

北海道大学歯学部 6 年生

4 6 期生（平成 2 8 / 2 9 年度）

研究実習報告集

[第 18 号]

Research Training Reports

Hokkaido University School of Dental Medicine

北海道大学歯学部46期生研究実習の概要

研究実習実施期間

平成28年8月～平成29年7月（5年次2学期～6年次1学期）

研究実習発表会

平成29年6月12日(月)、16日(金)

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）H28年度

田村 正人（口腔分子生化学教室）H29年度

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）

田村-辻 潔美 （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

02124015 関口 翔平（指導教員：土門 卓文）

舌神経に関する形態学的研究

02124031 石坂 文（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

02124036 小島 遥乃（指導教員：土門 卓文）

ホルマリン浸漬固定における固定液濃度が組織標本に与える影響

02124032 磯貝 明穂（指導教員：高橋 茂）

ホルマリン浸漬固定における固定温度が組織標本に与える影響

02124043 辻 綾香（指導教員：高橋 茂）

北海道縄文人とオホーツク人におけるクリブラ・オルビタリアおよび歯石沈着の検討

02124040 庵 敬（指導教員：森田 航）

咬耗から考える北海道縄文人とオホーツク人における下顎隆起の出現頻度

02124042 石丸 智也（指導教員：森田 航）

【口腔生理学教室】

強制運動が摂食行動に与える影響

02120701 布川 裕規（指導教員：船橋 誠、久留 和成）

15分間の傾眠による集中力の変化に関する生理学的研究

02120730 福井 俊（指導教員：久留 和成、船橋 誠）

味覚刺激が作業効率に及ぼす影響

02124021 富本 大翔（指導教員：船橋 誠、久留 和成）

匂い刺激が皺眉筋活動と精神性発汗に及ぼす影響

02124033 菊池 媛美（指導教員：船橋 誠、久留 和成）

【硬組織発生生物学教室】

上顎第二大臼歯近心頬側根の根管形態について

02114023 澤谷 和輝（指導教員：山本 恒之）

上顎第二小臼歯の根管形態について

02114031 中野 誠貴（指導教員：山本 恒之）

下顎第一小臼歯の根管形態について

02114034 藤嶋 将史（指導教員：山本 恒之）

上顎第一小臼歯の根管形態について

02124019 竹中 裕喜（指導教員：山本 恒之）

下顎第二小臼歯の根管形態について

02124025 町田 亮人（指導教員：山本 恒之）

*Klotho*遺伝子変異マウスの骨組織における石灰化関連蛋白の局在について

43090024 小林 博和（指導教員：長谷川 智香）

【口腔分子生化学教室】

胎生 14.5 日目マウス肢における CD31 を用いた血管の観察

02110293 羽藤 裕之（指導教員：田村-辻 潔美）

胎生期 14.5 日のマウスにおけるタイプIVコラーゲンをを用いた血管の染色

02124003 大多和 隼（指導教員：田村-辻 潔美）

マウス胎生期の血管における α SMA の発現

02124030 秋山 繭 （指導教員：田村-辻 潔美）

FGF-2 を用いた歯周組織再生治療と今後について

02120977 佐藤 舜 （指導教員：田村 正人）

ホワイトニングのメカニズムとその歴史について

02124012 久恒 楓 （指導教員：田村 正人）

骨基質タンパク質オステオカルシンがインスリン分泌に与える影響及び糖尿病との関連性

02114015 小木曾 哲（指導教員：田村 正人）

栄養素の歯周組織における役割について

02124002 寺田 梓 （指導教員：田村 正人）

【生体材料工学教室】

ゲニピン架橋マイクロ・ナノパターン化ゼラチンの作製

02110950 善徳 勇貴（指導教員：赤坂 司）

マイクロナノパターン上での細胞付着について

02120441 宮前 優介（指導教員：赤坂 司）

レジンマイクロ・ナノパターンと細胞接着挙動

02124035 城戸 春花（指導教員：赤坂 司）

齲蝕リスク低減を目指したお菓子作り

02124004 中木 菜美（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

02124016 米澤 史華（指導教員：阿部 薫明）

齲蝕リスク軽減を目指した菓子作成法の検討

02124018 平良 賢周（指導教員：阿部 薫明）

各種薬剤を用いた根管壁の洗浄効果

02114008 生井 佑紀（指導教員：八若 保孝、吉田 靖弘）

【口腔病理病態学教室】

腫瘍溶解ウイルスの効果増強条件の検討—5-FU 刺激に対する HuR の局在

02124006 中西 徳子 (指導教員:東野 史裕)

エトポシド刺激による HuR タンパクの細胞内局在変化

02124017 園部 昌直 (指導教員:東野 史裕)

UVR 刺激による HuR タンパクの細胞内局在変化

02124027 村椿 光 (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—TNF- α 刺激に対する HuR の局在

02124029 山本 悠太郎 (指導教員:東野 史裕)

口腔癌細胞におけるシスプラチン耐性機構の解析

02124009 佐藤 栄作 (指導教員:北村 哲也)

シスプラチン耐性細胞における 5-FU の併用療法の効果の検討

02124014 本間 風花 (指導教員:北村 哲也)

低用量メトロノミック化学療法によるがん間質反応の減弱と治療抵抗性の回避

02110566 石塚 啓太 (指導教員:菊地 央、間石 奈湖、樋田 京子)

抗癌剤治療後の癌細胞が分泌するサイトカインによる腫瘍血管内皮細胞の耐性獲得

02114027 武田 遼 (指導教員:菊地 央、間石 奈湖、樋田 京子)

【口腔分子微生物学教室】

アデノウイルスL5領域のスプライシングパターン

02111016 前田 友絵 (指導教員:安田 元昭)

アデノウイルスL5 領域のスプライシングがタンパク質発現に及ぼす影響

02124008 仲盛 優菜 (指導教員:安田 元昭)

抗菌性粘膜調整材による微生物増殖抑制作用

02124010 長澤 祐季 (指導教員:長谷部 晃)

抗菌性粘膜調整材による付着菌に対する殺菌効果について

02124041 田代 恵梨 (指導教員:長谷部 晃)

ヒトIL-1 α 遺伝子のクローニング

02120572 坂本 隆 (指導教員:柴田 健一郎、佐伯 歩)

IL-1 α 遺伝子の変異体作製

02124001 内田 知希 (指導教員:柴田 健一郎、佐伯 歩)

マイコプラズマ由来リポタンパク質によるインフラマソームの活性化

02120599 木村 拓 (指導教員:柴田 健一郎、佐伯 歩)

【細胞分子薬理学教室】

アルカリホスファターゼ活性における 2 価金属イオンと基質の関係

02114005 谷村 百和子（指導教員：鈴木 邦明）

低ホスファターゼ症とアルカリ性ホスファターゼ

02124024 福田 彬人（指導教員：鈴木 邦明）

各CRや研磨方法により得られる表面粗さの評価

02120131 高橋 静香（指導教員：南川 元）

各種表面処理によるTi表面性状の変化と石灰化組織及びコラーゲン合成の変化について

02120320 松本 奈緒（指導教員：南川 元）

暗算作業効率に及ぼすコーヒーとスイーツの効果

02124011 里村 美来生（指導教員：吉村 善隆）

暗算作業効率に及ぼすお茶とおかきの効果

02124038 高瀬 雅彩（指導教員：吉村 善隆）

各種飲料の暗算作業効率に及ぼす効果

02124039 高田 ひかる（指導教員：吉村 善隆）

顎動脈と下歯槽動脈に関する形態学的研究

02124015 関口 翔平

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⁾解剖体2体、田川³⁾は解剖体4体、小谷地⁴⁾は6体、鈴木⁵⁾は解剖体8体、金生は解剖体11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12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、79歳女性）のそれぞれ左・右側の頭頸部、計24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1型が6例、2型が12例、3型が6例であり、4型は観察されなかった。下歯槽動脈と下歯槽神経との位置関係は、後方型が13例、

外側型が4例、前方型は5例が観察された。

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⁾金生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12体の解剖体、左右計24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.
- 5) 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.
- 6) 金生 茉莉. 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45期生（平成27/28年度）研究実習論文報告集 17 : 1、2017.

舌神経に関する形態学的研究

02124031 石坂 文

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4体、柳⁴⁾は6体、水野⁵⁾は8体、山下⁶⁾は11体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12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12体（男性73、82、86、86歳、女性69、77、83、84、87、88、93、79歳、左・右側、計24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24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21例が上方型を示し、7中間型は2例、下方型は1例であった。

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、79歳女左・右の6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24例中21例に観察された。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2例のみしか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24例中17例に観察され、中1/3型が22例中6例に観察され、下1/3型は22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15:13, 2016.
- 6) 山下 航司. 舌神経に関する形態学的研究、北海道大学歯学部6年生45期生（平成27/28年度）研究実習論文報告集16:5, 2017.

顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

02124036 小島 遥乃

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、金沢⁶⁾は8体を、酒井⁷⁾は11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12体の左・右側24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⁾の報告と比較検討を行った。

2. 方 法

北海道大学大学院歯学研究院口腔機能解剖学教室に保管されていた解剖体12体(男性73、82、86、86歳、女性69、77、79、83、84、87、88、93、歳)の左・右側の頭頸部24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24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、79.87.88.93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、79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24例中17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⁾、金沢⁶⁾、酒井⁷⁾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8例、2型が13例、3型が3例観察され、市川³⁾、栗原⁴⁾、堀江⁵⁾、金沢⁶⁾、酒井⁷⁾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24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.
- 7) 酒井光太. 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 45 期生(平成 28 年度) 研究実習論文報告集 17:2, 2017.

ホルマリン浸漬固定における固定液濃度が組織標本に与える影響

02124032 磯貝 明徳

指導教員：高橋 茂（口腔機能解剖学教室）

キーワード：ホルマリン、固定液濃度、固定時間

緒言

組織細胞の形態構造を生体にあった時点の状態に近い状態に保存し、良好な標本を得るためには固定が重要な操作となる¹⁾。本研究では固定液濃度の違いによって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

7週齢 Wistar 系雄性ラット 2 匹を用い、エーテル吸入にて安楽死させ、肝と顎下腺を摘出した。1、10、30、100%ホルマリンに、室温にて 3h と 4 日の条件で浸漬固定を行った。その後通法に従ってヘマトキシリン染色標本を作製し、光学顕微鏡で観察した。

結果

1%の肝組織は、3h の固定では部位による染色性の違いが大きく、核と細胞質の間に空隙がみられ、収縮や変形している肝細胞が多数観察された。また、肝三つ組みは構成する細胞が崩壊していた。4 日の標本も同様であった。10%は、3h の固定では標本の染色は部位の違いによる差異は少ないが、肝細胞に収縮がみられ、肝類洞はやや拡張していた。肝三つ組みを構成する細胞の像は良好であったが、小葉間胆管の細胞の核質が消失されているものが多かった。4 日の固定では、肝細胞は収縮が軽度であった。30%は、3h の固定では標本の染色が全体的に一樣であり、肝細胞の収縮・変形が軽度みられた。肝三つ組みの像は比較的良好であった。4 日の固定では肝細胞の収縮は軽度だったが核周囲の細胞質の消失が強くおこっていた。100%は、3h の固定では部位による染色の違いがみられ、肝細胞の収縮がやや強く、肝類洞の拡張もみられた。4 日の標本も同様であった。

1%顎下腺は、3h の固定では標本の染色性は全体的に低く、腺房・導管は収縮し、周囲に空隙を生じていた。4 日の固定では、3h と比べると軽度に、腺房・導管の収縮、小葉間結合組織の断裂がみられた。10%は、3h の固定では染色差がなく、軽度の腺房・導管の収縮があるものの、小葉間結合組織の像や血管、赤血球は良好であった。4 日の固定ではさらに腺房・導管の収縮もみられず、全て良好であった。30%は、3h の固定では腺房に

やや収縮・変形を認める細胞があったが、概ね良好であった。4 日の固定では標本の染色性は不均一で、腺房細胞は染色性の高い部位は一方方向に伸ばされたように強く変形・収縮をおこしているものがあり、低い部分では空胞状となっているものもみられた。100%は、3h の固定では標本の染色が不均一であり、腺房・導管は収縮・変形しているものも多く、周囲に空隙を生じていた。4 日の標本も同様であった。

以上の所見を表 1 にまとめた。

表 1：固定液濃度・時間と組織別の標本の評価

	肝臓		顎下腺	
	3h	4日	3h	4日
1%	×	×	×	△
10%	△	○	○	◎
30%	○	△	○	△
100%	△	△	△	△

◎：良好 ○：やや良好 △：やや不良 ×：不良

考察

本研究では、高濃度、低濃度固定の標本は比較的不良となり、10%の標本が最も良好であった。ホルマリンは、タンパク質と反応して不動化し固定するホルムアルデヒドを希釈した固定液である¹⁾。そのためこの効果はホルマリンの濃度が高いほど強くなるので、1%のように薄すぎると固定力が低下し、100%のように濃すぎると組織表面がすぐに硬化し、内部にホルマリンが浸透できず良好な効果が得られなかったと考えられる²⁾。

固定時間に着目すると、10%以下では固定時間が長い方が、同じあるいは良い標本が得られ、30%以上では短い方が同じあるいは良い標本が得られていた。このことは低濃度ホルマリンは固定力が低いため長い固定時間が必要で、高濃度ホルマリンは短時間で固定できたためと考えられる。

本研究の結論として、ホルマリン浸漬固定における固定液濃度は低濃度、高濃度では良好な標本は得られず、10%が最も良好であるということが明らかになった。

参考文献

- 1) 山田 和順, 組織化学 初学者のための基礎と実際, 23-25, 1987
- 2) 渡辺 陽之助 坂口 弘 細田 泰弘, 病理組織標本の作り方 第 6 版, 15-17, 1986

ホルマリン浸漬固定における固定温度が組織標本に与える影響

02124043 辻 綾香

指導教員：高橋 茂(口腔機能解剖学教室)

キーワード：固定、固定温度、組織標本

1. 緒言

生物試料の固定は一般に各組織成分の形態学的構造の良好な保持を第一の目的としている。固定温度は固定の重要な因子と言われており迅速な固定を行う場合に固定液を加温する場合もある。しかしその反面、組織の障害も強くなるため特別な場合以外は使用されないとされている¹⁾。

本研究では固定温度が組織標本にどのような影響を及ぼすのかを目的として行った。

2. 方法

7週齢 Wistar 系雄性ラット2匹をエーテル吸入により安楽死させ、肝臓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、4℃、22℃、37℃、60℃でそれぞれ3時間、4日の固定を行った。エタノールによる脱水とクロロホルムによる置換を行い、パラフィンを作製した。各ブロックから4μm厚の切片を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を施して光学顕微鏡で観察した。

3. 結果

3時間の固定を行った肝組織において、4℃では標本全体にわたって肝細胞の細胞質の強い収縮が認められた。血管内の赤血球の細胞質は消失し、エオジンに染色されていなかった。22℃では、中心静脈付近の肝細胞の形態はおおむね良好であったが、中心静脈付近以外の肝細胞には部分的な収縮と細胞質の消失が認められた。37℃では、中心静脈付近の肝細胞の形態は22℃よりも良好でエオジンに好染している反面、標本辺縁や肝小葉辺縁部における肝細胞は収縮を起こし形態も変形しているものが多く認められた。60℃では肝細胞の収縮や変形に加えて標本辺縁部では組織内に不規則な裂隙が生じていた。小葉間胆管の細胞質の染色性の低下と核質の消失も認められた。

4日の固定を行った肝組織において、4℃では中心静脈付近の肝細胞は形態良好でグリコーゲン顆粒も明瞭に認められたが、標本辺縁部の肝細胞は核周囲の細胞質の消失が認められた。22℃では標本全体にわたり肝細胞や小葉間結合組織の形態は良好だった。37℃では標本辺縁部の肝細胞の収縮と核質の部分的な消失が認められたが、4℃より収縮は軽度であった。60℃では、標本全体の染色性の低下が認められ、肝細胞の収縮や変形に加えて標本内に不規則な裂隙が多く認められた。

3時間の固定を行った顎下腺において、4℃では腺房細胞はおおむね形態良好だったが、一部で収縮や変形が認められ、小葉間結合組織には一部断裂が認められた。22℃では腺房細胞、線条部や顆粒管は形態良好であり、収縮や変形を認めなかった。37℃では腺房細胞における収縮や変形が不規則に認められた。また結合組織には断裂が認められた。60℃では腺房細胞の収縮や変形に加えて細胞質

と核の染色性の低下がみられ、線条部導管や顆粒管の収縮が特に強く認められた。

4日の固定を行った顎下腺において4℃、22℃では腺房細胞、線条部や顆粒管の形態は標本全体において良好であった。37℃では標本中央部の腺房細胞において細胞質の収縮がみられ、標本辺縁部の腺房細胞では細胞質の分泌顆粒の消失が認められた。60℃では腺房細胞、線条部や顆粒管の収縮が強く、細胞間に空隙を生じていた。線条部細胞では基底線条が不明瞭となり、核と細胞質の染色性の低下も認められた。

以上の所見を表1にまとめた。

表1：固定温度と固定時間における組織別の標本の評価

	肝臓		顎下腺	
	3時間	4日	3時間	4日
4℃	×	△	△	◎
22℃	○	◎	◎	◎
37℃	○	○	○	△
60℃	×	×	×	×

◎：良好 ○：やや良好 △：やや不良 ×：不良

4. 考察

本研究では固定温度は室温が良い標本を得る条件であることが明らかになった。室温よりも高温で固定を行った場合、組織内で起こる自己融解の化学反応速度が促進され、組織内物質の抽出も活発に生じたためではないかと考えられる²⁾。一方、室温よりも低温で固定を行うと、これらの逆の変化が起こるが、固定剤の組織中への浸透速度が低下したため標本の状態が不良になったのではないかと考えられる²⁾。

本研究では固定時間が長いほど得られる標本の状態が良好である場合が多くあり、特に低温で顕著に認められた。標準固定時間は0.5–4時間の範囲であり固定時間が長すぎると、過固定の状態となり、組織細胞物質の抽出が活発に起こり組織は脆弱となって収縮または膨化して、組織化学反応も質的または量的に変化すると考えられている²⁾。今回、長期間固定・保存に向いている10%中性緩衝ホルマリンを使用したので、組織の障害は少ない状態で、長期間の固定により固定剤の組織中への浸透が充分に行われたため得られた標本の状態が良好になったのではないかと考えられる。

本研究の結論として、ホルマリン浸漬固定における固定温度は室温が望ましく、室温より低温、高温であっても得られる標本の状態は不良になることが明らかになった。

5. 参考文献

- 1) 監修：渡辺 陽之輔、坂口 弘、細田 泰弘、編：慶応義塾大学医学部病理学教室、病理学組織標本の作り方、第6版、13–17、1986
- 2) 山田 和順、組織化学 初学者のための基礎と実際、34–36、1987

北海道縄文人とオホーツク人におけるクリブラ・オルビタリアおよび歯石沈着の検討

02124040 庵 敬

指導教員：森田 航(口腔機能解剖学教室)

キーワード：北海道縄文人，オホーツク人，クリブラ・オルビタリア，歯石

緒言

北海道の歴史は本州と異なり、縄文文化の後には弥生文化ではなく、同じく狩猟採集生活を営むオホーツク文化が現れる。当時の生活環境を復元する一助として、北海道縄文人とオホーツク人の栄養状態(鉄欠乏性貧血の程度)と口腔衛生状態を明らかにすることを目的として本研究を行った。

資料と方法

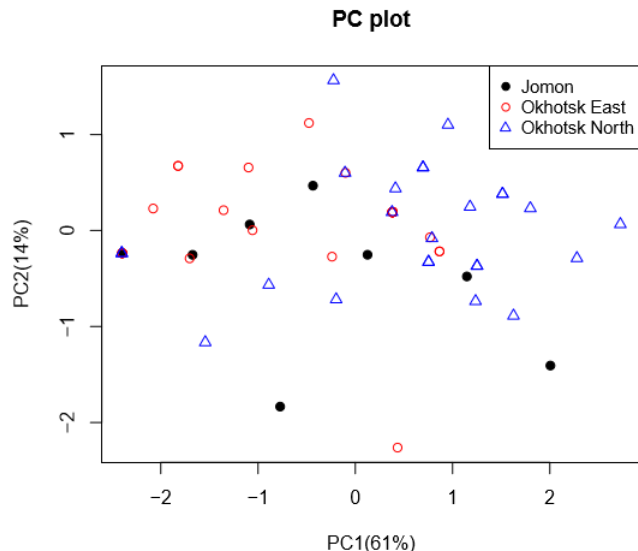
縄文人骨 14 体、オホーツク人骨 81 体(道東 38 体、道北 43 体)を用い、クリブラ・オルビタリアは Fairgrieve and Molto (2000)の方法に、歯石沈着は Brothwell (1981)の方法に従い分類した。クリブラ・オルビタリアの分析には Fisher の正確確率検定を、歯石沈着の分析には主成分分析、クラスカル・ウォリス検定、多重比較を用いた。

結果

クリブラ・オルビタリアの頻度に関して、縄文人・オホーツク人および、オホーツク道東人・オホーツク道北人において有意差は認められなかった。

歯石沈着量の分析結果を図 1 に示す。横軸は下顎歯列への歯石沈着を表しており、正の方向は沈着量が多く、負の方向は沈着量が少ないことを示している。縦軸は正の方向が上顎歯列への歯石沈着を表し、負の方向が下顎への歯石沈着を表している。歯石沈着量に関して北海道縄文人・オホーツク道東人、縄文人・オホーツク道北人において有意差は認められなかったが、オホーツク道東人・オホーツク道北人においてはオホーツク道北人で有意に歯石沈着量が多かった。

図 1：歯石沈着量の主成分分析結果



考察

クリブラ・オルビタリアの頻度に関して、縄文・オホーツク道東・道北それぞれの間で有意差が認められなかったことから、栄養状態(鉄欠乏性貧血の程度)に差はなかったと考えられる。

歯石沈着に関して、オホーツク道東と道北とで比較した場合に、道北のほうが有意に歯石沈着量が多く、そのほかの比較では有意差は認められなかったことから、歯石沈着量に差が出る要因を考えた。その要因として考えられるものは 2 つあり、1 つは食物の硬さで、軟らかい食べ物では硬い食べ物と比べて著明に歯垢の体積量が増える¹⁾、魚を食べていた集団とトナカイを食べていた集団とを比べると魚を食べていた集団のほうが歯石沈着量が多い²⁾という報告がある。もう 1 つの要因は飲水中の無機成分で、無機成分を多く含む水を飲んでいると歯石沈着量が多い²⁾という報告がある。

食物の硬さに関して、オホーツク道東では海獣猟を行っており主として海獣を食べていたこと、道北では漁労を行っており主として魚を食べていたことがわかっている。海獣の肉は硬いのに対し魚の身は軟らかいので、道東では硬いものを、道北では軟らかいものを食べていたと言える。

飲水中の無機成分に関して、現在の道東と道北で採れる天然水はともに軟水であることから、オホーツク文化期当時と現在で天然水の硬度が同等であると仮定すると、飲水中の無機成分が歯石沈着量に及ぼした影響は小さいと考えられる。

以上より、オホーツク道東と道北の歯石沈着量の差を作り出している要因は、道東と道北の食性の違いであると考えられる。

本研究の結論として、北海道縄文人とオホーツク人との間に栄養状態と口腔衛生状態の差はあるとはいえなかった。しかし、オホーツク道東人と道北人との間で口腔衛生状態に差が見られ、その差を作り出している要因として道東と道北の食性の違いが考えられた。

参考文献

- 1) Egelberg, J.: Local effect of diet on plaque formation and development of gingivitis in dogs. I Effect of hard and soft diets. Odont. Revy, 16:31, 1965.
- 2) Angela R. Lieverse. : Diet and the Aetiology of Dental Calculus. International Journal of Osteoarchaeology, 9:219-232, 1999.

