

北海道大学歯学部 6 年生

4 7 期生（平成 2 9 / 3 0 年度）

研究実習報告集

[第 19 号]

Research Training Reports

Hokkaido University School of Dental Medicine

北海道大学歯学部 47 期生研究実習の概要

研究実習実施期間

平成 29 年 8 月～平成 30 年 7 月（5 年次 2 学期～6 年次 1 学期）

研究実習発表会

平成 30 年 6 月 15 日（金），22 日（金）

実 施 組 織

歯学部長	横山 敦郎（口腔機能補綴学教室）	H29 年度
	八若 保孝（小児・障害者歯科学教室）	H30 年度
研究実習連絡会委員長	田村 正人（口腔分子生化学教室）	
研究実習連絡会委員		
高橋 茂	（口腔機能解剖学教室）	
長谷川 智香	（硬組織発生生物学教室）	
前澤 仁志	（口腔生理学教室）	
佐藤 真理	（口腔分子生化学教室）	
赤坂 司	（生体材料工学教室）	
東野 史裕	（血管生物分子病理学教室）	
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】

大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

02134039 奈邊 祐加（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

02134036 高際 友里（指導教員：土門 卓文）

エタノール浸漬固定における固定時間が組織標本に与える影響

02134024 大澤 杏子（指導教員：高橋 茂）

優れた組織標本作製のための適切なホルマリン固定時間について

02134030 佐久間 柚衣（指導教員：高橋 茂）

北海道縄文人とオホーツク人、現代日本人における年齢区分別、現在歯数と齲蝕歯数の比較

02131005 高木 満知子（指導教員：森田 航）

上顎中切歯輪郭と顔輪郭の相関性

02120234 山本 梨絵（指導教員：森田 航）

【口腔生理学教室】

視覚情報が開口量の調節に及ぼす影響

02134015 西潟 健太（指導教員：舩橋 誠）

舌随意運動時における20Hz帯域の律動性脳活動の変化

02134003 梅本 健太（指導教員：前澤 仁志、舩橋 誠）

噛みしめによる運動能力の向上について

02134009 阪田 哲郎（指導教員：舩橋 誠）

舌の味覚地図の起源に関する考察

02134014 檜舘 洋佑（指導教員：舩橋 誠）

塩分摂取量が人体に与える影響

02124028 山田 大志（指導教員：舩橋 誠）

【硬組織発生物理学教室】

副甲状腺ホルモン(PTH)間歇投与の投与頻度の違いによる長管骨の組織学的変化

02134019 萩野谷 大（指導教員：網塚 憲生、長谷川 智香）

モデリング部位における骨-血管連関による骨芽細胞活性化の可能性

02134016 阿部 未来（指導教員：網塚 憲生、長谷川 智香）

下顎中切歯と側切歯の根管形態について

02134007 柿崎 周斗（指導教員：山本 恒之）

上顎側切歯の根管形態について

02134013 中村 健人（指導教員：山本 恒之）

下顎第一大臼歯近心根の根管形態について

02134027 本田 竹志（指導教員：山本 恒之）

下顎第二大臼歯の根管形態について

02134029 室谷 智哉（指導教員：山本 恒之）

【口腔分子生化学教室】

ヒトの骨や歯におけるプロテオグリカン及びグリコサミノグリカンについて

02124005 兼子 裕史（指導教員：田村 正人）

顎骨壊死と関節リウマチの関連性

02124013 白川 輝（指導教員：田村 正人）

歯周病におけるアトルバスタチンの効果

02124026 三島 悠豊（指導教員：田村 正人）

閉経後女性を対象としたビタミンDと歯周病との相関についての研究

02124034 岸本 紗季（指導教員：田村 正人）

歯周病と糖尿病の関連性について

02134008 加藤 大貴（指導教員：佐藤 真理）

歯周治療が血糖コントロールに与える影響について

02134034 柴田 真友子（指導教員：佐藤 真理）

幹細胞に基づく歯および歯周組織再生について

02130991 井嶋 翔吾（指導教員：田村-辻 潔美）

炎症性歯髄組織に由来する自己幹細胞移植によるヒト歯槽骨欠損の修復について

02134017 西田 章人（指導教員：田村-辻 潔美）

【生体材料工学教室】

毛細管現象によるゼラチンピラーの自己組織化を利用した細胞足場材料の作製

02134002 石井 佑介（指導教員：赤坂 司）

マイクロ・ナノパターン上での血小板付着について

02124037 齊藤 紫（指導教員：赤坂 司）

各種薬剤を用いた根管壁の洗浄効果

02134043 山口 なつき（指導教員：八若 保孝、吉田 靖弘）

マイクロナノパターン上での破骨細胞分化誘導について

02134037 遠山 晏梨（指導教員：玉井 美保、赤坂 司）

代替甘味料の効果的な使用による齲蝕リスク低減を目指した菓子作製

02130961 吉川 公輝（指導教員：阿部 薫明）

う蝕リスクを軽減する菓子の作製

02134018 玉田 麦（指導教員：阿部 薫明）

【血管生物分子病理学教室】

高転移性腫瘍エクソソーム miRNA による血管バリア破壊と転移促進の可能性

02134040 早川 美奈子（指導教員：間石 奈湖 樋田 京子）

破骨細胞分化時の HuR タンパクの局在変化

02124020 手代木 孝仁（指導教員：東野 史裕 松田 彩）

熱刺激による HuR のがん細胞内の局在

02134041 堀井 彩夏（指導教員：松田 彩、東野 史裕）

腫瘍細胞の2次元培養と3次元培養における増殖様式と増殖速度の研究

02134021 橋爪 孝介（指導教員：北村 哲也）

扁平上皮癌の頸部リンパ節転移における細菌の同定

02134011 櫻岡 直也（指導教員：北村 哲也）

口腔内液状検体細胞診における検体の安定性と染色の復元

02134004 遠藤 研人（指導教員：北村 哲也）

【口腔分子微生物学教室】

初期遺伝子 (E1, E4) はヒトアデノウイルスDNA複製に必須である

02134012 辻岡 義崇（指導教員：安田 元昭）

アデノウイルス構造タンパク質発現にはE4領域のorf3とorf6が必須である

02134028 中川 愛子（指導教員：安田 元昭）

持続的な*Candida albicans* 摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響について

02130637 中川 紗百合（指導教員：長谷部 晃）

*Candida albicans*の持続的な摂取が全身に及ぼす影響について

02134028 國井 理恵子（指導教員：長谷部 晃）

*Mycoplasma salivarium*由来リポペプチドFSL-1はマウスマクロファージの細胞質へ局在し

NLRP3インフラマソームの活性化を誘導する

02130896 林 拓哉（指導教員：佐伯 歩）

*Mycoplasma salivarium*由来リポペプチドFSL-1はマクロファージの細胞質へ局在し

NLRP3/ASC speckの形成を誘導する

02134023 福本 哲也（指導教員：佐伯 歩）

【細胞分子薬理学教室】

暗算作業効率に対するカフェインの効果

02134032 篠崎 保乃夏（指導教員：吉村 善隆）

暗算作業効率に対するエナジードリンクの効果

02134035 春藤 彩花（指導教員：吉村 善隆）

歯科修復材料に関連する諸性質の評価

02134025 船戸 佑基（指導教員：南川 元）

幼若永久歯の部分断髄症例における水酸化カルシウム、MTAセメント、バイオセラミックス
の比較

02134026 河端アリア（指導教員：南川 元）

根管拡大・根管洗浄の方法の違いにより得られる根管の清掃効果

02134033 吉田 理志（指導教員：南川 元）

大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究

02134039 奈邊 祐加

指導教員:土門卓文(口腔機能解剖学)

キーワード:大口蓋神経、口蓋棘

1. 諸言

口蓋領域は歯科臨床において義歯作成・調整等で日常診療の対象となる部位であり、口蓋神経、特に硬口蓋の知覚を支配する大口蓋神経の走行に関しては正確な解剖学的知識が求められる部位である。国島¹⁾は大口蓋神経の走行を4つに分類し、それらの出現頻度について報告している。この報告例をもとに中富²⁾は解剖体2体を、ジョン³⁾は解剖体4体を、今多⁴⁾は解剖体6体を、福士⁵⁾は解剖体8体を、鈴木は⁶⁾は解剖体11体を用いて大口蓋神経の走行について剖出・観察を行っている。しかしながら、これら観察数は決して十分なものではない。今回、著者は解剖体12体の左・右側24例を用いて口蓋領域を詳細に剖出し、大口蓋神経の走行について肉眼的に観察し、過去の報告と比較・検討を行った。

2. 方法

北海道大学大学院歯学研究科・口腔機能学講座・口腔機能解剖学教室に保管されていた解剖体12体(男性73歳、82歳、86歳、86歳、女性69歳、77歳、84歳、88歳、93歳、83歳、87歳、95歳)を用いて、大口蓋神経の走行について観察した。大口蓋神経は大口蓋孔を出た後、硬口蓋を前走する際に、大口蓋孔の前方にある口蓋棘(骨の隆起部分)によって2分されることが多い。今回、国島¹⁾の分類に従い、大口蓋神経の走行を1～4型に分類した。

3. 結果

大口蓋神経の走行に関して1型は6例、2型は3例、3型は8例、4型は7例を示した。

4. 考察

大口蓋神経の走行について、国島¹⁾は男性・女性ともに左・右側において4型はほとんど観察されないと報告している。今回の結果では、4型に関しては24症例中7症例が観察された。またその他は1型から4型まで様々であった。この結果は男性・女性ともに国島¹⁾の報告とは異なる結果を示している。この要因の1つとして観察数が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4型の出現頻度について調査すべきと思われる。

本研究で観察した口蓋棘については記載している書籍は少なく、本邦では脇田・山下⁷⁾の「口腔解剖学」において記載されている。しかしながら、その中でも存在意義について記載はなく、口蓋棘に関しては不明な点が多い。口蓋棘は大口蓋神経が通る骨口蓋の口蓋溝に連続して上顎骨表面で棘状または稜状に隆起した形態を呈し、この溝の間を大口蓋神経が走行している。この形態は神経の両側を骨壁で保護する形になっている。これは上顎骨の眼窩下管、下顎骨の下顎管に類似する形態であることから、口蓋棘が咀嚼による外力から大口蓋神経を保護し、神経への障害を防ぐ役割をもつものと推測される。今後、口蓋棘の形態に関する詳細な報告も必要であろうと考えられる。将来の研究実習に期待したい。

5. 参考文献

- 1) 国島義郎. 口蓋神経の解剖学的研究. 歯科学報 58:1-13, 1958.
- 2) 中富貴大. 口蓋神経の走行に関する解剖学的研究. 北海道大学歯学部6年生 41期生(平成23/24年度)研究実習論文報告集 13:9-10, 2013.
- 3) ジョン ミギョン. 口蓋神経の走行に関する解剖学的研究. 北海道大学歯学部6年生 42期生(平成24/25年度)研究実習論文報告集 14:4-5, 2014.
- 4) 今多 将. 口蓋神経の走行に関する解剖学的研究. 北海道大学歯学部6年生 43期生(平成25/26年度)研究実習論文報告集 15:3, 2015.
- 5) 福士莉穂. 大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究. 北海道大学歯学部6年生 44期生(平成26/27年度)研究実習論文報告集 16:12, 2016.
- 6) 鈴木健一郎. 大口蓋神経の走行に関する解剖学的研究. 北海道大学歯学部6年生 45期生(平成27/28年度)研究実習論文報告集 17:3, 2017.
- 7) 脇田稔、山下靖雄 監修. 口腔解剖学, 医歯薬出版, 2009.

顔面動脈の屈曲と走行に関する形態学的研究

02134036 高際 友里

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、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⁾は顔面動脈の走行に関して4つに分類し、眼角部に達していないものが多いと報告している。これら顔面動脈の屈曲や走行について市川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、小島⁸⁾は12体を用いて観察しているが、その症例数は少なく不明な点が多く残っている。今回、著者は解剖体13体の左・右側26体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13体(男性73、82、86、86歳、女性69、77、79、83、84、87、88、93、95歳)の左・右側の頭頸部26体を観察した。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26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1例、軽屈型は3例、屈型は4例、強屈型は18例観察された。走行型では1型は9例、2型は14例、3型は3例観察された。

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26例中18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⁾、小島⁸⁾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9例、2型が14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⁾、小島⁸⁾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26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.
- 8) 小島 遥乃. 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 46期生(平成29年度)研究実習論文報告集 18:3, 2018.

エタノール浸漬固定における固定時間が組織標本に与える影響

02134024 大澤 杏子

指導教員：高橋 茂（口腔機能解剖学教室）

キーワード：固定、固定時間、エタノール、標本

1. 緒言

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¹⁾が、固定の過程が完全に解明されていないため、固定時間の設定には経験的要素が多い¹⁾。本研究は、固定液にエタノールを用いた場合、固定時間が組織標本に与える影響を明らかにすることを目的として行った。

2. 方法

ジエチルエーテルの過剰吸入により 7 週齢 Wistar 系雄性ラット 2 匹を安楽死させ、肝臓と顎下腺を摘出、100% エタノールに 1~24 時間浸漬し固定した。その後エタノールによる脱水、クロロホルムによる置換を行い、パラフィンに包埋した。各ブロックから切片を薄切して HE 染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

3. 結果

肝臓の 1~6 時間固定では、標本外層と内部とで、その状態が大きく異なっていた。外層は内部と比較して染色が濃く、構造が密であったのに対し、内部の染色は薄く、構造は疎で、肝細胞は索状構造をなさず個々に分離していた。特に標本中心部では、大きな空隙が多くみられた。中心静脈・小葉間動脈・小葉間静脈・小葉間胆管の壁と、それらを構成する細胞はほとんど崩壊していた。細胞の核はみられない部分が多かったが、観察されたものでも、その染色は薄かった。24 時間固定では、1~6 時間固定と比較すると、標本内部でこれらの影響は軽度であった。肝細胞の外形は比較的保たれており、核小体も観察された。一方、標本外層の組織は著しく不良であった。小葉間動脈・小葉間静脈・小葉間胆管の壁の構造は不明瞭であった。

顎下腺の 1 時間固定では、小葉間隙の拡大がみられた。線条部・介在部はそれぞれ強く収縮しており、特に標本中央部で収縮が強く、基底膜との間に空隙を生じていた。小葉間にみられる動脈・静脈壁は崩壊し、その中の赤血球も崩壊していた。腺房細胞は変形・収縮し、細胞質内の分泌顆粒は痕跡的であった。3~24 時間の固定では、1 時間固定と同様に小葉間隙の拡大、腺房細胞の変

形・収縮がみられたものの、その程度は軽度であった。標本内部の腺房細胞の境界は明瞭で、細胞質内には分泌顆粒が観察された。小葉間導管や小葉間動脈・静脈はその外形が比較的保たれていた。線条部では基底線条が観察される部分もあった。

以上の所見を表 1 にまとめた。

表 1：各固定時間における組織別の標本の評価

	肝臓	顎下腺
1 時間	×	×
3 時間	×	△
6 時間	×	△
24 時間	△	△

◎：良好 ○：やや良好 △：やや不良 ×：不良

4. 考察

本研究では、エタノール固定では形態良好な標本を得ることは困難であり、特に固定時間が短い場合、その傾向が顕著になる、という結果が得られた。この理由として、固定液の作用は主としてタンパク質に対するものでありエタノールはタンパク質に対して凝固作用を示すこと²⁾、その固定の機構は、組織内の遊離または結合水の分子がエタノールによって置換され組織が脱水されることにある²⁾ことが挙げられる。このため、固定時間が肝臓では 6 時間以下、顎下腺では 1 時間以下であると組織細胞を構成するタンパク質が十分に凝固されず、また、組織内の水分子が十分に脱水されなかったため、標本作製する過程で細胞が破壊され、このような結果が得られたと考えられる。また今回、肝臓と顎下腺で、同じ固定時間であっても標本の状態に差があり、顎下腺の方が、肝臓と比較して組織構造がやや良好に保たれていた。この理由として、顎下腺が周囲を結合組織に覆われていることや、顎下腺が、腺房が集合する構造をしており、肝臓と比べ固定液と直に接する面積が大きいことが挙げられる。固定時間を 24 時間以上にすることで組織構造を保持することが可能になると考えられる。

5. 参考文献

- 1) 渡辺 陽之輔, 坂口 弘, 細田 泰弘, 病理組織標本の作り方 第 6 版, 医学書院, 12 1986
- 2) 山田 和順, 組織化学 初心者のための基礎と実際, 南江堂, 25-30 1987

優れた組織標本作製のための適切なホルマリン固定時間について

02134030 佐久間 柚衣

指導教員：高橋 茂(口腔機能解剖学教室)

1. 緒言

固定は一般的に各組織成分の形態学的構造を良好な状態に保つことを第一の目的としているが、現在固定の過程が完全に解明されていないため、様々な固定液や固定方が考案されている¹⁾。本研究では固定液に 10%中性緩衝ホルマリンを使用した場合における、優れた組織標本作製のための適切な固定時間を明らかにすることを目的として行った。

2. 方法

7 週齢の Wistar 系雄性ラット 2 匹をエーテルにて安楽死させ、肝と顎下腺を摘出した。摘出後、それらを 10% 中性緩衝ホルマリンに 1 時間、3 時間、6 時間、24 時間の 4 パターンで浸漬固定した。以後、通法に従って HE 染色標本作製し、光学顕微鏡で観察した。

3. 結果

肝臓の 1 時間固定では標本の外層の一部とそれ以外で違いがみられた。外層の一部でみられる肝細胞は細胞質がエオジンに濃染し、細胞境界が不明瞭であった。外層の一部以外でもさらに中心静脈周辺とそれ以外で組織像に差がみられた。中心静脈周辺では類洞の拡張が観察された。中心静脈周辺以外では核周囲に空隙が認められる肝細胞が多く観察できた。また核の形態が不明瞭な肝細胞がみられ、核の存在自体がはっきりとしないものもみられた。三つ組みの構造は観察できるが収縮が強く、周辺組織との間に大きな空隙を生じていた。3 時間では標本外層と内部で差はほとんどみられなかった。中心静脈周辺では核周囲に空隙が認められる肝細胞や類洞が拡張しているものがほとんどみられず中心静脈周辺以外でも形態不良なものが減り正常に近い組織像も多少観察できた。6 時間や 24 時間では、全体的に形態は良好で、組織の収縮もほとんどみられず、正常に近い組織像となった。

顎下腺の 1 時間固定では外層と内部で組織像の差がみられた。内部の漿液性細胞では細胞内に空隙が認められ、分泌顆粒は消失するなど形態不良であった。小葉内の線条部や介在部の収縮、小葉自体の収縮もみられ周囲組織

との間に空隙が生じていた。外層では内部より細胞の形態も良好で小葉や小葉内の線条部や介在部の収縮はあまりみられなかった。3 時間では、内部と外層の差は 1 時間より軽度であったが、標本内部にみられる導管では収縮していたり、形態を保っていないものが認められた。6 時間や 24 時間では全体的に均一な組織像を呈しており、形態良好な組織像であった。

以上の結果を表 1 にまとめた。

表 1：染色時間による組織像の状態

	肝臓	顎下腺
1 時間	×	△
3 時間	△	○
6 時間	○	◎
24 時間	○	◎

◎：良好 ○：やや良好 △：やや不良 ×：不良

4. 考察

本研究ではホルマリン浸漬固定においては、固定時間が長いほど形態良好な標本が得られることが明らかとなった。ホルマリンは組織細胞を構成する主要素であるタンパク質に対して付加ないし縮合反応してタンパク質を不動化することで固定する固定液である²⁾。ホルマリンは組織中へ浸透し、拡散することにより固定効果を発揮する²⁾。ホルマリンの浸漬、拡散のためにある程度の時間が必要であることから、固定時間が長いほうが形態良好な標本が得られたのではないかと考えられる。このことは固定時間が短い場合、標本の外層と内部に差が生じ、外層のほうが形態良好であったこととも関係しているであろう。

5. 参考文献

- 1) 渡辺 陽之輔, 坂口 弘, 細田 泰弘 病理組織標本の作り方 第 6 版, 医学書院, 12 1986
- 2) 山田 和順, 組織化学 初心者のための基礎と実際, 南江堂, 25-36 1987

北海道縄文人とオホーツク人、現代日本人における年齢区分別、現在歯数と齶蝕歯数の比較

02131005 高木 満知子

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、年齢、ベイズ推定、現在歯数

1. 緒言

現代日本人と生活様式の異なる北海道縄文人やオホーツク人では加齢による現在歯数や齶蝕歯数の変化に差異はあるのかを明らかにするため、本研究を行った。

2. 方法

縄文人 7 体、オホーツク人 77 体の頭蓋骨を用いた。年齢は Sakaue(2015)の方法¹⁾に従い、頭蓋縫合の癒合度合いをスコアリングしベイズ推定により求めた。現在歯数と齶蝕歯数は Buikstra and Ubelaker(1994)の方法²⁾に従ってスコアリングを行った。各年齢区分における現在歯数と齶蝕歯数はフィッシャーの正確確率検定によって、各集団の年齢と歯数の相関関係はピアソンの積率相関分析によって評価した。比較対象の現代日本人のデータとして平成 28 年度歯科疾患実態調査の結果を用いた。

3. 結果

表 1：北海道縄文人とオホーツク人の推定年齢

年齢(歳)	北海道縄文人	オホーツク人
20-24	2	11
25-29	0	9
30-34	2	10
35-39	1	5
40-44	2	10
45-49	0	13
50-54	0	10
55-59	0	1
60-64	0	2
65-69	0	2
over70	0	4
合計	7	77

表 1 に北海道縄文人とオホーツク人の推定された年齢とその人数を示す。

現在歯数について、北海道縄文人とオホーツク人では 30 代で北海道縄文人の方が有意に少なかった。現代人とオホーツク人では 20 代後半、30 代前半、40 代前半、50 代でオホーツク人の方が有意に少なく、60 代後半では現代日本人の方が有意に少なかった。北海道縄文人と現代日

本人では 20 代前半、30 代で北海道縄文人の方が有意に少なかった。

年齢と現在歯数の相関関係は現代日本人では有意水準 1%において高い負の相関が認められたが、北海道縄文人とオホーツク人ではほぼ相関が認められなかった。

齶蝕歯数はすべての年代で現代日本人より北海道縄文人とオホーツク人が有意に少なかった。

4. 考察

現在歯数では多くの年代において現代日本人より北海道縄文人、オホーツク人の方が有意に少ない傾向にあるといえる。原因として、ブラッシングを行わず、歯を道具として用いていたために重度の歯周病だったと考えられることや歯の治療方法が未発達だったことが推測される。

齶蝕歯数でも北海道縄文人とオホーツク人の方が有意に少なく、糖質の少ない食べ物や速い咬耗の進行などがこの違いをもたらしたと考えられる。

北海道縄文人やオホーツク人の年齢と現在歯数にはほぼ相関関係が認められなかったが、原因として歯の本数が影響を及ぼすと考えられにくいけがや感染症などで死亡する確率が高かったことが考えられ、この時代の厳しい生活環境が示唆された。

5. 参考文献

- 1) Kazuhiro Sakaue, A Bayesian approach to age estimation from cranial suture closure in Japanese people. Bulletin of National Science Museum Series D ,41,pp.1-11(2015)
- 2) Standards for data collection from human skeletal remains. Arkansas Archeological Survey Research Series No.44, Buikstra J.E, Ubelaker D.H, p48-49, p54-55, (1994) Arkansas Archeological Survey, Fayetteville, Arkansas

上顎中切歯輪郭と顔輪郭の相関性

02120234 山本梨絵

指導教員：森田航(口腔機能解剖学教室)

キーワード：中切歯、顔の輪郭、Partial Least Square 解析、楕円フーリエ解析、

1. 緒言

超高齢化社会である日本では高齢者の数に付随し義歯を使用する人も増加する。そこで、人工歯の形態を選択する際に様々な要素の一つとして上顎中切歯の形態と顔の輪郭の相関性を調べることを目的とした。

2. 方法

撮影距離と地面からの角度を一定にした条件下で撮影した同一人物の顔と上顎左側中切歯の写真36人分を用いた。画像上でランドマークをデジタイズし、楕円フーリエ解析により定量化する⁽¹⁾。Partial Least Square (PLS) 解析を用いて顔の輪郭と中切歯の輪郭との相関を求めた。PLS スコアから逆フーリエ変換を用いて相関の高い形状変化を可視化した⁽²⁾。

3. 結果

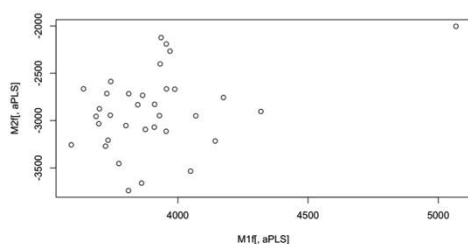


図1：PLS1スコアのプロット。X軸(M1f)：中切歯のPLS1スコア、Y軸(M2f)：顔の輪郭のPLS1スコア。

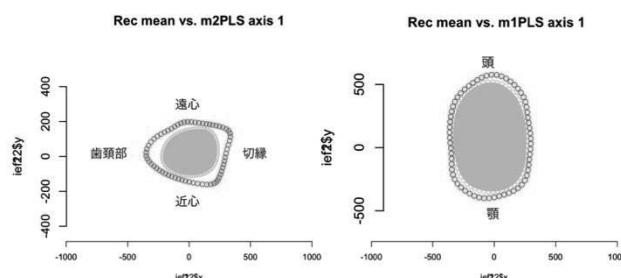


図2：PLS1スコアの正の方向への形状変化。(左)中切歯、(右)顔。灰色の形状が平均形状を表し、赤色の線で示される形状が平均形状から1標準偏差動かした変化後を再構成したものである。

中切歯と顔の輪郭の相関を表すRV相関係数は0.12、ブートストラップ法により算出したp値は0.087であった。図1に示したPLS1軸に沿った形状変化を見ると、中切歯は歯頸部から切縁方向に長くなり(図2左)、それに相関して顔の輪郭はわずかに長軸方向に長くなることが示された(図2右)。

4. 考察

有意水準5%で考えた場合、今回の調査は統計学的に有意とは言えず、歯と顔の形状変化の仕方に相関があるとは言えない。だが今回はサンプル数が40弱と少なかった事もあり、一概に今回の結果だけで顔と歯の形状に相関がないとは断言できず、より大規模なデータを用いた解析と検証が必要と考える。

5. 参考文献

- (1)Morphometrics with R Authors: Claude, Julien . chapter 5 (2018)
- (2)Iwata, H. and Y. Ukai SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. Journal of Heredity 93: 384-385. (2002)

視覚情報が開口量の調節に及ぼす影響

02134015 西潟 健太

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：視覚、開口量

1. 諸言

食事や会話をする際、開閉口運動の多くは無意識にコントロールされていると考え、これらの運動が日常的にどのように調節されているのかを明らかにしたいと思った。特に、「開口運動」と「視覚情報」の関係性に興味を持ち、視覚情報によってダイナミックに変化することが予想された開口量に注目し、「開口量と視覚情報」の関連を明らかにすることを目的として研究を行った。

2. 方法

健康な成人 4 名(男性 1 名、女性 3 名、21～26 才)を被験者とした。立方状ゼリー(5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33mm 四方、各 8 個)を竹串に刺した状態で被験者の利き手に手渡し、自由に開口、咀嚼、嚥下をさせた。異なる大きさのゼリーを乱数表に従いランダムに提示した。一連のゼリー摂取の動作を側方からビデオ撮影し、映像を解析してゼリー挿入時の開口量を計測した(実験 1)。

