

北海道大学歯学部6年生

45期生（平成27／28年度）

# 研究実習報告集

[第17号]

Research Training Reports

Hokkaido University School of Dental Medicine

# 北海道大学歯学部45期生研究実習の概要

## 研究実習実施期間

平成27年8月～平成28年7月（5年次2学期～6年次1学期）

## 研究実習発表会

平成28年6月13日（月）、17日（金）、20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）

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）

高橋 昌幸（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

顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

02114040 金生 茉莉 (指導教員:土門卓文)

顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

02114022 酒井 光太 (指導教員:土門卓文)

大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

02114026 鈴木 健一郎 (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

02110257 高橋 奏多 (指導教員:土門卓文)

舌神経に関する形態学的研究

02114043 山下 航司 (指導教員:土門卓文)

### 口腔生理学教室

$\gamma$ -オリザノールが肥満に伴って生じるレプチン抵抗性に与える影響

02114016 織田 祐太朗 (指導教員:船橋 誠、平井喜幸、久留和成、前澤仁志)

催吐薬エメチンの作用機序に関する研究:用量依存性と最後野ニューロン活動に対する影響

02110519 佐藤 孝紀 (指導教員:久留和成、平井喜幸、前澤仁志、船橋 誠)

水分摂取が安静時唾液分泌量に及ぼす影響

02114010 浜本 朝子 (指導教員:船橋 誠、久留和成)

精神性発汗に対する味覚刺激の影響

02110266 丸岡 春日 (指導教員:船橋 誠、久留和成)

### 硬組織発生物理学教室

マウス骨組織における sclerostin 陽性骨細胞の経時的 局在変化について

02110516 工藤 愛 (指導教員:長谷川智香、網塚憲生)

卵巣摘出(骨粗鬆症モデル)マウスにおける骨組織の継時的変化について

02114001 坂田 園実 (指導教員:長谷川智香、網塚憲生)

マウス骨組織における alkaline phosphatase および ENPP1 の局在について

02114025 鈴木 魁 (指導教員:長谷川智香、網塚憲生)

上顎第一大臼歯の近心および 遠心類側根の根管形態について

02114036 松本 恭 (指導教官: 山本恒之)

下顎第一大臼歯近心根の根管形態について

02114004 吉野 友都 (指導教官: 山本恒之)

### 口腔生化学教室

SIDT2 遺伝子の培養細胞における発現

02114012 安藤 龍汰 (指導教員:高橋昌幸、田村正人)

骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を亢進する因子

02114017 鎌田 正之 (指導教員:滝田裕子)

腫瘍由来培養細胞における SIDT1 mRNA の発現

02114009 巾 裕美子 (指導教員:高橋昌幸、田村正人)

継代骨髄間質細胞に及ぼす血清と BMP-2 による相乗効果

02114011 森豊 理英子 (指導教員:滝田裕子)

### 生体材料工学教室

マイクロナノパターンによる細胞移動性

02114003 澤村 萌香 (指導教員:赤坂 司)

架橋剤ゲニピン添加によるマイクロ・ナノパターン化ゼラチンの作製

43090031 玉川 誠一 (指導教員:赤坂 司)

歯根吸収抑制のための水酸化カルシウム製剤の象牙質内拡散評価

02114032 中道祥之 (指導教員:八若保孝、吉田靖弘)

う蝕リスク低減を目指したお菓子作り

02114033 西尾 優紀 (指導教員:阿部薫明)

代替甘味料の効果的な使用による齲蝕リスク軽減を目指した菓子作製

02114013 森本 友梨恵 (指導教員:阿部 薫明)

### 口腔病理病態学教室

低酸素条件下の HuR タンパク質の細胞内局在

02114014 江藤 朋憲 (指導教員:東野史裕)

LPS 刺激による HuR タンパク質の細胞質内局在変化

43100021 桂巻 卓史 (指導教員:東野史裕)

低酸素刺激による HuR タンパクの癌細胞内局在変化

02114042 小森 美穂 (指導教員:東野史裕)

HuR タンパク質の細胞質局在刺激の研究

02114029 鳥井 将貴 (指導教員:東野史裕)

エタノール刺激による HuR タンパクの細胞内局在変化

02110843 三浦 和仁 (指導教員:東野史裕)

腫瘍溶解ウイルスの効果増強条件の検討—アルコール刺激に対する HuR の局在

02114038 三原竜太郎 (指導教員:東野史裕)

### 口腔分子微生物学教室

がん化と mtDNA に関する分子生物学的研究

02110064 伊藤 航 (指導教員:安田元昭)

Real Time PCR による遺伝子コピー数の解析

02114020 小池 俊貴 (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

02114039 森 厚志 (指導教員:柴田健一郎、佐伯 歩)

*Streptococcus sanguinis* による IL-1 $\alpha$  産生誘導活性

02114041 森本 康仁 (指導教員:柴田健一郎、佐伯 歩)

*Candida albicans* 経口投与が抗体産生に及ぼす影響～経口免疫寛容を探る～

02114002 山本 大介 (指導教員:長谷部 晃)

### 細胞分子薬理学教室

Risedronate および Clodronate のアルカリ性ホスファターゼ活性阻害作用の Ca との拮抗性

02114018 河合 大史 (指導教員:鈴木邦明)

暗算作業効率に及ぼす各種飲料の効果

02114024 篠原 壮 (指導教員:吉村善隆)

Alendronate と Etidronate によるアルカリ性ホスファターゼ活性の阻害様式

02114007 中村 那月 (指導教員:鈴木邦明)

ガラスアイオノマーセメントの圧縮強さの経時的変化に関する研究

02114030 中戸川 矩之 (指導教員:中村光一、南川 元)

従来型ガラスアイオノマーセメントの物性に各種溶液が 与える影響に関する研究

02114006 脇田 修人 (指導教員:中村 光一、南川 元)

## 顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

02114040 金生 茉莉

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>解剖体2体、田川<sup>3)</sup>は解剖体4体、小谷地<sup>4)</sup>は6体、小鈴木<sup>5)</sup>は解剖体8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11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11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、83歳女性、86歳男性、87歳女性）のそれぞれ左・右側の頭頸部、計22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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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、86歳男性が両方とも2型、73歳男性、83歳女性では両側とも1型、93歳女性、

87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歳女性の両側、83歳女性左側、86歳男性右側は後方型、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、86歳男性左側、87歳女性左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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>の報告と異なる結果が得られ、吉田<sup>2)</sup>、田川<sup>3)</sup>、小谷地<sup>4)</sup>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11体の解剖体、左右計22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
- 4) 鈴木 静. 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44期生(平成26/27年度)研究実習論文報告集16 : 10, 2016

## 顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

02114022 酒井 光太

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<sup>1)</sup>は顔面動脈の屈曲形態について4つに分類し、小林ら<sup>2)</sup>はその走行に関して4つに分類している。

山本<sup>1)</sup>は屈曲に関しては加齢とともに屈型・強屈型が多く見られるようになる」と報告している。小林ら<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>は解剖体2体を、栗原<sup>4)</sup>は解剖体4体を、堀江<sup>5)</sup>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11体の左・右側22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<sup>1)</sup>と小林ら<sup>2)</sup>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11体(男性73、82、86、86歳、女性69、77、83、84、87、88、93、歳)の左・右側の頭頸部22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<sup>1)</sup>に、走行は小林ら<sup>2)</sup>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22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、83女左・右側、強屈型は86.86.73男左・右側、77.84女左側、82男右側、87.88.93女左・右側で観察された。

走行型では1型は86男左・右側、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、83女左・右側、87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22例中15例と、高頻度で観察された。この結果は、山本<sup>1)</sup>、市川<sup>3)</sup>、栗原<sup>4)</sup>、堀江<sup>5)</sup>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<sup>2)</sup>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8例、2型が11例、3型が3例観察され、市川<sup>3)</sup>、栗原<sup>4)</sup>、堀江<sup>5)</sup>による報告と類似していたが、小林ら<sup>2)</sup>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22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
- 6) 金沢美松. 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 44期生(平成27年度) 研究実習論文報告集 16:8, 2016

## 大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

02114026 鈴木 健一郎

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>は解剖体2体を、ジョン<sup>3)</sup>は解剖体4体を、今多<sup>4)</sup>は解剖体6体を、福士<sup>5)</sup>は解剖体8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11体の左・右側22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11体(男性73歳、82歳、86歳、86歳、女性69歳、77歳、84歳、88歳、93歳、83歳、87歳)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<sup>1)</sup>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、83歳女性の左・右側、87歳女性の左・右側、86歳男性の右側は口蓋棘を中心に内側と外側に分かれる3型を、86歳男性の左・右側、73歳男性の左・右側、86歳男性の左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<sup>1)</sup>は男性・女性ともに左・右側において4型はほとんど観察されないと報告している。今回の結果では、4型に関しては22症例中5症例が観察された。またその他は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<sup>1)</sup>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22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4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<sup>6)</sup>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) 福士莉穂. 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 44期生(平成26/27年度)研究実習論文報告集 16:12, 2016
- 6) 脇田稔、山下靖雄 監修. 口腔解剖学、医歯薬出版、2009.

## 茎突舌骨筋の停止部形態に関する形態学的研究

02110257 高橋奏多

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

### 1. 緒言

茎突舌骨筋の停止部の形態について、河西<sup>1)</sup>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<sup>2) 3)</sup>があり、その詳細に関してはよくわかっていない。澤田<sup>4)</sup>は解剖体2体を用いて茎突舌骨筋の停止部形態につ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5体の左・右側10例を用いて比較検討を行った。

今回、河西<sup>1)</sup>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5体（69歳女性、88歳女性、83歳女性、86歳女性、87歳男性）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10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

A型8例、B型1例、C型1例が観察された。

### 4. 考察

今回の結果、解剖体5体（10例）ではA型8例、B型1例、C型1例が観察され、河西の報告と類似していた。森ら<sup>2)</sup>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<sup>3)</sup>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5体（10

例）ではA型4例、B型1例、C型1例が観察され、森ら<sup>2)</sup>、上條<sup>3)</sup>の報告とも類似していた。

今回は10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。

### 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
- 4) 澤田武蔵. 茎突舌骨筋の停止部形態に関する形態学的研究, 44期研究実習報告書, p. 9, 2015.

## 舌神経に関する形態学的研究

02114043 山下 航司

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<sup>1)</sup>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<sup>2)</sup>は解剖体2体を、宗山<sup>3)</sup>は4体、柳<sup>4)</sup>は6体、水野<sup>5)</sup>は8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<sup>1)</sup>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11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11体（男性73、82、86、86歳、女性69、77、83、84、87、88、93歳、左・右側、計22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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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22例は矢木ら<sup>1)</sup>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、86歳男左・右、69歳女左・右、77歳女右、83歳女左・右、84歳女左・右、87歳女左・右、88歳女左・右、93歳女左・右の21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、86歳男右、69

歳女左・右、77歳女右、83歳女左・右、84歳女左・右、87歳女左、93歳女左・右の17例が上1/3型を示し、86歳男左、87歳女右、88歳女左・右の4例が中1/3型を示し、77歳女性右側は下1/3型を示した。

### 4. 考察

本研究では舌神経の起始については上方型が22例中21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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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22例中17例に観察され、中1/3型が22例中4例に観察され、下1/3型は22例中1例であった。矢木ら<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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<sup>1)</sup>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22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
- 5) 水野 麻梨子. 舌神経に関する形態学的研究、北海道大学歯学部6年生44期生（平成26/27年度）研究実習論文報告集13, 2016.

γ-オリザノールが肥満に伴って生じるレプチン抵抗性に与える影響

02114016 織田 祐太郎

指導教員：松橋 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：レプチン、γ-オリザノール、肥満

### 諸言

γ-オリザノールは米糠に含まれる成分であり、摂取することにより代謝性疾患予防に有効であることが報告されているが<sup>1)</sup>、高脂肪食飼育下のラットにおけるγ-オリザノールのレプチン抵抗性に与える影響については報告がなく、これを明らかにすることを目的とした。

### 方法

実験には7~9週齢 Wistar 系雄性ラット(200~250 g)20匹を使用した。飼育室内温度 23±1℃、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。普通食と高脂肪食の粉末試料を以下の組成(表1)に従い作製し自由摂取、自由飲水下で飼育した。

	普通食	高脂肪食
ミルクカゼイン	32.5%	21.8%
コーンスターチ	41.5%	41.5%
グラニュー糖	9%	9%
コーンオイル	5.3%	16%
KC フロック	4.5%	4.5%
ビタミン	0.9%	0.9%
ミネラル	6.2%	6.2%

表1. 各飼料の成分組成

コントロール群として高脂肪食のみにて飼育した群、高脂肪食に玄米粉を添加して飼育した群、及び高脂肪食にγ-オリザノール(東京化成工業株式会社)を添加して飼育した3群を用い、2週間の予備飼育期間後、レプチン(Cell Guidance Ltd)の皮下注射(0.1mg/ml)に伴う摂餌量/日の変化を7~10日間計測した。

### 結果

コントロール群である HF 群はレプチン投与後も、レプチン投与前と比較し摂餌量の有意な変化が見られないのに対し(図1)、玄米及びγ-オリザノールを添加した高脂肪食にて飼育した2群においては、レプチン投与により一時的な摂餌量の減少が観察された。(図2)

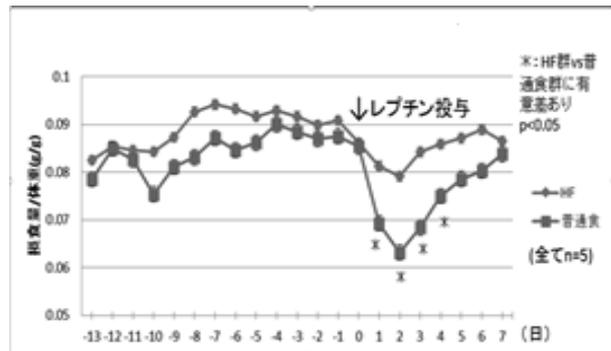


図1. HF群と普通食群の摂餌量比較

レプチン投与後1日目~4日目にHF群と普通食群に有意差が見られた。

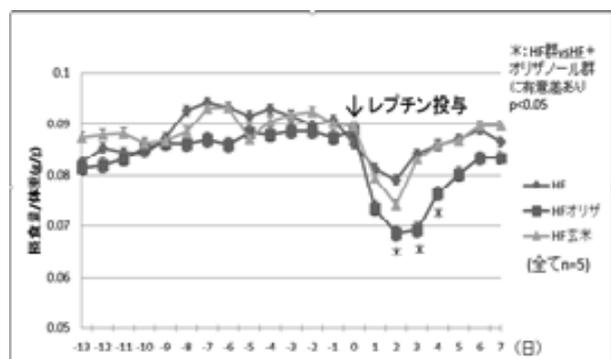


図2. 3群の摂餌量比較

HF+オリザノール群はレプチン投与後2日目~4日目にHF群との間で有意差が見られた。

### 考察

玄米及びγ-オリザノールは、高脂肪食摂取に起因するレプチン抵抗性を阻害する作用を有していることが示唆された。玄米添加群に有意な差が見られなかったのは、玄米粉の粒子が大きく、高脂肪食粉末と均等に混ざらないことでラットが玄米粉を避けて高脂肪食を摂食したことが原因ではないかと考えた。

### 参考文献

- 1) Wilson T. A., et al., Rice bran oil and oryzanol reduce plasma lipid and lipoprotein cholesterol concentrations and aortic cholesterol ester accumulation to a greater extent than ferulic acid in hypercholesterolemic hamsters. J. Nutr. Biochem. 18, 105-112 (2007).
- 2) Lin X., et al., The effects of a high fat diet on leptin mRNA, serum leptin and the response to leptin are not altered in a rat strain susceptible to high fat diet-induced obesity. J Nutr. 1998 Oct;128(10):1606-13.

## 催吐薬エメチンの作用機序に関する研究

—用量依存性と最後野ニューロン活動に対する影響—

02110519 佐藤孝紀

指導教員：久留和成、平井喜幸、前澤仁志、

船橋誠(口腔生理学教室)

キーワード：嘔吐、延髄最後野、エメチン

### 1. 緒言

エメチンは、催吐薬である吐根の成分であり非常に強い嘔気と嘔吐を誘発することが知られている。エメチンの催吐作用に関する先行研究には、犬を用いた実験 (Bhargava et al. 1961)<sup>1)</sup> とフェレットを用いた実験 (Endo et al., 2000)<sup>2)</sup> があり、エメチンは犬の延髄最後野 (嘔吐の化学受容器引き金帯: Chemoreceptor Trigger Zone, CTZ) に作用することと、フェレットの末梢における 5-HT<sub>4</sub> 受容体を介した作用であることが示唆されている。しかし、エメチンの催吐作用に関する機序の詳細については未だ解明されておらず、不明な点が多い。そこで、エメチンの用量と作用との関係を明らかにするとともに、CTZ である延髄最後野のニューロン活動を定量することにより、エメチンの中枢性作用機序の詳細を明らかにできるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

### 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。実験動物として、Wistar 系雄性ラット (250~350 g) を 45 匹使用した。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。ラットの餌は固形飼料を用い、24 時間自由摂取させ、水分摂取については毎日 23.5 時間の絶水後に蒸留水またはサッカリン溶液を 30 分間飲水させる飲水制限を行った。

エメチン投与による催吐作用発現の有無を検出する方法として、味覚嫌悪学習 (2 ボトル法) を用いた。サッカリンの味覚刺激を条件刺激、エメチンの腹腔内投与によって誘発される嘔気を無条件刺激として条件付けに用いた。エメチン (0.03, 0.1, 0.3, 0.5, 1.0, 3.0 mM) を投与して 2 日から、サッカリン溶液ボトルと蒸留水ボトルの 2 本を同時に呈示して、どちらのボトルからの摂水も自由に選択可能な条件下で摂水させ、蒸留水摂取量とサッカリン溶液摂取量を合わせた全摂水量に対するサッカリン溶液の摂取量の割合 (サッカリン嗜好性) を計測した。

行動実験後、パラホルムアルデヒドを用いてラットを灌流固定し、最後野を含む延髄の薄切切片 (厚さ 50 μm)

を作成した後、c-Fos 抗体を用いて免疫染色を行い、最後野における c-Fos タンパクの発現を計測した。統計学的解析には Tukey-Kramer 法を用いて、各グループ間の比較を行った。また有意水準は  $p < 0.01$  とした。

### 3. 結果

コントロール群 (n=7) では、サッカリン溶液の飲水割合がテスト 1 日目からテスト終了まで高値を示し、エメチン投与群 (各濃度 n=7) のサッカリン溶液の飲水割合はコントロール群と比較して用量依存的に低値を示した。高濃度エメチン投与群 (0.5, 1.0 mM) では、サッカリン溶液の飲水割合が非常に低く、コントロールと比較して有意に低い値であった。(図 1)

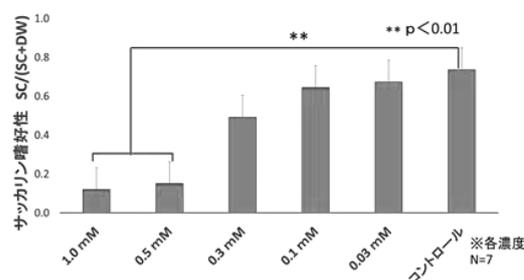


図 1 エメチン投与 2 日目のサッカリン嗜好

また、エメチンの用量反応曲線から、ED<sub>50</sub> を求めると約 0.35 mM と推定された。実際にエメチン 3.0 mM 投与を行うと、致死量に到ることが確認された (n=3, 未公表データ)。エメチン 1.0 mM 投与群において、c-Fos 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、c-Fos タンパク陽性細胞数の有意な増加を認めた。

### 4. 考察

エメチンは用量依存的に催吐作用を示し、その ED<sub>50</sub> は 0.35 mM と求められた。また、エメチン投与によって著明な催吐作用を示すラットの最後野に多数の c-Fos 陽性細胞が検出されたことから、仮説のとおり最後野ニューロン活動の変化が裏付けられ、エメチンの作用機序の一つとして、最後野ニューロンの活動上昇に伴う神経活動の変化が関与していること強く示唆された。

### 5. 参考文献

- 1) Bhargava, et al. (1961). Effect of ablation of the chemoreceptor trigger zone (CT-zone) on the emetic response to intraventricular injection of apomorphine and emetine in the dog. J. Pharmac. exp. Ther., 134, 329-331.
- 2) Endo T, et al. Neurochemistry and neuropharmacology of emesis -- the role of serotonin. Toxicology 2000;153:189-201

## 水分摂取が安静時唾液分泌量に及ぼす影響

02114010 浜本 朝子

指導教員：船橋 誠、久留 和成（口腔生理学教室）

キーワード：口腔乾燥症、水分摂取、安静時唾液

### 1. 緒言

近年、口腔乾燥を訴える高齢患者が急速に増加している。安静時唾液は、加齢に伴い減少することが知られており、高齢者の約25%は、口腔乾燥症やこれに関連した症状があると言われている。<sup>1)</sup>そこで本研究では、安静時唾液分泌量に影響を及ぼす因子である体内水分量に着目し、水分摂取により安静時唾液量がどのように変化するかを明らかにすることを目的とし、実験を行った。

### 2. 方法

健康成人8名（男性4名、女性4名、平均年齢23.5才）を被験者とした。水分摂取前の安静時唾液分泌量を3回測定し、その後水分（水:200, 500ml; スポーツドリンク:200, 500ml）を摂取させ、摂取直後から90分間15分毎に測定を行った。水分量を一定にするため、測定当日は朝から測定終了まで絶食させ、水分摂取は9時までとした。測定は、12時から14時半の間で行い、ワッテ法を用いて唾液量を測定した。

