに歯牙をピーカーに入れて真空容器内に置き、陰圧を利用して根管内に墨汁を流入させた。70%、80%、90%、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水したあと、サリチル酸メチルに2日間浸漬して透明にした。ついでスチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1：1混合液、純レジン（硬化剤入り）の順に標本を浸漬、レジンに浸透させた。重合前に標本の余剰なレジンをはき取り、紫外線重合器で1日間重合した。

結果

根管形態を以下の3種類に分類し、結果を表にした。

1. 単純根管：1本の根管が1つの根尖孔に開孔する
2. 不完全分岐根管：2本の根管が合わさって、1つの根尖孔に開孔する
3. 完全分岐根管：2本の根管が2つ以上の根尖孔に開孔する

〈下顎中切歯〉

	右	左	合計
単純根管	32本 (91.4%)	33本 (100%)	65本 (95.6%)
不完全分岐根管	2本 (5.7%)	0本 (0%)	2本 (2.9%)
完全分岐根管	1本 (2.9%)	0本 (0%)	1本 (1.5%)

〈下顎側切歯〉

	右	左	合計
単純根管	32本 (84.2%)	26本 (83.9%)	58本 (84.1%)
不完全分岐根管	6本 (15.8%)	5本 (16.1%)	11本 (15.9%)
完全分岐根管	0本 (0%)	0本 (0%)	0本 (0%)

考察

過去の文献における3種の根管形態の出現頻度を以下に示す。

	歯の解剖学入門 1)	グロス マン エン ド ド ン テ ィ ク ス ²⁾	倉地 ³⁾
単純根管	90.3% 74.3%	70%	95.6% 91.5%
不完全分岐根管	1.9% 21.8%	27%	4.4% 8.5%
完全分岐根管	7.7% 4.0%	3%	0% 0%
観察方法	不明	透明標本	透明標本

（二段表示は上段：中切歯、下段：側切歯の結果を示す）

不完全分岐根管は単純根管の経年的変化により生じると言われている。そこで、年齢による影響をなくすため『単純根管＋不完全分岐根管』と『完全分岐根管』とを比較した。本研究を含め、いずれにおいても下顎中切歯の9割以上が単純または不完全分岐根管ということが明らかとなった。下顎側切歯に関しては、下顎中切歯よりも不完全分岐根管の出現頻度が高いという点がいずれの研究も共通していた。ゆえに、下顎側切歯の根管治療において、特に患者さんが高齢者の場合には分岐根管の存在に注意を払う必要がある。今回の経験を今後の確実な根管治療に役立てたい。

参考文献

1. グロスマンエンドドンティクス 鈴木賢策 訳 グロスマン 1989年 166-167頁 医歯薬出版 東京
2. 歯の解剖学入門 赤井三千男 1990年 医歯薬出版 東京
3. 倉地美貴子 下顎中切歯と側切歯の根管形態について 研究実習論文報告書 第8号 47頁 2006-2007

下顎中切歯・側切歯の側枝と根尖分岐について

43090011 岡崎 史枝

指導教官 山本 恒之(硬組織発生生物学教室)

キーワード 歯牙透明標本、側枝、根尖分岐

緒言

歯根での根管の複雑化は、臨床、特に根管治療において注意を払うべき最重要事項である。根管の複雑な形態のなかに根尖分岐や側枝¹⁾が含まれる。側枝や根尖分岐に対しても根管充填を厳密に行う必要があることを理論では知っている。ただ、側枝や根尖分岐をいままで見たことがなかったため、この理論を実際のイメージとしてとらえられなかった。そこで、側枝と根尖分岐とはどのようなものなのか、およびそれらの出現頻度はどの程度なのかを知りたいと思い、本研究を行うことにした。材料として根管形態が比較的単純で、側枝、根尖分岐が観察しやすいと思われる下顎中、側切歯を選んだ。

材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室所有の、10%ホルマリン溶液中に保存してあった根面にう蝕がない完成した下顎中切歯(右12本、左12本)、下顎側切歯(右11本、左11本)を材料とした。なお、提供者の年齢、性別等は不明であった。60℃、30%水酸化カリウムを用いて歯牙表面の軟組織を化学的に除去した後、5%ギ酸水溶液で3週間脱灰した。墨汁とともに歯牙をビーカーに入れて真空容器内に置き、陰圧で根管内に墨汁を流入させた。70%、80%、90%、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルに2日間浸漬して透明にした。ついでスチレンモノマー：ポリエステルレジン(リゴラック)の1:1混合液純レジン(硬化剤入り)の順に標本を浸漬しレジンに浸透させた。重合前に標本の余剰なレジンをふき取り、紫外線重合器で1日間重合した。

結果

下顎中切歯には1本、側切歯には3本の根尖分岐を観察することができ、出現頻度は、各々4.1%、13.6%であった。また、今回の実験では側枝を観察することはできなかった。

考察

グロスマンエンドドンティクス²⁾によれば、根尖分岐を持つ割合は下顎中切歯で5%、下顎側切歯で6%、側枝を

持つ割合は下顎中切歯で20%、側切歯で18%と記されている。本研究もグロスマンと同じく透明標本を用いたにも関わらず、根尖分岐では特に側切歯に大きな差が見られ、側枝にいたっては本研究では観察できなかった。

上記の違いが生じた理由について考察する。まず、最も考えられるのは提供者の年齢である。根管は二次象牙質等の添加により、経年的に狭小化する。単純根管が不完全分岐根管となるのはその好例である。根尖分岐も同様に、あるものは経年的に縮小、消失すると言われている。すなわち、老年者では若年者よりも根尖分岐の出現頻度は小さくなると思われる。側枝に関しては、経年的に閉鎖するとの報告は見当たらないので、年齢による影響の有無はわからなかった。

次の理由として、例数の違いがある。グロスマンは100本用いているが、本研究では中切歯で24本、側切歯で22本しか用いなかった。以上から、年齢を統一し、標本数を増やしていけば、数値は一定値に収束し、より詳細な検討ができるものと思われる。

最後の理由として、人種差が挙げられる。根管形態に人種差があるという報告はないものの、歯冠形態では、たとえばカラベリー結節やシャベル型切歯には人種差が認められる。根管形態においても人種差があることは否定できないであろう。

感想

乳歯は側枝が多く、髄床底にも側枝が存在するため、充填時には髄床底までしっかり覆う必要があると習った。下顎中切歯と側切歯に限っては、予想に反して側枝はなかったものの、他歯種では側枝を観察できた。今回の研究実習を通して実際に見た側枝、根尖分岐の可能性を念頭におきながら、臨床の場で根管治療を行っていきたい。

参考文献

- 1) 歯の解剖学(第22版)
藤田恒太郎(1949、1995)/25~26 ページ/金原出版 1995/東京
- 2) グロスマンエンドドンティクス：松元仁・新田光朗
/Louis I. Frossman, Seymour Oliet Carols, and E. Del Rio(1997)/167 ページ/医歯薬出版/東京

下顎犬歯の根管形態について

43090020 木村 萌美

指導教官：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：下顎犬歯、根管形態、透明標本

諸言

確実な根管治療を行ううえで根管形態を把握することは非常に重要である。下顎犬歯は一般に根管形態が単純であるとされているが、分岐根管の出現が20%弱認められるという文献¹⁾²⁾もある。そこで、どのような根管形態がどの程度の頻度で同歯に出現するのかを、実際に目で見て確認したいと考え本研究を行った。

材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室が所有する、10%ホルマリン溶液中に保存されていた根面に齶蝕のない下顎犬歯（右38本、左34本）を材料とした。提供者の年齢、性別は不明であった。

60℃、30%水酸化カルシウム溶液を用いて歯牙表面の軟組織を化学的に除去した後、歯ブラシを用いてさらに清掃した。5%ギ酸水溶液に入れて3週間脱灰した後、標本を墨汁とともにビーカーに入れ真空容器内に置き、陰圧を用い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日ずつ脱色し、サリチル酸メチルに2日間浸漬して透明にした。スチレンモノマー、スチレンモノマー：ポリエステルレジンの1：1混合液、純ポリエステルレジンの順に標本を浸漬しレジンを浸透させた。重合直前に標本表面のレジンを筆でふき取り紫外線重合器で1日間重合した。

結果

根管形態は、単純根管（1本の根管が1つの根尖孔に開孔する）、不完全分岐根管（2本の根管が1つの根尖孔に開孔する）、完全分岐根管（2本の根管が2つ以上の根尖孔に開孔する）に分類できた。各々の出現頻度を表1に示す。

表1 下顎犬歯

	右	左	合計
単純根管	36本 (94.7%)	31本 (91.2%)	67本 (93.1%)
不完全分岐根管	2本 (5.3%)	3本 (8.8%)	5本 (6.9%)
完全分岐根管	0本 (0.0%)	0本 (0.0%)	0本 (0.0%)
合計	38本	34本	72本

考察

本研究と同じく下顎犬歯の根管形態を調べた文献にはグロスマンエンドドンティックス、カラーアトラスエンドドンティックスがある。透明標本を用いたことを明記してあるグロスマンエンドドンティックスのVertucciの結果（100例）と比較することにした。Vertucciは、

単純根管： 80.0%

不完全分岐根管：14.0%

完全分岐根管： 6.0%

と報告している。

不完全分岐根管は単純根管が経年的に圧平された結果、形成されると言われる。よって、単純根管と不完全分岐根管の出現頻度は歯牙抜去時の提供者の年齢に左右される。したがって提供者の年齢による影響をなくすために、単純根管と不完全分岐根管を1つの根管形態として比較することとし、改めて本研究の根管形態の出現頻度とVertucciの結果を表2に示す。

表2 各研究における根管形態の出現頻度

	本研究	Vertucci
単純根管、不完全分岐根管	100.0%	94.0%
完全分岐根管	0.0%	6.0%

2つの研究結果には完全分岐根管の有無で違いが見られた。その理由としては2つのことが考えられる。

1. 標本数が影響した。Vertucciは100本、本研究は72本の歯牙を使用している。これらの数は決して多いとはいえず、例数をさらに増やせば一定の数値に収束する可能性がある。

2. 人種差が影響した。グロスマンエンドドンティックスでは提供者が日本人以外のものであり、一方で、本研究の標本は日本人のものであると考えられる。根管形態に人種差が影響するという報告は見当たらないものの、歯冠形態では、たとえばカラベリー結節の出現率には人種差があることはよく知られている。人種差が根管形態に影響を与えることは否定できない。

これらを踏まえて、より正確な出現頻度を求めるのならば、歯牙提供者の年齢、人種を統一し、標本数を多くして考察する必要があるだろう。

今回の研究実習では、3種類の根管形態のほかに、根尖分岐や側枝も観察できた。3次元的に根管の形態を観察することによって、同じ単純根管でも唇舌的な幅の違いや、根管の蛇行も観察できた。

臨床の場で根管治療を行う際には下顎犬歯でも様々な根管形態が存在していることを念頭に置き、治療を行うことが大切だと分かった。さらには、X線写真や患者の年齢からできるだけ正確に根管形態を把握することが重要であると感じた。

参考文献

- グロスマンエンドドンティックス、鈴木賢策 松元仁 新田光朗 訳、Louis I.Grossman Seymour Oliet Carlos E.DelRio、p.167、1977年、医歯薬出版、東京
- カラーアトラスエンドドンティックス、斎藤毅 西川博文 中村洋 訳、C.J.R.Stock、p.121、1995年、医歯薬出版、東京

上顎第二大臼歯の近心頰側根の根管形態について

43090021 木村 雄太郎

指導教官：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：上顎第二大臼歯、根管形態、透明標本

諸言

確実な根管治療を行う際には様々なことを注意しなければならないが、なかでも根管形態を理解・把握するということは特に重要である。根管形態に関しては、多くの文献が存在しており¹⁾、いくつか読んでみたところ上顎第二大臼歯に関しては研究者によってばらつきがみられた。そこで本研究では透明標本を用いて同歯の、特に近心頰側根の根管形態を実際に観察し、過去の研究との比較を試みた。

材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室が所有し、10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面にう蝕がなく近心頰側根を含む3根をもつ上顎第二大臼歯（右41本、左48本）を材料とした。なお、提供者の年齢、性別等は不明であった。

60℃、30%水酸化カリウムを用いて、歯牙表面の軟組織を化学的に除去した後、5%ギ酸水溶液で3週間脱灰した。墨汁とともに歯牙をビーカーに入れて真空容器内に置き、陰圧を利用して根管内に墨汁を流入させた。70%、80%、90%、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水したあと、サリチル酸メチルに2日間浸漬して透明にした。ついでスチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1：1混合液、純レジン（硬化剤入り）の順に標本を浸漬しレジンに浸透させた。重合前に標本の余剰なレジンをはき取り、紫外線重合器で1日間重合した。

結果

一般に根管形態は以下の3種類に分類される。本研究でもこれに従うこととした。

- ①単純根管：1本の根管が1つの根尖孔に開孔する。
- ②不完全分岐根管：2本の根管が合わさって、1つの根尖孔に開孔する。
- ③完全分岐根管：2本の根管が2つ以上の根尖孔に開孔する。

3種類の根管形態の出現頻度を以下に示す。

	右	左	合計
単純根管	26本 (63.4%)	40本 (83.3%)	66本 (74.2%)
不完全分岐根管	5本 (12.2%)	3本 (6.3%)	8本 (9.0%)
完全分岐根管	10本 (24.4%)	5本 (10.4%)	15本 (16.9%)

考察

過去の文献における上顎第二大臼歯の根管形態の出現頻度を以下に示す²⁾。

研究者	Pineda and Kuttler (294本)	Vertucci (100本)
単純根管	79.0%	71.0%
不完全分岐根管	8.2%	17.0%
完全分岐根管	12.8%	12.0%
観察方法	抜去歯 X線写真	透明標本

一般に不完全分岐根管は単純根管が加齢とともに扁平・狭窄されて形成されると考えられている。本研究では提供者の年齢が不明であるので、年齢による影響をなくするため、単純根管と不完全分岐根管の2つをあわせて1つの根管形態として扱うことにする。

本研究と過去の研究を比較すると単純根管と不完全分岐根管の合計は、本研究、Pineda and Kuttler、Vertucciの順に83.2%、87.2%、88.0%であり、完全分岐根管は16.9%、12.8%、12.0%である。このことから多少の誤差はあるものの、上顎第二大臼歯の近心頰側根はその15%程度、あるいはそれ以上が分岐根管（完全および不完全分岐根管）ということになり、根管治療の際にはこの数字を意識する必要がある。

本研究と過去の研究とで出現頻度に差が現れた理由としては以下が考えられる。

- ①標本数が根管形態を統計的に把握するには不十分な数であった。さらに標本数を増やせば、一定値に収束すると思われる。
- ②過去の文献では、歯牙提供者はおそらく外国人であるのに対し、本研究ではほとんどが日本人と思われる。根管形態に人種差があるという報告は見当たらなかったものの、歯冠形態のあるもの（カラベリー結節など）には、はっきりと人種差が現れる。人種差の影響は否定できないと思われる。

上顎第一大臼歯近心頰側根のほぼ半数が2根管性であるということは習っていたが、今回の研究実習で第二大臼歯同根にも2根管性が多いことを実感した。さらに、初めて根管形態を三次元的に観察し、根管形態が複雑であることを改めて認識できた。この経験をこれからの臨床の場において有意義に活用していきたい。

参考文献

1. 歯の解剖学 第22版 藤田恒太郎、86-88頁、1949年、金原出版、東京
2. グロスマンエンドドンティックス 11th ed. 鈴木賢 策松元仁 新田光朗 訳、Louis I. Grossman Seymour Oliet Carlos E. DelRio、p.165、1977年、医歯薬出版、東京

上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について

43090034 千葉 彩乃

指導教官：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：上顎中切歯、側枝、根尖分岐、透明標本

諸言

根管治療は歯科治療において基本的で重要な分野であり、治療にあたり根管形態の理解・把握は必要不可欠である。

重要な根管形態の中には側枝と根尖分岐が含まれる。これらについて詳細に知りたいという思いから、本研究では側枝と根尖分岐が観察しやすいと思われる上顎中切歯を選び、両者がどの程度出現するかを検討することにした。観察には第30期生の研究実習にて考案されたレジン包埋した透明標本を用いた¹⁾。

材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室所有の、10%ホルマリン溶液中に保存してあった根面にう蝕がない完成した上顎中切歯（右43本、左31本）を材料とした。なお、提供者の年齢、性別等は不明であった。60℃、30%水酸化カリウムを用いて歯牙表面の軟組織を化学的に除去した後、5%硝酸水溶液で3週間脱灰した。墨汁とともに歯牙をビーカーに入れて真空容器内に置き、陰圧で根管内に墨汁を流入させた。70%、80%、90%、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水したあと、サリチル酸メチルに2日間浸漬して透明にした。ついでスチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1:1混合液、純レジン（硬化剤入り）の順に標本を浸漬しレジンを浸透させた。重合前に標本の余剰なレジンをふき取り紫外線重合器で1日間重合した。

結果

須田²⁾は根尖分岐をセメント質内で分岐する構造と定義した。上顎中切歯根尖のセメント質を切片上で観察したところ1.0mmを超える厚さのものなかったため、須田は根尖分岐と側枝を各々根尖から1mm以内で、側枝はそれ以上の高さで分かれるものと区別した。また、根尖分岐と側枝のいずれも持たない根管を直根管とした。本研究も須田による4種類の根管形態の分類法（直根管、根尖分岐のみもつもの、側枝のみもつもの、根尖分岐と側枝のいずれももつもの）を踏襲し、各々の頻度を算出し以下にまとめた。

	右	左	計
直根管	15本 (34.9%)	12本 (38.7%)	27本 (36.5%)
根尖分岐	6本 (14.0%)	5本 (16.1%)	11本 (14.9%)
側枝	17本 (39.5%)	8本 (25.8%)	25本 (33.8%)
根尖分岐 +側枝	5本 (11.6%)	6本 (19.4%)	11本 (14.9%)
計	43本	31本	74本

考察

本研究において上顎中切歯では、少なくとも側枝と根尖分岐のどちらかを持つものの出現頻度は直根管のおよそ2倍はあることが分かった。歯の解剖学入門³⁾では、直根管44.4%、根尖分岐13.9%、側枝38.4%、根尖分岐+側枝3.3%であり、本研究と違いが認められた。歯の解剖学入門では観察歯数と観察方法は不明である。本研究では根管形態を把握する上で、最も信頼のおける透明標本を用い根尖分岐と側枝の区別も厳密に行った。そこで本研究は標本数は少ないものの正確な数値を示していると考ええる。更に厳密に調べるなら、例数を増やし、観察法や判別法を統一する必要があるだろう。また、根尖分岐には経年的狭窄による閉鎖があるとの報告もある。したがって、歯の提供者の年齢も考慮しなければならない。

歯の解剖学入門では、ドイツ人の上顎中切歯について記載されており、根尖分岐25%、側枝21%の頻度であった。本研究結果とは反対に根尖分岐の頻度が側枝より高くなっている。根管形態は人種により差があるとの報告は見当たらなかった。しかしながら、歯冠形態のあるもの（シャベル型切歯など）には人種差があることはよく知られているので、人種差による影響も否定できないのではないかと考える³⁾。

参考文献

- 1)桜場一郎 歯牙透明標本のレジン包埋のついて 第30期生研究実習論文報告書第2号49頁2001
- 2)須田有紀子 上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について 第40期生研究実習論文報告書第12号46頁2010
- 3)歯の解剖学入門 赤井三千男 31頁1993 医歯薬出版 東京

上顎第二小臼歯の根管形態について

43090041 浜谷 絵里

担当教官：山本 恒之（口腔解剖学第二講座）

キーワード：上顎第二小臼歯、根管形態、透明標本

諸言

臨床歯科医学の基礎を成す根管治療を的確に行うためには根管形態についての知識は重要である。上顎小臼歯に関しては、第一小臼歯の根管形態が複雑であることは教科書等によく記載されている。一方、第二小臼歯については、第一小臼歯よりも記載が少ないようである。そこで研究実習を機会に、上顎第二小臼歯の根管形態を調べたいと思い本研究を行った。

