

北海道大学歯学部 6 年生

4 4 期生（平成 2 6 / 2 7 年度）

研究実習報告集

[第 16 号]

Research Training Reports

Hokkaido University School of Dental Medicine

北海道大学歯学部44期生研究実習の概要

研究実習実施期間

平成26年8月～平成27年7月（5年次2学期～6年次1学期）

研究実習発表会

平成27年6月15日(月)、19日(金)、22日(月)

実 施 組 織

歯学部長 横山敦郎(口腔機能補綴学教室)

研究実習連絡会委員長 土門卓文(口腔機能解剖学教室)

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、長谷川智香(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、佐藤真理(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)

吉村善隆(細胞分子薬理学教室)

口腔機能解剖学教室

超音波照射が組織標本へ与える影響

43100016 岡崎加奈（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

43090017 金沢美松（指導教員：土門卓文）

茎突舌骨筋の停止部形態に関する形態学的研究

43100033 澤田武蔵（指導教員：土門卓文）

顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

43100036 鈴木 静（指導教員：土門卓文）

マイクロウェーブ照射が組織標本に与える影響

43100038 竹川英輝（指導教員：高橋 茂）

大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

43100047 福士莉穂（指導教員：土門卓文）

舌神経に関する形態学的研究

43100054 水野麻梨子（指導教員：土門卓文）

口腔生理学教室

呼吸のリズムと量の随意的調節による唾液分泌促進の可能性

43090009 大田圭一（指導教員：船橋 誠）

明暗環境が唾液分泌量に及ぼす影響について

43100018 奥村拓真（指導教員：平井喜幸、船橋 誠）

舌の随意運動時における運動関連脳磁場反応の解析

43100019 小熊英敏（指導教員：前澤仁志、船橋 誠）

咬みしめによる反応時間の遅延

43100020 小田哲也（指導教員：船橋 誠）

咽頭部への味刺激が随意性嚥下に及ぼす影響

43100031 実藤 潤（指導教員：船橋 誠、平井喜幸、久留和成、前澤仁志）

口腔内に貯留できる唾液量と嚥下機能の関連性に関する研究

43100039 寺島広朗（指導教員：船橋 誠、平井喜幸）

苦味溶液の持続投与によるダイエット効果の可能性

43100043 橋本里紗（指導教員：平井喜幸、久留和成、船橋 誠）

硬組織発生生物学教室

上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について

43100005 栗野淳之介（指導教官：山本恒之）

下顎第一大臼歯の根管形態について

43100017 奥川 葵（指導教員：山本恒之）

上顎第二小臼歯の根管形態について

43100029 相良ふみ（担当教官：山本恒之）

上顎側切歯の根管形態について

43100046 平野知佳（指導教官：山本恒之）

上顎犬歯の根管形態について

43100056 柳澤瞳子（指導教官：山本恒之）

骨芽細胞特異的副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)過剰発現マウスの胎生期下顎骨における組織学的解析

43100057 山崎七愛（指導教員：網塚憲生）

口腔生化学教室

血清タンパク質を付着させたチタン不織布による培養

43100025 木村一誠（指導教員：滝田裕子）

初期う蝕の診断法の現状と課題

43100040 内藤 亮（指導教員：水野守道）

バイオインフォマティクスによるオステオポンチンの研究—腫瘍との関係—

43100044 畠中柚衣（指導教員：藤沢隆一）

バイオインフォマティクスによるオステオカルシンの研究

43100049 藤村真也（指導教員：藤沢隆一）

超音波刺激による骨折治癒促進における骨細胞の関与

～骨細胞を持つ・持たない魚を用いた解析～

43100034 清水達哉（指導教員：田村正人、佐藤真理）

ART system によるう蝕治療の現状と課題

43100041 中野晋太郎（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影響

43100045 平井尚哉（指導教員：滝田裕子）

生体材料工学教室

薬剤徐放性を有するポリ乳酸ナノ粒子の作製

43100022 葛山智彦（指導教員：阿部薫明）

蛍光特性を有する矯正歯科用ボンディング材の開発

43100027 黒田悠介（指導教員：山方秀一、吉田靖弘）

象牙質とレジンの化学的接着

43100037 相馬 靖（指導教員：吉田靖弘）

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

43100048 藤田裕允（指導教官：八若保孝、吉田靖弘）

ドラッグデリバリーキャリアを目指した蛍光性多孔質ナノシリカの作成

43100055 森本紫之（指導教員：阿部薫明）

レジンマイクロナノパターンと細胞接着挙動

43100058 山田 恭子（指導教員：赤坂 司）

パターン化コラーゲンフィルム作製時の条件について

43100060 脇 宗睦（指導教員：赤坂 司）

口腔病理病態学教室

骨肉腫細胞における腫瘍溶解アデノウイルスの効果

43100003 浅川寛（指導教員：東野史裕、三河洋平）

シスプラチンと腫瘍溶解ウイルスの併用効果Ⅰ

43100004 天野利香（指導教員：東野史裕、稗田敏雄）

悪性度の異なるがん細胞に対する腫瘍溶解ウイルスの効果Ⅰ

43100006 伊賀友哉（指導教員：東野史裕、三河洋平）

悪性度の異なるがん細胞に対する腫瘍溶解ウイルスの効果Ⅱ

43100014 太田祐介（指導教官：東野史裕、三河洋平）

シスプラチンと腫瘍溶解ウイルスの併用効果Ⅱ

43100015 大橋雄高（指導教官：東野史裕、稗田敏雄）

口腔分子微生物学教室

インフラマソーム関連遺伝子のクローニング

43100001 青田宥馬（指導教員：長谷部 晃）

Streptococcus sanguinis による NLRP3 インフラマソーム活性化とその機構

43100011 伊東慶介（指導教員：柴田健一郎、佐伯 歩）

NLRP3 インフラマソーム活性化モデルの作成

43100012 伊藤朋世（指導教員：長谷部 晃）

E1A が Ets2 におよぼす影響

43100013 太田聡美（指導教官：安田元昭）

Mycoplasma salivarium によるインフラマソームの活性化

43100035 杉本明優（指導教員：柴田健一郎、佐伯 歩）

長鎖ノンコーディング RNA 発現量の解析

43090045 福川岳歩（指導教員：安田 元昭）

Aggregatibacter actinomycetemcomitans によるインフラマソームの活性化

43090051 松下矩大（指導教員：柴田 健一郎、佐伯 歩）

E1A が p53 におよぼす影響

43100053 松本愛子（指導教官：安田元昭）

細胞分子薬理学教室

各種ビスホスホネートによるアルカリ性ホスファターゼ活性の阻害様式

43100002 赤堀永倫香（指導教員：鈴木 邦明）

ヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性に対する clodronate と risedronate の作用

43100007 池上なつみ（指導教員：鈴木 邦明）

スマートフォンを用いた放射線量の測定（１）

43100008 石坂理紗（指導教員：西方 眞）

スマートフォンを用いた放射線量の測定（２）

43100009 石田優馬（指導教員：西方 眞）

エナメル質の部位別における脱灰量の違いに関する研究

43100023 川村 桜（指導教員：中村光一、南川 元）

エナメル質に対する果汁の影響に関する研究

43100024 川谷内敬太（指導教員：中村光一、南川 元）

エナジードリンクの暗算作業効率に及ぼす影響

43100042 永井謙次（指導教員：吉村善隆）

カフェインの暗算作業効率に及ぼす影響

43100050 古野翔大（指導教員：吉村善隆）

緒言

生体試料を固定する際、超音波照射を行うと、化学固定液のみより短時間で、良好な組織固定が得られるといわれている^{1,2)}。本研究ではホルマリン固定時に超音波照射を行うと、組織標本にどのような影響が及ぶのかを明らかにすることを目的として行った。

材料と方法

本研究では、8 週齢 Wistar 系雄性ラット 3 匹を使用した。ジエチルエーテル吸入により、ラットを安楽死させた後、肝臓と顎下腺を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に 1 時間浸漬した。その間、Sharp 製 UT-204(200W 39kHz)により各試料へ 0,10,20,40,60 分の超音波照射を行った。続いて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。作成したパラフィンブロックは、ミクロトームを用いて 4 μm の厚さに薄切し、HE 染色を行い、光学顕微鏡を用いて観察をした。

結果

肝の照射時間 0 分の標本では、3 つ組の収縮などを除き、比較的形態良好な標本であった。一方照射した標本においては肝細胞が収縮し類洞腔の拡大が認められた。照射時間 20 分の標本においては肝細胞索の外形が保たれず類洞が不明瞭となっている部分も観察された。照射時間 40 分の標本では、肝細胞が索状をなしておらず、個々の細胞が分離した状態が観察された。照射時間 60 分の標本においては大きな動静脈、胆管の収縮や崩壊が観察された。照射時間が 20~60 分の標本においては広範にわたる完全に崩壊した肝組織が共通で観察され、照射しなかった標本よりも形態が不良であった。

顎下腺の照射時間 0 分の標本では、細胞の収縮や組織間の空隙が多く観察された。照射時間 10~20 分の標本は、0 分に比べ形態は良好であったが、標本中央部において細胞の収縮や変形が認められ、導管周囲には空隙を呈している部分が多く観察された。40 分照射を行ったものでは、細胞の収縮や組織間の空隙が少なく、大変良好な組織像を呈していたが、60 分照射ではサンプルの薄切

が困難であった。

以上の結果をまとめたものが表 1 である。

表 1：各組織における照射時間と固定状態の評価

組織 照射時間	肝	顎下腺
0 分	○	△
1 0 分	△	○
2 0 分	△	○
4 0 分	△	◎
6 0 分	△	—

◎良好 ○やや良好 △やや不良 ×不良 —観察不可

考察

本研究では超音波照射が組織標本へ与える影響は対象組織によって異なっていた。特に肝では逆の効果であった。超音波照射の生物体への影響の原因は熱の発生と cavitation である。前者については周辺への伝導が早いために拡散されてしまい、生物体の局所の温度上昇は極めて少ないとされる。cavitation とよばれる空洞化現象は、溶液や組織中に溶解しているわずかな気体が気化して空洞を形成することに起因する³⁾。一方で血液量の多い組織は固定液が浸透しにくいとされている⁴⁾。従って肝では、固定液が浸透する前に cavitation の影響を受け、超音波照射を行ったほうが細胞間の裂隙などの観察が多く見られたのかもしれない。

本研究の結論として、ホルマリン固定時の超音波照射は、組織によって与える影響が異なることが明らかとなった。

参考文献

1) 山田 仁彦、大野 和也、北山康彦：高速超音波自動固定包埋装置の開発 病理と臨床 24, 1221-1228, 2006

2) 北山 康彦、山田仁彦：病理組織検体に対する超音波処理 臨床病理 54, 1215-1222, 2006

3) 安田 健次郎：固定への新技術の導入—超音波の応用— 組織細胞化学 8-13, 1992

4) 春日 孟、松原 修：病理学 病理組織細胞学（第 1 版）IV 固定法、283-242, 1987

顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

43090017 金沢 美松

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

1. 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いう報告している。小林ら²⁾は走行について眼角部に達していないものが多くみられると報告している。しかしながら、顔面動脈の屈曲や走行が年齢の違いによりどのような分布を示すかについては市川³⁾は解剖体2体を、栗原⁴⁾は解剖体4体を、堀江⁵⁾は解剖体6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8体の左・右側16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。

2. 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8体(男性73、82、86歳、女性69、77、84、88、93、歳)の左・右側の頭頸部16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16面におけるそれらの頻度について検索した。

3. 結果

屈曲型では直型は82男左側、軽屈型は69女左・右側、屈型は77.84女右側、強屈型は86.73男右側、77.84女左側、82男右側、88.93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、88女左側で、2型は86男左・右側、77女右側、93女左側、73男左側、69女左・右側で、3型は82男右側、93女右側、88女右側で観察された。

4. 考察

69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16例中11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⁾、堀江⁵⁾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6例、2型が7例、3型が3例観察され、市川³⁾、栗原⁴⁾、堀江⁵⁾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。この要因の一つとして観察数が16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更なる調査が必要と思われる。

5. 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
- 5) 堀江 恵. 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 43期生(平成26年度) 研究実習論文報告集 15:8, 2015

茎突舌骨筋の停止部形態に関する形態学的研究

43100033 澤田武蔵

指導教員：土門卓文（口腔機能解剖学教室）

キーワード：茎突舌骨筋、顎二腹筋

5. 参考文献

- 1) 河西達夫. 解剖学実習アトラス. 南江堂. 1993
- 2) 森 於菟ら. 分担解剖学 1. 金原出版. 1981
- 3) 上條 雍彦. 口腔解剖学 2 筋学. アナトーム社. 1984

1. 緒 言

茎突舌骨筋の停止部の形態について、河西¹⁾はその部位と位置について A~D の 4 型（A 型：茎突舌骨筋の停止部が顎二腹筋中間腱の内側を通る、B 型：茎突舌骨筋の停止部が顎舌骨筋の中間腱を挟む、C 型：茎突舌骨筋の停止部が顎舌骨筋中間腱の外側を通る、D 型：茎突舌骨筋がないもの）に分類し、A 型 59%、B 型 39%、C 型 1%、D 型 1%であったと報告している。しかしながら、茎突舌骨筋の停止部形態については様々な報告^{2) 3)}があり、その詳細に関してはよくわかっていない。今回、河西¹⁾の報告を参考にして解剖体の観察から茎突舌骨筋の停止部について調査し、河西の報告と比較し、検討を行った。

2. 方 法

北海道大学大学院歯学研究所・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 2 体（69 歳女性、88 歳女性）のそれぞれ左・右側の頭頸部において茎突舌骨筋を剖出し、合計 4 例とした。茎突舌骨筋の停止部を目視下で観察し、河西の分類に従って 4 型分類した。

3. 結 果

4 例とも A 型が観察された。

4. 考 察

今回の結果、解剖体 2 体（4 例）ではすべて A 型が観察され、河西の報告と類似していた。森ら²⁾は A 型 58~89%、B 型 5~40%、稀に C 型があると報告している。上條³⁾は A 型 87%、B 型 9%、C 型 4%、D 型 0%と報告している。今回の結果、解剖体 2 体（4 例）ではすべて A 型が観察され、森ら²⁾、上條³⁾の報告とも類似していた。

今回は 4 例のみの結果であったので、茎突舌骨筋の停止部が顎二腹筋中間腱の内側を通る型の出現頻度に関してはさらなる調査が必要である。

顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

43100036 鈴木 静

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

1、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、小谷地⁴⁾は解剖体6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8体を用いて、宝田の報告と比較し、検討を行った。

2、方法

北海道大学大学院歯学研究所・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8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、88歳女性、69歳女性）のそれぞれ左・右側の頭頸部、計16症例を用い、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。

3、結果

顎動脈と下顎枝後縁との位置関係では、82歳男性、86歳男性、88歳女性と69歳女性が両方とも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、93歳女性、84歳女性、88歳女性と69歳女性では両側とも後方型、77歳女性右側、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。

4、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後方型が多くなった。

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⁾、小谷地⁴⁾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8体の解剖体、左右計16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。

5、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期生(平成24/25年度)研究実習論文報告集 14 : 6-7、2014
- 4) 小谷地 雅秀. 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43期生(平成25/26年度)研究実習論文報告集 15 : 6、2015

緒言

生物試料は固定が完了するまでの間にある程度の自己融解や物質の流出の危険性をはらんでいる。従って良好な標本を得るためには迅速な固定法を用いることが重要である。マイクロウェーブ(MW)照射では固定液の浸透を速めると言われている¹⁾。本研究では固定液に浸漬した組織片に MW を照射することで組織標本にどのような影響が及ぶのかを目的として行った。

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安楽死させ、肝と顎下腺を摘出した。摘出後 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬し、SHARP 製電子レンジ(500W)にて MW を各々 0, 10, 20, 40, 80 秒照射した。照射時間を含め計 1 時間浸漬固定を室温にて行った。エタノールによる脱水、クロロホルムによる置換を経て、パラフィンに包埋した。包埋後、各試料を 4 μm 厚の切片にミクロトームで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

結果

MW を照射しなかった肝組織(0 秒)では、核と細胞質の間に空隙がみられる細胞が多く、肝細胞は収縮し、肝類洞が明瞭に観察された。また組織中には裂隙が生じていた。肝三つ組は全体的に縮小し、周囲に空隙を生じた。標本中心部と辺縁部では細胞の染色性に違いがみられた。MW を 10, 20 秒照射した肝組織では同様の像を示した。40 秒では部位の違いにおける染色差は小さくなり、収縮量は低下した。肝三つ組の像は比較的良好であった。80 秒では肝細胞は膨化し、肝類洞は不明瞭になったが、肝三つ組の形態はいずれも比較的良好であった。

MW を照射しなかった顎下腺(0 秒)では、標本辺縁部の細胞形態は良好であったが、一方で標本中央部の腺房・導管は縮小し、一部は形態が明瞭でなく、周囲に空隙を呈していた。腺房細胞の細胞質には空胞が観察され、腺房細胞や導管の部位の違いにおける染色性に差が生じていた。20, 40 秒では染色差、収縮量が減少し、やや良好な形態が得られた。また結合組織内の神経組織の観察が明瞭となった。80 秒では辺縁部細胞の形態は良好であるが、中心部の細胞では内部に空胞が観察されるものが増加し、導管の外形は引き伸ばされたように変形した。

以上の所見を表 1 にまとめた。

表 1：照射時間と組織別の標本の評価

	肝臓	顎下腺
0 秒	△	△
10 秒	△	△
20 秒	△	○
40 秒	◎	○
80 秒	○	○

◎：良好 ○：やや良好 △：やや不良 ×：不良

考察

ホルマリン固定を行う際に MW を照射すると、得られる標本の状態を良好にする場合があることが明らかになった。このような効果は MW による反応の増強と分子運動により生じる摩擦熱が細胞内あるいは細胞間への固定液の浸透を促したためではないかと考えられている²⁾。

本研究では辺縁と中心部で部位の違いにおける固定差が認められた。この結果は追加固定なしでは組織表面のみ固定され、中心部では固定不良になるという過去の報告と一致する³⁾。以上のことは MW 照射により固定液を深部へ浸透させることには限度があることを示している。従って MW 照射を行ったとしても組織片の大きさや追加固定の時間に配慮が必要と考えられる。

照射時間の違いに注目すると肝 40 秒では良好な像が得られたが、これに比べて 80 秒では組織像が劣っていた。このことは MW 照射が長ければ長いほど良いとは限らないことを示している。肝 80 秒の標本では固定を長時間行った標本と同様の像を呈していたことから、MW 照射により過固定になったものと推察される。これには MW 照射による固定液温度の上昇が影響しているのかもしれない。

本研究の結論として、MW 照射により良好な組織標本が得られることがあることが明らかとなった。

参考文献

- 1) 水平 敏知. マイクロウェーブ照射による生物試料の固定法. 化学と生物 28(8), 535-544, 1990
- 2) 堤 寛. マイクロウェーブ照射(電子レンジ)を利用した抗体反応時間の短縮. 東京：学際企画株式会社, 133-134, 1977.
- 3) 大谷 明夫. マイクロウェーブ固定 形態学の基礎的研究および診断病理学への応用 病理診断用組織の固定法について(固定への新技術の導入). 組織細胞化学, 1-7, 1992

大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

43100047 福士 莉穂

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

1. 諸 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、今多⁴⁾は解剖体6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8体の左・右側16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。

2. 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69、77、84、88、93歳、左・右側、計16例)を用いて、大口蓋神経の走行について観察した。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(骨の隆起部分)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。

3. 結 果

大口蓋神経の走行に関しては、69歳女性の左・右側、82歳男性の左側、84歳女性の左・右側、88歳女性の右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、88歳女性の左側は口蓋棘を中心に内側と外側に分かれる3型を、86歳男性の左・右側、73歳男性の左・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。

4. 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16症例中女性の3症例しか観察されず、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⁵⁾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記載はなく、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孔・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。今後、口蓋棘の形態に関する詳細は報告も必要であろうと考えられる。将来の研究実習に期待したい。

5. 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) 今多 将. 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 43期生(平成25/26年度)研究実習論文報告集 15:3, 2015
- 5) 脇田稔、山下靖雄 監修. 口腔解剖学、医歯薬出版、2009.

舌神経に関する形態学的研究

43100054 水野 麻梨子

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

1. 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、柳⁴⁾は解剖体6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8体を用いてそれらの検討を行った。

2. 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8体（男性73、82、86歳、女性69、77、84、88、93歳、左・右側、計16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16例は矢木ら¹⁾の報告に従い分類し、比較・検討した。

3. 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、69歳女左・右、77歳女右、84歳女左・右、88歳女左・右、93歳女左・右の15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、69歳女左・右、77歳女右、84歳女左・右、93歳女左・右の13例が

上1/3型を示し、88歳女左・右は中1/3型を示し、77歳女性右側は下1/3型を示した。

4. 考察

本研究において舌神経の起始については上方型が16例中15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16例中13例に観察され、中1/3型が16例中2例に観察され、下1/3型は16例中1例であった。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、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16例と少なかったことが挙げられる。今後、被検体数を増やしてデーターを正確にしていくことを今後の検討課題としたい。

5. 参考文献

- 1) 矢木 庄司、渡辺 裕、柳 義文、風馬 照太郎. 日本人下歯槽神経・舌神経の解剖学的研究、口腔解剖研究、19:1961.
- 2) 南 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
- 3) 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
- 4) 柳 あさこ. 舌神経に関する形態学的研究、北海道大学歯学部6年生43期生（平成25/26年度）研究実習論文報告集15:9, 2015

呼吸のリズムと量の随意的調節による唾液分泌促進の可能性

43090009 大田 圭一

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：唾液、深呼吸、自律神経活動

1. 緒言

深呼吸は副交感神経活動を優位にすることが知られているが、深呼吸により唾液分泌が促進されるかどうかは明らかではない。呼吸のリズムと量を随意的に調節することにより唾液分泌は変化するかどうかを明らかにするために実験を行った。

2. 方法

喫煙者でない健康成人 21 名（男性 15 名、女性 6 名、23～40 才）を被験者とした。実験は午前 10 時から午後 6 時の間に行い、各被験者には実験中と実験開始 1 時間以内の水以外の飲食を行わないよう指示した。座位安静にて吐唾法により 5 分間の唾液分泌量を測定し、併せて唾液アミラーゼ活性を計測装置（唾液アミラーゼモニタ、NIPRO）にて測定した。自律神経活動の機能評価を行うために、手指用脈波測定器（piezo-electric Pulse Transducer、ADInstruments）を用いて心拍変動（心拍数、LF、HF、LF/HF、RMSSD）を測定した。呼吸条件として、第 1 回：自然呼吸、第 2 回：深呼吸（6 回/分、吸気時間 5 秒、呼気時間 5 秒）、第 3 回：自然呼吸、第 4 回：頻呼吸（30 回/分、吸気時間 1 秒、呼気時間 1 秒）、第 5 回：自然呼吸、各 5 分間とした。呼吸のリズムと量の調節はメトロノームやパソコン画面上で指示する機器（enwave2、Heartmath Institute）を用いて行った。各測定項目の第 1 回のデータと各回のデータを paired t-test により比較した。また、各測定項目の相関関係を Pearson と Spearman の積率相関係数を用いて解析した。

3. 結果

深呼吸による唾液分泌量変化率から、唾液量増加群（5 人）と唾液量減少群（8 人）とに分けられた（図 1）。唾液量増加群は基本的な唾液分泌量が少なく、唾液量減少群は基本的な唾液分泌量が多かった。唾液量増加群は深呼吸時、唾液分泌量と心拍数は有意に増加した。唾液量減少群は深呼吸時、頻呼吸時ともに唾液分泌量は有意に減少し、深呼吸後、頻呼吸後に RMSSD は有意に減少した。各測定項目には相関関係はみられなかった。

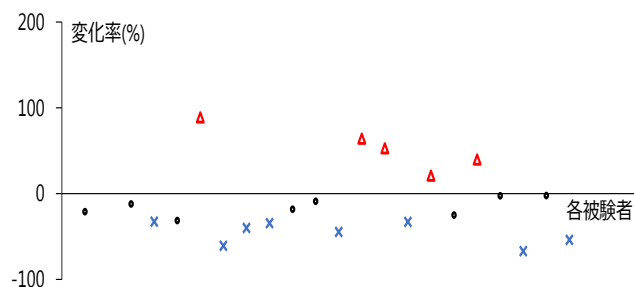


図 1 各被験者の深呼吸による唾液分泌量変化率

△は唾液量増加群（5 人）、×は唾液量減少群（8 人）を示す。唾液量減少群は、唾液分泌量が減少した群（16 人）の中で、その減少率が中央値を超えて大きい 8 人とした。

4. 考察

唾液量増加群は深呼吸時に心臓交感神経活動が増加したために唾液分泌が促進した可能性があり、唾液量減少群は深呼吸により心臓迷走神経活動が減少したために唾液分泌が抑制された可能性がある。また、本研究では想定した深呼吸の効果を明確に与えられなかった可能性がある。その理由として、深呼吸時の吸気時間が長すぎたために吸気相で呼吸が停止し、心拍数が増加したことが考えられ、¹⁾本実験では心臓迷走神経活動の抑制に因るものと思われる。他方で、深呼吸は喚起効率を改善し、酸素摂取量を増加させる。²⁾局所の血流制御において、酸素需要理論に従えば、組織酸素分圧が増加することで局所の血管は収縮し、血流量を減少させる。³⁾唾液量減少群において、唾液腺への血流量が減少したために唾液分泌量が減少した可能性もある。本実験では随意的に深呼吸を行う事により唾液分泌促進に効果がある可能性が示されたが、基本的な唾液分泌量の個人差により大きく影響を受ける事も明らかとなった。また、心拍変動解析により得られた自律神経活動の変化と唾液分泌量との相関については現時点では確定することはできず、今後解明していく課題となった。

5. 参考文献

- 1)Mori H, Yamamoto H, Kuwashima M, *et al*: How does deep breathing affect office blood pressure and pulse rate?, *Hypertens Res* 2005; 28:503
- 2)Yasuma F., Hayano J. Respiratory Sinus Arrhythmia: Why does the heartbeat synchronize with respiratory rhythm?, *Chest*, 125, 683-690, 2004
- 3)ガイドン臨床生理学 第 1 版 医学書院

明暗環境が唾液分泌量に及ぼす影響について

43100018 奥村 拓真

指導教員：平井 喜幸, 船橋 誠(口腔生理学)

キーワード：味覚, 視覚, 明暗環境

1. 緒言

食物などを目にするだけで唾液分泌量が増加することは知られているが, 明暗環境の違いによって唾液分泌量が増加するののかについては不明な点が多い. 本研究は明暗環境が唾液分泌量に与える影響について明らかにすることを目的として実験を行った.

2. 方法

実験 1 : 明暗環境における唾液分泌量の比較

被験者は健康成人 7 名(男性 6 名, 女性 1 名: 平均年齢 23.1 歳)とした. 晴天時の屋内の窓際を明環境(自然光), アイマスクを装着した状態を暗環境として 2 つの明暗環境を設定し, 唾液分泌量を計測した.

実験 2 : 照度の異なる明環境における唾液分泌量の比較

被験者は健康成人 6 名(男性 6 名: 平均年齢 29.6 歳)とした. 晴天時屋内の窓際を自然光下(照度 2000 lx 程度に相当), 明るさを蛍光灯のみとした室内を蛍光灯下(照度 500 lx 程度に相当)として 2 つの照度の異なる明環境を設定し, 唾液分泌量を計測した.

尚, いずれの実験も被験者は屋内で座位とし, 自由に開閉眼を許可した.

唾液分泌量の計測

始めに被験者を各明暗条件下にて 15 分間安静にさせ, 続いて 3 分間アメを舂めさせ, 唾液とアメを一緒に吐出させて採取した. その後被験者を 1 分間休憩させ, 同様の唾液採取を引き続き 2 回行い, 合計 3 回のデータから平均唾液分泌量を求めた.

得られたデータの統計学的解析には paired t -test を用いた.

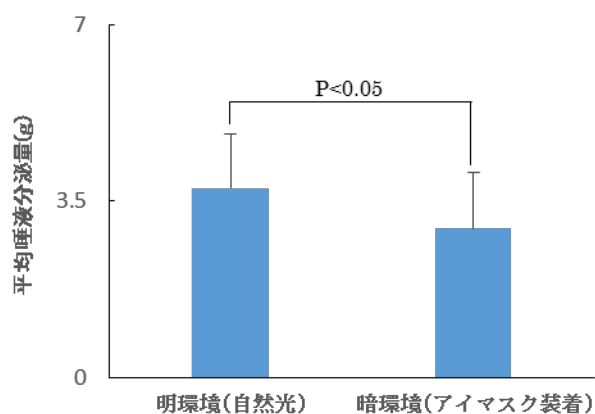


図 1 明環境と暗環境の唾液分泌量の比較

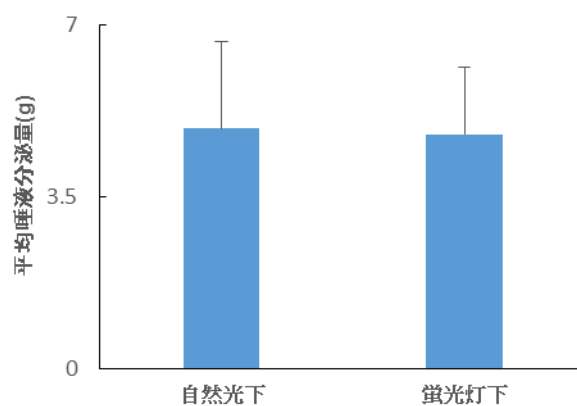


図 2 自然光下と蛍光灯下の唾液分泌量の比較

3. 結果

明環境(自然光)と暗環境(アイマスク装着)の唾液分泌量の計測結果を図 1 に示す. 明環境に比べ暗環境は唾液分泌量が有意に減少した ($P<0.05$).

自然光下と蛍光灯下の唾液分泌量の計測結果を図 2 に示す. 2 つの条件の唾液分泌量に有意な差は見られなかった.

4. 考察

本研究から, 極度に暗い環境においては, 唾液分泌量は減少することが示唆され, また唾液分泌量は明環境における照度の違いによって比例的に変化しないことも明らかとなった.

舌の随意運動時における運動関連脳磁場反応の解析

43100019 小熊 英敏

指導教員：前澤 仁志，船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：運動関連脳磁場反応，脳磁図，舌下神経核，運動野

1. 緒言

脳内の神経活動に伴って発生する磁場活動を計測する手法として脳磁図 (magnetoencephalogram, MEG) がある。示指の運動時には、対側半球優位に運動関連脳磁場反応 (movement-related cortical field, MRCF) が認められることが分かっている¹⁾。また、舌の随意運動における MRCF の研究²⁾はあるが、口蓋に設置したボタンを押した時点をトリガーとしているため、舌の筋電図とトリガーに時間差が生じている可能性がある。そこで、舌筋筋電図をトリガーにした舌の随意運動における MRCF 解析を行い、半球間における運動関連脳磁場反応の違いを明らかにした。

2. 方法

健康成人 6 名（男性 4 名，女性 2 名，年齢 22～38 才）を被験者とし、全頭型脳磁図計測装置 (VectorView, Neuromag, Finland) を用いて計測した。運動開始時点を決めるため、舌筋筋電図を同時計測した。また、アーチファクトの影響を除外するため、眼電図と側頭筋の筋電図も同時に計測した。運動のタスクは、10 秒に 1 回の舌前方突出運動とし、10 分間の計測を計 4 回行った。計測条件はサンプリング周波数を 600 Hz、バンドパスフィルターを 0.03-200 Hz とした。解析方法は過去の文献に従い^{1,3)}、計測データを抽出し、アーチファクトが入っていないことを確認した上で、舌筋筋電図の活動開始時点をトリガーにタグをつけ、加算平均した後、脳磁図波形の潜時と振幅を評価した。統計処理には Wilcoxon rank sum test を用いた。

3. 結果

全ての被験者において両側半球に MRCF が認められた。運動準備磁界の開始は左半球では、 865.7 ± 689.0 ms，右半球では、 457.2 ± 316.1 ms であった。運動磁界の潜時は左半球では、 64.3 ± 71.7 ms，右半球では、 112.7 ± 58.8 ms であり、振幅は左半球では、 72.3 ± 32.3 fT/cm，右半球では、 51.4 ± 13.8 fT/cm であった。運動準備磁界の潜時、運動磁界の潜時および振幅の全てにおいて半球間に有意差はなかった。

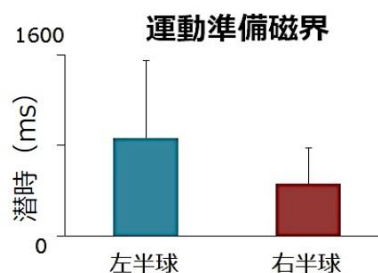


図1 運動準備磁界の潜時

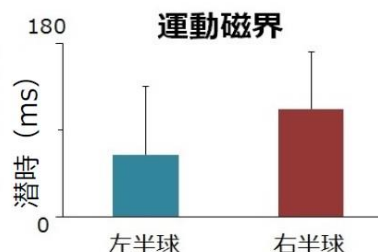


図2 運動磁界の潜時

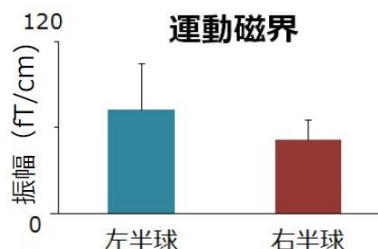


図3 運動磁界の振幅

4. 考察

舌の随意運動には両側半球の大脳皮質が関与しており、左右の半球間における神経活動に差がないことが示唆された。

5. 参考文献

- 1) Nagamine T, Kajola M, Salmelin R, Shibasaki H, Hari R. Movement-related slow cortical magnetic fields and changes of spontaneous MEG- and EEG-brain rhythms: Electroencephalography and clinical Neurophysiology 1996 ; 99 : 274-286.
- 2) Nakasato N, Itoh H, Hatanaka K, Nakahara H, Kannno A, Yoshimoto T. Movement-related magnetic fields to tongue protrusion: NeuroImage 2001 ; 14 : 924-935.
- 3) Cheyne D, Weinberg H. Neuromagnetic fields accompanying unilateral finger movements : pre-movement and movement-evoked fields. Exp Brain Res. 1989 ; 78 (3) : 604-12.