咬耗から考える北海道縄文人とオホーツク人における
下顎隆起の出現頻度

02124042 石丸智也

指導教員：森田航(口腔機能解剖学教室)

キーワード：北海道縄文人、オホーツク人、咬耗、
下顎隆起、遺伝的要因

緒言

現代人では咬耗の程度が大きくなくても下顎隆起がみられる。そこで、咬耗の程度が現代人より進んでいる北海道縄文人とオホーツク人において、下顎隆起の出現頻度と咬耗の関係性を調べることを目的とした。

材料と方法

下顎隆起の資料として、北海道縄文人骨 22 体、オホーツク人骨 92 体で計 114 体の下顎骨を用い、大関、五十嵐(2007)の方法に従って score0~3 に分類した。score0 を下顎隆起なし、score1 以上を下顎隆起ありとして、Fisher の正確確率検定によって評価した。

咬耗の資料として、下顎隆起で用いた資料のうち、上下顎左右 6 番の残存している個体、北海道縄文人 6 体、オホーツク人 32 体で計 38 体の個体を用いた。Scott system に従って上下顎左右 6 番をスコアリングし、得られたスコアは主成分分析を行って評価した。

結果

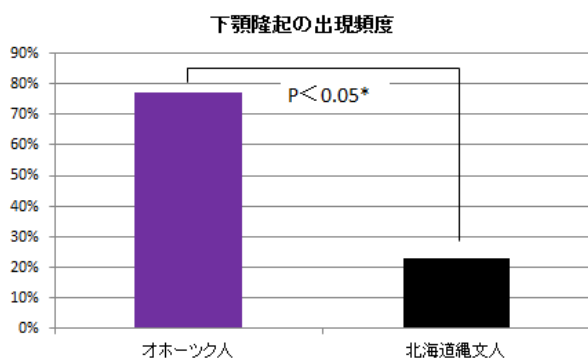


図 1：下顎隆起の出現頻度

下顎隆起の出現頻度に関して、Fisher の正確確率検定を行った結果、図 1 に示す通り北海道縄文人とオホーツク人とは下顎隆起の出現頻度に有意差があることがわかった。

咬耗の程度に関して、1 歯につき 4 つ、上下顎左右 6 番で合計 16 個のデータを変数として、主成分分析を行った

結果を図 2 に示す。咬耗に関しては北海道縄文人とオホーツク人とで有意差があるとは言えなかった。

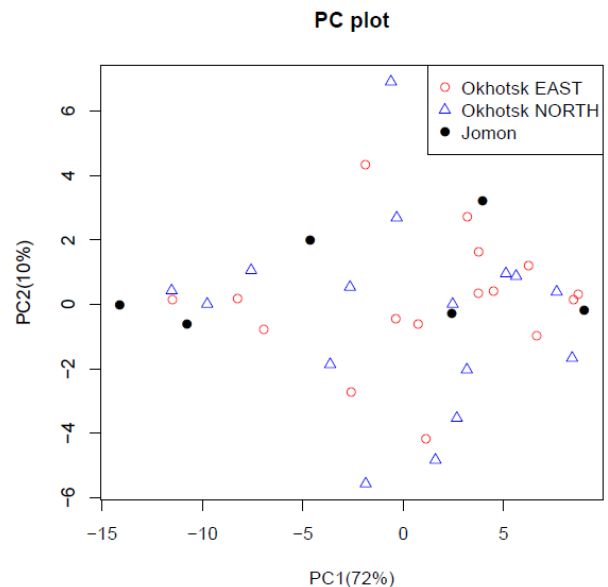


図 2：咬耗の主成分分析

考察

先行研究において、下顎隆起の出現に影響を与えるものとして遺伝的要因や非遺伝的要因があり、非遺伝的要因には力学的因子や環境因子が含まれると言われている。力学的因子に含まれるものとして咬耗から下顎隆起の出現頻度について検討したが、北海道縄文人とオホーツク人において、咬耗が下顎隆起の出現頻度に与える影響は大きくないと考えられた。北海道縄文人とオホーツク人とは時代背景や渡来ルートが異なるため遺伝的な差があり、遺伝的要因が下顎隆起の出現頻度の差に強く影響しているのではないかと考えられる。

参考文献

大関紗織,五十嵐由里子:近代以前の日本人における下顎隆起の出現頻度について,Anthropological Science (Japanese Series),115,97-107,2007
金澤英作 葛西一貴:歯科に役立つ人類学,40-57,2010,わかば出版

Buikstra JE, Ubelaker DH:Standards for data collection from human skeletal remains, Arkansas Archeological Survey Research Series 44,1994
Arkansas Archeological Survey, Fayetteville

強制運動が摂食行動に与える影響

02120701 布川 裕規

指導教員：船橋 誠、久留 和成（口腔生理学教室）

キーワード：トレッドミル、摂食量

1. 諸言

ラットの自発運動量が次第に増加した場合、低運動量時に一時的な摂食量の減少が起こり、それ以降の運動量の増加に伴って摂食量が増加することが報告されている¹⁾。本研究では強制運動においても同様の現象が観察されるかを調べた。

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 20 匹(190±15 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。自由摂食、自由飲水とした。毎日 16:00～17:30 の間に体重、摂食量の計測を行い、計測後に強制運動を行わせた。運動強度により以下の 4 群に分けた。

歩行速度 0 m/min で 30 分間の群 (control 群)

歩行速度 7 m/min で 20 分間の群

歩行速度 7 m/min で 30 分間の群

歩行速度 13 m/min で 30 分間の群

実験開始前には十分なハンドリング期間を設けた。実験開始前日の 2 日間は強制運動に慣れさせるトレーニング期間を設けた。歩行速度 5 m/min から開始し、5 分ごとに 1 m/min ずつ加速させた速度で、トレーニング 1 日目は 20 分間、2 日目は 30 分間の強制運動を行わせた。ただし、control 群についてはトレーニング時も歩行速度 0 m/min とし他の群と同じ時間トレッドミルに滞在させた。なお、トレッドミル内を歩行することができない個体については実験から除外した。飼料は CREA Rodent Diet CE-2 を、トレッドミルは Lafayette Instrument 社製 ラット用回転ケージ×6-80805A を使用した。統計学的解析については Tukey-Kramer 法を用い、有意水準は $p < 0.01$ とした。

3. 結果

動物数は control 群が 5 匹、歩行速度 7 m/min で 20 分間の群が 4 匹、歩行速度 7 m/min で 30 分間の群が 5 匹、歩行速度 13 m/min で 30 分間の群が 4 匹 であった。各群における摂食量の有意差は認められなかった (図 1)。また、各群における体重の有意差は認められなかった。

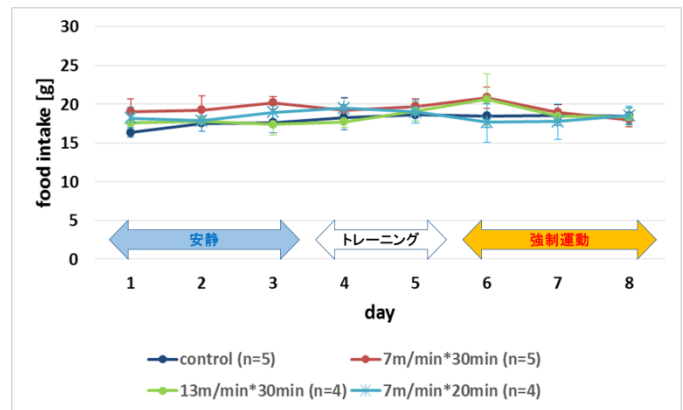


図 1 強制運動における摂食量の変化

4. 考察

本研究の結果からは強制運動による摂食量の変化は認められなかった。Tokuyama ら¹⁾ は、自発運動において低運動量時に摂食量の減少が起こると報告している。本研究と Tokuyama ら¹⁾ との相違点は運動方法が強制運動と自発運動であるという点と、運動を行わせる時間が指定された時間と 1 日を通して自由に運動を行うことができたという点である。Yanagita ら²⁾ は、強制運動は自発運動と比較し、PVN の副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン産生細胞を有意に刺激すると報告している。つまり、強制運動はラットにとってストレスになっていたことが推測される。本研究からは強制運動をさせた場合には一過性の摂食量減少は観察されなかったという現象については明らかとなったが、自発運動との違いについての詳細については今後の課題となった。

5. 参考文献

- 1) K. TOKUYAMA, M. SAITO 他 1 名. Effects of wheel running on food intake and weight gain of male and female rats. PHYSIOL. BEHAV. 28(5) 899-903, 1982
- 2) S. Yanagita, S. Amemiya 他 2 名. Effects of spontaneous and forced running on activation of hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurons in rats. Life Sciences. 80 356-363, 2007

15 分間の傾眠による集中力の変化に関する生理学的研究

02120730 福井 俊

指導教員：久留 和成, 舩橋 誠 (口腔生理学教室)

キーワード：傾眠, 集中力, 100 マス計算

緒言

睡眠時間の不足は集中力の低下を招く。しかし日中に長時間睡眠を取ると良好な深夜の睡眠を妨げてしまう。先行研究においては 15 分間の睡眠が日中に行える短時間で効果的な休憩方法であると提唱されている¹⁾。本研究は集中力の変化を指標にして 15 分間の傾眠の効果を検証することを目的とした。

方法

健康な大学生 8 名 (男性 7 名, 女性 1 名, 年齢 23~27 歳) を被験者とし, 実験時間帯は昼食後の 13 時~15 時とした。集中力の変化の尺度を 100 マス計算の速度とし, 測定には 100 マス計算アプリを用いた。ここでは傾眠を安静, 閉眼状態で椅子に浅く腰掛け背中を後ろに倒し, 上体が地面に対し 45° の角度をなす状態とした。実験群では初めに 100 マス計算の練習を行わせた。練習は 100 マス計算に慣れるために, 次に行う測定に使うアプリを用い, 各被験者に 3~7 回行わせた。練習は計測タイムが 1 回前より 1 秒以上短縮しないか, 延長した時点で終了とした。次に 15 分間の傾眠をさせ, 最後に 100 マス計算速度の測定を行った。測定回数は各被験者の練習回数と同じにした。対照群の休憩は傾眠以外の自由なものとし, 15 分間与えた。なお, 計算練習は 2 回目で速度が落ちた場合は 3 回目以降を行うという条件で行った。

結果

15 分間の休憩前後の最速値の平均値を比較したところこれらの間には統計学的有意差が認められなかった。一方で 15 分間の傾眠前後の 100 マス計算速度の最速値の平均値を比較したところ, 傾眠後は有意に計算速度が速くなっていた (図 1)。

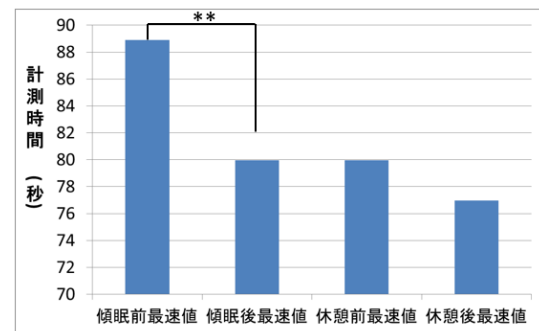


図 1 計算速度最速値の平均値

t 検定 ** $p < 0.01$

考察

15 分間の傾眠は集中力を向上させる可能性が示唆された。被験者数を増やすことで最速値の分布に偏りがなくなると考えられるので, 今後の課題としたい。

参考文献

1. Short daytime naps in a car seat to counteract daytime sleepiness: The effect of backrest angle. Mitsuo HAYASHI and Akiko ABE. (2008) 34-41

味覚刺激が作業効率に及ぼす影響

02124021 富本 大翔

指導教員：船橋 誠，久留 和成（口腔生理学教室）

キーワード：味覚刺激，単純作業負荷

1. 諸言

基本 4 味を用いた味覚刺激による単純作業負荷（計算負荷）時の作業効率の変化について興味を持ち，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

健常な男女 20 名（男性 16 名，女性 4 名，12～54 歳）を被験者とした．実験開始前に被験者に対し，味覚刺激に用いる味溶液を告知した．単純作業負荷として，他のストレスへの影響を観察したヒト試験¹⁾にも用いられている内田クレペリンテストを行った．これは，書かれた隣同士の数字を加算し，その解の 1 の位の数に数字間に書き込む作業である（図 1）．

6	3	7	8	1	6	3	8	5
9	0	5	9	7	9	1	3	
7	9	4	5	4	9	7	6	4
4	5	8	3	2	4	1	9	5

図 1. 内田クレペリンテストの問題例

1 回の内田クレペリンテストは 15 分ずつとし，1 回目終了後に味覚刺激を行い 2 回目を行った．味覚刺激は各味溶液を浸漬させた一辺 10mm の正方形の濾紙を舌尖に乗せ，10 秒後に吐出させた．実験終了後に採点を行い，テストの 1 回目と 2 回目それぞれの解答数，正答率を算出した．グルコース摂取によって甘味を感じし血糖値が上昇した場合には，作業の正確性や集中力が保持される可能性がある²⁾ことから，その影響を除外するために甘味としてサッカリンを用い，コントロールとして蒸留水を用いた．

〔味溶液〕サッカリン水溶液（10mM），塩化ナトリウム水溶液（125mM），クエン酸水溶液（130mM），塩酸キニーネ水溶液（7mM）

3. 結果

解答数は，4 種全ての味覚刺激により増加する傾向にあり，蒸留水で増加する傾向はなかった（図 3）．

正答率は，変化が認められなかった（図 4）．

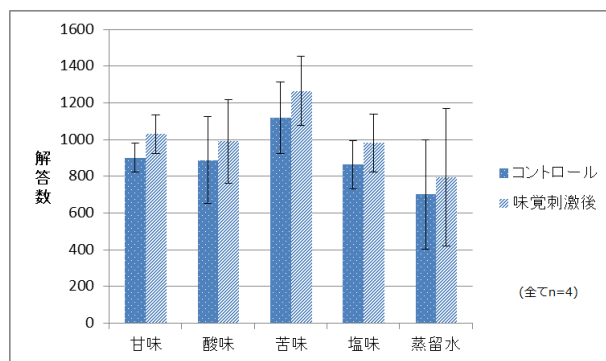


図 3. 前後半それぞれの解答数

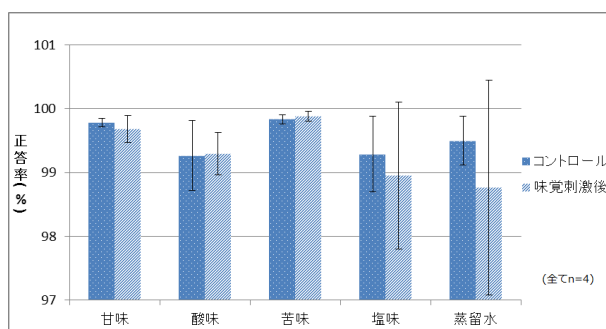


図 4. 前後半それぞれの正答率

4. 考察

結果から，検査への慣れにより解答数が増加するのではなく，味覚刺激により解答数が増加する可能性があることがわかった．したがって味覚刺激により計算作業効率が向上する可能性が示唆された．しかし $n=4$ と標本数が少ないため，今後は被験者数を増やすことによりデータの信頼性を高めることが課題となった．

5. 参考文献

- 1) 石崎 太一，黒田 素央，他 3 名，鯉節だし摂取が単純作業負荷時の精神疲労・ストレスおよび作業効率に及ぼす影響，日本食品科学工学会誌 54(7), 343-346, 2007.
- 2) 磯本知江，黒木由布子，他 5 名，糖や甘味が精神的ストレス応答に及ぼす影響，砂糖類・でん粉情報(21), 35-40, 2014.

匂い刺激が皺眉筋活動と精神性発汗に及ぼす影響
02124033 菊池 媛美
指導教員：船橋 誠、久留 和成（口腔生理学教室）
キーワード：匂い刺激、精神性発汗、皺眉筋活動

1. 諸言

歯科治療を苦手とする人の中には歯科治療恐怖症の患者が存在する。歯科治療に特有の味、匂い、痛み、音などはストレスになり得る本研究では、匂い刺激によるストレスに興味を持ち、皺眉筋活動及び精神性発汗の測定を行い、なおとストレスの関係を明らかにするため実験を行った。

2. 方法

健常成人 12 名(男性 8 名、女性 4 名、平均年齢 23.5 歳)を被験者とした。匂い刺激を各 30 秒間ずつ与えその間の皺眉筋活動及び精神性発汗を計測した。各匂い刺激の間は 5 分間の安静とした。皺眉筋活動量の計測は筋電図、精神性発汗の測定は皮膚電気抵抗測定装置(UFI)を用いて行った。無刺激時を Control とした。

[匂いサンプル]

ラベンダーオイル(100%, 0.15 ml) , グレープフルーツオイル(100%, 0.1 ml) , ジメチルサルファイド(0.01%, 0.4 ml) , メチルメルカプタン(0.1%, 0.5 ml)

3. 結果

匂い刺激時の皺眉筋活動量は無刺激時の皺眉筋活動量と比較し、有意差は認められなかった。メチルメルカプタン刺激時の皺眉筋活動量は他の条件と比較し、活動量が大きい傾向が認められた。(図 1)

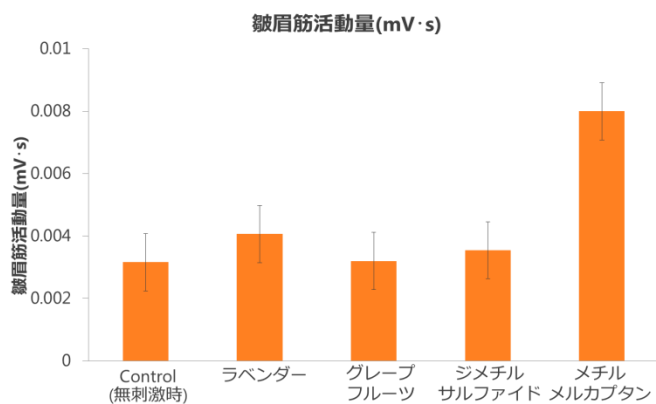


図 1：匂い刺激時の皺眉筋活動量

精神性発汗はどの匂い刺激によっても生じた。メチルメルカプタンによる発汗量はラベンダーオイル、グレープフルーツオイルによるそれに対し、有意差を認めた。(図 2)

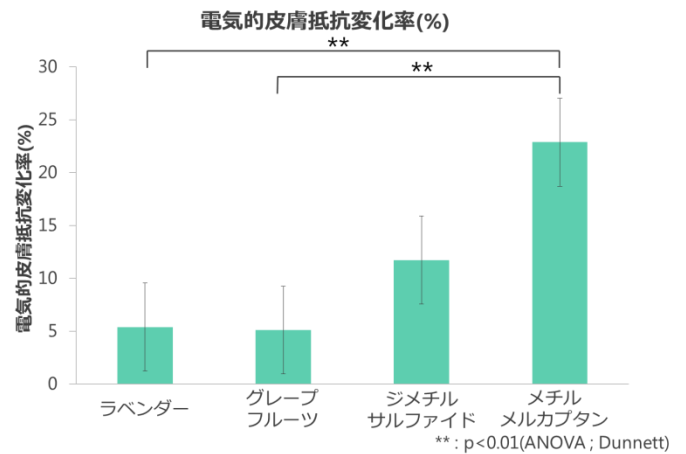


図 2：匂い刺激時の電氣的皮膚抵抗変化率

メチルメルカプタン刺激時の皺眉筋活動及び精神性発汗の波形の一例を示す(図 3)。L この記録から、皺眉筋活動と精神性発汗は同期して起こっていることが分かった。

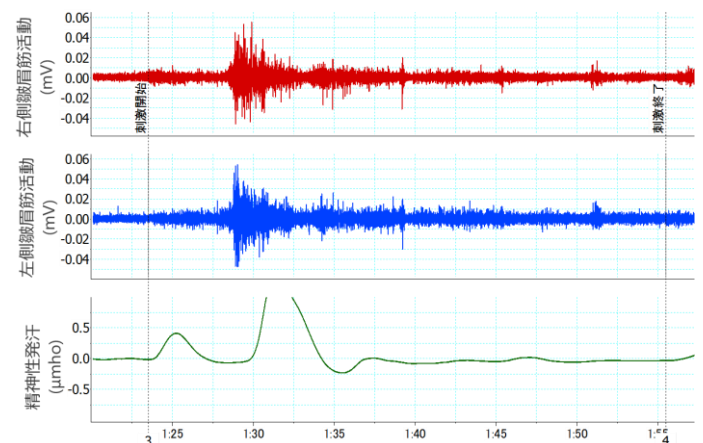


図 3：メチルメルカプタン刺激時の皺眉筋活動及び精神性発汗の一例

4. 考察

本実験で用いた匂い刺激に対しては精神性発汗の反応が明瞭に認められた。また、メチルメルカプタンのような強い匂い刺激では精神性発汗のより強い反応が認められることが分かった。匂い刺激に対して皺眉筋活動が顕著に認められなかったのは、皺眉筋活動量自体が小さく、変化が分かりにくい為だと考えられる。今後、匂い刺激の種類や強度を変えて実験を行うことを課題としたい。

5. 参考文献

1. 新島旭：アロマセラピーの生理学的基礎，日本アロマセラピー学会誌，6，13-21，2007
2. 北村かおる，吉原俊博，星野恵，大島昇平，種市梨紗，八若保孝（2016）：小児歯科診療における内在する情動変化の評価方法に関する研究-皮膚電気活動と短時間心拍変動解析の比較-，小児歯科学雑誌，54(4)：450-461，2016.

上顎第二大臼歯近心頬側根の根管形態について

02114023 澤谷和輝

指導教員：山本恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：上顎第二大臼歯、根管形態、透明標本

諸言

歯科治療における根管治療の重要性は言うまでもない。確実な根管治療を行うには、対象歯の根管形態を十分に把握しておく必要がある。上顎第二大臼歯は清掃性が悪く、う蝕治療、ひいては根管治療の対象歯になりやすいと思われる。同歯の近心頬側根の根管形態についての文献はあるものの¹⁻³⁾、私自身が直接調べ、それらと比較、考察しようと思い本研究を行った。根管形態の観察法には幾つかあるが、歯を破損することなく根管形態を視覚化できる、現在最も有効とされる透明標本法を用いた。

材料と方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室が所有し 10%ホルマリン溶液に保存されていた、根面に齲蝕がなく 3 根性の上顎第二大臼歯（右 29 本、左 24 本）を材料とした。なお、提供者の年齢、性別等は不明であった。60℃、24%水酸化ナトリウム水溶液を用いて、歯牙表面の軟組織を化学的に除去し歯ブラシで清掃した。墨汁と歯牙をピーカーに入れて、ガラスチャンパー内に置き、真空ポンプにより陰圧を利用して根管内に墨汁を流入させた。5%ギ酸水溶液で 4～5 週間脱灰後、再度墨入れを行った。歯ブラシで清掃後、70%アルコールで一晩保存し、ついで 80、90、100%、および無水アルコールで 1 日ずつ脱水した。サリチル酸メチルで標本を透明にした後、スチレンモノマー（2 日）、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（2 日）、リゴラック（1 日）、0.3%ベンゾイン入りリゴラック（1 日）に浸漬しレジンを浸透させた。重合前に余剰なレジンをふき取り、紫外線重合器で 1 日間重合した。

結果

一般に根管形態は以下の 3 種類に分類される。本研究もこれに従った。

単純根管：1 本の根管が 1 つの根尖孔に開孔する

完全分岐根管：2 本の根管が 2 つ以上の根尖孔に開孔する

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

各根管形態の出現数と頻度を表 1 に示す。

表 1： 3 種類の根管形態の出現数と頻度

	右	左	合計
単純根管	17本 58.6%	14本 58.4%	31本 58.5%
不完全分岐根管	2本 6.9%	8本 33.3%	10本 18.9%
完全分岐根管	10本 34.5%	2本 8.3%	12本 22.6%
計	29本	24本	53本

考察

不完全分岐根管は、加齢により単純根管が圧平・狭窄されて形成されるといわれる。本研究でも以下に言及する過去の研究でも、歯牙提供者の年齢が不明のため、単純根管と不完全分岐根管の頻度を別々に比較、考察しても意味はない。そこで、両者合わせて 1 つの根管形態として扱うことにする。単純根管と不完全分岐根管の合計は、本研究、38 期生阿部²⁾、43 期生木村³⁾では、それぞれ 77.4%、78.1%、83.1%、完全分岐部根管については 22.6%、21.9%、16.9%と若干の差が生じた。その理由を以下のように考える。①いずれの研究も標本数が少なく不十分であった。標本数を数百単位とするとばらつきがなくなると推測できる。②研究者により根管形態の判定基準に若干の差があった。基準のさらなる統一化、明確化が必要であろう。

上記のような若干の差があったとしても、「上顎第二大臼歯近心頬側根は若年者であっても約 20%が分岐根管（＝2 根管）であり、この数字は経年的に増加する」ということは言えると思う。これを本実習の結論とするとともに、臨床の場に出てからの同歯の根管治療に役立てたい。

根管形態を肉眼で直接に観察することで、その複雑性を再認識できた。この経験を臨床に生かし、自分の受け持つ患者に還元してゆきたい。

参考文献

1. 歯の解剖学 第 22 版 藤田恒太郎著 p.65-66; 1949 金原出版 東京
2. 阿部千尋 「上顎第二大臼歯の近心頬側根の根管形態について」 38 期生研究実習論文報告書 [第 10 号] p.43 ; 2009
3. 木村雄太郎「上顎第二大臼歯の近心頬側根の根管形態について」 43 期生研究実習論文報告書 [第 15 号] p.26 ; 2014

上顎第二小臼歯の根管形態について

02114031 中野誠貴

指導教員：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

歯科治療において、根管治療は最も Basic で、かつ頻度の高い治療分野である。そのため、歯科医師にとって根管形態の理解、把握は不可欠である。上顎小臼歯については、第一小臼歯では単根管と 2 根管の両方が出現し、複雑であることはしばしば記載されている。その一方、第二小臼歯の根管形態に関する記載は少ないように感じられる。そこで、本研究で上顎第二小臼歯の根管形態を透明標本により調べることにした。

方法

北海道大学歯学部硬組織発生生物学教室が所有し 10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面齧蝕がなく単根性の上顎第二小臼歯（右 25 本、左 25 本）を材料とした。60℃、24%水酸化ナトリウム水溶液を用いて、歯牙表面の軟組織を化学的に除去し歯ブラシで清掃した。つづいて墨汁と歯牙をビーカーに入れガラスチャンパー内に置き、真空ポンプにより陰圧を利用して根管内に墨汁を浸透させた。5%蟻酸水溶液で 4 週間かけて脱灰後、再度墨入れを行った。歯ブラシで清掃後、70、80、90、100%、および無水アルコールで 1 日ずつ脱水した。サリチル酸メチルに 2 日間浸漬し透明にした後、スチレンモノマーに 2 日、およびスチレンモノマーとポリエステルレジン の 1:1 混合液に 2 日、ポリエステルレジンに 1 日、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンに 1 日浸漬した。筆で標本表面のレジンにぬぐい、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⁾。

- ① 単純根管：1 本の根管が 1 つの根尖孔に開孔する。
- 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。
- 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。

3 種類の本数（頻度）を以下に記す。

単純根管：左 8 本（32.0%）、右 9 本（36.0%）、
計 17 本（34.0%）

完全分岐根管：左 3 本（12.0%）、右 2 本（8.0%）、
計 5 本（10.0%）

不完全分岐根管：左 14 本（56.0%）、右 14 本
（56.0%）、計 28 本（56.0%）

考察

加齢による二次象牙質の形成や齧蝕による局所的な修復象牙質の形成のため、経年的に根管は近遠心的に圧平され、単純根管は不完全分岐根管に移行すると言われる。本研究および引用した過去の報告では、歯牙提供者の年齢が不明なため、単純根管と不完全分岐根管の頻度を考察してもあまり意味をなさない。そこで、①「単純根管＋不完全分岐根管」と②「完全分岐根管」の 2 つに分類し考察する。

本研究では①90.0%②10.0%という結果が得られた。透明標本法により上顎第二小臼歯（単根）の根管形態を調べた過去の研究では、

齋藤²⁾：①83.0% ②17.0%

浜谷³⁾：①92.8% ②7.2%

相良⁴⁾：①81.8% ②18.9%

となっている。結果に差が生じた理由としては、1. 標本の絶対数が不足している、2. 研究者で分類基準が若干異なる、などの理由が考えられる。今後の検討課題となるであろう。

実際は 2 根性の上顎第二小臼歯も約 5%出現する。2 根性歯の根管形態を完全分岐根管とみなし、本研究結果を計算し直すと、①「単純根管＋不完全分岐根管」は 85.5%、②「完全分岐根管」は 14.5%という数値が得られた。同様に、齋藤²⁾ではおよそ①79.0%、②21.0%、浜谷³⁾では①88.0%、②12.0%、相良⁴⁾では①78.0%、②22.0%となった（筆者の再計算による）。

以上から、「上顎第二小臼歯全体では分岐根管（完全分岐根管＋不完全分岐根管）、すなわち 2 根管性の歯は、若年者でも 10%以上は確実に存在し、この数字は加齢により増加してゆく」ということを本研究の結論としたい。この結論は非常に重要で、今後つねに臨床の場で念頭に置きたいと考えている。

今回の実習を通して根管形態の複雑性を実感でき、根管治療は私が考えていたよりも遥かに高い技術を要する処置だと再認識させられた。このことだけでも本実習の意義を充分に感じた。

参考文献

- 1) 歯の解剖学 第 22 版 藤田恒太郎著 P.68-70 ;
1995 金原出版 東京
- 2) 齋藤由里子 「上顎第二小臼歯の根管形態について」
41 期生研究実習論文報告書（平成 23/24 年度）P.47-
48 ; 2012
- 3) 浜谷絵里 「上顎第二小臼歯の根管形態について」
43 期生研究実習論文報告書（平成 25/26 年度）P.28 ;
2014
- 4) 相良ふみ「上顎第二小臼歯の根管形態について」44
期生研究実習論文報告書（平成 26/27 年度）P17 ;
2015

下顎第一小白歯の根管形態について

02114034 藤嶋将史

指導教員：山本恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：下顎第一小白歯、根管形態、透明標本

緒言

根管治療を的確に行うために、根管形態についての知識と理解が不可欠である。上下顎第一大臼歯など、特定歯種の根管形態は講義などでよく扱われたが、他の歯種、特に単根歯の根管形態について詳しく知る機会は無かった。そこで、特に下顎第一小白歯を選び、その根管形態を透明標本により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所有の 10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面に齲蝕のない下顎第一小白歯（右 28 本、左 28 本）を材料とした。60℃、24%NaOH 水溶液で、30 分処理し軟組織を除去した。ビーカーに墨汁と標本を入れ、ガラスチャンパー内に置き、真空ポンプにより減圧して根管内に墨汁を流入させた。5%蟻酸水溶液で 4～5 週間脱灰した後に再度墨汁を流入させた。歯ブラシで清掃後、70%アルコールで 1 日保存し、80、90、100%、および無水アルコールで各々1 日ずつ脱水した。サリチル酸メチルに 2 日浸漬し標本を透明にした後、スチレンモノマーに 2 日、スチレンモノマーとポリエステルレジンの 1:1 混合液に 2 日、ポリエステルレジンの 1 日、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンの 1 日浸漬し、レジンを標本に浸透させた。筆で標本表面の余剰のレジンを拭い、紫外線重合器で 1 日重合した。