次に、視覚情報を無くすために被験者に目隠しをさせた。この状態で、ゼリーのサイズを口頭で伝えて、9, 15, 21mm 四方のゼリーを用いて上記と同様の課題を行わせ、ゼリーが口唇に接触する直前の開口量を計測した(実験 2)。

各実験の開口量は 8 回の試行の平均値とした。

3. 結果

実験 1 より、視覚情報がある場合、ゼリーのサイズ増加に伴い、平均開口量が増加する傾向を認めた(図 1)。

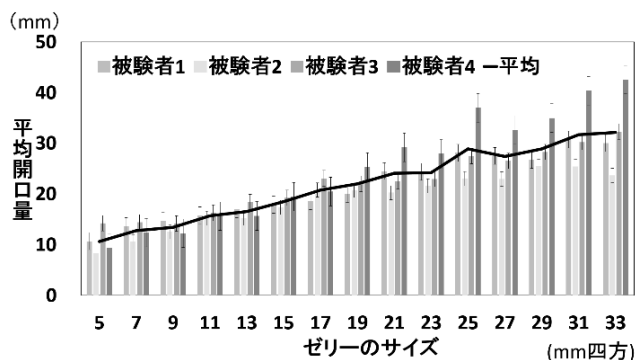


図 1：視覚情報ありの場合の平均開口量

実験 2 より、視覚情報なしの場合は、視覚情報がある場合よりも著しく開口量が減少した(図 2)。また、ゼリーを口に運び始めてから口唇に接触するまでの間は、開口量が食物の大きさよりも小さく、口唇に接触すると開口量を増加させ、口腔内へ挿入している試行が観察された。

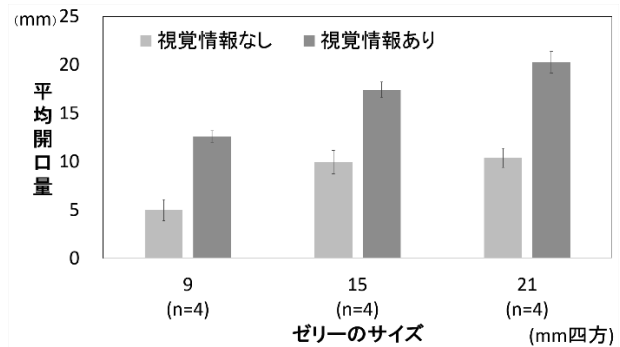


図 2：視覚情報の有無を比較したときの平均開口量

4. 考察

実験 1 の結果より、ヒトは視覚情報によって食物の大きさを認識し、その認識した食物の大きさに合わせて開口量を調節していると考えられる。

実験 2 の結果より、聴覚情報によって開口量をある程度調節していることは明らかとなった。しかし、聴覚情報を介した場合の開口量は、視覚情報を介した場合のものと比較して明らかに小さかった。また、食物を口に運び始めてから口唇に接触するまでの間は、それが食物の大きさよりも小さい試行を観察していた。したがって、食物の大きさに調和した開口量の決定において、聴覚情報による食物の大きさの認識と比較して、視覚情報による食物の大きさの認識は、より重要であると考えられる。

今回、実験 1 において、食物を見たときにそれが何ミリメートルだと想像するのか、実験 2 において、食物の大きさを聞いたときにそれがどれくらいの大きさだと想像するのか、について検討していなかった。したがって、今後、これらを明らかにしていきたい。

また、本実験では、 $n=4$ 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) 桑原隆男, 高島史男, 他 2 名, 各種食品が咀嚼運動に及ぼす影響に関する臨床的研究, 補綴誌, J Jpn Prosthodont Soc, 31, 661～674, 1987.
- 2) ダエット, デメトリオ G, 食品の大きさと硬さが開口量ならびに咀嚼筋活動量に及ぼす影響, 補綴誌, J Jpn Prosthodont Soc, 40, 489～500, 1996.
- 3) 瑞森崇弘, 桑原隆男, 他 3 名, 咀嚼運動に関する臨床的研究—食品の大きさ・固さの影響について—, 補綴誌, J Jpn Prosthodont Soc, 30:806～816, 1986.
- 4) 河野正司, 荒井良明, 他 4 名, 食物取り込み時の食物の大きさが開口量と頭部運動量に与える影響, 顎機能誌, J. Jpn. Soc. Stomateognath. Funct. 8, 17-2, 2001.

舌随意運動時における 20Hz 帯域の律動性脳活動の変化

02134003 梅本 健太

指導教員：前澤 仁志，船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：事象関連同期化，事象関連脱同期化，脳磁図

1. 緒言

脳磁図(magnetencephalogram, MEG)は大脳皮質の神経活動に伴って発生する磁場活動を計測する手法である。被験者に任意の運動タスクを行わせた時の脳磁図を計測すると、任意の周波数帯域においてタスクに関連した律動性脳磁界が記録され、これを筋電図から判定される筋活動のタイミングと合わせて分析することによって、タスクの違いによる感覚運動野における脳活動の変化を解析することができる。本研究は、舌の随意運動時における脳磁図計測を行い、特に 20Hz 帯域の律動性脳活動を明らかにすることを目的として行った。

2. 方法

健康成人 5 名(男性 4 名，女性 1 名，年齢 20～38 才)を被験者として，全頭型脳磁図計測装置 (VectorView, Neuromag, Finland) を用いて計測した。舌運動開始時点を決めるため，舌筋筋電図を同時計測した。また，アーチファクトの影響を除外するため，眼電図と側頭筋の筋電図も同時に計測した。運動のタスクは，10 秒に 1 回の舌前方突出運動とし，10 分間の計測を計 4 回行った。計測条件はサンプリング周波数を 600 Hz，バンドパスフィルターを 0.03-200 Hz とした。ERS, ERD 解析の方法は過去の文献^{1) 2)} に従い，18～23Hz 帯域の成分を抽出し，整流化した後，舌筋筋電図の開始時点トリガーに加算平均した。

3. 結果

すべての被験者において ERD が両側半球で認められた。ERS は左半球では 4 名で認められて，右半球では 3 名で認められた。左半球における ERD の潜時は， 296.3 ± 93.8 ms(平均±標準偏差)に認められ，平均振幅は 11.2 ± 1.5 fT/cm s(平均±標準偏差)であった。右半球における ERD は潜時 330.0 ± 111.4 ms に認められ，振幅は 10.7 ± 1.8 fT/cm であった。左半球における ERS は潜時 1557.9 ± 375.2 ms に認められ，振幅は 19.1 ± 3.9 fT/cm であった。右半球における ERS は潜時 1392.5 ± 334.4 ms に認められ，振幅は 19.4 ± 2.2 fT/cm であった。

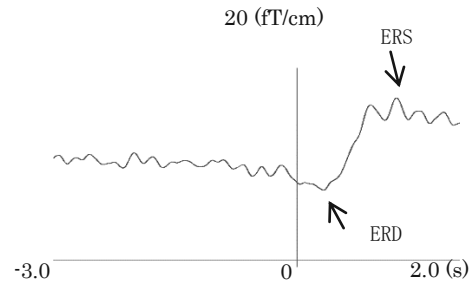


図 1 20Hz 帯域における律動性脳活動の変化

4. 考察

舌の随意運動には両側半球における大脳皮質律動波が出現することが明らかになった。示指の運動時には，対側半球優位に 20Hz 帯域の律動性脳活動が増幅する事象関連脱同期 (event-related desynchronization, ERD) や減衰する事象関連同期 (event-related synchronization, ERS) が認められる³⁾。このような 20Hz 帯域の ERD/ERS は感覚運動野における興奮性や抑制性の指標として用いられている⁴⁾。本研究で観察された舌随意運動による 20Hz 帯域の律動性脳活動の変調(図 1)は，示指の運動時に見られた ERD と ERS と同様の変化であり，指運動と舌運動において共通の脳活動変化が関与していることが示唆された。

5. 参考文献

- 1) Ayako Ichikawa, Haruka Yamamoto *et al.* Stimulus-related 20-Hz activity of human cortex modulated by the way of presenting hand action. *Neuroscience Research*. 58, 285-290, 2007.
- 2) Riita Salmelin, Riita Hari. Spatiotemporal characteristics of sensorimotor neuromagnetic rhythms related to thumb movement. *Neuroscience*. 60, 537-550, 1994.
- 3) Nagamine T, Kajola M, *et al.* Movement-related slow cortical magnetic fields and changes of spontaneous MEG- and EEG-brain rhythm. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology*. 99, 274-286, 1996.
- 4) Takahiro Kinai, Jun Matsubayashi *et al.* Modulation of stimulus-induced 20-Hz activity during lower extremity motor imagery. *Neuroscience Research*. 64, 335-337, 2009.

噛みしめによる運動能力の向上について

02134009 阪田 哲郎

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：噛みしめ、運動能力

1. 諸言

噛みしめにより握力や筋の等尺性収縮力が增大するという報告が多くされている。しかし、実際に筋力トレーニングを行う場合、噛みしめの状態には個人差がある。また、マウスピースを使用する場合でも、咬合の挙上量は様々である。そこで、本研究は噛みしめ時の咬合挙上量と運動能力との関連性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

健康成人 6 人（男性 4 名、女性 2 名、20～24 歳）を被験者とした。厚み 4.1mm の割り箸を前歯部または小臼歯部で噛ませることにより咬合挙上を行った。割り箸の本数と位置は、前歯部 1 本、前歯部 2 本、小臼歯部 1 本、小臼歯部 2 本の 4 種類とした。また、自身が噛んでないという状態を咬合挙上のない状態とした。各咬合挙上の条件下において、立ち幅跳びの飛距離とベンチプレスの挙上速度の測定をおこなった。ベンチプレスの重量は最大挙上重量の 80% の重量とした。統計学的解析については Tukey 法を用いて多重比較を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 結果

各咬合挙上の条件下における立ち幅跳びの平均飛距離を示す（図 1）。割り箸なしと比較して、割り箸前歯部 2 本、小臼歯部 1 および 2 本の場合に飛距離が伸びる傾向にあったが、統計学的な有意差は認められなかった。ベンチプレスの挙上速度については割り箸なしと比較して、割り箸前歯 1 本、割り箸小臼歯 2 本の場合に挙上速度が速くなる傾向がみられたが、統計学的な有意差は認められなかった（図 2）。

4. 考察

噛みしめることによって瞬発的な力を発揮することは先行研究の結果と一致しなかった。咬合挙上量に関しては統一することができたが、咬合力までコントロールすることができなかった点は改善の余地があると思われる。またベンチプレスの挙上速度で一番速かった挙上重量と、被験者が一番やりやすいと感じた挙上重量では必ずしも一致しなかったことから、被験者の普段からの慣れといった因子も関与しているのではないかと考えられた。今後は被験者のトレーニング状況等も精査して、咬合挙上が運動能力に与える影響について検討する必要があると感じた。

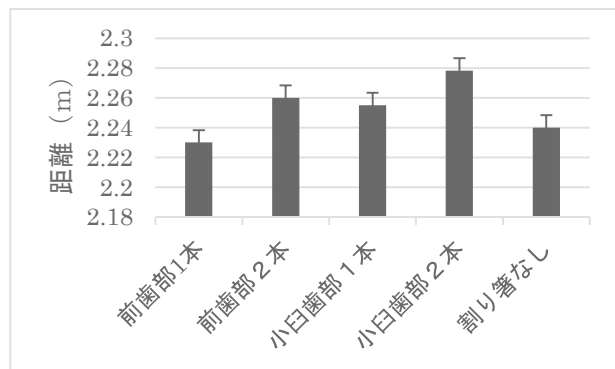


図 1. 各被験者の立ち幅跳び飛距離の平均値

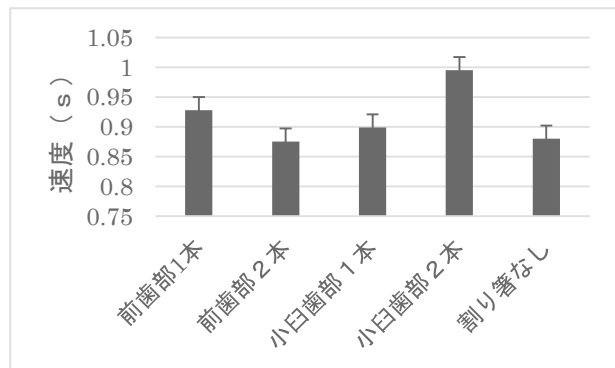


図 2. 各被験者のベンチプレス挙上速度の平均値

5. 参考文献

入門スポーツデンティスト [新たな歯科の挑戦], 竹内正敏・前田芳信, 84-94, 2003, 永末書店

舌の味覚地図の起源に関する考察

02134014 檜館洋佑

指導教員：船橋誠（口腔生理学教室）

キーワード：味覚地図

1. 緒言

基礎歯科生理学第 6 版 274 頁では「舌の感受性について、先端部で甘味を感じ、奥では苦味を感じるとする舌の味覚地図が一般的に知られているが、ヒトの基本味に対する閾値の測定実験では味覚感受性の顕著な舌部位差は報告されておらず、また各味覚受容体も舌の全領域にわたり発現がみられることから、現在では正しいものとは考えられていない。」¹⁾と記載されている。ではなぜその誤った説がかつて正しいものとされていたのか、ということに疑問を抱き研究を行うことにした。

2. 方法

舌の味覚地図の基となったとされる文献である、Hänig, D. P. の「Zur Psychophysik des Geschmackssinnes」を読み、研究の方法および結果を調査し、結論づける上で問題点がないかどうか調査した。

3. 結果

Hänig は 10%ショ糖、10%NaCl、0.2%HCl、0.1%塩酸キニーネ溶液を用いて、舌の味覚能力の空間的分布について実験を行っていた。その実験結果は、閾値に差はあるものの、甘味、塩味、酸味、苦味の全てにおいて舌全体に感受性が認められたことを示しており、また Hänig 自身も同様の要約を明記していた。

4. 考察

当初、私は味覚地図が正しいものであると広まった理由として、実験方法自体に問題点が挙げられたり、実験結果に対する考察が不十分であったりすることを予想していたが、その予想は大きく外れていた。むしろ、Hänig は現在正しいとされている、基本味に対して部位別に極端な感受性の差が存在するのではない、という説を当時から提唱していた。

以上のことから、私は味覚地図という誤った説が広まった理由として、論文の内容自体が誤って認識されてしまったか、もしくは各味質の舌部位における閾値の違いという一部分のみが広まってしまった可能性を考えた。また、1942 年、当時ハーバード大学心理学研究所所長であった E. Boring は「Sensation and perception in the history of experimental psychology」を著し、その中で Hänig の論文を翻訳・引用した際に味覚地図という誤った形で表現してしまっている。これも一般に誤った説が広まってしまった一つの可能性であると考えられる。

5. 参考文献

- 1) 基礎歯科生理学第 6 版、森本俊文ほか編、274 頁、2015、医歯薬出版株式会社
- 2) Hänig, D. P. : Zur Psychophysik des Geschmackssinnes, Philosophische Studien. 17, 576–623. 1901 (in Germany)

塩分摂取量が人体に与える影響

02124028 山田大志

指導教員：船橋 誠（口腔生理学教室）

キーワード：塩分摂取・血圧・味覚閾値

1. 諸言

塩辛い食べ物が高血圧には良くないといわれるが、日常の食生活における塩分摂取量を減らすことによって実際にどのような変化が起こるのかに興味を持ち、実験を行った。

2. 方法

自分を被験者として、塩分を含む食品を摂取しない生活を8日間継続して行い、毎日昼食後13時に座位安静時の血圧を測定し、朝起床直後の体重の測定を行った。

塩分を含むものの定義は成分表示に「食塩」と書いてあるものとし、この表示がないものだけを摂取した。また、激しい運動を避け、可能な限り普段通りの生活を心がけた。

次に、歯学部生理学実習において学生が行った塩味に対する味覚閾値と血圧の測定結果を集計して統計学的解析を行い、相関関係を調査した。

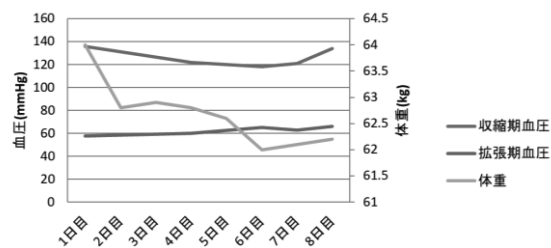


図1. 実験中の血圧と体重の推移

収縮期血圧（青線）、拡張期血圧（赤線）は変化が見られず、体重（緑線）は2 kg減少した。

3. 結果

塩分摂取をしない生活をした8日間において、収縮期血圧と拡張期血圧にはともに有意な変化を認めなかった（図1）。体重については、最初の24時間で1 kg減少し、8日後にはさらに1 kg体重が減少した。また、塩味の味覚閾値は著明に低下した（表1）。摂取できる品目の減少により食事の総量が減少し、また食欲が減退した。

実験日	検知閾値	認知閾値
10月20日	0.05	0.15
10月27日	0.1	0.3

表1. 実験前後の塩味に対する味覚閾値

実験終了時の塩味に対する閾値は、その後通常の食事を1週間摂った後より低かった

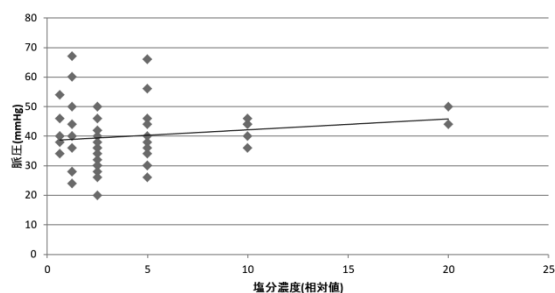


図2. 目隠しなしでの塩味に対する味覚検知閾値と安静時の脈圧（相関係数 $r=0.142$ ）

検知閾値と脈圧の間に相関は認められなかった。

塩味に対する味覚閾値（目隠しの有無）と、血圧（起立時の収縮期・拡張期血圧、座位の収縮期・拡張期血圧、座位の脈圧）の間の相関関係を図2に示す。相関係数 r が0.142であり、塩味閾値と脈圧との間に相関は見られなかった。

4. 考察

最初の24時間で体液量の減少により2 kg体重が減少し、また食欲の低下のため食事が減少し、あとの1週間は不足したエネルギーを補うために筋肉量が減少したと推測された。

塩味に対する味覚閾値の変化が確認されたことから、塩味に対する味覚閾値が低い人は日常生活での塩分摂取が少ないことが推測された。

極端な塩分摂取減少では塩味に対する味覚閾値が低下したが、一般的な食生活では十分多い食塩を摂取しており、塩分摂取量の多寡は味覚閾値の高低に関わるほどの変化を及ぼさないことが推測された。（実験①では塩分摂取を数分の一に減らしたが、一般大学生同士の日常生活のうえでは人によって塩分摂取量は数倍違うほどの差がない）

5. 参考文献

- 1) Chmielewski J, Carmody JB. Dietary sodium, dietary potassium, and systolic blood pressure in US adolescents. J Clin Hypertens (Greenwich), 19 (9), 904-909, 2017.
- 2) Kelly J, Kahles S. *et al.* The effect of dietary sodium modification on blood pressure in adult with systolic blood pressure less than 140 mmHg : a systematic review. JBI Database System Rev Implement Rep. 14(6), 196-237, 2016.

副甲状腺ホルモン (PTH) 間歇投与の投与頻度の違いによる長管骨の組織学的変化

02134019 萩野谷 大

指導教員：網塚憲生、長谷川智香（硬組織発生生物学教室）

キーワード：PTH, 骨リモデリング, 前骨芽細胞, 骨芽細胞

1. 緒言

骨形成誘導能をもつ副甲状腺ホルモン (PTH) を、異なる投与頻度で投与した際における骨形成能の違いを明らかにする目的で、PTH 間歇投与マウス的大腿骨を組織化学的に解析した。

2. 方法

生後 6 週齢雄性 C57BL/6J マウスに PTH ($20 \mu\text{g/kg/day}$) を 4 回/日、2 回/日、1 回/日で 2 週間、腹腔内投与した。同マウス的大腿骨を摘出し、10%EDTA 溶液で脱灰後、通法にてパラフィンまたは Epoxy 樹脂切片を作製した。パラフィン切片にて HE 染色、TRAP 染色、ALP、cathepsin K、osteopontin 免疫組織化学を行うとともに、Epoxy 樹脂準超薄切片にてトルイジンブルー染色を行った。

3. 結果

PTH 投与による骨形成量は、投与頻度が増加するほど上昇する傾向が認められた (図 1)。4 回/日投与群では多数の骨梁が形成されており、骨梁表面には、ALP 陽性骨芽細胞系細胞の厚い細胞層と多数の TRAP 陽性破骨細胞が局在していた (図 2)。また、TRAP 陽性破骨細胞の大部分は cathepsin K 陽性を示していた。骨梁内部に鋸歯状で osteopontin 陽性を示すセメントラインが観察されたことから (図 3)、活発な骨リモデリングが推測された。

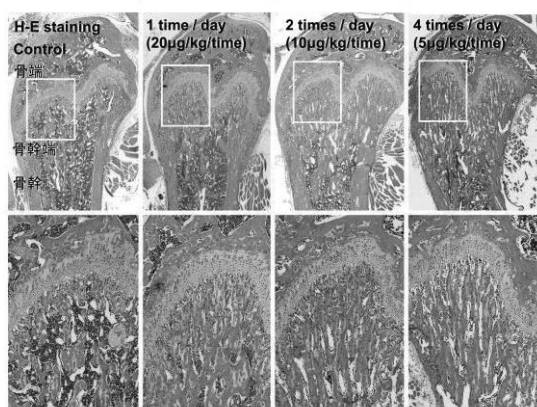


図 1 コントロールおよび PTH 投与群マウス大腿骨 HE 染色像

一方、1 回/日投与群では前骨芽細胞の細胞層はあまり発達せず (図 2)、滑らかなセメントラインが認められ、太い骨梁が形成されていた (図 3)。以上から、PTH を高頻度で投与すると活発な骨リモデリングにより骨形成が誘導され、また、低頻度で投与すると骨代謝回転が緩や

かになるものの、依然として、骨形成が誘導される可能性が示唆された。

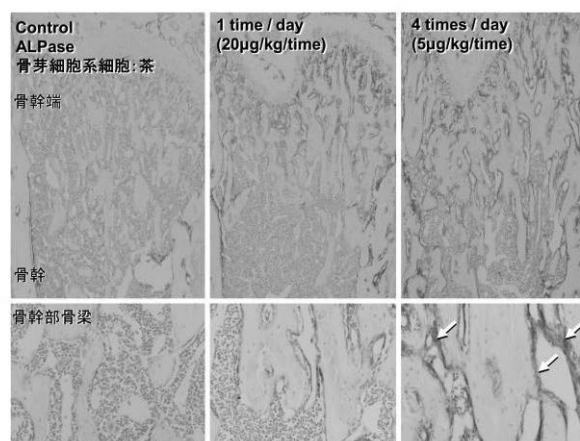


図 2 コントロールおよび PTH 投与群マウス大腿骨 ALP 免疫染色像

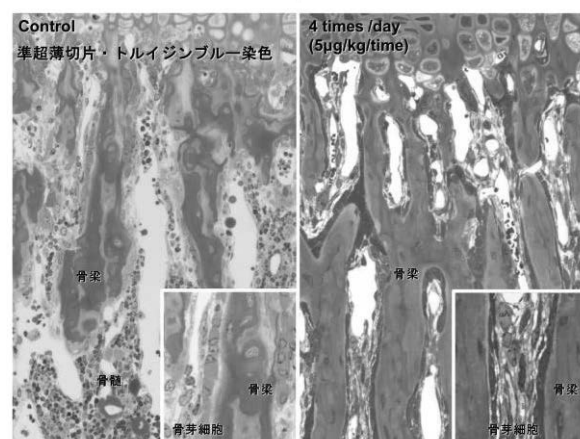


図 3 コントロールおよび PTH 1 日 4 回投与マウス大腿骨 トルイジンブルー染色像

4. 考察

PTH の一日の投与量を一定にした場合、投与頻度が高くなるにつれて、ALP 陽性骨芽細胞系細胞および TRAP 陽性/cathepsin K 陽性破骨細胞が増加し、活発な骨リモデリングが誘導され、多くの骨梁が形成されることが推測された。

5. 謝辞

この研究を遂行するにあたり、お忙しい中にも関わらず暖かく見守って下さった網塚憲生先生・長谷川智香先生に深く感謝いたします。なにも知らなかった自分を 1 から指導して頂き、また優しい言葉で私を励まして下さいました。自分の視野が広がるとてもいい研究ができました。短い期間ではありましたが、皆さん有り難うございました。

6. 参考文献

Freitus et al., J Bone Miner Res, 2009
Yamamoto et al., Endocrinology, 2016

モデリング部位における骨—血管連関による骨芽細胞活性化の可能性

02134016 阿部未来

指導教員：網塚憲生、長谷川智香（硬組織発生生物学教室）

キーワード：破骨細胞，骨芽細胞，モデリング，リモデリング，*c-fos*

1. 緒言

骨リモデリング部位では破骨細胞と骨芽細胞のカップリングによって骨芽細胞が活性化することで骨形成が行われる。一方、モデリング部位では血管の軟骨内侵入によって軟骨基質が露出し、その上に骨芽細胞が骨基質を添加していく。近年、Kusumbe らは、CD31^{high}/Endomucin ^{high} 陽性骨特異的血管を報告するとともに、それらが骨芽細胞を活性化する可能性を報告している（Nature 2014）。つまり、モデリング部位では、リモデリングとは異なり、破骨細胞が存在しなくとも（破骨細胞とのカップリングとは別の経路で）骨芽細胞が活性化される機序が推察される。破骨細胞が存在しない *c-fos* 遺伝子欠損 (*c-fos*^{-/-}) マウスでは骨芽細胞—破骨細胞間のカップリングは破綻している（図 1）。この状態における、骨リモデリング部位とモデリング部位の骨芽細胞を組織化学的・微細構造学的に検索した。

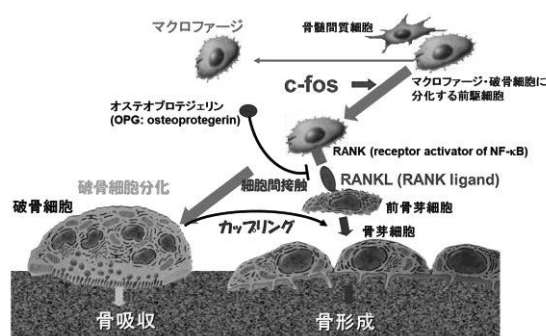


図 1：破骨細胞の分化過程

2. 方法

生後 8 週齢のコントロールマウスおよび *c-fos*^{-/-} マウスを 4% パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定し、大腿骨を採取した。これを用いて脱灰パラフィン切片を作製し、HE 染色、TRAP 染色、ALP、ENPP1、Endomucin、EphB4、ephrinB2 免疫組織化学を行った。また、脛骨は、5% EDTA 溶液で脱灰したものとしなかったものに分け、1% 四酸化オスミウムにて後固定を施し、エポキシ樹脂に包埋後、準超薄切片および超薄切片を作製した。超薄切片は、タンニン酸、酢酸ウラニル・クエン酸鉛を用いた電子染色を施し、透過型電子顕微鏡観察に用いた。また、

準超薄切片を用いて von Kossa 染色を行い、石灰化の評価を行った。一部の脛骨は、未脱灰ピラスエバ染色を行い、MMA 樹脂に包埋した。MMA 樹脂切片を作製し、蛍光顕微鏡にてカルセイン標識を観察した（カルセインラベルのため、と殺 2 日前に 20mg/kg の濃度でカルセイン溶液を腹腔内投与した）。