咬みしめによる反応時間の遅延

43100020 小田 哲也

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：筋電図，咬みしめ，反応時間

1. 緒言

強く咬みしめることで最大筋力が向上するということが報告されている。一方，咬みしめによる最大筋力の向上と，スポーツにおける競技記録の向上は，必ずしも一致するという見解は得られていない。例えば，投擲競技においては咬みしめることで飛距離が短縮するという報告もされている。そこで本研究では，咬みしめと競技記録との関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

健康成人 15 名（23～38 歳）を被験者とした。音刺激に応じて直ちにスイッチを押す動作を行わせ，これに要する時間を反応時間とし，咬みしめ時と下顎安静位における変化を調べた。反応時間を解析するため，音刺激とスイッチを押したタイミングを電圧信号としてパソコンに記録し，これらの間隔を計測した。また，被験者がスイッチを押した瞬間の母指内転筋の筋電図を記録し，その積分波形の最大値を算出した。データの統計学的比較には，Paired t test を用い，5%の有意差水準で検定を行った。

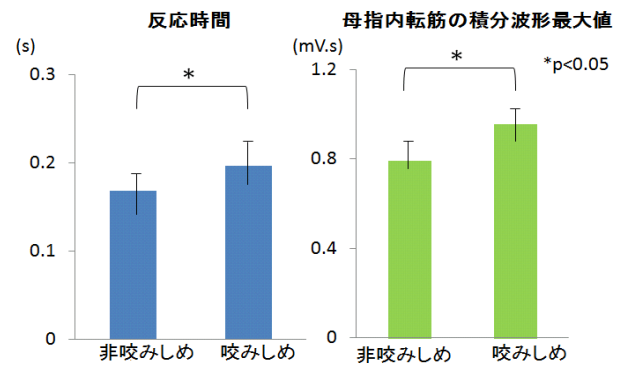
3. 結果

咬みしめ時の反応時間は 0.169 ± 0.05 s（平均値±標準偏差），咬みしめていない時の反応時間は 0.197 ± 0.05 s であった。また，咬みしめ時の積分波形最大値は $0.954 \pm$

0.892 mV・s，咬みしめていない時の積分波形最大値は 0.793 ± 0.717 mV・s であった。反応時間において，咬みしめ時と，咬みしめていない時の間に統計学的有意差が認められた。また，積分波形最大値において，咬みしめ時と，咬みしめていない時の間に統計学的有意差が認められた。

4. 考察

咬みしめ時には瞬間的な筋活動量は増加する可能性が示唆された。また，水泳や短距離走等の，音をスタートの合図とする競技においては，スタート音に対する反応は，咬みしめのないほうが早くなる可能性が示唆された。



5. 参考文献

- 1) 高梨雄太. 咬みしめが投擲競技者の運動能力に及ぼす影響. スポーツ歯学 13 (2) ,75 - 80,2010.
- 2) 松原周信. 視覚および聴覚刺激による跳躍反応時間の時系列構造. 京都府立大学学術報告 55,2003.

咽頭部への味刺激が随意性嚥下に及ぼす影響

43100031 実藤 潤

指導教員：船橋 誠, 平井 喜幸, 久留 和成,

前澤 仁志(口腔生理学教室)

キーワード：味刺激, 随意性嚥下, 顎筋電図

1. 緒言

嚥下食や嚥下障害者に関する研究は数多く行われているが、嚥下の生理学的な機序についてはまだ不明な点が存在する。例えば、咽頭部へ NaCl 溶液を滴下すると連続嚥下が抑制され¹⁾、臨床現場では嚥下障害者に酸味のゼリーを嚥下させると嚥下機能が改善される場合があることが知られている²⁾。しかし、その機序の詳細は未だ不明である。本研究では、咽頭部への味刺激が随意性嚥下に影響を及ぼす機序を理解するために、要因の一つとして考えられる唾液分泌量の変化に注目し、その関連性を検討することとした。

2. 方法

嚥下機能に臨床的異常を認めない健常者 9 名（男性 4 名、女性 5 名、平均年齢 25 ± 3 歳、23~33 歳）を被験者とし、咽頭部への味刺激時の唾液分泌量および顎二腹筋前腹相当部の筋電図を記録し嚥下間隔時間を求めた。実験環境および手順は先行研究を参考にして下記の通り行った¹⁾。

〔味溶液〕0.25 M クエン酸溶液、0.3 M NaCl 溶液を原液とし、それぞれ 14 段階まで倍数希釈した溶液を作製し、各被験者の口腔での認知閾値濃度を全口腔法で予め測定した。咽頭部刺激に使用する味溶液は、高濃度溶液として 0.25 M クエン酸溶液および 0.3 M NaCl 溶液を、低濃度溶液として各被験者の認知閾値濃度に設定した NaCl 溶液およびクエン酸溶液を用意した。また、コントロールとして蒸留水 (DW) を用いた。味溶液は外径 1 mm のポリエチレンチューブを使用し、ペリスタポンプで 0.2 mL/min の速度で咽頭部へ直接注入した。

〔記録と解析〕各味溶液滴下中に舌下に 30 秒間ガーゼ挿入し、その重量変化を咽頭部への味刺激時の唾液分泌量とした。続いて味溶液は滴下したままで被験者に連続嚥下 (10 回) を行わせ、顎二腹筋前腹相当部の開口筋筋電図を PowerLab (ADInstruments, Australia) を用いて計測した。記録した筋電図の積分波形のうち、4 から 9 回目の嚥下の積分波形のピーク間の時間間隔を求め、その平均値を嚥下時間間隔 (SI) とした。

統計解析は蒸留水に対して各溶液の唾液分泌量と嚥下時間間隔を repeated measure ANOVA で検定を行い Bonferroni 法で多重比較検定を行った。有意水準は 5% または 1% とした。

3. 結果

各味溶液による咽頭刺激時の唾液分泌量および嚥下時間

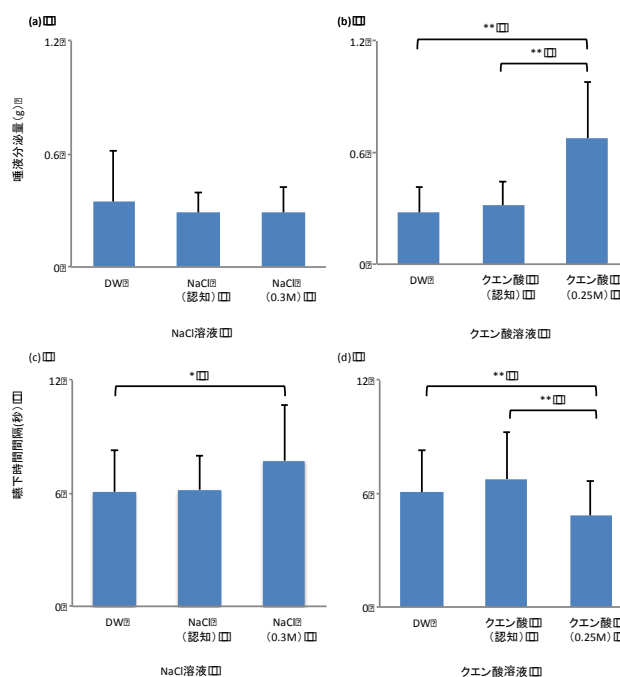


図 1 NaCl 溶液およびクエン酸溶液投与時の唾液分泌量 (a, b), および嚥下時間間隔 (c, d)

間隔の変化の結果を図1に示す。0.3 M NaCl 溶液投与により、DW と比較して唾液分泌量に有意な変化は認められなかったが (図1a), SI は有意に増加した (図1c)。一方、0.25 M クエン酸溶液投与により、DW と比較して唾液分泌量は有意に増加し (図1b), SI は有意に減少した (図1d)。また、咽頭部への味溶液刺激時に被験者に味を認識したか質問したところ、全ての被験者が 0.25 M クエン酸溶液に対してのみ味を認識していた。

4. 考察

NaCl 溶液投与では SI の減少が認められ、これは先行研究の結果と一致していた。しかし、その要因としては、味覚や唾液分泌量変化以外のものが存在すると考えられた。一方、0.25 M クエン酸溶液投与では、味覚刺激により唾液分泌が促進し SI が減少した可能性が考えられる。しかし、SI 減少を生じさせる主要因が味覚刺激なのか唾液分泌量なのかについては本研究では明らかにできなかった。

5. 参考文献

- 1) Yasuyuki Kitada, Rika Yahagi and Kazuhisa Okuda-Akabane. Effect of Stimulation of the Laryngopharynx with Water and Salt Solutions on Voluntary Swallowing in Humans: Characteristics of Water Receptors in the Laryngopharyngeal Mucosa. Chem. Senses 35: 743-749, 2010
- 2) Logemann JA, Pauloski BR, 他 4 名. Effects of sour bolus on oropharyngeal swallowing measures in patients with neurogenic dysphagia. J Speech Hear Res. 1995;38:119-28

口腔内に貯留できる唾液量と嚥下機能の関連性に関する研究

43100039 寺島 広朗

指導教員：船橋 誠、平井 喜幸（口腔生理学教室）

キーワード：唾液、嚥下、RSST

1. 緒言

ヒトは普段唾液を反射的に嚥下している。唾液の嚥下については多くの先行研究が行われているが、唾液を口腔内に溜める事に関してはほとんど研究がなされていない。パイロットテストにおいて口腔内に溜めることのできる唾液の重量と時間には個人差がみられた。そこで本研究では考えられる原因の一つとして嚥下機能に着目し、唾液を溜める事と嚥下機能との関連性を検証する事を目的に実験を行った。

2. 方法

実験 1

被験者(男性 7 名, 女性 7 名, 平均年齢 24.4 歳)に対し可能な限り唾液を口腔内に溜めさせた。唾液を溜め始めてから最初に嚥下を行うまでの時間を計測し、これを唾液貯留時間とした。溜めた唾液をコップに吐き出させ重量を計測し、これを唾液貯留量とした。

実験 2

実験を行った被験者 14 人に嚥下機能を評価するためスクリーニングテストである反復唾液嚥下テスト (RSST) を行った。

3. 結果

実験 1

唾液を 1 時間以上溜められる 7 名の集団 (L グループ) と 20 分程度しか溜められない 7 名の集団 (S グループ) に大きく二分された (図 1)。唾液の分泌速度に関して二グループ間で有意差は認められなかった。

実験 2

RSST では嚥下回数において S グループの方が L グループよりも有意に多かった (Paired t -test, $p < 0.05$, 図 2, 図 3)。唾液を長時間溜める事ができる L グループは RSST の回数において低い値を示し、唾液を長時間溜める事ができない S グループは RSST の回数において高い値を示した。

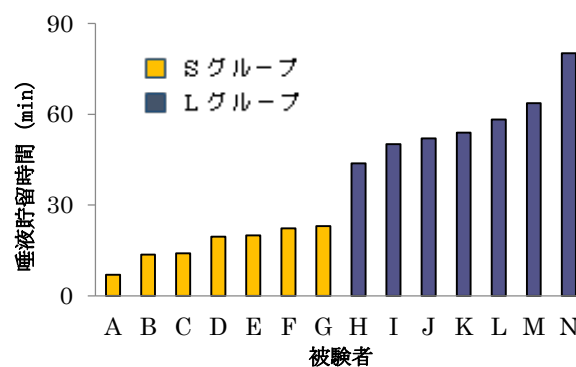


図 1：唾液貯留時間の成績
被験者 14 名各個人の唾液貯留時間 (min) を示す。

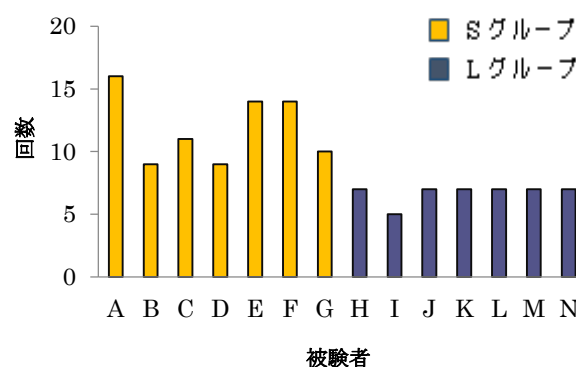


図 2：RSST の成績
被験者 14 名各個人の RSST (回) を示す。

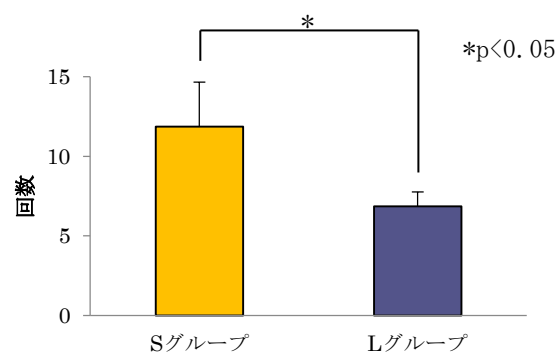


図 3：RSST における 2 グループ間の平均
横軸に RSST の回数を縦軸に示す。
S グループの方が L グループよりも有意に多かった。

4. 考察

唾液を口腔内に溜める時間において個人差があり、1 時間程度溜められる人がいる一方で、20 分程度しか溜められない人もいる事が示唆された。

唾液を長時間溜める事が出来る人は溜める事ができない人に比べ、RSST においての嚥下回数が少なく嚥下機能が低い事が示唆された。

苦味溶液の持続投与によるダイエット効果の可能性

43100043 橋本 里紗

指導教員：平井 喜幸，久留 和成，船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：苦味，摂食，飲水

1. 緒言

5 基本味の 1 つである「苦味」は，毒物のシグナルであり，生物が忌避する味である。

ラットは，苦味を認知することができ¹⁾，飼料に苦味物質を混入させると，摂食量が減少することが知られている²⁾。しかし，苦味物質を混入させた水を持続的に飲水させた場合の摂食量の変化については知られていない。本研究では，これを明らかにすることを目的として実験を行った。

2. 方法

本研究は，国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定を遵守して行った。

実験には，7 週齢の SD 系雄性ラット 15 匹（体重 150～300 g）を使用した。飼育室内温度 23 ± 1 °C，湿度 40 ± 5 % に調節し，12 時間ごとの明暗サイクル（7:00～19:00 明期）の下で個別にラットを飼育した。苦味物質としては，キニーネと抗ヒスタミン薬を使用した。なお，抗ヒスタミン薬は，苦味を呈し，ラットの脳室内投与において摂食促進作用があることが知られている³⁾。

ラットは，固形飼料と蒸留水を 24 時間自由摂取下で 5 日間予備飼育し，5 日目の 1 日総摂食量と飲水量をコントロールとして記録した。その後，ラットを飲水制限群（蒸留水），キニーネ溶液飲水群（2 mM キニーネ塩酸塩二水和物溶液），抗ヒスタミン薬溶液飲水群（0.6 mM dl-クロルフェニラミンマレイン酸塩溶液）の 3 群に分け，1 日総摂食量と飲水量を計測した。統計検定は paired t-test を用いた。

3. 結果

飲水制限群，キニーネ溶液飲水群，抗ヒスタミン薬溶液飲水群，いずれにおいてもコントロールと比較して摂食量と飲水量が減少した（図 1，図 2）。しかし，飲水量あたりの摂食量は，飲水制限群，抗ヒスタミン薬溶液投与群は有意に高値を示したが，キニーネ溶液投与群は有意差がみられなかった（図 3）。

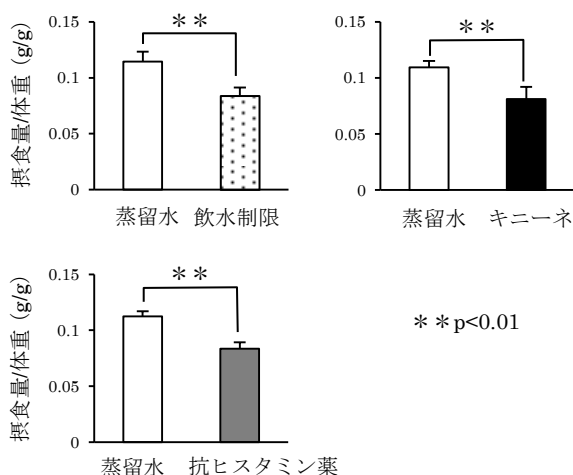


図 1 体重あたりの摂食量の変化

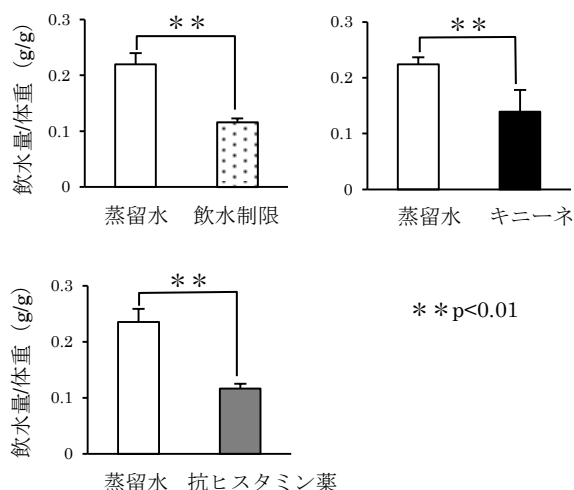


図 2 体重あたりの飲水量の変化

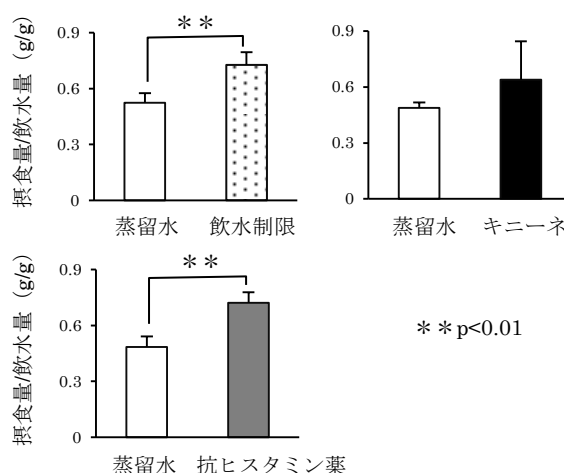


図 3 飲水量あたりの摂食量の変化

4. 考察

苦味嫌悪により飲水量が減少し，固形飼料の摂取に支障をきたしたために，摂食量が減少した可能性が考えられた。

また，飲水量あたりの摂食量は，抗ヒスタミン薬投与時と飲水制限時とで同様な結果が得られたことから，今回の抗ヒスタミン薬の濃度では，抗ヒスタミン薬の摂食促進作用が苦味による摂食抑制により相殺された可能性が考えられた。

以上のことから，苦味溶液投与によるダイエット効果の可能性が示唆された。

5. 参考文献

- 1) 味覚，栗原 堅三，51-58，1978，東京大学出版会
- 2) Constance M. Kratz, David A. Levitsky, Susan L. Lustick, Long term effects of quinine on food intake and body weight in the rat, Physiology & Behavior, Vol. 21, 321-324, 1978
- 3) Sakata T, Ookuma K, Fukagawa K, Fujimoto K, Yoshimatsu H, Shiraishi T, Wada H, Blockade of the histamine H1-receptor in the rat ventromedial hypothalamus and feeding elicitation, Brain Research, 403-407, 1988

上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について
43100005 栗野 淳之介
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、根管分岐、透明標本

諸言

齦蝕や外傷等で歯髄が不可逆的な損傷を受けた場合、歯の形態を修復し最終的に機能を回復させる前に必ず歯内治療を施さなければならない。私たちはこのようなケースに将来ほぼ毎日遭遇するであろう。歯内療法を進める上で、根管形態を熟知することは歯科医にとって必須事項である。しかし、根管形態、特に側枝と根尖分岐について詳述した専門書はなく、いままで重点が置かれていなかったように感じていた。

今回の研究実習をよい機会ととらえ、側枝と根尖分岐の出現頻度を自分なりに確かめてみようと思い本研究を開始した。今回、審美性や発音機能において重要である上顎中切歯を選んだ。側枝と根尖分岐の形態分類については、須田¹⁾が提唱した、側枝と根尖分岐のいずれも持たない直根管、根尖分岐のみ持つ根管、側枝のみ持つ根管、それら両方を持つ根管、の4分類法を踏襲し、それぞれの出現頻度をレジン包埋した透明標本により調べた。

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上顎中切歯（右41本、左33本）を材料とした。歯を60℃の30%水酸化カリウムで30分処理し付着軟組織を除去した。5%蟻酸で3週間脱灰した後、ピーカーに墨と標本を入れ、真空チャンパーで5分間空気を抜くことを2回繰り返し歯髄腔に墨汁を流入した。歯ブラシで歯の表面についた墨を取り除き、80%、90%、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水した。サリチル酸メチルⅠ、Ⅱに1日ずつ浸漬して歯を透明にし、ついでスチレンモノマー液、スチレンモノマーとリゴラック（ポリエステルレジンの1対1混合液）に1日ずつ、最後に0.3%ベンゾイン（触媒）を入れた100%リゴラックに1日間浸漬して歯にレジンを浸透させた。筆で標本表面のレジンをぬぐい紫外線重合器で1日重合した。

結果

根尖分岐は根管が根尖のセメント質内で分岐し、それぞれが同等の大きさ（太さ）を持つもの、側枝は歯根象牙質内で分かれ明らかに主根管よりも細いもの、と定義される。須田¹⁾は上顎中切歯根尖のセメント質は厚さが1mm以下であることを組織学実習切片で確認し、側枝は根尖端から1mm以上歯冠側で分かれるもの、根尖分岐は1mm以内で分かれるものとした。本研究もこの判別法を利用して4種類の根管形態の出現頻度を算出した。結果を表1に示す。

	右	左	計
直根管	23 本 (56.1%)	18 本 (54.5%)	41 本 (55.4 %)
根 尖 分 岐 のみ	5 本 (12.2%)	5 本 (15.2%)	10 本 (13.5%)
側枝のみ	11 本 (26.8%)	6 本 (18.2%)	17 本 (23.0%)
根 尖 分 岐 +側枝	2 本 (4.9%)	4 本 (12.1%)	6 本 (8.1%)
計	41 本 (100%)	33 本 (100%)	74 本 (100%)

表 1

考察

本研究における結果は直根管が55.4%、根尖分岐のみが13.5%、側枝のみが23.0%、根尖分岐と側枝が8.1%であった。歯の解剖学入門²⁾ではそれぞれ44.4%、13.9%、38.4%、3.3%（標本数は不明）、須田は33.3%、15.8%、35.1%、15.8%（標本数57本）、千葉³⁾は36.5%、14.9%、33.8%、14.9%（標本数74本）と報告している。過去の研究結果と比較すると、頻度にばらつきがあるものの、高頻度のものから、直根管、側枝のみ、根尖分岐のみ、根尖分岐と側枝を持つ、の順であることは一致していた。ばらつきの原因には調査歯数の絶対的な少なさがまず挙げられる。数百本、数千本単位で調べれば頻度は一定の数字に収束していくと考える。また、根尖分岐は加齢により封鎖するという報告もあるので、観察歯提供者の年齢の違いも影響しているかもしれない。より正確に頻度を算出するためには、標本歯数を増やし年齢を考慮するとともに判別法も統一していく必要があるだろう。

本研究から、上顎中切歯には直根管以外の複雑な根管形態も存在することを確認できた。これを踏まえ、一見、他歯よりも容易と思われがちな上顎中切歯の根管治療にも慎重かつ丁寧な治療を心がける事が大切であると実感した。そのことだけでも有意義な研究実習であった。

参考文献

1. 須田有紀子(2012) 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 p45-46
2. 赤井三千男(1999) 歯の解剖学入門 医歯薬出版 東京
3. 千葉彩乃 上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について 第43期生研究実習論文報告書 p27

下顎第一大臼歯の根管形態について
43100017 奥川 葵
指導教員：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）
キーワード：下顎第一大臼歯、根管形態、透明標本

緒言

的確な根管治療を行う上で根管形態を理解することは非常に重要である。第一大臼歯は咀嚼と咬合に特に重要な歯であると同時に、根管形態が多様で複雑であることが知られている。そこで下顎第一大臼歯の根管形態を透明標本により観察することにした。

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、根面に齶蝕がない下顎第一大臼歯（右 19 本、左 17 本）を材料とした。60℃、30%水酸化カリウム溶液で歯牙表面の軟組織を除去し、5%蟻酸水溶液で3週間脱灰した。墨汁と歯牙を入れたビーカーを真空チャンパー内に置き、真空ポンプで5分間2回、空気を引いて根管内に墨汁を流入させた。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Ⅰ、Ⅱに1日ずつ浸漬して歯を透明にした。ついで、スチレンモノマー、スチレンモノマーとポリエステルレジン（リゴラック）の1：1混合液にそれぞれ1日ずつ、0.3%ベンゾイン入り100%リゴラックに1日標本を浸漬しレジンに歯に浸透させ、紫外線重合器で1日間重合した。¹⁾

結果

根管形態を分岐状態から以下の3種類に分類した。

- ①単純根管…一つの根管が一つの根尖孔に開孔するもの
 - ②完全分岐根管…二つの根管が二つ以上の根尖孔に開孔するもの
 - ③不完全分岐根管…二つの根管が合わさり一つの根尖孔に開孔するもの
- 下顎第一大臼歯における上記3種類の根管形態の出現頻度を以下の表に示した。

（1）下顎第一大臼歯近心根

表 1

	右:数(%)	左:数(%)	計:数(%)
単純根管	1(5.3)	8(47.1)	9(25.0)
完全分岐根管	7(36.8)	5(29.4)	12(33.3)
不完全分岐根管	11(57.9)	4(23.5)	15(41.7)
計	19	17	36

（2）下顎第一大臼歯遠心根

2根性のものが右4本、左3本の計7本存在し、14根全てが単純根管であった。

表 2 2根性遠心根を完全分岐根管とみなした場合

	右:数(%)	左:数(%)	計:数(%)
単純根管	10(52.6)	11(64.7)	21(58.3)
完全分岐根管	4(21.1)	4(23.5)	8(22.2)
不完全分岐根管	5(26.3)	2(11.8)	7(19.5)
計	19	17	36

表 3 2根性遠心根を除いた場合

	右:数(%)	左:数(%)	計:数(%)
単純根管	10(66.7)	11(78.6)	21(72.4)
完全分岐根管	0	1(7.1)	1(3.5)
不完全分岐根管	5(33.3)	2(14.3)	7(24.1)
計	15	14	29

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により、根管は経年的に近遠心的に圧平されるために単純根管は不完全分岐根管へ変化するとされている。標本提供者の年齢は不明であったため、「単純根管+不完全分岐根管」と「完全分岐根管」の2グループに再分類し、年齢の因子を除外して考察する。

近心根においては、完全分岐根管が33.3%、単純根管+不完全分岐根管が66.7%となった。三橋²⁾は完全分岐根管が39.6%、単純根管+不完全根管が60.3%と本研究と近い結果を報告している。

遠心根においては、2根性のものを完全分岐根管とした場合、完全分岐根管が22.2%、単純根管+不完全分岐根管が77.8%となった。森下³⁾も遠心2根性のものを完全分岐根管とみなし、完全分岐根管26.3%、単純根管+不完全分岐根管を73.7%と報告しており、本研究と近い結果である。また2根性遠心根の出現率は19.4%であり、佐伯と瀬尾⁴⁾の報告する20%とほぼ一致した。上記文献以外では根管形態の分類が本研究と異なったため比較できなかった。

今回の研究実習から、下顎第一大臼歯の3種類の根管形態に関してのおよその出現率を求めることができた。直接に臨床に関連するのは完全分岐根管の出現頻度であろう。今回の結果は、歯根完成歯ならば近心根では少なくとも30%以上、遠心根では2根性を含めると20%以上が完全分岐根管であることを示した。この数字は今後の臨床に充分活用できると思う。根管形態にはより複雑な形態、たとえば網目状のもの（網状根管）、根尖付近での分岐（根尖分岐）、側枝が多く存在するもの、などもあった。根管形態がいかに多様で複雑であるかを実感させられた。これらのことをつねに思い出しながらこれからの診療に臨みたい。

参考文献

- 1) 桜庭一郎(2001): 歯牙透明標本のレジン包埋について、30期生(平成12/13年度)研究実習論文報告書(第2号): 49-50
- 2) 三橋憲司(2003): 下顎第一大臼歯近心根の根管形態についてーレジン包埋した透明標本を用いてー、32期生(平成14/15年度)研究実習論文報告書(第4号): 53-54
- 3) 森下剛(2005): 下顎第一大臼歯遠心根の根管形態について、34期生(平成16/17年度)研究実習論文報告書(第6号): 65-66
- 4) 佐伯政友 瀬尾次郎(1994): 歯の解剖学 医歯薬出版: 100

上顎第二小臼歯の根管形態について
43100029 相良 ふみ
担当教官：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）
キーワード：上顎第二小臼歯、根管形態、透明標本

【緒言】

日常の歯科診療において根管治療はほぼ毎日行われている。従って、根管の形態についての知識を充分に持つことは歯科医にとって必須条件である。

上顎第一小臼歯の根管形態が複雑であることは教科書によく記載されている。それに比べ、上顎第二小臼歯の根管形態に関してはあまり記載されていない。そこで本研究で、上顎第二小臼歯の根管形態について透明標本を用いて調べることにした。

【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完成した単根の上顎第二小臼歯（右 32 本、左 35 本）を材料とした。

60℃の 30%KOH で 30 分（15 分を 2 回）処理し、化学的に歯を清掃した後、流水下で歯ブラシで機械的に歯の清掃を行った。5%蟻酸で 3 週間脱灰した後、墨汁と標本を入れたビーカーを真空チャンバー内に置き、真空ポンプを用いて空気を引いて根管に墨汁を流し込んだ。80%、90%、100%、無水アルコールで 1 日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルに 2 日間浸漬し透明にした。スチレンモノマーに 1 日、およびスチレンモノマーとポリエステルレジン（リゴラック）の 1:1 混合液に 1 日、0.3%ベンゾインを入れた 100%リゴラックに 1 日、標本を浸漬しレジンを浸透させた。重合前に標本表面の余剰なレジンをふき取り紫外線重合器で 1 日重合した¹⁾。

【結果】

根管形態を分岐の状態から以下の 3 種類に分類した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 に示した。

表 1

	右	左	計
単純根管	17 (53.1%)	24 (68.6%)	41 (61.2%)
完全分岐根管	5 (15.6%)	2 (5.7%)	7 (10.4%)
不完全分岐根管	10 (31.3%)	9 (25.7%)	19 (28.4%)
計	32 (100%)	35 (100%)	67 (100%)

【考察】

一般に加齢による二次象牙質の形成やう蝕による局所的な修復象牙質の形成のため、経年的に根管は細くなってゆき、近遠的に圧平されると単純根管が不完全分岐根管になる場合がある。そのため高齢者になると不完全分岐根管の割合が多くなると考えられる。

本研究では、歯牙提供者の年齢は考慮されていないため不完全分岐根管を単純根管の一部とし、「単純根管と不完全分岐根管」と「完全分岐根管」の 2 つのグループに再分類し、さらに 2 根性の上顎第二小臼歯の出現率は約 10%であるので、本研究の単根歯の結果を上顎第二小臼

歯全体の 90%として 2 根性のものを含め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。その結果を表 2 に示した。

表 2

	右	左	計
単純根管 ＋不完全分岐根管	27 (73.0%)	33 (89.2%)	60 (81.1%)
完全分岐根管 (単根性＋2 根性)	10 (27.0%)	4 (10.8%)	14 (18.9%)
計	37 (100%)	37 (100%)	74 (100%)

日本人の透明標本を利用した過去の研究結果と本研究をまとめたものが、以下の表 3 である。

表 3

	単純根管 ＋不完全分岐根管	完全分岐根管 (単根性＋2 根性)
浜谷 ³⁾	81.8%	18.2%
斎藤 ⁴⁾	78.8%	21.2%
本研究	81.8%	18.9%

外国の研究⁵⁾では、不完全分岐根管と単純根管を合わせたものの出現頻度は 81.8%、完全分岐根管は 18.2%であり本研究結果と近似していた。

以上から「単純根管と不完全分岐根管を合わせたもの」と「完全分岐根管」はおおよそ 8:2 の割合で出現すると言える。個々の根管形態の出現頻度をより厳密に算出し考察するには、年齢、性別、人種なども考慮し分類を行わなければならないが、この 8:2 という数値は大まかではあるものの将来の私自身の臨床に役立つ指標になると考える。