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 各根管形態の出現歯数と頻度

	右 本数 (%)	左 本数 (%)	計 本数 (%)
単純根管	23 (82.1)	23 (82.1)	46 (82.1)
完全分岐根管	3 (10.7)	4 (14.3)	7 (12.5)
不完全分岐根管	2 (7.1)	1 (3.6)	3 (5.4)
計	28 (100)	28 (100)	56 (100)

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、単純根管は近遠心的に圧平され不完全分岐根管へ移行するとされる。本研究でも後述する過去の研究においても、標本提供者の年齢や抜歯に至った経緯は不明である。したがって、これらのデータを基にして単純根管と不完全分岐根管の頻度を比較しても、ほとんど無意味である。よって、①単純根管＋不完全分岐根管と②完全分岐根管の 2 つに分類し考察する。

本研究では①が 87.5%、②が 12.5%であった。「歯の解剖学入門」¹⁾では①96.4%、②3.6%（筆者による計算）と記載されている。「日本人永久歯解剖学」²⁾でも根管形態とその頻度が記載されているが、「単純根管」と「不完全分岐根管＋完全分岐根管」の頻度を算出しているため、この文献の数値は除外する。加齢という因子を排除しても、「歯の解剖学入門」¹⁾との間に差が見られることについては、観察方法の違いが影響していると考ええる。「歯の解剖学入門」¹⁾では観察方法が明記されておらず、透明標本以外が用いられた可能性がある。現在では根管形態の観察には透明標本法が最も確実とされており、透明標本を用いた研究に限れば、塩越³⁾は②を 9.5%、生駒⁴⁾は 11.6%と本研究とおおよそ近似した数値を報告している。以上から、「下顎第一小白歯の根管は、若年者であってもほぼ 10%が分岐根管であり、加齢に伴いこの数値は増加する」ということを本研究の結論としたい。さらに信頼度を上げるには、標本数をもっと増やす必要があるだろう。

完全分岐根管あるいは不完全分岐根管と判断した歯牙（10 本）には、歯根近心面に溝あるいは凹みを確認された。この部分で根管が圧平され分岐したとも考えられるが、詳細は不明である。

最後に、根管形態の複雑さを理解しているのとしていないとでは、臨床での治療の成否に大きな差が出てくると考える。今回の研究実習で実際に観察した根管形態の複雑性を忘れることなく、今後の臨床に役立てていきたい。

参考文献

- 1) 歯の解剖学入門 赤井三千男著 p.157-164 ; 1990 医歯薬出版 東京
- 2) 日本人永久歯解剖学 「下顎第一小白歯」上條雍彦著 p. 93-101 ; 1975 アナトーム社 東京
- 3) 塩越久子 「下顎第一および第二小白歯の根管形態について」 34 期生(平成 16/17 年度)研究実習論文報告集 p.61-62 ; 2005
- 4) 生駒光子「下顎第一小白歯の根管形態について」 39 期生(平成 21/22 年度)研究実習論文報告集 p.39-40 ; 2010

緒言

根管治療を適切に行なうためには、根管形態を正しく把握することが必要不可欠である。歯根形態が単純であっても、根管が複雑に分岐・吻合したり、また同一個人でも左右同名歯の根管形態は異なることが知られている。臨床経験の殆どない学生でも、根管治療が困難を極めることは容易に想像できる。上顎第一小臼歯の歯根は、近遠心方向に強く圧平され単根管と 2 根管の両方が出現し、とりわけ複雑な根管形態を示す。本研究の目的は、根管治療の一助とするために、上顎第一小臼歯の透明標本を観察し、その根管形態を把握することである。

材料と方法

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齲蝕が無い単根の上顎第一小臼歯(右:30 本、左:30 本)を材料とした。60℃、24%水酸化ナトリウム水溶液で処理後、歯ブラシで軟組織を除去した。ビーカーに墨汁と標本を入れ、ガラスチャンバー内に置き、真空ポンプにより減圧して根管内に墨汁を流入させた。5%ギ酸で 4～5 週間脱灰した後、1 日間 70%アルコールで保存し、80、90、100%及び無水アルコールで 1 日間ずつ脱水した。サリチル酸メチルに 2 日間浸漬し透明にした後、スチレンモノマーに 2 日間、スチレンモノマーとポリエステルレジン（Rigolac 2004）の 1:1 混合液に 2 日間、ポリエステルレジンに 1 日間、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンに 1 日間浸漬し、レジンに浸透させた。筆で標本表面のレジンを経く拭い、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 根管が 1 つの根管孔に開孔
②完全分岐根管：2 根管が 2 つ以上の根尖孔に開孔
③不完全分岐根管：2 根管が合流し、1 つの根管孔に開孔

各根管形態の出現歯数(本)と頻度(%)を以下に記す。
単純根管：右 7 (23.3)、左 7 (23.3)、計 14 (23.3)
完全分岐根管：右 7 (23.3)、左 12 (40.0)、計 19 (31.7)
不完全分岐根管：右 16 (53.3)、左 11 (36.7)、計 27 (45.0)

考察

過去の報告における単根性上顎第一小臼歯（提供者の年齢は不明）の各根管形態の頻度を表 1 に示す。

表 1 各根管形態の出現頻度

	小沢 ¹⁾	岡田 ²⁾	本研究
単純根管	30.0%	35.0%	23.3%
不完全分岐根管	32.5%	40.0%	45.0%
完全分岐根管	32.5%	30.0%	31.7%

完全分岐根管以外は結果にばらつきが認められた。一般に、単純根管は加齢による二次象牙質形成、齲蝕等による局所的な修復象牙質添加のため、経年的に狭搾し不完全分岐根管へと移行する。ばらつきは提供者の年齢の違いによるものと思われる。一方、完全分岐根管は歯根完成時に決定し、加齢による影響を受けにくいので、ほぼ似た結果が生じたのであろう。提供者の年齢が不明である以上、単純根管と不完全分岐根管の頻度を分けて比較してもあまり意味がない。そこで、①「単純根管＋不完全分岐根管」と②「完全分岐根管」で再分類し出現頻度を計算すると、本研究では①68.3%、②31.7%、小沢¹⁾では①67.5%、②32.5%、岡田²⁾では①70%、②30%となり、非常に近いものになった。これは、「単根の上顎第一臼歯における 2 根管性の頻度は、若年者であれば 30%程度で経年的に増加する」ということを示している。単根でも多くは頬舌 2 根管性が多い³⁾、と記述されているが、実際は年齢に影響され一概にはいえないことを理解できた。

上顎第一小臼歯には 2 根のものも 40%出現する^{3、4)}。その全てを完全分岐根管とみなして本研究結果を再計算すると、上顎第一小臼歯全体における出現頻度は、①：②＝41：59 となり頻度が逆転する。この数字も銘記しておきたい。

今回の研究実習で、根管形態は歯根形態に一致せず複雑であることを実感出来た。歯科医師となった後も、このことを念頭に置きながら診療にあたりたいと思う。

参考文献

1) 小沢 翠 「単根の上顎第一小臼歯の根管形態について～レジン包埋した透明標本を用いて」 31 期生（平成 13/14 年度）研究実習論文報告集 p.49-50；2002
2) 岡田 壮平「単根の上顎第一小臼歯の根管形態について」 39 期生（平成 21/22 年度）研究実習論文報告集 p.41-42；2010
3) 日本人永久歯の解剖学 上條 雍彦 著 p.67；1970 アナトーム社 東京
4) 歯の解剖学 第 22 版 藤田 恒太郎 著 p.83；1995 金原出版 東京

下顎第二小臼歯の根管形態について

02124025 町田亮人

指導教員：山本恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：下顎第二小臼歯、根管形態、透明標本

諸言

根管治療は、手指の感覚を頼りに行わざるを得ないときも多く、治療の際の根管形態の認識は不可欠である。根管形態は個人差、年齢差が強く反映し変化に富んでいる。下顎第二小臼歯については、その殆どが単根管であるとされているが、7.5%は2根管性であるという報告もある¹⁾。将来、良好な根管治療を達成するために、実際に同歯の根管形態を観察し理解する必要があると考え、本研究を立案した。観察法としては透明標本法を用いた。

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%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面に齲蝕のない下顎第二小臼歯（右25本、左25本）を使用した。60℃の24%NaOH水溶液で30分処理し、歯ブラシで刷掃した。ビーカーに入れた墨汁に標本を浸漬し、ガラスチャンパー内で20～30分間真空ポンプにより減圧し、急速に減圧を解いて根管内に墨汁を流入させた。5%蟻酸水溶液で4～5週間脱灰後、再び墨汁を根管に流入させた。歯ブラシで刷掃後、70%アルコールで1日保存、ついで80、90、100%、無水アルコールでそれぞれ1日ずつ脱水した。サリチル酸メチルに2日浸漬して透明にした後、スチレンモノマーに2日、スチレンモノマーとポリエステルレジジン（Rigolac 2004）の1:1混合液に2日、ポリエステルレジジンに1日、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジジンに1日浸漬した。筆で標本表面の余剰のレジンを拭き取り、紫外線重合器で1日重合した。

結果

根管形態を以下の様に分類した。

- 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

表1に本研究に各根管形態の出現歯数と頻度を示す。

考察

本研究では下顎第二小臼歯のすべてが単純根管であった。過去の文献と比較してみると、教科書では、「歯の解剖学入門²⁾（標本数1,400本）」は単純根管が94.8%、完全分岐根管が0.9%、不完全分岐根管が4.3%、「日本人永久歯解剖学³⁾（標本数71本）」は完全分岐根管が7%（他の形

表1 各根管形態の出現歯数と頻度

	右 歯数(%)	左 歯数(%)	計 歯数(%)
単純根管	25(100)	25(100)	50(100)
完全分岐根管	0(0)	0(0)	0(0)
不完全分岐根管	0(0)	0(0)	0(0)
総歯数	25	25	50

態についての記載はない)、「簡明 歯の解剖学⁴⁾」は単純根管がおおよそ98%で2根管が2～3%程度（完全分岐根管と不完全分岐根管の区別はない）出現すると記載している。以前の研究実習報告書では、塩越⁵⁾（標本数57本）は単純根管が100%、大岩⁶⁾（標本数154本）は単純根管98.7%、完全分岐根管1.3%であると報告している。本研究で観察されなかった分岐根管が他の研究では認められ、さらにはその出現頻度も文献により異なっている。

根管形態の観察方法には、透明標本法以外にもX線写真法、脱灰連続切片を利用する方法、および鋳型法などがある。上述の文献で観察法を明記してあるのは、透明標本法を用いた塩越⁵⁾と大岩⁶⁾の報告のみである。他の3つは透明標本以外の観察法を用いたかもしれず、観察法の違いにより差が生じた可能性がある。現在では、透明標本法が最も精度が高いとされているものの、大岩⁶⁾は透明標本法であっても完全分岐根管を観察している。彼は塩越⁵⁾および本研究のおおよそ3倍の数の標本を観察しているので、標本数の違いが影響しているのであろう。

わずかな可能性の看過が重大な過失や事故につながる。これは日常散見されることである。「下顎第二小臼歯の根管の殆どが単純根管であるのは確かであるが、まれに分岐根管が出現する可能性がある」ということを本研究の結論とし、臨床の場での銘にもしたいと思う。

参考文献

- 1) 歯の解剖学 藤田恒太郎著「下顎第二小臼歯」p.75-78；2012 金原出版 東京
- 2) 歯の解剖学入門 赤井三千男著 「日本人永久歯の根管形態と分岐状態」p.163；1990 医歯薬出版 東京
- 3) 日本人永久歯解剖学 上條雍彦著 「下顎第2小臼歯」p.102-112；1975 アナトーム社 東京
- 4) 下顎第二小臼歯 後藤仁敏著「簡明歯の解剖学 三好作一郎編」よりp.48-53；1997 医歯薬出版 東京
- 5) 塩越久子「下顎第一および第二小臼歯の根管形態について」34期生（平成16/17年度）研究実習論文報告集 p.61-62；2005
- 6) 大岩大祐「下顎第二小臼歯の根管形態について」40期生（平成22/23年度）研究実習論文報告集 p.43-44；2012

Klotho 遺伝子変異マウスの骨組織における石灰化関連蛋白の局在について

43090024 小林 博和

指導教員：長谷川 智香（硬組織発生生物学教室）

キーワード：Klotho、FGF23、骨基質石灰化

1. 緒言

骨細胞で産生される線維芽細胞増殖因子（Fibroblast growth factor: FGF）23 は、腎臓の近位尿細管におけるリン再吸収の抑制と、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度低下による腸管でのリン吸収の抑制を行うことで、血中リン濃度を低下させる。Klotho は、腎臓で FGFR1c と複合体を形成し、FGF23 の共受容体として機能するため、*klotho* 遺伝子変異 (*kl/kl*) マウスは *Fgf23* 遺伝子欠損マウスと同様に高リン血症、高 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 血症を示すこと、また、骨基質石灰化異常を呈することが報告されている。そこで、本研究では、*kl/kl* マウスの骨組織における石灰化関連蛋白の局在変化について組織化学的に解析を行った。

2. 方法

生後 7 週齢野生型マウス及び *kl/kl* マウスを 4%パラホルムアルデヒド溶液により灌流固定し、大腿骨を摘出した。摘出した大腿骨を EDTA 脱灰し、通法に従ってパラフィンに包埋し、厚さ $5\mu\text{m}$ の組織切片を作製した。組織切片上にて H-E 染色及び組織非特異型アルカリフォスファターゼ (ALP)、Dentin matrix protein 1(DMP-1)、matrix Gla protein(MGP)、オステオカルシン(OCN)を抗原とした免疫組織化学法による解析を行った。

3. 結果

(1) H-E 染色

kl/kl マウス大腿骨では、野生型マウスと同様に、多数の骨梁が観察された。しかし、骨端部の骨梁内部に多数の空の骨小腔が認められた。

(2) ALP：モノリン酸イオン産生酵素

野生型マウスでは、骨梁表面に ALP 強陽性を示す骨芽細胞が認められたのに対し、*kl/kl* マウスの骨芽細胞では、ALP 陽性反応が一部減弱する傾向を示した。

(3) DMP-1：石灰化抑制に関与（骨細胞・骨細管系）

野生型マウスでは、骨梁内部の骨細胞・骨細管系に一致して均一な DMP-1 陽性反応を認めた。一方、*kl/kl* マウス

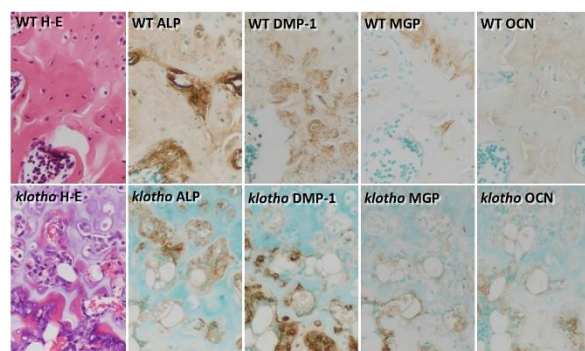
では、骨細胞や骨芽細胞に DMP-1 強陽性反応が認められた。

(4) MGP：石灰化抑制に関与（異種の基質間）

MGP 陽性反応は、野生型マウスの骨・軟骨移行部に認められる。ところが、*kl/kl* マウスでは、骨梁内部の骨細胞や骨芽細胞に MGP 陽性反応が観察された。

(5) OCN：石灰化球形成に関与

野生型マウスでは、骨基質にわずかな OCN の沈着を認める。一方、*kl/kl* マウスでは、骨細胞および骨芽細胞に OCN 陽性反応が認められた。



図：野生型マウス大腿骨と Klotho マウス大腿骨骨端部骨梁の H-E 染色像および ALP、DMP-1、MGP、OCN 免疫組織化学像

4. 考察

klotho 遺伝子変異マウスでは、骨芽細胞における ALP 発現が低下するだけでなく、骨細胞や骨表面の骨芽細胞に DMP-1、MGP といった石灰化抑制に関与する蛋白の発現を認めた。以上のことから、*klotho* 欠損は、骨芽細胞・骨細胞における骨基質石灰化関連蛋白の発現を変化させる可能性が推測された。

5. 謝辞

本研究実習を行うにあたり、ご指導いただいた長谷川智香助教をはじめ硬組織発生生物学教室の皆様に心より感謝申し上げます。

胎生14.5日目マウス肢におけるCD31を用いた血管の観察

02110293 羽藤 裕之

指導教員: 田村-辻 潔美 (口腔分子生化学教室)

キーワード: 血管, 胎生期マウス, ホールマウント免疫染色, CD31

1. 緒言

発生過程において、血管と骨の発達には密接な関係があるとされている¹⁾。胎生期の骨周囲の血管を観察することを目的として、今回の実験を通して、血管内皮細胞の抗体の一つであるCD31を用いて、様々な固定、Blocking条件下でホールマウント免疫染色を行い、その最適な染色条件を探索した。

2. 方法

マウスの子宮から胎生14.5日のマウス胚を取り出して前肢のみを切り出し、パラホルムアルデヒド(PFA)の濃度を2%と4%で、さらに温度を4℃でover night、37℃で15分、それぞれ条件を変えて固定を行った。次に、Triton濃度を1%、1.5%、2%と条件を変えたSkim-milk-TritonX100-PBS(SM-PBST)を用いてover nightでBlockingを行った、(Table 1、Table 2)。その後、蛍光が付加された抗体(PE anti-mouse CD31)を用いて4℃、over nightで反応後、Washを行った。さらに50%、75%、90%、100%のMetOHを用いて脱水し、50%のbenzyl alcohol+benzyl benzoate (BABB)に置換後、100%のBABBでマウントを行い、蛍光顕微鏡Axio Imager M2、ソフトZEN2012を用いてで試料を観察した。

Table 1

4℃における条件検討			
PFA濃度 \ triton 濃度	1.00%	1.50%	2.00%
4%PFA	①	②	③
2%PFA	④	⑤	⑥

Table 2

37℃における条件検討			
PFA濃度 \ triton 濃度	1.00%	1.50%	2.00%
4%PFA	⑦	⑧	⑨
2%PFA	⑩	⑪	⑫

3. 結果

固定温度4℃、37℃とも、固定のPFA濃度は2%、BlockingのTriton濃度は1.5%の条件下で最もCD31の染色が強く観察された(図1)。

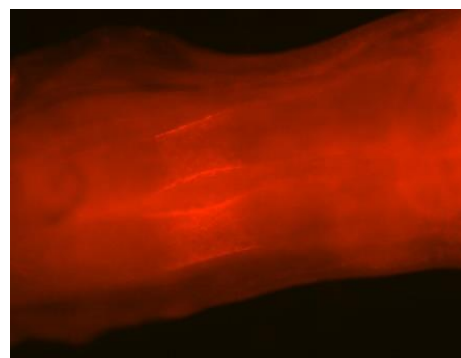


図1:前肢(4℃固定時のCD31染色)

4. 考察

図1において、骨と見られる構造の周りにCD31の発現が認められた。その染色は固定の際のPFA濃度、Triton濃度に左右されることが考えられる。今回の実験ではTable 1の⑤、Table 2の⑪の条件が良かった。

5. 参考文献

- 1) Kishor K.Sjvaraj and Ralf H. Adams, Blood vessel formation and function in bone. Development, 143, 2706-2715, 2016

胎生期14.5日のマウスにおけるタイプIVコラーゲンをを用いた血管の染色

02124003 大多和 隼

指導教員：田村-辻 潔美(口腔分子生化学教室)

キーワード: 血管, 胎生期マウス, ホールマウント免疫染色, タイプIVコラーゲン

1. 緒言

内軟骨性骨化において骨の新生とそれに伴う血管の発達には密接な関係がある¹⁾。今回の実験では血管の基底部に存在するタンパクであるタイプIVコラーゲンに対する抗体を用いてホールマウント免疫染色を行い、その際の最適な染色条件を調べるとともに血管の発達の様子を観察することを目的とした。

2. 方法

マウスの子宮から胎生期 14.5 日のマウス胚を取り出し前肢を切り取り Paraformaldehyde (PFA) 濃度をそれぞれ 2%, 4%、温度を 4℃, 37℃ に設定して固定を行った。次に Skim-milk-PBS-TritonX100 (SM-PBST) の Triton 濃度をそれぞれ 1%、1.5%、2% の条件にしたものに一晩置き Blocking を行った (Table 1、Table 2)。その後一次抗体として Rabbit anti mouse collagen type IV を一次抗体に用い一晩反応させた後 Wash を行った。さらに二次抗体として Goat Anti Rabbit IgG H & L Alexa Fluor 488 を用い一晩反応させた。その後 MetOH を 50%、75%、90%、100% の順で置換することにより脱水を行った。50% benzylalcohol + benzylbenzoate (BABB) に置換後、100% の BABB でマウントを行い、蛍光顕微鏡 Axio Imager M2、ソフト ZEN2012 により試料を観察した。

Table 1 4℃における条件検討

PFA 濃度 \ triton 濃度	1%	1.50%	2%
2%	①	②	③
4%	④	⑤	⑥

Table 2 37℃における条件検討

PFA 濃度 \ triton 濃度	1%	1.50%	2%
2%	⑦	⑧	⑨
4%	⑩	⑪	⑫

3. 結果

固定条件として 4%PFA、温度 4℃、Blocking 条件として 1.5%Triton-X100 を用いた場合の⑤の条件が最もよく染色された (図 1)。

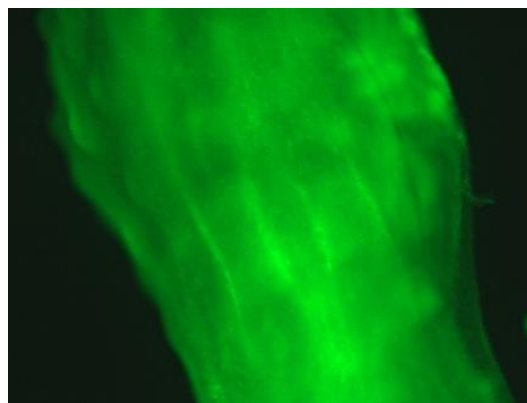


図 1、マウス前肢 (タイプIVコラーゲン)

4%PFA 温度 4℃ 1.5%Triton-X100

4. 考察

胎生期 14.5 日マウスの前肢のタイプIVコラーゲンの染色では固定条件として 4%PFA、温度 4℃、Blocking 条件として 1.5%Triton-X100 を用いた場合が一番最適な条件であるということが分かった。今回の実験で得られた条件はマウス前肢の血管の発達を観察するうえで有用であると考えられる。今後は PFA 以外の固定剤や Triton-X100 以外の界面活性剤を用いて同様の実験を行うことでより最適な染色条件を検討することを課題としたい。

5. 参考文献

- 1) Kishor K. Sivaraj and Ralf H. Adams, Blood vessel formation and function in bone. Development, 143, 2706-2715, 2016

マウス胎生期の血管における α SMA の発現

02124030 秋山 蘭

指導教員：田村-辻 潔美（口腔分子生化学教室）

キーワード：胎生期マウス，血管，ホールマウント免疫染色， α SMA

1. 緒言

近年の多くの組織学研究から、骨の形成および吸収が旺盛な部位においては血管組織が豊富に存在することが報告されており、発生期の血管と骨との相互作用が注目されている^{1),2)}。しかし、その詳細については未解明な部分が多い。そこで本研究実習では胎生14.5日のマウス胚に対してホールマウント免疫染色(Whole mount immunofluorescent staining)を用いて血管壁細胞の特異的マーカーである α -smooth muscle actin (α SMA) の染色を行い、胎生期の骨周囲の血管の様子を観察した。

2. 方法

胎生 14.5 日のマウス胚の前脚をサンプルとした。2%及び 4%PFA(Paraformaldehyde)により 37℃、15 分の条件下で固定後、5%SM (SkimMilk)-PBST (Triton-X100/Phosphate Buffered Saline)によるブロッキングを行った。次に 1 次抗体として α SMA を加え 4℃で一晩反応させた後、5%SM-PBST で洗浄した。2 次抗体(Alexa Fluor 488 標識)を加え、反応させた後、PBST で洗浄した。50,75,90,100% Methanol(MetOH)に順次置換することにより脱水処理を行い、50%Benzyl Alcohol Benzyl Benzoate (BABB)に置換後、100%BABB を用いて透明化処理を行い、スライドガラスにマウントした。観察は、AXIO Imager M2 (ZEISS)で行い、固定条件による染色状態を比較した。

3. 結果

4%PFA で固定したサンプルでは α SMA の弱い染色が見られた。一方、2%PFA で固定したサンプルは、 α SMA の強い染色が観察された。



図 1 . 2%PFA37℃15 分で固定した胎生 14.5 日のマウス胚の前脚(5x)

4. 考察

胎生期のマウス胚の前脚の α SMA のホールマウント免疫染色において、2%PFA,37℃15 分の固定によって良好な染色像が得られた。また、骨端よりも骨中間部において良くシグナルが観察された。マウスの胎生期においては、骨の成長において、骨端で増加した軟骨細胞が骨幹方向へ向かい、破骨細胞による破壊で骨髓腔が形成され残った軟骨基質に骨芽細胞が骨基質を添加し、内軟骨性骨化が起こる。本実験で得られた条件は内軟骨性骨化の初期の骨周囲の血管を観察するのに適していると考えられる。

5. 参考文献

- 1) Kishor K. Sivaraj and Ralf H. Adams, Blood vessel formation and function in bone. Development,143, 2706-2715, 2016
- 2) Elazar Zelzer & Bjorn R. Olsen, The genetic basis for skeletal diseases. NATURE VOL, 423, 343-348, 2003

FGF-2 を用いた歯周組織再生治療と今後について

02120977 佐藤 舜

指導教員 田村 正人 (口腔分子生化学教室)

キーワード: FGF-2、歯周組織

1. 緒言

日本では歯周病に対する組織再生治療の方法として GTR 法やエムドゲイン (EMD) を用いた方法が行われてきた。2016 年に、歯周組織再生治療に fibroblast growth factor-2 (FGF-2) が厚生労働省に認可され、臨床の場で使用されるようになった。そこで今回は、FGF-2 を用いた歯周組織再生治療作用について学ぶこととした。

2. 方法

- ・ Hasegawa T, et al., Effect of fibroblast growth factor-2 on periodontal ligament cells derived from human deciduous teeth in vitro. *Exp Ther Med*. 1(2):337-341, 2010.
 - ・ Nagayasu-Tanaka T, et al., Action mechanism of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in the promotion of periodontal regeneration in beagle dogs. *PLoS One*. 10(6):e0131870, 2015.
 - ・ Murakami S. Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol* 2000. 56(1):188-208, 2011.
 - ・ Kitamura M, et al., Randomized placebo-controlled and controlled non-inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. *J Bone Miner Res*. 31(4):806-14, 2016.
- これらの FGF-2 に関する作用機序や臨床研究についての論文を読み、今後の展望や課題について考察を行った。

3. 結果

- ・ ビーグル犬やカニクイザルの下顎臼歯部複根歯に歯周病モデルを作成し、架橋ゼラチンを基剤とした FGF-2 を実験側の歯周欠損部に充填し、対照側には同基剤のみを充填した結果、目で見ても明

らかな骨新生が認められた。

- ・ FGF-2 の歯周組織ならびに安全性の検討を目的とした全国 13 施設が参加した前期第二相臨床試験 (プラセボを含む用量反応同時対象による二重盲検試験) を行い、その後全国 25 施設が参加した後期第二相臨床試験が実施された。結果、安全性上問題となる事例はなかった。

- ・ EMD と FGF-2 で骨新生量に差があるのか (アタッチメントゲインを基準として測定) について研究した結果、FGF-2 のほうがより新生骨の再生量が多いという結果が得られた。

