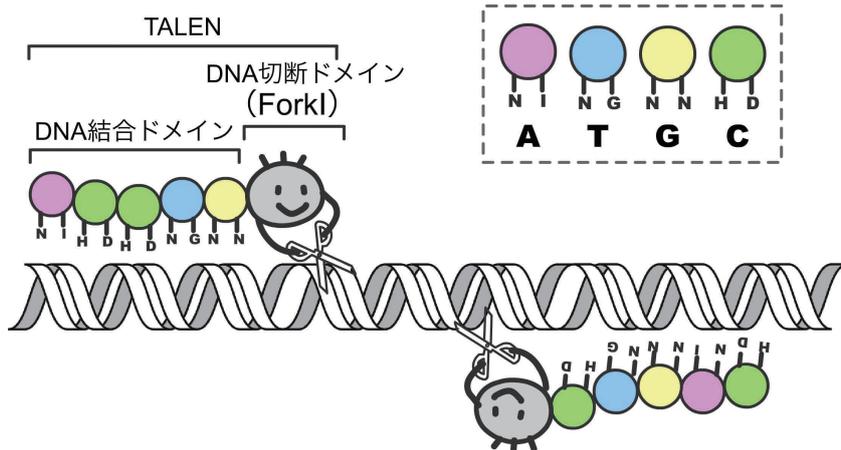
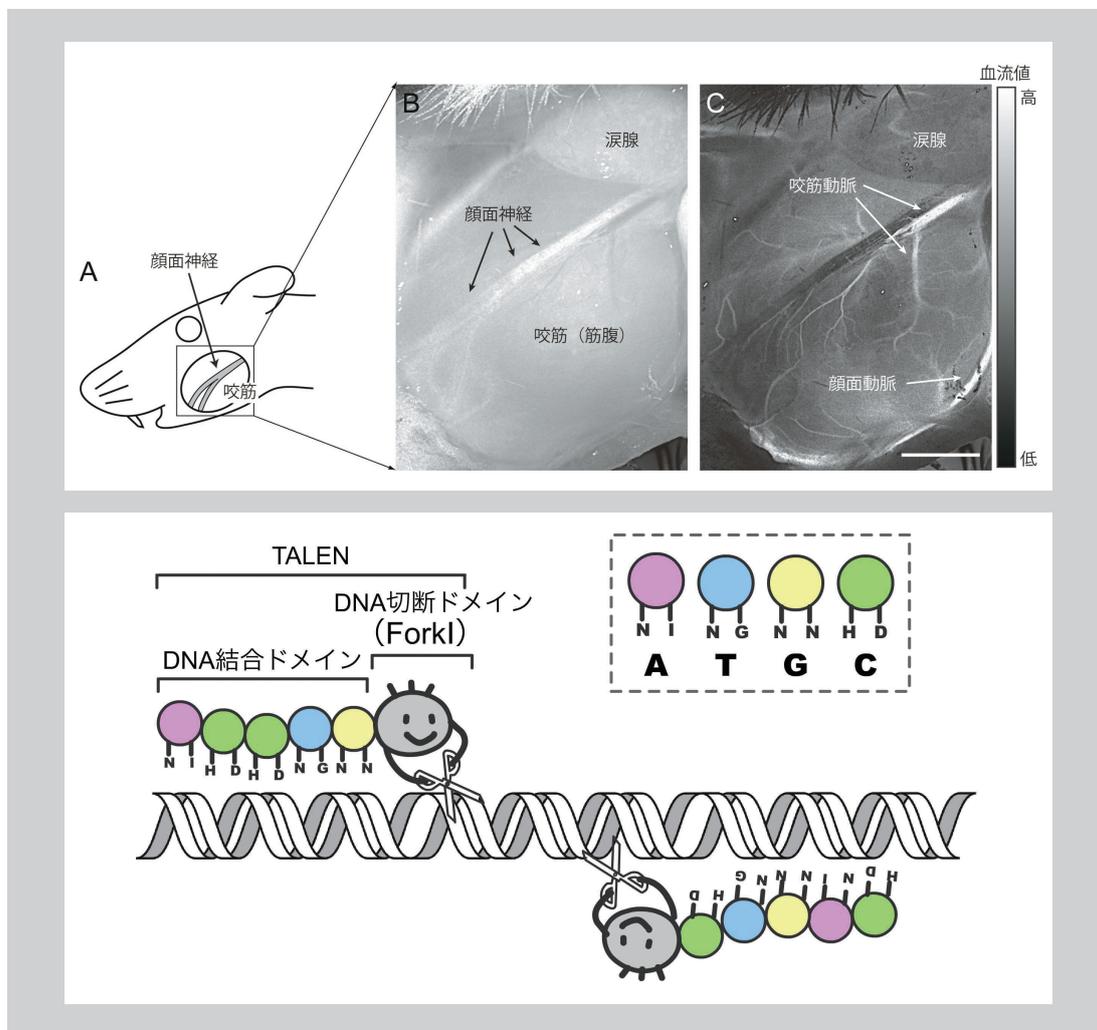


# 北海道医療大学歯学雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北 医 療 大 歯 誌  
第32卷 第1号 平成25年 6月



# 北海道医療大学歯学会役員

会 長 有 末 眞  
専 務 理 事 越 智 守 生  
常 任 理 事 安 彦 善 裕・齊 藤 正 人 (庶務担当)  
遠 藤 一 彦・谷 村 明 彦 (会計担当)  
田 隈 泰 信・坂 倉 康 則 (編集担当)  
越 野 寿・入 江 一 元 (企画担当)  
監 事 江 口 正 尊・東 城 庸 介

## The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Makoto ARISUE

Vice President : Morio OCHI

Directors : Yoshihiro ABIKO, Masato SAITO,  
Kazuhiko ENDO, Akihiko TANIMURA,  
Taishin TAKUMA, Yasunori SAKAKURA,  
Hisashi KOSHINO, Kazuharu IRIE

Auditors : Masataka EGUCHI, Yosuke TOJYO

## Editorial Board

Editor-in-Chief : Taishin TAKUMA

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

## Address of Editorial Board

Taishin TAKUMA

Division of Biochemistry, Department of Oral Biology, School of Dentistry,  
Health Sciences University of Hokkaido,  
Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

E-mail: takuma@hoku-iryu-u. ac. jp

Phone: + 81 133-23-2394; Fax: + 81 133-23-1391

北海道医療大学歯学雑誌  
第32巻 第1号 平成25年6月  
目 次

[原著]

- 1 The correlation among practical training components in preclinical training of complete denture prosthodontics  
Yoshifumi TOYOSHITA, Katsuya KAWANISHI, Satoshi NUKA, Hideki AITA, Yasuhiro IKEDA,  
Hisashi KOSHINO ..... (1)
- 7 FGF-2及びBMP-2がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響  
上與那原朝秀, 日高 竜宏, 白井 要, 門 貴司, 長澤 敏行, 古市 保志..... (7)
- 21 ラット咬筋の基礎血流調節に対するサブスタンスPの作用  
新岡 丈治, 石井 久淑..... (21)
- 33 ヒト歯根膜由来線維芽細胞のメカニカルストレスによるfibrillin-1およびversicanの発現と局在の変化  
鳥谷奈保子, 永坂 萌, 敦賀 英知, 坂倉 康則, 溝口 到..... (33)
- 43 The characteristics of *Prevotella oris* hemolysin and its interaction with the erythrocyte membrane  
Toshiya SATO, Herastuti SULISTYANI, Arihide KAMAGUCHI, Futoshi NAKAZAWA ..... (43)
- 53 ラットにおける咀嚼動態の変化に伴う酸化ストレス誘導に関する研究  
鈴木 裕仁..... (53)
- 65 小児における唾液流量, pH, 緩衝能および無機イオン濃度の経年的変化  
福田 敦史, 広瀬 弥奈, 村田 幸枝, 八幡 祥子, 首藤 かい, 近藤 有紀, 齊藤 正人..... (65)

[Mini Review]

- 71 The fifth HOPE meeting with Nobel laureates  
Izumi MASHIMA ..... (71)
- 75 DLC成膜ブラケットの特性と臨床応用  
六車 武史, 飯嶋 雅弘, 溝口 到..... (75)

[歯学情報]

- 79 最近のトピックス..... (79)
- 82 北海道医療大学歯学会第31回学術大会 特別講演・一般講演抄録..... (82)
- 93 会務報告..... (93)
- 97 北海道医療大学歯学会会則..... (97)
- 99 北海道医療大学歯学雑誌 投稿規程..... (99)
- 104 編集後記 ..... (104)

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

VOL. 32, NO. 1, JUNE, 2013

CONTENTS

ORIGINAL

- 1 **The correlation among practical training components in preclinical training of complete denture prosthodontics**  
Yoshifumi TOYOSHITA, Katsuya KAWANISHI, Satoshi NUKA, Hideki AITA, Yasuhiro IKEDA,  
Hisashi KOSHINO ..... ( 1 )
- 7 **Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells**  
Tomohide UEYONAHARA, Tatsuhiro HIDAKA, Kaname SHIRAI, Takashi KADO, Toshiyuki NAGASAWA,  
Yasushi FURUICHI ..... ( 7 )
- 21 **Effects of substance P on basal blood flow regulation in rat masseter muscle**  
Takeharu NIIOKA and Hisayoshi ISHII ..... (21)
- 33 **Changes in expression and localization of fibrillin-1 and versican in human periodontal ligament fibroblast (HPLF) s induced by mechanical stimulation**  
Naoko TORIYA, Moe NAGASAKA, Eichi TSURUGA, Yasunori SAKAKURA, Itaru MIZOGUCHI ..... (33)
- 43 **The characteristics of *Prevotella oris* hemolysin and its interaction with the erythrocyte membrane**  
Toshiya SATO, Herastuti SULISTYANI, Arihide KAMAGUCHI, Futoshi NAKAZAWA ..... (43)
- 53 **Alteration of masticatory performance caused by diet change induces oxidative stress in Wistar rats**  
Hirohito SUZUKI ..... (53)
- 65 **Study of variation in salivary flow rate, pH, buffer capacity, and inorganic ion concentrations obtained from 3, 4 and 5 year-old children**  
Atsushi FUKUDA, Mina HIROSE, Yukie MURATA, Shoko YAHATA, Kai SHUDOH, Yuki KONDOH,  
Masato SAITOH ..... (65)

Mini Review

- 71 **The fifth HOPE meeting with Nobel laureates**  
Izumi MASHIMA ..... (71)
- 75 **Property and clinical application of DLC coating bracket**  
Takeshi MUGURUMA, Masahiro IJIMA and Itaru MIZOGUCHI ..... (75)

DENTAL INFORMATION

- 79 **Recent topics** ..... (79)

[Original]

## The correlation among practical training components in preclinical training of complete denture prosthodontics

Yoshifumi TOYOSHITA, Katsuya KAWANISHI, Satoshi NUKA, Hideki AITA, Yasuhiro IKEDA, Hisashi KOSHINO

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

### Abstract

In a program for preclinical training of complete denture prosthodontics for dental students, only a limited number of topics including the clinical procedures can be taught within the insufficient practice hours available. It is necessary for those planning such programs to analyze each topic and training component in detail, yet there are few reports relevant to this process. We designed a questionnaire to assess student achievement to utilize the responses for improvements to our program. Seventy-nine fourth-year students who had finished the pre-clinical training in complete denture prosthodontics were asked whether they thought they would be able to conduct the following 6 training components by themselves without help from the instructor: “preliminary impression taking”, “precise impres-

sion taking”, “maxillomandibular registration”, “gothic arch tracing”, “wax denture trials”, and “denture insertion”. Answers were scored on a Visual Analogue Scale. The results showed strong positive correlations, indicated by correlation coefficients greater than 0.70, [were observed] between “preliminary impression taking” and “precise impression taking”, “maxillomandibular registration” and “gothic arch tracing”, “wax denture trials” and “denture insertion”, as well as between “maxillomandibular registration” and “denture insertion”. It is worth noting that each of these pairs display similarities in procedures or theory. The results will be useful in improving the efficiency of our training programs.

**Key words** : preclinical practice, undergraduated prosthodontic education, simulation

### Introduction

With advances in dental medicine, the quantity and diversity of the knowledge and skills that dental students are required to acquire are increasing rapidly; accordingly, an extensive assortment of dental school courses is now offered, ranging from the Structure of Dental Materials to Molecular Biology. Upon graduation from dental school, dentists are expected to possess all of the knowledge and skills that are necessary to provide dental care. Therefore a thorough and intense undergraduate education is needed. There remain several unresolved questions regarding how to teach prosthodontics, including how to secure sufficient faculty to take change of the instruction (Nimmo et al., 2007; Nimmo et al., 2008) and the provision of suitable self-instructional materials for on-demand video-based demonstrations (Ingebrigtsen et al., 2008) and suggestions for decreasing the duration of training in specific components (Graser, 1990). The complete denture prosthodontics curriculum is traditionally taught during the lower grades of dental education, and a strong emphasis is placed on the laboratory component (Petropolous & Rashedi, 2005; Rashedi & Petropolous, 2003; Weintraub & Weintraub, 1997; Haug et al., 1993). The practical nature of the undergraduate clinical training pro-

gram is considered important in Japan because it allows students to actively participate in dental care after completing the preclinical practice programs. Preclinical practice programs in prosthodontics education have been improved through the education system using the manikin simulation; accordingly, the goal of pre-clinical training in complete denture prosthodontics has changed from the mere fabrication of dentures to the acquisition of basic clinical skills through the complete denture fabrication.

The typical curriculum for removable denture prosthetics education in a Japanese dental school is as follows. Fourth-year students attend lectures and receive basic training in complete denture prosthetics for half the year and partial denture prosthetics for the remaining half. In the fifth year, students go through clinical training in an outpatient department for about one year, to give students extensive practical experience through the treatment of outpatients. This makes it essential that students acquire the basic knowledge and skills in the fourth year to be able to participate in treatment with a practicing dentist in the fifth year; here there is a steady increase in the amount of information they must absorb in the fourth year, making it necessary to explore methods of educating students efficiently in the limited time period available.

A basic requirement here is that students must learn the preclinical practice course material thoroughly before beginning clinical practice. In planning a program for basic training including clinical practice in removable denture prosthetics, educators must analyze all training components in detail to establish the optimal number of topics and hours to invest in the training. Few reports have analyzed the education practice in removable denture prosthetics (Ueno et al., 2007). In this report we have analyzed responses to a questionnaire to assess student achievement and investigated the correlations among various practical training components taught in preclinical complete denture prosthodontics training, in order to be able to conduct the program more effectively.

## Materials and Methods

The complete denture prosthodontics curriculum in-

cludes a simulated case which the students follow from diagnosis to the installation of a complete set of dentures. The case is simulated using a mannequin with a double-hinge axis allowing a range of mandibular border movements similar to the biomechanical range depicted in Posselt's figure. A complete series of denture treatments is performed on the mannequin, starting with a medical exam and continuing with preliminary impression taking, precise impression taking, maxillomandibular registration, gothic arch tracing, wax denture trials, and finally the installation of the new complete denture fabricated by the student.

The curriculum includes one lecture and three practice sessions per week for 14 weeks, i.e., 14 lectures and 42 practice sessions in a year. Each lecture and practice session is 80 minutes long. At the beginning of a practice session, the teaching staff demonstrates the procedures to be studied that day. The staff-to-student ratio is 1 : 13.

The subjects of the present questionnaire study were 79 fourth-year students (57 male and 22 female) who had finished the preclinical training in complete denture prosthodontics. Students who participated in the practical training without attending the lectures were excluded from the subjects for analysis of questionnaire responses. There was no statistically significant difference in the attendance rates between any pair of the practical training components. The pre-test associated with the basic parts of the practical training showed no statistically significant differences in the level of understanding of the students before the practical training. The questionnaire asked for a score of confidence in the ability to treat the following 6 training components on their own without direct guidance by a dentist, using a Visual Analogue Scale (VAS): "preliminary impression taking", "precise impression taking", "maxillomandibular registration", "gothic arch tracing", "wax denture trials" and "denture insertion".

The VAS scale is a horizontal line, 100mm in length, anchored by the word descriptors "treat perfectly" at the right end and "not treat at all" at the left end. The participants marked the line at the point representing the degree of perceived confidence. The VAS score was recorded as the measurement in millimeters from the left-hand end of the line to the point that a subject had

marked.

The average VAS score and standard deviation were calculated for each training component. In addition, the VAS range was divided into quarters, as follows : VAS score  $\leq 25$ ,  $25 < \text{VAS score} \leq 50$ ,  $50 < \text{VAS score} \leq 75$ ,  $75 < \text{VAS score}$ . The proportion of scores in each quarter was calculated for each of the six training components surveyed. The values were analyzed by one-way analysis of variance. Correlation coefficients between the VAS scores of the various training components were also calculated.

### Results

Table 1 shows the average VAS scores and standard deviations for all the training components. There were statistically-significant difference between the average VAS scores of “preliminary impression taking” and “gothic arch tracing”, “wax denture trials” and “gothic arch tracing”, and between “denture insertion” and “gothic arch tracing”. There were no statistically significant differences among the 6 training components. The

students had the least confidence in performing “gothic arch tracing” on their own. On the other hand, “denture insertion” was relatively easy. The “gothic arch tracing” score was statistically significantly different from the “preliminary impression taking”, “wax denture trial”, and “denture insertion”. The average VAS score for all six training components was  $46.0 \pm 23.9$ .

Table 2 shows the proportion of scores that fell into each of the four ranges detailed above. The score distribution for “preliminary impression taking” was not statistically different from that of “precise impression taking”, that for “maxillomandibular registration” was not statistically different from that of “gothic arch tracing”, and that for “wax denture trials” was not statistically different from that of “denture insertion”.

Table 3 shows the correlation coefficients between each pair of training components. Strong positive correlations, indicated by correlation coefficients above 0.70, were observed between “preliminary impression taking” and “precise impression taking”, between “maxillomandibular registration” and “gothic arch tracing”, between “wax denture trial” and “denture insertion”, and between

**Table 1.** Average VAS scores for practical training components

There were statistically significant difference between average score of “preliminary impression taking” and “gothic arch tracing”, “wax denture trial” and “gothic arch tracing”, and “denture insertion” and “gothic arch tracing”.

Training components	Average Score
preliminary impression taking	*49.0 ± 24.3
precise impression taking	46.0 ± 24.4
maxillomandibular registration	46.6 ± 23.4
gothic arch tracing	37.5 ± 21.7
wax denture trial	*49.4 ± 23.5
denture insertion	*51.2 ± 23.3

\*p<0.05 denotes statistically significant difference to average score for “gothic arch tracing”.

**Table 2.** Distribution of VAS scores among quarter-ranges

The score distribution for “preliminary impression taking” was similar to that of “precise impression taking”, that for “maxillomandibular registration” was similar to that of “gothic arch tracing”, and that for “wax denture trial” was similar to that of “denture insertion”.

	>75	75 ≥, >50	50 ≥, >25	25 ≥
preliminary impression taking	16.5	34.2	31.6	17.7
precise impression taking	13.9	30.4	36.7	19.0
maxillomandibular registration	13.5	24.7	31.5	30.3
gothic arch tracing	6.3	22.8	40.5	30.4
wax denture trial	11.4	39.2	32.9	16.5
denture insertion	16.5	40.5	26.6	16.5

**Table 3.** Correlation coefficients between practical training components

There were strong positive correlations, indicated by correlation coefficients greater than 0.70, between “Preliminary impression taking” and “precise impression taking”, between “maxillomandibular registration” and “gothic arch tracing”, between “wax denture trial” and “denture insertion”, and between “maxillomandibular registration” and “denture insertion”.

	preliminary impression taking	precise impression taking	maxillomandibular registration	gothic arch tracing	wax denture trial	denture insertion
preliminary impression taking	–					
precise impression taking	0.76	–				
maxillomandibular registration	0.51	0.57	–			
gothic arch tracing	0.48	0.56	0.77	–		
wax denture trial	0.56	0.57	0.63	0.61	–	
denture insertion	0.57	0.57	0.70	0.63	0.71	–

“maxillomandibular registration” and “denture insertion”. The regression equation for “preliminary impression taking” and “precise impression taking” was  $y=0.76x+8.54$ , that for “maxillomandibular registration” and “gothic arch tracing” [was]  $y=0.71x+4.23$ , and that for “wax denture trials” and “denture insertion”  $y=0.71x+16.19$ .

### Discussion

Some studies have reported on materials or methods that are useful in preclinical prosthodontics training (Demirjian & David, 1995 ; LaVere et al., 1996 ; Kawai et al., 2007), but we were unable to locate report of relative difficulty of preclinical complete prosthodontics training components or on correlations between these training components. The results of the VAS questionnaire responses show that students consider gothic arch tracing to be the most difficult training component and installing the fabricated dentures to be the easiest. Gothic arch tracing involves complicated mandibular movement and is considered to depict the path of actual mandibular movement in a comprehensive manner, so performing this training component is difficult for students who do not yet completely understand the underlying principles and mechanisms for analysis of mandibular movement with gothic arch tracing equipment. Installing fabricated dentures, on the other hand, is easy to understand and accomplish because denture installation is similar to the wax denture trials conducted during the point-of-fit check and occlusal adjustment following the denture fitting.

In this study, the data were obtained from student self-assessments. Related to this, it has been reported that

there is no statistically significant differences between assessments of instructors and student self-assessments about clinical training (Ono, 2010), and in this study that results are reliable. The correlation analysis clearly showed strong statistical correlations between “preliminary impression taking” and “precise impression taking”, between “maxillomandibular registration” and “gothic arch tracing”, and between “wax denture trials” and “denture insertion”, though these correlations. It is worth noting that, in each of these three pairs, the paired training components involve similar elements in procedures and theory. Both “preliminary impression taking” and “precise impression taking” are required to understand the relationship between intraoral movement and the shape of the borders, and both involve the use of an impression tray, though one is custom made and the other is ready-made. Maxillomandibular registration and gothic arch tracing both require dental students to understand the mechanism of mandibular movement and specifically that of the temporomandibular joint. The wax denture trials and denture insertion both involve checking for proper shape and function, including proper denture flange shapes and occlusal relationships. If instructors were to stress these similarities and differences when planning lectures and training, student perceived abilities in the practice component could improve considerably. Once the similarities and differences of each pair of elements are thoroughly understood, students who have learned and performed one training component in a pair would be able to better understand and perform the related training component that follows in that pair shortly afterward. As the amount of time available for instruction is limited, as is the amount of

effort that instructors can expend, a teaching method based on similarities and differences could also benefit instructors.

In complete denture prosthodontics education, making time available in the curriculum would be particularly helpful because it would free up time for dental students to view procedures as they are actually performed, on video. As it has been reported that humans take in most input information visually (Zimmerman, 1989), watching videos of dental procedures would be effectively equivalent to engaging in practice. Multimedia teaching materials on the practice of complete denture prosthodontics are used at our institution, and the questionnaire respondents had access to these materials. Multimedia instructional materials should be updated to emphasize the similarities established in this study between the various training components that make up the complete denture prosthodontics skill set.

Simplified technical procedures, such as the abbreviated impression technique that has been developed for use in complete denture prosthodontics, represent one solution to the problem of limited practice time (Duncan & Taylor, 2001), though of course simplifying all training components is not possible and may not always result in the best possible educational experience. Before introducing a simplified version of any procedure, the instructor must consider the nature of the procedure. Structuring the curriculum for greater efficiency by emphasizing similarities in theory and technique is also an effective means of simplifying instruction.

This study reports dental student perceptions of their ability to practice complete denture prosthodontics as a means of gathering information that will help in the curriculum design of complete denture prosthodontics education to convey the maximum impact in the limited available time. If a significant correlation is found, it may be useful as an index to decide the volume of training required for students. That is, students who are well-acquainted with a preceding component can more simply understand the following component in the practical training. Meanwhile, students with poor knowledge of a preceding component will need extensive follow up training in both components. But, at present there is no agreed standard for when to conduct the intervention follow-up study to investigate whether the strategy to

focus clearly on the analogy of the strongly correlated components is effective for our training programs. However, this study may give particular attention to the results of simulated clinical practice.

## Conclusions

Dental students asked how well they believe they would be able to perform 6 aspects of complete denture prosthodontics, and statistically positive correlations were established between the VAS responses for “preliminary impression taking” and “precise impression taking”, between “maxillomandibular registration” and “gothic arch tracing”, between “wax denture trials” and “denture insertion”, and between “maxillomandibular registration” and “denture insertion”. These results will be useful in improving the efficiency of training programs that we conduct.