本研究では、根管形態を単純根管、不完全分岐根管、完全分岐根管の 3 種類のみ分類し、上顎第二小臼歯では単純根管が 8 割程で一番多いことが判明した。ただし実際の根管形態はより複雑であった。単純根管でも根管の太さは個々の歯で異なり、不完全分岐根管では分岐した根管が合わさる位置や分岐の程度は様々であった。その他にも根管が網目状に広がった網状根管、根管が根尖部、特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。

上顎第二小臼歯のみを観察しても一つとして同じ根管形態が無いことを実感させられた。今後の臨床の場で、今回学んだ根管形態の複雑性や多様性をつねに想起しながら治療を行いたい。

【参考文献】

- 1) 桜庭一郎 (2001) 歯牙透明標本のレジン包埋について 30 期生（平成 12/13 年度）研究実習論文報告書（第二号）p49-50
- 2) 歯の解剖学第 (1995) 藤田恒太郎 p68-70 金原出版 東京
- 3) 浜谷絵里 (2014) 上顎第二小臼歯の根管形態について 43 期生（平成 25/26 年度）研究実習論文報告書 p28
- 4) 斎藤由里子 (2013) 上顎第二小臼歯の根管形態について 41 期生（平成 23/24 年度）研究実習論文報告書 p47-48
- 5) 鈴木賢策、Louis I. Frossman, Seymour Olieet Carols, and E. Del Rio (1997) グロスマンエンドドンティックス p161-162 医歯薬出版、東京

上顎側切歯の根管形態について

43100046 平野知佳

指導教官；山本 恒之(硬組織発生生物学教室)

キーワード：上顎側切歯、側枝、根尖分岐、透明標本

緒言

根管治療は日常の歯科治療において中核をなす分野である。正確な根管治療は予後の成績を高めるが、そのためには根管形態を熟知し理解しなければならない。上下顎前歯は単根管であるものが大部分であるが、側枝や根尖分岐もしばしば出現するといわれる。しかし、それらの形態、出現頻度などについて詳細に述べた文献は極めて少ない。そこで本研究では特に上顎側切歯を選び、透明標本を用いて同歯の側枝と根管分岐の出現頻度を調べることにした。

材料と方法

硬組織発生生物学教室所有の 10%ホルマリン溶液で保存してあった上顎側切歯、右側 30 本、左側 31 本の計 61 本を使用した。標本歯を 60℃の 30%KOH 水溶液で処理し、流水下で歯ブラシでよく清掃した。5%蟻酸で3週間脱灰した後、ピーカーに墨汁と標本を入れて真空チャンバー内で空気を引き根管に墨汁を流入させた。歯ブラシで歯を清掃した後、80%、90%、100%、無水アルコールで1日ずつ脱水した。サリチル酸メチルⅠ、Ⅱに1日ずつ浸漬し標本を透明にした後、スチレンモノマー、スチレンモノマーとリゴラック（ポリエステルレジン）の1:1混合液にそれぞれ1日間、さらに0.3%ベンゾインを入れた100%リゴラックに1日間浸漬し標本にレジンに浸透させた。筆でよく標本表面のレジンにぬぐい紫外線重合器で1日重合した。

結果

40 期生須田¹⁾と41 期生小林²⁾は、それぞれ上顎中切歯と上顎側切歯の根管形態の研究で側枝と根尖分岐を明確に判別した。彼らは組織学実習標本により上顎中・側切歯根尖のセメント質の平均厚さを1.0mmと算出し、側枝は根尖端から1.0mm以上歯頸側で主根管から分岐しかつ明らかに主根管より細いもの、根尖分岐は根尖端から1.0mm以内で分岐するもの、あるいは1.0mmより歯頸側で分岐するが主根管と区別ができないものとした。この判別法を使い、彼らは上顎中・側切歯の根管形態を、側枝も根尖分岐も持たない直根管、側枝のみ持つ根管、根尖分岐のみ持つ根管、側枝と根尖分岐の両方持つ根管、の4種類に分類し、それぞれの形態を持つ歯の数と頻度(%)を算出した。今回の研究でもその判別法と分類法を踏襲し、上記4種類の根管形態の頻度を算出した(表1)。なお、全ての歯が上記4種類のいずれかに分類できた。

表 1

	右	左	計
直根管	18 本 (60.0%)	18 本 (58.1%)	36 本 (59.0%)
側枝のみ	3 本 (10.0%)	8 本 (25.8%)	11 本 (18.0%)
根尖分岐のみ	8 本 (26.7%)	5 本 (16.1%)	13 本 (21.3%)
側枝 + 根尖分岐	1 本 (3.3%)	0 本 (0%)	1 本 (1.6%)
計	30 本 (100%)	31 本 (100%)	61 本 (100%)

考察

歯の解剖学入門³⁾では、上顎側切歯における4種類の根管形態の出現頻度は、単純根管(直根管)が52.8%、側枝のみが15.7%、根尖分岐のみが28.3%、側枝+根尖分岐が3.2%であった(標本数は不明)。小林の研究²⁾では直根管が55.4%、側枝のみが18.5%、根尖分岐のみが26.1%、側枝+根尖分岐が0%であった(標本数65本)。頻度の順位はどちらも本研究と同じであるものの、個々の頻度について多少のばらつきがみられる。歯の解剖学入門では観察方法と側枝と根尖分岐の判別法は不明である。これらが頻度のばらつきに影響した可能性がある。一方、小林との違いは、お互いに標本の絶対数が足りないことにより生じたと考えられる。さらに厳密に出現頻度を調べるためには、標本数を増やすとともに、観察法や側枝・根尖分岐の判別法を統一する必要があるだろう。また、根尖分岐は経年的に狭窄し閉鎖するという報告もあることから、歯の提供者の年齢も考慮しなければならないと思われる。

本研究実習を通して、一般に単純であるといわれている上顎側切歯の約半数に側枝や根尖分岐が存在することがわかった。予後の良い治療を行うには、根管形態をしっかり理解し予断しないことが重要であると再認識させられた研究実習であった。

参考文献

1. 須田有紀子(2012) 上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について 40 期生(平成 22/23 年度)研究実習論文報告集 p45-46
2. 小林泰(2013) 上顎側切歯の根管形態について 41 期生(平成 23/24 年度)研究実習論文報告集 p43-44
3. 赤井三千男(1993)：歯の解剖学入門 医歯薬出版

上顎犬歯の根管形態について

43100056 柳澤 瞳子

指導教官 山本恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：上顎犬歯、根管形態、透明標本、側枝、根尖分岐

緒言

根管治療は歯科臨床において基本的で重要な分野であり、根管治療を的確に行うためには根管形態を十分に理解する必要がある。側枝と根尖分岐は根管治療の成績に関わる重要な構造物であるものの、詳細に論じている文献は極めて少ない。本研究は歯牙の中で最も根管が長い上顎犬歯を選び、同歯にどの程度の頻度で側枝と根尖分岐が出現するかを明らかにすることを目的とした。観察にはレジン包埋した透明標本を利用した。

材料と方法

硬組織発生生物学教室所有の、10%ホルマリン溶液に保存されていた根面に齲蝕の無い上顎犬歯 59 本(右 24 本、左 35 本)を材料とした。標本を 60℃の 30%水酸化カリウムで 30 分間処理し、流水下で歯ブラシで清掃した。5 % 蟻酸で 3 週間脱灰した後、ピーカーに墨汁と標本を入れて真空チャンバーで空気を引き墨汁を根管内に流入させた。歯ブラシで表面の墨汁を取り除き、80%、90%、100%、無水アルコールで 1 日ずつ脱水した。サリチル酸メチル I、II に 1 日ずつ浸漬し標本を透明にし、ついでスチレンモノマー、スチレンモノマーとリゴラック（ポリエステルレジ） 1 : 1 混合液にそれぞれ 1 日ずつ、0.3%のベンゾインをいれた 100%リゴラックに 1 日間浸漬しレジンを浸透させた。筆でよく標本表面のレジンをぬぐい紫外線重合器で 1 日重合した。

結果

40 期生須田¹⁾と 41 期生前田²⁾はそれぞれ上顎中切歯と上顎犬歯の根管形態の研究で、側枝と根尖分岐のいずれも持たない根管を直根管と名付けた。さらに前歯の根尖セメント質の平均厚さを組織切片から 1.0mm と算出し、根尖分岐は根尖セメント質内で、すなわち根尖端から 1.0mm 以内の高さで分かれるもの、側枝は歯根象牙質内で、すなわち根尖端より 1.0mm 以上歯頸側で主根管から分かれ、かつ明らかに主根管より細いもの、と判別した。以上の方法により彼らは根管形態を①直根管、②側枝のみ持つ根管、③根尖分岐のみ持つ根管、④側枝+根尖分岐ともに持つ根管の 4 種類に分類した。本研究もこの分類法と判別法を踏襲し上顎犬歯の根管形態を分類した。それぞれの根管を持つ歯の数と頻度 (%) を表 1 にまとめた。

	右 (24 本)	左 (35 本)	合計 (59 本)
直根管	16 本(66.7%)	24 本 (68.6%)	40 本 (67.8%)
側枝	1 本 (4.1%)	7 本 (20.0%)	8 本 (13.6%)
根尖分岐	6 本 (25.0%)	3 本 (8.5%)	9 本 (15.3%)
側枝+ 根尖分岐	1 本 (4.1%)	1 本 (2.8%)	2 本 (3.3%)

表 1

考察

本研究により通常は直根管とされる上顎犬歯にも、実際には約 3 割に側枝や根尖分岐を持つ根管が存在することが明らかになった。

歯の解剖学入門³⁾による上顎犬歯の 4 種類の根管形態の頻度は、単純根管 (=直根管) が 42.7%、側枝のみが 27.3%、根尖分岐のみが 25.9%、側枝+根尖分岐が 4.1%であった。41 期前田²⁾の研究結果では、直根管が 49.0%、側枝のみが 43.1%、根尖分岐のみが 5.9%、側枝+根尖分岐が 2.0%であった (標本数 51 本)。

歯の解剖学入門³⁾と 41 期前田²⁾の研究結果では数値は異なるが、ともに頻度の多いものから順に直根管、側枝のみ、根尖分岐のみ、側枝+根尖分岐となる。本研究では、直根管の頻度が最も高く、側枝+根尖分岐が最も低いのは変わらないが、根尖分岐のみと側枝のみの出現頻度の順位は反対であった。標本数の絶対数の不足がこの違いを生じさせた最も大きな原因であろうと思われる。信頼度を上げるためには標本数を増やすと共に、観察法、根尖分岐と側枝の判別法を統一する必要がある。また、根尖分岐には経年的閉鎖があるとの報告もあるので、歯の提供者の年齢も考慮する必要があるかもしれない。

今回の研究実習から上顎犬歯の約 3 割に、以前の文献も含めるとそれ以上に側枝や根尖分岐が存在することが明らかとなった。上顎犬歯は単根管で根管治療も比較的容易であると漠然と考えていたが、そうとは限らないということを実際に標本を通して学ぶことができ、大きな収穫であった。側枝は一般的に機械的清掃だけでは十分な清掃ができず、十分な垂直加圧により緊密な根管充填を行うとともに化学的な清掃も併用する必要があるといわれている。上顎犬歯にもそのような治療法を積極的に取り入れるべきと考える。予後良好な根管治療を行うためには根管形態の複雑性を常に意識しながら治療を行っていかなければならない。このことを実感した有意義な研究実習であった。

文献

1) 須田有紀子(2012) 上顎中切歯根管の側枝と根尖分岐について 40 期生 (平成 22/23 年度) 研究実習論文報告集 p45-46
2) 前田良子(2013) 上顎犬歯の根管形態について 41 期生 (平成 23/24 年度) 研究実習論文報告集 p51-52
3) 赤井三千男 (1990) : 歯の解剖学入門、医歯薬出版

骨芽細胞特異的副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)過剰発現マウスの胎生期下顎骨における組織学的解析

43100057 山崎 七愛

指導教員：網塚 憲生（硬組織発生生物学教室）

キーワード：PTHrP, 骨芽細胞, 骨細胞, 下顎骨

1. 緒言

副甲状腺ホルモン関連ペプチド(PTHrP)は顎顔面領域において、エナメル器ならびに歯槽骨・顎骨の骨芽細胞から産生され、歯槽骨および歯胚の発生・形成を調節することが示唆されている。そこで、骨芽細胞から PTHrP が過剰産生された場合における歯槽骨および歯胚の異常を組織化学的に検索した。

2. 方法

マウス骨芽細胞に特異的な I 型コラーゲンのプロモーターを用いて骨芽細胞特異的 PTHrP 過剰発現(Tg)マウスを作製した。胎生 18 日齢 PTHrP Tg マウスの下顎骨を採取し、パラホルムアルデヒド固定後、通法にてパラフィン切片を作製した（動物実験については、動物実験実教育訓練未受講のため、指導教員の実験を見学した）。これらの切片において、各種組織解析を行った。

- ・ H-E 染色
- ・ 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP）染色
- ・ 免疫組織化学

alkaline phosphatase (ALP)：アルカリホスファターゼ
ecto-nucleotide pyrophosphatase/
phosphodiesterase1(ENPP1)：ピロリン酸合成酵素
proliferating cell nuclear antigen (PCNA)：細胞増殖抗原
E11：骨細胞初期マーカー

3. 結果

①骨格標本（アリザリンレッド・アルーシャンプルー染色）

胎生 18 日齢野生型マウスおよび PTHrP Tg マウスにてアリザリンレッド・アルーシャンプルー染色を行うと、PTHrP Tg マウス下顎骨ではアリザリンレッドで赤色に染まる骨が少なく、野生型マウスに比較して骨形成が抑制されている可能性が推測された。

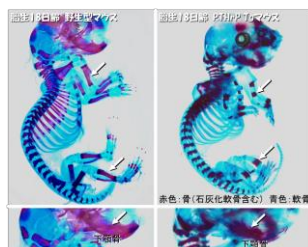


図 1：野生型マウスおよび PTHrP Tg マウス骨格標本

②H-E 染色

野生型マウスならびに PTHrP Tg マウス下顎骨パラフィン切片にて H-E 染色を行った(図 2)。野生型マウス下顎骨では発達した骨梁を観察するが (図 2 上段)、PTHrP Tg マウ

スでは、多数の細胞の中に不規則な形状を示す僅かな幼若骨しか認められなかった (図 2 下段)。

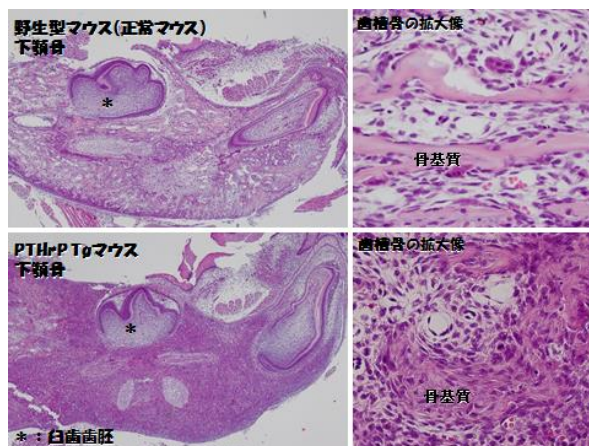


図 2：野生型マウス（上段）および PTHrP Tg マウス下顎骨（下段）における H-E 染色像。左パネルは右パネル歯槽骨の拡大像を示す。なお、野生型マウスと比較して、PTHrPTg マウス臼歯歯胚の大きさや形に明らかな異常は認められない。

③ALP 免疫組織化学/TRAP 酵素組織化学

野生型マウスおよび PTHrP Tg マウスの下顎骨にて骨芽細胞系細胞を染色する ALP 免疫染色ならびに破骨細胞を染色する TRAP 染色を行った結果 (図 3)、野生型マウスでは骨基質表面に茶色に染まる多数の ALP 陽性骨芽細胞系細胞と赤色に染まる TRAP 陽性破骨細胞が観察された(図 3 上段)。一方、PTHrP Tg マウスでは、幼弱骨周囲を取り囲むように多数の ALP 陽性骨芽細胞系細胞が認められた (図 2 左下)。また、形成された幼若骨は僅かであるにも関わらず、多数の TRAP 陽性破骨細胞が局在していた (図 3 右下)。

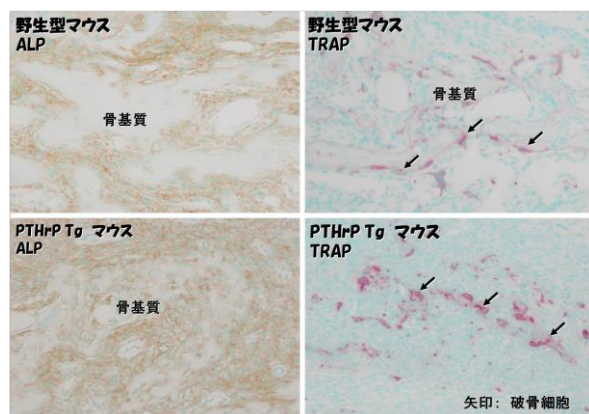


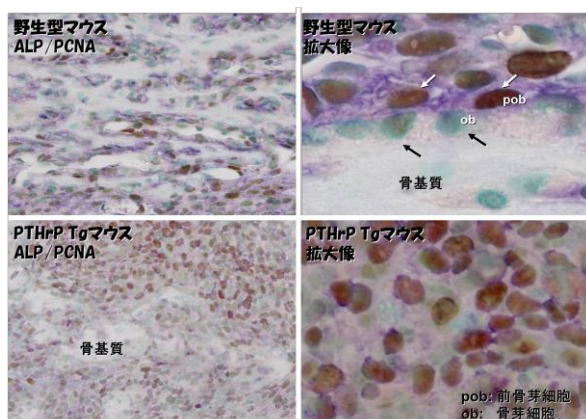
図 3：野生型マウス（上段）および PTHrP Tg マウス下顎骨（下段）における ALP 免疫染色（左）および TRAP 染色像（右）。PTHrP Tg マウスでは、僅かな幼若骨しか形成されていないにもかかわらず、多数の TRAP 陽性破骨細胞（矢印、右下図）が局在していた。

④ALP/PCNA 二重免疫染色

野生型マウスおよび PTHrP Tg マウス下顎骨における前骨芽細胞の分布を検索するため、ALP/PCNA 二重免疫染色を行った (図 4)。骨芽細胞は細胞増殖しないが、前骨芽細胞は細胞増殖を行うため、核に一致した茶色の PCNA

陽性反応を示す。野生型マウスでは、骨基質表面に一層の ALP 陽性/PCNA 陰性骨芽細胞（黒矢印）が局在し、それらの血管側に ALP 陽性/PCNA 陽性前骨芽細胞（白矢印）が認められる（図 4 上段）。一方、PTHrP Tg マウスでは、幼弱骨周囲に存在する多数の ALP 陽性細胞が PCNA 陽性反応も示すことから（図 4 下段）、前骨芽細胞が活発に細胞増殖を行い、その数を増やしていると推測された。

図 4：野生型マウス（上段）および PTHrP Tg マウス下顎骨（下段）にお

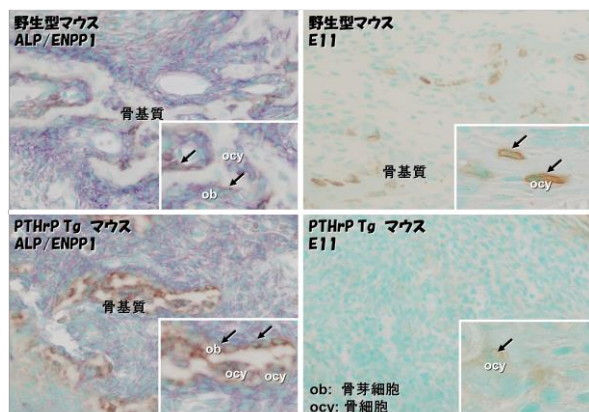


ける ALP/PCNA 二重染色像。左パネルは右パネルの拡大像を示す。

⑤ALP/ENPP1 二重免疫染色、E11 免疫染色

ピロリン酸からモノリン酸イオンを合成し、石灰化促進に作用する ALP、および、石灰化を抑制するピロリン酸合成酵素（ENPP1）の二重免疫染色を行った（図 5 左）。野生型マウスでは骨基質上の骨芽細胞の多くは ALP 陽性を示す一方、ENPP1 陽性を示す骨芽細胞は僅かにしか認められない（図 5 左上）。また、骨基質中の骨細胞は ALP、ENPP1 共に陰性であった。ところが、PTHrP Tg マウスでは、多数の骨芽細胞と骨細胞が ENPP1 陽性反応を示していた（図 5 左下）。よって、PTHrP Tg マウスでは骨基質石灰化が抑制されていると考えられる。さらに、骨細胞の初期分化マーカーである E11 の免疫染色（図 5 右）では、野生型マウスの骨細胞が E11 陽性を示すのに対し（図 5 右上）、PTHrP Tg マウスの骨細胞はほとんど E11 陽性を示さなかった（図 5 右下）。

図 5:野生型マウスおよび PTHrP Tg マウス下顎骨における ALP/ENPP1 二重免疫染色像（左）ならびに E11 免疫染色像（右）。枠内は拡大像を示す。



4. 考察

骨芽細胞特異的 PTHrP 過剰発現マウスでは、歯胚の形成には著しい異常は認められなかった。一方、歯槽骨では、多くの ALP 陽性/PCNA 陽性細胞が観察されたことから、前骨芽細胞が活発に細胞増殖を行っている可能性が推測された。また、骨芽細胞および骨細胞はピロリン酸合成酵素（ENPP1）の強陽性反応を示し、骨基質石灰化が抑制されている可能性が示唆された。

以上より、歯槽骨の骨芽細胞から産生された PTHrP は、オートクライン・パラクライン的に、周囲に局在する骨芽細胞系細胞の細胞増殖・分化に影響を与え、骨基質石灰化に影響を与えていると推察される。

5. 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である網塚教授に感謝致します。また、日常的に実験手法を教えて頂いたり、アドバイスをいただいた長谷川先生、山本先生、本郷先生、そして、硬組織発生生物学教室の皆様にご感謝の気持ちと御礼を申し上げます。

血清タンパク質を付着させたチタン不織布による培養

43100025 木村一誠

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：血清タンパク質,チタン不織布,骨髄間質細胞

緒言

社会の高齢化にともない骨・関節疾患、歯牙の喪失といった硬組織を失う疾患が増えてきており、硬組織を如何に再建するかが重要な問題となっている。1960年代にスウェーデンのブローネマルクらにより生体内でのチタンと骨の特異結合が発見された¹⁾。そこから歯科および整形外科の分野でチタンが人工歯根や人工骨をはじめ、骨再建用に広く普及している。また、チタン表面の構造を粗造にしたり、チタンビーズを焼結して表面積を増大させたり、ハイドロキシアパタイトをコートすることで骨との結合を増加させる試みが行われてきた²⁾。本研究では、血清タンパク質が付着したチタン不織布を細胞培養担体として用い、骨髄間質細胞を培養した場合、骨芽細胞への分化や増殖の程度にどのような変化がみられるかを検討した。

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。チタン不織布(TW: 5 x 5 x 1.5 mm、繊維径 80 μ m)は牛胎児血清(FBS)に2日間浸漬させた(TWFBS)。FBSの代わりにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸漬させたTWをコントロールとした(TWPBS)。FBS中の主要タンパク質であるアルブミンに2日間浸漬させたTWを比較として用意した(TWAlb)。48 wellのディッシュに3種類のTWを入れ、骨髄間質細胞を 2×10^4 個ずつ播種した。培地には骨芽細胞への分化誘導剤としてデキサメタゾン、 β グリセロフォスフェート、アスコルビン酸を添加した。培養1、2週間後にそれぞれのwellにおける生細胞数、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性、カルシウム(Ca)量を測定した。

結果

生細胞数は各培養群において経時的に増加した。培養2週のTWAlbにおける生細胞数はTWPBS, TWFBSと比較して有意に高い値を示した(図1)。骨髄間質細胞が骨芽細胞に分化する初期にALPが発現される。培養後2週において各群ともにALP活性が認められた。TWFBSにおけるALP活性はTWPBS, TWAlbと比較して高い傾向にあったが、有意差は認められなかった(図2)。未熟な骨芽細胞が成熟してくると細胞外マトリックスにカルシウムの沈着が認められる。培養2週のTWFBSではTWPBSと比較してカルシウム量が有意に増加した。TWAlbではTWPBSと比較してカルシウム量の増加は認められな

った(図3)。

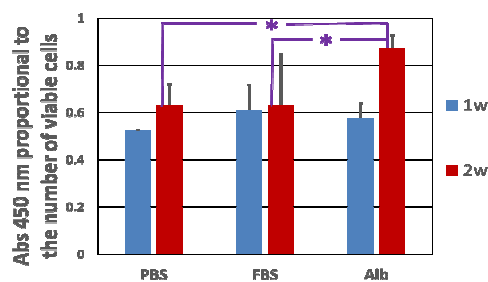


図1 生細胞数

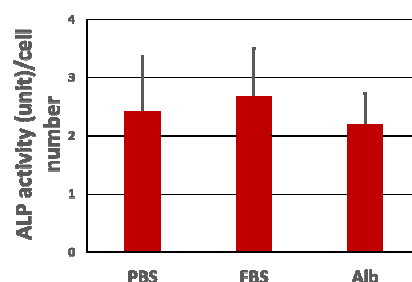


図2 ALP 活性

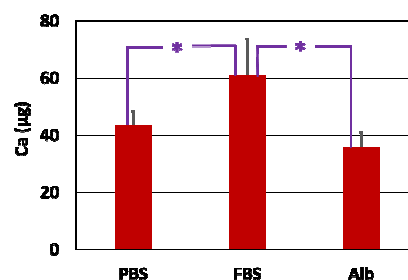


図3 カルシウム量

考察

TWに血清タンパク質を付着させると骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化が促進された。血清中の主要なタンパク質であるアルブミンをTWに付着させても骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化の促進は認められなかった。このことからTWFBS担体からのアルブミン以外の血清タンパク質の徐放性が骨髄間質細胞の骨髄細胞への分化を制御している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Branemark, P. I., Adell, R. (他4名): Osseointegrated titanium fixtures in the treatment of edentulousness. *Biomaterials* 4: 25-28, 1983.
- 2) Zinger, O., Zhao, G. (他5名): Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 26: 1837-1847, 2005.

超音波刺激による骨折治癒促進における骨細胞の関与 ～骨細胞を持つ・持たない魚を用いた解析～

43100034 清水達哉

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：超音波刺激、骨折治癒、骨細胞

1. 緒言

骨折治療において、微弱な超音波で1日1回20分間、骨折部を刺激することで骨折治癒を促進する方法が知られている。実際にこの超音波療法は、骨折治癒期間を4割程度短縮するが、この治癒促進メカニズムは明らかではない。骨折治癒に関わる細胞として骨芽細胞や破骨細胞がこれまで注目されてきたが、本研究では mechanosensing cell である骨細胞に着目した。すなわち、メカニカルストレスのひとつである超音波刺激を骨細胞が感知することで骨折治癒促進に関与しているという仮説を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 方法

ヒトを含む哺乳類は骨細胞を埋め込んだ骨を持つが、興味深いことに魚類では骨の中に骨細胞を持つ種と持たない種が存在する。本研究では骨細胞を持たないメダカと骨細胞を持つゼブラフィッシュを実験種として用いた。メダカとゼブラフィッシュの尾部骨をタングステン針にて骨折させ、1日1回、30mW/cmで20分間のLIPUS（Low Intensity Pulsed Ultrasound = 低出力超音波パルス）刺激を行い、骨折治癒促進効果に違いがあるか否かを調べた。骨折治癒過程はAlizalin RedおよびAlcian blue染色による骨形態観察により確認した。さらに、メダカとゼブラフィッシュの肋骨を用いて、引っ張り強さ測定とマルテンス硬さ測定を行った。

3. 結果

骨細胞を持つゼブラフィッシュでは超音波刺激により2～3日ほどの骨折治癒期間が早まったが、骨細胞を持たないメダカでは超音波刺激による骨折治癒促進効果は見られなかった。（図1）

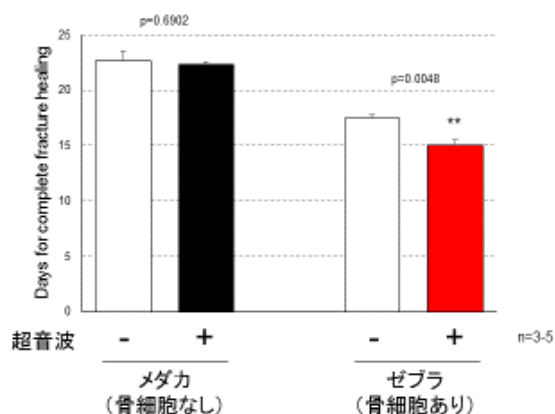


図1. ゼブラフィッシュの骨のみで超音波刺激は骨折治癒を促進した

引っ張り強さならびにマルテンス硬さ測定から、骨細胞を持つゼブラフィッシュの骨の方が骨細胞を持たないメダカの骨よりも、引っ張り力による骨切断に際してより大きな力が必要であること、同じ試験力でより深部まで圧下できる（やわらかくしなやかである）ことが明らかとなった。（図2）

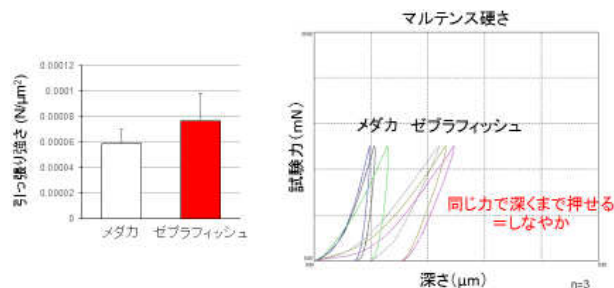


図2. ゼブラフィッシュの骨の方がやわらかくしなやかである

4. 考察

これらの結果より、骨細胞が超音波刺激に応答して骨折治癒を促進する役割を果たしている可能性が示唆された。さらに、骨細胞を持つゼブラフィッシュ骨の方がやわらかくしなやかなことから骨折しにくいと考えられる。

自然界の多くの魚類は進化の過程で骨細胞を失い、現在の骨細胞を持たない骨を獲得した。骨折リスクを回避し、骨折治癒促進刺激に応答するためには骨細胞を持つ骨の方が有利であるにも関わらず、なぜほとんどの魚類が進化の過程で骨細胞を放棄したのかは全く明らかではない。今後は、魚類における環境適応進化の側面から骨細胞の真の役割について調べていきたいと考えている。

5. 参考文献

1. Takeyama K, Chatani M, Takano Y, Kudo A. In-vivo imaging of the fracture healing in medaka revealed two types of osteoclasts before and after the callus formation by osteoblasts. Dev Biol. 2014 Oct 15; 394(2):292-304.
2. Ron S and Mason ND. The enigmas of bone without osteocytes. Bonekey Rep. 2013 May 1; 2:343

6. 謝辞

北海道大学大学院 地球環境科学研究院
動物生態学コース 小泉逸郎研究室

初期う蝕の診断法の現状と課題

43100040 内藤亮

指導教員：水野 守道（口腔分子生化学教室）

緒言

全てのう蝕は初期う蝕の段階を経ており、初期う蝕の検知とモニタリングを適切に行うことがう蝕治療及び予防において非常に重要と言える。今回、初期う蝕における再石灰化の発見、治療、モニタリング方法に関する論文を読み、考察した。

方法

I.A.Pretty,R.P.Ellwood による "The caries continuum: Opportunities to detect, treat and monitor re-mineralization of early caries lesions" を読み、考察した。

結果

う蝕の発見とモニタリングの手助けとなる方法は大きく分けて、視覚の強化、器具の利用、画像処理の三つがある。

視覚の強化方法の一つである International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) は歯面を洗浄、乾燥の後に歯面のう蝕を記録し、7段階に分けて評価するシステムである。もう一つの方法である Fibre Optic Trans-Illumination (FOTI) は歯面に強い光を当てることでう蝕象牙質がオレンジ色に発光することを利用してエナメル質う蝕か初期の象牙質う蝕か否かの診断ができる。

問題点として、どちらのシステムも基準が主観的で解釈が多様ということが挙げられる。理想的な手段は客観的で石灰化のわずかな変化を捉えることが出来るものであるが、その手助けとなる器具として Diagnodent と Electrical Caries Monitor (ECM) がある。

Daiagnodent は現在最も広く使われており、近赤外線 (655nm) を被検歯に照射した時に発する蛍光スペクトルが健全象牙質とう蝕象牙質で異なることを応用したものである。視診に比べて明らかに感度が高いが、偽陽性が出やすいため有用性が制限され、最適な診断法とは言えない。

ECM は一定の振動数の交流を被検歯に流し、対象歯の対抵抗を測定することにより、う蝕エナメル質と

う蝕象牙質を発見することができる器具である。更に、抵抗値から再石灰化の有無を知ることでもある。ECM は一点での測定と面レベルでの測定の両方において高い感度と特異度を示し、実用的かつ高感度の診断法と言える。