- ・ FGF-2 の作用機序について

FGF-2 は歯根膜細胞を未分化な状態で保ちつつ増殖を促進することにより、骨欠損部での歯根膜細胞の細胞密度を増加させ、かつ欠損部への細胞遊走を促進させる。一方で血管新生を促進し、ヒアルロン酸などの細胞外基質の産生を制御して歯周組織再生に適切な局所環境を整備する。その後、FGF-2 の影響が投与部位から排除された後には、数が増大した歯根膜細胞が歯周組織再生に適した環境の中で硬組織形成細胞へと分化を開始し、歯槽骨やセメント質の再生量が量的に、時間的に促進された。

4. 考察

今まで行われていた組織再生療法である GTR 法や EMD より FGF-2 を用いた治療法は歯槽骨の再生レベルが高く、より良い治療を受けたいという患者の要望も考えると、これから先 FGF-2 を用いた治療は増えてくると思う。まだ FGF-2 は厚生労働省から認可を受けて間もないが、普及すれば治療費も安くなり FGF-2 が第一選択となるのではないかと考えます。そうなるために、臨床研究の結果は安全性に問題はなかったとあったが、患者に FGF-2 を使用する際にはしっかりと根拠が必要となります。今後の課題としてはさらに理論的に安全性を証明する事だと思う。

今回は FGF-2 について調べたが、組織再生療法の中のサイトカイン療法のなかの一つであり、他にも様々なサイトカインについても研究が行われており、また多血小板血漿 (PRP) の応用や遺伝子療法、培養細胞移植などの方法も研究されているので、歯周組織再生療法はさらにより良い方法が開発されていくのではないかと思います。

ホワイトニングのメカニズムとその歴史について

02124012 久恒 楓

指導教員：田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：ホワイトニング，歯の表面構造

1. 緒言

現在、ホワイトニングはいくつかの方法が臨床で行われている。そこで、ホワイトニングのメカニズムとこれまでの歴史について学ぶこととした。

2. 方法

So Ran Kwon and Philip W. Wertz によるホワイトニングのメカニズムとその歴史についての総説論文¹⁾ Review of the Mechanism of Tooth Whitening, Journal of Esthetic and Restorative Dentistry, 27(5), 240-257, 2015 を読み、考察した。

3. 結果

ホワイトニングのメカニズムは下記の三つに分かれる。

- ①薬剤が歯に浸透する
- ②薬剤と着色物質の相互作用が起こる
- ③歯の表面構造が変化する

②の相互作用とは酸化と還元のことであり、漂白剤は酸化型漂白剤と還元型漂白剤に分けられる。前者は活性酸素の酸化作用により有機質汚れを分解・除去するものであり、過酸化水素や次亜塩素酸など多くの漂白剤が含まれる。後者は、鉄を鉄イオンに還元することで汚れを分解する。これらの漂白剤は具体的にはエナメル質表層・内部、エナメル・象牙境付近、そして象牙質での着色を除去する。過酸化水素の具体的な漂白様式は、過酸化水素に光が当たることでOHラジカルが発生し、不安定なOHラジカルが安定するために有機質から電子を奪い、電子を奪われた有機質が分解される、というものである。OHラジカルを多く発生させるためには1. 温度が高いこと、2. 紫外線があること、3. アルカリ性の環境であること、4. 金属が存在すること、の4つが重要である。

③について、筆者は、歯を白く見せるためには光の反射を増やすこと、さらには、光の屈折率を変え散乱光を増やすことが必要であると述べている。歯面の凹凸を増やすことで反射光を増えるため、漂白剤によって歯面は微小な凹凸ができていると考えられる。また、色の見え方の別のファクターとして、透明感があげられるが、透明感は光が透過することで得られる。象牙質の有機質を除去することはホワイトニングにおいてとても重要であることがわかる。さらに、色の認識の仕方は光の状態、対象の見え方、そして見る人によって異なる、とも述べられている。さらに、ホワイトニングの歴史についても詳細な記載があり、昔は硝酸や塩素、Kのシアン化物が用いられていたが、現在は過酸化水素、過酸化尿素、次亜塩素酸が用いられていると記載されていた。ホワイトニングの歯への作用はまだわかっていないことが多くあり、今後のさらなる研究が期待される。

4. 考察

ホワイトニングのメカニズムについて3ステップに分けて説明されていたが、②のステップと③のステップそれぞれが歯を白くする作用があることが分かった。OHラジカルを発生させる条件で、アルカリ性であることと記したが、実際アルカリ性の溶液が使われることは多くなく、弱アルカリ性や中性、酸性のものが用いられている。その場合には金属が添加され、反応が滞りなく進むようになっている。

色の認識の仕方は光の状態、対象の見え方、そして見る人によって異なる、と書かれていたが、歯科臨床において色の見え方が人によって異なることを念頭に置いておかなければ患者の不信感につながる可能性があるかもしれない。

ホワイトニングがこれからも発展していくためには、さらなる機序の解明と研究が必要だと考える。

5. 参考文献

- 1) Kwon SR, Wertz PW, Review of the mechanism of tooth whitening, J Esthet Restor Dent, 27(5): 240-257, 2015.

骨基質タンパク質オステオカルシンがインスリン分泌に与える影響及び糖尿病との関連性

02114015 小木 曾 哲

指導教員：田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：オステオカルシン、インスリン

1. 緒言

近年様々な糖尿病治療薬が開発されているが、ヒトの骨に含まれているオステオカルシンが糖尿病の検査指標である HbA1c を改善するという報告がある。そこでオステオカルシンと糖尿病について学ぶことにした。

2. 方法

Sabek OM, Nishimoto SK, Fraga D, Tejpal N, Ricordi C, Gaber AO. Osteocalcin effect on human β -cells mass and function. Endocrinology. 156(9):3137-3146, 2015 を読み、考察した。

3. 結果

マウスでの実験において、骨代謝ホルモンであるオステオカルシンはインスリンの産生を増加させ、膵臓のランゲルハンス島 β 細胞を増殖させた。またオステオカルシンを経口摂取することにより血糖値が下り、全身の代謝が活性化されていることがわかった。

表 1：さまざまな糖尿病の治療薬

性質	種類	作用部位
インスリン分泌促進	インクレチン関連薬	小腸
インスリン分泌促進	スルフォニル尿素薬	膵臓
インスリン分泌促進	グリニド薬	膵臓
血糖上昇抑制	α グルコシターゼ阻害薬	小腸
インスリン作用増大	ビグアナイド薬	肝臓・小腸
インスリン作用増大	チアリゾン薬	肝臓・筋肉・脂肪

オステオカルシンはインクレチンの一種であるグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1) の分泌を促し、相互に関連して糖代謝に働きかける。49 個のアミノ酸からなるオステ

オカルシンには、 γ カルボキシラーゼによってカルボキシル化された Gla 型オステオカルシン (GlaOC) と、全くあるいはほとんどカルボキシル化されていない Glu 型オステオカルシン (ucOC) がある。ヒトでもマウスでも体内では大部分が GlaOC として骨基質に埋もれているが、血中にもわずかに存在し、約 8 割が GlaOC、残りの約 2 割が ucOC として循環している。インクレチンは消化管から出るホルモンの総称で、現在のところ、GLP-1 とグルコース依存性インスリン分泌刺激ポリペプチド (GIP) の 2 種類が知られている。いずれも食事成分 (糖や脂肪) が腸管粘膜に接することにより、粘膜細胞から血中に分泌され、膵臓に達すると血糖値に依存してインスリンの分泌を促す。GLP-1 は膵臓の β 細胞の増殖にも関係し、胃では内容物が腸に出る量を調節していることもわかってきた。そのため、最近、GLP-1 に似た構造を持つ GLP-1 受容体作動薬や、GLP-1 と GIP の分解酵素ジペプチジルペプチダーゼ-4 (DPP-4) を抑制する DPP-4 阻害薬が血糖降下薬として次々に承認され、糖尿病治療に使われ始めている (表 1)。GLP-1 を分泌するマウスの小腸由来の細胞株に ucOC を作用させると、ある範囲内で濃度依存的に GLP-1 を分泌すること、そして、ucOC をマウスの腹腔や静脈に注射した場合、また、GlaOC を経口投与した場合にも GLP-1 濃度が上昇することを明らかにした。さらに、マウスに GLP-1 受容体を阻害する exendin(9-39) を作用させた上で、ucOC の注射による投与や GlaOC の経口投与を行うと、ucOC によるインスリン分泌が exendin(9-39) を与えない場合に比べて低くなることも証明した。つまり、ucOC によるインスリン分泌の増強には、GLP-1 が関わる部分があることが分かった。GlaOC を経口投与すると、ucOC の血中濃度が増えることも確かめており、胃酸によって GlaOC のカルボキシル基がはずれて ucOC に変わり、腸管で GLP-1 の分泌を促進して、インスリンの分泌を進めていると考えられる。

4. 考察

今回のオステオカルシンの作用の発見により今後、糖尿病と同時にメタボリックシンドロームなどの予防につながると考えられる。それに伴い、糖尿病の合併症や生活習慣病の悪化による症状の重篤化の予防につながるだろう。

栄養素の歯周組織における役割について

02124002 寺田 梓

指導教員：田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：栄養素、ビタミン、歯周組織

1. 緒言

歯周組織の健康は口腔衛生状態や遺伝、全身の健康以外に、食事の栄養からも影響を受けている。今回、バランスのとれた食事が歯周組織の健康にどのように影響を及ぼすかを学ぶことにした。

2. 方法

Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Zohaib S, Almas K による歯周組織と栄養についての 18 ページに及ぶ総説の論文¹⁾ The Role of Nutrition in Periodontal Health: An Update (2016)を読み、考察を行った。

3. 結果

1. ビタミン

ビタミン A は主に卵やニンジン、レバーなどに含まれる。これらは歯のエナメル質形成に関与しているが、上皮細胞を構成するケラチンの生成にも欠かせないことがこれまでにわかっている。

ビタミン C はレモンや赤ピーマンなどに含まれる。これらは歯肉を構成するコラーゲンの合成に必須であり、欠乏すると歯肉出血や疼痛が生じやすくなる。また、ROS スカベンジャーとして酸化的損傷の防止にも役立っている。

ビタミン D は牛乳やチーズに含まれる。インプラントの歯槽骨とのオッセオインテグレーションの向上や、ビタミン D3 を腹腔内注射することによる歯列矯正への応用の可能性も示している。

ビタミン B 群の補給は歯周外科手術後の創傷治癒促進につながることが明らかとなっている。

ビタミン E は鶏肉やナッツなどに含まれるが、これらは歯周組織の健康の維持や炎症の抑制に有利に作用することが報告されている。また、歯周病患者においては健康者よりもビタミン E の摂取量の減少が確認されているが、メカニズムは解明されていないことが多い。

ビタミン K は納豆などに含まれる。欠乏により歯肉出血を起こす。また骨代謝に必要なタンパク質の形成に関与している。

2. 抗酸化物質

歯周病は ROS の産生をもたらす感染性および炎症性の疾患といえる。抗酸化物質は ROS を阻害することで歯周治療の転帰を改善できることがわかっている。メラトニンは睡眠障害を改善するための栄養補助食品としては認可されているが、歯周組織の健康と手術後の治癒に対する全体的なメラトニンの効果はこれまでに研究されておらず、今後焦点を当てて研究すべきと指摘している。

3. 食物ミネラルと微量元素

カルシウムの局所作用はオッセオインテグレーションを強化する、鉄や亜鉛は歯周組織における抗酸化作用をもつといわれている。しかし、カルシウムの摂取が、ポケット深さや臨床的アタッチメントレベルを改善させるという報告はまだ確立されていない。

4. 妊娠や老化による栄養状態

妊娠においての嘔吐は食欲喪失、食事パターンの変化に影響を及ぼす。また老化においては多剤服用や体内代謝の低下により栄養状態の低下をもたらす。このような人々は口腔内の衛生状態が影響を受けやすいため、歯周病予防のためにも確立された栄養指導が必要である。

4. 考察

これまでの様々な研究結果より、ビタミンやミネラル、特にビタミン C の栄養と補給を改善することは歯周組織の健康の改善に役立つことがわかっている。しかし、これまでに報告された結果では、歯周治療の補助剤として使用するには効果が小さすぎるといわれている。今後、歯周治療の補助剤として積極的に使われるようになるためには、歯周病の転帰により直接的な影響を与えるかどうかに関する、長期的な研究が必要だと考えられる。現代人に多い食事における栄養バランスの偏りは、歯の健康にも影響を及ぼすということが広く認知されるためにもよりしっかりした研究とその結果が必要であるだろう。

5. 参考文献

- 1) Najeeb S, Zafar MS, Khurshid Z, Zohaib S, Almas K. The role of nutrition in periodontal health: An update. *Nutrients*. 8(9). pii: E530, 2016.

ゲニピン架橋マイクロ・ナノパターン化ゼラチンの作製

02110950 善徳 勇貴

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：コラーゲン、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、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

20mM ゲニピンと 20%ゼラチン溶液を 60℃のホットプレート上でよく混合し、培養ディッシュ上に 150 μ l 滴下した。グループ (0.5 μ m, 1 μ m, 2 μ m)、ホール (0.5 μ m, 1 μ m, 2 μ m)、ピラー (0.5 μ m, 1 μ m, 2 μ m) のマイクロ・ナノパターンを持つ PDMS レプリカモールドをゼラチン混合溶液上に被せた。その後、湿度 100%環境下、37℃、3 日間反応させることにより架橋反応を進行させた。次いで乾燥後、モールドを剥がすことでパターン化したゼラチンディッシュを得た。

得られたゼラチンパターンは、4 分間 UV 滅菌後その後の試験に使用した。細胞接着試験は、ゼラチンディッシュ培地 DMEM+10%FBS+1%antibiotics を加え、ヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 を播種し、1 時間インキュベートした。細胞固定後、付着細胞数を光学顕微鏡でカウントした。付着細胞は、グルタルアルデヒドで固定後、段階脱水、臨界点乾燥した。その後、Pt-Pd コート後、走査型電子顕微鏡（SEM）にて観察した。

3. 結果と考察

得られたゼラチンパターンの SEM 観察の結果（図 1）、PDMS モールドに相当するパターンがゼラチンフィルムに転写されていることが分かった。また、正常形状であることより、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ことが分かった。

続いて、Saos-2 の細胞付着試験の結果（図 2）、付着細

胞数は、平面よりもパターン化ゼラチンフィルムの方が高かった。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。但し、n 数が少ないため、詳細な比較は、さらなる検討が必要である。

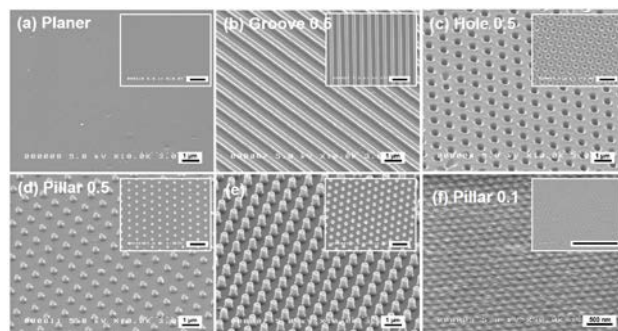


図 1 ゲニピン架橋ゼラチンの表面 SEM 像

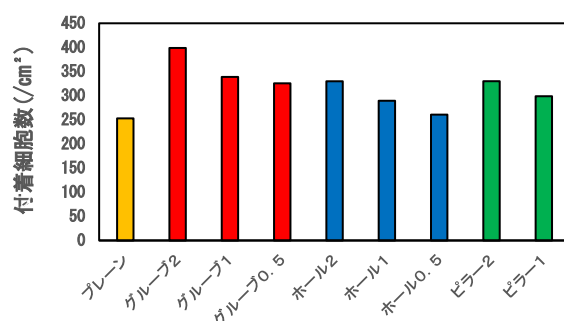


図 2 パターン上への Saos-2 細胞の付着試験 パターンの種類とサイズ (μ m)

次に、付着細胞を SEM 観察した結果（図 3）、グループやピラー構造では、多数の仮足を伸ばして付着しているのに対し、平面やホールでは仮足の数は少なかった。また、グループ上では細胞の配向が観察された。

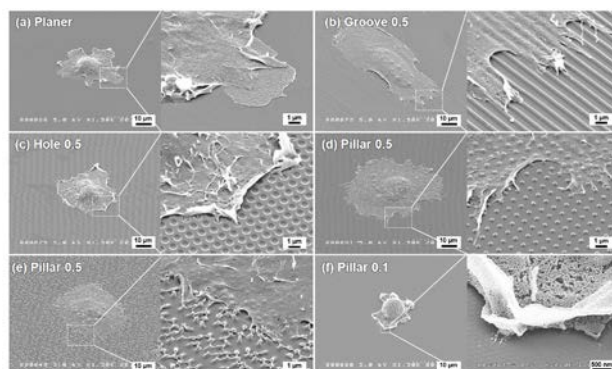


図 3 ゼラチンパターン上に付着した細胞の SEM 像

以上より、ゲニピン架橋によりゼラチンマイクロ・ナノパターンの作製は可能となった。また、パターン形状は、ヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 の細胞付着性や細胞付着形態に影響を与えることがわかった。

マイクロナノパターン上での細胞付着について

DEN1348 02120441 宮前優介

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、細胞付着、
COP film、PDMS

1. 緒言

マイクロナノパターンは細胞の接着性や接着形態に影響を与えることが知られている。本研究では、マイクロナノパターンを異なる種類の媒体に転写し、それぞれにおいて細胞の付着数にはどのような変化が現れるかを検討した。今回は硬質材料の代表として COP film、軟質材料の代表として PDMS を用いることとした。マイクロナノパターンは Groove、Pillar、Hole（各パターン幅： $2.0\mu\text{m}$ 、 $1.0\mu\text{m}$ 、 $0.5\mu\text{m}$ ）の3種を使用した。さらに表面処理の有無による変化も調べるためにプラズマ処理を行った COP film、PDMS も用意し、それぞれの媒体上での細胞の付着数の評価、走査型電子顕微鏡(SEM)での観察を行った。

2. 方法

マイクロナノパターンの鋳型であるマイクロナノモールドを用いて、COP filmへ熱ナノインプリントとし、続いてPDMSへパターン転写した。また、それぞれのパターンに対しプラズマ処理を行った。作製した媒体にヒト骨芽細胞様細胞 Saos-2 を播種し、細胞付着数の測定および臨界点乾燥後、SEMによる解析を行った。

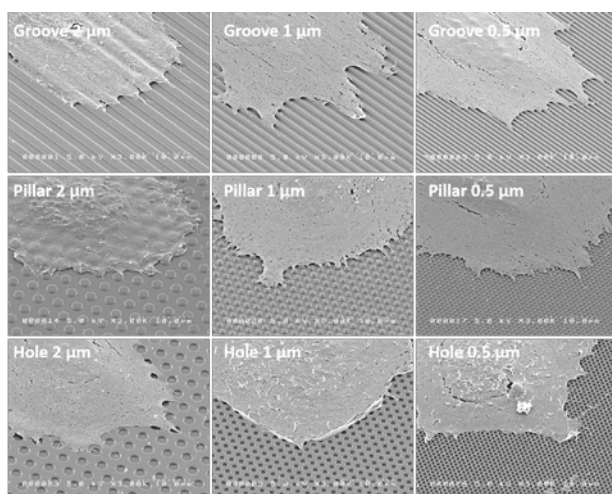


図1. COP filmに付着した細胞のSEM像

3. 結果

各媒体上での細胞の付着状態を顕微鏡で観察すると(図 2)、

プラズマ処理を行った COP film において明らかに付着数が増えることが認められた。一方で表面処理を行っていない PDMS ではほとんど付着が認められなかった。

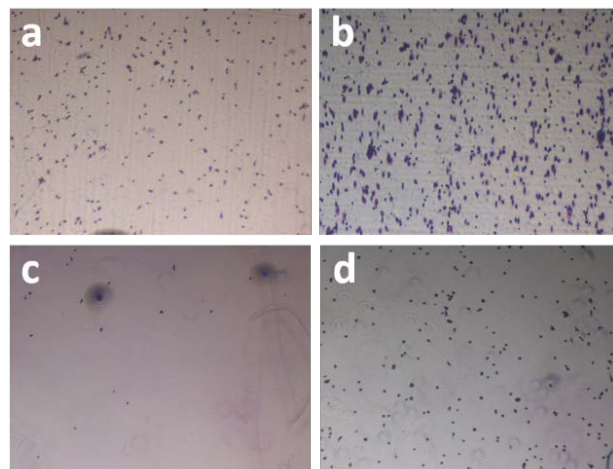


図2. (a)COP film (b)プラズマ処理COP film
(c)PDMS (d)プラズマ処理PDMS

各パターンでの細胞付着数(図 3)は、プラズマ処理していない COP film とプラズマ処理をした PDMS において Groove、Pillar でパターン形態が小さくなると付着数は減少する傾向が認められた。Hole においては規則的な傾向は認められなかった。他のプラズマ処理を行った COP film とプラズマ処理を行っていない PDMS においては全てのパターンで規則性は無く有意差が認められなかった。

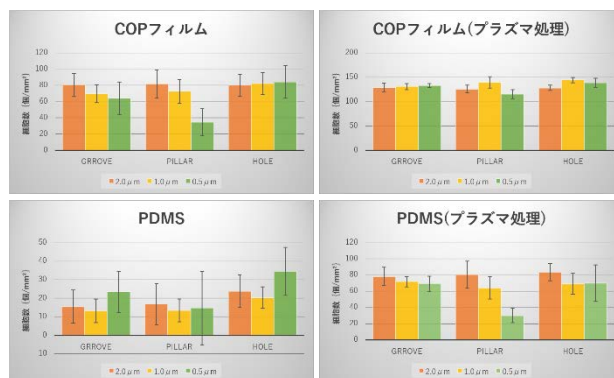


図3. 媒体別の細胞付着数

4. 考察

結果より、“硬質材料の使用”“上面積の多いパターンの使用”“プラズマ処理等の表面処理”によって細胞付着数が増加すると考えられた。また、媒体自体の付着性能が極端に高い場合や低い場合では細胞の付着数はパターンの形態に影響されない可能性も考えられた。

1. 諸言

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。一方で、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、初めにマイクロ・ナノパターンを容易に製作可能な歯科材料であるコンポジットレジンを用いて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

熱ナノプリント法を用いて G-PET フィルムにグループパターンを転写し、さらに G-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。濡れ性は、グループパターンと平面レジンにおける接触角を測定することにより評価した。次に、パターン上にヒト歯肉線維芽細胞を播種し、1 時間後にグルタルアル固定後、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ブロッキング材として使用されているアルブミン (BSA)、ウシ胎児血清 (10%FBS) の 2 種類の表面コート処理を施し、それぞれプラズマ処理を施したものを合わせた 4 種類のパターンに、それぞれ $0.5\mu\text{m}$ 、 $1\mu\text{m}$ 、 $2\mu\text{m}$ のグループの幅を作製し、計 12 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、また付着細胞数は少なかった。一方で、グループパターンは濡れ易い表面性状であり、また付着細胞数は多かった。このことから、パターンを付与することにより振れ性はよくなり、また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が分かった。

配向性試験の結果 (図 2~3)、BSA プラズマ処理、10%FBS、10%FBS プラズマ処置の場合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、10%FBS プラズマ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 (図 2)。一方、BSA $0.5\mu\text{m}$ の場合ではグループに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 (図 3)。

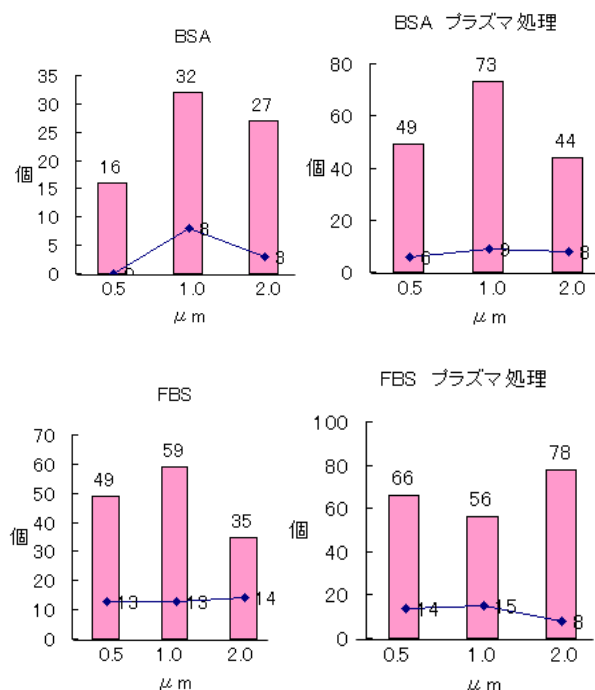


図 1 棒グラフ：付着細胞数 折れ線グラフ：細胞配向数

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、同じ表面コート処理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 2 10%FBS コート $2\mu\text{m}$ 幅、細胞は配向している。



図 3 BSA コート $0.5\mu\text{m}$ 幅、細胞は配向していない。

齲蝕リスク低減を目指したお菓子作り

02124004 中木 菜美

指導教員：阿部 薫明(生体材料工学研究室)

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、その効果的な使用方法を検討した。

2. 方法

齲蝕リスク軽減を試み、ゼリー作成時に原料中のショ糖を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、エリスリトール、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、48 時間、72 時間後の溶液の濁度を吸光光度計で測定した。

②ミュータンスを加えたショ糖、若しくはエリスリトール 2% 含有培養液へとガラスアイオノマーセメント (Fuji I) の試験片を、37℃で 48 時間、浸漬し、その試験片の表面へのミュータンスの増殖・定着の様子を、電子顕微鏡を用いて観察した。

(2) 作成したゼリーを被験者に試食してもらい、見た目・香り・甘味・雑味の 4 項目について 5 段階評価のアンケートを実施した。試食者には、コントロールを含め、甘味料の種類の情報は与えずに、試食・アンケートを実施した。

3. 結果

(1) ミュータンス培養液の濁度測定から、ショ糖含有培養液と比較してエリスリトール含有培養液において、ミュータンス連鎖球菌の増殖抑制が示された。(図 1)

また、ミュータンス培養液に浸漬したセメント片表面の SEM 観察からも、エリスリトール含有培地において、ミュータンスの増殖・定着の抑制が確認された。(図 2)

(2) 代替甘味料を用いたゼリーのについてのアンケートの結果、どの項目においてもコントロールと同等の評価を得られた。(図 3)

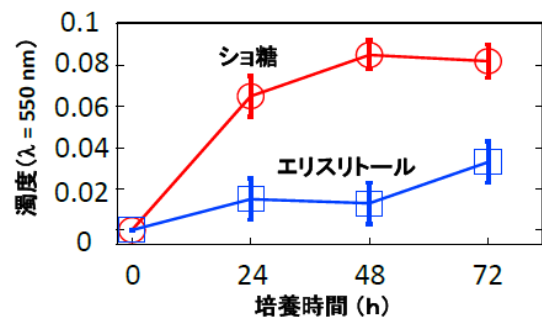


図 1 ミュータンス培養液の濁度変化への代替甘味料の影響 (○：ショ糖、□：エリスリトール)

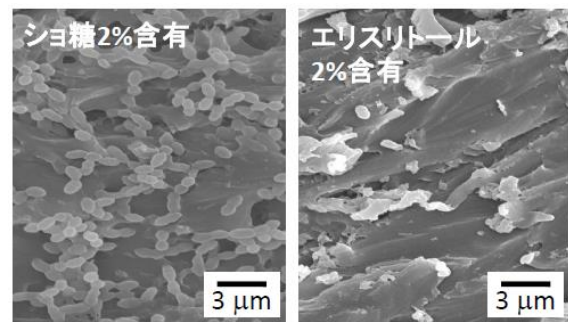


図 2 ミュータンスの SEM 像 (左：ショ糖 2% 含有 TY 培地、右：エリスリトール 2% 含有 TY 培地)