方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室が所有し、10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面にう蝕がなく単根性の上顎第二小臼歯（右 38 本、左 45 本）を材料とした。なお、提供者の年齢、性別等は不明であった。

60℃、30%水酸化カリウムを用いて、歯牙表面の軟組織を化学的に除去した後、5%ギ酸水溶液で3週間脱灰した。墨汁とともに歯牙をビーカーに入れて真空容器内に置き、陰圧を利用して根管内に墨汁を流入させた。70%、80%、90%、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルに2日間浸漬して透明にした。ついでスチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1：1混合液、純レジン（硬化剤入り）の順に標本を浸漬、レジンを浸透させた。重合前に標本の余剰なレジンをふき取り紫外線重合器で1日間重合した。¹⁾

結果

根管形態は分岐の状態から以下の3種類に分類することができた²⁾。

- 1) 1本の根管が1つの根尖孔に開孔する単純根管
- 2) 2本の根管が2つ以上の根尖孔に開孔する完全分岐根管
- 3) 2本の根管が合わさって1つの根尖孔に開孔する不完全分岐根管

上顎第二小臼歯における3種類の根管形態の出現頻度を表1で示した。左右とも約半数に単純根管がみられた。残りはほとんど不完全分岐根管で、完全分岐根管は83本中わずか6本のみに見られた。

表1

	右	左	計
単純根管	19(50.0%)	25(55.5%)	44(53.0%)
完全分岐根管	3(7.8%)	3(6.7%)	6(7.2%)
不完全分岐根管	16(42.1%)	17(37.8%)	33(39.8%)
計	38(100%)	45(100%)	83(100%)

考察

加齢による二次象牙質の形成や齶蝕による局所的な修復象牙質の形成のため、経年的に根管は近遠心的に圧平され、結果、単純根管が不完全分岐根管になるとされている。本研究では歯牙提供者の年齢が不明なため、単純根管と不完全分岐根管の出現頻度を論じてあまり意味がない。そこで「単純根管+不完全分岐根管」と「完全分岐根管」の2グループで考察する。さらに、2根性の上顎第二小臼歯は全体の約10%であり、その根管は完全分岐根管であると考へ、単根性と2根性をあわせた上顎第二小臼歯全体での根管形態の出現頻度を計算し直した。結果、完全分岐根管16.5%、不完全分岐根管と単純根管を合わせて83.5%となった。日本人以外の標本を使った外国の研究では、完全分岐根管の出現頻度は18.2%、不完全分岐根管と単純根管を合わせてものは81.8%である³⁾。本研究とは若干の差がある。差の理由に関しては、1) 標本数を多くすればこの差が小さくなり一定値に収束する、2) 人種差を反映している、の2つがあるものの、これ以上は考察できなかった。

根管形態の分類を、単純根管、不完全分岐根管、完全分岐根管の3種類とし論述したが、実際の根管形態はより複雑であった。他歯種では網目状の根管や、根管が根尖部、とくにセメント質の中で2本または数本に分かれる根尖分岐も観察できた。

今回の研究実習から、上顎第二小臼歯の根管の2割弱は分岐根管であることがわかった。さらに同一歯種においても根管が様々な形態をしていることがわかり、根管治療が考えていた以上に難しいことを改めて実感した。根管の複雑性をつねに認識し実際の臨床に臨みたいと思う。

参考文献

- 1) 桜庭一郎：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)研究実習論文報告書(第二号):49-50、2001
- 2) 藤田恒太郎:歯の解剖学(第22版)、桐野忠大、山下靖雄、p68-70、1995、金原出版、東京
- 3) Louis I.Frossman,Seymour Oliet Carols,and E.Del Rio:グロスマンエンドドンティックス、鈴木賢策、p161-162、1997、医歯薬出版、東京

歯根吸収抑制のための水酸化カルシウムの象牙質内拡散評価

43090039 西澤 秀一

指導教員：八若 保孝 (小児・障害者歯科学教室)

赤坂 司 (生体材料工学教室)

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

諸言

破歯細胞は歯根表面に緊密に接着し、接着部分で酸と酵素を分泌して、無機質の脱灰と有機質の溶解を起こし歯根を吸収する。水酸化カルシウム剤による根管充填は、象牙細管を經由して塩基性イオンを拡散させることにより、破歯細胞の産生する酸を中和し、病的歯根吸収を抑制すると考えられ、臨床応用されている¹⁾。根管治療の臨床現場では、リーミング・ファイリングによる機械的清掃と、薬剤による化学的清掃がなされている²⁾。しかし、機械的清掃後の根管壁には、スメア層が形成される。このスメア層は象牙細管の開口部を閉塞し、その後の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^{3,4)}。そこで本研究では、1) 効率的なスメア層除去の方法を検討し、2) 水酸化カルシウムの象牙質内の拡散を評価した。

材料と方法

1) 根管洗浄方法の検討

抜去されたヒト永久歯(単根・単根管) 15 歯を K ファイルで #80 まで根管拡大・根管形成を行い、3 歯ずつ 5 グループに分類し、以下の 5 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)→※ (※は交互洗浄, 以下同様)
- G3: 5%EDTA(超音波洗浄) →※
- G4: 5%NaOCl(超音波洗浄)→5%EDTA(超音波洗浄) →※
- G5: 5%EDTA(超音波洗浄)→5%NaOCl(超音波洗浄) →※

超音波洗浄は、Osada ENAC 10W にエンドチップを装着、power1 で使用し、根管内に薬液を満した状態で、各洗浄液につき 45 秒間ずつ行った。また全てのグループにおいて、最後に交互洗浄を行った。洗浄後、歯を歯軸に沿って二分割し、走査型電子顕微鏡 (SEM: 日立 S-4000) にて観察した。無作為に選択した根中央部の 5 箇所、根尖部の 3 箇所の SEM 写真を撮影し、これを使用して象牙細管の開口率を数値化した。

2) 水酸化カルシウムの象牙質内拡散評価

8 歯を各 G1 と G5 の方法で洗浄した後、歯根表面中央部に人工的に吸収窩を 2 か所形成した。2 歯ずつ 4 グループに分け、根管内に水酸化カルシウム剤三種(カルシペックス、ビタペックス、水酸化カルシウム+生理食塩水)および、水酸化ストロンチウム+生理食塩水を根管充填した。根管口と根充剤をレジンで塞いだ歯を 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 pH による色調変化を 4 週間観察した。その後、歯を取り出して割断し、象牙質内の吸収窩方向への塩基性イオンの拡散を計測し比較した。計測方法には、根管から吸収窩までの距離 (do) と染色された距離 (d) の比 (赤変長比 d/do) を用いた (図 1)。



図 1 象牙質内塩基性拡散の計測方法

結果

1) 根管洗浄方法の検討

SEM による観察から、G1、G2 では象牙細管の開口はあまり認められなかったが、G3、G4、G5 では多くの象牙細管が開いた(図 2)。全ての洗浄条件において、根尖部より根中央部でより多く開いた。開口率を計測した結果、G4、G5 の根中央部では 90%以上の高い開口率を示した(図 3)。

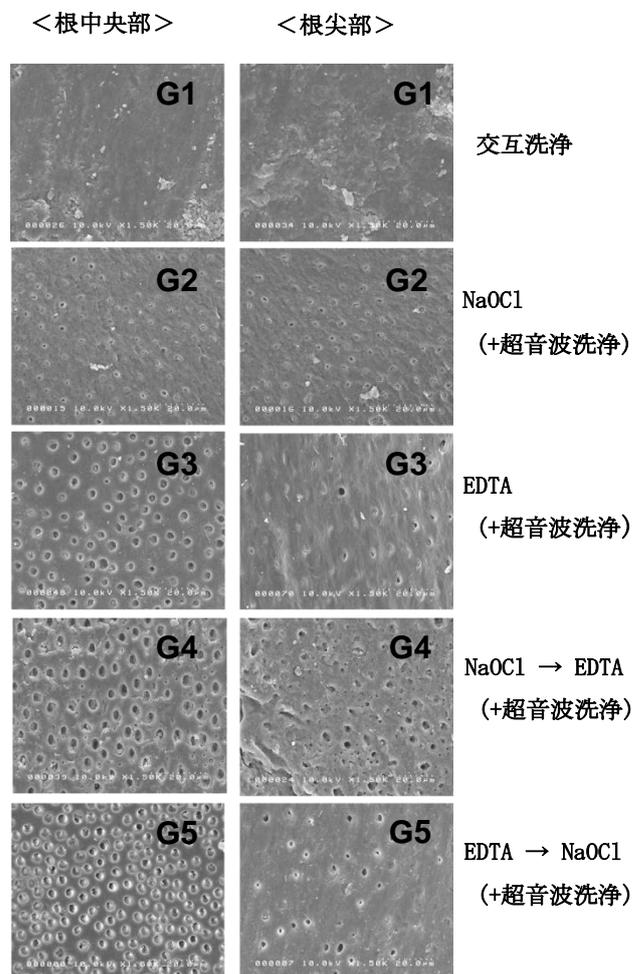


図 2 各洗浄処理後の根管壁の SEM 観察

2) 水酸化カルシウムの象牙質内拡散評価

寒天培地の色の変化においては、塩基性イオンの拡散が寒天培地内に及んでいるものと、吸収窩表面に局限しているものがあり、水酸化カルシウム剤により拡散の様子に違いが見られた（図4）。

吸収窩方向へのイオンの拡散については、水酸化ストロンチウムにおいて高い拡散性が認められた。水酸化カルシウム以外では象牙細管の開口率と塩基性イオンの拡散に相関性が認められた。水酸化カルシウムでは他の製剤とは逆の結果となった。（図5）。

考察

根管洗浄において、EDTA と NaOCl を使用した超音波洗浄が高い洗浄効果を示した。すべての洗浄方法で、根中央部に比較して根尖部の開口率は低い値となったことは、根尖部の形態学的要因や手技的要因から、超音波による洗浄効果が根尖まで行き届かない可能性が示唆された。

塩基性イオンの拡散において、拡散の様子は水酸化カルシウム剤により異なっていた。その原因のひとつとして、水酸化カルシウム剤の親水性の違いが考えられた。特に水酸化ストロンチウムの親水性が一番高いと推測された。

水酸化カルシウムの拡散性が他の製剤と異なる結果となったのは、他の根充剤と比較し水酸化カルシウム糊剤は流れが悪く、また、吸収窩を作るときに根管に近接しすぎたことも原因として考えられた。

結論

1. EDTA、NaOCl、超音波洗浄を併用する洗浄方法は、開口率の増加に効果があると考えられた。
2. 水酸化カルシウム剤の根管充填は、塩基性イオンの拡散により吸収窩において中和作用をもたらし、歯根吸収抑制効果が期待できると考えられた。
3. 水酸化ストロンチウム単体では他の製剤と同等以上に象牙質内に塩基性イオンが拡散した。

参考文献

- 1) 荒木孝二：根管貼薬に水酸化カルシウムを使う理由，NEW エンドドンテリックス，医歯薬出版株式会社，東京，1999，pp.102-110.
- 2) 片岡博樹：根管洗浄の重要性，NEW エンドドンテリックス，医歯薬出版株式会社，東京，1999，pp.94-101.
- 3) Jeen-Nee Lui et al. : Effect of EDTA with and without Surfactants or Ultrasonics on Removal of Smear Layer, J. Endod., 33: 472-475, 2007.
- 4) Clegg et al. : The Effect of Exposure to Irrigant Solutions Apical Dentin Biofilms In Vitro, J. Endod., 32: 434-436, 2006

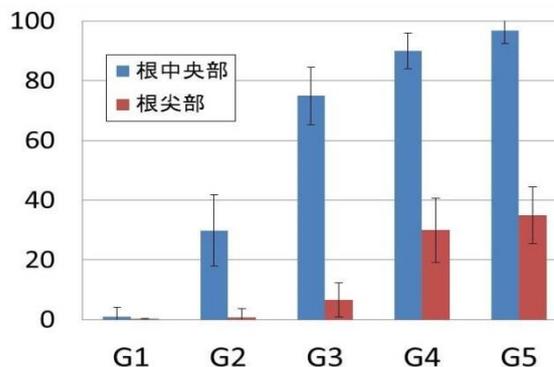


図3 各洗浄方法での象牙細管開口率(%)

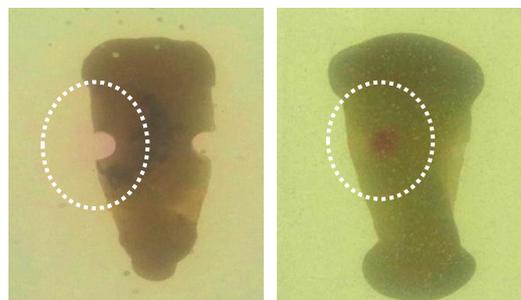


図4 塩基性イオン拡散による赤変部位の観察

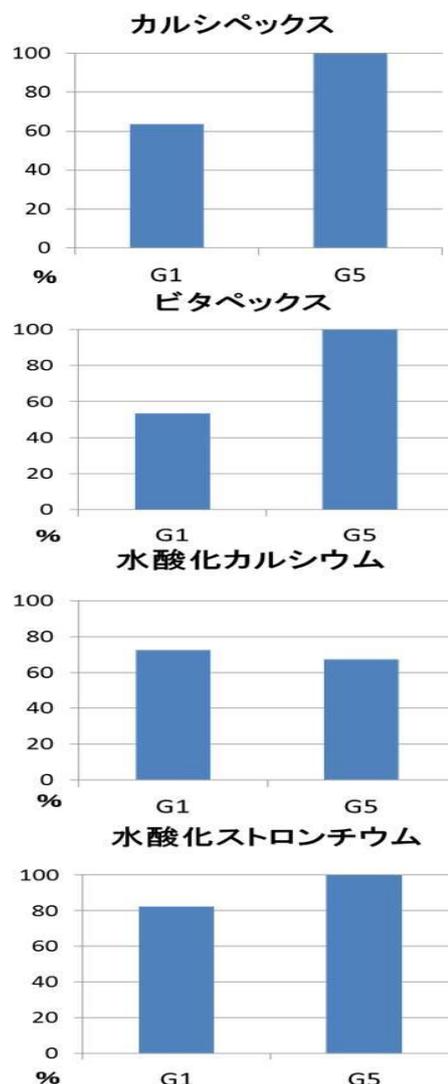


図5 象牙質内塩基性拡散による赤変長比

高分子接着剤と非貴金属との直接接着に与える大気圧低温プラズマ照射の効果

43090053 宮西 華子

指導教員：山方 秀一(歯科矯正学教室)

キーワード：接着、ダイレクトボンディング法、大気圧低温プラズマ、金属、表面改質

諸言

金属歯冠修復物へのダイレクトボンディングが必要となる例は少なくない。貴金属合金に対する接着前処理には、硫黄含有プライマー処理が表面改質法の主流となっている。しかし、高エネルギー表面である金属表面には瞬時に水や有機物などの汚れが吸着するため、プライマーによる処理効果を十分に得ることは困難である。実際、このような影響を防ぎ、高密度で金属と硫黄を結合させ得る清浄化処理は実用に至っていない。

プラズマ処理は、化学薬品を用いずに材料表面を改質できる技術として注目されている¹⁾。我々は、高い活性化能を有しながら対象物に熱的ダメージを与えないという利点を有する大気圧低温プラズマを、口腔への応用が期待できる新しい技術として注目している。本研究の目的は、表面改質効果を評価しやすいステンレス鋼を利用し、ペン型大気圧低温プラズマ装置による表面清浄化能および表面活性化能に関する実験的考察を行うことである。

方法

試料には、表面非処理群として脱イオン水で耐水研磨紙による#8000 までの鏡面研磨を行ったステンレス鋼 (SUS430) 板を用いた。さらに、それを大気圧低温プラズマ、耐水研磨紙(#1000)、貴金属用プライマー (V プライマー、サンメディカル、滋賀) の単独または組み合わせで処理した 5 種の表面改質群を用意した。

プラズマ装置にはペン型大気圧プラズマ装置 (P500-SM、魁半導体、京都) および窒素ガスを用いた。SUS 板のぬれ性評価には接触角計 (DMS-200、協和界面科学、埼玉) を用い、静滴法による接触角測定を行った。まず、プラズマ照射時間依存性として、照射時間を 5 秒から 30 秒まで 5 秒毎に設定した実験を、照射距離依存性として、照射距離を 10 mm から 50 mm まで 10 mm 毎に設定した実験を各 30 回行った。次に、3 種の液体(超純水およびグリセリン、ヘキサデカン)を各 7 回ずつ計測して得た接触角 θ に基づ

き、Young-Dupre の式、拡張 Fowkes 式を用いた表面エネルギー解析を行った²⁾。

XPS 測定には光電子分光装置 (JPS-9200、日本電子、東京) を用い、プラズマ処理とプライマー処理の有無の組み合わせで決まる表面 4 種を測定した。剪断試験では、SUS 板とリングボタン (トミーインターナショナル、東京) とをスーパーボンド C&B (サンメディカル、滋賀) で接着し、万能試験機 (4202 型、インストロン、MA、USA) を用いて各 10 回ずつの試験を実施した。

統計学的処理として、正規性の検定 (Shapiro-Wilk)、等分散性の検定 (Levene)、分散分析とそのポストホック比較 (One-way ANOVA と Tukey もしくは Kruskal-Wallis と Dunnett T3) をそれぞれ有意水準 5% で行った。

結果

照射時間依存性については、すべてのデータ間に有意差はなく、照射は 5 秒で十分なことがわかった (図 1)。照射距離依存性については、照射距離 10 mm に対し 40 mm 以上で接触角が有意に大きくなることがわかった (図 2)。

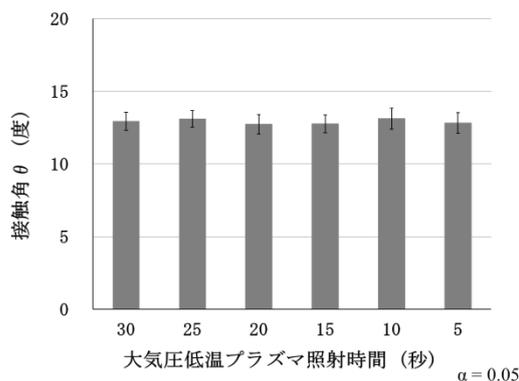


図1 接触角の大気圧低温プラズマ処理時間依存性

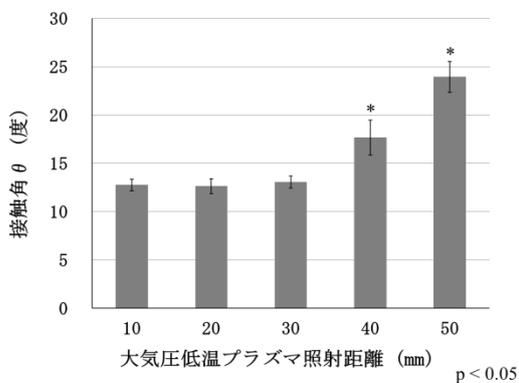


図2 接触角の大気圧低温プラズマ照射距離依存性

ステンレスの表面エネルギーと各成分の比率については、表面エネルギーはプラズマにより 73.6 mJ/m^2 から

112.9 mJ/m²へと増加したが、その主体は双極子成分であり、水素結合成分の増加はわずかだった(図3)。XPS測定の結果から、すべてに存在する530 eVのピークは金属酸化物の酸素によるものであり、531.5 eVの水酸基によるピークはプラズマ処理単独の場合のみに認められることがわかった(図4)。剪断試験の結果から、プライマー処理を行っていない群の剪断強さは30 MPa以上と高く、なかでもプラズマ処理群が最大であった。なお、すべてのデータ間に有意差は認められなかった(図5)。

