

北海道医療大学歯学雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北 医 療 大 歯 誌
第27巻 第2号 平成20年12月
目 次

〔原 著〕

- 1 Porphyromonas gingivalis無色突然変異株のバイオフィルム形成性
鎌口 有秀, 岡本 公彰, 五十嵐英次, 藤田 真理, 宮川 博史, 中澤 太……………(85)
- 9 成長期ラット顎関節円板におけるproteoglycanのmRNA発現
甲田 尚央, 鳥谷奈保子, 荒川 俊哉, 田隈 泰信, 溝口 到……………(93)

〔学位論文要旨〕

- 19 マルチモダリティ三次元画像融合による顎矯正手術シミュレーション法の確立
上地 潤……………(103)
- 23 高分子材料の重合収縮と熱収縮によって生じた金属・レジン接着界面の残留応力とメタルフレームの変形
垣野 健……………(107)

〔歯学情報〕

- 25 最近のトピックス……………(109)
- 47 北海道医療大学歯学会会則……………(131)
- 49 北海道医療大学歯学雑誌 投稿規程……………(133)
- 56 編集後記……………(140)

北海道医療大学歯学会役員

会 長 賀 来 亨
専 務 理 事 越 智 守 生
常 任 理 事 齋 藤 隆 史・千 葉 逸 朗 (庶務担当)
中 澤 太・国 永 史 朗 (会計担当)
和 泉 博 之・古 市 保 志 (編集担当)
溝 口 到・越 野 寿 (企画担当)
監 事 小 野 正 利・東 城 庸 介

Editorial Board

Editor-in-Chief : Hiroshi IZUMI

Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Takanori SHIBATA,
Taishin TAKUMA, Yosuke TOJYO, Itaru MIZOGUCHI

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Toshihiko YAJIMA

Vice President : Morio OCHI

Auditors : Masatoshi ONO, Tohru KAKU

Directors : Hiroshi IZUMI, Morio OCHI, Shiro KUNINAGA,
Hisashi KOSHINO, Takashi SAITOU, Taishin TAKUMA,
Itsuo CHIBA, Itaru MIZOGUCHI

Address of Office

c/o Health Sciences University of Hokkaido, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

Address of Editorial Board

Hiroshi IZUMI

Division of Physiology, Department of Oral Biology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido,

Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

E-mail: izumih@hoku-iryo-u.ac.jp

Phone: +81 133-23-1239; Fax: +81 133-23-1402

北海道医療大学歯学雑誌
第27巻 第2号 平成20年12月
目 次

〔原 著〕

- 1 *Porphyromonas gingivalis*無色突然変異株のバイオフィルム形成性
鎌口 有秀, 岡本 公彰, 五十嵐英次, 藤田 真理, 宮川 博史, 中澤 太……………(85)
- 9 成長期ラット顎関節円板におけるproteoglycanのmRNA発現
甲田 尚央, 鳥谷奈保子, 荒川 俊哉, 田隈 泰信, 溝口 到……………(93)

〔学位論文要旨〕

- 19 マルチモダリティ三次元画像融合による顎矯正手術シミュレーション法の確立
上地 潤 ……………(103)
- 23 高分子材料の重合収縮と熱収縮によって生じた金属・レジン接着界面の残留応力とメタルフレームの変形
垣野 健 ……………(107)

〔歯学情報〕

- 25 最近のトピックス ……………(109)
- 47 北海道医療大学歯学会会則 ……………(131)
- 49 北海道医療大学歯学雑誌 投稿規程 ……………(133)
- 56 編集後記 ……………(140)

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido
VOL.27, NO.2, DECEMBER, 2008
CONTENTS

ORIGINAL REPORT

- 1 **Study of the spontaneous non-pigmented variant of Porphyromonas gingivalis in biofilm formation**
Arihide KAMAGUCHI, Masaaki OKAMOTO, Eiji IGARASHI, Mari FUJITA, Hiroshi MIYAKAWA,
and Futoshi NAKAZAWA (85)
- 9 **mRNA expression of proteoglycans in temporomandibular joint disc of growing rats**
Naohisa KOHDA, Naoko TORIYA, Toshiya ARAKAWA, Taishin TAKUMA and Itaru MIZOGUCHI (93)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

- 19 **Establishment of orthognathic surgery simulation by using multimodal 3D (3-dimensional)
image-fusion techniques.**
Jun UECHI (103)
- 23 **Residual stress at the adhesion interfaces and deformation of metal frame induced to polymerization
shrinkage and thermal contraction of high polymer**
Ken KAKINO (107)

DENTAL INFORMATION

- 25 Recent topics (109)

〔原著〕

*Porphyromonas gingivalis*無色突然変異株のバイオフィルム形成性鎌口 有秀¹⁾, 岡本 公彰²⁾, 五十嵐英次¹⁾, 藤田 真理¹⁾, 宮川 博史¹⁾, 中澤 太¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野

2) 鶴見大学歯学部口腔細菌学教室

Study of the spontaneous non-pigmented variant of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm formation

Arihide KAMAGUCHI*, Masaaki OKAMOTO**, Eiji IGARASHI*, Mari FUJITA*, Hiroshi MIYAKAWA*, and Futoshi NAKAZAWA*

*Department of Microbiology, Division of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

**Department of Oral Bacteriology, School of Dental Medicine, Tsurumi University.

Abstract

Porphyromonas gingivalis is one of the major aetiological agents involved in advanced adult periodontitis. An important factor of this organism in the complaint is thought to be its presence over long periods in the oral biofilm. But, the characteristics of *P. gingivalis* biofilm are not fully understood. To study the characteristics of *P. gingivalis* biofilm, this investigation obtained non-pigmented *P. gingivalis* variants(np8strain, np11strain)by subculturing in medium. The np11 strain formed more biofilm than the wild type and np8 strain. Aggregation activity of np11 strain was stronger than that of wild type and np8 strain. The SDS-PAGE protein profile of these cells showed that the amount of 17 kDa and 26 kDa proteins increased in only the np11 strain. These proteins were identified to be flavodoxin and 3-oxoacyl(acyl-carrier protein) reductase, respectively.

This study indicates that aggregation activity is correlated with biofilm formation of *P. gingivalis*. Factors related to the metabolic process, such as flavodoxin and 3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase, may also be related to the biofilm formation process of *P. gingivalis*.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, biofilm, non-pigmented variant

緒 言

*Porphyromonas gingivalis*は成人性歯周炎の主病原細菌の1つとされている。*P. gingivalis*は種々の病原因子を保有するが、その中でも主要な病原因子としてアルギニン特異的システインプロテアーゼ (RgpまたはArg-gingipain) とリジン特異的システインプロテアーゼ (KgpまたはLys-gingipain) がある。RgpとKgpはコラーゲンタイプIの分解, フィブロンクチンの分解 (Kadowaki et al., 1994; Abe et al., 1998), 免疫グロブリン (Kadowaki et al. 1994) やサイトカインの分解

(Calkins et al., 1998), 補体の破壊 (Wingrove et al. 1992), フィブリンやフィブリノーゲンに対する分解作用 (Imamura et al., 1995; Okamoto et al., 1998), 血液凝固因子に対する活性化能 (Imamura et al., 1997), protease activated receptorsの活性化能などが報告されている (Lourbakos et al., 2001)。また, *P. gingivalis*は糖を利用できないことより, タンパク質を分解し, ペプチドの形で取り込みエネルギー源として利用するためにもRgpとKgpが関与する。このことより, RgpとKgpは発育のためのエネルギー源の獲得においても重要な働きをする。また, *P. gingivalis*も発育に鉄イオン

受付:平成20年9月30日

を必要とするが、生体成分に結合した鉄結合物から鉄イオンを獲得するシドロフォアをもたないため、Rgp, Kgpならびアドヘジンドメインタンパク質複合体が赤血球の成分であるヘモグロビンから鉄イオンを獲得することにも関与していることが報告されている (Nakayama et al., 1998). *P. gingivalis*は血液寒天培地上では黒色のコロニーを形成することが大きな特徴であり、これは菌体表層にヘモグロビンを結合し、ヘムを蓄積することによる (Smalley et al., 1998). この*P. gingivalis*のコロニーの黒色化にもRgp, Kgpおよびアドヘジンドメインタンパク質が関与する。この現象は*P. gingivalis*が発育し、病原性を発揮する上でも重要なことである。

*P. gingivalis*は歯肉溝バイオフィーム形成菌の一員として長期間存在し、病原因子を産生することが本疾患の重要な要因の1つと考えられる (Slots et al., 1982)。しかし、*P. gingivalis*のバイオフィーム形成因子の詳細にはついては明確にされていない。

今回*P. gingivalis*の継代により無色突然変異株が出現した。この変異株の中に親株よりバイオフィーム形成性の増加した株が存在したことより、*P. gingivalis*のバイオフィーム形成因子の一端を明らかにするために、その性状について検討した。

実験方法

供試菌株と培養方法

P. gingivalis ATCC33277株, np 8株, np11株をGAM培地またはTYHM (Tryptic soy broth 30g / L, Yeast extract 5g / L, Hemin 5 mg / L, Menadione 1 mg / L) 培地にて37℃で嫌気培養 (CO₂ (10%), H₂ (10%), N₂ (80%)) した。

バイオフィーム形成性の測定方法

O'TooleとKolterの方法 (O'Toole and Kolter, 1998) に準じて、96well plateにてバイオフィーム形成性を検討した。*P. gingivalis* ATCC33277株, np 8株, np11株をTYHM培地にて前培養後、希釈TYHM培地 (TYHM培地:PBS = 1:2) に前培養菌液を1/10量添加した菌液を96well plateにて200μl添加し、嫌気培養した。培養後、各wellをsalineにて洗浄し、各wellにクリスタルバイオレット液を添加し、室温で15分放置後、再度salineで洗浄した。ついでエチルアルコールを加えクリスタルバイオレットを可溶化し、OD540nmの吸光度を測定した。

SDS-PAGEとタンパク質バンドのN末端アミノ酸配列の解析方法

SDS-PAGEはLaemliの方法に従った (Laemmli, 1970)。タンパク質バンドのN末端アミノ酸配列の解析はSDS-PAGE後、ゲルをPVDF膜に転写し、Coomassie brilliant blueにて染色した。ついで、目的のバンドを切り出しアミノ酸シーケンサー (Procise492, Applied Biosystems) を用いてアミノ酸配列を決定した。また、この配列をBLAST searchにてホモロジー検索を行い、蛋白質とその遺伝子を検索した。

Rgp活性の測定方法

菌体と培養上清のRgp活性は1 mM Nα-Benzoyl-DL-arginine *p*-nitro-anilide HClと10mM cystein HCl含有0.1 M Tris-HCl (pH7.4) 液800μl, 水1,700μlおよび試料20 μlを加え10分後のOD405nmを測定し、Δ405nm/min/mg proteinまたはΔ405nm/min/mlで活性を表した。タンパク質量の測定はDCprotein assay kit (Bio-RAD) を用いた。

統計処理の方法

統計処理はStudent's t testまたは分散分析後ポストホックテスト (Fisher's PLSD法) を行った。

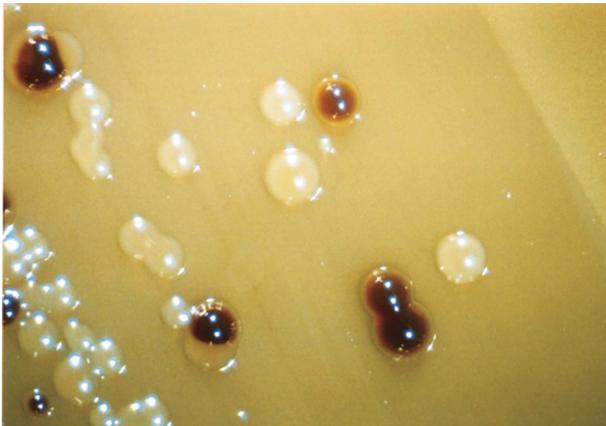
結 果

*P. gingivalis*の無色突然変異株の出現とその性状

P. gingivalis ATCC33277をGAM半流動寒天培地にて一夜培養した。ついで、4℃で7日間保存後、新たなGAM半流動寒天培地に接種、培養することを約20回繰り返した。この菌液をGAM血液寒天培地に塗抹した結果、黒色コロニーを形成する親株と共に無色のコロニーを形成する自然変異株が得られた (Fig. 1)。

親株と無色変異株のバイオフィーム形成性

得られた無色変異株と親株のバイオフィーム形成性を検討した結果、親株とバイオフィーム形成性が同程度の株と親株よりバイオフィーム形成性を強い株がみられた。前者の性状を示す株としてnp 8株、後者の性状を示す株としてnp11株を今回の実験に供試した (Fig. 2)。np11株が96well plateに対して親株やnp 8株よりバイオフィーム形成性が強いことは、96wellプレートに結合したバイオフィームのクリスタルバイオレット染色像と染色されたバイオフィームからのエチルアルコールにより溶出されたクリスタルバイオレット量から明となった

(A) *P. gingivalis* ATCC33277株(B) *P. gingivalis* 継代培養株Fig. 1. *P. gingivalis* ATCC33277株と継代培養株の血液寒天培地上でのコロニー形態

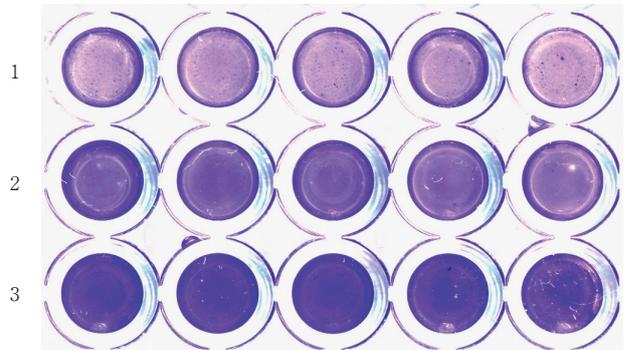
(Fig. 3, 4).

グラム染色像

親株, np 8株, np11株のバイオフィルム形成菌をピペッティングによりwellより剥離した菌体と培養上清菌をグラム染色後観察した。バイオフィルム形成菌はいずれの菌体も大きな菌塊が観察されたが, np11株の菌塊の周囲に連鎖する菌体が観察された (Fig. 5)。*P. gingivails* np 11株の培養上清の菌体は他の2株の菌体より長く連鎖している菌体が見られた (Fig. 6)。このことより, np11株は他の株より菌体の性状が異なることが観察された。

タンパク質発現

np11株は親株, np 8株よりバイオフィルム形成性が強くみられたことより, np11株は他の菌株とは異なる物質を発現している可能性が示唆された。そこで, これらの菌体のSDS-PAGEを行い発現タンパク質の違いを比較した。その結果, np11株においてAとBのバンドがより多く産生されていた。この2つのバンドのN-末端アミノ酸分析を行いBLAST Searchにて該当するタンパク質を検索したところバンドAはflavodoxin, バンドBは3-

(A) *P. gingivalis* np8株(B) *P. gingivalis* np11株Fig. 2. *P. gingivalis* np 8株とnp11株の血液寒天培地上でのコロニー形態。Fig. 3. *P. gingivalis* ATCC33277株, np 8株, np11株の96well plateに形成されたバイオフィルムのクリスタルバイオレット染色像。

1 : ATCC33277株, 2 : np 8株, 3 : np11株。

oxoacyl- (acyl-carrier protein) reductaseであった (Fig. 7, Table 1)。

凝集性

1日培養後, 培養液中での凝集性を観察した。np11株は菌体の沈殿が多くみられ, 凝集性が強いことが観察された (Fig. 8)。この結果, np11株は菌体表層の物質に違いがある可能性が示唆された。

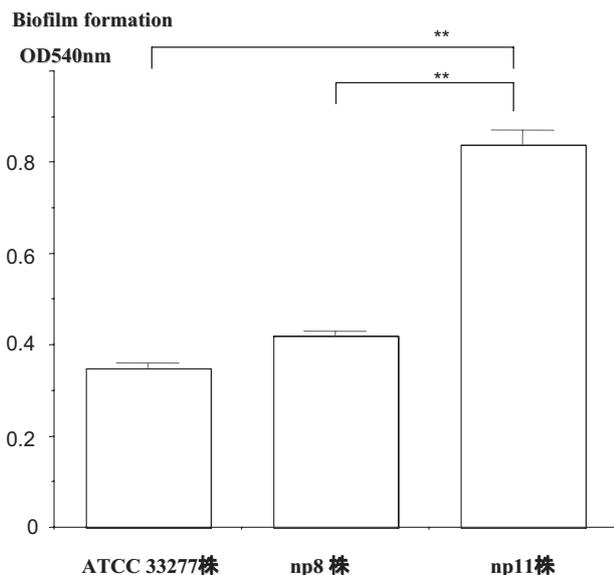


Fig. 4. *P. gingivalis* ATCC33277株, np 8株, np11株のクリスタルバイオレット染色バイオフィームからエタノールにより溶出されたクリスタルバイオレット量.
** : P<0.05, N=3.

Rgp活性

親株, np11株それぞれの菌体と培養上清のRgp活性を測定した. その結果, 親株の菌体のRgp活性は高く, 培養上清のRgp活性は低いことが観察された. 一方, np11株では菌体のRgp活性は低く, 培養上清のRgp活性が高いことが観察された (Fig. 9). ついで, 培養上清のSDS-PAGEを行いRgpの量を検討した結果, 親株と比較し, np11株の培養上清にはRgpのタンパク質量が多いことが観察された (Fig. 10). このことからこの実験で得られた無色突然変異株は菌体表層に保有するRgpが減少

(A) *P. gingivalis* ATCC 33277株

(B) *P. gingivalis* np8株

(C) *P. gingivalis* np11株

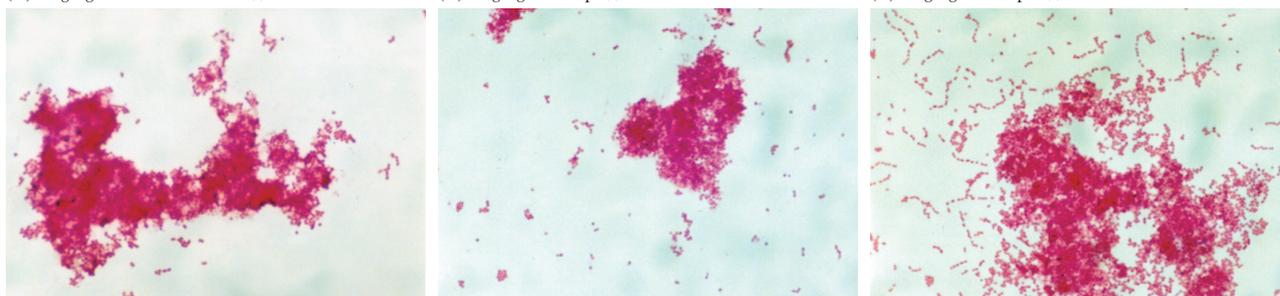


Fig. 5. *P. gingivalis* ATCC33277, np 8株, np11株のバイオフィーム形成菌のグラム染色像.

(A) *P. gingivalis* ATCC 33277株

(B) *P. gingivalis* np8株

(C) *P. gingivalis* np11株

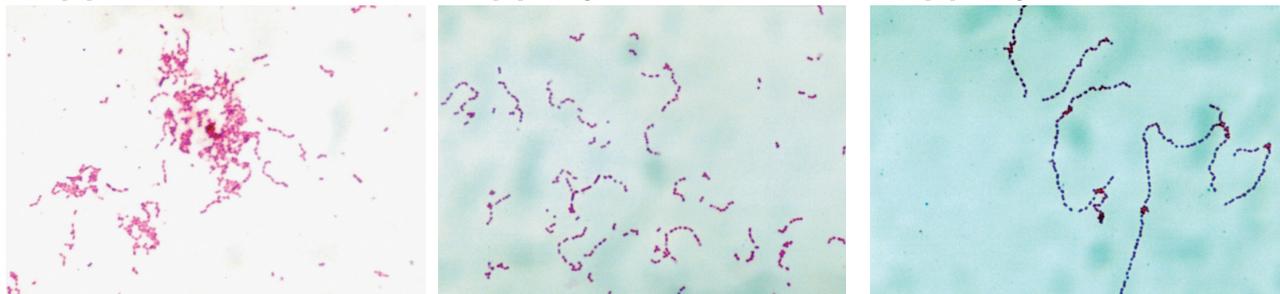


Fig. 6. *P. gingivalis* ATCC 33277株, np 8株, np11株の浮遊菌のグラム染色像.

し, 菌体外により多く遊離したことが確認された.

考 察

*P. gingivalis*が血液寒天培地上で黒色のコロニーを形成することは大きな特徴であるが, GAM半流動寒天培地にて継代を繰り返すことにより, 自然突然変異により無色コロニーが出現した. *P. gingivalis*が黒色のコロニーを呈する機構は菌体表層にヘムを蓄積することによると報告されていることより (Smalley et al., 1998), 無色のコロニーは菌体表層の物質に何らかの変化が生じ, ヘムを蓄積できなくなった結果と思われた. 菌体表層の物質の変化が*P. gingivalis*のバイオフィーム形成性に対して影響するか検討したところ, 親株と同程度のバイオフィーム形成性を示す菌株 (np 8株) と親株よりバイオフィーム形成性が強い菌株 (np11株) が存在した. このことは, 菌体のヘムの蓄積に関係する変異とバイオフィーム形成性に関与する変異が別々に生じたものと思われた.

親株, np 8株, np11株のバイオフィーム形成菌のグラム染色像ではいずれも菌塊が形成されているが, np11株の周囲には連鎖した菌体が観察され, さらに, 浮遊菌のグラム染色像において, np11株は長く連鎖する傾向がみられた. *Eschrichia coli*等において菌体が長く連鎖する菌株は自己融解酵素群の一部の活性に変化あることが報告されている (Heidrich et al., 2001). そこで, 親株とnp11株の増殖曲線を比較したところ, np11株は自己融解

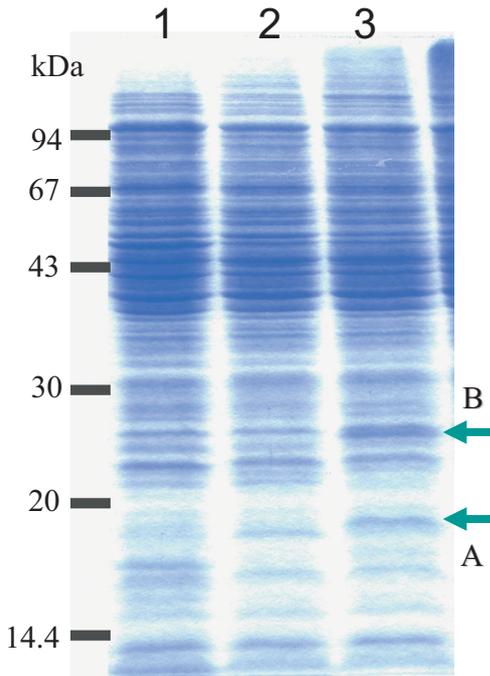


Fig. 7. *P. gingivalis* ATCC33277, np 8 株, np11 株の菌体の SDS-PAGE パターン.
レーン1: ATCC33277 株, レーン2: np 8 株, レーン3: np11 株.

による菌の濁度の低下が遅くなることが観察された (data not shown). このことより, np11 株においては自己融解酵素の活性にも変化が生じた可能性が示唆された. また, np11 株は培地中で凝集性が強く, 菌体が多く沈殿することが観察された. これらのことはバイオフィーム形成性が他の菌株より強くみられることと関連している可能性が示唆された.

これまで, *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に関与するとされる幾つかの因子が報告されている. Chen ら (2002) は polyphosphate kinase (PPK) gene (*ppk*) の変異株はバイオフィーム形成性と stationary-phase における生存が低下することを報告している. PPK はグラム陽性, 陰性菌に広く存在し, 栄養状態, 環境ストレスや stationary phase での生存などに重要な役割をしていると考えられている (Rao and Kornberg, 1996; Shiba et al., 2000). Capestany ら (2006) によると internalin protein family の InlJ の変異株は *P. gingivalis* 単独でのバイオフィーム形成性を減少させ, *P. gingivalis* と *Streptococcus gordonii* のバイオフィーム形成性を増加させるとしている. また, Capestany ら (2008) はストレス応答システ

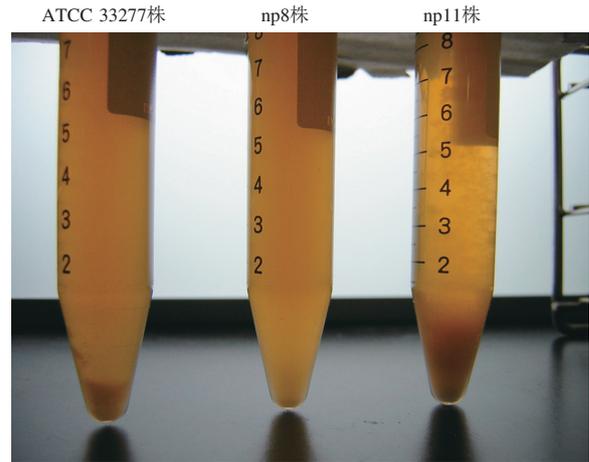


Fig. 8. *P. gingivalis* ATCC33277 株, np 8 株, np11 株の液体培地で培養後の凝集性.

ムの 1 つである Clp システムの中の *clpC* と *clpXP* の変異株は *P. gingivalis* の単独のバイオフィーム形成性を増加し, *clpXP* の変異株は *P. gingivalis* と *Streptococcus gordonii* とのバイオフィーム形成性を増加するとしている.

Chen ら (2006) は Universal stress protein の遺伝子の *upsA* の変異株は *P. gingivalis* のバイオフィーム形成性が低下することより, バイオフィーム形成に関与すると示唆している. Ang ら (2008) は *P. gingivalis* のバイオフィーム形成菌と浮遊菌のプロテオーム解析を行い, バイオフィーム形成菌においては 24 のタンパク質の増加がみられ, 18 のタンパク質の減少がみられることを示した. 増加したタンパク質の中に RgpA, HagA, CPG70, HmuY, HhtB FrdAB, internalin family protein 等があり, これらの内のいずれかの関与が示唆されている. この様にいくつかのバイオフィーム形成に関与すると想定される因子が報告されているが, *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に関与する明確な因子については明らかにされていない.