## References

- Duncan JP & Taylor TD. Teaching an abbreviated impression technique for complete dentures in an undergraduate dental curriculum. *J Prosthet Dent* 85 : 121-125, 2001.
- Graser GN. Predoctoral removable prosthodontics education. *J Prosthet Dent* 64 : 326-333, 1990.
- Haug SP, Brown DT, Goodacre CJ, Cerimele BJ. Recent graduates' and current dental students' evaluation of their prosthodontic curriculum. *J Prosthet Dent* 70 : 361-371, 1993.
- Ingebrigtsen J, Roynstrand E, Berge ME. An evaluation of the preclinical prosthodontic training at the Faculty of Dentistry, University of Bergen, Norway. *Eur J Dent Educ*. 12(2) : 80-84, 2008.
- Kawai Y, Yazaki T, Matsumaru Y, Senzaki K, Asai H, Imamichi Y, Ito M, Sugimura K, Takeo A, Shu K, Izawa T, Ohno Y, Yamamoto S, Kodaira M, So K, Shima Y, Hayashi Y, Kuwahara K, Kobayashi K. Comparative analysis of learning effect for students who experienced both lecture-based learning and problem-based learning in a complete denture course. *Nihon Hotetsu Shika Gakkai Zasshi* 51(3) : 572-581, 2007.
- La Vere AM, Sarka RJ, Marcroft KR, Smith RC, Holloway GW. A seminar/case-based approach to teaching removable partial dentures to predoctoral students.

- J Prosthodont 5(3) : 214-218, 1996.
- Nimmo A, Mitchell GS, Penfield RD, Hall A. Evaluation of dental students as instructors in preclinical prosthodontics and occlusion courses. J Prosthodont 16 : 400-405, 2007.
- Nimmo A, Mitchell GS, Echeto L, Ojha AK. Effect of dental students as instructors on preclinical performance in prosthodontics. J Dent Educ 72 : 1488-1492, 2008.
- Ono K, Yagi M, Ohuchi A, Uoshima K, Hayashi T, Saito I, Okiji T, Maeda T, Yamada Y. Evaluation of the new dental curriculum for undergraduates at the Niigata university of dentistry. JJADE 26 : 49-57, 2010.
- Petropolous VC & Rashedi B. Complete denture education in U.S. dental schools. J Prosthodont 14 : 191-197, 2005.
- Rashedi B & Petropolous VC. Preclinical complete denture survey. J Prosthodont 12 : 37-46, 2003.
- Ueno T, Nishiyama A, Sato M, Okano N, Minami I, Nakamura T, Igarashi Y. Evaluation of clinical training for removable partial denture at the Tokyo medical and dental university. Prosthodont Res Pract 6 : 259-264, 2007.
- Weintraub AM & Weintraub GS. The dental student as technician : an 18-year follow-up of preclinical laboratory programs. J Prosthodont 6 : 128-136, 1997.
- Zimmerman, M. The nervous system in the context of information theory. In : Schmidt RF, Thews G., eds. Human physiology. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong : Springer ; 166-173 ; 1989.



豊下 祥史

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

略歴

平成12年3月 北海道大学歯学部歯学科卒業

平成16年3月 北海道大学大学院歯学専攻科修了

平成16年4月 北海道大学病院歯科診療センター勤務

平成19年4月 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助教

平成21年4月 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講師

現在に至る

〔原著〕

## FGF-2及びBMP-2がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響

上與那原朝秀, 日高 竜宏, 白井 要, 門 貴司, 長澤 敏行, 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

## Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells

Tomohide UEYONAHARA, Tatsuhiro HIDAKA, Kaname SHIRAI, Takashi KADO, Toshiyuki NAGASAWA, Yasushi FURUICHI

Division of Periodontology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## Abstract

Recently, cytokines such as fibroblast growth factors (FGF-2) and bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) have attracted attention due to its efficacy in periodontal tissue regeneration. Animal studies have reported that FGF-2 and BMP-2 promote proliferation and differentiation of periodontal ligament (PDL) cells, and subsequently enhance periodontal tissue regeneration. However, there have been few studies of the interaction between FGF-2 and BMP-2 on PDL derived cells *in vivo*. The purpose of the present study was to use an animal model to determine whether FGF-2 and/or BMP-2 influence tissue regeneration using PDL derived cells.

Implanted materials included human PDL (HPDL) derived cells (collected from 3 human extracted teeth) and implants without PDL cells, human demineralized dentin matrix (DDM ; provided as crushed dentin particles of extracted teeth), and growth factors (1 : none, 2 : FGF-2, 3 : BMP-2, 4 : FGF-2+BMP-2). The materials

were implanted into the subcutaneous tissues of nude mice. Four weeks after the implantation, the mice were sacrificed, implanted tissue collected, and the tissue prepared for histological analyses. The rates of new bone formation and the number of blood vessels in the implanted tissue were measured, and the expression of human GAPDH mRNA were verified with RT-PCR.

The histological analyses established that the number of blood vessels was significantly increased in the implanted tissue with FGF-2, the new bone formation ratio was significantly increased with BMP-2, and new bone formation ratio and number of blood vessels were increased with a combination of FGF-2+BMP-2, resulting in new bone formation with internal newly formed vessels.

The study suggests that implantation of HPDL derived cells in combination with FGF-2 and BMP-2 would be useful for periodontal tissue regeneration.

**Key words** : ヒト歯根膜細胞群, FGF-2, BMP-2

## 緒 言

歯周病とは、歯肉と歯槽骨、セメント質、歯根膜からなる歯周組織が歯周病原菌を原因とする慢性炎症により破壊される疾患であり、成人が歯を喪失する主な原因となる疾患である。一度損傷を受け失われた歯周組織の再生能は限られている (Melcher, 1976)。近年、生体組織工学を用いて失われた生体組織を再生する再生医療が注目されている。生体組織工学において、細胞、増殖因子と足場が組織再生に必要な三大因子である (Langer & Vacanti, 1993)。増殖因子の中でも、特に塩基性線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor; FGF-2) や骨形成タンパク (bone morphogenetic protein; BMP-2) などのサイトカインが歯周組織再生療法において注目されている。FGF-2は皮膚、血管、骨、軟骨などさまざまな組織形成に関与する細胞成長因子の一つである。その働きは主に組織の創傷治癒、血管新生を促すことであり、線維芽細胞、血管内皮細胞、未分化間葉系細胞などの細胞増殖促進作用など様々な生理活性を有している (Gospodarowicz et al., 1986; Ledoux et al., 1992; Tsutsumi et al., 2001)。歯科領域においては、現在歯周組織への治験の第Ⅲ相まで進んでおり、FGF-2の歯周組織への局所応用が歯周病により破壊されたヒト歯周組織の再生に有効であることが示されており (Kitamura et al., 2008)、今後臨床応用が期待されているサイトカインである。しかし治験においては2壁性や3壁性の骨欠損を対象としており1壁性や水平性骨欠損などの大きな骨欠損への応用には改善の余地が残っている。ヒト歯根膜由来間葉系細胞群 (HPDL細胞群) に対するFGF-2の作用については様々な報告があり、主に血管内皮細胞や未分化間葉系細胞の増殖と分化を促し、血管新生を促進させると報告されている (Nugent & Iozzo, 2000; Takayama et al., 1997)。また、FGF-2は歯根膜由来未分化間葉系細胞の基質形成や前骨芽細胞などの未成熟な細胞に対して硬組織形成を抑制すると考えられている (Debiais et al., 1998; Takayama et al., 1997)。一方、BMP-2は骨、軟骨の発生と維持に深く関与しており、それ以外にも多彩な生理活性を有しているタンパク質である。その働きは主に異所性の骨誘導能であると報告されており、未分化間葉系細胞・前骨芽細胞から骨芽細胞への分化や骨芽細胞の増殖を促進させたと報告されている (Campbell & Kaplan, 1992; Ripamonti & Reddi, 1994; Urist, 1965)。歯科領域においては、rhBMP-2と吸収性コラーゲンスポンジキャリアとの組み合わせが海外で現在市販されており、サイナスリフトやインプラントのための骨増大に

用されている。BMP-2はHPDL細胞群に対して骨芽細胞への分化および骨の形成を促進する作用を有し、ALP活性を上昇させることが報告されている (Kobayashi et al., 1999)。これまでにShiraiらは、株化したブタ歯根膜由来間葉系細胞にFGF-2及びBMP-2が与える影響を検討し、ブタ歯根膜由来間葉系細胞はBMP-2刺激により石灰化物を形成するだけでなく、FGF-2の刺激により管腔様構造を構築したことが、FGF-2はBMP-2の誘導する石灰化物の形成を抑制し、反対にBMP-2はFGF-2の誘導する管腔様構造の形成を抑制したことを報告している (Shirai et al., 2009)。*In vivo*におけるFGF-2 + BMP-2の相互作用に関する報告として、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hBMMSCs)、FGF-2 + BMP-2を併用することで骨密度が上昇したことが報告されている (Akita et al., 2004)。しかし、HPDL細胞群に対するFGF-2及びBMP-2の相互作用に関する報告はない。これまで、歯周組織再生療法に用いられてきた移植材としては、自家骨あるいは骨補填剤がある。自家骨は骨採取における侵襲、骨採取量の制限などの課題が残されており、骨補填剤は非吸収性であることが多く、生体内で永久に残存し感染源になりうることなど改善する余地が残っている。そこで今回の研究では、拒絶反応のない自己組織由来材料であり、利用されることなく捨てられているヒト抜去歯象牙質の再利用に着目し、担体としてDDMを用いた。また、Shiraiらの*in vitro*の研究結果に基づき、HPDL細胞群に対してFGF-2及びBMP-2を併用すると血管新生や骨新生が促進するとの仮説を立て、担体とHPDL細胞群からなる埋植体を製作し、そこにFGF-2、BMP-2およびその併用を添加しヌードマウス背部皮下に移植することによって組織再生、特に血管組織形成や骨様組織形成にどのような影響を及ぼすかを検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験動物と飼育

実験動物は4週齢の雄性ヌードマウス (BALB/c Slc-nu体重: 約20 g) を1週間の検疫期間をおき、実験に使用した。室温平均24°C、明暗12時間周期のもとで固形飼料と水を自由に与えて飼育した。本研究は北海道医療大学動物実験の承認 (承認番号: 第014号) を得て行った。

### 2. HPDL細胞群の採取

HPDL細胞群は北海道医療大学歯科内科クリニックを受診した患者において、治療上抜歯が必要と判断し抜去した3人の患者の3本の歯の歯根膜組織からoutgrowth

法にて増殖させ (Nagatomo et al., 2006), 3細胞群を採取し, それぞれHPDL 1, HPDL 2, HPDL 3とした. 歯根膜組織はNo. 11メスを用いて各抜去歯の歯根中央1/3から採取し, I型コラーゲンコート培養ディッシュ上で10%ウシ胎児血清 (FBS, Valley Biomedical), 2 mM L-グルタミン (Invitrogen), 200  $\mu$ g/mlカナマイシン (Sigma-Aldrich), 100  $\mu$ g/mlペニシリン・ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich), 5  $\mu$ g/mlアムホテリシン B (Sigma-Aldrich) 含有DMEM培地 (Sigma-Aldrich) をbiopsy mediumとして用い24時間培養した. その後得られたHPDL細胞群は, growth mediumとして10%FBS, 2 mM L-グルタミン, 200  $\mu$ g/mlカナマイシン含有DMEM培地を用いて5代継代培養後, 歯根膜特異的遺伝子であるPLAP-1, periostinの発現を確認して埋植実験に使用した. 全ての培養は37°C, 5%CO<sub>2</sub>の条件下で行った.

### 3. ヒト凍結乾燥脱灰象牙質顆粒の製作

ヒト凍結乾燥脱灰象牙質の製作は, 村田らの方法に従った (村田ら, 2003). すなわち, 修復・補綴物, 根管充填物や齲蝕のないヒト抜去歯を低温骨粉碎機 (NS-101, 岡田鉄工所) で液体窒素冷却下にて粉碎し, 完全脱灰12時間 (2% HNO<sub>3</sub>, pH2.0), 洗浄60分 (冷蒸留水), 凍結乾燥を12時間行い, 凍結乾燥脱灰象牙質顆粒 (Demineralized Dentin Matrix: DDM) として用いた. その後, DDMは粒径0.4~0.8 mmサイズの篩にかけて回収した.

### 4. 成長因子

成長因子として, リコンビナントヒトBMP-2 (R&D Systems), リコンビナントヒトFGF-2 (科研製薬) を使用した. 溶媒としてPBSを用い, Shiraiらの報告 (Shirai et al., 2009) を参考にしてFGF-2溶液は2  $\mu$ g/site, BMP-2溶液は5  $\mu$ g/siteとなるように調整した.

### 5. 埋植体の調整

埋植体には, 担体としてDDM (20 mg/site) を用い, 移植する細胞としてHPDL 1, HPDL 2, HPDL 3のそれぞれを用い, 無細胞群も設定した. 成長因子の付与には, ①無添加群, ②FGF-2群, ③BMP-2群, ④FGF-2+BMP-2併用群の4条件を設定した. 埋植体として, DDMと3つのHPDL細胞群および無細胞群からなる4群に4条件の成長因子を付与することによって, 16条件の埋植体を調整した. 埋植体の調整は埋植直前に行った.

### 6. 埋植体の皮下埋植法

皮下埋植は, 村田らの方法に従った (村田ら, 2003). すなわち, 滅菌注射用水で10倍希釈したPentobarbital sodium (NENBUTAL<sup>®</sup>, 大日本住友製薬) を8  $\mu$ l/g体重でヌードマウスの腹腔内に投与し, 全身麻酔を行った. その後, 背部両側にそれぞれ1カ所ずつ, 計2カ所に約10 mmの皮下切開を加えて, 皮下結合組織を鈍的に剥離してポケットを形成し, 1条件あたり4カ所で計32匹64カ所埋植体を埋植した. 埋植体は切開創付近に後戻りしないよう切開創から十分な距離をとって埋植し, 創部はナイロン糸で2~3針縫合し, 抗生剤軟膏 (アクロマイシン<sup>®</sup>, ポーラファルマ) を塗布した.

表1 埋植体の条件

	細胞	FGF-2	BMP-2
無添加群	HPDL 1	-	-
	HPDL 2		
	HPDL 3		
	無細胞群		
FGF-2群	HPDL 1	+	-
	HPDL 2		
	HPDL 3		
	無細胞群		
BMP-2群	HPDL 1	-	+
	HPDL 2		
	HPDL 3		
	無細胞群		
FGF-2+BMP-2併用群	HPDL 1	+	+
	HPDL 2		
	HPDL 3		
	無細胞群		

1条件あたり4カ所, DDM (20 mg/site) は全てに含まれる.  
HPDL細胞群: 1  $\times$  10<sup>7</sup>個/site  
FGF-2: 2  $\mu$ g/site BMP-2: 5  $\mu$ g/site

### 7. 薄切切片の作製

埋植4週後にエーテル吸入による深麻酔にて屠殺し, 埋植体を周囲結合組織とともに一塊として摘出し, 10%中性緩衝ホルマリン液に24時間浸漬固定した. 10% EDTA溶液中で脱灰した後, パラフィン包埋し, 厚さ3  $\mu$ mの切片を作製した.

### 8. Reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

移植したHPDL細胞が生着しているかを検討するために, HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3および無細胞の成長因子無添加群からなる摘出試料を用い, 以下の実験を行った. 摘出した組織をISOGEN (Nippon gene) に浸漬, ホ

モジナイズし、全RNAを添付プロトコールに従い抽出した後、cDNAをcDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) を用いて合成した。PCRはTaq PCRコアキッット (Qiagen) を用いて60°C 25 cyclesにて行った。標的遺伝子としてヒトglyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) を用いforward/reverseプライマー (5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3' / 5'-AGG GGTCTACATGGCAACTG-3'; NM002046) を作製した。PCR反応産物は1.5% (w/v) アガロース (Sigma-Aldrich) に電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、Light Capture (Atto) を用いて観察した。

#### 9. 摘出した埋植体の組織学的観察と血管数・新生骨形成割合の分析

作製した薄切切片にヘマトキシリン-エオジン (Hematoxylin-Eosin: H-E) 染色を施し、光学顕微鏡で組織学的観察後、1条件あたり無作為に5視野 (倍率100倍) を選び1視野当たりのDDM周囲に存在する血球を含む管腔状構造を血管としその数を計測した。また、同様に1条件あたり無作為に5視野を選び1視野当たりのDDM周囲に存在する新生骨の面積およびDDMの面積をImage J (NIH) にて計測後、新生骨形成割合 (新生骨の面積/DDMの面積) を算出した。

#### 10. 統計解析

計測結果は平均値±標準偏差で表示し、Steel-Dwass法およびWilcoxonの順位和検定を用いて有意水準を0.05にて解析した。

今回の実験終了後、採取した細胞は廃棄し、遺伝子解析を行わないことで北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得た (承認受付番号: 81号)。

## 結 果

#### 1. 摘出した埋植体中におけるヒト由来細胞の存在: ヒトGAPDH mRNAの発現

摘出した組織中にHPDL細胞群由来のものが存在するかどうかを検討するためにヒトGAPDH mRNAの発現を調べた結果、HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3の成長因子無添加群から摘出した組織の全てから、ヒトGAPDH mRNAの発現がみられた (図1A~C)。しかしDDMのみからなる無細胞群では、ヒトGAPDH mRNAの発現はみられなかった (図1D)。

#### 2. 摘出した埋植体の組織学的所見

HPDL 1を含む埋植体埋植4週後のH-E組織像では、無添加群において弱拡大 (×100) でDDMの象牙細管の横断面が観察でき (図2A), 強拡大 (×400) ではDDM周囲には細胞が配列し薄い線維性膜で被包化されていた (図2B)。FGF-2群では、DDM周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられた (図2CD)。しかし新たな骨の添加はほとんど認められなかった。BMP-2群では弱拡大でDDM表面に新生骨が添加性に形成されているのがみられ (図2E), 強拡大では骨細胞を含む新生骨が観察された (図2F)。FGF-2+BMP-2併用群では弱拡大でDDM表面に新生骨が添加性に形成されて、血球を含む管腔様構造も同時に観察された (図2G)。また、強拡大では血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられた (図2H)。HPDL 2を含む埋植体では、HPDL 1の時と同様の所見がみられた。すなわち無添加群では血球を含む管腔様構造がみられたが、新生骨はみられなかった (図3AB)。FGF-2群では、多数の血球を含む管腔様構造をみる事ができた (図3CD)。BMP-2群ではDDM表面に添加性に新生骨の形成がみられた (図3EF)。FGF-2+BMP-2併用群では、血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられた (図3GH)。HPDL 3を含む埋植体でもHPDL 1, HPDL 2とほぼ同様な所見がみられた (図4A~F)。しかし、FGF-2+BMP-2併用群において血球を含む管腔様構造はみられたが、新生骨の形成はみられなかった (図4GH)。無細胞埋植体では、無添加群で血球を含む管腔様構造がみられるが、新生骨はみられなかった (図5AB)。FGF-2群では、DDM周囲や内部に血球を含む管腔様構造がみられた (図5CD)。BMP-2群では、DDM表面に添加性に新生骨の形成がみられた (図5EF)。FGF-2+BMP-2併用群において血球を含む管腔様構造はみられたが、新生骨の形成はみられなかった (図5GH)。

#### 3. 血管および新生骨の分析観察

摘出された組織中の血管数と新生骨形成割合をH-E染色切片上で画像解析により算出した (図6, 7)。

##### 1) 血管の分析観察

HPDL細胞群を含む埋植体では、1視野 (倍率100倍) 当たりのDDM周囲に存在する血管数は、FGF-2群では $16.01 \pm 8.30$ 個/視野で、FGF-2+BMP-2併用群では $15.28 \pm 9.05$ 個/視野であり、これら両群と無添加群 ( $6.28 \pm 4.55$ 個/視野) およびBMP-2群 ( $6.68 \pm 5.72$ 個/視野) との間に統計学的な有意差を認めた ( $p < 0.05$ ,



図1 RT-PCR :

A : HPDL 1 B : HPDL 2 C : HPDL 3 D : 細胞なし

HPDL細胞群を含む埋植体を埋植した組織からはヒトGAPDHの発現がみられ, HPDL細胞群を含まない埋植体を埋植した組織からはヒトGAPDHの発現がみられなかった。

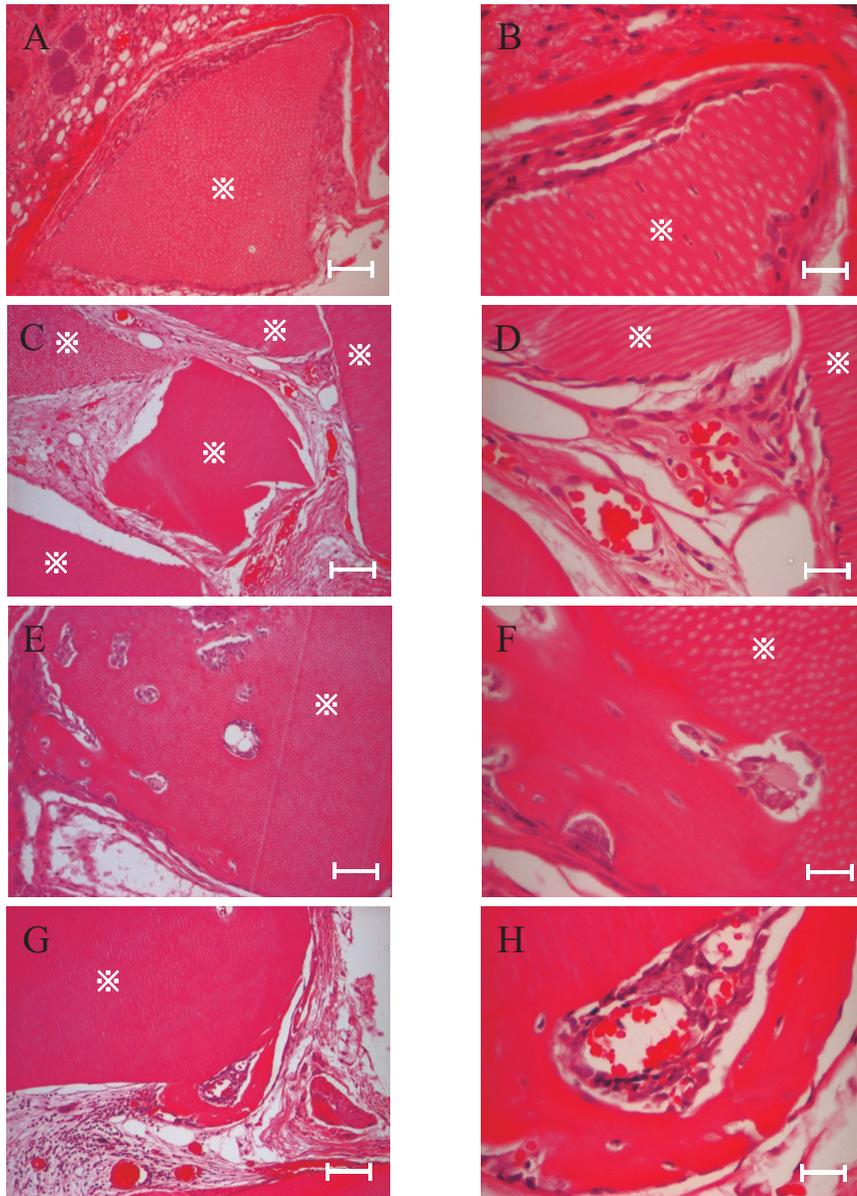


図2 HPDL 1 を含む埋植体埋植 4 週後のH-E組織像 :

A : 無添加群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM (\*) の象牙細管の横断面がみられる。

B : 無添加群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). DDM 周りには細胞の配列, 及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる。

C : FGF-2群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM 周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられる。

D : FGF-2群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). DDM 周囲に血球を含む管腔様構造がみられる。

E : BMP-2群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM 表面に新生骨が添加性に形成されている。

F : BMP-2群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). 骨細胞を含む新生骨がみられる。

G : FGF-2 + BMP-2併用群, 弱拡大 ( $\times 100$ , bar : 100  $\mu\text{m}$ ). DDM 表面に新生骨が添加性に形成されている。

H : FGF-2 + BMP-2併用群, 強拡大 ( $\times 400$ , bar : 25  $\mu\text{m}$ ). 血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられる。