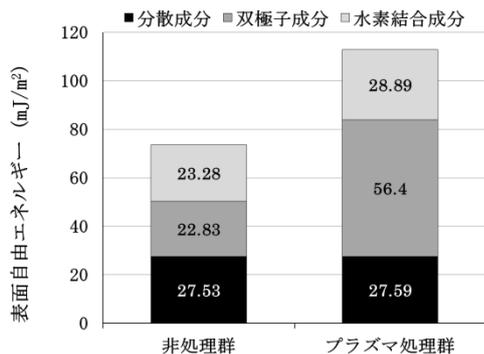


図3 SUS430の表面自由エネルギーおよびその各成分の変化

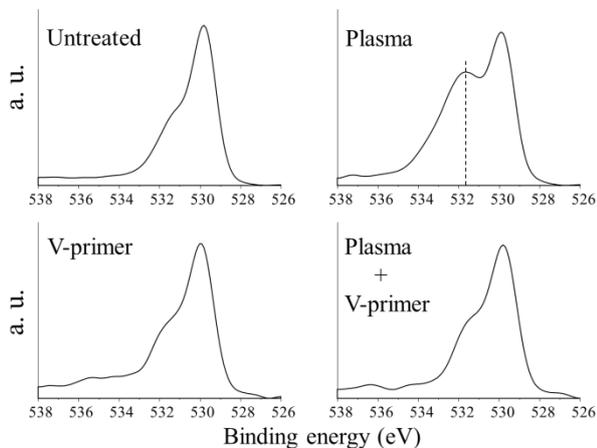


図4 XPS測定の結果 (O_{1s}スペクトル)

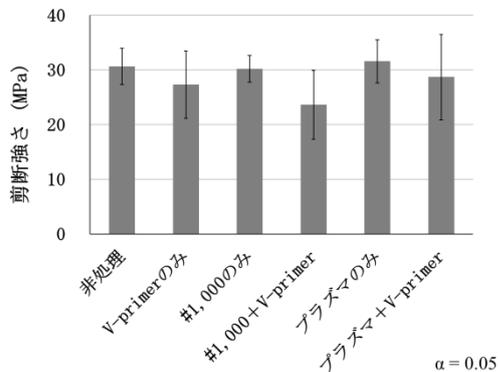


図5 表面改質種別の剪断強さ

考察

Kibayashi らは、チタン純金属への大気圧プラズマ処理の効果調べた報告において、接着強さの向上は表面清浄化の結果として増加した双極子成分と水素結合成分によるものと結論付けている²⁾。しかし、本研究で得られた剪断強さは金属-接着剤間の化学結合によると推測される非常に高い値であったため、双極子成分および水素結合成分による強さの増加は軽微な比率にとどまったと考えるのが妥当である。今回の実験モデルで考え得る化学結合のメカニズムは、4-META の酸無水物基の加水分解によるカルボキシ基と金属表面の塩基性水酸基との間に生じる共有結合や、カルボキシ基の共役塩基と金属表面の配位水との間に生じるイオン結合などが挙げられる。一方、プライマー処理群における接着強さ低下の原因は、鉄酸化物層の介在による硫黄原子吸着の不安定化であると考えられる。さらに、表面粗造化が接着強さに与えた影響を次式³⁾に従って考察するならば、

$$F \propto A_R \cdot n \cdot f$$

(A_R:接着面積、n:結合数、f:個々の結合の強さ)

A_Rの増加が接着強さの向上に与えた影響は無視できる程度であったのに対し、プライマー処理による結合数あるいは個々の結合の強さの低下は比較的顕著に現れたと推測できる。

本研究により、ペン型大気圧低温プラズマ装置がわずか5秒の短時間処理で非貴金属表面を清浄化し、かつ反応性官能基を付与できることを明らかとした。表面が不活性な貴金属に対しては、この優れた表面清浄化能が金属表面に硫黄原子を高密度で結合させる前処理となり得ることを示唆する研究成果が得られたといえる。

参考文献

- Walsh JL, Shi JJ (1 other author), Contrasting characteristics of pulsed and sinusoidal cold atmospheric plasma jets, Appl Phys Lett 88, 171501-1-171501-3, 2006
- Kibayashi H, Teraoka F (3 others), Surface modification of pure titanium by plasma exposure and its bonding to resin, Dent Mater J 24 (1), 53-58, 2005
- 金丸 競, 接着における固定反応のレオロジー, 高分子 12, 294-301, 1963

SEM-EDS を用いたグラスアイオノマーセメントのフッ素徐放挙動の観察

49090054 武藤 和子

指導教員：阿部 薫明 (生体材料工学教室)

キーワード：グラスアイオノマーセメント、フッ素徐放性

緒言

グラスアイオノマーセメント (GIC) は歯質接着性、歯髄刺激性が少ないこと、フッ素の取り込み、フッ素徐放性 (抗う蝕性) といった優れた性質を有するため、臨床において日常的に多用されている。本研究ではこのうちのフッ素徐放性を検討するため GIC を人工唾液に浸漬し、SEM-EDS を用いてフッ素徐放の挙動を経時的に追跡した。SEM-EDS とは、走査型電子顕微鏡 (SEM) に蛍光 X 線分析装置を付加した装置で、SEM により試料の微小領域の形態を確認した上で、その領域の構成元素の分析や、それら元素の分布をイメージングする事が可能である。そのため、フッ素徐放への形態の有無などの解明が期待できる。そこで本研究では、SEM-EDS を用いたフッ素徐放の挙動追跡の可能性を検討した。

方法

実験材料

光硬化型グラスアイオノマーセメント IXGP (GC 社)、

人工唾液 (Greenwood 氏人工唾液)

実験方法

試料は直径 6mm、厚さ 3mm の円柱状試料とした。GIC は室温大気中でメーカー指定の粉液比にて練和を行った。練和した GIC はステンレス製の割型に填入し、上下をスライドガラスで圧接した。その後光照射を上下面からそれぞれ 40 秒間行った。光照射後、試料を型から取り出し、人工唾液を 3mL 入れた 24 穴プレートに浸漬、37°C の恒温器中に保存した。浸漬 1 週毎に新しい人工唾液に交換した。交換時に試料を取り出し、蒸留水で洗浄、減圧乾燥し、SEM 試料台にグラファイトテープで固定した。得られた試料について、SEM-EDS (EDAX, Genesis 社) を用い、試料表面に残存しているフッ素を測定した (加速電圧 15kV)。本実験では 3 個の試料片を用い、各試料の任意の 2 箇所を測定し、各回 n = 6 のデータを得た。

結果

図 1 に SEM-EDS で測定した GIC 試料片の蛍光 X 線スペクトルを示す。Al、Si、C、O、F の含有が観察された。また人工唾液への浸漬後、フッ素元素 (F) 強度の減少と、人工唾液由来の元素 (Ca、P、K など) の出現が見られた。SEM-EDS を用いて F の絶対量を測定するには標準試料を用いた検量線の作成が必要になるが、今回は GIC の主成分 (Al) のピーク面積との比較により、試料表面に残留し

ている F の相対的な残存量を算出し、その経時変化を追跡した。その結果を図 2 に示す。人工唾液に浸漬した場合、浸漬時間の増加とともに試料のフッ素量が減少し、浸漬前試料との有意差が見られた (浸漬 3 週以降)。

考察

本実験で得られた人工唾液に浸漬した GIC からのフッ素徐放の挙動を塩澤 (36 期) の結果と比較すると、同様の傾向を示した。しかし、その経時変化には若干の違いが見られた。この経時変化の違いは、作成した試料形状の違いや、測定方法の違い (塩澤：浸漬溶液に溶出したフッ素イオン濃度を検出、本実験：試料表面に残存しているフッ素元素を検出)、などの要因が考えられる。今後、条件検討による要因の解明は必要であるが SEM-EDS を用いた GIC からのフッ素徐放挙動の追跡が可能である事が示された。今回の実験では測定回毎に異なる部位を観察していた。そのため、得られたデータにバラツキがみられた。その点を改善するためには、試料の固定法を改良し、各回で同じ測定部位を観察する、若しくは、測定点の増加によりバラツキを減らす必要がある。

本実験から、人工唾液中において GIC のフッ素徐放性が示された。この結果は、GIC が二次う蝕の抑制などに有効な修復材料である事を示唆している。

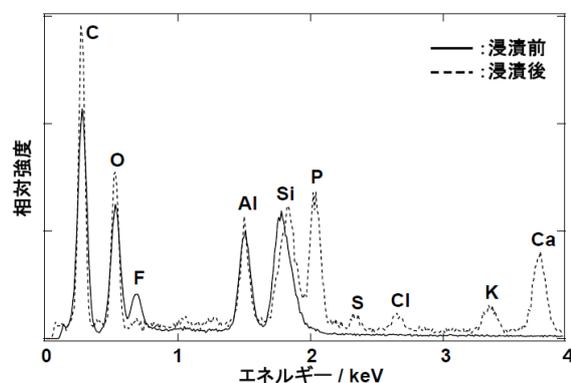


図 1 浸漬前後の試料の EDS スペクトル

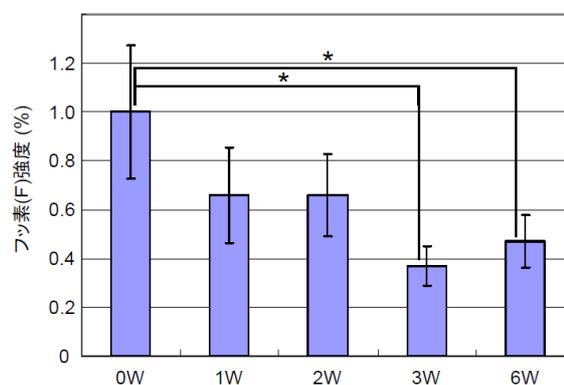


図 2 試料表面のフッ素量の経時変化

コラーゲンでできたマイクロ・ナノパターンの作製とその細胞接着性

43090055 森 祐貴

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：コラーゲン，マイクロ・ナノパターン

緒言

コラーゲンは生体の主要な細胞外マトリックスであり、歯周組織再生の足場として歯周外科治療への応用が期待される。一方で、マイクロ・ナノ構造を付与した材料は、細胞の接着性や接着形態に変化を与えることが知られている。そこで本研究ではコラーゲンでできたマイクロ・ナノパターンを用いて細胞の接着性・配列をコントロールできる生体材料の開発を目指し、コラーゲンでできたマイクロ・ナノパターンの作製、濡れ性、細胞接着性の評価、走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察を行った。

方法

マイクロ・ナノ構造を付与した PET フィルムモールド上に 10%コラーゲン溶液を滴下・乾燥することでパターン化したコラーゲンフィルムを得た。200℃で所定時間、加熱架橋を行い、吸水膨張率に対する影響を検討した。次に接触角試験として、加熱処理パターン化コラーゲンフィルムの各パターン上に蒸留水を滴下し、接触角を測定した。細胞接着試験としては、ヒト歯肉線維芽細胞を各パターン上へ播種し、1時間後の細胞数の測定および SEM による観察を行った。

結果

SEM 観察の結果 (図 1)、PET フィルムと同様のパターンがコラーゲンフィルムにも認められたため、コラーゲンフィルムへのナノインプリントが可能であると判明した。加熱架橋後における蒸留水浸漬の結果、200℃・2時間の条件で吸水膨張率が小さく、コラーゲンの分解が少ないマイクロ・ナノパターンを作製することができた。接触角試験の結果 (図 2)、パターンの形状による差は認められなかったが、パターン化コラーゲンフィルムの方が接触角が小さい傾向にあった。細胞接着試験の結果 (図 3)、パターンの形状による差は認められなかったが、パターン化コラーゲンフィルムの方が高い接着性を示した。SEM 観察の結果 (図 4)、グループでは細胞が細長く、ピラーでは細胞が突起を伸ばし、ホールでは細胞が球状になっているのが観察された。

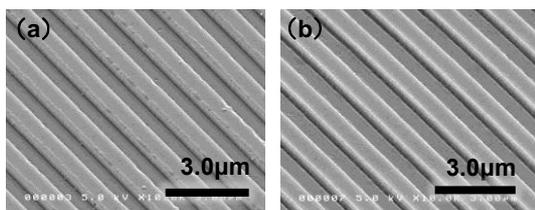


図 1. パターン化フィルムの SEM 像

(a)PET フィルム (b)コラーゲンフィルム

考察

マイクロ・ナノ構造を付与したコラーゲンシートの方が、接触角が小さく、高い接着性を示した。これは、単純に表面積が増加したことだけでなく、親水性の向上が関与したと思われる。また、パターン形状の違いにより細胞の接着形態が変化した。細胞がピラーのような突起構造物に対して足を伸ばしていることから、細胞が微細凹凸構造を認識している可能性がある。また、凹凸構造のふちに細胞が付着しているように見えることから接着性タンパクがパターン形状により制限されているために形状が変化したという可能性も考えられる。

以上より、コラーゲンでできたマイクロ・ナノパターンの作製は可能であり、パターン化コラーゲンが細胞接着性や細胞接着形態に影響を与えることがわかった。

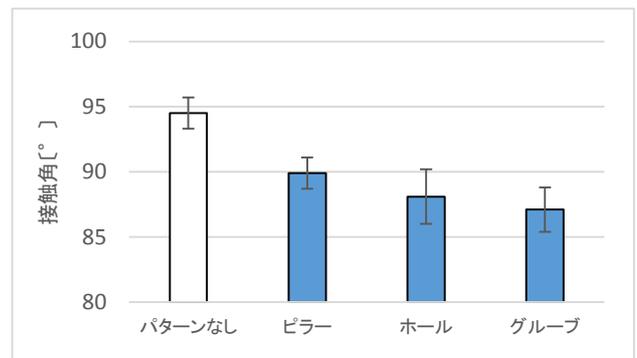


図 2. 接触角試験の結果

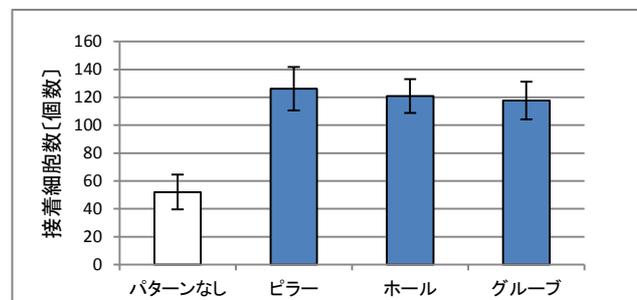


図 3. 細胞接着試験の結果

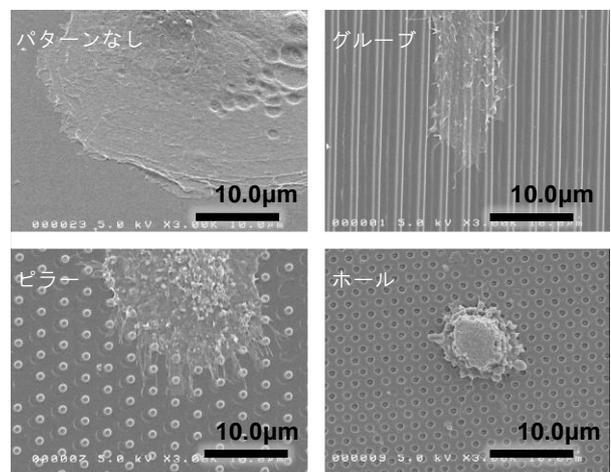


図 4. 細胞接着試験後の SEM 像

石膏への硬化調整剤添加による結晶形状変化の観察

43090059 ユウカ

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：石膏硬化反応、促進剤、遅延剤、結晶形状

緒言

歯科修復物、補綴物は模型上で作製し口腔内へ装着する。そのため口腔内の諸状態を三次元的に正確な寸法で再現した模型が必要である。模型作製のための石膏は適当な時間で硬化し、また硬化の際の寸法変化が少ないことが望ましい。さらに細かいところまで進入でき、再現性が正確である必要もある。よって硬化時間のコントロールは模型作製には極めて重要な因子の一つである。

そこで本研究では、石膏硬化時間の調整剤を用いて硬化時間を測定し、その際の石膏の結晶構造の変化を走査型電子顕微鏡にて検討した。

方法

普通石膏（混水比 0.37）（デンタルプラスター）を用いた。ガラス練板上に直径 30mm 高さ 20mm の円筒紙をワックスで固定し、練和した石膏を加え、パイプレーターにて気泡を除去した。その後、初期硬化時間を測定するため、ピカー針（直径 2mm、300g）を石膏表面に静かに下ろし、進入深さが 1mm になるまでの時間を計測した（室温は 13.5 度）。また、硬化後の石膏は、Pt-Pd コート後、走査型電子顕微鏡にて石膏の結晶構造の変化を観察した。

結果

初期硬化時間測定の結果（図 1）、コントロールとしての水を用いて練和した普通石膏では 20 分後に硬化が観察された。0.2% 硫酸カリウム添加では 30 分後に硬化し、2% 硫酸カリウム添加では 4 分後に硬化した。0.2% ホウ砂添加では 40 分後に硬化し、2% ホウ砂添加では 80 分後まで測定したが、硬化は観察されなかった。

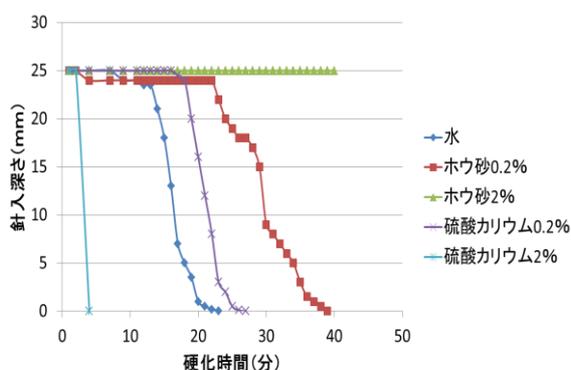


図 1 硬化促進剤および遅延剤添加による普通石膏の初期硬化時間の比較

次に、石膏硬化後の結晶を走査型電子顕微鏡にて観察した（図 2）。その結果、普通石膏の場合、様々な大きさの結晶が観察されたものの、主に針状で長さ $9\mu\text{m}$ 程度太さ $1\sim$ 数 μm 程度の結晶が観察された。一方で、硬化時間調整剤使用時の普通石膏結晶形状を観察したところ、硬化条件の違いにより結晶の大きさに顕著な変化は認められなかった。

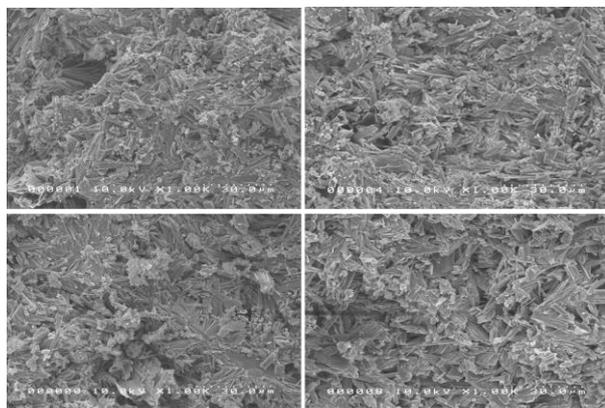


図 2 条件を変化させ硬化させた普通石膏の走査顕微鏡像

(a) 普通石膏（コントロール）、(b) 0.2% 硫酸カリウム、(c) 2% 硫酸カリウム、(d) 0.2% ホウ砂

考察

本研究では、普通石膏の硬化に対する添加剤の効果を検討した。硬化促進剤は、硬化促進剤がすぐに溶解し、少ないカルシウムイオンと硫酸イオンで過飽和となり、二水石膏の結晶を成長させる。そのため結晶は太く短くなると考えられている。また硬化遅延剤は、キレート材でカルシウム塩をキレートし、二水石膏の成長が障害される。そのため結晶は太く短くなると考えられている。よって硬化促進剤や遅延剤を添加した結晶の形態は太く短くなるはずだが、今回の実験では著明な変化は見られなかった（図 2）。その原因として、添加剤の低い濃度範囲の使用により、変化が現れなかったと考えられる。また 0.2% 硫酸カリウム添加時は硬化時間が促進されるはずだが、今回の実験では硬化時間が延長された（図 1）。原因として測定回数が少なく誤差によるものではないかと考えられる。