今回得られた np 8 株, np11 株と親株の菌体の SDS-PAGE におけるタンパク質バンドのパターンを比較したところ, 親株と np 8 株と異なる np11 株のバンドとして 2 つのバンドがみられ, それは flavodoxin と 3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase であった. flavodoxin はエネルギー産生系に, 3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase は脂質合成系に関与する酵素である. これらの因子のバイオフィーム形成性への関与はこれまで報告されていないが, これらはバイオフィーム形成性が

Table 1. SDS-PAGE におけるバンド A とバンド B の N-末端アミノ酸配列と対応するタンパク質.

| Protein band | N-terminal amino acid sequence determined | | | | | Gene product |
|--------------|---|---|----|----|----|---|
| Band A | 1 | 5 | 10 | 15 | 20 | flavodoxin (17 kDa) |
| | M K S I G I F Y G S S T G T T S D L A Q | | | | | |
| Band B | 1 | 5 | 10 | 15 | | 3-oxoacyl-(acyl-carrier protein) reductase (26 kDa) |
| | M K L L E N K V A L I T G A G R | | | | | |

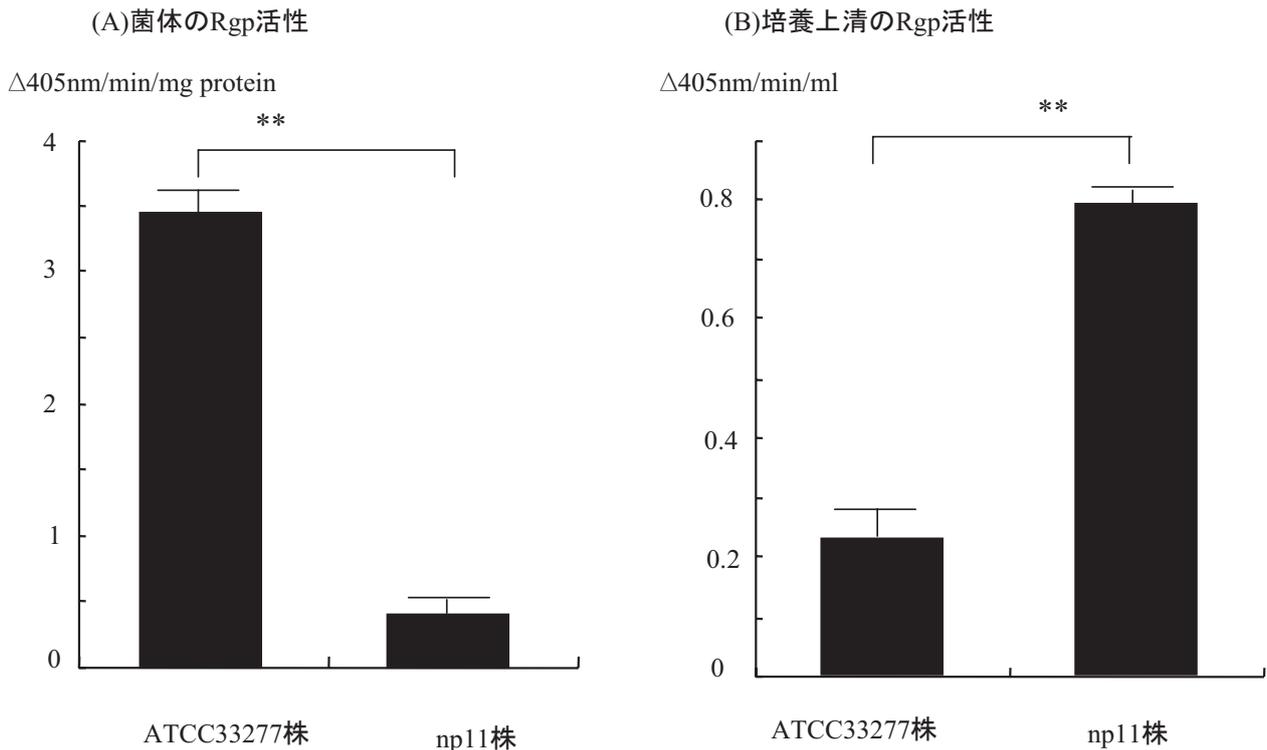


Fig. 9. *P. gingivalis* ATCC33277株とnp11株の菌体と培養上清のRgp活性.
** : $P < 0.05$, $N = 3$.

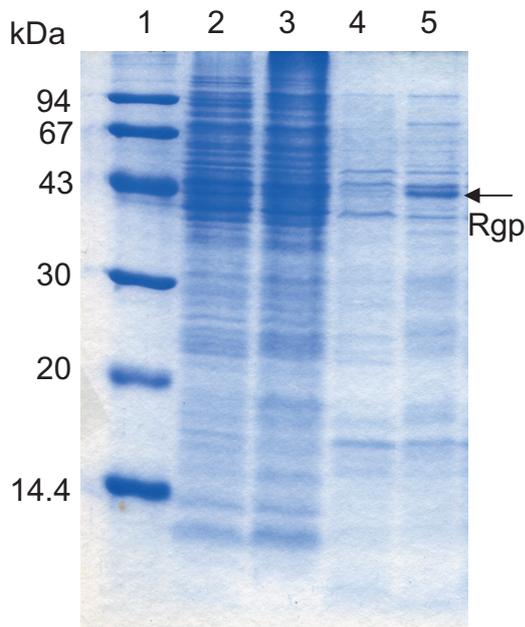


Fig. 10. *P. gingivalis* ATCC33277株とnp11株の菌体と培養上清のSDS-PAGEパターン.

レーン1：分子量マーカー，レーン2：ATCC33277株の菌体，
レーン3：np11株の菌体，レーン4：ATCC33277株の培養上清，
レーン5：np11株の培養上清。

強い株に強く発現していることより，*P. gingivalis*のバイオフィーム形成に何らかの関与をしている可能性が示唆された。

Shojiら（2002）は*P. gingivalis*にトランスポゾン挿入することにより無色変異株が得られ，この変異株は菌体のRgp活性は弱く，培養上清にRgp活性が強くみられ

ると報告している．親株とnp11株の菌体および培養上清のRgp活性を測定したところnp11株の菌体のRgp活性は弱く，np11株の培養上清にRgp活性が強くみられた．また，親株とnp11株の培養上清のSDS-PAGEによるタンパク質パターンよりRgpに相当する44kDaタンパク質の増加がnp11株においてみられた．さらに，Kgpに相当する51kDaタンパク質バンドの若干の増加がnp11株の上清において観察された．これらの性状はShojiら（2002）のトランスポゾンによる変異株の結果と類似している．Shojiら（2002）の実験においてトランスポゾンは*porR*遺伝子内に挿入されており，*porR*遺伝子の変異の結果とされている．*porR*は細胞表面のpolysaccharideとamino-glycosideの糖部分の生合成に関与するtransamidaseの遺伝子とされている．Shojiら（2002）は*porR*が変異したことにより外膜においてRgp，Kgpおよびアドヘジドメインタンパク質複合体のアンカーの役割をしているpolysaccharideに変化が生じ，これら複合体を外膜上に保持できず培養上清に遊離されたものと推察している．通常Rgp，Kgpおよびアドヘジドメインタンパク質は複合体を形成し，外膜上に糖鎖により結合している．また，アドヘジドメインタンパク質の中のHgp15はヘモグロビンレセプターとして働き，また，ヘムの蓄積に作用するとNakayamaら（1998）により報告されている．これらのことより，今回得られたnp11株等はRgp，Kgpおよびアドヘジドメインタンパク質複合体を外膜上に

保持する糖鎖に何らかの変異がおき、Hgp15もこれらの複合体と共に遊離したことが無色のコロニーになった原因と推察された。

近年、バイオフィーム形成菌は浮遊菌といくつかの性状が異なることが知られており、バイオフィーム形成菌の物理的要因の他に浮遊菌と遺伝子発現が相違することが報告されている (Whiteley et al., 2001). 遺伝子発現の相違を網羅的に検討するにはプロテオーム解析やmicro arrayによる解析が必要となる。これらの解析をするには比較的多くの菌量を必要とする。浮遊菌は多くの菌体を集めることは容易であるが、*P. gingivalis*のバイオフィーム形成菌を多く集めることはなかなか困難である。今回のnp11株はバイオフィーム形成性が親株より良好であることより、バイオフィーム形成菌を集め、これらの解析に供試する上でも有用な菌株でもあった。

結 論

*Porphyromonas gingivalis*は成人性歯周炎の主要な原因菌と1つである。この菌の重要な病原因子の1つに口腔内バイオフィーム形成菌の一員として長期存在することがある。しかし、*P. gingivalis*のバイオフィームの性状については明確にされていない。*P. gingivalis*のバイオフィームの性状を検討するために*P. gingivalis*を継代することより得られた無色変異株 (np 8株とnp11株)を用いた。np11株は親株とnp 8株より強いバイオフィーム形成性を示した。np11株の凝集性は親株とnp 8株より強くみられた。これらの菌体のSDS-PAGEによるタンパク質バンドの比較において、17 kDaと26 kDaのバンドがnp 11株にのみ強く発現していた。これらのバンドはそれぞれflavodoxinと3-oxoacyl (acyl-carrier protein) reductaseであった。

これらのことより、凝集性と代謝過程に関与するflavodoxinと3-oxoacyl (acyl-carrier protein) reductaseはバイオフィーム形成性に関与する可能性が示唆された。

文 献

- Abe N, Kadowaki T, Okamoto K, Nakayama K, Ohishi M and Yamamoto K. Biochemical and functional properties of lysine-specific cysteine protease (Lys-gingipain) as a virulence factor of *Porphyromonas gingivalis* in periodontal disease. *J Biochem* 123 : 305-312, 1998.
- Ang C-S, Veith PD, Dashper SG and Reynolds EC. Application of 160/180 reverse proteolytic labeling to determine the effect of

- biofilm culture on the cell envelope proteome of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Proteomics* 8 : 1645-1660, 2008.
- Calkins CC, Platt K, Potempa J and Travis J. Inactivation of tumor necrosis factor- α by preteinsases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 273 : 6611-6614, 1998.
- Caestany CA, Kuboniwa M, Jung I-Y, Park Y, Tribble D and Lamont RJ. Role of the *Porphyromonas gingivails* InlJ protein in homotypic and heterotypic biofilm development. *Infect Immun* 74 : 3002-3005, 2006.
- Caestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuthi DR and Lamont RJ. Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation and intercellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 190 : 1436-1446, 2008.
- Chen W, Honma K, Sharma A and Kuramitsu HK. A universal stress protein of *Porphyromonas gingivalis* is involved in stress responses and biofilm formation. *FEMES Microbiol Lett* 264 : 15-21, 2006.
- Chen W, Palmer RJ, and Kuramitsu HK. Role of polyphosphate kinase in biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 70 : 4708-4715, 2002.
- Heidrich C, Templin M F, Ursinus A, Merdanovic M, Berger J, Schwarz H, Pedro MA and Holtje J-V. Involvement of N-acetylmuramyl-L-alanine amidases in cell separation and antibiotic-induced autolysis of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41 : 167-178, 2001.
- Imamura T, Potempa J, Pike RN, Moore JN, Barton MH and Travis J. Effect of free and vesicle-bound cysteine proteinases of *Porphyromonas gingivalis* on plasma clot formation : implications for bleeding tendency at periodontitis sites. *Infect Immun* 63 : 4877-4882, 1995.
- Imamura T, Potempa J, Tanase S and Travis J. Activation of blood coagulation factor X by arginine-specific cysteine proteinases (gingipain Rs) from *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 272 : 16062-16067, 1997.
- Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K and Yamamoto K. Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine protease (argngipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem* 269 : 21371-21378, 1994.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- Lourbakos A, Potempa J, Travis J, D'Andrea MR, Andrade-Grdon P, Santulli R, Mackie EJ and Pike RN. Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun* 69 : 5121-5130, 2001.
- Nakayama K, Ratnayake DB, Tsukuba T, Kadowaki T, Yamamoto K, and Fujimura S. Haemoglobin receptor protein is intragenically encoded by the cysteine proteinase-encoding genes and the haemagglutinin-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Microbiol* 27 : 51-61, 1998.
- O'Toole GA and Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signaling pathways : a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28 : 449-461, 1998.
- Okamoto K, Nakayama K, Kadowaki T, Abe N, Ratnayake DB and Yamamoto K. Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porpy-*

- romonas gingivalis*. J Biol Chem 273 : 21225–21231, 1998.
- Rao NN and Kornberg A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. J Bacteriol 178 : 1394–1400, 1996.
- Shiba T, Tsutsumi K, Ihige K and Noguchi T. Inorganic polyphosphate and polyphosphate kinase : their novel biological functions and applications. Biochemistry 65 : 315–323, 2000.
- Shoji M, Ratnayake DB, Shi Y, Kadowaki T, Yamamoto K, Yoshimura F, Akamine A, Curtis MA and Nakayama K. Construction and characterization of a nonpigmented mutant of *Porphyromonas gingivalis* : cell surface polysaccharide as an anchorage for gingipains. Microbiol 148 : 1183–1191, 2002.
- Slots J. Importance of black-pigmented Bacteroides in human periodontal disease. In : Genco RJ and Mergerhagen SE, editors. Host-Parasite Interactions in Periodontal Disease. American Society for Microbiology, 1982, p27–45.
- Smalley JW, Silver J, Marsh PJ, and Birss A. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the μ -oxo dimeric form : an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. Biochem J. 331 : 681–685, 1998.
- Whiteley M, Banger G, Bumgarner RE, Parsek MR, Teitzel GM, Lory S and Greenberg E P. Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Nature 413 : 860–864, 2001.
- Wingrove JA, DiScipio RG, Chen Z, Potempa J, Travis J and Hugli TE. Activation of complement components C3 and C5 by a cysteine proteinase (gingipain-1) from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis*. J Biol Chem 267 : 18902–18907, 1992



鎌口有秀

北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野

略歴

昭和54年 3月 東北薬科大学大学院博士課程修了
 昭和54年 4月 東日本学園大学（現 北海道医療大学）歯学部口腔細菌学教室助手
 昭和60年 同教室 講師
 昭和61年 同教室 助教授
 平成4年 5月 Saskatchewan州立大学歯学部（カナダ）に留学（平成5年4月まで）
 平成19年 4月 同教室 准教授
 現在に至る。

所属学会

日本細菌学会
 歯科基礎医学会
 北海道医療大学歯学会

〔原著〕

成長期ラット顎関節円板におけるproteoglycanのmRNA発現

甲田 尚央¹⁾, 鳥谷奈保子¹⁾, 荒川 俊哉²⁾, 田隈 泰信²⁾, 溝口 到¹⁾¹⁾北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野²⁾北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野

mRNA expression of proteoglycans in temporomandibular joint disc of growing rats

Naohisa KOHDA¹⁾, Naoko TORIYA¹⁾, Toshiya ARAKAWA²⁾, Taishin TAKUMA²⁾ and Itaru MIZOGUCHI¹⁾¹⁾Department of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.²⁾Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

Abstract

It is well known that proteoglycans can be divided into small leusine-rich proteoglycans (SLRPs) and large modular proteoglycans, which are composed of various functional domains, and play crucial roles in cellular proliferation, cellular attachment, and matrix assembly. In addition, proteoglycans provide tissue integrity when subject to shearing and compressive forces via the glycosaminoglycan (GAG) chains linked to their core protein. This study analyzes the growth related changes in extracellular matrix components in temporomandibular joint (TMJ) discs, the expression of four SLRPs, including decorin, biglycan, fibromodulin, and lumican, and a modular proteoglycan, versican, in rat TMJ discs during the postnatal growth stage using real-time quantitative PCR (QPCR). Male Wistar rats at 2, 4, 8, and 16 weeks after birth were used in this study. Total RNA was extracted from the TMJ discs and used to generate cDNA. Quantification of target transcripts was performed by real-time PCR with SYBR Green I and/ or TaqMan probe. The copy number of the target transcript was determined using an external standard, which was serially diluted from 10^8 copies down to 10^1 copies, and calculated as the number of copies of proteoglycan per 10^3 copies of the internal standard, GAPDH. The real-time QPCR indicated that mRNA expression of decorin peaked at 2 weeks and gradually decreased after that. The mRNA expression levels of biglycan, fibromodulin, and lumican decreased with growth. The mRNA expression of biglycan was highest and the other three SLRPs showed similar expressions. The mRNA expression levels of V0, V1, and V3 isoforms decreased with growth, while the mRNA expression of the V2 isoform peaked at 8 weeks. Among the four versican isoforms, mRNA expression of the V1 isoform was predominant from 2 to 16 weeks. These results indicate that there are growth-related changes in mRNA expression of proteoglycans in the TMJ discs of growing rats.

Key words : Proteoglycan · Real-time quantitative PCR · Temporomandibular joint disc

緒 言

顎関節は、側頭骨と下顎骨とを連結する関節であり、生体の関節の中でも最も複雑な形態および機能を有する(Bell, 1990)。顎関節は、解剖学的には側頭骨下顎窩、

関節結節、下顎骨下顎頭、関節円板、円板後部組織、滑膜および靭帯等から構成され、機能的には蝶番運動と滑走運動が複合した運動様式を呈し、ginglymoarthrodial jointに分類される。

顎関節の構成要素のひとつである顎関節円板は、下顎

受付：平成20年9月30日

頭と側頭骨関節窩の間に介在する陥凹形の線維性緻密結合組織であり、関節表面を被覆し、関節腔を上下に分けている。上関節は主に滑走運動を、下関節は蝶番運動を営む (Bell, 1990)。関節円板は、顎関節の滑走、蝶番運動によって生じる複雑な生力学的力のshock absorberとして働き (Kimura, 1990; Hart et al., 1992; Koriath et al., 1992; Tanaka et al., 1994)、また、関節運動を円滑に行うために下顎頭のdestabilizerとして機能している (Osborn, 1985)。関節円板が、損傷を受けると円板の変形、変位あるいは穿孔をきたし、顎運動の障害 (関節内障) や疼痛を引き起こす可能性がある (Scapino, 1983; Osborn, 1985; De Bont et al., 1986, Stegenga et al.; 1991)。

一方、顎関節円板における主要な細胞外基質は、collagenとproteoglycanであり (Kopp, 1976; Scapino, 1983; Mills et al., 1988; 1994; Milam et al., 1991)、一般的にcollagen線維は牽引に対する抵抗性を、proteoglycanはそれに結合する糖鎖 (glycosaminoglycan; GAG) を介して剪断、圧縮に対する耐性を組織に付与し、それぞれの組織での機械的特性に寄与していることが知られている (Tanaka et al., 2003)。

Proteoglycanは、core proteinと呼ばれる1本のポリペプチド鎖に1本以上のGAG鎖が付着し共有結合した複合糖鎖の一種である。近年、proteoglycanとcore proteinの遺伝子配列の解析が進み、様々なproteoglycanの存在が明らかになっている (Zimmermann et al., 1994; Iozzo and Murdoch, 1996)。Proteoglycanは、core proteinのアミノ酸配列の構造的な特徴から、小型のsmall leucine rich proteoglycan (SLRPs) と様々な機能を有したdomainが連結した大型のmodular proteoglycanの2つに分類される (Iozzo and Murdoch, 1996)。前者にはdecorin, bigly-

can, fibromodulin, lumicanなどが含まれ、後者には軟骨組織に特徴的なaggrecan、線維芽細胞が産生するversican、脳組織に特異的なbrevican, neurocanなどが属している (Zimmermann et al., 1994; Iozzo and Murdoch, 1996)。

SLRPsは40kD前後の短いcore proteinを有し、6から10個の繰り返し構造であるleucine-rich repeatを含む (Henly et al., 2001; Tasheva et al., 2004)。Leucine-rich repeat domainは、cystein残基を含むN末端とC末端には含まれている。Decorinとbiglycanは、core proteinにdecorinは1本、biglycanは2本のdermatan sulphateあるいはchondroitin sulphate鎖がserine残基に結合した構造をしている (Chopra et al., 1985; Krusius and Ruoslahti, 1986; Fisher et al., 1989)。またfibromodulinは4本、lumicanは2本から3本のkeratan sulphate鎖が結合した構造をしている (Plaas et al., 1990; Blochberger et al., 1992)。Decorinは、軟骨、骨、腱、皮膚、象牙質などの組織に、biglycanは、軟骨、骨、骨格筋、血管内膜などの組織に、fibromodulinは、軟骨、腱、皮膚などの組織に、lumicanは、角膜、筋肉、腸、軟骨などの組織に広く分布し、様々な生物学的機能を果たしていることが知られている (Bianco et al., 1990)。これらのSLRPsは、細胞外基質に存在し、それぞれcollagen線維との結合能を有し (Vogel et al., 1984; Scott et al., 1989; 1995; Pringle and Dodd, 1990)、collagen線維の形成速度や線維間の距離、線維の太さなどの調節を行い、組織の機械的特性等に重要な役割を果たしている (Vogel et al., 1984; Scott et al., 1995; Danielson et al., 1997; Kuc and Scott, 1997)。また、TGF- β などの成長因子との結合能を有し、細胞増殖や基質形成などの細胞機能に重要な役割を果たしているとされている (Bianco et al.,

表1 Small leucine rich proteoglycan と GAPDH の primer の配列 (SYBR Green I による QPCR 用)

| | sequence | length (mer) | Tm (°C) | amplicon size (bp) |
|---------------------------|------------------------|--------------|---------|--------------------|
| decorin (#X59859) | tgcccgaaaaattgcccaaac | 22 | 56.7 | 180 |
| | atccgagaccctcattcctg | 22 | 60.4 | |
| biglycan (#U17834) | cctactgggaagtgcagcct | 20 | 58.0 | 67 |
| | tttccaaattggatggcca | 19 | 58.0 | |
| fibromodulin (#X82152) | agaagatccctcccgtcaacac | 22 | 60.4 | 153 |
| | gcttgatctcgttccatccag | 22 | 60.4 | |
| lumican (#X84039) | tcgcttcaccgggcttc | 17 | 59.0 | 70 |
| | gtttccaggcagccact | 18 | 58.0 | |
| GAPDH (#AB017801) | gaaggtcgggtggaacggatt | 21 | 58.5 | 212 |
| | tgatgggtttcccggtgatg | 20 | 56.3 | |

()内は GenBank accession number を示す。

表2 VersicanとGAPDHのprimerおよびprobeの配列 (TaqMan probeによるPCR用)

| versican (#AF072892) | | sequence | length (mer) | Tm (°C) |
|----------------------|----------|------------------------------|--------------|---------|
| forward primer | VC-F | cctgcaagaagggaacagttg | 21 | 58.5 |
| | F-0 | aaaacaacttccaaacctcaagagtt | 26 | 55.8 |
| | F-1 | gggtgagaacctgtatcgt | 20 | 55.4 |
| reverse primer | VC-R | ttccaaaggcttgccatttc | 22 | 54.8 |
| | R-0 | cctcactgtgatataatgtctatttcg | 26 | 57.3 |
| | R-2 | gtaggatagcaggtgcctccat | 22 | 60.4 |
| probe | Taq-VC | tgccgccaacccccctgtgt | 20 | 62.5 |
| | TaqR-116 | gtcagggtggaatttgctcctgcc | 26 | 65.2 |
| | TaqR-141 | cagtaggatcaaatctatcagggagagg | 30 | 65.7 |
| | Taq-183 | tgatctctgcaaaacacccatgcct | 27 | 60.5 |

| GAPDH (#AB017801) | | sequence | length (mer) | Tm (°C) |
|-------------------|--|------------------------------|--------------|---------|
| forward primer | | tgccaagtatgatgacatcaagaag | 25 | 57.2 |
| reverse primer | | agcccaggatgcccttagt | 20 | 58.4 |
| probe | | cctggccaaggtcatccatgacaacttt | 27 | 63.5 |

()内は GenBank accession number を示す.

表3 Versicanに対するprimerとprobeの組合せ (TaqMan probeによるQPCR用)

| | primer combination | probe | amplicon size (bp) |
|----|--------------------|----------|--------------------|
| VC | VC-F and VC-R | Taq-VC | 66 |
| V0 | F-0 and R-0 | TaqR-116 | 268 |
| V1 | F-1 and R-0 | TaqR-141 | 240 |
| V2 | F-0 and R-2 | Taq-183 | 161 |
| V3 | F-1 and R-2 | Taq-183 | 133 |

VC: 4つの isoform (V0 からV3) に共通の C 末端

表4 Real-time QPCRの反応条件

SYBR Green I 法

| | initial | 3-step cycling | | | final |
|-----------------|-----------------|----------------|-----------|-----------|-----------|
| | activation step | denaturation | annealing | extention | extention |
| temperature | 95°C | 94°C | 52~55°C | 72°C | 72°C |
| incubation time | 15 min | 1 min | 1 min | 1 min | 10 min |
| PCR cycles | 1 | | 50 | | 1 |

TaqMan probe 法

| | initial | 2-step cycling | | final |
|-----------------|-----------------|----------------|-----------------------|-----------|
| | activation step | denaturation | annealing / extention | extention |
| temperature | 95°C | 95°C | 60°C | — |
| incubation time | 10 min | 15 sec | 1 min | — |
| PCR cycles | 1 | | 50 | |

1990; Scott et al., 1995). 他には, 石灰化過程の制御因子としての作用も有していることが報告されている (Scott and Haigh, 1985).