3. 結果

HE 染色ならびに TRAP 染色を行うと、*c-fos*^{-/-} マウスの骨髓腔は多くの骨梁で満たされており、TRAP 陽性破骨細胞が存在しないことが確認された。骨リモデリング部位（二次骨梁）を観察すると、コントロールマウスでは骨芽細胞は ALP 強陽性/ENPP1 陽性を示したのに対して、*c-fos*^{-/-} マウスでは、ALP 弱陽性/ENPP1 陰性の扁平な骨芽細胞が局在していた。さらに、同部位において、骨形成能を示すカルセイン染色を行ったところ、*c-fos*^{-/-} マウスではカルセイン標識は認められず、von Kossa 染色で活性型骨芽細胞や類骨層もほとんど認められなかった。透過型電子顕微鏡観察を行うと、コントロールマウスでは細胞内小器官の豊かな活性型骨芽細胞が認められたのに対して、*c-fos*^{-/-} マウスでは、粗面小胞体やゴルジ体などの細胞内小器官をごくわずかに含む休止期骨芽細胞の状態であった。

一方、モデリング部（成長板直下の一次骨梁）を観察すると、コントロールマウスと同様に、*c-fos*^{-/-} マウスでも ALP 強陽性/ENPP1 陽性を示す骨芽細胞が局在していた。また、同部位の基質に明瞭なカルセイン標識を認め、von Kossa 染色で黒色に染まる骨梁と、骨芽細胞直下の類骨層が観察された。透過型電子顕微鏡で観察すると、これらの骨芽細胞は発達した粗面小胞体やゴルジ体を含む活性型骨芽細胞であった。

モデリング部位における骨芽細胞活性化の機序について明らかにするために、同部位に局在する血管について検索を行った。モデリング部位には、endomucin 陽性/EphB4 陽性血管が存在し、これらの血管は ephrinB2 陽性骨芽細胞と直接接触していた。さらに透過型電子顕微鏡観察でも血管内皮細胞と骨芽細胞の細胞間接触が認められた。

4. 考察

モデリング部位では、骨リモデリング部位とは異なり、破骨細胞が存在しなくとも骨芽細胞は活性化し、骨形成を行うことが強く示唆された。その細胞学的機序として、血管内皮細胞と骨芽細胞の EphB4/ephrinB2 シグナルによる細胞連関が推察された。これらの詳細な細胞学的機序について、さらに検索を進めていきたい。

下顎中切歯と側切歯の根管形態について

02134007 柿崎 周斗

指導教官：山本 恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：下顎中切歯、下顎側切歯、根管形態

緒言

根管治療を確実に行う上で根管形態を理解することは非常に重要である。下顎中・側切歯の根管形態は単純であり比較的治療が容易とされているものの、学生である自分にはそれをイメージとしてとらえにくい。そこで同歯において、最も一般的な分類、すなわち単純根管（1本の根管が1つの根尖孔に開孔する）、不完全分岐根管（2本の根管が1つの根尖孔に開孔する）、および完全分岐根管（2本の根管が2つ以上の根尖孔に開孔する）が、各々どの程度の頻度で出現するかを調べたいと思い本研究を立案した。観察法として根管形態の観察に最も信頼のおける透明標本を用いた。

材料と方法

北海道大学歯学部 硬組織発生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、根面に齶蝕がない下顎中切歯（右23本、左27本）、同側切歯（右30本、左35本）の計114本を材料とした。なお、提供者の年齢、性別は不明であった。60℃、24%水酸化ナトリウムに30分浸漬し歯牙表面の軟組織を除去した後、5%蟻酸で4-5週間脱灰した。ピーカーに入れた墨汁に標本を浸し、真空チャンバーに置いて真空ポンプで30分空気を抜いて根管内に墨汁を流入させた。ついで70、80、90、100%、および無水アルコールで1日ずつ脱水した後、サリチル酸メチルに4日

間浸漬し透明にした。ついでスチレンモノマーに4日間、スチレンモノマー：ポリエステルレジン（Rigolac-2004）の1:1混合液に4日間、ポリエステルレジンに2日間、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンに2日間標本を浸漬しレジンを浸透させた。紫外線重合器で1日重合した。

結果

3種類の根管の出現頻度を表1に示した。

考察

過去の文献における3種の根管形態の出現頻度を表2に示した。

表2（上段：中切歯 下段：側切歯）

	歯の解剖学入門 ¹⁾	グロスマンエンドドンティクス ²⁾	有田 ³⁾
単純根管	90.3% 74.3%	70%	95.6% 84.1%
不完全分岐根管	1.9% 21.8%	27%	2.9% 15.9%
完全分岐根管	7.7% 4.0%	3%	1.5% 0%

不完全分岐根管は単純根管の経年的狭窄によって生じるとされ、一方、完全分岐根管は終生変化しないと考えられる。そこで、年齢の影響を無くすため『単純根管＋不完全分岐根管』と『完全分岐根管』とを比較した。本研究結果と過去の研究結果ともに、下顎中・側切歯のいずれも9割以上が『単純根管＋不完全分岐根管』であった。

この結果から「きわめて若年者ならば下顎中・側切歯のいずれも9割以上が単純根管であるが、加齢とともに分岐根管の頻度が増してゆく」と結論づけられる。私はこの結論を「同歯の根管はほとんど単純根管なので根管治療は容易である」と、とらえるのではなく「高齢の患者さんの場合には分岐根管の存在に注意を払わなければならない」ととらえ今後の治療に活かしたい。

今回の研究実習から、患者さんによって様々な根管形態が存在することを実際に目で見て学ぶことができた。非常に充実した有意義な実習であった。

参考文献

1. 歯の解剖学入門 赤井三千男 編 163頁 1990 医歯薬出版 東京
2. グロスマンエンドドンティクス 鈴木賢策 訳 166-167頁 1989 医歯薬出版 東京
3. 有田恵莉奈 下顎中切歯と側切歯の根管形態について 研究実習論文報告書 第15号 47頁 2014

表1：3種類の根管の出現頻度
（上段：中切歯、下段：側切歯）

	右	左	合計
単純根管	18本 (78.3%) 21本 (70%)	25本 (92.6%) 29本 (82.9%)	43本 (86%) 50本 (76.9%)
不完全分岐根管	5本 (21.7%) 8本 (26.7%)	2本 (7.4%) 6本 (17.1%)	7本 (14%) 14本 (21.5%)
完全分岐根管	0本 (0%) 1本 (3.3%)	0本 (0%) 0本 (0%)	0本 (0%) 1本 (1.6%)

上顎側切歯の根管形態について

02134013 中村健人

指導教官：山本恒之(硬組織発生生物学教室)

キーワード：上顎側切歯、側枝、根尖分岐、透明標本

緒言

根管治療は日常の歯科治療において基本となる重要な治療である。適切な根管治療は予後の成績を高めるが、そのためには根管形態を理解し熟知する必要がある。上下顎前歯は単根管が大部分であるが、側枝や根尖分岐がしばしば出現すると言われる。41 期生小林¹⁾と 44 期生平野²⁾は、透明標本を用いて上顎側切歯の側枝と根尖分岐の出現頻度を調べ興味深い結果を報告した。私も実際に自分の目で同歯の根管形態を観察してみたいという思いから本研究を行った。

材料と方法

硬組織発生生物学教室所有の 10%ホルマリン溶液で保存してあった上顎側切歯、右側 25 本、左側 25 本の計 45 本を使用した。標本歯を 60℃の 24%水酸化ナトリウムに 30 分浸漬し、流水下で歯ブラシでよく清掃した。5%蟻酸で 4~5 週間脱灰した後、ビーカーに入れた墨汁に標本を浸し真空チャンパー内に置き、真空ポンプで 30 分空気を引いて墨汁を根尖から流入させた。歯を清掃後、70%、80%、90%、100%、無水アルコールで 1 日ずつ脱水した。サリチル酸メチルに 4 日間浸漬し標本を透明にした後、スチレンモノマーに 4 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 4 日間、ポリエステルレジンに 2 日間、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンに 2 日間浸漬しレジンに標本に浸透させた。筆で標本表面のレジンにぬぐい紫外線重合器で 1 日重合した。

結果

小林¹⁾と平野²⁾は上顎側切歯の透明標本を作製し、同歯の根管形態を直根管(根尖分岐と側枝のいずれも持たない根管)、側枝のみ持つ根管、根尖分岐のみ持つ根管、側枝と根尖分岐の両方持つ根管の 4 種類に分類してそれらの頻度を算出した。その際、側枝を根尖から 1.0mm(上顎前歯根尖のセメント質の平均的厚さ)以上歯頸側で分かれ主根管より細いもの、根尖分岐を根尖から 1.0mm 以内で分岐するか、1.0mm より歯頸側で分岐しているが太さが主根管と同程度で区別できないものと定義した。本研究もこの判別法を踏襲し、標本歯における上記 4 種類の出現頻度(%)を算出した(表 1)。なお、右側上顎側切歯の内 5 本は透明化が十分でなく、根管の観察が不可能であったため分類から除外した。

考察

小林¹⁾、平野²⁾ および歯の解剖学入門³⁾による 4 種類の根管形態の出現頻度を表 2 に示す。歯の解剖学入門³⁾では観察方法と側枝と根尖分岐の判別法は不明であるも

表 1：4 種類の根管形態の出現歯数と頻度

	右	左	計
直根管	15 (75.0%)	23 (92.0%)	38 (84.4%)
側枝のみ	2 (10.0%)	2 (8.0%)	4 (8.9%)
根尖分岐のみ	2 (10.0%)	0 (0%)	2 (4.4%)
側枝+根尖分岐	1 (5.0%)	0 (0%)	1 (2.2%)
計	20 (100%)	25 (100%)	45 (100%)

表 2：過去の研究における 4 種類の根管形態の頻度

	歯の解剖学入門	小林	平野
直根管	52.8%	55.4%	59.0%
側枝のみ	15.7%	18.5%	18.0%
根尖分岐のみ	28.3%	26.1%	21.3%
側枝+根尖分岐	3.2%	0%	1.6%

の、三研究はほぼ近似した値を示した。一方、本研究では直根管が 84.4%と多く側枝や根尖分岐はほとんど見られなかった。小林¹⁾、および平野²⁾の研究とは判別法と観察法が同じため、この二つが違いの理由であるとは考えにくい。根尖分岐は経年的に狭窄し閉鎖するという報告もあるため、歯の提供者の年齢が影響したともいえるが、小林¹⁾と平野²⁾も本研究同様、提供者の年齢を考慮していないことからその影響も考えにくい。残念ながら過去の研究と結果が異なる理由は考察できなかった。標本数を増やせば異なる結果が生じ、なにかしら考察することができるかもしれない。機会があれば再チャレンジしたい。

複雑な側枝や根尖分岐を実際に観察することができたことは、本研究実習における大きな収穫であった。これらの存在につねに注意を払い予後の良い根管治療を目指したいと思っている。

参考文献

- 1 小林泰 上顎側切歯の根管形態について 41 期生研究実習論文学報告集 43-44 頁 2013
- 2 平野知佳 上顎側切歯の根管形態について 44 期生研究実習論文報告集 18 頁 2016
- 3 歯の解剖学入門 赤井三千男 編 163 頁 1990 医歯薬出版 東京

下顎第一大臼歯近心根の根管形態について

02134027 本田竹志

指導教員：山本恒之（硬組織発生生物学教室）

キーワード：下顎第一大臼歯、根管形態、透明標本

緒言

根管治療の成績を向上させるためには根管形態を十分に理解しなければならない。下顎第一大臼歯は上顎同名歯とともに咀嚼・咬合において特に重要な歯であり、複雑な根管形態を有する。そこで下顎第一大臼歯の透明標本を作製し、根管形態を自分自身の目で観察し理解することを目的として本研究を行った。遠心根よりも複雑な根管形態を持つとされる近心根を観察した。

材料と方法

北海道大学歯学部 硬組織発生生物学教室が所有し、10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面に齶蝕がない下顎第一大臼歯（右31本、左21本）を材料とした。60℃の24%水酸化ナトリウム水溶液で30分（15分×2回）処理し、流水下で歯ブラシを用いて軟組織を除去した。5%蟻酸で1週間脱灰した後、表面を刷掃し再び3週間脱灰した。ピーカー内の墨汁に標本を浸漬し、真空チャンバー内で真空ポンプにより30分空気を引いて陰圧にすることで根管内に墨汁を流入させた。歯ブラシで刷掃後、70%、80%、90%、100%、無水アルコールで1日ずつ脱水した。サリチル酸メチルに4日間浸漬し透明にした後、スチレンモノマーに4日間、スチレンモノマーとポリエステルレジン1対1混合液に4日間、ポリエステルレジンに2日間、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンに2日間浸漬しレジンに浸透させた。筆で標本表面の余剰のレジンにぬぐい紫外線重合器で1日重合した。

結果

下顎第一大臼歯近心根の根管形態を分岐形態から以下の3種類に分類した。

- ① 単純根管：一本の根管が一つの根尖孔に開孔する。
- ② 不完全分岐根管：2本の根管が合流し1つの根尖孔に開孔する。
- ③ 完全分岐根管：2本の根管が2つ以上の根尖孔に開孔する。

上記3種類の出現歯数と頻度を以下に記す。

- ① 単純根管：左3本（14.3%）、右4本（12.1%）、計7本（13.4%）
- ② 不完全分岐根管：左9本（42.9%）、右16本（48.5%）、計25本（48.1%）
- ③ 完全分岐根管：左9本（42.9%）、右11本（33.3%）、計20本（38.7%）

考察

加齢による二次象牙質の形成や齶蝕による局所的な修復象牙質の形成のため、経年的に根管は圧平され狭窄する。これにより単純根管は不完全分岐根管に移行するといわれている。一方、完全分岐根管は経年変化がないと考えられる。本研究では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について考察しても意味はないと考える。そこで（a）「単純根管＋不完全分岐根管」と（b）「完全分岐根管」の2つを算出して考察する。

本研究では（a）61.5%（b）38.7%であった。藪内らは（a）57.7%、（b）40.4%（観察法、標本数ともに不明、歯の解剖学入門¹⁾より引用）、三橋²⁾は（a）60.3%、（b）39.6%（透明標本、観察数53）、奥川³⁾は（a）66.7%、（b）33.3%（透明標本、観察数36）、吉野⁴⁾は（a）54.4%、（b）45.6%（透明標本、観察数57）、でありほぼ本研究と似た値を報告している。Vertucci とFla⁵⁾は、透明標本（標本数100）により「根尖孔が1つのもの（（a）に相当）」40.0%、「根尖孔が2つのもの（（b）に相当）」60.0%と報告しており、日本人を対象とした研究結果とは異なる。日本人以外を対象とし、かつ透明標本を使った研究は彼らの研究しかないため、「人種差がある」と結論付けるのは早計であるものの否定も出来ない。

日本人に関する限り「下顎第一大臼歯近心根においては、きわめて若年者であってもおよそ4割程度が（完全）分岐根管であり経年的にその頻度は増してゆく」と言えるのでこれを本研究実習の結論としたい。

研究実習により3種類の根管形態を直接観察しイメージとしてとらえることができるようになった。さらに根管の太さ、分岐、側枝、根尖分岐などの形態も、たとえ同一歯種であってもきわめて多様であることを実感できた。これらはいままでの授業や実習では経験できなかったことであり、今後の臨床に必ず役立つものと信じている。

参考文献

- 1) 赤井三千男：歯の解剖学入門 第一版 163頁、1993、医歯薬出版、東京
- 2) 三橋賢司：下顎第一大臼歯近心根の根管形態について－レジン包埋した透明標本を用いて－、研究実習論文報告集49－50頁、2003
- 3) 奥川葵 下顎第一大臼歯近心根の根管形態について研究実習論文報告集 16頁 2015
- 4) 吉野友都 下顎第一大臼歯近心根の根管形態について 研究実習論文報告集 14頁 2016
- 5) Vertucci FJ, Fla G : Root canal anatomy of human permanent teeth. Oral Surg. 58 : 589-599、1984

下顎第二大臼歯の根管形態について

02134029 室谷智哉

指導教員：山本恒之(硬組織発生物学教室)

キーワード：下顎第二大臼歯、根管形態、透明標本

緒言

歯科治療のなかで根管治療は最も Basic な治療の一つであり、歯科医師にとって根管形態の理解は不可欠である。最も大きな咬合圧を負担する大臼歯は、多根であり根管形態も特に複雑である。下顎大臼歯に関するいままでの歯内療法学の授業や実習では、主として第一大臼歯の根管が扱われ第二大臼歯のそれは少ないように思われた。そこで下顎第二大臼歯の根管形態を私自身の目で観察したいと思い本研究を立案した。

方法

北海道大学歯学部 硬組織発生物学教室が所有する 10%ホルマリン溶液中に保存されていた、根面にう蝕のない下顎第二大臼歯、右 26 本、左 21 本、計 47 本を材料とした。60℃、24%水酸化ナトリウムを用いて、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。5%ギ酸に 4～5 週間浸漬し脱灰した後、墨汁とともに歯牙をピーカーに入れて真空容器内で陰圧を利用して根管内に墨汁を浸透させた。歯牙を歯ブラシで清掃し墨汁を除いた後、70、80、90、100%、無水アルコールにそれぞれ 1 日ずつ浸漬し脱水した。サリチル酸メチルに 4 日間浸漬し透明にした後、スチレンモノマーに 4 日間、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 4 日間、ポリエステルレジンの 2 日間、0.3%ベンゾインを加えたポリエステルレジンの 2 日間浸漬しレジンを浸透させた。筆で標本表面の余剰のレジンをぬぐい、歯根を上にして台に立てかけ紫外線重合器で 1 日重合した。

結果

近心根、遠心根で以下の 3 種類の根管形態の出現頻度を調べた。

- 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。

結果は以下の通りであった。

近心根

単純根管：24 本 (51.1%)、

完全分岐根管：5 本 (10.6%)

不完全分岐根管：18 本 (38.3%)

遠心根

単純根管：37 本 (80.4%)

完全分岐根管：1 本 (2.2%)

不完全分岐根管：8 本 (17.4%)

考察

加齢による二次象牙質の形成や齶蝕による局所的な修復象牙質の形成のため、経年的に根管は狭くなる。結果、単純根管は不完全分岐根管に移行するとされる。本研究では歯牙提供者の年齢が不明なため、単純根管と不完全分岐根管の頻度について考察することは意味をなさないと考える。そのため、①「単純根管＋不完全分岐根管」と②「完全分岐根管」の 2 つに分けて考察した。また、3 種類の根管形態が報告されている過去の研究結果からも①と②を計算し、本研究結果と比較、検証した。

近心根については、本研究：①89.4% ②10.6%、グロスマンエンドドンティックス¹⁾：①65% ②35%、歯の解剖学入門²⁾：①80.9% ②19.1%、高木³⁾：①91.8% ②8.2% であった。遠心根については、本研究：①97.8% ②2.2%、グロスマンエンドドンティックス¹⁾：①95% ②5%、歯の解剖学入門²⁾：①95.1% ②5%、高木³⁾：97.9% ②2.1%、であった。遠心根に関してはすべての過去の研究結果と近似していた。近心根に関しては過去の高木³⁾の研究結果と極めて近かったが、他の研究とはかなりの違いがみられた。理由として、1) 標本数の絶対的不足、2) 観察方法の違い (歯の解剖学入門²⁾ では観察法は不明であり、グロスマンエンドドンティックス¹⁾ では透明標本と切片とが併用されている)、3) 人種の違い、などが挙げられる。高木³⁾と本研究は根管形態の観察において最も信頼のおける透明標本を用いているので、標本数は少ないものの最も正確なのではないかと考える。以上から「きわめて若年者では下顎第二大臼歯の近心根の 1 割程度、遠心根のごくわずか (2%程度) が (完全) 分岐根管であるが、経年的にその頻度は増してゆく」ということを今回の研究実習の結論としたい。将来の臨床に応用できると考える。また、研究実習を通して、たとえ同一歯種であっても様々な根管形態が存在することを再認識した。このことも必ず臨床の場で役立つと思う。

参考文献

1. グロスマンエンドドンティックス 鈴木賢策 訳 173 頁 1989 医歯薬出版 東京
2. 歯の解剖学入門 赤井三千男 編 163 頁 1990 医歯薬出版 東京
3. 高木亜希子 下顎第二大臼歯の根管形態について 研究実習論文報告書 第 7 号 49-50 頁 2006

ヒトの骨や歯におけるプロテオグリカン及びグリコサミノグリカンについて

02124005 兼子 裕史

指導教員：田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：プロテオグリカン、グリコサミノグリカン

1. 緒言

歯や骨といった硬組織は、ハイドロキシアパタイトなどの無機成分と、コラーゲンおよび非コラーゲン性タンパク質やプロテオグリカン（PG）などの有機成分から構成される。そこでPGやグリコサミノグリカン（GAG）について学ぶこととした。

2. 方法

・Coulson-Thomas YM, Coulson-Thomas VJ, Norton AL, et al. The identification of proteoglycans and glycosaminoglycans in archaeological human bones and teeth. PLoS ONE 10(6): e0131105, 2015 を読み、考察した。

3. 結果

・A.D.1150～1400 頃のもものと推定されるヒトの骨及び歯から PG と GAG の抽出をすることに成功し、すべての骨と歯からコンドロイチン硫酸（CS）とヒアルロン酸（HA）が検出された。

・PG と構成成分である GAG 鎖はハイドロキシアパタイトと結合し、分解から保護されていることがわかった。

・過去の論文（Rees SG, Hughes W, Embury G Interaction of glucuronic acid and iduronic acid-rich glycosaminoglycans and their modified forms with hydroxyapatite. Biomaterials 23: 481–489, 2002.）ではヘパラン硫酸（HS）、ヘパリン、デルマタン硫酸（DS）は、コンドロイチン4硫酸（C4S）、コンドロイチン6硫酸（C6S）、HA よりもハイドロキシアパタイトに強く結合することが示されている。この論文では、中世のヒトの資料には、これらの GAG が存在しないことが示され、さらに HSPG（ヘパラン硫酸プロテオグリカン）および KSPG（ケラタン硫酸プロテオグリカン）のコアタンパク質のみが検出され、他の因子が GAG を保存していることが示唆された。

・過去の論文（Kitamikado M, Lee YZ. Chondroitinase-producing bacteria in natural habitats. Appl Microbiol 29: 414–421, 1975. および Bohmer LH, Pitout MJ, Steyn PL, Visser L Purification and characterization of a novel heparinase. J Biol Chem 265: 13609–13617, 1990）によると中世のヒトの骨や歯の PG や GAG のなかには、細菌が産生する酵素などの外因性因子およびコラーゲンへの結合などの内因性因子のために迅速に分解される得るものがあることが示されている。

4. 考察

本論文で用いられたヒトの骨や歯は、イギリスのリンカーンのモンクスロードの南に位置する教会墓地跡から出土したものであった。この論文で用いられた方法で、中世のヒトの骨や歯からPGやGAGの抽出に成功したことを考えると、時代がより古いヒトの骨や歯からもPGやGAGが検出される可能性がある。また、年代、人骨の推定される年齢、出土した或いは保存されていた場所といった条件を変更しつつPGやGAGの同定を行い、統計学的に解析していくことで、本論文では解明できなかったGAGを保護している因子について新たな発見が得られる可能性があると考えられた。

HS、ヘパリン、DSは、中世の人間の骨や歯から検出されなかった。HSは腎や肺、肝臓、ヘパリンは肝臓や小腸、そしてDSは皮膚や心臓弁にそれぞれ多く分布している。また、サンプルは火山や地震などの災害のない穏やかな土地から出土したものである。さらに本論文が対照として使用したサンプルは、サメの軟骨である。このサンプルからはHSやDSが検出されていた。これらのことを考慮すると、HSやヘパリン、DSはハイドロキシアパタイトと結合できずに、細菌によって分解されてしまった可能性が推測される。また、ヒトとサメでは哺乳類と魚類で綱が異なるため、当然PGやGAGの分布が異なる可能性が推測される。したがって、本研究のサンプルと同年代の現代人の骨や歯を用いてGAGを定量して比較してみる必要があると思われる。

顎骨壊死と関節リウマチの関連性

02124013 白川 輝

指導教員：田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：顎骨壊死、関節リウマチ

1. 緒言

関節リウマチ（RA）は骨破壊を伴うため、治療薬としてしばしばビスフォスフォネート（BP）製剤が用いられる。しかし、BP 製剤は顎骨壊死（ONJ）と関連しており、ONJ 発症の危険因子である。そこで、RA と ONJ の関連性について学ぶことにした。

2. 方法

de Molon RS, Hsu C, Bezouglaia O, Dry SM, Pirih FQ, Soundia A, Cunha FQ, Cirelli JA, Aghaloo TL, Tetradis S. Rheumatoid Arthritis Exacerbates the Severity of Osteonecrosis of the Jaws (ONJ) in Mice. A Randomized, Prospective, Controlled Animal Study. J Bone Miner Res. 31(8):1596-1607, 2016 を読み、考察した。

3. 結果

マウスでの実験において、コントロール群、ゾレドロン酸投与（ZA）群、コラーゲン誘導性関節炎（CIA）群、ゾレドロン酸投与及びコラーゲン誘導性関節炎（CIA-ZA）群の4つに分類した。全てのマウス群に歯周病を発症させたうえで、上顎歯槽骨における CEJ から歯槽骨頂までの距離を測定し、骨損失を定量化した。CIA 群では、有意な歯槽骨頂からの距離の増加が観察され、骨損失を示した。一方、ZA および CIA-ZA 群では、骨量は減少したものの、歯槽骨頂からの距離は減少した。また、ZA 群および CIA-ZA 群において炎症細胞の浸潤が見られ、特に CIA-ZA 群において強かった。CIA 群では骨壊死の領域は見られなかったものの、CIA-ZA 群および ZA 群において骨壊死が観察された。そのうち、CIA-ZA 群において有意であり広範囲に見られた。

関節の骨変化を観察するために、 μ CT にて膝関節の評

価を行ったところ、CIA 処理したマウスは膝関節における骨破壊および広範囲のびらんを示した。ZA 処理を行ったマウスでは骨破壊はないものの、骨膜の形成は喪失していた。コントロール群および ZA 処理群は、炎症性細胞の浸潤は認められなかったものの、CIA 群および CIA-ZA 群においては炎症性細胞浸潤を関節に認めた。

これらのことより、RA と ONJ の潜在的なつながりはこれらの共通の病因によって引き起こされる可能性があると考えられた。RA は全身性歯周炎などの口腔内の他の炎症性疾患と非常によく似た炎症性サイトカインを持続的に放出する自己免疫疾患であり、歯周病は、宿主免疫系による調節を受ける。T 細胞の役割、炎症促進性サイトカインの放出、ストレスの増大、および歯周組織の破壊の進行に関与する可能性のある炎症反応の増加は、RA および ONJ 共通である。また、RA 患者は細菌感染のリスクを大きくし、ONJ の経過を複雑にする可能性がある。

X 線写真における評価では、ZA 治療により CIA の存在下であっても患部の全体的な歯槽骨容積が増加することが示された。CIA-ZA 群においても、ほかのすべての群よりも口蓋および舌側、頬側の両方で骨の厚さが増加した。病理組織学的には、空の骨細胞腔の存在および骨壊死の領域を含む、ZA および CIA-ZA 群の両方において ONJ の誘導が観察された。CIA-ZA 群では、空の骨細胞腔および骨壊死領域ならびに露出した骨の領域における差が観察され、ONJ の発生率に有意な差があることが明らかになった。これらより、RA が ONJ の危険因子であり得ると考えられた。