以上のように添加剤により硬化時間を調整することは可能であるが、気泡の発生、石膏と印象材の分離性の低下、模型表面のあれ及び強さの低下などの様々な問題がある。従って硬化時間の調整は練和時の水の温度で行うのが最も適切であると考えられる。

参考文献

小倉 英夫 コア歯科理工学 医歯薬出版 2008

アデノウイルス感染細胞での HuR の発現

43090015 加藤郁子

指導教官:東野史裕(口腔病理病態学教室)

キーワード:アデノウイルス、HuR

諸言

アデノウイルスは二本鎖の直鎖 DNA をそのゲノムに持ち、げっ歯類の細胞をがん化できる DNA 型がんウイルスで、古くから細胞がん化のモデルとして研究されてきた。

アデノウイルス E4orf6 は宿主細胞やウイルスの mRNA の輸送を制御することによりウイルスの増殖を調節することが知られており、発がん活性も持つウイルス初期遺伝子である。E4orf6 は、pp32 と結合し、ARE-mRNA を核外輸送・安定化することにより細胞がん化に寄与する。また、ウイルスによらない細胞がん化でも同様に、HuR が ARE に特異的に結合し、ARE-mRNA が核外輸送・安定化され、細胞ががん化することが証明されている。

本研究は、アデノウイルス感染細胞で HuR がどのような挙動を示すかを理解し、がんだけではなくアデノウイルス複製にも HuR が関わるかを検討した。

方法及び方法

・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 (10% serum 1%serum)

・実験 1

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 を 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 24 時間後感染細胞を回収し、HuR の局在を免疫染色法により観察した。

・実験 2

実験 1 と同様の方法で細胞を回収後、HeLa 細胞を核 (Nucleus) と細胞質 (Cytoplasm) に分画し、ウエスタン法により HuR タンパク量を比較した

結果

免疫染色の結果、wt300 を感染させていない HeLa 細胞では、細胞質よりも核が優位に HuR 抗体によって染色された。これに対し wt300 を感染させて 24 時間後の HeLa 細胞では、細胞質も HuR 抗体によって染色された(図 1)。この結果は wt300 を感染させた HeLa 細胞では、細胞質の HuR が増加することを示している。

ウエスタン法で HuR のタンパク量を検討した結果、総タンパク中の HuR 量は同程度であったが、アデノウイルスを感染させて 24 時間後の HeLa 細胞では細胞質の HuR タンパ

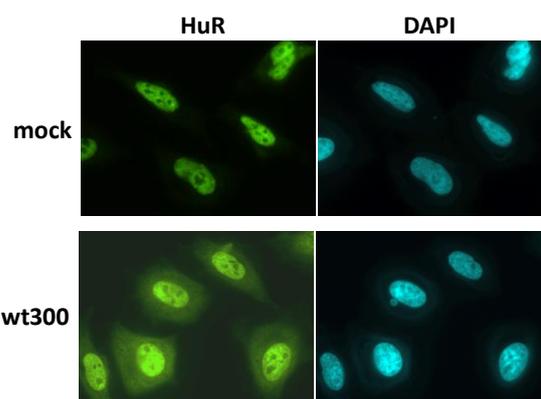


図1 アデノウイルス感染細胞におけるHuRの局在

ク量は増加し、それに対し核の HuR タンパク量は減少した(図 2)。

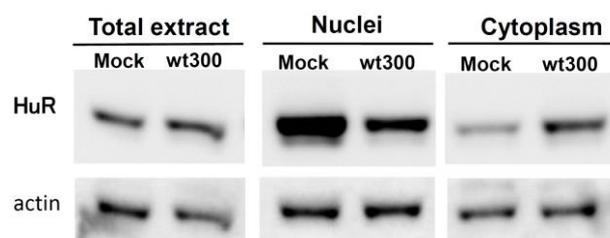


図2 アデノウイルス感染細胞におけるHuRの核外輸送

以上の結果は、wt300 を感染させた細胞では HuR の局在が変化することを示しており、アデノウイルス感染によって宿主細胞の HuR が核から細胞質へ輸送されることを示唆している。

考察

本研究では、ARE-mRNA の輸送・安定化に関連する RNA 結合タンパク HuR が、アデノウイルス感染後期の 24 時間後には細胞質でその発現が高くなり、HuR が核外輸送されていることが示唆された。ウイルス感染後期では、ARE-mRNA が核外輸送されており、同時期にはウイルス後期 mRNA も細胞質に局在し、さらに本研究で明らかになったように、HuR も細胞質にその局在を移すことから、HuR は ARE-mRNA の核外輸送のみならず、ウイルス後期の mRNA の核外輸送にも関連している可能性がある。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

アデノウイルス感染細胞での pp32 の発現 II

43090016 加藤泰史

指導教官: 東野史裕(口腔病理病態学教室)

キーワード: アデノウイルス、pp32

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。東野らは、ウイルスによる発がんの研究より、RNA 結合タンパク HuR やそれに結合する pp32 が AU-rich element (ARE) を持つ mRNA を核外輸送・安定化し、細胞をがん化することを解明した。また、ARE-mRNA の核外輸送・安定化は、口腔がんをはじめとする、ウイルスによらないヒトの多くのがん細胞でも証明され、新たな細胞がん化機構として注目されている。HuR の結合タンパクの一つ、pp32 は細胞質に発現している HuR を分解し、がん細胞ではその発現が少なく、tumorsuppressor 活性を持つことが知られている。また、本年度の研究実習で、アデノウイルス感染細胞では、細胞質の HuR 発現が高くなることが証明されている。

目的

pp32 のアデノウイルスの複製に対する影響を検討するために、アデノウイルス感染細胞で pp32 がどのような挙動をとるか免疫染色法を用いて解析する。

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 (10% serum 1%serum)

抗体: pp32 抗体、FITC 付加二次抗体

核染色剤 DAPI

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 を 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 24 時間培養した。

II 免疫染色法

感染細胞をホルムアルデヒドで固定後、pp32 抗体を付加し、引き続き FITC 付き二次抗体で処理した。また、固定後の細胞を DAPI を用いて染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果

図 1 に示すように、アデノウイルス感染細胞は、核のみならず細胞質の pp32 が検出でき、細胞質の pp32 発現が上昇していることが明らかになった。

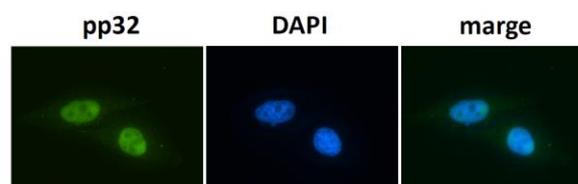


図1 アデノウイルス感染細胞におけるpp32の局在

考察

通常 pp32 は HuR とともに核外輸送されると、HuR が caspase により分解される。また、本年度の研究実習で、ウイルス感染細胞では、細胞質の HuR の発現が増加することが明らかになった。さらに、本研究でわかったように、pp32 の細胞質での発現はアデノウイルス感染細胞により増加した。これらのことから、ウイルス感染では HuR と pp32 の複合体が細胞質に輸送されているが、何らかのメカニズムにより、HuR の分解が抑制されていることが予想できる。ウイルスは、自己の複製のために、宿主細胞の pp32 の機能を阻害し、ウイルスの複製を促進させているのではないかと考えられる。

謝辞

本研究に数々のご援助、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

アデノウイルス感染細胞での pp32 の発現 I

43090042 林葉子

指導教官:東野史裕(口腔病理病態学教室)

キーワード:アデノウイルス、pp32

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。東野らはウイルスによる発がんの研究より、RNA 結合タンパク HuR やそれに結合する pp32 が AU-rich element (ARE) を持つ mRNA を核外輸送・安定化し、細胞をがん化することを解明した。また、ARE-mRNA の核外輸送・安定化は、口腔がんをはじめとする、ウイルスによらないヒトの多くのがん細胞でも証明され、新たな細胞がん化機構として注目されている。HuR の結合タンパクの一つ、pp32 は細胞質に発現している HuR を分解し、がん細胞ではその発現が少なく、tumorsuppressor 活性を持つことが知られている。

目的

pp32 のアデノウイルスの複製に対する影響を検討するために、アデノウイルス感染細胞で pp32 がどのような挙動をとるかウエスタン法を用いて解析する。

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 (10% serum 1%serum)

抗体: pp32 抗体、 β -actin 抗体、二次抗体

バッファー: RIPA バッファー

方法

I ウイルス感染

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 を MOI=10pfu/cell となるように感染させ、37°C の CO₂ インキュベーター中で 24 時間培養した。

II ウエスタン法

感染細胞に RIPA buffer を加えタンパクを回収し、サンプルバッファー添加後 97°C で 5 分間処理し、サンプル

をアクリルアミドゲルを用いて、150V で 1 時間電気泳動した。次に、タンパクをメンブレンに転写後、Blocking buffer を加え over night でインキュベートし、次に pp32 抗体もしくは β -actin 抗体で処理後、二次抗体でインキュベートし、LAS-4000 で pp32 および β -actin のバンドを検出した。

結果

図 1 に示すように、非感染細胞 (Mock) とアデノウイルス (wt300) 感染細胞それぞれで pp32 の発現量に差はなかった。 β -actin の発現量もほぼ同じことから、pp32 の発現に差がないことは確からしいと考えられる。

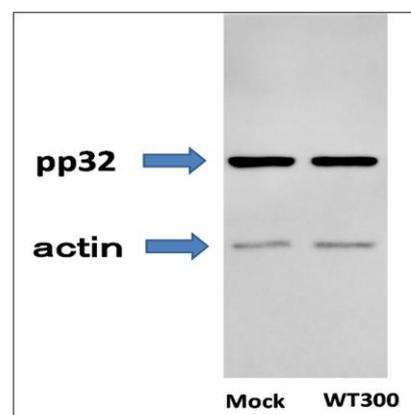


図1 アデノウイルス感染細胞におけるpp32の発現

考察

通常 pp32 は HuR とともに核外輸送されると、HuR が caspase により分解される。また、本年度の研究実習で、ウイルス感染細胞では、細胞質の HuR の発現が増加することが明らかになった。本研究でわかったように、pp32 の発現はアデノウイルス感染細胞では変化しない。これらのことから、ウイルス感染により pp32 が増加しないことが、細胞質の HuR 増加の原因の一つと示唆できる。ウイルスは、自己の複製のために、宿主細胞の pp32 の発現を阻害し、ウイルスの複製を促進させているのではないかと考えられる。

謝辞

本研究に数々のご援助、ご協力を頂きました北海道大学大学院歯学研究科口腔病理病態学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

アデノウイルス感染細胞での pp32r1 の発現

43090052 水谷友美

指導教官: 東野史裕(口腔病理病態学教室)

キーワード: アデノウイルス、pp32r1

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。HeLa 細胞にアデノウイルスを感染させると、細胞質へ HuR が輸送され、細胞質の HuR の発現が高くなる。Imamachi らは発がん時に pp32r1 の発現が高くなる、HuR は pp32 と比べて親和性のより高い pp32r1 のほうに結合し、caspase の活性が低下し、HuR の分解が制限されることにより、細胞質に局在する HuR が増加することを証明した。¹⁾

本研究は、アデノウイルス感染細胞での pp32r1 の役割を明らかにするため、感染後 pp32r1 がどのような変化・挙動を示すのか解明することを目的とした。

方法

【材料】

細胞: HeLa(ヒト子宮頸がん細胞)

5 型ヒトアデノウイルス: wt300

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

抗体: pp32r1 抗体 (一次抗体)、FITC 付加二次抗体

薬品: 4%パラホルムアルデヒド(固定液)、0.3%Triton X-200、Blocking Buffer、RIPA buffer

【方法】

[感染] カバーガラスをメタノールで火炎滅菌したのちに、各 6 welldish に 1 枚ずつ入れた。そこへ HeLa 細胞を 5×10^4 個となるよう播種し、24 時間培養した後、wt300 を MOI=10pfu/cell となるように感染させた。

[実験 1] 固定液により、カバーガラスの細胞を固定し、pp32r1 抗体、二次抗体を用いて、免疫染色法を行い、蛍光顕微鏡で pp32r1 の局在を観察した。

[実験 2] RIPA バッファーを用いて細胞のタンパクを回収し、電気泳動でたんぱくを分離した後、メンブレンに転写させ、pp32r1 の抗体を用いてウエスタン法で pp32r1 の発現を検討した。

結果

HeLa 細胞に wt300 を感染させ、pp32r1 の局在を観察した。非感染 HeLa 細胞 (mock) と wt300 感染細胞を比較すると、染色されている部位は核内に局限しており (図 1)、両細胞で pp32r1 の局在に変化は見られなかった。

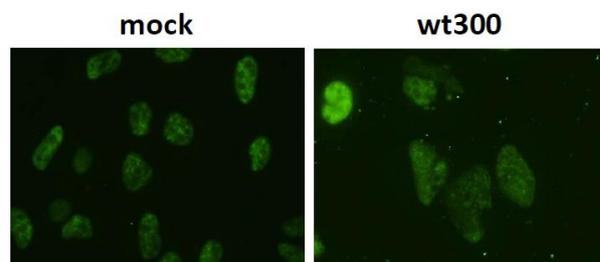


図1 アデノウイルス感染細胞におけるpp32r1の局在

次に同様の感染細胞に発現している pp32r1 をウエスタン法で確認した。その結果、非感染細胞で発現する pp32r1 より、感染細胞の pp32r1 の方が発現量は多く、アデノウイルス感染により pp32r1 の発現が上がるということがわかった。

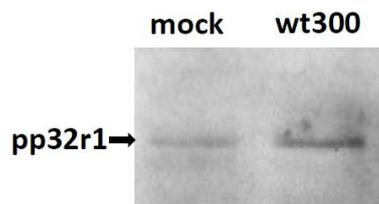


図2 アデノウイルス感染細胞におけるpp32r1の発現

これらの結果から、アデノウイルスの感染により、pp32r1 の局在に変化は認められなかったが、その発現は上がるということが明らかになった。

考察

アデノウイルス感染細胞では細胞質の HuR 発現が上昇することが明らかになっている。本研究の結果より、アデノウイルスの感染で、pp32r1 が増加することにより、細胞内で pp32 と結合している HuR が、pp32r1 とより結合するようになり、その結果 caspase の活性が低下し、細胞質の HuR 分解が阻害され、HuR 量が上昇すると予想できる。

参考文献

1) Imamachi K, Higashino F, 他 7 名, *Oncology Reports*, 31, 1103-1108, 2014.

腫瘍血管内皮マーカーBiglycan の発現制御システムに関する検討

43090056 安永賢史

指導教員：間石奈湖、樋田京子（血管生物学研究室）、進藤正信（口腔病理病態学教室）

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、低酸素、Biglycan

緒言

腫瘍組織において、血管は腫瘍細胞への栄養・酸素の供給や代謝物の排出などの役割を担っており、腫瘍の進展・転移には血管新生が必要不可欠である。腫瘍血管は正常血管と比べて走行が乱雑であり、漏出性が高いことが知られている。これまで Hida 研究室では、腫瘍血管を構成する腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞に比べて、様々な異常性を示すことを報告してきた。その異常性の1つに特異遺伝子の発現がある。DNA microarray 解析により腫瘍血管内皮細胞において発現が亢進していた Biglycan に着目し、ヒト腎癌、大腸癌などの多くの腫瘍血管内皮細胞において Biglycan の発現が亢進していることを見出した。さらに、Biglycan が Toll like receptor 2, 4 を介したオートクライン機構により、腫瘍血管内皮細胞の高い遊走能、管腔形成能に関与していることを見出した(Yamamoto et al., Br J Cancer, 2012)。しかし、腫瘍微小環境において腫瘍血管内皮細胞が Biglycan を発現亢進するメカニズムと、Biglycan の下流シグナルについては未だ不明である

腫瘍微小環境には、腫瘍細胞から分泌される様々なサイトカインや増殖因子などが存在する。また、血管の蛇行による血流のよどみや腫瘍の組織間圧の亢進により、腫瘍組織は低酸素状態に陥っている。一方、マクロファージや線維芽細胞などにおいて、Biglycan は Toll like Receptor 2, 4 を介して ERK を活性化し、遊走能を亢進させることが知られている(Renato V. Iozzo et al. FEBS Journal 2010, Liliana Schaefer et al., JCI 2005)。

本研究では、腫瘍微小環境において Biglycan を発現亢進した腫瘍血管内皮細胞が、Toll like receptor 2, 4 を介して ERK を活性化することにより高い血管新生能を獲得しているのではないかと仮説をたて、検討を行った。

方法

正常血管内皮細胞をマウスの正常皮膚から、腫瘍血管内皮細胞をヒトメラノーマ皮下移植腫瘍塊から磁気ビーズ

法により分離、培養した。

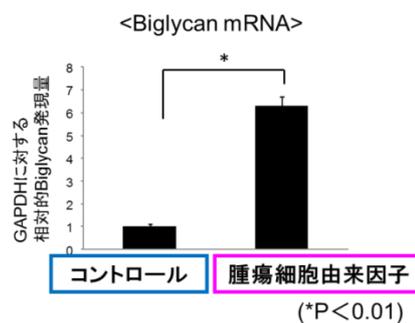
腫瘍微小環境が腫瘍血管内皮細胞の Biglycan 発現に影響を与えるかどうか検討するために、腫瘍細胞の培養上清を正常血管内皮細胞に5日間処理し、Biglycan の発現が亢進するか Real Time PCR 法により解析した。また、低酸素チャンバー(1% O₂環境)内で正常血管内皮細胞を24時間培養し、同様の解析を行った。

ERK の活性が腫瘍血管内皮細胞の特性にどのような影響を与えているのか検討するため、U0126(MEK 阻害剤)を用いて ERK の活性を阻害し、tube formation assay を行った。

正常血管内皮細胞を Biglycan タンパクで処理し、Biglycan が ERK を活性化するのかどうか、免疫細胞染色法により解析した。さらに、Biglycan は血管内皮細胞においても Toll like receptor 2, 4 を介して ERK を活性化するのかどうか Toll like receptor 2 と 4 の阻害剤を用いて、同様に解析を行った。

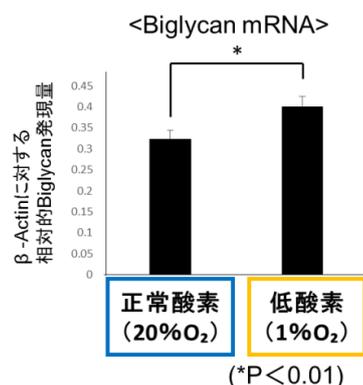
結果

- ① 腫瘍細胞由来液性因子が血管内皮細胞の Biglycan mRNA 発現に及ぼす影響



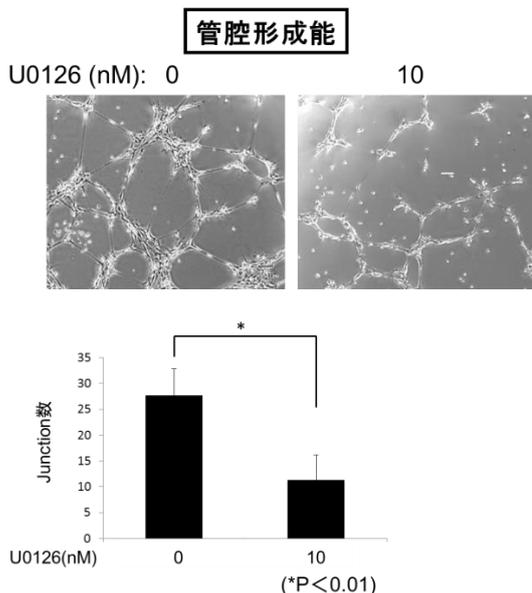
腫瘍細胞の培養上清で処理した血管内皮細胞では、Biglycan の発現が有意に亢進した。