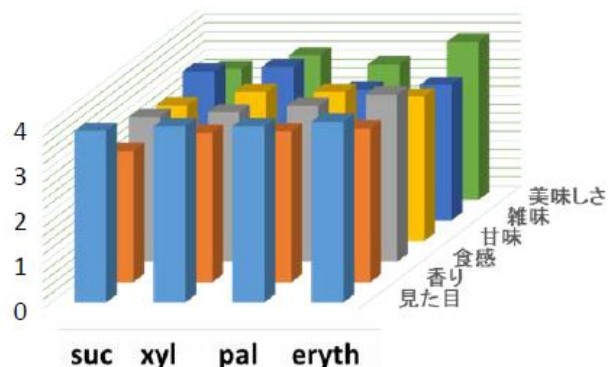


図 3 試作品へのアンケート評価の結果 (suc：ショ糖含有、xyl：キシリトール含有、pal：パルスweet含有、eryth：エリスリトール含有)

4. 考察

本実験では、代替甘味料のみを用いて、コントロールとほぼ同等の評価を得ることができた。加熱により甘味を発しにくくなる代替甘味料もあるが、加熱調理の少ないゼリーを作成したために、十分な満足度を得られたと考えられる。今後は、ほかの食品についても齲蝕誘発性が低いものへの代替により、齲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

02124016 米澤 史華

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

試料にはゼリーを選択した。乳酸菌飲料(ショ糖を含まないもの)か紅茶にゼラチン5g、ショ糖30gを溶かしたものを冷やして固め、コントロールのゼリーを作成した。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、パルスweet)に全量置換することで齲蝕リスクの低減を試みた。

作製した試料を被験者に試食してもらい、見た目・香り・食感・甘味・雑味・美味しさの6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うアンケートを実施した。その際、どの試料がどの甘味料を用いているかは明らかにせずに行った。

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の結果を図1に示す。

いずれの代替甘味料においても、見た目・香り・食感・甘味・雑味・美味しさの6項目すべてにおいて、ショ糖で作製したものと同等の評価が得られた。

ミュータンスの培養試験結果を図2に示す。培養時間とともに培養液の濁度の増加が見られるが、エリスリトール含有培地、およびショ糖とエリスリトールとを1：1

で混合した培地では、ショ糖含有培地と比較して、有意に低い濁度が観測された。

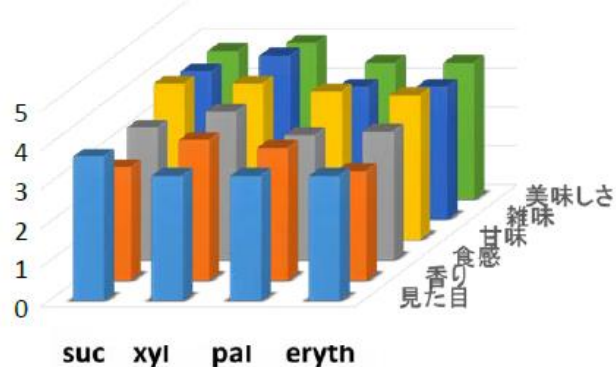


図1 試作品へのアンケート評価の結果(suc：ショ糖含有、xyl：キシリトール含有、pal：パルスweet含有、eryth：エリスリトール含有培地)

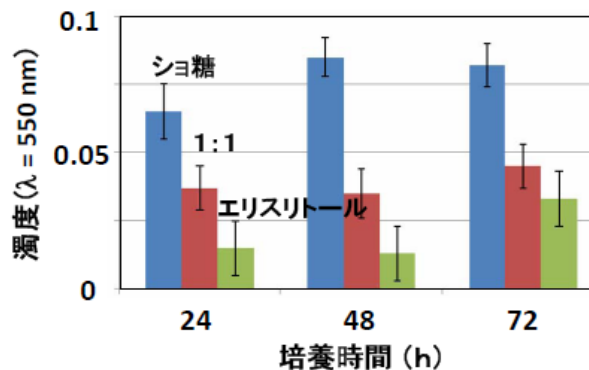


図2 ミュータンス培養液の濁度への含有糖類の影響(■：ショ糖、■：ショ糖・エリスリトール混合(1：1)、■：エリスリトール)

4. 考察

昨年の研究では試料に焼き菓子を用いたが、代替甘味料の中には加熱で甘味を発揮しにくくなるものがあり、膨らみや表面性状がコントロールと異なることで雑味が得られることがわかった。そこで今回の研究では、加熱調理のないゼリーについて検討したところ、アンケート結果からショ糖をすべて代替甘味料に置換してもショ糖と変わらない評価が得られることが示された。ゼリーは代替甘味料100%で作製してもショ糖で作製した菓子と同等の評価が得られ、口腔内に停滞しにくい性状であるため、齲蝕リスク軽減を目指した菓子作製に適した試料であることが示唆された。

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。

齲蝕リスク軽減を目指した菓子作成法の検討

02124018 平良賢周

指導教員：阿部薫明

キーワード：代替甘味料、う蝕、圧縮強さ

1. 緒言

市販されているお菓子には齲蝕の原因となるショ糖が豊富に含まれており、お菓子の過剰な摂取は齲蝕リスクの増加を誘発する。そこでこのショ糖を、う蝕抑制効果があるとされる代替甘味料に置換した上で、従来と同等のおいしさを確保した菓子を製作することを目的に、菓子作成法を検討した。

2. 方法

試料には口腔内停滞性が低い菓子であるゼリーを選択した。

(1) 齲蝕リスクに対する代替甘味料の効果を検討するため、ミュータンス連鎖球菌(*S.mutans*)培養試験を実施した。TY培地に、甘味料(ショ糖 or エリスリトール)を2%加えた培養液をそれぞれ用意した。それらの溶液に*S.mutans*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。

(2) 齲蝕リスク軽減効果の検討のため、ガラスアイオノマーセメント試験片(Fuji I, φ: 10 mm, h: 1 mm)を、甘味料(ショ糖 or エリスリトール)2%含有の培地に浸漬し、*S.mutans*を37℃で2日間培養を行った。試験片表層の*S.mutans*の様子を走査型電子顕微鏡(Hitachi S-4800)で観察した。

(3) 一般的な作成方法に基づき、ゼラチンの量を変えた3種類の硬さの異なる試料(ゼリー)を作成した。

作成された硬さの異なる3種の試料の圧縮試験、および被験者による試食による食感、甘味、美味しさについて5段階評価のアンケートを行った。

(4) (3)で評価の高かった試料の硬さのゼラチン量を採用し、原材料中のショ糖をキシリトール、エリスリトール、パルスweetにそれぞれ全量置換し、(1)と同様に食感、甘味、美味しさについて5段階評価のアンケートを実施した。

3. 結果

濁度測定から、エリスリトールへと置換した場合、ショ糖含有培養液と比較して*S.mutans*の増殖抑制が示された。SEM観察からも、ショ糖含有培地に比べエリスリトール含有培地では*S.mutans*の定着・増殖が抑制されることが観察された。(図1)

甘味量の使用量が等しい場合、ゼリーの硬さに応じて

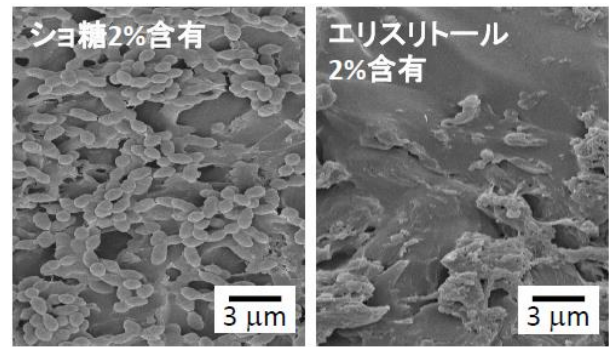


図1. *S. mutans*のSEM像(左:ショ糖2%含有、右:エリスリトール2%含有)

甘味の評価に有意な差が見られた。(図2)

次に、試料③の条件を用い、代替甘味料を用いた試料を作成した。いずれの甘味料においても、ショ糖使用時との有意差が無い、という評価が得られた。

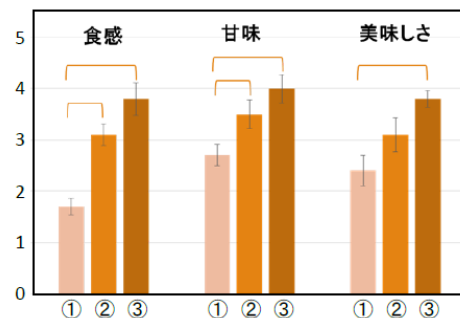
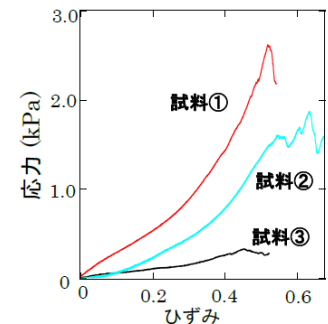


図2. 試料の特性へのゼラチン量の影響(上)圧縮強さ、(下)味覚の評価(①:標準量, ②:2倍, ③:3倍)

4. 考察

本実験では、代替甘味料のみを用いて従来法と同等のおいしさを確保した菓子の作成に成功した。甘味料の量が同量であってもゼラチンの配合量による硬さの差が甘味の評価に影響したことの理由として以下の点が挙げられる。甘味は口腔内主に存在する味蕾に甘味成分が唾液中に溶解することによって知覚されること。さらに硬さの硬いゼリーは咀嚼によって細分化しづらく反対に硬さの柔らかいゼリーは咀嚼によって細分化されやすい。より細分化されやすいやわらかいゼリーのほうが唾液への溶解率が高く、結果として柔らかいゼリーほど甘味の評価が高かったと考えられる。

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。

各種薬剤を用いた根管壁の洗浄効果

02114008 生井佑紀

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：根管洗浄, スミヤー層, 超音波洗浄

1. 緒言

根管治療において、根管内の細菌や根管内容物などを除去するために、リーマーやファイルなど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。しかし、機械的清掃により根管壁ではスミヤー層が形成され、象牙細管を閉塞し、その後の貼薬薬剤の浸透性を阻害、さらに根管治療の予後に影響を及ぼすこととなる^{1~3)}。

そこで本研究は、機械的清掃後の根管壁を化学的に洗浄し、象牙細管を開口することのできる効率的な根管洗浄法を検討することを目的とした。

2. 方法

ヒト抜去永久歯（単根・単根管）20本を試料として用いた。歯冠を切断後、Kファイルで#80まで根管拡大・根管形成を行い、4本ずつ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, 10%NaOCl, 3% H_2O_2 使用）

G2: 10%NaOCl（超音波洗浄）

G3: 14%EDTA（超音波洗浄）

G4: 10%NaOCl（超音波洗浄）→14%EDTA（超音波洗浄）

G5: 14%EDTA（超音波洗浄）→10%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）にて根管壁を観察した。無作為に選択した根中央部の12箇所、根尖部の6箇所（1本あたり18箇所観察）のSEM写真を撮影し、開口率を数値化した。

3. 結果

<根中央部>図1に示すように、SEMによる観察から、G1ではスミヤー層がほぼ除去されておらず、象牙細管の開口がわずかに観察されるのみであった。G5では象牙細管の開口が明瞭に観察された。G2、G3、G4では象牙細管の開口が認められたが、明瞭には観察できなかった。根中央部において、G1およびG2それぞれの開口率に対してG3、G4、G5の開口率は統計学的に有意差が認められた（ $p<0.05$ ）。また、G3の開口率に対し、G4、G5の開口率は統計学的に有意差が認められた（ $p<0.05$ ）（図3）。

<根尖部>図2に示すように、SEMによる観察から、G1およびG2ではスミヤー層がほぼ除去されておらず、象牙細管の開口がわずかに観察されるのみであった。G3、G4、G5では象牙細管の開口が認められたが、明瞭には観察できなかった。根尖部において、G1およびG2それぞれの開口率に対してG3、G4、G5の開口率は統計学的に有意差が認められた（ $p<0.05$ ）（図3）。

4. 考察

EDTAとNaOClを併用した超音波洗浄を行う方法が、根

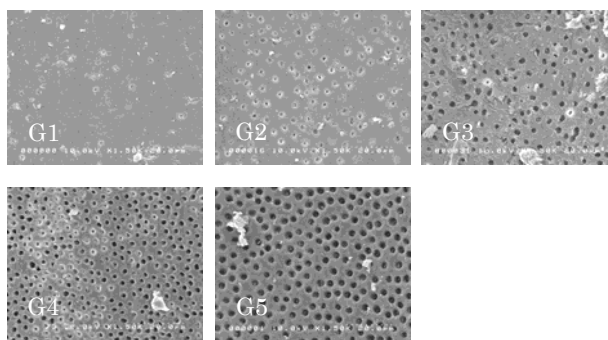


図1 根中央部の各洗浄処理後の根管壁のSEM観察

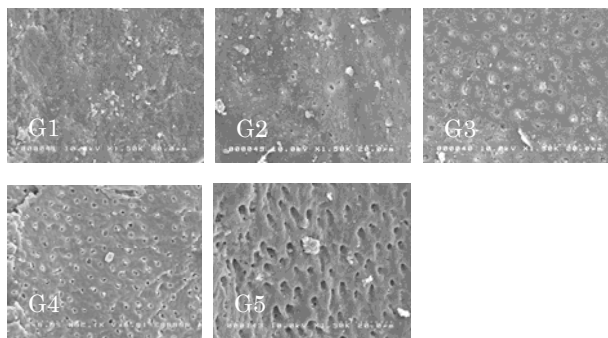


図2 根尖部の各洗浄処理後の根管壁のSEM観察

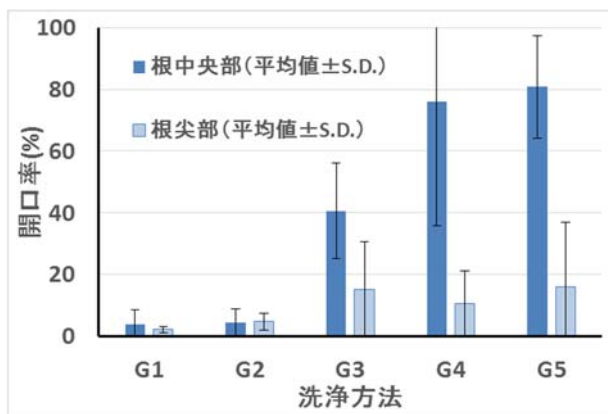


図3 各種洗浄後の象牙細管開口率

管壁のスミヤー層を効果的に除去することが示された。しかし、根中央部に比較して根尖部の開口率が低くなったことは、根尖部の形態学的要因ならびに手技的要因から、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。

5. 参考文献

- 1) NEW エンドドンティクス: 根管洗浄の重要性, 片岡博樹, p94-101, 1999, 医歯薬出版株式会社, 東京.
- 2) 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.
- 3) Clegg et al.: The Effect of Exposure to Irrigant Solutions Apical Dentin Biofilms In Vitro, J. Endod., 32: 434-436, 2006.

腫瘍溶解ウイルスの効果増強条件の検討—5-FU 刺激に対する HuR の局在

02124006 中西徳子

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、癌細胞では 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、さまざまな物理的刺激、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抗がん剤 5-FU 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 の動態変化がみられるか検討した。

2. 方法

《免疫染色法》

6well dish で HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）を培養し、5-FU 濃度 $100\mu\text{M}$ で 24 時間細胞を刺激後、HuR を抗体で染色することにより、HuR の動態変化を観察した。

《ウエスタンブロット法》

HeLa 細胞、A549 細胞(ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞)を培養したあと、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あと、各サンプルを電気泳動し、メンブレンに転写後 HuR 抗体でウエスタンブロット法を行い HuR の細胞内局在を検討した。

3. 結果

《免疫染色法》

5-FU 刺激した HeLa 細胞と無刺激の細胞の、HuR の免疫染色の結果を図 1 に示す。刺激した細胞では、細胞質に HuR 局在しており、5-FU 刺激により HuR は核内から核外に輸送されていた。

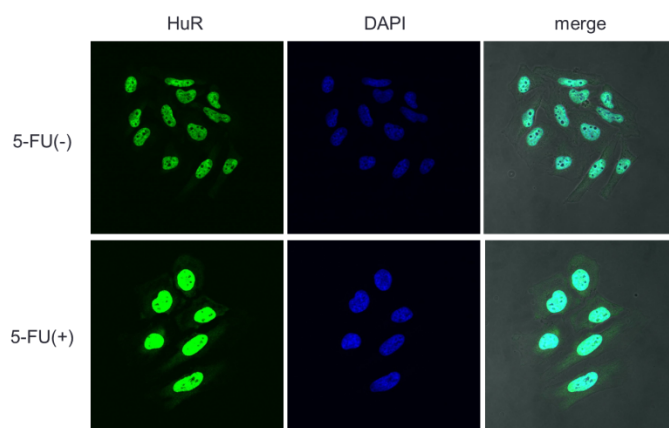


図 1 HuR の局在（免疫染色法）

《ウエスタンブロット法》

5-FU 刺激した HeLa 及び A549 細胞の、HuR の局在をウエスタンブロット法により検討した（図 2）。5-FU 刺激 15 時間後、コントロールと比較して、より多くの HuR タンパクが各細胞の細胞質で検出された。

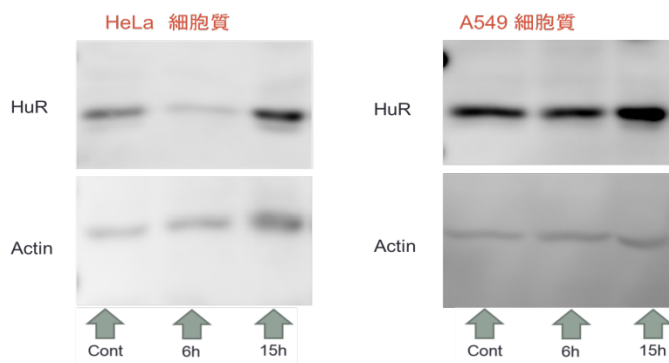


図 2 HuR の局在（ウエスタンブロット法）

4. 考察

免疫染色法、ウエスタンブロット法から、5-FU 刺激を加えると、無刺激の細胞よりも HuR タンパク質が核内から核外に輸送されることがわかった。したがって、5-FU 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る。今回の実験では濃度 $100\mu\text{M}$ 、作用時間を 6 時間、15 時間としたが、今後 5-FU の至適濃度、作用時間のさらなる検討により腫瘍の破壊効率はより向上する可能性がある。

5. 謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々のご援助、ご協力をいただきました北海道大学大学院市学研究科口腔病理病態学教室員各位に深く感謝申し上げます。

エトポシド刺激による HuR タンパクの細胞内局在変化
02124017 園部昌直
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 が核外輸送されている細胞で増殖し、がん細胞を破壊する。本研究はがん細胞にエトポシド刺激を加えた後の HuR の局在を調べること、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

(1) Western blotting 法

HeLa 細胞（ヒト子宮頸がん細胞）と、A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞）を用い、エトポシドを濃度 $100\mu\text{M}$ で 6h、15h 作用させ、細胞質と核に細胞を分離した。次に SDS-PAGE を行い、タンパクをゲルからメンブレンに転写後、HuR 抗体を用いて、Western blotting を行った。

(2) 免疫染色法

10cm dish に HeLa 細胞を培養し、 0.1mM/ml の濃度のエトポシドで刺激し、24 時間後、Western Blotting、免疫染色を行うことにより HuR の動態変化を観察した。

3. 結果

Western Blotting 法において細胞質分画で確認された HuR を以下に示す(図 1、図 2)。HeLa 細胞、A549 細胞それぞれにおいて、エトポシド刺激後 6h の HuR 量が、無刺激のものに比べて多かった。



図 1. HeLa 細胞質分画における HuR タンパク
左から無刺激、6h 刺激、15h 刺激



図 2. A549 細胞質分画における HuR タンパク
左から無刺激、6h 刺激、15h 刺激

次に免疫染色法を用いて、HuR の局在を検討した結果を示す(図

3)。エトポシドで刺激した細胞は、無刺激の細胞と比較して、細胞質に HuR タンパクが確認できた。

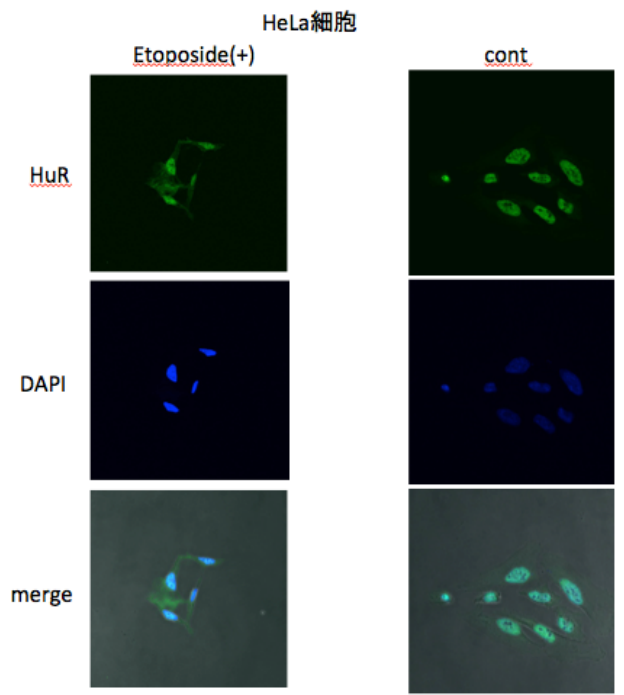


図 3. HeLa 細胞の免疫染色像
左がエトポシド刺激有り、右が刺激無しの像。

4. 考察

ウエスタン法では HeLa 細胞、A549 細胞のそれぞれにおいて、エトポシド刺激後 6h のバンドがコントロールのものに比べ、濃染されていた。これにより、エトポシドによる刺激から 6h 後に HuR の核外輸送が多く行なわれている事が分かった。免疫染色法ではコントロールと比べ、エトポシド刺激を行った場合明らかに細胞質へ輸送された HuR が多く確認された。これらの結果から、エトポシド刺激により、核外輸送される HuR が増加する事が分かり、エトポシド刺激と共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るが、刺激を加える時間等、実用的な条件を検討する必要があることが明らかになった。

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。

UVR 刺激による HuR タンパクの細胞内局在変化

02124027 村椿光

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 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。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。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、開発した腫瘍溶解ウイルスの効果を増強するために、腫瘍細胞と正常細胞に UVR 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)を培養し、UVR(60J/m²)で刺激し、1 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

UVR 刺激し、免疫染色後の HeLa 細胞の結果を図 1 に示す。UVR 刺激した細胞では、無刺激の細胞に比べて、細胞質に局在する HuR の量が多かった。したがって、UVR 刺激によって HuR が核外輸送されるという結果になった。

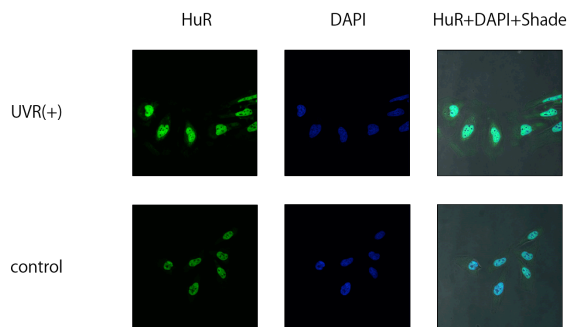


図1 UVR 刺激した細胞の HuR の局在

4. 考察

この結果は、HeLa 細胞では UVR 刺激により、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、UVR による刺激が有用であることが示唆された。今回は UVR 刺激の条件は 60J/m² だけであったが、HeLa 細胞に与える UVR のエネルギー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。

腫瘍溶解ウイルスの効果増強条件の検討—TNF- α 刺激に対する HuR の局在

02124029 山本悠太郎

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、TNF- α

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、腫瘍細胞に TNF- α 刺激を加え、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

<ウエスタンブロット法>

(1) 10cm dish で HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌細胞）を培養し、それぞれ 100ng/mL の濃度の TNF- α で、6、15、24 時間刺激したものと、コントロール群として刺激を加えずに培養したものを用意した。(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 α -mouse IgG 抗体を用いた。(4) LAS-4000 を用いて、メンブレン上の HuR を検出した。

<免疫染色法>

(1) 6well dish で HeLa 細胞を培養し、それぞれ 100ng/mL の TNF- α で、3、6、12 時間刺激したものと、コントロール群として刺激を加えずに培養したものを用意した。(2) 各 well を 4% パラホルムアルデヒド溶液で固定し、TritonX-100 で透過処理を行い、1%BSA でブロッキングを行った。(3) 一次抗体(3A2:Hu 抗体)、二次抗体(anti-mouse IgG FITC) を使用し HuR を検出した。また、DAPI で核を染色した。

3. 結果

<ウエスタンブロット法>

TNF- α 処理した細胞の、細胞質分画の HuR と inner-control である actin のバンドを検出した(図 1)。TNF- α を 15 時間作用させたものは、コントロールと比較して、細胞質に HuR が多く存在していた。



図 1. 細胞質分画における HuR(上)と Actin(下)のバンド
左から 0 時間、6 時間、15 時間、24 時間、TNF- α を作用させた

<免疫染色法>

HeLa 細胞に TNF- α 刺激を 3 時間行い、免疫染色を行った(図 2)。TNF- α 刺激を加えた細胞では無刺激の細胞と比較して、HuR が細胞質に多く存在し、HuR が核外輸送されていた。

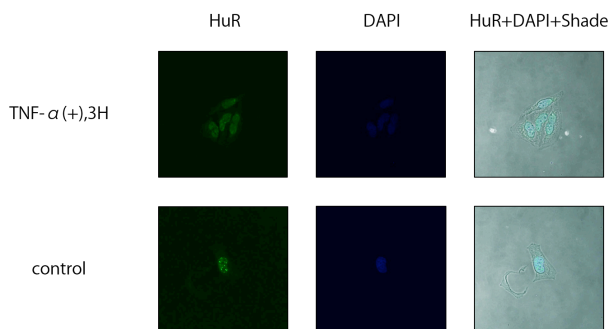


図 2. TNF- α を 3 時間処理した群(上)とコントロール群(下)の免疫染色像

4. 考察

これらの結果は、HeLa 細胞では TNF- α 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、TNF- α による刺激が有用であることが示唆された。今回は TNF- α 刺激の条件は作用時間の違いだけであったが、濃度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。

口腔癌細胞におけるシスプラチン耐性機構の解析
02124009 佐藤栄作
指導教員：北村哲也（口腔病理病態学教室）
キーワード：口腔癌，シスプラチン，JNK

1. 緒言

シスプラチン(CDDP)は、口腔癌における化学療法で用いられる抗癌剤の1つであるが、口腔癌にはCDDP耐性を示すものが存在し、期待した化学療法の効果が得られない場合があります。本研究ではCDDP耐性癌細胞の耐性機構について調べることを目的とした。

2. 方法

- (1) 細胞：ヒト舌の扁平上皮癌細胞 SAS からシングルクローニングした細胞株である SAS1、SAS4、SAS5、SAS20 を用いた。SAS1、SAS4 は CDDP 耐性株、SAS5、SAS20 は CDDP 感受性株である。
- (2) MTS assay：96well plate に細胞を 3000 個播種した。24 時間後に CDDP を加え 48 時間培養した。CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (promega) を用いて生存細胞の数を測定した。なお、CDDP 濃度は、0.3、0.6、1.25、2.5、5.0、10、20 ($\mu\text{g/ml}$) に設定した。また阻害剤を用いた実験では CDDP を添加する 4 時間前に阻害剤を加えた。
- (3) 阻害剤：JNK inhibitor, MEK inhibitor, NF- κ B inhibitor, mTOR inhibitor, PI3 Kinase inhibitor, EGFR inhibitor を用いた。
- (4) Western blotting：各細胞は Lysis Buffer (150mM NaCl, 1% NP-40, 50mM Tris-HCl pH7.4, proteasome inhibitor (sigma)) で可溶化後 SDS PAGE を行い、タンパク質を PVDF メンブレン (Millipore) に転写し、抗 pJNK 抗体 (Cell signaling 社) を用いた。SuperSignal West Femto (Pierce) を用いて可視化した。撮影には LAS-4000 (Fuji film) を用いた。