4. 考察

本研究で RA と ONJ の関連性が明らかになったことから、臨床の場でますます BP 製剤服用患者に対するケアが重要になってくると考えられた。また、ONJ は重篤な副作用であると考えられるので、BP 製剤に代わる新薬の研究が望まれる。

歯周病におけるアトルバスタチンの効果

02124026 三島悠豊

指導教員：田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：アトルバスタチン、歯周病

1. 緒言

抗高脂血症薬である 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) 還元酵素阻害物質であるスタチンは、肝臓のコレステロール合成を阻害することにより、血液中のコレステロールを低下させる作用をもつことが知られている。このスタチンはこれまで多くの研究により、抗炎症作用など様々な生理機能が報告されており、今回はスタチンの歯周病に対する効果について学ぶこととした。

2. 方法

Atorvastatin Decreases Bone Loss, Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Periodontitis. PLOS ONE 8(10): e75322 を読み、考察を行った。

3. 結果

今回、ケタミン (70 mg/kg 腹腔内投与、10%Quinamine) およびキシラジン (10 mg/kg 投与腹腔内) をラットに投与し麻酔した。この実験的歯周炎モデル (EPD) ラットを (=①非結紮処置、②結紮のみ、③結紮プラス 1 mg/kg アトルバスタチンを 10 日間毎日投与、④結紮プラス 5 mg/kg アトルバスタチンを 10 日間毎日投与、⑤結紮プラス 10 mg/kg アトルバスタチンを 10 日間毎日投与の 5 群に分けた。なお、炎症、抗酸化物質、マトリックスメタロプロテナーゼおよび骨マーカーのレベルを測定することにより、アトルバスタチンの歯周病の治療における効果を評価した。

① 歯槽骨吸収の減少

組織病理学的分析の結果から、EPD ラットに対し、アトルバスタチンを投与すると歯槽骨吸収の減少がみられた。また、高用量のアトルバスタチンを投与されたラットの方が、低用量のアトルバスタチンを投与されたラットよりも、歯槽骨吸収が少なかった。

また、免疫組織化学的検出結果 (COX-2、MMP-2、MMP-9、RANK-L、RANK および OPG) からアトルバスタチンを投与された EPD ラットは、COX-2 ならびに MMP-2、MMP-9、RANK-L および RANK のレベルが下がった。高

濃度のアトルバスタチン投与でさらに下がった。一方、アトルバスタチン投与で OPG は増加した。

② 炎症反応の軽減

アトルバスタチンの投与により、MPO の濃度、炎症誘発性サイトカイン IL-1 β および TNF- α のレベルが有意に低下した。このことより、炎症反応の軽減の作用をもつことがわかった。

③ 酸化ストレスの軽減

アトルバスタチンの投与で、マロンジアルデヒド (MDA) 活性の有意な低下がみられ、酸化ストレスの軽減作用があるとわかった。

以上の結果より、アトルバスタチンには、歯周疾患における RANK/RANKL を減少させ、OPG を増加させ、骨損失、炎症反応、酸化ストレス、および細胞外マトリックスタンパク質の発現を減少させる効果があることが明らかになった。

4. 考察

今回の研究結果より、歯周病において、アトルバスタチンには、歯槽骨吸収の減少、炎症反応の軽減、酸化ストレスの軽減といった効果が認められ、歯周病治療に有効であると考えられえた。さらなる研究により、アトルバスタチンの有効な投与量、投与期間、安全性等を十分に確認できれば、スタチンを歯周病の治療薬として積極的に使用していくことは、非常に有効であると考えられた。

5. 参考文献

Araújo RFd Júnior, Souza TO, Moura LMd, Torres KP, Souza LBd, Alves MdSCF, et al. (2013) Atorvastatin Decreases Bone Loss, Inflammation and Oxidative Stress in Experimental Periodontitis. PLOS ONE 8(10): e75322

閉経後女性を対象としたビタミン D と歯周病との関連についての研究

02124034 岸本 紗季

指導教員 田村 正人（口腔分子生化学教室）

キーワード：ビタミン D、歯周病、齲蝕、骨粗鬆症

1. 緒言

ビタミン D はマグロ、ウナギや乾椎茸などの食品に多く含まれ、脂溶性ビタミンの一つである。ビタミン D は皮膚で紫外線によって前駆体から生成され、肝臓と腎臓で水酸化を受け活性型ビタミン D となり、血清カルシウム濃度を調節する機能を有している。このため、健全な骨代謝の維持に必須であり、骨粗鬆症の治療薬としても用いられている。また、ビタミン D は免疫や癌とも関係しているといわれている。ビタミン D とカルシウム摂取と歯周疾患に関するいくつかの臨床研究がこれまでに行われてきた。ビタミン D とカルシウム摂取は歯槽骨吸収、歯肉炎症やアタッチメントロスの減少を促す、特に活性型ビタミン D では抗炎症作用や抗菌作用を有するとの報告がある。そこで今回は、閉経後の女性を対象とした Buffalo osteoporosis and periodontal disease (OsteoPerio) study において血中ビタミン D 濃度と歯の喪失について相関があるかどうかを調べた論文を読み、ビタミン D が歯周病を予防するという仮説について考察した。

2. 方法

Pavlesen S, Mai X, Wactawski-Wende J, LaMonte MJ, Hovey KM, Genco RJ, Millen AE. Vitamin D status and tooth loss in postmenopausal females: The Buffalo osteoporosis and periodontal disease (OsteoPerio) study. J Periodontol. 2016 87(8):852-863.を読み、考察した。

3. 結果

ビタミン D はステロイド性プロビタミンである植物性エルゴステロールや動物由来の 7-デヒドロコレステロールに紫外線が当たるとそれぞれビタミン D2 とビタミン D3 が合成される。そして、血流を介して肝臓へ運ばれて、水酸化酵素によって 25(OH)ビタミン D となる。この研究では、1997 年から 2000 年に口腔内診査を行った患者について 2002 年から 2005 年にかけて喪失歯の既往と数について調査した。対象は閉経後女性 780 名、血中 25(OH)ビタミン D 濃度と歯の喪失数などを調べた。このコホート研究においては、血中 25(OH)ビタミン D 濃度と歯周病やう蝕による歯の喪失の発生との関係を調べたが、統計

学的には有意な相関を認めることはできなかった。

4. 考察

ビタミン D のカルシウム代謝における役割と免疫に対する役割から、歯周病を予防する可能性が考えられている。これまでの臨床研究では、Ca（1000 mg/日以上）とビタミン D（400IU/日）のサプリメント使用者は非使用者と比較して 12 か月後の歯周病の状態が良好など歯周病の抑制に有益であることやビタミン D と子供の齲蝕との相関を示す過去の研究報告がある。しかし、今回読んだ研究論文では、血中 25(OH)ビタミン D 濃度の齲蝕や歯周病による歯の喪失に対する有益性を示すことはできなかった。臨床研究ではどのようなデザインで研究を行うか、研究対象の性別や年齢、人種などの条件によっても結果が異なる可能性がある。したがって、これからも更なる機序の解明と臨床研究を行う必要があると考えた。また、高齢者の女性での骨粗鬆症の人が多い。若年のうちからビタミン D とカルシウムを摂取し適度な運動を行って、骨量を増加させ丈夫な骨を形成することが、歯にとっても大切であるといわれているが、臨床研究によってエビデンスを得ることは重要であると考えられた。

6. 参考文献

Pavlesen S, Mai X, Wactawski-Wende J, LaMonte MJ, Hovey KM, Genco RJ, Millen AE. Vitamin D status and tooth loss in postmenopausal females: The Buffalo osteoporosis and periodontal disease (OsteoPerio) study. J Periodontol. 2016 87(8):852-863.

歯周病と糖尿病の関連性について

02134008 加藤大貴

指導教員：佐藤真理（口腔分子生化学教室）

キーワード：歯周病、糖尿病

1. 緒言

近年歯周病と糖尿病の関連性について多くの研究がなされている。今回はその研究の歴史の中でもマイルストーンとなった文献を読むことで、歯周病と糖尿病の関連について学ぶこととした。

2. 方法

Sara G. Grossi and Robert J. Genco による Periodontal Disease and Diabetes Mellitus: A Two-Way Relationship Ann Periodontol. (Vol. 3, No. 1, 51-61, July 1998) を読み、考察した。

3. 結果

重度の歯周病はしばしば糖尿病と共存し、歯周病の重篤さは糖尿病の経過年数と関連することから、糖尿病は歯周病を悪化させることが分かった。詳細を下に記述する。

・歯周病による結合組織破壊の機序

歯周病原細菌による感染は慢性的であり、多くがグラム陰性細菌によるものである。その影響は歯周組織だけではなく、免疫細胞や炎症の伝達によって全身にまで及ぶ。歯周病原細菌はリポ多糖類（LPS、エンドトキシン）やリポタイコ酸、毒素、タンパク質分解酵素などの有害因子を放出し、宿主は多数の細菌の毒素と産生物にさらされることとなる。そして食細胞との相互作用により炎症性カスケードが活性化し、IL-1 β を主としてPGE、TNF- α 、IL-6の合成と分泌が生じる。その結果、歯周組織破壊や歯槽骨吸収が起こる。

・糖尿病による結合組織破壊の機序

高血糖に基づく糖化の終末産生物としてAGEs（終末糖化産物）が合成される。AGEsは糖尿病患者の血漿、組織、そして歯肉にも蓄積する。AGEsは主に糖尿病患者のコラーゲンの架橋結合や細胞外基質の拡大の原因となり、動脈硬化や導管腔の狭窄といった糖尿病に関連する血管合併症の原因となる。グルコースによって架橋結合されたマトリックス構成要素は通常の酵素で分解されにくく血管壁に蓄積し時間とともにこれらの構造を厚くする。糖尿病による血管壁の肥厚はマトリックスタンパク質と血漿に架橋結合されたAGEsの分解を減少させ、結果としてマトリックス構成要素自体の合成を増加させる。このマトリックスの急増による慢性刺激はTNF- α 、IL-1のような成長因子と血小板由来の成長因子（PDGF）の局所的な

産生を増加する。マクロファージはAGEsに修飾されたタンパク質に対する高親和性レセプターを持ち、ここにAGEsに修飾されたタンパク質が結びつくことで局所的なサイトカイン産生サイクルの増加によりIL-1とTNF- α の合成を開始する。これらのサイトカインの合成と分泌が増加することで結合組織の破壊、急増、局所的な血栓症を引き起こす。

・糖尿病が歯周病に与える影響

グルコースに起因するAGEsの蓄積が食細胞の食作用と集積に影響を及ぼし、結果としてより病原性の高い歯肉縁下細菌叢が成立する。また歯周病に起因するサイトカインの合成と分泌はAGEsによるサイトカインの産生を増大させる。

・歯周病が糖尿病に与える影響

TNF- α はインシュリン刺激に誘導されるインシュリン受容体基質-1（IRS-1）の誘導抑制によってインシュリンの作用を低下させる。その他、毒素や細胞膜産生物などによって骨格筋におけるインシュリン依存性のグルコースの取り込みを減少させ、全身的なインシュリン抵抗性を引き起こす。このインシュリン抵抗性による高血糖によって、AGEsタンパク質の合成がさらに増加することで糖尿病の治療が困難となる。

Grossiらは歯周治療が糖尿病のコントロールに影響を及ぼすかどうかについての研究を再調査した。9つの研究を（1）機械的な歯周処置のみを行った研究、（2）機械的な歯周処置および補助的に抗生物質の全身投与を行った研究、の2つのグループに分類し調査を行った。また、糖尿病のコントロールは、血糖、糖化ヘモグロビン濃度、フルクトサミンによって評価を行った。

（1）のグループではどの研究においても糖尿病患者への機械的処置による糖尿病のコントロールへの影響はみられなかった。対照的に、（2）のグループでは3つの研究すべてにおいて抗生物質投与を伴う機械的処置後に糖尿病のコントロール改善がみられた。

以上のことからGrossiらは歯周病を伴う糖尿病患者において、抗生物質の全身投与を補助的に行いながらの機械的歯周治療は糖尿病治療における標準的なケアのひとつであるべきだと結論付けた。

4. 考察

歯周病と糖尿病が相互に影響を及ぼし合うメカニズムについて理解することができた。現在では糖尿病患者への口腔ケアは一般的であるが、今後さらに糖尿病のみならず他の全身疾患に対する歯科の役割は重要なものとなっていくと考えられる。

歯周治療が血糖コントロールに与える影響について

02134034 柴田 真友子

指導教員：佐藤真理（口腔分子生化学教室）

キーワード：メタ解析、炎症性サイトカイン、HbA1c、
抗生物質による治療

1. 緒言

糖尿病はここ数十年世界的に、ますます一般的な病気となっている。糖尿病と歯周病は双方に影響を与えていると言われているが、歯周治療を行うことで糖尿病患者の血糖コントロールが改善するかについて、いくつかの文献を読んで学ぶことにした。

2. 方法

参考文献に示す論文とガイドラインを読み、考察した。

3. 結果

歯周治療による HbA1c の変化を、全糖尿病患者、1 型糖尿病患者、2 型糖尿病患者で解析により評価した。2 型糖尿病患者（HbA1c7.5~9.5%）157 名をテスト群と対照群に分け歯周治療介入を行い、生物学的評価項目（PD、アタッチメントレベル、歯肉出血インデックス、プラーク指数、HbA1c、空腹時血糖、hs-CRP、中性脂肪）の改善を比較した。血液検査を行い、炎症性サイトカインの数値を比較した。これらの研究により以下の結果が得られた。

Jancket らによると HbA1c は、全糖尿病患者で 0.38%、2 型糖尿病患者で 0.66%、歯周治療に抗生物質を利用した場合は 0.71% 低下し、統計学的な有意差はなかった。Sun らによると歯周治療を行った群では歯周病の状態、HbA1c、空腹時血糖値、hsCRP を含めた炎症性因子の統計学的に有意な改善を認めた。

4. 考察

Jancket らの解析によると歯周治療による血糖改善について統計学的に有意差は見られず「歯周治療は糖尿病患者の血糖コントロールに影響を与えない」という帰無仮説を否定しきれなかった。しかし、全ての糖尿病患者よりも 2 型糖尿病患者のほうが HbA1c の改善がみられたことから、慢性炎症が発病の原因である 2 型糖尿病患者

において、口腔内の炎症を取り除く歯周治療に効果があったとも言える。

歯周病と糖尿病の関係についてさらに詳しく調べたところ 2014 年に日本歯周病学会による「糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン」が改訂され、歯周治療による血糖コントロールへの改善の効果が最近の論文により示されたことから糖尿病患者への歯周治療が推奨されていた。参考文献のひとつである Sun らの論文を読みさらに考察を行った。

Sun らによると歯周治療は血糖コントロールが比較的に不良な 2 型糖尿病患者（HbA1c7.5~9.5%）の HbA1c、空腹時血糖値やインスリン抵抗性を改善することが分かった。日本歯周病学会のガイドラインでは 2009 年から 2014 年の改訂において歯周治療が血糖コントロールの改善に効果があるとして、糖尿病患者に歯周治療を推奨するグレードを上げていた。

このように、最近の研究では血糖コントロールにおける歯周治療の効果を支持するものが増えており、引き続きガイドラインは改訂されている最中にあることが分かった。一見相反するような研究結果を慎重に見極めながらガイドラインの改訂を行なっている背景には、これらの研究が患者毎に異なる歯周治療を行っていることや治療方法が糖尿病の重症度に左右されることに難点があると考えられている。歯周治療は血糖コントロール改善に効果がないという帰無仮説を否定しきれないという研究結果がある一方、歯周治療の効果を支持する研究が増えてきていることから、さらなる研究が必要とされ、また歯科医師は医師と連携しながら糖尿病患者の歯周病治療を積極的に行うことが重要であると考えられた。

5. 参考文献

1. Janket SJ, Wightman A, Baird AE, Van Dyke TE, Jones JA. J Dent Res. 84(12): 1154-1159, 2005
2. Sun WL, Chen LL, Zhang SZ, Wu YM, Ren YZ, Qin GM. Intern Med.50:1569-1574. 2011.
3. 科学的根拠に基づく糖尿病診療ガイドライン 2013、南江堂
4. 糖尿病患者に対する歯周治療ガイドライン改訂第 2 版、2014、日本歯周病学会

幹細胞に基づく歯および歯周組織再生について

02130991 井嶋 翔吾

指導教員：田村-辻 潔美（口腔分子生化学教室）

キーワード：歯周組織再生，幹細胞，歯再生

1. 緒言

近年幹細胞に基づく組織工学が発展し、失われた組織の再生を目的とした新たな治療戦略が注目されている。そこで今回歯科領域における、幹細胞に基づく歯および歯周組織再生について学ぶこととした。

2. 方法

L Hu, Y Liu, S Wang, Stem cell-based tooth and periodontal regeneration. Oral Diseases. 2017.を読み、考察した。

3. 結果

・歯および歯周組織再生に用いられる幹細胞

歯由来間葉系幹細胞と非歯由来間葉系幹細胞に大別される。それぞれの幹細胞の特徴を示す（表 1）。

表 1：歯由来幹細胞と非歯由来幹細胞との特徴の比較

幹細胞型	新生組織	歯科への応用
------	------	--------

歯由来幹細胞

DPSCs (歯髄幹細胞)	象牙質・歯髄様組織、骨様組織、血管、神経組織	象牙質・歯髄、歯根、歯周組織の再生
SHEDs (脱落乳歯歯髄幹細胞)	象牙質・歯髄様組織、骨様組織、血管、神経組織	象牙質・歯髄、歯根、歯周組織の再生
SCAPs (歯根端乳頭幹細胞)	象牙質・歯髄様組織、血管	象牙質・歯髄、歯根の再生
PDLSCs (歯根膜幹細胞)	セメント質様組織、PDL（歯根膜）様組織	歯周組織の再生
DFSCs (歯小嚢幹細胞)	PDL 様組織、セメント質様組織	歯根、歯周組織の再生

非歯由来幹細胞

BMMSCs (骨髄間葉系幹細胞)	骨様組織、軟骨、筋、神経組織、歯様組織	歯、歯周組織の再生
ADSCs (脂肪由来幹細胞)	骨様組織、軟骨、血管、脂肪組織	歯周組織の再生
ESCs (胚性幹細胞)	骨様組織、軟骨、心筋、血管、脂肪組織、神経組織	歯、歯周組織の再生
iPSCs (人工多能性幹細胞)	骨様組織、軟骨、心筋、血管、脂肪組織、神経組織	歯、歯周組織の再生

・象牙質・歯髄複合体の再生

歯髄の血管再生と、足場または幹細胞に基づく歯髄の再生の二つの方法がある。前者は根尖孔から宿主細胞を誘導することに依存する。

・歯全体の再生

上皮系および間葉系細胞から生物学によって再構築された歯胚を歯槽骨に移植する方法と、幹細胞の多分化能によって再生する方法がある。

・歯根の再生

成形した足場に間葉系幹細胞を組み合わせ歯槽骨に移植することで歯根を再生させる。

・歯周組織の再生

間葉系幹細胞のうち特に PDLSCs の効果が期待される。骨欠損を伴う歯周病部に、間葉系幹細胞を直接、もしくは間葉系幹細胞シートとして移植することにより歯周組織を再生させる。

4. 考察

現在、様々な種類の幹細胞を応用した歯および歯周組織再生の研究が行われており、さらに移植後の副作用、各種の幹細胞による再生効果の違い、移植後の運命や機能等について明らかにする必要があると考えられる。今後、幹細胞に基づく歯および歯周組織再生は新たな治療方法として応用される可能性がある。

炎症性歯髄組織に由来する自己幹細胞移植によるヒト歯槽骨欠損の修復について

02134017 西田 章人

指導教員：田村-辻 潔美（口腔分子生化学教室）

キーワード：歯髄幹細胞、炎症性歯髄、組織再生

1. 緒言

近年、様々な幹細胞による再生医療が研究されているが、炎症性歯髄組織由来幹細胞（DPSCs-IPs）の自己移植についての報告があった。そこでDPSCs-IPsを用いたヒト歯槽骨欠損部位の修復について学ぶこととした。

2. 方法

Li Y, Zhao S, Nan X, Wei H, Shi J, Li A, Gou J. Repair of human periodontal bone defects by autologous grafting stem cells derived from inflammatory dental pulp tissues. Stem Cell Res Ther. 2016, vol. 7, 141.を読み、考察した。

3. 結果

DPSCs-IPs/ β -TCPの移植

5～6mmの歯周ポケットを有する歯周・歯内病変と診断された2人の女性（患者1、2とする）から採取したDPSCs-IPsを β -リン酸三カルシウム（ β -TCP）を足場として、各患者の歯槽骨欠損部位に移植した。その結果、9か月後に、各患者の歯周ポケットの深さ（PD）、根分岐部病変、動揺度は以下のように改善がみられた（図1）。

（図1）

	治療前		治療9か月後	
	患者1	患者2	患者1	患者2
PD（mm）	6	5	3	3
分岐部病変（度）	Ⅲ	Ⅲ	Ⅱ	Ⅰ
動揺度（度）	Ⅲ	Ⅱ	Ⅰ	Ⅰ

DPSCs-IPsと他の歯髄幹細胞との比較

DPSCs-IPs、正常ヒト歯髄幹細胞（DPSCs-NPs）、脱落乳歯歯髄幹細胞（SHED）の生物学的特性を初代培養成功率、細胞増殖指数 $PI = (G2/M + S)$

$\div (G0/G1 + S + G2/M) \times 100\%$ 、細胞増殖曲線にて評価した。その結果、DPSCs-IPsは他の2つに比べ、初代培養成功率は低下し、PI値は有意に減少し、細胞増殖曲線もわずかな減少傾向が見られた。DPSCs-IPsの細胞培養は可能であるが、細胞増殖能の低下が示唆された。

また、DPSCs-IPs、DPSCs-NPsの多分化能をin vitro 分化21日目にqRT-PCRで遺伝子マーカーを調べることで比較した。その結果、骨芽細胞分化マーカーであるオステオカルシン（OCN）の有意差はなかったが、アルカリフォスファターゼ（ALP）はDPSCs-IPsで減少した。一方、脂肪細胞分化マーカーであるリポ蛋白リパーゼ（LPL）とPPAR γ -2、軟骨細胞分化マーカーであるⅡ型コラーゲン（COL2A1）、アグリカン（ACAN）の発現には有意差は認められなかった。したがって、骨形成能はある程度影響を受けるが、DPSCs-IPsは多分化能を有し、DPSCs-NPsの代替として利用できる可能性が示唆された。

4. 考察

正常な歯髄幹細胞を再生医療に使用する場合、正常な歯を犠牲にする必要があるため、実際の臨床では患者の同意が得られにくいという問題がある。一方、炎症性歯髄組織はそれ自体が医療廃棄物とみなされるものであり、患者の同意は得られやすいのではないかと考えられる。そのため、DPSCs-IPsを利用した再生医療はこれからの医療において大変価値のあるものであると言える。

本研究においてDPSCs-IPsの移植は歯槽骨欠損の修復に有効であることが示された。しかしながら、そのメカニズムが明確に解明されていない点や被験者数が不足している点など、臨床に応用するには多くの課題が残されている。今後、そのような課題を克服し、臨床における再生医療の一端を担うものとなることを期待する。

毛細管現象によるゼラチンピラーの自己組織化を利用した細胞足場材料の作製

02134002 石井佑介

指導教員：赤坂 司（生体材料工学教室）

キーワード：コラーゲン、マイクロピラー、自己組織化

1. 緒言

以前の研究実習において、玉川氏によってコラーゲン足場材料にマイクロパターンを付与し、細胞接着性並びに接着形態に影響を与えることが判明した。

そこで本研究では細胞培養担体として応用することを将来目的とし、コラーゲン材料形状のバリエーションが、細胞接着性や形態変化にどのような影響を与えるかを検討した。コラーゲン足場材料の特性を変化させることなく足場の形状を変化させるため、今回はエタノールの蒸発による毛細管現象を利用したマイクロピラー自己組織化によるパターン化を検討した。コラーゲン足場材料のパターン変化量とエタノール濃度の関係検討、細胞接着性の評価、走査型電子顕微鏡 (SEM) および光学顕微鏡による形態観察を行った。

2. 方法

シャーレ上にゼラチンパターンを作製し、エタノールを滴下、その後、蒸発させることで直径 5 μm マイクロピラー構造を自己組織化させた。光学顕微鏡 40 倍拡大条件にて形態を撮影し、その画像上の自己組織化形態を区画とその区画内のピラー数をカウントし、それぞれ滴下したエタノール濃度毎に計測した。

次に、自己組織化した材料を上記の計測の結果を基に 4 種類を選択し、材料上にヒト口腔粘膜上皮細胞を播種し 3 日間の細胞増殖試験を行った。3 日後の細胞数の測定及び SEM による形態観察を行った。

3. 結果と考察

自己組織化の凝集分布の計測の結果(図 1)、エタノール濃度減少に伴って凝集体を作るピラー数の上昇が認められた。エタノール濃度 100%~90%を滴下したサンプルにおいて凝集ピラー数は 4 本程度であったが、エタノール濃度 30%~20%を滴下したサンプルでは 2000 本を超えるピラー凝集が確認された。自己組織化の巨大化はエタノール水溶液の表面張力の増加を反映しているものと考えられ、これにより自己組織化によるパターン種の増加は、エタノール濃度の制御によって達成されると推測された。

続いて細胞増殖試験の結果(図 2)、ピラー凝集が 2000 を超えたサンプル上の細胞は細胞数平均が、ピラー凝集数

0 本や 4 本のサンプルと比較して 2 倍以上の細胞数となることが確認された。また、細胞の接着の状態を観察した SEM 画像(図 3)からはピラー凝集が 2000 本をこえる足場で特徴的な細胞形態の変化が観察された。この特徴的な形態をとる細胞は足場材料ピラーの凝集によって斜面構造が形成される部分で顕著であり、この細胞形態をつくる要因であることが考えられた。

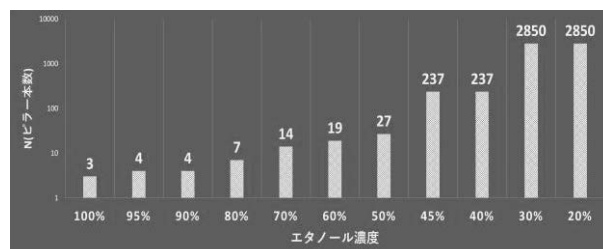


図 1 エタノール濃度変化による凝集の変化

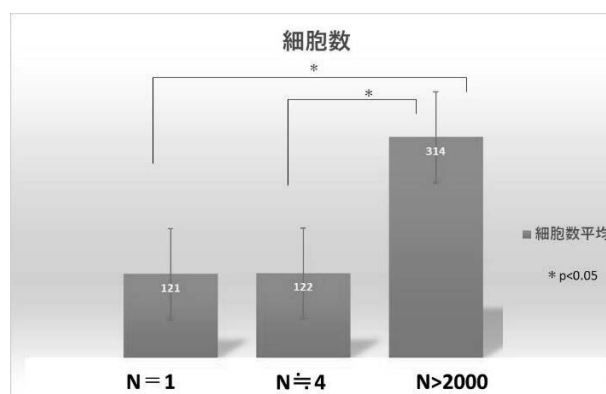


図 2 シートに接着した細胞数

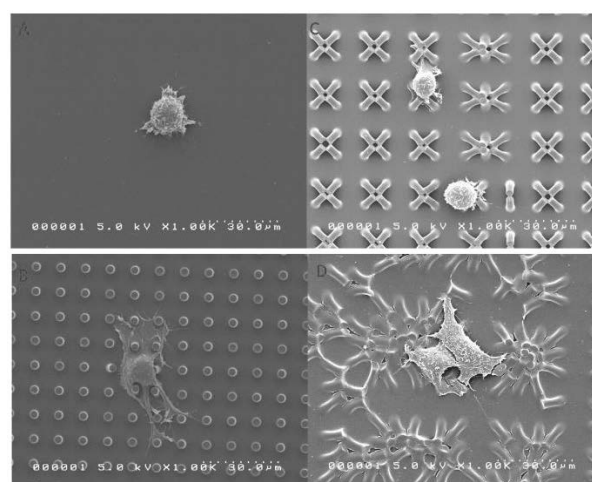


図 3 ゼラチンシート上に接着した細胞 SEM 像

マイクロ・ナノパターン上での血小板付着について

DEN1315 02124037 齊藤 紫

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、血小板付着、
COP film、付着形態観察

1. 緒言

血液に含まれる細胞成分の一種である血小板は、直径約 2 ～3 μm で、止血や血液凝固にきわめて重要な役割を果たす。また、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。