- ② 低酸素環境が血管内皮細胞の Biglycan mRNA 発現に及ぼす影響



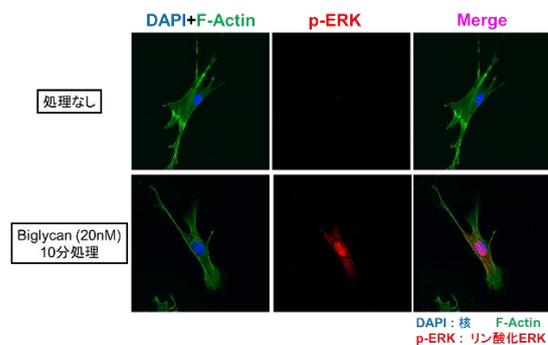
低酸素条件下で培養した血管内皮細胞では、Biglycan の発現が有意に亢進した。

- ③ ERK 活性が腫瘍血管内皮細胞の管腔形成能に及ぼす影響



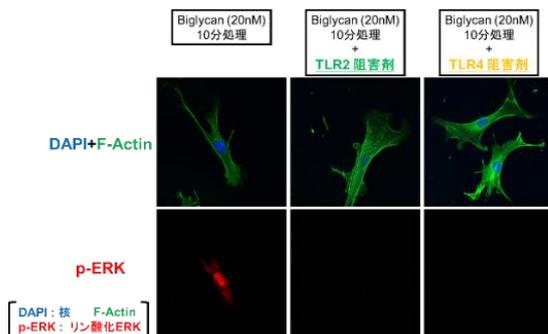
血管内皮細胞において ERK の活性を阻害すると、管腔形成能が有意に低下した。

- ④ Biglycan が血管内皮細胞の ERK 活性に及ぼす影響



Biglycan タンパクで処理した血管内皮細胞では、ERK の活性化が認められた。

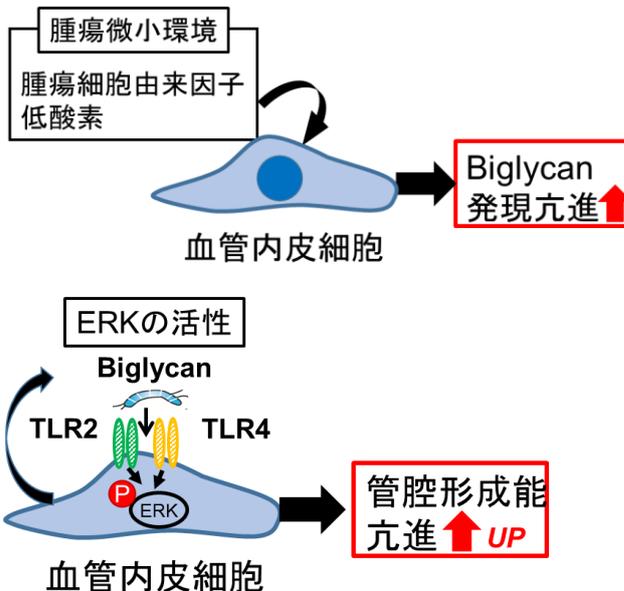
- ⑤ Biglycan による ERK 活性における Toll like receptor2, 4 の役割



Toll like receptor2, 4 の阻害剤を用いると、Biglycan による ERK の活性化が抑制された。

考察

腫瘍細胞由来液性因子が豊富に存在し、また低酸素状態に陥っている腫瘍微小環境において、血管内皮細胞は Biglycan の発現を亢進する可能性が示唆された。今回 Biglycan を高発現する腫瘍血管内皮細胞が Toll like receptor2, 4 を介したオートクライン機構により ERK の活性化を介して高い血管新生能を獲得している可能性を示すことができた。今後、口腔がんをはじめとした固形がんにおける腫瘍血管内皮細胞の Biglycan の時間空間的な発現パターンを解析し、Biglycan 発現と患者の臨床病理学的因子や予後との関係についてさらなる解析を進め、腫瘍血管により特異的な血管新生阻害療法の開発につなげたい。



参考文献

- 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
- Yamamoto K., Ohga N., Hida Y., Maishi N., Kawamoto T., Kitayama K., Akiyama K., Osawa T., Kondoh M., Matsuda K., Onodera Y., Fujie M., Kaga K., Hirano S., Shinohara N., Shindoh M., *Hida K.: Biglycan is a specific marker and an autocrine angiogenic factor of tumour endothelial cells, *Br J Cancer*, 106(6), 1214-1223, 2012

放射線照射による“マイトファジー誘導”とその
遺伝子変化について

43090007 梅津 幹也

指導教員 安田元昭

キーワード：遺伝子変化、マイトファジー、RNA
結合性タンパク質

諸言

肺癌細胞である H1299 細胞は p53 欠損株
であり、放射線を照射した場合に多くの細胞が生
き残ることがわかっている。なぜ生き残れる細胞
があるのか？生き残った細胞では何が起きている
のか？このことを調べるために、照射前の細胞と
照射後の細胞について、ミトコンドリアの観察と
遺伝子変化について比較することとした。

方法

ミトコンドリアの観察については、放射線を 1
2 Gy 照射後、48 時間が経過した細胞について
MitoTracker により染色し、共焦点レーザー顕微
鏡で観察した。さらに、マイトファジー(選択的オ
ートファジーの 1 つで、ダメージを受けたミトコ
ンドリアや古くなったミトコンドリアを選択的に
オートファジーによって取り除く機構のことであ
る)のマーカーである LC3 - II 染色も行った。ま
た、マイトファジーが起こった後の細胞がどうな
るのかを調べるために、放射線照射後に一定期間
継代することとした。ここで、親株(PT)に 1.2 Gy
の放射線照射をして 2 か月継代したものを IR1、さ
らにこの IR1 に 1.2 Gy の放射線を照射して 2 か
月継代したものを IR2 とした。つまり、IR1 と IR2
はマイトファジーを経て得られた細胞というこ
とになる。

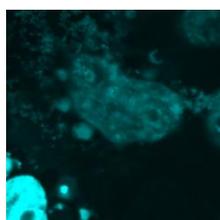
遺伝子解析については、マイクロアレイ法を行
った。その原理は DNA マイクロアレイ法スライド
ガラスなどの基板上に個々の DNA 配列を高密度
に配置したものをプローブとして用いるものであ

る。今回の場合、PT と IR1 と IR2 の細胞から RNA
を抽出し、プローブと結合させ各遺伝子について
発現量を比較した。※1

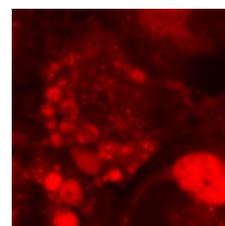
結果

MitoTracker とは、生細胞のミトコンドリアを
染色する膜電位依存性プローブである。写真②よ
りミトコンドリアにおいて形態異常がみられた。
写真からオートファジーが起きている場所とミト
コンドリアの場所が重なっており(写真④)、照射後
48 時間後の変化は、マイトファジーであると考
えられる。

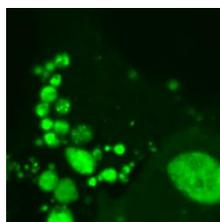
①核染色



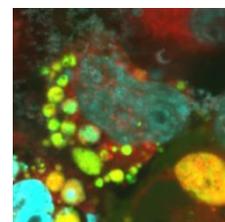
②ミトコンドリア染色



③LC3 - II 染色



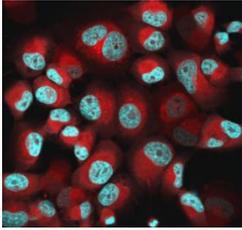
④①～③の重ね合わせ



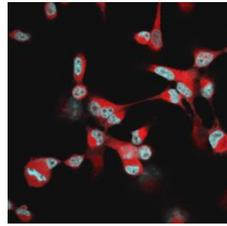
さらに、この現象を照射後 48 時間経過した細
胞の 10 視野で観察した。平均すると、約 86 %
の細胞で生じていることがわかった。

下に PT、IR1、IR2 の写真を示す。IR1 と IR2
はマイトファジーを経て得られた細胞であるが、
写真を観察すると、生残細胞は小型化しているこ
とがわかる。

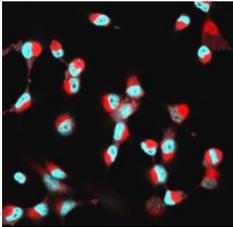
PT



IR1



IR2



参考文献

- ※1 新遺伝子工学ハンドブック 改訂第5版
松村正實・山本雅・岡崎康司 編集 羊土社

遺伝子解析については、マイクロアレイ法で、発現が1/10以下もしくは10倍以上となった遺伝子を4万個の遺伝子から調べた。その結果、照射後に発現が1/10以下となった遺伝子が183個、10倍以上になった遺伝子が37個あることがわかった。さらにそれぞれの遺伝子の機能をデータベース上で解析した結果、あるRNA結合性タンパク質が含まれており、その遺伝子発現量は約1/200となっていた。

考察

上記のRNA結合性タンパク質は細胞の翻訳効率を正に制御していることから、発現が1/200となると細胞内で合成される総タンパク質量は減少することが予想できる。放射線照射により照射直後の細胞の環境が悪化し、マイトファジーが生じる。一方、生残したRNA結合性タンパクが減少することで翻訳効率が低下する。これにより、細胞の小型化・ミトコンドリア数減少の状態が維持されると考えることができる。

この癌細胞は小型化したことにより、細胞にとって環境が悪い条件でも生存し続けるため、悪性度が高く、予後も悪い細胞ではないかと考えられる。

Candida albicans によるマクロファージと樹状細胞への IL-1 β 産生誘導メカニズムの違い

43090012 尾崎 公哉

指導教官 長谷部 晃

(口腔分子微生物学教室)

キーワード:カンジダ・アルビカンス, IL-1 β

緒言

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明らかにすることを目的とし、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

GFP を発現する *C. albicans* 株 pACT1-GFP ならびに *ura3* 遺伝子欠損株 CAI4 (アバディーン大学 A. J. Brown 教授より分与) を用いて、LPS (100 ng/ml) でプライミングしたマウスマクロファージ系細胞 J774.1 ならびに樹状細胞系細胞 XS106 を刺激した。

細胞の培養上清中の IL-1 β は ELISA で測定し、培養上清中の成熟型 IL-1 β はウェスタンブロッティングで確認した。細胞死は、Cytotox 96 で細胞培養上清中の乳酸脱水素酵素を測定して調べた。

Uridine, UTP ならびに ATP は、細胞のプライミング後 *C. albicans* による刺激開始 30 分前に添加した

結果

J774.1 及び XS106 を *C. albicans* pACT1-GFP ならびに *C. albicans* CAI4 で刺激し、培養上清中の IL-1 β 産生量を測定したところ、*C. albicans* CAI4 による J774.1 刺激ではほとんど IL-1 β 産生が見られなかった (図 1)。

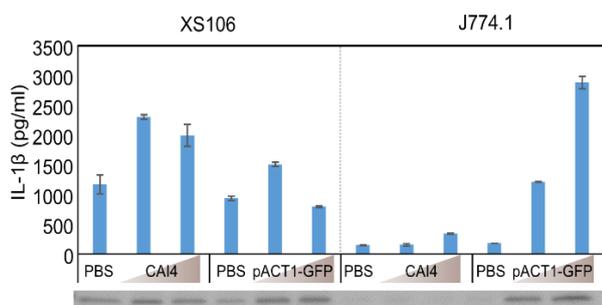


図 1. *C. albicans* CAI4 と pACT1-GFP (MOI=1, 10) による XS106 と J774.1 細胞への IL-1 β 誘導の違い。

この結果は細胞を *C. albicans* で 18 時間刺激したときのものであるので、3 時間ごとの IL-1 β 産生誘導を調べた (図 2)。

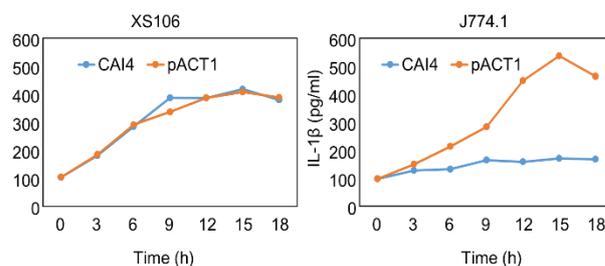


図 2. *C. albicans* CAI4 と pACT1-GFP (MOI=1) による XS106 と J774.1 細胞への IL-1 β 誘導の経時変化。

その結果 J774.1 においては、pACT1-GFP が時間依存的に IL-1 β を誘導していたのに対し、CAI4 では 18 時間の刺激までの間で IL-1 β を誘導することはなかった。XS106 の場合は、pACT1-GFP ならびに CAI4 の両方が経時的に IL-1 β 産生を誘導していた。

次に、この時の J774.1 及び XS106 の細胞死の誘導についても調べた (図 3)。

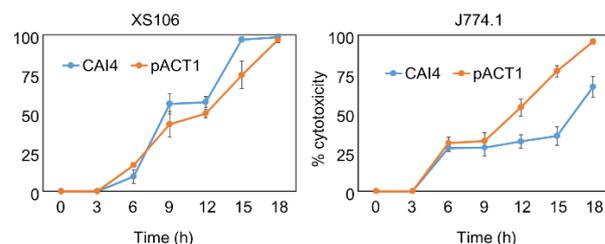


図 3. *C. albicans* CAI4 と pACT1-GFP (MOI=1) による XS106 と J774.1 細胞への細胞死誘導の経時変化。

XS106 ならびに J774.1 において、*C. albicans* pACT1-GFP ならびに CAI4 は経時的に細胞死を誘導した。XS106 においては pACT1-GFP と CAI4 で細胞死の速度に違いはなかったが、J774.1 においては CAI4 による細胞死誘導が pACT1-GFP よりも遅いことがわかった。

以上のことから、樹状細胞系細胞とマクロファージ系細胞ではカンジダによる IL-1 β 産生誘導のメカニズムが異なることが示唆された。

C. albicans CAI4 は *ura3* 遺伝子を欠損することから、増殖に Uridine を必要とする。そこで、Uridine だけでなく、インフラマソームを活性化して IL-1 β 産生誘導活性を有する事が知られている ATP あるいは UTP を加えたときに、それらが IL-1 β 産生誘導に及ぼす影響を調べた (図 4-7)。

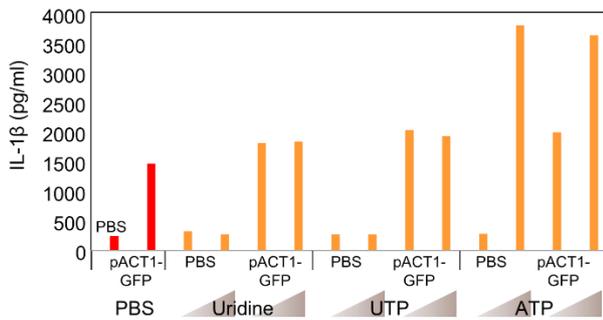


図4. *C. albicans* pACT1-GFP (MOI=1) による J774.1 細胞への IL-1 β 誘導に及ぼす Uridine (0.1, 1 μ M), UTP (0.1, 1 μ M), ATP (0.1, 1 μ M) の影響.

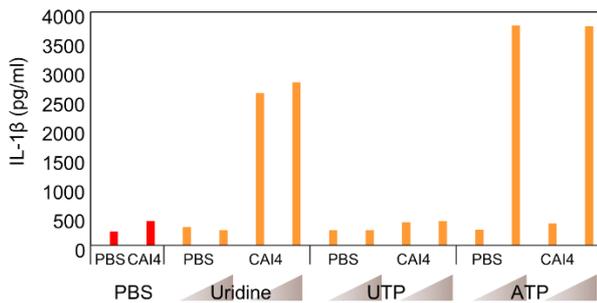


図5. *C. albicans* CAI4 (MOI=1) による J774.1 細胞への IL-1 β 誘導に及ぼす Uridine (0.1, 1 μ M), UTP (0.1, 1 μ M), ATP (0.1, 1 μ M) の影響.

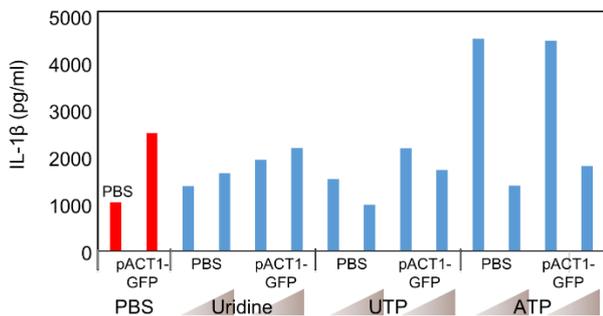


図6. *C. albicans* pACT1-GFP (MOI=1) による XS106 細胞への IL-1 β 誘導に及ぼす Uridine (0.1, 1 μ M), UTP (0.1, 1 μ M), ATP (0.1, 1 μ M) の影響.

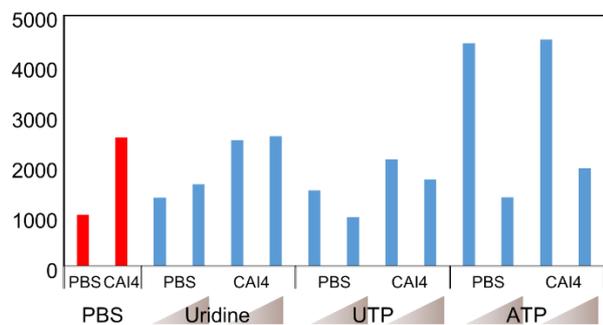


図7. *C. albicans* CAI4 (MOI=1) による XS106 細胞への IL-1 β 誘導に及ぼす Uridine (0.1, 1 μ M), UTP (0.1, 1 μ M), ATP (0.1, 1 μ M) の影響.

その結果, Uridine を添加することによって, *C. albicans* CAI4 は増殖するが, pACT1-GFP の増殖には影響しない事がわかった. また, J774.1 を Uridine 存在下で *C. albicans* CAI4 により刺激すると IL-1 β を産生誘導が著しく増加したが, UTP 存在下では IL-1 β 産生に影響を与えなかった. ATP はそれ自体が強い IL-1 β 産生誘導活性を持つため, *C. albicans* による IL-1 β 産生誘導に対する影響はわからなかった.

以上のことから *C. albicans* CAI4 は, 増殖することによりマクロファージ系細胞 (J774.1) に IL-1 β 産生を誘導するが, 樹状細胞系 (XS106) においては, *C. albicans* CAI4 の増殖がなくとも IL-1 β が誘導されることが示唆された.

考察

C. albicans CAI4 によるマクロファージと樹状細胞への IL-1 β 産生誘導メカニズムの違いについては, *C. albicans* の増殖が重要であるということが示唆された. しかしながら, IL-1 β 産生誘導メカニズムの違いについてそれぞれの細胞表面に発現しているレセプター分子の違いや *C. albicans* CAI4 と pACT1-GFP において発現している物質の違いなど, 他の因子が影響していることも考えられ, それらについても解明していくことが必要である.