最後に、画像処理による診断法は短期間でう蝕の石灰化状態のわずかな変化を感知でき、高感度な診断法として確立している。以下にその4つを示す。

1つ目の White light digital imaging は口腔内カメラにより得た画像を用いた方法で、偏光フィルターの使用により正確な診断が可能である。ICDAS のようなシステムを応用し、同時に近接撮影した部位との比較によってう蝕の進行と改善とを主観的に評価するものである。

2つ目の Digital Imaging Fibre Optic Trans-Illumination (DIFOTI) は FOTI を瞬時に画像化できるようにしたもので、White light digital imaging のような効果に加え、客観的かつ定量的なデータが得られる。しかし、現在一般に普及していない。3つ目の X 線写真は数十年使われている方法である。しかし、放射線被曝の問題から、毎回の使用は難しくなっている。

4つ目の Quantitative Light-induced Fluorescence (QLF) は特定波長の光を歯面に照射し、CCD カメラで撮影して初期う蝕の経時的な進行と改善を観察するシステムである。多様なう蝕の検知において高感度を示し、現在最も信頼できる技術の一つである。

考察

初期う蝕の診断法において重要なことは客観性と高感度、特異度、更に人体に悪影響がないことである。現段階では ECM と QLF が最も実用的で有用であると考えられるが、いずれも偽陽性の可能性があり、種々のシステムをどこまで信用すべきか見極める事が歯科医に必要な技術であると言える。

その技術の向上の為に学生実習や講義において種々の診断法を積極的に取り入れる、更に歯科医自ら多様な診断法を学び考察するといった取り組みが必要であると考ええる。

ART system によるう蝕治療の現状と課題

43100041 中野 晋太郎

指導教員：水野 守道（口腔分子生化学教室）

キーワード：グラスアイオノマーセメント 障がい者
歯科、

緒言

ART(Atraumatic Restorative Treatment：非侵襲的う蝕治療) system とは手用切削器具のみで軟化象牙質を除去しグラスアイオノマーセメントのような歯質接着性、再石灰化促進作用のある材料を用いて修復するものである。よって、ART system は手技、治療時間などの観点から障がい者のう蝕治療に適していると思われる。しかし、ART system は臨床ではあまり使用されていない。この理由を文献から考察したい。

方法

Gustavo F. Molina, Denise Faulks, Jo E.Frencken による論文 Suitability of ART approach for managing caries lesions in people with disability-Experts' opinion を読むことで考察する。

結果

30 人の歯科医師（男性 12 名、女性 18 名）（21 の別々の国の歯科医師で、ヨーロッパ諸国出身が 11 名、アジア出身が 4 名、南アメリカ出身が 4 名、北アメリカ出身が 2 名、オセアニア出身 2 名）（2 名が 5～9 年、4 名が 5 年以下、24 名が障がい者歯科を専門とし 10 年以上治療している）にアンケートを実施した。

まず ART についてどれだけ知っているか、という質問に対し、よく知っていると答えたのが 23.3%、普通と答えたのが 63.3%、なんとなくと答えたのが 13.3%であった。また、ART は障がい者のう蝕治療に重要である、と答えたのが 66.7%、もう少しエビデンスが欲しい、と答えたのが 9%、わからない、と答えたのが 3.3%であった。

しかしより科学的に信頼できるエビデンスが認められると ART を使用するか、との問いに 83.3%は”はい”と答えたが、16.6%は”わからない”と答えた。どのくらい ART を使うかという問いに 10%は非常によく使う、40%はよく使う、30%はたまに、20%は使ったことがないと答えた。

また、ART system において、さらに改良が必要なものとして、切削器具、材料、そして術式の簡易化な

どが挙げられた。また、ART の使用に際し問題となることとして患者の状況や環境によっては処置をするのが難しくなる、治療の質が低いという先入観、科学的なエビデンスの欠如などが挙げられた。

考察

上記のように、87%以上の歯科医師は ART に対して普通以上の知識を持っているのに拘らず、ART を常用しているのは 50%となっており、これは新しいものよりも、これまで使われ、一定の評価を得てきた治療法を使ってしまうということ、ART は質が低いという先入観があるということ、長期にわたって治療の効果を持続させるためには、きちんとした手順を踏み状態を整えなくてはいけないなどの理由のためであると考えられる。それを解消するためにさらなるエビデンスを追及し、材料の改良、術式の簡易化が必要である。また、切削器具の改良と共に歯科医師のう蝕治療の技術の向上も必要で、除去すべきう蝕象牙質を確実に診断することが必要である。硬いう蝕象牙質は軟らかいう蝕象牙質に比べ細菌数が有意に少なく、濃く着色したう蝕象牙質を除去すると細菌感染の少ない透明層となる。したがって、軟らかいう蝕象牙質のみを除去するために、切削器具を高速回転で用いることは避け、スプーンエキスカベータや低速のラウンドバーを用い、軟らかく濃く着色している部分を、う蝕検知液を用いて取り残しがなくかつ過剰切削も避けて除去すべきである。また、急性う蝕の進行は淡黄色の着色が脱灰による軟化より遅れ、細菌侵入は着色よりさらに遅れるが、慢性う蝕は軟化象牙質の前縁まで黒褐色の着色と細菌侵入が起きているため、慢性う蝕はより軟化象牙質を取り残さないように注意することが必要である。う蝕検知液（1%アシッドレッドポリプロピレングリコール液）は可逆的に変性しているう蝕象牙質第一層のみを染色するため、染色しなくなるまで軟化象牙質を除去することが可能である。

参考文献

1. Suitability of ART approach for managing caries lesions in people with disability-Experts' opinion

Gustavo F. Molina, Denise Faulks, Jo E.Frencken 著 2013 年

2.う蝕治療ガイドライン 31 頁

日本歯科保存学会 編

永松書店

バイオインフォマティクスによるオステオポンチンの研究—腫瘍との関係—

43100044 畠中柚衣

指導教員：藤沢 隆一（口腔分子生化学教室）

キーワード：バイオインフォマティクス、オステオポンチン

緒言

骨は約 70% のミネラルと 20% の蛋白質によって構成されており、その主体はコラーゲンである。骨蛋白質の残りは非コラーゲン性蛋白質群であり、Gla 蛋白質、糖蛋白質、プロテオグリカン、血清蛋白質らが挙げられる。糖蛋白質の一つであるオステオポンチン（osteopontin:OPN）は、骨芽細胞および破骨細胞によって合成され、活性型ビタミン D によってその合成が活性化する骨の代表的なリン・蛋白質である。OPN は骨基質以外の正常組織および腫瘍組織にも存在しており、Arg-Gly-Asp (RGD) により成る細胞接着配列を持つ。この接着配列によって骨芽細胞の骨基質への接着を促進する一方、破骨細胞の接着誘導も行っており、様々な条件下において骨代謝に関与している。また、血管内皮細胞への結合に関与し、癌転移における働きを持っていることも明らかとなっている。そこで本研究では、

1. OPN の蛋白質・DNA を様々な動物間で比較し、OPN の機能について明らかにする。
2. ヒトにおいて、OPN と腫瘍との関係性を明らかにする。という目的を設定した。

方法

遺伝子配列のデータベースである NCBI (National Center for Biotechnology Information)、DDBJ (DNA data bank of JAPAN)、Ensembl Genome Browser、Uniprot、Cancer browser) で情報を集め、キーワード検索システムである ARSA、塩基配列・アミノ酸配列の多重整列と系統樹作成のためのツールである ClustalW を用いた。

結果

ヒト OPN は、314 残基からなる分子量 35409、等電点 4.4 の蛋白質である。N 末端から 16 残基は疎水性アミノ酸を中心とする小胞体シグナルペプチドで、85-95・107-116 にアスパラギン酸連続配列、細胞接着に関与する RGD 配列 (159-161) と、VYGLR 配列 (163-167) が存在する。

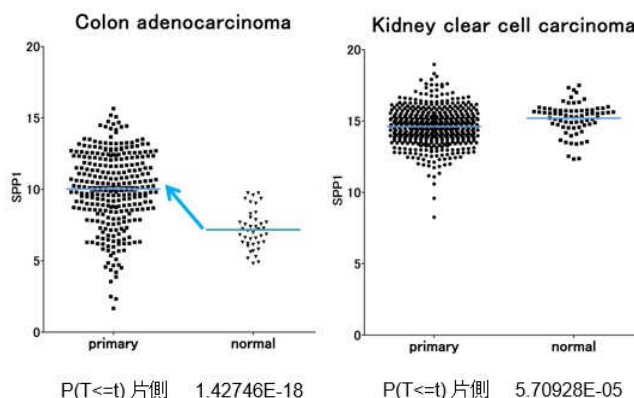
OPN はヒトをはじめとした哺乳類、爬虫類、鳥類、硬骨魚類、軟骨魚類に存在することが確認された。

様々な動物において OPN の蛋白質配列を比較したところ、相同領域が 5 つ確認され、これらを第 1 相同領域～第 5 相同領域と名付けた。第 1 相同領域には、小胞体シグナルペプチドが含まれており、ヒトにおいては、第 2 相同領域の直前にアスパラギン酸連続配列が存在していた。第 3 相同領域に RGD 配列と VYGLR 配列が含まれており、RGD 配列の位置は種を超えて保存されていて前後は Glycine と Serine であること、哺乳類は RGD 配列が 1 個しか存在し

ないのに対し、鳥類・爬虫類・魚類は RGD 配列が近接して 2 個存在していることが判明した。

次に DNA 配列の比較をしたところ、TATAbox が OPN においては存在しない一方、オステオカルシンや Matrix Gla Protein、Bone Sialo Protein には TATAbox が Exon1 の約 25 残基上流に存在することがわかった。

Cancer Browser の RNAsequence Result の統計解析を行い、対応のない症例内のサンプル間の OPN 遺伝子 (SPP1) 発現においてそれぞれの組織において、原発癌部と正常組織部に有意差があるか解析を行ったところ、結腸腺癌・肺癌・肝細胞癌・頭頸部癌等において、正常部に比べて顕著に SPP1 の発現量が上がっていた。(図 1) 一方、前立腺癌・乳癌においては発現量が上がっていたが、正常組織との差は小さく、腎細胞癌は、正常部の方が発現量は高かった。(図 2)



(図 1) 結腸腺癌

(図 2) 腎細胞癌

考察

OPN の蛋白質を比較し系統樹を作成することで、脊椎動物から軟骨魚類、硬骨魚類、爬虫類、哺乳類へと進化し、さらにから爬虫類から鳥類へ変化するという一般的な生物学的進化様式と矛盾していないことがわかった。

第 3 相同領域が特によく保存されており、細胞接着機能が OPN の性格の中でもっとも重要であると考えられた。

TATAbox を有するものでは転写制御が厳格かつ劇的に行われる傾向が高いのに対して、TATA レスプロモーターには恒常的な活性を示すものが多いとされていることから、OPN は他の骨蛋白質と異なり、骨基質以外の正常組織および腫瘍組織などの様々な場所で恒常的な活性があると考えられた。

結腸腺癌、肺癌などの腫瘍部分において SPP1 の発現は高くなることから、腫瘍の形成に関与することが推定できた。一方で、前立腺癌・腎細胞癌のような転移が多い腫瘍は OPN の接着機能がなくても転移することができ、特に腎臓は正常組織においてもともと発現量が多く、癌化によって正常オステオポンチンが脱分化したため発現量が低下したと考えられた。

継代培養骨髄間質細胞におけるサイトカインの影響

43100045 平井 尚哉

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、骨欠損部に自家骨移植の代わりに骨髄間質細胞を用いるという臨床応用が試みられている。継代を繰り返した骨髄間質細胞は骨芽細胞への分化が劣ることが知られており、多分化能を有した細胞を大量に確保するのは難しいと考えられている¹⁾。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) と骨形成タンパク質 (BMP-2) を投与し、各継代細胞の分化増殖能について調べた。

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。骨髄間質細胞を継代し、F1～F7 を作成した。F1, F3, F5, F7 を 48well ディッシュに 1well あたり 10000 個ずつ播き、コントロール、FGF 投与、BMP 投与、FGF と BMP の同時投与、FGF 投与後 BMP を投与という 5 群に分けて培養を行った。培地には骨芽細胞への分化誘導剤としてデキサメタゾン、βグリセロフォスフェート、アスコルビン酸を添加した。培養 1、2 週間後にそれぞれの well における生細胞数、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、カルシウム (Ca) 量を測定した。

結果

生細胞数は FGF-2 が投与されている F3, F5 の培養系において無投与群に比較して高い傾向を示した (図 1)。

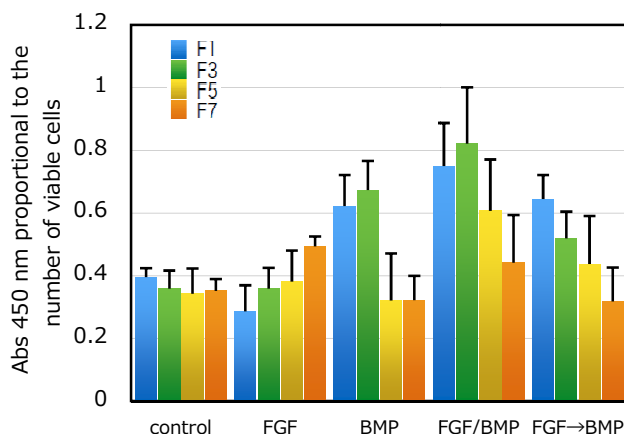


図 1 生細胞数

骨髄間質細胞が骨芽細胞に分化する初期に ALP が発現される。BMP-2 単独投与、FGF-2 と BMP-2 の同時投与群、

そして FGF-2 を投与してから BMP-2 を投与した群において ALP 活性の上昇が認められた (図 2)。

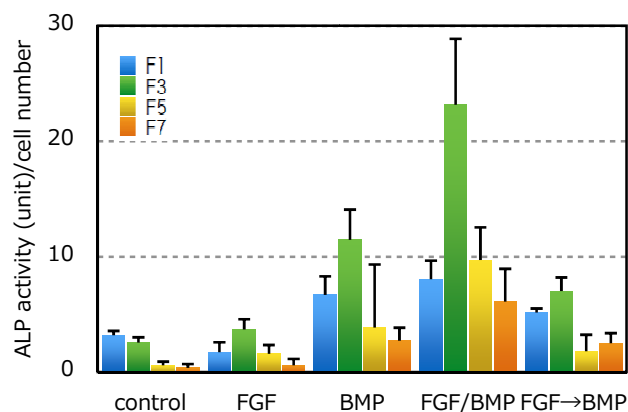


図 2 ALP 活性

未熟な骨芽細胞が成熟してくると細胞外マトリックスにカルシウムの沈着が認められる。F5 の培養系において骨芽細胞への分化マーカーである Ca 量は FGF-2 を投与してから BMP-2 を投与した群が最も高い値を示した (図 3)。

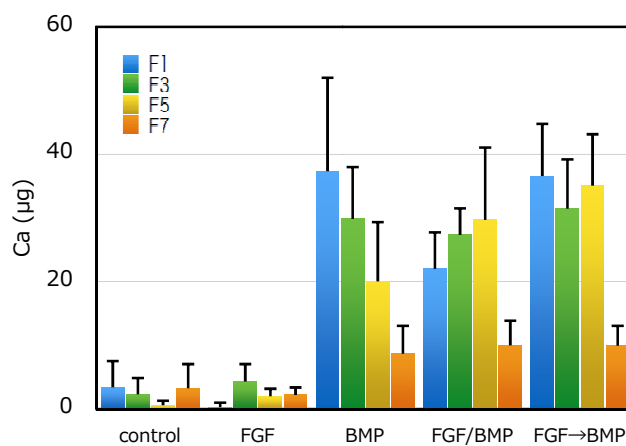


図 3 カルシウム量

考察

FGF-2 が投与されている F3, F5 の培養系の生細胞数は無投与のものに比較して高い傾向を示した。F5 の培養系において骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化マーカーである Ca 量は FGF-2 を投与してから BMP-2 を投与した群が最も高い値を示した。以上より、継代を繰り返した骨髄間質細胞において初期に FGF-2 を投与すると細胞（未熟な骨芽細胞）が増殖し、そこに BMP-2 が投与されることにより、骨芽細胞への分化が促進されることが示唆された。

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.

バイオインフォマティクスによるオステオカルシンの研究

43100049 藤村真也

指導教員：藤沢 隆一（口腔分子生化学教室）

キーワード：バイオインフォマティクス、オステオカルシン

背景

硬組織のタンパク質にはコラーゲン、Gla タンパク質（オステオカルシン、マトリックス Gla タンパク質）などが存在する。骨のタンパク質のうち、コラーゲンを除いた残りは非コラーゲン性タンパク質である。このタンパク質はカルシウム結合能をもっており、酸性タンパク質である。非コラーゲンタンパク質のひとつに γ -カルボキシグルタミン酸と呼ばれる Gla タンパク質であるオステオカルシンがある。これはプロトロンビンなどの血液凝固に関係するタンパク質に含まれ、骨、象牙質に特有のタンパク質である。

方法

DNA などの配列データのデータベースである DDBJ を主に用いた。このシステムの検索システムである ARSA を使って、様々な動物のオステオカルシンの DNA や mRNA をダウンロードしデータ収集を行った。次に、多重整列プログラムである ClustalW で遺伝子配列の相同性を抽出し分析を行った。また、ClustalW の系統樹作成機能で系統樹を作成し、ツリービューというアプリケーションを用いて系統樹データの図式化を行った。

結果

①人のオステオカルシンの特徴：全長はアミノ酸 100 残基よりなり、シグナルペプチドは 1 番目から 23 番目、プロペプチドは 24 番目から 51 番目、分泌タンパクは 52 番目から 100 番目であった。 γ -カルボキシグルタミン酸 (Gla) は 68 番目、72 番目と 75 番目に発見できた。

②異なる動物のオステオカルシンの比較：人、カエル、羊、鶏、魚などのオステオカルシンアミノ酸配列を相互に比較すると、相同な領域が 4 か所発見された。人のプロペプチド相当領域は 2 番目の相同領域に含まれた。これらの相同領域を第 1～第 4 相同領域と名付けた。第一相同領域はシグナルペプチドの中央部、第二相同領域はプロペプチド領域の中央部、第三相同領域には Gla を含む領域、第四相同領域は分子の C 末端部分付近に見られた。

③系統樹の作成：系統樹よりオステオカルシンの進化系統は一般のものと矛盾しない結果が得られた。

④protein c と prothrombin のアミノ酸配列：protein c のアミノ酸配列の 81 番目から 91 番目、prothrombin のアミノ酸配列 391 番目から 398 番目に、第二相同領域と相動性を持つ部位が見つかった。

⑤osteocalcin、protein c、prothrombin の Gla を持つ部位を第三相同領域相当部となづけた。ここでは R や K の塩基性アミノ酸が多いことや、 γ -カルボキシグルタミン酸になる E の直前または直後に L や I など疎水性アミノ酸が多いことが分かった。

⑥人の matrix Gla protein の特徴

matrix Gla protein は Gla を持つタンパク質である。全長はアミノ酸 103 残基よりなり、シグナルペプチドは 1 番目から 19 番目、プロペプチドは 97 番目から 103 番目であった。Gla は 21 番目、56 番目と 60 番目、67 番目、71 番目に発見できた。

⑦さまざまな生物のオステオカルシン mRNA の比較

mRNA では第三相同領域までよく保存されていた。

考察

オステオカルシンは骨芽細胞のみから分泌され、代謝調節および骨形成促進性に働くものと考えられている。よって、進化の過程でオステオカルシンを出現した生物には、骨の発生が必要だったからだと推定される。第二相同領域はプロペプチド内にあり、共通する配列はプロテイン C とプロトロンビンにもあり、 γ -カルボキシラーゼが認識して γ -カルボキシグルタミン酸を合成する領域と想像される。第三相同領域における 3 つの Gla は非常によく保存されており、重要な機能を持つことが考えられる。Gla はカルシウムイオンに親和性を持つため、この部位がハイドロキシアパタイトと結合すると考えられるので、我々の研究結果と矛盾しない結果が得られた。オステオカルシンの表面に Gla が 3 つ並ぶことで、ハイドロキシアパタイトの表面性状と相補的結合構造を形成していることが考えられている。このオステオカルシンの Gla の並び方が骨の石灰化や維持に関与していることが推定される。（文献 1）

参考文献

1 Quyen Q. Hoan, Frank Sicheri 他 2 名 Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure NATURE 425 979 30 oct 2003

薬剤徐放性を有するポリ乳酸ナノ粒子の作製

43100022 葛山 智彦

指導教員：阿部 薫明（生体材料工学教室）

キーワード：ポリ乳酸, ナノ粒子, 薬剤徐放, 生分解材料, EPR 効果, 細胞毒性

1. 緒言

従来の投与法では副作用や毒性が出現してしまうようなケースでも、ドラッグデリバリーシステム(DDS)を用いることで、有効性の増強、副作用の低減を図ることができ、結果 QOL の向上へとつながる。DDS には、Passive targeting という、腫瘍の脈管系の特性を利用して抗がん剤が選択的に腫瘍に集積するようにするというものがある¹⁾。具体的には、固形腫瘍では腫瘍新生血管が増生するが、それに見合うだけのリンパ回収系の増生がなく、また、腫瘍局所では著しい血管透過性亢進が起きており、これによって血管内皮細胞間に約 200 nm 程の間隙が生じているという Enhanced permeability and retention (EPR)効果を利用する²⁾。今回の研究では、DDS の中でも特に EPR 効果への応用を目指した粒子を志向して、生分解性を持つことが知られているポリ乳酸を原材料とした粒径 200 nm 以下のナノ粒子を作るということを目指した。

2. 方法

実験材料：ポリ乳酸 (PLA、平均分子量：1,500～1,800)、ポリビニルアルコール (PVA、平均分子量：10,000)、アセトン、エタノール、アミノフルオレセイン

実験方法：PLA 100 mg を溶解させアセトン 1 mL、エタノール 0.5 mL へと溶解し、2 mg/mL のアミノフルオロセイン / アセトン溶液(0.5 mL)を加えた。得られた溶液を、40℃の 0.5% PVA 水溶液 25mL 中へ 1 滴ずつ滴下した。40℃の状態 で 30 分攪拌し、更に室温で 30 分攪拌した。その後、遠心分離し沈殿物を保留粒子径 3 μm のフィルターで濾過し、凍結乾燥させて精製した³⁾。

得られた粒子の形状観察には、走査型電子顕微鏡 (SEM: Hitachi S-4000) を用いた。紫外光照射により粒子の発光特性の確認を行った。生体への影響を評価するために、得られた粒子の細胞暴露試験を行った。試験には HeLa 細胞を用い、10%FBS 含有 D-MEM 培地中、37℃、5% CO₂ 雰囲気下で培養を行った。各種濃度(1, 10, 20 ppm)でナノ粒子を暴露し、24 時間後の細胞活性を CellTiterGlo (Promega) を用いて評価した⁴⁾。また粒子曝露下での細胞の動的挙動を確認するため、24 時間の蛍光 time-lapse 観察(Nikon, Ti-E, 対物レンズ x40, 励起波長：477 nm)を行った。

3. 結果

図 1 にフィルターでの濾過を行わなかった場合の PLA ナノ粒子の SEM 像を示す。この場合、粒径数～数十μm

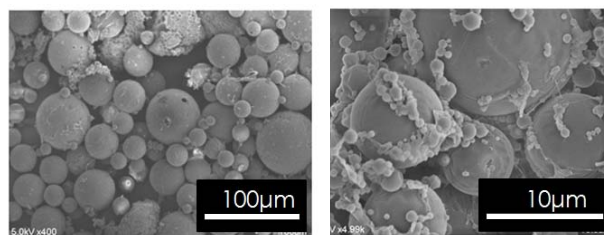


図 1：濾過を行っていないポリ乳酸粒子の SEM 像
(左：弱拡大、右：強拡大)

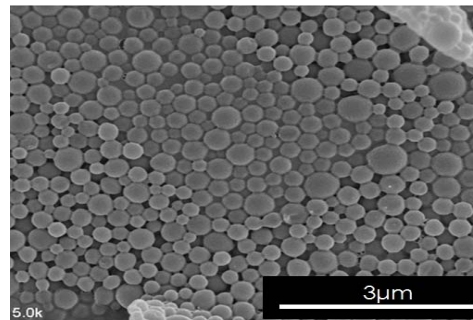


図 2：濾過を行ったポリ乳酸粒子の SEM 像



図 3：濾過を行ったポリ乳酸粒子の SEM 像

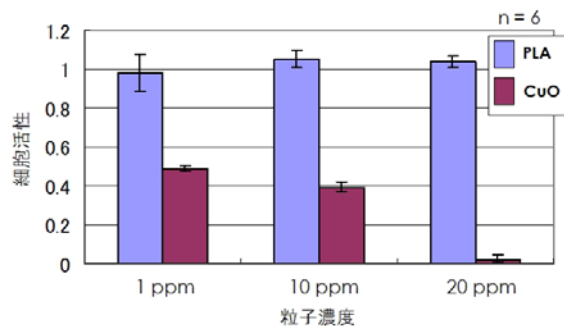


図 4：Hela 細胞を用いた細胞活性試験の結果

の粒子が主流であった。一方、濾過を行った場合、目的とする粒径 100～200nm 程の PLA ナノ粒子を分画することに成功した(図 2)。蛍光色素(アミノフルオロセイン)の PLA 粒子への導入を確認するため紫外光を照射したところ、赤色の発光が確認された(図 3)。次に、得られた PLA ナノ粒子の細胞への影響を検討するため、様々な濃度で HeLa 細胞へと曝露した。その結果を図 4 に示す。酸化銅ナノ粒子曝露下では低濃度から細胞活性の低下が確認されたが、PLA ナノ粒子の場合には 20 ppm まで濃度を上昇させても、細胞活性の低下は見られなかった。PLA ナノ粒子曝露下 (10 ppm) で、time-lapse 観察を行ったところ、細胞が PLA ナノ粒子を捕捉し、盛んに細胞分裂している様子が観察された(図 5)。

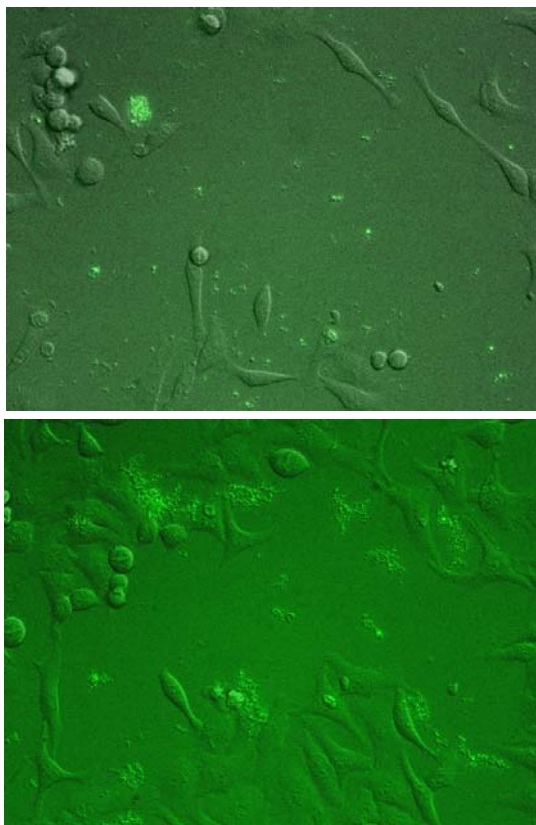


図 4:PLA ナノ粒子曝露下での HeLa 細胞の蛍光 time-lapse 観察 (a : 曝露直後、b : 23 時間後)

4. 考察

今回の実験で、最初に得られた PLA 粒子には、サイズに大きな分布が見られたが、精製過程に改良を加えることにより、サイズ・形状を制御した PLA ナノ粒子の作製に成功した。得られた PLA ナノ粒子の生体への影響を検討するため、HeLa 細胞へと曝露したところ、細胞活性の低下は認められなかった。同条件下で酸化銅ナノ粒子を曝露した場合、低濃度(1 ppm)においても活性の低下が見られ、その後も酸化銅粒子濃度の増加(10, 20 ppm)に伴い、細胞活性の低下が見られた。一方、PLA ナノ粒子を暴露した場合、濃度が 20 ppm に達しても、活性の低下は認められなかった。また、ナノ粒子曝露下での細胞挙動の動的観察から、細胞が仮足を伸ばし、周囲の PLA ナノ粒子へと接触・捕捉しており、その状況下においても盛んに細胞分裂している様子が確認された。これらの挙動は観察開始直後(図 4a)から観察終了時(図 4b)まで、ほぼ同一で、顕著な変化は認められなかった。一方、酸化銅粒子曝露下では粒子と接触した細胞は、活性の低下と細胞死に至るという報告がなされている⁴⁾。今回の用いた PLA ナノ粒子では、それら細胞活性低下を示す挙動は認められないため、PLA 粒子の高い生体適合性が示唆された。

今後の展望としては、PLA 粒子の生分解性を利用した薬剤の徐放についての検討が期待される。例えば、細胞

への影響が認められる薬剤を含有した PLA 粒子を作成し、time-lapse 観察などを用いた PLA 粒子の薬剤保持能と薬剤徐放能の検討が考えられる。また、これまでの研究⁵⁾で、蛍光色素含有 PLA マイクロ粒子(粒径: 1-5 μm)をマウス尾静脈より血中投与したところ、肺・脾臓への滞留が認められている。ドラッグキャリア等への応用を目指すためには、粒子径の違いが体内動態へとどのような効果を与えるのかを明らかにする必要もある。将来的には、今回の作成法を活用した、局所に薬剤を留め、持続的に薬物の効果を得ることができる製剤開発への展開が期待される。

5. 謝辞

本研究の蛍光 time-lapse 観察は、北海道大学ニコンイメージングセンターにて実施しました。同センターのご協力に感謝いたします。

6. 参考文献

- 1) Y. Ohya, K. Nagahama, *Drug Delivery System*, **23**, 618-626 (2008).
- 2) Y. Matsumura, *Jpn. J. Nat. Med. Serv.*, **57**, 289-298 (2003).
- 3) H. Shi, T. Zhang, (他1名), *J. Rare Earths*, **29**, 746-752 (2011).
- 4) N. Iwadera, S. Abe, (他3名), *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 374-378 (2013).
- 5) S. Abe, T. Kiba, (他10名), *J. Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **181**, 181-185 (2010).