3. 結果

それぞれの細胞のシスプラチン耐性の程度

SAS1、4、5、20 細胞の CDDP 耐性について MTS assay を用いてそれぞれの細胞の CDDP 耐性の程度について検討した。耐性細胞である SAS1、4 は SAS5、20 に比べ CDDP 耐性を示し、その濃度が $1.25 \mu\text{g/ml}$ のときに最も顕著な差が現れた (図 1)。

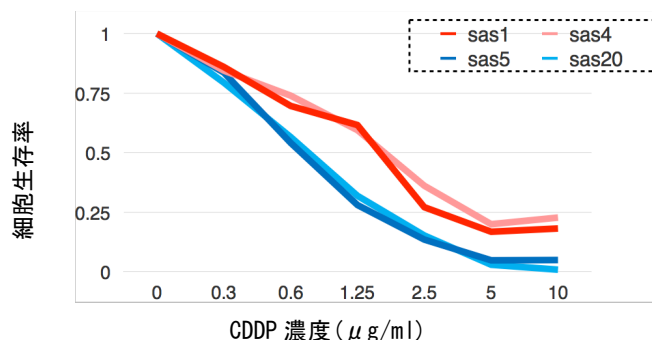


図 1 各細胞株の CDDP 耐性
耐性細胞 SAS1、SAS4 と感受性細胞 SAS5、SAS20 ではシスプラチンに対する耐性が異なっていた。

次に、CDDP 耐性の機序について調べるため、様々なシグナル伝達経路の阻害剤を併用して実験を行った。CDDP 濃度は $1.25 \mu\text{g/ml}$ とし、MTS assay にて細胞生存率を測定した。

耐性細胞 SAS1、4 のどちらの細胞においても、JNK 阻害剤は他の阻害剤と比較して、強い殺細胞効果を示した (図 2-1, 2)。この効果は CDDP の有無に依らず細胞生存率を約 30% にまで減少させた。これは感受性細胞に CDDP を作用させた場合と同程度の殺細胞効果であった。また感受性株でも同様に CDDP 単剤より JNK 阻害剤を併用した方が、殺細胞効果が上昇した (図 2-3, 4)。

JNK 阻害剤が耐性細胞で殺細胞効果が特に高かったことから、JNK の活性化が CDDP に関与している可能性が考えられた。そこで JNK の活性について Western blotting 法を用いて検討した。

その結果、耐性細胞株 SAS4 細胞では感受性細胞株 SAS5 細胞に比べ、CDDP の有無に関わらず JNK の活性が高かった。

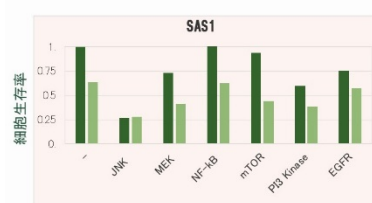


図 2-1 SAS1 細胞



図 2-2 SAS4 細胞



図 2-3 SAS5 細胞



図 2-4 SAS20 細胞

図 2. CDDP と各種阻害剤との併用効果
耐性細胞では特に JNK 阻害剤の殺細胞効果が高かった。

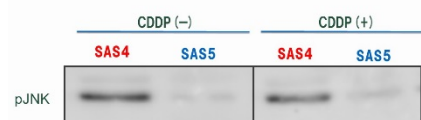


図 3. JNK の活性
耐性細胞では感受性細胞に比べ JNK の活性が高かった。

4. 考察

今回用いた耐性株 SAS1、SAS4 は感受性株 SAS5、SAS20 に比べ CDDP に耐性を示し、また JNK の活性化が耐性の機序となっている可能性が示唆された。この結果は実際に臨床において、化学療法として CDDP を投与する前に腫瘍の JNK の活性を測定すればその耐性の有無を把握できるだけでなく、耐性を示す腫瘍においても JNK 阻害剤を併用すれば、その効果を増強できる可能性が示唆された。

シスプラチン耐性細胞における 5-FU の併用療法の効果の検討

02124014 本間風花

指導教員：北村哲也（口腔病理病態学教室）

キーワード：口腔癌、シスプラチン、5-FU

1. 諸言

シスプラチン（CDDP）は口腔癌における化学療法で用いられる抗癌剤の一つである。口腔癌には CDDP に耐性を示すものが存在し、期待した化学療法の効果が得られない場合があり問題となる。そこで本研究では、CDDP 耐性細胞に対し、CDDP と別の抗癌剤である 5-FU の併用処理の効果を検討した。

2. 方法

(1) 細胞：ヒト舌の扁平上皮癌細胞 SAS からシングルクローニングした細胞株である SAS1、SAS4、SAS5、SAS20 を用いた。SAS1、SAS4 は CDDP 耐性株、SAS5、SAS20 は CDDP 感受性株である。

(2) MTS assay：96well plate に細胞を 3000 個播種した。24 時間後に CDDP あるいは 5-FU、またはその両方を加え 48 時間培養した。細胞数の生存率には CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (promega) を用いた。なお、CDDP 濃度は 0、0.6、1.25 $\mu\text{g/ml}$ とし、5-FU の濃度は 0、6、12.5 μM とした。

3. 結果

CDDP と 5-FU を単独あるいは併用処理した細胞生存率の

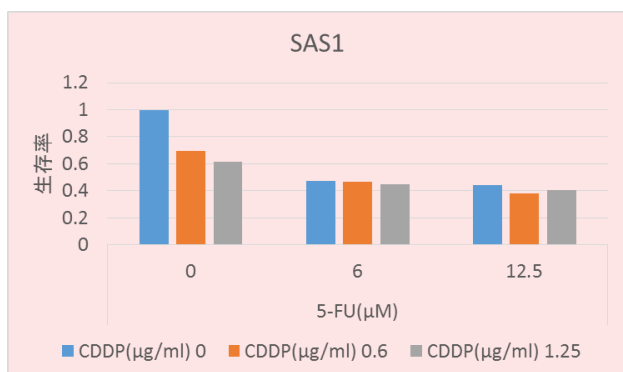


図 1. SAS1（耐性細胞株）

グラフを示す（図 1：SAS1 細胞株、図 2：SAS4 細胞株、図 3：SAS5 細胞株、図 4：SAS20 細胞株）。CDDP 単独処理では、耐性細胞株 SAS1、SAS4 細胞は感受性細胞株 SAS5、SAS20 に比べ細胞生存率が高かった。5-FU を併用したところ、耐性細胞株 SAS1 および SAS4 では、5-FU に CDDP を併用し濃度を上昇させても殺細胞効果の上昇はみられなかった。これに対し、CDDP 感受性細胞株 SAS5、SAS20 では、5-FU に CDDP を併用すると CDDP 濃度依存的に効果の増強がみられた。

4. 考察

CDDP に耐性を示す腫瘍では、CDDP と 5-FU の併用による殺細胞効果の上昇が期待できない可能性が示唆された。逆に、CDDP に感受性を示す腫瘍では、CDDP と 5-FU の併用で殺細胞効果の上昇が期待できる可能性が示唆された。これらのことから、化学療法前に腫瘍細胞の CDDP 耐性の有無が判断出来れば、抗癌剤の併用による有害な副作用の軽減に繋がる可能性が考えられた。

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。

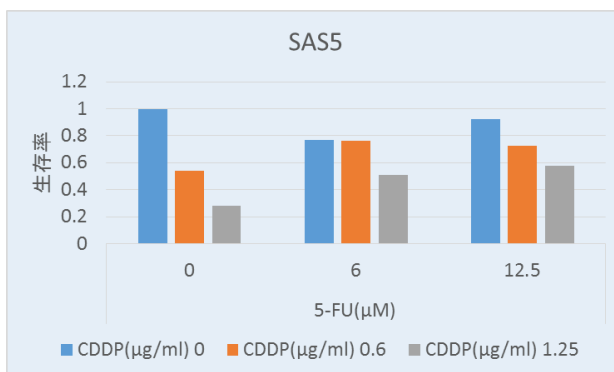


図 3. SAS5（感受性細胞株）

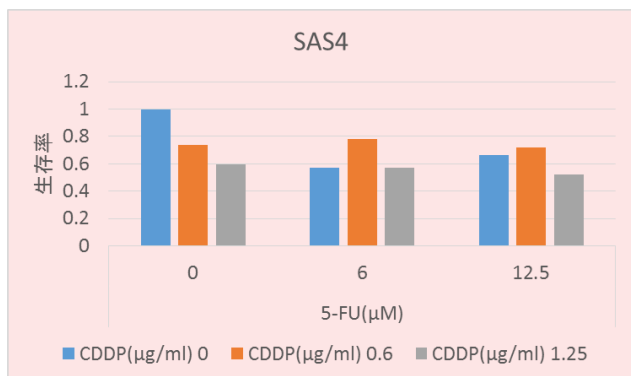


図 2. SAS4（耐性細胞株）

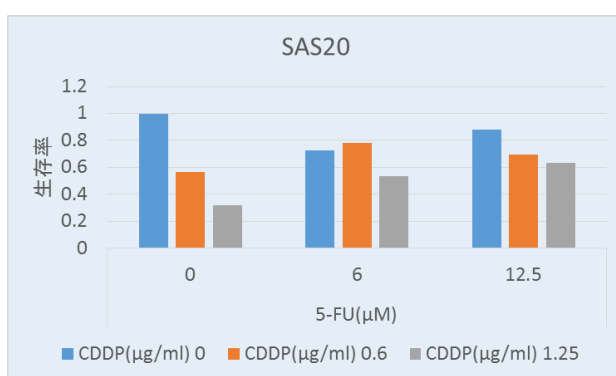


図 4. SAS20（感受性細胞株）

低用量メトロノーミック化学療法によるがん間質反応の減弱と治療抵抗性の回避

02110566 石塚 啓太

指導教員：菊地 央，間石 奈湖，樋田 京子

(遺伝子病制御研究所 血管生物学研究室)

キーワード：メトロノーミック化学療法，腫瘍間質

1. 緒言

がん組織は、がん細胞からなる実質とそれを囲む間質で構成されており、がん組織の大部分を占める間質ががんの進展に重要な役割を果たしていることがわかっている。近年、抗がん剤治療により誘導されるがん間質での反応が、治療抵抗性の原因になることがわかってきた。通常、抗がん剤は「最大耐用量投与方法（Maximum Tolerable Dose：MTD）」で用いられ、副作用を伴うことから休薬期間を必要とする。一方、血管新生阻害を目的として提唱された「低用量メトロノーミック化学療法（Low Dose Metronomic chemotherapy：LDM）」は、低用量の抗がん剤を休薬期間を設けることなく用いられている。今回の研究では、LDM 治療がもたらすがん間質への影響を MTD 治療と比較検討した。

2. 方法

担癌マウスに MTD および LDM 治療を行い、摘出した腫瘍組織を用いて以下の解析を行った。

(1) 血管と腫瘍随伴マクロファージ (TAM)

抗 CD31 抗体および抗 CD206 抗体を用いて二重免疫染色を行い、腫瘍組織の血管および TAM を可視化した。染色された血管および TAM の数を計測し、MTD 治療群と LDM 治療群で比較した。

(2) 膠原線維

トリクローム染色を行い、腫瘍組織の線維化の程度を可視化した。描出された膠原線維の割合を画像解析ソフト ImageJ を用いて定量解析した。

3. 結果

MTD 治療後に比べ LDM 治療後の腫瘍組織において、血管および TAM の数は少なかった (図 1)。トリクロームで染色された膠原線維の量も、MTD 治療群よりも LDM 治療群で少なかった (図 2)。LDM 治療では、がん間質に

新生される血管やがん組織内に動員される TAM、線維化の程度が低くなる傾向にあることが示された。

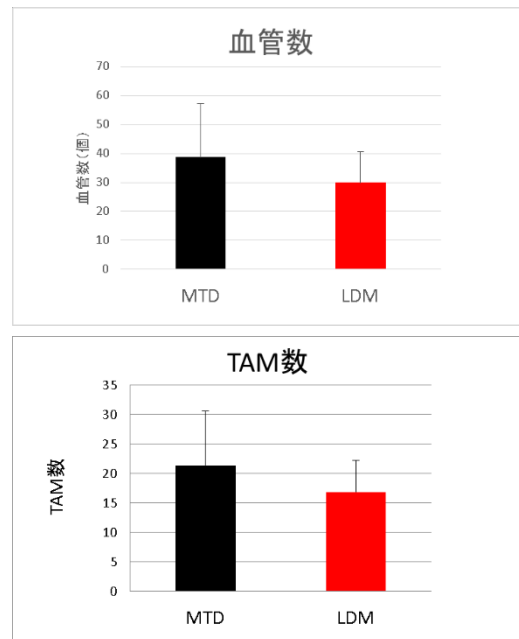


図 1. MTD および LDM 治療群における腫瘍組織の血管数 (上) および TAM 数 (下) の比較

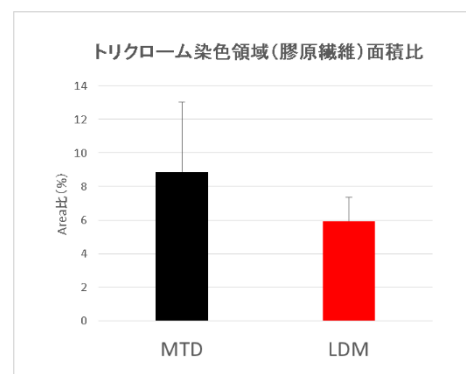


図 2. MTD 治療群に比べ、LDM 治療群のがん間質内では、膠原線維の産生がわずかに抑制された

4. 考察

以上の結果から新しい化学療法である低用量メトロノーミック化学療法 LDM は、最大耐用量投与方法 MTD に比べてがんの悪性化に関わる間質の反応変化を起こしにくいことが示され、治療抵抗性が獲得されにくい可能性が示唆された。したがって、低用量メトロノーミック化学療法は腫瘍の治療成績向上に向け、今後大きな可能性を持つことが期待される。

抗癌剤治療後の癌細胞が分泌するサイトカインによる 腫瘍血管内皮細胞の耐性獲得

02114027 武田 遼

指導教員: 菊地 央, 間石 奈湖, 樋田 京子

(遺伝子病制御研究所 血管生物学研究室)

キーワード: 腫瘍, 血管, 薬剤耐性

1. 緒言

がんは日本の死因第一位であり、がん克服に向けた研究が世界中でなされている。血管生物学研究室では、腫瘍血管内皮細胞が正常血管内皮細胞と比較し、様々な異常性をもつことを報告してきた。腫瘍血管内皮細胞では、薬剤を排出する ABC トランスポーターのひとつである MDR1/ABCB1 の発現が亢進しており、薬剤耐性を獲得している⁽¹⁾⁽²⁾。最近では、抗癌剤治療により癌細胞の ABCB1 発現が亢進することが報告されている。しかし、血管内皮細胞に対する抗癌剤の影響は不明である。本研究では、抗癌剤が血管内皮細胞の ABCB1 発現に与える影響とそのメカニズムを、癌細胞が分泌するサイトカインに着目して検討した。

2. 方法

①抗癌剤が誘導する癌細胞のサイトカイン発現:

癌細胞に抗癌剤 Gemcitabine (GEM) と Cisplatin (CDDP) を処理後、Total RNA を抽出した。RNA を鋳型として cDNA を合成後、RT² ProfilerTM PCR array Human Cytokines & Chemokines を用いて PCR array 解析を行った。抗癌剤処理により癌細胞で発現が亢進する遺伝子として、サイトカイン X を選出した。その後、同様に癌細胞に抗癌剤を処理し、サイトカイン X の発現変化を Real-time PCR 法にて解析した。

②サイトカイン X による MDR1 発現誘導:

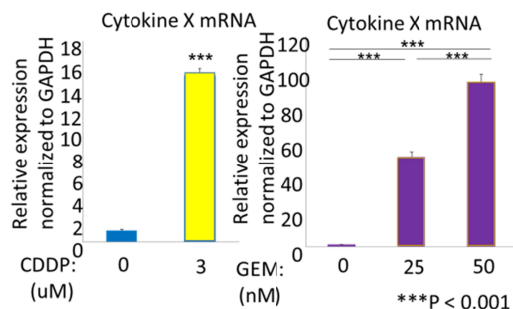
血管内皮細胞にサイトカイン X を処理して培養後、RNA を抽出して cDNA を合成した。MDR1 遺伝子の発現変化を Real time PCR 法にて解析した。

3. 結果

抗癌剤 GEM ならびに CDDP 処理により、癌細胞におけるサイトカイン X の発現亢進が見られた (図 1)。

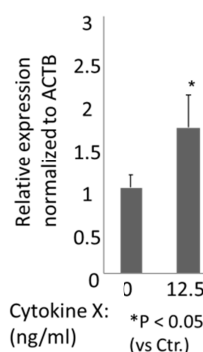
サイトカイン X を処理により、血管内皮細胞において

MDR1/ABCB1 の発現が亢進した (図 2)。



(図 1) 抗癌剤処理による癌細胞におけるサイトカイン X 発現亢進

MDR1 mRNA



(図 2) サイトカイン X 処理による血管内皮細胞における MDR1 発現亢進

4. 考察

抗癌剤投与により、癌細胞のサイトカイン X の産生が誘導され、血管内皮細胞の MDR1/ABCB1 発現を亢進させた。抗癌剤は血管内皮細胞の ABCB1 発現亢進ならびに薬剤耐性誘導に関与することが示唆された。

5. 参考文献

- (1) Akiyama K, Hida K (他 11 名), Tumor endothelial cells acquire drug resistance by MDR1 up-regulation via VEGF signaling in tumor microenvironment. Am J Pathol. Mar;180(3):1283-93. 2012
- (2) Akiyama K, Hida K (他 10 名), Inhibition of multidrug transporter in tumor endothelial cells enhances antiangiogenic effects of low-dose metronomic paclitaxel. Am J Pathol. Feb;185(2):572-80. 2015

1. 緒言

アデノウイルスの L1-L5 の 5' 非翻訳領域(以下 UTR)には、トリパートタイリーダー（以下 TL）という共通の DNA 配列がある。また、L5 遺伝子の UTR には、L1-L4 遺伝子にはない X、Y、Z という配列があり、UTR の翻訳効率やタンパク発現量への重要性が指摘されている(1)。今回、この L5 5' UTR における新規のスプライシングパターンの検出を目的として実験を行った。

2. 方法

アデノウイルス感染 24 時間後の Hela 細胞 Total RNA から作成された cDNA を出発材料として使用した。L5 遺伝子のエキソン 1(TL1)の開始部分と、L5 5'UTR にプライマーを設定し、L5 の cDNA を増幅した。増幅された L5 cDNA を、プラスミド(pBulunt) に挿入した。挿入遺伝子の有無を T7、SP6 プライマーを用いた PCR 法にて確認した。確認にはアガロースゲル電気泳動法を用いた。

3. 結果

実験では 55 個のクローンを得た。得られたクローンを鋳型とした PCR 産物の電気泳動の結果を Figure1 に示した。サイズマーカーおよび事前に作成されていた標準クローン（図中では XYZ、YZ、Z、TL と標記）との比較により 5'UTR のスプライシングパターンを分類した ()。分子量が TL 単独のものよりも小さいものが 2 パターン、TL+XYZ のものよりも大きいものが 4 パターンあり、少なくとも 10 種類のスプライシングパターンが確認できた。また、TL+Z、TL+YZ の頻度が高かった。

4. 考察

PCR 産物のサイズからスプライシングパターンとして想定外のもがクローニングされた。この事実から、L5 領域の上流には XYZ 以外のエキソンがあることが推測される。また特に頻度の高かった YZ 配列、Z 配列は何かの機能を持つ可能性があると考えられ、アデノウイルス粒子形成におけるこれらスプライシング様式の意義解明が今後の課題と考えられた。

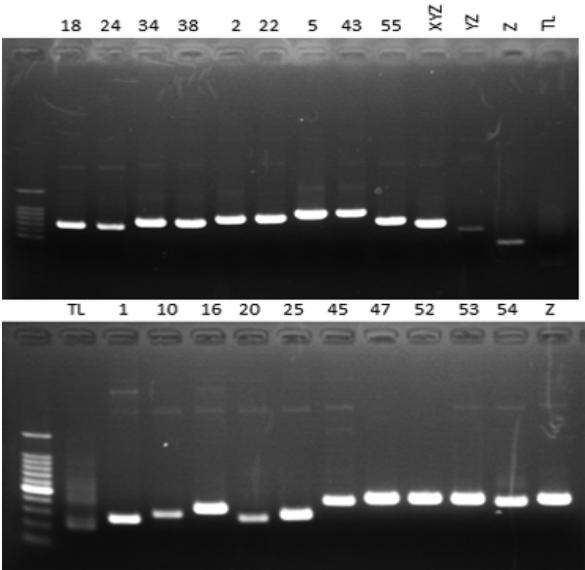


Figure 1

size	No.
220	1,20
270	10,25
330	16
444	14,21,39,45,47,52,53,55
638	7,13,26,28,30,35,44,46,51
747	18,24,
800	34, 38,54
850	2,22
900	5
1000	43

Table 1

5. 参考文献

(1)Characterization of the translational defect to fiber synthesis in monkey cells abortively infected with human adenovirus: role of ancillary leaders. J Virol. 1989 Oct;63(10):4376-85. Silverman L1, Klessig DF.

アデノウイルス L5 領域のスプライシングがタンパク質発現に及ぼす影響

02124008 仲盛優菜

指導教員：安田元昭（口腔分子微生物学教室）

キーワード：アデノウイルス、TrLdr

1. 緒言

アデノウイルスは、二重鎖直鎖状 DNA を有する小型 DNA ウイルスである。エンベロープは持たず、カプシドは直径約 80nm の正 20 面体の球形粒子を形成する。アデノウイルスは、風邪症候群の主要病原ウイルスの一つと考えられているが、2, 5, 12 型ヒトアデノウイルスはげっ歯類初代培養細胞を形質転換できることから、古くから DNA 腫瘍ウイルスとして研究されてきた。アデノウイルス後期遺伝子群には共通するエキソンが 3 つ存在しこれらが転写された配列はトリパータイトリダー (TrLdr) と呼称されている (1)。これらの配列がタンパク質発現に与える影響について解析することを目的として実験を行った。

2. 方法

①発現プラスミド：5 型ヒトアデノウイルス感染細胞から作成された cDNA ライブラリーを出発材料とし、PCR 法によって TrLdr 配列を増幅した。この配列をルシフェラーゼ発現プラスミド (pcDNA LUC) の 5' UTR 領域にクローニングした。順列方向にクローニングしたものを TrLdr wt、逆方向にクローニングしたものを TrLdr rev とした (Figure 1)。

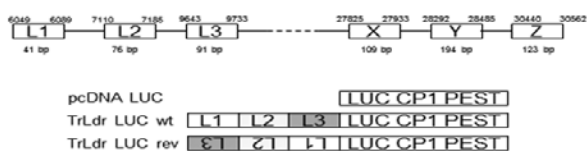


Figure 1

②培養細胞：HeLa 細胞を 10%FBS 添加ダルベッコ改変イーグル培地にて 5 % 二酸化炭素、37℃にて培養・維持し、対数増殖期にある細胞を実験に使用した。

③ルシフェラーゼアッセイ

48 穴プレートに 90 % コンフルエントとなった細胞に

pcDNA LUC、TrLdr wt あるいは TrLdr rev と内部標準レニラルシフェラーゼ発現プラスミドを同時に導入した。同一組み合わせのトランスフェクションを三重実験にて行った。トランスフェクション後 24 時間で細胞を溶解し、細胞溶解液をデュエルルシフェラーゼキットにて解析・定量化した。

④リアルタイム PCR

実験方法③で示した条件と同一のトランスフェクションを行い、24 時間後に総 RNA を抽出した後、通法に従って cDNA を作成、ルシフェラーゼおよびネオマイシンに対するプライマーでリアルタイム PCR を行いルシフェラーゼ mRNA の発現量を比較した。

3. 結果

Figure 2 のごとく、各計測値は三重実験の平均値でありエラーバーは標準偏差の値を示している。

Figure 2

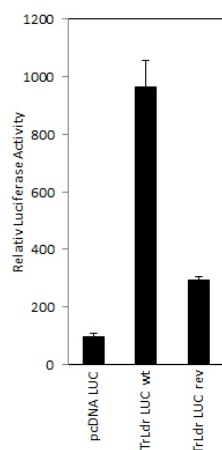
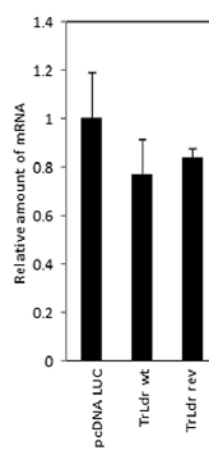


Figure 3



TrLdr を順方向に挿入した場合のみルシフェラーゼ比活性が亢進していた (Figure 2)。一方、リアルタイム PCR で有意な mRNA 量の変動は認められなかった (Figure 3)。

4. 考察

mRNA 量が増加していないにもかかわらず TrLdr の挿入によりルシフェラーゼ活性の増加がみられたことから、TrLdr はタンパク質の翻訳に何らかの亢進作用を有することが示唆された。

5. 参考文献

(1) Characterization of the translational defect to fiber synthesis in monkey cells abortively infected with human adenovirus: role of ancillary leaders. J Virol. 1989 Oct;63(10):4376-85. Silverman L1, Klessig DF.