Candida albicans によるマクロファージ/樹状細胞への IL-1 β 産生誘導について

43090023 小池 和茂

指導教官 長谷部 晃

(口腔分子微生物学教室)

キーワード:カンジダ・アルビカンス, IL-1 β

緒言

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、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、マクロファージ系細胞である J774. 1, 樹状細胞系細胞である XS106 を LPS (100 ng/ml) でプライミングして使用した。*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 と *ura3* 遺伝子欠損株で pACT1-GFP の親株である *C. albicans* CAI4 を使用した。*C. albicans* で細胞を刺激し、得られた細胞培養上清中に含まれる IL-1 β の量を ELISA 法で測定した。なお、ELISA キットは BD 社の Opt EIA mouse IL-1 β を使用した。成熟型の IL-1 β の検出は anti mouse IL-1 β (R&D 社) を用いて Western blotting 法により行った。また、Caspase-1 阻害剤は Z-YVAD-fmk (Abcam 社) を用い、細胞刺激の 1 時間前に各 well に添加した。

結果と考察

まず、XS106 ならびに J774. 1 をそれぞれ *C. albicans* CAI4 あるいは pACT1-GFP で 18 時間刺激し、培養上清中の IL-1 β を測定した。また、コントロールとして PBS を用いて、それぞれ比較した。

その結果、XS106 の場合は CAI4 ならびに pACT1-GFP とともに IL-1 β 産生を誘導し、MOI=1 で最も多く誘導することがわかった (図 1A)。

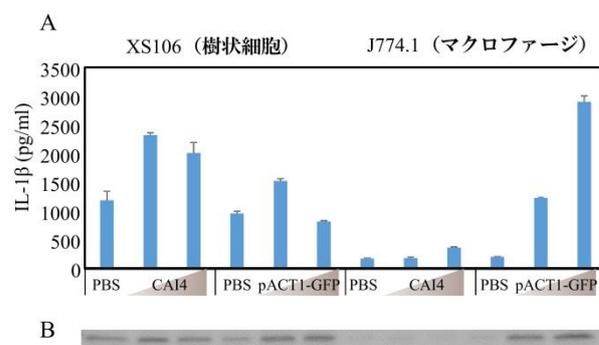


図 1. CAI4 あるいは pACT1-GFP による XS106 ならびに J774. 1 の刺激で培養上清中に誘導される IL-1 β (A). *C. albicans* は MOI=1 になるように用いて刺激した。それらの上清中における成熟型の IL-1 β のウェスタンブロットティング法による確認 (B)。

一方、J774. 1 の場合は pACT1-GFP が濃度依存的に IL-1 β 産生を誘導したが、CAI4 はほとんど産生を誘導しなかった (図 1A)。このことから、XS106 と J774. 1 において *C. albicans* による IL-1 β 産生誘導メカニズムが異なることがわかった。したがって樹状細胞とマクロファージで産生の誘導のメカニズムに違いがあると推測された。

次に、産生された IL-1 β が成熟型であるか確認するため、ウェスタンブロットティングを行った (図 1B)。その結果、成熟型の IL-1 β を示すバンドが得られたことから、これらの細胞において、カンジダによる刺激でインフラマソームが活性化されて IL-1 β 産生が誘導されることがわかった。

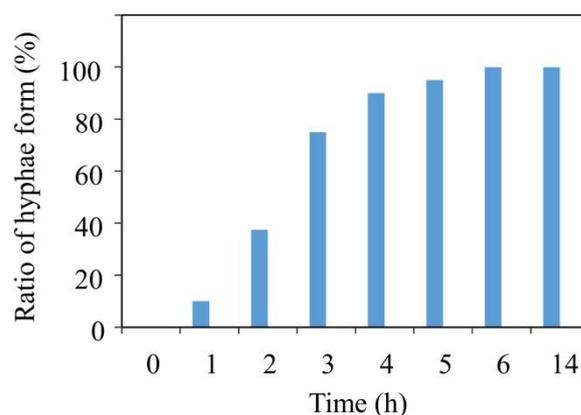


図 2. RPMI 培地中における *C. albicans* の菌糸型の割合の経時変化。*C. albicans* の形態は顕微鏡下で肉眼的に確認。

次に、RPMI 培地における *C. albicans* の形態変化を調べた。*C. albicans* は菌糸型と酵母型の両方を持つ二形性を有

していることから、酵母型の *C. albicans* を細胞培養用の培地である RPMI 培地に加え、経時的な形態変化を調べた。その結果、時間依存的に菌糸型の割合が増加し、培養開始から 4 時間程度でほとんど菌糸型になることがわかった (図 2)。したがって、IL-1 β 誘導には菌糸型の *C. albicans* が重要である可能性が高いことが示唆された。

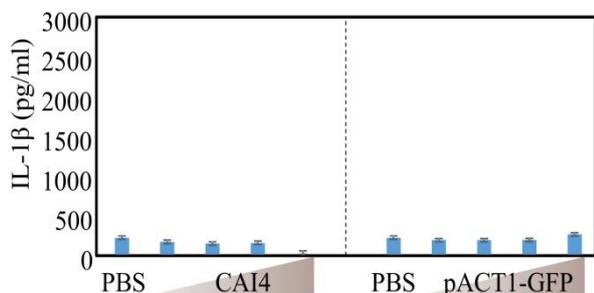


図 3. 菌糸型の *C. albicans* CAI4 ならびに pACT1-GFP による XS106 に対する IL-1 β 産生誘導. 菌糸型の *C. albicans* に UV 照射 (60 秒 \times 2) を行い殺菌した. MOI=0, 1, 10, 100. コントロールは PBS.

そこで次に形態が菌糸型であれば *C. albicans* の生死に関係なく IL-1 β の産生を誘導できるのか確認するため、*C. albicans* を菌糸型にした後 UV 処理をして IL-1 β の誘導の違いを調べた (図 3)。

UV 処理された菌糸型の *C. albicans* CAI4 と pACT1-GFP の両方とも IL-1 β を誘導しなかった。このことから IL-1 β を産生するためには *C. albicans* は生きてなければならないことが分かった。

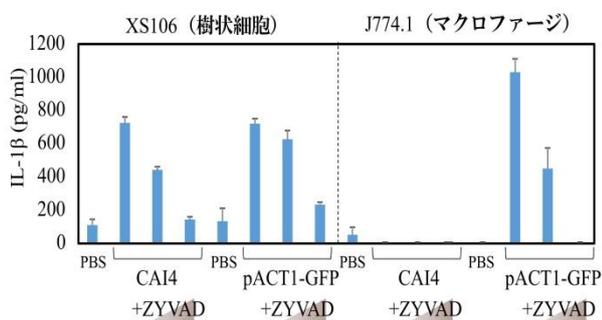


図 4. XS106 ならびに J774. 1 における pACT1-GFP あるいは CAI4 による IL-1 β 産生誘導へのカスパーゼ 1 阻害剤 (Z-YVAD-fmk) の影響。

次に、*C. albicans* CAI4, pACT1-GFP あるいはコントロール

ルの PBS で細胞を刺激したときの IL-1 β の産生にカスパーゼ 1 阻害剤が及ぼす影響を調べた。カスパーゼ 1 阻害剤である Z-YVAD-fmk が濃度依存的に XS106 ならびに J774. 1 における IL-1 β の産生誘導を阻害することがわかった。このことから、インフラマソームの活性化においてカスパーゼ 1 が必要であることがわかった。

以上のことから、i) 樹状細胞系細胞とマクロファージ系細胞では IL-1 β 産生の誘導に違いが見られること、ii) 酵母型のカンジダは時間の経過とともに菌糸型へと変化し、IL-1 β の産生を誘導するためにはそのカンジダが生きていることが必要であること、iii) カンジダによるインフラマソームの活性化にはカスパーゼ 1 が必要であること、がわかった。

放射線照射によるミトコンドリア数の変化

43090039 堂前翔史

指導教官：安田元昭（口腔分子微生物教室）

キーワード：ミトコンドリア、放射線、悪性腫瘍

諸言

一般的に、悪性腫瘍の放射線治療において照射生残細胞は悪性度が高いといわれている。本研究では、照射後の癌細胞を用いて解析及び実験を行い、細胞レベルでその原因について考察することとした。

材料と方法

今回は、p53欠損の肺の癌細胞 H1299 を用いた。H1299 (PT) に 12Gy の放射線照射を行い、2 カ月以上継代、さらにその細胞に 12Gy の放射線照射を行い 2 カ月以上継代した細胞を IR とした。PT・IR を用いて以下の解析及び実験を行った。

解析① それぞれの細胞及びその核の大きさの解析

それぞれの細胞を同一規格で撮影した画像を用いた。画像解析ソフトウェア Image J にて細胞、核の色域を赤色に設定してその面積の計測を行い、相対的な大きさに着目して解析を行った。なお、それぞれの細胞の高さについて共焦点顕微鏡を用いることで、ほぼ同じ高さであることが確認できた。

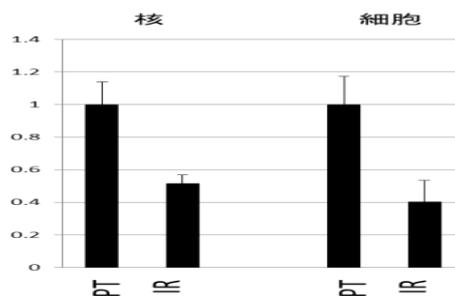
実験① リアルタイム PCR を用いた MitochondriaDNA (mtDNA) の計測¹⁾

それぞれの細胞での核 DNA (AMG アメロジェニン) 量と mtDNA 量をリアルタイム PCR にて計測を行い、mtDNA 量/核 DNA 量を考えた。ただし、今回の実験では、細胞 1 個あたりの核の数は放射線照射前と後で変わらないと考え、細胞 1 個あたりの核 DNA 量は不変であると仮定した。

結果

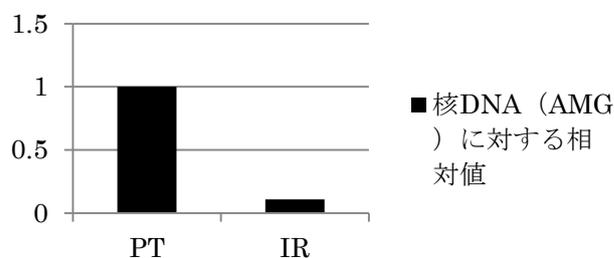
解析①

以下が計測したデータをまとめて PT を 1 としたときの IR の相対値である。細胞・核どちらも放射線照射後に小さくなっている。総計測細胞数は 300 個以上である。



実験①

以下が計測したデータを Excel にまとめて PT の mtDNA 量/核 DNA 量を 1 としたときの IR1 及び IR2 での mtDNA 量/核 DNA 量の相対値である。核 DNA 量は前述の通り不変と仮定しているため、mtDNA 量の比較と考えられる。放射線照射後で、mtDNA 量は減少している。



考察

mtDNA 量の放射線照射による減少については、ミトコンドリア数の減少が考えられる。

ミトコンドリア数の減少は、エネルギー産生における酸化的リン酸化の効率低下を意味すると考えられる。これは、癌細胞でのエネルギー産生が解糖系に移る Warburg 効果を増強すると考えられる。当然、解糖系では ATP 産生が酸化的リン酸化に比べ劣るので、エネルギー使用量を細胞としては減らす必要がある。これが、細胞及び核が小さくなったこと（総タンパク量の減少？）の原因ではないかと考えられる。また、ミトコンドリアが作る活性酸素は DNA を損傷することによってアポトーシスに関与することが知られているが、ミトコンドリア数の減少によって活性酸素の産生量も下がることが予想され、これが、放射線療法や化学療法への抵抗性に関与するかもしれない。

参考文献

1)リアルタイム PCR 実験ガイド 2007 羊土社

Streptococcus sanguinis 菌体による NLRP3 インフラマゾームの活性化

43090040 長谷川 裕規

指導教員：柴田 健一郎、佐伯 歩 (口腔分子微生物学教室)

キーワード：Streptococcus sanguinis, NLRP3, インフラマゾーム, IL-1 β

諸言

口腔レンサ球菌である *Streptococcus sanguinis* は、感染性心内膜炎の代表的起因菌として報告されている。近年、炎症性サイトカインの一つである IL-1 β がその病態の形成に関与しているという報告がなされている。IL-1 は IL-1 α と IL-1 β からなり (1)、IL-1 β はインフラマゾームの活性化で誘導されることが明らかにされている。昨年の研究実習では *S. sanguinis* がマウス樹状細胞に caspase-1 依存的に IL-1 β の産生を誘導することを明らかにした (2)。そこで、

本研究実習では *S. sanguinis* がどのようなインフラマゾームを介して IL-1 β の産生を誘導するかを明らかにすることを目的とした。

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。さらに、C57BL/6 (B6) マウスあるいは琉球大学鈴木教授から分与された NLRP3 ならびに ASC ノックアウトマウス (NLRP3-KO ならびに ASC-KO) から調製した骨髄細胞を、GM-CSF 存在下で分化誘導した骨髄由来マクロファージ (BMMs) 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 あるいは 2.4×10^7 cfu 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 blot 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。

結果ならびに考察

NLRP3 特異的な siRNA を安定発現する XS-106 細胞を樹立し、Ss で刺激したところ、IL-1 β 産生量は野生型の

XS-106 細胞に比べて有意に低下した (図 1)。さらに、Ss は B6 由来の BMMs に対して強い IL-1 β 産生活性を示したが、NLRP3 KO ならびに ASC KO 由来の BMMs に対しては殆ど活性を示さなかった (図 2)。

これらの結果から、*S. sanguinis* はマウス樹状細胞ならびにマウスマクロファージにおいて NLRP3 インフラマゾームを介して IL-1 β の産生を誘導することが示唆された。

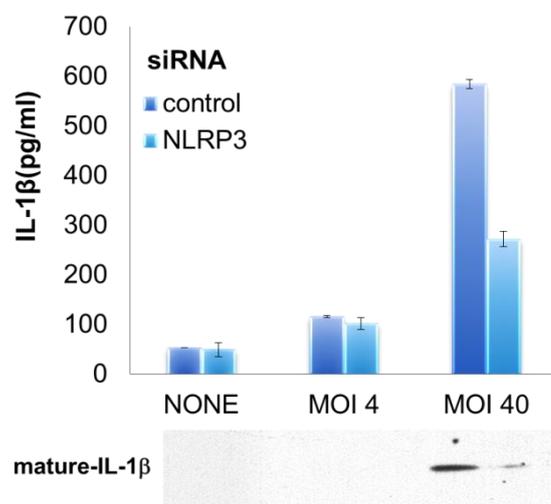


図1. 野生型ならびに NLRP3 特異的な siRNA を安定発現する XS-106 細胞における IL-1 β 産生 (ELISA 法、Western blot 法)

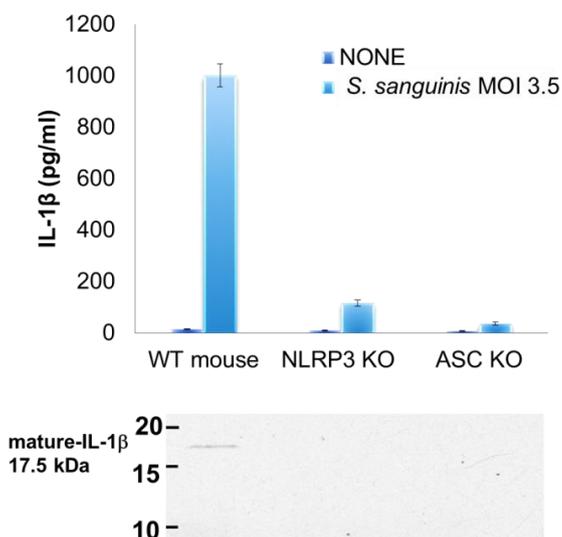


図2. B6 WT マウス、NLRP3 ならびに ASC ノックアウトマウス由来 BMMs による IL-1 β の産生 (ELISA 法、Western blot 法)

参考文献

- Gross, O., Yazdi, A.S., et al. Immunity Vol 36, Issue 3, 388–400, 2012
- 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

Mycoplasma salivarium によるインフラマソームの活性化

43090049 前川 翠(口腔分子微生物学教室/指導教員:柴田 健一郎、佐伯 歩)

緒言

Mycoplasma salivarium は歯周疾患患者の歯周ポケットから健常者に比べて高頻度で分離され、また、顎関節炎患者の顎関節の滑液から高頻度で分離され、口腔疾患における病因的役割が注目されている(1-4)。

本研究では、本マイコプラズマの歯周炎における病因論の一つを明らかにするために、歯周炎において重要な病因的役割を果たしているIL-1 β (5)に注目し、本マイコプラズマがIL-1 β 産生誘導活性を有するかどうかを検証した。

材料と方法

1) 供試マイコプラズマ種と標的細胞

マイコプラズマ種として *Mycoplasma salivarium* ATCC23064 (MS)を用い、また、標的細胞として A/J マウス由来の樹状細胞である XS-106 細胞を用いた。

2) IL-1 β の測定

6×10^5 個の XS-106 細胞に、MS 生菌あるいは 100 °Cで5分間処理したMS死菌をタンパク質量としてそれぞれ、0 $\mu\text{g/ml}$ 、36.5 $\mu\text{g/ml}$ 、365 $\mu\text{g/ml}$ で、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。

3) caspase 阻害薬の影響

Pan-caspase 阻害薬である z-VAD-FMK および caspase-1 阻害薬である z-YVAD-FMK の存在下で XS-106 細胞に MS 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。

4) RNA 干渉

caspase-1 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。

5) Nod-like receptor (NLR)の同定

NLRP3 特異的 siRNA を安定発現する XS-106 細胞を樹立した後、反応上清中のIL-1 β の産生量を ELISA 法で測定した。なお、NLRP3 の mRNA の発現抑制は real-time RT-PCR 法で確認した。

6) 反応性酸素種(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)をそれぞれ 0、5、10 mM存在下で XS-106 細胞に MS で 24 時間刺激しIL-1 β の産生を ELISA 法で測定した。

5. 細胞死の測定

XS-106 細胞に MS で 24 時間刺激した後に 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。

結果ならびに考察

XS-106 細胞に菌体で刺激すると、生菌ならびに死菌共に菌体濃度依存的にIL-1 β が産生された。しかしながら、ELISA 法では pro-IL-1 β と成熟型IL-1 β を区別できないために、成熟型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 の成熟型IL-1 β の産生が確認された(図1)。

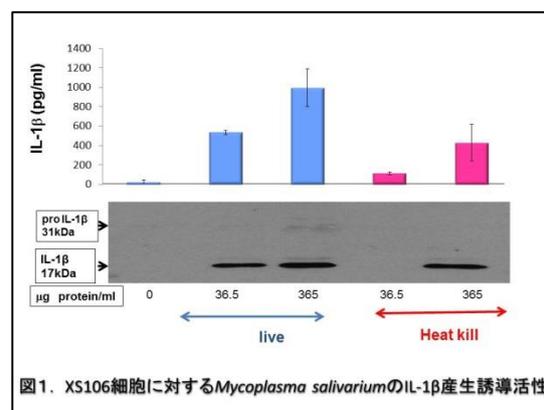


図1. XS106細胞に対する*Mycoplasma salivarium*のIL-1 β 産生誘導活性

MS 生菌のIL-1 β 産生誘導活性は pan-caspase 阻害薬である z-VAD-FMK および caspase-1 阻害薬で

ある z-YVAD-FMK で抑制された。さらに、RNA 干渉により caspase-1 mRNA の発現を抑制すると、IL-1 β 産生誘導活性は大きく低下した。

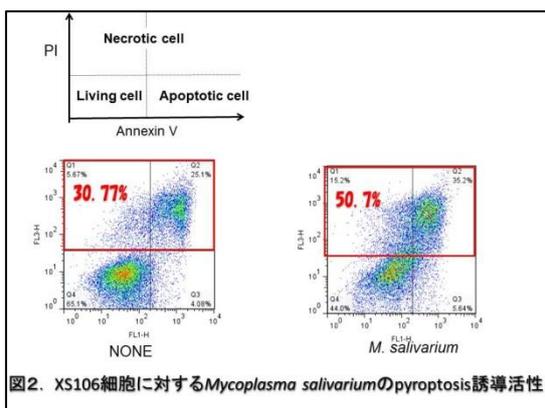
これまでインフラマソームには種々の NLR が関与していることが報告されている (6)。そこで、MS はどのような NLR インフラマソームを活性化しているかを明らかにするために。これまで最も良く研究されている NLRP3 に注目した。NLRP3 の関与を明らかにするために NLRP3 特異的な siRNA の導入を試みたが、うまく導入できなかった。そこで、NLRP3 インフラマソームの活性化に ROS が関与していることが報告されているので、ROS 阻害剤 NAc 存在下での IL-1 β 産生の影響を調べた。その結果、NAc は濃度依存的に MS 菌体刺激による IL-1 β の産生を低下させた。

インフラマソームの活性化による IL-1 β の産生は pyroptosis という細胞死を伴うことが知られている。そこで、XS-106 細胞を菌体 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、ネクロシス様の細胞死が誘導されていることがわかった。pyroptosis 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シス様の細胞死であることから、MS は XS-106 細胞に pyroptosis を誘導していることがわかった(図2)。

的であることが判明した。また、XS-106 細胞の MS 菌体刺激による IL-1 β の産生には NLRP3 インフラマソームの関与が示唆された。さらに、本菌体は XS-106 細胞に pyroptosis という細胞死を誘導した。IL-1 β が歯周炎の病態形成に重要な役割を果たしていることから、MS 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成果は、本菌が歯周炎において何らかの病因的役割を果たしていることを示唆している。

参考文献

1. Engel L. D., Kenny G. E. J. Periodont. Res. 5:163-171, 1970
2. Kumagai K., Iwabuchi T. 他 3 名 J. Infect. Dis. 123:16-21, 1971
3. Watanabe T., Matsuura M., 他 1 名 J. Clin. Microbiol. 23:1034-1038, 1986.
4. Watanabe T., Shibata K., 他 6 名 FEMS Immunol Med Microbiol. 22(3):241-, 1998.
5. Graves, D.T. and Cochran D. J Periodontol 74(3): 391-401, 2003.
6. Mariathasan S. and D.M. Monack. Nat Rev Immunol 7:31-40, 2007.