一方, modular proteoglycanに属するversicanは線維芽

細胞から産生され (Zimmermann and Ruoslahti, 1989), core proteinの分子量は350から500kDに達し, 最大で20本前後のchondroitin sulphate側鎖を有する (Yamagata et al., 1993; Shinomura et al., 1993; Zimmermann et

al., 1994; Ito et al., 1995). VersicanはN末端側からヒアルロン酸結合部位 (HABR), GAG鎖が結合するGAG- α domainとGAG- β domain, およびC-terminalから成り, GAG鎖結合領域のsplicingによる4つのisoform, V0, V1, V2およびV3が存在することが報告されている (Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995; Zako et al., 1995; Sztrolovics et al., 2002). Versicanは, 脳, 軟骨, 大動脈, 皮膚, 腱等の様々な組織に分布し (Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), 組織の形態維持, 細胞増殖 (Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), 細胞接着 (Yamagata et al., 1989; 1993; 1994; Ang et al., 1999), 細胞遊走 (LeBaron et al., 1992; Landolt et al., 1995) などの機能に参与している。

顎関節円板において, proteoglycanのcore proteinとそれらに関連したGAG鎖は, 生化学的分析によって検討されている (Mills et al., 1988; 1994; Scott et al., 1989; 1995; Nakano and Scott, 1989a; 1996; Nakano et al., 1993; Carvalho et al., 1995). Decorinとbiglycanの局在は顎関節円板の中央部と周辺部において異なり, その領域差は, 顎関節における複雑な生体力学的環境要因を反映していると考えられている (Scott et al., 1995; Mizoguchi et al., 1998). しかし, proteoglycanの局在あるいはその成長に伴う変化に関しては不明である。

そこで本研究では, 成長期ラット顎関節円板の細胞外基質の成長変化について検討することを目的とし, 実験動物に生後2週から16週の雄性Wistar系ラットを用い, real-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR) 法により, SLRPsに属するdecorin, biglycan, fibromodulinおよびlumicanと, modular proteoglycanに属するversicanのmRNA発現の変化を検討した。

実験動物および方法

実験動物には, 生後2週, 4週, 8週および16週齢の雄性Wistar系ラットを用いた。なお, すべての実験動物の取り扱い, 北海道医療大学動物実験の指針に基づき行った。

1. Total RNAの抽出とreverse transcription (RT) 反応

各週齢のラットより採取した顎関節円板からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてtotal RNAを抽出した。なお, genomic DNAの試料への混入を防止するため, total RNAの抽出過程でRNase-free DNase

(Qiagen) 処理を行った。抽出されたtotal RNAに対しOmniscrypt reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行った。

2. Primerの設計

各SLRPsおよびinternal standardとしてのGAPDHを検出できるprimerを設計した (表1)。また, versican isoform (V0, V1, V2およびV3) の検出にTaqMan probe (exonuclease probe) を使用するため, primerとprobeを設計した (表2)。Versican isoformの識別のためには, 4種類のprimerと3種類のprobeとの組合せを適用した (表3)。Versican isoformのprimerとTaqMan probeの位置および組合せは図1に示す。Primerの設計には専用設計ソフト, Primer Express software (version2.0, Applied Biosystems, Foster, CA, U.S.A.) を用いた。

3. External standardの作製

生後2週齢のラット脳組織から抽出したtotal RNAをRT反応後, 各々に対応するprimerを用いてPCR産物を作製し, QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いてPCR産物を精製した。精製した各々のPCR産物およびvector pT 7 T 3 (Qiagen) を2つの制限酵素, Hind III (Gibco BRL, Rockville, MD, U.S.A.) およびEcoR I (Gibco BRL) で処理後subcloningし, 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料を作製しexternal standardとした。

4. 顎関節円板におけるmRNA発現の定量

生後2週, 4週, 8週および16週齢のラットより摘出した関節円板からtotal RNAを抽出し, RT反応およびreal-time QPCRを行った (表4)。各種SLRPsの検出にはSYBR Green I法を用い, versican isoformの検出にはTaqMan probe法を用いた。各種proteoglycanおよびGAPDHに対するcDNAの 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料 (external standard) により, 得られたstandard curveからの数値を用い両分子のmRNAを定量化後,

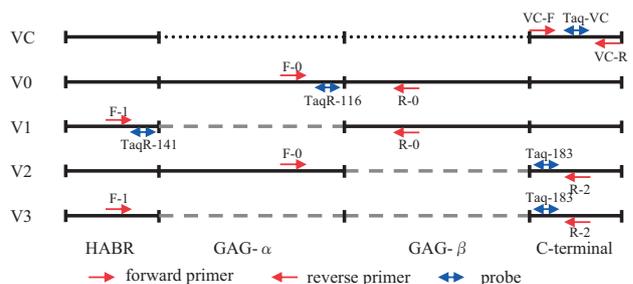


図1 4つのversican isoformに対するprimerとprobe
HABR; ヒアルロン酸結合領域, GAG- α ; グリコサミノグリカン α domain
GAG- β ; グリコサミノグリカン β domain, C-terminal; C-末端。

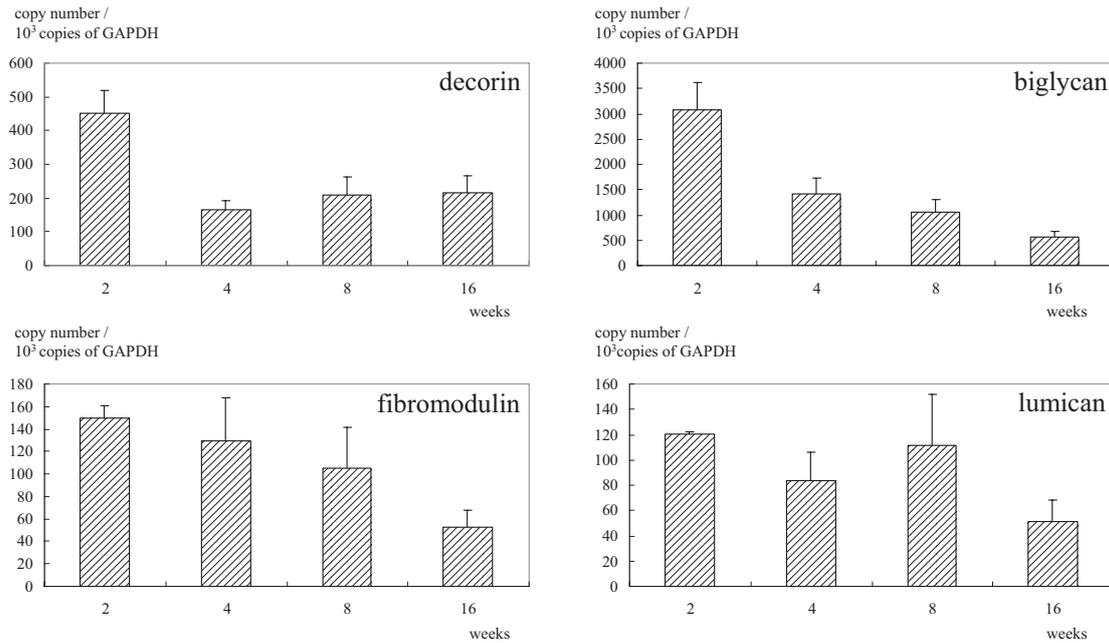


図2 頰関節円板におけるsmall leucine rich proteoglycanのmRNA発現の成長変化 (n=3 experiments ; mean±S.E.) DecorinのmRNA発現量は2週齢が最も多く、その後減少して一定量に推移した。一方、biglycan、fibromodulinおよびlumicanのmRNA発現は2週齢に最も多く、その後成長に伴い徐々に減少した。

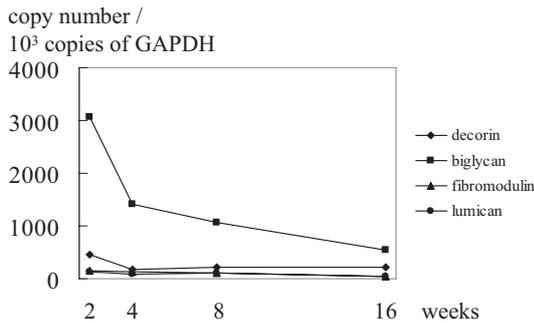


図3 頰関節円板におけるsmall leucine rich proteoglycanのmRNA発現の成長変化 Biglycanが最も多く、他のSLRPsの6倍以上の発現であった。Decorin、fibromodulinおよびlumicanの発現量は同程度であった。

GAPDH10³コピー数に対するproteoglycan cDNAのコピー数を算出した。検出にはGeamAmp5700Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いた。

結 果

QPCRの定量の結果、decorinのmRNA発現量は2週齢が最も多く、その後減少して一定量に推移した。一方、biglycan、fibromodulinおよびlumicanのmRNA発現は2週齢に最も多く、その後成長に伴い徐々に減少した(図2)。また4種のSLRPsにおけるmRNA発現量は、biglycanが最も多く、他のSLRPsの6倍以上の発現であった。Decorin、fibromodulinおよびlumicanの発現量は同程度であった(図3)。Versican isoformのmRNA発現量は、V0、V1およびV3は成長に伴い減少し、V2は8週齢にピークを示した(図4)。4つのisoformの中で

は、生後2週から16週の期間を通して、V1のmRNA発現量がversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった(図5)。

考 察

1. Quantitative PCRを用いたmRNAの定量方法

Quantitative PCRには、(1) double strand DNAに結合することによって蛍光を生じるSYBR Green Iという色素を用いる方法、(2) forwardおよびreverse primer間に特異的な配列のTaqMan probe (exonuclease probe) の両端に蛍光色素とそのquencher色素を付けたprobeを用い、Taq polymeraseによるprobeの加水分解の結果として蛍光を発することを利用する方法、および(3) primer間に特異的な配列をもつ2つのhybridization probeを反応させFRET反応を利用する方法の3つがある(Wittwer et al., 2001)。

本研究においてversican isoformに適用したTaqMan probe法では、primer dimerおよび非特異なPCR産物が反応中に形成されても、目的とするcDNAに特異的なprobeがそれらには結合しないため、特異的かつ感度の高い手法であるとされている(Yin et al., 2001)。本研究においてもGeneAmp5700を用いてTaqMan probe法を適用した場合には、少なくとも10³コピー数までのcDNAの定量が可能であることが明らかになった(data not shown)。

本研究では、SLRP mRNA発現の定量にはSYBR Green I法を、versican isoformに関してはTaqMan probe法を用

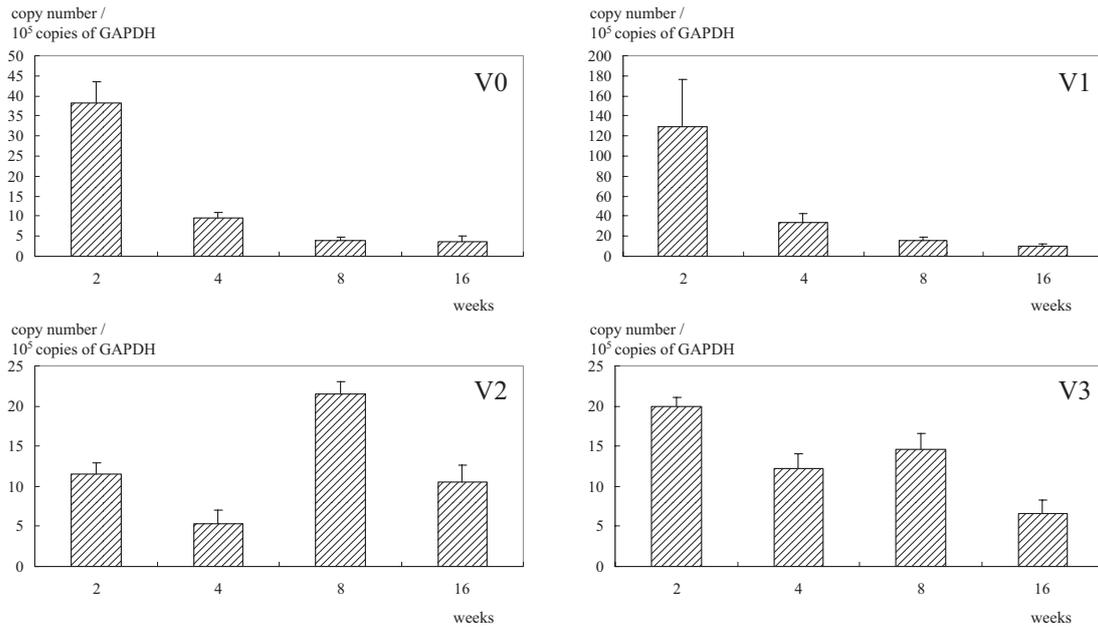


図4 顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現の成長変化 (n=5 experiments; mean±S.E.)
V0, V1およびV3は成長に伴い減少し, V2は8週齢にピークを示した。

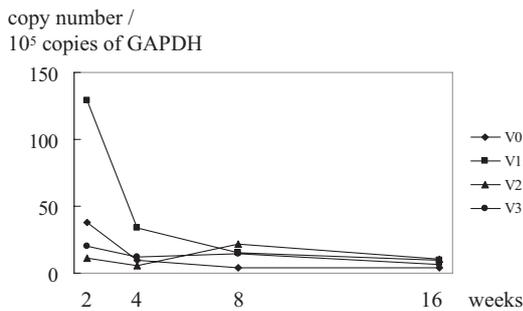


図5 顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現の成長変化
生後2週から16週の期間を通して, V1のmRNA発現量がversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった。

いた。前者のSYBR Green I法は、特別にprobeを作製する必要がなく簡便で比較的安価な方法ではあるが、dimerおよび非特異的なPCR産物に結合して蛍光を生じ、その結果としてmRNAの定量性が低下する可能性が指摘されている。この点に関して、Yinら(2001)は、PCR反応液内の目的cDNAが 10^3 コピー数以上であれば両者の定量性に差はほとんど認められないが、低コピー数のcDNAを定量する場合には、より感度の高いTaqMan probe法を選択する必要があることを指摘している。本研究では、versican isoformの定量においてmRNAの検出量がSYBR Green Iの検出限界である反応液中の目的cDNAのコピー数が 10^3 を下回ったため、SLRPおよびversicanの総発現量の定量にはSYBR Green Iを用い、versican isoformの定量にはTaqMan probe法を利用し良好な結果を得た。

2. DecorinとbiglycanのmRNA発現

DecorinはI型, II型, III型collagen, fibronectinなど、他の細胞外基質との結合能を有し、基質形成、細胞接着、細胞増殖などに関与していることが知られている (Vogel et al., 1984; Scott and Haigh, 1985; Pringle and Dadd, 1990; Scott et al., 1995)。Vogelら(1984)は、ウシ腱から抽出したdecorinの存在下ではcollagen原線維の形成速度が抑制され、また形成されたcollagen原線維の直径も減少することを初めて報告した。一方、KucとScott(1997)はウシ関節円板あるいは皮膚から抽出したdecorinを用いた同様の研究から、decorinはcollagen原線維の直径を増加させることを示した (Kuc and Scott, 1997)。このように、decorinのcollagen原線維形成に及ぼす影響に関しては統一された見解が得られずにいたが、最近のdecorinのknockout mouseを微細構造学的に検討した研究から、decorinが欠如した状態では、collagen原線維の直径には大きな影響がないものの、原線維の太さが不均一になることが明らかにされた (Danielson et al., 1997)。

ヒト関節軟骨におけるbiglycanの遺伝子発現を調べた研究によると、biglycanの発現は成長に伴い減少することが報告されている (Roughley et al., 1994)。一方、decorinは骨、軟骨、靭帯、真皮などの組織に広く分布し (Chopra et al., 1985; Bianco et al., 1990; Scott et al., 1981)、一般的に加齢に伴い増加傾向を示すことが報告されている (Bianco et al., 1990; Scott et al., 1981)。

ラット関節円板の蛋白発現の所見では、biglycanは生

直後からはほぼ一定であり、decorinは成長に伴い増加傾向を示している (Kuwabara et al., 2002). Decorinとbiglycanは、関節円板においてchondroitin sulphateではなくdermatan sulphateを側鎖に持ち (Scott et al., 1995), dermatan sulphateはラット顎関節円板では成長に伴って増加傾向を示すことが報告されている (Kuwabara et al., 2002).

本研究においては成長に伴い、ラット顎関節円板のmRNA発現量は、decorinは2週齢が最も多く、その後減少して一定量に推移し、また、biglycanも2週齢が最も多いが、その後成長に伴い減少していた。また、株化骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3 - E 1) を用いた研究では、mRNAの発現量はbiglycanがdecorinの60から80倍多いことが報告されているが (泰間ら, 2006), 本研究でもbiglycanが最も多く他のSLRPsの6倍以上の発現であった。

3. FibromodulinとlumicanのmRNA発現

Fibromodulinは、関節軟骨と腱から初めて単離され、腱、皮膚、筋肉、強膜、角膜などの間質性結合組織に存在することが報告された (Oldberg et al., 1989; Blochberger et al., 1992). しかし両proteoglycanともその機能に関しての見解は少ない。Fibromodulinはdecorinやbiglycanと同様にcollagen線維との結合能を有するが (Oldberg et al., 1989; Scott, 1996), その結合部位はdecorinのそれとは異なることが知られている (Svensson et al., 1999). 前述したようにdecorinがcollagen原線維の直径を調節しているのに対し (Danielson et al., 1997), fibromodulinはcollagen原線維間のスペースと太さを調節することが示唆されている (Scott and Parry, 1992). 一方、lumicanも広く軟組織、石灰化硬組織に存在し (Blochberger et al., 1992; Ying et al., 1997; Hall et al., 1997), collagenとの結合能を有し、原線維形成に深く関与する (Scott, 1996).

Knockout mouseを用いた研究から、fibromodulinとlumicanの欠乏はcollagen原線維の形態異常、サイズの不規則化を生じる (Svensson et al., 1999; Ezura et al., 2000; Chakravarti et al., 2002; Ameye and Young, 2002). Lumicanは原線維形成初期の細い原線維の反応の安定化に不可欠であり、fibromodulinは原線維形成後期における原線維の沿面成長の抑制に関与していることが明らかにされている (Chakravarti et al., 2002). この2つのproteoglycanの機能に関しては、原線維形成に大きな役割を有していることは明らかとなったが、他にどのような機能を有しているのかに関しては不明のまま

ある。Fibromodulinとlumicanの結合部位が同じであること、およびfibromodulinが欠損した状態では、lumicanのmRNA発現は減少していたにもかかわらずlumicanの蛋白質発現が代償的に約4倍増加し、collagen原線維上に蓄積されていたことから、fibromodulinとlumicanの機能は類似している可能性が指摘されている (Svensson et al., 1999). 株化骨芽細胞様細胞 (MC 3 T 3 - E 1) を用いた研究ではfibromodulinとlumicanは同様の機能を相補的に営んでいる可能性が指摘されている (泰間ら, 2006).

本研究においては成長に伴い、ラット顎関節円板のmRNA発現量は、fibromodulin, lumicanともに減少していたが、減少する時期は異なっていた。このことはfibromodulinとlumicanが相補的に働いている可能性が考えられる。

4. VersicanのmRNA発現

Versicanの機能のひとつとして、他の細胞外基質と結合することによる、細胞外基質の構築および組織への機械的特性の付与がある。Versicanはtenascinおよびヒアルロン酸と結合することが知られている (LeBaron et al., 1992). 成長終了後のウシ関節円板の生化学的研究から、円板には乾燥重量の5%のGAG鎖が存在し、その内訳は、ヒアルロン酸が5%, dermatan sulphateが14%, chondroitin sulphateが79%, keratan sulphateが2%含まれていることが報告されている (Nakano and Scott, 1989b). 円板組織内に存在するversicanが、滑液に含まれるヒアルロン酸の動態にどのような影響を及ぼしているのかに関しては不明である。

本研究でのRT-PCRの結果から、versican mRNA総発現量が生後2週齢をピークとして減少していた。この結果は、様々な組織でのversican遺伝子発現が加齢に伴い減少する報告と一致していた (Melching et al., 1997; Hart et al., 1998; Carrino et al., 2000; 鳥谷ら, 2005).

しかし、最近の研究によると、versicanの成長に伴う発現はversicanのisoformによって異なることが報告されている。Versicanの α domainと β domainに対する2つの抗体を用いた生化学的研究によると、versicanの β domainを含むisoformであるV0およびV1は、出生時をピークとし、2週齢までに急速に減少、その後減少は少し緩やかとなり、約8週齢で一定となったとしている (Milev et al., 1998). また、 α domainを含むV0およびV2では、出生の約5日前をピークとし2週齢までわずかに減少、その後約16週齢まで徐々に増加し、その後ほぼ一定となることが報告されている (Milev et al., 1998). 一方、

本研究においては、versicanのisoformにおけるmRNA発現は、V0、V1およびV3は2週齢以降減少していた。また、V2は8週齢にピークを示した。このことは、脳組織の遺伝子発現の研究でV2が10週まで増加する報告があり、顎関節円板でも類似した結果を示したと考えられる。

Versicanの4つのisoformのうち高い発現を示していたのはV0とV1であり、この傾向は特に生後2週から4週において顕著であった。なぜ、成長初期においてV0とV1のmRNA発現が高いのかは明らかではないが、2つのisoformと他のisoformとの構造的な違いはcore proteinに付くGAG鎖の数だけである。ヒトversicanで見ると、V0 isoformとV1 isoformには12本のGAG鎖の結合部位をもつ β domainが存在するのに対し、 α domainのみが存在するV2 isoformには4本、GAG結合domainがないV3 isoformにはGAG鎖が存在しない (Zimmermann et al., 1994)。したがって、成長初期において α domainを有するversicanのisoformの発現が高いことはversicanの有するGAG鎖が顎関節円板の成長に何らかの役割を有していることを示唆していると考えられる。Versicanの各isoformの機能に関しては不明の点が多いが、最近の研究ではversicanと組織の機械的強度との関係が指摘されている。Theocharisら (2001) は、ヒト動脈管でのV0 isoformの減少が血管壁の粘弾性と被圧縮性を低下させ、動脈の変形を惹起することを報告している (Theocharis et al., 2001)。また、Hinekら (2004) は、V3 isoformを過剰発現させると、elastin-binding proteinの発現および弾性線維の合成が促進されることを報告し、これには、V3 isoformの増加に伴うGAG鎖の減少が関与していることを示唆した (Hinek et al., 2004)。これらの研究は、円板におけるversicanのisoformの発現が弾性線維系の動態を介して円板組織の機械的強度に関与している可能性を示唆している。

結 論

ラット顎関節円板における各種proteoglycanのmRNA発現は、成長に伴い変化することが明らかとなった。このことは、成長に伴うラットの顎口腔機能の発達、あるいは顎関節における生力学的環境の変化が関与していることを示唆している。今後は、弾性線維系分子に関わる分子も含めてラット顎関節円板の成長変化に伴うmRNA発現を検討していきたいと考えている。

参 考 文 献

- Ameys L and Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans : novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal disease. *Glycobiology* 12 : 107-116, 2002.
- Ang LC, Zhang Y, Cao L, Yang BL, Young B, Kiani C, Lee V, Allan K and Yang BB. Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58 : 597-605, 1999.
- Bell WH. Normal craniomandibular structure. In "Temporomandibular Disorders : Classification, Diagnosis, Management", ed. by W.E. Bell, Year Book Medical Publishers, London, Chicago : 18-37, 1990.
- Bianco P, Fisher LW, Young MF, Termine JD and Robey PG. Expression and localization of the two small proteoglycans biglycan and decorin in developing human skeletal and non-skeletal tissues. *J Histochem Cytochem* 38 : 1549-1563, 1990.
- Blochberger TC, Cornuet PK and Hassell JR. Isolation and partial characterization of lumican and decorin from adult chicken corneas. A keratan sulfate-containing isoform of decorin is developmentally regulated. *J Biol Chem* 267 : 20613-20619, 1992.
- Carrino DA, Sorrell JM and Caplan AI. Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373 : 91-101, 2000.
- Carvalho RS, Yen EH and Suga DM. Glycosaminoglycan synthesis in the rat articular disk in response to mechanical stress. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 107 : 401-410, 1995.
- Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin : lessons from knockout mice. *Glycoconj J* 19 : 287-293, 2002.
- Chopra RK, Pearson CH, Pringle GA, Fackre DS and Scott PG. Dermatan sulphate is located on serine-4 of bovine skin proteodermatan sulphate. Demonstration that most molecules possess only one glycosaminoglycan chain and comparison of amino acid sequences around glycosylation sites in different proteoglycans. *Biochem J* 232 : 277-279, 1985.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE and Iozzo RV. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136 : 729-743, 1997.
- De Bont LG, Blankestijn J, van der Kuijl B and Boering G. The role of the articular disk in temporomandibular joint disorders. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 93 : 345-350, 1986.
- Ezura Y, Chakravarti S, Oldberg A, Chervoneva I and Birk DE. Differential expression of lumican and fibromodulin regulate collagen fibrillogenesis in developing mouse tendons. *J Cell Biol* 151 : 779-788, 2000.
- Fisher LW, Termine JD and Young MF. Deduced protein sequence of bone small proteoglycan I (biglycan) shows homology with proteoglycan II (decorin) and several nonconnective tissue proteins in a variety of species. *J Biol Chem* 264 : 4571-4576, 1989.
- Hall RC, Embery G and Lloyd D. Immunohistochemical localization of the small leucine-rich proteoglycan lumican in human predentine and dentine. *Arch Oral Biol* 42 : 783-786, 1997.
- Hart DA, Sciore P, Boykiw R and Reno C. Pregnancy induces complex changes in the the pattern of mRNA expression in knee ligaments of the adolescent rabbit. *Matrix Biol* 17 : 21-34, 1998.