### 3. 結果

図1は、水200mlと水500mlを摂取した際、何分後に安静時唾液量が最大値をとったかを示している。水分摂取30分後から最大値をとる人数が増加している。このことから、水分摂取が安静時唾液量に影響を与えるまで、30分程時間がかかることがわかる。

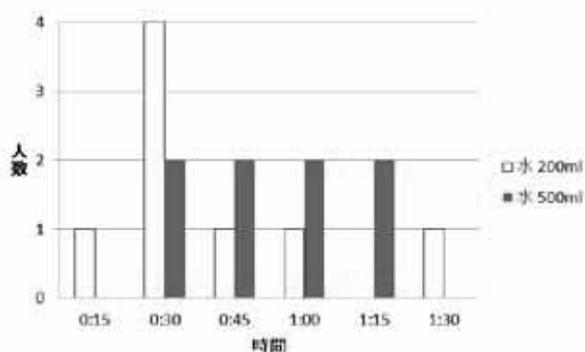


図1 安静時唾液量が最大値を示した時間と人数

水分摂取前3回の安静時唾液量の平均値である基準値を100%とし増減を比較すると、水分摂取直後から7回の安静時唾液量が基準値より常に高値を示した者は、水200mlで1名、水

500mlで2名、スポーツドリンク200mlで0名、スポーツドリンク500mlで2名であり、その他の被験者においては、水分摂取後の安静時唾液量の定常的な増加は見られなかった。

この8名の変化率の平均をとると、水200mlと水500mlでは、水分摂取75分後に最大値をとったが、基準値と比較して有意差は見られなかった（図2）。スポーツドリンクでは、200mlは30分後に最大値のピークがあり、500mlは45分後に最大値のピークがあるという異なる増加・減少傾向が見られた。しかし、こちらも基準値と比較して有意差は見られなかった（図3）。

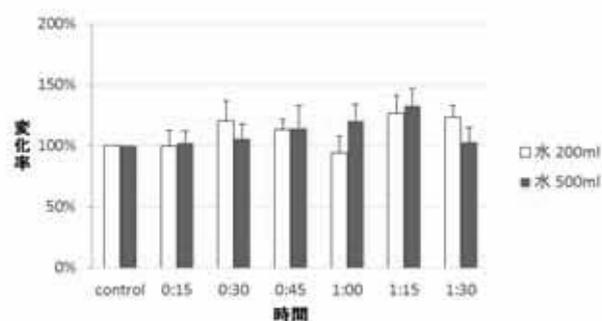


図2 水200,500mlの変化率

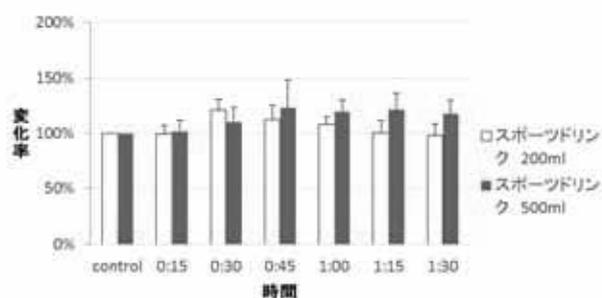


図3 スポーツドリンク200,500mlの変化率

### 4. 考察

本研究結果から、水分摂取により生じる急性的な安静時唾液分泌量の増加には個人差が認められ、被験者全体を通し、平均として有意差は認められなかった。しかし、少なくとも水分摂取により、急性的な安静時唾液分泌量の減少は起こらないことがわかった。今後、口腔乾燥症の高齢者において同様の実験を行うことが課題となった。

### 5. 参考文献

1) 基礎歯科生理学 第5版、森本俊文 山田好秋、420頁、2012年、医歯薬出版

## 精神性発汗に対する味覚刺激の影響

02110266 丸岡 春日

指導教員：船橋 誠、久留 和成(口腔生理学教室)

キーワード：精神性発汗、味覚刺激

### 1. 緒言

味覚性発汗と精神性発汗との相互関連の有無について興味を持ち、精神性発汗に対する味覚刺激の影響を明らかにするため、実験を行った。

### 2. 方法

健康成人 14 名(男性 5 名、女性 9 名、20~25 歳)を被験者とした。精神性発汗は、直径 60 mm 重さ約 100 g のボールを 60 cm の高さから落下させ、右手で掴む動作(ボールキャッチ: BC)にて生じさせた。精神性発汗の測定は、皮膚電気抵抗測定装置(UFI)を用いて行い、安静座位にて各試行から 10 秒間の発汗量を、左手の第 3・4 指に接続した電極から計測した。味覚刺激は、各味溶液をシリンジで 0.2 mL 舌背に滴下した。BC 時には「ボールキャッチします。」と言ってから、味刺激時には「〇〇味入れます。」と告知してから行った。

[味溶液] スクロース水溶液 (250 mM)、塩化ナトリウム水溶液 (250 mM)、クエン酸水溶液 (150 mM)、キニーネ水溶液 (15 mM)

[実験 1] 蒸留水での刺激を 3 回行った後、四基本味をランダムに、各味 4 回ずつ計 16 回の刺激を行い、その時の精神性発汗を計測した。

[実験 2] BC のみ、蒸留水・甘味・塩味・酸味・苦味刺激下での BC の順で、これを 1 セットとし、その時の精神性発汗量を計測した。これを計 5 セット繰り返した

### 3. 結果

[実験 1] 各味刺激では、精神性発汗は見られなかった。

[実験 2] BC のみの場合、回を重ねると発汗量が初回に比べ有意に減少し (\* $p < 0.05$ )、近似直線の傾きは約 0.07 だった。(図 1) 蒸留水・甘味・酸味・苦味は発汗量に減少傾向が見られるものの、初回の発汗量との有意差は得られなかった。塩味では近似直線の傾きが、本実験で用いた全味覚刺激中最小 (0.01) で、BC の回数を重ねても発汗量の減少は見られなかった。

また、各味覚刺激下での BC による発汗量を BC のみの場合と比較すると、初回では全刺激で発汗量が有意に抑制されているが、4 回目以降には有意差が認められなくなり、塩味では 5 回目で BC のみの発汗量を上回っていた。

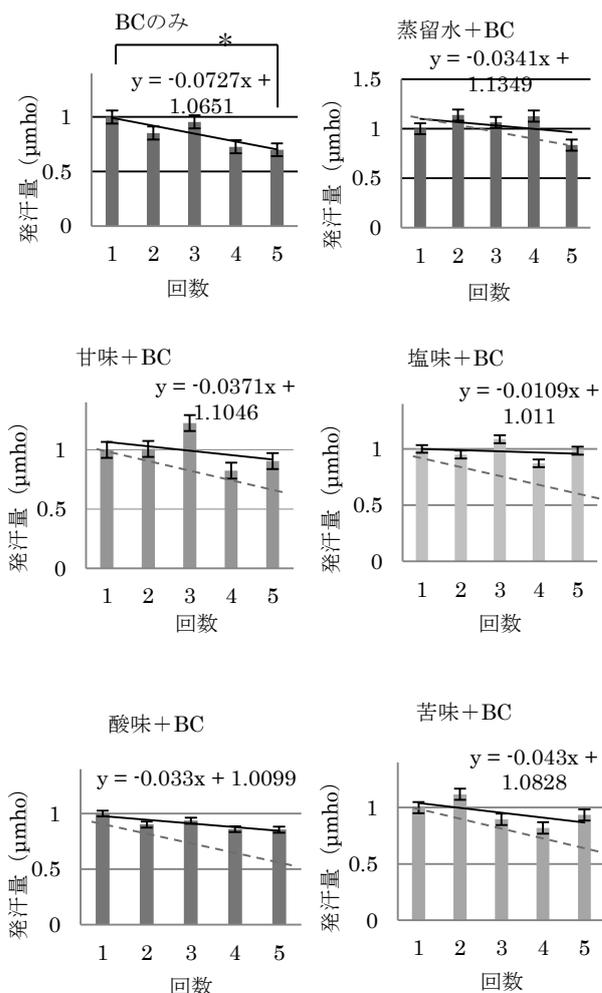


図 1 各刺激下での精神性発汗量の変化

グラフ内の実線は各回における発汗量の近似直線である。各味刺激のグラフに BC のみの場合の近似直線を点線で示す。

### 4. 考察

味覚刺激による手指の発汗は生じないことが確認できた。精神性発汗が BC の回を重ねると減少するのは、慣れによるものだと考えられる。塩味以外の刺激は、精神性発汗の抑制も続きやすく、慣れを遅らせるのに対して、塩味は精神性発汗の抑制がすぐに効かなくなるため、慣れを生じさせないことがわかった。各刺激において精神性発汗が減少したのは、味溶液が何らかの機序により交感神経活動を抑制したのではないかと推察された。

### 5. 参考文献

- 1) 津田孝雄 ヒトの発汗活動と神経伝達 (2002)
- 2) 中村嘉男、森本俊文 基礎歯科生理学 医歯薬出版 1998

## マウス骨組織における sclerostin 陽性骨細胞の経時的局在変化について

02110516 工藤 愛

指導教員：長谷川智香、網塚憲生（硬組織発生生物学教室）

キーワード：骨細胞、sclerostin

### 1. 緒言

骨細胞に特異的に発現する sclerostin は、Wnt シグナルを介して骨芽細胞分化を抑制する因子である。骨細胞における sclerostin の発現は、個体成長に応じて変化する可能性があるため、マウスの成長過程における sclerostin 陽性骨細胞の局在を組織化学的に解析した。

### 2. 方法

胎生 18 日齢および生後 1 日齢、1, 2, 4, 8, 20 週齢の C57BL/6J マウスをアルデヒド固定し、右側大腿骨・脛骨を摘出した。これらのサンプルは、EDTA 脱灰後、パラフィンに包埋し、厚さ 5 $\mu$ m の切片を作製した。組織切片上にて H-E 染色、組織非特異型 alkaline phosphatase (ALP: 骨芽細胞のマーカー)、sclerostin 免疫染色を行った。また、sclerostin 陽性・陰性骨細胞の数を計測し、Tukey-Kramer 法を用いた多重比較検定を行った。

### 3. 結果

胎生 18 日齢から生後 8 週齢と週齢が進むにつれ、大腿骨の長径・幅径が増加しており、骨端軟骨直下には多数の骨梁が観察された。しかし、生後 20 週齢では、成長板の幅が狭くなり、また、骨梁数も減少していたことから、成長は終了していることが推測された。骨梁が活発に形成されて間もない一次骨梁（骨幹端成長板直下）の領域と、骨改造を受けた二次骨梁（骨幹端骨梁の骨幹側）の領域に分けて、解析した結果を示す。

#### I. 一次骨梁

##### (1) H-E 染色, ALP 免疫染色

一次骨梁を観察すると、胎生 18 日齢から生後 2 週齢のマウスでは、わずかな骨基質を有する骨梁上に、細胞体がふくよかな多数の ALP 強陽性骨芽細胞が局在したが、骨細胞はほとんど観察されなかった。一方、生後 4 週齢と 8 週齢のマウスでは、骨基質の量が増加し、内部に円形もしくは類円形を呈する骨細胞が認められた。生後 20 週齢では、より多くの骨細胞が観察されたが、骨芽細胞は楕円形となり、ALP 陽性反応が減弱するとともに、その細胞数は減少する傾向が認められた。

##### (2) sclerostin 免疫染色

一次骨梁の領域において、生後 2 週までは、骨細胞は明らかなスクレロスチン陽性反応を有さず（図 1 A-D）、生後 4 週齢（図 1 E）になると、僅かな骨細胞がスクレロスチン陽性反応（黒矢印）を示しはじめた。さらに、生後 8、20 週齢（図 1 F, G）と成長するに従って、スクレロスチン陽性を示す骨細胞が有意に増加していた。

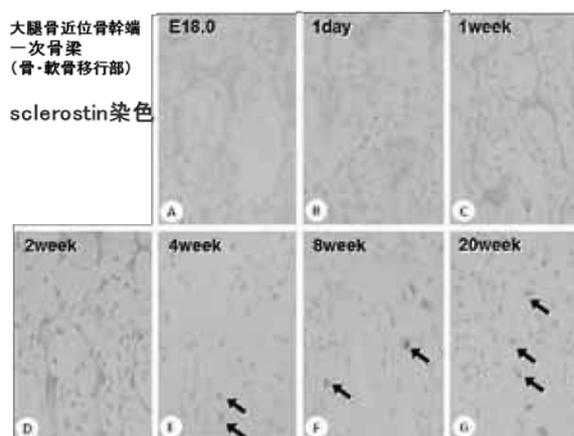


図 1 マウス大腿骨一次骨梁における sclerostin 免疫染色像

#### II. 二次骨梁

##### (1) H-E 染色, ALP 免疫染色

二次骨梁を観察すると、胎生 18 日齢の骨基質には骨細胞が観察され、その後、成長と共に、骨細胞の形は類円形からやや扁平なものへと変化していた。ALP 免疫染色については、生後 1 週齢までは、骨梁のほぼ全面が ALP 陽性骨芽細胞で覆われていたが、生後 2 週齢以降では、ALP 陽性骨芽細胞で覆われる部位とそうでない部位が存在し、ALP 陽性細胞層の厚みも薄くなる傾向が認められた。

##### (2) sclerostin 免疫染色

二次骨梁の領域では、生後 1 日齢（図 2 B）から、骨基質の内部にごく弱いスクレロスチン陽性骨細胞（黒矢印）が出現し、一次骨梁と同様に、成長と共にその数が有意に増加していた（図 2 D-G）。

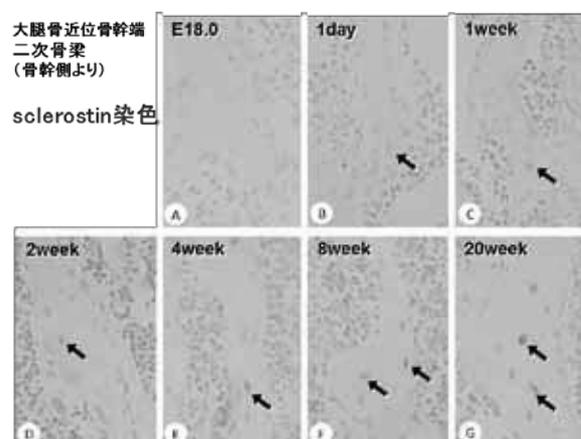


図 2 マウス大腿骨二次骨梁における sclerostin 免疫染色像

### 4. 考察

ALP 陽性骨芽細胞が豊富に存在する一次骨梁では、スクレロスチン陽性骨細胞は少なく、また、その出現も 4 週齢以降から認められた。一方、弱い ALP 陽性反応を示す二次骨梁では、生後 1 日から、多数のスクレロスチン陽性骨細胞を認めた。従って、マウスの成長過程において、一次骨梁よりも二次骨梁にて骨細胞は早期からスクレロスチンを産生する可能性が推測された。

## 卵巣摘出（骨粗鬆症モデル）マウスにおける骨組織の経時的変化について

02114001 坂田 園実

指導教員：長谷川 智香、網塚 憲生（硬組織発生物学教室）

キーワード：骨粗鬆症，OVX マウス，骨代謝，破骨細胞，骨芽細胞

### 1. 緒言

1941年にAlbrightらが骨粗鬆症患者の臨床像を検討したところ、その大半が自然閉経後の発症であることをつきとめた。女性の血中エストロゲンは40歳以降で徐々に低下しはじめ、平均閉経年齢の50歳以降になると急激に低下する。骨保護作用に重要な血中のエストロゲンの急激な低下は、骨代謝に大きなダメージを与え、急激な骨量減少を引き起こす。これを閉経後骨粗鬆症という。卵巣摘出モデルマウス（OVXマウス）は、卵巣を摘出することによりエストロゲンが欠乏し、閉経後骨粗鬆症と同様の症状を呈することが知られている。そのためOVXマウスは、代表的な骨粗鬆症病態モデル動物として骨粗鬆症治療薬の薬効評価に標準的に用いられる。また、OVXラットにおける骨の経時的変化についての報告は散見されるが、OVXマウスの骨の経時的な変化に関しては、ほとんど認められない。そこで本研究実習では、OVXマウスの骨組織が、経時的にどのような変化を示すのか組織化学的に解析を行った。

### 2. 方法

生後8週雌性マウスにOVXを行い、2週、4週、6週、8週でアルデヒド溶液による灌流固定を行った。摘出した大腿骨・脛骨を10%EDTAで脱灰後、通法にてパラフィン包埋を行い、H-E染色、TRAP（破骨細胞のマーカー酵素）染色、ALP（alkaline phosphatase、骨芽細胞のマーカー酵素）およびCathepsin K（破骨細胞が産生する基質分解酵素）の免疫組織化学を行った。また骨形態計測は大腿骨遠位端成長板直下600×600 $\mu\text{m}$ の領域で計測し、統計はTukey-Kramer法を用いて解析した。なお、マウスの固定ならびに組織切片の薄切は、動物実験実施者訓練を受けた指導教員の手技を見学させていただいた。

### 3. 結果

H-E染色像を観察すると、大腿骨遠位端において骨量が経時的に減少していた（図1）。骨形態計測を行ったところBV/TV（骨量）やTb.N（骨梁数）は、OVX後経時的に減少していたが（BV/TV: 18.7, 14.6, 9.8, 7.9, 6.4%, Tb.N: 0.72, 0.62, 0.40, 0.32, 0.25/mm）、Tb.Sp（骨梁間隙）は経時的に増加していた（Tb.Sp: 1.1, 1.4, 2.3, 3.7, 4.7 $\mu\text{m}$ ）。一方、Tb.Th（骨梁幅）の値は、統計学的な有意差が認められなかった。

ALP陽性骨芽細胞系細胞の領域は、OVX前と比較して、経時的に減少しており（5.2, 3.9, 2.6, 2.1, 1.5%）、また、TRAP陽性破骨細胞数も、OVX前と比較して、6週、8週で有意に減少していた（105, 93, 82, 50, 37個）。

TRAP(+)Oc.N/BS（骨面に対するTRAP陽性破骨細胞数）は、OVX前と比較し、4週で有意に増加し、その後緩やかにOVX前の状態に戻っていた（0.012, 0.013, 0.018, 0.017, 0.014個/ $\mu\text{m}$ ）。さらに、Cathepsin K陽性破骨細胞数も、OVX前と比較して、6週、8週で有意に減少していた（89, 80, 85, 38, 30個）。骨面に対するCathepsin K陽性破骨細胞の割合（Cathepsin K(+)Oc.N/BS）は、OVX前と比較して4週で有意に増加し、その後はOVX前の状態に戻っていた（0.011, 0.011, 0.018, 0.012, 0.012個/ $\mu\text{m}$ ）。

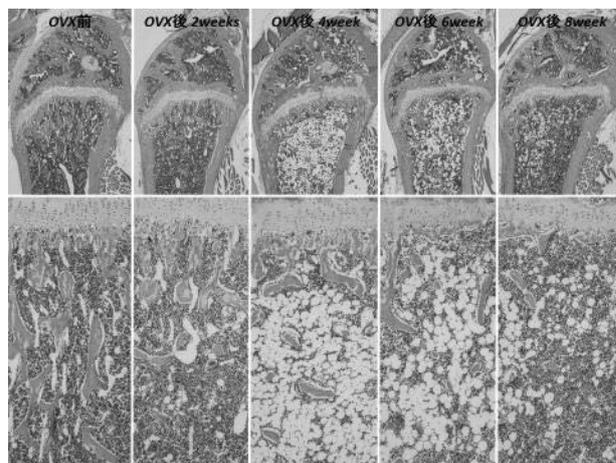


図1 卵巣摘出前、摘出後2, 4, 6, 8週のマウス大腿骨におけるH-E染色像

### 4. 考察

今回の解析結果は、過去の報告と同様に、OVX後に骨量の減少を示すものであった<sup>1,2)</sup>。OVX後、経時的にTRAP陽性破骨細胞数が減少したものの、TRAP(+)Oc.N/BSの値は4週で有意に増加していることから、骨表面に対する破骨細胞数は増加していることが推測された。また、基質分解酵素であるCathepsin K陽性破骨細胞数とCathepsin K(+)Oc.N/BSの値も、TRAPと同様の傾向を示したことから、OVX後、骨組織に局在する破骨細胞は、活発に骨吸収を行っている可能性が推察される。しかしながら、術後6, 8週齢では、これらの値に有意差が認められなかったことから、生後8週齢OVXマウスでは、術後4週程までは骨芽細胞と破骨細胞の活性化は持続またはやや増加するが、それ以降では、共に低下してゆくことが示唆された。

### 5. 謝辞

今回の研究実習において、ご指導いただいた網塚憲生教授、長谷川智香助教をはじめ硬組織発生物学教室の皆様にご感謝いたします。

### 6. 参考文献

- 1) T. J. Wronski, L. M. Dann and S. L. Horner : Time Course of Vertebral Osteopenia in Ovariectomized Rats. Bone 10:295-301, 1989.
- 2) T. Tanizawa, A. Yamaguchi, Y. Uchiyama, C. Miyaura, T. Ikeda, S. Ejiri, Y. Nagai, H. Yamato, H. Murayama, M. Sato, T. Nakamura : Reduction in Bone Formation and Elevated Bone Resorption in Ovariectomized Rats With Special Reference to Acute Inflammation. Bone 26:43-53, 2000

## マウス骨組織における alkaline phosphatase および ENPP1 の局在について

02114025 鈴木 魁

指導教員：長谷川智香、網塚憲生（硬組織発発生生物学教室）

キーワード：alkaline phosphatase, ENPP1, 骨芽細胞, 骨細胞

### 1. 緒言

組織非特異型アルカリフォスファターゼ (ALP) はリン酸エステルを加水分解する酵素であり、hydroxyapatite の結晶成長を阻害するピロリン酸を分解することが主要な役割として知られている。一方、ecto-nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (ENPP1) はヌクレオシド三リン酸などからピロリン酸を合成する酵素として知られている。これらの酵素は、骨組織において局所のリン調節因子として作用し、骨基質石灰化において重要な役割を担う可能性が示唆されている。しかし、骨組織におけるこれら酵素の詳細な局在は未解明であるため、本研究実習では ALP および ENPP1 の骨組織における局在を組織化学的に解析した。