以上の結果から、MS 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

薬学系論文の翻訳

43080046 早坂 博喜

指導教員：鈴木 邦明（細胞分子薬理学教室）

キーワード：アルカリ性ホスファターゼ

緒言

医歯薬系の産業翻訳実務士の資格を取得希望であったため、より専門的な論文翻訳指導をしていただくこと。

方法

指導教員に課せられた論文を翻訳。

指導教員に課せられた論文—Millan の「Mammalian Alkaline Phosphatase」の第 5 章「Enzymatic Properties」と、Goodman and Gilman の「The pharmacological Basis of Therapeutics」の第 14 章「Local Anesthetics」—の完訳。

結果

全ての範囲を和訳翻訳。それぞれの訳出結果の一部を以下で掲載する。

Millan の「Mammalian Alkaline Phosphatase」の第 5 章「Enzymatic Properties」の内容は以下の通り。

5.1 : 触媒阻害

5.1.1 : APs の拮抗的、非拮抗的阻害剤

5.1.2.1 : PLAP/GCAP での阻害の機序

5.1.2.2 : TNAP での阻害剤の結合

5.2 : アロステリック作用

5.3 : ヒトの APs の触媒効率

5.4 : 基質特異性

5.5 : 酵素のスーパーファミリーとしての APs

序論の訳文の一部翻訳の結果は次の通り。

「この書籍では先天性代謝異常とノックアウトマウスの分析に主に焦点を当てている。なぜなら、これらの研究により酵素や他物質の生物学的役割が解明されてきており、今後の研究での仮説として有益であるためである。人間の Aps をコード化している遺伝子数とその構造を解明することは、低ホスファターゼ症の出生前診断の際、その異常な対立遺伝子を見つける手助けになる。また、低ホスファターゼ症の変異についての最新の遺伝子型相関性や形質型相関性により、罹患患者の形質的異常の重症度を予測することも可能となっている。多くの進歩により、低ホスファターゼ症や他の疾患に対する実験的な治療もされている。AP の作用は長きにわたり健康や病気の様々な状態の指標として使用されており、治療対象として Aps 自体を利用する有用性については、近年の反応機構研究の結果の一つとして注目されるようになった。AP 作用を修飾可能な薬の開発への試みは、三次元構造や人類の Aps の機能的な(分子内の)領域について近年得られた膨大な新情報により、非常に進歩している。また、

APs は腫瘍の様々な部分に発現しているため、悪性腫瘍の免疫検出や免疫局在性の腫瘍マーカーとして使用されている。」

Goodman and Gilman の「The pharmacological Basis of Therapeutics」の第 14 章「Local Anesthetics」の翻訳の序論と掲載内容の翻訳結果の一部は次の通り。

「局所麻酔薬は神経の Na⁺チャンネルの穴に存在する特異的受容体結合部位に可逆的に結合し、この穴を通して流れるイオンの移動を阻害する。神経組織の局所に適切な濃度で使用した場合、局所麻酔薬はその部位のすべての神経系に作用するとともに、すべてのタイプの神経線維にも作用し、神経伝達を担う活動電位を可逆的に阻害する。ゆえに、局所麻酔薬を神経幹に用いると、その神経が支配する領域の感覚、運動の両方が麻痺する。臨床で、局所麻酔薬を適切な濃度で用いれば作用は可逆的であり、本薬剤の使用後は、神経線維や神経細胞では構造上の損傷は一切なくその機能回復を得られる。

歴史

最初の局所麻酔であるコカインの麻酔作用は 19 世紀後半に偶然見つかった。コカインは *Erythroxylon coca* という灌木の葉に多量に含まれている。その葉のアルカリ抽出物を噛んだりすることで、アンデス原住民たちは興奮作用、陶酔作用を何世紀もの間味わってきた。コカインは 1860 年に Albert Niemann によって初めて分離された。多くの科学者がするように、彼はこの分離した物質をなめて舌がしびれることを発見した。Sigmund Freud はコカインの生理作用を調査し、Carl Koller は 1884 年に眼科手術において局所麻酔薬として初のコカインの臨床応用を行った。その後まもなく、Halstead が浸潤麻酔・伝達麻酔薬としてコカインの使用を普及させた。

考察

論文は論の展開に各者個性がみられるのは当然である。しかしながら、冗長な文を書くことはストレートに筆者の主張が読者に伝わりにくいものとなる。今回の Millan の「Mammalian Alkaline Phosphatase」の第 5 章「Enzymatic Properties」では、具体化の部分が非常に冗長な文構成であり、具体化の内容がさらに抽象度が高くなっていった。抽象→具体化→説明の展開では「抽象部分と具体化の部分を冗長にしないこと」これが、わかりやすく読者に筆者の主張をストレートに伝えるものと考えられる。

エナメル質に対するキシリトールの影響に関する研究

43090013 小田 若菜

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)

キーワード：エナメル質，キシリトール，*S. mutans*

諸言

キシリトールは、分解時に酸が産生されず、*S. mutans* 等の細菌を化学的に阻害し、唾液分泌促進により口腔内防御機構を活性化させ、Ca 複合体形成により唾液およびプラーク中のリン酸化 Ca を安定化させるといった効果により、う蝕予防効果を発揮する(1)。ここで歯質への直接的な影響はあるのかという疑問が浮かび、エナメル質に対するキシリトールの影響について検討した。

方法

ヒト臼歯(一辺 2 mm の正方形のエナメル質部分のみ露出)を用い、1~15%の水道水あるいは脱イオン水を用いたキシリトール溶液を歯牙に作用させた。試料の脱灰には 0.2M 乳酸(pH4.5)を用いた。試料を各種濃度のキシリトール溶液に1週間浸漬させた後に乳酸に1時間浸漬させた。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。また各溶液の pH を測定した。

結果

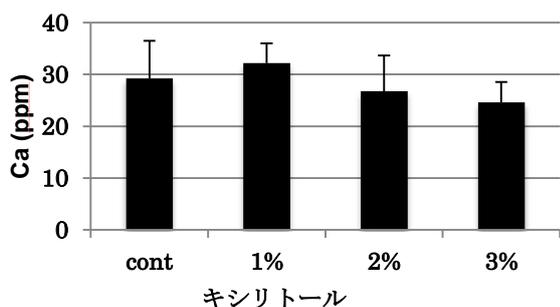


図1 低濃度キシリトール溶液浸漬後の Ca 溶出量

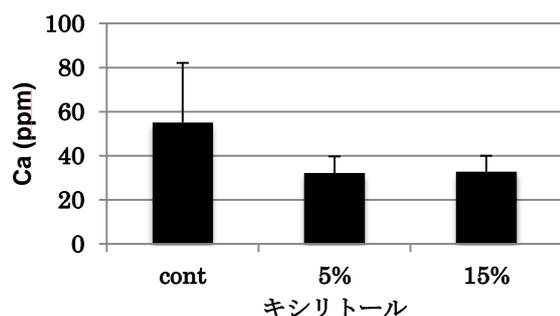


図2 高濃度キシリトール溶液浸漬後の Ca 溶出量

脱イオン水を用いた低濃度キシリトール溶液に浸漬した後に、乳酸中の Ca 溶出量は濃度依存的に減少した(図1)。また脱イオン水を用いた高濃度キシリトール溶液に浸漬した後に、乳酸中の Ca 溶出量は減少し、5%と15%ではほぼ同程度となった(図2)。

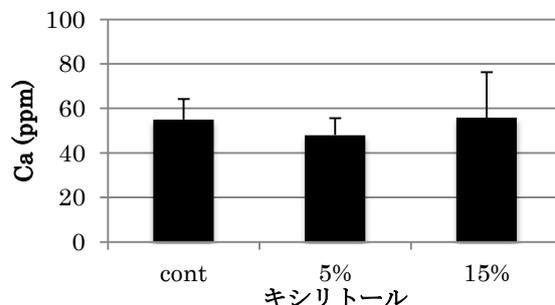


図3 キシリトール溶液(水道水)に浸漬後の Ca 溶出量

各種溶液の pH を測定するとキシリトール溶液(脱イオン水)5%は pH6.16、15%は H6.33、キシリトール溶液(水道水)5%は pH7.12、15%は pH6.99 となった。キシリトール溶液(水道水)に試料を浸漬すると Ca 溶出量に変化はみられなかった(図3)。

以上の結果からキシリトール溶液に歯を浸漬するとキシリトールは歯質を強化していると考えられる。

キシリトールは中性下では歯質の耐酸性に影響を及ぼさず、弱酸性下では濃度依存的に歯質の耐酸性を向上させたといえる。キシリトールは再石灰化に必要な Ca の供給源となるが歯質の耐酸性を向上させることはないと言われていたが、本研究において、酸性環境下では歯質の耐酸性を向上させることがわかった。ガムやタブレットによるキシリトール摂取時に pH を適切に調整することにより、キシリトールは、歯質を強化すると推測される。ただし、pH を下げることは歯の脱灰を引き起こす可能性があるため、さらなる検討が必要である。

結論

弱酸性下においてキシリトールがエナメル質に作用し、歯の耐酸性を向上させることが明らかになった。

参考文献

キシリトールのすべて カウコ, K. マキネン/鈴木 章/福田 雅臣 P33
1997/5/30 日本フィンランド虫歯予防研究会 発行
株式会社 ティピィジャパン 出版

エナメル質に対するリン酸オリゴ糖カルシウムに関する研究

43090018 岸 宏美

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)

キーワード：エナメル質、リン酸オリゴ糖カルシウム、*S. mutans*

緒言

リン酸化オリゴ糖カルシウム (POs-Ca)¹⁾ は歯質を再石灰化し、初期齲蝕に効果的であると言われている。本研究では、POs-Ca によるエナメル質の脱灰の抑制について検討した。

方法

ヒト臼歯(一辺 2 mm の正方形のエナメル質部分のみ露出)を用い、POs-Ca あるいはフッ素とキシリトールを併用した溶液を歯牙に作用させた。試料の脱灰には 0.2M 乳酸 (pH4.5) を用いた。試料を各種溶液に 1 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した。また一部の試料は POs-Ca 浸漬後、走査型電子顕微鏡で表面を観察した。

結果

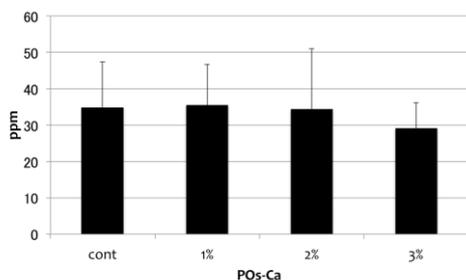


図 1 低濃度 POs-Ca 溶液に浸漬後、乳酸溶液に溶出したカルシウム量

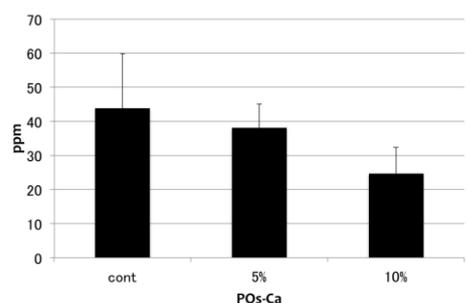


図 2 高濃度 POs-Ca 溶液に浸漬後、乳酸溶液に溶出したカルシウム量

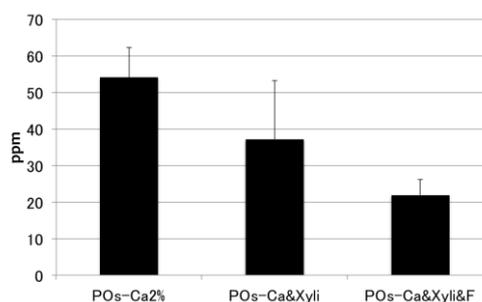


図 3 POs-Ca とキシリトールとフッ素の併用による効果

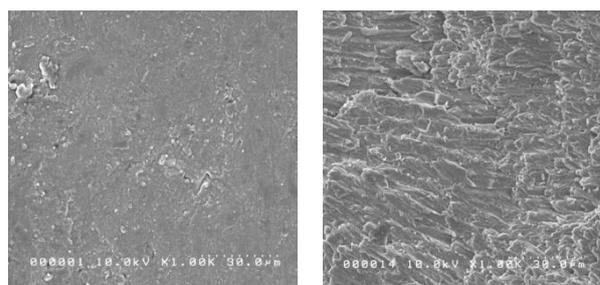


図 4 走査型電子顕微鏡写真

図 4 走査型電子顕微鏡写真

様々な POs-Ca 濃度で実験を行った結果、濃度依存的に Ca 溶出量低下の傾向がみられた。(図 1・図 2) 特に 10% では有意な Ca 溶出量の低下が認められた。(図 2) またキシリトールとフッ素の併用により、乳酸中の Ca 溶出量は、2% POs-Ca 単独の場合と比較して有意な低下が認められた。(図 3) 走査型電子顕微鏡写真では POs-Ca の作用により歯質の表面性状が変化しているのが確認できた。(図 4)

考察

以上により POs-Ca が歯牙脱灰抑制に効果的であると確認された。現在市販されている POs-Ca 配合ガムには 2% の POs-Ca が含まれている。結果から POs-Ca の濃度が 10% において最も Ca 溶出量の低下が認められたため、ガムにおける POs-Ca 含有量を増やした方が歯質の脱灰の抑制に効果的ではないかと考えられる。

また現在歯科医院専売として、POs-Ca に加えキシリトールやフッ素配合のガムが開発されているが、市販のガムと比較して効果的であることが示唆された。

参考文献

1) グリコHP: <http://www.glico.co.jp/posca/posca.html>

線量計の作製と自動計測

43090029 高橋 弘祥

指導教員：西方 眞（学術支援部）

キーワード：放射線、線量計、自動計測

諸言

過去の北海道大学歯学部における研究実習において、放射線に対する理解を深める目的で、線量計（ガイガーカウンター）の作製を行ってきた^{1,2)}。その際の、放射線の計測方法は、線量計から出る電波をラジオのノイズとしてとらえ、それを手動のカウンターで計測するものであった。そのため、放射線量が多くなると、手動でのカウンターを用いた計測が追い付かず正確な値を求めるのは困難であった。今回はこの点を解決することを目的として実験を行った。

方法

線量計（ガイガーカウンター）は過去の研究実習で作製したものと様様のものを新たに作製して用いた。概要は図1に示す。

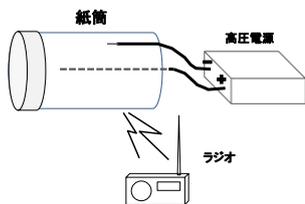


図1. 線量計の概要

線量計の本体は円柱形の紙筒（直径 4.5cm、長さ 7cm）を用いた。この容器は密閉されたもので、蓋が付いている。リード線のビニールの被膜を取り除き、銅線をむき出しにして、その内の1本だけ残し、その他は切り取った。残した銅線（8cm）を二つ折りにし、こよりを作るようにねじり、ヘアピンのように先端部分に直径 1mm ほどの輪ができるようにした。この銅線を紙筒の底から挿入し、固定した。この線を陽極とした。もう1本のリード線を紙筒の表面に接させて陰極とした。紙筒の中にライターからボタンガスを少量入れて（連続放電防止のため）、両極間に 6300 ボルトの高電圧をかけた。この紙筒に放射線が入ると、中の空気が電離し、生じたイオンが両極に移動し電気が流れることになる。この時に電波が発生し、ラジオでノイズを受信することができる。ガッ、ガッという音がする。今回は、この音を自動的に計測するために、GMCLogger というフリーソフトを用いた。ラジオのイヤホンジャックからの音をパソコンに入力させると、このソフトによって単位時間当たりのノイズの数を計測することができる。放射線の数を1分あたりのカウント数（cpm, count per minute）で表した。計測は1分間を5回行い、その平均を求めた。

結果

線量計を先端を下にしてスタンドに固定し、机の上に置き（線量計の先端と机の距離は 10cm）、そのまま計測したところ、1分毎に 80、70、71、78、71 の値が得られた。これを平均すると、74cpm となる。1分間ごとの数値のばらつきはそれほど大きくはなく、平均値との差は大きくても 10% 以下であった。この時に計測された放射線の数は、自然放射線に由来するものと思われる。

次に、作製した線量計が放射線を正確に測定することができるのかを調べるために、放射線を比較的多く放出する物質について測定を行った。そして、この値が妥当なものなのか、精度の良い、市販の線量計で測定した値と比較した。用いたのは、校正済みの線量計（アロカ日立メディカル株式会社 GM サーベイメータ TGS-136）で、値はこの線量計にデジタル表示される。TGS-136 は、今回作製した線量計と同じ原理で放射線を測定する。双方とも試料と線量計の先端の距離は 10cm とした。結果を表1に示す。

試料	測定値 (cpm)	
	今回作成の線量計	TGS-136
無し	74	60
ウランガラス (ウラン 238)	110	115
塩化カリウム (カリウム 40)	105	150
ランタンマントル (トリウム 232)	1105	3200

表1. 各種試料の放射線量 各種の試料を、今回作製した線量計と市販の線量計（TGS-136）で測定した。

表1に示すデータを収集した数日後に実験を再開したところ、今回作製した線量計が誤作動を起こすようになった。試料がないにもかかわらず、あたかも多くの放射線を測定しているかのごとく高い計数値が得られ、放射性物質を近づけても計数値は更に高くなることはなかった。陽極を洗浄するなど対策を試みたが、改善されなかった。そのため、多くの試料について放射線量を測定する実験はできなかった。誤作動の原因は解明できなかった。

考察

今回作製した線量計が実験途中で誤作動を起こしてしまい、放射線量を測定できた試料は限られてしまった（表1）。今回作製の線量計の値と市販品（TGS-136）の値を比較する。市販品の直径は 5cm で双方とも似たような大きさで、放射線の入りやすさは同等であると思われる。試料がない状態（自然放射線）での値は、双方の値は良い一致を示した。ウラン 238 を含むウランガラスでも、非常に近い値が得られた。1分間に 100 を超える計測数であるが、これを従来のように手動のカウンターで測定しようとしても正確な値を得るのは困難である。今回、大きな計測値でも測定できたのは、パソコンで計測した成果である。試薬の塩化カリウムには、ごく少量の放射性核種であるカリウム 40 が含まれているので、放射線が検出された。値は、双方で多少の違いがみられ、TGS-136 でより大きな値が得られた。トリウム 232 を含むランタンマントル（アウトドア用品）では、双方の線量計でかなり大きな値が得られた。1000 を超える値を検出できたのも、パソコンによる自動計測の成果である。このように、自動計測をすることで、大きな値の測定にも対応できることがわかる。ただ、ランタンマントルの場合は、今回作製した線量計では、市販の線量計の 3分の1 の値であった。理由は分らないが、パソコン側で検出するノイズの解析の精度の問題であるかもしれない。