抗菌性粘膜調整材による微生物増殖抑制作用

02124010 長澤 祐季

指導教員：長谷部 晃（口腔分子微生物学教室）

キーワード：*S. mtans*, *C. albicans*, *S. aureus*,

誤嚥性肺炎, 粘膜調整材

【緒言】

超高齢社会を迎え、多くの後期高齢者が義歯などの補綴物を使用しており、粘膜調整材を使用する機会も増えてきた。粘膜調整材はその粘弾性という特徴から微生物が付着、増殖しやすい。粘膜調整材の使用により、口腔内環境が悪化し、誤嚥性肺炎のリスクを高めることを防止するためにも抗菌性粘膜調整剤の開発が必要である。本実験では抗菌性粘膜調整材の微生物増殖抑制効果を調べた。

【材料と方法】

微生物は *Candida albicans* IFM40009、*Streptococcus mutans* 109c、*Staphylococcus aureus* 209P を用いた。実験には抗菌性粘膜調整材と、比既存の粘膜調整材としてティッシュコンディショナー (GC) とフィクショナー (ニッシン) を使用し、これらの粘膜調整材染み出し液の微生物増殖抑制作用を調べた。具体的には、以下の通りである。粘膜調整材をそれぞれ厚み 1.6 mm、直径 2 cm の試験片とし、試験片は 70%エタノールに 2~3 秒浸漬し、滅菌生理食塩水でリンス後使用した。この試験片を滅菌生理食塩水 15ml に入れ 37 °C、22 h、75 rpm でインキュベートして粘膜調整材染み出し液を作成した。これらの染み出し液の抗菌活性を調べるため、各粘膜調整材染み出し液：滅菌生理食塩水をそれぞれ 1 : 0、1 : 1、0 : 1 で混ぜたものを作成し、それぞれ微生物を含む液体培地と混ぜ、8 時間後まで 2 時間おきに経時的にサンプルを採取した。これらのサンプルを 96-well プレートに接種し、マイクロプレートリーダーで波長 630 nm における濁度を測定した。

【結果】

C. albicans の増殖において、インキュベート後 4 時間から濁度に差が生じ、抗菌性粘膜調整材を含む場合において他のものよりも濁度が低かった。また、滅菌生理食塩水を加えたものよりも抗菌性粘膜調整材単独のものゝ濁度が低くなっており染み出し液の濃度依存的に増殖抑制されていた (図 1)。また、*S. mutans* (図 2) ならびに *S. aureus* (図 3) においても同様の結果が得られた。

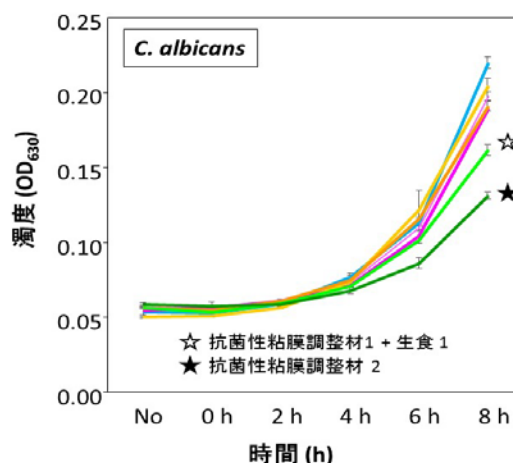


図 1. *C. albicans* 増殖に及ぼす染み出し液の影響

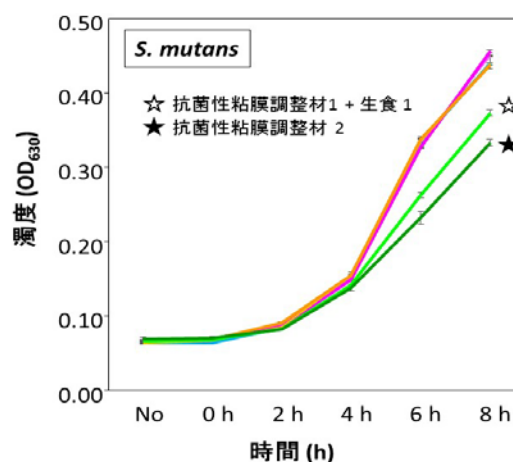


図 2. *S. mutans* 増殖に及ぼす染み出し液の影響

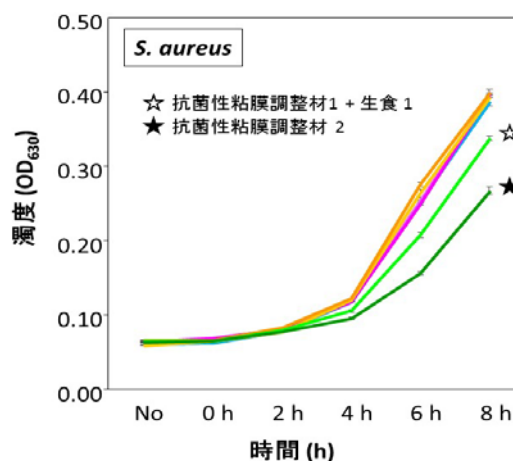


図 3. *S. aureus* 増殖に及ぼす染み出し液の影響

【考察】

抗菌性粘膜調整材から染み出した液体は、用いた全ての微生物に対して濃度依存的に増殖抑制効果があった。このことから抗菌性粘膜調整材に微生物増殖抑制効果を期待できるといえる。

抗菌性粘膜調整材による付着菌に対する殺菌効果について

02124041 田代 恵梨

指導教員：長谷部 晃（口腔分子微生物学教室）

キーワード：抗菌性粘膜調整材、*C. albicans*、*S. mutans*、*S. aureus*

【緒言】

本研究では粘膜調整材に抗菌性物質と粘土様物質を配合した抗菌性粘膜調整材における *Candida albicans*、*Streptococcus mutans* ならびに *Staphylococcus aureus* の付着菌と浮遊菌に対する抗菌性とその効果の持続について調べることを目的とした。

【材料と方法】

粘膜調整材は、抗菌性物質と電氣的に親和性を持つ粘土様物質を粘膜調整材に配合することにより徐放的な抗菌性を獲得した粘膜調整材、ならびに対照としてフィクション（ニッシン）を用いた。微生物は *C. albicans* IFM40009、*S. mutans* 109c ならびに *S. aureus* 209P を使用し、カンジダ GS、Mitis-Salivarius、ならびにスタヒロコッカス 110 をそれぞれの選択培地として用いた。粘膜調整材の試験片を 1:1.5 と 1:2 の二通りの粉液比で作成し円盤状にした後、それぞれ 0~4 週間抗菌性物質を放出させた。試験片を 6well プレートに入れ培養液を加えて振とうし浮遊菌を含む菌液を採取したのち、滅菌生理食塩水で洗浄した。さらに界面活性剤の TX-100 を加えた生理食塩水を入れて振とうし、粘膜調整材への付着菌を剥がし、付着菌の菌液を採取した。浮遊菌、付着菌をそれぞれ希釈したのち選択培地に接種し培地上に形成されたコロニーの数から生菌数を計測した。

【結果】

C. albicans において、付着菌は全期間を通して濃度依存的に殺菌効果が認められた。浮遊菌は 1 週目までは有意に殺菌されたが、以降はコントロールと有意差がなかったことから、付着菌に対してより有効であることが示唆された（図 1）。*S. aureus* の場合、*C. albicans* の場合よりも付着、浮遊とも粘膜調整材が強い殺菌効果を示し、*C. albicans* の場合と同様に付着菌により長い期間の殺菌効果があった（図 2）。*S. mutans* の場合においても *S. aureus* の場合と同様の傾向を示した（図 3）。

【考察】

C. albicans、*S. mutans*、*S. aureus* の付着菌、浮遊菌いずれにおいても、抗菌性物質含有粘膜調整材の殺菌効果が認められた。また、付着菌により強い効果が認められたことは、臨床使用において口腔内細菌叢に影響を与えずに

粘膜調整剤により殺菌される可能性が高いことが示され、本粘膜調整材はより有用性が高いと考えられる。

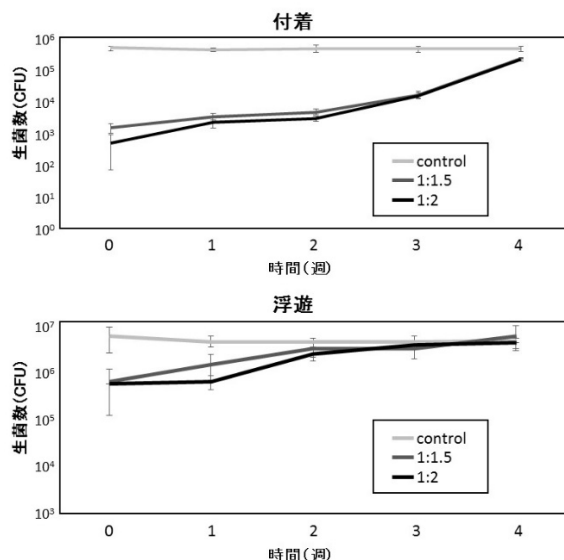


図 1. *C. albicans* の付着菌、浮遊菌に対する抗菌活性

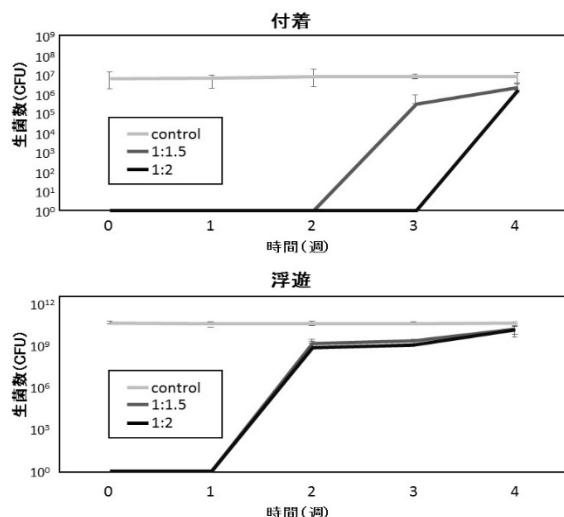


図 2. *S. aureus* の付着菌、浮遊菌に対する抗菌活性

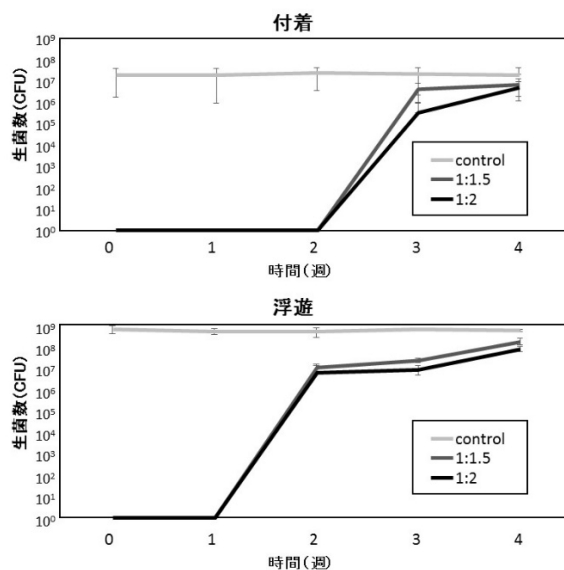


図 3. *S. mutans* の付着菌、浮遊菌に対する抗菌活性

ヒト IL-1 α 遺伝子のクローニング

02120572 坂本 隆

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：ヒト IL-1 α 遺伝子

諸言

炎症性サイトカインの一つである IL-1 は IL-1 α と IL-1 β からなり、発熱等の種々の炎症反応に関わっている (1)。

本研究実習では、ヒトの IL-1 α 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

ヒト単球系細胞株 THP-1 細胞から全 RNA を調製し、逆転写酵素を用いて cDNA ライブラリーを作成した。TA クローニングベクターとして pEF6/V5-His-TOPO (invitrogen 社)を用いた。PCR 産物、また、インサートのサイズならびに方向性は制限酵素 MscI による切断の後、アガロース電気泳動により確認した。

結果ならびに考察

GeneBank に登録されているヒト IL-1 α 遺伝子 (accessionNo M28983,816bp) の塩基配列をもとに、開始コドンならびに終止コドンを含むプライマー (5'-AAGATGGCCAAAGTTCCAGAC-3'ならびに 5'-GACCTACGCCTGGTTTTCC-AR-3') を合成した。これらのプライマーを用いて、THP-1 細胞から作成した cDNA ライブラリーから PCR 法で目的のヒト IL-1 α 遺伝子を検索した。その結果、ヒト IL-1 α 遺伝子と同等の約 800bp の PCR 産物が得られた。この PCR 産物を pEF6/V5-His-TOPO にライゲーションし (図 1)、大腸菌にトランスフォーメーションした。形成されたアンピシリン耐性コロニーの内 12 個からミニプレップによりプラスミドを調製した。ヒト IL-1 α 遺伝子の開始コドンから 20 塩基下流と、ベクターにそれぞれ一か所切断部位のある制限酵素 MscI を用いてインサートの方向性をアガロース電気泳動により確認した。12 個

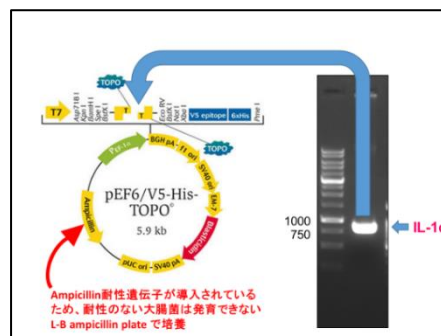


図 1 pEF6/V5-His-TOPO へのクローニング

の内、6 個 (図 2 赤枠) に正しい方向性でヒト IL-1 α と思われる遺伝子が挿入されていることがわかった。その内の 2 個 (3, 6 のサンプル) のプラスミ



図 2 遺伝子のサイズならびに方向性の確認

ドをシークエンスし、ブラストサーチによりホモロジー検索を行ったところ、ヒト IL-1 α 遺伝子がクローニングされていることがわかった。

参考文献

1. Gross O, Yazdi AS 他 7 名, Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1, Immunity, 36(3), 388-400, 2012

IL-1 α 遺伝子の変異体作製

02124001 内田 知希

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：IL-1 α 、pEF6/V5-His-TOPO、遺伝子変異導入

緒言

炎症性サイトカインの一つである IL-1 は IL-1 α と IL-1 β からなり、発熱などの種々の炎症反応に関わっている (1)。

本研究実習では、pEF6/V5-His-TOPO ベクター (invitrogen 社) にヒト IL-1 α 遺伝子をクローニングした pEF6/V5-His-hIL-1 α の下流に存在する V5 ならびに His タグを発現させるため、hIL-1 α 遺伝子の終止コドン TAG を、グルタミンをコードする CAG へ点変異させることを目的とした。

材料と方法

pEF6/V5-His-hIL-1 α に QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (以後、クイックチェンジ、Agilent Technologies 社) を使い、付属のプロトコール(2)に準じて変異を導入した (図 1)。

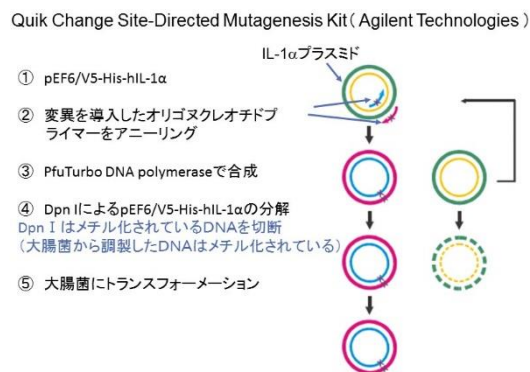


図 1 クイックチェンジ法

結果並びに考察

ヒト IL-1 α の終止コドンを含む

5'-ACTGGAAAACCAGGCGTAGGTCAAGGGC

AATTC-3' の T を C に変換した forward primer:

5'-ACTGGAAAACCAGGCGCAGGTCAAGGGC

AATTC-3' とその相補鎖 reverse primer:

5'-GAATTGCCCTTGACCTGCGCCTGGTTTTTC

CAGT-3' を合成した。これらのプライマーを用いて、

pEF6/V5-His-hIL-1 α を鋳型として PfuTurbo

DNA polymerase を用いて DNA 合成反応を行っ

た。次に、メチル化されたプラスミドを特異的に

分解する Dpn I で鋳型プラスミドを分解し、大腸

菌へトランスフォーメーションし、LB-ampicillin

plate で培養した。形成されたコロニー 12 個から

ミニプレップキットを用いてプラスミドを精製し、

シーケンス解析を行った。その結果、ヒト IL-1 α

の終止コドン TAG の T が C に変換されたコンス

トラクト (pEF6/V5-His-hIL-1 α m) を作成できた

(図 2)。

```
Query 781 ATCACTGACTTTTCAGATACTGGAAAACCAGGCGCAG 816
          |||
Sbjct 781 ATCACTGACTTTTCAGATACTGGAAAACCAGGCGTAG 816
```

図 2 シーケンス結果

今後、この pEF6/V5-His-hIL-1 α m を HEK293 細胞に遺伝子導入し、V5 ならびに His タグの発現を確認する予定である。

参考文献

1. Gross O, Yazdi AS 他 7 名, Inflammasome activators induce interleukin-1 α secretion via distinct pathways with differential requirement for the protease function of caspase-1, Immunity 36(3), 388-400, 2012
2. QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit Instruction Manual

マイコプラズマ由来リポタンパク質によるインフラマソームの活性化

02120599 木村 拓

指導教官：柴田 健一郎、佐伯 歩（口腔微生物学教室）

キーワード： *M. salivarium*、 *M. pneumoniae*、 インフラマソーム、 IL-1 β

緒言

M. salivarium は、歯周疾患患者の歯周ポケット内から高頻度で分離され、種々の口腔感染症において本マイコプラズマの抗体価が健常者に比べて優位に高いことから、様々な歯周疾患に関与していると考えられている(1,2)。以前の研究実習では、*M. salivarium* ならびに *M. pneumoniae* の菌体が NLRP3 インフラマソームを活性化して IL-1 β の産生を誘導することを報告した(3)。本研究では、これらマイコプラズマの有するインフラマソームの活性化物質を同定することを目的とした。

方法

マイコプラズマとして *M. salivarium* ATCC23064(Ms)と *M. pneumoniae* ATCC15492(Mp)を用いた。標的細胞としては、C57BL/6(B6) ならびに B6 から caspase-1、NLRP3、ASC あるいは TLR2 をノックアウトしたマウス(caspase-1^{-/-}、NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-}、TLR2^{-/-})から分化誘導した骨髄由来マクロファージ(BMM)を用いた。これらの BMM を LPS で 4 時間刺激した後に、菌体あるいはリポタンパク質(LP)で 24 時間刺激し、上清に放出された IL-1 β 量を ELISA 法と Western Blotting 法で測定した。Ms ならびに Mp から TritonX114 二相分離法で LP (MsLP と MpLP) を調製した。

結果ならびに考察

B6 と TLR2^{-/-}/BMM を Ms ならびに Mp 菌体で刺激したところ、B6BMM では IL-1 β の産生が誘導されたが、TLR2^{-/-}/BMM では IL-1 β の産生が誘

導されなかった。そこで、Ms ならびに Mp の有するインフラマソームの活性化物質は TLR2 のリガンドである LP ではないかと推測した。B6BMM を MsLP、MpLP ならびに Ms 由来リポペプチドである FSL-1 で刺激したところ IL-1 β の産生が誘導されたが、caspase-1、NLRP3、ASC をノックアウトすることで本活性はほぼ消失した (図 1)。以上のことから、Ms ならびに Mp の有するマウス BMM に対する NLRP3 インフラマソームの活性化物質は両マイコプラズマの細胞膜に存在する LP であることが分かった。

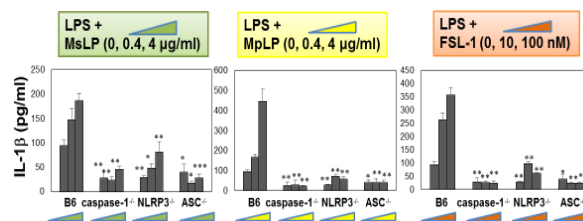


図 1 caspase-1^{-/-}、NLRP3^{-/-}、ASC^{-/-}の影響

参考文献

1. Watanabe T, Matsuura M, 他 1 名, Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). J Clin Microbiol, 23(6), 1034-8, 1986
2. Watanabe T, Shibata K, 他 6 名, Detection of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma fermentans* in synovial fluids of temporomandibular joints of patients with disorders in the joints. FEMS Immunol Med Microbiol, 22(3) 241-6, 1998
3. 杉本明優, *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 16 号, 49, 2015

アルカリホスファターゼ活性における 2 価金属イオンと基質の関係

02114005 谷村百和子

指導教員: 鈴木邦明(細胞分子薬理学教室)

キーワード: アルカリホスファターゼ(ALP)、Ca、Zn、Mg

1. 緒言

アルカリ性ホスファターゼ(ALP)には、Zn、Mg、Ca イオンの結合部位が存在する。これらの 2 価金属の ALP 活性に対する役割を調べるために、ALP 活性のタイムコースに対する 2 価金属と基質の影響を調べた。

2. 方法

ヒト胎盤型 ALP を用い、パラニトロフェニルリン酸(pNPP)やナトリウムピロリン酸(Na-PPi)を基質として様々な組み合わせの 2 価金属存在下での活性の直線性を Chifflet 法によるリン酸の定量により調べた。

3. 結果

・pNPP を基質とした場合

各金属単独で存在すると、最初の 10 分間で大きく Pi 量が増加し、直線性は得られなかった。そこで、2 種類(Zn、Mg)を組み合わせると図 1 が得られ、直線となっているのがわかる。

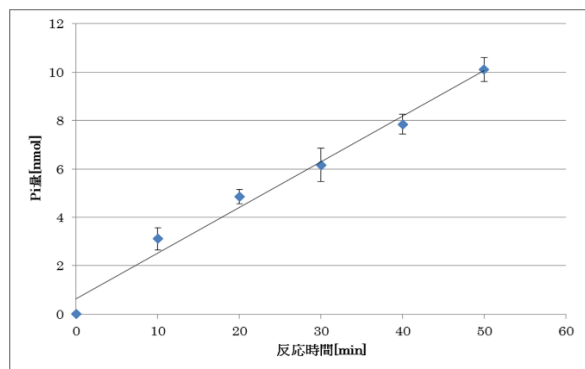


図 1 pNPP を基質 Zn、Mg を含むタイムコース

Ca と他の金属イオンを組み合わせた場合、最初の 10 分間で大きく Pi 量が増加し、直線性が得られなかった。そこで Ca を低濃度にし、3 種類(Ca、Zn、Mg)を組み合わせたときのグラフを図 2 に示す。

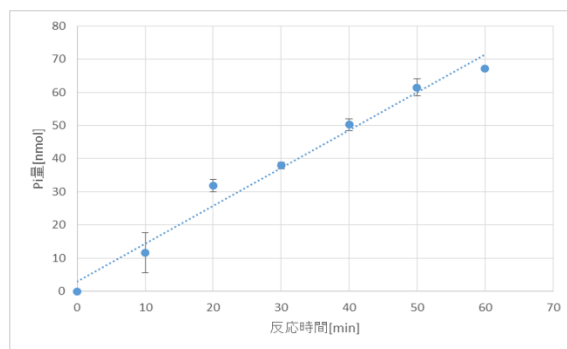


図 2 pNPP を基質 Ca、Zn、Mg を含むタイムコース

・Na-PPi を基質とした場合

pNPP で直線となった 3 種類の組み合わせで実験を行うと図 3 が得られた。最初の 10 分間で大きく Pi 量が増加し、以降も直線になっているとは言えない。

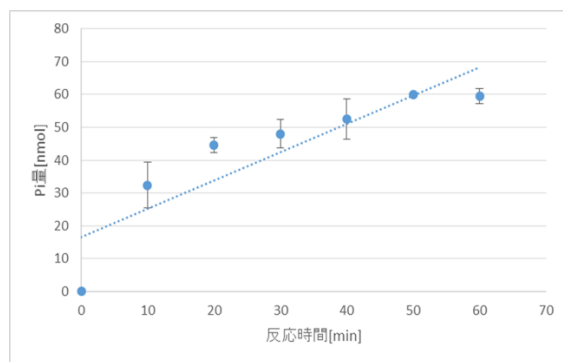


図 3 Na-PPi を基質 Ca、Zn、Mg を含むタイムコース

そこで、Ca を取り除いて実験を行い(図 4)、比較的直線となっているのが観察される。

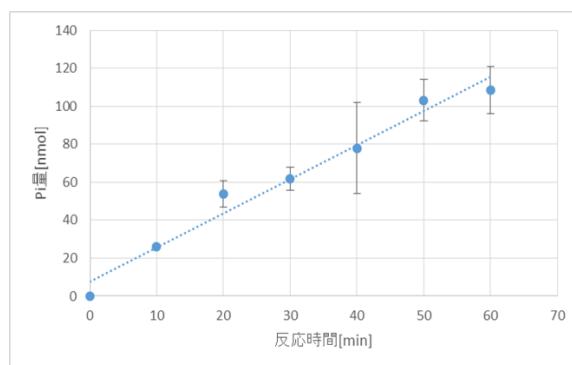


図 4 Na-PPi を基質 Zn、Mg を含むタイムコース

4. 考察

pNPP を基質としたときに直線性が見られる条件は必ずしも Na-PPi を基質としたときに直線性が見られるとは限らないことが実験により明らかになった。

アルカリホスファターゼ活性が発現するには、適切な組み合わせの Zn、Ca、Mg イオンが必要であり、また、使用する基質も影響すると考えられる。

低ホスファターゼ症とアルカリ性ホスファターゼ

02124024 福田彬人

指導教員：鈴木邦明（細胞分子薬理学教室）

キーワード：低ホスファターゼ症、アルカリホスファターゼ、リモデリング、酵素補充療法

1. 緒言

有用な治療方法が確立されていない低ホスファターゼ症（HPP）について、最新の英語論文を通して理解すること。

2. 方法

2編の英語論文を読み、内容の和文意識を作成した。

3. 結果

骨の石灰化とは、石灰化を妨げるピロリン酸を分解するALP（アルカリホスファターゼ）の存在で石灰化が進行する。人間のALPは4つのタイプに分けられ、1) 組織非特異型、2) 小腸型、3) 胎盤型、4) 生殖細胞型に分けられる。しかし、低ホスファターゼ症（HPP）はALPの低下、特に非特異的アルカリホスファターゼ（TNAPL）の低下によって石灰化が進行しないことに起因している遺伝性全身疾患である。系統的にHPPは大きく5つに分類され、1) 周産期型、2) 乳幼児期型、3) 小児期型、4) 成人型、5) 歯限局型のように重篤度と年齢によって分けられる。一般的にHPPの重篤度は最初に発現した年齢と逆相関の関係にある。現在最も有用とされている治療方法は酵素補充療法（EzRT）という骨芽細胞移植であるが、週3の注射を必要とする。有用な治療方法が確立されていないこの疾患について、苦しむ患者・その家族を救うため新しい治療アプローチが開発の下にあることに関する論文を紐解いた。

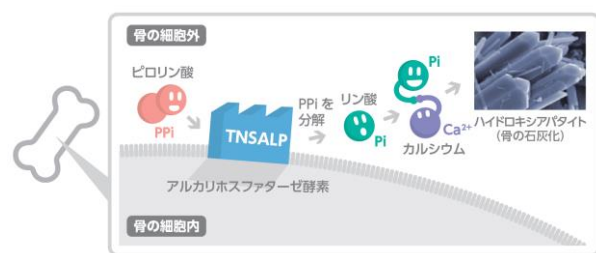


図1 健康者における石灰化機構

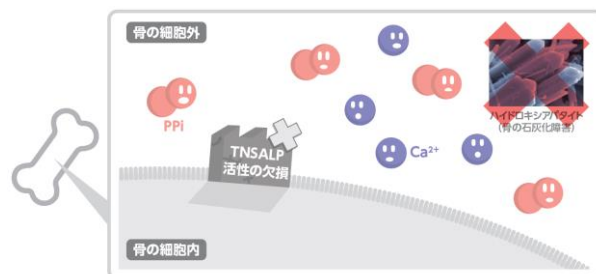


図2 HPPにおける石灰化機構



図3 健康者におけるPLP分解機構

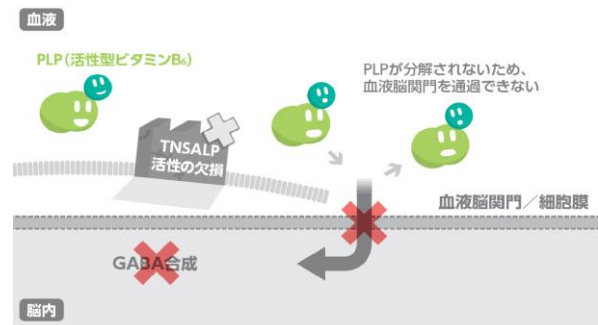


図4 HPPにおけるPLP分解機構

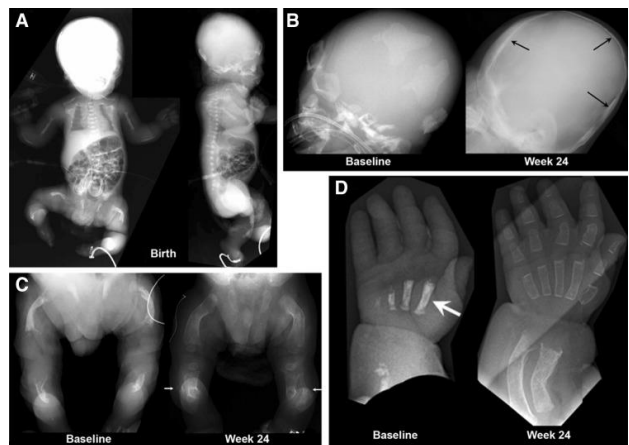


図5 HPPに対するAsfotase α の効果

4. 考察

HPPについて現在は、注射による補充酵素投与を頻繁に行わなければならないこと、あくまで対処療法であり原因療法ではないことが現実である。従って、さらに革新的な新しい治療アプローチが開発の下にあることを理解した。