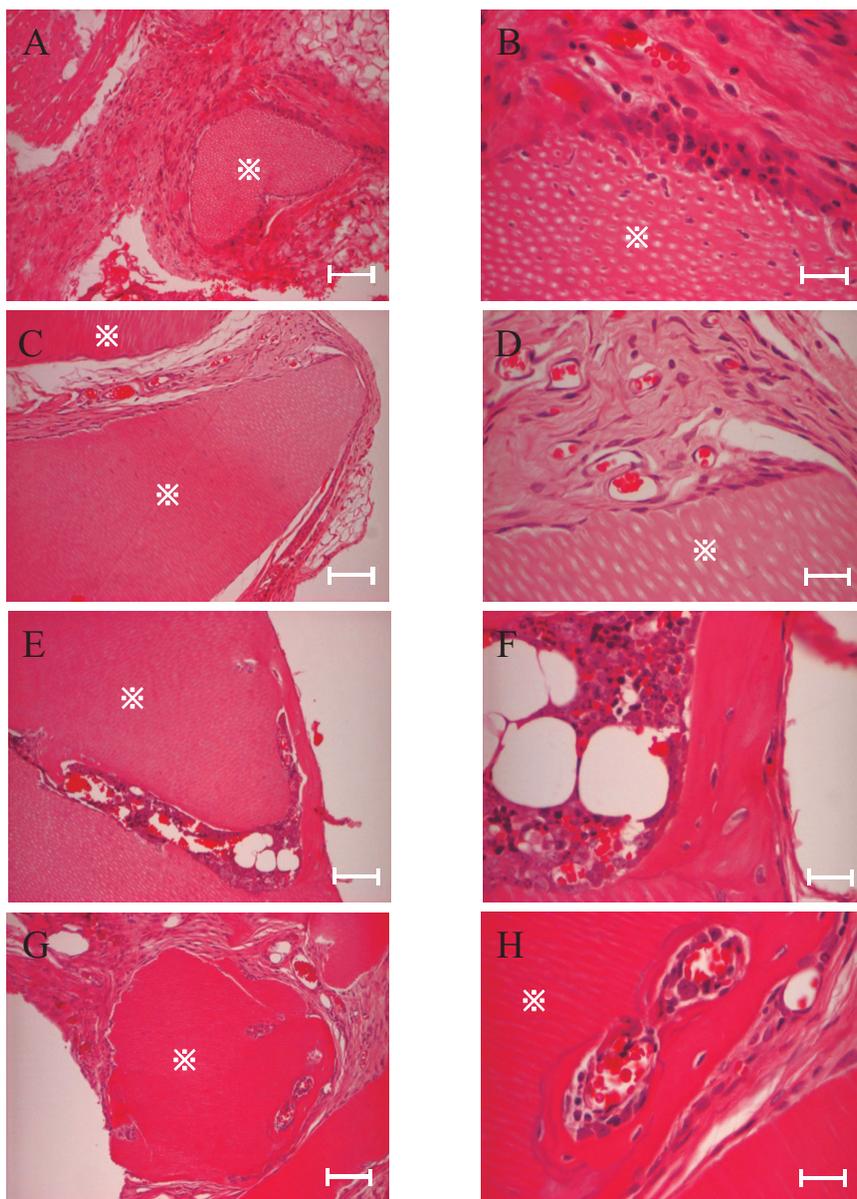


図3 HPDL 2 を含む埋植体埋植 4 週後のH-E組織像：

A：無添加群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM（※）の象牙細管の横断面がみられる．

B：無添加群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲には細胞の配列，及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる．

C：FGF-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられる．

D：FGF-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

E：BMP-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている．

F：BMP-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．骨細胞を含む新生骨がみられる．

G：FGF-2+BMP-2併用群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている．

H：FGF-2+BMP-2併用群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．血球を含む管腔様構造をとり囲むように新生骨の形成がみられる．

図6)．一方で，無細胞埋植体では，血管数はFGF-2群で $22.85 \pm 7.43$ 個/視野であり，無添加群（ $5.65 \pm 3.70$ 個/視野）およびBMP-2群（ $5.95 \pm 4.64$ 個/視野）との間に統計学的な有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）．さらに，FGF-2+BMP-2併用群では $15.75 \pm 9.36$ 個/視野であり，無添加群，BMP-2群との間に統計学的な有意差を認めた（ $p < 0.05$ ）．また，FGF-2群はHPDL細胞群を含む群より無細胞

群で統計学的に有意に大きな値を示した．

## 2) 新生骨の分析観察

HPDL細胞群を含む埋植体では，1視野（倍率100倍）当たりのDDM周囲に存在する新生骨形成割合は，BMP-2群では $0.036 \pm 0.069$ であり，この値は他群と比較して有意に高かった（ $p < 0.05$ ）．またFGF-2+BMP-2併

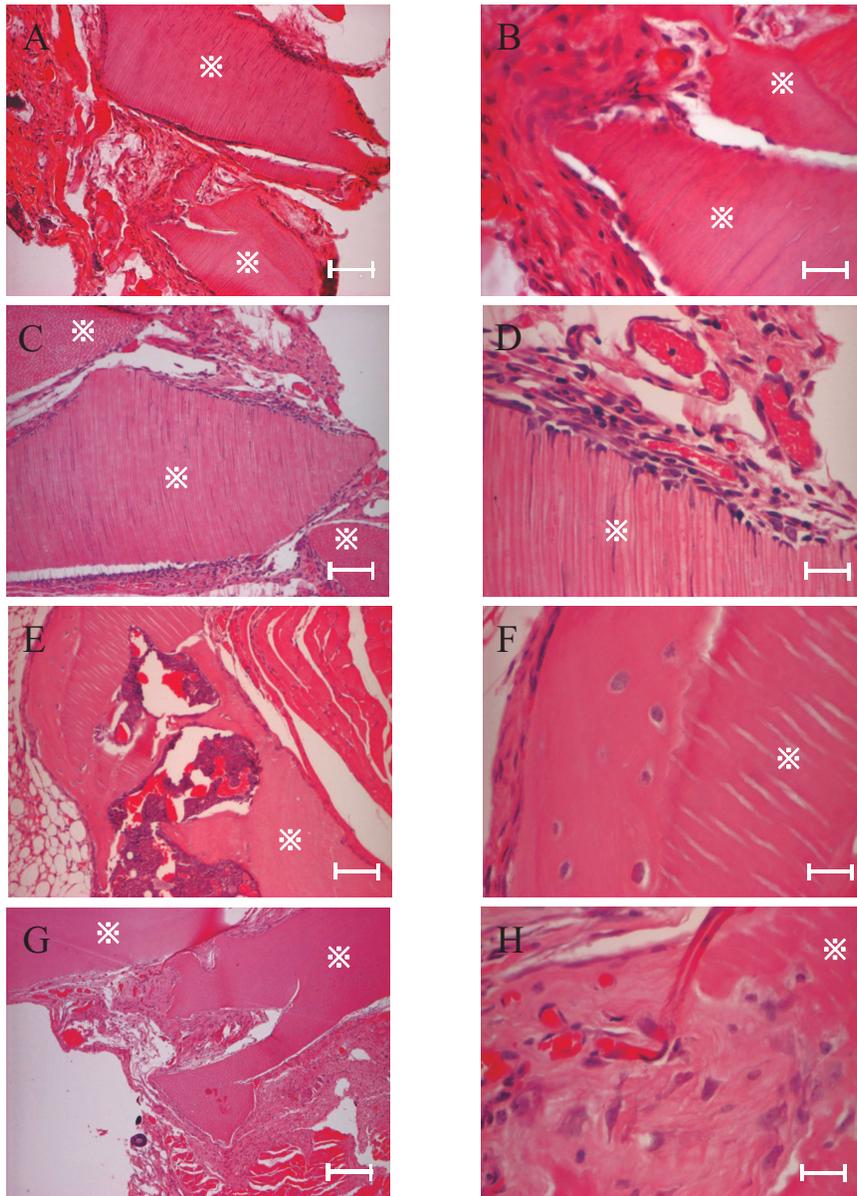


図4 HPDL 3を含む埋植体埋植4週後のH-E組織像：

A：無添加群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）。DDM（\*）の象牙細管の縦断面がみられる。

B：無添加群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）。DDM周囲には細胞の配列，及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる。

C：FGF-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）。DDM周囲に血球を含む管腔様構造が多数みられる。

D：FGF-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）。DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる。

E：BMP-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）。DDM表面に新生骨が添加性に形成されている。

F：BMP-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）。骨細胞を含む新生骨がみられる。

G：FGF-2+BMP-2併用群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）。DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる。

H：FGF-2+BMP-2併用群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）。血球を含む管腔様構造が確認できるが新生骨の形成はみられない。

用群では $0.009 \pm 0.029$ であり，これは無添加群と比較して有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ，図7）。一方で，無細胞群では，1視野（倍率100倍）当たりのDDM周囲に存在する新生骨形成割合はBMP-2群で高い傾向にあったが，無添加群，FGF-2群およびFGF-2+BMP-2併用群との間には有意な差は認めなかった。また，BMP-2群ではHPDL細胞群を含む群は無細胞群よりも統計学的に有意

に大きな値を示した（ $p < 0.05$ ）。

## 考 察

これまで歯周組織再生療法に用いられてきた移植材は，自家骨あるいはリン酸カルシウム系セラミックなどの無細胞性生体材料である（Block & Kent, 1985）。自家骨には，骨採取における健常組織への侵襲，患者の精神

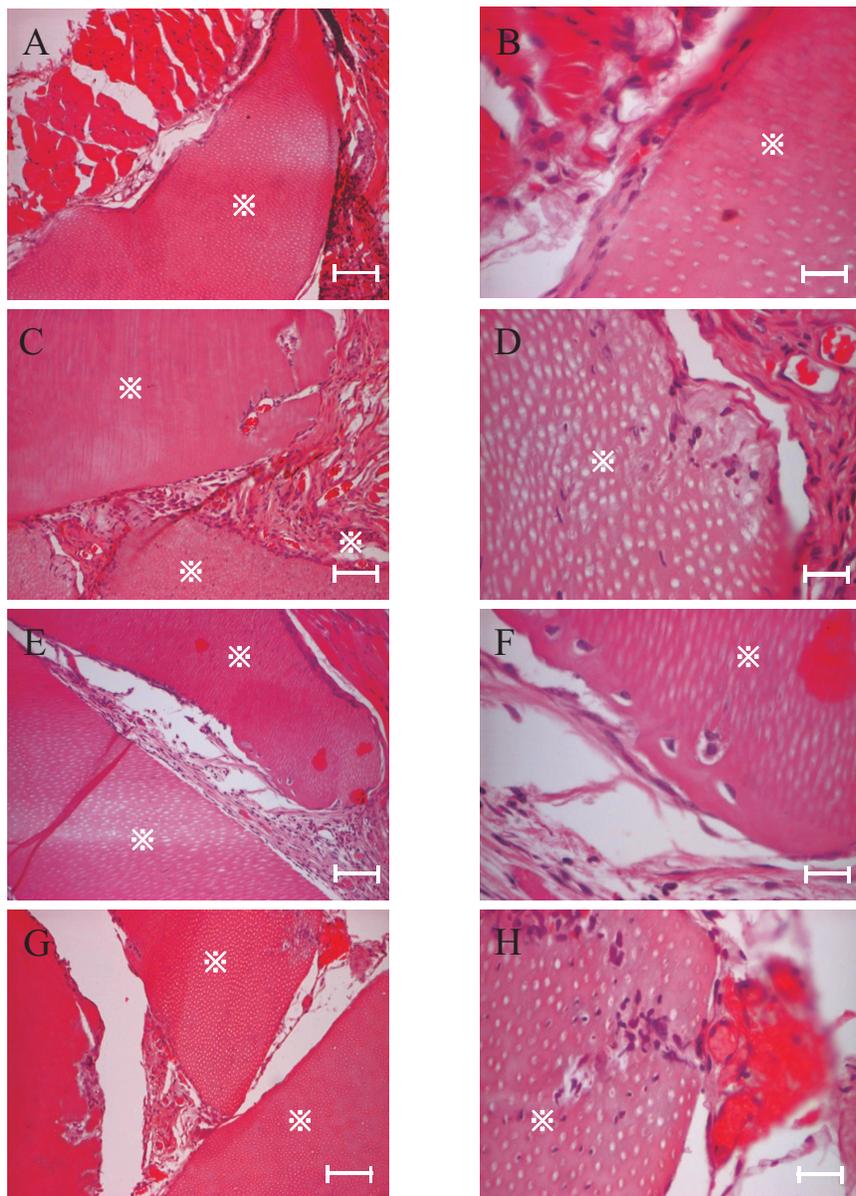


図5 HPDL細胞群を含まない埋植体埋植4週後のH-E組織像：

A：無添加群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM（※）の象牙細管の横断面がみられる．

B：無添加群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲には細胞の配列，及び薄い線維性膜で被包化されていることがみられる．

C：FGF-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲や内部に血球を含む管腔様構造がみられる．

D：FGF-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

E：BMP-2群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM表面に新生骨が添加性に形成されている．

F：BMP-2群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．骨細胞を含む新生骨がみられる．

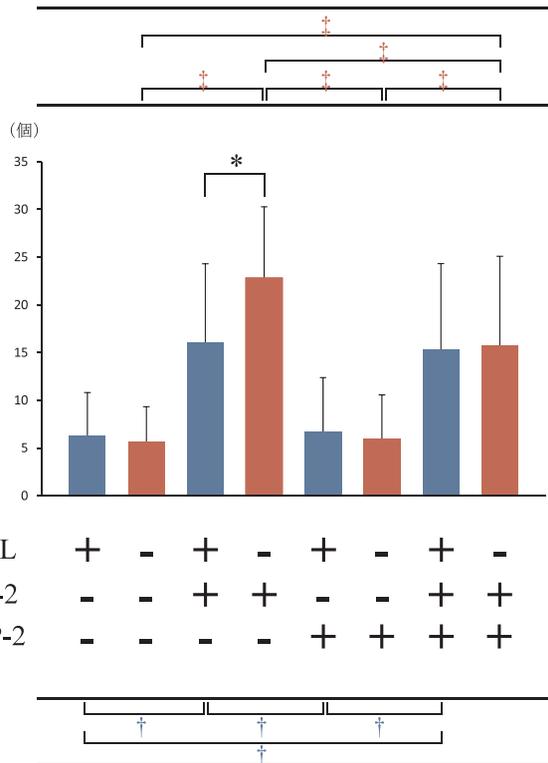
G：FGF-2+BMP-2併用群，弱拡大（ $\times 100$ ，bar：100  $\mu\text{m}$ ）．DDM周囲に血球を含む管腔様構造がみられる．

H：FGF-2+BMP-2併用群，強拡大（ $\times 400$ ，bar：25  $\mu\text{m}$ ）．血球を含む管腔様構造が確認できるが新生骨の形成はみられない．

的身体的負担過多，骨採取量や形態の制限などの課題が残されている（Block & Kent, 1985）．また無細胞性生体材料では主にハイドロキシアパタイトが組織親和性と骨伝導能を有することから骨補填材として広く用いられている（島田ら，1989；小笠原ら，2000）．しかしながら，それらの骨補填材は非吸収性であるため，生体内で永久に残存し感染源になりうることや，骨誘導能を有さ

ないため，早期の骨増生は望めず，患者の時間的負担過多になりやすい．そこで利用されることなく捨てられているヒト抜去歯象牙質の再利用に着目し，本研究では担体としてDDMを用いた．

今回の研究では，担体とHPDL細胞群からなる埋植体を製作し，そこにFGF-2，BMP-2およびその併用を添加しヌードマウス背部皮下に移植した．背部皮下では骨形

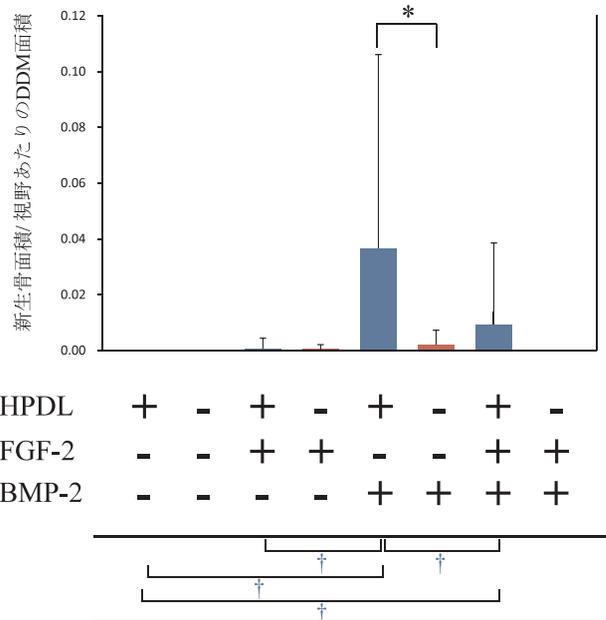


**図6** 血管数  
測定値は平均±標準偏差 (n = 4) で表示している。  
青：HPDL細胞群を含む群 赤：無細胞群  
同色の異なるアルファベット間に統計学的有意差を認める (Steel-Dwass法：p<0.05)。  
\*は有意水準0.05以下をもって有意差ある群間を示す (Wilcoxonの順位和検定)。

成に関与する細胞が少ないため、新生骨形成は埋植体の効果によるものと考えられる。今回の研究では埋植体におけるサイトカインの効果を検討するために背部皮下に埋植実験を行った。

本研究では移植したHPDL細胞が組織に生着しているかを検討した。RT-PCRの結果、HPDL 1, HPDL 2, HPDL 3の成長因子無添加群による埋植体から、ヒトGAPDH mRNAの発現が確認された(図1A~C)が、無細胞無添加群ではGAPDH mRNAの発現が認められなかった(図1D)。このことより、ヌードマウス背部皮下に移植したHPDL細胞群が生着し組織形成に関与したことが考えられる。GAPDH mRNAの発現において細胞群間に強弱があったことから、摘出した組織に存在したHPDL細胞群の量に差があることがわかる。一方、骨形成量に差はなかった。このことから、埋植したHPDL細胞群は骨以外の組織の形成にも関与した可能性が考えられる。

無細胞無添加群とHPDL細胞群を含む無添加群では、ともに新生骨はみられず血管数も同程度であった。このことから、異所性にHPDL細胞群を移植しても血管新生や骨新生を促進しないということが考えられる。背部皮



**図7** 新生骨形成割合：  
測定値は平均±標準偏差 (n = 4) で表示している。  
青：HPDL細胞群を含む群 赤：無細胞群  
違う条件間における異なるアルファベット間に統計学的有意差を認める (Steel-Dwass法：p<0.05)。  
\*は有意水準0.05以下をもって有意差ある群間を示す (Wilcoxonの順位和検定)。

下にDDM単独を埋植して4週後に新生骨が観察されたという報告 (Murata et al., 2010) もあるが、32週間観察しても骨誘導は認められなかった (佐藤ら, 2002), あるいは3週間の観察期間中での新生骨の形成量にバラつきが大きかった (Ike et al., 1998) とも報告されている。本研究においてもこれらの研究と一致するように無添加群では新生骨形成がみられなかった。DDM単独における新生骨形成に関してはさらなる検討が必要と思われる。

無細胞群において比較すると、FGF-2群は無添加群、BMP-2群およびFGF-2+BMP-2併用群よりもより多くの血管がみられ、さらに、FGF-2+BMP-2併用群では無添加群とBMP-2群よりも多く血管がみられた。HPDL細胞群を含むFGF-2群、FGF-2+BMP-2併用群はそれぞれ無添加群、BMP-2群と比較して有意に多くの血管がみられた。FGF-2は歯根膜由来間葉系細胞に対して管腔形成促進作用があり (Shirai et al., 2009), FGF-2は創傷治癒過程において皮膚に対して血管新生を促進する働きがある (Tsuboi et al., 1990) と報告されている。このことから本研究ではFGF-2を含む埋植体の働きによりhost由来、donor由来細胞両方に対して血管の形成を促すことによ

り血管数の増加に関与したことが考えられる。血管新生は組織再生に重要であるため、FGF-2による血管数の増加は歯周組織再生に有効であると考えられる。また、FGF-2群においてHPDL細胞群を含む群と無細胞群を比較すると、無細胞群の方が有意に多く血管がみられた。FGF-2はHPDL細胞群に対して作用するよりもヌードマウス背部皮下の場の細胞に働きかけた方が効果的に血管数は増加することが考えられる。BMP-2群ではHPDL細胞群の有無に関わらず血管数は同程度であり、無添加群と比較しても有意差は認めなかった。無細胞群についてFGF-2 + BMP-2群とFGF-2群とを比較すると、FGF-2とBMP-2を併用した場合の宿主細胞による血管新生はFGF-2単独で添加した場合より減少している。このことはShiraiらの結果と同様であり、BMP-2がFGF-2の血管新生の働きを抑制したと考えられる。一方、HPDL細胞群を含むFGF-2 + BMP-2併用群ではHPDL細胞群を含むFGF-2群と比較して血管数は減少しなかった。このことはHPDL細胞群を含むFGF-2 + BMP-2併用群では新生骨が形成され、さらに図2 GH, 3 GHにみられるような硬組織形成に伴う血管新生が生じたことによると考えられる。骨再生に先だって血管新生が起こることが報告されている(岸ら, 2001) ことから、創傷治癒の過程で生じる血管新生はその後の組織再生にとって重要な最初のステップであると考えられる。

骨新生についてみると、無細胞群では、BMP-2群はわずかに新生骨の形成を認めたが、無添加群、FGF-2群およびFGF-2 + BMP-2併用群との間に有意差はみられなかった。また、FGF-2 + BMP-2併用群でもほとんど新生骨の形成がみられなかった。一方、HPDL細胞群を含む4群のうち、BMP-2群は他群と比較して有意に高い新生骨形成割合を示した。また、FGF-2 + BMP-2併用群における新生骨形成割合は無添加群と比較して有意に高い値を示したが、BMP-2群より有意に低い値を示した。Debiaisらの研究によると、FGF-2はヒト頭蓋由来細胞に作用させると、未分化な状態では細胞増殖を促進し分化を抑制するが、分化が進んだ状態では細胞増殖促進効果はなかったとの報告がある(Debiais et al., 1998)。このことから、今回の研究ではBMP-2はHPDL細胞群中に存在する未分化間葉系細胞と骨芽細胞に対して作用し骨分化を促したが、FGF-2 + BMP-2の併用群ではFGF-2が未分化間葉系細胞に対して作用し、BMP-2の骨芽細胞への分化および骨形成促進作用を抑制したのと考えられる。FGF-2群では、HPDL細胞群の有無に関わらず新生骨はほとんどみられなかった。BMP-2群では、新生骨形成割合は無細胞群よりもHPDL細胞群を含む群で統計学

的に有意に高い値を示した。ヌードマウスの背部皮下には骨系の細胞が少ないためBMP-2による骨芽細胞への分化および骨形成の促進効果が小さかったが、HPDL細胞群中には骨芽細胞や骨芽細胞に分化しうる未分化間葉系細胞など様々な細胞を含むとされており(Seo et al., 2004; Hidaka et al., 2012)、BMP-2による骨分化促進効果が際立って出現したと考えられる。FGF-2 + BMP-2併用群では、HPDL細胞群を含む群が無細胞群より高い新生骨形成割合の傾向を示した。これは使用したりコンピナントBMP-2がヒト由来であることに起因しているかもしれない。

現在、歯周治療において行われるフラップ手術による原因除去療法では、炎症状態に陥った歯周組織に治癒を促すことは可能であるが、歯周組織の再生はほとんど望むことはできない。そこで、組織再生誘導法(GTR法)(Nyman et al., 1982)やエムドゲイン®療法(Heijl, 1997)が開発され、それまでの原因除去療法に比べ、歯周組織の再生において一定の成績をあげている(Murphy & Gunsolley, 2003; Tonetti et al., 2002)。しかし、GTR法やエムドゲイン®療法は組織内の細胞に働いて再生を導いているために、広範囲な歯周組織欠損においては組織再生に十分な細胞の遊走や増殖が困難である。そのため、これらの歯周組織再生療法では部分的な再生しか期待できないことから、適応症が限られているのが現状である。また、これまでに歯周組織欠損の残存骨壁数は歯周治療の予後に大きく関係しており3壁性の骨欠損は組織再生能が高く、1壁性や2壁性の骨欠損は組織再生能が低いと報告されている(Kim CS et al., 2004)。そこで、近年の生体組織工学を用いた手法に注目が集まり、特にサイトカイン療法にかかる期待は大きい。しかしながら、骨が再生しにくいと考えられる1壁性や2壁性骨欠損、さらには水平性骨欠損にサイトカイン療法を用いた研究は僅かである。Saitoらはビーグル犬の歯周組織における水平性骨欠損に対してBMP-2を用いて骨形成が増大したと報告している(Saito et al., 2003)。一方、Kinoshitaらは12匹のビーグル犬に水平性骨欠損を人工的に作製し、rhBMP-2を投与したところ、歯周組織の再生が認められたが、骨の再生量は平均0.68mmであったと報告しており(Kinoshita et al., 1997)、期待されたより骨の再生量は少なく、得られた骨再生がBMPの作用によるものか否かの判断が困難であると思われる。Murakamiらの実験(Murakami et al., 1999; 村上 et al., 2000)においても、実験的に作製されたモデルはFGF-2を用いなくても比較的再生が生じやすいと考えられる3壁性の骨欠損であった。これらの実験結果から歯周組織

再生には、成長因子の種類と同様に骨欠損形態が影響を及ぼしているものと考えられ、このことが歯周組織再生にとって不利な条件を作り出しているものとする。そこで本研究では、より複雑で大きな歯周組織欠損の再生を目的とし血管新生に重要なFGF-2と骨誘導能を有するBMP-2の併用に注目した。これまでにヒト間葉系幹細胞(hMSCs)を用いてFGF-2+BMP-2を併用すると、hMSCsのみ、hMSCs+FGF-2あるいはhMSCs+BMP-2と比較して有意にALP陽性細胞数が増加したと報告されている(Akita et al., 2004)。さらに、*in vivo*でヌードラットの頭蓋骨欠損モデルを用いてFGF-2+BMP-2の併用効果を検討したところ、埋植2週で最も骨形成が促進され、PBSを用いた群、hMSCs群と比較して有意に骨形成量が増加したと報告されている(Akita et al., 2004)。また、ウサギの脊椎固定にウサギのBMMSCs、FGF-2+BMP-2を併用すると、BMMSCsのみと比較して有意に高い成功率を示し、BMMSCs+FGF-2、BMMSCs+BMP-2と比較してもその成功率に高い傾向があることが示されている(Minamide et al., 2007)。

今回の研究では、担体のみと比較してHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2の併用群における血管数、新生骨形成の増加がみられた。さらにHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2併用群では、組織像において内部に新生血管を含む骨新生が特徴的にみられた。以上のことからHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2の併用による移植は組織再生に有用である可能性が示された。

## 結 論

FGF-2、BMP-2およびその併用がHPDL細胞群において血管組織形成や骨様組織形成に及ぼす影響を検討し、以下の結果を得た。

1. HPDL細胞群を含む埋植体を埋植すると摘出した組織からヒトGAPDH mRNAの発現を認め、移植したHPDL細胞群が生着していることが確認できた。

2. HPDL細胞群の有無に関わらずFGF-2群では無添加群、BMP-2群と比較して有意に多くの血管がみられたが新生骨形成はみられなかった。さらにFGF-2群では、無細胞群はHPDL細胞群を含む群よりも有意に多くの血管が観察された。

3. HPDL細胞群を含むBMP-2群では無添加群、FGF-2群およびFGF-2+BMP-2併用群と比較して有意に新生骨形成割合が増加した。さらに、HPDL細胞群を含むBMP-

-2群では、無細胞BMP-2群と比較して有意に新生骨形成割合が増加していたが、血管数には差を認めなかった。

4. HPDL細胞群を含むFGF-2+BMP-2併用群では、血管数は無添加群やBMP-2群と比較して有意に増加した。またFGF-2群と比較しても同程度の血管数であった。一方、同様の条件において、新生骨形成割合はBMP-2群と比較して有意に減少したものの、HPDL細胞群を含む無添加群と比較すると有意に増加した。HPDL 1、HPDL 2を含むFGF-2+BMP-2併用群では血管を取り囲むように新生骨の形成がみられた。

以上の事から本研究によりヒト歯根膜細胞群にFGF-2とBMP-2を併用添加すると、担体のみと比較して血管および骨形成を増加させ、内部に新生血管を含む骨新生が形成されることが示された。また増加した血管および骨形成はヒト歯根膜細胞群に由来する可能性が示唆された。本研究の知見を基に大型動物を用いて、歯根膜細胞群の移植とFGF-2及びBMP-2添加が歯周組織再生に及ぼす効果について検索を行っていく予定である。

## 文 献

- Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T & Akino K. Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen* 12 : 252-259, 2004.
- Block MS & Kent JN. Healing of mandibular ridge augmentations using hydroxylapatite with and without autogenous bone in dogs. *J Oral Maxillofac Surg* 43 : 3-7, 1985.
- Campbell JT & Kaplan FS. The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 50 : 283-289, 1992.
- Debiais F, Hott M, Graulet AM & Marie PJ. The effects of fibroblast growth factor-2 on human neonatal calvaria osteoblastic cells are differentiation stage specific. *J Bone Miner Res* 13 : 645-654, 1998.
- Gospodarowicz D, Massoglia S, Cheng J & Fujii DK. Effect of retina-derived basic and acidic fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of retina-derived capillary endothelial cells. *Exp Eye Res* 43 : 459-476, 1986.
- Heijl L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. A case report.