- Hart RT, Hennebel VV, Thongpreda N, Van Buskirk WC and Anderson RC. Modeling the biomechanics of the mandible : a three-dimensional finite element study. *J Biomech* 25 : 261–286, 1992.
- Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, Mayne PM, Eberspaecher H, Zhou W, de Crombrughe B, Hook M and Mayne R. Expression pattern and gene characterization of asporin, a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem* 276 : 12212–12221, 2001.
- Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y and Wight TN. Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients. *Am J Pathol* 164 : 119–131, 2004.
- Iozzo RV and Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment : clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J* 10 : 598–614, 1996.
- Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M and Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 270 : 958–965, 1995.
- Kimura A. Stress analysis of the temporomandibular joint by finite element method. *J Jpn Oral Surg* 36 : 1180–1196, 1990.
- Kopp S. Topographical distribution of sulphated glycosaminoglycans in human temporomandibular joint disks. A histochemical study of an autopsy material. *J Oral Pathol* 5 : 265–276, 1976.
- Korioth TW, Romilly DP and Hannam AG. Three-dimensional finite element stress analysis of the dentate human mandible. *Am J Phys Anthropol* 88 : 69–96, 1992.
- Krusius T and Ruoslahti E. Primary structure of an extracellular matrix proteoglycan core protein deduced from cloned cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 7683–7687, 1986.
- Kuc IM and Scott PG. Increased diameters of collagen fibrils precipitated in vitro in the presence of decorin from various connective tissues. *Connect Tissue Res* 36 : 287–296, 1997.
- Kuwabara M, Takuma T, Scott PG, Dodd CM and Mizoguchi I. Biochemical and immunohistochemical studies of the protein expression and localization of decorin and biglycan in the temporomandibular joint disc of growing rats. *Arch Oral Biol* 47 : 473–480, 2002.
- Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH and Zimmermann DR. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 121 : 2303–2312, 1995.
- LeBaron RG, Zimmermann DR and Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267 : 10003–10010, 1992.
- Melching LI, Cs-Szabo G and Roughley PJ. Analysis of proteoglycan messages in human articular cartilage by a competitive PCR technique. *Matrix Biol* 16 : 1–11, 1997.
- Milam SB, Klebe RJ, Triplett RG and Herbert D. Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 381–391, 1991.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK and Margolis RU. Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain : aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247 : 207–212, 1998.
- Mills DK, Daniel JC and Scapino R. Histological features and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 33 : 195–202, 1988.
- Mills DK, Fiandaca DJ and Scapino RP. Morphologic, microscopic, and immunohistochemical investigations into the function of the primate TMJ disc. *J Orofac Pain* 8 : 136–154, 1994.
- Mizoguchi I, Scott PG, Dodd CM, Rahemtulla F, Sasano Y, Kuwabara M, Satoh S, Saitoh S, Hatakeyama Y, Kagayama M and Mitani H. An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 43 : 889–898, 1998.
- Nakano T, Imai S, Koga T, Dodd CM and Scott PG. Monoclonal antibodies to the large chondroitin sulphate proteoglycan from bovine temporomandibular joint disc. *Matrix* 13 : 243–254, 1993.
- Nakano T and Scott PG. Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Arch Oral Biol* 41 : 845–853, 1996.
- Nakano T and Scott PG. A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 34 : 749–757, 1989a.
- Nakano T and Scott PG. Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. I. High molecular weight chondroitin sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 277–283, 1989b.
- Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K and Heinegard D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *EMBO J* 8 : 2601–2604, 1989.
- Osborn JW. The disc of the human temporomandibular joint : design, function and failure. *J Oral Rehabil* 12 : 279–293, 1985.
- Plaas AH, Neame PJ, Nivens CM and Reiss L. Identification of the keratan sulfate attachment sites on bovine fibromodulin. *J Biol Chem* 265 : 20634–20640, 1990.
- Pringle GA and Dodd CM. Immunoelectron microscopic localization of the core protein of decorin near the d and e bands of tendon collagen fibrils by use of monoclonal antibodies. *J Histochem Cytochem* 38 : 1405–1411, 1990.
- Roughley PJ, Melching LI and Recklies AD. Changes in the expression of decorin and biglycan in human articular cartilage with age and regulation by TGF- β . *Matrix Biol* 14 : 51–59, 1994.
- Scapino RP. Histopathology associated with malposition of the human temporomandibular joint disc. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55 : 382–397, 1983.
- Scott JE. Proteodermatan and proteokeratan sulfate (decorin, lumican/fibromodulin) proteins are horseshoe shaped. Implications for their interactions with collagen. *Biochemistry* 35 : 8795–8799, 1996.
- Scott JE, Orford CR and Hughes EW. Proteoglycan-collagen arrangements in developing rat tail tendon. An electron microscopical and biochemical investigation. *Biochem J* 195 : 573–581, 1981.
- Scott JE and Haigh M. Proteoglycan-type I collagen fibril interactions in bone and non-calcifying connective tissues. *Biosci Rep* 5 : 71–81, 1985.
- Scott JE and Parry DA. Control of collagen fibril diameters in tissues. *Int J Biol Macromol* 14 : 292–293, 1992.
- Scott PG, Nakano T and Dodd CM. Small proteoglycans from different regions of the fibrocartilaginous temporomandibular joint disc. *Biochim Biophys Acta* 1244 : 121–128, 1995.
- Scott PG, Nakano T, Dodd CM, Pringle GA and Kuc IM. Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. II. Low molecular weight dermatan sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 284–292, 1989.

- Shinomura T, Nishida Y, Ito K and Kimata K. cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem* 268 : 14461-14469, 1993.
- Stegenga B, de Bont LG, Boering G and van Willigen JD. Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint : a review. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 1079-1088, 1991.
- Svensson L, Aszódi A, Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D and Oldberg A. Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem* 274 : 9636-9647, 1999.
- Sztrvolovics R, Grover J, Cs-Szabo G, Shi SL, Zhang Y, Mort JS and Roughley PJ. The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* 20 : 257-266, 2002.
- 泰間康平, 鳥谷奈保子, 荒川俊哉, 田隈泰信, 溝口 到. 株化骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞の分化・石灰化過程におけるデコリンとパイグリアンのmRNA発現. *北医療大歯誌* 25 : 63-71, 2006.
- Tanaka E, Tanne K and Sakuda M. A three-dimensional finite element model of the mandible including the TMJ and its application to stress analysis in the TMJ during clenching. *Med Eng Phys* 16 : 316-322, 1994.
- Tanaka E, Aoyama J, Tanaka M, Van Eijden T, Sugiyama M, Hanaoka K, Watanabe M and Tanne K. The proteoglycan contents of the temporomandibular joint disc influence its dynamic viscoelastic properties. *J Biomed Mater Res* 65 : 386-392, 2003.
- Tasheva ES, Klocke B and Conrad GW. Analysis of transcriptional regulation of the small leucine rich proteoglycans. *Mol Vis* 10 : 758-772, 2004.
- Theocharis AD, Tsolakis I, Hjerpe A and Karamanos NK. Human abdominal aortic aneurysm is characterized by decreased versican concentration and specific downregulation of versican isoform V(0). *Atherosclerosis* 154 : 367-376, 2001.
- 鳥谷奈保子, 荒川俊哉, 田隈泰信, 安彦善裕, 溝口 到. 成長期ラット顎関節円板におけるversican isoform mRNAの発現. *北医療大歯誌* 24 : 31-39, 2005.
- Vogel KG, Paulsson M and Heinegard D. Specific inhibition of type I and type II collagen fibrillogenesis by the small proteoglycan of tendon. *Biochem J* 223 : 587-597, 1984.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Gundry CN and Elenitoba-Johnson KS. Real-time multiplex PCR assays. *Methods* 25 : 430-442, 2001.
- Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM and Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem* 64 : 8012-8018, 1989.
- Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M and Kimata K. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *J Cell Sci* 106 : 55-65, 1993.
- Yamagata M and Kimata K. Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci* 107 : 2581-2590, 1994.
- Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, McCaughan GW, Eris JM and Bishop GA. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* 79 : 213-221, 2001.
- Ying S, Shiraishi A, Kao CW, Converse RL, Funderburgh JL, Swiergiel J, Roth MR, Conrad GW and Kao WW. Characterization and expression of the mouse lumican gene. *J Biol Chem* 272 : 30306-30313, 1997.
- Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K and Kimata K. Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues. *J Biol Chem* 270 : 3914-3918, 1995.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M and Bruckner-Tuderman L. Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 124 : 817-825, 1994.
- Zimmermann DR and Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 : 2975-2981, 1989.



甲田 尚央

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

平成15年3月北海道医療大学歯学部卒業

平成16年4月北海道医療大学大学院歯学研究科入学

平成20年3月北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了

平成20年4月北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野任期制助手

〔学位論文要旨〕

マルチモダリティ三次元画像融合による顎矯正手術シミュレーション法の確立

上地 潤

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

Establishment of orthognathic surgery simulation by using multimodal 3D
(3-dimensional) image-fusion techniques.

Jun UECHI

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido**Key words** : 外科的矯正治療, 顎矯正手術, 手術シミュレーション, 人工現実感

骨格的不調和を伴う症例に対して適用される外科的矯正治療は、顎顔面骨格形態と咬合を大きく改変させるものであり、治療目標や治療方針の設定を精度よく行うことが重要となる。特に非対称などの頭蓋顎顔面骨格の複雑な不調和を伴う症例では、三次元データでシミュレーションを行い三次元的に明確な治療目標を設定する必要がある (Uechi et al., 2006; Mizoguchi et al., 2008)。これまでこのような症例では、セファロ写真のトレース図を用いたペーパーサージェリーや歯列模型を用いたモデルサージェリーを行って術後を予測し、治療計画の立案がなされてきた (Turvey et al., 1982)。しかしペーパーサージェリーでは、骨格の形態変化を予測するのが二次元情報であるX線の投影像に基づいたものであり、そのため顎顔面骨格の三次元的に複雑な変形をきたした症例の治療目標を正確に設定することが困難であった。一方モデルサージェリーでは、実空間での正確なシミュレーションが可能である (Ellis, 1990)。反面、得られる情報が歯列模型上の領域に限定されたものであり、近位・遠位骨片間の干渉や術後の顎顔面骨格の対称性を評価することができない。つまり術後の骨格形態を予測するためには、歯列の位置変化に対応する骨片の位置変化を三次元的に把握しなければならない。

近年、X線CT装置とそれに関連したソフトウェアが飛躍的に進歩したことにより、頭蓋顎顔面骨格の立体画像の取得が可能となり、これを応用したコンピュータ支援診断 (Mah and Hatcher, 2004) や手術シミュレーシ

ョン (Troulis et al., 2002) が報告されるようになった。しかしX線CT装置から得られる画像では、補綴装置や矯正装置からのメタルアーチファクトの発生や咬頭嵌合状態での上下顎歯列の重なりにより咬合面形態を正確に表現することができないなどの問題があった (上田ら, 2005)。他方、非接触三次元形状計測装置は、それらの問題を解決するために有効であり、歯の咬合面形態と歯列の咬頭嵌合状態を正確に表現するための高い空間分解能と精度を有している (DeLong et al., 2003)。この三次元画像とX線CT装置から得た顎顔面骨格の三次元画像とを融合させる新しい手法が提案され、より精密な三次元仮想患者モデルの生成 (Gateno et al., 2003) と手術シミュレーション (Sohmura et al., 2004) への応用が報告された。しかしこの際の骨片移動方法は、モニター上に描画された歯の形態を指標にマニュアル操作で行うものばかりで、シミュレーションを行う者の技術、経験または洞察力などに頼った主観的方法であった。

本研究では、外科的矯正治療における客観的、定量的な術後予測とそれに基づく精緻な三次元治療目標の設定を実現することを目的として、術前のX線CT装置から得た頭蓋顎顔面骨格形態情報と非接触三次元形状計測装置から得た歯列形態情報を融合する新しい顎矯正手術シミュレーション法を確立し、その精度を検証した。得られた成果を以下に示す。

1) 術前・術後の顎顔面骨格形態と歯列形態を詳細に表現した仮想患者モデルを生成できた (図1)。

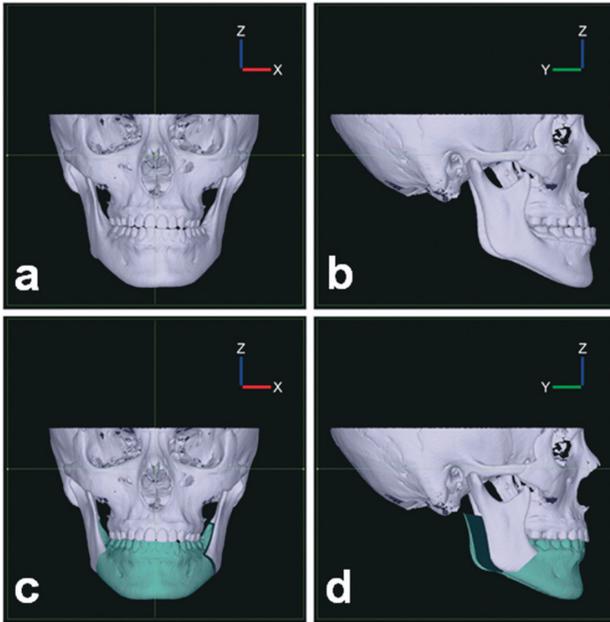


図1：術前仮想患者モデル，(a) 正面観，(b) 側面観．術後仮想患者モデル，(c) 正面観，(d) 側面観．

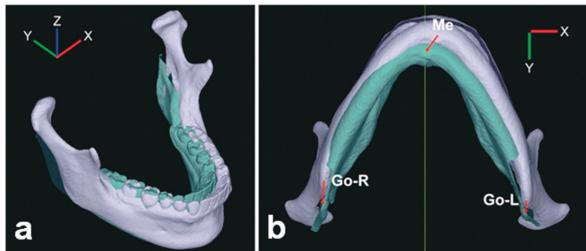


図2：下顎枝矢状分割術に伴う下顎遠位骨片の位置変化，(a) 鳥瞰図，(b) 軸面観．白：術前，緑：術後予測．

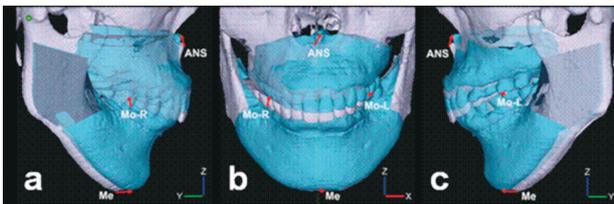


図3：上下顎同時骨切り術に伴う上顎および下顎遠位骨片の位置変化，(a) 右側面観，(b) 正面観，(c) 左側面観．白：術前，水色：三次元治療目標．

- 2) 咬合環境の改変に伴う顎顔面骨格形態の変化を三次元で予測することができた (図2)。
- 3) 本法は、極めて高い再現性を有した客観的な骨片移動シミュレーションであり、マニュアルによる方法と比較して統計学的有意差を認めた。
- 4) メタルアーチファクトを除去した精密な画像生成とシミュレーションが可能となった (図1)。
- 5) 本法において、上顎骨と下顎骨遠位骨片を一塊に移動させることにより、上下顎同時骨切り術へ応用できた (図3)。
- 6) 本法における画像位置合わせの総誤差は平均0.12 mmであり、X線CT画像の再構成間隔の0.50mmよ

り小さかった。

以上のことから、外科的矯正治療における客観的、定量的な術後予測とそれに基づく精緻な三次元治療目標の設定を実現することができた。しかし仮想三次元空間上に設定した治療目標を実空間の患者に正確に具現する方法はなく、口腔外科医の経験や洞察力に頼らざるを得ないのが現状である。下顎骨単独の骨切り術の場合では、上下顎咬合関係を基準に下顎を位置付けることで達成することができる。しかし上下顎同時骨切り術における上顎骨の位置付けでは、明確な基準が存在しないことから、設定した三次元治療目標を正確に達成することが困難である (福井ら, 1993)。このような治療の目標と結果に差が生じる問題に対して、コンピュータ外科の分野では、リアルタイム表示可能な三次元測定装置を用いて仮想三次元空間と術中実空間を相互作用的に接続し、病変の位置や大きさの正確な定量を行う報告や骨片の整復・位置付けを支援する報告などより先進的な研究開発が行われている (Nishihara et al., 2003)。本研究で示した手法とデータは、高い汎用性と拡張性を有しており、これらの報告と密接に関連する。すなわち本システムは、顎変形症治療における手術ナビゲーションシステムへの発展の高い実現可能性を含んでいる。

参考文献

- Delong R, Heinzen M, Hodges JS, Ko CC and Douglas WH. Accuracy of a system for creating 3D computer models of dental arches. *J Dent Res* 82 : 438-442, 2003.
- Ellis E 3rd. Accuracy of model surgery : evaluation of an old technique and introduction of a new one. *J Oral Maxillofac Surg* 48 : 1161-1167, 1990.
- 福井和徳, 氷室利彦, 山口俊雄, 大野朝也, 森悦秀, 鶴木隆. 外科矯正手術における上顎骨位置づけの正確性について. *顎変形誌* 3 : 214-215, 1993.
- Gateno J, Teichgraber JF and Xia JJ. Three-dimensional surgical planning for maxillary and midface distraction osteogenesis. *J Craniofac Surg* 14 : 833-839, 2003.
- Mah J and Hatcher D. Three-dimensional craniofacial imaging. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 126 : 308-309, 2004.
- Mizoguchi I, Uechi J, Shibata T, Tsuji Y, Okayama M, Muguruma T and Hayashi K. Three-dimensional (3-D) simulation of orthognathic surgery using a multimodal image-fusion technique : *In silico Dentistry -the evolution of computational oral health science -*. Osaka : Medigit, 2008, p125-128.
- Nishihara S, Sugano N, Ikai M, Sasama T, Tamura Y, Tamura S, Yoshikawa H and Ochi T. Accuracy evaluation of a shape-based registration method for a computer navigation system for total knee arthroplasty. *Knee Surg* 16 : 98-105, 2003.
- Troulis MJ, Everett P, Seldin EB, Kikinis R and Kaban LB. Development of a three-dimensional treatment planning system based on

- computed tomographic data. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 : 349–357, 2002.
- Sohmura T, Hojo H, Nakajima M, Wakabayashi K, Nagao M, Iida S, Kitagawa T, Kogo M, Kojima T, Matsumura K, Nakamura T and Takahashi J. Prototype of simulation of orthognathic surgery using a virtual–reality haptic device. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 : 740–750, 2004.
- Turvey T, Hall DJ, Fish LC and Epker BN. Surgical–orthodontic treatment planning for simultaneous mobilization of the maxilla and mandible in the correction of dentofacial deformities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 54 : 491–498, 1982.
- Uechi J, Okayama M, Shibata T, Muguruma T, Hayashi K, Endo K and Mizoguchi I. A novel method for the 3–dimensional simulation of orthognathic surgery by using a multimodal image–fusion technique. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130 : 786–798, 2006.
- 上田康夫, 田村信太郎, 大畑昇, 井上農夫男. CTデータからのアーチファクトを有する画像の検出. *顎顔面補綴* 28 : 39–45, 2005.

〔学位論文要旨〕

高分子材料の重合収縮と熱収縮によって生じた 金属・レジン接着界面の残留応力とメタルフレームの変形

垣野 健

北海道医療大学大学院歯学研究科

目 的

加熱重合法によって接着性レジンを経金属構造物に接着させ場合、レジンの重合収縮と熱収縮によって、接着界面に大きな応力が生ずる。この応力は、接着構造物を変形させる力となるとともに、接着界面からレジン剥離させる原因となる。しかし、接着界面の応力状態についてはほとんど解析されておらず、またメタルフレームの変形についても十分に解明されていない。

本研究では、金属とレジンの厚さの異なる接着試験片について、レジンの重合過程で生ずる収縮に起因するメタルフレームの変形挙動を調べるとともに、接着界面における応力状態の解析を試みた。変形挙動の観察では、リング状試験片、平板状試験片および多数歯ブリッジを想定した湾曲試験片の3種類の試験片を用いた。

材料および方法

1. メタルフレームの変形挙動の観察

厚さ0.3mm、高さ10mmの塑性加工で作製した金銀パラジウム合金板に鑲付を施し、直径20mmのリング状試験片を作製した。リング外周に厚さ1mmの接着性加熱重合レジン層を形成した。重合後、刃厚0.5mmのダイヤモンドカッターでリングを切断した。リングを接着させた場合と接着していない場合について、切断後のリングの開きを調べた。

平板状試験には、縦10mm、横50mm、厚さ0.3mmのフレームを用いた。レジン築盛前に金属表面をアルミナサンドブラスト処理し、メタルプライマーを塗布して、硬質レジンを経均一な厚みに築盛した。レジンの厚さは1mm、2mm、3mmの3条件とした。重合後、平板メタルフレームのたわみを万能投影器で計測した。

6歯ブリッジを想定した金銀パラジウム合金製湾曲試験片を鋳造で製作した。基板の厚さを7種類(0.7

mm~2.8mm)とした。レジン前装部には、リテンションビーズを付け、レジンとの機械的維持機構を付与した。レジンの厚さを1.5mmとし、硬質レジンを経築盛して重合後、フレームの変形を経万能投影器で計測した。

2. 超音波顕微鏡による接着界面の応力測定

超音波顕微鏡によって応力の解析を試みた。超音波顕微鏡で測定した表面弾性波の音速VRは、応力状態によって変化するので、VRの変化から応力を求めることができる。ロードセル付の三点曲げ試験装置を用いて、レジンの曲げ試験を行った。引張応力側のレジン表面で音速の測定を行い、応力と音速変化の関係を求めた。

厚さ4mmのスチレス鋼に4-META含有の接着性加熱重合型レジンを経重合し、接着界面における応力測定試験片とした。またリテンションホールを有するメタルフレームについて、レジンを経接着した場合と接着しない場合について、リテンションホールの近傍クラックを観察するとともに、応力状態を経超音波顕微鏡で調べた。

結果および考察

1. 超音波顕微鏡による応力測定

音速測定の結果、接着界面の極狭い領域(60μm)内に引張応力が限局していることが明らかになった。リテンションホールを有する試験片では、レジンとメタルフレームが接着している場合では、レジンと合金の界面における接着の影響を受けて、ホール内のレジンの収縮が拘束されるため、同部位のレジン内に引張応力が導入された。

2. 重合収縮と熱収縮によって生じたメタルフレームの変形とクラックの発生

リング状試験片では、レジンが接着していない場合では、金属リングに変形は現れず、隙間はカッター刃の厚み(0.5mm)であった。しかし、レジンと金属が強固に接着している試験片では、リングの切断後における隙

間の開きが大きくなった。レジンの重合収縮と熱収縮によって生じた応力によるメタルフレームの変形を強調して可視化することができた。

平板状試験片では、レジンの厚さが増すにしたがって、レジンの収縮に伴うメタルフレームのたわみは小さくなった。また、レジンの厚さを1.5mm一定にした場合でもフレームの厚さが増大するとたわみが減少した。レジンの断面積の幅と弾性係数が同一だとすると、曲げこわさは、厚さの3乗に比例する。レジンの厚さの増加に伴う応力の増大よりも、曲げこわさの効果の影響が大きいため、レジンの厚さの増大に伴って試験片のたわみが減少したと考えられる。レジンの厚さを一定にし、メタルフレームの厚さを変えた湾曲フレームにおいても、同様の理由でフレームの厚さの大きいほどたわみが小さくなった。

リテンションホールを有するメタルフレームの場合、接着の有無によって、レジンの亀裂の様相が異なった。レジンとメタルフレームが接着していない場合では、レジンの収縮によって合金がたわみ、合金が水平に戻ろうとする力によってレジン内に直線的な微細なクラックが生じた。しかし、レジンとメタルフレームが接着している場合では、ホール内のレジンに引張応力が作用したため、ホールに沿った形でクラックが生じた。

3. 硬質レジンの重合過程の収縮によって生ずる臨床的問題

多数歯にわたるレジン前装ブリッジの場合には、レジンの重合収縮にともなうメタルフレームの変形と、その結果として生じるメタルフレームの弾性回復力によって、硬質レジン内に引張応力が発生し、クラックが生ずることが明らかになった。技工段階において生じた歯冠隣接部のクラックは、前装レジンの破折や変色などの原因になる。

結 論

本実験では、接着性加熱重合レジンを金属試験片上に重合し、試験片の変形の大きさから、レジンの重合収縮と熱収縮に起因するレジン内の残留応力の大きさを調べるとともに、レジンとメタルフレームの接着の有無とリテンションホール近傍のレジン内における応力状態を超音波顕微鏡法で解析した。また、多数歯ブリッジを想定した硬質レジン前装ブリッジの変形挙動を解析し、レジンの重合収縮と熱収縮に伴う臨床的問題を提起した。

得られた結果は次の通りである。

1) 板状試験片におけるたわみの測定では、レジンの厚

さが薄くなるほど、たわみが増大した。

2) 超音波顕微鏡による音速測定では、金属・レジン接着界面近傍のレジン側で、音速が減少し、引張応力が作用していた。特に接着界面から約60 μm の領域における応力変化が大きかった。リテンションホール近傍のレジン内における応力状態を超音波顕微鏡法で解析したところ、レジンとメタルが接着している場合には、リテンションホールのレジンに引張応力が作用し、ホールに沿ってクラックが発生した。

3) 6本の前装ブリッジに硬質レジンを重合した場合、メタルフレームの曲率半径が減少するように変形した。重合後の形態修正によって、硬質レジンの隣接部にクラックが発生し、発生したクラックの数が多いほど、重合収縮によるメタルフレームの変形が回復した。

[最近のトピックス]

舌乳頭と味蕾の発生を制御する転写因子

鈴木 裕子

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系・組織学分野

哺乳動物の舌は発音や咀嚼器官であると同時に味覚を受容する重要な器官である。味覚は食物の嗜好や有害物質の感知といった個体の生存や生活のクオリティに関わる。味覚受容細胞として味蕾が茸状乳頭、有郭乳頭および葉状乳頭に局在する。発生過程では舌上皮のプラコード肥厚から舌乳頭が形成され、さらに乳頭上皮細胞から味蕾の基底細胞が分化しそれぞれの味蕾細胞型になると推測されている。

舌乳頭のうち舌尖と舌体に分布する茸状乳頭はマウスでは胎生12日ころ、神経が侵入する前に発生が始まるので(図1A)、器官培養が容易でありまた遺伝子改変マウスを用いた研究が近年急速に進められた。その結果、茸状乳頭の発生には歯胚、毛根、羽毛の発生と共通する系が働いていることが明らかとなった。器官培養した舌にShh阻害剤を投与すると乳頭が融合して大きくなることから、Shhは茸状乳頭の規則的な配列を決定すると考えられている。BMP4は投与する時期により乳頭数が増加、あるいは減少する。拮抗剤のNoggin投与では小さな乳頭ができる。canonical Wnt系の関与も知られておりLiCl投与によりWnt系を活性化させると茸状乳頭は巨大化する。Lef1ヌルマウスでは逆に茸状乳頭は非常に小さくなる(総説文献1)。最近Sry-related HMG box型転写因子SoxファミリーのうちSox2が舌上皮から茸状乳頭とさらに糸状乳頭への分化を調節することが報告された(文献2)。Sox2の発現量を低下させた矮小変異体では茸状乳頭の形成と味蕾数が著しく抑制されており、舌上皮から味蕾への分化が妨げられていた。糸状乳頭は正常に発生し突起構造を保っていた。逆にSox2を過剰に発現させた舌では糸状乳頭の分化が抑えられていた(図1B)。

上記の分子、転写因子群は茸状乳頭の上皮に発現するが、有郭乳頭では明らかでない。そこでSox2が有郭乳頭とその味蕾の分化に関与するかどうか胎生期と舌咽神経を切断したマウスの発現様式を解析した。胎生期の有郭乳頭では神経の侵入と同時に上皮細胞にSox2が発現し、味蕾原基が分化すると味蕾と周囲上皮のみに発現す

るようになった(図1C)。舌咽神経切断後の過程では、神経が消失するとSox2の発現は味蕾と上皮から消失し、再生神経が侵入すると、神経が接触した部分の細胞がSox2を発現するようになった(図1D文献3)。Sox2を発現する上皮細胞が味蕾の基底細胞となる可能性が示唆される。

- 1) Mistretta CM and Liu H-X : Arch. Histol. Cytol. 69 : 99-208 (2006)
- 2) Okubo T. et al. : Genes Dev. 20 : 2654-2659 (2006)
- 3) Suzuki Y : Cell Tissue Res. 332 : 393-401 (2008)