### 2. 方法

生後8週齢の C57BL/6J マウスをパラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、右側大腿骨・脛骨を摘出した。これらのサンプルは、EDTA 脱灰後、パラフィンに包埋し、厚さ 5 $\mu$ m の切片を作製した（ここまでの過程は、動物実験実施者等教育訓練を受けた指導教員の手技を見学するのみとした）。組織切片上にて H-E 染色、組織非特異型 alkaline phosphatase (ALP)、ecto-nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase 1 (ENPP1) 免疫染色を行った。

### 3. 結果

#### (1) H-E 染色

大腿骨骨幹端成長板直下の一次骨梁領域(図 1A)を観察すると、内部に軟骨コアを含む骨梁が認められた。このような骨梁表面には細胞体のふくよかな活性型骨芽細胞が局在していた。また、骨梁を構成する骨基質内部には楕円形の骨細胞が埋め込まれていた。一方、皮質骨領域(図 1B)では、骨基質表面に骨芽細胞が一行に配列しており、その骨髄側には扁平な前骨芽細胞が局在していた。また、皮質骨内部に骨細胞が観察された。

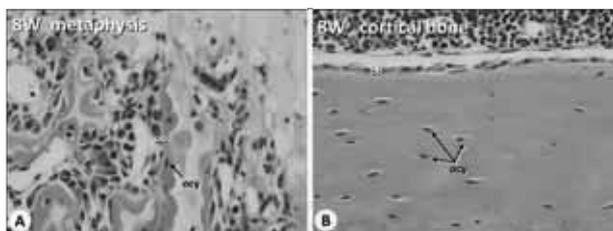


図 1 マウス大腿骨骨幹端部一次骨梁および皮質骨における H-E 染色像 ocy 骨細胞 ob 骨芽細胞

#### (2) ALP, ENPP1 免疫染色

一次骨梁では、骨梁表面の骨芽細胞系細胞（骨芽細胞および前骨芽細胞）に茶色で示される ALP 強陽性反応ならびに ENPP1 陽性反応が観察された（図 2 A, B）。なお、骨基質内部の骨細胞（図 2A, B）は、ENPP1 陽性反応を示すものの、ALP 陽性反応は示さなかった。

皮質骨を観察すると、一次骨梁と同様に、ALP は骨芽細胞および前骨芽細胞に局在したが（図 2C）、ENPP1 は主に骨芽細胞に認められた（図 2D）。また、前骨芽細胞には強い ENPP1 陽性反応は認められなかった。さらに、一部の骨細胞（図 2D）に ENPP1 陽性反応が観察された。

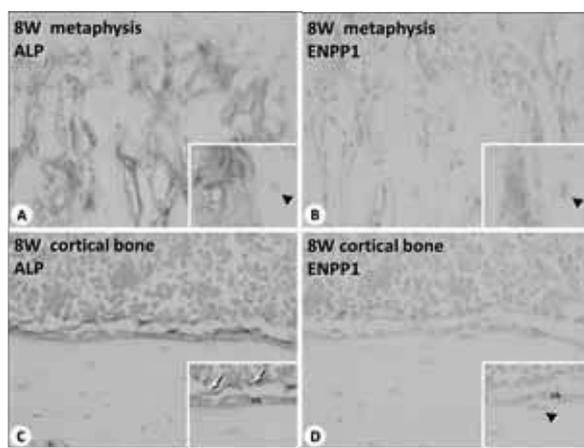


図 2 マウス大腿骨骨幹端部一次骨梁および皮質骨における ALP, ENPP1 免疫染色像 ob: 骨芽細胞 黒矢頭: 骨細胞 黄矢印: 前骨芽細胞

### 4. 考察

野生型マウスの骨組織において、ENPP1 は骨細胞や骨芽細胞といった石灰化基質に直接接する細胞に優位に発現することが推測された。一方、ALP は骨芽細胞および前骨芽細胞に発現していた。またその発現は、骨芽細胞よりも石灰化基質から離れた前骨芽細胞で、より強いことが推察された。以上より、ALP によるモノリン酸産生は広範囲にわたった供給を、一方、ENPP1 で産生されたピロリン酸は局所的な石灰化抑制を示すと考えられた。

### 5. 謝辞

今回の研究実習において、丁寧にご指導いただいた網塚憲生教授ならびに長谷川智香助教をはじめ硬組織発発生生物学教室の皆様にご心より感謝いたします。

上顎第一大臼歯の近心および遠心頬側根の根管形態について

02114036 松本 恭

指導教官：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：上顎第一大臼歯、根管形態、透明標本

【緒言】

根管治療を行なう上で、根管形態を十分に理解することは極めて重要である。上顎第一大臼歯の近心頬側根は、頬舌的に圧平され約半数が2根管性であることがよく知られている。研究実習を機会に、咬合の要である上顎第一大臼歯の近・遠心頬側根の根管形態を、実際に自分で調べたいと思い本研究を立案した。方法としてレジン包埋した透明標本<sup>1-3)</sup>を用いた。

【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%ホルマリン溶液に保存されていた根面に齶蝕のない上顎第一大臼歯、右44本、左30本、計74本を材料とした。60℃、30%水酸化カリウム溶液を用いて歯牙表面の軟組織を化学的に除去し、5%蟻酸水溶液で4週間脱灰した。墨汁と標本をビーカーに入れ真空容器内に置き、真空ポンプを用いて陰圧により根管内に墨汁を流入させた。80%、90%、100%、無水アルコールで1日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルで標本を透明にした。ついでスチレンモノマー、スチレンモノマー：ポリエステルレジン（リゴラック）の1：1、1：3混合液、および純レジン（硬化剤入り）の順に標本を浸漬しレジンを浸透させた。重合前に標本表面の余剰レジンを筆でふき取り紫外線重合器で1日間重合した。

【結果】

根管形態を以下の3種類に分類した。

- ①1根管が1つの根尖孔に開孔する【単純根管】、
- ②2根管が2つ以上の根尖孔に開孔する【完全分岐根管】、
- ③2根管が合流し1つの根尖孔に開孔する【不完全分岐根管】。

3種類の根管形態の出現歯数と頻度を表1に示した。

表1：各根管形態の出現指数と頻度  
上顎第一大臼歯 近心頬側根

	右		左		合計	
単純根管	23本	52.3%	16本	55.2%	39本	53.4%
不完全分岐根管	5本	11.4%	2本	6.9%	7本	9.6%
完全分岐根管	16本	36.4%	12本	41.4%	28本	38.4%
	44本		30本		74本	

上顎第一大臼歯 遠心頬側根

	右		左		合計	
単純根管	39本	88.6%	28本	96.6%	67本	91.8%
不完全分岐根管	5本	11.4%	0本	0%	5本	6.8%
完全分岐根管	0本	0%	1本	3.4%	1本	1.4%
	44本		29本		73本	

近心頬側根の約半数が単純根管で、残りが2根管性（分岐根管）であった。遠心頬側根では、約9割が単純根管であり近心頬側根と顕著な差がみられた。

【考察】

本研究結果と過去の研究実習の結果<sup>1-3)</sup>とを比較しやすいようにグラフにまとめた（図1）。

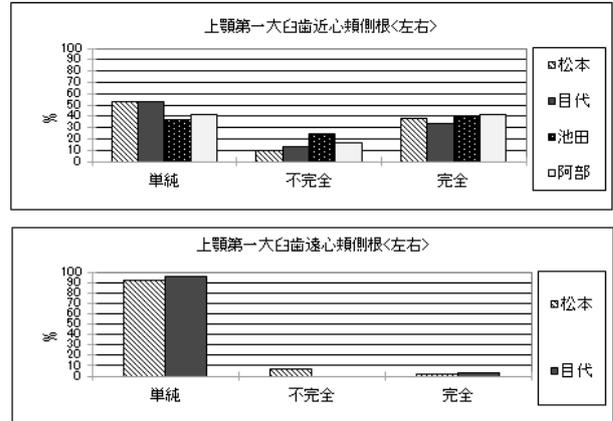


図1：上顎第一大臼歯の根管形態を研究者別に示したグラフ

一般に、第二象牙質、修復象牙質、象牙質粒等の沈着により経年的に根管は狭くなり、単純根管は不完全分岐根管へ移行する<sup>4)</sup>。本研究を含めた全ての報告で、標本提供者の年齢は不明なので、各報告で様々な年代の歯が混在していると思われる。従って、単純根管と不完全分岐根管の頻度を個別に算出し考察してもあまり意味はない。そこで、「単純根管と不完全分岐根管」を同種のものとして頻度を合算すると、本研究では63.0%、目代66.1%、池田61.2%、阿部58.2%、とかなり近似した数値となった。一方、完全分岐根管は各報告ではほぼ40%であり、この形態は加齢による形態移行を起こしにくいことが示唆された。

以上から、「上顎第一大臼歯近心頬側根においては、歯根完成直後であれ40%以上は分岐根管で、経年的にその頻度は増す。遠心頬側根では、全年代で90%以上が単純根管である」ということを本研究の結論としたい。単純化してあるが今後の臨床に応用できると考える。

本研究では根管形態を3種類のみに分類したが、根管の太さ、分岐の高さ、側枝の有無や形態などにも各歯に独自のバリエーションがみられ、実際はより複雑であった。根管形態は個人によって異なり、同一個人でも経年的に変化し続けることを再認識した。

作製した透明標本は、藤田<sup>4)</sup>が述べているように「まことに見事であり永久に保存することができる」。根管治療の際に、患者さんに歯根・歯髓形態を実際に見ていただき、病状の正しい理解とセルフケアに対するモチベーションの向上につなげていきたいと考えている。

【参考文献】

- 1) 池田欣希：上顎第一大臼歯近心頬側根の根管形態について 研究実習論文報告集 [第5号]：41-42、2004
- 2) 目代匡：上顎第一大臼歯の近心および遠心頬側根の根管形態について 研究実習論文報告集 [第10号]：51-52、2009
- 3) 阿部真也：上顎第一大臼歯近心頬側根の根管形態について 研究実習論文報告集 [第12号]：41-42、2011
- 4) 藤田恒太郎：歯髓腔の形態、藤田恒太郎著：歯の解剖学 第22版、21-25、1995、金原出版、東京

## 下顎第一大臼歯近心根の根管形態について

02114004 吉野 友都

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

根管治療の成績向上には根管形態の十分な理解が不可欠である。下顎第一大臼歯は上顎同名歯とともに咀嚼と咬合において特に重要な歯であり、複雑な根管形態を有することが知られている。そこで、下顎第一大臼歯の透明標本作製し、近心根の根管形態を自分自身で観察し理解することを目的として本研究を行った。

### 材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室が所有し、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 28 本、左 29 本）を材料とした。60℃の 30%水酸化カリウム水溶液で 30 分（15 分×2 回）処理し、流水下で歯ブラシで刷掃し軟組織を除去した。5%蟻酸で 1 週間脱灰した後、表面を刷掃し再び 3 週間脱灰した。ピーカーに墨汁を入れ標本を浸漬し、真空チャンバー内で真空ポンプにより 20 分（10 分×2 回）減圧して根管内に墨汁を流入させた。歯ブラシで刷掃後、80%、90%、100%、および無水アルコールでそれぞれ 1 日ずつ脱水した。サリチル酸メチルで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、1:3 混合液、0.3%ベンゾイン入り 100%リゴラックにそれぞれ 1 日ずつ浸漬しレジンを浸透させた。筆で標本表面のレジンを軽く拭い、歯冠を下にして台に立てかけ紫外線重合器で 1 日間重合した。

### 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：1 本の根管が 1 つの根尖孔に開孔するもの
- ② 完全分岐根管：2 本の根管が 2 つ以上の根尖孔に開孔するもの
- ③ 不完全分岐根管：2 本の根管が合流し 1 つの根尖孔に開孔するもの

各根管形態の出現歯数と頻度を表 1 に示した。

表 1：下顎第一大臼歯近心根の  
各根管形態の出現歯数と頻度

	右 数 (%)	左 数 (%)	計 数 (%)
単純根管	7 (25.0)	8 (27.6)	15 (26.3)
完全分岐根管	13 (46.4)	13 (44.8)	26 (45.6)
不完全分岐根管	8 (28.6)	8 (27.6)	16 (28.1)
計	28	29	57

### 考察

加齢による二次象牙質の形成や局所的な修復象牙質の添加により、単純根管は経年的に狭窄し不完全分岐根管へと移行する。一方、完全分岐根管には加齢による形態移行は起きにくいと考えられる。本研究でも後述する過去の研究においても、標本提供者の年齢が不明のため異なる年代の歯がランダムに混在していると思われる。このような状況で、単純根管と不完全分岐根管の頻度を各々算出して比較・考察してもあまり意味はない。そこで、年齢の因子を除外し「単純根管＋不完全分岐根管」と「完全分岐根管」の 2 つに分類して考察する。

本研究では、下顎第一大臼歯近心根における「単純根管＋不完全分岐根管」の出現頻度は 54.4%、「完全分岐根管」は 45.6%であった。藪内らは「単純根管＋不完全分岐根管」57.7%、「完全分岐根管」40.4%（観察法・標本数ともに不明：赤井<sup>1)</sup>より引用）、三橋<sup>2)</sup>は透明標本（標本数 53）により「単純根管＋不完全分岐根管」60.3%、「完全分岐根管」39.6%、といずれも本研究とほぼ近似した数値を報告している。奥川<sup>3)</sup>は「単純根管＋不完全分岐根管」66.7%、「完全分岐根管」33.3%と報告しており、本研究とは 10%以上の差がある。奥川も透明標本を用いているが、標本数が 36 本と少なくこの影響が出たのかもしれない。以上から、「下顎第一大臼歯近心根においては、歯根完成直後であってもおおよそ 40%以上が分岐根管であり、経年的にその頻度は増してゆく」ことを本研究の結論とした。

日本人を対象にした研究では、「単純根管＋不完全分岐根管」は「完全分岐根管」よりも高頻度で出現する。Vertucci と Fla<sup>4)</sup> は、透明標本（標本数 100）により「根尖孔が 1 つのもの（本研究の単純根管＋不完全分岐根管に相当）」40.0%、「根尖孔が 2 つのもの（完全分岐根管に相当）」60.0%と報告しており、日本人を対象とした研究結果とは異なる。日本人以外を対象とし、かつ透明標本を使った研究は、Vertucci と Fla<sup>4)</sup> の研究しかないため、「下顎第一大臼歯近心根の根管形態は人種によって差がある」と結論付けるのは早計であるが、同時に否定もできない。さらなる検討が必要である。

本研究では根管形態を 3 種類のみで分類したが、分岐の位置、根管の太さ、側枝の有無および位置なども各歯によって非常に多様で、より細分化した分類も必要ではないかと考える。より密接に治療に活かすのであれば、抜去歯を年齢ごとに分けることも大切ではないかと思う。

今回の研究実習から、根管形態の複雑さを授業や教科書から学ぶ以上に実感することができた。このことを理解したうえで根管治療に臨むのと理解せずに臨むとでは治療の成否に大きな差が出てくると思っている。本研究で得たデータを常に念頭に置きながらこれからの臨床に役立てていきたい。

### 参考文献

- 1) 赤井三千男：日本人永久歯の根管形態と分岐状態 歯の解剖学入門 第 1 版：163、1993、医歯薬出版、東京
- 2) 三橋憲司：下顎第一大臼歯近心根の根管形態についてーレジンを包埋した透明標本を用いてー、研究実習論文報告集「第 4 号」：49～50、2003
- 3) 奥川葵：下顎第一大臼歯近心根の根管形態について、研究実習論文報告集「第 16 号」：16、2015
- 4) Vertucci FJ, Fla G: Root canal anatomy of human permanent teeth. Oral Surg. 58:589-599、1984

## SIDT2 遺伝子の培養細胞における発現

02114012 安藤 龍汰

指導教員：高橋昌幸，田村正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：ヒト細胞，マウス細胞，SIDT2

### 緒言

SID (systemic RNA interference-deficient) は，*Caenorhabditis elegans*において二本鎖 RNA の細胞内への取り込みに関与するタンパク質として同定された．SIDT (SID1 transmembrane family member)1, 2 は，哺乳類における SID1 のオルソログである．SIDT1 は，組織特異的に発現し，細胞膜に局在している．他方，SIDT2 は，リソソーム膜に局在すること，様々な細胞にユビキタスに発現すること，二本鎖 RNA の取り込みに関与するとの報告もある (1) が，その機能はよくわかっていない．そこで，本研究ではヒトおよびマウス由来培養細胞における SIDT2 の mRNA 発現を調べ，その役割を明らかにすることを目的とした．

### 方法

ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞，ヒト神経芽腫細胞由来 SHSY5Y 細胞およびマウス神経芽腫細胞由来 Neuro2a 細胞を 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養を行った．これらの細胞より ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて全 RNA を抽出した．全 RNA から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用い逆転写反応により cDNA を合成した．この cDNA を Taq DNA polymerase (QIAGEN) および表 1 に示す塩基配列のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて PCR を行った．得られた PCR 産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い，紫外線照射下で写真を撮影した．なお PCR のサイクル数は同一とした．

表 1 用いたプライマーの塩基配列

マウス	Forward	Reverse
SIDT1	5'-CCGCACTCTATGCCCTTCAA-3'	5'-GAAGGCAACATTCGTCGGGA-3'
SIDT2	5'-GTCCTTCCTGGTTTGTCTGAC-3'	5'-CTTGCCACGACATCCAATGC-3'
$\beta$ -actin	5'-CCTGCTGACATCAAAAGAA-3'	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCCT-3'
ヒト	Forward	Reverse
SIDT1	5'-AGATTGGGAATTTCCGGCG-3'	5'-AGAGGGCGAAGGACCACTTA-3'
SIDT2	5'-ATGAGTTCCTGAAGGCGTG-3'	5'-TCTTTGCGCTGTACGGTGAT-3'
$\beta$ -actin	5'-TCTTTGCGCTGTACGGTGAT-3'	5'-ACAATGTGGCCGAGGACTTT-3'

### 結果

HeLa 細胞，Neuro2a 細胞および SHSY5Y 細胞といった 3 種類の腫瘍由来細胞株いずれにおいても，SIDT2 mRNA の発現が RT-PCR によって検出された (図 1)．これらの発現は SHSY5Y 細胞で見られた SIDT1 mRNA の発現量に比べて多かった (図 1)．インターナルコントロールの  $\beta$ -actin mRNA は，HeLa 細胞，SHSY5Y 細胞

および Neuro2a 細胞いずれの細胞でも同様に発現していた (図 2)．

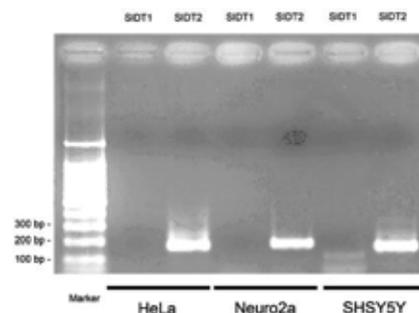


図 1 HeLa 細胞，Neuro2a 細胞および SHSY5Y 細胞における SIDT1 および 2 mRNA の発現

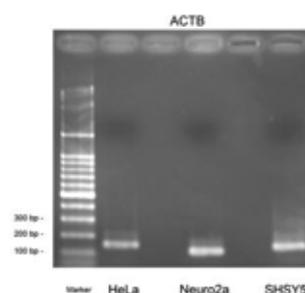


図 2 HeLa 細胞，Neuro2a 細胞および SHSY5Y 細胞における  $\beta$ -actin mRNA の発現

### 考察

3 種類の異なるヒトおよびマウス腫瘍組織由来の培養細胞において SIDT2 遺伝子は比較的強い発現が認められた．これまで，SIDT2 の発現はユビキタスに広範な組織で報告されている．正常組織においてのみならず腫瘍組織においても SIDT2 が発現していることが考えられた．正常細胞と腫瘍由来細胞の発現量の比較は行っていないが，SIDT2 の発現が細胞のがん化によって制御は受ける可能性も考えられた．SIDT2 タンパク質はリソソーム膜に局在することが報告されていることから，リソソームの機能に関連した何らかの普遍的な役割を果たしていると考えられた．

### 参考文献：

- 1) McEwan DL, Weisman AS, Hunter CP. Uptake of extracellular double-stranded RNA by SID-2. Mol Cell. 47:746-754, 2012.