- J Clin Periodontol 24 : 693-696, 1997.
- Hidaka T, Nagasawa T, Shirai K, Kado T & Furuichi Y. FGF-2 induces proliferation of human periodontal ligament cells and maintains differentiation potentials of STRO-1+/CD146+periodontal ligament cells. Archs Oral Biol, 2012, in press.
- Ike M, Marshall R & Urist M.D. Recycled dentin root matrix for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein J. Oral Implantol 24 : 124-132, 1998.
- Kim CS, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Moon IS, Wikesjo UM & Kim CK. Periodontal repair in surgically created intrabony defects in dogs : influence of the number of bone walls on healing response. J Periodontol 75 : 229-35, 2004.
- Kinoshita A, Oda S, Takahashi K, Yokota S & Ishikawa I. Periodontal regeneration by application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 to horizontal circumferential defects created by experimental periodontitis in beagle dogs. J Periodontol 68 : 103-109, 1997.
- 岸好彰, 高橋好文, 東分吉, 松尾雅斗, 高橋和人, 長谷川二郎. 咬合機能下におけるインプラント界面骨と微小循環. 日本歯周病学会誌 43 : 43-51, 2001.
- Kitamura M, Nakashima K, Kowashi Y, Fujii T, Shimauchi H, Sasano T, Furuuchi T, Fukuda M, Noguchi T, Shibutani T, Iwayama Y, Takashiba S, Kurihara H, Ninomiya M, Kido J, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Hara Y, Izumi Y, Hirofujii T, Imai E, Omae M, Watanuki M & Murakami S. Periodontal tissue regeneration using fibroblast growth factor-2 : randomized controlled phase II clinical trial. PLoS One 3 : e2611, 2008.
- Kobayashi M, Takiguchi T, Suzuki R, Yamaguchi A, Deguchi K, Shionome M, Miyazawa Y, Nishihara T, Nagumo M & Hasegawa K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. J Dent Res 78 : 1624-1633, 1999.
- Langer R & Vacanti JP. Tissue engineering. Science 260 : 920-926, 1993.
- Ledoux D, Gannoun-Zaki L & Barritault D. Interactions of FGFs with target cells. Prog Growth Factor Res 4 : 107-120, 1992.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol 47 : 256-260, 1976.
- Minamide A, Yoshida M, Kawakami M & Okada M, Enyo Y, Hashizume H & Scott D Boden. The effects of bone morphogenetic protein and basic fibroblast growth factor on cultured mesenchymal stem cells for spine fusion. Spine (Phila Pa1976) 32 : 1067-1071, 2007.
- Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T & Okada H. Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. J Periodontal Res 34 : 425-430, 1999.
- 村上伸也, 高山真一, 岡田宏. 【21世紀を担う研究者の動向】 歯周組織再生をめざして 塩基性線維芽細胞増殖因子を応用した治療法の開発. 生体材料 18 : 186-193, 2000.
- 村田勝, 佐藤大介, 赤澤敏之, 平敏夫, 佐々木智也, 有末眞. ノードマウスにおけるヒト脱灰象牙質顆粒の骨・軟骨誘導. Journal of Hard Tissue Biology 11 : 110-114, 2003.
- Murata M, Akazawa T, Takahata M, Ito M, Tazaki J, Hino J, Nakamura K, Iwasaki N, Shibata T & Arisue M Bone induction of human tooth and bone crushed by newly developed automatic mill. J. Ceram. Soc. Japan 118 : 434-437, 2010.
- Murphy KG & Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. Ann Periodontol 8 : 266-302, 2003.
- Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S Muneta T & Ishikawa I. Stem cell properties of human periodontal ligament cells. J Periodontal Res 41 : 303-310, 2006.
- Nugent MA & Iozzo RV. Fibroblast growth factor-2. Int J Biochem Cell Biol 32 : 115-120, 2000.
- Nyman S, Lindhe J, Karring T & Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol 9 : 290-296, 1982.
- 小笠原健文, 五百蔵一男, 野村篤, 藤原寿彦, 阿多史雄, 神田禎則, 白川正順. アパタイトブロック長期填入例のCTによる検討. 日本口腔インプラント学会誌 13 : 180, 2000.
- Ripamonti U & Reddi AH. Periodontal regeneration : potential role of bone morphogenetic proteins. J Periodontal Res 29 : 225-235, 1994.
- Saito E, Saito A & Kawanami M. Favorable healing following space creation in rh-BMP-2-induced periodontal regeneration of horizontal circumferential defects in dogs with experimental periodontitis. J Periodontol 74 : 1808-

1815, 2003.

佐藤大介, 村田勝, 佐々木智也, 赤澤敏之, 有末眞.  
ヒト脱灰象牙質/リコンビナントヒトBMP-2複合イン  
プラントによる骨誘導. 日本口腔インプラント学会誌  
15 : 403-411, 2002.

Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S,  
Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY & Shi S. In-  
vestigation of multipotent postnatal stem cells from hu-  
man periodontal ligament. *Lancet* 364 : 149-55, 2004.

島田勝弘, 陳明裕, 武宜昭. HAPと $\beta$ -TCPの骨伝導性  
および安定性に関する組織学的研究家兎脛骨骨髓腔内  
移植実験の長期観察結果について. 日本口腔インプラ  
ント学会誌 2 : 236-243, 1989.

Shirai K, Ishisaki A, Kaku T, Tamura M & Furuichi Y.  
Multipotency of clonal cells derived from swine periodon-  
tal ligament and differential regulation by fibroblast  
growth factor and bone morphogenetic protein. *J Peri-  
odontal Res* 44 : 238-247, 2009.

Takayama S, Murakami S, Miki Y, Ikezawa K, Tasaka S,  
Terashima A, Asano T, & Okada H. Effects of basic fi-  
broblast growth factor on human periodontal ligament  
cells. *J Periodontal Res* 32 : 667-675, 1997.

Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adriaens P,  
Dubravec D Fonzar A, Fourmoussis I, Mayfield L, Rossi  
R, Silvestri M, Tiedemann C, Topoll H, Vangsted T &  
Walkamm B. Enamel matrix proteins in the regenerative  
therapy of deep intrabony defects. *J Clin Periodontol* 29 :  
317-325, 2002.

Tsuboi R & Rifkin DB. Recombinant basic fibroblast  
growth factor stimulates wound healing in healing-  
impaired db/db mice. *J Exp Med.* 172(1) : 245-51, 1990.

Tsutsumi S, Shimazu A, Miyazaki K, Pan H, Koike C,  
Yoshida E Takagishi K, & Kato Y. Retention of mul-  
tilineage differentiation potential of mesenchymal cells

during proliferation in response to FGF. *Biochem Biophys  
Res Commun* 288 : 413-419, 2001.

Urist MR. Bone : formation by autoinduction. *Science* 150 :  
893-899, 1965.



上與那原 朝秀

平成19年 3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成24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24年 4月 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  
任期制助手



〔原著〕

## ラット咬筋の基礎血流調節に対するサブスタンスPの作用

新岡 丈治<sup>1)</sup>, 石井 久淑<sup>2)</sup>

1) 北海道医療大学薬学部/大学教育開発センター

2) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野

## Effects of substance P on basal blood flow regulation in rat masseter muscle

Takeharu NIIOKA<sup>1)</sup> and Hisayoshi ISHII<sup>2)</sup>

1) School of Pharmaceutical Sciences/Center for Development in Higher Education, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

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

## Abstract

The present study investigated the suppressive effect of the selective substance P-receptor antagonist, spantide I, on the resting blood flow in the rat masseter muscle with the aid of a laser speckle imaging flowmeter to confirm the presence of dilator tone at the resting state. The effects of inhibition of the resting blood flow by application of spantide I on vasodilatation evoked by activation of the parasympathetic vasodilator fiber and intravenous administration of acetylcholine were also investigated.

The resting blood flow in the masseter muscle was significantly reduced by the application of spantide I in a dose-dependent manner. The blood flow was recov-

ered 60 min after washing with spantide I. After application of spantide I, the blood flow increases evoked by activation of the parasympathetic vasodilator fiber and administration of acetylcholine were significantly inhibited when compared with those of the non-treated control.

These results suggest that substance P induces dilatory tone via its receptor in the vessels of the rat masseter muscle at the resting state. If the dilator tone decreases, vascular beds may constrict excessively by their own elasticity and/or contractile tone, and a subsequent vasodilatory responses may be suppressed.

Key words : Rat, Masseter muscle, Basal blood flow, Substance P

## 緒 論

咬筋は咀嚼、嚥下および発声などの複雑な運動に関わる骨格筋であり、体幹・四肢の骨格筋に比べて疲労しにくいなどの特徴をもつ (van Steenberghe et al., 1978; Jow & Clark, 1989). この様な骨格筋の運動や疲労には、酸素、栄養素や代謝産物の運搬や交換を担う血流の動態が密接に関わっている (Guyton & Hall, 2006).

我々はこれまで、咬筋の血流動態とその調節機序を明

らかにする目的で様々な研究を行ってきた (Ishii et al., 2005, 2007, 2009a, b, 2010, 2011; Ishii & Izumi, 2012).

また近年では、特定範囲の血流動態を二次元の経時的な画像データを元に解析することが可能なレーザースペックルイメージング血流計を用いた実験により、浅部咬筋表面における定常状態の基礎血流の分布と、交感神経性ならびに副交感神経性に血管が収縮・弛緩反応を示したときの血流動態変化を報告した (Niioka et al., 2009b).

この報告の中で、基礎血流量が少ない部位では基礎血流

受付：平成25年3月27日 受理：平成25年4月30日

量が多い部位に比べてより大きな血流増加反応が認められ、また一方で、基礎血流量が多い部位では、より大きな血流減少反応が認められた。これらの結果は、咬筋血管の収縮・弛緩反応には、基礎血流量すなわち定常状態における血管壁のトーン調節状態が影響を及ぼすことを示唆している。同様の結果・示唆はネコの口唇血流についても報告されている (Karita & Izumi, 1995)。

全身に分布する血管の基礎血流には、交感神経性血管収縮線維の活動レベルに依存する収縮性トーン調節が重要であることが広く認識されているが (Barcroft et al., 1943), それに対して本研究を行う中で、サブスタンスP受容体の選択的阻害薬であるspantide Iを筋腹中に投与すると、咬筋表面を走行する血管や筋腹中の定常状態における基礎血流が減少することを見いだした。この結果は、咬筋中の血管壁は、サブスタンスP受容体を介したメカニズムによって、定常状態でも拡張性にトーン調節を受けている事を示唆する。すなわち基礎血流調節には、収縮性トーン調節に加えて、拡張性トーン調節系が存在する事が考えられる。しかしながら、血管壁の拡張性トーン調節系に対する報告は少なく統一した見解はない。

本研究では、咬筋血管に対する拡張性トーン調節系の有無を明らかにする目的で、spantide Iの基礎血流に対する抑制作用を調べ、さらに基礎血流が抑制された状態が、神経刺激や薬物によって誘発される血管拡張反応に及ぼす影響を調べた。我々の近年の報告 (Niioka et al., 2009b) で示される様に、咬筋表層における血流分布は一定ではない。例えば、咬筋組織に血液を供給している血管部位 (咬筋動脈や顔面動脈の咬筋枝) では、定常状態でも常に一定以上の血流値が認められるし、咬筋筋腹においては一定以上の血流値を示す部位もあれば、きわめて低い血流値を示す部位もある。この様に多様な血流分布を示す咬筋表層の血流動態を効率良く観察・解析するために本研究でも血流測定にレーザースペックルイメージング血流計を採用し、基礎血流値が高い咬筋動脈と基礎血流値が低い筋腹中央部に対する解析を行った。

## 方 法

### 1. 実験動物

本研究は、北海道医療大学動物実験規定に基づき、北海道医療大学動物実験センター管理運営委員会の審査、並びに学長の承認を得て行った。実験には、Wistar系の雄性ラット (325~485 g) を用いた。ラットは、ワイヤーケージに入れ、昼夜12時間サイクルの環境下、水と固形飼料は随時与えた状態で飼育した。エーテルで沈静

化した後、ウレタン (1 g/kg, Sigma) を頸背部に皮下注射することで麻酔をかけた。大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入し、それぞれから血圧測定と薬物の静脈注入を行った。血圧は、圧トランスデューサー (AP-601G, 日本光電) を介して得られた電圧変化をレコーダー (NR-500/NR-TH08, キーエンス) で記録した。ミオブロック (0.6 mg/kg, シスメックス・ピオメリュー) の静脈注入により筋弛緩させた後、継続的な人工呼吸下 (酸素50%, 空気50%) で実験を行った。左側頰の皮膚を切開・除去し、咬筋筋腹ならびに周辺組織を露出させ、組織表面を乾燥させないように、咬筋表面には適宜流動パラフィン (和光純薬) を滴下させた。実験終了後は、ソムノペンチル (共立製薬) の過量投与 (100 mg/kg以上) によりラットを安楽死させた。

生体は、温度刺激、光、空気の対流による刺激や代謝活動に伴う生体内からの様々な刺激などを常に受容し、それに応じた生体反応を行っている。つまり、厳密には定常状態であるとは言い難いが、本研究では、ウレタン麻酔したラットに上述した通りの処理を行い、人工呼吸下で維持した状態で、特別な薬物刺激や電気刺激を行っていない状態を「定常状態」と表現した。

### 2. 舌神経の電気刺激

咬筋の副交感神経性血管拡張反応は、三叉神経 (舌神経) の電気刺激による反射法 (Izumi & Karita, 1992, 1993; Ishii et al., 2005, 2009b; Niioka et al., 2009a) で誘発させた。舌神経は、末梢側を切断したうえで両極性の電極を用いて中枢性に刺激した。刺激には電気刺激装置 (SEN-7103, 日本光電) を用い、2 ms間隔の矩形波にて、強度20 V、周波数20 Hzで20秒間刺激した。この刺激条件では、最大限の血管拡張反応が誘発されることを過去に報告している (Ishii et al., 2005)。

### 3. 咬筋血流の測定

#### 3-1. 共通操作

ラット左側咬筋の血流は、レーザースペックルイメージング血流計 (OMEGAZONE OZ-01, Omegawave) を用いて観察した。露出させた咬筋筋腹表層をCCDカメラで観察し、8 bitスケールのモノクロ実像とスペックル画像を2秒間隔で、1つの実験当たり4分間記録した。スペックル画像の処理や解析は、Image J (National Institutes of Health) を用いて行い、任意に設定した観察範囲 (それぞれの図を参照) に含まれる個々の画素が示す輝度の値の平均を血流値とした。

### 3-2. 定常状態の咬筋血流に対するspantide Iの効果

麻酔・人工呼吸下で維持したラットの咬筋筋腹中央部に、生理食塩水（大塚製薬）ならびにspantide I（1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ M, ペプチド研究所）を投与（20  $\mu$ L, im）した。我々が行った予備実験において、spantide Iは本研究で用いた濃度を大腿静脈に挿入したカニューレから静脈内に注入しても効果を示さなかった。ラットを用いた他の報告でも、spantide Iを静脈内投与では用いていない（Zochodne & Ho, 1991; Anderson et al., 2006）。本研究では、spantide Iを筋肉内投与した。血流記録は、生理食塩水および各濃度のspantide Iを投与した10分後から行った。Spantide I（100  $\mu$ M）投与後の血流測定を行った後に、生理食塩水でspantide Iを洗浄し、その60分後に改めて血流記録を行った。生理食塩水による洗浄は、27ゲージの注射針を筋腹に対して水平方向に、筋腹を貫通させる様に刺入した後、針の先端が筋腹中に留まる程度まで引き戻し、およそ1 mLの生理食塩水を注入・漏出させることで行った。この操作は、定常状態の基礎血流量ならびに、神経刺激や薬物投与によって誘発される血流増加反応に影響しなかった。Spantide Iの投与ならびに洗浄は、以下に記す実験系でも同様の操作で行った。

### 3-3. サブスタンスPによって誘発される咬筋の血流増加反応とそれに対するspantide Iの抑制作用

麻酔・人工呼吸下で維持したラットに生理食塩水ならびにサブスタンスP（0.1, 0.3, 1, 3  $\mu$ g/kg, ペプチド研究所）を投与した。生理食塩水ならびにサブスタンスPは、血流の記録開始30秒後に大腿静脈に挿入したカニューレから投与した。また、spantide I（100  $\mu$ M）の投与10分後にもサブスタンスP（3  $\mu$ g/kg）を投与し、その時の血流変化を記録した。

### 3-4. 副交感神経性血管拡張反応に対する、spantide Iの影響

麻酔・人工呼吸下で維持したラットの咬筋筋腹中に、生理食塩水ならびにspantide I（1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ M）を投与した後、副交感神経性血管拡張反応を誘発させた。副交感神経血管拡張線維を活性化させるための舌神経刺激は、血流記録開始30秒後に行った。またspantide I洗浄60分後にも副交感神経性血管拡張反応を誘発させ、血流変化を記録した。

### 3-5. アセチルコリンによる血流増加反応とそこに対するspantide Iの影響

生理食塩水ならびにspantide I（100  $\mu$ M）を投与したラット群に対してアセチルコリン（100 ng/kg, Sigma）を大腿静脈に挿入したカニューレから投与し、その時の血流変化を記録した。アセチルコリンは、血流記録開始30秒後に投与した。血流記録は、生理食塩水ならびにspantide Iを投与した10分後から行った。

## 4. 統計解析

全てのデータは、平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。平均値の差の検定は、2群間の比較ではt検定を行い、他群間の比較では、はじめに分散分析を行い、有意差が認められた際には、その後にDunnnett'sテストを行った。危険率が5%未満となる結果が得られた際に有意差があると判断した。統計解析には、SPSS Statics20（日本IBM）を用いた。

## 結 果

### 1. ラット咬筋表面の実像とスペックル画像

ラット左側咬筋表面の観察で得られた実像とスペックル画像を図1に示した。模式図（図1A）で示されるラットの左側咬筋を観察した視野中には咬筋筋腹、咬筋表面を走行する顔面神経束ならびに涙腺が観察された。実像中では、咬筋表層を走行する顔面神経束が高輝度で観察されたのに対して（図1B）、スペックル画像中では顔面神経に沿って走行する神経栄養血管が高輝度で観察された。また咬筋に酸素や栄養素を供給する咬筋動脈や顔面動脈の咬筋枝ならびにそれらの分岐血管が高輝度で鮮明に観察された（図1C）。

### 2. 定常状態の基礎血流に対するspantide Iの抑制効果

Spantide Iの投与（1, 3, 10, 30, 100  $\mu$ M）は、濃度依存的に咬筋における定常状態の基礎血流量を低下させた。定常状態の血流値は、咬筋動脈では30  $\mu$ M以上、筋腹中央部では100  $\mu$ Mの投与時に、Salineのみを投与したControlと比較して有意に低値を示した（図2B）。特に咬筋動脈においては、100  $\mu$ Mのspantide I投与によって、スペックル画像中に認められる血管の像が消失するレベルまで血流の低下が認められた（図2A）。Spantide Iの投与により低下した咬筋血流は、spantide I洗浄後60分にはcontrolレベルまで回復した。

### 3. サブスタンスPの静脈内投与によって誘発される咬筋の血流増加反応とspantide Iによるその抑制

サブスタンスPの静脈内投与によって誘発される血流増加反応の様子を図3に示した。サブスタンスPの静脈内投与（0.1, 0.3, 1, 3  $\mu$ g/kg）は、咬筋表面を走行する血管、ならびに咬筋筋腹の両者に対して濃度依存的

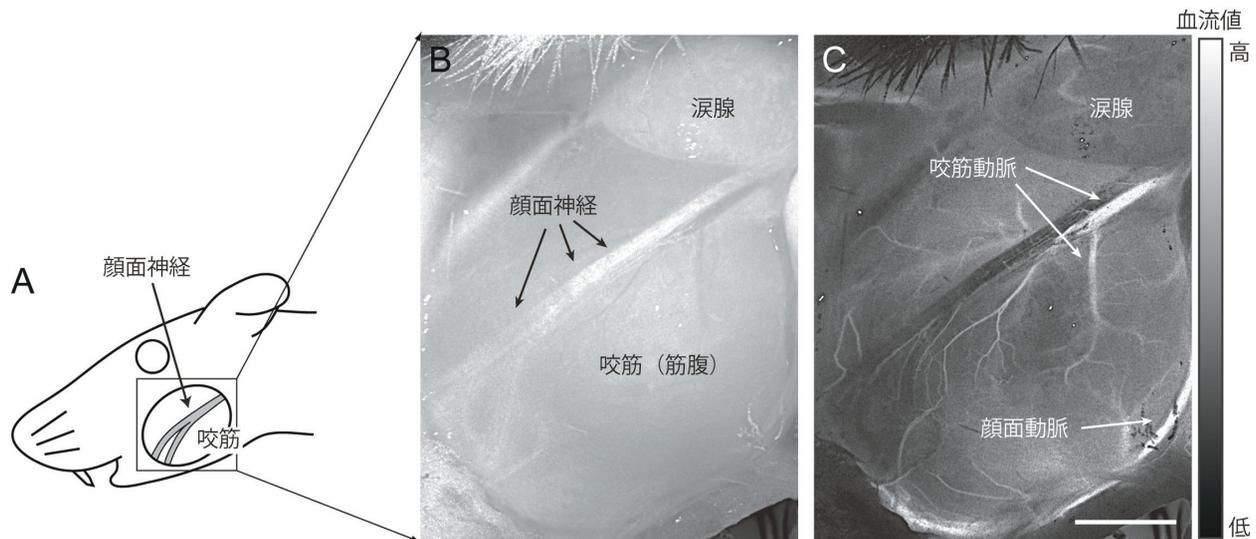


図1 ラット左側咬筋表層の実像とスペックル画像  
A. ラット頭部の模式図 B. ラット咬筋表層の実像. C. ラット咬筋表層のスペックル画像. スケールは1 cm.