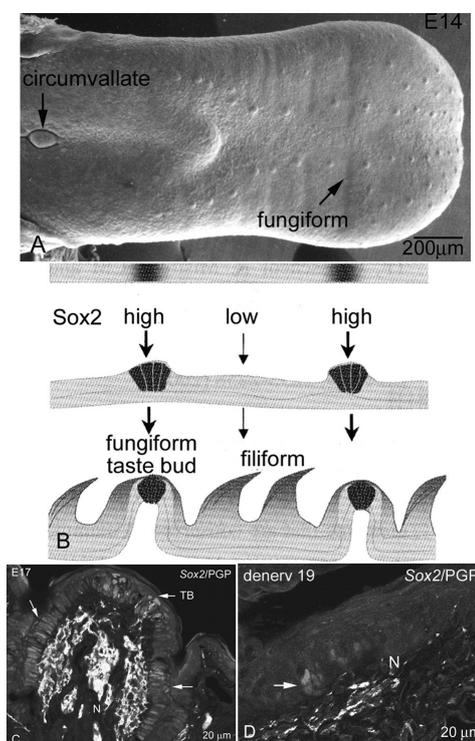


図1A: 胎生14日マウスの舌のSEM像。茸状乳頭 (fungiform papillae) と有郭乳頭 (circumvallate papillae) がみられる。糸状乳頭、葉状乳頭はまだ発生していない。B: Sox2の発現量の差異により茸状乳頭と糸状乳頭に分化が決定するモデル(文献2より)。C: 胎生17日の有郭乳頭。Sox2とPGP9.5抗体を用いた蛍光二重染色像。味蕾原基(TB)と溝上皮(矢印)にSox2陽性が見られる。D: 舌咽神経切断19日目の有郭乳頭。Sox2とPGP9.5抗体を用いた蛍光二重染色像。神経(N)が接触している上皮細胞にSox2陽性が見られる。

[最近のトピックス]

iPS細胞の開発とその後の進展状況

荒川 俊哉

Toshiya ARAKAWA

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

iPS細胞 (induced pluripotent stem cell) は、京都大学の山中伸弥教授のグループによって、ES細胞 (embryonic stem cell) に代わる夢の幹細胞として2006年8月に開発された⁽¹⁾。iPS細胞は、開発後すぐさま全世界で注目を浴びる事となり、ヒトへの応用や臨床への応用を目指して、熾烈な開発競争が繰り広げられることとなった。

iPS細胞とは、皮膚などの体細胞に特定の遺伝子を導入して誘導した多能性幹細胞である。iPS細胞には、同じく多能性を持つES細胞と比べて、受精卵を扱うことが無いので倫理的な問題が無い。また自分自身の細胞を使用できるので、移植などに用いられた場合の拒絶反応の問題が無い。そのため、iPS細胞は未来の再生医療にとって最良で夢の幹細胞と言える。

iPS細胞は、初期胚およびES細胞で発現している転写因子Oct 3 / 4 およびSox 2, ES細胞の維持・増殖に関与する遺伝子c-MycおよびKlf 4 の4つの因子をマウスの線維芽細胞に遺伝子導入することによって初めて開発された⁽¹⁾。その翌年の2007年11月には、ヒトの細胞でも同様な手法を用いてiPS細胞の誘導に成功した⁽²⁾。同時期にアメリカ合衆国ウイスコンシン大学のThomson教授の研究グループによって、c-MycおよびKlf 4 の代わりに、NANOGとLIN28の2つの因子を用いることによってヒトのiPS細胞を誘導できることが報告され、導入する遺伝子にはいろいろな組み合わせが考えられることが示された⁽³⁾。

誘導されたiPS細胞を用いたマウスの発生実験では、初め胎児の発生まで確認され⁽¹⁾、その後マウスの個体発生にも成功した^(4, 5)。しかしながら、生まれたマウスは、高頻度でteratomasを発生し、誘導に用いた癌遺伝子c-Mycおよび発現に用いたレトロウイルスベクターが発癌に関与していることが示唆され、方法の改善が求めら

れた。2007年12月に開催された第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会合同大会では、c-Mycを使わずに3つの因子だけでiPS細胞が誘導できることが報告され、早くもその問題の一つに対する解答が示された。レトロウイルスベクターを使うことに関しての解決策は、ごく最近2つの報告があり、代わりにアデノウイルスベクターを用いた方法と環状DNAを用いた方法が報告された^(6, 7)。

また、体細胞より未分化な細胞を用いたiPS細胞誘導の研究も行われている。マウスの神経幹細胞を用いたiPS細胞の誘導実験では、2つの因子 (Oct 4 と Klf4, またはOct 4 と c-Mycのいずれか) でiPS細胞が誘導された⁽⁸⁾。このことは、細胞が多能性を獲得するには遺伝子の発現状態の初期化が必要であるが、それには細胞の分化状態が大きく影響していることを示している。

更に、こうした初期化因子を遺伝子導入する代わりに、特殊な化合物を使ってiPS細胞を誘導する研究も行われている。米国カリフォルニア州Scripps研究所のDing博士の研究グループは、2つの化合物 (まだ公開されていない) を用いることによって、iPS細胞が誘導できたと報告している。このように遺伝子の導入を行わずにiPS細胞を誘導することができれば、より安全な多能性細胞を作成可能となるであろう。

臨床応用への基礎研究も進みつつある。その一つは筋萎縮性側索硬化症の患者さんよりiPS細胞を誘導した研究で⁽⁹⁾、もう一つはアデノシン・デアミナーゼ欠損症、ダウン症、パーキンソン病などの遺伝子病の患者さんより誘導したiPS細胞の研究である⁽¹⁰⁾。こうした疾患の発症機序の解明や薬の開発などが大いに期待されている。

このように、今後、iPS細胞は益々研究が進展し、夢の多能性幹細胞として進化し続けることであろう。iPS細胞を用いた肝臓が完成するのも間近かもしれない。

(2008.10.10)

参考文献

- 1) Takahashi K, and Yamanaka S, Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors, *Cell* 126, 1–14, 2006
- 2) Takahashi K, *et al.*, Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 129, 1377–1388, 2007
- 3) Yu J, *et al.*, Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells, *Science* 318, 1917–1920, 2007
- 4) Okita K, *et al.*, Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells, *Nature* 448, 313–317, 2007
- 5) Wernig M, *et al.*, In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state, *Nature* 448, 318–324, 2007
- 6) Stadtfeld M, *et al.*, Induced pluripotent stem cells generated without viral integration, *Science online* Sep 25, 2008
- 7) Okita K *et al.*, Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors, *Science online*, Oct 9, 2008
- 8) Kim JB, *et al.*, Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors, *Nature* 454, 646-650, 2008
- 9) Dimos JT, *et al.*, Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons, *Science* 321, 1218-1221, 2008
- 10) Park IH, *et al.*, Disease-specific induced pluripotent stem cells, *Cell* 134, 877-886, 2008

[最近のトピックス]

蛍光タンパク質GFPとノーベル化学賞

東城 庸介

Yosuke TOJYO

北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野

Department of Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

今年4人の日本人(一人はアメリカ国籍)が同時にノーベル賞を受賞し、日本中大いに盛り上がりました。物理学賞は“自発的対称性の破れ”なる素粒子研究だそうです。内容が全く理解できない私にはコメントしようがありませんが、化学賞の「GFP (Green fluorescent protein)」は私たちが日頃から研究に利用している馴染みの蛍光タンパク質ですので、ニュースを聞いた時はいつになく興奮してしまいました。今や、GFPがなければ私たち薬理学分野の研究は一步も進みません。図1は私たちが以前に作ったGFP融合IP₃受容体を発現したCOS-7細胞(共焦点レーザー顕微鏡像)です。GFP-IP₃受容体が小胞体のネットワーク上に均一に分布していることがよくわかります。ATPでプリン受容体を刺激するとGFP-IP₃受容体の局在がダイナミックに変化し、多くの凝集塊(clusters)を作ります(1)。この様にGFPは様々な分子の細胞内の動きを生きた細胞で解析するのに極めて有効です。

ノーベル化学賞を受賞した下村脩先生がGFPを発見したのは1961年(論文は1962年)ですので、40年以上も前です。GFP遺伝子のクローニングは1990年代前半ですから、GFPを使った研究が爆発的に増加したのはそれ以降です。理化学研究所の宮脇敦史先生によると、1962年からの30年間は「GFP研究者がクラゲと格闘した古き良き時代」(2)だそうです。毎年発表されるGFP関係の論文もごく僅かでした。下村先生自身、GFPが今のように大ブレイクするとは全く予想しなかったでしょう。周囲からはクラゲに熱中している風変わりなおじさん程度に思われていたのかも知れません。何が役に立つのか、誰にもわかりません。昨今の日本では“実用的な研究”、“すぐに役に立つ研究”がもてはやされ、単に未知の現象を明らかにしたいという、研究者個人の興味に基づく研究はあまり優遇されないように思います。GFPの発見も研究

の場がアメリカなので可能であったとしたら、私たち日本の研究者は喜んでばかりはいられません。

1962年のGFP発見の論文を読んでみようと思ってネットでアクセスを試みましたが、あまりにも古くてdownloadできませんでした。その代わりに、2005年に下村先生が書かれた“The discovery of aequorin and green fluorescent protein”というreview(3)を見つけました。オワンクラゲの発光器を切り取るカッター装置が図入りで出ていますので、興味のある方はぜひ見て下さい。ところで、今回下村先生と共にカリフォルニア大学のRoger Y. Tsienが化学賞を受賞しました。TsienはGFPやGFP変異体を使った様々な蛍光プローブを作ったことが受賞理由のようですが、Tsienの功績としては若い頃にFura-2などのCa²⁺蛍光指示薬を開発したことの方が大きいと思います。この指示薬の開発によりカルシウムシグナルの研究は飛躍的に進歩したのですから、私は、Tsienがいつかはノーベル賞を取るのではと思っていたので、本歯学雑誌の総説に「生命現象をリアルタイムで可視化することを可能にしたTsienの功績は極めて大きく、ひょっとするとノーベル賞も近いかも知れない。」(4)と書きました。手前みそになりますが、私の予想はばっちりであったわけで、大いに気分を良くしています。私の総説をすでに読んだ方は再度、まだ読んでいない方はぜひ一度お読み下さい。

文献

- 1) Tojyo Y, Morita T, Nezu A and Tanimura A. The clustering of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors is triggered by IP₃ binding and facilitated by depletion of the Ca²⁺ store. J Pharmacol Sci 107: 138-150, 2008.
- 2) 宮脇敦史 編集. GFPとバイオイメージング(実験医学別冊), 羊土社, 2000.

- 3) Shimomura O. The discovery of aequorin and green fluorescent protein. *J Microscopy* 217: 3-15, 2005.
- 4) 東城庸介. カルシウムシグナルと唾液分泌機能. 北海道医療大学歯学雑誌 24 (1): 1-11, 2005.

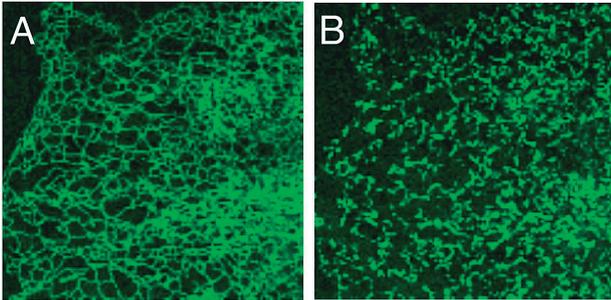


図1. GFP-IP₃受容体を発現したCOS-7細胞の小胞体ネットワークの共焦点レーザー顕微鏡像。(A) 刺激前, (B) 刺激後

[最近のトピックス]

神経性及び体液性の自律神経系を介する咀嚼筋の血流調節機序

石井 久淑

Hisayoshi ISHII

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野

Department of Oral Biology, Division of Physiology, Health Sciences University of Hokkaido

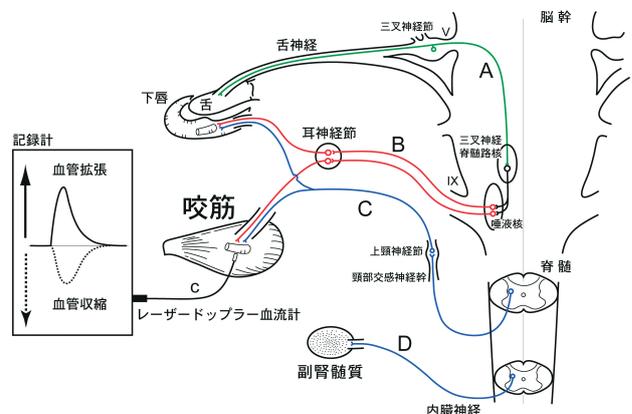
これまでに我々は、咀嚼筋の血管には体幹及び四肢の骨格筋とは異なり、副交感神経性血管拡張線維（図1—B）と交感神経性血管収縮線維（図1—C）による二重神経支配が存在することを証明し、自律神経系を介する血管反応が咀嚼筋の血流調節の基盤を成していることを報告した（Ishii et al., *J Physiol* 569 : 617–629, 2005）。副交感神経性血管拡張反応は三叉神経（舌神経など）の感覚神経線維（図1—A）を介して反射的に誘発され、交感神経性血管収縮反応は頸部交感神経幹（図1）に由来する自発性の神経トーンによって調節されていることが明らかにされている（Izumi et al., *J Oral Biosci* (Review) 40 : 30–41, 2006 ; Ishii et al., *J Physiol* 569 : 617–629, 2005 & *J Oral Biosci* (Review-JAOB/Rising Members Award) 40 : 30–41, 2006）。

咀嚼筋の機能障害は顎・顔面・頭部領域の慢性疾患に最も多く認められる症候であり、それらの発症機序や病態には自律神経系の乱れを伴う咀嚼筋の血流障害が密接に関連していると考えられている（Delcanho, *Aust Prosthodont* 9 : 49–59, 1995 ; Sugisaki et al. *J Orofac Pain* 15 : 320–328, 2001）。実際に、咀嚼筋の血流動態はメンタルストレスに対して非常に感受性が高く（Hidaka et al., *J Dent Res* 83 : 227–231, 2004）、慢性的な咀嚼筋の血流障害は交感神経活動の変調を伴う場合が多いことが報告されている。しかしながら、自律神経系と咀嚼筋の血流障害との関連性は未だ明確ではない。

近年我々は、交感神経緊張状態は咀嚼筋の血流量を減少させるとともに、副交感神経性血管拡張反応を顕著に抑制することを明らかにし（Ishii et al., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293 : R729–R733, 2007）、交感神経緊張状態が咀嚼筋の血流に対して抑制的な作用を有していることを報告した。ところが、一方で寒冷刺激によって誘発される交感神経緊張状態は咀嚼筋の血流量を

増加させることがヒトの咬筋で報告されており（Maekawa et al., *Arch Oral Biol* 43 : 849–859, 1998）、交感神経系を介する咀嚼筋の血流増加機構の存在が示唆されている。この咀嚼筋の血流増加機序は明らかにされていないが、寒冷刺激やメンタルストレスによる交感神経緊張状態は交感神経—副腎系（図1—D）を活性化し、それにより副腎髄質から分泌されるカテコラミンは心血管系の調節に重要であると考えられている（Herd, *Physiol Rev* 71 : 305–330, 1991）。したがって、交感神経—副腎系は交感神経緊張状態における咀嚼筋の血流増加に密接に関与すると考えられる。

このように、神経性（頸部交感神経幹）及び体液性（交感神経—副腎系）の自律神経系を介する血流調節の相互作用は、交感神経緊張状態における咀嚼筋の血流維持に重要であり、それらの破綻は慢性的な咀嚼筋の血流障害に密接に関連していることが予想された。今後の関連分野の研究の進展が期待される。



【図1】咀嚼筋を支配する自律神経性血管運動線維とそれらの中枢の模式図

(A) 感覚神経線維, (B) 副交感神経性血管拡張線維, (C) 交感神経性血管収縮線維, (D) 副腎髄質を支配する交感神経節前線維

[最近のトピックス]

歯垢から口腔バイオフィームへ

中澤 太

口腔生物学系微生物学分野

1970年代に、「歯垢は、清掃が不十分な歯や補綴物の表面に形成される非石灰化細菌性沈着物」と定義されている。その後、「歯面を覆ったペリクルに付着した *Streptococcus sanguinis* や *S. mutans* 等の初期集落形成細菌種に、*Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* 等の後期集落形成細菌種が定着することによって歯垢が蓄積し、その後石灰化した死菌が歯石となる」と考えられてきた。即ち、多種類の細菌が単純に積み重なることによって形成されると考えられてきたものが、従来の歯垢の概念である。

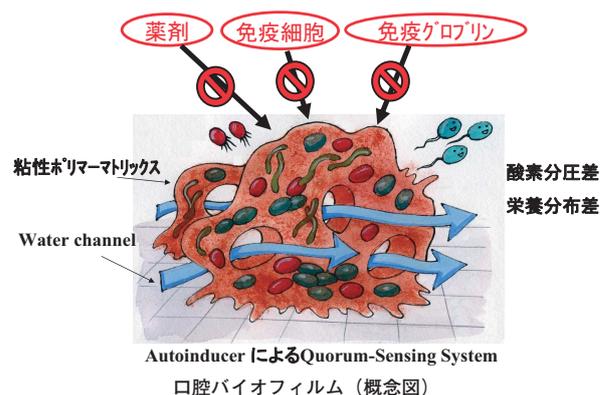
一方、バイオフィームは水道管や水路系等の“ぬめり”として古くから知られていた。長い間それは微生物と粘性物質が混じりあった比較的均一な堆積層と考えられていた。しかし、1994年 J. W. Costerton 等の蛍光を用いた共焦点レーザー顕微鏡による詳細な解析によって、その概念は大きく様変わりした。そして現在バイオフィームは、ビルが建ち並び、上下水道が完備し、情報通信網が張り巡らされた都市に例えられている。即ち、バイオフィーム内の細菌は都市で暮らす人間に見立てられるのである。

バイオフィームの生成は、1) コンデショニング薄膜の形成、2) 浮遊細菌の薄膜への付着、3) 粘性ポリマーマトリックスの産生、4) マイクロコロニーの形成、5) バイオフィームの成熟、6) バイオフィームからの細菌の離脱、の6段階の過程からなると理解されている。上記の4)～6)の過程で、細菌は相互にオートインデューサー (autoinducer: AI) を介した情報交換し (所謂クオラムセンシング, Quorum-Sensing: QS), 少ない栄養分や細菌の代謝産物等の有効利用と効果的排泄を行なうことによって細菌の数的バランスを保ち、より成熟した三次元構造を有するバイオフィームを形成することになる。その結果、バイオフィームは全体として強固な防御システムを持つ社会となり、細菌にとっての外敵である抗生物質や抗体などの免疫作用物質から、内部の細菌を守っていると考えられる。

従来の“歯垢”には、“細菌相互のコミュニケーショ

ンによってバランスを維持し細菌を守る社会システム”という概念は含まれていなかった。しかし現在、「歯垢は典型的なバイオフィームである」と認識され、“口腔バイオフィーム”と言われている。実際にAIを介したQSの存在が幾つかの口腔細菌で確認されている。また口腔細菌由来のAI分子も多数報告されている一方、QSを阻害し口腔バイオフィームの形成を抑制する物質も明らかにされている。

これまでの研究では、歯垢構成細菌を分離し、その純培養菌を用いてそれらの性状を明らかにしてきた。コッホに始まるこの古典的手法で、多くの生命原理が解明されたことは事実である。しかし、QS等によって単独の細胞とは全く異なる挙動を示し、しかも全体の約50%が未知の細菌種から構成されている口腔バイオフィームの解明と制御方法の構築には、従来の研究手法では限界があると考えられる。むしろ逆の手法、例えば、多種多様な細菌種で構成されながらも社会を形成している口腔バイオフィームを一集団と捕まえ、その集団の全DNA塩基配列を網羅的に解析すること等は有効な手法の1つであろう。これによって口腔バイオフィームとして発現している全遺伝子や、異なる環境下の口腔バイオフィームの特異的な遺伝子等が解明される。これらの情報は、人工的培養過程を経ないため実際の口腔内細菌叢の生態系を直接的に示すことから、口腔バイオフィームの臨床的制御戦略への重要な足がかりを提示することとなる。



[最近のトピックス]

歯科用ユニットの給水系における細菌検査の研究

水谷 博幸¹⁾, 村井 雄司²⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野
 2) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

【目的】

歯科用ユニット（ユニット）には、含嗽水、ならびに歯の切削時の摩擦防止や口腔内清掃時に使用するシリンジやタービンからの水がある。こうした給水系の水は、安全であるとの前提で使用されている。一方で、歯科治療後に緑膿菌による感染を起こしたケースなどが報告されてきた¹⁾。国内では、含嗽水に高率の細菌汚染があることも報告されている²⁾。歯科医療現場では、始業時に数分間排水することによって細菌数の減少を試みているが、休日明けに使用する際には給水タンクや配管の中でバイオフィーム形成が進行する可能性がある。院内感染防止のため、ユニット給配水系における細菌数変動を把握することが必要と考えた。

そこで我々は、ユニットからの給配水に含まれる細菌レベルを簡便に検査実施することを試みた。このことは、歯科医療現場における医療従事者側の院内感染防止に役立つだけでなく、安全・安心に評価を患者側に提供することができる。

【対象および方法】

ユニット8台について、休日明けの月曜日始業時と終業時における含嗽水とタービン用水に含まれるATPを測定した。微生物（細菌）には、必ずATPが含まれている。化学発光法によりこのATPを測定し、給配水系の細菌汚染を検査・測定することとした。測定には、MERCK社製のHY-LITE 2[®]を用い、相対的光量単位（RLU値）にて確認した。また、始業時と終業時の統計処理にはpaired-t検定を用いた。

【結果および考察】

1) 含嗽水の1日におけるATP変化

ユニット番号をNo.1からNo.8までに決め、それぞれの始業時と終業時におけるコップ用水のATPを3回ずつ調べ、その平均を各ユニットのRLU値とした。ユニット8台の休日明け始業時の平均RLU値は、 162.5 ± 51.7

(110~263)であり、終業時は、 81.9 ± 43.5 (38~160)であった。始業時に比較し終業時のRLU値は有意に減少した ($p < 0.01$)。(図1)

2) タービン用水の1日におけるATP変化

タービン用水の結果は、始業時の平均RLU値は 1622.9 ± 1457.3 (550~4400)で、終業時平均は、 674.4 ± 472.8 (157~1357)であった。1)と同様に始業時のRLU値は、終業時に比べ有意に減少した ($p < 0.01$)。(図2)

一般家庭13軒の水道水について調べたところ、RLU値の平均は20.7であった。今回測定した施設の水道水はRLU値52.3で、調査したユニットからの配水はこれらに比べて有意に高い汚染を示した。本ユニット設置施設では、上水道からではなく井戸水を使用している。消毒の観点から考えると、井戸水の方が上水道より細菌が多いことは予想されるため、我々の数値は上水道を使用している医療施設には当てはまるものではない。しかし、常時飲んでいる水と同程度の水でなければ、受診者は安心できないだろう。初回に採取した水は、休日を経て給水ライン内で細菌が多量に増殖していることが考えられ、免疫能の低い者にとって感染の温床になる。それゆえに、歯科医療従事者はユニットの水に関して細菌汚染を認識し、受診者に知らせる義務があると考えられる。しかしながら、ユニットからの配水における細菌の変動に関する報告は少ない。飲料用として使用している水に近い値でなければ、患者も安心して受療することができないだろう。ユニットからの水が安全であるかを確認してから診療や治療を開始しなければならず、簡易モニタリングが必要不可欠である。

1) Wirthlin MR, Marshall GW Jr, Rowland RW : Formation and decontamination of biofilms in dental unit waterlines. J Periodontal 74 : 1595-1609. 2003.

2) 歯科用ユニットの水の管理：林 俊治・磯貝恵美子・平井義一，臨床医，Vol. 31, No. 8, 1468-1471, 中外医学社，2005.