## 骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化を亢進する因子

02114017 鎌田正之

指導教員：滝田裕子（学術支援部/口腔分子生化学教室）

キーワード：骨髄間質細胞, BMP-2, serum, statin

### 緒言

骨髄間質細胞の骨欠損部位治療への臨床的応用が試みられている。しかし骨髄中の間葉系幹細胞の割合は少なく、年齢とともに低下することから、大量に確保するのは難しい<sup>1)</sup>。そこで骨髄間質系幹細胞を効率良く骨芽細胞へ分化させるために、骨形成タンパク質(BMP-2)、牛胎児血清 (serum)、statin を組合せ培地に添加し、骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化・増殖能について比較検討した。

### 方法

ラット大腿骨の骨髄より分離した骨髄間質細胞を serum と BMP-2 の存在下、または statin (0.1  $\mu$ M, 1.0  $\mu$ M) と BMP-2 (50 ng) の存在下にて培養した。培養 7 日目に生細胞数、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性、10 日目にカルシウム (Ca) を定量した。細胞は  $2 \times 10^4$  個ずつ播種した。Serum は培養 2 日前、well に 0.5 ml 加え静置した。培地にはデキサメタゾン、 $\beta$ -グリセロホスフェート、アスコルビン酸を添加した。

### 結果

生細胞数はコントロール群に比較して BMP 単独投与群、serum/BMP 群において有意に増加した (図 1)。骨髄間質細胞が骨芽細胞に分化する初期に ALP が発現するが、serum/BMP 群において最も高い値を示した (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 Ca の沈着が認められる。Ca 量は serum/BMP 群において最も高い値を示した (図 3)。

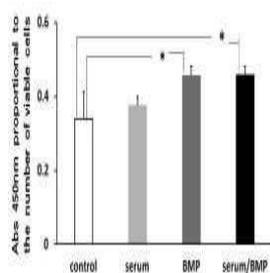


図 1 生細胞数

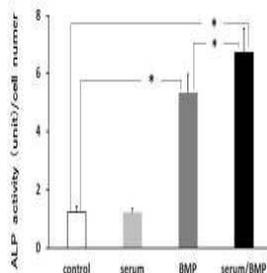


図 2 ALP 活性

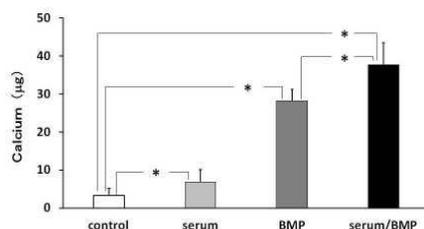


図 3 カルシウム量

Statin 0.1  $\mu$ M 投与群において生細胞数の増加は認められなかった。Statin を 1.0  $\mu$ M 投与すると細胞数が減少した (図 4)。Statin 0.1  $\mu$ M 投与群において ALP 活性は僅かに上昇した。しかし statin1.0  $\mu$ M と BMP を同時投与すると、BMP 単独投与と比較して ALP 活性は減少した (図 5)。Ca 量についても statin1.0  $\mu$ M と BMP を同時投与すると、BMP 単独投与と比較して減少した (図 6)。

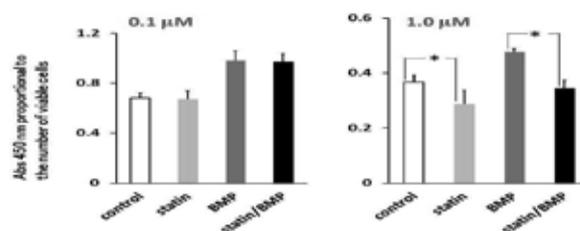


図 4 生細胞数

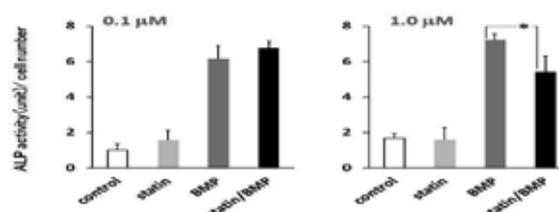


図 5 ALP 活性

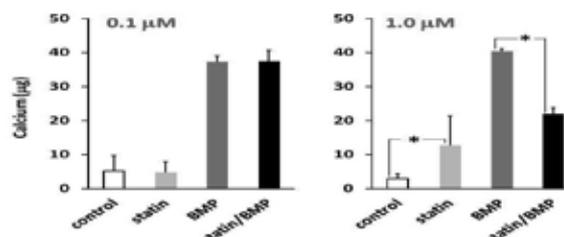


図 6 カルシウム量

### 考察

骨髄間質細胞に serum と BMP-2 を同時に加えて培養すると ALP 活性と Ca 量の増加が認められた。血清中のサイトカイン等が BMP-2 と相乗的に作用し、骨芽細胞への分化を促進していると考えられる。

一方、statin と BMP-2 を同時に培養系に加えると、BMP-2 単独投与に比べて Ca 量の減少が認められ、骨芽細胞への分化が抑制されていることが示された。Statin は骨芽細胞の BMP-2 プロモーター活性を亢進することにより、骨形成を促進することが報告されている<sup>2)</sup>。本実験においては statin により産生された内因性の BMP-2 が外因性の BMP-2 の機能に対してネガティブに作用している結果が示された。

参考文献：1) Pittenger, M.F. et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284: 143, 1999. 2) G. Mundy et al.: Stimulation of bone formation in vitro and in rodents by statins. Science 286: 1946-1949, 1999.

## 腫瘍由来培養細胞における SIDT1 mRNA の発現

02114009 巾 裕美子

指導教員：高橋昌幸，田村正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：ヒト細胞，マウス細胞，SIDT1

### 緒言

SID 1 (systemic RNA interference-deficient 1) は、*Caenorhabditis elegans*において二本鎖 RNA の細胞内への取り込みに関与するタンパク質として同定された (1)。SIDT (SID1 transmembrane family member)1, 2 は、哺乳類における SID1 のオルソログである。SIDT1 は、細胞膜に局在すること、樹状細胞などの免疫系細胞に発現する。他方、SIDT2 は、リソソーム膜に局在すること、様々な細胞にユビキタスに発現することが報告されている。しかし SIDT1 および 2 の生理的機能はよくわかっていない。そこで、本研究ではヒトおよびマウス腫瘍由来培養細胞における SIDT1 の mRNA 発現を調べ、その役割を明らかにすることを目的とした。

### 方法

ヒト子宮頸癌細胞由来 HeLa 細胞，ヒト神経芽腫細胞由来 SHSY5Y 細胞およびマウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a 細胞を 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 下で培養を行った。これらの細胞より ISOGEN (ニッポンジーン)を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA から ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用い逆転写反応により cDNA を合成した。この cDNA を Taq DNA polymerase (QIAGEN) および表 1 に示す配列のプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物を 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射下で写真を撮影した。PCR のサイクル数は同一とした。

表 1 用いたプライマーの塩基配列

マウス	Forward	Reverse
SIDT1	5'-CCGCACTCTATGCCCTTCAA-3'	5'-GAAGGCAACATTCGTCGGGA-3'
SIDT2	5'-GTCCTTCCTGGTTTGTCTGAC-3'	5'-CTTGCCACGACATCCAATGC-3'
$\beta$ -actin	5'-COTGCGTACATCAAAGAGAA-3'	5'-CAATAGTGATGACCTGGCCOT-3'
ヒト	Forward	Reverse
SIDT1	5'-AGATTGGGAATTTCCGGCG-3'	5'-AGAGGGCGAAGGACCACTTA-3'
SIDT2	5'-ATGAGTCCCTGAAGGCGTG-3'	5'-TCTTTGCGCTGTACGGTGAT-3'
$\beta$ -actin	5'-TCTTTGCGCTGTACGGTGAT-3'	5'-ACAATGTGGCCGAGGACTTT-3'

### 結果

HeLa 細胞および Neuro2a 細胞では、SIDT1 mRNA の発現が RT-PCR によって検出されなかった (図 1)。一方、SHSY5Y 細胞においては SIDT1 mRNA の発現が見られた (図 1)。インターナルコントロールとして  $\beta$ -actin mRNA は、HeLa 細胞、SHSY5Y 細胞および Neuro2a 細胞いずれの細胞でも同様に発現していた (図 2)。

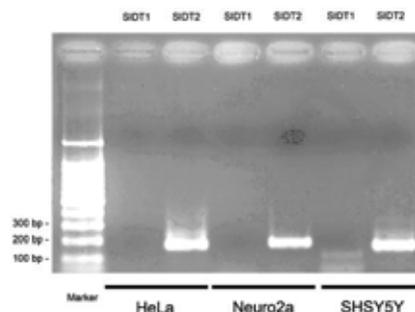


図 1 HeLa 細胞，Neuro2a 細胞および SHSY5Y 細胞における SIDT1 および 2 mRNA の発現

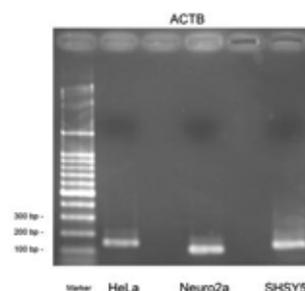


図 2 HeLa 細胞，Neuro2a 細胞および SHSY5Y 細胞における  $\beta$ -actin mRNA の発現

### 考察

3 種類の異なる腫瘍由来の培養細胞で SIDT1 遺伝子の発現量が異なっていることが認められた。ヒト神経芽腫細胞由来 SHSY5Y 細胞では SIDT1 mRNA の発現が認められたが、マウス神経芽細胞腫由来 Neuro2a では発現が見られなかったことから、SIDT1 が神経芽細胞腫において腫瘍特異的な発現調節が行われる可能性が考えられた。他方、正常組織由来の神経芽細胞でも同様に SIDT1 が発現しているのか不明であるため、神経芽細胞において何らかの生理的機能を有しているのか、わからなかった。SIDT1 は免疫系細胞だけでなく、神経芽細胞腫においても発現が認められたことから、何らかの腫瘍組織特異的な機能と関連している可能性が考えられた。

### 参考文献：

- 1) Winston WM, Molodowitch C, Hunter CP: Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*. 295:2456-2459, 2002.

継代骨髄間質細胞に及ぼす血清と BMP-2 による相乗効果  
 02114011 森豊理英子  
 指導教員：滝田裕子（学術支援部/口腔生化学教室）  
 キーワード：骨髄間質細胞、継代、血清、BMP-2

### 緒言

現在、骨組織の再生に骨髄間質細胞を利用することが試みられている。骨髄間質細胞を臨床応用するためには、できるだけたくさんの骨髄間質細胞の採取が望ましい。しかしながら、年齢とともに骨髄中の間質系幹細胞の数は少なくなる。また細胞数を増やすために継代を繰り返すと増殖能と骨芽細胞への分化能が低下することも報告されている<sup>1)</sup>。本研究では、継代を繰り返した骨髄間質細胞に Bone Morphogenetic Protein (BMP)-2 と牛胎児血清 (serum) を同時に添加することにより、継代前の骨髄間質細胞と同等の増殖能・骨芽細胞への分化能を有するようになるかを調べることを目的とした。

### 方法

ラットの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 と F6 を作成した。

F1 と F6 を、1 well 当たり  $2 \times 10^4$  個ずつ播き、コントロール群、serum 群、BMP 群、serum/BMP 群という 4 群に分けて培養した。Serum 群と serum/BMP 群の well には培養 2 日前に牛胎児血清 (serum) 0.5ml を加え 2 日間静置した。培養培地には、デキサメタゾン、 $\beta$ -グリセロホスフェート、アスコルビン酸の分化誘導剤を投与した。BMP-2 は 1 well あたり 50 ng 添加した。培養 7 日目に、生細胞数、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を定量し、10 日目にカルシウムを定量した。

### 結果

骨髄間質細胞の増殖については、4 群ともに F1 に比べて F6 の細胞数が減少していた。F1 はコントロール群に比べ、serum 群、BMP 群、serum/BMP 群ではそれぞれ細胞の増加が認められた。F6 は serum 群では細胞数が増加したが、BMP-2 群と serum/BMP 群では細胞数の増加が抑制された (図 1)。

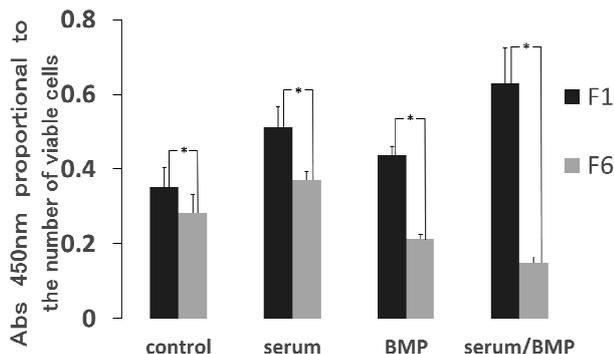


図 1 生細胞数

骨髄間質細胞が骨芽細胞に分化する初期に ALP が発現する。F1 はコントロールに比較して BMP 群、serum/BMP 群において ALP 活性が高くなった。F6 の場合、serum/BMP 群において ALP 活性は最も高くなった (図 2)。

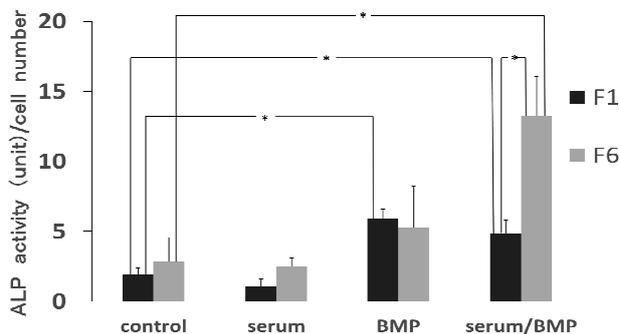


図 2 ALP 活性

骨髄間質細胞が成熟した骨芽細胞に分化すると、リン酸カルシウムが沈着して石灰化が始まる。F1 において BMP 群ではカルシウム量が増加し、serum/BMP 群では有意差はないが、さらにカルシウム量は増えた。F6 において BMP 群ではカルシウム量は F1 の半分程度だったが、serum/BMP 群では F1 と同量近くまでカルシウム量が増加した (図 3)。

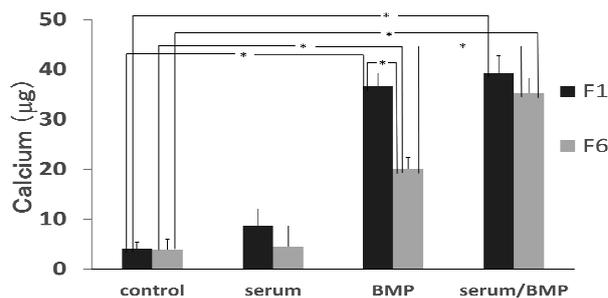


図 3 カルシウム量

### 考察

継代骨髄間質細胞 (F6) に serum と BMP を同時添加した条件で培養すると細胞増殖の抑制が認められた。F6 の ALP 活性は serum と BMP を添加すると F1 に比較して高い値を示し、F6 のカルシウム量は F1 に近い値を示した。

以上の結果より、継代を繰り返した細胞を serum と BMP の存在下で培養することにより早い段階で細胞増殖が抑制され、骨芽細胞への分化が促進されることが示唆された。継代細胞において serum 中の因子が BMP と相乗作用することにより骨芽細胞への分化を高めていると考えられる。

### 参考文献

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

## マイクロナノパターンによる細胞移動性

02114003 澤村 萌香

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：マイクロナノパターン、ヒト歯肉線維芽細胞

### 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。本研究ではポリスチレン基材を用いてマイクロナノパターンを作製し、ヒト歯肉線維芽細胞の移動を観察することで、移動距離や配向性を評価した。その際、マイクロナノパターンのグループ構造の間隔が細胞の移動に影響を与えるか検討した。

### 2. 方法

マイクロナノパターンの作製：熱ナノインプリント装置を昇温し、上段を 104℃、下段を 80℃にした。フィルムとモールドを乗せ温度を保ちながら 4 分間の圧接、冷却水で徐々に温度を下げ 4 分間、冷却装置に乗せ 4 分間の後に、モールドを引き離しマイクロナノパターンを作製した。この方法により、グループの幅は 3 μm、深さは 0.8 μm とし、グループの間隔は (A) コントロールとしてプレーン、(B) 25 μm (C) 6.25 μm の 3 種類を作製した (図 1)。

細胞の培養と移動：熱ナノインプリント法により作製した 3 種類のグループパターン上にスタート線からシリコンシートで覆った。ヒト歯肉線維芽細胞を播種し、3 日間細胞の定着を行った。シリコンを撤去し、スタート線から同時に細胞移動を開始させ、3 日間の移動の後に光学顕微鏡写真から細胞移動距離を計測し、細胞配向性や移動軌跡を比較した。

### 3. 結果

パターンにおける細胞移動距離は最前方の細胞 20 個ずつを計測した。移動距離の大きいものから (C) 6.25 μm > (B) 25 μm > (A) plane となり、グループが付与され間隔の狭い (C) 6.25 μm のパターンが最も移動距離が大きい結果となった (図 2)。

配向性については移動後の細胞の拡大像と cell tracking より (C) 6.25 μm のパターンで最も細胞のグループに沿った配向と直線的な移動が観察された。一方で (A) plane ではグループに沿うような配向性は認められず、cell tracking でも様々な方向に移動した様子が観察された。また細胞の移動速度については (B) 25 μm (C) 6.25 μm でやや速い結果となった (図 3)。

### 4. 考察

今回の検討の中でグループを付与し、より間隔の狭いパターンで最も細胞移動距離は増加し、配向性も良好であった。これは配向性が良くなることで、細胞の移動軌跡が曲がりにくく細胞同士でぶつかることなく、直線的に移動することが可能となり、結果として、スタート地点からより遠くへの移動が可能となると推察された。

以上のことから、マイクロナノパターンの付与により、細胞の移動を制御できる可能性が示唆された。

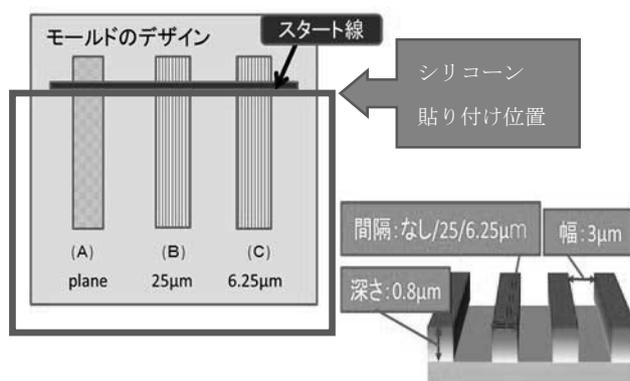


図 4 マイクロナノパターンのデザイン

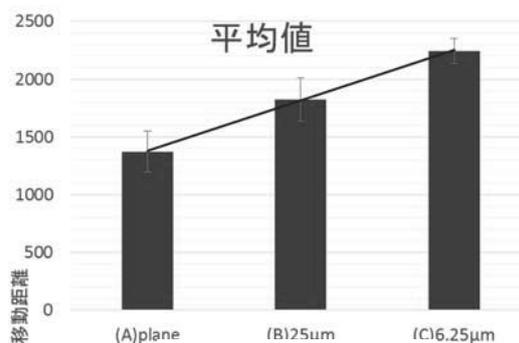


図 5 細胞移動結果

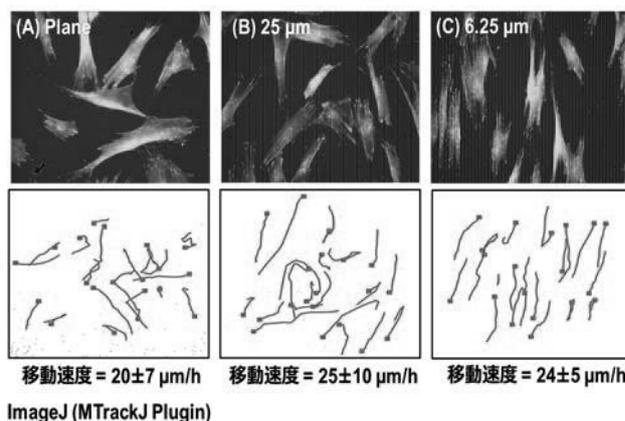


図 6 細胞の配向性と cell tracking

# 架橋剤ゲニピン添加によるマイクロ・ナノパターン化ゼラチンの作製

43090031 玉川 誠一

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、ゼラチン、マイクロ・ナノパターン、ゲニピン

## 1. 緒言

コラーゲンは生体の主要な細胞外マトリックスであり、歯周組織再生の足場として歯周外科治療への応用が期待されている。一方で、マイクロ・ナノ構造を付与した材料は、細胞の接着性や接着形態に変化を与えることが知られている。そこで、本研究ではマイクロ・ナノパターンをコラーゲンに付与することで生体内での細胞の接着性・配列のコントロールできる生体材料の開発を目的とした。しかしコラーゲンの物性は水に容易に溶解するなど不安定である問題が指摘されている。そのため今回は天然素材由来の架橋剤ゲニピンを用いて架橋を行い、架橋に必要な試薬量の検討や透過率の測定、ゼラチンでできたマイクロ・ナノパターンの作製、細胞接着性の評価、走査型電子顕微鏡 (SEM) による形態観察を行った。

## 2. 方法

濃度別でゲニピンとゼラチン溶液を混合し、視感度透過率測定器で色の変化を経時的に測定した。同様に濃度別のゲニピンとゼラチン溶液を混合し、簡易的な加重試験を行った。続いて、マイクロ・ナノ構造を付与したPETフィルムモールド上に10%ゼラチンとゲニピンとの混合溶液を滴下・乾燥することでパターン化したゼラチンフィルムを得た。微細構造はSEMとレーザー顕微鏡にて観察した。細胞接着試験は、ヒト骨芽細胞様細胞を各パターン上へ播種し、1時間後の細胞数の測定およびSEMによる観察を行った。

## 3. 結果と考察

透過率測定観察の結果 (図1) と簡易的加重試験の結果、ゼラチンの濃染と物性の向上が認められた。物性の変化についてはゲニピン未使用のものが15.6hPa加重した時、50%程度まで高径が低下したのに対し、ゲニピンを400mM高濃度で加えたものは高径低下量が約30%であった。これはゼラチンの架橋反応が生じ強度が向上したためだと考えられる。次にSEM画像観察の結果からPETフィルムと同様のパターンがゼラチンフィルムにも認められた。このことより、ゼラチンフィルムへのマイクロ・ナノインプリントがゲニピンの架橋を用いても可能であると判明した。続いて、細胞接着試験の結果 (図2)、パターンの形状による細胞接着形態の変化が認められた。グループでは細胞が細長く、ピラーでは細胞が突起を伸ばし、ホールでは細胞が球状になっている様子が観察された。付着細胞数の検討で