5. 謝辞

Joe Luis Millan ならびに Hideo Orimo の文献引用に感謝いたします。

6. 参考文献

・ Alkaline Phosphatase and Hypophosphatasia/ Joe Luis Millan, Michael P Whyte/GrossMark/2016 ・ The Mechanism of Mineralization and the Role of Alkaline Phosphatase in Health and Disease/Hideo Orimo/J Nippon Med Sch/2010

各 CR や研磨方法により得られる表面粗さの評価

02120131 高橋 静香

指導教員：南川 元（細胞分子薬理学教室）

キーワード：CR，研磨，表面粗さ

1. 緒言

研磨は歯科臨床において必要不可欠な工程であるが、コンポジットレジン（CR）の硬化直後と比較してその表面粗さは大きくなり、審美性や細菌増殖に影響を与える。表面粗さがより小さくなる CR や研磨方法を見つけ出し、臨床応用に生かすことを目的に行った。

2. 方法

3 つの論文を読み、CR や研磨非方法、またその組み合わせにより得られる表面粗さの評価について検討した。

3. 結果

論文 1 の概要については以下の通り。

CR はナノフィラー型 CR (Ceram X)、マイクロフィラー型 CR (Esthet-X) , ハイブリッド型 CR (Filtek Z250) の 3 種類と、研磨方法は Super Snap Rainbow Technique Kit (Shofu)、Sof-lex Pop-on Contouring and Polishing System (Sof-lex)、 Enhance Finishing and Polishing System (Enhance) の 3 種類を使用した。各 CR と研磨方法の組み合わせで得られる表面粗さを、プロフィロメータを用いて評価したところ、表 1 に示した結果となった。Shofu の研磨システムでは他のシステムより高い研磨性が示された。ナノフィラー型である Ceram X が他の CR より高い研磨性がみられた。

表 1. 各 CR、研磨方法の組み合わせで得られる表面粗さ

Groups	Subgroups	Observations	Mean±S.D.	Groups Mean±S.D.	Std. error
I (Shofu)	Nanofilled-IA	10	0.0798±0.005664	0.1377±0.009418	0.0017
	Microfilled-IB	10	0.1361±0.002148		
	Hybrid-IC	10	0.1970±0.001606		
II (Sof-Lex)	Nanofilled-IIA	10	0.04308±0.005106	0.0747±0.03901	0.0071
	Microfilled-IIB	10	0.06847±0.00351		
	Hybrid-IIIC	10	0.11254±0.03039		
III (Enhance)	Nanofilled-IIIA	10	0.1457±0.001863	0.3108±0.004146	0.00076
	Microfilled-IIIB	10	0.5419±0.0015		
	Hybrid-IIIC	10	0.2446±0.001132		

論文 2 の概要については以下の通り。

5 種類の CR (Surefil, Prodigy Condensable, Filtek P60, ALERT, Filtek Z250) と 4 種類の研磨方法 (Sof-lex, Enhance, Composite Finishing Kit, Jiffy Polisher Cups) の組み合わせにより得られる表面粗さを、プロフィロメータを用いて評価したところ、表 2 に示した結果となり、Sof-lex と Jiffy Polisher Cups は大多数の CR において滑らかな表面を得ることができた。CR と研磨方法の組み合わせによる影響が非常に大きく、表面粗さが最も大きくなるのは ALERT と Composite Finishing Kit を用いた場合、最も小さくなるのは ALERT と Sof-lex を用いた場合であった。

表 2. 各 CR、研磨方法の組み合わせで得られる表面粗さ

Composite Resin	Time of measurement	Mean Surface Roughness in μm (S.D.)			
		Sof-Lex	Enhance	Composite Kit	Jiffy Points
SureFil	Before	0.01(0.03)	0.01(0.03)	0.01(0.03)	0.01(0.03)
	After	0.63(0.24)	0.83(0.29)	1.26(0.21)	0.85(0.17)
Prodigy Condensable	Before	0.11(0.03)	0.11(0.02)	0.11(0.02)	0.11(0.03)
	After	1.14(0.43)	0.55(0.12)	0.60(0.09)	0.73(0.43)
Filtek P60	Before	0.12(0.03)	0.12(0.04)	0.12(0.04)	0.12(0.04)
	After	0.96(0.23)	0.75(0.15)	0.71(0.19)	0.63(0.15)
ALERT	Before	0.15(0.03)	0.15(0.02)	0.15(0.02)	0.15(0.03)
	After	0.41(0.18)	1.39(0.15)	2.02(0.35)	1.00(0.26)
Filtek Z250	Before	0.12(0.01)	0.12(0.01)	0.12(0.01)	0.12(0.01)
	After	0.78(0.15)	1.31(0.16)	0.60(0.07)	0.62(0.20)

論文 3 の概要については以下の通り。

6 種類の CR (Gradia Direct, Venus, Venus Diamond, Enamel Plus HFO, Tetric EvoCeram, Filtek Supreme XT) と 3 種類の研磨方法 (PoGo polishiers, Enhance, Venus Supra) の各組合せを用いた。研磨を行わない群を対照群とした。それぞれの表面粗さを、AFM により二乗平均平方根を計測することにより評価したところ、表 3 に示した結果となった。ProGo polisher が対照群と比較して有意に表面の粗さが大きくなった。他の研磨方法と比べると Venus Supra が CR の表面を滑沢にした。また、対照群と比較しても有意差は認められなかった。

表 3. 各 CR、研磨方法の組み合わせで得られる表面粗さ

Composite Resin	Mean Surface Roughness in μm $\pm$ S.D.					
	Gradia Direct	Venus	Venus Diamond	Enamel Plus HFO	Tetric EvoCeram	Filtek Supreme XT
Pogo polisher	0.42±0.09	0.34±0.03	0.98±0.04	0.53±0.10	0.62±0.13	0.78±0.13
Venus Supra	0.25±0.07	0.24±0.10	0.62±0.11	0.45±0.02	0.26±0.07	0.19±0.03
Enhance	0.41±0.04	0.36±0.02	0.60±0.15	0.75±0.12	0.23±0.01	0.16±0.02
Control	0.18±0.02	0.13±0.02	0.51±0.22	0.40±0.05	0.21±0.02	0.08±0.01

4. 考察

表面粗さは、研磨方法や CR の種類による影響を受けるが、それらの組合せによりもっとも左右されることがわかった。

しかし、そのほかに研磨粗さに影響を与える因子として、研磨圧や方向、時間、道具などがあり、異なる評価項目として、細菌の増殖や CR の物性などがある。よって、CR と研磨方法の最適な組み合わせに関して、他の要素や評価方法によりさらなる検討が必要である。

5. 参考文献

1. Yadav RD, Raisingani D et al. Comparative Analysis of Different Finishing and Polishing Devices on Nanofilled, Microfilled, and Hybrid Composite: A Scanning Electron Microscopy and Profilometric Study, International Journal of Clinical Pediatric Dentistry 9(3), 201-203, 2016
2. Borges AB, Marsilio AL et al. Surface Roughness of Packable Composite Resins Polished with Various Systems Journal of Esthetic and Restorative Dentistry, 16(1), 42-47, 2004
3. Giacomelli L1, Derchi G et al. Surface Roughness of Commercial Composites after Different Polishing Protocols: An Analysis with Atomic Force Microscopy, 15(4), 191-4, 2010

各種表面処理による Ti 表面性状の変化と石灰化組織及びコラーゲン合成の変化について

02120320 松本奈緒

指導教員：南川元（細胞分子薬理学教室）

キーワード：Ti, 表面処理, 表面性状, 石灰化組織, コラーゲン

1. 緒言

インプラント表面処理は、表面性状を変化させることで、細胞の増殖や分化、配列等に影響し、osseointegrationの促進や骨形成およびコラーゲン合成に大きく関与することが知られている。それぞれの方法によって表面処理を行った場合の Ti 表面の形態、細胞の増殖などについて比較し深く学ぶことを目的として研究実習を行った。

2. 方法

3 本の論文を読みまとめた。

3. 結果

論文 1 の概要については次の通り。

未処理の Ti ディスクと硫酸と塩酸によって酸処理した Ti ディスクの 2 種類の Ti ディスクを用意し、それぞれの Ti ディスクの表面性状の観察と、それぞれの Ti ディスクにラットの骨芽細胞を培養し、細胞増殖、生成された石灰化組織の性状について評価した。Ti 表面性状について、酸処理を行った Ti 表面のほうが未処理の Ti 表面に比べて粗くなる。酸処理された Ti 表面では骨芽細胞の増殖は減少するが、コラーゲン合成の促進に関与する P4H 遺伝子発現は増え、コラーゲン合成は促進される。生成される石灰化組織についても、酸処理を行った Ti 表面に生成された石灰化組織のほうが硬さ、弾性力は大きくなった。

論文 2 の概要については次の通り。

未処理の Ti ディスク、硫酸によって酸処理した Ti ディスク、塩酸によって酸処理した Ti ディスクの 3 種類の Ti ディスクを用意し、それぞれの Ti ディスクの表面性状の観察と、それぞれの Ti ディスクにラットの線維芽細胞を培養し、細胞の形態、密度、Ti 表面に吸着したコラーゲンの量について評価した。表面粗さは硫酸処理>塩酸処理>未処理の順に粗くなった。表面粗さが大きい方が、線維芽細胞は Ti 表面に、広がらずに厚く点状に吸着し、細胞の増殖を減弱させた。Ti の表面性状によって細胞 1 個あたりのコラーゲン産生遺伝子マーカーの出現レベルに差はできなかったが、Ti 表面に吸着した細胞の密度は塩酸処理>硫酸処理>未処理の順に大きくなり、吸着したコラーゲンの量についても塩酸処理>硫酸処理>未処理の順に大きくなった。

論文 3 の概要については次の通り。

未処理の Ti ディスク、硫酸によって酸処理した Ti ディスク、5M の水酸化ナトリウムで AH 処理した Ti ディスク、10M の水酸化ナトリウムで AH 処理した Ti ディスクの 4

種類の Ti ディスクを用意し、それぞれの Ti ディスクの表面性状の観察と(図 1)、それぞれの Ti ディスクにラットの歯肉線維芽細胞を培養し、細胞の吸着、コラーゲンの合成、Ti 表面に吸着したコラーゲンの物理化学的強さを評価した。AH 処理による Ti 表面のスパイク構造や細孔、それらによってできるスポンジのような内部の構造ができることで細胞の接着やコラーゲンが Ti 表面とよく結合することができるようになった。また AH 処理によってできる Ti 表面の構造によって、コラーゲンがネットワークを作りながら堆積し歯周結合組織と同じような構造ができるため、Ti 表面から線維芽細胞ははがれにくくなった。

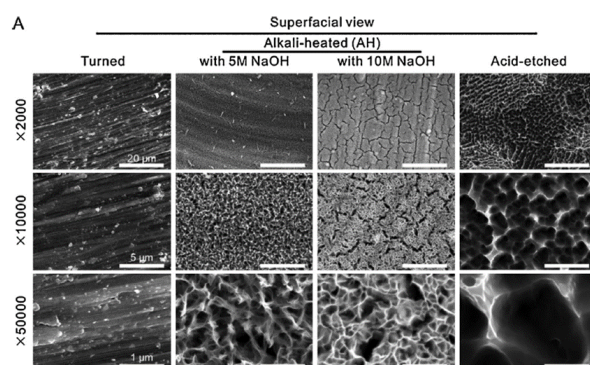


図 1. 左から、未処理、5M NaOH+AH 処理、10M NaOH+AH 処理、酸処理を行った Ti ディスクの SEM 画像標本。

4. 考察

表面処理の方法によって Ti 表面の性状は異なる。石灰化組織の性状については、酸処理を行った場合のほうが未処理の場合よりも硬さ、弾性力はともに大きくなる。コラーゲン合成能についてはいずれ表面処理を行った場合でも 1 個当たりの線維芽細胞のコラーゲン合成能は変わらないが、全体としてのコラーゲンの合成量は変化する。またコラーゲンの走行の違いから、インプラント体からのはがれにくさにも変化ができ、咬合力や炎症への耐力にも変化が現れることがわかった。

5. 参考文献

1. Takeuchi K, Saruwatari L et al. Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface, Journal of Biomedical Materials Research A, 72(3), 296-306, 2005
2. Att W, Yamada M et al. Effect of Titanium Surface Characteristics on the Behavior and Function of Oral Fibroblasts, The International journal of oral & maxillofacial implants 24(3), 419-431, 2010
3. Kato E, Sakurai K et al. Periodontal-like connective tissue attachment on titanium surface with nano-ordered spikes and pores created by alkali-heat treatment Dental, Materials, 31(5), 116 -130, 2015

暗算作業効率に及ぼすコーヒーとスイーツの効果
 02124011 里村 美来生
 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、コーヒー、スイーツ

1. 緒言

過去の研究実習においてコーヒーと食品の摂取で暗算作業効率の向上が認められた場合と認められなかった場合があった。そこで、今回、内田クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として、コーヒーとスイーツの摂取後の短時間における精神疲労の回復効果について検討した。

2. 材料と方法

健康な被験者 A、B および C 三名に、飲料等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。検査は三名を二組に分け、一方が監督者、もう一方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（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）との間に飲料等を摂取した。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ことを示している。この摂取前後の暗算作業効率の変化からそれぞれ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。

飲料としてコーヒー（140ml：チモトコーヒー）、スイーツとしてロールケーキ 1/3 個（パールモンドール）を用いた。



図 1 内田クレペリン検査用紙

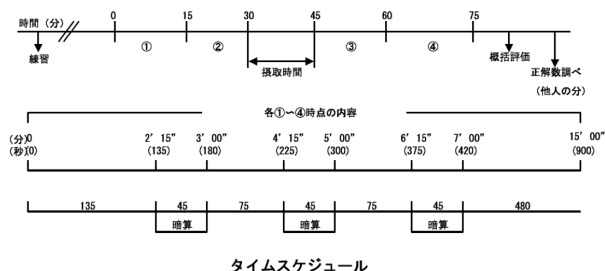


図 2 測定のタイムスケジュール

3. 結果

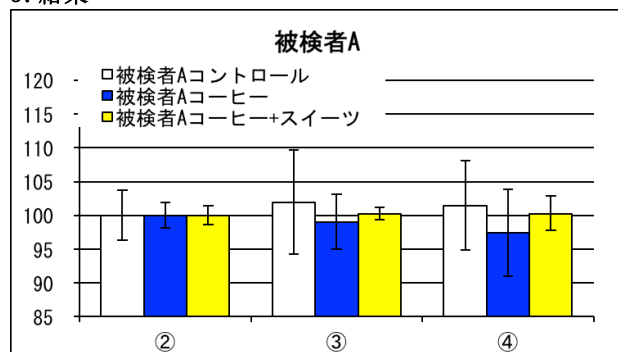


図 3 被検者 A の結果

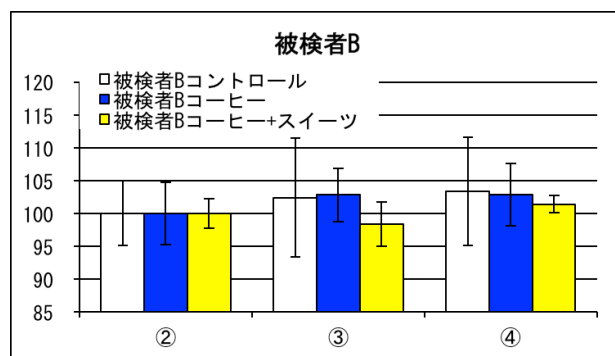


図 4 被検者 B の結果

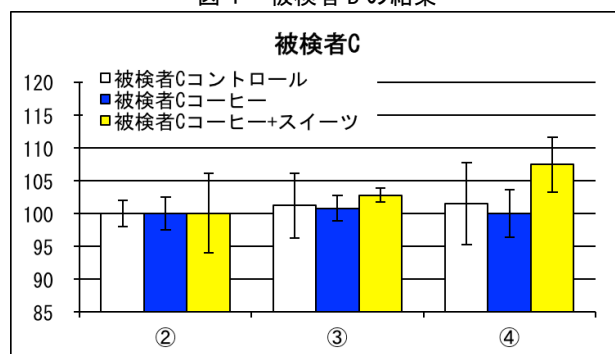


図 5 被検者 C の結果

コーヒー摂取後、被験者 A、B および C 共に 5 % 以上の暗算作業効率の上昇が認められなかった。また、コーヒーとロールケーキを摂取した場合、被験者 C のみで作業効率の向上が認められた。

4. 考察

過去の研究実習によると、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報告しているが、今回は認めなかった。これは、被験者三名はコーヒーなどのカフェイン含有飲料を好み、普段より摂取していることが影響している可能性がある。

コーヒーと同時に摂取する食品（スイーツ）による効果を検討すると、被験者 C のみで作業効率の向上が認められた。被験者三名にとって食品は好みの味であり、おいしかったのであるが、その効果は分かれた。被験者 C は、コーヒーと食品を摂取することで気分をリフレッシュすることができ、その結果、精神活動が刺激され、暗算作業効率の向上が認められた可能性があるが、摂取後 30 分経過した第 4 時点でのみの効果であるので、スイーツに含まれる糖（グルコース）による効果の可能性もある。今回の結果だけでは明確にはならない。被験者 A および B においては、そのような効果が認められなかった。

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、被験者も三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方法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。

暗算作業効率に及ぼすお茶とおかきの効果
 02124038 高瀬 雅彩
 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、休憩時間、リフレッシュ

1. 緒言

過去の研究実習において、休憩時間の過ごし方により、暗算作業効率の向上が認められた場合と認められなかった場合があった。そこで本実験では、内田クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として、休憩時間の過ごし方による精神疲労の回復効果について検討した。

2. 材料と方法

健康な被験者 A、B および C 三名に、飲料等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。検査は三名を二組に分け、一方が監督者、もう一方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（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）との間に飲料等を摂取した。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ことを示している。この摂取前後の暗算作業効率の変化からそれぞれ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。

飲料として緑茶（140ml：宇治園 香りの緑茶パック）、食品としておかき 3 個（岩塚製菓 田舎のおかき）を用いた。



図 1 内田クレペリン検査用紙

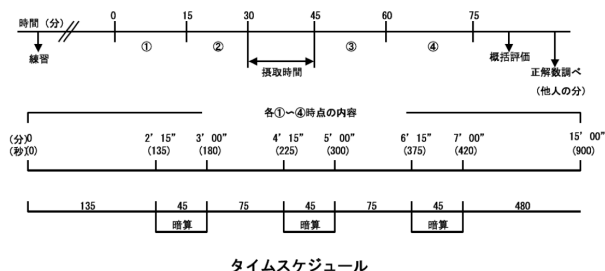


図 2 測定のタイムスケジュール

3. 結果

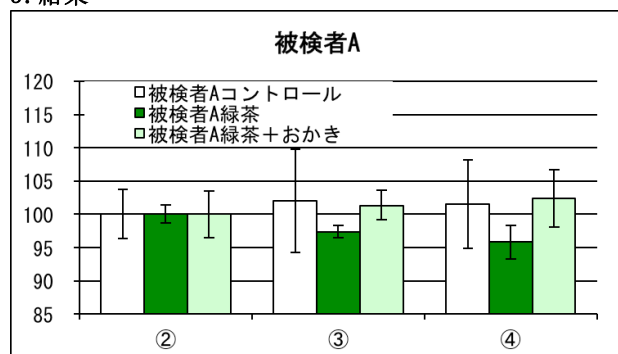


図 3 被検者 A の結果

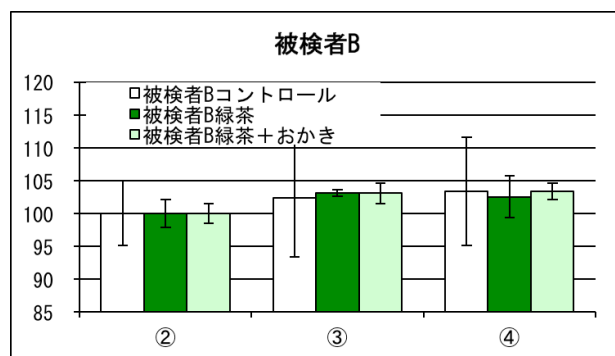


図 4 被検者 B の結果

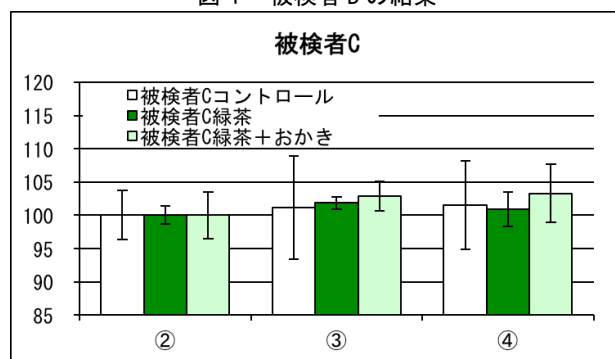


図 5 被検者 C の結果

緑茶摂取後、被験者 A、B および C 共に 5 % 以上の暗算作業効率の上昇は認められなかった。また、緑茶とおかきを摂取した場合も認められなかった。しかし、被験者三名共に、お茶およびお茶・おかきによるリフレッシュ効果が得られたと回答した。

4. 考察

過去の研究実習によると、休憩時間にリフレッシュすることで、暗算作業効率を向上すると報告しているが、今回、休憩時間にお茶の摂取およびお茶・おかきの摂取による暗算作業効率向上の効果は認めなかった。

緑茶にはカフェインが含まれているが、その量はコーヒーより少ない。里村の報告において、被験者三名にはカフェインの効果が認められなかった。また、おかき摂取の際に咀嚼を必要とし、過去の研究実習において、咀嚼が暗算作業効率を向上する報告もあるが、今回は認められなかった。被験者三名共に、おかきは好みの味であり、リフレッシュ効果が得られたと回答したが、暗算作業効率の向上には至らなかった。

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、被験者も三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、休憩時間にお茶やおかきを摂取してリフレッシュ効果が得られた場合でも、作業効率の向上が期待できない場合があることが示唆された。

参考文献

- 1) 田中千賀子、加藤隆一 編集：NEW 薬理学 改訂第 6 版. 南山堂，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.

各種飲料の暗算作業効率に及ぼす効果

02124039 高田 ひかる

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

休憩時間には様々な飲料を摂取するが、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。そこで今回、内田クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として、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、B および C 三名に、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。検査は三名を二組に分け、一方が監督者、もう一方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（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）との間に飲料を摂取した。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を示している。この摂取前後の暗算作業効率の変化から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。

飲料としてコーヒー（140ml:チモトコーヒー）、紅茶（140ml:リプトン）、リボビタミンゴールド N（50ml:大正製薬第 2 類医薬品）、レッドブル（185ml）、コカコーラゼロ（140ml）、経口補水液 OS-1（140ml:大塚製薬）を用いた。



7 6 9 3 4 0 6 3 8 6 7 5 9 8 5 6 3
3 8 5 9 8 7 6 5 4 9 6 8 3 7
8 7 4 9 8 4 7 3 8 5 9 8 5 6
4 7 8 6 5 3 9 5 8 4 5 6 7 9
8 3 5 9 4 8 7 5 3 8 4 5 8 7

図 1 内田クレペリン検査用紙

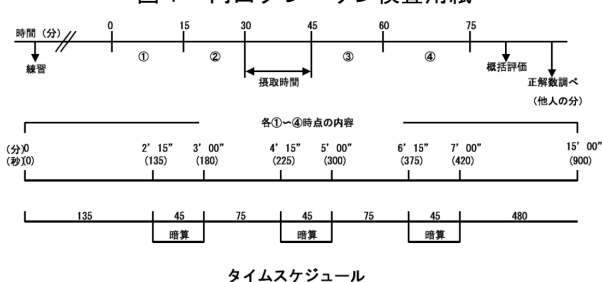


図 2 測定のタイムスケジュール

3. 結果

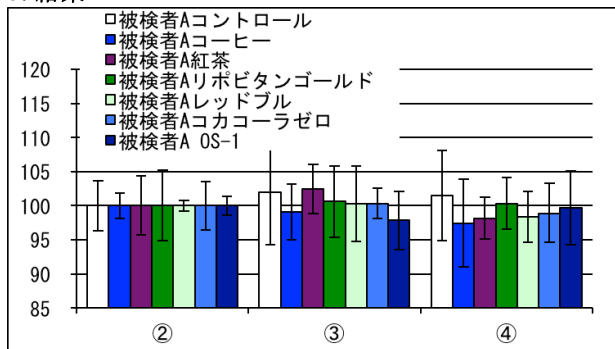


図 3 被験者 A の結果

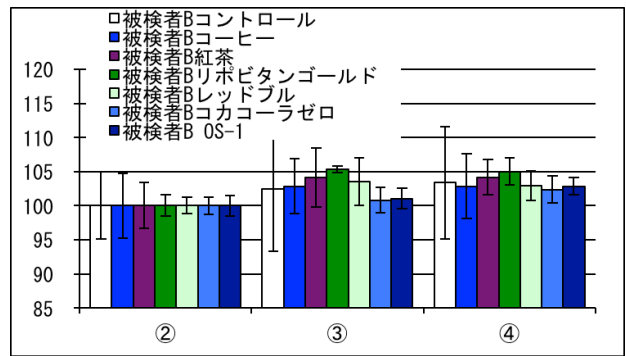


図 4 被験者 B の結果

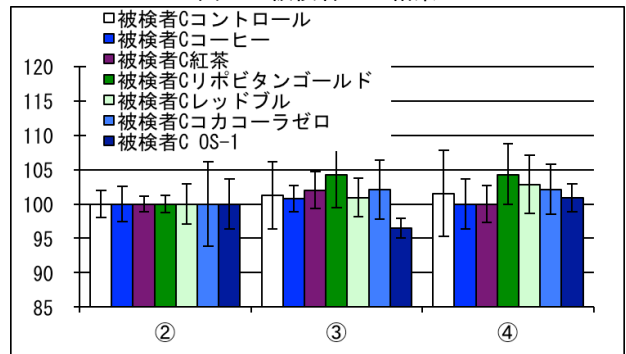


図 5 被験者 C の結果

被験者三名においては、コントロールと比較して、いずれも暗算作業効率の向上が認められなかった（図 3-5）。

4. 考察

経口補水液 OS-1 以外の飲料にはカフェインが含まれている。今回の被験者三名はカフェイン含有飲料を好み、普段より摂取しているためか、カフェインによる暗算作業効率の向上は認めなかった。また、経口補水液 OS-1 以外の飲料は好みの味であったが効果は認められなかった。さらに、休憩時間に飲料を摂取するというリフレッシュ効果においても効果は認められなかった。従って、カフェイン、嗜好、リフレッシュ効果が必ずしも暗算作業効率の向上を認めないことが示唆された。

リボビタミンゴールド N はカフェイン、タウリン含有の第 2 類医薬品で、過去の研究実習においては効果が認められたが、今回は認められなかった。この結果はカフェイン、タウリン含有であっても、被験者によっては効果を認めないことが示唆された。

今回の結果は、プラセボを用いた二重盲検試験ではなく、また、被験者も三名であることから一般的な効果を示すことはできないが、通常のカフェイン含有飲料を休憩時間に摂取しても被験者によっては作業効率の向上は期待できないことが示唆された。

参考文献

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