そこで本研究では、血小板付着に対するマイクロ・ナノパターンの影響を検討することとした。今回は、マイクロ・ナノパターンとして Groove、Pillar、Hole（各パターン幅：2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm ）の 3 種の Cyclo-olefin polymer (COP) film を選び、ウシ保存血液を接触させ、各パターンに対する血小板の付着数計測や走査型電子顕微鏡（SEM）による形態観察を行い評価した。

2. 方法

マイクロ・ナノパターンの鋳型として石英製マイクロ・ナノモールドを用いて、熱ナノインプリント（175℃・4 分間）を用い COP film へ転写した。この際、Groove、Pillar、Hole（各パターン幅：2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm 、高さ 0.5 μm ）の 3 種のパターンを転写し、パターンと幅が異なる計 9 種のパターンを得た。

市販ウシ保存血液をダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）に加え 1%血液溶液を作製した。各種パターン上に、1%血液溶液を加え、10 分インキュベートした。その後、グルタルアルデヒドにより固定後、蛍光顕微鏡にて付着血小板数を測定した。また臨界点乾燥後、SEM による形態観察を行った。

3. 結果

血小板の付着状態を蛍光顕微鏡で観察すると、いずれのパターンにおいてもパターン付与により血小板付着数が平面よりも多くなることが分かった。特に、幅 0.5 μm の Pillar において付着数が多くなることが認められた。なお、3 種のパターンのうち、Groove は幅の違いによる血小板付着数の変化は小さく、Pillar は幅の違いによる血小

板付着数の変化が最も大きいことが認められた（図 1）。

各パターンでの血小板付着数は、Groove ではパターン幅が小さくなると付着数は減少する傾向が認められた。一方で、Pillar ではパターン幅が小さくなると血小板付着数は増加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ず、差は小さいものの 0.5 μm > 2.0 μm > 1.0 μm の順に血小板付着数が多いことが分かった。

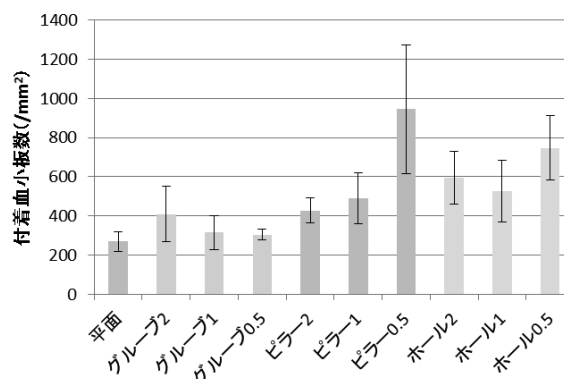


図 1：パターンへの付着血小板数

走査型電子顕微鏡観察の結果、パターン有無により形態に違いが観察された。平面に付着した血小板は比較的球形に近い形態をしているが、パターン上に付着した血小板は平面と比較して突起様構造が多く認められた（図 2）。

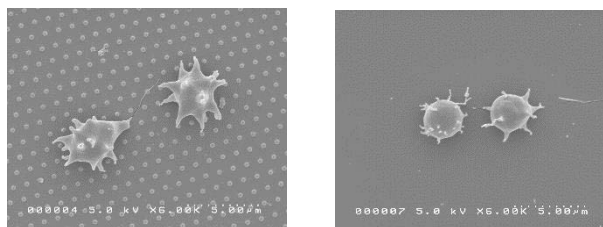


図 2：COP film への付着した血小板の SEM 像

4. 考察

パターン付与により血小板付着数が増加したことや付着血小板の形態の違いが認められたことから、パターン付与は血小板の付着性や付着形態に影響を与えることが分かった。これは、突起物がパターンの形状効果または表面積の増加効果に応答しているものと推測される。

また、パターンの種類や幅により付着数に違いがあることから、パターン付与に加えてその種類や幅も同様に血小板の付着性や付着形態に影響を与えることが分かった。このことより、多くの血小板付着を得るために適したパターンの種類とその幅が存在することが示唆された。

各種薬剤を用いた根管壁の洗浄効果

02134043 山口 なつき

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^{1~2)}。

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）8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、2本ずつ4グループに分類し、以下の4通りの洗浄方法で根管洗浄を行った。

G1: 交互洗浄（シリンジ, 10%NaOCl, 3% H_2O_2 使用）

G2: 14%EDTA（超音波洗浄）

G3: 10%NaOCl（超音波洗浄）

G4: 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36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では象牙細管の開口がわずかに観察されるのみであった。一方、G4では象牙細管の開口が明瞭に観察できた。その他のグループでは象牙細管の開口は認められたが、開口の明瞭さはG4には劣っていた。根中央部において、G2およびG4それぞれの開口率に対してG1、G3の開口率、G2の開口率に対してG4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とG3では象牙細管の開口がわずかに観察されるのみであった。それに比較してG2とG4では、明瞭ではないものの、象牙細管の開口が認められた。根尖部において、G2およびG4それぞれの開口率に対してG1、G3の開口率は統計学的に有意差が認められた（ $p < 0.05$ ）（図3）。

すべての洗浄法において、根尖部より根中央部の方が象牙細管の開口がより明瞭であった。

4. 考察

EDTAとNaOClを併用した超音波洗浄を行う方法が、根

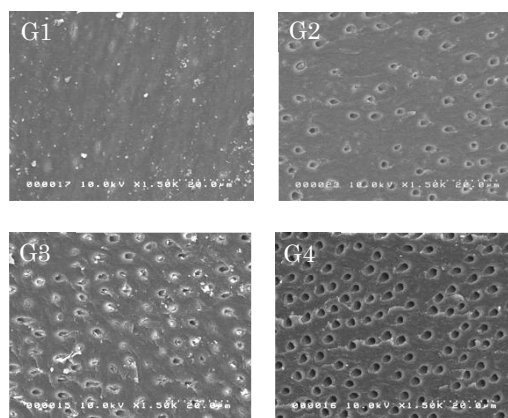


図1 根中央部の各洗浄処理後の根管壁のSEM観察

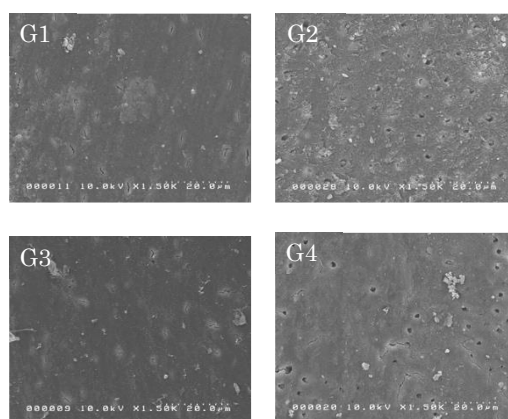


図2 根尖部の各洗浄処理後の根管壁のSEM観察

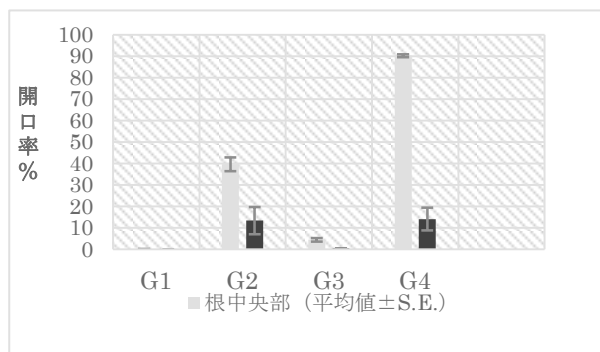


図3 各種洗浄後の象牙細管開口率

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) Clegg et al.: The Effect of Exposure to Irrigant Solutions Apical Dentin Biofilms In Vitro, J. Endod., 32: 434-436, 2006.

マイクロナノパターン上での破骨細胞分化誘導について

DEN1431 02134037 遠山晏梨

指導教員：玉井美保、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、破骨細胞、

G-PET フィルム

1. 諸言

マイクロナノパターンとは、光、熱などで微細構造を型(モールド)から材料に転写したものであり、細胞の接着性、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、異なる種類のマイクロナノパターンを転写し、各々における破骨細胞の分化効率を検討した。マイクロナノパターンはグループ、ピラー、ホール の 3 種類を各パターン幅 2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm で製作したものと、ピラー (パターン幅: 100 μm) 計 10 種類を使用した。

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、熱ナノインプリント法により G-PET フィルムに転写しパターンを作製した。RAW264.7 細胞 (マウスマクロファージ様細胞株) は 10%FBS 含有 DMEM 培地で培養し増殖させた。サブコンフルエントまで増殖した RAW264.7 細胞を準備したパターンに分化誘導培地 (10%FBS 含有 α MEM+100 μg sRANKL) を使用し、 4×10^4 cells/3.5cm の細胞密度で播種した。2、4 日目に培地交換および観察をおこない、6 日目に培養した細胞を、4%パラフォルムアルデヒドを用いて固定した。固定したサンプルは TRAP 染色をおこない破骨細胞を可視化した後、光学顕微鏡で写真を撮影した。撮影した写真から分化した細胞数 (全細胞数と 3 核以上の大きな細胞数) を計測し比較検討した。有意差検定は、Tukey's 多重検定を用い検定の有意水準は 5%としおこなった。

3. 結果

各パターンにおける TRAP 陽性の全細胞数を計測した結果を図 1 に示す。コントロール (パターン無し) またはピラー 100 nm に対して、各パターン上では、TRAP 陽性細胞が多い傾向が確認され、ホール (2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm) においては有意差が認められた。

また、各パターンにおける 3 核以上の大きな細胞数の計測をおこなった結果 (図 2)、ホール (2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm)、グループ (2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm)、ピラー (2.0 μm 、

1.0 μm 、0.5 μm 、100 nm) に対してピラー 1.0 μm が、ホール (0.5 μm)、グループ (2.0 μm 、0.5 μm)、ピラー 100 nm に対してはピラー 0.5 μm が、ピラー 100 nm に対してはコントロールが面積当たりの 3 核以上の大きな破骨細胞数に有意に多いことが確認された。

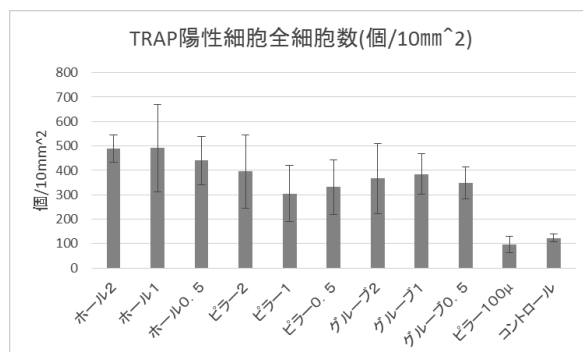


図 1 TRAP 陽性細胞全細胞数

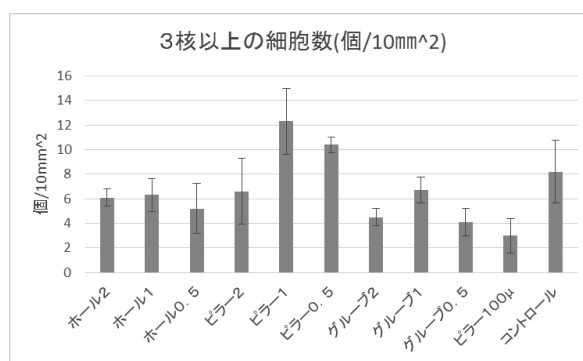


図 2 3 核以上の細胞数



図 3 破骨細胞数が
多いパターン

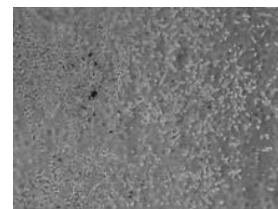


図 4 3 核以上の大きな破骨
細胞数が多いパターン

4. 考察

破骨細胞分化における細胞の足場にマイクロナノパターンを形成することで、分化誘導時の TRAP 陽性細胞数が増加することが示唆された。さらに 3 核以上のより成熟した破骨細胞への分化においては、ホール (2.0 μm 、1.0 μm 、0.5 μm) と比較してピラー 1.0 μm が、またホール (0.5 μm) よりもピラー 0.5 μm において有意に促進されることが分かった。以上の結果より、破骨細胞への分化誘導時における細胞の足場にマイクロナノパターンを形成することで、破骨細胞の分化が促進され、さらにピラー構造ではより破骨細胞の成熟化が誘導可能であることが分かった。

代替甘味料の効果的な使用による齲蝕リスク低減を 目指した菓子作製

02130961 吉川 公輝

指導教員：阿部薫明（生体材料工学教室）

キーワード：齲蝕、代替甘味料

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いるため、過剰な摂取は齲蝕リスクの増加が想起される。齲蝕リスクを低減するには代替甘味料を使用することがよく知られており、代替甘味料の1種であるキシリトールを原材料として使用したガム、飴等も販売されている。しかし、代替甘味料を使用したお菓子はガム、飴等が主流であり、その他の種類のお菓子ではあまり見受けられない。そこで、代替甘味料を市販の知育菓子のような練り菓子に用い、代替甘味料の性質を調べ、齲蝕を心配することなく楽しめるお菓子への効果的な使用法を検討した。

2. 方法

齲蝕リスク低減を試み、練り菓子作製時に原料中のショ糖を代替甘味料であるキシリトールへと置換した。また、一部香料を使用することで、風味の向上を試みた。

(1) 試作品の評価

作製した練り菓子を被験者に試食してもらい、見た目、匂い、舌触りの3項目について5段階評価のアンケートを実施した。被験者にはスプーン小さじ1杯の試料を渡し、まず見た目に評価をしてもらい、その後試食してもらい、匂い、舌触りを確認してもらった。試料はキサンタンガム0.3g、水0.7mL、重曹3g、水溶性食物繊維3g、クエン酸1.5gにそれぞれ砂糖10g、キシリトール10g、キシリトール20g、キシリトール10gとレモン香料2mL、キシリトール10gとメロン香料2mLを加えた計5種類を用いた。

(2) 粘度測定試験

試料をシリンジに5mL入れて先端を下に向けスタンドに固定し、押子の上に300gの重りをのせて、試料がすべて押し出されてくるまでの時間を計測した。計測は同一試料につき、3回行い、平均値を求めた。試料は

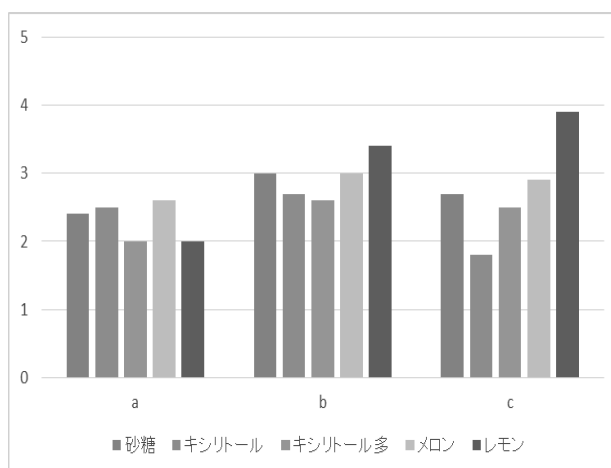
- a: ショ糖 20g・デキストリン 12g・キサンタンガム 2g
 - b: ショ糖 20g・デキストリン 12g・キサンタンガム 1g
 - c: キシリトール 20g・デキストリン 12g・キサンタンガム 2g
 - d: キシリトール 20g・デキストリン 12g・キサンタンガム 1g
- の計4種類を用いた。

得られた結果について、studentのt検定($p < 0.05$)を行った。

3. 結果

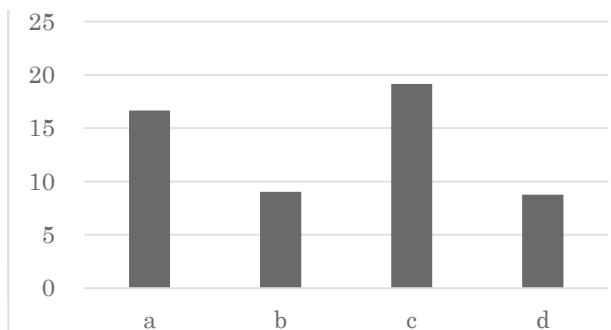
試作品の評価により、見た目・匂い・舌触りについて、キシリトールを用いた試料とショ糖を用いた試料との間に有意な差は見られなかった。但し、舌触りに関しては、香料の添加による効果が見られた。[Fig. 1]

粘性測定試験では増粘多糖類であるキサンタンガムの含有量を大きくすると、粘性も大きくなることが確認された。一方、ショ糖を用いた試料とキシリトールを用いた試料との間に粘性に有意な差は見られなかった。



[Fig. 2]

[Fig 1] 試料の評価：(a) 見た目、(b) 匂い、(c) 舌触り



[Fig 2] 増粘多糖類含有量の粘性への影響の評価

a: ショ糖 20g・増粘多糖類 2g、b: ショ糖 20g・増粘多糖類 1g

c: キシリトール 20g・増粘多糖類 2g

d: キシリトール 20g・増粘多糖類 1g

4. 考察

試作品の評価より、香料を上手く活用することでキシリトールを用いたお菓子の舌触りをより好ましいものにすることができると考えられる。今後は見た目、匂い、舌触りを最大化する香料の配合を調整することが課題となる。

粘性測定においては、今後、生じた粘性の差が味覚、食感、匂い等にどのように影響するか精査し、最適な粘性を求めていく必要があると考えられる。

う蝕リスクを軽減する菓子の作製

02134018 玉田 麦

指導教員：阿部薫明（生体材料工学教室）

キーワード：代替甘味料、粘性

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、そのため過剰な摂取は齲蝕リスクの増加が懸念される。一方、代替甘味料の摂取により齲蝕リスクを低減できることは周知の事実であるが、代替甘味料を使用したお菓子は、ガムや飴以外では稀である。また、前年度に行われたお菓子作りでは、加熱調理による代替甘味料の変性が問題となった。そこで、ショ糖を代替甘味料で置換し、加熱調理を行わないことで、従来と同等あるいはそれ以上の美味しさを実現できるのではないかと考え、その効果的な使用法を検討した。

2. 方法

試料には粘稠性のある菓子を選択し、キサンタンガム 0.3g、水 7ml、重曹 3g、砂糖 10g、水溶性食物繊維 3g、クエン酸 1.5g を混合して作成した。原料中のショ糖を代替甘味料であるキシリトールに全量置換することで、齲蝕リスクの低減を試みた。また、香料を使用することで、風味の向上を試みた。

(1) 試作品の評価

作成した粘稠性のある菓子 5 種類を被験者に試食してもらい、甘味、苦味、酸味について 5 段階で評価してもらいアンケートを 10 人に対して実施した。小さじ 1 杯分を一人分として、5 試料を 1 つずつ試食し、評価してもらった。試料は

- a) ショ糖 10g
- b) キシリトール 10g
- c) キシリトール 20g
- d) キシリトール 10g・レモン香料 2ml
- e) キシリトール 10g・メロン香料 2ml

を、上述のレシピの砂糖以外の材料と混合したものをを用いた。見た目については、小さじに入っている状態での評価とした。

(2) 粘性評価試験

成分の違いによる粘性への影響を評価するため、以下の 4 種類の試料を作成した。

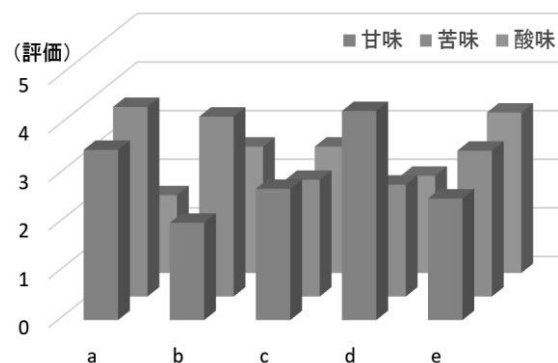
- a) ショ糖 20g・増粘多糖質 2g、
- b) ショ糖 20g・増粘多糖質 1g、
- c) キシリトール 20g・増粘多糖質 2g、
- d) キシリトール 20g・増粘多糖質 1g

を、デキストリン 6g・水 30ml と混合した。増粘多糖類として、キサンタンガムを用いた。また、発泡していると正確な測定が困難なため、重曹とクエン酸を除いた。結果について、student の t 検定($p < 0.05$)を行った。

3. 結果

(1) 試作品の評価

代替甘味料で作製した試料で、香料の添加による甘味の評価が増加した。また、代替甘味料で作製した試料では酸味が高いと評価されたほか、代替甘味料の量が多い試料と香料を使用している試料では苦味が低いとの評価を得た。一方、酸味への影響はほとんど見られなかった。



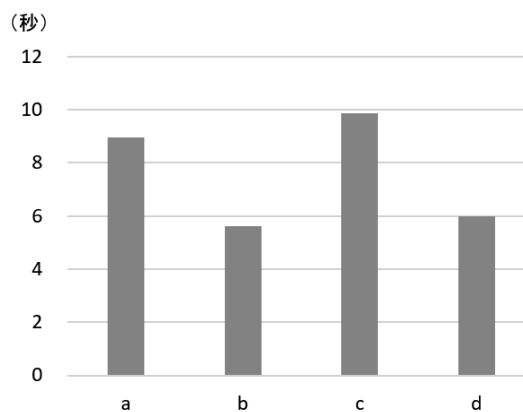
[Fig. 1]

[Fig. 1] アンケート結果

- a: ショ糖 10g (control)、b: キシリトール 10g、
- c: キシリトール 20g、d: キシリトール 10g・レモン香料 2ml
- e: キシリトール 10g・メロン香料 2ml

(2) 粘性評価試験

甘味料の種類に関わらず、増粘多糖類の使用量の増加に伴い、粘性が増加した。 [Fig. 2]



[Fig. 2] 増粘多糖類の量の粘性への影響

- a: ショ糖 20g・増粘多糖類 2g、b: ショ糖 20g・増粘多糖類 1g
- c: キシリトール 20g・増粘多糖類 2g
- d: キシリトール 20g・増粘多糖類 1g

4. 考察

香料の使用と人工甘味料の増量による、苦味の抑制がみられた。しかし、人工甘味料の増量による甘味の増加は特に見られず、一方、レモン香料を加えた場合に最も強く甘味を感じたことから、匂いと甘味の関係についてより詳細に実験を行う必要があると考えられる。

高転移性腫瘍エクソソーム miRNA による 血管バリア破壊と転移促進の可能性

02134040 早川 美奈子

指導教員:間石奈湖 樋田京子(血管生物分子病理学教室)

キーワード:腫瘍血管内皮細胞,エクソソーム,miRNA,血管内皮細胞

1. 緒言

血管はがん転移の必要な経路である。がん微小環境の様々な因子により、血管内皮細胞が異常性を獲得することが知られている。これまでがん微小環境因子として腫瘍細胞から分泌されるエクソソームに着目し、miRNA アレイ解析によって低転移性腫瘍と比べて高転移性腫瘍由来エクソソーム中に多く含まれるマイクロ RNA (miR) として miR-X を同定した。本研究では、この miR-X が血管内皮間接着に与える影響を解析し、転移促進に働くメカニズムを検討した。

2. 方法

①miR-X による内皮間接着分子 VE-Cadherin の発現変化:
ヒト皮膚微小血管内皮細胞 HMVEC に miR-X を導入し、VE-Cadherin の発現を Real-time PCR およびウェスタンブロッティング法により解析した。VE-Cadherin の発現と局在を細胞免疫染色法により検討した。

②エクソソーム投与によるバリア破壊:

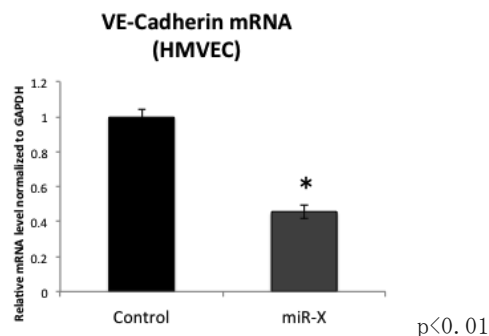
Transwell のメンブレン上にヒト臍帯静脈内皮細胞 HUVEC を播いてモノレイヤーを形成させ、そこに高転移性腫瘍由来エクソソームを添加した。48 時間培養後、FITC-dextran を加え、モノレイヤー下に漏れ出た dextran の量を FITC の蛍光強度を測定することで解析した (Permeability assay)。

3. 結果

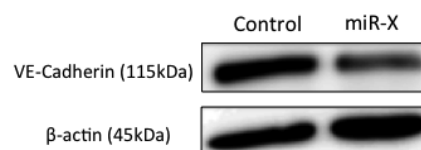
HMVEC に miR-X を導入すると、VE-Cadherin の mRNA (図 1) ならびにタンパク (図 2) の発現低下が認められた。また、細胞膜の VE-Cadherin シグナルの減少が認められ、細胞あたりの VE-Cadherin 染色面積も有意に減少した (図 3)。

Permeability assay において、高転移性腫瘍由来エクソ

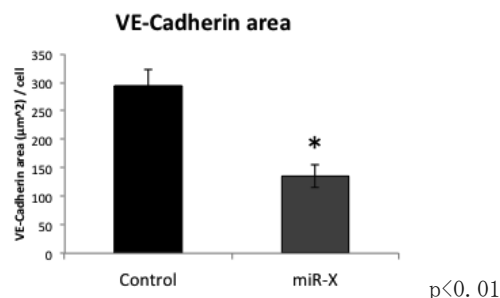
ソーム処理により蛍光強度は有意に増加した (図 4)。



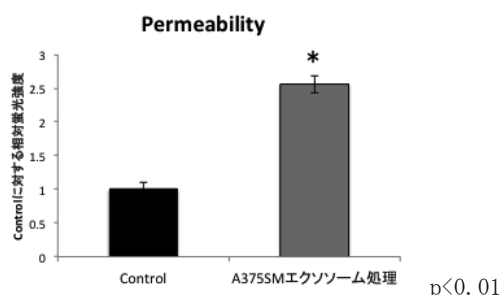
(図 1) miR-X 導入による VE-Cadherin mRNA の発現低下 (Real-time PCR)



(図 2) miR-X 導入による VE-Cadherin タンパク発現低下 (ウェスタンブロッティング)



(図 3) 細胞あたりの VE-Cadherin 面積



(図 4) エクソソーム処理による血管透過性亢進

4. 考察

高転移性腫瘍由来エクソソーム中の miR-X は血管内皮細胞の VE-Cadherin 発現を低下させ、血管のバリア機構を破壊することで、転移を促進する可能性が示唆された。

破骨細胞分化時の HuR タンパクの局在変化

02124020 手代木孝仁

指導教員：東野史裕 松田彩

(口腔病理病態学教室)