は、平面よりもパターン化ゼラチンフィルムの方が高い接着性を示した (図3)。より詳細には、付与した形状によって接着性に若干の違いは生じたものの、何も付与していない部位に対し2倍以上の細胞接着性が観察された。これらの現象はコラーゲンの表面積が向上や、形状へのタンパク質の吸着が大きく関与したものと推測される。また細胞がピラーのような突起構造物に対して足を伸ばしていることから、細胞が微細凹凸構造を認識している可能性がある。また、凹凸構造のふちに細胞が付着しているように見えることから接着性タンパクがパターン形状により制限されているために形状が変化したという可能性も考えられる。

以上より、ゼラチンでできたマイクロ・ナノパターンの作製は可能であり、パターン化ゼラチンがヒト骨芽細胞様細胞の細胞接着性や細胞接着形態に影響を与えることがわかった。

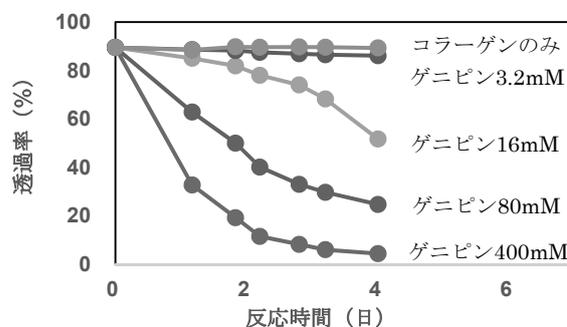


図1 ゲニピン添加時のゼラチンの透過性変化

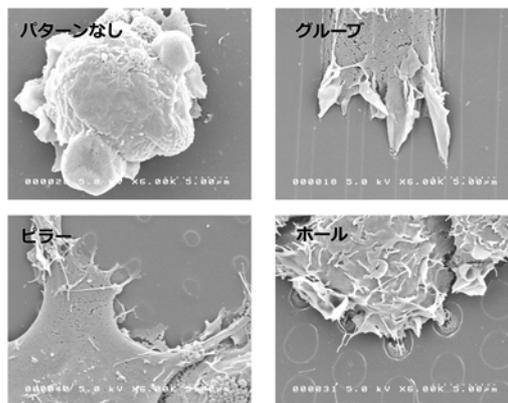


図2 細胞接着試験後のSEM像

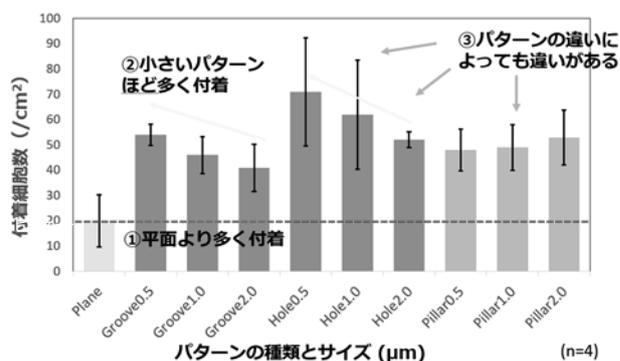


図3 細胞接着試験の結果

## 歯根吸収抑制のための水酸化カルシウム製剤の象牙質内拡散評価

02114032 中道祥之

指導教官：八若保孝（小児・障害者歯科学教室）

吉田靖弘（生体材料工学教室）

キーワード：病的歯根吸収，根管洗浄，スミア層，超音波洗浄，水酸化カルシウム製剤

### 1. 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。水酸化カルシウム製剤による根管充填は、象牙質細管を經由して塩基性イオンを拡散させることにより、破歯細胞の産生する酸を中和し、病的歯根吸収を抑制すると考えられ、臨床応用されている<sup>1)</sup>。根管治療の臨床現場では、機械的清掃と、薬剤による化学的清掃がなされている<sup>2)</sup>。しかし、機械的清掃後の根管壁には、スミア層が形成され、象牙質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<sup>3,4)</sup>。そこで本研究では、1) 効率的なスミア層除去の方法を検討し、2) 水酸化カルシウム製剤による塩基性イオンの象牙質内への拡散を評価した。

### 2. 方法

試料：ヒト永久歯(単根・単根管)18本を用いた。

#### 1) 根管洗浄方法の検討

試料10歯をKファイルで#80まで根管拡大・根管形成を行い、2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。

(※は交互洗浄)

G1:交互洗浄(シリンジ, 5%NaOCl, 31%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>使用)

G2:RO水(超音波洗浄)→※

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)→※

試料を洗浄後、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3箇所、根尖部の3箇所(一歯あたり12箇所観察)のSEM写真を撮影し、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

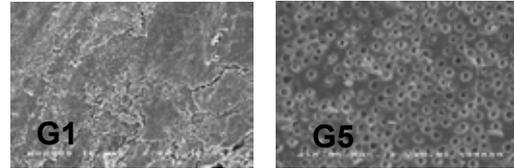
試料8歯をG1とG5の洗浄方法で洗浄した後、歯根表面中央部に人工的に吸収窩を2か所形成した。4歯ずつ2グループに分け、根管内に水酸化カルシウム製剤(カルシペックスII®、ピタペックス®)を根管充填した。1%フェノールフタレイン含有寒天培地に封入し、歯根外部のpHによる色調変化を肉眼にて6週間観察した。その後歯根を取り出して切断し、象牙質内の吸収窩方向への塩基性イオンの拡散を計測し比較した。計測方法には、根管から吸収窩までの距離(do)と染色された距離(d)の比(赤変長比d/do)を

用いた。

### 3. 結果

#### 1) 根管洗浄方法の検討

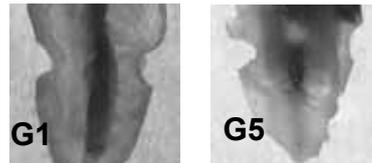
SEMによる観察から、G1、G2では象牙質細管はほぼ開口せず、G3、G4、G5では多くの象牙質細管が開口し、G1とG2それぞれの開口率に対してG3、G4、G5の開口率は統計的に有意差が認められた。



(図1 各洗浄処理後の根管壁のSEM観察)

#### 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すべての試料においてpHによる培地の赤色変化は見られなかった。切断後の評価においてはG1よりもG5で塩基性拡散が認められ有意差も認められた。(図2)また、各水酸化カルシウム製剤による拡散性の有意差は認められなかった。



(図2 カルシペックスIIでの塩基性拡散評価)

### 4. 考察

根管洗浄において、EDTA、NaOClと超音波洗浄が高いスミア層除去効果を示した。

切断前の塩基性拡散の観察において寒天培地の赤色変化が見られなかったのは、吸収窩が浅く塩基性拡散が根管外へ及ばなかったことが考えられる。また切断後の観察においてはG1と比較しG5での塩基性の拡散が高いことが示された。これはスミア層がG5で効率的に除去され、象牙質細管が多く開口したため、水酸化カルシウム製剤の塩基性拡散範囲が広がったと考えられた。よってスミア層の除去と水酸化カルシウム製剤の貼薬は、吸収窩に中和作用をもたらし、歯根吸収抑制効果が期待できることが考えられた。

### 5. 参考文献

- 1) NEW エンドドンティクス:根管貼薬に水酸化カルシウムを使う理由, 荒木孝二, pp. 102-110, 1999, 医歯薬出版株式会社, 東京
- 2) NEW エンドドンティクス:根管洗浄の重要性, 片岡博樹, p91-101, 1999, 医歯薬出版株式会社, 東京
- 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

# う蝕リスク低減を目指したお菓子作り

02114033 西尾 優紀

指導教員：阿部 薫明（生体材料工学教室）

キーワード：う蝕、代替甘味料

## 1. 緒言

市販されているお菓子には齶蝕の要因となるショ糖が豊富に含まれているため、過剰な摂取は齶蝕リスクの増加が想起される。一方、代替甘味料は齶蝕リスクを低減できるということは周知の事実である。代替甘味料一種であるキシリトールを原材料として使用したガムや飴はスーパーマーケットなどで容易に購入することができる。しかし、代替甘味料を使ったお菓子などは、ガムや飴などに比べると稀である。そこで、ショ糖を代替甘味料へと置換しながらも、従来法と同等の美味しさを実現できれば、齶蝕を心配することなくお菓子を楽しむことができると考え、その効果的な使用法を検討した。

## 2. 方法

齶蝕リスク低減を試み、マドレーヌ作成時に原料中のショ糖(suc)を各種代替甘味料へと置換した。代替甘味料として、キシリトール(xyl)、エリスリトール(eryth)、フラクトオリゴ糖( fruc)、およびパルスweetを用いた。

### (1) ミュータンス培養試験

①TY培地にショ糖、エリスリトール、キシリトールを加えた2%溶液をそれぞれ用意した。その溶液にミュータンス連鎖球菌を加え、37℃で培養し、24時間後の溶液の濁度を吸光度計で測定した。

②また、ショ糖のみ、エリスリトールのみ、ショ糖とエリスリトールの混合比が2:1、1:1の溶液（糖類の最終濃度2%）を用いて培養を行い、24時間、48時間、72時間と濁度の経時変化を測定した。

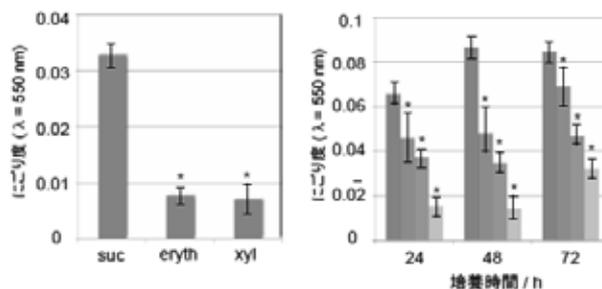
### (2) 試作品の評価

作成したマドレーヌを被験者に試食してもらい、見た目・甘み・香りの3項目について5段階評価のアンケートを実施した。通常法に基づき作成した試料をコントロールに用いて、相対評価を行った。試食時にはコントロールを含め、甘味料の種類・混合比などの情報は与えずに、試食・アンケートを実施した。試食は、7.5cmのマドレーヌカップに作成した試料の1/4を1人分として、甘味料の配合の異なる4条件で作成した試料を試食した。初めに4試料各々について、1/2(全体の1/8)ずつ試食を行い、4種類の違いを確認した後に、残りの1/2ずつを食べて、各々の試料についての評価を行った。見た目については、切り分けていない試料を見て評価を行った。

## 3. 結果

ミュータンスの培養試験から、ショ糖溶液と比較してエリスリトール溶液とキシリトール溶液ではミュータンス菌の増殖抑制が示された。[Fig.1]

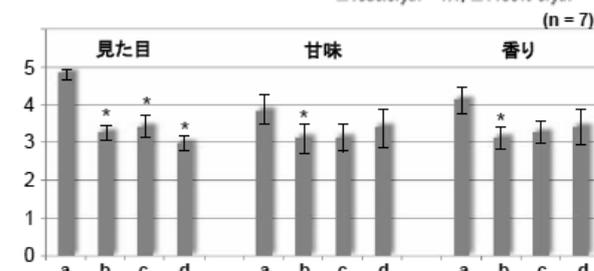
また、ショ糖と代替甘味料との混合溶液においても、ミュータンス菌の増殖を抑制する効果が示された。[Fig.2]次に、試食後のアンケート結果を[Fig.3]に示す。代替甘味料100%で作成した試料では、殆どの評価項目でコントロールより低い値が得られた。



[Fig.1] 24時間後の濁度

[Fig.2] 混合溶液における濁度

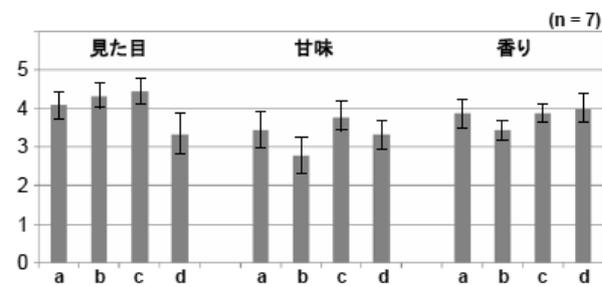
■: 100% suc, ▨: suc:eryth = 2:1, ▩: suc:eryth = 1:1, ▪: 100% eryth



[Fig.3] 1回目のアンケート結果

a: suc (control), b: eryth, c: xyl, d: fruc

そこで「甘み」、「香り」への影響の改善を目指し、代替甘味料の様々な配合を試した。また、「見た目」の改善のため、ベーキングパウダーの配合量をコントロール作成時の倍の量に増加させた。その結果、各項目の評価に上昇がみられた。特に、キシリトール・エリスリトールでは、ショ糖50%・代替甘味料50%の配合比で製作することにより、コントロールと同等の評価が得られた。[Fig.4]



[Fig.4] 2回目のアンケート結果

a: suc (control), b: eryth, c: xyl, d: xyl + eryth

## 4. 考察

本実験では、代替甘味料のみを用いて、被験者の満足するお菓子を作製するのは困難であった。代替甘味料の中でも、加熱調理に適しているもの、適していないものなどがあり、単純にショ糖相当とされる甘味度だけで配合量を決めても十分な満足度が得られなかった。そのため、それぞれの甘味料の特徴の把握や、焼く温度、ベーキングパウダーなどの配合量を最適化していく必要がある。また、今回の実験では、糖分だけを代替甘味料に置き換えたが、小麦にも齶蝕誘発性が存在するので、今後は、小麦についても齶蝕誘発性が低いものへの代替により、齶蝕リスクの軽減効果の検討を試みる。

## 5. 謝辞

本研究は一部、エリザベス・アーノルド富士財団の助成により実施された。

## 代替甘味料の効果的な使用による齲蝕リスク軽減を 目指した菓子作製

02114013 森本 友梨恵

指導教員：阿部 薫明（生体理工学教室）

キーワード：代替甘味料，齲蝕リスク，ミュータンス  
連鎖球菌

### 1. 緒言

市販されているケーキや焼き菓子などのお菓子には、齲蝕の要因となるショ糖が豊富に含まれており、過剰な摂取により齲蝕リスクの増加が懸念される。そこで、ショ糖を代替甘味料へと置換しながらも、従来法と同等の美味しさを実現できれば、齲蝕を心配することなくお菓子を楽しむことができると考え、その効果的な使用法を検討した。

### 2. 方法

試料にはマドレーヌを選択した。一般的な作成方法に従い、原料中のショ糖を代替甘味料（キシリトール、エリスリトール、フラクトオリゴ糖、パルスイート）に全量・または一部置換することで、齲蝕リスクの低減を試みた。

作成した試料を被験者に試食してもらい、美味しさ・香り・雑味、の3項目について、通常法に基づき作成した試料（コントロール）を含めた4種類の試料を相対的に5段階で評価してもらったアンケートを実施した。その際、どの試料がコントロールかは明らかにせず行った。2切れずつ計8切れを一人分とし、初めに4試料各々1切れずつ試食を行い、4種類の違いを確認した後に、残りの1切れを試食し、評価してもらった。見た目については、切り分けていない試料を見て評価してもらった。

さらに齲蝕リスクを検討するために、ミュータンス連鎖球菌培養試験を実施した。TY培地に、ショ糖、エリスリトール、ショ糖：エリスリトール＝1：1の2%の溶液をそれぞれ用意し、その溶液にミュータンス連鎖球菌を加え37℃で培養し、各溶液の経時的な濁度の変化を測定した。

### 3. 結果

試食後のアンケート結果を図1に示す。

代替甘味料100%で作成した試料では、殆どの評価項目でコントロールより低い評価が得られた（雑味に関しては、値が大きくなるほど雑味が強いのを示す）。

次に、ショ糖と代替甘味料を組み合わせる試料を作成することにし、様々な配合比での作成を行った。膨らみに

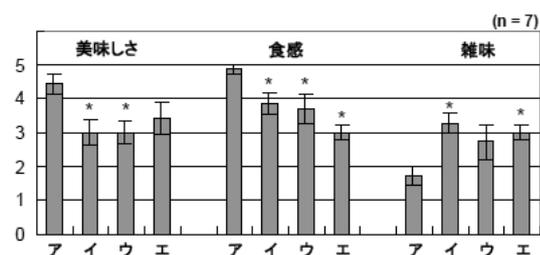


図1 項目ごとのアンケート結果  
ア)コントロール、イ)エリスリトール、ウ)キシリトール、エ)フラクトオリゴ糖

関してはベーキングパウダーの配合量をコントロールの倍量に増加させた。その結果、アンケートの評価が向上した。その一例を以下に示す（図2）。

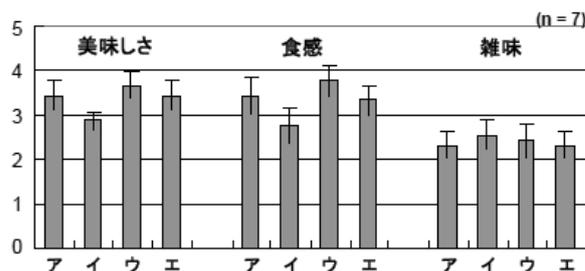


図2 項目ごとのアンケート結果  
ア)コントロール、イ)50% エリスリトール、  
ウ) 50%キシリトール、エ)エリスリトール+キシリトール

代替甘味料自体の齲蝕リスク軽減性は知られているが、ショ糖と代替甘味料を混合使用した際の齲蝕リスクは検討する必要があると考え、ミュータンス連鎖球菌培養試験を行った。結果（図3）より、エリスリトールのみの溶液とショ糖：エリスリトール＝1：1の溶液は、ショ糖の溶液と比較して濁度が低いことがわかる。

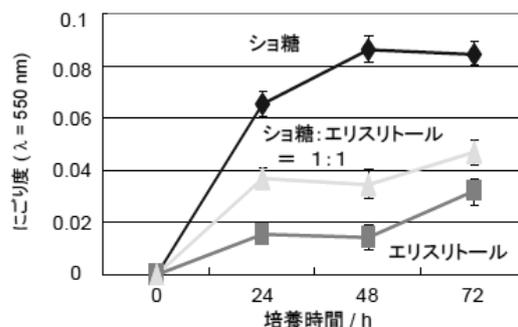


図3 ミュータンス連鎖球菌培養試験

### 4. 考察

アンケート結果から、ショ糖を全て代替甘味料に置換することにより、膨らみや表面性状がコントロールと異なること、雑味が強くなることが示された。代替甘味料によって甘味を表現することができたとしても、その他の項目でコントロールと同等の評価を獲得することは難しく、ショ糖と組み合わせて使用する必要があると考えられる。そこで、ショ糖と組み合わせた場合の齲蝕リスクについて検討した。培養試験においてミュータンス連鎖球菌の菌数・不溶性グルカンの産生により濁度が上昇すると考えると、ショ糖と代替甘味料を1：1で使用した場合も齲蝕リスクは優位に低下すると考えられる。また、代替甘味料の中には加熱によって甘味を発揮しにくくなるものなどもあるため、焼き菓子ではなく、加熱調理の少ない菓子（ゼリーなど）のほうが、代替甘味料を用いるには適している可能性がある。

### 5. 謝辞

本研究は一部、エリザベス・アーノルド富士財団の助成により実施された。

## 低酸素条件下の HuR タンパク質の細胞内局在

02114014 江藤朋憲

指導教員: 東野史裕(口腔病理病態学教室)

キーワード: HuR, 低酸素, MRC5 細胞

### 1. 緒言

HuR は、mRNA 結合タンパク質で、細胞内で核に局在している。標的 mRNA に結合することで、その mRNA を安定化し、細胞癌化の中心的な役割を担っていると近年考えられている(①)。口腔病理病態学教室が考案した腫瘍溶解アデノウイルスは、腫瘍細胞内の HuR を利用して増殖することで腫瘍細胞を破壊する。今回、我々は、他研究室の発表の通り、低酸素により HuR が細胞質に多く蓄積し、腫瘍溶解アデノウイルス活性の手助けになり得るかどうか、正常細胞(MRC5 細胞)内の HuR 追跡を行った。

### 2. 方法

MRC5 細胞(ヒト線維芽細胞)に低酸素条件を再現する  $\text{CoCl}_2$  (最終濃度  $200 \mu\text{M}$ ) を加え、24時間培養した(②)。その後、免疫染色法で HuR の細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察。細胞を核分画と細胞質分画に分画を行い、Western blotting 法により HuR (3A2 抗体) の発現を調べた。

### 3. 結果

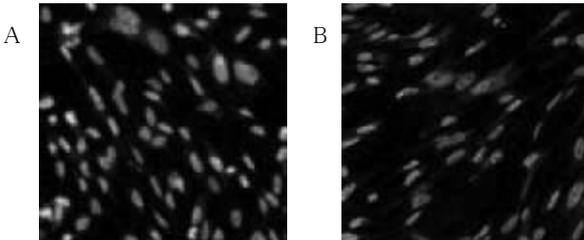


Figure 1 共焦点レーザー蛍光顕微鏡像

青:核、緑:HuR、細胞:MRC5 細胞

A:生理学的条件下の HuR の細胞内局在を示している。核内、及び細胞質に HuR の局在が見られた。

B:低酸素条件下の HuR の細胞内局在を示している。核内、及び細胞質に HuR の局在が見られた。

Figure 1 より、低酸素条件に関わらず MRC5 細胞では、HuR は、核と細胞質に局在していることが、確認された。

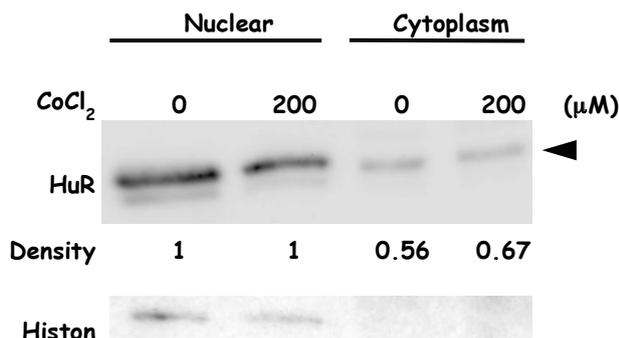


Figure 2 核内及び細胞質内の HuR の発現確認

各分画の HuR の発現を抗 HuR 抗体 (3A2 抗体) で検出し、化学蛍光発光により可視化した。そのバンドの濃さをデンシトメーターで測定し、核分画のバンドの濃さを基準に細胞質分画のバンドの濃さを測定した。各分画のタンパク量をヒストンを指標として示した。