蛍光特性を有する矯正歯科用ボンディング材の開発

43100027 黒田 悠介

指導教員：山方 秀一(歯科矯正学教室)

吉田 靖弘(生体材料工学教室)

キーワード：マルチブラケット装置、ボンディング材、エナメル質、蛍光、ランタノイド

1. 緒言

マルチブラケット装置撤去後の歯面残留ボンディング材の除去方法としては、回転切削器具を用いる削除がもっとも一般的である。しかし、透明ないし歯冠色に近似したボンディング材は視認性が低いため、不用意な切削操作はエッチングによって脆弱となったエナメル質を過度に損傷させる危険を伴う。このような背景から、エナメル質の保全に向けて、優れた蛍光特性を有するランタノイドイオンを応用するボンディング材の可視化を着想した。

ランタノイドとは $[Xe]4f^{0-14}5d^{0-1}6s^2$ で表わされる電子構造を持つ15個の元素群をいい、これらのイオンはN殻4f軌道の電子の遷移による蛍光特性を持つ。本来は禁制な4f-4f遷移を許容遷移にするには、酸化イットリウム(Y_2O_3)結晶などへの置換(ドーブ)が効果的であると知られている。ところが、ある結晶場へのランタノイドイオンのドーブ濃度には最適値が存在し、それを超えると発光効率の低下(濃度消光)が生じる¹⁾。

本研究の目的は、ランタノイドのうちユウロピウム(Eu)を用い、 Y_2O_3 結晶への最適ドーブ濃度を明らかにし、さらに、同微粒子を添加したMMA/PMMA系レジンの蛍光特性を評価することである。

2. 方法

1) Euドーブ Y_2O_3 ($Y_2O_3:Eu^{3+}$)微粒子の合成(均一沈殿法)

硝酸イットリウムと硝酸ユウロピウムをEu/Y比が1 mol%きざみで1-10 mol%となるよう調整して脱イオン水100 mlに溶解し、尿素溶液(2M/200ml)へ加えた後に97℃以上で90分間攪拌することでYおよびEuの塩基性炭酸塩の白色沈殿物を得た。これを十分に洗浄した後に大気中1, 100℃で1時間焼成し、 $Y_2O_3:Eu^{3+}$ 微粒子を得た。

2) $Y_2O_3:Eu^{3+}$ 微粒子の微細構造の解析

走査型顕微鏡(SEM)(S-4000, Hitachi, Tokyo, Japan)とX線回折装置(XRD)(Multi Flex/HS, Rigaku, Tokyo, Japan)を用い、 $Y_2O_3:Eu^{3+}$ 微粒子の微細構造の評価を行った。

3) 蛍光特性の評価

分光蛍光光度計(F-4010, Hitachi, Tokyo, Japan)を用い、 $Y_2O_3:Eu^{3+}$ 微粒子ならびに同微粒子を添加したMMA/PMMA系レジンの蛍光特性を評価した。なお、微粒子添加レジン試験片の作製については、一部(2, 4, 6, 8, 10 wt%)を微粒子で置換したPMMA粉末にMMAおよび重合開始剤(過酸化ベンゾイル)、還元剤(第3アミン)を粉液比(質量比)2.1:1となるように加え、これをエチレン・テトラフルオロエチレン共重合体(ETFE)シートを介してステンレス板で圧接(約2.8 kPa)したまま10分間静置した後に取り出し、電気炉(大気中60℃・1時間)に静置することで残留モノマーを除去するという手順で行った。

3. 結果

SEM観察の結果から、ドーブ濃度によらず概ね形状の揃った粒径200-300 nmの球状微粒子を得られたことがわかった(図1)。また、X線回折の結果から、どのピークにも低角側へのシフトは認められず、すべて酸化イットリウムの結晶構造を持つことが明らかとなった(図2)。

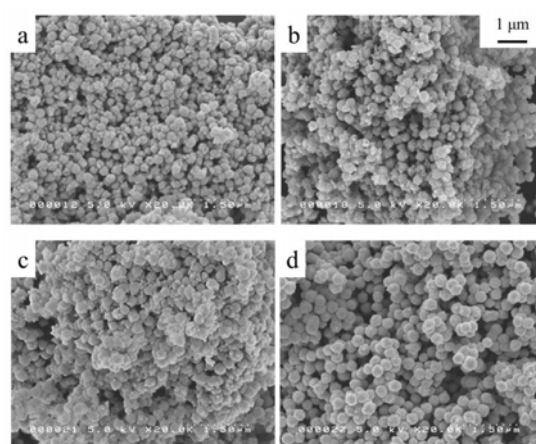


図1 $Y_2O_3:Eu^{3+}$ 微粒子のSEM像

a) 4 mol%, b) 6 mol%, c) 8 mol%, d) 10 mol%

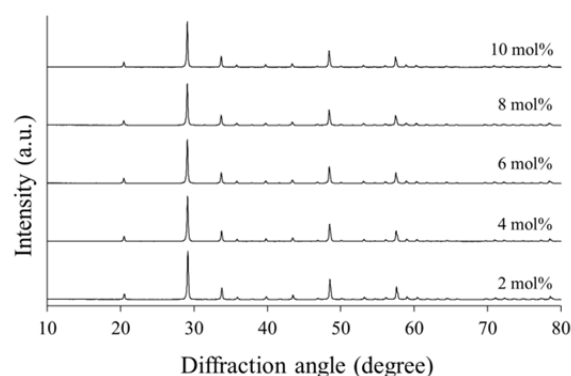


図2 $Y_2O_3:Eu^{3+}$ 微粒子のXRDチャート

図3はEu/Y比2, 4, 6, 8, 10 mol%微粒子の蛍光スペクトル(励起光: 396 nm)を重ねて示したものである。これより、ドーブ濃度によらず611 nmに鋭いピークが現れ、その強度は8 mol%まではドーブ濃度依存的に高くなることが確認された。この結果に基づき、本研究では以降の実験にはEu/Y比9 mol%の微粒子を用いることとした。

9 mol%微粒子の励起および蛍光スペクトルから、励起および蛍光の極大波長は、それぞれEu³⁺固有のエネルギー遷移⁷F₀→⁵L₆および⁵D₀→⁷F₂を表す396 nmおよび611 nmに認められることが明らかとなった(図4)。

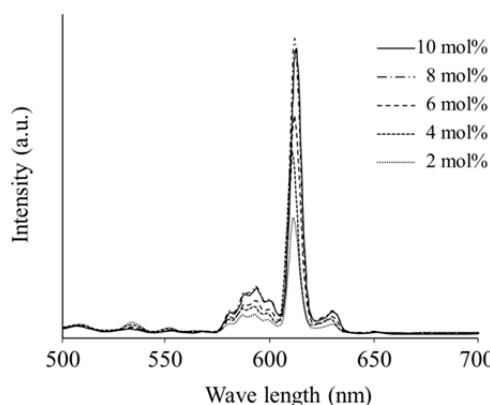


図3 各ドーブ濃度のY₂O₃:Eu³⁺微粒子の蛍光スペクトル

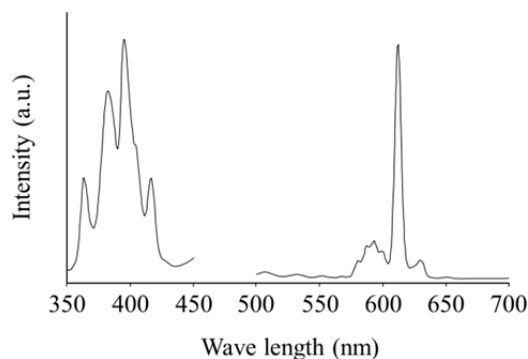


図4 Y₂O₃:Eu³⁺微粒子(9 mol%)の励起・蛍光スペクトル

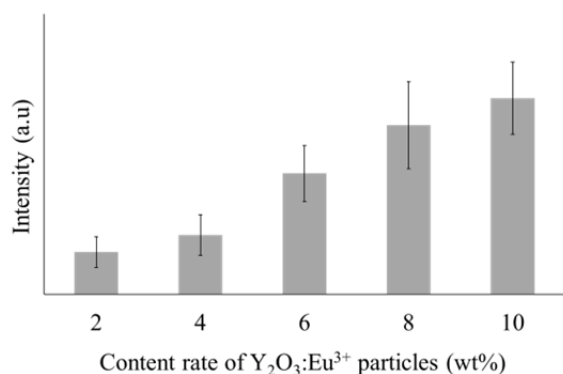


図5 Y₂O₃:Eu³⁺微粒子添加MMA/PMMAレジンの蛍光強度

Y₂O₃:Eu³⁺微粒子を添加したMMA/PMMAレジンの蛍光強度の添加率依存性を示すグラフから、蛍光強度は概ね微粒子含有率に比例して高くなることが確認できた(図5)。

4. 考察

ランタノイドイオンの蛍光は、有機蛍光色素のそれよりも輝度・単色性が高く、励起光と色の差(ストークスシフト)が大きい。これらの性質は、蛍光特性を有する矯正歯科用ボンディング材の開発にとって意義が高い。

近年、Y₂O₃:Eu³⁺微粒子の発光効率を高めるために様々な合成法が試みられており²⁾、最適ドーブ濃度を直接的に比較することは難しい。実際、2-12 mol%と幅広い結果が報告されており^{1, 3)}、一定の見解は得られていない。本研究に用いた合成法で8 mol%までの効果的なドーブが可能であった理由としては、第一に、合成した微粒子のXRDピークに低角側へのシフトが認められなかったこと(図2)から、同法はEu³⁺をY₂O₃結晶に固溶させるのではなく、Y₂O₃結晶格子の酸素空孔に置換させやすかったのだと考えられる。第二に、本来禁制遷移である⁵D₀→⁷F₂による蛍光がもっとも強く現れたこと(図3, 4)から、Eu³⁺はY₂O₃結晶内で反転対称性を持つC_{3i}格子よりも反転対称性を持たないC₂格子に順当に置換されたと推測するのが妥当である。

Y₂O₃:Eu³⁺微粒子を添加したMMA/PMMAレジンの蛍光強度は、微粒子単体のそれに比して微弱であった。これは、同試料からの蛍光の量子収率が、散乱や再吸収、エネルギーの内部転換などにより減弱したためであると考えられる。このことについては、微粒子の蛍光強度の向上やレジン内における微粒子の分散制御などが解決すべき今後の課題になると考えている。

5. 参考文献

- 1) Atabaev TSh, Kim HK (1 other author), Submicron Y₂O₃ particles codoped with Eu and Tb ions: Size controlled synthesis and tuning the luminescence emission, J Colloid Interf Sci 373, 14-19, 2012
- 2) Moura AP, Oliveira LH (6 others), Photoluminescent properties of nanorods and nanoplates Y₂O₃:Eu³⁺, J Fluoresc 21, 1431-1438, 2011
- 3) Chong MK, Pita K (1 other author), Photoluminescence of Y₂O₃:Eu³⁺ thin film phosphors by sol-gel deposition and rapid thermal annealing, J Phys Chem Solids 66, 213-217, 2005

象牙質とレジンの化学的接着

43100037 相馬 靖

指導教員：吉田 靖弘（生体材料工学教室）

キーワード：樹脂含浸層, 象牙質, 接着, 機能性モノマー

1. 緒言

従来、歯質とレジンの接着メカニズムは歯質無機成分脱灰部にレジンが流れ込み、重合硬化して得られた樹脂含浸層による機械的結合として説明されてきた。しかし、加えて化学的結合も近年、再び注目を集めている。そこで化学的相互作用が歯質接着にどのような影響を与えるのかを明らかにし深く学ぶことを目的として研究実習を行った。

2. 方法

Japanese Dental Science Review(2012) 48, 141-152 に掲載されている吉田靖弘、井上哲の論文 “Chemical analyses in dental adhesive technology” を読みPower Point にまとめ、研究実習のグループ内にて発表を行った。

3. 結果

市販セルフエッチングシステムであるユニフィルボンド(GC)、クリアフィルライナーボンドII(クラレメディカル)、クリアフィルメガボンド(クラレメディカル)にそれぞれ含まれる機能性モノマー、4-MET、Phenyl-P およびMDPを用いて接着特性を比較した。

1) アパタイトとの化学的結合能

X線光電子分光法によるワイドスキャンを行い、アパタイト表面に化学的に吸着した機能性モノマーの分子中の炭素原子数を比較したところ、MDP > 4-MET > Phenyl-P ということが明らかとなった。これはMDPが最も化学的結合能に優れていることを示している。

2) 接着耐久性

5℃と55℃に60秒間ずつ交互に浸漬するのを1サイクルとし、10000、20000、30000、50000および100000回サーマルサイクル負荷を行った後に、微小引張り接着試験で試料の劣化を比較した。その結果、接着耐久性もクリアフィルメガボンド > ユニフィルボンド > クリアフィルライナーボンドII の順となり化学的結合能に優れた機能性モノマーを含有する接着システムほど長期安定性に優れているということが示唆される。

4. 考察

1) Phenyl-P

図aのように2番目のステップとしてカルシウムと結合した分子が解離し、溶液内に素早く拡散する。反応が進むとコラーゲン線維の周囲を保護するアパタイトがすべて溶解され、線維がむき出しとなる。

2) 4-MET

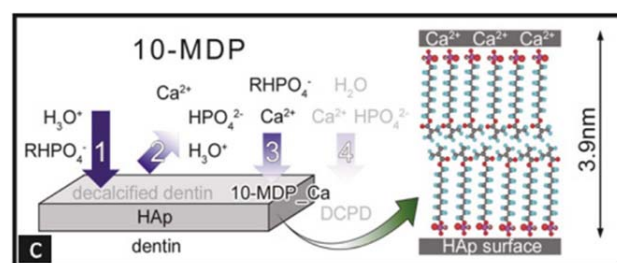
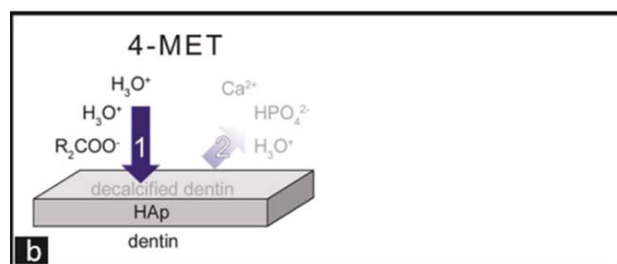
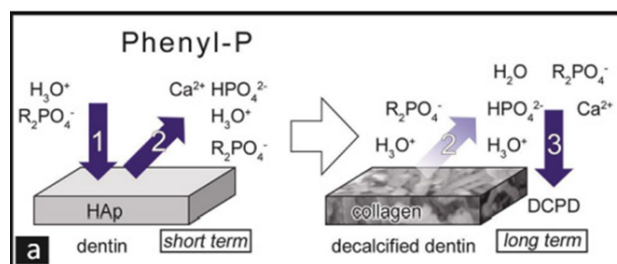
脱灰能が低いためコラーゲン線維周囲のアパタイトを完全には脱灰しない(図b)。4-MET含有のユニフィルボンド

はPhenyl-Pのようにコラーゲン線維をむき出しにしないためクリアフィルライナーボンドIIよりは耐久性に優れていたと考えられる。

3) MDP

まずアパタイトと反応し、カルシウム塩を形成したMDPはほとんど溶けずにその部位にとどまる(図c)。すなわちアパタイトは完全に脱灰されず、さらにMDP分子内は親水性部分と疎水性部分とに分かれているため、アパタイトに吸着したMDPに反対方向を向く形でMDPのカルシウム塩が集まり、MDP2分子が重なった層状構造物を形成する。この疎水性の構造物がアパタイトの保護膜となり、耐久性が向上したものと考えられる。

以上のように機能性モノマーとアパタイトとの化学的相互作用により樹脂含浸層の形態は大きく変化し、これが接着耐久性や修復物辺縁の封鎖性にも大きく影響することが示唆された。



5. 参考文献

- 1) 吉田靖弘, Adhes Dent Vol.28 No.1 2010 歯質接における化学分析の応用
- 2) 吉田靖弘, 歯界展望別冊 歯質への化学的接着を科学する 医歯薬出版株式会社 2006

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

43100048 藤田裕允

指導教官：八若保孝（小児・障害者歯科学）

吉田靖弘（生体材料工学）

緒言

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拡散をさせることにより、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) 水酸化カルシウム剤による塩基性の象牙質内への拡散を評価した。

材料と方法

1) 根管洗浄方法の検討

抜去歯20 歯のヒト永久歯(単根・単根管)をK ファイルで #80 まで根管拡大・根管形成を行い、4 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% H_2O_2 使用)

G2: 5%NaOCl(超音波洗浄)→※ (※は交互洗浄)

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、U ファイルを装着した Osada ENAC 10W を power1 で使用した。超音波洗浄は、根管内に薬液を満たした状態で、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、象牙細管の開口率を数値化した。

2) 水酸化カルシウム剤の象牙質内拡散評価

12 歯を各 G1 と G5 の洗浄方法で洗浄した後、歯根表面中央部に人工的に吸収窩を 2 か所形成した。6 歯ずつ 2 グループに分け、根管内に水酸化カルシウム剤 (カルシペックス II) を根管充填した。この試料を 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。肉眼での観察により、吸収窩内に赤色が見られないものを (-)、吸収窩表面に赤色が見られるものを (+)、吸収窩外まで赤色が見られるものを (++) として評価した。4 週後試料を取り出して切断し、象牙質内の吸収窩方向への塩基性の拡散を計測し

比較した。計測方法には、根管から吸収窩までの距離 (d_0)

と染色された距離 (d) の比 (赤変長比 d/d_0) 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 観察から、G1、G2 では象牙細管はあまり開口認められなかったが、G3、G4、G5 では多くの象牙細管の開口が認められた (図 2)。

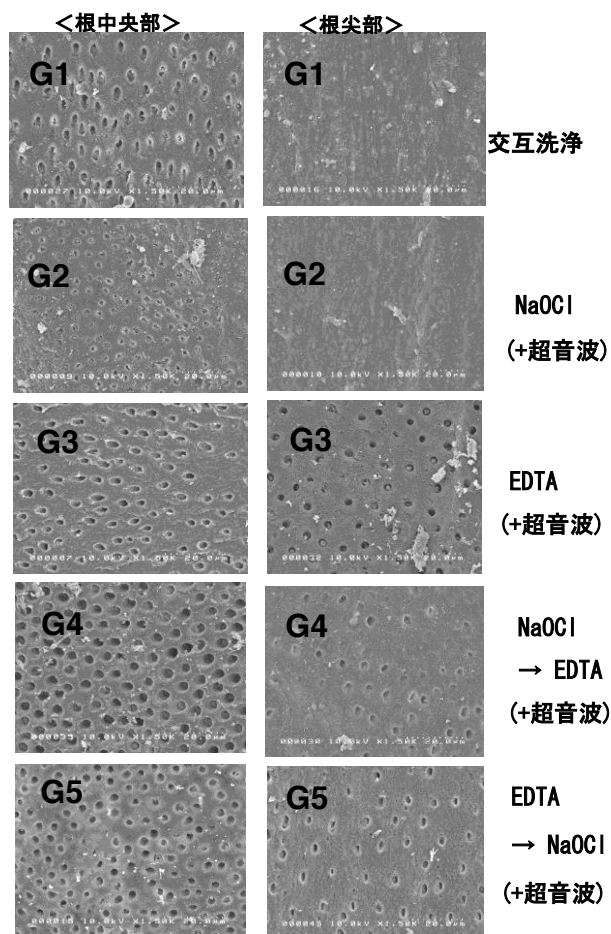


図 2 各洗浄処理後の根管壁の SEM 観察

全ての洗浄条件において、根尖部より根中央部で開口率は高く、EDTA 使用の有無により根中央部で 40%以上の差を示した(図 3)。

2) 水酸化カルシウム剤の象牙質内拡散評価

切断前の肉眼所見では G1 ではすべての試料で塩基性の拡散は確認できなかったが、G5 では根外への赤色拡散が確認できた。(図 4、5)。

切断後の評価では、G1 は平均で吸収窩の 47%の距離まで塩基性の拡散が見られたが、G5 では吸収窩まで塩基性の拡散が見られるものも多く、平均で 87%の拡散が見られた(図 4、6)。

考 察

根管洗浄において、EDTA もしくは 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。これは、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。またサンプル数が少ないことから G3, G4, G5 の開口率の差についての言及はできなかった。

塩基性拡散の観察において、G1 と比較し G5 で塩基性の拡散率が高いことが示された。これはスメア層が G5 で効率的に除去され、象牙細管が多く開口したため、水酸化カルシウムの拡散範囲が大きくなったと考えられる。このように EDTA と NaOCl を使用した超音波洗浄により象牙細管の開口率は増加し、水酸化カルシウム製剤の根外表面への拡散が示され、歯根吸収の抑制効果が期待できる。

結 論

1. EDTA、NaOCl、超音波洗浄を併用する洗浄方法は、スメア層除去に効果があると考えられた。
2. スメア層の除去により水酸化カルシウム剤の塩基性が吸収窩表層まで効率的よく到達することができる。これにより、酸性になった吸収窩において、中和作用により、歯根吸収抑制効果が期待できると考えられた。

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

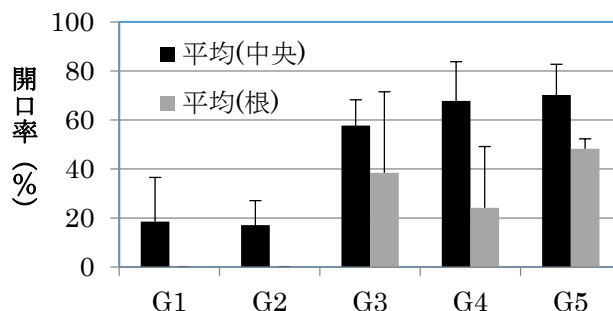


図 3 各洗浄方法での象牙細管開口率(%)

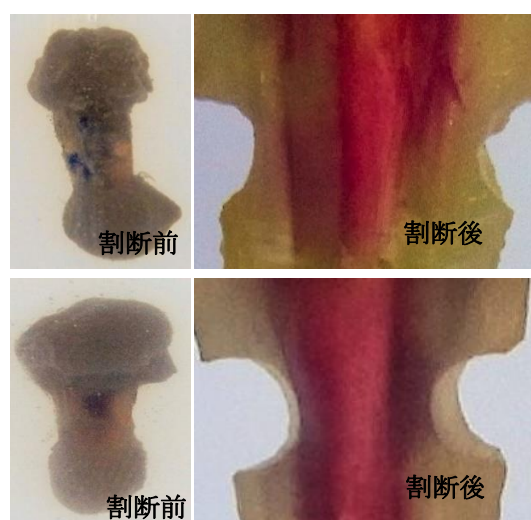


図 4 各洗浄方法での象牙質内の塩基性拡散状態

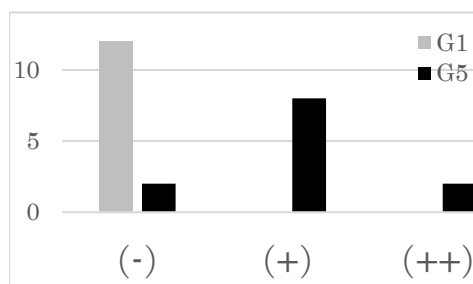


図 5 各洗浄方法での吸収窩赤色変化

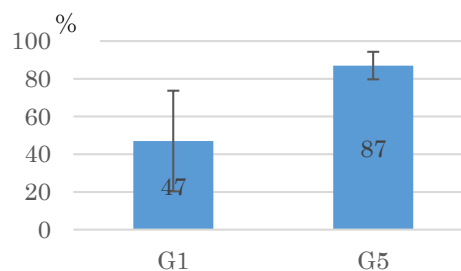


図 6 各洗浄方法での象牙質内の塩基拡散距離

ドラッグデリバリーキャリアを目指した蛍光性多孔質ナノシリカの作成

43100055 森本 紫之

指導教員：阿部 薫明（生体材料工学教室）

キーワード：蛍光性多孔質ナノ粒子，薬剤担体，薬剤徐法

1. 緒言

無数の細孔を持ちスポンジ状の構造からなる多孔質材料は、体積当たりの表面積が大きいことや、細孔サイズの制御が可能なことから、高い化学反応効率やサイズ認識能を示し、化学物質吸着材料や水素ガスなどの吸蔵材料、熱交換材料や薬剤担体などへの応用が期待されている。本研究では界面活性剤によるミセル形成に基づいたテンプレート法を用いて、多孔質シリカナノ粒子の作製を行った。粒子の生体内での追跡を可能にするため、優れた発光特性を持つ事が知られているユーロピウム(Eu)の導入を試みた。更に、得られたシリカナノ粒子の細胞への影響や取り込みの有無について検討した。

2. 方法

実験材料：

界面活性剤 (CTAB)、ガラス化試薬 (TEOS)、2.0 M 水酸化ナトリウム水溶液、 $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$

実験方法：

0.5 g の CTAB を蒸留水 120 mL に溶解した。2.0 M 水酸化ナトリウム水溶液 1.75 mL を加え、80℃ で 30 分還流後、更に TEOS 2.75 mL、 $\text{EuCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.11 g を加え 80℃ で 2 時間還流を行った¹⁾。濾過、洗浄、減圧乾燥の後、550℃ で 4 時間焼成を行い、白色粉末を得た。得られた粒子の形状観察には、走査型電子顕微鏡 (SEM: Hitachi S-4000)、元素分析には SEM-EDS (Genesis EDAX Japan) を用い、また紫外光照射により粒子の発光特性の確認を行った。細胞への影響を確認するために、得られた粒子を HeLa 細胞へと暴露した。10%FBS 含有 D-MEM 培地を用い、37℃、5% CO_2 雰囲気下で培養を行った。各種濃度でナノ粒子を暴露した後、CellTiterGlo (Promega) を用いて、24 時間後の細胞活性を評価した。また粒子暴露下での細胞の動的挙動を確認するため、24 時間の time-lapse 観察²⁾ (Nikon, Ti-E, 対物レンズ x40) を、粒子の細胞への取り込みを確認するために、レーザー共焦点顕微鏡観察³⁾ (Nikon, Ti-A1, 対物レンズ x60, 励起波長：477 nm) を行った。

3. 結果

SEM 観察(図 1)から、粒径 100~200nm 程のナノ粒子の生成が確認され、図 2 に示す元素分析の結果より、ケイ素(Si)、酸素(O) のピークの他にユーロピウム(Eu)のピークが観察されたことから、シリカ(二酸化ケイ素)への Eu の導入が確認された。また、紫外光照射下では

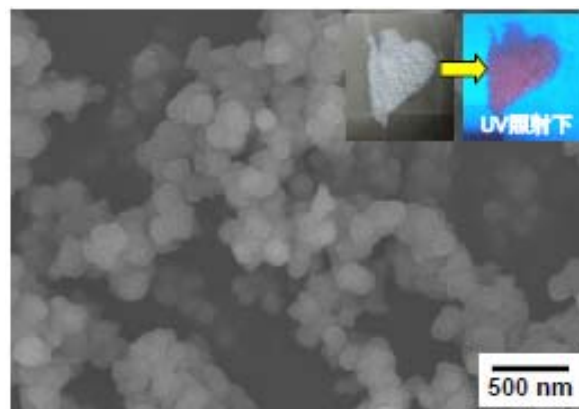


図 1：シリカナノ粒子の SEM 像(挿入：紫外光照射による Eu 含有シリカナノ粒子の発光)

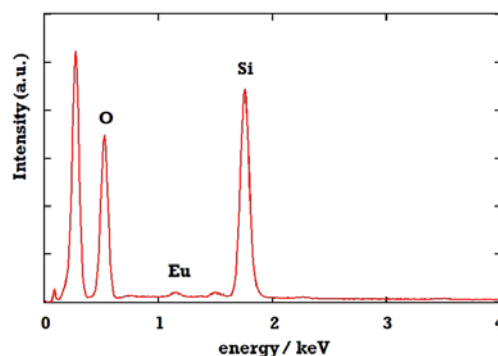


図 2：Eu 含有シリカナノ粒子の EDS スペクトル

Eu 錯体に特徴的な赤色の発光が観察された(図 1、挿入図)。得られたシリカナノ粒子の細胞への影響を検討するため、様々な濃度で HeLa 細胞へと曝露した。その結果を図 3 に示す。酸化銅ナノ粒子曝露下では低濃度から細胞活性の低下が確認されたが、シリカナノ粒子の場合には 20 ppm まで濃度を上昇させても、細胞活性への影響は見られなかった。シリカナノ粒子曝露下 (10 ppm) で、time-lapse 観察を行ったところ、細胞がシリカナノ粒子を捕捉し、盛んに細胞分裂している様子が観察された。また、レーザー共焦点顕微鏡観察から、補足した粒子が細胞内に取り込まれていることが示された(図 4)。

4. 考察

本実験にて、発光特性を持つ粒子径 100~200nm 程のシリカナノ粒子を作成することに成功した。HeLa 細胞の

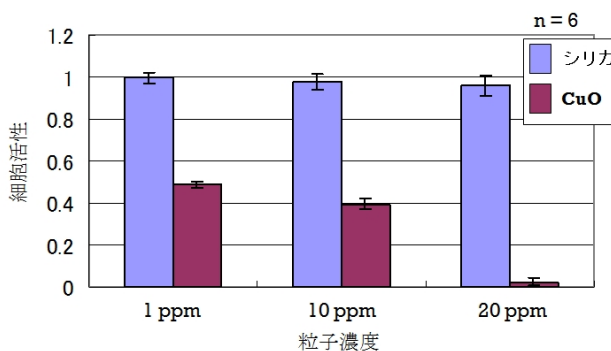
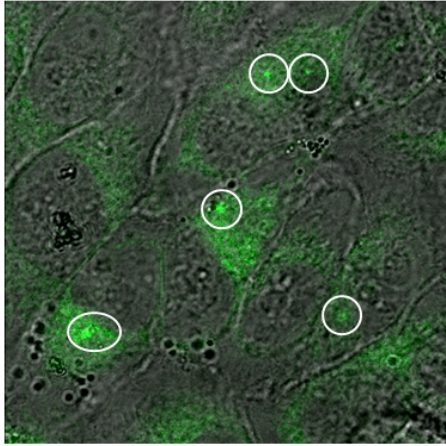


図 3：シリカナノ粒子曝露下での細胞活性

透過+蛍光像



3D 蛍光像

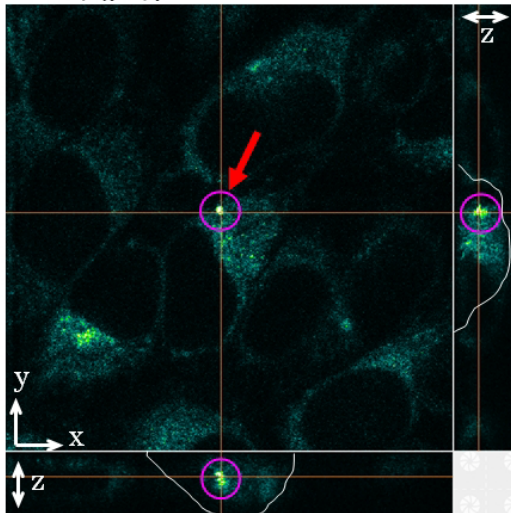


図4：シリカナノ粒子曝露下での HeLa 細胞の共焦点顕微鏡観察（上：微分干渉像+蛍光画像、下：共焦点 3 次元蛍光像）

細胞表面に付着・集積されているのかの判断がつかなかったが、本実験で発光特性を持つ粒子を作成したことにより、細胞内への取り込みが確認された(図4下)。

本実験で作成したシリカナノ粒子は、1) 生体内でも検出可能な発光特性、2) 高い細胞適合性、3) 細胞への取り込み、といった特性を示した。更に本研究では実証する事が出来なかったが、本方法で作成したシリカナノ粒子は多孔質構造を持つ事が知られており、その空孔を利用した薬剤の保持・徐放機能を持つドラッグキャリアなどバイオ分野への展開が期待される。

5. 謝辞

本研究のレーザー共焦点顕微鏡観察および time-lapse 観察は、北海道大学ニコンイメージングセンターにて実施しました。同センターのご協力に感謝いたします。

[参考文献]

- 1) H. Shi, T. Zhang, (他1名), *J. Rare Earths*, **29**, 746752 (2011).
- 2) N. Iwadera, S. Abe, (他3名) *Key Eng. Mater.*, **529-530**, 374-378 (2013).
- 3) E. Seitoku, S. Abe, (他3名), *J. Nanosci. Nanotechnol.*, (in press).