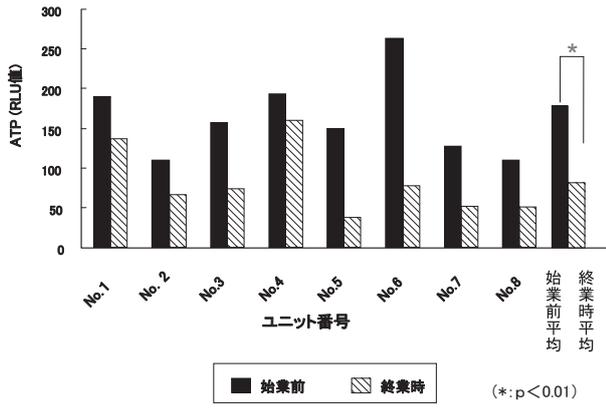


図1 含嗽水の1日におけるATP変化

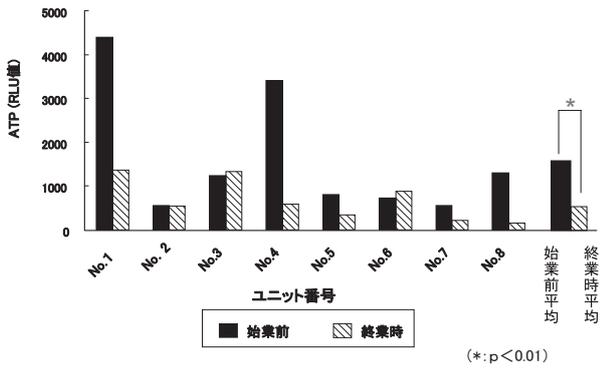


図2 タービン用水の1日におけるATP変化

[最近のトピックス]

頭頸部癌に対する超選択的動注療法

杉浦 一考, 中山 英二

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系 歯科放射線学分野

近年、頭頸部癌の集学的治療戦略のoptionとして、超選択的動注療法が普及してきている。頭頸部癌への抗癌剤の動注療法は、1950年代から開始され、その後、主に術前治療として行われてきた歴史を有するが、初期の成績が不振であったため、一時期、衰退していた。1980年代後半から、カテーテルをはじめとする機材の発達と血管造影装置の進歩により、より選択的にカテーテルを目的動脈に到達させる手技が開発され、現在、再び注目を集めるようになってきている。

頭頸部領域への動注手技に関しては、大別して2つの手技が存在するが、その適応においては、現時点では明らかなcriteriaは存在せず、各施設に任されているのが現状である。

一つめは、米国などで主流の方法で、大腿動脈からのアプローチにより選択的にカテーテルを挿入する方法である。まず、大腿動脈に5.5Fシースを留置し、5Fガイディングカテーテルを外頸動脈起始部に留置し、同軸法にてマイクロカテーテルを目的動脈に留置する方法である。

もう一つの方法としては、愛知県がんセンターの不破らにより発展普及してきた方法で、浅側頭動脈から逆行性に選択的にカテーテルを挿入する方法である。まず側頭部を切開し、浅側頭動脈を露出させた後、4Fガイディングカテーテルを目的血管の起始部に挿入し、ガイドワイヤーを目的動脈内に深く進めた後、ガイディングカテーテルを抜去し、先端部2.7Fのテーパー状カテーテルと置換する方法である。(Fuwa N et al., 2008)

いずれの方法も、色素を動注し患部が濃染されるのを確認した後、抗癌剤の動注となるが、浅側頭動脈アプローチの場合は、持続動注が可能であるのに対し、大腿動脈からのアプローチでは基本的にone shot動注となる。よって、抗腫瘍効果としては浅側頭動脈からの持続動注療法が勝っていると思われるが、複数の動脈への対応など手技の自由度は大腿動脈からのone shot動注が優れており、動脈塞栓術を用いた血流改変も可能である。

使用薬剤は、カルボプラチンまたはシスプラチンとい

ったプラチナ系薬剤が主に使用されている。以前は、カルボプラチンが体表面積から目標血中濃度に対する薬剤投与量の算出が可能であるため広く使用されてきたが、現在は、シスプラチンを用い大量に投与した後に、チオ硫酸ナトリウムで中和する方法が主流となっている。

超選択的動注療法は高濃度の抗がん剤を腫瘍内に投与可能で、従来の経口もしくは静脈内投与の化学療法と比して、格段の抗腫瘍効果が期待できる治療法である。しかしながら、現時点では単独療法としての根治性は乏しく、放射線治療や手術療法などの併用療法としての役割であり、その臨床的意義に関しては、確固たる統一的な見解は存在していない。

頭頸部領域の動注療法の併用に関する高いevidenceの治療成績は未だ存在しておらず、今後の課題としては、生存率、局所制御率を含め、その手技、方法においても多施設無作為臨床試験による評価が必要と思われる。

適応症例があれば北海道医療大学においても実施できる体制を整備していきたいと考えている。

参考文献

1. Fuwa N, Kodaira T, Furutani K, Tachibana H, Nakamura T. A new method of selective intra-arterial infusion therapy via the superficial temporal artery for head and neck cancer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 105 : 783-789, 2008

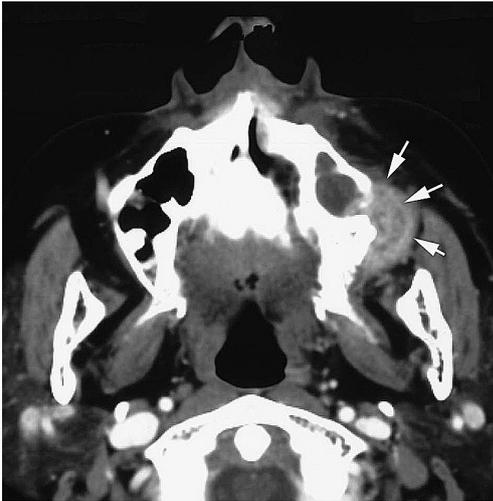


図1 左上顎歯肉癌 (T2N0M0)
破壊性骨変化を伴う内部不均一に増強される腫瘍性病変 (←)

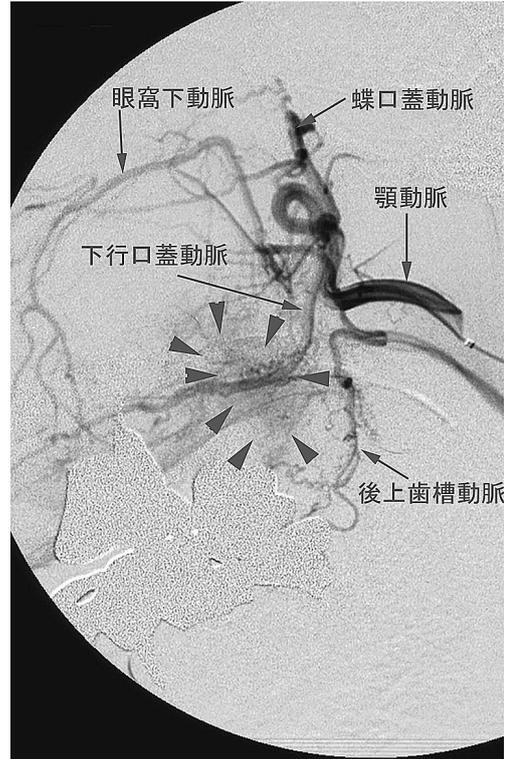


図3 顎動脈超選択的造影 (図2の破線円部の拡大像)
下行口蓋動脈および後上歯槽動脈を栄養血管とする腫瘍濃染像が見られる。(←)

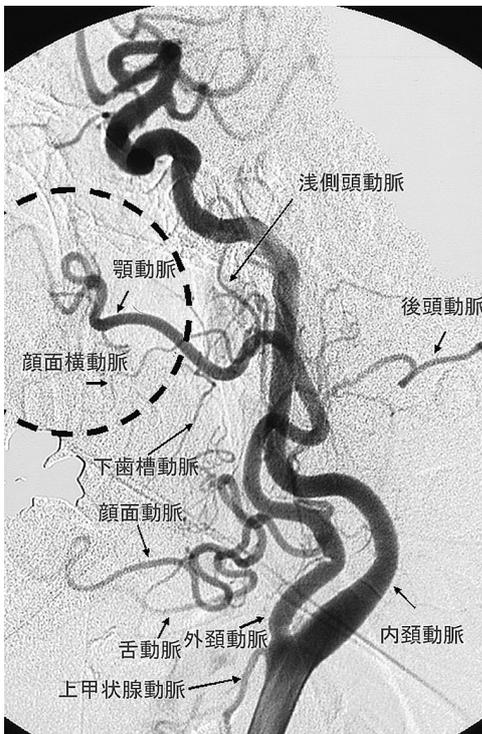


図2 大腿動脈アプローチによる総顎動脈造影

[最近のトピックス]

根分岐部病変に対する処置法とその予後に関する後向き研究

森 真理, 古市 保志

北海道医療大学歯学部 口腔機能修復・再建学系 歯周歯内治療学分野

根分岐部は解剖学的に複雑な形態をしているため、スケーラーが根面に到達しにくく、根分岐部病変に対する歯周治療は困難となることが多い。さらに患者自身がブラークコントロールしやすい環境を整えることも困難となるため、メンテナンス中に抜歯になる場合も少なくない。今回我々は、歯周病専門医による歯周治療を受け、3年以上のメンテナンスを受けている患者の根分岐部病変の予後について調査し、予後に影響を与える因子と歯の生存率を検討した。

北海道医療大学歯学部歯科内科クリニック保存Iにて歯周治療を受け、3年以上のメンテナンスを受けた慢性歯周炎患者29名を対象とし、初診時に根分岐部病変が存在した上下顎第一、第二大臼歯113歯について調査した。初診時、メンテナンス開始時、直近のメンテナンス時において、部位、歯種、根分岐部病変の程度、処置内容、口腔清掃状態、歯周ポケット深さ、病的ポケット率、残存歯数を調査し、各々の処置を行った根分岐部病変の経過を分析した。

初診時の被験者の年齢は平均55.2±10.8歳であった。治療期間は平均14.2±6.5年であり、根分岐部病変の処置後平均12.0±6.5年経過していた。対象歯は、初診時のLindheの分類で1度：48歯、2度：35歯、3度：30歯であった。Lindheの分類で1度の歯に対してはSRPが最も多く行われていた。根分岐部病変の重症度が高いほど、外科処置が行われていた。外科処置としては、オープンデブライドメント、ヘミセクションが多かった。メンテナンス中に抜歯されたのは18歯であり、ポケットの進行によるものが最も多かった(表1)。初診時に、根分岐部病変が認められた歯と認められない歯のメンテナンス中の喪失率はそれぞれ15.9%と10.5%であった(表2)。重回帰分析の結果、歯の残存年数と分岐部のポケット深さ・残存歯数に有意な関連(p<0.05)が認められた。

根分岐部病変が認められない歯と比べて、根分岐部病変が認められた歯ではメンテナンス中の歯の喪失率は高かった。また、初診時に軽度の根分岐部病変でも、メンテナンス中に進行した症例も認められたことから

(表3, 4), 根分岐部病変では注意深く経過を観察し、必要に応じて治療を行う必要があると考えられた。

表1 メンテナンス中の抜歯数とその理由

| 治療内容 開始前の メンテナンス | 処置 歯数 | 抜歯 歯数 | 抜歯理由 | | | |
|------------------------|----------|----------|---------------------------------|--------|----------------------------|--------|
| | | | ポ ケ ッ ト の 進 行 | 破 折 | 根 尖 性 歯 周 炎 | う 蝕 |
| SRP | 59 | 11 | 9 | 0 | 1 | 1 |
| トンネリング | 5 | 2 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| ヘミセクション | 15 | 3 | 2 | 1 | 1 | 0 |
| オープンデブ ライドメント | 17 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |

表2 複根歯の長期予後に関する論文検索結果

| | 研究期間 | 歯の喪失率 | |
|------------------------------|--------|-------|-------|
| | | 複根歯 | 単根歯 |
| Hirschfeld & Wasserman(1978) | 平均22年 | 31.4% | 4.9% |
| McFall(1978) | 14~29年 | 57% | 7% |
| Moriら(2007) | 3~28年 | 15.9% | 10.5% |

表3 非根切除療法・非外科治療の長期予後に関する論文検索結果

| | 観察期間 (年) | 被験 歯数 | 歯の喪失 率(%) |
|------------------------------|-------------|----------|--------------|
| Hirschfeld & Wasserman(1978) | 22(平均) | 1464 | 31 |
| Goldmanら(1986) | 15-34 | 636 | 44 |
| Ross & Thompson(1978) | 5-24 | 387 | 12 |
| Woodら(1989) | 10-34 | 164 | 23 |
| McFall(1982) | 15-29 | 163 | 57 |
| Wangら(1994) | 8 | 87 | 30 |
| Moriら(2007) | 3-28 | 81 | 37 |

表4 根分割/根切除療法の長期予後に関する論文検索結果

| | 観察期間 | 被験 歯数 | 歯の喪 失(%) | 歯の喪失原因 | | | |
|-------------------|-----------------------|----------|-------------|------------------|------------------|------------------|--------|
| | | | | 歯 根 破 折 | 歯 周 疾 患 | 歯 内 病 変 | う 蝕 |
| Bergenholtz(1972) | 2~10 | 45 | 6 | | 4 | 2 | |
| Klaván(1975) | 3 | 34 | 3 | | 3 | | |
| Hamp&Nyman(1975) | 5 | 67 | 0 | | | | |
| Langerら(1981) | 10 | 100 | 38 | 18 | 10 | 7 | 3 |
| Erpenstein(1983) | 4-7 | 34 | 9 | | 3 | 6 | |
| Buhler(1988) | 10 | 28 | 32 | 3.5 | 7.1 | 17.7 | 3.6 |
| Carnevaleら(1991) | 303歯/3-6 185歯/7-11 | 488 | 4 | 1.8 | 0.4 | 0.9 | 0.9 |
| Bastenら(1996) | 2-23 | 49 | 8 | | 2 | 4 | 2 |
| Carnivaleら(1998) | 10 | 175 | 7 | 1.1 | 1.8 | 2.3 | 1.8 |
| Moriら(2007) | 3-28 | 31 | 19 | 3.2 | 9.6 | 3.2 | 3.2 |

[最近のトピックス]

新規直接覆髄剤としてのMineral Trioxide Aggregate (MTA) について

半田 慶介, 安田 善之, 斎藤 隆史

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系う蝕制御治療学分野

軟化象牙質除去中の露髄, 生活歯形成中の偶発的な露髄, 外傷による歯冠破折に伴う露髄など, 直接覆髄を試みる症例は少なくない. この際の第一選択薬剤として水酸化カルシウム製剤を用いることが多いが, 本稿で紹介するMineral Trioxide Aggregate (MTA) は水酸化カルシウムに替わる新規直接覆髄剤として期待されている材料である.

MTAは1998年にFDAにより認可され, 2007年にデンツプライ三金社からProRoot MTAとして製品化された. MTAは優れた生体適合性と封鎖性を有しており, 辺縁漏洩による炎症を引き起こすことなく外来刺激を遮断するため, 水酸化カルシウムに替わる直接覆髄剤として, その臨床成績が期待されている. これまでに直接覆髄のみならず生活歯髄切断, 根管充填, 逆根管充填, パーフォレーション部の封鎖, 根尖部の封鎖等に関する臨床研究が報告されている⁽¹⁾が, わが国では直接覆髄のみが許認可を受けている.

MTAの主成分は建築用セメントであるポルトランドセメントであり, CaO, SiO₂, Al₂O₃, Fe₂O₃等で構成されている. 建築用セメントとの違いは, 粉末の粒径を建築用セメントよりも小さく均一化させ, 造影剤として酸化ビスマスを追加していることである. MTAの硬化反応は, 無機酸化物が水や種々のイオンと化学反応して水和物を生成しながら硬化体を形成する⁽²⁾. 臨床上望ましい性質として湿潤環境下でも硬化反応が進行する. 水酸化カルシウムの場合, 経時的にその成分が溶出することで崩壊を招き, これが辺縁封鎖性や接着強さの低下を引き起こす原因と考えられている. これに対してMTAは非水溶性のケイ酸化合物を含むため封鎖性が維持されると考えられる. しかしながら, 窩壁との適合性や歯質に対する接着メカニズムの詳細は現在のところ不明で, 今後の研究が待たれるところである.

MTAの硬化直後のpHは非常に高く(練和3時間後にpH12.5), そのため水酸化カルシウム製剤と同様に一時的に歯髄傷害性に働くが, 経時的にpHが安定化することが報告されている. また本分野でのin vitro研究で

MTAが歯髄細胞によるBMP-2発現を誘導し, 石灰化を促進することが明らかになっており⁽³⁾, さらに骨形成関連タンパクであるオステオポンチンやオステオカルシンの発現を誘導することが他の研究グループにより学会報告されていることから, 直接覆髄後の積極的な被蓋象牙質形成の誘導に関連するものと考えられる. 直接覆髄において, 水酸化カルシウム製剤とMTAを比較したところ修復象牙質形成能は同程度であったが, 歯髄の炎症は同程度⁽⁴⁾もしくはMTAの方が軽度であったことが報告されている⁽⁵⁾. MTAの抗菌性については, MTA自身の高pHや構成成分の鉄イオンが*staphylococcus aureus*などの細菌⁽⁶⁾や真菌(*candida albicans*)⁽⁷⁾に対して抗菌性を示すが, 酸化亜鉛ユーージノールセメントと同程度との報告がある.

MTAの開発から約10年が過ぎ, 数多くの基礎研究成果や臨床データが報告されている. MTAにはコストや操作性といったクリアしなければならない問題点が多く残されているが, 優れた直接覆髄剤としての特徴を生かして今後臨床応用が進むと思われる. これにより, これまで保存不可能であると診断されてきた症例の多くを救うことが期待される.

参考文献

- (1) Torabinejad M, 著, 福西一浩, 訳, 月星光博, 監訳
MTAの臨床応用, the Quintessence 2007 ; 26 : 1737-1745
- (2) Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR.
Physical and chemical properties of a new root-end filling materials. J Endod 1995 ; 21 : 349-353
- (3) Yasuda Y, Ogawa M, Arakawa T, Kadowaki T, Saito T
The Effect of Mineral Trioxide Aggregate on the Mineralization Ability of Rat Dental Pulp Cells : An in vitro study. J Endod 2008 ; 34 : 1057-1060

- (4) Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar AS.
Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth : a preliminary report. *Int Endod J* 2003 ; 36 : 225-231
- (5) Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg EE, Jefferies S.
Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct capping. *Am J Dent* 2006 ; 19 : 85-90
- (6) Tanomaru -Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY
In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci.* 2007 ; 49(1) : 41-45
- (7) Al-Hezaimi K, Naghshbandi J, Oglesby S, Simon JH, Rotstein I.
Comparison of antifungal activity of white-colored and gray-colored mineral trioxide aggregate (MTA) at similar concentrations against *Candida albicans*. *J Endod* 2006 ; 32 : 365-367

[最近のトピックス]

骨系細胞における伸展刺激とMAPKシグナルのCYP24発現への関与

豊下 祥史, 越野 寿, 平井 敏博

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系咬合再建補綴学分野

Department of Oral Rehabilitation Division of Occlusion and Removable Prosthodontics, Health Sciences University of Hokkaido School of Dentistry

有床義歯やインプラントを用いる補綴歯科治療においては、顎堤形態や骨の性状が治療の予後に大きく影響を及ぼす。このことから、骨増生や骨再生、さらには骨質の改善などのニーズはますます増加すると予想され、骨代謝に関する分子生物学的研究は極めて重要であると考えられる。

CYP24は骨代謝に関与するビタミンDを不活性化する酵素であり、ビタミンDの濃度に依存して発現量が増加し、ビタミンDの調節に関わっている。さらにCYP24はMitogen-activated protein kinase (MAPK) により、その発現が調節されることが知られている。MAPKは細胞外の様々な刺激により活性化する細胞内タンパク質リン酸化酵素で、種々の遺伝子発現に関与しており、機械的な刺激もMAPKを活性化させる因子の一つであることが知られている。しかしながら、機械的的刺激が加わった骨系細胞内におけるCYP24の発現の詳細なメカニズムは明らかとされていない。そこで本研究では、機械的的刺激を加えられた骨系細胞内でのCYP24のpromoter活性について、またMAPK経路がCYP24の発現に関与する可能性について検討した。

骨肉腫由来MG63細胞をビタミンDとともに培養後、CYP24プロモーター領域を含むレポーター遺伝子のCYP24-Lucを遺伝子導入した。細胞に伸展刺激を加えた後、Luciferase assayによりCYP24のpromoter活性を測定した。さらに、MAPKファミリーであるERK 1/2, p38の阻害剤U0126およびSB203580を添加した後、同様に伸展刺激を加え、Luciferase assayによってCYP24のpromoter活性を測定した。

これまでの報告どおり、ビタミンDを添加すると、MG63細胞内ではCYP24のプロモーター活性が認められた。さらに、伸展刺激を加えると、CYP24promoter活性は減少が認められた (Fig 1)。ERK 1/2 およびp38の阻害剤の添加もCYP24のpromoter活性は減少した。しかしながらCYP24promoter活性はERK 1/2 阻害剤を加えた

後に伸展刺激を加えた場合は減少しなかったのに対し、p38の場合は減少がみとめられた (Fig2,3)。

これらの結果から、機械的的刺激が加えられた骨系細胞内ではCYP24の転写が抑制されることが明らかとなった。その際、ERK 1/2 は単独で、p38は機械的的刺激と相互作用してCYP24の発現に関与する可能性が示唆された。

参考文献

Toyoshita Y, Iida S, Koshino H, Hirai T, Yokoyama A. : CYP24 promoter activity is affected by mechanical stress and mitogen activated protein kinase in MG63 osteoblast-like cells. 日本補綴歯科学会雑誌 52, 171-174, 2008

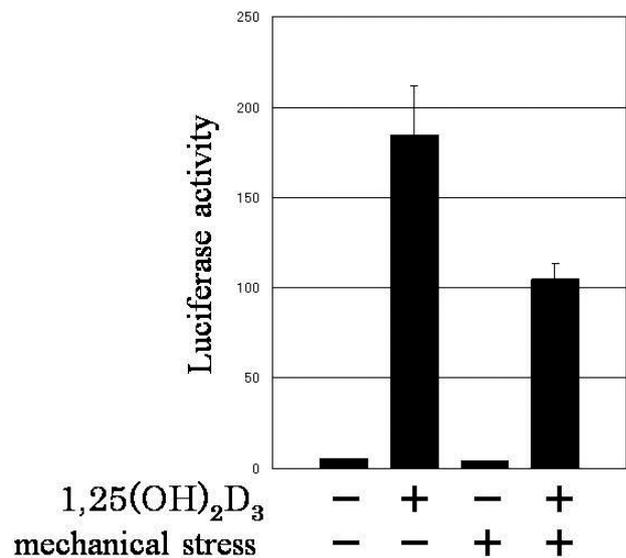


Fig 1 : CYP24 promoter activity in stretched and nonstretched MG63 cells.

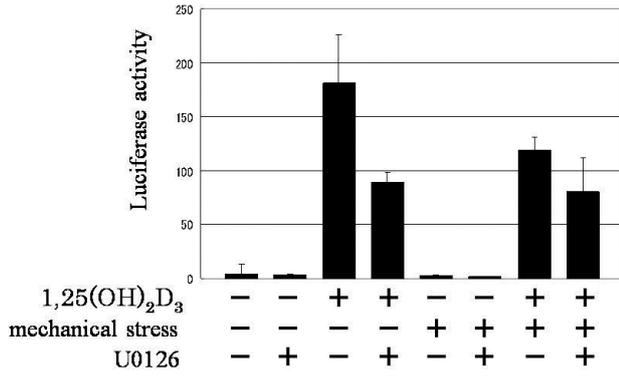


Fig 2 : Suppression of CYP24 promoter activity induced by ERK1/2 inhibitor U0126.

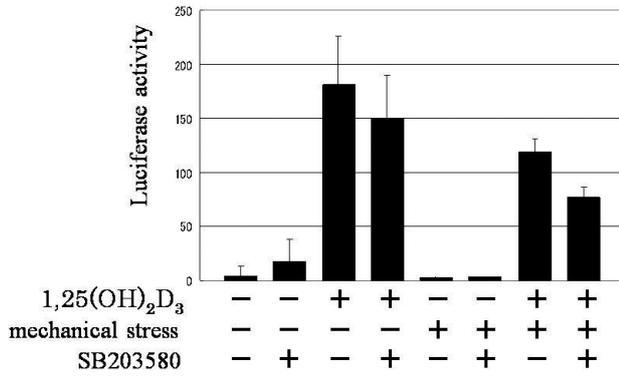


Fig 3 : Suppression of CYP24 promoter activity induced by p38 inhibitor SB203580.

[最近のトピックス]

インプラント治療の診断と手術支援システム
「BoneNavi system」について

松原 秀樹, 仲西 康裕, 木村 和代, 高薄 紀男, 廣瀬由紀人, 越智 守生

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系
クラウンブリッジ・インプラント補綴学分野

インプラント治療の現場では各社から診断・治療に対する安全性・正確性の向上のために様々なコンピュータ技術が導入されている。今回、本講座ではインプラント治療で診断からインプラント埋入手術および手術当日のプロビジョナルクラウン装着までを支援する「BoneNavi system」(Bionic社)を導入した。「BoneNavi system」はインプラントシミュレーションソフト「10DR」(10DR JAPAN社)と併用して使用するもので、「10DR」はCT撮像で得たDICOMデータをコンピュータに三次元構築し、インプラントの治療計画をたてるソフトである。それぞれの診療所で設計したインプラント埋入計画をBionic社へe-mailにて送信すると、Bionic社では「BoneNavi system」を使用して、顎骨のCTデータとインプラントの埋入計画位置データを合成し、3DプリンターエデンによるCAD/CAMで手術用歯牙支持型サージカルガイドが設計・製作されてくる。資料によると計画した埋入位置と実際の埋入位置の誤差は100 μ mレベルとされており、臨床で使用するには問題ないものと思われる。

本講座ではまだ経験していないが、手術当日にプロビジョナルクラウンを装着するケースでは、手術前に和田精密歯研社においてサージカルガイドを使って、石こう模型上でドリリングを行い、技工用アナログおよびテンポラリーシリンダーを石こう模型に埋入、その模型上で前もってプロビジョナルクラウンを製作しておくといった方法をとっている。

以下に本講座の症例を紹介する。患者は64歳の男性。上顎右側臼歯部の欠損補綴を希望してインプラント外来を受診。インプラント外来クリニカルパスに沿って医療面接、術前検査を行った後に「BoneNavi system」によるインプラント治療を説明し、同意を得たので2008年6月にインプラント埋入手術を行った。サージカルガイドシステムを使用した結果、手術時間は53分と以前報告した従来法によるインプラント埋入手術に要した平均時間

93分より短い時間で手術が終了した。上部構造装着後も良好に経過している(図1~5)。

以上のように、インプラント治療での安全性・正確性を向上させるための支援システムはコンピュータ技術の発展、3Dプリンターの開発、CT撮像データの誤差の低減化によって飛躍的に進化している。本講座ではこれからも新しいシステムを導入し、患者QOLの向上に寄与していく所存である。



図1 「BoneNavi system」によるサージカルガイド



図2 術前口腔内写真



図3 術中口腔内写真 サージカルガイドを装着しインプラント床を形成



図4 術後口腔内写真 ヒーリングアバットメントを装着

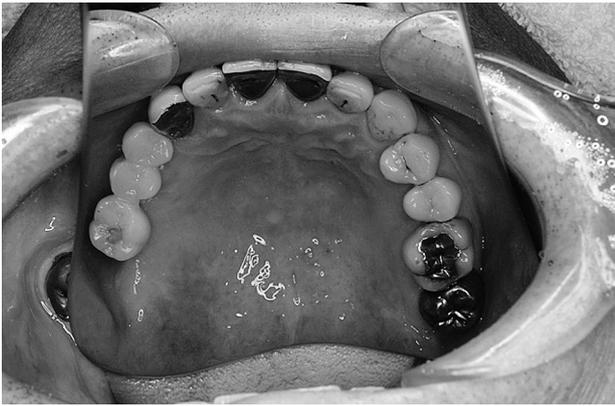


図5 上部構造装着後口腔内写真

[最近のトピックス]

光造形を活用した外科的矯正治療支援ツールの開発

上地 潤, 辻 祥之*, 柴田 考典*, 溝口 到

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野
北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野*

近年、医用画像技術の進歩に伴い顎変形症患者の三次元的な診断と治療計画の立案が行えるようになった。顎矯正手術に対応したシミュレーションソフトウェアでは、CTデータから構築した三次元画像を自由に骨切り・骨片移動するバーチャルサージェリーが可能でありその有用性は高い。また本学顎変形症外来においても独自のコンピュータ支援診断・治療計画立案システムを構築し、臨床応用を果たした。これにより矯正歯科医と口腔外科医との診断情報の共有と治療目標の一元化が確固たるものとなり、より正確な外科的矯正治療を可能にした。しかし実際の手術の現場においては、仮想三次元空間上に設定した治療目標を実世界空間の患者に正確に具現する方法はなく、口腔外科医の経験、洞察力または直感などに頼らざるを得ない“待たなし”の状況に直面する場面も少なくない。これに対して本学顎変形症外来では、「客観的かつ定量的治療（手術）の実現」を目標に掲げ、本システムの更なる発展に努めている。他方、光造形に代表されるラビッドプロトタイプング技術は、三次元CADデータを用いて製品の実物モデルを高速に試作できることから工業分野において広く浸透しており、その信頼性の高さは既に多くの研究により実証されている。我々はこの技術が目標を達成させるための一助となるものと考え、光造形を活用した外科的矯正治療支援ツールの開発に着手した。まず、患者の咬合状態を再現可能な“顎顔面骨格・歯列実体モデル”（図1）と顎矯正手術の際に離断した上顎骨や下顎骨の骨片の位置付けをサポートする“サージカルプリント”（図2）の二種類の外科的矯正治療支援ツールを開発した。そのデータ処理法や作製過程などの詳細な説明は他に譲るが、前者は外科的矯正治療における診断、治療計画の立案およびインフォームドコンセントを支援し、また後者は設定した治療目標を実際の患者により正確にトランスファーするための骨片の位置付けを支援する。とりわけ顎顔面骨格・歯列実体モデルは、特定患者の“顎顔面骨格形状をした咬合器”という見方でとらえれば診断用・作業用模型と

しての価値がより高まるであろう。さらに下歯槽管を忠実に再現し歯列部に石膏模型を正確に位置づけたモデルの試作も行った（図3）。このモデルは、下歯槽管、オトガイ孔および歯列の位置関係に配慮したインプラントの埋入シミュレーションや歯列支持タイプのインプラント埋入用ステントの作製に利用することも可能である。また造形精度の検証や適合試験によりその有用性の検討を行った結果、これらのツールが十分に臨床応用可能であることを示していた。今後は臨床応用を果たし臨床的効果を実証したいと考えている。

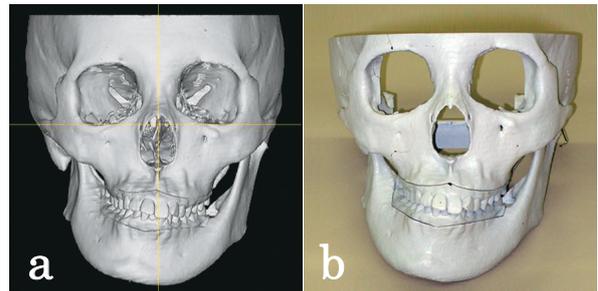


図1. a：顎顔面骨格・歯列仮想モデル，b：顎顔面骨格・歯列実体モデル。

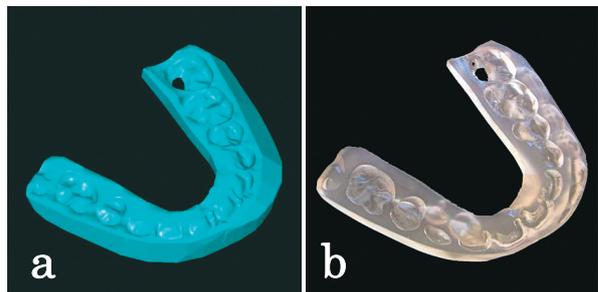


図2. a：仮想サージカルプリント，b：サージカルプリント。



図 3. 矯正用インプラント（プレートタイプ）の埋入用ステント作製に利用した実体モデル。

[最近のトピックス]

薬液を注入できる局所麻酔注射シミュレーターの発明と実用化

工藤 勝

Masaru KUDO D.D.S., Ph.D.