Figure 2 より、低酸素条件下で MRC5 細胞内の HuR は、細胞質内局在が多少上昇しているように見えるが、劇的な上昇という結果ではなかった。

### 4. 考察

今回、低酸素条件下での MRC5 細胞内の HuR の細胞質蓄積は観察されなかった。この結果は、低酸素条件下では、腫瘍溶解アデノウイルスによる高効率な腫瘍細胞破壊が期待できないことを示唆しているものである。しかし、腫瘍細胞でも今回と同様の結果であるかどうか、検討が必要である。

### 5. 謝辞

直接実験指導、実験計画立案指導をして頂いた東野先生、北村先生、松田先生に感謝申し上げます。特に、今回の研究の機会を作って頂いた進藤先生に感謝申し上げます。

### 6. 参考文献

- ① Multiple Function of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis : Int J Mol Sci. 2013 May 10;14(5):10015-41: Wang J, Guo Y, et al.
- ② Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture : Danli Wu, Patricia Yotnda Induction and Testing of Hypoxia in Cell Culture

## LPS 刺激による HuR タンパク質の細胞質内局在変化

43100021 桂巻卓史

指導教員：東野史裕（口腔病理病態学教室）

キーワード：HuR, LPS

### 1. 緒言

HuR は核内に局在する mRNA 結合タンパク質で、mRNA の非翻訳領域 (3' -UTR) に存在する AU-rich elements (AREs) に結合することで、その mRNA の安定化に寄与する。ARE は原癌遺伝子、サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子などから転写される mRNA に存在するエレメントであり、ARE に HuR が結合することにより、ARE-mRNA が核外輸送、安定化され、細胞の癌化に大きく関わっている。口腔病理病態学教室が開発した腫瘍溶解アデノウイルスは、腫瘍細胞の HuR を利用して増殖することで腫瘍細胞を破壊する。本研究では、LPS 刺激による HuR の核外輸送を検討し、腫瘍溶解アデノウイルスが腫瘍細胞を効率的に破壊するための条件を解析することを目的とした。

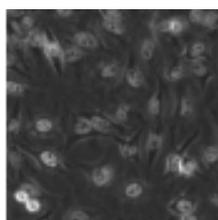
### 2. 方法

LPS (E. coli 0111 フェノール抽出) を濃度 25ng/ml になるように添加した細胞培養液で、HeLa 細胞を 30~120 分培養した。その後、免疫染色法で HuR を染色後、HuR の細胞内局在を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

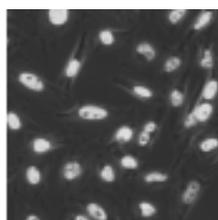
### 3. 結果

LPS 刺激 30 分後、60 分後、120 分後の 3 つの条件下において、LPS 刺激を行わない場合よりもより多くの HuR タンパクが細胞質に局在していた。

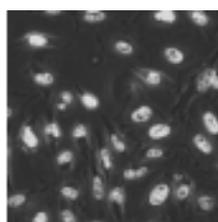
無刺激



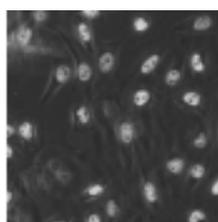
30 分刺激



60 分刺激



120 分刺激



### 4. 考察

本研究の結果から、LPS 刺激によって HuR の細胞質局在量が上昇することが認められた。このことは、LPS 刺激が、腫瘍溶解アデノウイルスの持つ癌細胞を破壊する能力を補助する可能性を示唆している。しかしながら、正常細胞においても LPS 刺激によって HuR の細胞質の蓄積が起こる可能性があるため、今回と同様の研究を正常細胞を使って行う必要があると考える。

### 5. 謝辞

実験および実験計画立案の指導をしていただいた進藤先生、東野先生、北村先生、松田先生に感謝申し上げます。

### 6. 参考文献

- Multiple Function of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis : Int J Mol Sci. 2013 May 10;14(5):10015-41: Wang J, Guo Y, et al.
- The Role of Human Antigen R, an RNA-binding Protein, in Mediating the Stabilization of Toll-Like Receptor 4 mRNA Induced by Endotoxin

## 低酸素刺激による HuR タンパクの癌細胞内局在変化

02114042 小森 美穂

指導教員：東野史裕（口腔病理病態学教室）

キーワード：低酸素 HuR HeLa 細胞

### 緒言

HuR は、AU-rich elements(AREs)を持つ mRNA に結合し、その mRNA を核外へ輸送し安定化させることで細胞をがん化させることが解明されている。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は、癌細胞内の HuR の核外輸送を利用し、癌細胞内で増殖することで細胞を破壊する。HuR は様々な物理刺激、ストレスなどによって細胞質に蓄積することが数々の論文で報告されている。本研究では、低酸素条件下で HuR が細胞質に多く蓄積されるかどうか解析し、腫瘍溶解アデノウイルス活性を促進する可能性を検討した。

### 材料

細胞：HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん細胞)

培地：DMEM(10%serum)

薬品：4%パラホルムアルデヒド,0.3%TritonX-200,

blocking buffer(1%BSA,0.1%Tween20),200  $\mu$  M

COCl<sub>2</sub> 溶液

抗体：1次抗体 3A2 2次抗体 anti-mouse IgG FITC

DAPI Histon

マーカー：kaleodscope

### 方法

【低酸素刺激】6 cm dish に HeLa 細胞を播種し、200  $\mu$  M COCl<sub>2</sub> 溶液を加え 24 時間培養した。

【実験 1】細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定し、1 次抗体、2 次抗体を用いて免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で HuR の局在を確認した。

【実験 2】fractionation buffer を用いて細胞質、核それぞれのタンパクを回収し、アクリルアミドゲルを用いて 150 V で 1 時間電気泳動した。次にタンパクをメンブレンに転写後、HuR, histon の抗体を用いてウエスタンブロッティングを行い、HuR の発現を検討した。

### 結果

生理学的条件下と低酸素条件下での HuR の発現を免疫染色法にて確認した像を示す (図 1)。

生理学的条件

低酸素条件

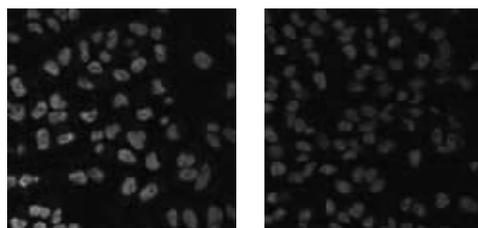


図 1：生理学的条件、低酸素条件における HuR の局在

いずれの条件下においても HuR は細胞質、核共に存在しており低酸素刺激による細胞質に発現する HuR の量の違いはほぼ見られなかった。

次にウエスタン法で生理学条件下と低酸素条件下での HuR の発現量の測定結果を示す (図 2)。

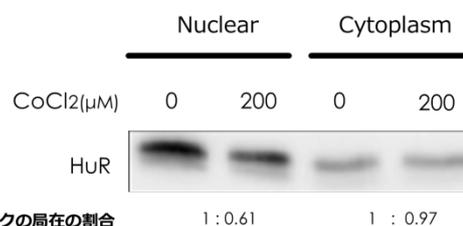


図 2：生理学的条件、低酸素条件における核、細胞質の HuR の発現

細胞質に局在する HuR の量は生理学的条件下、低酸素条件下において変化はほぼ見られなかった。

以上の結果から HeLa 細胞において HuR は低酸素刺激の有無に関わらず核と細胞質に局在しており、低酸素刺激による局在変動は認められなかった。

### 考察

これらの結果は HeLa 細胞において低酸素刺激により、HuR の核外輸送が増加しないことを示唆しており、低酸素条件による腫瘍溶解ウイルスの増殖の促進は期待できないと考えられる。ただし刺激時間によって変動する可能性はあるため、COCl<sub>2</sub> 刺激時間を検討する必要があると思われる。

### 謝辞

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

## HuR タンパク質の細胞質局在刺激の研究

02114029 鳥井 将貴

指導教員：東野史裕（口腔病理病態学教室）

キーワード：HuR, LPS

### 1. 緒言

HuR タンパク (HuR) は、mRNA 結合タンパクで、通常は核内に局在しており、mRNA の非翻訳領域 (3'-UTR) に存在する AU-rich elements(AREs)に結合することで、その mRNA の安定化に寄与する。ARE は原癌遺伝子、サイトカイン遺伝子、成長因子遺伝子等から転写される mRNA に存在するエレメントで、ARE に HuR が結合することにより、ARE-mRNA が核外輸送・安定化され、細胞癌化に大きな役割を果たすことが知られている (①)。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は、癌細胞内の HuR の核外輸送を利用して増殖することで癌細胞を破壊する。本研究では、LPS 刺激が HuR の核外への蓄積を上昇させるという報告 (②) をもとに、リポ多糖 (LPS) による HuR の核外輸送を検討し、腫瘍溶解アデノウイルスがより効率的に癌細胞の破壊を行うための条件を解析した。

### 2. 方法

HeLa 細胞を、LPS(E.coli 0111 フェノール抽出)を加え LPS 濃度 25ng/ml に調整した細胞培養液で 30~120 分間培養した後、細胞をスクレイパーで回収し核分画と細胞質分画に分離した。各サンプルのタンパク量を吸光度計にて解析し総タンパク量を均一にした後、各サンプルを電気泳動しメンブレンに転写後 HuR 抗体でウェスタン法を行った。

### 3. 結果

ウェスタン法による HuR タンパクの検出を行った結果、細胞質において LPS 刺激 30 分後、60 分後、120 分後の 3 つの条件で、LPS 刺激を行わない場合よりも多くの HuR タンパクが検出された。また、核内においては、LPS 刺激後やや検出量の増加を認めるものの、細胞質ほどの著名な変化を認めなかった。(Figure 1)

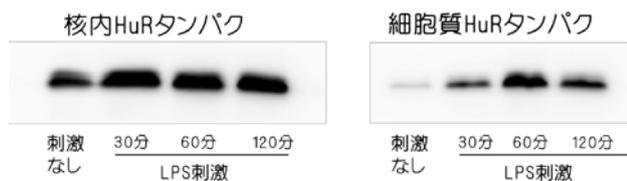


Figure 1

### 4. 考察

今回、LPS 刺激で HeLa 細胞内の HuR の細胞質蓄積上昇が観察された。この結果は LPS 刺激が腫瘍溶解アデノ

ウイルスの効率的な腫瘍細胞破壊を補助する可能性を示唆しているものである。しかし、LPS 刺激による HuR の細胞質の蓄積は正常細胞でも起こる可能性が高いため、その場合、腫瘍溶解アデノウイルスの持つ選択的な腫瘍に対する毒性という利点が損なわれることになる。よって同様の研究を正常細胞に対しても行い検討することが必要である。

### 5. 謝辞

実験および実験計画立案の指導を頂いた進藤先生、東野先生、北村先生、松田先生に深く感謝申し上げます。

### 6. 参考文献

- ① Multiple Function of the RNA-Binding Protein HuR in Cancer Progression, Treatment Responses and Prognosis : Int J Mol Sci. 2013 May 10;14(5):10015-41: Wang J, Guo Y, et al.
- ② The Role of Human Antigen R, an RNA-binding Protein, in Mediating the Stabilization of Toll-Like Receptor 4 mRNA Induced by Endotoxin

## エタノール刺激による HuR タンパクの細胞内局在変化

02110843 三浦和仁

指導教員：東野史裕（口腔病理病態学教室）

キーワード：ARE-mRNA、HuR、腫瘍溶解ウイルス

### 1. 緒言

AU-rich element (ARE)を持つmRNA (ARE-mRNA)はがん細胞で核外輸送、安定化され、細胞がん化に関わっていると考えられており、その核外輸送、安定化の際に RNA 結合タンパクである HuR が結合することが知られている。口腔病理病態学教室が開発した腫瘍溶解アデノウイルスはこの HuR を利用して増殖し、がん細胞を破壊する。本研究はがん細胞に刺激を加えた後の HuR の局在を調べることで、腫瘍溶解ウイルスの効果がより増強される条件を検討することを目的とした。

### 2. 方法

実験手順を以下に示す。

(1)HeLa 細胞(ヒト子宮頸がん細胞)を 10cm dish で培養し、これに培地 10ml に対してエタノールを濃度がそれぞれ 0.1%、0.3%、1.0%となるように加え、24 時間刺激を行った。また、コントロールとして刺激を加えずに培養した HeLa 細胞を用意した。(2)細胞を回収し、細胞質分画と核分画に分け、サンプルを調製した。(3)調整したサンプルを用いて、SDS-PAGE、Western Blotting を行った。この際、1 次抗体として HuR に対する抗体である 3A2、2 次抗体として  $\alpha$ -mouse IgG 抗体を用いた。(4)LAS-4000 を用いて、メンブレン上の HuR を観察した。

### 3. 結果

細胞質分画、核分画のそれぞれにおいて Western Blotting 法で確認された HuR のバンド(図 1、図 3)と、それらから HuR の相対的な量を無刺激のものを 1.00 とし比率で表したグラフ(図 2、図 4)を以下に示す。細胞質分画では、無刺激よりも有刺激条件において HuR が多く存在しており、最も多いのがエタノール濃度 0.3%で刺激した時であった。核分画については、無刺激条件と比較して、有刺激条件の方が HuR の存在量が少なかった。



図 1. 細胞質分画における HuR のバンド  
左から 0%、0.1%、0.3%、1.0%のエタノール濃度

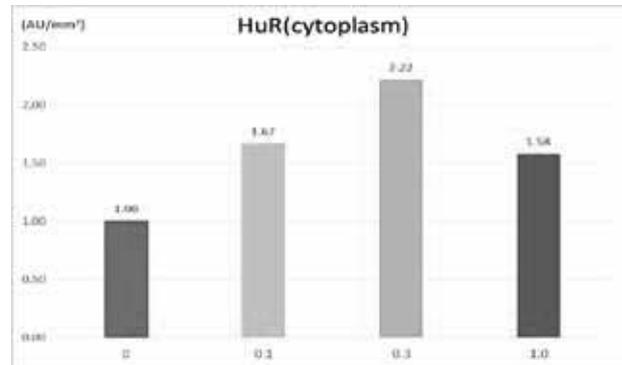


図 2. 細胞質分画においてエタノール濃度 0%の条件を 1.00 とした場合の HuR の相対量



図 3. 核分画における HuR のバンド  
左から 0%、0.1%、0.3%、1.0%のエタノール濃度

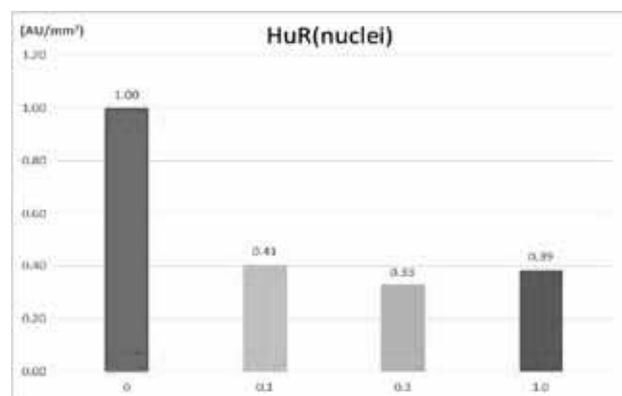


図 4. 核分画においてエタノール濃度 0%の条件を 1.00 とした場合の HuR の相対量

### 4. 考察

これらの結果からエタノール刺激を加えると、HuR ががん細胞の細胞質に輸送されることが示唆された。ゆえに、エタノール刺激とともに腫瘍溶解ウイルスを感染させると腫瘍の破壊効率が増す可能性があり、その際のエタノールの至適濃度は 0.3%であると考えられる。

腫瘍溶解ウイルスの効果増強条件の検討—アルコール刺激に対する HuR の局在

02114038 三原竜太郎

指導教員：東野史裕（口腔病理病態学教室）

キーワード：腫瘍溶解ウイルス、ARE-mRNA、HuR

## 1. 緒言

腫瘍溶解ウイルスはがん細胞に感染させると増殖し、最終的にその細胞を融解し、正常細胞には何も影響を与えないウイルスである。口腔病理病態学教室では、AU-rich element (ARE) を持つ mRNA の制御機構に注目し、腫瘍溶解アデノウイルスを開発した。ARE-mRNA は正常細胞では合成後、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。これまで、様々な物理的刺激、ストレス、サイトカイン刺激などにより HuR タンパク質が細胞質に蓄積することが報告されている。本実験では、腫瘍細胞と正常細胞にエタノール刺激を加え、それぞれの核内と細胞質に存在する HuR の局在を調べ、HuR の動態変化が見られるか検討した。

## 2. 方法

6well dish で HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）、MRC5 細胞（ヒト正常肺線維芽細胞）を培養し、それぞれ 0.1%、0.3%、1.0% の濃度のエタノールで刺激。

24 時間後、免疫染色することにより HuR の動態変化を観察した。

<免疫染色法>

固定：4%パラホルムアルデヒド溶液

TritonX-100、1%BSA

核染色：DAPI

一次抗体：3A2、二次抗体：anti-mouse IgG FITC

## 3. 結果

エタノール刺激し、免疫染色後の MRC5 細胞の結果（図 1）と HeLa 細胞の結果（図 2）を以下に示す。

染色像から、MRC5 細胞では 0.1% 刺激時、HeLa 細胞では 0.3% 刺激時に、HuR が最も核外輸送・安定化されているという結果になった。

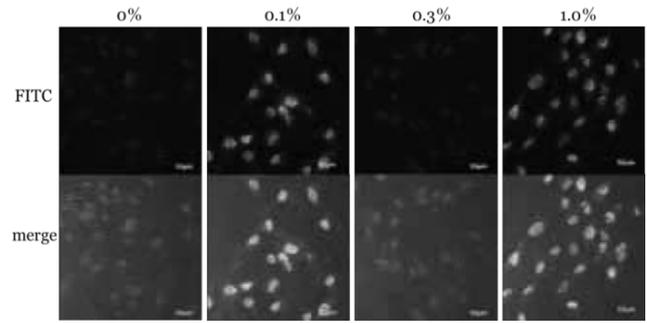


図 1 MRC5 細胞

左からエタノール濃度 0%、0.1%、0.3%、1.0%

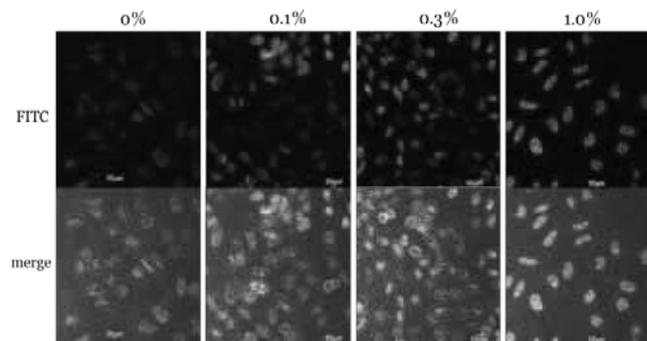


図 2 HeLa 細胞

左からエタノール濃度 0%、0.1%、0.3%、1.0%

## 4. 考察

これらの結果は、どちらの細胞もエタノール処理により、HuR の核外輸送が促進されたことを示しており、腫瘍溶解ウイルスの効率的ながん細胞の破壊には、エタノールによる刺激が有用であることが示唆された。今回はエタノール刺激の条件は濃度の違いだけであったが、時間的な条件の違いによっても変化がでる可能性があり、より実用的な条件を探るためには、さらなる検討が必要であると思われる。

## 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。

## がん化と mtDNA に関する分子生物学的研究

02110064 伊藤 航

指導教員：安田 元昭（口腔分子微生物学教室）

キーワード：mtDNA Real-TimePCR  $\Delta\Delta Ct$  法

### 1. 緒言

ミトコンドリアはほとんど全ての真核生物の細胞に含まれる細胞小器官である。ミトコンドリアの主要な機能は電子伝達系による酸化的リン酸化による ATP 産生である。そのほかに細胞周期やアポトーシスの調節などにも大きく関わっているとされている。ミトコンドリア中にはミトコンドリア DNA が存在しており、細胞核のものとは異なる独自の遺伝情報をコードしている。細胞あたりのミトコンドリア数は数個から数十個以上ある<sup>1)</sup>といわれている。また、ミトコンドリアの形態は決まったものではなく、細胞内で融合や分裂を繰り返し、動的に形態を変化させている。このようなことから細胞のミトコンドリア数を測定することは困難であると考えられる。一方、がん化と mtDNA 量の関連については不明なことが多く今回がん化によって mtDNA 量が増加するか明らかにしたい考え実験を行った。