活性測定からは、シリカナノ粒子の曝露による細胞活性への影響は確認されなかった。ネガティブコントロールとして酸化銅ナノ粒子を曝露した場合、低濃度(1 ppm)においても活性の低下が見られ、その後も酸化銅粒子濃度の増加(10, 20 ppm)に伴い、細胞活性の低下が見られた。一方、シリカナノ粒子を暴露した場合、濃度が 20 ppm に達しても、活性の低下は認められなかった。また、ナノ粒子曝露下での細胞挙動の動的観察から、細胞が周囲のシリカナノ粒子を捕捉しており、その状況下においても盛んに細胞分裂している様子が確認された。その際、一部の粒子は細胞内に取り込まれていることが、レーザー共焦点顕微鏡観察から明らかにされた。これらの結果から、今回作成したシリカナノ粒子は高濃度で曝露しても、細胞への顕著な影響は見られず、高い生体適合性を持つ事が示唆された。また、通常の光学顕微鏡観察(図4上)、および SEM や原子間力顕微鏡 (AFM) 観察からでは、捕捉された粒子が細胞内に取り込まれたのか、それとも

レジンマイクロナノパターンと細胞接着挙動

43100058 山田 恭子

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：レジン、マイクロナノパターン

1. 緒言

マイクロナノパターンとはマイクロナノ構造を材料に転写し表面加工したものの総称である。また、マイクロナノパターンなどメカニカルストレスは細胞骨格を伸展させるなど細胞形態に影響を与えることや、材料の表面性状は細胞の接着挙動に影響を与えることが知られている。そこで、本研究ではマイクロナノパターンを比較的簡単に作製可能な歯科材料であるコンポジットレジンを用いてマイクロナノパターンを作製した。続いて、レジンパターンにおける接触角、細胞の接着性、配向性を評価することで、細胞の接着挙動が制御可能である材料の表面性状を検討した。

2. 方法

熱ナノインプリント法を用いてPETフィルムにグループパターンを転写し、さらにPETフィルムパターンからコンポジットレジンに転写することで、レジンによるグループパターンを得た。グループパターンと平面レジンにおける接触角を評価後、パターン上にヒト歯肉線維芽細胞を播種し、1時間後にグルタル固定後、細胞数を測定、走査型電子顕微鏡（SEM）による観察を行った。

次にグループパターン上にウシ胎児血清（10%FBS）、接着タンパクであるフィブロネクチン（Fn）、ブロッッキング材として使用されているアルブミン（BSA）の3種類の表面コート処理を施し、コントロールである表面コート処理なしを合わせた4種類のパターンとした。続いて、ヒト歯肉線維芽細胞を播種し、それぞれの光学顕微鏡写真から細胞配向性を計測比較した。

3. 結果

パターンにおける接触角および細胞接着試験の結果（図1）、平面レジンは濡れにくい表面性状であり付着細胞数は少ないのに対し、グループパターンは濡れ易く付着細胞数は多かった。このことは、濡れ易い表面性状は付着細胞数を増加させる傾向にあることを示している。

SEM観察の結果（図2）、平面レジンの場合、細胞は丸い形状が観察された。一方、グループパターンの場合、グループに沿った伸長形状が観察された。

配向性試験の結果（図3）、表面コート処理なし、10%FBS、Fn処理の場合のいずれも細胞はグループに沿った配向が観察された。特に10%FBS、Fn処理では光学顕微鏡写真からも細胞が縦長にグループに沿って伸長する様子が観察された。一方、BSA処理の場合ではグループ沿うような配向性は認められず、付着細胞数は少なく、丸い形態が観察された。

4. 考察

グループパターン付与によりパターンの濡れ性は向上、細胞形態は伸長、付着細胞数は増加したことから、マイクロナノパターン化は細胞接着挙動を変化させると考えられる。また、同じグループパターン上においても表面コート処理の違いにより、細胞接着性、配向性はさらに変化する。このことから、細胞接着挙動には、材料のパターンのみならず、材料の材質も大きく関わっていると推察される。

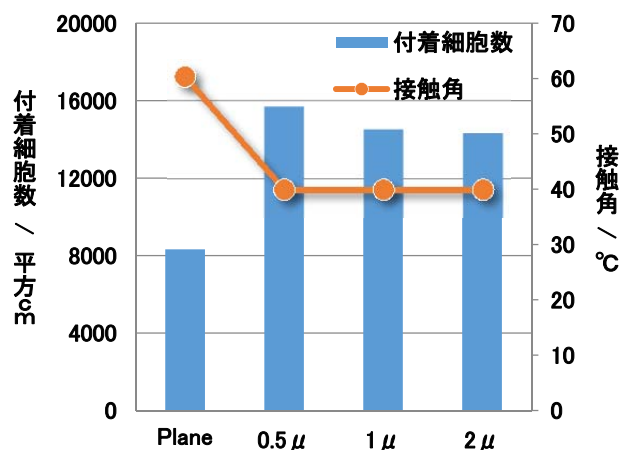


図1. 付着細胞数と接触角の比較

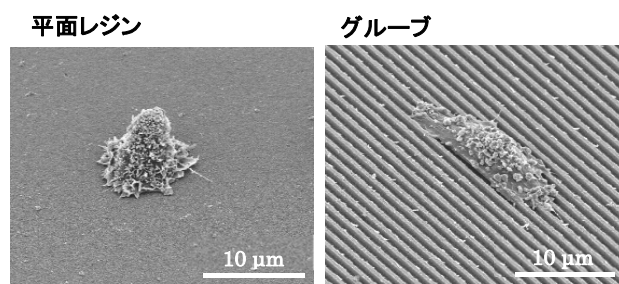


図2. 細胞接着試験後のSEM像

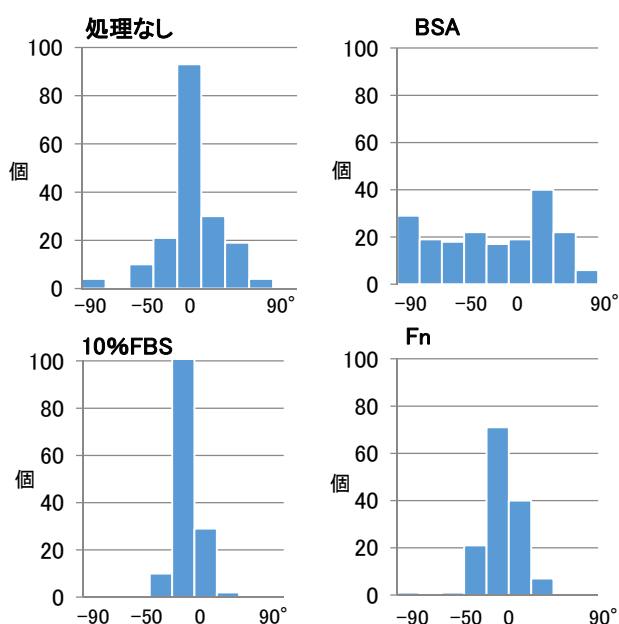


図3. 細胞配向性試験の結果

パターン化コラーゲンフィルム作製時の条件について

43100060 脇 宗陸

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：コラーゲンフィルム

1. 緒言

昨年度の研究実習において、マイクロ・ナノパターン化コラーゲンフィルムの作製を検討した。本年度、引き続き、フィルムの耐水性和変形を評価した。昨年度、フィルム作製に際しての加熱時間を変化させ、吸水によるフィルムの膨張率の比較をすることで、作製に最適な加熱時間の検討は行われていたが、加熱時間以外の条件に関しては検討されていなかった。よって、本研究では、パターン化フィルム作製時の①加熱時間、②添加コラーゲン溶液量、③加熱温度、作製したフィルムの④浸漬時間を因子として、作製したフィルムの水に浸漬時の変化量を検討することとした。各条件下において吸水による変化量を比較することでフィルム作製に最適な条件を見出すことを目的とした。

2. 方法

実験に使用した材料を以下に示す。マイクロ・ナノモールド（協同インターナショナル 型番：DTM2-3）、PET フィルム（緑川化成工業 G-PET）、コラーゲン（SHIGMA-ALDRICH Gelatin from porcine skin）

実験手順を以下に示す。（1）PET フィルムにマイクロ・ナノモールドを圧接し、PET フィルムにマイクロ・ナノパターンを付与した。（2）10%コラーゲン溶液の任意量をPET フィルム上へ滴下し、乾燥させ、パターン化コラーゲンフィルムを作製した。

（3）コラーゲンフィルムを設定した温度・時間にて加熱した。

（4）シャーレ上で蒸留水に浸漬し、一定時間後に取り出し、吸水しによるフィルムの線膨張の変化量(mm)を測定した。

各設定条件を以下に示す。

①コラーゲン液量：150 μ l、250 μ l、500 μ l、1000 μ l

（加熱温度：200℃、加熱時間：1時間、浸漬：15分）

②加熱時間：5分、15分、30分、1時間、2時間

（液量：250 μ l、加熱温度：200℃、浸漬：15分）

③加熱温度(1時間)：150℃、175℃、200℃

（液量：250 μ l、加熱時間：1時間、浸漬：15分）

④浸漬時間：5分、10分、15分、30分、1時間、2時間

（液量：250 μ l、加熱温度：200℃、加熱時間：1時間）

3. 結果

【検討条件①】：コラーゲン添加量

フィルムを作製する際のコラーゲン溶液添加量150 μ l、250 μ l、500 μ l、1000 μ lの全てにおいて、浸漬による変化量はほぼ1mmとなった。しかしながら、150 μ lで作製したフィルムでは、浸漬後にフィルム表面に微細なしわが観察された。また500 μ lと1000 μ lではフィルム辺縁の変形が生じた。一方で、250 μ lでは、

しわや変形は見られなかった。

【検討条件②】：フィルム加熱時間

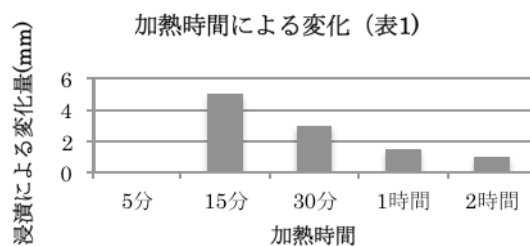


図1 フィルム寸法変化に対する加熱時間の影響

フィルム加熱時間5分では、浸漬中に溶解した為、計測不能となった。また、加熱時間2時間では、加熱前は淡黄色であったフィルムが褐色に変色した。

【検討条件③】：フィルム加熱温度

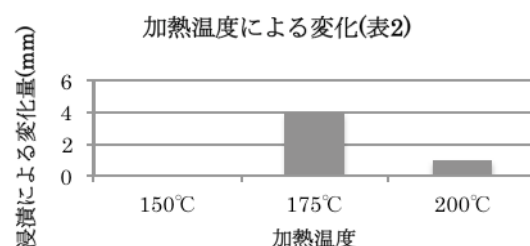


図2 フィルム寸法変化に対する加熱温度の影響

フィルム加熱温度150℃の条件では、浸漬中に溶解した為、計測不能となった。また、加熱によりほぼ透明だったフィルムは175℃で淡黄色となり、200℃で淡褐色となった。

【検討条件④】：浸漬時間

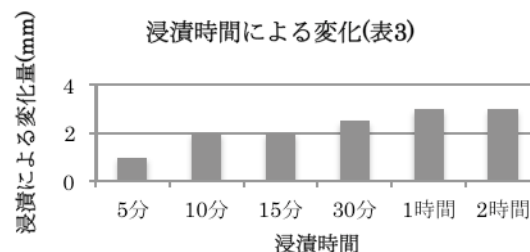


図3 フィルム寸法変化に対する浸漬時間の影響

フィルム浸漬時間は、約30分で安定した。

4. 考察

条件①②③の結果から、作製に適した条件は、液量250 μ l、加熱温度200℃、加熱時間1時間であると考えられる。先行研究において、3時間以上の加熱はフィルムの割れが生じ、加熱は200℃で2時間程度が良いという結果が示されており、条件②③による結果（表1、2）と相同性が見られた。加熱温度と加熱時間はコラーゲンの架橋に関与しており、コラーゲンフィルムの安定性に重要であるが、今回の研究ではコラーゲンフィルムの作製手法を習得するのに時間を要し、十分な試行回数が得られなかった。

今後、実験条件を再度検討した上で、試行回数を増やし、コラーゲンフィルム作製に適した条件に関するデータの精度を高めて行きたいと思う。

骨肉腫細胞における腫瘍溶解アデノウイルスの効果

43100003 浅川寛

指導教員：東野史裕、三河洋平（口腔病理病態学教室）

キーワード：骨肉腫、腫瘍溶解、アデノウイルス

1. 緒言

一般に骨肉腫細胞において、腫瘍溶解アデノウイルスは増殖しにくいといわれている。そこで我々は、口腔病理病態学教室で開発された腫瘍溶解アデノウイルス Ad Δ E4 を、すでに臨床応用されている dl1520 と比較することにより、Ad Δ E4 が骨肉腫細胞においてどれだけ増殖能と腫瘍溶解能を持つかを検討した。

2. 方法

【材料】

U2OS(骨肉腫細胞)

Ad Δ E4

dl1520

【実験方法】

骨肉腫細胞 U2OS を 12 穴プレートで培養し、Ad Δ E4 と dl1520 のそれぞれを MOI 1 で感染させてウイルス生産効率(titer)測定を行った。

次に U2OS を 96 穴プレートで培養し、Ad Δ E4 と dl1520 をそれぞれ MOI 1, 10, 100 で感染させて 1, 3, 5 日目に XTT Assay を行い、細胞死を検討した。

3. 結果

それぞれのウイルスを U2OS に MOI 1 で感染させて行った titer 測定の結果(図 1)と、それぞれの MOI 1, 10, 100 で U2OS に感染させ、1, 3, 5 日目に行った XTT Assay の結果(図 2, 図 3)を示す。

titer の値は、Ad Δ E4 の方が 500 倍程度高かった。また、dl1520 では MOI 1, 10, 100 とも細胞死活性は見られなかったが、Ad Δ E4 では MOI 100 で 5 日目において有意な細胞死活性が現れた。

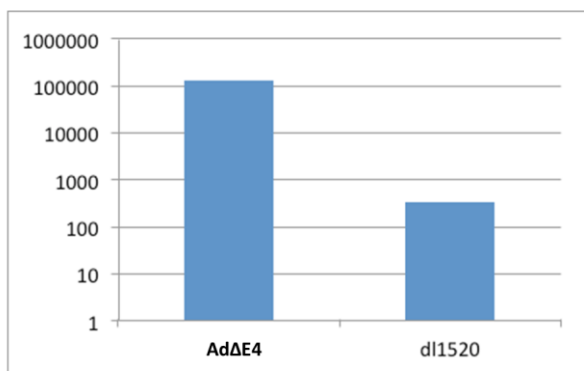


図 1 titer の値

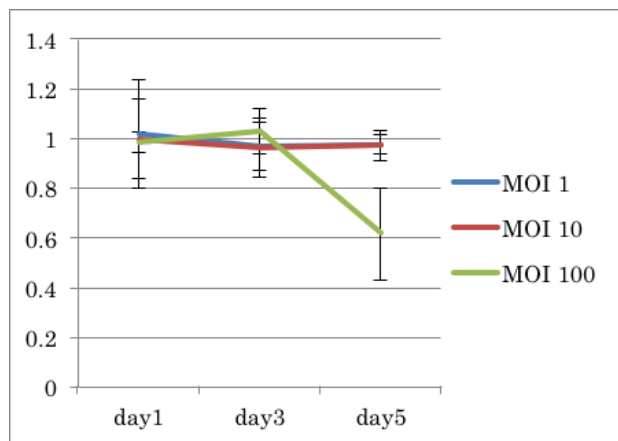


図 2 Ad Δ E4 の XTT Assay の結果

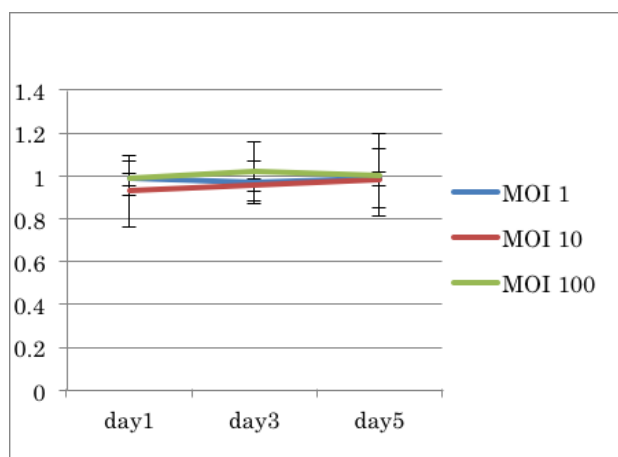


図 3 dl1520 の XTT Assay の結果

4. 考察

上記結果より、骨肉腫細胞において dl1520 よりも Ad Δ E4 の方が増殖能が高く、腫瘍細胞の溶解能も高いことが明らかとなった。よって、臨床応用した際の治療効果も従来の腫瘍溶解ウイルスより高いことが期待できる。

5. 謝辞

本研究を行うに当たり、多大なご支援、ご協力をいただ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。

シスプラチンと腫瘍溶解ウイルスの併用効果 I

43100004 天野利香

指導教員 東野史裕、稗田敏雄

(口腔病理病態学教室)

キーワード：シスプラチン、腫瘍溶解ウイルス

1. 緒言

腫瘍溶解ウイルスとは、正常な細胞に感染しても増殖することができず、何も影響しないが、がん細胞では増殖でき、その後がん細胞を融解する特徴を持つ。腫瘍細胞に感染後は細胞を破壊させるのみならず、放出された腫瘍溶解ウイルスが周辺のがん細胞にも新たに感染し、腫瘍全体を縮小することが期待できる。

一方、シスプラチン処理などがんの化学療法は現在までに有効な効果をもたらしてきたが、副作用もあり、できるだけ低濃度での使用が望まれる。本研究では、腫瘍溶解アデノウイルスとシスプラチンのがん細胞に対する併用効果を検討した。

2. 方法

材料：腫瘍溶解ウイルスである ARET、シスプラチン (CDDP)、子宮頸がん細胞 HeLa 細胞。方法：96Well dish に HeLa 細胞を播種し、培養させた。何も感染させていない系 (MOCK)、ウイルスを MOI 100 で感染させた系、CDDP (濃度 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$) のみ作用させた系、ウイルスと CDDP の濃度 $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ を併用させた系で 72 時間培養した。その後 MTS アッセイを行い、生細胞を検討した。

3. 結果

非感染実験系 (MOCK) の MTS アッセイの値を 100% とし、それぞれの実験系で生き残った細胞数を図 1 に示す。腫瘍溶解ウイルスとシスプラチン濃度 $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ を併用させたときは腫瘍溶

解ウイルス単独の場合や濃度 $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ の場合よりも細胞が死ぬことが明らかになった。

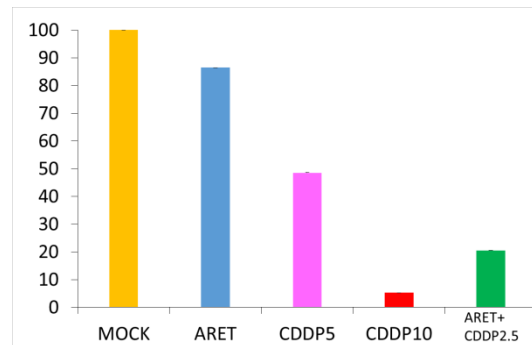


図 1

4. 考察

この結果は、ウイルス単独、シスプラチン単独よりもウイルスとシスプラチンを併用させたほうが細胞死活性が高いことを示しており、両者の併用効果が確認できたと言える。このことは腫瘍溶解ウイルスを用いることにより、シスプラチンなどの抗がん剤の量を減らすことが期待でき、その結果、抗がん剤に対する副作用を抑えられることを示唆している。今回の実験ではシスプラチン $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ と腫瘍溶解ウイルスの併用の実験のみ検討したが、他の濃度でも実験を行い、最適なシスプラチン濃度とウイルス量を今後も解析したい。

悪性度の異なるがん細胞に対する腫瘍溶解

ウイルスの効果 I

4 3 1 0 0 0 6 伊賀友哉

指導教員：指導教官 東野史裕 三河洋平

(口腔病理学教室)

キーワード：腫瘍溶解、アデノウイルス、悪性度

1. 緒言

腫瘍溶解ウイルスをがん細胞に感染させると、その細胞を融解し、その際放出された、ウイルスが周囲のがん細胞にも新たに感染し、そのがん細胞も融解する。また、腫瘍溶解ウイルスはがん細胞だけで増殖できるため、正常細胞にはなんの影響も与えないウイルスである。

我々は AU-rich element(ARE)を持つ mRNA の制御機構に注目した。ARE-mRNA は正常細胞では合成されると、すぐに分解されるが、がん細胞では ARE に HUR タンパクが結合し、ARE-mRNA が核外輸送され安定化される。本実験で用いた腫瘍溶解アデノウイルスである ARET は、アデノウイルスの増殖に必須の E1A 遺伝子領域に ARE を持つ。正常細胞では ARE-mRNA は分解されてしまうため E1A mRNA も分解され、ウイルスは増殖することができないが、がん細胞では ARE-mRNA は核外に輸送され、安定化されるため、E1A mRNA も安定化され、アデノウイルス増殖後細胞が融解される。

本研究では ARE-mRNA が通常のがん細胞に比べて、より安定化されている悪性度の高いがん細胞での ARET の生産を検討し、がんの悪性度とウイルス生産効率との関連を解析した。

2. 方法

12穴マイクロプレートをもちいて悪性度の高い乳がん細胞である MDAMB231 と悪性度の低い乳がん細胞である MCF7 をそれぞれ 5×10^4 個培養し、これに MOI100 で ARET を感染させ、72時間後それぞれの細胞から増殖した腫瘍溶解アデノウイルスを取り出した。取り出したウイルスをそれぞれ HEK293 に感染させ、72時間後、ウイルスタンパクの抗体で免疫染色することによりウイルス増殖を測定した。

3. 結果

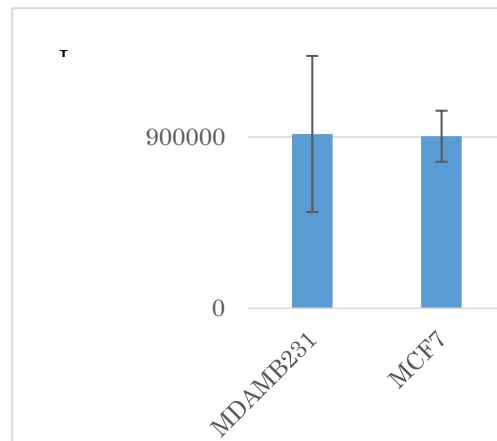


図1 ウイルス増殖の比較

悪性度の高いMDAMB231細胞と、悪性度の低いMCF7細胞で、ともに平均して 9×10^5 ifu/ml 程度のウイルス生産効率になり（図1）、ほとんどウイルス増殖には差が認められなかった。

4. 考察

今回は感染後72時間でウイルス増殖を検討したが、今後より長い感染時間で検討する必要がある。また、ウイルス増殖後の細胞死に対する影響はまだ解析されていないので、今後細胞死を検討する必要があり、今後の検討課題にしていきたい。

5 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お礼申し上げます。

悪性度の異なるがん細胞に対する腫瘍溶解ウイルスの効果Ⅱ

43100014 太田祐介

指導教官:東野史裕,三河洋平(口腔病理病態学教室)

キーワード:アデノウイルス、腫瘍溶解、悪性度

1. 緒言

今回我々が使用した腫瘍溶解アデノウイルス ARET はアデノウイルスの増殖に必須である E1A 遺伝子領域に、TNF 遺伝子の AU-rich element(ARE)をもつアデノウイルスである。正常細胞では E1A-ARE-mRNA が転写後すぐに分解され、腫瘍溶解アデノウイルスは増殖できない。一方、がん細胞においては、E1A-ARE-mRNA は核外へ輸送され、安定化されるため、ウイルスは増殖可能である。これまで、大多数のがん細胞では ARE-mRNA が核外輸送・安定化去ることが知られており、悪性度の高いがん細胞では、ARE-mRNA がより安定化されているという報告がある。

本研究では、腫瘍溶解アデノウイルスを用いて、悪性度の異なるがん細胞にウイルスを感染させ、ウイルスによる細胞死に差異がみられるかを検討した。

2. 方法

- 材料：MDA-MB-231(悪性度の高い乳がん細胞)
MCF-7(悪性度の低い乳がん細胞)
ARET(腫瘍溶解アデノウイルス)
- 実験：悪性度の異なる 2 つのがん細胞(MDA-MB-231、MCF-7)を 96 穴マイクロプレートで 3 日間培養した。その後、がん細胞 5×10^3 個に対して ARET を感染させ(MOCK・MOI100)、1 週間インキュベーターで培養した。XTT 標識混合液を作成し、これを各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ加え、4 時間インキュベーターで培養した。この実験系では、オレンジ色で水溶性のフォルマザン色素が形成されるので、マルチプレートリーダーで吸光度を測定し、細胞死を比較検討した。

3. 結果

コントロールの非感染細胞 (MOCK) では、ほとんど細胞死活性に差異はなかった。MOI の低い時には、同程度、もしくは、MCF-7 のほうが高い細胞死活性を示した

(data not shown)。一方、MOI100 で感染させた時には、悪性度の高い MDA-MB-231 細胞のほうが、悪性度の低い MCF-7 と比較してより多くの細胞死が認められた(図 1)。

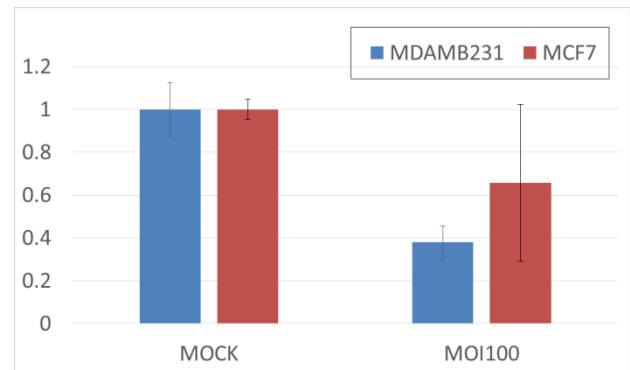


図 1 ARET による細胞死の比較

4. 考察

本研究の結果より、高い MOI の時には、悪性度の高いがん細胞のほうが、腫瘍溶解アデノウイルス感染による細胞死効率が低いことが明らかとなった。また、ウイルス産生効率は変化しないが、悪性度の高い細胞のほうが細胞死活性は高く、ウイルス産生と細胞死は必ずしも比例するわけではないということが分かった。

5. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力をいただ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。

シスプラチンと腫瘍溶解ウイルスの併用効果Ⅱ

43100015 大橋 雄高

指導教官：東野史裕 稗田敏雄（口腔病理病態学講座）

キーワード：腫瘍溶解ウイルス、シスプラチン、SAS 細胞、Cell Titer

【緒言】

腫瘍溶解ウイルスはがん細胞特異的に増殖し、その後細胞を破壊し、正常細胞ではほとんど増殖できず何の影響も与えないウイルスで、近年、新たながん治療法として脚光を浴びている。我々は、これまでにアデノウイルスの増殖に必須の遺伝子に改変を加えた腫瘍溶解ウイルス（ARET）を開発した。本研究では、口腔がん細胞を用いて、このウイルスが持つ抗がん剤との併用効果を解析した。

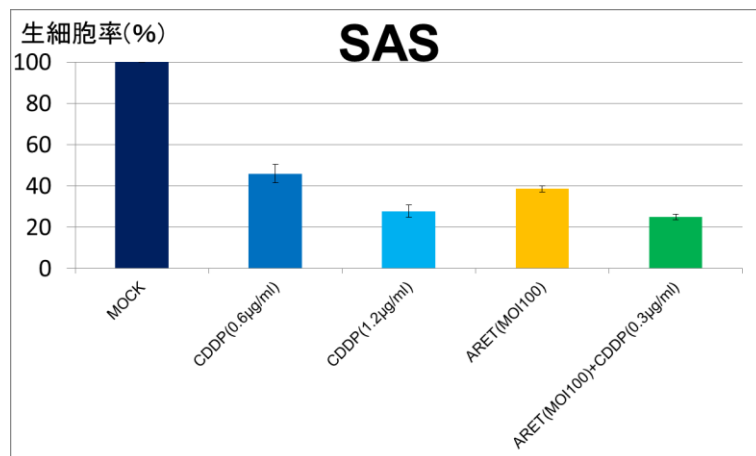
【材料と方法】

北海道大学歯学部口腔病理病態学教室所有の口腔扁平上皮がん細胞株(SAS)をダルベッコ改変イーグル培地（D-MEM）にて24時間培養した。このSAS細胞にMOI 100（一つの細胞にウイルス粒子百個が感染）となるように希釈した腫瘍溶解ウイルスを感染させ、72時間培養した。この腫瘍溶解ウイルス感染細胞に①薬を何も作用させてないコントロール群であるMOCK②シスプラチン0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用させた群③シスプラチンを1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用させた群④腫瘍溶解ウイルスのみ作用させた群⑤腫瘍溶解ウイルスとシスプラチン0.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用させた群に分けて培養を継続した。

これらの培養細胞を、生細胞数を測定する比色定量分析用試薬であるCellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assayを用いて生きている細胞を測定した。この試薬を用いると、生細胞によって培地に可溶な有色のホルマザン産物が産生されることを利用し、96ウェルプレートリーダーを用いて490 nmのホルマザン定量値が、培地中の生細胞数に比例することを利用して、培養細胞の生存率が測定できる。

【結果】

MOCK、腫瘍溶解ウイルス単独、シスプラチン単独、腫瘍溶解ウイルスとシスプラチン併用の五種類について検討したところ、腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンを併用したほうが腫瘍溶解ウイルス単独やシスプラチン単独と比べて、SAS細胞の生存率が低いことが分かった。



【考察】

本研究により、シスプラチン単独処理よりも、腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとの併用処理の方が、がん細胞死活性が高いことがわかった。また本研究で用いられている腫瘍溶解ウイルスはアデノウイルスを用いており、他大学で用いられているヒトヘルペスウイルスなどと比べて、副作用が少ないと考えられる。このことから、臨床において、腫瘍溶解ウイルスとシスプラチンとを併用することによって、シスプラチンの使用量を減らすことができ、シスプラチンによる副作用である嘔気、嘔吐、食欲不振、全身倦怠感、脱毛、腎臓機能障害を軽減させることができるため、癌治療完遂率の向上が期待できると考えられる。またシスプラチンなどの旧来の抗がん剤が効きにくい腫瘍に対しても、この腫瘍溶解ウイルスは効果が期待できる。

今後頭頸部癌の治療は放射線療法と抗がん剤の超選択的動脈注射による侵襲性の低い化学放射線療法が第一選択になっていくのではないかと考えられる。そのときに本腫瘍溶解ウイルスが寛解率向上の一助になると考えられる。また癌腫だけでなく肉腫細胞にも強い細胞死活性をもった腫瘍溶解ウイルスを開発することにより、悪性リンパ腫や骨肉腫など頭頸部領域でも稀にみられる悪性腫瘍にも同様の効果を期待できると考えられる。

インフラマソーム関連遺伝子のクローニング

43100001 青田 宥馬

指導教員：長谷部 晃（口腔分子微生物学教室）

キーワード：インフラマソーム，クローニング，PCR

【緒言】

免疫系細胞に炎症刺激が加わると、NF- κ B などの転写調節因子を介し、pro-IL-1 β などが細胞内に産生される。さらにその炎症刺激が加わった細胞への危険シグナルにより、細胞質内のカリウムイオンの低下などが起こり、インフラマソームと呼ばれるタンパク複合体を活性化させる。このインフラマソームの活性化により、酵素である caspase-1 が活性化し pro-IL-1 β を成熟型に変え、細胞外に成熟型 IL-1 が産生される。この感染防御において重要な役割を果たす IL-1 β や IL-18 の産生に関わ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ために、その関連遺伝子である IL-1 β と caspase-1 の遺伝子をクローニングすることを目的とした。

【材料と方法】

ヒト単球・マクロファージ系細胞の THP-1 細胞から全 RNA を抽出し、逆転写酵素を用いて cDNA を合成した。IL-1 β ならびに caspase-1 の前駆体 (pro-IL-1 β , pro-caspase-1) の mRNA 配列に基づいてプライマーを合成し、目的の cDNA を PCR 法により増幅した。プライマーの設計に当たっては、フォワードプライマー、リバースプライマーそれぞれが目的遺伝子の開始コドン、ストップコドンを含むようにし、両プライマーの T_m 値が同程度 (55～60℃) となるよう調整した (表 1)。また、プライマーの 3' 末端同士が相補的にならないよう注意し、プライマー自身が二本鎖やヘアピンなどの高次構造を形成しないよう配慮しながら設計した。

表 1. pro-caspase-1 ならびに pro-IL-1 β のプライマーの塩基配列

	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
pro-caspase-1	aaagccatggccgacaag	gtttccttattttaatgtctctggg
pro-IL-1 β	agcagccatggcagaagtac	ctctttaggaagacacaaattgc

PCR によって得られた産物を電気泳動で確認すると、pro-IL-1 β , pro-caspase-1 とともにバンドが出現したため (図 1), PCR 産物をゲルから切り出し、ゲル成分を除去して PCR 産物の精製を行った。

精製した pro-IL-1 β の cDNA は TA クローニングにより pTARGET (プロメガ) に、pro-caspase-1 の cDNA は制限酵素処理を行い pcDNA3.1 (+) (ライフテクノロジー) にライゲーションした。それぞれのプラスミドを大腸菌にトランスフォームした後、大腸菌からプラスミドを精製し DNA 配列を確認した。

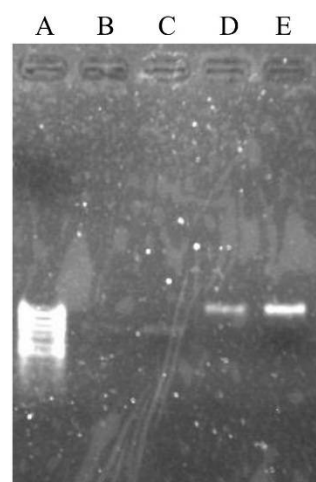


図 1. PCR 産物のアガロースゲル電気泳動の結果。

A: DNA ラダー， B, C: pro-IL-1 β ， D, E: pro-caspase-1

【結果】

pro-IL-1 β ならびに pro-caspase-1 の DNA がそれぞれのプラスミドに挿入されていた。

【考察】

pro-IL-1 β ならびに pro-caspase-1 の DNA は哺乳類細胞発現プラスミドにクローニングした。これらのインフラマソーム関連遺伝子を哺乳類細胞にトランスフェクションすることによりインフラマソームのモデル細胞を作成できる。このモデル細胞を利用した研究により、インフラマソーム活性化メカニズムの詳細を明らかにできると思われる。

Streptococcus sanguinis による NLRP3 インフラマソーム活性化とその機構

43100011 伊東 慶介

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*, インフラマソーム, IL-1 β , NLRP3

諸言

口腔レンサ球菌である *Streptococcus sanguinis* は感染性心内膜炎の主要な原因菌の一つとして報告されている(1)。近年、炎症性サイトカインの一つである IL-1 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(2)。昨年の研究実習では *S. sanguinis* はマウス樹状細胞ならびにマクロファージにおいて NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β の産生を誘導することを報告した(3)。そこで、本研究実習では *S. sanguinis* がどのようなメカニズムで NLRP3 インフラマソームを活性化し IL-1 β の産生を誘導するの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】

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

【IL-1 β ならびに細胞外 ATP の測定】

6 x 10⁵ 個の XS-106 細胞に、Ss の生菌をペニシリンとストレプトマイシン存在下で、2.4 x 10⁶ cfu あるいは 2.4 x 10⁷ cfu 加え、24 時間刺激した後、反応上清に含まれる IL-1 β の産生量を ELISA 法ならびに Western blotting 法で測定した。細胞外 ATP 量は ATP bioluminescence Assay kit CLS (Roche) を用いて測定した。

結果

Ss の IL-1 β の産生誘導は食食阻害剤である Cytochalasin D により阻害された。また、実際に XS-106 細胞による菌体の食食を FITC 標識した *S. sanguinis* を用いてフローサイトメトリーにて調べたところ、菌体が食食され、Cytochalasin D により食食が阻害されることが確認された。本活性は P2X/P2Y レセプター阻害剤である oATP (図 1 a)、P2X₇ レセプター阻害剤である KN-62 (図 1 b) ならびに ATP 加水分解酵素である apyrase により阻害された。また、実際に、

菌体刺激により細胞外 ATP の濃度が増加していた。さらに、本活性は ATP-感受性 K⁺チャネル阻害剤

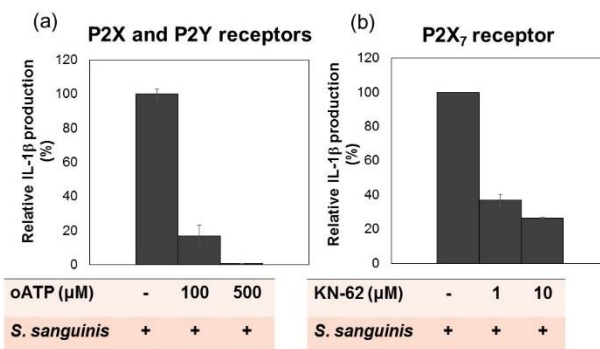


図1. P2X/P2Y レセプター阻害剤ならびに P2X₇ レセプター阻害剤の影響

glybenclamide ならびに tolbutamide により抑制された。

考察

Ss による NLRP3 インフラマソーム活性化のメカニズムには、菌体の食食、ATP の細胞外への放出とそのレセプターとの相互作用ならびに ATP 感受性 K⁺チャネルによる

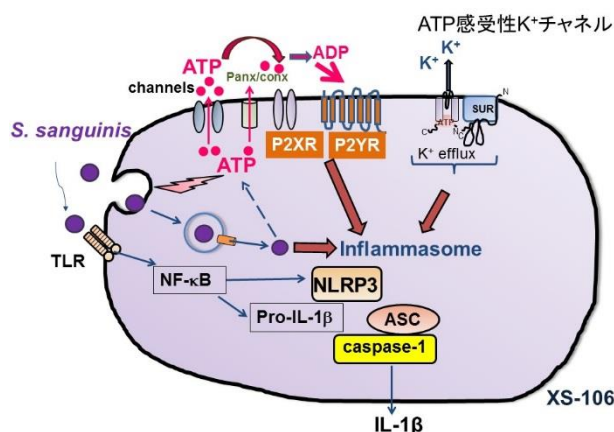


図2. *S. sanguinis*によるNLRP3インフラマソームの活性化に K⁺の細胞外流出が関与している可能性が示唆された(図2)。

参考文献

- Douglas CW, Heath J, *et al.* Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis, J Med Microbiol:39(3), 179-82, 1993.
- Veltrop MH, Beekhuizen H, *et al.* Bacterial species- and strain-dependent induction of tissue factor in human vascular endothelial cells, Infect Immun:67, 6130-6138, 1999.
- 長谷川 裕規, *Streptococcus sanguinis* 菌体による NLRP3 インフラマソームの活性化, 研究実習報告集 第 15 号, 49, 2014.