文献

1. 新谷ゆかり ガイガー計数管の作製と放射線量の測定。北海道大学歯学部6年生 研究実習論文報告集 第9号 117-118 (2008)
2. 牧野紗織 ガイガー計数管の作製と放射線の測定。北海道大学歯学部6年生 研究実習論文報告集 第11号 119-120 (2010)

暗算作業効率に及ぼすドリンク剤の効果

43090032 玉木 宏典

指導教員：吉村 善隆（細胞分子薬理学教室）

キーワード：内田クレペリン検査、暗算作業効率、ドリンク剤

緒言

精神的、肉体的疲労回復を目的としたドリンク剤が販売されているが、その効果について知ることはほとんどない。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、短時間におけるドリンク剤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 二名に、ドリンク剤の摂取前後に内田クレペリン検査（図 1）を行った。内田クレペリン精神作業検査とは、クレペリンが実験心理学的研究のために考案したものを、内田勇三郎が翻訳したパーソナリティ検査である。

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 2）。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（縦軸）、第 2 時点（②）と第 3 時点（③）との間にドリンク剤を摂取した。なお、コントロールは何も摂取しなかった場合のことを示している。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を比較検討した。文献 3 より、5% 以上の上昇が見られれば効果があると認められ、今回はその報告に従った。

ドリンク剤として、清涼飲料水であるレッドブル（185ml：レッドブル）および眠眠打破（50ml：常磐薬品）、第 2 類医薬品であるリポビタンゴールド（50ml：大正製薬）およびビタシーローヤル 3000（100ml：常磐薬品）を用いた。



図 1 内田クレペリン検査用紙

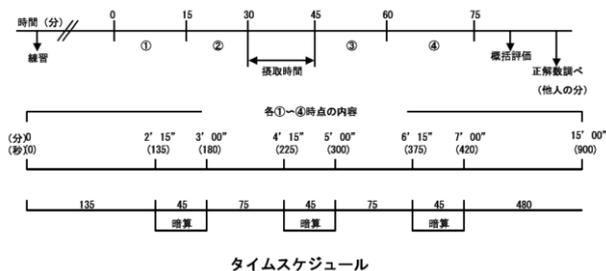


図 2 測定タイムスケジュール

結果

被験者 A においては、レッドブル（図 3）、眠眠打破（図 3）、ビタシーローヤル（図 4）で作業効率の向上が認められ、リポビタンゴールドにおいては認められなかった。嗜好に関して調べたところ、レッドブルおよびビタシーローヤルは好む味であり、リポビタンゴールドは嫌いな味であり、眠眠打破はどちらでもなかった。

被験者 B においては、眠眠打破の第 3 時点（図 3）、ビタシーローヤルの第 4 時点（図 4）で作業効率の向上が認められ、レッドブル、リポビタンゴールドでは認められなかった。嗜好に関して調べたところ、ビタシーローヤルの

み好む味であり、他は嫌いな味であった。

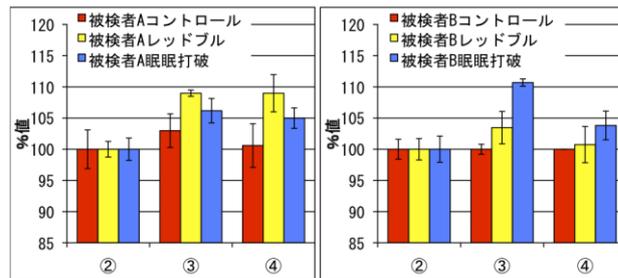


図 3 清涼飲料水

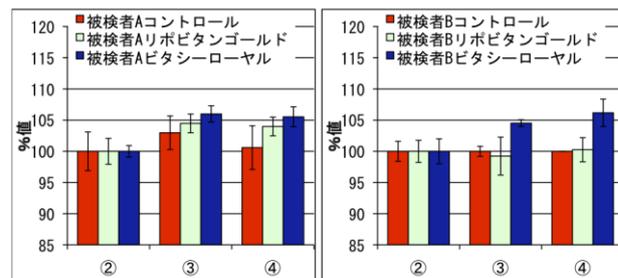


図 4 第 2 類医薬品

考察

清涼飲料水に対して、第 2 類医薬品であるリポビタンゴールドおよびビタシーローヤルにはタウリンが配合されている。今回の結果は、第 2 類医薬品のドリンク剤に含まれているタウリンによる作業効率の向上は認められなかった。

今回用いたドリンク剤はカフェインが配合されている。過去の研究実習の結果から、カフェイン配合ドリンク剤は作業効率の向上が認められる場合が多かったが、今回の結果は被験者の嗜好が大きく影響を与えている可能性が考えられた。これは、被験者 A、B ともに好む味で作業の向上が認められ、嫌いな味では認められなかった。データは示していないが、好む味のカフェインレスの飲料では作業効率の向上は認められなかった。また、過去の研究実習の結果から、ドリンク剤の摂取による気分転換により作業効率が向上する場合は考えられるが、今回は認められなかった。

以上の結果をまとめると、ドリンク剤の内容物の薬理作用は重要であるが、その味も重要であることが示唆された。

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、劇的に作業効率の上がるドリンク剤は無いことが示唆された。

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。

アルカリ性ホスファターゼの酵素活性の性質と解析の一例
 43090036 寺崎 恵美
 指導教員：鈴木 邦明（細胞分子薬理学教室）
 キーワード：アルカリ性ホスファターゼ，ALP，リセドロネート

緒言

硬組織形成に重要とされるアルカリ性ホスファターゼ(ALP)の酵素活性について深く学び、活性の解析法を実際に経験することを目的に研究実習を行った。

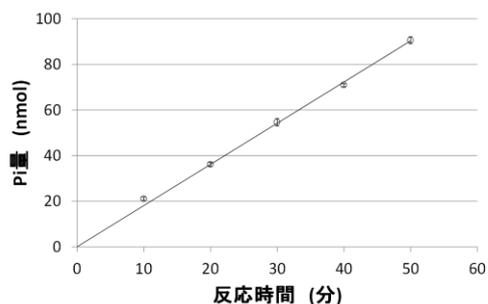
方法

ALP の酵素活性の性質については、Millan の著書である”*Mammalian Alkaline Phosphatases*“の第 5 章”Enzymatic Properties“を英文で読みレポートを作成した。ALP 活性の解析法は、ビスフォスフォネートであるリセドロネートの ALP 活性に対する作用を検討するために行われた一連の実験データを使用して、データ解析の方法を学んだ。

結果

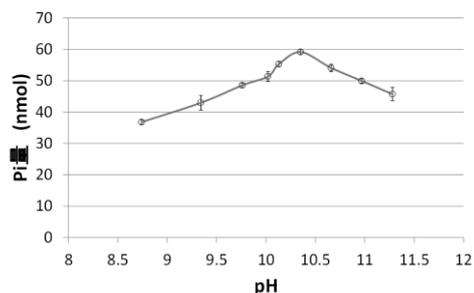
- 1) アルカリ性ホスファターゼ (ALP) の酵素的性質¹⁾
- ALP は細胞外たんぱく質であり、R-OP が加水分解され、無水リン酸とアルコール、糖、フェノールなどが生成される過程を触媒するが、これがフォスファターゼ、つまりリン酸モノエステル加水分解酵素という意味である。
 - アルカリ性という名の通り、pH が 8~10 と、アルカリ性で最も効率的に触媒作用を行う。
 - 非特異的に出現し、様々な基質と反応するという点で、フォスファターゼの中では特徴的である。
 - 生体内の特にアルカリ性とは思われていない部分に出現することは驚くべきことである。
 - 腫瘍の様々な部分に発現しているため、悪性腫瘍の免疫検出や免疫局在性の腫瘍マーカーとして使用される。
 - ビスフォスフォネートは、活性部位の Zn^{2+} 、 Mg^{2+} をキレート結合することにより、ALP の 4 つのアイソザイムの 1 つである、TNAP 組織非特異的アルカリ性フォスファターゼを阻害する。

2) 基質分解の反応時間依存性について解析すると、図 1 のように基質の 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。



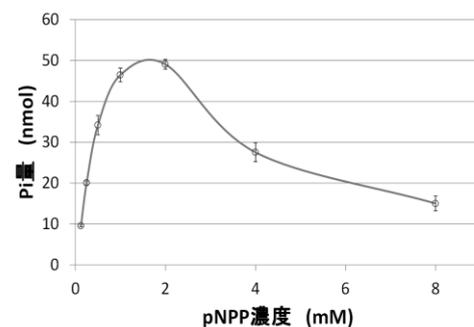
〔図 1〕 反応時間依存性

3) 基質分解の 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 10.35 であった。



〔図 2〕 pH 依存性

4) 活性の基質濃度依存性について解析すると、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、基質 2mM で最大活性を示した。それ以降の濃度では活性が低下し、基質阻害が起こっていることが示唆された。

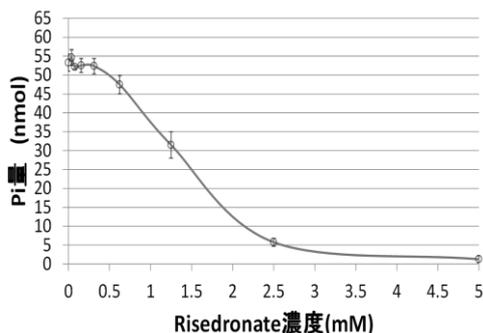


〔図 3〕 基質濃度依存性

- 5) ビスフォスフォネート (リセドロネート) について^{2,3)}
- ビスフォスフォネート (BP) はピロリン酸の構造類似体であり、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への形成・誘導を阻害したり、骨吸収面に露呈しているハイドロキシアパタイトに強く結合することで破骨細胞の機能を抑制し、骨吸収や波状縁を抑制する。
 - 生体内には本来存在しない物質であり、体内蓄積が長いことに危惧があるが、骨折を予防する公衆福祉的観点から有益性が高い薬剤である。

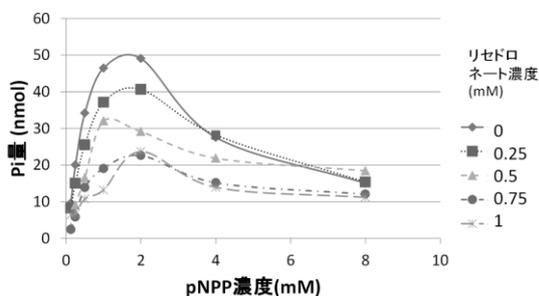
- ・リセドロネートは、効力、つまり骨吸収抑制作用と骨代謝回転抑制作用は強力で、FPP 酵素抑制能も高い。
- ・BP の中では骨への親和性は低いとされており、つまり投与中止後の薬剤効果消失が速い。さらに、FPP 酵素抑制能が高いため、投与開始後の効果発現も速い。

6) ALP 活性のリセドロネート阻害濃度依存性を解析すると、図 4 のように、リセドロネートの濃度依存的に ALP 活性は阻害された。また、低濃度のときにはほとんど阻害されず、0.625 から 2.5mM の間で急激に活性が阻害された。



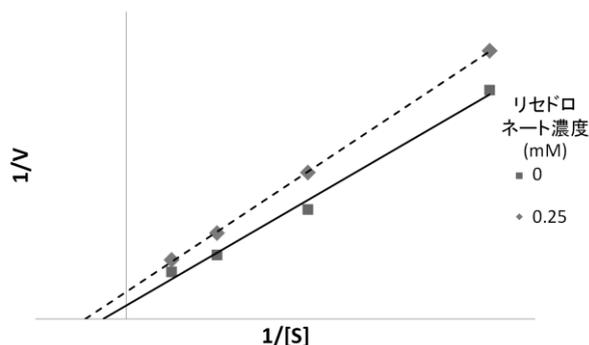
〔図 4〕 ALP 活性のリセドロネート阻害濃度依存性

7) 各種リセドロネート濃度下での ALP 活性阻害における基質濃度依存性を解析すると、図 5 のようにリセドロネートの濃度依存的に最大活性は低下する傾向が見られた。



〔図 5〕 様々なリセドロネート濃度での ALP 活性の阻害 基質濃度依存性

8) 二重逆数プロットによりリセドロネートの阻害様式を調べると、7) のリセドロネート 0, 0.25mM の結果からは図 6 が得られ、混合阻害であると示唆された。二重逆数プロットの各濃度の結果から出された、基質の 50% 活性濃度値および ALP の最大活性値を表 1 にまとめた。リセドロネート 0.5, 0.75, 1.0mM において、実験値では最大活性の低下が見られたにもかかわらず、その実際と外れて二重逆数プロットによる値は無秩序であり、グラフも直線上にのらず、結果は得られなかった。



〔図 6〕 二重逆数プロット

【表 1】 二重逆数プロットによる解析結果

リセドロネート濃度 (mM)	基質の50%活性濃度 (mM)	ALPの最大活性 (nmol/mM)
0	0.193548 ↑	161.2903 ↓
0.25	1.104839 ↑	80.64516 ↓
0.5	4.311478	163.9344
0.75	0.152318	384.6154
1	0.152318	13.24503

9) Hi11 プロットによりリセドロネートの阻害様式を調べると、表 2 のように、一部の解析データを除き、基質の 50% 活性濃度はリセドロネート濃度に応じて増加し、ALP の最大活性は低下したため、混合阻害であると示唆された。

【表 2】 Hi11 プロットによる解析結果

リセドロネート濃度 (mM)	基質の50%活性濃度 (mM)	ALPの最大活性 (nmol/mM)
0	0.278925 ↑	49.06306 ↓
0.25	0.308617 ↑	40.63063 ↓
0.5	0.465990 ↑	32.02102 ↓
0.75	0.407167	22.57657 ↓
1	0.741977 ↑	23.68768

考察

二重逆数プロットによる解析には、データがミカエリスメンテン型つまり双曲線型である必要があるが、今回のデータは二重逆数プロットには不向きであったと考えられた。今回の実習から酵素反応の解析には適切な方法を検討することが大事であることを学んだ。しかし、Hi11 プロットでも適切な解析結果が出なかった 0.75 と 1mM リセドロネートの結果については、実験をやり直さなくてはならないと考えられた。

参考文献

- 1) J. L. Millan (2006). Mammalian Alkaline Phosphatases; Introduction:1-2, Enzymatic Properties:67-89
- 2) ビスホスホネートを使いこなす 文光堂
- 3) ビスホスホネートエビデンスブック 医薬ジャーナル

暗算作業効率に及ぼすカフェインの影響
 43090046 古田 誉之
 指導教員：吉村 善隆（細胞分子薬理学教室）
 キーワード：内田クレペリン検査、暗算作業効率、ドリンク剤

緒言

カフェインは日本薬局方に収載されている医薬品であり、各種医薬品に配合されている。また、薬事法により劇薬に指定されている。しかし、コーヒーや紅茶などカフェインを含有している飲料は数多く存在している。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。そこで、今回クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標とし、短時間におけるカフェイン含有飲料の効果について体験し検討した。

材料と方法

健康な被験者 A および B 二名に、ドリンク剤の摂取前後に内田クレペリン検査（図 1）を行った。内田クレペリン精神作業検査とは、クレペリンが実験心理学的研究のために考案したものを、内田勇三郎が翻訳したパーソナリティ検査である。

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 2）。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（縦軸）、第 2 時点（②）と第 3 時点（③）との間にドリンク剤を摂取した。なお、コントロールは何も摂取しなかった場合のことを示している。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。文献 3 より、5% 以上の上昇が見られれば効果があると認められ、今回はその報告に従った。

カフェイン含有飲料として、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）、スリランカ紅茶（175ml：スリランカ）を用いた。

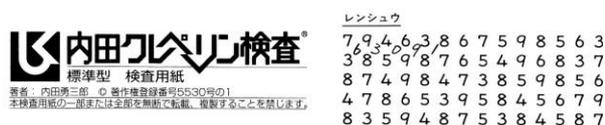


図 1 内田クレペリン検査用紙

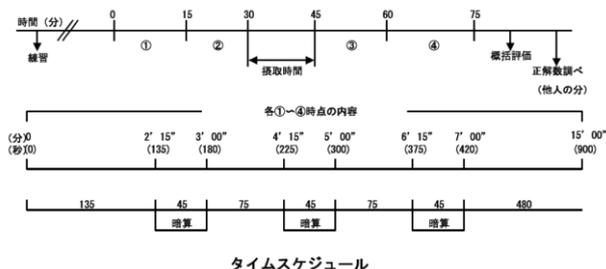


図 2 測定のタイムスケジュール

結果

被験者 A においては、スリランカ紅茶（図 3）で作業効率の向上が認められ、コーヒーおよび紅茶においては認められなかった。

被験者 B においては、コーヒーの第 4 時点（図 4）、スリランカ紅茶で作業効率の向上が認められ、紅茶において作業効率の向上が認められた。

また、被験者 A・B とともに日常においてカフェインを摂

取る機会が多かった。

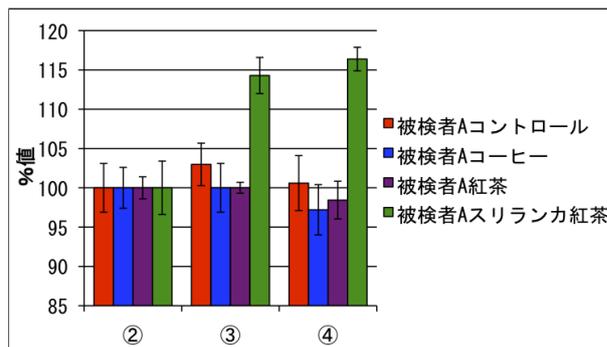


図 3 カフェイン含有飲料（被験者 A）

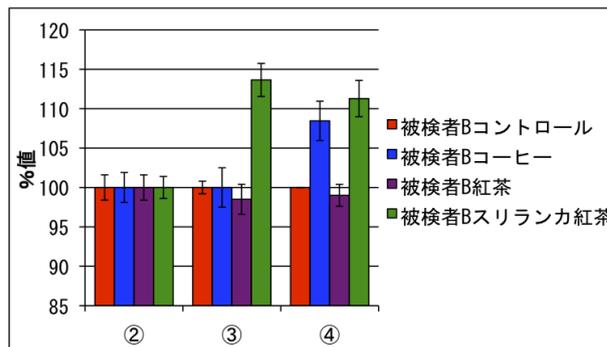


図 4 カフェイン含有飲料（被験者 B）

考察

経口摂取の場合、カフェインは 5 分程度で全身に到達し、血脳関門を容易に通過し、中枢作用を発揮する。成人の場合の生物学的半減期は 2.5～4.5 時間と報告されている。

今回用いたカフェイン含有飲料におけるカフェイン含有量は、コーヒー 105mg、紅茶 87.5mg であり、スリランカ紅茶においては記載がなかった。コーヒー、紅茶においては、中枢作用が認められる量であったが、認められなかった。これは被験者 A・B とともに日常においてカフェインを摂取する機会が多かったことから、カフェインに対する耐性の存在が考えられた。また、スリランカ紅茶には、大量のカフェインが含まれているか、他の作業効率の向上させるものが含まれている可能性が示唆された。

教科書には、カフェインの中枢作用については「耐性は生じない」と記載されている。脳に多く見られるのは A1 受容体と A2A 受容体であるか、最近、A1 については組織耐性が生じることが報告されている。今回はこれ以上の考察はできなく、今後の研究の進展を期待したい。

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、通常のカフェイン含有飲料によって、作業効率の向上は期待できないことが示唆された。

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。