歯科麻酔科学分野

A field of Dental Anesthesiology, School of Dentistry Health Sciences University of Hokkaido

現在、歯学部5年生の実習では著者の発明した局所麻酔注射シミュレーターをクリンシム（臨床シミュレーション装置，CLINSIM）に装着し，電動注射器と歯科用注射針（31G）を用いた浸潤麻酔注射（写真1），ガラス製注射器・神経ブロック針（25G）を用いた伝達麻酔注射（写真2）を10時間にわたり実施している。なお，4年生にはカートリッジ専用金属製の注射器を用いた浸潤麻酔注射実習を3時間行っている。医療安全を推進するために歯科の注射器はユニークな電動化が進み，新たな薬剤も臨床に導入されている¹⁾。一方，局所麻酔注射の手技教育に適うシミュレーターは流通化していない。今回は局所麻酔注射シミュレーター発明から開発の経緯，教育効果，そして今後の改良および実用化計画を紹介する。



写真1

1. 局所麻酔注射シミュレーター発明と開発の経緯

(1) 伝達麻酔注射シミュレーター

1981年の本学歯学部1期～1984年の4期生の歯科麻酔学臨床実習では，下顎前歯部への浸潤麻酔注射（傍骨膜・歯根膜），眼窩下孔および下顎孔伝達麻酔注射の手技訓練を，学生相互で行っていた。しかし，針刺入による電撃用疼痛や恐怖でショックを誘発する学生がいた。1992年，教育効果と安全性を向上するために伝達麻酔注射訓練モデル（シミュレーター）の開発が始まり，

試作モデル作成を(株)ニッシンに依頼した。上下顎骨の各孔部位に電極を設置し，注射針が電極に刺入されるとランプ点灯・ブザーがなるが，薬液を注入することは出来ないシミュレーターであった。1994年に臨床実習へ導入すると，針刺入部位のシリコンが断裂する等の欠点を認めたので，針刺入部シリコンの耐久性を向上し，取り外しできるようにして経済性も向上させた(写真3)。1997年，針刺入部位シリコンに下歯槽動脈を内蔵し注射器への血液逆流を体験できるように改良し，現在も使用している²⁾。

(2) 浸潤麻酔注射シミュレーター

2002年，歯学部の開発費補助を得て，針をシリコン粘膜に刺入し，薬液を注入すると粘膜が膨れる浸潤麻酔注射シミュレーターの開発に取り組んだ。開発当初の試作品は伝達麻酔注射シミュレーターを改造したが失敗した。2004年，補綴用の歯牙欠損模型に薬液注入可能な機能を組み込み，伸展性のよいシリコンを用いて薬液を注入できる浸潤麻酔注射シミュレーターを発明した。すなわち，針をシリコン粘膜下に刺入，薬液を緩徐に生体と同様な低圧で注入³⁾すると刺入部位のシリコン粘膜が膨らみ，数分後には粘膜の膨らみがなくなるシミュレーターを開発し⁴⁾，実習に用いた(写真4，5)。

2. 局所麻酔注射シミュレーターの教育効果

下顎孔伝達麻酔注射における，相互実習前のシミュレーター練習は麻酔成功率を87%から97%へ向上した³⁾。学生の本シミュレーターに対する印象は，「適正位置に針が刺入されるとブザーが鳴るので，分かりやすかった」等である。

浸潤麻酔注射シミュレーターに関する学生の印象は，「薬液を注入すると粘膜が膨らむので，粘膜下に注射できた実感があった」等，概ね良好であった。しかし，強圧での注入や繰り返し使用することで「壊れて針孔以外

から液が漏れだす」等の不満も多かった。

3. 局所麻酔注射シミュレーターの実用・市販化計画

現状では局所麻酔注射の手技教育に適うシミュレーターが流通していない。2007年10月には浸潤麻酔注射シミュレーターの発明に関する特許申請を済ませた。2008年4月、(株)ニッシンとの共同開発の契約をした。現在、改良型を開発したので(株)ニッシンの総合カタログ Vol. 2に「浸潤麻酔注射訓練模型」として掲載を予定している。流通化により、本邦におけるOSCE（客観的臨床能力試験）課題「浸潤麻酔」に浸潤麻酔注射シミュレーターが導入されると、注射手技の適正な評価が可能と成る。なお、今年度は学外研究費補助金を得て、薬液を注入できる下顎孔伝達麻酔注射シミュレーターの実用化を推進するために、(株)ニッシン開発部の協力を得て開発・作成中である。

著者は「痛くなく良く効く局所麻酔から」を旗印に歯科麻酔専門医・大学人として、浸潤麻酔局所麻酔注射手技教育の実施とともに、シミュレーターの開発を推進している。社会が求める歯科の医療安全推進には「痛くなく良く効く局所麻酔」は必須である。高品質な臨床教育に貢献できれば幸いである。

伝達麻酔注射シミュレーターの開発・作成の機会を与えていただいた故新家昇名誉教授、浸潤麻酔注射シミュレーター開発に理解を示し研究費補助を御面いただいた故松田浩一名誉教授、特許申請のご支援と学外研究費補助金獲得にご支援いただいた松田一郎学長および蛸島武弘元参与（北海道大学産学官連携コーディネータ）、共同開発者である(株)ニッシンの岩城重次氏、そして代表取締役の宮内 浩氏を始め、ご協力いただいた多くの皆様に感謝の意を表す。

【参考文献】

- 1) より快適な歯科の局所麻酔へ向けた最近の流れ。北海道歯学雑誌, 大桶華子, 29 (1), 11-12, 2008
- 2) Kudo M: Initial Injection Pressure for Dental Local Anesthesia: Effects on Pain and Anxiety. Anesth Prog 52:95-101, 2005.
- 3) 工藤勝, 大桶華子, 河合拓郎, 加藤元康: 歯科麻酔学講座における歯科局所麻酔注射シミュレーションモデルを活用した臨床実習の教育効果. 東日本歯学雑誌 21 (2). 275-279, 2002.
- 4) Masaru KUDO, Noboru SHINYA: Development of a novel training model for dental infiltration anesthetic injection. Dent J Health Sci Univ Hokkaido 24(1). 25-30, 2005.



写真 2

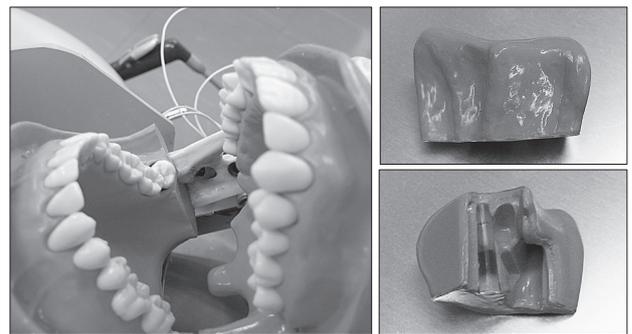


写真 3

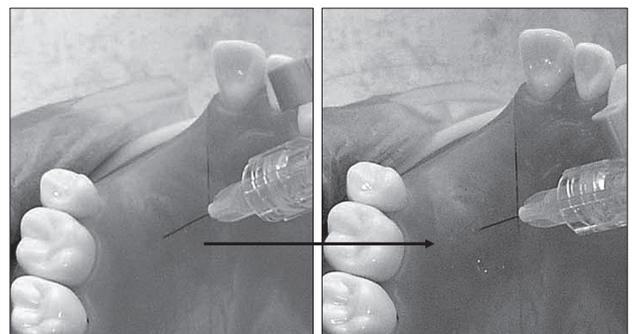


写真 4

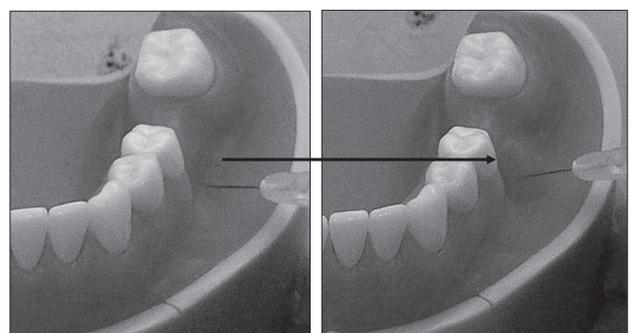


写真 5

北海道医療大学歯学会会則（2006年12月15日現在）

第1章 総 則

（名 称）

第1条 本会は北海道医療大学歯学会（The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido）と称する。

（目 的）

第2条 本会は北海道医療大学歯学部（以下本学部と略す）を中心に、会員相互の緊密な協力により、学術研究の推進・専門技術の錬磨を計り、歯学の進歩・発展に寄与するとともに、会員の親睦を図ることを目的とする。

第2章 会 員

（会 員）

第3条 本会は以下の会員よりなる。

1. 正会員

歯学の研究に従事し、本会の目的に賛同する者、本学部教職員・大学院生・研究生・臨床研究生・歯科臨床研修医・卒業生および本学部元教育関係者で理事会の承認を得た者。

2. 名誉会員

本会の設立または発展に、特に功労のあった者で、常任理事会が推挙し、理事会、評議員会の議を経た者。なお、名誉会員には名誉会員証を贈るほか会員の権利を保有し、年会費一切の費用を徴収しない。

3. 準会員

歯学教育・診療関係者で理事会の承認を得た者。

4. 学生会員

本学部専門課程の学生で理事会の承認を得た者。ただし、学生会員は卒業後正会員に移行するものとする。

5. 賛助会員

本会の目的および事業に賛同し、協力・支援する個人・団体等で、理事会の承認を得た者。

（入 会）

第4条 本会に入会を希望する者は、所定の申し込み書に必要事項を記入の上本会事務局に申し込むものとする。

（退 会）

第5条 会員で退会を希望する者は、速やかにその旨を本会事務局に通知すること。ただし、納入済み会費の返還はこれを行わない。

（会員資格喪失）

第6条 会員は以下の事由によりその資格を喪失する。

1. 2年以上会費の未納、所在不明または連絡のつかない者。

2. 本会の名誉に反する言動のあった者については、会長は理事会、評議員会の議を経て退会を勧告または除名することがある。

（再入会）

第7条 会費未納により会員資格を喪失した者が再入会を希望する場合は、2年分の未納会費を納入後入会手続きをとるものとする。

第3章 役員および運営

（役 員）

第8条 本会に以下の役員をおく。

会長1名、専務理事1名、常任理事 若干名、理事 若干名、監事2名、評議員 若干名、および常任委員若干名

1. 会長は本学部教授の中より、理事会が推薦し、評議員会の議を経てこれを決める。会長は本会を代表し、会務を統括する。

2. 専務理事は理事会の議を経て会長が委嘱する。専務理事は会務の運営処理を推進する。

3. 常務理事は理事の中より選出し、会長が委嘱する。常任理事は常任理事会を組織し、会務を分担し、執行する。分担する会務は、庶務、会計、編集、企画、その他とする。

4. 理事は本学部教授、ならびに3名以上の理事の推薦を受け理事会の承認を得た者とする。理事は、理事会を組織し、役員 の推薦など会務に関する重要事項を審議する。

5. 監事は理事会の議を経て会長がこれを委嘱する。監事は会計およびその他の会務を監査する。また必要に

応じ、理事会に出席する。

6. 評議員は本学部教授、助教授、専任講師で構成するほか、会長の推薦により理事会の承認を得た者とする。評議員は評議員会を組織し、会長の諮問に応じて必要事項を審議する。
7. 常任委員は理事会の議を経て、会長がこれを委嘱する。常任委員は常任理事を補佐し、会務の分掌処理にあたる。

(会議の成立条件)

第9条 理事会、評議員会は構成員の2分の1以上の出席（委任状を含む）をもって成立し、議事は出席者の過半数によりこれを決する。

(任期)

第10条 各役員の任期は2年を原則とする。ただし、再任を妨げない。

第4章 事業

第11条 本会は第2条の目的を達成するために以下の事業を行う。

1. 総会
総会は会長の召集により年1回学術大会を開催し、会務等について報告する。また、必要に応じ会長は臨時総会を開催することがある。
2. 学術大会
学術大会は年1回以上開催し、会員の研究発表、その他学術発展に関する行事を行う。
3. 学術講演会、研修会
4. 会誌
本会は機関誌“北海道医療大学歯学雑誌（The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido）”を年2回発行し、会員に配布する。会誌は逐次増刊することが出来る。北海道医療大学歯学雑誌の投稿規定ならびに論文査読規定については別に定める。
5. その他
本会の目的達成に必要と認めた事業。

第5章 会計

(運営経費、会計)

第12条 本会の運営経費は会員の納入する会費、寄付金、その他の収入をもってこれにあてる。

2 各会員の会費は以下の通りとする。

| | | | | |
|------------|-----|---------|-----|---------|
| イ 正会員 | 入会金 | 3,000円 | 年会費 | 5,000円 |
| ロ 準会員、学生会員 | | | 年会費 | 3,000円 |
| ハ 賛助会員 | 入会金 | 10,000円 | 年会費 | 30,000円 |

ただし新入会員（正会員、賛助会員）で、会費3年以上を前納した者に対しては入会金を免除する。なお事業の目的に応じ、臨時会費を徴収することがある。

3 本会の会計年度は1月1日より12月31日とする。

(会計報告)

第13条 本会の収支決算については、理事会、評議員会の承認を得て、総会において会員に報告しなければならない。

第6章 雑則

(事務局)

第14条 本会の事務局は本学部内におく。

(会則の改廃)

第15条 この会則に定めるもののほか、本会則の実施に必要な内規は理事会の議を経て別に定めるものとする。

第16条 本会則の改廃は理事会、評議員会の承認を得て、会長は会員に報告しなければならない。

附 則

1. 本会則は昭和61年8月1日より施行する。
2. 本会則は平成7年3月1日より施行する。
3. 本会則は平成8年4月1日より施行する。
4. 本会則は平成17年4月1日より施行する。

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿規程（2008年5月13日現在）

1. 投稿資格

著者は、原則として共著者を含め、本学会員に限る。ただし、非会員が共著者となる場合には、1年分の会費を徴収する。

2. 生命倫理への配慮

- 1) 臨床研究は、ヘルシンキ宣言の主旨にそったもので、「北海道医療大学倫理委員会」の承認を得たものとする。
- 2) 人の遺伝子解析を含む場合は、本学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の計画および実施に関する倫理規程」に基づき、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」の審査をへて学長の許可を得たものとする。
- 3) 動物実験は、「北海道医療大学動物実験の指針」に基づき、「動物実験センター管理運営委員会」の承認を得たものとする。

なお、本学以外の研究機関等で行われた研究については、当該研究機関等の倫理委員会等で承認を得たものとする。

3. 論文の種類及び内容

- 1) 論文の種類は、原著論文 (Original)、症例報告 (Clinical report)、総説 (Review)、解説 (Comment)、システムティックレビュー (Systematic review)、臨床統計 (Clinical statistical survey) とする。
- 2) 論文の内容は、他の刊行物に未発表のものに限る。
- 3) 本誌はその他に、歯学情報、本学会講演抄録、学会関係記事、学位論文などを掲載する。

4. 査読および採否

- 1) 投稿論文は、編集委員会および編集委員会の依頼する専門家により査読される。
- 2) 採否については、査読の結果に基づき編集委員会が決定する。

5. 投稿論文の作成

- 1) 投稿論文は、投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること。
- 2) 投稿論文は、表紙、チェックリストシート、英文抄録 (300語以内)、本文、表、図および図表説明文の順番にまとめる。
- 3) 投稿原稿は、2部 (正1部、コピー1部) とする。最終的に論文掲載を認められた際には投稿原稿とともにフラッシュメモリーまたはCD-R/RW (フラッシュメモリーが望ましい、印刷終了後にお返しします) を提出すること。なおデスクには、使用したOS、ワードプロセッサのソフト名とファイル名を記載する。さらに論文投稿者は論文投稿時にメールにて表紙 (タイトル名、投稿者名、所属を記載されている箇所) と要約 (abstract) を編集委員会まで送信すること。

メールアドレス ; dentalj@hoku-iryuo-u.ac.jp

件名 ; 北海道医療大学歯学雑誌

- 4) 和文論文の本文については、原則として、緒論 (緒言)、方法 (材料および方法)、結果、考察、結論 (結語)、謝辞 (必要な場合のみ)、文献の順に記載するものとする。
- 5) 英文論文の本文については、原則として、Abstract (300語以内)、Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Conclusion, Acknowledgment (必要な場合のみ)、Referencesの順に記載するものとする。
- 6) 投稿論文のヘッダーに右詰め、名前、所属さらに初稿なのか修正論文なのかがわかるように記載する。
- 7) 投稿時、著者全員が編集委員会 (dentalj@hoku-iryuo-u.ac.jp) に当該論文の共著者である旨の承諾許可をメールで送信するものとする。

6. 投稿論文の校正

- 1) 投稿論文に対する著者校正は2回までとする。
- 2) 修正論文は、特別な事情がない以外は一週間以内、校正は48時間以内に返却するものとする (返却、連絡が無い場合は、投稿を取り下げたものと判断する)。

7. 証明書等の発行

- 1) 投稿原稿の受付日は、編集委員会に到着した日付とする。
- 2) 受理証明が必要な場合には、掲載が決定した後受理証明書を発行する。

8. 掲載料および別刷料

- 1) 掲載料は、刷り上がり10頁まで無料とする。これを超過した場合には、編集委員会が依頼したものを除き、1頁1万円の著者負担とする。
- 2) カラー頁については、著者の実費負担とする。
- 3) 別刷料については、50部まで無料とし、これを超過する場合 (50部単位) には著者の実費負担とする。

9. 著作権の帰属

本誌に掲載された著作物の著作権は東日本歯学会に帰属する。本会はこれら著作物の全部または一部を、ネットワーク媒体を含む媒体に掲載・出版することが出来る。ただし、論文の内容については、著者が全ての責任を負う。

10. 著者のプロフィール

巻末に著者のプロフィールを記すので、著者のスナップ写真と経歴を提出すること。

11. 原稿の送付および本誌に関する問い合わせ

住所 : 〒061-0293 北海道石狩郡当別町宇金沢1757番地

北海道医療大学歯学部・口腔生物学系・生理学分野

北海道医療大学歯学雑誌編集委員会 (和泉 博之)

Tel ; 0133-23-1239

e-mail ; dentalj@hoku-iryuo-u.ac.jp

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿の手引き（2008年5月13日現在）

本学会誌の体裁を統一するために、「投稿の手引き」に準拠して、ご執筆下さいますようお願い致します。

原稿はすべてA4版とし、下記の項目1)－7)のすべてを、2部提出して下さい。査読後、論文掲載が認められた際には、和文抄録、英文抄録、本文について、フラッシュメモリーまたはCD-R/RW（フラッシュメモリーが望ましい、印刷終了後にお返しします）を投稿原稿とともに提出して下さい。なおディスクには、使用したOS、ワープロのソフト名とファイル名を記載して下さい。

- | | |
|---------------------------------|----------|
| 1) 投稿原稿表紙 | 5) 図表説明文 |
| 2) チェックリストシート（著者全員分のサインと連絡先を記載） | 6) 表 |
| 3) 英文抄録（ABSTRACT, 英文表題を含む） | 7) 図 |
| 4) 本文 | |

1. 投稿原稿表紙

表紙には以下の事項を和文および英文で記入する。

- | | |
|----------------|--------------------------------|
| 1) 原稿の種類 | 5) 著者の所属および所在地 |
| 2) 表題 | 6) 別刷数（50部単位） |
| 3) 著者名 | 7) 連絡先（郵便番号、住所、電話、Fax, e-mail） |
| 4) キーワード（5語以内） | |

1) 表題

- (1) 一般固有名詞として通用していない商品名は用いない。
- (2) 和文表題には、原則として略号以外の英文字を用いない。スペースも含めて35字以内のランニングタイトルを付ける。
- (3) 英文表題は和文表題の内容と一致させる。文頭のみ大文字とし、他は小文字とする。また、スペースも含めて45字以内のランニングタイトルを付ける。
- (4) 副題はできる限り用いない。ただし、必要な場合は次の例に準拠する。続報、第2報などの表記は認めない。
和文・英文：－□□□□□□□□□□－

2) キーワード

5語以内のキーワードを付ける。英文の場合は、キーワードの先頭のみを大文字とし、他は小文字とする（例：Impression materials, Bone morphogenetic proteins）。

3) 氏名および所属

- (1) 英文氏名（和文）は、姓は大文字、名は先頭のみを大文字とする（例：Akira YAMADA（山田 昭）and Taro HOKKAI（北海太郎））。
- (2) 著者の所属が2ヶ所以上の場合には、所属の著者に^{1), 2), 3)}を付ける。

2. チェックリストシート

チェックリストの指示に従い、投稿原稿を確認する。

著者全員分のサインを取り、連絡先を記載する。

3. 抄録

300語以内の英文抄録を付ける。本文が和文の場合には、抄録の和訳も記載する。

4. 本文

- 1) 原稿はA4判用紙にワードプロセッサなどによる横書きとする。原則として12ポイント文字を使用し、1頁35文字×30行とする。句読点は「.」と「,」を用いる。英文の場合は、ダブルスペースとする。
 - (1) 提出メディアに、使用機種名、OS名、ソフト名、所属、著者名を明記する。
 - (2) 著者がテキストファイルへ変換できる場合は、変換したファイルを提出する。
- 2) 原稿の下段中央にページ番号を記す。
- 3) 論文の原則的な構成は、緒論（緒言）、方法（材料および方法）、結果、考察（結果および考察）、結論（結語）、謝辞、文献、図の説明、図表とする。

4) 見出しを用いるときは次の順に項目をたてる.

3 → 3) → (3) → a → a) → (a)

5) 文章は、専門用語を除いて、常用漢字、新かなづかい、ひらがなは口語体とする。

6) 数字はアラビア数字とし、単位の記号はJIS・Z8202およびZ8203に準じ、国際単位系(SI)を使用するよう努める。
また単位にピリオドをつけない。(例：GHz, MPa, kW, cm, mV, μm, nA, pF, mL, mmol, N (kgf), K, °C, min)

7) 学術用語は、原則として「文部省学術用語集」に準拠する。

8) 商品名、器械名などは、可能な限り一般化されている「カタカナ書き」とする。英文字で表す場合は、かしら文字のみ大文字にする。

9) 外国の人名などの固有名詞は原則として原綴とする。

10) 連続した数値は「,」でつなぎ、最後に単位をつける。(例：10, 20, 30°C)

11) 製造社の表記法は()内に会社名のみを記し、社製および製作所、工業社製、株式会社などを入れない。

例：(型式名, 製造会社名), (略号, 製造会社名)

(X-3010, 日立) (EPMA, 日本電子)

12) 図表の挿入場所を本文右欄外に朱書きする。

5. 文献

1) 文献リストは、アルファベット順(A, B…Z順)で作成する。また本文中の引用箇所以下の体裁に従い、文献内容を記載する。

例：単著者 (Izumi, 1999)(和泉, 1999), 2名 (Izumi and Ito, 1998)(和泉, 伊藤, 1998), 3名以上 (Izumi et al., 1970)(和泉ら, 1970), 2編以上 (Sato et al., 1988; Izumi, 1999)(佐藤ら, 1988; 和泉, 1999)

※「,」「;」の様な記号は、日本文の場合全角を、英文の場合は半角を使用する。

2) 文献として不適当なもの、例えば未公表のデータや私信などは文献として引用しない。

3) 文献の著者または編集者が複数の場合にはet al., 他などとせず、その全部を記載する。

4) 著者名が欧字綴の場合は姓の後に名前の頭文字をつけ、また著者が複数の場合は最後の著者の前にandを入れる。

5) 文献の記載方法の基本は次のとおりとする。

(1) 雑誌の場合

著者名(複数の場合、氏名を「,」で区切る.)。表題—サブタイトル—。雑誌名 巻：引用ページの始めと終わり, 発行年。

例：Izumi H. Functional roles played by the sympathetic supply to lip blood vessels in the cat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 277 : R682–R689, 1999.

Izumi H, and Ito Y. Sympathetic attenuation of parasympathetic vasodilatation in oro–facial areas in the cat. *J Physiol (Lond)* 510 : 915–921, 1998.