キーワード：ARE-mRNA、HuR、破骨細胞

1、緒言

HuR タンパクは、mRNA 結合タンパクであり、ARE-mRNA の ARE 領域と結合し、ARE-mRNA の核外輸送、安定化に関わっていることが知られている。本実験では破骨細胞分化時に HuR と破骨細胞への分化に関わる ARE-mRNA とが結合し、核外輸送、安定化が起き、HuR の局在変化がみられるのか検討した。

2、方法

(1) TRAP 染色

破骨細胞前駆細胞を 24well dish で培養し、それぞれ、50ng/ml の濃度で RANKL を 1、5、7 日間処理したものと、コントロールとして RANKL 未処理のものを用意し TRAP 染色を行った。

(2) 免疫染色法

TRAP 染色で用いた細胞と同条件のものを用意した。それぞれに対し、4 %PFA で固定、TritonX-100 で透過処理、1%BSA でブロッキングを行った。一次抗体は HuR では 3A2(mouse anti HuR)、Calcitonin receptor では Rabbit anti Rat Calcitonin receptor、2次抗体は HuR では Goat Anti-Rabbit IgG H&L(Alexa Fluor®568)、Calcitonin receptor では Goat Anti-Rabbit IgG H&L(Alexa Fluor®488)を用いた。また、核は DAPI で染色した。

3、結果

(1) TRAP 染色

RANKL 処理後 5 日以降では、矢印で示した細胞のように、TRAP 陽性の多核化した細胞が観察され、破骨細胞への分化が確認された(図 1)。

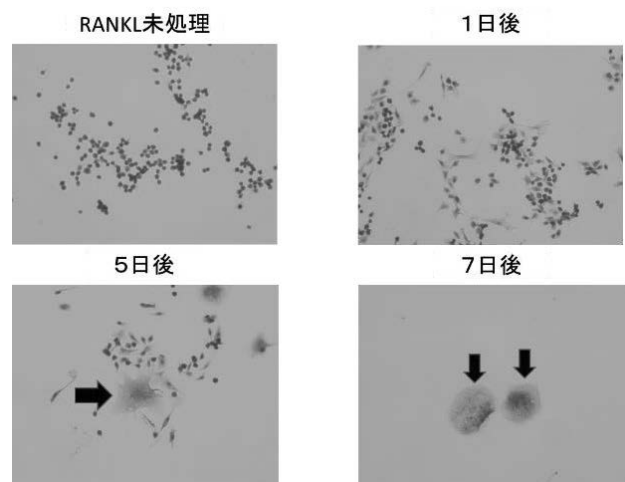


図 1 RANKL 処理 1、5、7 日間と RANKL 未処理の TRAP 染色像

(2) 免疫染色法

カルシトニンレセプター陽性の破骨細胞では HuR が細胞質に局在しており、HuR が核外に輸送されていることが示唆された(図 2)。

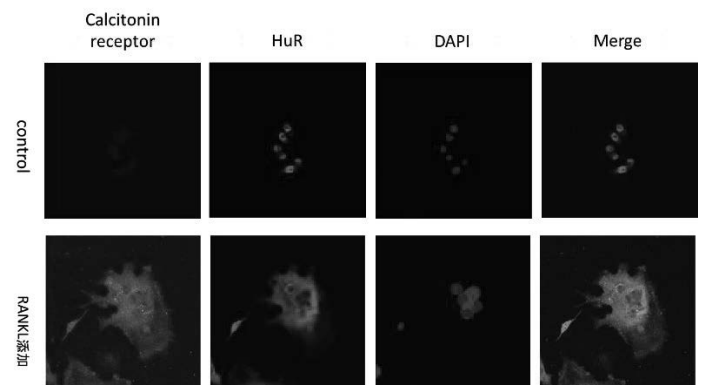


図 2 コントロール(上)と RANKL 処理を 7 日間行ったもの(下)の免疫染色像

4、考察

破骨細胞に分化した細胞では HuR の局在が核内から細胞質へと変化しており ARE-mRNA と結合し核外輸送されることが示唆された。今後、破骨細胞の分化に関係する ARE-mRNA と HuR との結合がどのように分化に関与しているかを検討する予定である。

熱刺激による HuR のがん細胞内の局在

02134041 堀井 彩夏

指導教員: 松田 彩、東野 史裕(血管生物分子病理学教室)

キーワード: HuR、ARE-mRNA、熱刺激

1. 緒言

がん遺伝子やサイトカインなどの細胞増殖に関わる遺伝子の mRNA には、ARE (AU-rich element) と呼ばれるアデニンとウラシルに富んだ領域がみられる。HuR は ARE に特異的に結合し ARE-mRNA を安定化するタンパクで、ストレス下にある細胞では ARE-mRNA が HuR と結合して核外輸送されて安定化しており、細胞のがん化に関わっていることが知られている。HuR は様々な物理刺激、ストレスなどによって細胞内の局在が変化することが数々の論文で報告されている。本研究では、熱刺激による HuR の細胞内の挙動を解析した。

2. 方法

細胞: HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん細胞)

培地: DMEM (serum free)

37℃、10cm dish で HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) を培養し、43℃ で 2 時間 heat shock した。

また、コントロールとして刺激を加えていない HeLa 細胞を用意した。

〈ウエスタンブロッティング〉

細胞を回収し、細胞質分画と核分画に分けて電気泳動を行った。次にタンパクをメンブレンに転写後、HuR に対する一次抗体として 3A2、二次抗体として anti-mouse IgG HRP を用いてウエスタンブロッティングを行い、HuR の発現を検討した。

〈蛍光免疫染色法〉

細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定し、HuR に対する一次抗体として 3A2、二次抗体として anti-mouse IgG FITC を用いて HuR の局在を検討した。

3. 結果

〈ウエスタンブロッティング〉

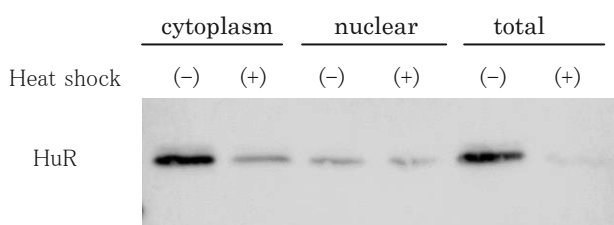


図 1: 熱刺激を加えた細胞と、加えていない細胞での核と細胞質での HuR の発現

図 1 より、熱刺激を加えた細胞では、細胞質での HuR の発現が著しく減少した。核での HuR の発現量はほとんど変化が見られなかった。また、細胞全体でも HuR の発現が減少した。

〈蛍光免疫染色法〉

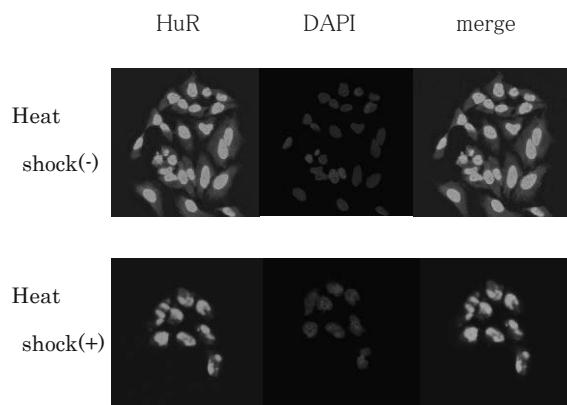


図 2: 細胞内の HuR の局在

図 2 より、熱刺激を加えていない細胞では核と細胞質に HuR の発現が見られるが、熱刺激を加えた細胞では、細胞質での HuR の発現がほとんど見られなかった。核では HuR の発現が見られた。

4. 考察

今回の 43℃、2 時間という条件下では、がん細胞の細胞質での HuR の発現が減少することが示された。Total でも HuR の発現が減少しているため、熱刺激により細胞内の HuR が分解されたと考えられる。今回の条件下では、細胞質での HuR の発現が減少したため、ARE-mRNA が不安定化し、がん細胞の増殖が抑制されることが期待される。

5. 謝辞

本研究に数々のご援助、ご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究科血管生物分子病理学教室員各位に厚く御礼申し上げます。

腫瘍細胞の2次元培養と3次元培養における増殖様式と増殖速度の研究

02134021 橋爪孝介

指導教員：北村哲也（口腔病理病態学教室）

キーワード：三次元培養，細胞増殖様式，細胞増殖速度

1. 緒言

生体では細胞は三次元構築をしているが、実験に用いる培養細胞では二次元培養が一般的である。本研究では、良性および悪性腫瘍細胞の二次元培養と三次元培養における違いを比較検討した。

2. 方法

口腔扁平上皮癌細胞由来株 HSC-3 とエナメル上皮腫細胞由来株 AM-1 を、通例に従い二次元培養とコラーゲンゲル（新田ゼラチン）を用いた三次元培養を行った。三次元培養では、細胞を含むゲルが細胞を含まないゲルに挟まれ、密閉される構造物を作成した。細胞を播種した日を day 0 とし、以後一日おきに写真撮影を行い、増殖様式を観察した。HSC-3 の day 10 と AM-1 の day 14 において、腫瘍辺縁を強拡大で 30 分おきに計 10 時間写真撮影した。また、HSC-3 において二次元培養と三次元培養の両方で day 0 から day 2 まで細胞数を計測した。Day 0 の細胞数を 100% とし、day1、2 における細胞数を百分率で比較した。

3. 結果

二次元培養ではどちらも細胞株も散在する細胞がそれぞれの位置で増殖し、dish が細胞で満たされていく様子が観察された（図 1、2）。これに対し、三次元培養では細胞を含むゲルが細胞で飽和状態になった後、細胞が周囲のゲルに向かって増殖していく様子が観察され、HSC-3 は膨張性に、AM-1 は突起を伸ばすように周囲のゲルに浸潤した（図 3、4）。次に 30 分おきに撮影した連続写真を詳細に検討したところ、細胞塊の辺縁における強拡大写真で、HSC-3 では掌を開いたような形態を、AM-1 では腕を伸ばしたような形態をとることが観察された（図 7、8 矢印）。

細胞増加率の比較では、二次元培養では三次元培養と比較して細胞増殖能が亢進しており、day 1 では 10% 有意水準で有意差が認められた（図 9）。

4. 考察

二次元培養に比べ、三次元培養では増殖の様子が生体内に近い形で再現された（図 3、4、5、6）。三次元培養における細胞塊辺縁の強拡大写真で確認された細胞形態の違いは、HSC-3 の膨張性の増殖様式と、AM-1 の突起を伸ばすような増殖様式と関係していると考えられた。また、3 次元培養では、間質との適応に時間を要するため、2 次元培養に比べ細胞増殖活性が低くなったと考えられた。

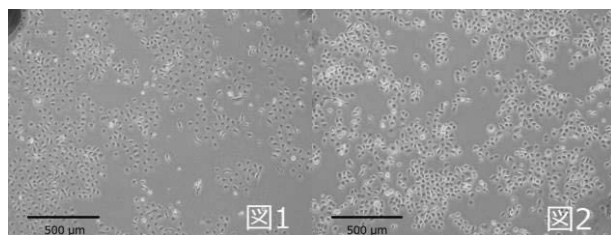


図 1、2 二次元培養（左：HSC-3、右：AM-1 共に day 5）

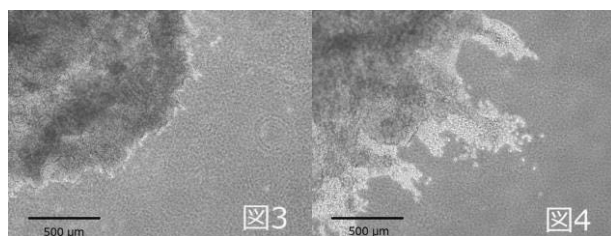


図 3、4 三次元培養（左：HSC-3、右：AM-1 共に day 11）

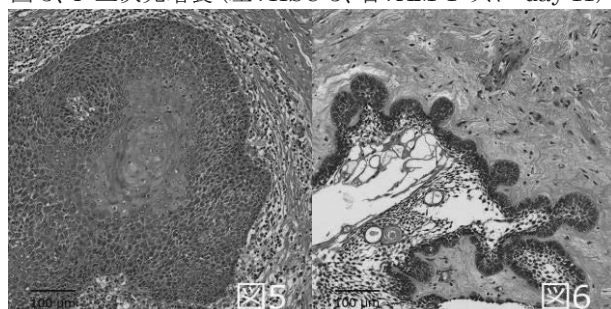


図 5、6 組織像（右：扁平上皮癌、左：エナメル上皮腫）

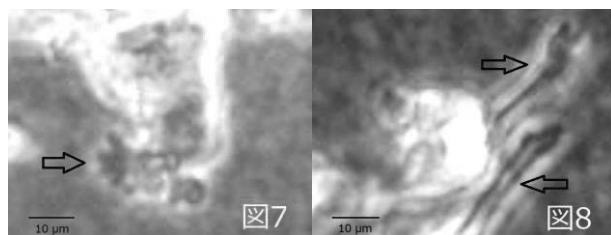


図 7、8 強拡大（左：HSC-3 day 10、右：AM-1 day 14）

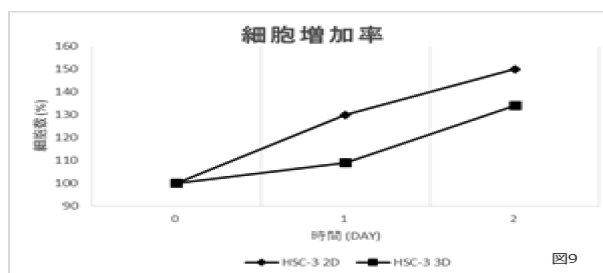


図 9(細胞増加率)

扁平上皮癌の頸部リンパ節転移における細菌の同定
02134011 櫻岡直也
指導教員：北村哲也（血管生物分子病理学教室）
キーワード：口腔癌、口腔内細菌、転移

1. 緒言

扁平上皮癌は口腔癌の約 90%を占め、癌の頸部リンパ節への転移は生存率と深く関係している。また口腔癌患者では、口腔衛生状態が不良なことが多く口腔癌と口腔内細菌の関連性についていくつか研究があるが、口腔癌の頸部リンパ節転移と口腔内細菌の関連性についてはあまり研究がされていない。そこで本研究では、口腔内細菌が口腔癌の頸部リンパ節転移を促進するかを明らかにするため、転移リンパ節における細菌の有無を検討した。

2. 方法

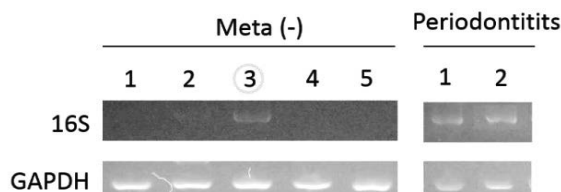
症例は、非転移リンパ節 5 例、転移リンパ節 5 例を用いた。また、陽性のコントロールとして細菌が存在すると期待できる歯周病組織 2 例を用いた。原発腫瘍部位とリンパ節レベルは以下に示す。

非転移リンパ節群：舌 3 例、口底 1 例、歯肉 1 例
IIA 2 例、III 2 例、VB 1 例
転移リンパ節群：舌 2 例、頬粘膜 1 例、口底 1 例、歯肉 1 例
IB 3 例、IIA 2 例

パラフィン包埋組織からリンパ節、原発腫瘍を薄切し、DNA 抽出剤 DEXPAT (Takara bio) を用いて DNA を抽出した。エタノール沈殿にて DNA を精製した後、細菌のリボゾーム RNA 遺伝子 (以後 16S rDNA) を PCR 法により増幅させ、電気泳動を行った。なお、コントロールには GAPDH を用いた。

3. 結果

16S rDNA と GAPDH のバンドを図 1 に示す。非転移リンパ節群では 1 例にのみ (Lane 3)、転移リンパ節群には 4 例 (Lane 1, 2, 4, 5) に 16S rDNA のバンドが認められた (図 1)。なおこのバンドは歯周病罹患患者から採取された DNA の PCR 産物と同じ高さであった。また、転移リンパ節の多くに細菌が存在することが明らかになったことから、細菌が存在する腫瘍は頸部リンパ節転移しやすいと考えられ、原発腫瘍の細菌の有無



を検索した。しかし、予想に反して非転移リンパ節の原発腫瘍、転移リンパ節の原発腫瘍のどちらにも細菌が存在することが明らかになった (図 2)。

図 1

上：非転移リンパ節群と歯周病罹歯肉の 16S rDNA
下：転移リンパ節群の 16S rDNA

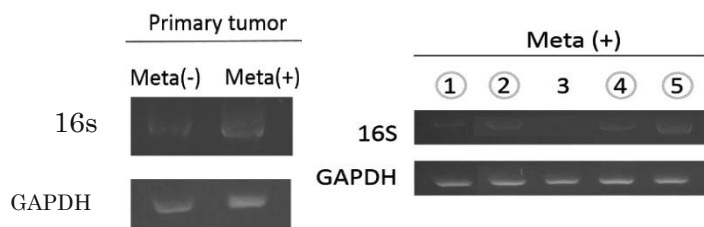


図 2：原発腫瘍の 16S rDNA

左：非転移リンパ節の原発腫瘍
右：転移リンパ節の原発腫瘍

4. 考察

転移リンパ節群には細菌の存在率が高いことから、口腔内細菌が口腔癌の頸部リンパ節転移に関与している可能性が示唆された。そこで、口腔内細菌が口腔癌の頸部リンパ節転移に関与する 3 つのモデルを考えた。

細菌特異モデル (図 3 上段)：原発腫瘍に、特定の細菌が存在することにより頸部リンパ節転移を促進するモデル。

細菌先行モデル (図 4 中段)：予め、頸部リンパ節に特定の細菌が存在することにより転移を促進するモデル。

因果関係なしモデル (図 5 下段)：頸部リンパ節転移する腫瘍細胞に細菌が偶然共存していただけで、細菌が頸部リンパ節転移には関与しないモデル。

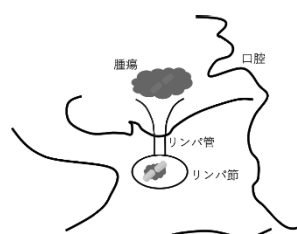


図 3：細菌特異モデル
原発内の特定の細菌が腫瘍に感染し、腫瘍が転移しやすくなるモデル。

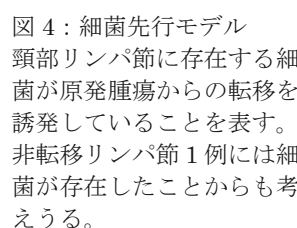


図 4：細菌先行モデル
頸部リンパ節に存在する細菌が原発腫瘍からの転移を誘発していることを表す。非転移リンパ節 1 例には細菌が存在したことから考へうる。

図 5：因果関係なしモデル
細菌と腫瘍細胞が偶然共存し、頸部リンパ節に転移していることを表す。この場合、細菌と頸部リンパ節転移に因果関係があるとはいえない。

今後、この 3 つのモデルを検証するためには、細菌特異モデルにおける転移を促進する細菌や、細菌先行モデルにおける転移を誘発する細菌といった、頸部リンパ節転移に関与する細菌の同定や転移リンパ節内における細菌の局在を今後明らかにする必要があると考えられた。口腔癌患者の口腔内細菌の種類や構成を調べ、頸部リンパ節転移を促進するような細菌が同定されれば、口腔ケアにより頸部リンパ節転移のリスクを減少させられるかもしれない。また、原発腫瘍にいる細菌を同定することにより、頸部リンパ節転移への転移リスクを予測できる可能性もある。今後症例数を増やし、さらなる検討を行う必要がある。

口腔内液状検体細胞診における検体の安定性と染色の復元

02134004 遠藤 研人

指導教員：北村 哲也（口腔病理病態学教室）

キーワード：口腔細胞診、液状検体、口腔扁平上皮癌

1. 緒言

細胞診は一般歯科医院でも行える非常に簡便な癌のスクリーニング検査法である。一般歯科医において癌か炎症かの鑑別が困難な病変は、抗生剤を投与して病変の大きさの変化を観察することが一般的である。細胞診は科学的かつ迅速にその判断が行えること、口腔内は直接触診できる臓器であることから、今後急速に普及すると考えられている。

細胞診は、口腔内から採取した細胞をスライドガラスへ塗抹・固定し、検査施設で染色・検鏡するのが一般的である。なかでも液状検体細胞診（Liquid-based cytology：以下 LBC 法）は歯科医師は擦過、採取した細胞をそのまま固定液に浸漬するだけよく簡便である。しかし、北海道は広大であることや季節による温度変化が大きいいため郵送の時間や環境が染色性に影響を及ぼす可能性がある。今回は LBC 法で保存された液状検体の安定性、変色について検討し、また退色した際の復元性について調べた。

2. 方法

液状化検体細胞診システムは TACASTM 法、用手法を用いた。細胞採取には歯間ブラシを用い、口腔粘膜全体から細胞を採取し、TACAS Ruby（細胞診用固定液）30ml に浸漬した。10 等分し、1 本は 24℃ で 30 分放置し細胞固定を行い染色した。残りの 9 本は 3 本ずつにわけ 4℃、24℃、37℃ で保管し、4 日後、9 日後、14 日後にそれぞれ染色した。

すべての細胞は、染色後対物 20 倍で写真撮影を行い、角化物、表層細胞、深層細胞を 12 個ずつ無作為に選び、各々の平均 HSL 値を求めた。なお、HSL 色空間では H は色相（0~360）、S は彩度（0~100）、L は輝度（0~100）を表し、これら 3 つの数値の組み合わせで色が決定される。

3. 結果

角化物、表層細胞、深層細胞の HSL 値と HSL 色空間を示す（表 1, 2, 3）。また、変化の大きかった S 値をグラフとして示す（図 1, 2, 3）。固定後 30 分での染色性と比較して、4℃ 保管した細胞は 4 日後および 9 日後に染色しても角化物と表層細胞、深層細胞に染色性変化はほとんどみられなかったが、14 日後では若干変色が見られた。24℃ および 37℃ ではすべての細胞および角化物において 4 日後でも染色性に若干の変化が見られ、9 日後 14 日後では染色性は大きく変化した。特に 37℃ では著明に変色した。

4. 考察

TACAS 法を用いた細胞診では 4℃ で 9 日間は色調に変化が少なく、実際の顕微鏡下でも色調の変化に大きな違いはなかった。しかし 24℃ あるいは 39℃ の環境下では 4 日後でも特に深層細胞に

色調の変化が見られたことから、保存液を室温で輸送する場合は 4 日までに標準化したほうが良いことが明らかとなった。

また、今回、色調を HSL 値で評価したところ、ある程度経時的に鮮やかさが変化することが明らかとなったことから、たとえば、温度や日数によって色調が変化したとしても、デジタル的に復元できる可能性が示唆された。

	4℃	24℃	37℃
30分後		26 60 60	
4日後	27 57 55	25 57 59	26 50 61
9日後	27 54 60	19 51 64	19 51 62
14日後	27 60 60	25 51 65	16 50 68

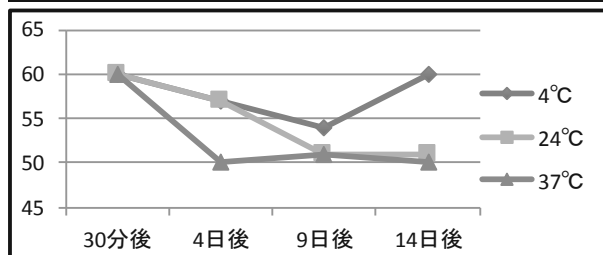


表 1、図 1：角化物の HSL 値と鮮やかさの経時的変化

	4℃	24℃	37℃
30分後		339 46 70	
4日後	337 37 68	329 38 66	328 37 75
9日後	336 38 71	323 41 69	322 38 67
14日後	336 48 70	323 39 66	320 30 68

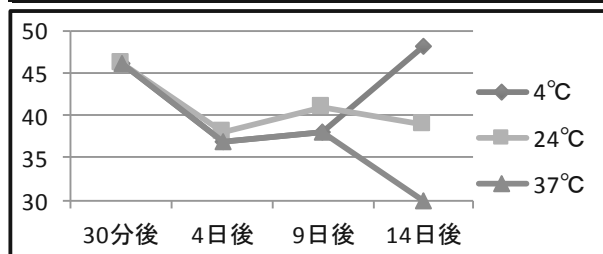


表 2、図 2 表層細胞の HSL 値と鮮やかさの経時的変化

	4℃	24℃	37℃
30分後		187 28 60	
4日後	194 26 66	201 21 70	205 21 70
9日後	198 24 69	201 20 71	219 19 74
14日後	197 26 66	208 19 76	211 18 75

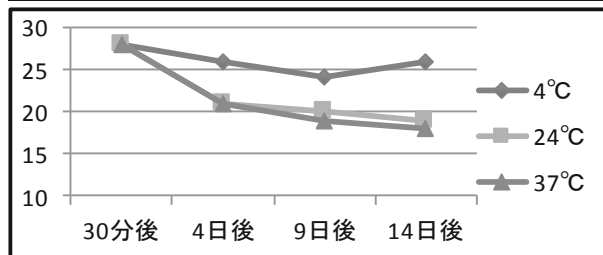


表 3、図 3 深層細胞の HSL 値と鮮やかさの経時的変化

初期遺伝子 (E1, E4) はヒトアデノウイルス DNA 複製に必須である

02134012 辻岡義崇

指導教員：安田元昭 口腔分子微生物学教室

キーワード：ヒトアデノウイルス、初期遺伝子

1. 緒言

ヒトアデノウイルスは約 3 万 6 千塩基対からなる二重鎖直鎖状 DNA ウィルスである。ウィルスカプシドは直径約 80nm の正 20 面体の球形粒子をしており、エンベロープは持たない。アデノウイルスは感染性胃腸炎、ライノウイルス等とともに、「風邪症候群」を起こす主要病原ウィルスの一つと考えられている。ヒトアデノウイルスには転写単位が 17 個あり、それぞれが 1 から 8 個のタンパク質遺伝子を含んでいる。またそれぞれの転写単位から選択的スプライシングによって複数の異なった mRNA が転写される。

これらの内、感染後 8 時間程度で発現する遺伝子群を初期遺伝子と呼び、E1 から E4 までの領域がゲノム上に存在しており、翻訳されたタンパク質は、主にウィルスゲノムの複製や転写の制御と、宿主の感染応答の抑制に関与すると考えられている⁽¹⁾。ゲノム複製には E2 に存在する DNA ポリメラーゼが必須であるが、この DNA 複製に E4 領域が関与するか否かについては不明な点が多い。今回の実験では E1 あるいは E4 領域を欠損した変異ウィルスを用い、ウィルスゲノム量を定量的に比較することによって E4 のウィルスゲノム DNA 複製における役割について解析を行った。

2. 方法

宿主細胞には、ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いた。野生型 wt300、E1A 欠損ウィルスとして dl312、E1B 欠損ウィルスとして dl313、E4 欠損ウィルスとして dl366 を使用した。1X10⁵ 個の細胞に対して m. o. i=20pfu のウィルス濃度で感染を行い、感染 2 時間後および 2 4 時間後の細胞から抽出した総タンパク質およびゲノム DNA を出発材料とした。

E1A、E1B19K、E1B55K に対するモノクローナル抗体を用いた Western Blot 法によりそれぞれの感染細胞における初期遺伝子産物の発現を確認した。E4 に関しては RT-PCR 法により E4 mRNA の発現の有無を確認した。

アデノウイルスゲノム DNA に対するプライマーによる RealTime PCR 法によりウィルスゲノム量を定量的に計測した。内部標準には GAPDH を用いた。