### 2. 方法

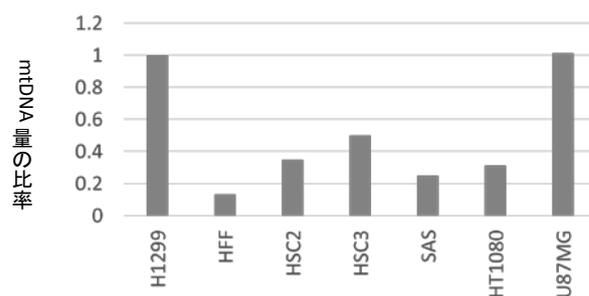
Gentra 社製 PUREGENE DNA Purification Kit を用いてゲノム DNA の抽出を行った。対象細胞として H1299、HFF、HSC2、HSC3、SAS、HT1080、U87MG を用いた。培養細胞をそれぞれシャーレで培養した。シャーレ内の培養液を除去した。1ml の PBS で洗浄後、300ml の cell lysis solution を加えた。シャーレの底に張り付いた細胞をはがし、チューブに移した。1.5 $\mu$ l の RNase solution を加え、インキュベートした。100 $\mu$ l の Protein Precipitation を加えた。20 秒間、最高速度でボルテックスにかけた。最高回転で 3 分間、遠心分離する。上澄みを新しいチューブに移した。300 $\mu$ l の イソプロパノールを加えた。蓋が閉まっていることを確認し、50 回ひっくり返した。1 分間、遠心分離した。DNA が沈殿しているのを確認した。ペレットを吸わないように上澄みを捨てた。300 $\mu$ l の 70% エタノールを加え、数回懸濁した。3 分間、遠心分離した。ペレットを確認し、上澄みを除去した。チューブのふたを開けたままにし、乾燥させた。50 $\mu$ l の DNA Hydration solution を加えた。抽出した 50 $\mu$ l の DNA 溶液を 10 $\mu$ g/ml に希釈した。

KAPA-SYBR FAST qPCR Kit を使用し、Real-Time PCR を行った。ターゲットを mtDNA、内部標準をアメロジェニンとした。アメロジェニンのプライマーとして (AMG\_S, AMG\_A)、mtDNA のプライマーとして (mt\_A1, mt\_A1R) を用いた。2X KAPA を 10 $\mu$ l、S (100pmol/ $\mu$ l) を 0.04 $\mu$ l、AS (100pmol/ $\mu$ l)

を 0.04 $\mu$ l、Sample を 2 $\mu$ l、DDW を 7.92 $\mu$ l で混ぜた。初期変性に 94 度を 2 分、94 度 10 秒→58 度 10 秒→72 度 5 分を 1 サイクルとして 40 サイクル、72 度で 10 分、その後 4 度で維持されるように設定し、リアルタイム PCR で Ct 値を計測した。 $\Delta\Delta Ct$  法を用いて H1299 のアメロジェニンに対する mtDNA 量を 1 とした時のほかの対象細胞の mtDNA 量の比率を計算した。

### 3. 結果

図 1: 縦軸はアメロジェニンに対する mtDNA 量の相対量を示す。トリPLICATE したサンプルの測定値の平均値をグラフに示した。実験は 2 回行い、代表的な結果を示した。



アメロジェニンに対する mtDNA の相対量を縦軸に示している。下に細胞名を記してある。H1299(肺の腺がん)と U87MG(悪性膠芽腫)で mtDNA が特に多いのがわかる。HFF(正常繊維芽細胞)が 1 番少なく、正常細胞よりがん細胞で mtDNA が多い傾向が見られた。

### 4. 考察

一般にがん細胞ではミトコンドリアによるエネルギー産生より解糖系によるエネルギー産生が優位であるとする (Warburg 効果) が知られている。しかし、今回の実験ではがん細胞で mtDNA が相対的に多くなっていることがわかった。これはがん化がミトコンドリア量に何らかの影響を及ぼしている可能性を示唆している。今後、組織や個体によるミトコンドリア量の違いを考慮した実験を行い、明らかにしていく必要があると考える。

### 5. 参考文献

<sup>1)</sup> 医歯薬系のための生物学, 丸山 敬・松岡 耕二, 58 頁, 2013 年, 裳華房

## Real Time PCR による遺伝子コピー数の解析

02114020 小池 俊貴

指導教員：安田 元昭（口腔分子微生物学教室）

キーワード：Real time-PCR、Amelogenin

### 緒言

本研究は Real Time PCR の  $\Delta\Delta CT$  法を用いて染色体上の遺伝子のコピー数の差を検出できるかどうかを目的とした。今回はその標的を Amelogenin 遺伝子とした。

Amelogenin とはエナメルマトリックスタンパク質の約 90% を占めるタンパク質である。細胞接着能を有し骨芽細胞やセメント芽細胞の分化に関与する。遺伝子の欠損、変異はエナメル質減形成に関わっている。また、マウスの Amelogenin 遺伝子は X 染色体にのみ存在していることが知られており、雄で 1 コピー、雌で 2 コピー存在している。

本研究ではこの特徴に着目し、この 1 コピーと 2 コピーの差を Real Time PCR で区別できるかどうか実験を行った。

### 方法

Genra 社製 Puregene DNA Purification kit を用いて、C57BL/6 マウスの雄の尾の組織細胞、C57BL/6 マウスの雌の尾の組織細胞、マウスの NIH3T3 からそれぞれ DNA を抽出した。NCBI のアルゴリズムを使用し設定したマウスの amelogenin と GAPDH にそれぞれに特有のプライマーの特異性を PCR、電気泳動で確認した後、Step one plus リアルタイム PCR システム KAPA-SYBR FAST qPCR kit にて Real-time PCR の  $\Delta\Delta CT$  で分析した。

$\Delta\Delta CT$  は増幅曲線から基準値まで増幅するまでのサイクル数の差から遺伝子のコピー数の比較をすることができる。<sup>1)</sup>

### 結果

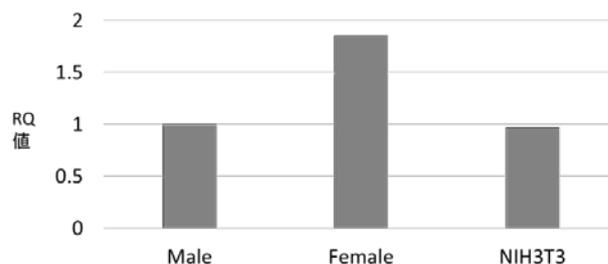
プライマーの特異性の確認の結果を図①、Real Time PCR の結果を図②に示す。図①は設定したプライマーがマウスに特有であることを示している。図②は雄の Amelogenin DNA 量を 1 としたときの他サンプル Amelogenin DNA の相対量を示している。グラフに示すように Amelogenin のゲノム DNA 量の比は雄ゲノム DNA、雌ゲノム DNA、NIH3T3 で 1:1.9:1 であった。この実験は 2 回行い、同様の結果を得ている。

図①…0.8%アガロースゲル電気泳動



①マウス繊維芽細胞②マウスがん細胞③ラット繊維芽細胞  
④ハムスター卵巣細胞⑤ヒトがん細胞

図②…縦軸は RQ 値でトリPLICATEしたサンプルの測定値の平均値を表したものである。実験は 2 回行い、代表的な結果を図に示した。



### 考察

今回の実験で雌の Amelogenin のゲノム DNA 相対量は雄の約 2 倍となっており、本解析法は計測した遺伝子の 1 コピーと 2 コピーの差を鑑別することに十分な精度があると思われた。しかし、実験回数が 2 回と少ないため、今後さらに実験回数を重ね、本解析法の有用性を示していかなければならない。また、NIH3T3 は雄由来のものであると思われた。本解析法は遺伝子増幅や遺伝子欠損の検出にも応用可能と考えられた。

### 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた指導教員の安田元昭先生に感謝致します。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂いた口腔分子微生物学教室の皆様へ感謝致します。

### 参考文献

<sup>1)</sup>よくわかるリアルタイム PCR 完全実験ガイド/羊土社

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

02114039 森 厚志

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：*A. actinomycetemcomitans*、インフラマソーム、IL-1 $\beta$ 、NLRP3

### 緒言

*A. actinomycetemcomitans* は侵襲性歯周炎、慢性歯周炎、感染性心内膜炎などの起炎菌の一つであり、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 $\beta$  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)。昨年の研究実習では、本菌がマウス樹状細胞に IL-1 $\beta$  の産生を誘導し、RNA 干渉法によりその活性発現が NLRP3 インフラマソームに依存することを報告した。

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 をノックアウト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性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

菌株は *A. actinomycetemcomitans* JP2 (Aa) を用いた。樹状細胞として A/J マウス由来 XS-106 を用いた。C57BL/6 (B6) ならびに B6 から NLRP3、ASC あるいは caspase-1 をノックアウトしたマウスの骨髄由来マクロファージ(BMM)を用いた。IL-1 $\beta$  は ELISA 法および Western blotting で測定した。

### 結果並びに考察

Aa は B6 由来 BMM に対して IL-1 $\beta$  産生誘導活性を示し、本活性は NLRP3、ASC、caspase-1 の

それぞれをノックアウトすることによりほぼ完全に消失した。(下図)

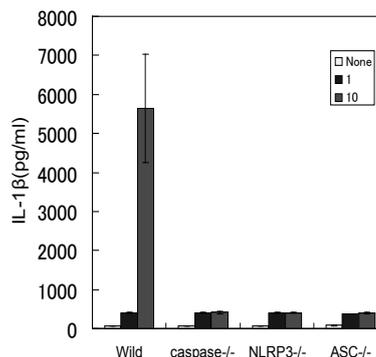


図 BMM に対する IL-1 $\beta$  産生誘導活性

これらの結果から、Aa は樹状細胞だけでなく、マクロファージにも IL-1 $\beta$  産生誘導活性を示し、その活性発現は NLRP3 インフラマソームに依存することが明らかになった。

### 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, *et.al*. Inflammasomes in health and disease. *Nature* 481: 278-286, 2012.

*Streptococcus sanguinis* による IL-1 $\alpha$  産生誘導活性

02114041 森本 康仁

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*、IL-1 $\alpha$ 、NLRP3 inflammasome

### 【緒言】

*Streptococcus sanguinis*(Ss)は、感染性心内膜炎の代表的起病菌として報告されている(1)。また、その病態の形成に IL-1 が関与していることが報告されている(2,3)。

IL-1 には IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  がある。昨年の研究実習では、IL-1 $\beta$  に注目し、Ss がマウス樹状細胞において NLRP3 inflammasome を活性化して IL-1 $\beta$  の産生が誘導することを報告した。

今回は、Ss がマウス樹状細胞ならびにマクロファージに IL-1 $\alpha$  の産生を誘導することを明らかにすることを目的とした。

### 【方法】

*S. sanguinis* ATCC 10556 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。標的細胞として A/J マウス由来の樹状細胞(XS-106)とマウス骨髄由来マクロファージ(BMM)を用いた。

6 $\times$ 10<sup>5</sup>個の XS-106 細胞に、Ss を加え、24 時間刺激した後、反応上清中に含まれる IL-1 $\alpha$ ならびに IL-1 $\beta$ の産生量を ELISA 法と Western blot 法で測定した。また、4 $\times$ 10<sup>5</sup>個の Caspase-1, NLRP3, ASC ノックアウトした BMM に Ss を加え、12 時間刺激した後、反応上清中に含まれる IL-1 $\alpha$ ならびに IL-1 $\beta$ の産生量を ELISA 法で測定した。Duolink により caspase-1 と IL-1 $\alpha$ の共局在を評価した。

### 【結果】

XS-106 細胞に対する Ss の IL-1 $\alpha$  産生誘導活性は calpain inhibitor III (MDL 28170)で阻害され、また、caspase-1, NLRP3 ならびに ASC をノックアウトしたマウス由来 BMM に対する活性も同様に阻害された。しかし、XS-106 細胞に対する活性は caspase-1 の特異的阻害剤である zYVAD-fmk では阻害されなかった(図1)。また、IL-1 $\alpha$  と caspase-1 が細胞質で共局在していた(図2)。

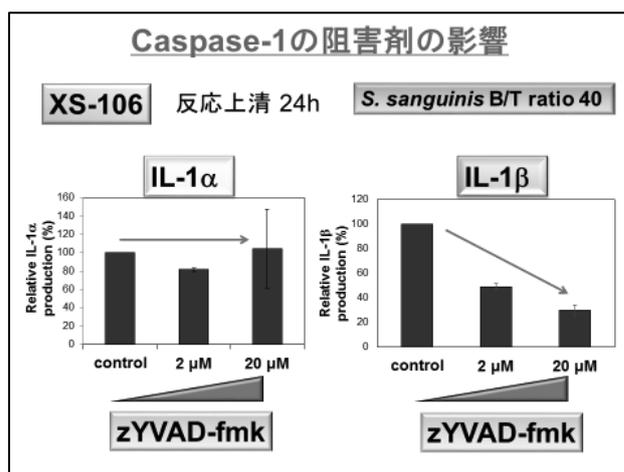


図1. Caspase-1 阻害剤(zYVAD-fmk)の影響

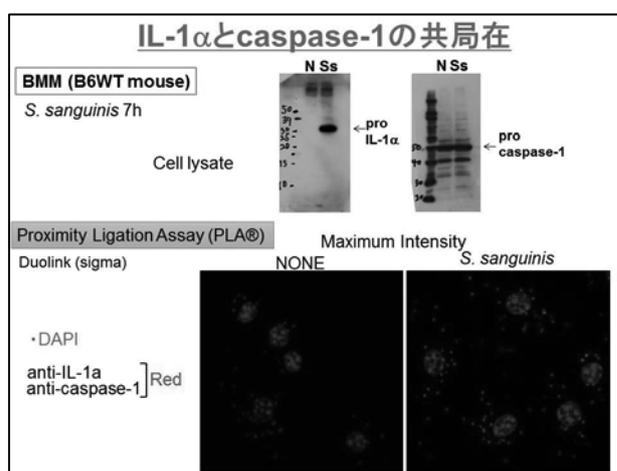


図2. IL-1 $\alpha$  と caspase-1 の共局在

### 【考察】

Ss は BMM に対して IL-1 $\alpha$  産生を誘導する活性を有し、その活性発現には NLRP3 inflammasome が関与していることが示唆された。

しかしながら、NLRP3 inflammasome の活性化で誘導される caspase-1 のタンパク分解活性が重要ではなく、caspase-1 と IL-1 $\alpha$  とが細胞質で共局在していることが何か重要な役割を果たしているのではないかと推測された。

### 【参考文献】

1. Douglas CW, J Med Microbiol 39: 179-, 1993.
2. Infective endocarditis, Philippe Moreillon.et.al, THE LANCET:363, 2004
3. Update on Infective Endocarditis, Thomas M.et.al, Curr Probl Casdiol, 2006

## *Candida albicans* 経口投与が抗体産生に及ぼす影響～経口免疫寛容を探る～

02114002 山本 大介

指導教員：長谷部 晃（口腔分子微生物学教室）

キーワード：経口免疫寛容, *C. albicans*, 口腔カンジダ症, IgA, IgG, ELISA

### 【緒言】

経口免疫寛容は、経口摂取したタンパク質が腸管に達して過敏な免疫反応が起こるのを避けるための生体の機能である。本研究では *Candida. albicans* の経口投与により *C. albicans* に対して免疫寛容が誘導されるか、また加齢による違いがあるか調べることを目的とした。

### 【材料と方法】

マウスは C57BL/6 の 7 週齢と 42 週齢を用いた。マウスは 3 つのグループに分けて、i) PBS を経口投与後に *C. albicans* を皮下免疫したグループ、ii) *C. albicans* を経口投与後に *C. albicans* を皮下免疫したグループ と、iii) 何も投与せず無免疫のコントロールグループとした。PBS あるいは *C. albicans* の経口投与は、2 週間で計 10 回、*C. albicans* が確実に腸管に達するようにゾンデを用いて行った。皮下免疫は、経口投与終了後に 3 週間、計 3 回行った。糞便あるいは血液中の *C. albicans* 特異的抗体の有無は ELISA 法で調べた。

皮下免疫は経口投与終了の翌日から背部皮下に投与を 3 週間にわたり週 1 回のペースで免疫を行い、その後マウスから血清と糞便を採取した。

ELISA 法では、まず 96 穴プレートの各ウェル底面に *C. albicans* 付着させた。ブロッキング後に、各ウェルにマウスから得られた血清や糞便成分を加えた。*C. albicans* に特異的な抗体は底面の *C. albicans* に結合するので、それらを検出するために Biotin 化した、マウス抗体に対する抗体と結合させた。Biotin 化した抗体は Avidin と強く結合するので、Avidin 化 HRP と基質で、発色させることにより、血清中ならびに糞便中の *C. albicans* に対する抗体を検出・定量した。

### 【結果】

7 週齢のマウスでは経口投与によって *C. albicans* 特異的

IgG の値に有意な差は認められなかったが、42 週齢のマウスでは経口投与により有意に IgG が誘導された (図 1)。

一方、IgA では、7 週齢のマウスでは生理食塩水を経口投与させたマウスでは *C. albicans* 特異的 IgA が誘導されたのに対し、*C. albicans* 経口投与では抑制され、42 週齢のマウスにおいてもコントロールに比べて誘導が抑制される傾向があった (図 2)。

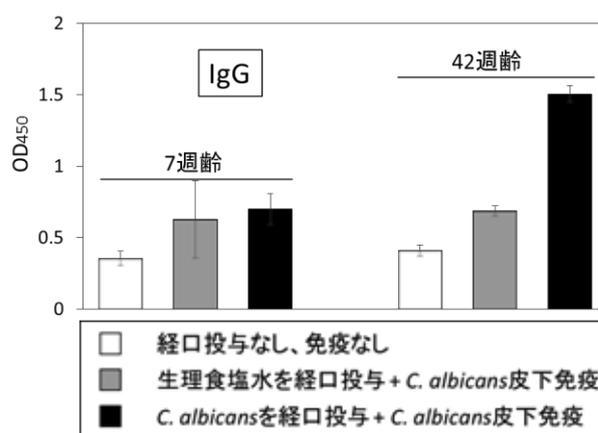


図 1. *C. albicans* 特異的的血清中 IgG 抗体価

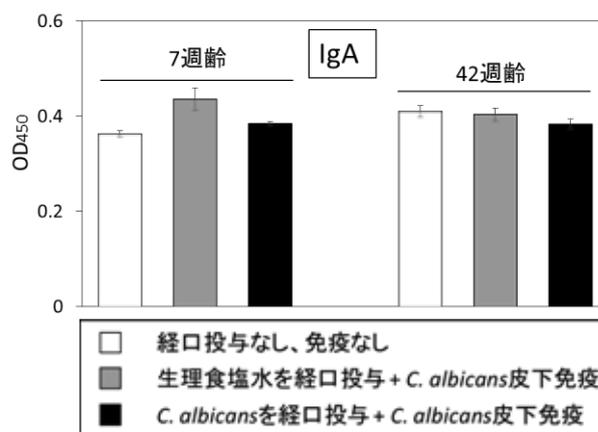


図 2. *C. albicans* 特異的糞便中 IgA 抗体価

### 【考察】

経口投与により抗体の誘導が抑制され、高齢のマウスではさらに強く抑制されると予測していたが、得られたデータは予測とは反していた。今後、この実験の再現性を確認し、経口投与の日数、免疫回数や部位などに関して再検討を行うことが必要であると考えられる。

Risedronate および Clodronate のアルカリ性ホスファターゼ活性阻害作用の Ca との拮抗性

02114018 河合大史

指導教員：鈴木邦明(細胞分子薬理学教室)

キーワード：Risedronate、Clodronate、アルカリ性ホスファターゼ(ALP)、Ca

### 1. 緒言

窒素含有の Risedronate、窒素非含有の Clodronate の 2 種類のビスホスホネートにおいて、その骨芽細胞に対する ALP 活性阻害作用が ALP 活性を促進させる 2 価金属と拮抗する関係にあるかを調べた。ALP 活性を引き起こすために必要な 2 価金属としては Mg、Zn、Ca などが知られるが、今回は Ca を使用することとした。

### 2. 方法

MC3T3-E1 細胞のミクロソームを使用し、ピロリン酸を基質とした Ca-ALP 活性阻害のビスホスホネート濃度依存性に対する、添加する Ca 濃度の影響を検討した。

事前の実験により、この 2 種類のビスホスホネートが MC3T3-E1 細胞の ALP 活性に対して、阻害作用を示すことは確認した。

### 3. 結果

#### (1)Risedronate について

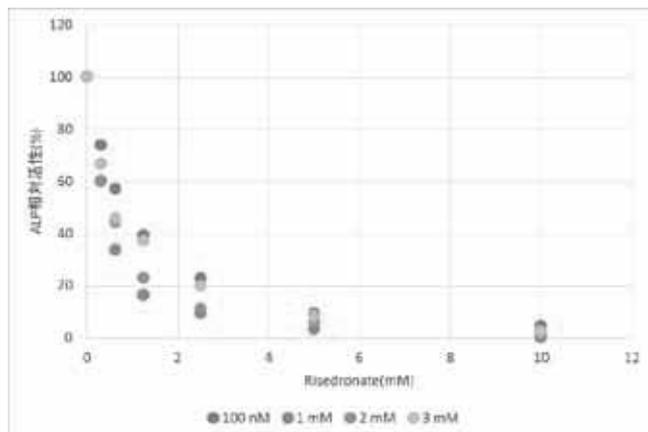


図 1 Risedronate による ALP 活性阻害の Ca 濃度依存性

表 1 Risedronate による 50%活性阻害濃度

Ca濃度	Risedronateによる50%活性阻害濃度
100 nM	1.02 mM
1 mM	1.52 mM
2 mM	1.39 mM
3 mM	1.16 mM

Risedronate における 50%阻害濃度は Ca 濃度を 100 nM

から 3 mM まで変えても、明確な変化は示さなかった。

(図 1、表 1 参照)