な血流増加反応を誘発した. その血流増加反応の血流変化量は,  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 以上のサブスタンスP投与で, Salineのみを投与したControlと比較して有意に大きな値を示した(図3C). ラットの平均血圧は, 定常状態では $148.0 \pm 8.0 \text{ mmHg}$ で維持されていた ( $n = 5$ ). 各濃度のサブスタンスPの静脈内投与は, 投与直後からおよそ20秒間に渡って僅かに血圧を低下させる傾向が見られた(平均血圧の変化量: Saline,  $11.6 \pm 2.62 \text{ mmHg}$ ;  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $20.98 \pm 3.36 \text{ mmHg}$ ;  $0.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $20.63 \pm 3.27 \text{ mmHg}$ ;  $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $21.47 \pm 2.64 \text{ mmHg}$ ;  $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ ,  $23.92 \pm 1.61 \text{ mmHg}$ ). 各濃度のサブスタンスP投与に伴う平均血圧の変化量にサブスタンスPの濃度依存性は認められなかった, また, Salineのみを投与したcontrolと比較して有意な差も認められなかった. Spantide Iの投与 ( $100 \mu\text{M}$ )は, サブスタンスP ( $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ )の投与によって誘発される血流増加反応を有意に抑制した(図3C).

#### 4. 咬筋の血流増加反応に対する基礎血流抑制の影響

三叉神経(舌神経)の電気刺激によって反射的に誘発される咬筋の副交感神経性血管拡張反応は, spantide Iの投与による濃度依存的な基礎血流量の低下に伴って抑制された(図4). 咬筋動脈では $30 \mu\text{M}$ 以上のspantide Iを投与した時に, 筋腹中央部では $10 \mu\text{M}$ のspantide Iを投与して基礎血流を低下させた時に有意な血流増加反応の抑制が認められた(図4B).

またSpantide I ( $100 \mu\text{M}$ )の投与で基礎血流を低下させた状態では, アセチルコリン ( $100 \text{ ng}/\text{kg}$ )の静脈内投与によって誘発される血流増加反応も有意に抑制された(図5).

## 考 察

本研究では, 咬筋血管に対する拡張性トーン調節系の有無とそこに関わるサブスタンスPの役割を明らかにする目的で, サブスタンスP受容体選択的阻害薬であるspantide Iの基礎血流に対する抑制作用を調べ, さらに基礎血流が抑制された状態が, 神経刺激や薬物によって誘発される血管拡張反応に及ぼす影響を検討した.

浅部咬筋表層の血流観察には, レーザースペックルイメージング血流計を用いた. 得られたスペックル画像中では血流が豊富な部位ならびに流速が大きい部位が高輝度で表現されるため, 咬筋動脈や顔面動脈の咬筋枝をこれらの細かな分岐に至るまで鮮明に検出することができた(図1). また筋腹部では, 筋腹の部位毎に血流動態が異なる様子も観察することができた(図2, 3). 単一血管ではなく, 咬筋表層の様に血管の分布や血流動態が多様な部位を観察するのに, レーザースペックルイメージング血流計は, 最も有用なツールの1つであるといえる.

定常状態の基礎血流調節には, 全身の血管に分布する交感神経血管収縮線維が関与することが広く認識されており, 骨格筋の血管においても交感神経血管収縮線維は, 自発的に一定レベルのパルスを発生していて, 終末から遊離されるノルアドレナリンを介して血管壁に対して収縮性にトーン調節を行っていることが確認されている(Barcroft et al., 1943; Laverty, 1962; Hagbarth & Vallbo, 1968). また骨格筋の血管壁には, 交感神経血管拡張線維の支配も確認されているが(Bulbring & Burn, 1935; Joyner & Dietz, 2003), 交感神経系の自発的なパルスは殆どが収縮性トーン調節に関与することが示唆され

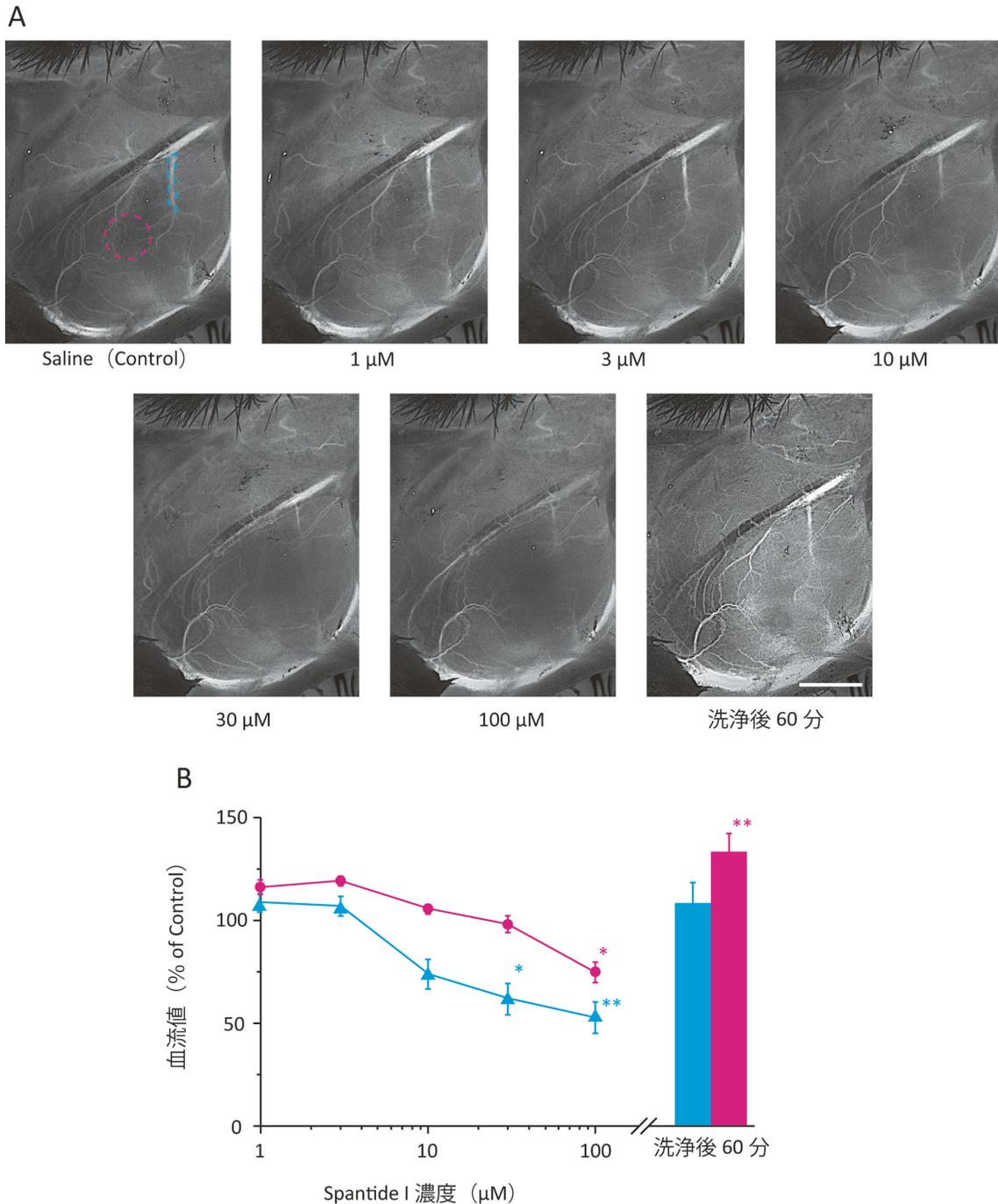


図2 Spantide Iによる基礎血流の抑制

A. 生理食塩水ならびにSpantide I (1, 3, 10, 30, 100 μM) を咬筋に投与した10分後のスペックル画像, ならびにspantide I 洗淨60分後のスペックル画像. ピンクならびに水色の点線は, 筋腹および咬筋動脈の分岐における血流値の測定範囲を示す. スケールは1 cm. B. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐 (水色), ならびに筋腹中央部 (ピンク色) の血流値をまとめたグラフ. グラフの縦軸 (血流値) は, control実験の基礎血流値の平均値に対する百分率で示した. 例数は4. \*および\*\*は, それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrolの血流値に対して有意差が有ることを示す.

ている (Hagbarth & Vallbo, 1968; Delius et al., 1972). 本研究では, サブスタンスP受容体の選択的阻害薬であるspantide Iを咬筋に投与すると, 投与部位周辺の血流がspantide Iの濃度に依存して有意に抑制されることを示した (図2). またサブスタンスPによって誘発される咬筋血流の増加反応もspantide Iにより有意に抑制された (図3). これらの結果から, 咬筋の血管壁にはサブスタ

ンスP受容体が存在し, この受容体を介して血管が拡張性の調節を受けること, 特に定常状態でも血管壁に対するサブスタンスPを介した拡張性調節系が存在する事が示唆された. サブスタンスPの選択的阻害薬による基礎血流の抑制は, ラットの坐骨神経栄養血管 (Zochodne & Ho, 1991, 1993) やフェレットの歯肉血管 (Berggreen & Heyeraas, 1999, 2000) でも報告されているため, これ

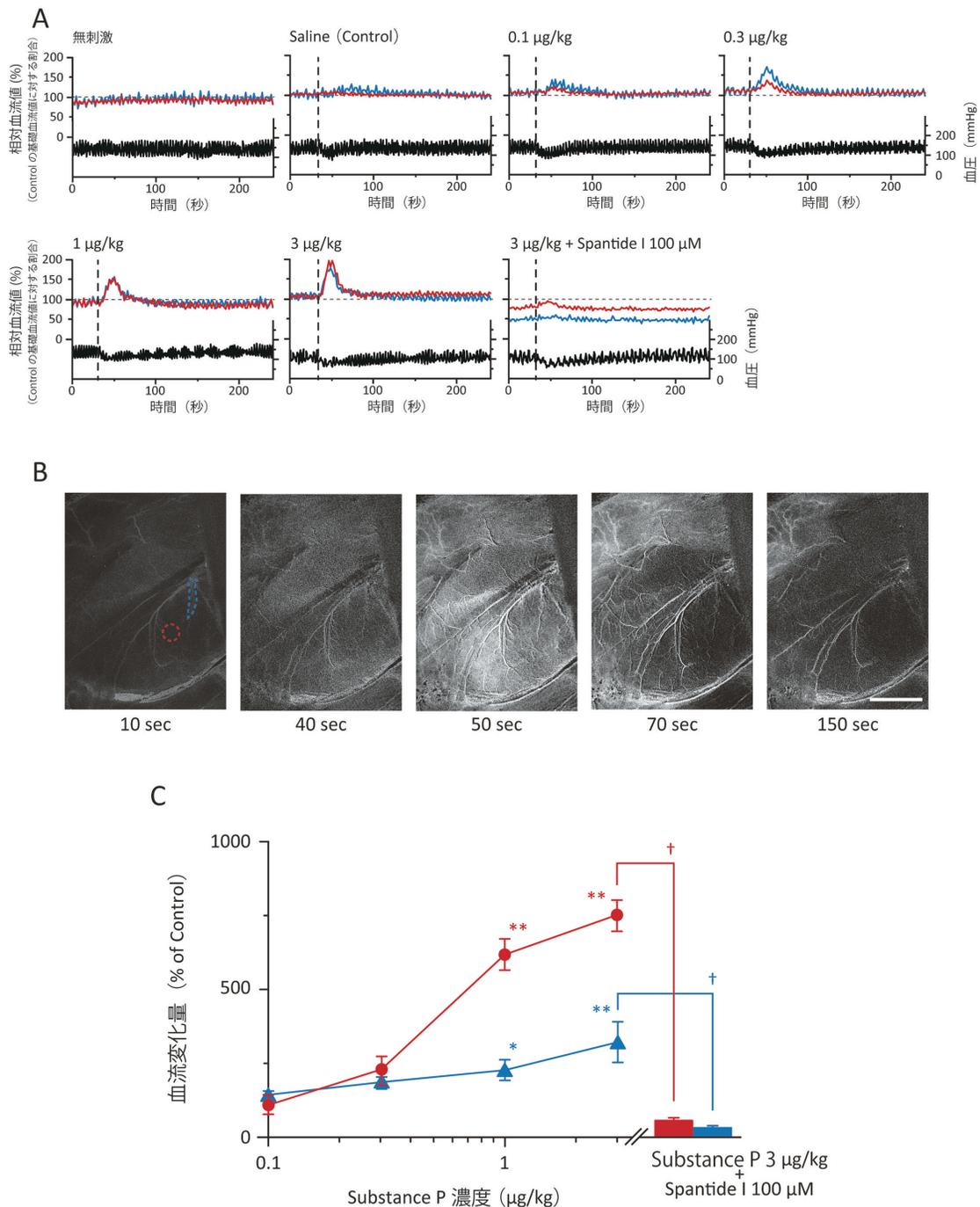


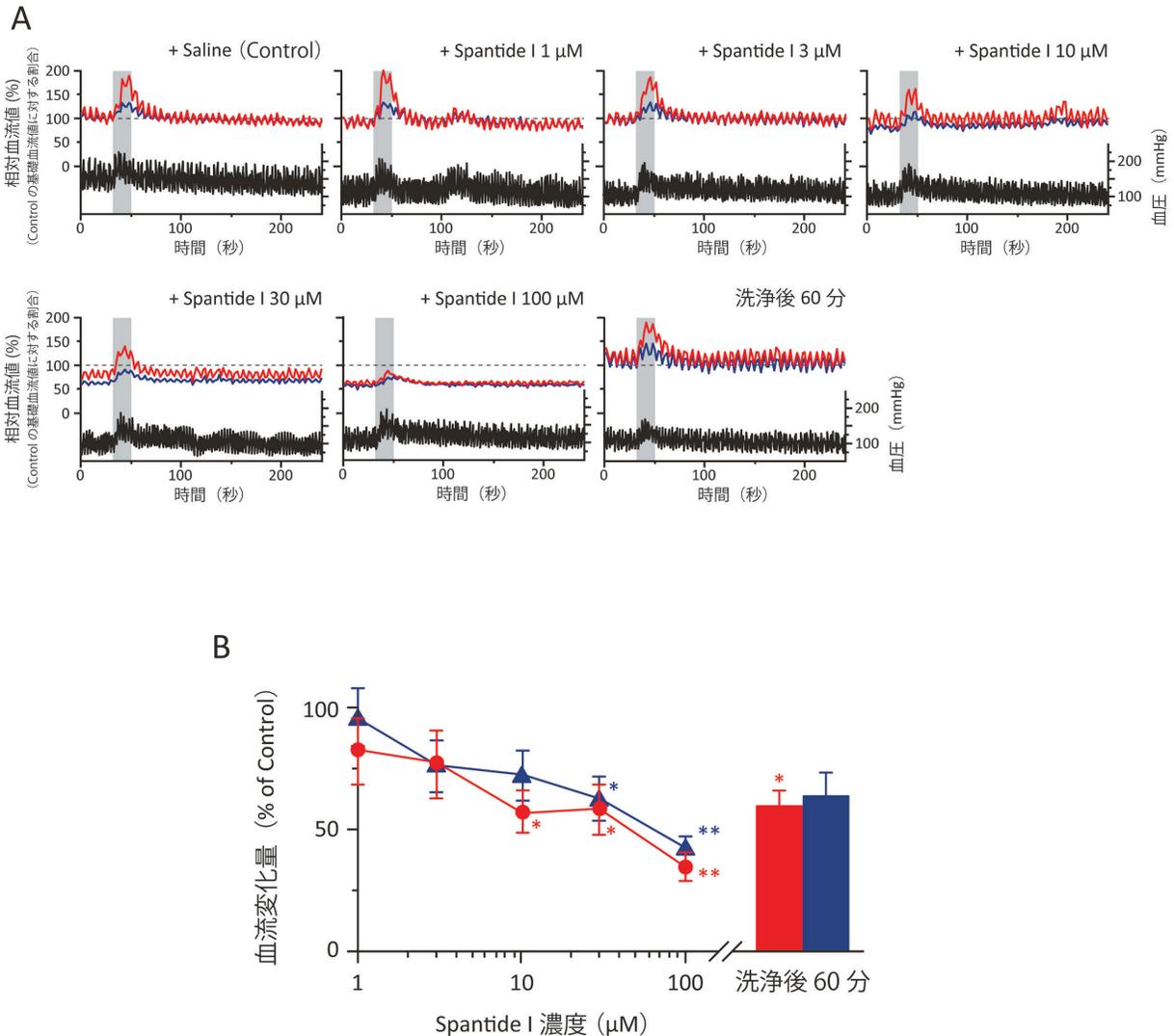
図3 サブスタンスPによる血流増加反応

A. 生理食塩水ならびにサブスタンスP (0.1, 0.3, 1, 3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を静脈内投与したとき、ならびにspantide I (100  $\mu\text{M}$ ) 投与後にサブスタンスP (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を投与したときの咬筋の血流変化 (咬筋動脈の分岐: 青色と筋腹中央部: 赤色) と血圧変化の典型例。サブスタンスPを投与した時点を点線で示した。血流変化の縦軸 (相対血流値) は、control実験の開始から10秒間における基礎血流値の平均値に対する百分率で示した。B. サブスタンスP (3  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) を投与した際に認められる血流変化の経時変化画像 (スペックル画像)。赤ならびに青色の点線は、筋腹および咬筋動脈の分岐における血流値の測定範囲を示す。スケールは1 cm。C. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐 (青色)、ならびに筋腹中央部 (赤色) の血流変化量をまとめたグラフ。縦軸 (血流変化量) は、control実験の30~50秒間における血流変化量に対する百分率で示した。例数は6。\*および\*\*は、それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrol実験の血流変化量に対して有意差が有ることを示す。†は危険率 $P < 0.001$ で有意差が有ることを示す。

らの報告も我々の仮説を支持する。

サブスタンスPは、全身に広く存在する求心性一次ニューロン (A $\delta$ 線維ならびにC線維) に多く分布することが報告されている (Bevan & Brayden, 1987)。同様に咬

筋由来の求心性一次ニューロンの細胞体が存在する三叉神経節でも豊富なサブスタンスP免疫陽性反応が確認されている (Champlin et al., 1991)。すなわち、咬筋の定常状態における拡張性血管トーン調節に関するサブス



**図4** Spantide Iの前処理が、咬筋の副交感神経性血管拡張反応に及ぼす影響  
 A. 生理食塩水ならびにSpantide I (1, 3, 10, 30, 100 μM) を投与した10分後、ならびにspantide Iを洗浄した60分後に副交感神経血管拡張線維を活性化させたときの咬筋の血流変化（咬筋動脈の分岐；青色と筋腹中央部；赤色）と血圧変化の典型例。血流変化の縦軸（相対血流値）は、control実験の開始から10秒間における基礎血流値の平均値に対する百分率で示した。副交感神経血管拡張線維は、三叉神経（舌神経）を求心性に電気刺激（2 msの矩形波、20 V, 20 Hz, 20秒間）することで反射的に活性化させた。電気刺激中をグレーの領域で示した。B. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐（青色）、ならびに筋腹中央部（赤色）の血流変化量をまとめたグラフ。縦軸（血流変化量）は、control実験の30～50秒間における血流変化量に対する百分率で示した。例数は6。\*および\*\*は、それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrol実験の血流変化量に対して有意差が有ることを示す。

タンスPは求心性一次ニューロンに由来することが第一に考えられる。生体は体外・体内からの様々な刺激に常時さらされているため、求心性一次ニューロンは常になんらかの情報を伝達していると考えられる。したがって、我々が意識しない感覚も含めて、様々な情報が中枢に伝えられる際のインパルスが軸索反射 (Loaiza et al., 2002) に伴って周囲の神経終末に伝導され、終末から遊離されたサブスタンスPが拡張性血管トーン調節に関わっていることが示唆される。また培養細胞を用いた検討では、動脈の血管内皮細胞にもサブスタンスPが存在し、培養液の灌流による物理的な流れ刺激によってその遊離が亢進されることが報告されている (Milner et al.,

1990, 2004; Ralevic et al., 1990)。生体では血管内を常に血液が流れているため、血流に起因する流れ刺激によって内皮細胞からサブスタンスPが一定レベルで遊離され、拡張性トーン調節に関与することも示唆される。咬筋血管の拡張性トーン調節に関与するサブスタンスPの由来を明らかにするには、今後の更なる検討が必要とされる。

高濃度のspantide Iは、咬筋血管の基礎血流を、レーザースペckルイメージング血流計で検出することができないレベルまで大幅に抑制した (図2)。この結果は、spantide IによってサブスタンスPを介した拡張性血管トーン調節が消失したために、血管壁が自らの弾性や

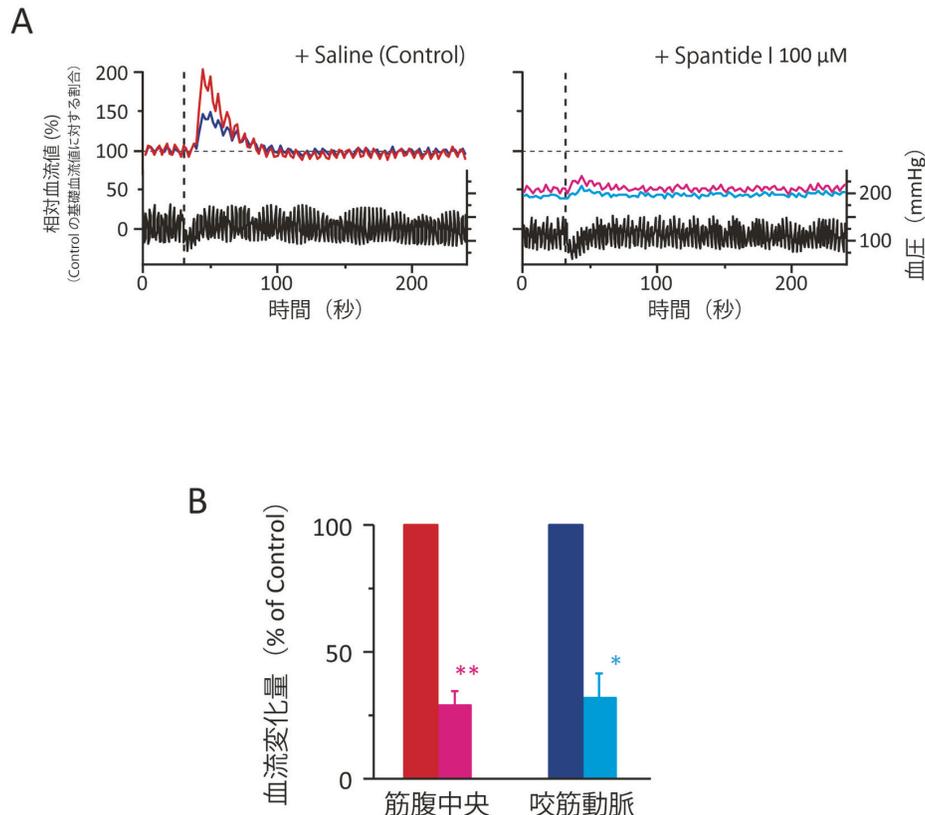


図5 Spantide Iの前処理が、咬筋のアセチルコリン誘発性血管拡張反応に及ぼす影響

A. 生理食塩水ならびにspantide I (100 μM)を投与した10分後にアセチルコリン (100 ng/kg)を静脈内投与したときの咬筋の血流変化 (咬筋動脈の分岐; 青色および水色と筋腹中央部; 赤色およびピンク色)と血圧変化の典型例. 血流変化の縦軸 (相対血流値)は, control実験の開始から10秒間における基礎血流値の平均値に対する百分率で示した. アセチルコリンを投与した時点を点線で示した. B. 画像解析によって得られた咬筋動脈の分岐 (生理食塩水投与後; 青色, spantide I投与後; 水色), ならびに筋腹中央部 (生理食塩水投与後; 赤色, spantide I投与後; ピンク色)の血流変化量をまとめたグラフ. 縦軸 (血流変化量)は, control実験の30~50秒間における血流変化量に対する百分率で示した. 例数は5. \*および\*\*は, それぞれ危険率 $P < 0.05$ ならびに $P < 0.001$ でcontrol実験の血流変化量に対して有意差が有ることを示す.

収縮性トーン調節によって非生理的なレベルまで過度に収縮した結果, 血流シグナルが検出できなくなったことを示唆する. 生理的な条件下では, 定常状態の基礎血流は, 交感神経血管収縮線維による収縮性トーン調節と, サブスタンスPを介した拡張性トーン調節のバランスの下で維持され, もし拡張性トーン調節系が大幅に抑制されると血管壁が過度に収縮し, 虚血に伴う組織病変を引き起こすことが示唆される.