3. 結果

図 1 に Western Blot の結果を示した。それぞれの欠損部位に対応する初期遺伝子産物が発現していないことが確認されたが、E1A 欠損ウィルスである dl312 感染細胞に

おいては E1B19K の発現は確認されたが E1B55K は今回の実験の検出感度外であることがわかった。

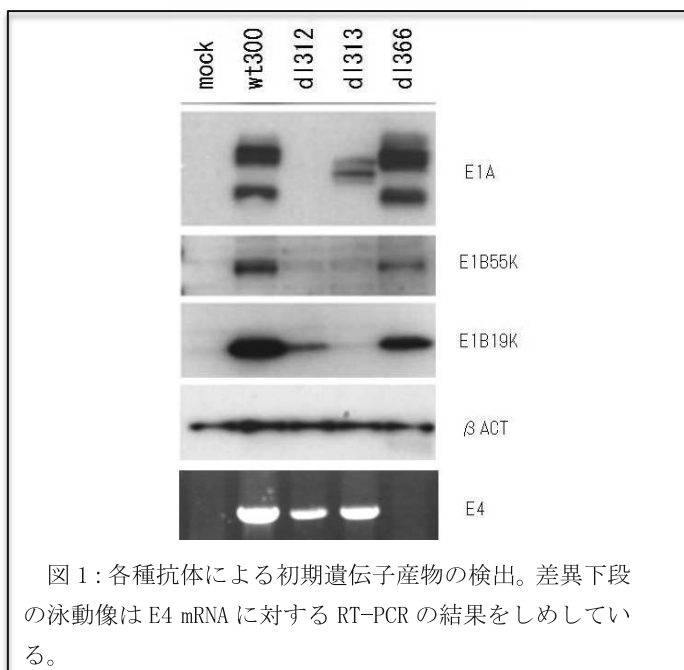


図 1：各種抗体による初期遺伝子産物の検出。差異下段の泳動像は E4 mRNA に対する RT-PCR の結果をしめしている。

図 2 に RealTime PCR の結果を示す。

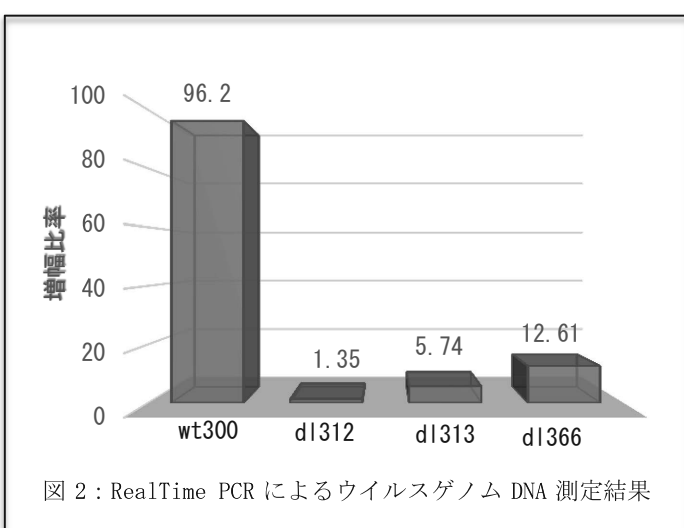


図 2：RealTime PCR によるウィルスゲノム DNA 測定結果

図に示すごとく E1 領域の欠損、および E4 領域の欠損はそれぞれ独立してゲノム DNA 複製効率に影響を与えていた。

4. 考察

今回の結果から、アデノウイルスゲノム DNA の複製には E1 だけでなく E4 が必要であることが確認された。複製に必要な E2 領域の転写において、E4 領域のいくつかのタンパク質が重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

5. 参考文献

(1) Adenoviridae: The Viruses and Their Replication, Fields Virology 4th Edition, David M. Knipe, p2265-2300 (2001), Lippincott Williams & Wilkins

アデノウイルス構造タンパク質発現には E4 領域の orf3 と orf6 が必須である

Orf3 and orf6 in the E4 region are essential for expression of adenovirus structural proteins

02134028 中川 愛子

指導教員：口腔分子微生物学教室／安田 元昭

キーワード：ヒトアデノウイルス、Hexon、E4

1. 緒言

ヒトアデノウイルスは約 3 万 6 千塩基対からなる二重鎖直鎖状 DNA ウイルスである。ウイルスキャプシドは直径約 80nm の正 20 面体の球形粒子をしており、エンベロープは持たない。アデノウイルスは感染性胃腸炎、ライノウイルス等とともに、「風邪症候群」を起こす主要病原ウイルスの一つと考えられている。アデノウイルスは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する CAR タンパク質をレセプターとして宿主細胞内に取り込まれる。そして E1A の転写をきっかけとして各種の初期遺伝子が活性化され、ウイルスの DNA ポリメラーゼや DNA 結合タンパク質、感染細胞のアポトーシスを抑制する物質が合成される。さらに E1A はウイルスの DNA 複製に都合のよい S 期に誘導する。その後、ウイルス DNA の複製が始まると後期遺伝子が発現され、キャプシドなどが合成され成熟したウイルスとなる⁽¹⁾。後期遺伝子群の発現機構には E4 領域の関与が報告されているがその詳細については不明な点が多い。今回の実験では E4 領域のオープンリーディングフレームを個別に欠損させた変異プラスミドを用い、キャプシドタンパク質の 1 つである Hexon タンパク質発現を比較することによって E4 のうちどの遺伝子が後期遺伝子群の発現機構において重要な役割をはたしているのかを解析した。

2. 方法

宿主細胞には、ヒト胎児腎由来の HEK293 細胞を用いた。野生型 wt300、E4 欠損ウイルスとして d1366 を使用した。1X10⁵ 個の細胞に対してプラスミド導入し、6 時間後に d1366 を m. o. i=20pfu のウイルス濃度で感染させた。感染 24 時間後の細胞から抽出した総タンパク質を出発材料とした。図 1 に作成した変異プラスミドを示した。

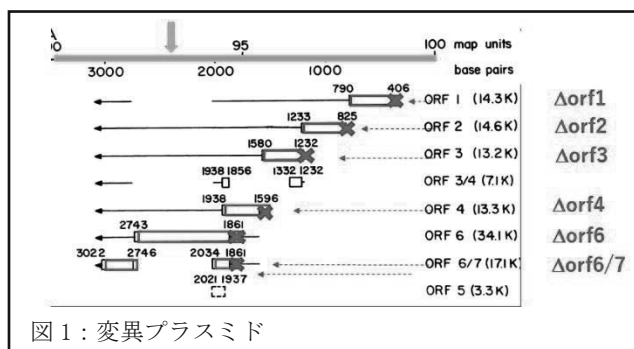


図 1：変異プラスミド

SDS PAGE の後、ニトロセルロース膜にセミドライ法により転写を行い、タンパク質を抗 Hexon ポリクローナル抗体により検出した。

3. 結果

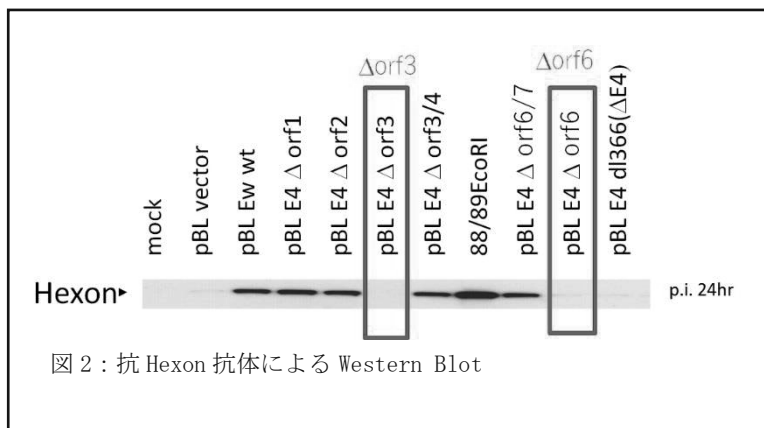


図 2：抗 Hexon 抗体による Western Blot

図 2 に示すごとく、d1366 単独では Hexon タンパク質の発現は検出感度以下であったが、E4 を共導入することによって顕著な Hexon タンパク質の発現が確認された。図から明らかなように、E4 orf3 および E4orf6 の非発現ミュータントプラスミドの共導入では Hexon タンパク質の発現は認められなかった。

4. 考察

後期遺伝子転写単位 L1-L5 は増殖サイクルの後期になって転写され、主にウイルスのカプシド形成に関わり、今回対象とした Hexon は L3 にコードされている。これらは単一のプロモーター領域で制御されており、ひとつの転写開始点から転写を開始し、下流にある 5 つの転写終結点のいずれかでランダムに転写を終結して 5 種類の mRNA 前駆体を生じ、さらに選択的スプライシングによって様々なタンパク質をコードする mRNA になる。このプロモーターは後期主要プロモーターと呼ばれ E1A により制御されていることがわかっているが⁽¹⁾、今回の実験から E4 領域の E4 orf3 および E4orf6 の発現が必須であることがわかった。E4 orf3 と E4orf6 がそれぞれ独立して発現に関わっているかについては今後の重要な検討課題であると考えられた。

5. 参考文献

(1) Adenoviridae: The Viruses and Their Replication, Fields Virology 4th Edition, David M. Knipe, p2265-2300 (2001), Lippincott Williams & Wilkins

持続的な *Candida albicans* 摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響について

02130637 中川紗百合

指導教員:長谷部 晃 (口腔分子微生物学教室)

キーワード: *C. albicans*, 腸内細菌叢

1. 緒言

腸内細菌と全身の関わりにおいて、腸は多くの神経や血管が集中しており、脳と密接に影響を及ぼし合うことから腸は第二の脳と言われている。また、腸内細菌は自閉症やうつ病、自閉症、肥満、炎症性腸疾患とも関連があると言われており、糞便移植などによる治療効果が期待されている。本実験では持続的な *C. albicans* 摂取が腸内細菌叢に及ぼす影響についてマウスを用いて調べた。

2. 方法

C. albicans の定着に使用したのは GFP 遺伝子を有する *C. albicans* pACT1-GFP を用いた。マウスは、C57BL/6 マウスの 4 週齢のメスを使用し、カンジダ選択培地にはカンジダ GS 培地を用いた。マウスへのカンジダの接種にはゾンデを使用した。マウスへのカンジダの摂取のスケジュールとしては、実験に先立ち、マウス腸管にもともとカンジダがないことの確認をし、マウスを 4 匹ずつの 2 つのグループに分けた。一方はカンジダを接種させ、もう一方は接種せず、両グループともエサには AIN-93G を用い、二週間摂食させた後に 16 時間の絶食を行った。一方のグループには、*C. albicans* を定着させるために *C. albicans* を経口的に接種した。二週間後、マウスから糞便を採取して、カンジダ GS 培地を用いて *C. albicans* が定着していることを確認し、糞便中の腸内細菌叢の変動を T-RFLP 法を用いて調べた。

T-RFLP は、適切な制限酵素を用いることで塩基配列の異なる遺伝子を、異なる長さの断片として分離し、微生物群集構造を解析する手法であり、微生物集団の構成を、比較的少ない手間で分析することができるという利点がある。手順としては、まず、マウスの糞便中から全 DNA の抽出をし、次に、rRNA 遺伝子上にある全細菌に共通な配列をプライマーに蛍光標識し、PCR で増幅をした。DNA を特定の位置で切断することが可能である制限酵素で DNA を切断し、電気泳動によって解析を行い、蛍光標識された末端を含む PCR 産物を検出し、DNA 断片の数や蛍光の強度を測定することで、細菌の構成を解析した。今回の実験では、この解析は外部に依頼した。

3. 結果

C. albicans を摂取していないマウス (図 1) に比べて、*C. albicans* の定着したマウスの糞便中では、通性嫌気性菌である *Lactobacillales* 目の増加と偏性嫌気性菌の減少が起こった (図 2)。特に偏性嫌気性菌に関し、ヒトにおいても正常な腸内細菌叢に多く見られる *bacteroides* の減少が見られた。

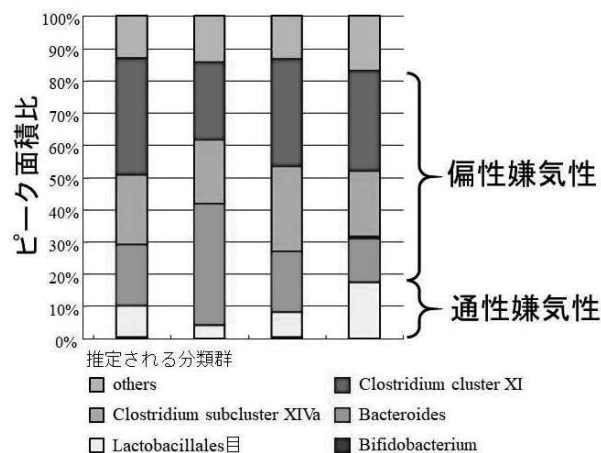


図 1. *C. albicans* を摂取していないマウス (4 匹) の糞便中における腸内細菌叢

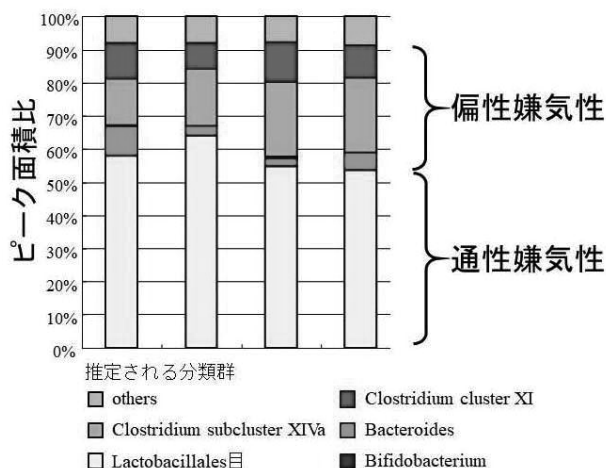


図 2. *C. albicans* を摂取したマウス (4 匹) の糞便中における腸内細菌叢

4. 考察

C. albicans を定着させたマウスの糞からは、摂取していないマウスに比べて通性嫌気性菌の割合が多く検出された。*C. albicans* によって腸内細菌叢のバランスが変化するということが言える。*Lactobacillales* の割合が増加することで、腸内環境を整える良い働きがある可能性がある一方、腸内細菌の多様性の減少によって生じる腸内毒素症は偏性嫌気性菌の減少と通性嫌気性菌の増加を伴うと言われており、腸内細菌叢のバランスが全身疾患に影響を及ぼす可能性もあるため、今後さらなる研究で確かめる必要がある。

Candida albicans の持続的な摂取が全身に及ぼす影響について

02134028 國井理恵子

指導教員：長谷部 晃（口腔分子微生物学教室）

キーワード：*C. albicans*, 腸内細菌叢, 腸炎, IgA

1. 緒言

C. albicans を持続的に摂取すると腸内細菌叢が変化することから、本研究では、*C. albicans* を持続的に摂取することで引き起こされた腸内細菌叢変動の原因を明らかにすること、そして腸内細菌叢が変化したことによって、全身状態に何らかの影響が生じるかどうかを、調べることを目的とした。

2. 方法

GFP 遺伝子を有する *C. albicans* pACT1-GFP と、C57BL/6 マウス 4 週齢のメスをを用いた。大腸炎誘導には、3.5%デキストラン硫酸ナトリウム水（DSS 水）を使用した。マウスはそれぞれ *C. albicans* を定着させなかったグループと定着させたグループを用意し、さらに飼育に与える水を通常の水、あるいは DSS 水を与えるグループとすることで、合計 4 匹ずつ 4 グループに分けた。これら 4 つのグループの体重変化を調べることで大腸炎の状態を評価することとし、*C. albicans* を接種後、さらに水または DSS 水の摂取開始後も体重測定をした。1 週間後に糞便を採取したのちに、含まれる IgA の量を ELISA 法で測定した。ELISA 法について簡単に説明すると、まず、96 穴プレートのすべての底面に抗 IgA 抗体を結合させ、その穴にマウス糞便を潰して攪拌した上清を加えた。糞便中の IgA は、底面の抗 IgA 抗体に結合する。そこに、ビオチン標識した抗 IgA 抗体を加えると結合するので、さらにアビジン標識した酵素を加えると、結果として糞便中の IgA 抗体は、アビジン標識した酵素が結合しているという状況になる。そこで、この酵素に反応する基質を加え発色させ、吸光度を測定することで、糞便中の IgA 量を算出した。

3. 結果と考察

図 1 は、実験開始時のマウスの体重を 100%としたときの経日変化を表す。*C. albicans* が定着していなく、通常の水を与えたコントロールグループを、実験結果の比較基準とした。*C. albicans* が定着しており、水を与えたグループとコントロールグループと比較すると、体重変化に有意差はないことがわかった。*C. albicans* が定着していなく、DSS 水を与えたグループについては、DSS 水飲むと、腸炎を起こして下痢を起こすため、明らかな体重減少が生じ、実験開始 7 日間で 85%程度まで減少した。*C. albicans* が定着しており、DSS を与えたグループと、DSS 単独のグループとを比較すると、前者は *C. albicans* が定着していることでより大きな体重減少が生じると予想されたが、有意差がなかった。これらの結果を総合すると、水を与

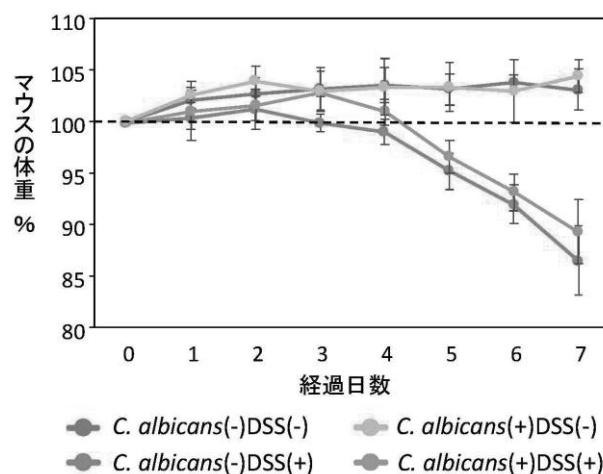


図 1. マウスの体重変化。-と+ はそれぞれの有無を表す。

えた場合も、DSS を与えた場合も、体重減少には腸内細菌叢における *C. albicans* の有無が影響しないということであり、この実験条件では腸炎の状態には腸内細菌叢の変動が影響しないことがわかった。

次に、IgA は腸管における重要な免疫グロブリンであり、その量の変化が腸内細菌叢に影響を与えている可能性があることから、糞便中の IgA の量を調べた（図2）。IgA の

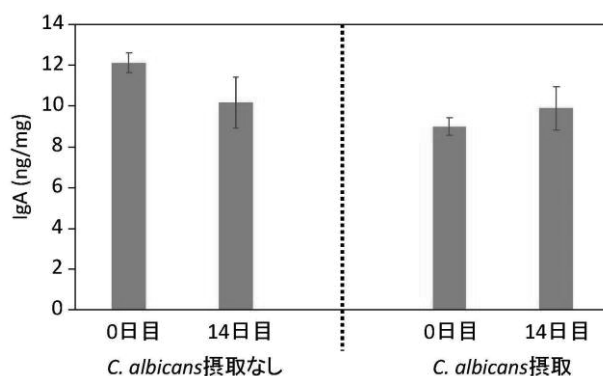


図 2. 糞便中の IgA の量。

量については、*C. albicans* 接種前（0 日目）と *C. albicans* 定着後 14 日の二度測定することで *C. albicans* 定着が腸管内の IgA 量に与える影響を調べた。*C. albicans* を定着させなかったグループでは、そもそも *C. albicans* はいないため、0 日目も 14 日目も糞便中の IgA の量に有意差はなかった。また、*C. albicans* を定着させたグループについても、0 日目と 14 日目で有意差はなかった。したがって、*C. albicans* の有無は腸内細菌叢に影響を与えるが、IgA の量には影響を及ぼさないことがわかった。*C. albicans* 定着により明らかに腸内細菌叢に変動があるため、今後は、DSS の濃度条件を検討し、体重変動がゆるやかに起こる条件での実験を行うことや、糞便中の IgA の特異性についての検討などが必要であると思われる。

Mycoplasma salivarium 由来リポペプチド FSL-1 はマウスマクロファージの細胞質へ局在し NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導する

02130896 林 拓哉

指導教官：佐伯 歩（口腔微生物学教室）

キーワード：*M. salivarium*, NLRP3 インフラマソーム, IL-1 β , マイコプラズマ由来リポタンパク質, FSL-1

緒言

Mycoplasma salivarium は、歯周疾患患者の歯周ポケット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有意に高いことから、歯周疾患に関与していると考えられている(1, 2, 3)。歯周炎において重要な病因的役割を果たしている炎症性サイトカイン IL-1 β は caspase-1、NLRP3 ならびに ASC の 3 分子複合体であるインフラマソームの活性化で誘導される(4, 5)。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(6, 7)、さらにこれらのマイコプラズマの有する活性物質の一つは、両マイコプラズマの細胞膜に存在するリポタンパク質 (LP)・リポペプチドであること(8)を報告した。本研究では、LP・リポペプチドが NLRP3 インフラマソームの活性化を誘導するためには、標的細胞の細胞質に局在する必要があるのかどうかを明らかにすることを目的とした。

方法

標的細胞としては、C57BL/6 マウスから分化誘導した骨髄由来マクロファージ(BMM)を用いた。BMM を LPS で 4 時間刺激した後に、*M. salivarium* 由来リポペプチド FSL-1 で 24 時間刺激し、上清に放出された IL-1 β 量を ELISA 法で測定した。トランスフェクション試薬は PULSin (PolyPlus Transfection) を用いた。FSL-1 の細胞質への局在は、FITC 標識した FSL-1 (FITC-FSL-1) を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

結果ならびに考察

BMM を FITC-FSL-1 で刺激すると、FITC-FSL-1 が細胞質に取り込まれていること、さらにトランスフェクションにより細胞質への局在が有意に増加していることが観察された (図 1)。FSL-1 による IL-1 β 産生誘導活性は、BMM の細胞質に直接 FSL-1 を導入することで有意に上昇した (図 2)。以上のことから、FSL-1 はマウスマクロファージの細胞質に局在することで NLRP3 インフラマソームを活性化することが示唆された。

参考文献

- Engel LD, Kenny GE. *Mycoplasma salivarium* in human gingival sulci. J Periodontal Res. 5(3), 163-71, 1970
- Kumagai K, Iwabuchi T.他 3 名, Incidence, species, and significance of *Mycoplasma* species in the mouth. J Infect Dis. 123(1), 16-21, 1971
- 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
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. J Periodontol, 74(3), 391-401, 2003
- von Moltke J, Ayres JS.他 3 名, Recognition of bacteria by inflammasomes. Annu Rev Immunol, 31, 73-106, 2013
- 前川 翠, *Mycoplasma salivarium* によるインフラマソームの活性化, 研究実習報告集 第 15 号, 50-51, 2014
- 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
- 木村 拓, 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, 研究実習報告集 第 18 号, 46, 2017

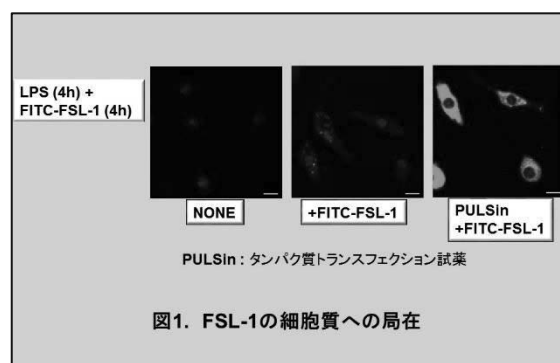


図1. FSL-1の細胞質への局在

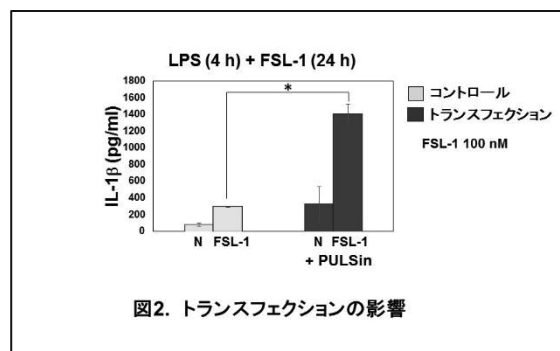


図2. トランスフェクションの影響

Mycoplasma salivarium 由来リポペプチド FSL-1 はマクロファージの細胞質へ局在し NLRP3/ASC speck の形成を誘導する

02134023 福本 哲也

指導教員：佐伯 歩（口腔分子微生物学教室）

キーワード: *M. salivarium*, FSL-1, NLRP3/ASC speck, インフラマソーム

緒言

炎症性サイトカインの一つである IL-1 β は caspase-1、NLRP3 ならびに ASC の 3 分子複合体であるインフラマソームの活性化で誘導される(1)。共同研究者(林の研究実習報告書参照)が、*M. salivarium* 由来リポペプチド FSL-1 はマウスマクロファージの細胞質に局在することで NLRP3 インフラマソームを活性化することを明らかにした。そこで、FSL-1 が細胞質へ移行するメカニズムならびに NLRP3 インフラマソームを活性化するメカニズムを明らかにする第一段階として、本研究では FSL-1 が細胞質へ移行するタイムコースならびに NLRP3 インフラマソームと FSL-1 が共局在するかどうかを明らかにすることを目的とした。

方法

標的細胞としては、C57BL/6 マウス骨髄由来マクロファージ(BMM)を用いた。BMM を LPS で 4 時間刺激した後に、FITC 標識した *M. salivarium* 由来リポペプチド FSL-1 (FITC-FSL-1) で刺激した。30 分、1、2、3、5、10 時間後に、lysosome marker である Lamp-1 の抗体で免疫染色した。24 時間後に、抗 NLRP-3 抗体ならびに抗 ASC 抗体で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

結果および考察

FSL-1 刺激、30 分後、1 時間後では、FSL-1 は Lamp1 とは別の部位のエンドソームに局在していた。刺激後 2 時間程で、FSL-1 を含むエンドソームとリソソームの融合が観察され、すでに一部の FSL-1 は細胞質に局在していた(図 1, 2)。FSL-1 は NLRP3/ASC 複合体 (speck) の形成を誘導したが、speck と FSL-1 との共局在は見られなかった(図 3)。