#### (2)Clodronate について

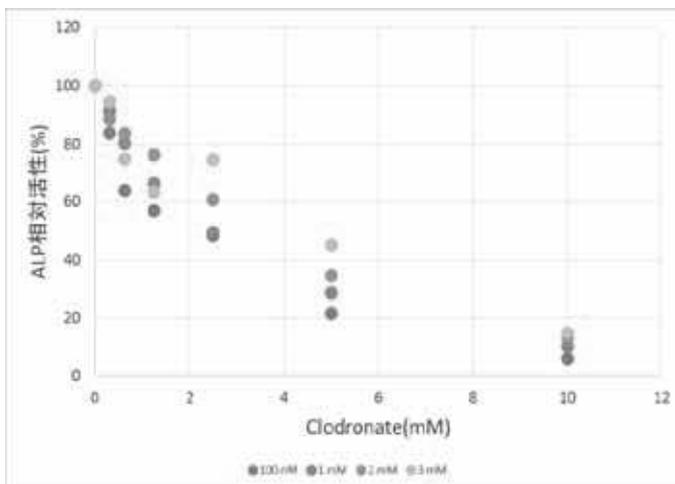


図 2 Clodronate による ALP 活性阻害の Ca 濃度依存性

表 2 Clodronate による 50%阻害濃度

Ca濃度	Clodronateによる50%阻害濃度
100 nM	1.57 mM
1 mM	1.98 mM
2 mM	2.55 mM
3 mM	2.76 mM

Clodronate による阻害においては、Ca 濃度を 100 nM から 3 mM まで変えると 50%阻害濃度は 1.57 mM から 2.76 mM まで増加した。

(図 2、表 2 参照)

### 4. 考察

上記の結果から Risedronate においてはその ALP 活性阻害は Ca との拮抗性を見せないが、Clodronate においてはその ALP 活性阻害は Ca と拮抗の関係にあることが分かった。

この 2 種類の検討だけでは不十分ではあるが、今回の結果にこのような差が表れた要因として、一方が窒素を含むものであり、もう一方が窒素を含まないものであることが考えられる。

ビスホスホネートによる骨の石灰化を促す骨芽細胞の ALP 活性の阻害作用が、生体に対してどのような影響をもたらしているのかはまだあまりわかっていないが、今回の研究実習において、窒素を含まない Clodronate を使用した場合においてその作用部位の Ca 濃度を上げておくことが可能であれば ALP 活性阻害作用を極力抑えることができるのではないかと考えた。

暗算作業効率に及ぼす各種飲料の効果

02114024 篠原 壮

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

我々が摂取する飲料には、ドリンク剤や清涼飲料水があるが、精神的、肉体的疲労回復に関してどのような効果があるのか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、短時間における各種飲料の効果について検討した。

2. 材料と方法

健康な被験者 A 一名に、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。

検査はタイマーを使用して行った（図 2）。作業慣れによる影響を排除するため、第 2 時点（②）の中央値をパーセント回答数 100% とし（縦軸）、第 2 時点（②）と第 3 時点（③）との間にドリンク剤を摂取した。値は同一飲料に対して実施日を変えて 4 回行った平均を示している。なお、コントロールは何も摂取しなかった場合のものを示している。この摂取前後の暗算作業効率の変化から各種飲料の効果を比較検討した。文献 3 より、5% 以上の上昇が見られれば効果があると認められ、今回はその報告に従った。

飲料として、ミネラルウォーター（ユニバー水：175ml：大学生協）、コーヒー（175ml：ティーズコーヒー）、紅茶（175ml：リプトンイエローラベル）、清涼飲料水である緑茶（おーいお茶：175ml：伊藤園）、レッドブル（185ml：レッドブル）、コココーラゼロ（350ml：コココーラ）、エナジードリンク（250ml：西友）、第 3 類医薬品であるリポビタンゴールド X（50ml：大正製薬）を用いた。



図 1 内田クレペリン検査用紙

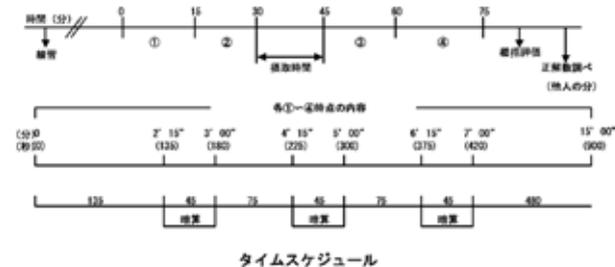


図 2 測定タイムスケジュール

3. 結果

リポビタンゴールド X およびレッドブル、エナジードリンクの第 4 時点で作業効率の向上が認められた（図 4）。ミネラルウォーター、コーヒー、紅茶（図 3）、コココーラゼロ、おーいお茶（結果は示していない）においては認められなかった。過去の研究実習の結果から作業効率の向上と嗜好との関連性が認められているので、嗜好に関して調べたところ、コーヒー、紅茶、レッドブル、おーいお茶は好む味であり、コココーラゼロは嫌いな味であり、水、リポビタンゴールド X、エナジードリンクはどちらでもなかった。

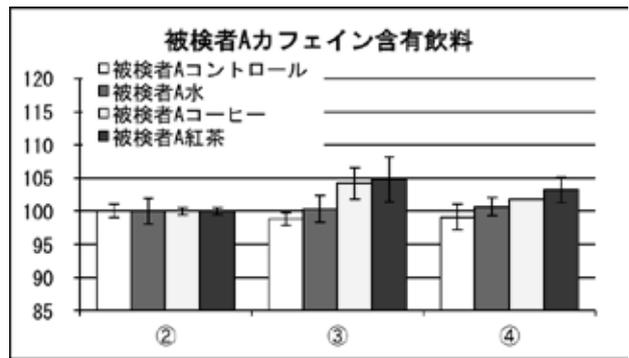


図 3 カフェイン含有飲料

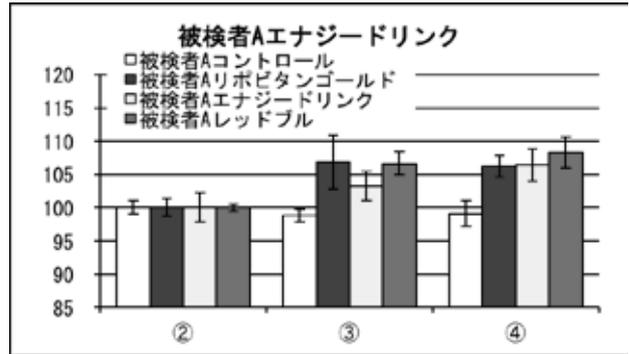


図 4 ドリンク剤

4. 考察

今回の被験者はコーヒー、紅茶などのカフェイン含有飲料を好み、普段より摂取していた。過去の研究実習の結果から、カフェイン含有飲料は作業効率の向上が認められる場合が多かったが、今回の結果はコーヒー、紅茶、コココーラゼロは認めず、レッドブル、エナジードリンク、リポビタンゴールド X で認めた。これは被験者の嗜好と関連を認めなかった。今回の結果は、過去の研究実習の結果と類似点がなく考察は難しいが、作業効率の向上が認められた飲料には糖類（果糖ぶどう糖液糖、砂糖など）が含有されており、糖類による作業効率の向上の可能性が示唆された。過去の研究実習の結果から、ミネラルウォーターなどの薬理学的効果が考えられない飲料の摂取および休憩による気分転換により作業効率が向上する場合が考えられたが、今回は認めなかった。

タウリンが配合されるリポビタンゴールドは第 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の可能性を認めたが、今回の結果からは考察できなかった。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、被験者も一名であることから一般的な効果を示すことはできないが、劇的に作業効率の上がる飲料は無いことが示唆された。

参考文献

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

Alendronate と Etidronate によるアルカリ性ホスファターゼ活性の阻害様式

02114007 中村那月

指導教員 鈴木邦明 (細胞分子薬理学教室)

キーワード: Alendronate、Etidronate、アルカリ性ホスファターゼ (ALP)、ナトリウムピロリン酸 (NaPPi)

### 1. 諸言

骨粗鬆症などの治療薬として用いられるビスホスホネートは、その副作用として顎骨壊死や大腿骨の非定型骨折などが知られている。今回は破骨細胞と相互関係をもつ骨芽細胞に着目し、窒素含有の Alendronate 及び非含有の Etidronate における種々濃度 Ca 存在下でのアルカリ性ホスファターゼ (Ca-ALP) 活性の阻害様式の違いを調べた。

### 2. 方法

Alendronate と Etidronate について、マウスの培養骨芽細胞様細胞のマイクロソームを使用し、NaPPi を基質として、種々濃度カルシウム存在下での Ca-ALP 活性について調べた。実験は弱アルカリ性環境下 (pH 9.43) で行い、Chifflet 法を用いてリンの定量を行った。またビスホスホネートによる Ca-ALP 活性の 50%阻害濃度を Hill plot 法により算出した。

### 3. 結果

①Ca-ALP 活性は Alendronate の濃度に依存して低下した。活性の 50%阻害濃度 (IC50) と free Ca 濃度には関係性は見られなかった。(図 1、表 1 参照)

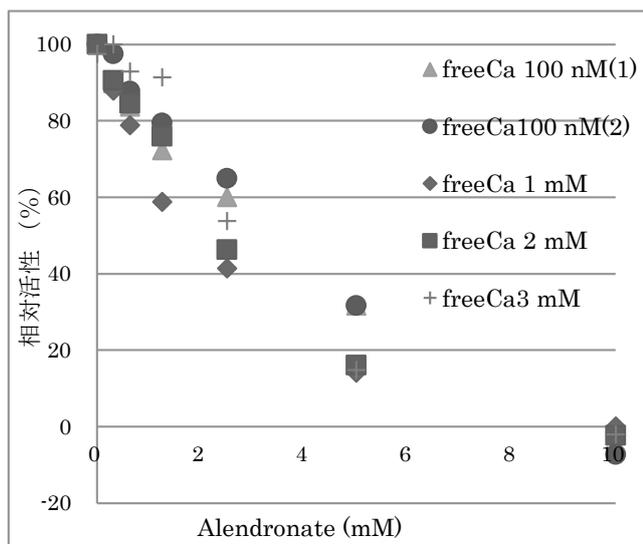


図 1 free Ca 濃度による比較 Alendronate

表 1 50%阻害濃度の比較 Alendronate

	50%阻害濃度 (mM)
Free Ca 100 nM(1)	2.94
Free Ca 100 nM(2)	3.15
Free Ca 1 mM	1.56
Free Ca 2 mM	2.00
Free Ca 3 mM	2.58

②Ca-ALP 活性は Etidronate の濃度に依存して低下した。また free Ca 濃度が 100 nM から 4 mM まで増加すると、Etidronate による阻害の IC50 値は 0.7 mM から 2.3 mM まで増加した。(図 2、表 2 参照)

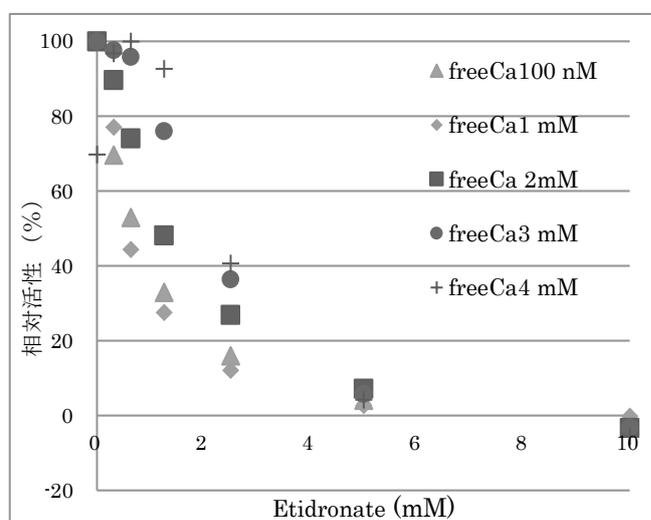


図 2 free Ca 濃度による比較 Etidronate

表 2 50%活性阻害濃度の比較 Etidronate

	50%阻害濃度 (mM)
Free Ca 100 nM	0.74
Free Ca 1 mM	0.64
Free Ca 2 mM	1.21
Free Ca 3 mM	1.94
Free Ca 4 mM	2.32

### 4. 考察

本実験では、窒素非含有である Etidronate による Ca-ALP 活性の阻害様式は Ca と拮抗していたが、窒素含有である Alendronate では関係性はみられなかった。以上の結果により、Alendronate と Etidronate による Ca-ALP 活性阻害様式は Ca との拮抗性において異なることが示唆された。

# グラスアイオノマーセメントの圧縮強さの経時的変化に関する研究

02114030 中戸川 矩之

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：グラスアイオノマーセメント、ダイアメトラル引張試験

## 1. 緒言

グラスアイオノマーセメント(GIC)は歯質接着性、歯髄刺激性が少ないこと、フッ素徐放性(抗う蝕性)、フッ素の取り込みといった優れた性質を有するため、充填、合着、予防充填など歯科臨床的に幅広く使用されている。しかしながら、GICの長期保存後の機械的強さの変化については不明な点が多い。本研究では、初期硬化後のGICを乾燥状態、R0水に浸漬した状態で保存した後、間接引張強さを計測することによりGICの機械的性質の経時的変化を検討した。

## 2. 方法

実験には修復用GICであるフジアイオノマータイプII(GC社)を使用した。GICを粉0.54g液0.20gの割合で練和し、直径約6mm、高さ約3mmの型枠に填入し、円柱上の試料を作成した。初期硬化したことを確認した後、37℃の恒温器で溶液に浸漬しない試料(乾燥群)とR0水に浸漬した試料(R0水群)を10分間、1時間、3時間、1日間、3日間、5日間、1週間、2週間の条件で保管した。それぞれの保管期間後、GICの機械的性質をダイアメトラル引張試験(Instron 万能試験機 島津製作所ヘッドスピード0.5mm/min)により検討した。

## 3. 結果

図1に乾燥状態におけるGICのダイアメトラル引張強さの経時的変化を示す。10分保管した群と1時間、3時間保管した群との間では有意差が認められなかったが、10分保管した群と比較すると1日以上保管した群では有意にダイアメトラル引張強さが高くなった。

図2にR0水に浸漬させたGICの圧縮強さの経時的変化を示す。乾燥状態で保管したGICと同様に、10分保管した群と比較すると1時間、3時間保管した群との間では有意差が認められなかった。1日以上保管した群では、10分間保管した群と比べ有意にダイアメトラル引張強さが高くなった。また、3時間保管までは乾燥群とR0水浸漬群間にダイアメトラル引張強さの差は認められなかった。

以上の結果より、乾燥状態でもR0水に浸漬させた状態でも1日以上保管することで圧縮強さが大きくなることがわかった。

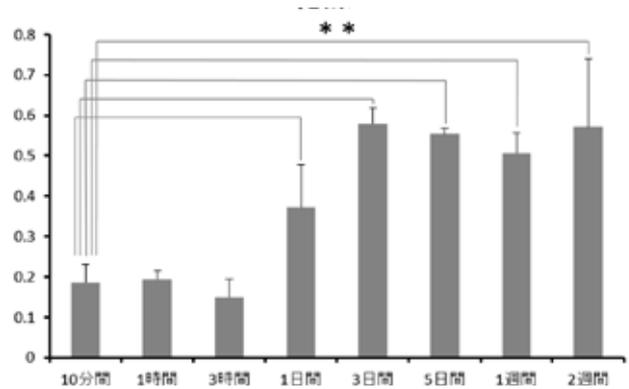


図1 乾燥状態におけるGICの圧縮強さの推移

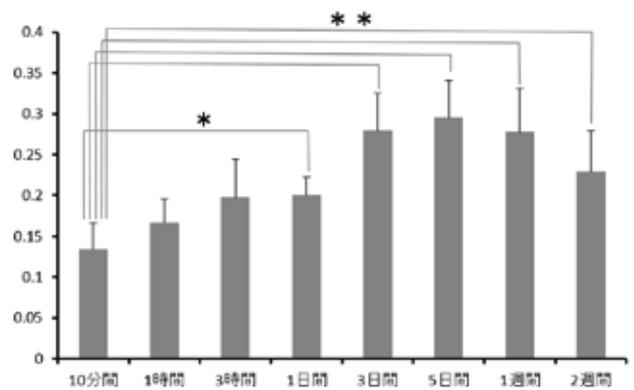


図2 R0水に浸漬させたGICの圧縮強さの推移

## 4. 考察

本研究の結果より、初期硬化後、乾燥状態でもR0水に浸漬させた状態でも3日以上保管することで圧縮強さが大きくなることがわかった。また、初期硬化3時間までは、乾燥状態とR0水の間接引張強さに差が認められなかった。このことは、GIC内部までR0水が浸透していないのではないかと考えられる。しかし、1日以上経過するとR0水よりも乾燥状態の方が間接引張強さにおいて高い値を示した。本研究は、常に乾燥状態もしくは溶液に浸漬したので特殊な環境であり、実際に使用される口腔環境とは違うが、GICの機械的性質を損なわないためにも、臨床において充填後乾燥状態を保つバーニッシュ塗布は必要ではないかと考えられる。

## 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健康科学講座生体材料工学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

# 従来型グラスアイオノマーセメントの物性に各種溶液が与える影響に関する研究

02114006 脇田修人

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：グラスアイオノマーセメント、ダイアメトラル引張試験、ダイナミック硬さ試験、SEM

## 1. 緒言

グラスアイオノマーセメント(GIC)は歯質接着性、歯髄刺激性が少ないこと、フッ素の取り込み、フッ素徐放性(抗う蝕性)といった優れた性質を有するため、臨床的に多用されている。GICは感水性を持つといわれており、初期硬化後に曝露された溶液の種類によって物性の変化に違いが生じるかについては不明な点が多く見られる。

本研究では、初期硬化が完了しているGICをR0水・ミネラルウォーター・炭酸水・コーラ zeroの4種類の溶液にそれぞれ浸しておいた際に、その溶液がGICの物性にどのような影響を与えるのかに関して、ダイアメトラル引張試験、ダイナミック硬さ試験、走査型電子顕微鏡(SEM)観察を行い検討した。

## 2. 方法

GICはフジアイオノマータイプII(GC社)を使用した。GICを粉0.54g液0.20gの割合で練和し、直径約6mm、高さ約3mmの型枠に填入し、円柱上の試料を作成した。5分後試料が初期硬化したのを確認した後、R0水・ミネラルウォーター(アルカリイオン水、キリンビバレッジ)・炭酸水(南アルプスの天然水スパークリング、サントリー)・コーラ zero(日本コカコーラ)に浸漬させた。対照群として浸漬しない試料(乾燥群)を用意した。それらを保温器(37°C)に保管し、一時間後にダイアメトラル引張試験(Instron 万能試験機 島津製作所 ヘッドスピード0.5mm/min)、ダイナミック硬さ試験(ダイナミック超微小硬度計 島津製作所 DUH-211/211S)、走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行った。以上の方法により、各種溶液がGICの物性にどのような影響を与えるのか調べた。

## 3. 結果

図1にダイアメトラル引張試験の結果を示す。ダイアメトラル引張試験において、乾燥群と各種溶液との間で有意な差は得られなかった。また、溶液間においても有意な差は得られなかった。

図2にダイナミック硬さ試験の結果を示す。乾燥群と比較して、各種溶液に浸漬させたGICでは有意にダイナミック硬さの低下が認められた。また、溶液間においてはミネラルウォーターと比較してコーラ zeroで有意にダイナミック硬さの低下

が認められた。

図3にSEMの写真を示す。R0水に浸漬させた試料表面が最も滑らかであり、コーラ zeroに浸漬させた試料表面が最も粗造に変化していた。

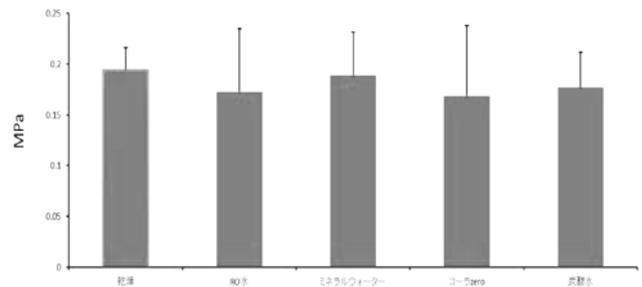


図1 ダイアメトラル引張試験の結果

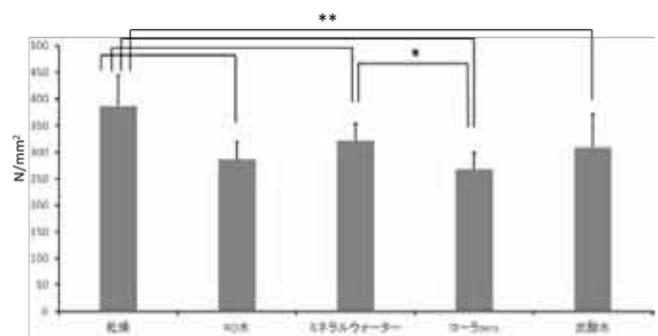


図2 ダイナミック硬さ試験の結果

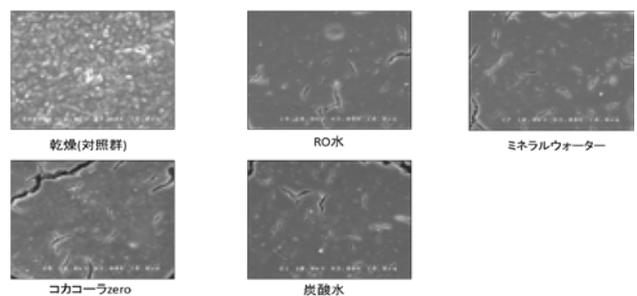


図3 SEM写真

## 4. 考察

本実験の結果より、GICは初期硬化が完了した後であっても溶液に浸漬することにより表面の硬さに影響を受けたと考えられる。臨床においてはGIC充填後、バーニッシュ等により表面の保護を行うことが必要ではないかと考えられる。

## 5. 謝辞

本研究を行うにあたり、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健康科学講座生体材料工学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