NLRP3 インフラマソーム活性化モデルの作成

43100012 伊藤 朋世

指導教員：長谷部 晃（口腔分子微生物学教室）

キーワード：インフラマソーム，インフラマソーム関連遺伝子（pro IL-1 β ，pro caspase-1，ASC，NLRP3），成熟型 IL-1 β

【緒言】

インフラマソームは，多くの炎症性疾患の発症と進行において中心的役割を果たしており，その活性化により炎症誘導性のサイトカインである IL-1 β の産生が誘導されることが知られている．本研究では，インフラマソーム関連遺伝子（pro IL-1 β ，pro caspase-1，ASC，NLRP3）を HEK293 細胞に導入することで，その活性化モデルを作成し，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た．

【材料と方法】

インフラマソーム関連遺伝子のうち，pro IL-1 β ，pro caspase-1 については青田君がヒト単球・マクロファージ系 THP-1 細胞からクローニングを行い，それぞれ pcDNA3.1(+) (Invitrogen) ならびに pTARGET (Promega) にライゲーションした．pUNO/human ASC ならびに pUNO/human NLRP3 は InvivoGen 社より購入した．

HEK293 細胞を 10% 牛胎児血清，ペニシリン／ストレプトマイシンを含む DME 培地で培養後，poly-L-lysine でコーティングをした 24-well plate に播種した．その後，リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) を用いて pcDNA3.1(+)/pro IL-1 β ，pTARGET/pro caspase-1，pUNO/human ASC ならびに pUNO/human NLRP3 を等量ずつトランスフェクションした．

Candida albicans pACT1-GFP は SD 培地で好氣的に培養後 SD 寒天平板に接種し CFU を測定した．これを PBS に懸濁し -80℃ で保存し用時調製した．

インフラマソーム関連遺伝子をトランスフェクションした HEK293 細胞を *C. albicans* pACT1-GFP で 16 時間刺激し，刺激後の培養上清中に含まれる IL-1 β を測定・比較した．測定にはヒトの IL-1 β 測定用の ELISA キットを使用した (Biolegend)．また，産生された IL-1 β が成熟型であるかどうかの確認は，抗ヒト IL-1 β 抗体 (Cell Signaling) な

らびに化学発光試薬 Luminata Forte (Millipore) を用いてウェスタンブロッティング法で検出した．

【結果】

インフラマソーム関連遺伝子をトランスフェクションし，*C. albicans* pACT1-GFP で刺激をした HEK293 細胞は，無刺激の HEK293 細胞よりも多くの IL-1 β を産生したことが確認された．また，ウェスタンブロッティング法により，産生された IL-1 β はいずれも成熟型であることが確認できた (図 1)．

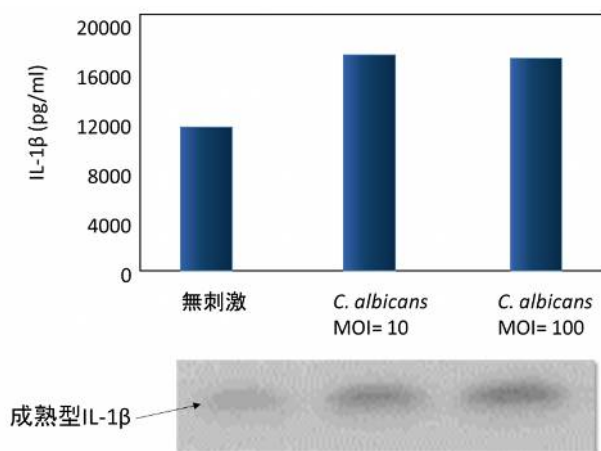


図 1. HEK293 培養上清中の IL-1 β 産生量 (上) とウェスタンブロッティング法で確認された成熟型 IL-1 β のバンド (下)

【考察】

インフラマソーム関連遺伝子を導入していない HEK293 細胞においては，*C. albicans* で刺激しても IL-1 β 産生が誘導されなかったため (データ未掲載)，本実験における IL-1 β 産生誘導はインフラマソーム関連遺伝子の導入によるものであった．

今回作成したモデルにより，インフラマソームの活性化メカニズムを明らかにすることが期待されるが，現段階では遺伝子導入された HEK293 細胞において無刺激の状態でも大量の IL-1 β を産生するため，トランスフェクションするインフラマソーム関連遺伝子の量を調節するなど，今後はさらなる条件検討が必要である．

E1A が Ets2 におよぼす影響

43100013 太田聡美

指導教官：安田 元昭（口腔分子微生物学教室）

キーワード：Ets2, E1A, MMP

緒言

マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）は、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解する酵素で、癌細胞に多く発現していることが知られている。癌が転移するときには、まず原発巣での癌細胞が増殖し、次に原発巣からの癌細胞の離脱し組織内へ侵入する。そして血管やリンパ管への侵入しその流れに乗って遠隔部位へ移動しそこで転移巣を形成する。MMP は、癌細胞が組織に侵入する際に周囲の細胞外マトリックスを分解することで、癌の悪性化に関わっている。MMP の発現には、転写因子 ETS、転写補助因子 p300、RNA ポリメラーゼ II が関わっており、転写因子 ETS が DNA 上のプロモーター/エンハンサー領域に結合すると RNA ポリメラーゼ II による転写が開始し MMP が発現するが、この際、転写補助因子 p300 は必須分子となる。

E1A はアデノウイルス DNA でコードされ感染初期に宿主細胞内で発現するタンパク質で、複数のドメインがアデノウイルス間で保存されることが知られている。からなります。N 末端には転写補助因子 p300 結合部位があり、この部位と p300 が結合し種々の転写因子の転写活性化能を抑制することが知られている。

Ets2 とは転写因子の一種で mRNA の 3'UTR 部分に ARE 様の配列を 4 箇所含んでおり、この配列を介した発現制御機構の存在が予想される。一方、同転写因子は自然免疫応答時に発現することが多く、PPM1 といったタンパク質の発現にかかわっている。

今回、5 型ヒトアデノウイルス E1A の N 末端領域が Ets2 の MMP 転写活性化にも寄与しているかを確認する目的で実験を行った。

材料・方法

1. 細胞株

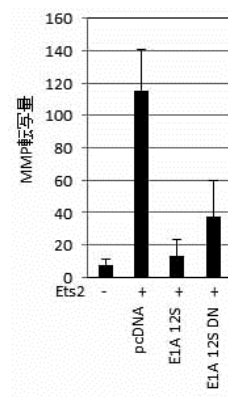
ラット歯髄細胞 RPC-C2A を、10%ウシ胎児血清を含む DMEM 培地（Sigma）にて培養した。

2. プラスミド

実験 1) pcDNA3 Ets2 と、pLuc ベクターのプロモーター領域に MMP1 のプロモーターを導入したもの。マトリックスメタロプロナーゼ 1 (MMP1) はタンパク質で Ets2 に反応するプロモーターを持ち、EBS(Ets Binding sight) とは Ets2 を転写因子としたプロモーターである。

結果

図 1



左の図に示すように、野生型の E1A 12S ではやや ets2 による転写活性が抑制されたが、N 末端を削除した E1A では抑制効果がやや減弱していた。この結果は N 末端のみでは野生

型 E1A の転写抑制能について説明できないことを意味している。

考察

従来報告の通り E1A N 末端には p300 を介した転写抑制能がみられたが、他のドメインにも転写抑制活性があることが示唆された。

Mycoplasma salivarium によるインフラマソームの活性化

43100035 杉本明優

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：*Mycoplasma salivarium*,
インフラマソーム, IL-1 β , NLRP3

緒言

Mycoplasma salivarium は歯周疾患患者の歯周ポケットから健康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滑液から高頻度で検出され、口腔疾患における病因的役割が注目されている(1-4)。

昨年の研究実習において、*Mycoplasma salivarium* が樹状細胞に IL-1 β の産生を誘導し、その活性は部分的に NLRP3 インフラマソーム依存的であることを報告した(5)。本研究では、NLRP3 インフラマソーム複合体の構成成分である NLRP3、ASC ならびに caspase-1 を欠損したマウスから誘導したマクロファージを用いて、本活性が NLRP3 インフラマソーム依存的であるかどうかを確認することを目的とした。

材料と方法

【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)を用いた。インフラマソームの活性化は 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、ASC ならびに caspase-1 ノックアウトマウス(NLRP3 KO、ASC KO ならびに caspase-1 KO)から調整した骨髓細胞を、GM-CSF 存在下で分化誘導した骨髓由来マクロファージ(BMM)を用いた。

【IL-1 β の測定】

4x10⁵ 個の BMM を大腸菌由来の精製リポ多糖(LPS)で刺激した後に、MS 生菌をタンパク質量としてそれぞれ、0 μ g/ml、0.365 μ g/ml、3.65 μ g/ml で更に 24 時間刺激した後、反応上清中に含まれる IL-1 β 量を ELISA 法ならびに Western blotting 法で測定した。

結果ならびに考察

B6 由来 BMM を MS 単独で刺激したところ IL-1 β の産生量が少なかったため、BMM を LPS で刺激した後に、MS で更に 24 時間刺激したところ、本マイコプラ

ズマは B6 由来の BMM に対して強い IL-1 β 産生誘導活性を示した(図1)。caspase-1 ならびに ASC をノック

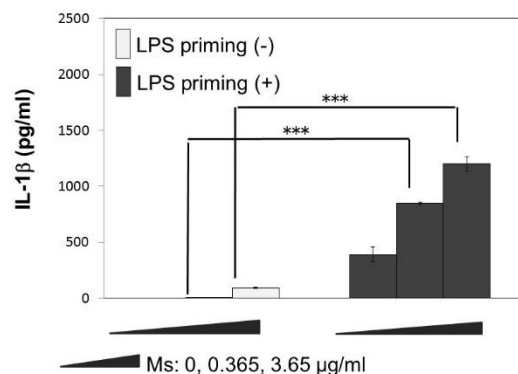


図1. B6由来BMMに対する*M. salivarium*のIL-1 β 産生誘導活性

アウトすることにより本活性はほぼ消失した。しかしながら、NLRP3 のノックアウトでは有意な抑制はみられたが、完全な消失には至らなかった(図2)。

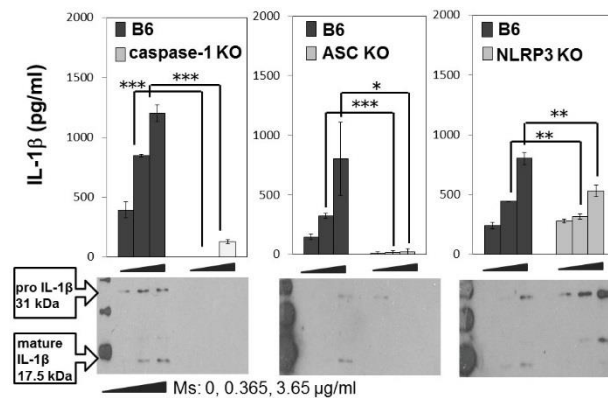


図2. caspase-1 KO, ASC KO, NLRP3 KO由来BMMに対する*M. salivarium*のIL-1 β 産生誘導活性

これらの結果から、MS は BMM に対して IL-1 β の産生を誘導する活性を有し、その活性発現には NLRP3 を含む複数のインフラマソームが関与していることが示唆された。

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. 前川 翠, *Mycoplasma salivarium* によるインフラマソームの活性化, 研究実習報告集 第 15 号, 50, 2014.

長鎖ノンコーディング RNA 発現量の解析

43090045 福川 岳歩

指導教員：安田 元昭（口腔分子微生物学教室）

キーワード：Lnc RNA, micro array, 放射線

【緒言】

前年度の研究実習で放射線照射残存肺がん細胞株 (IR2) と親株肺がん細胞株 (PT) の比較 (総計測細胞数は 300 個以上) において、細胞・核どちらも IR2 株で小さくなっていることが見出された。そして、このような形態変化に伴い、遺伝子発現プロファイルの変化が認められることも明らかとなった。

近年、9000 ヶ所ものゲノムから転写される長鎖ノンコーディング (タンパク質をコードしない) RNA (long nc RNA, lnc RNA) が、機能性であることが示されてきた。たとえば lincRNA-p21 は代謝のリプログラミングに関わっており、ANRIL はがん抑制遺伝子 Ink4 遺伝子座の発現制御に関わっていることが明らかになった。

今回の研究実習では、前年度で未解析であった PT と IR2 の間の長鎖ノンコーディング RNA の発現量の変化について検討した。

【方法】

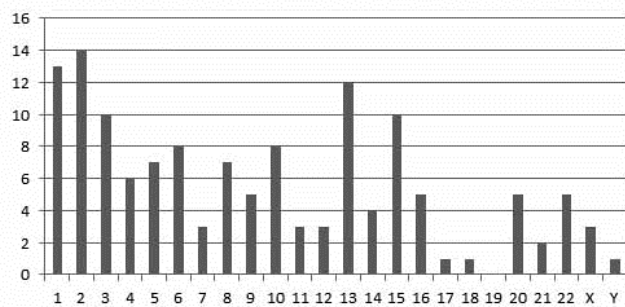
p 53 欠損の肺の癌細胞 H1299 を用いた。H1299 (PT) に 24Gy の放射線照射を行い、2 カ月以上継代した細胞を IR2 とした。PT・IR2 から総 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法によって lncRNA の発現量を比較した。

【結果】

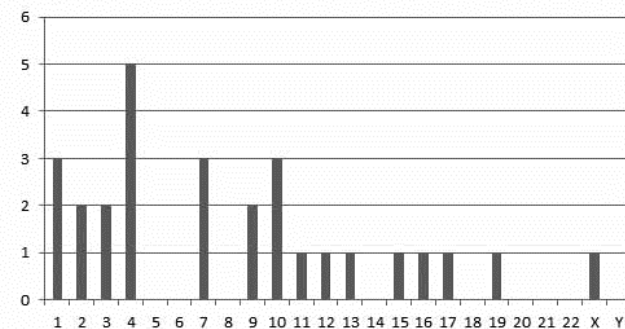
発現量に大きな変化が見られた lincRNA は 9190 個中 162 個、1.76% であった。各染色体の lincRNA 発現量変化について、lincRNA の増加及び減少の比率が特定の染色体において他の染色体より多少大きいといえる部分はあったが、規則性があると判断できるほどの差異ではなかった。発現量に大き

な変化のあった lincRNA の種類及び元の染色体にコードされている全 lincRNA との比率はいずれも発現量が増加した lincRNA 群のほうが減少した

図 1 10倍以上発現が上昇したLncRNAの個数



1/10以下に発現が減少したLncRNAの個数



lincRNA 群より多かった。

【考察】

放射線の照射によって lncRNA の発現量変化は生じるが、それほど高頻度な変化ではなく、また部位的特異性は見られないことが示唆された。しかしながら、発現量が変化した lncRNA の生物学的な意義は不明であり、今後、それぞれの lncRNA についての詳細な解析が必要と考えられた。また、今回観測された変化が、照射の影響によって生じたものか、あるいは照射前からこのような発現傾向を持っていた細胞が放射線の殺傷作用に抵抗性を示したのかという問題は興味深いものと考えられた。

Aggregatibacter actinomycetemcomitans によるインフラマソームの活性化

43090051 松下 矩大

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: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, インフラマソーム, IL-1 β , NLRP3, ピロプトーシス

緒言

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa) は侵襲性歯周炎の主な病原菌であり、その病原因子としてはロイコトキシンや内毒素が注目されている(1, 2)。近年、多様な生理活性をもつ IL-1 β が関与する炎症性疾患の多くがインフラマソームと呼ばれる細胞内センサーの活性化と関連している可能性が示唆されている(3)。本研究では、Aa の歯周炎における新たな病因論を明らかにするために、本菌が歯周炎の病態形成において重要な役割を果たしている IL-1 β の産生誘導活性を有するかどうか、また、もし産生する場合はどのようなインフラマソームを介するのかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

【細菌と標的細胞】

Aa JP2 株は、1 % (w/v) yeast extract を含む Brain Heart Infusion 培地で培養し、PBS で洗浄した菌体を用いた。インフラマソームの活性化を調べる細胞は A/J マウス由来の樹状細胞である XS-106 細胞を用いた。

【IL-1 β の測定】

6×10^5 個の XS-106 細胞に、Aa の生菌をペニシリンとストレプトマイシン存在下で、あるいは 100 °C で 5 分間処理した死菌をそれぞれ、 3.6×10^6 cfu、 3.6×10^7 cfu あるいは 3.6×10^8 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 blotting 法で測定した。

【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。caspase-1 の mRNA の発現抑制は real-time RT-PCR 法で確認した。

【Nod-like receptor (NLR) の同定】

NLRP3 特異的 siRNA を発現するプラスミドを XS-106 細胞に導入し、安定発現する XS-106 細胞 (XS106-NLRP3 細胞) を樹立した。

【Reactive oxygen species (ROS) 阻害剤の影響と ROS の産生】

IL-1 β 産生における ROS の関与を調べるために、ROS の阻害剤である N-acetylcysteine (NAC) 存在下で XS-106 細胞を Aa で刺激し IL-1 β の産生を ELISA 法で測定した。ROS の産生は、dihydrorhodamine123 を用いてフローサイトメーターで解析した。

結果ならびに考察

XS106 細胞を Aa 生菌・死菌で刺激したところ、生菌・死菌ともに IL-1 β の産生を誘導した (図 1)。

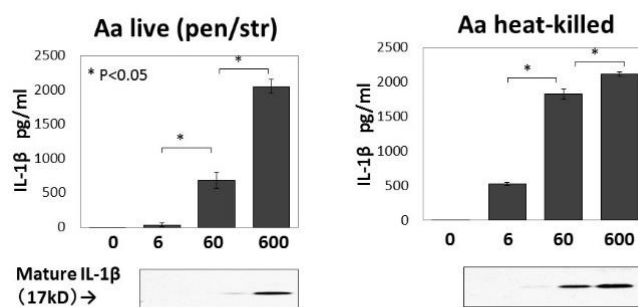


図1.Aa 刺激によるIL-1 β 産生誘導

本活性は pan-caspase 阻害剤である Z-VAD-FMK および caspase-1 阻害剤である Z-YVAD-FMK で有意に阻害された。さらに、本活性は caspase-1 のノックダウンにより有意に抑制された (図 2)。

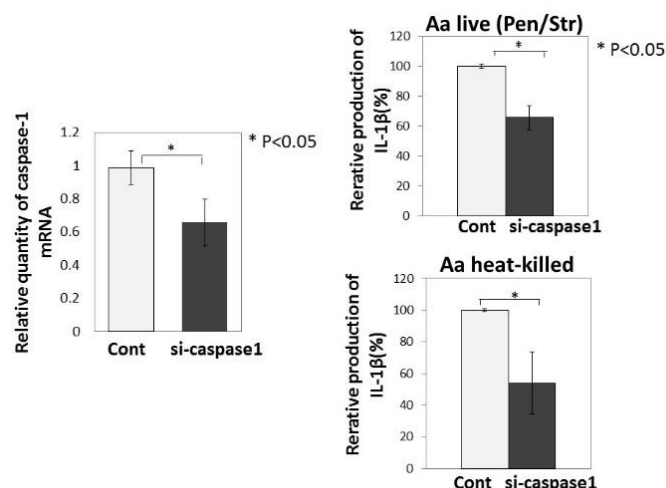


図2.caspase-1 mRNAの抑制とIL-1 β 産生量の低下

次に、Aa によるインフラマソームの活性化にはどのような NLR が関与しているかを明らかにするため、これまで多くの細菌で活性化されるという報告がある NLRP3 に着目した(4)。XS106-NLRP3 細胞を Aa の生菌あるいは死菌で刺激したところ、生菌の IL-1 β 産生誘導活性は抑制されたが、死菌による活性は抑制されなかった。ROS は NLRP3 インフラマソームを活性化し、IL-1 β の産生を誘導することが明らかにされている(5)。そこで、ROS 阻害剤である NAc による Aa 生菌の IL-1 β 産生誘導活性に及ぼす影響ならびに ROS の産生を検証した。その結果、NAc は濃度依存的に Aa 生菌の IL-1 β 産生誘導活性を阻害し、また、Aa 生菌刺激により ROS が産生されていることから、Aa 生菌によるインフラマソームの活性化に関与している NLR は NLRP3 であると考えられる。

インフラマソームの活性化による IL-1 β の産生はピロプトーシスとよばれる細胞死を伴うことが知られている(6)。そこで、XS106 細胞を菌体で刺激した後、PI ならびに Annexin V で染色し、細胞死が誘導されるかどうかを解析したところ、ネクローシス様の細胞死が誘導されていることがわかった。ピロプトーシスは炎症性サイトカインである IL-1 β や IL-18 の産生を伴うネクローシス様の細胞死であることから、Aa は、XS106 細胞にピロプトーシスを誘導していることがわかった。

本研究により、本菌の侵襲性歯周炎における新たな病因論の一つとして、NLRP3 インフラマソームの活性化により産生された IL-1 β が病態形成に関与していることが示唆された。

参考文献

1. Slots J, Ting M. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in human periodontal disease: occurrence and treatment, *Periodontology* 2000 20: 82-121, 1999.
2. Johansson A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: a powerful tool with capacity to cause imbalance in the host response, *toxins* 3:242-259, 2011.
3. Strowig T, Henao-Mejia J, 他 2 名 Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481: 278-286, 2012.
4. Vladimer GI, Marty-Roix R, 他 3 名 Inflammasomes and host defenses against bacterial infections, *Curr Opin Microbiol* 16: 23-31, 2013.
5. Martinon F. Signaling by ROS drives inflammasome activation, *Eur J Immunol* 40: 616-619, 2010.
6. Bergsbaken T, Fink SL, 他 1 名 Pyroptosis: host cell death and inflammation, *Nat Rev Microbiol* 7: 99-109, 2009.

E1A が p53 におよぼす影響

43100053 松本 愛子

指導教官：安田 元昭（口腔分子微生物学教室）

キーワード：E1A、p53

【目的】

アデノウイルスの初期遺伝子である E1A が、がん抑制遺伝子である p53 にどのような影響を与えるか検討することとした。

【方法 1】

E1A が転写補助因子 P300 と結合することで、p53 による転写活性を抑制するという仮説のもと、デュアルルシフェラーゼアッセイにより p53wt のみの場合と E1A 存在下での p53 の転写活性の比較を行った。

材料：①肺癌細胞 H1299

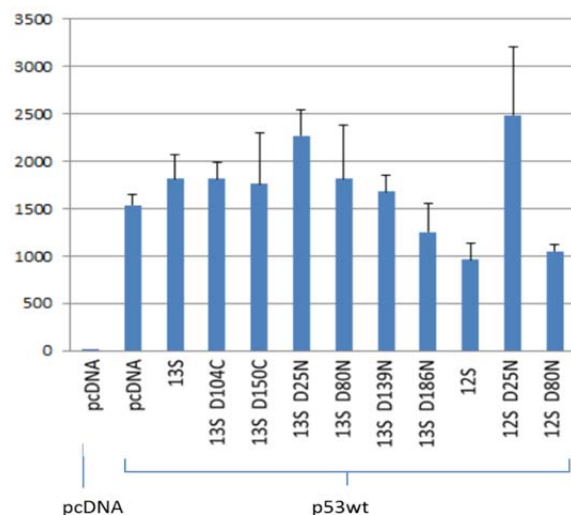
②p53 LUC、pGL4.72 (Renilla LUC)

③p53 wt

④E1A mutant

【結果 1】

結果を以下に示す。



E1Amutant は加えず p53 のみを加えた場合転写量は 1500 倍だったのに対し、p53 と E1Amutant の両方を加えた場合では約 1700 倍と、ほぼ変わらない、もしくは若干増加傾向を示した。これは、

E1A が P300 と結合し p53 の転写活性化能を抑制するという仮説と矛盾する結果となった。

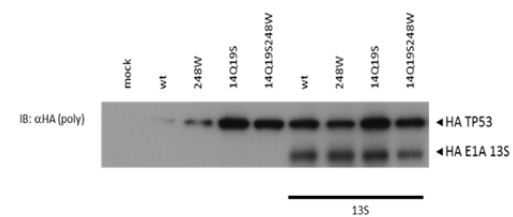
この要因として、p53 の発現量が変化しているという予測を立てた。

【方法 2】

WesternBlot 法により E1A 存在下・非存在下での p53 の発現量の比較を行った。

【結果 2】

結果を以下に示す。



P53wt のみでは、発現量が少なく、MDM2 により速やかに分解されていることがわかる。これに対し、E1A13S 存在下では p53 の発現量は増加した。

【考察】

E1A は P300 と結合し転写活性化を抑制するが、一方で p53 を安定化し、発現量を増やす働きもあるため、転写活性化を抑制するに至らなかったと考えられる。

E1A のみの発現では p53 が安定化し、アポトーシスが起こるため、癌化抑制的だが、アデノウイルス E1 領域を用いた発がん実験では E1A のほかに E1B も必要なことがわかっており、E1B など他のウイルス遺伝子の作用により、ウイルスの増殖や癌化が引き起こされるのであろうと考えられる。

各種ビスホスホネートによるアルカリ性ホスファターゼ活性の阻害様式

43100002 赤堀 永倫香

指導教員 鈴木 邦明（細胞分子薬理学教室）

キーワード：alendronate、tildronate、アルカリ性ホスファターゼ（ALP）、パラニトロフェニルリン酸（*p*NPP）

1. 諸言

骨粗鬆症や悪性腫瘍骨転移の治療薬として用いられているビスホスホネートは、その重篤な副作用として顎骨壊死が知られている。顎骨壊死を引き起こす骨吸収抑制作用について、破骨細胞と相互作用を持つ骨芽細胞に着目して調べた。また、窒素含有・非含有の2種類のビスホスホネートを種々の濃度で実験に使用し、ALP活性の阻害様式に違いがあるかを調べた。

2. 方法

各種ビスホスホネートを様々な濃度で市販のヒト骨型アルカリ性ホスファターゼに作用させ、基質が分解されて生じたリンを *chifflet* 法で定量し活性を求めた。窒素を含有するビスホスホネートとして alendronate、窒素を含有しないものとして tildronate を使用した。また、本実験では基質として *p*NPP を用いた。

3. 結果

① ALP 活性の *p*NPP 濃度依存性を測定すると、図 1 のように *p*NPP 濃度が 4 mM の時に最大活性を示し、それ以降では基質阻害を示した（図 1 参照）。

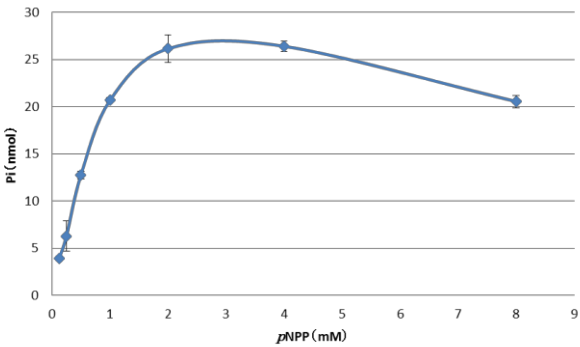


図 1 基質濃度依存性

② 種々濃度の alendronate を ALP に作用させその阻害様式を調べたところ最大活性は存在する alendronate の濃度に依存して低下したが、基質の 50%活性濃度はほぼ一定であった（図 2、表 2 参照）。

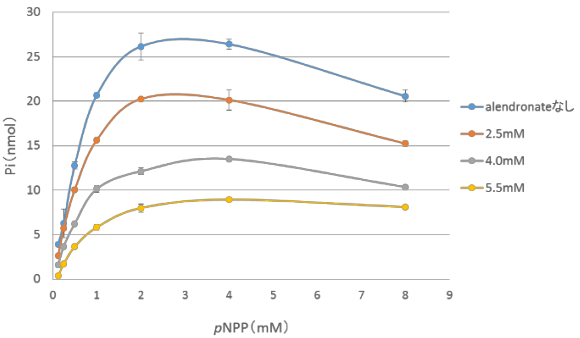


図 2 alendronate の ALP 活性阻害様式

tildronate濃度	Vmax	[S] _{0.5}
0	26.40	0.47
1.5	30.99	0.44
2.5	19.50	0.61
3.5	9.72	0.41

表 2 alendronate 添加、ALP 活性の基質依存性

③ 種々濃度の tildronate を ALP に作用させ、その阻害様式を調べたところ、最大活性は、1.5 mM では増加したが 2.5 mM 以上では存在する tildronate の濃度に依存して低下した。基質の 50%活性濃度はほぼ一定であった（図 3、表 3 参照）。

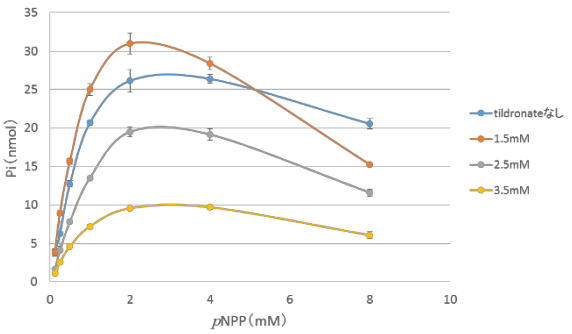


図 3 tildronate 添加、ALP 活性の基質依存性

alendronate濃度	Vmax	[S] _{0.5}
0	26.40	0.47
2.5	20.24	0.47
4	13.50	0.61
5.5	8.93	0.64

表 3 tildronate の ALP 活性阻害様式

4. 考察

本実験により ALP 活性は *p*NPP 濃度が 4 mM の時最大活性を示し、それより高濃度では基質阻害を示した。また、alendronate, tildronate 共に ALP 活性を非拮抗的に阻害するという結果が得られた。すなわち、両ビスホスホネートとも ALP の *p*NPP 結合部位以外の部位に結合箇所を持つと考えられる。さらに、ALP 活性を非拮抗的に阻害することから、両ビスホスホネートは骨の石灰化をも阻害する可能性がある。これらより、ビスホスホネートは骨吸収を阻害するだけでなく、骨の石灰化をも阻害することで骨の形成や成長を抑制している可能性があり、それ故に顎骨壊死を誘発する原因となっていることが考えられる。

ヒト骨型アルカリ性ホスファターゼ活性に対する
clodronate と risedronate の作用

43100007 池上 なつみ

指導教員 鈴木 邦明

キーワード：アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、パラニ
トロフェニルリン酸 (p NPP)、clodronate、risedronate

1.緒言

顎骨壊死を起こすとされるビスホスホネート (BPs) 剤に
おいて窒素非含有 clodronate および窒素含有 risedronate
の二種類の BPs 剤を用いてヒト骨型 ALP 活性の阻害様式
を調べた。破骨細胞と BPs 剤の活性阻害関係について着
目されることが多いが、今回は破骨細胞と相互関係のある
骨芽細胞ではどのような活性阻害様式がみられるかにつ
いて着目した。

2.材料と方法

市販のヒト骨型 ALP を使用し、 p NPP を基質とし、アル
カリ性の環境下(pH 10.14)で、各濃度での窒素含有
clodronate、及び窒素非含有 risedronate 存在下で、30
分間の ALP 活性について調べた。ALP 活性については
Chifflet 法を用いてリン酸の定量を行うことにより算出
し、得られた値を Hill plot 法により ALP を 50%活性化
する p NPP の濃度を解析した。