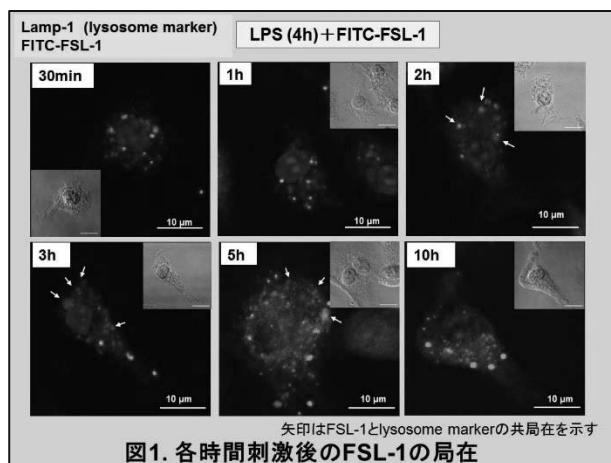


図1. 各時間刺激後のFSL-1の局在

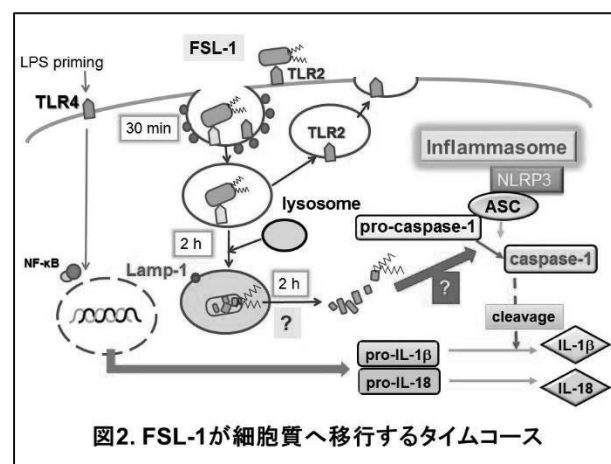


図2. FSL-1が細胞質へ移行するタイムコース

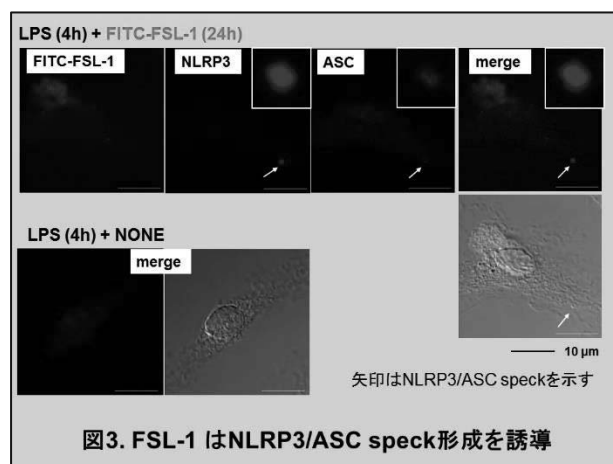


図3. FSL-1 はNLRP3/ASC speck形成を誘導

参考文献

1. von Moltke J, Ayres JS.他 3 名, Recognition of bacteria by inflammasomes. Annu Rev Immunol, 31, 73-106, 2013

暗算作業効率に対するカフェインの効果

02134032 篠崎 保乃夏

指導教員：吉村 善隆（細胞分子薬理学教室）

キーワード：内田クレペリン検査、暗算作業効率、カフェイン

1. 緒言

カフェインは医薬品医療機器等法により劇薬に指定されている医薬品であるが、コーヒーや紅茶などカフェインを含有している飲料は多数存在している。カフェインは脳皮質に作用し、精神・運動・知覚機能を高めることが知られている。そこで、今回、クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として、短時間におけるカフェイン含有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 および B 二名に、各種飲料の摂取前後に内田クレペリン検査（図 1）を行った。内田クレペリン精神作業検査とは、クレペリンが実験心理学的研究のために考案したものを、内田勇三郎が翻案したパーソナリティー検査である。

検査は二人一組で一名が監督者、もう一名が受検者として交互に行い、一人目が開始してから 7 分 30 秒後に二人目が開始し、検査時間が重ならないようにした（図 2）。作業慣れによる影響を排除するため、第 2 時点の中央値をパーセント回答数 100% とし（縦軸）、第 2 時点（②）と第 3 時点（③）との間に各種飲料を摂取した。なお、コントロールは何も摂取しなかった場合の結果を示している。それぞれ 4 回行い、この摂取前後の暗算作業効率の変化から各種飲料の効果を比較検討した。参考文献 3）の報告により、5% 以上の上昇が認められれば効果があると判定した。

飲料として、コーヒー（140ml（カフェイン 84mg）：ペーパーフィルター用イタリアンロースト：カルディ）、および紅茶（140ml（カフェイン 70mg）：アールグレイティーバッグ：トワイニング）、緑茶（140ml（カフェイン 28mg）：香りの緑茶ティーバッグ：宇治園）、ハーブティ（140ml（カフェイン 0mg）：カモミールティーバッグ：トワイニング）を用いた。

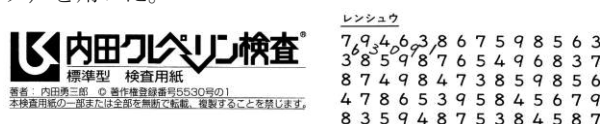


図 1 内田クレペリン検査用紙

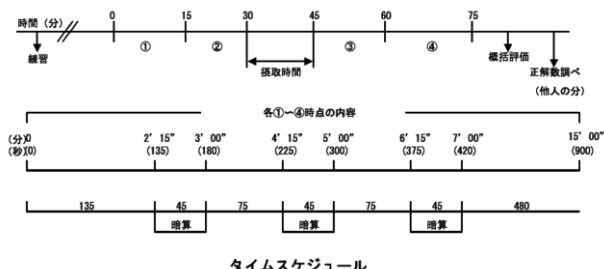


図 2 測定のタイムスケジュール

3. 結果

被験者 A、被験者 B ともに、カフェイン含有飲料であるコーヒー、紅茶（図 3）、カフェイン含有量が少ない緑茶、カフェインを含有していないハーブティ（図 4）のいずれも作業効率の向上が認められなかった。嗜好性に関して調べたところ、被験者 A、被験者 B ともに、毎日、カフェイン

含有飲料を摂取しており、今回使用した飲料全てが好みの味であった。

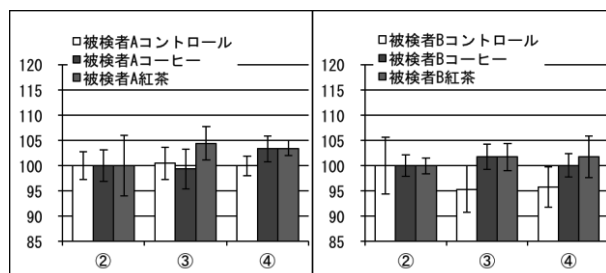


図 3 コーヒー・紅茶

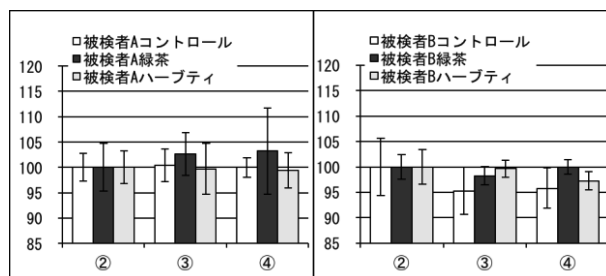


図 4 緑茶・ハーブティ

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。カフェインの作用発現時間 15～30 分と報告されているので、作用発現前に検査を行った可能性は低いと考えられる。被験者二名ともに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。

今回、カフェインが配合されていないハーブティで作業効率の向上が認められなかったことから、休憩によって生じる気分転換によるリフレッシュ効果、リラックス効果も認められなかった。

今回の結果は、プラセボを用いた二重盲検試験ではなく、また、被験者も二名であることから一般的な効果を示すことはできないが、今回の被験者においては、カフェインによる短時間における暗算作業効率の向上は認められず、また、リフレッシュ効果、リラックス効果も認めなかった。従って、カフェイン含有飲料を毎日摂取している場合、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、成宮周 編集：NEW 薬理学改訂第 7 版. 南江堂，東京，2017.
- 2) 大谷啓一 監修：現代歯科薬理学 第 6 版. 医歯薬出版社，東京，2018.
- 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.

暗算作業効率に対するエナジードリンクの効果

02134035 春藤 彩花

指導教員：吉村 善隆（細胞分子薬理学教室）

キーワード：内田クレペリン検査、暗算作業効率、エナジードリンク

1. 緒言

エナジードリンクは精神的、肉体的疲労時のリフレッシュ気分を味わうことを目的として販売されているが、その効果について知ることはほとんどない。そこで本実験では、クレペリン検査を用いた暗算作業効率を指標として、短時間におけるエナジードリンクの効果について検討した。

2. 材料と方法

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

検査は二人一組で一名が監督者、もう一名が受検者として交互に行い、一人目が開始してから7分30秒後に二人目が開始し、検査時間が重ならないようにした（図2）。作業慣れによる影響を排除するため、第2時点の中央値をパーセント回答数100%とし（縦軸）、第2時点（②）と第3時点（③）との間に各種ドリンク剤を摂取した。なお、コントロールは何も摂取しなかった場合の結果を示している。それぞれ4回行い、この摂取前後の暗算作業効率の変化から各種ドリンク剤の効果を比較検討した。参考文献3）の報告により、5%以上の上昇が認められれば効果があると判定した。

ドリンク剤として、コーヒー（140ml（カフェイン84mg）：ペーパーフィルター用イタリアンロースト：カルディ）、清涼飲料水であるレッドブル（185ml（カフェイン80mg）：レッドブル）およびモンスターウルトラ（177.5ml（カフェイン71mg）：アサヒ飲料）、第3類医薬品であるリポビタンゴールドX（50ml（カフェイン50mg）：大正製薬）を用いた。

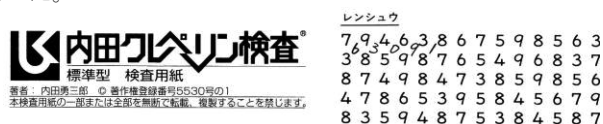


図1 内田クレペリン検査用紙

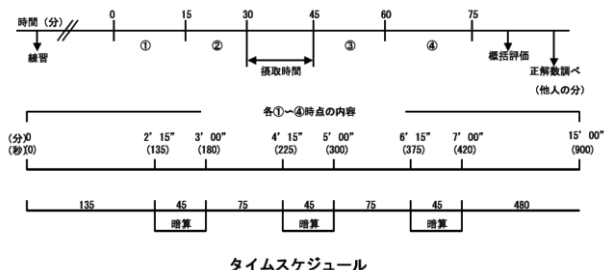


図2 測定タイムスケジュール

3. 結果

被験者A、被験者Bともに、カフェイン含有飲料であるコーヒー、レッドブル（図3）、リポビタンゴールド、モンスターウルトラ（図4）のいずれも作業効率の向上が認められなかった。過去の研究実習の結果から作業効率の向上と嗜好との関連性が認められているので、嗜好に関して調べたところ、被験者A、被験者Bともに、毎日、カフェイン含有飲料を摂取しており、今回使用した飲料全てが好

みの味であった

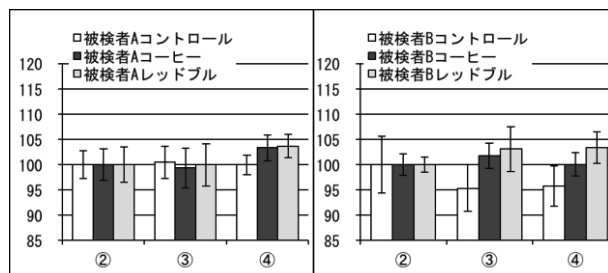


図3 コーヒー・レッドブル

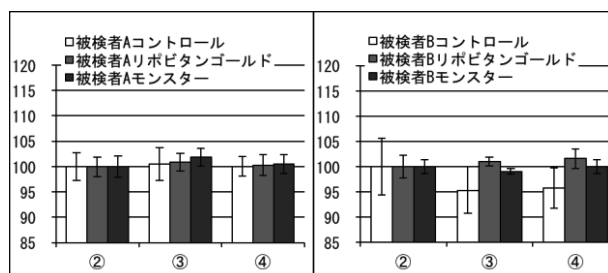


図4 リポビタンゴールド・モンスター

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ことを示唆しているが、今回は認めなかった。また、疲労回復作用があると報告されているタウリンの効果も認めなかった。アメリカで販売されているモンスターウルトラおよびレッドブルにはタウリンが配合されているが、医薬品医療機器等法の規定により、日本で販売されているモンスターウルトラおよびレッドブルには配合されておらず、清涼飲料水である。タウリンが配合されるリポビタンゴールドは第3類医薬品である。また、モンスターウルトラはノンカロリーであり、レッドブルに含まれるぶどう糖、リポビタンゴールドXに含まれる白糖による効果も認めなかった。

今回の結果は、プラセボを用いた二重盲検試験ではなく、また、被験者も二名であることから一般的な効果を示すことはできないが、今回の被験者においては、エナジードリンクによる暗算作業効率の向上は認められず、また、タウリン、糖類の効果も認めなかった。従って、カフェイン含有飲料を毎日摂取している場合、エナジードリンクによる短時間における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、成宮周 編集：NEW 薬理学改訂第7版. 南江堂，東京，2017.
- 2) 大谷啓一 監修：現代歯科薬理学 第6版. 医歯薬出版社，東京，2018.
- 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.

歯科修復材料に関連する諸性質の評価

02134025 船戸 佑基

指導教員：南川 元（細胞分子薬理学教室）

キーワード：フッ化物、ジャイオマー、コンポマー

1. 緒言

GIC、レジン添加型 GIC、コンポマー、ジャイオマーなど、臨床ではフッ素含有歯科修復材がいくつか存在する。それら材料においては、マトリックス、硬化機構が異なるため、フッ化物放出能力が異なる。修復材の抗菌性および抗蝕性は、フッ化物放出量に関連すると考えられている。GIC およびフッ素化ガラスフィラーを含有するレジンベース材料のフッ化物放出能力を調べることを目的に論文検索を行った。

2. 方法

2 編の論文を読み、GIC、レジン添加型 GIC、コンポマー、ジャイオマーのフッ化物放出性およびリチャージ後の再放出性について評価した。

3. 結果

論文 1 の概要については以下の通りである。

フッ化物含有材料から放出される F の量を測定するために、4 つの GIC (Fuji IX、Fuji VII、Fuji IX Extra および Fuji II LC)、コンポマー (Dyract Extra)、ジャイオマー (Beautifil) を本研究で使用した。フッ化物放出量を、第 1 週、14 日目、21 日目に測定したところ、図 1 に示した結果となった。

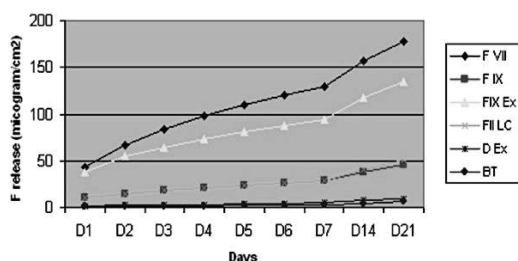


図 1 フッ化物放出量

Beautifil と Dyract Extra に比べて Fuji IX、Fuji VII、Fuji IX Extra、Fuji II LC ではフッ化物放出率が高かった。Dyract Extra と Beautifil はともにフッ化物の放出量が少なかったが、Dyract Extra は Beautifil と比べてフッ化物を多く放出した。

論文 2 の概要については以下の通りである。

従来型 GIC (Fuji II)、光重合レジン添加型 GIC (Fuji II LC)、ジャイオマー (Beautifil II)、コンポマー (Dyract) など種々の修復材料へのフッ化物放出量とリチャージ後における再放出量を測定した。フッ化物放出量は 1 日目、7 日目、15 日目に測定した。15 日後、各材料をそれぞれ 5 つのサンプルずつの 3 つのサブグループに分け、サブグループ A をコントロール群として使用し、サブグループ B を 2% NaF 溶液、サブグループ C を 1000ppm F の歯磨剤に曝露した。フッ化物再放出量は、1 日目、7 日目、15 日目に測定した。結果は、図 2、3 に示した通りとなり、1 日

目、7 日目、15 日目のフッ化物放出を比較すると、すべての材料で、1 日目が最高で、7 日目まで徐々に減少したが、その後、GIC、レジン添加型 GIC からのフッ化物放出が急激に減少したのに対し、ジャイオマー、コンポマーでの値は時間が経過してもほぼ一定のままであった。種々の修復材料のリチャージにおいて、フッ化物の再放出は、2% NaF 溶液の方がフッ化物歯磨剤と比較して高かった。GIC は大きなリチャージ能力を有しており、レジン添加型 GIC がそれに続いた。ジャイオマーとコンポマーの内、ジャイオマーはより高いリチャージ能力を有していた。両方の曝露においても、フッ化物再放出は 1 日目に最大であり、7 日目まで急激に減少し、その後減少は緩やかであった。

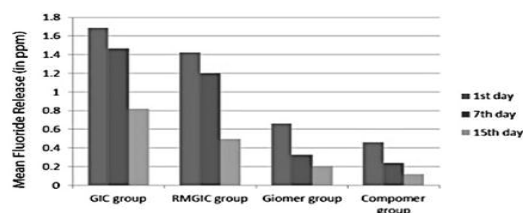


図 2 硬化後のフッ化物放出量

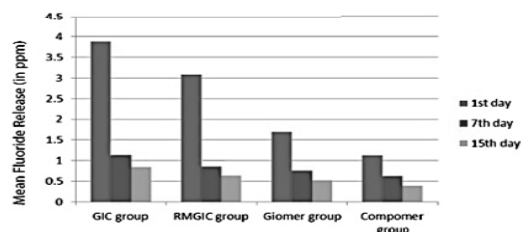


図 3 リチャージ後のフッ化物放出量

4. 考察

フッ化物放出性およびリチャージ後の再放出性において、GICの方がレジンベース材料よりも有意に高いことが示されたが、これは GIC にはフッ化物を入れるだけの細孔が存在するためと考えられる。しかしその反面、細孔の存在により、機械的性質はレジンベース材料よりも劣る。また、象牙質の脱灰は、わずか 1ppm のフッ化物濃度で阻害することができ、フッ化物が効果を発揮する至適条件は、毎日のフッ化物洗口による非常に低い濃度で達成することができるため、歯冠修復処置を行う際には、各々の材料の性質を熟知した上で行うべきである。今回の研究結果より、GIC とレジンベース材料との間に見られたような差異は、ジャイオマーとコンポマーの間には見られなかった。また、ジャイオマーはフッ化物イオン以外の各種イオンの徐放性を特徴とするため、諸性質の評価に関してはさらなる検討が必要といえる。

5. 参考文献

1. Fluoride release by glass ionomer cements, compomer and giomer. Mousavinasab SM, Meyers I. Dent Res J (Isfahan), 6, 75-81, 2009
2. A Comparative Evaluation of the Amount of Fluoride Release and Re-Release after Recharging from Aesthetic Restorative Materials: An in vitro Study. Bansal R, Bansal T. J Clin Diagn Res, 9:2C11-4, 2015

幼若永久歯の部分断髄症例における水酸化カルシウム、MTA セメント、バイオセラミックスの比較

02134026 河端アリア

指導教員：南川 元（細胞分子薬理学教室）

キーワード：幼若永久歯、部分断髄、水酸化カルシウム、MTA セメント、バイオセラミックス

1. 緒言

小児の幼若永久歯は外傷や中心結節の破折により歯髄壊死をしばしば起こしうる。

根が未完成な幼若永久歯が部分断髄処置を行い、アペキシフィケーション/アペキソゲネシスを達成するために現在使用されている材料について検討を行った。

2. 方法

Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth 4th Edition の幼若永久歯の処置についての部分と 2 編の英語論文を読み、歯髄壊死を起こした幼若永久歯における部分断髄処置での水酸化カルシウム、MTA セメント、バイオセラミックスの臨床結果についてまとめた。

3. 結果

論文 1 の概要については以下の通り。

6 歳半から 10 歳の子供の歯髄壊死を起こした根未完成歯（切歯）に対して超音波を併用したファイリング、手動のみでのファイリングと覆髄材料として、水酸化カルシウム、MTA セメントをそれぞれ組み合わせて処置を行い、根尖部硬組織形成に要する平均期間と完成した根の平均長径を比較したところ、それぞれ表 1、表 2 に示した結果となった。

（表 1：超音波を併用したファイリング、手用ファイリング、覆髄材料として水酸化カルシウムと MTA をそれぞれ組み合わせた時の根尖部硬組織形成に要する平均期間）

（表 2：超音波を併用したファイリング、手用ファイリング、覆髄材料として水酸化カルシウムと MTA をそれぞれ組み合わせた時の根の平均長さ）

表 1

	Case no.	Mean elongated root length (mm)	p (Student t test) ^a
Type of filing			0.695
Ultrasonic	20	2.8 ± 0.8	
Hand	20	2.9 ± 0.8	
Intracanal medication			<0.001
MTA	20	2.1 ± 0.2	
Ca(OH) ₂	20	3.6 ± 0.3	
Combination			<0.001
Group 1: ultrasonic + MTA	10	2.1 ± 0.2	
Group 2: ultrasonic + Ca(OH) ₂	10	3.5 ± 0.3	
Group 3: hand + MTA	10	2.1 ± 0.1	
Group 4: hand + Ca(OH) ₂	10	3.7 ± 0.3	

表 2

	Case no.	Mean duration of apical hard tissue barrier formation (wk)	p (Student t test) ^a
Type of filing			0.045
Ultrasonic	20	8.4 ± 3.2	
Hand	20	10.5 ± 3.2	
Intracanal medication			<0.001
MTA	20	6.6 ± 1.9	
Ca(OH) ₂	20	12.2 ± 1.6	
Combination			<0.001
Group 1: ultrasonic + MTA	10	5.4 ± 1.1	
Group 2: ultrasonic + Ca(OH) ₂	10	11.3 ± 1.3	
Group 3: hand + MTA	10	7.8 ± 1.8	
Group 4: hand + Ca(OH) ₂	10	13.1 ± 1.5	

また、水酸化カルシウムを覆髄材として使用した 20 症例のうち 16 症例が鋭い円錐状の根尖を形成し、MTA を使用した 20 症例のうちすべての症例が緩やかなカーブを描く根尖を形成した。

論文 2 の概要については以下の通り。

9 から 11 歳の 3 人の男児における、下顎小臼歯中心結節の破折による歯髄壊死を起こした症例に対して、それぞれバイオセラミックスと MTA セメントを用いて部分断髄を行い、治癒結果を比較した。

結果は、バイオセラミックス、MTA とともに部分断髄において良好な成績を示した。

臨床症状は消退し、誘発痛に正常な反応を示すようになり、根尖の X 線透過性は減少した。

根成長の持続も確認された。

4. 考察

結果より、根管内の洗浄においては超音波洗浄を併用しファイリングした方が臨床成績において優れていた。その理由としては、超音波洗浄とファイリングの併用により微生物の細胞壁を破壊することができ、細い根管においても高い洗浄効果をあげられるためである。

覆髄材料については材料ごとに特徴があった。

水酸化カルシウムは、緊密性は劣るが、残存歯髄や根尖部歯乳頭組織の保護に優れている。

MTA セメントは、根尖部に感染を波及させない密封性を有しているが、その密封性により歯髄や歯乳頭組織の働きを阻害する恐れがある。

バイオセラミックスは、生体適合性が良く、細胞障害性がなく、収縮を起こさない、化学的に安定な材料であり、MTA と同様の成績を収めている。バイオセラミックスを MTA と比較すると、毒性が低い、操作時間が長い、硬化時間が短い、除去が容易などといった点で優れている。

以上の点を踏まえ、適切な方法、材料を選択することで良好な治療成績が得られると考えられる。

5. 参考文献

1. Textbook and Color Atlas of Traumatic Injuries to the Teeth 4th Edition
J. O. Andreson F. M. Andreson L. Andreson
2. Comparison of clinical outcomes for 40 necrotic immature permanent incisors treated with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate apexification/apexogenesis. J Formos Med Assoc, Lee, LW et al., 114(2):139-46, 2015
3. Partial Pulpotomy of Immature Teeth with Apical Periodontitis using Bioceramics and Mineral Trioxide Aggregate: A Report of Three Cases. Chin J Dent Res Jiang, S et al., 114(2):139-46, 2016

根管拡大・根管洗浄の方法の違いにより得られる根管の清掃効果

02134033 吉田 理志

指導教員：南川 元（薬理学教室）

キーワード：歯内療法，根管拡大，根管洗浄

1. 緒言

感染根管治療は歯科臨床において必要不可欠な工程であるが、根管拡大・根管洗浄の質により歯の予後に大きな影響を与える。根管の清掃効果が高くなり、また安全性が高く作業効率の良い方法を見つけ出し、臨床応用に生かすことを目的に論文検索を行った。

2. 方法

1)Cohen' s Pathways of the PULP 2)Effect of apical expansion in decreasing microorganisms :a literature review 3)Irrigation of the root root canal の3つの文献から、感染根管治療における根管拡大の方法、大きさ、根管洗浄の方法、根管洗浄液の種類、またその組み合わせにより得られる根管の清掃効果の評価についてまとめた。

3. 結果

1)では、根管拡大と根管洗浄における基本的な情報を確認した。感染根管内の細菌減少を目的に根管拡大を行ったとき、90%以上の細菌を減少させることができる。しかし、根管はイスムス、フィンといった多様で複雑な解剖学的形態をとるため根管洗浄による化学的清掃を併用しなければ細菌を完全に除去することはできないため、根管洗浄の重要性についても言及されていた。また、現在最も用いられている根管洗浄液の1つである NaOCl について、洗浄液の温度と化学的清掃効果の相関について言及された。0.5% NaOCl を 20℃ で用いた場合 5.25% NaOCl, 20℃ の半分以下の組織溶解能しか示さない。しかしながら、0.5% NaOCl を 45℃ まで加熱した場合 5.25% NaOCl, 20℃ と同等の組織溶解能を示すことが分かった。さらに 0.5% NaOCl を 60℃ まで加熱すると 5.25% NaOCl, 20℃ の組織溶解能を超え、ほぼすべての根管内組織を溶解しうることも分かった。

2)では、根管拡大処置における根管内細菌の減少、トランスポート形成のリスク、根尖周囲組織への押し出しの観点から根管拡大の方法の評価がなされた。根管拡大量の増加に伴い根管内細菌は減少することが分かった。手用 K ファイルによるステップバック法と比較して、Ni-Ti ロータリーファイルによるクラウンダウン法を行ったときトランスポート形成のリスク、根尖周囲組織への押し出しの観点から優れているとされた。

3)では、各種根管洗浄液 (NaOCl, CHX, H₂O₂, EDTA,

Citric acid) 単独、またその組み合わせによる清掃効果の評価がなされた。組織溶解能、殺菌作用の観点から NaOCl が優れているとされた。また、NaOCl には無機溶解能がないためスメヤー層を除去する目的として EDTA, Citric acid と併用することで根管清掃効果が向上するとされた。CHX は再感染による感染根管治療における根管洗浄に優れており、また生体親和性が高いが組織溶解能がないという点で NaOCl に劣る。H₂O₂は単独で用いると他の根管洗浄液より殺菌作用が弱く、また NaOCl との併用による発泡作用により機械的清掃作用が期待されるが H₂O₂と NaOCl が相互に殺菌作用を打ち消しあってしまうため根管清掃効果は低いとされた。

また、根管洗浄は根管拡大後のみ行うのではなく根管拡大中もこまめに行うことが根管清掃において効果的であるとされた。

4. 考察

感染根管治療において根管内細菌の完全な除去の達成には根管拡大・根管洗浄の質が大きくかわることが分かった。特に、NaOCl で洗浄を行いながら Ni-Ti ロータリーファイルを用いて根管拡大を行い、根管拡大後 EDTA あるいは Citric acid によりスメヤー層を除去し NaOCl で根管洗浄を行うことが、今回の文献からは優れた感染根管治療であると考えられる。

しかし、根管の拡大量が増加するほど歯質は脆弱になるため、感染の程度により症例に応じた根管拡大が求められる。

また、根管拡大においては各メーカーの製品による違い、根管洗浄においては洗浄液の濃度や温度、また洗浄針の太さ、形状による違いにより結果に変化が現れる可能性が考えられるため、使用しているシステムへの習熟が求められると考えられる。

5. 参考文献

1) Cohen' s Pathways of the PULP 10th edition :Kenneth Hargreaves Louis Berman

2) Effect of apical expansion in decreasing microorganisms :a literature review :LA da SILVA et al. Dental Press Endod.5(3):41-8. 2015

3) Irrigation of the root root canal: Ellen Park et al. Endodontic topics 27(1):54-73, 2012