Izumi H, Ito Y, Sato M, Karita K and Iwatsuki N. The effects of inhalation anesthetics on the parasympathetic reflex vasodilatation in the lower lip and palate of the cat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 273 : R168–R174, 1997.

(2) 単行本の場合

i) 章を参考にしたとき

例：Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms.

In：Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. *Pathologic physiology : mechanisms of disease*. Philadelphia : Saunders, 1974, p457–472.

ii) 個人または複数の著者の場合

例：Colson JH, Armour WJ. *Sports injuries and their treatment*. 2nd ed. London : S. Paul ; 1986.

iii) 編集者、監修者が著者の場合

例：Diener HC, Wilkinson M, editors. *Drug-induced headache*. New York : Springer-Verlag ; 1988.

iv) 団体、組織が著者で、かつ出版社の場合

例：Virginia Law Foundation. The medical and legal implications of AIDS. Charlottesville : The Foundation ; 1987.

v) 会議録全体を参考にした場合

例：Vivian VL, editor. Child abuse and neglect : a medical community response. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect ; 1984 Mar 30-31 ; Chicago. Chicago : American Medical Association ; 1985.

(3) 分担執筆の場合

分担執筆者名：分担執筆の表題、書名巻など、発行所名：発行年、引用ページの始めと終わり。

例：山田早苗：橋義歯の力学－傾斜歯ブリッジの形成と設計について－。新臨床歯科学講座3，医歯薬出版：1978，157-165.

(4) 翻訳書の場合

著者（翻訳者）：書名（原著書名）。発行所名：発行年、引用ページの始めと終わり。

例：Davidge RW（鈴木弘茂，井関孝善）：セラミックスの強度と破壊（Mechanical behavior of ceramics）。共立出版：1982，34-55.

6. 図

- 1) 用紙はA4版とし，1枚ずつ別葉にする。
- 2) 各葉杖に，図の番号，著者名，片段あるいは両段の指定，カラー印刷の有無を明記する。
- 3) 図の大きさは，片段か両段一杯になることがのぞましい。刷り上がりを想定して，図の大きさが片段で横幅45-68mm，両段で100-150mmになるように縮小コピーし，文字，記号の大きさ，線の太さなどをチェックする，棒グラフなどのハッチングは識別可能なものにする。
- 4) 図中の文字は，刷り上がりで本文とほぼ同じ10-13級（7-9ポイント），線の太さは0.15-0.3mmになるよう原図を作成する。
- 5) 図のタイトルおよび説明は，まとめて，文献の後につける。
- 6) 組図の原稿は，貼込み間隔や角度を正確にする。
- 7) 写真は，A4判の用紙に貼り，必要な文字，記号などを記入する。写真の拡大率は，単位長さのバーで表す。
- 8) 患者の顔や特徴ある身体の一部の写真を使用する場合は，目隠し等により個人が特定できないように配慮するとともに，患者本人あるいは後見人から文書により許可を得ること。
- 9) 記号は中心の明確な○●□■◇◆などを使用する。
- 10) 記号を使用する場合の凡例は，脚注に置かず図中に入れる。

7. 表

- 1) 罫線はできる限り入れない。
- 2) 標準偏差は，（ ）もしくは±とし，信頼区間との混同を避けるために説明を入れる。
- 3) 表題が英文字の場合は書き出しのみを大文字にし，それ以後は小文字とする。しかし略号はこの限りではない。
- 4) 単位などの表記は同一言語に統一する。単位（unit），平均（mean），標準偏差（SD）

（例：）

Table1 Mechanical properties of specimen

| specimen | Tensile strength Mpa | Elongation % |
|----------|----------------------|--------------|
| A | 500 (20) | 10.2 (3.3) |
| B | 300 (15) | 5.4 (2.3) |

() : SD

表1 試料の力学的性質

| 試料 | 引張強さ Mpa | 伸び % |
|----|----------|----------|
| A | 500±20 | 10.2±3.3 |
| B | 300±15 | 5.4±2.3 |

平均±標準偏差

8. その他

本規定ならびに「投稿の手引き」に規定されていない事項については，編集委員会にお尋ね下さい。

投稿の手引き，投稿規定，チェックリストのファイルは，ホームページ (<http://www.hoku-iryuo-u.ac.jp/~physiol/>) からダウンロード出来ます。

北海道医療大学歯学会第27回学術大会一般演題募集要領

平成20年度北海道医療大学歯学会総会・第27回学術大会ならびに北海道医療大学歯学会定例講演会を合同で開催致します。下記の要領で学術大会の一般演題を募集いたしますので、多数のご参加を賜りますよう、ご案内申し上げます。

記

開催日：平成21年2月28日(土) 午前9時～午後5時頃

会場：北海道医療大学 札幌サテライトキャンパス (Tel.011-223-0205)

(日本生命札幌ビル5F：札幌市中央区北3条西4丁目1)

定例講演会：「脂質・脂肪酸の身体機能制御での重要性についての細胞生物学的研究」

講師：東北文化学園大学 近藤尚武 教授 (東北大学名誉教授)

[演題・抄録申し込み要領]

・演題・抄録申し込み期限：平成21年1月9日(金)必着

・演題・抄録申し込み方法：

裏面の原稿作成要領を参照してB5用紙に演題名・所属・発表者全員の氏名(演者には○印)とともに抄録を記載し、抄録とCD-R(抄録を焼き込んだもの)を下記の住所までご郵送ください。その際、申込み封筒に赤字で「北海道医療大学歯学会演題・抄録申込み」とご記入ください。なお、CD-Rの代わりに電子メールにて抄録ファイル(MS Word)をお送り頂いても構いませんが、その場合でも印刷された抄録はご郵送ください。原則として、同一講座・機関からは2演題までとします。発表者(共同研究者も含む)はすべて北海道医療大学歯学会会員および準会員に限ります。なお当該年会員制度(5,000円)もあります。

[発表形式]

一般演題は原則として発表7分、討論3分の予定です。ただし、演題数により増減する場合がございますのでご了承ください。液晶プロジェクター1台にて発表して頂きます。発表される方は2月26日(木)までに発表用スライドを「フラッシュメモリ」か「CD-R」に入れて微生物学分野までご持参くださり、ご確認をお願いします。また、事前に発表用スライドをご持参いただけない方と遠方からお越しの方は会場に1時間前(午前10時から11時までに発表される方は30分前)にお越しのうえ備え付けのプロジェクターにて試写して下さい。

発表される方は、補助1名(スライド進行係)をおつけください。補助人をつけられない方は、事前にkamaguti@hoku-iryu-u.ac.jpへご連絡ください。

歯科医師生涯研修カードをお持ちの方は、ご持参ください。

発表・抄録に関するお問い合わせ・申込み先：
北海道医療大学歯学部口腔生物学系・微生物学分野
第27回学術大会編集係宛
〒061-0293 石狩郡当別町金沢1757番地
Tel&Fax0133-23-1385
e-mail：kamaguti@hoku-iryu-u.ac.jp

北海道医療大学歯学会抄録原稿作成要領

B5版の用紙を用い、タテ19cm・ヨコ13cmに納まるようにパソコンを使って作成してください。文字は明朝体で12ポイントを使用してください。

なお、抄録は以下の例に従って記載してください。

1. 演題名
2. 発表者氏名：演者の前に○印をつけてください。
3. 所属：発表者の所属が2つ以上の場合は、アスタリスク（*）で所属を区別してください。
4. 本文：一般発表の場合は【目的】、【方法】、【結果および考察】、【結論】の順で、症例発表の場合は【目的】、【症例】、【結果および考察】あるいは【経過および考察】の順で記載してください。

*Porphyromonas gingivalis*の浮遊菌とバイオフィルム形成菌の
遺伝子発現の比較

○鎌口有秀，藤田真理，宮川博史，中澤 太
北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野

【目的】 *Porphyromonas gingivalis*は成人性歯周炎の…

【方法】 *P. gingivalis* np11株をヘミン，メナジオン添加Tryptic soy…

【結果および考察】 *P. gingivalis*の1,909遺伝子をターゲットとして…

【結論】 細胞壁における物質の取り込みや排出に関与するタンパク質…

編 集 後 記

11月に入ったとたん寒波が来て慌ててタイヤ交換をしました。毎年恒例ですが、北海道に冬到来を実感させる行事です。北海道住民から今年を振り返ってみて、大きな出来事はG8北海道洞爺湖サミット（7月7-9日、2008年）ではなかったでしょうか。実際の成果は疑問視されますが、警備や規制に関しての迷惑度が記憶に残ったイベントだったような気がします。年末にかけてはアメリカ発信の金融不安が起こり、世界中が右往左往しているようです。日本の一般家庭はあまり株の変動に影響されないようで、輸出産業や投資家よりは冷静なように見受けられます（株を持っているのはお金持ちってことですね）。アメリカ大統領は来年1月から民主党のオバマ氏に決定した。イラクの問題、金融不安の問題等難問がオバマ大統領を苦しめるでしょう。これを乗り越えられるかどうかが大統領か並みの大統領かの分かれ道になることでしょう。一方日本では選挙管理内閣と言われて発足した麻生内閣（福田康夫首相が突然9月24日に辞任）ですが、なかなか衆議院を解散しなくて宙ぶらりんと思っていたら、年末には定額給付金を一律に給付するか所得制限をするかなどと新聞で大きく報道されています。一度取めさせた税金を選挙対策用にばらまかれたのでは納税者は怒りと共に日本の行く末がますます心配になります。

私の仕事では考えさせられることが数多くありました。一つは私の仕事に密接な感覚神経や自律神経の機能不全が遺伝的に起こる病気、“無痛無汗症”のシンポジウム（10月11&12日、仙台）での講演会でした。これは小径線維である侵害性C-線維や自律神経節後線維の発達・成長が遺伝的にできない（神経成長因子受容体（*TRK*；神経の細胞膜に存在し、NGFと結合して神経の成長・分化・生存に必要なシグナルを細胞内に伝達する蛋白質）の欠損）ことから痛みを感じることができないうえに、交感神経機能が働かないために体温調節ができなくなる病気で、日本に250名程度しかいない難病の一つです。親の会がしっかりしていて、医師、歯科医師、研究者らとのサポートを得て毎年勉強会をして、子供の将来などを話し合っていました、私の研究は全く基礎なのですが、このような会での講演をすることができ少しは社会に役立ったのかと実感できる発表会でした。

平成19年度から開始した”最近のトピックス”も皆様のお陰で順調に持続しています。内容も読みやすく、簡単に歯科領域の話題を知ることができ大変良い企画であったと思っています。最近論文の紹介だけでなく、自分の研究に関連する諸々の話題（ノーベル賞や本人の研究の発端となっている話題など）を書いて頂き大変読みやすく、楽しく読めるトピックスが多くなってきました。私は北海道歯学雑誌の中ではこれを読むのが一番の楽しみになっています。これからも楽しい紙面作りに協力をお願い致します。

平成20年12月

和泉博之

北海道医療大学歯学雑誌編集長

次号（第28巻、第1号）の発行は平成21年6月30日です。

会員各位の投稿原稿募集の締め切りは平成21年3月31日必着と致します。期日厳守の上、ご投稿をお願いします。本誌投稿規定（2007年第26巻、第2号の巻末あるいは歯学部生理学教室のホームページ；<http://www.hoku-iryo-u.ac.jp/~physiol/>）をご参照の上、投稿してください。

Dental & Oral Surgery

歯科用インスツルメント

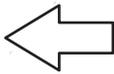
ペリオ・インプラントのエキスパートに！

KLS martin
GROUP



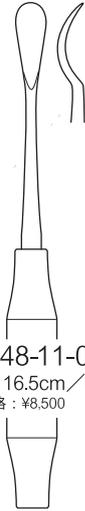
1/2

Korner/Westermann



23-448-11-07
全長：16.5cm/6 1/4 inch
医院価格：¥8,500

1/1



1/2

先端部ギザ付き

23-436-22-07
全長：17.5cm/7 inch
医院価格：¥10,600

1/1

3.0mm

Martin
Periosteal elevators
マーチン
起子及び剥離子
医療機器届出番号：
28B1X00005000196



1/2

Molt

23-452-09-07
Fig. 9
全長：18cm/7 inch
医院価格：¥9,500

1/1

23-452-54-07
Fig. 854
全長：18cm/7 inch
医院価格：¥9,500



1/2

Korner/Westermann

作業部幅：
φ1.1mm

23-448-01-09
全長：18cm/7 inch
医院価格：¥8,500
Ti Titanium

1/1

作業部幅：
2.0mm

作業部幅：
φ1.1mm

23-448-02-07
全長：18cm/7 inch
医院価格：¥7,500
ステンレス製

作業部幅：
2.0mm

MOKUDA DENTAL

KOBE, JAPAN TEL(078)303-8241 FAX(078)303-2151
E-mail:info@mokuda.co.jp http://www.mokuda.co.jp/

マーチン社製品総合カタログもございます。
お出入りのディーラー様にご請求下さい。





歯周炎・口内炎治療、術後感染予防に。
 抗生剤に加えて、抗炎症剤を配合した幅広い適応を持つ軟膏剤。



歯科用抗生物質製剤
テトラサイクリン・プレステロン
 歯科用軟膏

【医薬品】 薬価基準収載 **TCPS** パスタはレセプト記載上の略称です。

- 包装……5g×10本入(チューブ)、0.6g×10本入(カートリッジ型容器) ●貯法……冷所(1~15℃)・遮光保存
- 効能・効果、用法・用量、警告、禁忌を含む使用上の注意等については添付文書を参照してください。

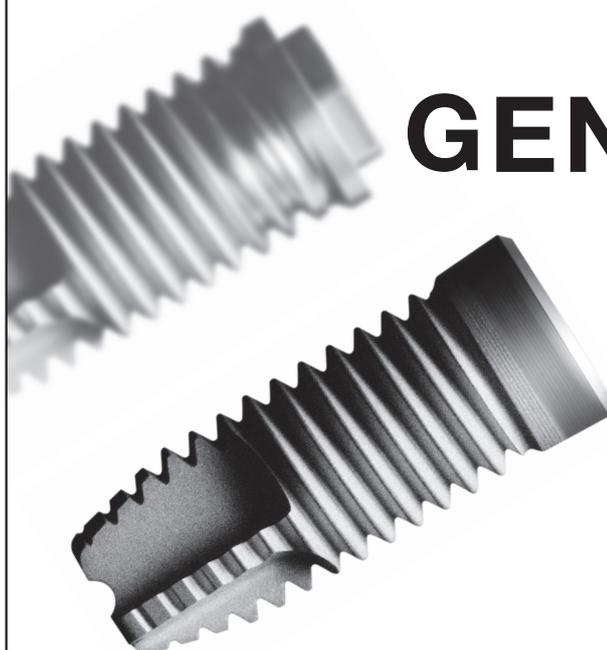


本社 山口県下関市西入江町2-5 〒750-0015 TEL083-222-2221(代) FAX083-222-2220
 大阪営業所 大阪市中央区瓦町4-8-4 〒541-0048 TEL06-6222-4090(代) FAX06-6222-3950
 東京営業所 東京都台東区柳橋1-23-4 〒111-0052 TEL03-5822-5350(代) FAX03-5822-5351
 お問い合わせ・資料請求は お客様窓口 ☎0120-8020-96 [ホームページ] <http://www.nishika.co.jp/>

GC

GENESiO Debut

インターナルフィクスチャー「ジェネシオ®」を加えた
ジーシー インプラントシステム”Re(アール・イー)”。
2つのシステムが臨床の幅を広げます。



GC IMPLANT SYSTEM Re

internal implant GENESiO

external implant SETiO



taper

straight

株式会社 ジーシー

DIC(デンタルインフォメーションセンター)
東京都文京区本郷3-2-14 〒113-0033

フリーダイヤル ☎ 0120-416480

受付時間 9:00a.m.~5:00p.m.(土曜日、日曜日、祭日を除く)
*アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。

www.gcdental.co.jp/

支店 ●東京 (03)3813-5751 ●大阪 (06)4790-7333

営業所 ●北海道 (011)729-2130 ●東北 (022)283-1751 ●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286

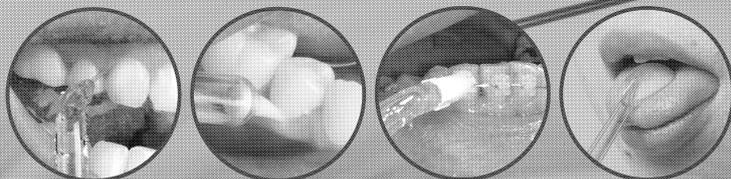
高度管理医療機器 20500BZZ00868000 ジーシーインプラント
高度管理医療機器 21400BZZ00102000 ジーシースクルーインプラント Re
高度管理医療機器 21400BZZ00068000 ジーシーインプラント Re

*掲載は、2008年5月現在のものです。製品の仕様・外觀等は、予告なく変更になる場合があります。

ウォーターピック再び。今度はヨシダから新登場!

ウォーターピック®ウルトラ

4種類のチップが付属。用途に併せた洗浄ができます。



ジェット水流口腔内洗浄補助装置

ウォーターピック®ウルトラ

waterpik®

treat yourself better™



- セット内容:本体、水タンク、ハンドル、チップ(ジェットチップ3本・ピックポケットチップ1本・歯列矯正用チップ1本・タンククリーナー3本)●患者様価格:14,175円(税込)
- チップ単品患者様価格:◎ジェットチップ(2本入)◎ピックポケットチップ(2本入)◎歯列矯正用チップ(2本入)◎タンククリーナー(2本入)各1,418円(税込)

発売元: <ヨシダ> 株式会社 ヨシダ 〒110-8507 東京都台東区上野7-6-9 TEL.03-3845-2931(器材営業本部) 製造元:Water Pik, Inc.

PROVINCE FAST

SHOFU



ゆとりある
操作時間
シャープな硬化

プロビナイスファスト

歯科汎用アクリル系レジン

管理医療機器
医療機器認証番号 219AIBZX00084000

液瓶は新規
フンタッチキャップ
採用

| | | |
|--------|--------|----------------------|
| 粉50g | ¥2,800 | 〈色調〉 |
| 粉250g | ¥9,000 | 歯冠色(4種): |
| 液100mL | ¥2,800 | A1、A2、A3、Inc(インサイザル) |
| 液250mL | ¥6,000 | 歯肉色(2種): U3、8S |

価格は2008年6月現在の標準医院価格(消費税抜き)です。



世界の歯科医療に貢献する

株式会社 松風

●本社:〒605-0983京都市東山区福福上高松町11・TEL(075)561-1112(代)

<http://www.shofu.co.jp>

●支社:東京(03)3832-4366 ●営業所:札幌(011)232-1114/仙台(022)299-2332/名古屋(052)709-7688/大阪(06)6252-8141/福岡(092)472-7595

THE BEST PARTNER OF DENTIST



SINCE 1948
With the utmost care, and the most advanced manufacturing technology, our innovative products are designed and produced!

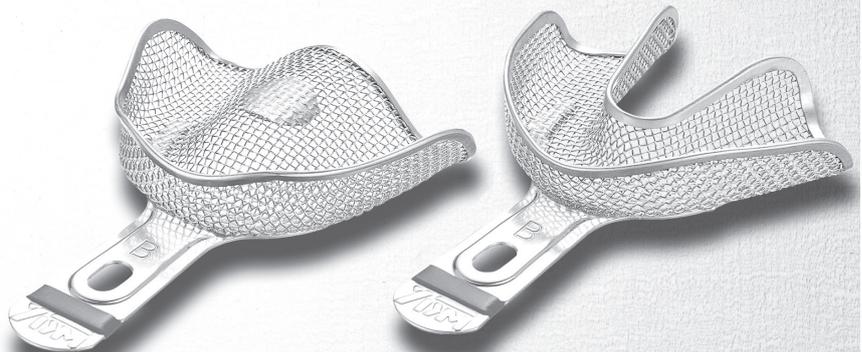
よりよい品質と
新たな信頼を求めて



株式会社YDM
〒114-0014 東京都北区田端6-5-20
TEL03-3828-3161 FAX03-3827-8991
<http://www.ydm.co.jp/>

耐久性にすぐれたステンレス製

トレクリーナーや消毒液に浸漬してもサビ・変色が起きません。
長期間の使用に耐えられる経済的なトレーです。



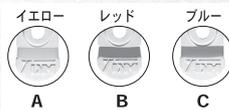
網トレープレミアム

単品 標準価格 各¥2,100

| 上顎 | | a | 下顎 | |
|-----------|-----------|---|-----------|--|
| サイズ/a×b | サイズ/a×b | | | |
| A 73×60mm | A 76×62mm | b | B 72×58mm | |
| B 70×55mm | B 72×58mm | | C 69×54mm | |
| C 66×53mm | C 69×54mm | | | |

カラーリング付

●サイズがひと目でわかるように色分けされており、カンタンに選択できます。



フィンガーレスト付

※上顎のみ
●保持位置の目安になります。
●押し出された印象材が指につくのを防ぎます。



医療機器届出番号 11B1X1000668D105

ビクトリーワンで 自由診療率をアップ!

自由診療へのスイッチングを強力にサポートします。

1. 学ぶ



【スキルアップビデオ】
提案型カウンセリングを
学習します

2. 使う



【説明用模型】
治療方法を
比較説明します

&



【治療提案書作成ソフト】
作成した資料で
治療方法を説明します

3. 結果が出る

自由診療率の向上

- 患者さんのデンタルIQ向上
- クリニックへの信頼感醸成
- リコール患者数増大

デンタル プロポーザル システム
Victory I

学ぶ、使う、結果が出る

提案型カウンセリングのノウハウを習得し、
すぐに実践できるシステムです。

■標準価格 ¥299,000



まずは
資料の
ご請求を

ビクトリーワン 検索

www.victoryclub.jp



イベント/セミナー情報も
チェック!!

NISSIN

西日本営業所 / 〒601-8469 京都市南区唐橋平坦町8 TEL075-681-5719
東日本営業所 / 〒110-0016 東京都台東区台東4-14-8 TEL03-3836-3691

●仕様および外観は、製品改良のため、予告なく変更することがありますので、予めご了承ください。
●価格は、2008年5月1日現在のものです。消費税は含まれておりません。



since 1896



山藤三陽印刷株式会社

〒063-0051 札幌市西区宮の沢1条4丁目16-1

【営業部】代表電話 (011) 661-7163 FAX. (011) 661-7173

東京支店 / 電話 (03) 3518-4631 FAX. (03) 3518-4633

苫小牧営業所 / 電話 (0144) 34-8078 FAX. (0144) 31-2423

千歳営業所 / 電話 (0123) 26-3555



Suck back Zero

クリーン革命

給気ストップ時の、ゼロ-サックバックをハンドピース単体で実現

新開発のゼロ-サックバック機構により、切削粉や汚物の吸い込みをシャットアウトします。
ハンドピースへの給気を止めたとき、慣性でタービンが回り続け、サックバック(吸い込み)が起きます。

ツインパワータービンのゼロ-サックバック機構により、
排気回路に流れる空気を、ヘッド外に押し出し、サックバックの発生をゼロに抑えます。

静か、パワフル、ロングライフ

- 独自のツインパワーテクノロジーによる、余裕のあるトルク。
- 患者さんにも、先生にも快適な静音設計。
- 効率的で安全性の高いクイックセーフティストップ。
- 高温洗浄消毒から注油、滅菌、保管までの一連のプロセスに、高い品質を確立。
- 3種類のヘッドタイプ(ライト付き)をラインアップ。(トルクタイプ・スタンダードタイプ・ミニチュアタイプ)

- 販売名 ツインパワータービン 4H
- 医療機器承認番号 21900BZX00096000

● 今お使いのユニットのチューブ(カップリング)に直結できます。

| | | | |
|----------|--|--|-------------------------------------|
| 4Hカップリング | | | TwinPower 4-hole coupling |
| KaVo | | | KaVo® MULTiflex LUX** |
| Sirona | | | Sirona® Quick coupling† |
| W&H | | | W&H® Roto Quick** |
| NSK | | | NSK® Mach/Phatelus® Coupling* |

*: KaVo®とMULTiflex LUX®はKaltenbach & Voigt GmbHの登録商標です。Sirona®はSirona Dental Systems GmbHの登録商標です。W&H®とRoto Quick®はW&H Dental Birnmoos GmbHの登録商標です。NSK®とMach/Phatelus®は株式会社ナカニシの登録商標です。

TwinPower Turbine 4H, Xseries

ツインパワータービン 4H, Xシリーズ

新登場

発売 株式会社モリタ

大阪本社 大阪府吹田市豊水町3-33-18 〒564-8650 TEL (06) 6380-2525
東京本社 東京都台東区上野2-11-15 〒110-8513 TEL (03) 3834-6161

製造販売・製造 株式会社モリタ製作所

本社工場 京都府京都市伏見区東浜南町680 〒612-8533
TEL (075) 611-2141
久御山工場 京都府久世郡久御山前大字市田小字新珠城190 〒613-0022
TEL (0774) 43-7594

www.dental-plaza.com

編集委員会

委員長 和泉博之

越智守生・斎藤隆史・柴田考典・田隈泰信
東城庸介・溝口 到

(アイウエオ順)

北海道医療大学歯学雑誌 第27巻 第2号

平成20年12月31日

発行者 賀 来 亭

編 集 北海道医療大学歯学会

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757番地

北海道医療大学内

電 話 0133-23-1211(内線2563)

電話/FAX 0133-23-1345(直通)

メールアドレス：iryodsh@hoku-iryodsh-u.ac.jp

印刷 山藤三陽印刷株式会社

札幌市西区宮の沢1条4丁目16番1号

電話 011(661)7163(代)

Dent J Health Sci Univ Hokkaido

ORIGINAL REPORT

- 1 **Study of the spontaneous non-pigmented variant of Porphyromonas gingivalis in biofilm formation**
Arihide KAMAGUCHI, Masaaki OKAMOTO, Eiji IGARASHI, Mari FUJITA, Hiroshi MIYAKAWA,
and Futoshi NAKAZAWA (85)
- 9 **mRNA expression of proteoglycans in temporomandibular joint disc of growing rats**
Naohisa KOHDA, Naoko TORIYA, Toshiya ARAKAWA, Taishin TAKUMA
and Itaru MIZOGUCHI (93)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

- 19 **Establishment of orthognathic surgery simulation by using multimodal 3D (3-dimensional)
image-fusion techniques.**
Jun UECHI (103)
- 23 **Residual stress at the adhesion interfaces and deformation of metal frame induced to polymerization
shrinkage and thermal contraction of high polymer**
Ken KAKINO (107)

DENTAL INFORMATION

- 25 **Recent topics** (109)