3.結果と考察

- ① ALP 活性の p NPP 濃度依存性を測定すると図 1 のよ
うに p NPP 2 mM で ALP は最大活性を示した。

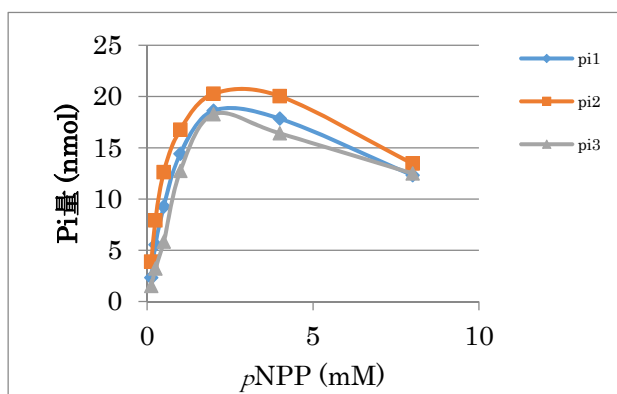


図 1 p NPP 濃度依存性

- ② Clodronate 存在下 ALP 活性の基質濃度依存性を測定
すると、図 2 のように ALP の活性は clodronate 濃度
依存性に低下した。表 1 より 50%活性化 p NPP 濃度
の変化については clodronate 濃度依存性に低下して
いったが、値の変化はわずかであり、非拮抗阻害であ
ると考えられた。

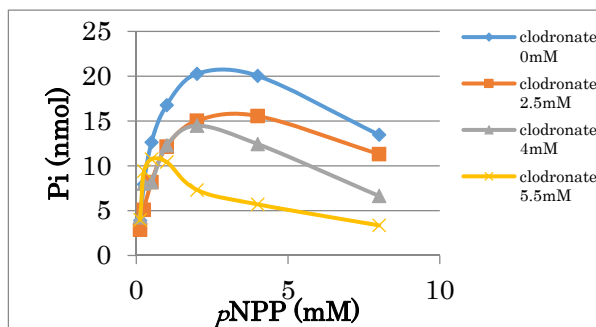


図 2 clodronate 存在下 ALP 活性基質濃度依存性

clodronate	Vmax	K0.5
0	20.27	0.34
2.5	15.56	0.37
4	14.47	0.26
5.5	10.75	0.24

表 1 50%活性化 p NPP 濃度

- ③ risedronate 濃度依存性を測定すると、図 3 のように
最大活性は 2.5 mM まで増加した。表 2 より 50%活
性化 p NPP 濃度変化については risedronate 濃度依存
性に低下していき、risedronate 存在下で基質 p NPP
に対する親和性が増加することが考えられた。

これらより clodronate と risedronate の ALP 活性に対す
る作用は異なることが判明した。

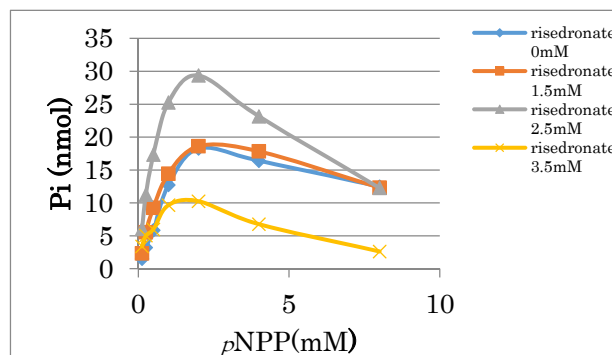


図 3 種々 risedronate 濃度での ALP 活性基質濃度依存性

risedronate	Vmax	[S]0.5
0	18.27	0.67
1.5	18.62	0.49
2.5	29.36	0.37
3.5	10.25	0.24

表 2 50%活性化 p NPP 濃度

4.結論

本実験により、ヒト骨型 ALP 活性は 2 mM p NPP で最大
活性を示すことが分かった。また、ALP 活性は clodronate
による阻害では非拮抗阻害を示したが、risedronate 存在
下では 2.5 mM までは最大活性は増加し、 p NPP に対する
親和性も増加して clodronate とは異なる作用を示した。

スマートフォンを用いた放射線量の測定(1)

43100008 石坂 理紗

指導教員：西方 眞（学術支援部）

キーワード：スマートフォン、線量計、放射線

諸言

2011年の東日本大震災によってひきおこされた福島第一原発の事故により、近隣地域は甚大な放射能汚染に見舞われた。これをきっかけとし、自ら線量計を入手して環境の放射線量を測定する個人が増えている。翌年には、線量計としての機能を持つスマートフォンが発売された。本研究では、このスマートフォンが信頼性の高い放射線測定器として使用できるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

スマートフォンとして、2012年発売のシャープのPANTONE 5 107SH（以下107SHと略、端末価格23,500円）を用いた。これは、日本で発売されている唯一の放射線測定機能付きのものである。107SHには、放射線を感知するセンサーとして、シリコン半導体を搭載している。このセンサーに放射線が当たると電気が流れる仕組みである。107SHの測定値が正しいかどうか確かめるために、校正済みの線量計（アロカ日立メディカル株式会社 シンチレーションサーバイメータ TCS-161、定価588,000円）の値（真の値とした）と比較した。両機器とも放射線量は外部被ばく線量（ $\mu\text{Sv/h}$ ）として表示される。

結果と考察

環境には α 線、 β 線、 γ 線が存在するが、 α 線と β 線は皮膚を完全には通過しない。更に皮膚は放射線に対する感受性が他の臓器と比べ非常に低いので、外部被ばくを評価するためには透過性の高い γ 線のみを測定することが要求される。107SHがこの条件を満たしているかは、線源と107SHの間に γ 線のみが透過できる厚さ2mmのアルミニウム板を置いて測定を行い、アルミニウム板の有無で放射線量が変化するかどうかを見ればよい。

まず、セシウム137の密封線源からの放射線量を測定した。線源と107SHとの距離を5cmとし、アルミニウム板の有無で測定した（図1）。図1からわかるように、放射線量の値は測定ごとに、本来ほぼ同じ値を示すはずだが、大きく変化した。最大値/最小値は1.86もあった。平均値で比較すると、アルミニウム板の有無によって値はほとんど変わらなかった。これらの平均値（アルミニウム板の有無にかかわらず約1.1 $\mu\text{Sv/h}$ ）はTCS-161で測定

した真の値(0.64 $\mu\text{Sv/h}$)より70%も高かった。

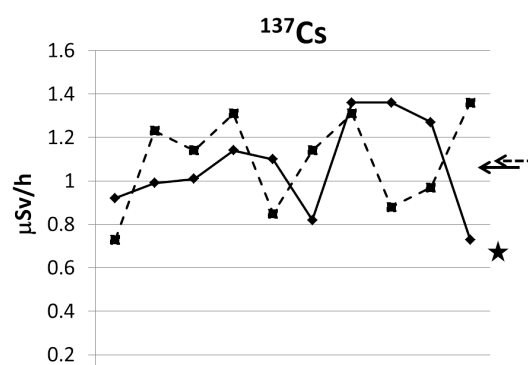


図1. ^{137}Cs によるセシウム137の測定。実線はアルミニウム板無し、点線は有り。各点3分間、計10回測定。矢印は10回の平均値。星印は真の値。

同様の実験を、コバルト60とウラン238を線源として行った。セシウム137の場合と同様に、測定ごとの値は大きく変化したので平均値を採用した。コバルト60に関しては、アルミニウム板有りでは0.23 $\mu\text{Sv/h}$ 、無しでは0.19 $\mu\text{Sv/h}$ 、真の値は0.16 $\mu\text{Sv/h}$ であった。ウラン238では、アルミニウム板有りで0.88 $\mu\text{Sv/h}$ 、無しで0.94 $\mu\text{Sv/h}$ 、真の値は0.81 $\mu\text{Sv/h}$ であった。これらの実験から、アルミニウム板の有無によって測定値は大きくは変わっていないことがわかる。おそらく、センサー部分が適切にシールドされ、 α 線や β 線が侵入しないように設計されているものと思われる。つまり、外部被ばく線量を評価する上で必要な γ 線のみを検出しているといえる。

107SHで得られた値（アルミニウム板無し）と真の値の比は、セシウム137で1.7、コバルト60で1.2、ウラン238で1.2であった。いずれの線源でも、真の値より高い値が得られた。コバルト60とウラン238では真の値に近かった。しかし、セシウム137では真の値に比べてかなり高めの値が得られている。しかし、その値も真の値のせいぜい1.7倍であり、環境の放射線量の目安を知る上では実用的であるといえる。

結語

今回使用したスマートフォンはガンマ線のみを検出し、被ばく線量として測定した値は真の値から飛びぬけて乖離したものではなかった。手軽に持ち運びでき、環境の放射線量の目安を知る上では実用的であると考えられる。ただ、0.05 $\mu\text{Sv/h}$ 以下の被ばく線量は全て0.05 $\mu\text{Sv/h}$ と表示されてしまうので、福島県などのある程度放射線量の高い地域では、特に有用であると考えられる。

スマートフォンを用いた放射線量の測定(2)

43100009 石田 優馬

指導教員：西方 眞 (学術支援部)

キーワード：スマートフォン、線量計、放射線

諸言

今回の研究実習の共同研究者である石坂の報告書(スマートフォンを用いた放射線量の測定(1))では、放射線測定機能の付いたスマートフォン(シャープ PANTONE 5 107SH)の信頼性について調べた結果を述べた。その結果、測定のたびに値の変動が大きいものの、 γ 線による被ばく線量を測定でき、その値も真の値からとびぬけて乖離したものではなく、環境の放射線量を知る上では実用的であることが明らかになった。この報告書では、スマートフォンを用いて測定した環境の放射線量や応用例について述べる。

材料と方法

用いたスマートフォンや実験方法は、共同研究者である石坂の報告書(スマートフォンを用いた放射線量の測定(1))に記載しているとおりである。なお、本報告書内では、PANTONE 5 107SH を単にスマートフォンと記すことにする。

結果と考察

1) 環境の放射線量の測定

スマートフォンを用いて札幌市内の放射線量を測定した。スマートフォンを手に持って床や地面から約50cmの場所を約3分間測定した。結果を表1に示す。なお、スマートフォンでは0.05 $\mu\text{Sv/h}$ 以下の値は0.05 $\mu\text{Sv/h}$ と表示される。スマートフォンの値は真の値と大きくは異なっていなかった。

	スマートフォン	真の値
北大ひょうたん池	0.05	0.03
北大古川講堂	0.05	0.04
歯学部C-505	0.06	0.05
歯学部RI実験室	0.06	0.07
北海道銀行入口	0.07	0.10
三越入口付近	0.08	0.12
大通公園噴水前	0.11	0.09
札幌信用金庫入口	0.18	0.16
北大理学部ロビー	0.28	0.24

表1. スマートフォンによる各所の放射線量の測定

放射線量の高いところは高く、低いところは低く表示された。札幌信用金庫入口と北大理学部ロビーで比較的高い値が得られたのは、床材に茶色の花崗岩が使われており、そこから出る放射線に反応したためと思われる。

2) 応用例

スマートフォンを放射線教育の現場で使うことができるか検証した。放射線量は線源からの距離の二乗に反比例することになっているが、スマートフォンを使ってこのことを確かめてみた。セシウム 137 の密封線源からの放射線量(この場合 γ 線)を距離を変えて測定した。結果を図1に示す。理論曲線(点線)とよく合っているのがわかる。

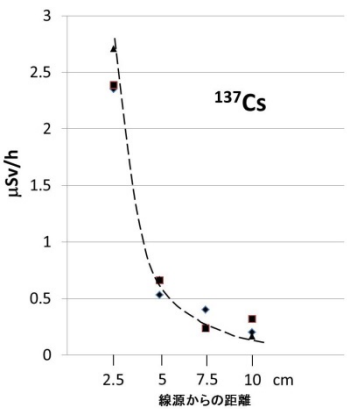


図1. 放射線量と線源からの距離の関係

放射線、特に γ 線は色々な物質を透過する性質がある。しかし、鉛のような重い金属により遮蔽することができる。このことを、スマートフォンを用いて確かめてみた。遮蔽材としては、鉛、紙(本を用使用)、水(薄い発砲スチロール容器に入れて使用)、木材を用いた。線源は、トリウム 232 の密封線源を用い、遮蔽材の厚さは2cmとした。スマートフォンは遮蔽材のすぐ上に置いた。図2に結果を示す。星印は真の値である。鉛が最も遮蔽効果が高かった。真の値を見ても同じ結果であった。

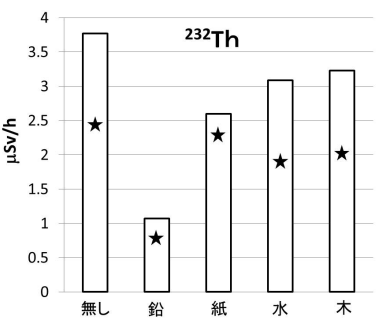


図2. 各種素材による放射線(γ 線)の遮蔽効果

結語

スマートフォンを用いた環境の測定では、真の値に近い測定値が得られた。0.05 $\mu\text{Sv/h}$ 未満の値は表示できないことを除くと、環境の放射線量を測定するには適していると考えられる。放射線教育の現場においても、簡易線量計として使用できることが分かった。

エナメル質の部位別における脱灰量の違いに関する研究

43100023 川村 桜

指導教員：中村 光一（小児・障害者歯科学教室）

南川 元（細胞分子薬理学教室）

キーワード：エナメル質、最大豊隆部、歯頸部、酸蝕症、フッ素

1. 緒言

酸蝕症は超高齢社会を迎え、非感染性の疾患として注視すべき疾患である。近年では、食生活の変化により酸性のスポーツ飲料、健康食品の摂取が原因の酸蝕症が増加している¹⁾が、エナメル質の部位による違いが脱灰に関係するのかについては、不明な点が多い。そのため、エナメル質の酸への感受性が部位により違いがあるのかを検討した。

2. 方法

ヒト上顎大白歯を低速精密切断機でブロック状に切断し、エナメル質表面を2mm×2mmで露出させその他の部位をネイルバーニッシュで覆い、頬側面、舌側面、遠心面、近心面のそれぞれについて最大豊隆部と歯頸部を露出させた計八種類の試料を作製した。これらの試料をフッ化ナトリウム溶液(F:900ppm)、5%酢酸溶液、脱イオン水に37℃で1週間浸漬した後、0.2M 乳酸溶液(pH4.0)に1時間浸漬した。乳酸中に溶出したCa量をInductive Coupled Plasma(ICP)を用いて計測した。

3. 結果

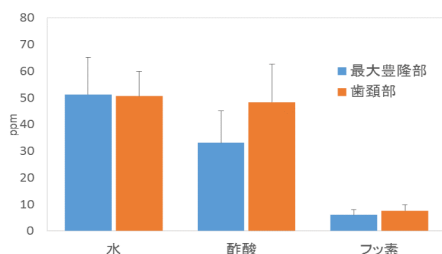


図1. 溶液に浸漬後のCa溶出量（頬側面）

頬側面、近心面ではエナメル質の最大豊隆部と歯頸部を比較した場合、脱イオン水、酢酸溶液、フッ化ナトリウム溶液の各溶液に浸漬し、乳酸中に溶出したカルシウム量には有意差は認められなかった。（図1、図3）

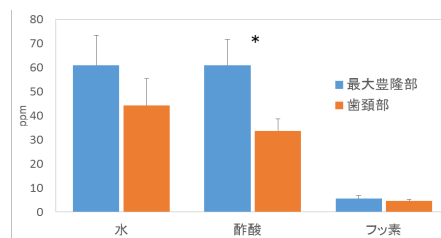


図2. 溶液に浸漬後のCa溶出量（舌側面）

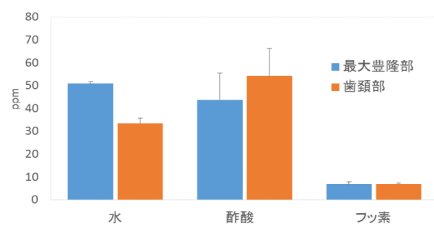


図3. 溶液に浸漬後のCa溶出量（近心面）

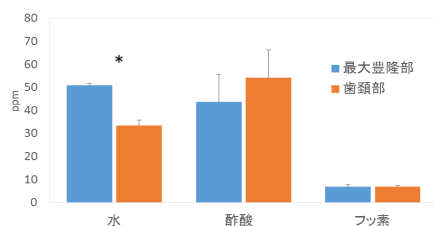


図4. 溶液に浸漬後のCa溶出量（遠心面）

舌側面では酢酸溶液で有意差がみられ（図2）、遠心面では脱イオン水で有意差が見られた。（図4）

また、全ての面において、フッ化ナトリウム溶液に浸漬したグループでは他の溶液に浸漬したグループに比べ、Ca溶出量が有意に減少した。

4. 考察

エナメル質の最大豊隆部と歯頸部を比較すると、歯面によつては、溶液へのCa溶出量の差がみられた。有意差が出た二歯面（舌側面、遠心面）では最大豊隆部の方が歯頸部に比べCa溶出量が多かった。またフッ化ナトリウム溶液に浸漬することで、最大豊隆部と歯頸部ともにCa溶出量が他のグループと比べ有意に減少した。

以上の結果より、ヒトの永久歯における最大豊隆部エナメル質と歯頸部エナメル質を比較すると、酸への感受性が異なる歯面もみられたが、フッ素に浸漬することでCa溶出量が他のグループと比べ有意に減少し、また、その有意差を無くすることが可能であることが示唆された。

6. 参考文献

1) 保存修復学 21, 田上 順次, 千田 彰, 他 2 名, 永末書店(2011), 東京

エナメル質に対する果汁の影響に関する研究

43100024 川谷内 敬太

指導教員：中村 光一(小児・障害者歯科学教室)

南川 元(細胞分子薬理学教室)

キーワード：エナメル質、果汁、脱灰

1. 緒言

近年、飲食物による酸蝕症が問題となっているが、果物もその原因として例外ではない。果汁はその種類により成分や性質が異なるが、エナメル質への影響は不明な点が多い。本研究では果汁の種類によりエナメル質の脱灰に違いがあるか検討した。

2. 方法

【材料】

ヒト下顎大白歯、ネイルバーニッシュ、紙やすり(#400、#1000、#2000)、果汁(りんご、みかん、ぶどう)、脱イオン水、5%酢酸溶液、2%フッ化ナトリウム溶液

【試料の作成】ヒト下顎大白歯を低速精密切断機でエナメル質表面が 2mm×2mm で露出するように切断した。エナメル質表層以外をネイルバーニッシュで覆い、エナメル質表層を紙やすりで研磨し均一な試料を作成した。

【実験 I】

各種溶液の pH、フッ素濃度を測定した。各種溶液 10mL に試料を 37 度で 1 週間浸漬した。この時、溶液中に溶出した Ca 量を Inductively Coupled Plasma(ICP)を用いて測定した。また、実験に用いた試料のエナメル質表面を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。

【実験 II】

各種溶液 1mL に試料を 37 度で 1 週間浸漬したあと、試料を水洗乾燥させ、乳酸溶液 1mL に 37 度で 1 時間浸漬した。この時乳酸溶液中に溶出した Ca 量を ICP を用いて測定した。また、実験に用いた試料のエナメル質表面を SEM で観察した。

3. 結果

【実験 I】

pH はどの溶液も一週間でほとんど変化はなかった。(図 1)果汁のフッ素濃度もほとんど検出できないほど微量であった。(りんご 0.1ppm, みかん 0.1ppm, ぶどう 0.2ppm)

各種溶液に溶出した Ca 量は水とフッ化ナトリウム溶液では有意差が認められなかったが、酢酸、りんご、ぶどう、みかんに関しては互いに有意差が認められた。(図 2)

SEM 写真は水に浸漬したものでは滑沢な像となったが、酢酸、果汁に浸漬したものは粗雑な像が認められ脱灰している様子が観察された。フッ化ナトリウムに浸漬したものは結晶が析出した像が観察された。(図 3)

【実験 2】

水、酢酸、フッ素、りんごでは有意差が認められなかったが、ぶどう、みかんでは他のグループと比べ有意差が認められた。(図 4)

SEM 写真は全ての像において脱灰している様子が観察された。(図 5)

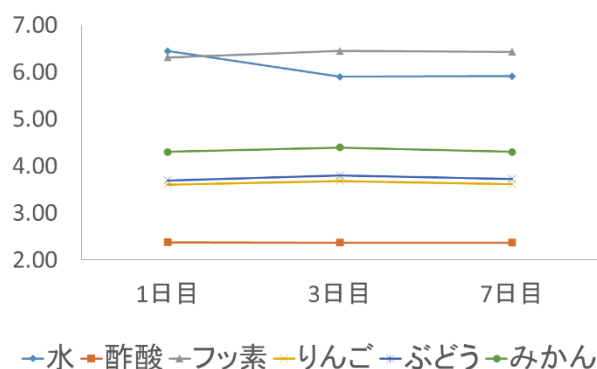


図 1：各種溶液の pH 変化と果汁のフッ素濃度

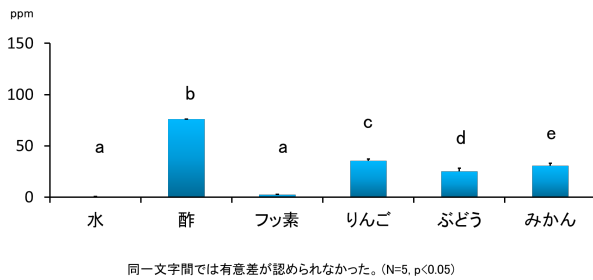


図 2：各種溶液に溶出した Ca 量

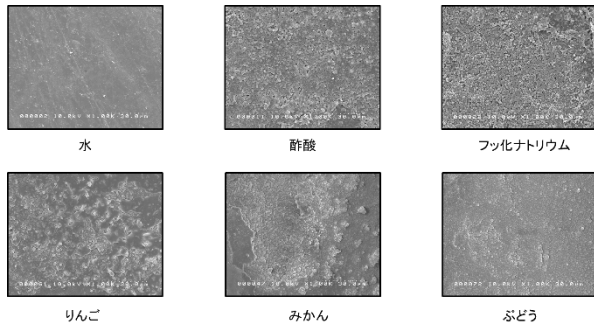


図 3：SEM 写真

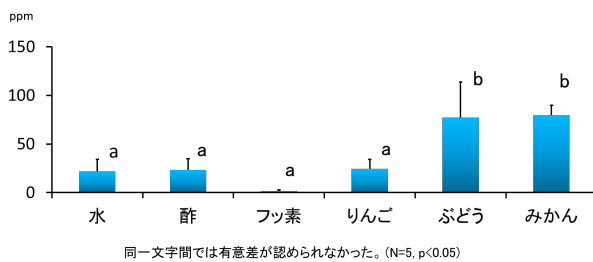


図 4：乳酸溶液に溶出した Ca 量

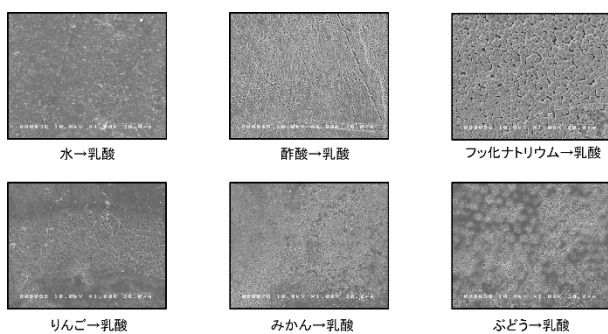


図 5：SEM 写真

4. 考察

酸蝕症は pH が影響していると考え果汁の pH を測定したところ、りんごが最も低く、りんご果汁中に溶出した Ca 量も多かった一方で、乳酸への溶出量は他の果汁に浸漬したものに比べて著しく低下していた。SEM 写真でもりんご果汁に浸漬したものはみかん、

ぶどうとは異なる像が観察された。

5. 結論

果汁の種類によりエナメル質の脱灰に違いが認められた。本研究結果より、果汁によるエナメル質の脱灰は pH だけではなく、他の因子の関与が示唆された。

6. 参考文献

松平 文朗、de Oliveira Cordeiro Jose Geraldo、他 2 名：リンゴポリフェノールのう蝕抑制効果，口腔衛生学会雑誌 (0023-2831)58 巻 2 号 Page113-124(2008. 04)

エナジードリンクの暗算作業効率に及ぼす影響
43100042 永井 謙次
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、エナジードリンク

1. 緒言

エナジードリンクは精神的、肉体的疲労回復を目的として販売されており、市場規模は日本国内で 500 億円と言われているが、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、短時間におけるエナジードリンクの効果について検討した。

2. 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、内田勇三郎が翻案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）との間に各種エナジードリンクを摂取した。なお、コントロールは何も摂取しなかった場合の結果を示している。それぞれ 4 回行い、この摂取前後の暗算作業効率の変化から各種エナジードリンク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。

エナジードリンクとして、清涼飲料水であるモンスター（355ml（カフェイン 142mg）：アサヒ飲料）およびレッドブル（185ml（59.2mg）：レッドブル）、コーヒー飲料であるモンスターコーヒー（250g（160mg）：アサヒ飲料）、第 3 類医薬品ビタシーローヤル 3000ZERO（100ml（0mg）：常磐薬品）および第 2 類医薬品であるリポビタンゴールド N（50ml（40mg）：大正製薬）を用いた。

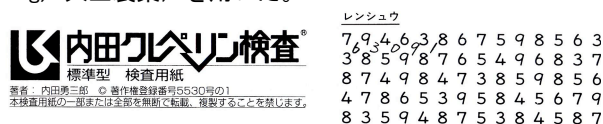


図 1 内田クレペリン検査用紙

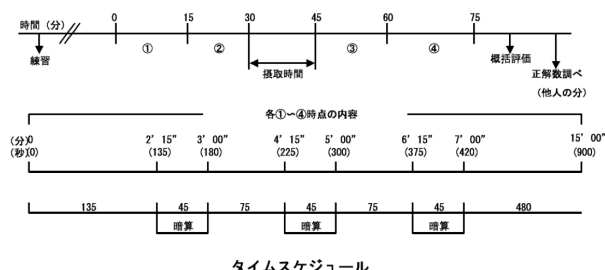


図 2 測定のタイムスケジュール

3. 結果

被験者 A においては、モンスター、モンスターコーヒー、レッドブル（図 3）、リポビタンゴールド（図 4）で作業効率の向上が認められ、ビタシーローヤル（図 4）は作業効率の向上が認められなかった。嗜好に関して調べたところ、エナジードリンクの摂取経験がほとんど無く、モンスター、モンスターコーヒー、レッドブルは好む味であり、

リポビタンゴールドは嫌いな味であった。

被験者 B においては、モンスター、モンスターコーヒー、およびリポビタンゴールドで作業効率の向上が認められ、レッドブルは第 4 時点（図 3）で認められ、ビタシーローヤルでは認められなかった。嗜好に関して調べたところ、普段からエナジードリンクを摂取し、好き嫌いは無かった。

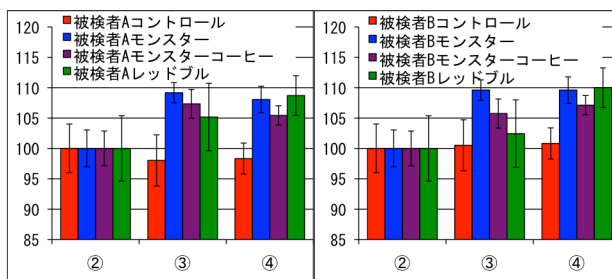


図 3 清涼飲料水・コーヒー飲料

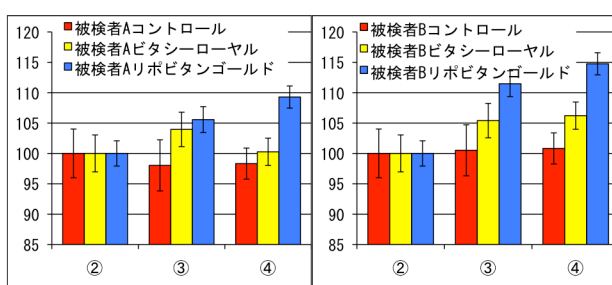


図 4 第 3 類・第 2 類医薬品

4. 考察

アメリカで販売されているモンスター・レッドブルにはタウリンが配合されているが、旧薬事法（医薬品医療機器等法）の規定により、日本で販売されているモンスター・レッドブルには配合されていない。タウリンが配合されるリポビタンゴールド・ビタシーローヤルはそれぞれ第 2 類・第 3 類医薬品である。今回の結果は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、カフェインが配合されていないビタシーローヤルで作業効率の向上が認められず、他のカフェイン配合エナジードリンクで作業効率の向上が認められたことから、過去の研究実習の結果と同様に、カフェインが中枢神経を刺激し、暗算作業効率を向上することが示唆された。しかし、カフェイン含有量との関連性は認められなかった。昨年度は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が、今年度は被験者の嗜好との関連性は認められなかった。

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、カフェインが配合されているエナジードリンクは作業効率を向上させることが示唆された。

参考文献

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

カフェインの暗算作業効率に及ぼす影響
 43100050 古野 翔大
 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、カフェイン

1. 緒言

カフェインは旧薬事法（医薬品医療機器等法）により劇薬に指定されている医薬品である。カフェインは脳皮質に作用して、精神、運動、知覚機能を高めることが知られている。今年度研究実習の永井によるとカフェイン配合エナジードリンクは作業効率を向上させると報告している。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おり、それらは本当に効果があるのかについて、クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として検討した。

2. 材料と方法

健康な被験者 A および B 二名に、各種飲料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、内田勇三郎が翻案したパーソナリティー検査である。

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）との間に飲料を摂取した。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。それぞれ 4 回行い、この摂取前後の暗算作業効率の変化から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（105mg）：ティーズコーヒー）、紅茶（175ml（87.5mg）：リプトンイエローラベル）、モンスターコーヒー（250g（160mg）：アサヒ飲料）およびコカコーラゼロ（250ml（31mg）：コカコーラ）、カフェイン非含有飲料としてコカコーラゼロフリー（250ml：コカコーラ）を用いた。

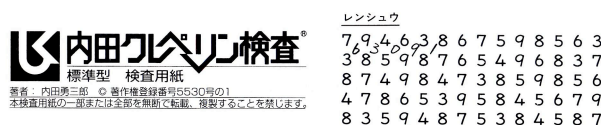


図 1 内田クレペリン検査用紙

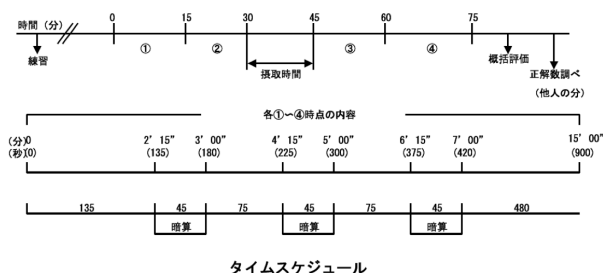


図 2 測定のタイムスケジュール

3. 結果

被験者 A においては、モンスターコーヒー（図 3）およびコカコーラゼロ（図 4）で作業効率の向上が認められ、

他においては認められなかった。

被験者 B においては、モンスターコーヒー（図 3）およびコカコーラゼロフリー（図 4）で作業効率の向上が認められ、コカコーラゼロは第 4 時点（図 4）で認められ、他においては認められなかった。

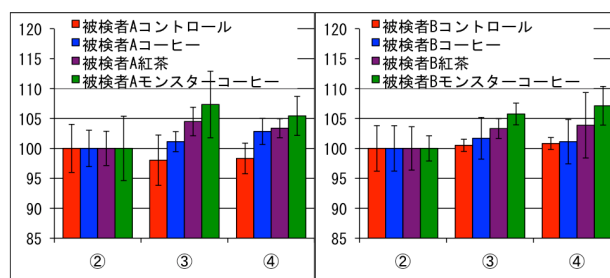


図 3 コーヒー・紅茶

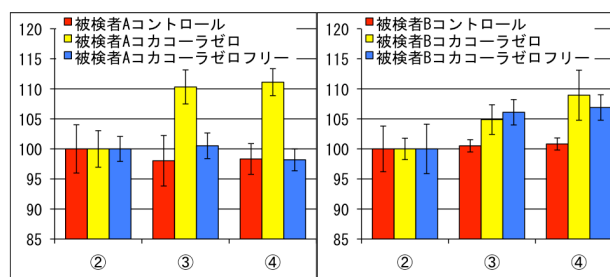


図 4 コーラ

4. 考察

今年度研究実習の永井によるとカフェイン含有量には依存していないが、カフェイン含有飲料において、カフェインが中枢神経を刺激し、暗算作業効率を向上すると示唆した。しかし、本研究結果ではカフェインの効果は認められなかった。そこで、味覚の好みについて検討すると、被験者 A・B ともに好みの飲料で暗算作業効率の向上が認められた。

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、カフェインによる暗算作業効率の向上は認められないが、味が好みのカフェイン含有飲料によって作業効率の向上が期待できることが示唆された。これは好みの飲料を摂取することによるリラックス効果も関与すると考えられた。また、いろいろなポジティブコントロール、ネガティブコントロールを用意して、カフェインの作用を注意深く検討する必要があると示唆された。

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。