我々は以前, 浅部咬筋表層の血流動態をレーザースペックルイメージング血流計を用いて調査したなかで, 定常状態の基礎血流量が少ない部位では基礎血流量が多い部位と比較して, 副交感神経性血管拡張の際により大きな血流増加反応が認められることを報告した (Niioka et al., 2009b). 本研究においてサブスタンスP (図3)やアセチルコリン (図5)を投与した時にも, 定常状態の基礎血流量が多い部位 (咬筋動脈の分岐部)に比較して基礎血流量が少ない部位 (筋腹中央部)で大きな血流増加反応が認められている. つまり基礎血流量の調節状態が, 血管拡張反応に影響を与える事が示唆される. 我々

は, 基礎血流量は交感神経血管収縮線維による収縮性トーンとサブスタンスPを介した拡張性トーンとのバランスによって調節されていると仮定した. つまり基礎血流量が少ない部位は収縮性トーンの影響が大きく血管壁がより収縮した状態にあり, その血管が弛緩反応に応じる時には, 強く収縮していた分に対応した拡張反応が起こると考えた. そこでspantide IでサブスタンスPを介した拡張性トーン調節を抑制し, 血管壁を収縮させたときに, 舌神経の電気刺激によって反射的に生じる副交感神経性血管拡張反応 (図4)ならびにアセチルコリンの静脈内投与によって生じる血管拡張反応 (図5)が増強されるのかを調べた. その結果spantide Iによって基礎血流を抑制させた状態では, 副交感神経性血管拡張反応およびアセチルコリン誘発性血管拡張反応のいずれも有意な抑制を受けた (図4, 5). 特に基礎血流値が大きな部位 (咬筋動脈の分岐部)の血流を抑制した時には, 抑制させた分に対応した, より大きな血流増加反応が認められることを期待したが, 血流増加反応は基礎血流量が多い部位も少ない部位も同様に抑制された.

サブスタンスPによる血管拡張反応には、内皮細胞から産生・遊離されるNOが関与することが報告されている (Wallace, 1997; Hsu et al., 2003). またアセチルコリン誘発性の血管拡張反応もNO依存性である (Loke et al., 1994a, b). 加えて、咬筋における副交感神経性血管拡張反応は我々が明らかにした調節系であり (Ishii et al., 2005, 2009a, b; 石井, 和泉, 2010a, b), そこに関与する神経伝達物質の全容は未だ明らかになっていないが、そこにコリナージックなメカニズムが関与することを報告している (Ishii et al., 2005; Niioka et al., 2009a). NOは、平滑筋細胞のグアニルシクラーゼに直接作用し、cGMPの産生を促すことで血管拡張に重要な役割を演じており (Moncada et al., 1991; Sausbier et al., 2000), 近年の報告でも、平滑筋細胞のグアニル酸シクラーゼがNOに対して高い感受性を示すことや、NOの量に依存して血管径の増大が認められることから、血管トーン調節に対するNOの重要性が示されている (Held & Dostmann, 2012). Spantide Iは、サブスタンスP受容体を阻害し、内皮細胞からのNO産生・遊離を抑制したため血管が収縮し、定常状態の基礎血流量が減少したことが考えられる。またspantide I存在下では、副交感神経血管拡張線維を興奮させたりアセチルコリンを投与して内皮細胞のNO産生系が亢進されても、定常状態のNO量がspantide Iの作用によって減少しているため、平滑筋細胞に作用するNOが十分な量に至らず、血管拡張反応が抑制されたことが考えられる。咬筋における血管拡張反応とNOとの関連については、今後の検討でNOの定量的な解析などを行い明らかにしていく予定である。

## 結 論

咬筋における定常状態の基礎血流は、サブスタンスP受容体の選択的阻害薬によって有意に抑制された。また基礎血流が低下した状態では、副交感神経性血管拡張反応ならびにアセチルコリンの投与によって誘発される血管拡張反応が抑制された。これらの結果から、咬筋血管では、サブスタンスPがその受容体を介して拡張性トーン調節に関与していることが示唆された。またサブスタンスPによる拡張性トーンの維持が抑制されると血管が過度に収縮し、その後の血管拡張反応に対して抑制的に影響することが示唆された。

## 謝 辞

本研究は、平成22年度北海道医療大学歯学会奨励研究金(研究テーマ名;ラット咬筋の拡張性基礎血流調節に関わるサブスタンスPの役割の解明)の助成を受けて実

施した。

## 論 文

- Anderson LC, Martin DJ, Phillips DL, Killpack KJ, Bone SE & Rahimian R. The influence of gender on parasympathetic vasodilatation in the submandibular gland of the rat. *Exp Physiol* 91: 435-444, 2006.
- Barcroft H, Bonnar WM, Edholm OG & Effron AS. On sympathetic vasoconstrictor tone in human skeletal muscle. *J Physiol* 102: 21-31, 1943.
- Berggreen E & Heyeraas KJ. The role of sensory neuropeptides and nitric oxide on pulpal blood flow and tissue pressure in the ferret. *J Dent Res* 78: 1535-1543, 1999.
- Berggreen E & Heyeraas KJ. Effect of the sensory neuropeptide antagonists h-CGRP (8-37) and SR 140.33 on pulpal and gingival blood flow in ferrets. *Arch Oral Biol* 45: 537-542, 2000.
- Bevan JA & Brayden JE. Nonadrenergic neural vasodilator mechanisms. *Circ Res* 60: 309-326, 1987.
- Bulbring E & Burn JH. The sympathetic dilator fibres in the muscles of the cat and dog. *J Physiol* 83: 483-501, 1935.
- Champlin R, Jansen J, Ho W, Gajewski J, Nimer S, Lee K, et al. Retention of graft-versus-leukemia using selective depletion of CD8-positive T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease following bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Transplant Proc* 23: 1695-1696, 1991.
- Delius W, Hagbarth KE, Hongell A & Wallin BG. General characteristics of sympathetic activity in human muscle nerves. *Acta Physiol Scand* 84: 65-81, 1972.
- Guyton AC & Hall JE. *Textbook of Medical Physiology*, Hall JE, editors. *Muscle Blood Flow and Cardiac Output During Exercise; the Coronary Circulation and Ischemic Heart Disease*: Elsevier Saunders, 2006, p246-257.
- Hagbarth KE & Vallbo AB. Pulse and respiratory grouping of sympathetic impulses in human muscle-nerves. *Acta Physiol Scand* 74: 96-108, 1968.
- Held KF & Dostmann WR. Sub-Nanomolar Sensitivity of Nitric Oxide Mediated Regulation of cGMP and Vasomotor Reactivity in Vascular Smooth Muscle. *Front Pharmacol* 3: 130, 2012.
- Hsu YY, Jou YT, Wong R, Karabucak B, Simchon S & Kim S. Effect of nitric oxide synthase inhibitor (L-

- NAME) on substance P-induced vasodilatation in the dental pulp. *Int Endod J* 36: 840-847, 2003.
- Ishii H & Izumi H. GABA<sub>B</sub> receptors in the NTS mediate the inhibitory effect of trigeminal nociceptive inputs on parasympathetic reflex vasodilation in the rat masseter muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 302: R776-R784, 2012.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Circulating adrenaline released by sympathoadrenal activation elicits acute vasodilatation in the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 486-494, 2009a.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Difference between male and female rats in cholinergic activity of parasympathetic vasodilatation in the masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 533-542, 2009b.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Vagal visceral inputs to the nucleus of the solitary tract: involvement in a parasympathetic reflex vasodilator pathway in the rat masseter muscle. *Brain Res* 1312: 41-53, 2010.
- Ishii H, Niioka T & Izumi H. Parasympathetic reflex vasodilatation in the masseter muscle compensates for carotid hypoperfusion during the vagus-mediated depressor response. *Brain Res* 1370: 145-153, 2011.
- Ishii H, Niioka T, Sudo E & Izumi H. Evidence for parasympathetic vasodilator fibres in the rat masseter muscle. *J Physiol* 569: 617-629, 2005.
- Ishii H, Niioka T, Watanabe H & Izumi H. Inhibitory effects of excess sympathetic activity on parasympathetic vasodilation in the rat masseter muscle. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R729-R736, 2007.
- Izumi H & Karita K. Selective excitation of parasympathetic nerve fibers to elicit the vasodilatation in cat lip. *J Auton Nerv Syst* 37: 99-107, 1992.
- Izumi H & Karita K. Innervation of the cat lip by two groups of parasympathetic vasodilator fibres. *J Physiol* 465: 501-512, 1993.
- Jow RW & Clark GT. Endurance and recovery from a sustained isometric contraction in human jaw-elevating muscles. *Arch Oral Biol* 34: 857-862, 1989.
- Joyner MJ & Dietz NM. Sympathetic vasodilation in human muscle. *Acta Physiol Scand* 177: 329-336, 2003.
- Karita K & Izumi H. Effect of baseline vascular tone on vasomotor responses in cat lip. *J Physiol* 482: 679-685, 1995.
- Laverty R. Relation in rat hind-limb blood vessels between nervous vasomotor tone and the response to vasoconstrictor drugs. *Br J Pharmacol Chemother* 18: 451-464, 1962.
- Loaiza LA, Yamaguchi S, Ito M & Ohshima N. Vasodilatation of muscle microvessels induced by somatic afferent stimulation is mediated by calcitonin gene-related peptide release in the rat. *Neurosci Lett* 333: 136-140, 2002.
- Loke KE, Sobey CG, Dusting GJ & Woodman OL. Cholinergic neurogenic vasodilatation is mediated by nitric oxide in the dog hindlimb. *Cardiovasc Res* 28: 542-547, 1994a.
- Loke KE, Sobey CG, Dusting GJ & Woodman OL. Requirement for endothelium-derived nitric oxide in vasodilation produced by stimulation of cholinergic nerves in rat hindquarters. *Br J Pharmacol* 112: 630-634, 1994b.
- Milner P, Bodin P, Guiducci S, Del Rosso A, Kahaleh MB, Matucci-Cerinic M, et al. Regulation of substance P mRNA expression in human dermal microvascular endothelial cells. *Clin Exp Rheumatol* 22: S24-27, 2004.
- Milner P, Kirkpatrick KA, Ralevic V, Toothill V, Pearson J & Burnstock G. Endothelial cells cultured from human umbilical vein release ATP, substance P and acetylcholine in response to increased flow. *Proc Biol Sci* 241: 245-248, 1990.
- Moncada S, Palmer RM & Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142, 1991.
- Niioka T, Ishii H & Izumi H. Involvement of vasoactive intestinal polypeptide in the parasympathetic vasodilatation of the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 909-916, 2009a.
- Niioka T, Ishii H & Izumi H. Regional differences in blood flow variation in rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 54: 1022-1028, 2009b.
- Ralevic V, Milner P, Hudlicka O, Kristek F & Burnstock G. Substance P is released from the endothelium of normal and capsaicin-treated rat hind-limb vasculature, in vivo, by increased flow. *Circ Res* 66: 1178-1183, 1990.
- Sausbier M, Schubert R, Voigt V, Hirneiss C, Pfeifer A, Korth M, et al. Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation. *Circ Res* 87: 825-830, 2000.
- van Steenberghe D, De Vries JH & Hollander AP. Resistance of jaw-closing muscles to fatigue during repetitive maximal voluntary clenching efforts in man. *Arch Oral Biol* 23: 697-701, 1978.
- Wallace WF. Contribution of nitric oxide to vasodilatation

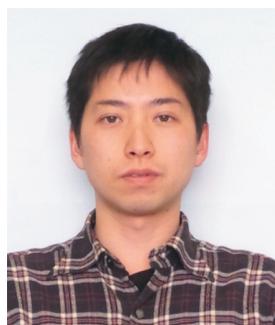
by substance P in human forearm vessels. Clin Sci (Lond) 93: 607-609, 1997.

Zochodne DW & Ho LT. Influence of perivascular peptides on endoneurial blood flow and microvascular resistance in the sciatic nerve of the rat. J Physiol 444: 615-630, 1991.

Zochodne DW & Ho LT. Vasa nervorum constriction from substance P and calcitonin gene-related peptide antagonists: sensitivity to phentolamine and nimodipine. Regul Pept 47: 285-290, 1993.

石井久淑, 和泉博之. 咀嚼筋の自律神経系を介する血管拡張反応 - 骨格筋における新たな血流増加機構 -. 北海道医療大学歯学雑誌 29: 1-23, 2010a.

石井久淑, 和泉博之. 咀嚼筋の自律神経性血流調節に関する末梢性及び中枢性神経機構. 自律神経 47: 340-349, 2010b.



新岡 丈治

北海道医療大学 薬学部/大学教育開発センター (生物・運動科学分野)

略歴

平成12年3月 昭和大学 薬学部 卒業  
 平成12年4月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士前期課程入学  
 平成14年3月 同 修了  
 平成14年3月 学位取得 (薬学修士 昭和大学第566号)  
 平成14年4月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士後期課程入学  
 平成16年4月 北海道医療大学 歯学部 口腔生理学講座 助手  
 平成17年3月 昭和大学大学院 薬学研究科 薬理学専攻 博士後期課程修了  
 平成17年3月 学位取得 (薬学博士 昭和大学第1898号)  
 平成19年4月 北海道医療大学 歯学部 口腔生物学系 生理学分野 助教 (名称変更)  
 平成23年4月 北海道医療大学 薬学部 人間基礎科学講座 (生物学) 講師  
 平成24年4月 北海道医療大学 薬学部/大学教育開発センター (生物・運動科学分野) 講師 (名称変更)

現在に至る



〔原著〕

## ヒト歯根膜由来線維芽細胞のメカニカルストレスによる fibrillin-1およびversicanの発現と局在の変化

鳥谷奈保子<sup>1)</sup>, 永坂 萌<sup>1)</sup>, 敦賀 英知<sup>3)</sup>, 坂倉 康則<sup>2)</sup>, 溝口 到<sup>1)</sup>

- 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構造・機能発育学系解剖学分野  
3) 福岡歯科大学生体構造学講座機能構造学分野

### Changes in expression and localization of fibrillin-1 and versican in human periodontal ligament fibroblast (HPLF) s induced by mechanical stimulation

Naoko TORIYA<sup>1)</sup>, Moe NAGASAKA<sup>1)</sup>, Eichi TSURUGA<sup>3)</sup>,  
Yasunori SAKAKURA<sup>2)</sup>, Itaru MIZOGUCHI<sup>1)</sup>

- 1) Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido  
2) Division of Anatomy, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido  
3) Section of Functional Structure, Department of Morphological Biology, Division of Biomedical Sciences, Fukuoka Dental College

#### Abstract

The periodontal ligament (PDL) is a specialized fibrous connective tissue that functions as a splinting and supporting tissue for teeth and as a shock-absorber for forces exerting strain on the teeth. The purpose of the present study is to clarify the response of extracellular matrix molecules of the PDL to mechanical stress exerted by occlusal forces. Human periodontal ligament fibroblasts (HPLF) were used and mechanical stress (monoaxial stretching) was applied for 7 days, and HPLF cultured without stretching were used for controls. The mRNA expression and localization of fibrillin-1 and versican in the HPLF were examined by quantitative RT-PCR and immunohistochemically, respectively. The expression of fibrillin-1 and versican mRNA

increased 3.6 and 6.8 times, respectively in the stretch group over those of the control group. Especially, the mRNA expression of the V1 isoform, lacking the GAG- $\alpha$  domain, was considerably increased in the stretch group. Immunohistochemical staining for fibrillin-1 indicated that HPLF under stretching showed a mesh-like staining, which increased the stained area and intensity and converged perpendicular to the stretching direction. Staining of versican was observed to be very similar to fibrillin-1, and the staining was more intense than that of the control group. These results indicate that mechanical stress may be involved in remodeling and maintaining PDL via regulation of the expression and assembly of fibrillin-1 and versican.

**Key words** : 歯根膜, 線維芽細胞, fibrillin-1, versican, メカニカルストレス

#### 緒 言

歯根膜は、咀嚼筋、舌筋、口腔周囲筋などが惹起する機能に絶えず曝されており、機能力の緩衝、歯の固定・支持構造として機能している (Edwards, 1968 ; Full-

mer et al., 1974)。歯根膜は線維芽細胞、骨芽細胞や破骨細胞などの細胞成分とコラーゲン線維、弾性系線維やプロテオグリカンなどの細胞外基質成分から構成されている。歯根膜にみられる主要な線維性基質はコラーゲン線維と弾性系線維であり、弾性系線維は歯周組織、大動

受付：平成25年3月28日 受理：平成25年4月24日

脈, 肺, 皮膚などの様々な組織に広く分布し (Rosenbloom et al., 1993), それぞれの組織に弾性と柔軟性を与えている (Isogai et al., 2002). 弾性系線維はエラスチンとマイクロフィブリルの相対的含有比率により, オキシタラン線維, エラウニン線維と弾性線維に分類され (Böck & Stockinger, 1984; Mecham & Davis, 1994), 歯根膜にはマイクロフィブリルのみからなるオキシタラン線維が存在する (Böck & Stockinger, 1984). マイクロフィブリルにはMAGP (microfibril-associated glycoprotein) とfibrillin-1が含まれ (Sakai et al., 1986; Kumaratilake et al., 1989), fibrillin-1を主要な構成成分としている (Tsuruga et al., 2002). Fibrillin-1は弾性系線維におけるversicanのリガンド候補としても考えられている (Zimmermann et al., 1994).

一方, 細胞外基質であるプロテオグリカンはコアタンパク質とそれに付着する糖鎖 (glycosaminoglycan: GAG) からなり, コアタンパク質のアミノ酸配列の構造的特徴から modular proteoglycan と small leucine rich proteoglycan に分類される (Iozzo and Murdoch, 1996). Modular proteoglycan の1つにversicanが知られており, 主に線維芽細胞によって産生される (Zimmermann and Ruoslahti, 1989). Versicanは, 脳, 軟骨, 大動脈, 皮膚, 腱などの様々な組織に広く分布し (Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994), 組織の形態維持, 細胞増殖, 細胞接着, 細胞遊走などの機能に深く関与する (Wight, 2002). また, versicanにはalternative RNA splicingにより, GAG- $\alpha$  domainおよびGAG- $\beta$  domainを含むV0, GAG- $\alpha$  domainの欠如したV1, GAG- $\beta$  domainが欠如したV2, および両domainが欠如したV3の4つのisoformが存在する (Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995; Zako et al., 1995).

近年, versican結合領域に関連する*FBN1* (fibrillin-1の遺伝子) の変異がMarfan症候群の重症型をもたらすことも報告されており (Putnam et al., 1996), 弾性系線維とversicanの密接な関係が注目されている. しかしながら, 矯正歯科治療や咀嚼などの機能力によって歯根膜に負荷されるメカニカルストレス (伸展刺激) に対するfibrillin-1とversicanの動態変化については不明である.

本研究では, ヒト歯根膜由来線維芽細胞に周期的伸展刺激を負荷し, マイクロフィブリルの主成分であるfibrillin-1とversicanについて免疫組織化学的手法によりタンパク質の局在を, Real-Time quantitative PCR法によるmRNA発現の変化を検討した.

## 材料と方法

### 1. ヒト歯根膜由来線維芽細胞の単離と特異的形質の同定

歯根膜組織は本学歯科・内科クリニック矯正歯科で抜歯治療が必要とされ, 実験内容に同意を得た患者より除去した小白歯から得られた. 歯根膜組織の小片をプラスチックシャーレ上に静置し, 10%新生仔牛血清を添加したminimum essential medium培養液 (MEM, Invitrogen: ペニシリン100units/ml, ストレプトマイシン100 $\mu$ g/ml, L-グルタミン含有) 中で37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>環境下にて培養し, ヒト歯根膜由来線維芽細胞 (HPLF) を単離した. 単離したHPLFを継代培養後, 実験に用いた. なお, 本研究は北海道医療大学歯学部・歯学研究科倫理委員会の承認 (承認番号31号) を得て行った.

さらに, 歯根膜ではPLAP-1とperiostinが特異的に発現することが知られていることから (Yamada et al., 2001, 2006, 2007; Horiuchi et al., 1999), 以前の報告 (永坂ら, 2012) と同様に, 今回用いた細胞 (HPLF) がヒト歯根膜由来の線維芽細胞としての性質を保持していることをRT-PCR法により確認し使用した.

### 2. 周期的伸展培養

STB-140 STREXcell stretch system (Strex Co.) を用いてHPLFに伸展刺激を負荷した. I型コラーゲンをコーティングしたエラスティック・シリコン・チャンバー上に1  $\times$  10<sup>5</sup> cells/mlの細胞密度で播種した. 7日間培養後, 80%サブコンフルエント状態を確認し, 伸展率4%, 頻度は1分間に1往復のプログラム設定で伸展刺激を負荷し, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub>の培養環境下にて7日間伸展刺激を与えた.

### 3. Real-Time quantitative PCR法によるfibrillin-1, versicanおよびversican isoformのmRNA発現

培養7日後, 対照群と伸展刺激群のHPLFからRNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてtotal RNAを抽出した. 抽出したtotal RNAに対しOmniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行った. Fibrillin-1, versicanおよびversican isoformおよびinternal standardとしてのGAPDHに対するprimerとTaqMan probeを設計した (表1, 表2).

HPLFのcDNAサンプルについてGeenAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) を用いて, TaqMan probeによるReal-Time quantitative PCR法によってfibrillin-1, versican, およびversican isoformの

mRNA発現の変化について検討した。得られた結果は、比較Ct (threshold cycle) 法により相対的に定量し検討した。Ct値は、それぞれ蛍光強度が0.1の時のサイクル数として算出した。① $\Delta Ct$ =ターゲット遺伝子Ct-内部標準遺伝子Ct, ② $\Delta\Delta Ct$ =各サンプル $\Delta Ct$ -キャリブレーションサンプル $\Delta Ct$ , ③未知サンプルはキャリブレーションサンプルの $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 倍により、算出定量した。統計分析には、Student's t-testを用いた。

なお、primerおよびTaqMan probeは、Primer Express software (version 2.0, Applied Biosystems) を用いて設計した。

#### 4. 免疫蛍光染色による形態学的観察

培養7日後、HPLFを2%パラホルムアルデヒドで5~10分間固定した。PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7.4) で洗浄し、一次抗体 [goat anti-human fibrillin-1 polyclonal antibody (1:100, Santa Cruz), rabbit anti-mouse versican (GAG- $\alpha$  domain) polyclonal antibody (1:100, Millipore), rabbit anti-mouse versican (GAG- $\beta$  domain) polyclonal antibody (1:100, Millipore)] でそれぞれ室温にて60分間反応させた。PBSで洗浄した後、二次抗体としてAlexa Fluor<sup>®</sup> 488 donkey anti-goat IgG (H+L), Alexa Fluor<sup>®</sup> 568 goat anti-rabbit IgG (H+L) (Invitrogen) をそれぞれ室温にて40分間反応させた。PBS洗浄後、HPLFを共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

表1. Fibrillin-1およびversicanのprimerおよびTaqMan probeの配列

human-fibrillin-1	forward : 5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' reverse : 5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3' TaqMan : 5'-CGTCTGCTGGAGATCGCCCT-3'
human-versican	forward : 5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' reverse : 5'-TCCAAAGGTCTTTGGCATTCTTA-3' TaqMan : 5'-TTGCGGCCAGCCCCCTGTT-3'
human-GAPDH	forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCTGTTTCGAC-3' reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3' TaqMan : 5'-CTCCTCTGTTTCGACAGTCAGCCGC-3'

表2. Versican isoformのprimerおよびTaqMan probeの配列

h-V0	forward : 5'-GCACAAAATTCACCCTGACATT-3' reverse : 5'-GATGACCAATTACACTCAAATCACTCA-3' TaqMan : 5'-ATTGAGGTCAGAGAAAATAAGACAGGTCGA-3'
h-V1	forward : 5'-GGCTTCCCTCCCCCTGATA-3' reverse : 5'-GATGACCAATTACACTCAAATCACTCA-3' TaqMan : 5'-CAGATTTGATGCTACTGCTTTAAACGTCGA-3'
h-V2	forward : 5'-GCACAAAATTCACCCTGACATT-3' reverse : 5'-GGCACGGGTTTCATTTTGC-3' TaqMan : 5'-TCAGAGAAAATAAGACAGGACCTGATCGC-3'
h-V3	forward : 5'-CCTCCCCCTGATAGCAGATTT-3' reverse : 5'-GGCACGGGTTTCATTTTGC-3'

## 結 果

### 1. Real-Time quantitative PCR法によるfibrillin-1, versicanおよびversican isoformのmRNA発現

HPLFに周期的伸展刺激を負荷した時のfibrillin-1とversicanのmRNA発現は、fibrillin-1mRNAは対照群と比較して3.6倍 (n=8, p<0.005) に増加した (図1a)。一方、versican mRNAは伸展刺激により対照群に対して6.8倍 (n=8, p<0.005) に増加した (図1b)。

周期的伸展刺激によりversicanのmRNA発現量が増加することが明らかになったため、そのisoformであるV0, V1, V2, V3のmRNA発現についても検討した (図2)。周期的伸展刺激により、V0では対照群に対して17.8倍 (図2a, n=5, p<0.005) のmRNA発現増強を示した。同様に、V1は9.6倍 (図2b, n=5, p<0.01) に、V3は11.6倍 (図2c, n=5, p<0.005) に増強した。V2はコントロールでほとんど検出されず、伸展するとわずかにmRNA発現が確認されたが、微量であったため相対定量できなかった。V0, V1, V3のmRNA発現は伸展刺激で顕著に上昇した。

### 2. Fibrillin-1とversican (GAG- $\alpha$ domain, GAG- $\beta$ domain) の免疫組織化学的局在および発現の変化

伸展刺激を負荷しなかった培養2週後の対照群に蛍光免疫染色を行い、fibrillin-1とversicanのタンパク質の局在について検討した (図3)。fibrillin-1は緑色蛍光をもってHPLFの細胞シート上に明瞭に観察され、網目を呈した走行配列を示した (図3a, d)。一方、赤色蛍光で示されるversicanは、fibrillin-1の走行に沿うように認められたが、fibrillin-1に比して全体的に弱い蛍光強度の染色を示した (図3c, f)。また、これらの蛍光画像を融合して検討した結果、versicanのGAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainの多くはfibrillin-1に共局在したが、強蛍光を示す部位以外でも赤色蛍光を帯びたversicanの線維状の配列走行も散見された (図3b, e)。また、こうした特徴はGAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainとの間には差異を認めなかった。

一方、7日間伸展培養したHPLFの免疫染色像では、fibrillin-1の緑色蛍光強度は対照群のHPLFにおける染色結果と大きな差異を認めなかった (図4a, d, g, j)。しかし、伸展刺激実験群では、緑色蛍光で示されるfibrillin-1の網目状構造が大きさを増して認められ、伸展方向に直行して集束して観察された。さらに、緑色蛍光で示されるfibrillin-1の蛍光強度は増加した。また、赤色蛍光で示されるGAG- $\alpha$  domainは対照群と同様にfibrillin-

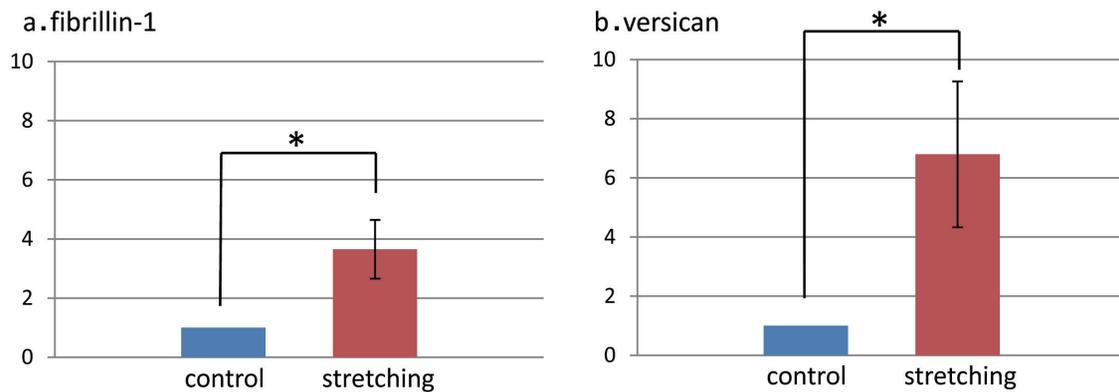


図1. 周期的伸展刺激負荷によるHPLFのfibrillin-1およびversicanのmRNA発現の相対的变化

周期的伸展刺激により, fibrillin-1のmRNA発現は約3.6倍 (n = 8) に増強し (a), versicanのmRNA発現は約6.8倍 (n = 8) に増強されている (b). \*p < 0.005

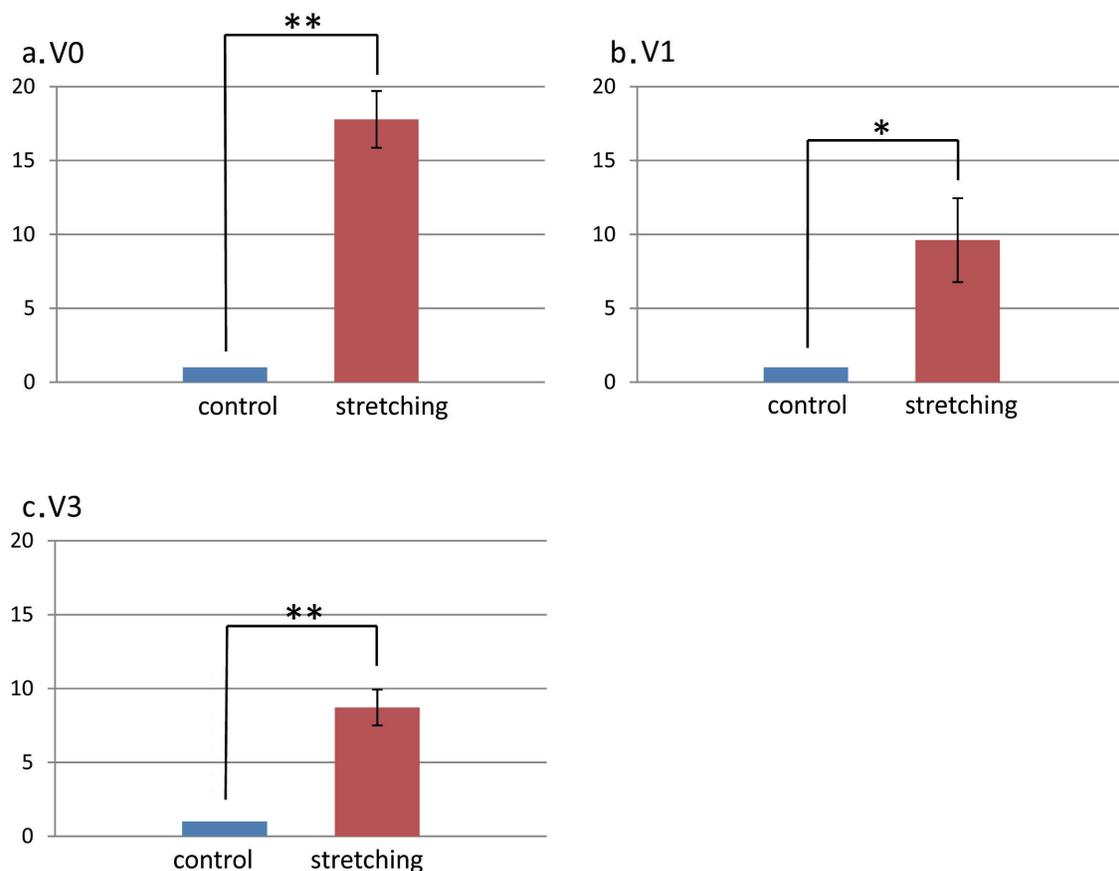


図2. 周期的伸展刺激負荷によるHPLFのversican isoformsのmRNA発現の相対的变化

周期的伸展刺激はV0 (a), V1 (b), V3 (c) のそれぞれにおいて, 17.8倍 (n = 5), 9.6倍 (n = 5), 8.7倍 (n = 5) にmRNA発現を増強する. \*p < 0.01, \*\*p < 0.005

1に沿って配列していたが, 配列するGAG- $\alpha$  domainの蛍光強度が明らかに増加していた (図4c, f). これは, GAG- $\beta$  domainの蛍光強度においても同様に観察された (図4i, l). さらに, 融合した画像の観察では, 対照群の赤色蛍光を帯びたversicanのGAG- $\alpha$  domainおよびGAG- $\beta$  domainともに, ほぼfibrillin-1に沿って局在した線維走行がみられたが, versicanが優位に局在する黄色の線

維走行が一部に観察された (図4b, h). 一方, 伸展刺激実験群におけるfibrillin-1とversicanの共局在では, 観察領域のほぼ全域で黄色を呈した線維走行が観察された (図4e, k).

## 考 察

HPLFが産生する主要なプロテオグリカンはversican,

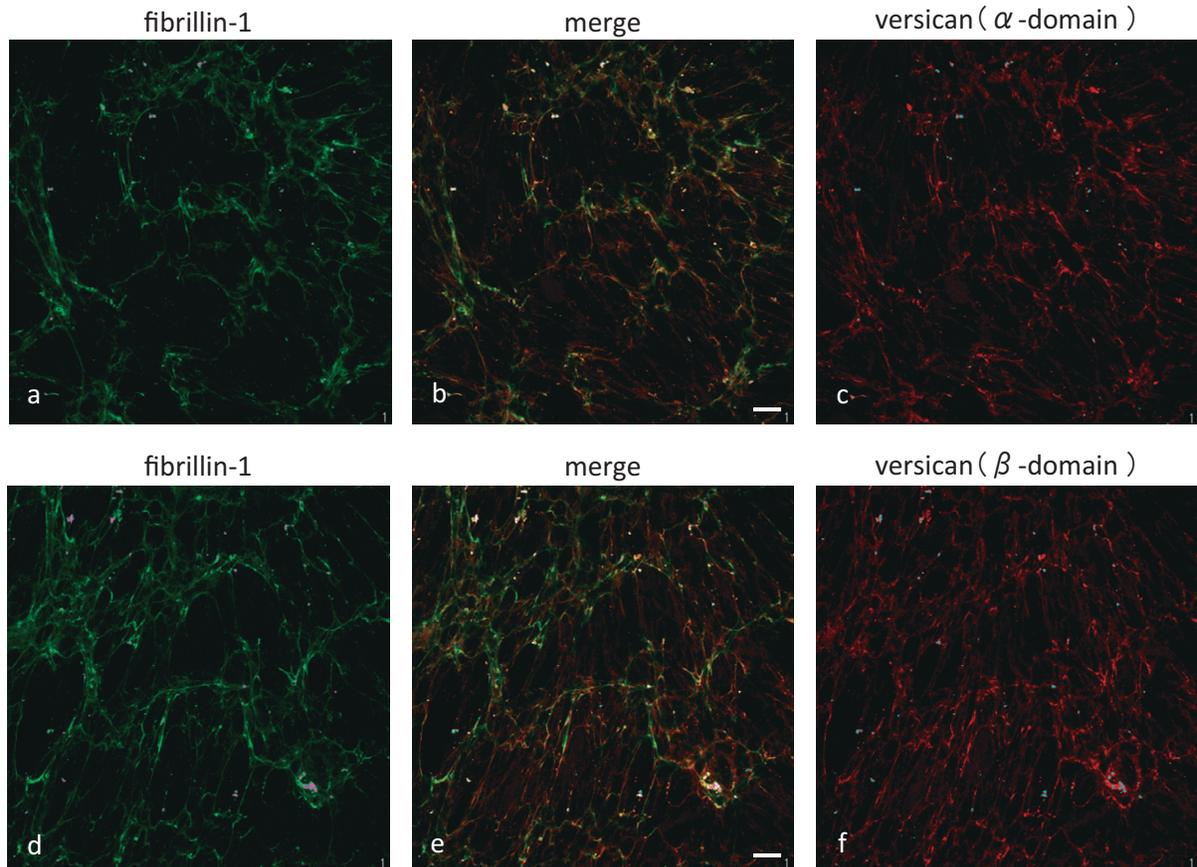


図3. 周期的伸展刺激を負荷していないHPLFにおけるfibrillin-1とversicanの免疫組織化学的局在

培養2週後のHPLFでは、fibrillin-1 (a, d) は緑色蛍光をもって細胞シート上に観察され、網目を呈した走行配列を示している。Versicanの $\alpha$  domain (c) と $\beta$  domain (f) は画像合成の結果、fibrillin-1に共局在する (b, e)。しかし、一部に赤色蛍光を強くする線維状の走行も観察される。Scale bars : 100 $\mu$ m。

decorin, heparan sulphate proteoglycan (HSPG) と未知の91kDaのchondroitin sulphate proteoglycanであり、versicanはdecorinに次いで豊富に存在することが明らかにされている (Larjava et al., 1992)。さらにversicanには、4つのisoformが存在し (Shinomura et al., 1993 ; Zimmermann et al., 1994 ; Ito et al., 1995 ; Zako et al., 1995)、各isoformの発現比率は組織によって異なる (Cattaruzza et al., 2002)。PCRによるブタ歯根膜の分析において、歯根膜と歯肉の主要なversican isoformはV1であることが明らかにされている (Okahata et al., 2011)。本研究で用いたin vitroのHPLFの各versican isoformのmRNA発現についてみると、比較Ct法では各isoformのmRNA発現の量比は正確には求めることができないが、 $\Delta$ Ct値で比較すると、対照群ではV1の発現が最も高く、V0とV3の発現が低く、V2の発現はほとんど認められなかった。この結果は、本研究で用いたHPLFがin vivoに類似したversican isoformを発現していることを示している。

伸展刺激に伴う各versican isoformの相対的な増加率はV0 isoformで17.8倍、V1で9.6倍、V3で11.6倍と、V2を除くisoformでmRNAの発現の増加率が顕著であった。な

ぜ、伸展刺激によってV1のmRNA発現が特に高くなるのかは明らかではないが、V1と他のisoformとの構造的な違いはcore proteinに付くGAG鎖 (chondroitin sulphate) の数である。ヒトversicanでみると、V0 isoformで16、V1 isoformで12、V2 isoformで4、V3 isoformで0か所のGAG鎖結合可能部位をもつ (Zimmermann et al., 1994)。したがって、伸展刺激によって $\beta$  domainを有するversicanのV1 isoformの発現が上がることはversicanの有するGAG鎖が歯根膜のメカニカルストレスに対する反応性において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。免疫組織学的研究から、ラット歯根膜に存在する主要なGAG鎖は、chondroitin-4-sulphate、chondroitin-6-sulphateおよびdermatan sulphateである (Smalley et al., 1984 ; Matsukawa, 1994 ; Kagayama et al., 1996)。HPLFのメカニカルストレスによるGAG発現の変化に関する研究は、我々の知る限り無いが、in vivoの実験系において、矯正力の負荷によってchondroitin-6-sulphateが増加すること、また咬合力除去実験によって逆にchondroitin sulphateが減少することが報告されている (Kagayama et al., 1996 ; Kaneko et al., 2002)。また、

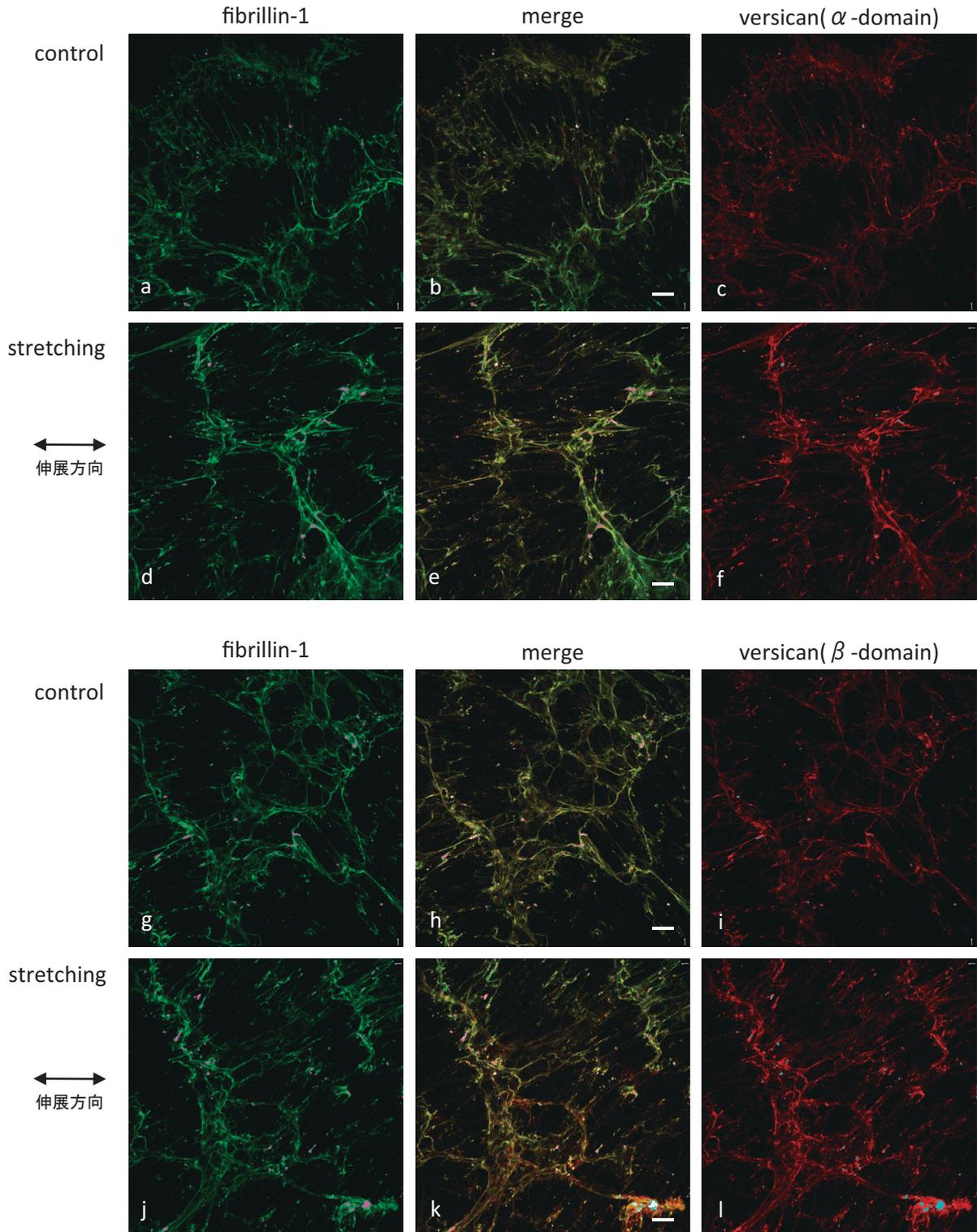


図4. 周期的伸展刺激負荷したHPLFにおけるfibrillin-1およびversicanの免疫組織化学的局在

周期的伸展刺激によるfibrillin-1の蛍光強度は対照群と差異を認められない (aとd, gとj). 一方, versicanの $\alpha$  domainと $\beta$  domain共に蛍光を増してみられる (cとf, iとl). 合成画像においては黄色を帯びた線維が明瞭にみられ, 伸展刺激がversicanを増強することを示している (bとe, hとk). Scale bars : 100 $\mu$ m.

最近の研究ではversicanと組織の機械的強度との関連性が指摘されている. 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. 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. これらの研究は, 歯根膜組織におけるversicanのisoformの発現量比がGAGの動態および弾性線維系を介し

て歯根膜細胞の機械的強度に関与している可能性を示唆している。

対照群と実験群でのfibrillin-1, GAG- $\alpha$  domainおよびGAG- $\beta$  domainの免疫染色の結果から, 伸展刺激によって3つの基質は伸展方向に直行する帯状の集積を示した。この所見は, 過去の研究でのfibrillin-1とfibrillin-2の免疫染色の結果 (Tsuruga et al., 2009) と一致しているが, 本研究ではversicanの局在についても同様の結果が得られた。線維芽細胞あるいは血管内皮細胞に一定軸方向の伸展刺激が加わると, 細胞および細胞内のアクチンストレスファイバーが伸展方向に対して垂直に整列することが知られており (Wei et al., 2008 ; Hsu et al., 2009), 本研究においても同様の細胞の整列がみられた。このことはメカニカルストレスという情報が細胞内に伝達し, それに対してアクチンストレスファイバーが伸展率を最小化するための応答をしたことを示唆しているが, versicanなどの基質の配列が細胞内のアクチンの整列を介した反応なのか, あるいは基質そのものの反応なのかは, その機序ともども不明である。

GAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainの免疫染色についてみると, 2つのdomainの局在には対照群, 実験群とも大きな差異は認められなかった。しかし, 両群の免疫染色の融合画像を詳細に比較すると, 伸展刺激によってfibrillin-1に比較して2つのGAG domainの染色範囲と蛍光強度が相対的に増加していた。免疫染色はあくまでもタンパク質の局在をみるものであり, タンパク質発現の定量は困難ではあるが, この結果は本研究におけるfibrillin-1とversican-totalのmRNA発現の結果 (fibrillin-1で3.6倍増, versican-totalで6.8倍増) によっても支持される。

また, 本研究で用いた2種類のversican抗体はそれぞれrabbit anti-mouse versican (GAG- $\alpha$  domain) 抗体はV0とV2のisoformを, rabbit anti-mouse versican (GAG- $\beta$  domain) 抗体はV0とV1のisoformを認識する。V0, V1, V2 isoformの局在をみても, 少なくともV0, V1とV2の3つのversican isoformはfibrillin-1に沿って存在することが明らかとなった。さらに, 周期的伸展刺激の負荷によりversicanのGAG- $\alpha$  domainとGAG- $\beta$  domainの蛍光強度がともに増大したことに加え, 融合画像が示すようにマイクロフィブリルの網目状構造の間にも明るい蛍光反応がみられた。これは, 伸展刺激がfibrillin-1よりもversicanの発現を増強させることを示唆するものであり, 実際fibrillin-1とversicanのmRNA発現を比較すると, 伸展刺激はversicanのmRNA発現を著しく増強し, V0, V1, V3 isoformにおいても著しい増強がみられた。約3.6倍程度増強されたfibrillin-1のmRNA発現は免疫蛍光染色に

は現れなかった。本実験で利用した周期的伸展刺激がfibrillin-1よりもversicanのmRNA発現を増強したことから, HPLFは伸展刺激に対してversicanのmRNA発現を介して応答したものと考えられる。従って, fibrillin-1とversicanは歯根膜の細胞外基質, 特に弾性系線維を構成するうえで極めて密接な関係にあり, 伸展刺激のようなメカニカルストレスに対してHPLFはfibrillin-1とversicanの発現を増強し, その配列の分布が伸展方向に直行する様に変化した。このように, メカニカルストレスは弾性と柔軟性を伴う歯根膜特有の機能を維持するために重要であることが示唆された。

## 結 論

ヒト歯根膜線維芽細胞は, メカニカルストレス (伸展刺激) に対してfibrillin-1とversicanの発現を増強し, タンパク質の局在の集積を生ずることが明らかになった。このことは, メカニカルストレスに対する歯根膜組織の適応反応であることが示唆された。

## 文 献

- Böck P & Stockinger L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. *Anat Embryol* 170 : 145-153, 1984.
- Cattaruzza S, Schiappacassi M, Ljungberg-Rose A, Spesotto P, Perissinotto D, Mörgelin M, Mucignat MT, Colombatti A & Perris R. Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro. *J Biol Chem* 277 : 47626-47635, 2002.
- Edwards JG. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. *Am J Orthod* 54 : 441-61, 1968.
- Fujii T & Hirabayashi Y. Histochemical studies of glycosaminoglycans in developing periodontal ligaments of ICR mice. *Anat Rec* 254 : 465-73, 1999.
- Fullmer HM, Sheetz JH & Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers : a review. *J Oral Pathol* 3 : 291-316, 1974.
- Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y & 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.
- Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Kat-

- suura M, Oazwa H, Toyama Y, Bonewald LF & Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor. *J Bone Miner Res* 14 : 1239-1249, 1999.
- Hsu HJ, Lee CF & Kaunas R. A dynamic stochastic model of frequency-dependent stress fiber alignment induced by cyclic stretch. *PLoS One* 4 : e4853, 2009.
- Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP & Sakai LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277 : 4565-4572, 2002.
- Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M & Kimata K. Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 270 : 958-965, 1995.
- Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I, Kamo N, Takahashi I & Mitani H. Localization of glycosaminoglycans in periodontal ligament during physiological and experimental tooth movement. *J Period Res* 31 : 229-234, 1996.
- Kaneko S, Ohashi K, Soma K & Yanagishita M. Occlusal hypofunction causes changes of proteoglycan content in the rat periodontal ligament. *J Periodontal Res* 36 : 9-17, 2001.
- Larjava H, Häkkinen L & Rahemtulla F. A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. *Biochem J* 284 : 267-274, 1992.
- LeBaron RG, Zimmermann DR & Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267 : 10003-10010, 1992.
- Mecham RP & Davis EC. Elastic fiber structure and assembly. In : Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. *Extracellular matrix assembly and structure*. New York : Academic Press Inc. 281-314, 1994.
- Okahata S, Yamamoto R, Yamakoshi Y & Fukae M. A large chondroitin sulfate proteoglycan, versican, in porcine pre-dentin. *J Oral Biosci* 3 : 72-81, 2011.
- Putnam EA, Cho M, Zinn AB, Towbin JA, Byers PH & Milewicz DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the FBN1 gene. *Am J Med Genet* 29 : 233-42, 1996.
- Rosenbloom J, Abrams WR & Engvall E. Extracellular matrix 4 : The elastic fiber. *FASEB Journal* 7 : 1208-1218, 1993.
- Sakai LY, Keene DR & Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103 : 2499-2509, 1986.
- Shinomura T, Nishida Y, Ito K & 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.
- Smalley JW, Shuttleworth CA & Grant ME. Synthesis and secretion of sulphated glycosaminoglycans by bovine periodontal ligament fibroblast cultures. *Arch Oral Biol* 29 : 107-16, 1984.
- Theocharis AD, Tsolakis I, Hjerpe A & 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.
- Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y & Yajima T. Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. *J Periodontal Res* 37 : 23-28, 2002.
- Tsuruga E, Nakashima K, Ishikawa H, Yajima T & Sawa Y. Stretching modulates oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res* 44 : 170-4, 2009.
- Wei Z, Deshpande VS, McMeeking RM & Evans AG. Analysis and interpretation of stress fiber organization in cells subject to cyclic stretch. *J Biomech Eng* 130 : 031009, 2008.
- Wight TN, Heinegard D & Hascall V. Proteoglycans : structure and function. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Edited by Hay E. Plenum Press, New York., USA, pp39-50, 1991.
- Wight TN. Versican : a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 617-623, 2002.
- Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, Matsubara K & Okada H. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* 275 : 279-286, 2001.
- Yamada S, Ozawa Y, Tonoeda M, Matoba R, Matsubara K & Murakami S. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. *J Dent Res* 85 : 447-451, 2006.
- Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S & Mu-

rakami S. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem* 282 : 23070-23080, 2007.

Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M & 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.

Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K & 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 & 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 & Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 : 2975-2981, 1989.

永坂 萌, 鳥谷奈保子, 敦賀英知, 坂倉康則, 溝口 到. ヒト歯根膜由来線維芽細胞における fibrillin-1 の発現抑制が versican の mRNA とタンパク質発現およびタンパク質の局在へ及ぼす影響. *北医大誌* 31 : 81-87, 2012.



鳥谷 奈保子

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12年3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成16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18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  
助手

平成19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  
助教



[Original]

## The characteristics of *Prevotella oris* hemolysin and its interaction with the erythrocyte membrane

Toshiya SATO, Herastuti SULISTYANI, Arihide KAMAGUCHI, Futoshi NAKAZAWA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

### Abstract

*Prevotella oris* produces a proteinous hemolysin, which is observed as a 16-kDa band on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel. In this study, we analyzed the N-terminal amino acid sequence of *P. oris* hemolysin. We identified 7 N-terminal amino acids, and it was deduced that *P. oris* hemolysin has a short peptide sequence. The amino acid sequence of hemolysin did not share any sequence similarity with any the other known bacterial protein or peptide.

It was also clarified that *P. oris* hemolysin binds to erythrocytes in a temperature-dependent manner before

hemolysis. This hemolytic activity was inhibited when the erythrocytes treated with trypsin or glycosidase were used. Cholesterol did not affect the activity. Furthermore, a 46-kDa glycoprotein band disappeared from the profiles of the erythrocyte membranes treated with trypsin when run on a SDS-PAGE gel. This result suggests that the 46-kDa erythrocyte membrane glycoprotein may be a binding site for the hemolysin. This is the first report describing the N-terminal amino acid sequence of *P. oris* hemolysin and its binding site on the erythrocyte membrane.

**Key words :** *Prevotella oris*, hemolysin, N-terminal amino acid sequence, hemolysin-binding site, glycoprotein

### Introduction

*Prevotella oris*, a nonpigmented, gram-negative, rod-shaped anaerobic bacterium, is assumed to be one of the pathogenic bacteria involved in suppurative inflammation of the oral and head regions. Previous studies, showed that *P. oris* is frequently isolated not only from the lesions of several oral infections such as periodontal disease (Yousefimashouf et al., 1993), endodontic infection (Brito et al., 2007), dentoalveolar abscess (Dymock et al., 1996), and spreading odontogenic infection (Riggio et al., 2007) but also from the lesions of systemic infections such as empyema (Civen et al., 1995) and meningitis (Frat et al., 2004). Furthermore, *P. oris* produces immunoglobulin A protease (Frandsen et al., 1986), hyaluronidase (Grenier & Michaud, 1993),  $\beta$ -lactamase (Iwahara et al., 2006), hemolysin (Sato et al., 2012), and coaggregates with *Porphyromonas gingivalis*

(Sato and Nakazawa, 2012), suggesting that these factors may contribute to the pathogenic potential of the organism.

In our previous study, it was demonstrated that *P. oris* produces a proteinous hemolysin, determined as a 16-kDa band on a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) gel (Sato et al., 2012). The characteristics of hemolysin produced by oral bacteria such as *Porphyromonas gingivalis* (Deshpande & Khan, 1999), *Prevotella intermedia* (Takada et al., 2003), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Kimizuka et al., 1996), and *Treponema denticola* (Chu & Holt, 1994), have been reported. These hemolysins were reported to be proteinous substances, because such activities are inactivated by heat or trypsin treatment. However, there is no report describing the function domains of hemolysin from oral bacteria. In this study, we analyzed the N-terminal

受付：平成25年4月2日 受理：平成25年5月10日

amino acid sequence of *P. oris* hemolysin, and examined its sequence similarity with any the other known bacterial proteins and peptides.

The hemolysin of *P. oris*, *P. intermedia*, and *A. actinomycetemcomitans* has been reported to be activated by thiol compounds (Sato et al., 2012; Takada et al., 2003; Kimizuka et al., 1996). Streptolysin O, produced by *Streptococcus pyogenes*, is a member of the thiol-activated cytolytins. It binds to cholesterol in the erythrocyte cell membrane and causes hemolysis by oligomerization on the cell membrane (Bhakdi et al., 1996). Previously, perfringolysin O, listeriolysin O, and cereolysin O were identified as thiol-activated cholesterol-binding cytolytins (Palmer, 2001). However, the binding site of the thiol-activated hemolysin produced by oral gram-negative bacteria remains unknown. In this study, we investigated the interaction between hemolysin from *P. oris* and erythrocyte cell membranes to determine the hemolysin-binding site.

## Materials and methods

### Bacterial strain and culture conditions

We used a clinical strain of *P. oris* WK1 exhibiting strong hemolytic activity. The WK1 was isolated from the subgingival sites of patients with chronic periodontitis, and it was already confirmed as a *P. oris* species by 16S rRNA sequence analysis (Sato et al., 2012). *P. oris* was subcultured on TYHM blood agar (tryptic soy broth [BD, Difco] supplemented with 0.5% yeast extract [BD, Difco], 1.5% agar [BD, Difco], 5% v/v sheep blood, 5 µg/mL hemin [Wako], and 1 µg/mL menadione [Wako]). To purify hemolysin, TYHM broth (tryptic soy broth [BD, Difco] supplemented with 0.5% yeast extract [BD, Difco], 5 µg/mL hemin, and 1 µg/mL menadione) was used.

### Purification of hemolysin and N-terminal amino acid sequence analysis

*P. oris* hemolysin was purified, in the methods as described previously (Sato et al., 2012). Briefly, the hemolysin produced in the culture supernatant was subjected to ion-exchange and gel-filtration chromatography; hemolysin fractions were then, subjected to HPLC. The purified hemolysin was desalinated using an amicon Ultra-0.5 centrifugal filter device (10 K; Millipore,

Billerica, MA, USA).

The N-terminal amino acid sequence of the purified hemolysin was determined by Edman degradation with an automatic protein sequencer (Procise 491; Applied Biosystems, Tokyo, Japan). Furthermore, the sequence similarity with any the other known bacterial protein and peptide was analyzed using the protein homology search data base system, BLAST (basic local alignment search tool).

### Hemolysin-binding studies

Horse erythrocytes were washed 3 times with PBS and resuspended. Then, 2ml of 1% erythrocyte suspension (v/v) with 1unit *P. oris* hemolysin was incubated at 37° C, 27° C, or 4° C for 1h. Thereafter, the erythrocytes were separated by centrifugation (1,500×g for 5min) and washed three times with PBS. Subsequently, the erythrocytes were resuspended with PBS, and the pre-incubated supernatant (PiS) was added to untreated erythrocytes. After incubation at 37° C for 5h, the hemolytic activity in both samples was measured as described previously (Sato et al., 2012).

### Effect of various treatments on hemolytic activity

The effect of cholesterol on hemolytic activity was evaluated after incubation with 1unit *P. oris* hemolysin at 37° C for 1h. The hemolysin pretreated with 10µg/mL or 50µg/mL cholesterol and horse erythrocytes were then incubated at 37° C for 5h and the activity was measured as described previously (Sato et al., 2012). Untreated hemolysin was used as the control, with an assumed hemolytic activity of 100%.

Horse erythrocytes were treated with 2mg/ml trypsin at 37° C for 2h, or 15,000 U *N*-glycosidase, 2,000,000 U *O*-glycosidase and 2,000 U neuraminidase at 37° C for 18h. After treatment, the erythrocytes were washed 3 times with PBS, and then, 2ml of 1% erythrocyte suspension (v/v) with 1unit hemolysin of *P. oris* was incubated at 37° C for 5h. After incubation, hemolytic activity was measured as described previously (Sato et al., 2012).

### Effect of trypsin treatment on SDS-PAGE profiles of erythrocyte membrane proteins

To identify the hemolysin-binding site, the cell mem-

branes of horse erythrocytes treated with trypsin were subjected to SDS-PAGE. The erythrocytes were washed 3 times with PBS, and then 2 ml of the 1% erythrocyte suspension (v/v) was incubated at 37°C with 2 mg/ml trypsin for 18 h. In order to clarify the difference of band intensity on SDS-PAGE gel, the erythrocytes were treated for long time. The treated erythrocytes were washed 3 times with PBS containing 6 mg/ml trypsin inhibitor from soybean (Wako, Japan) and then lysed with a hypotonic buffer solution (10 mM Tris-HCl, pH 7.4). The erythrocyte membranes were collected by centrifugation (15,000 × g for 5 min), washed 3 times with a hypotonic buffer solution, and subjected to SDS-PAGE. The SDS-PAGE gel was then visualized by CBB staining or PAS staining.

## Results

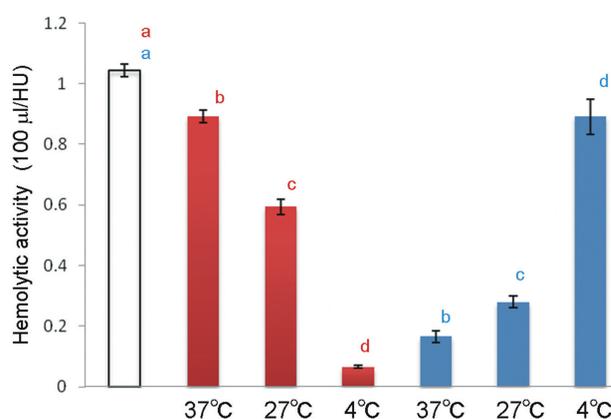
The N-terminal amino acid sequence of the purified hemolysin was identified as <sup>1</sup>Asp-Tyr-Glu-Pro-Phe-Glu-Pro<sup>7</sup>. In this study, the amino acid peaks on the automatic protein sequencer rapidly decreased after each cycle, although the peak for <sup>1</sup>Asp was significantly higher. Finally, after identification of Pro<sup>7</sup>, the N-terminal amino acid sequence could no longer be identified (data not shown). In the protein homology search by BLAST, the N-terminal amino acid sequence similarity with any of the other known bacterial proteins and peptides could not be detected.

The results of the hemolysin binding studies are shown in Fig. 1. The erythrocytes pre-incubated with hemolysin at 37°C were hemolyzed, and only a weak hemolytic activity was detected in PiS. However, the erythrocytes pre-incubated at 27°C showed moderate activity, whereas those pre-incubated at 4°C did not undergo hemolysis. The activity was maintained in PiS especially almost of all the activity was in PiS in case of pre-incubation at 4°C. Therefore, in this study, it was demonstrated that hemolysin bound to erythrocytes in a temperature-dependent manner.

In order to identify the hemolysin-binding site, the affinity between hemolysin and cholesterol was examined (Fig. 2). The hemolytic activity was weakly inhibited by cholesterol treatment. However, there was no statistically significant difference between the results obtained using 10 µg/ml and 50 µg/ml cholesterol treatment.

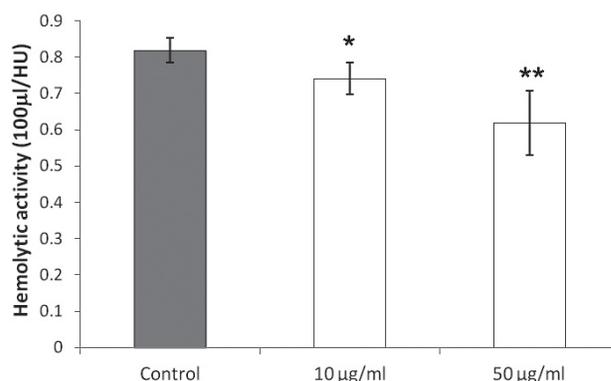
To determine whether other membrane constituents other than cholesterol might provide a hemolysin-binding site, erythrocyte surface proteins and sugar chains were enzymatically removed. As a result, the binding activity for the erythrocytes treated with trypsin (Fig. 3) and glycosidase (Fig. 4) was significantly inhibited. The percent hemolysis inhibition by cholesterol treatment, trypsin treatment and glycosidase treatment was calculated 24.3%, 46.6%, 73.6% respectively (Fig. 5). The inhibitory effect of treatment with trypsin or glycosidase was higher than that observed with cholesterol treatment.

Furthermore, the SDS-PAGE profiles of the erythrocyte membrane proteins with or without trypsin treat-



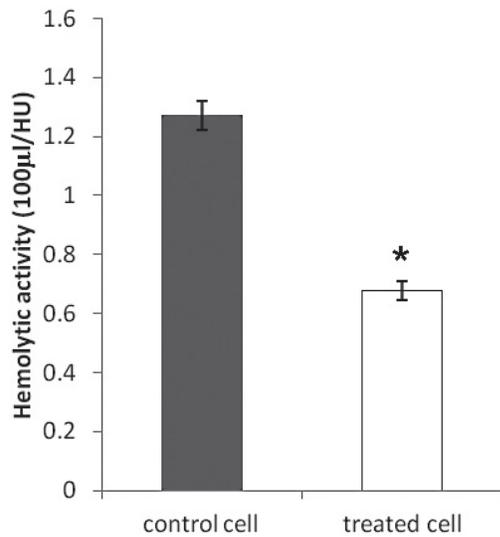
**Fig.1. Hemolysin binding test**

The existence of hemolysin was determined by measuring the activity in erythrocytes and reaction buffer. ■: Erythrocyte activity when pre-incubated with hemolysin at 37°C, 27°C, or 4°C for 1 h. ■: Activity of the pre-incubated supernatant □: Activity without pre-incubation. The relationship between the different treatments indicates a statistically significant difference ( $P < 0.05$ ); Kruskal-Wallis test.

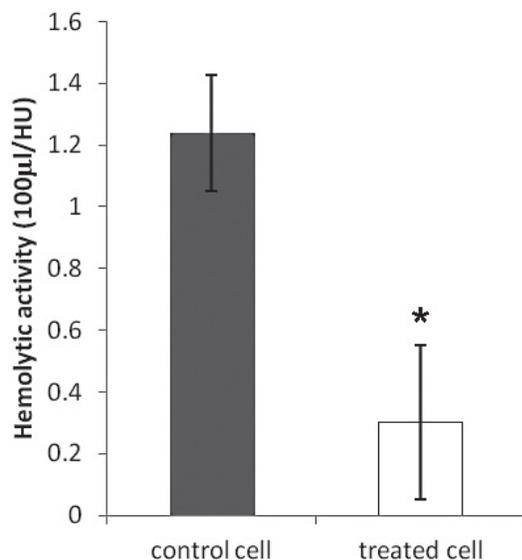


**Fig.2. Effect of cholesterol on hemolytic activity**

To examine the sensitivity of hemolysin for cholesterol, the activity of hemolysin treated with cholesterol was measured. ■: Activity with treatment. □: Activity of hemolysin treated with 10 µg/mL, 50 µg/mL cholesterol. Mann-Whitney  $U$  test, \* $P < 0.05$  vs. control, \*\* $P < 0.01$  vs. control

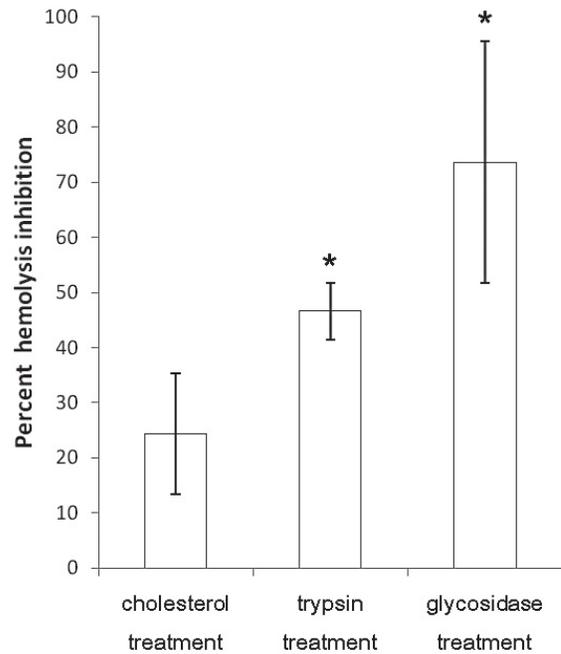


**Fig.3. Hemolytic activity on erythrocytes treated with trypsin**  
The activity on erythrocytes treated with 2mg/ml trypsin was measured for treated cells (■). Erythrocytes not treated with trypsin were used as control cells (□). Mann-Whitney *U* test, \*  $P < 0.05$  vs. control

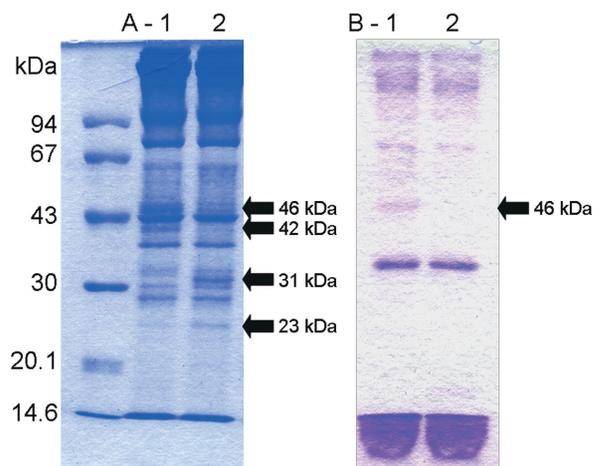


**Fig.4. Hemolytic activity on erythrocytes treated with glycosidase**  
The activity on erythrocytes treated with 15,000 U *N*-glycosidase, 2,000,000 U *O*-glycosidase, and 2,000 U neuraminidase was measured for treated cells (■). Erythrocytes not treated with trypsin were used as control cells (□). Mann-Whitney *U* test, \*  $P < 0.05$  vs. control

ment were examined (Fig.6). When the erythrocytes were treated with trypsin, a 46-kDa and 42-kDa band disappeared from the SDS-PAGE gel following CBB staining. However, a 31-kDa band was determined, although it was not detected in the case of the erythrocytes not treated with trypsin. Furthermore, the intensity of the 23-kDa band was higher in the erythrocytes treated with trypsin. On the SDS-PAGE gel stained with PAS, a 46-kDa band also disappeared. Although several



**Fig.5. Percent hemolysis inhibition by various treatments**  
The percent hemolysis inhibition by 50µg/mL cholesterol treatment, trypsin treatment and glycosidase treatment were calculated as follows ; { (hemolytic activity of control group-hemolytic activity of test group)/hemolytic activity of control group} × 100 = % hemolysis inhibition  
The Statistical significance was calculated using Mann-Whitney *U* test. \*  $P < 0.05$  vs. cholesterol treatment



**Fig.6. SDS-PAGE profiles of erythrocyte membrane proteins**  
Erythrocytes treated with/without trypsin were hemolyzed, and then cell membranes were collected by centrifugation. Erythrocyte membranes not treated with trypsin were loaded onto lane1. Erythrocyte membranes treated with trypsin were loaded onto lane2. The gel, A, was visualized by CBB staining ; the gel, B was visualized by PAS staining.

major bands were determined by PAS staining, there was no difference between the results in the presence and absence of trypsin except for the 46-kDa band.

## Discussion

Previously, we had purified a 16-kDa proteinous

hemolysin produced by *P. oris* by using gel-filtration and ion-exchange chromatography (Sato et al., 2012). In this study, the 7N-terminal amino acids of *P. oris* hemolysin were identified by Edman degradation. The amino acid peaks in the automatic protein sequencer rapidly decreased from cycle to cycle. In light of this phenomenon, two possibilities were suggested. One suggestion was that the amount of hemolysin is too low. However, because the peak of <sup>1</sup>Asp was sufficiently high, it was assumed that the amount of hemolysin was sufficient. The other possibility is that the protein part of hemolysin is a short peptide. In our previous study, the 16-kDa band was not observed by CBB staining, although the much clearer band was identified with silver staining. Furthermore, on the SDS-PAGE gel loaded with the partially purified hemolysin, the hemolysin band was stained by sudan black staining (data not shown). These phenomena support the possibility that *P. oris* hemolysin may be composed of a lipid and a short peptide.

Additionally, N-terminal amino acid sequencing revealed that the hemolysin of *P. oris* includes only Try and Phe, two aromatic amino acids, which have an affinity to CBB. Thus, it is assumed that *P. oris* hemolysin is not easily stained by CBB because of its amino acid composition. Furthermore, we demonstrated that purified hemolysin is not decomposed by trypsin treatment, based on SDS-PAGE analysis (Sato et al., 2012). This phenomenon supports the result of the N-terminal amino acid sequence in this study, as this hemolysin does not include Arg and Lys, which are recognized by trypsin.

In the homology search using BLAST, the N-terminal amino acids of *P. oris* hemolysin did not show any similarity to any the other known protein or peptide produced by bacteria. Although the internal amino acids sequence of crude *P. gingivalis* hemolysin has been determined (Deshpande & Khan, 1999), there is no report describing the N-terminal amino acids sequence of hemolysin from oral bacteria.

Previously, there has been no report describing sugar/lipid modification of hemolysin. Thus, whether hemolysin from oral bacteria is a lipoprotein remains unknown. Recently, bacterial lipo-proteins have been well studied in gram-negative bacteria such as *E. coli*

(Okuda & Tokuda, 2011) and *spirochete* (Haake, 2000), gram-positive bacteria (Sutcliffe & Russell, 1995), and *Mycoplasma* (Rezwan et al., 2007), indicating that many microorganisms have lipo-proteins. Furthermore, using gene analyses, the number of lipoprotein gene has been identified in pathogenic bacteria such as *Helicobacter pylori*, *Borrelia burgdorferi* and *Mycobacterium tuberculosis* (薬師 et al., 2000). Bacterial lipo-proteins exhibit a number of biological activities such as the activation of immunocytes and the induction of apoptosis (Kovacs-Simon et al., 2011). However, the cytotoxic activity of lipo-proteins has not yet been reported.

In this study, we clarified that *P. oris* hemolysin bound to erythrocytes in a temperature-dependent manner (Fig.1). The level of hemolysin binding was stronger after pre-incubation at 37°C than after pre-incubation at 27°C or 4°C. Thus, the environmental conditions in the oral cavity are appropriate for the hemolytic activities of *P. oris*. Similarly, the hemolysis rate of *P. intermedia* hemolysin is temperature-dependent (Beem et al., 1998). In contrast, *Fusobacterium necrophorum* hemolysin has been reported to bind to erythrocytes in a temperature-independent manner (Amoako et al., 1997). These phenomena may imply that the hemolysis mechanism is basically different among oral gram-negative bacterium, but details remain unknown.

Previously, we reported that the hemolysin of *P. oris* was activated by pre-treatment with thiols such as L-cysteine, DTT, and 2-mercaptoethanol (Sato et al., 2012). These phenomena are similar to the properties of streptolysin O, a product of *S. pyogenes*. The activity of streptolysin O is strongly inhibited by cholesterol, because the cholesterol on the erythrocyte membrane is a target for streptolysin O (Prigent et al., 1976 ; Bhakdi et al., 1985). However, the activity of *P. oris* hemolysin was not inhibited by cholesterol pre-treatment (Fig.2). Thus, the major binding site of *P. oris* hemolysin is not likely to be a cholesterol on the erythrocyte membrane. In contrast, the activity of the erythrocytes treated with trypsin or glycosidase was inhibited, suggesting that the binding site of this hemolysin may be a glycoprotein (Fig.3, 4).

To identify the hemolysin-binding site, the SDS-PAGE profiles of erythrocyte membranes were examined (Fig.6). When the erythrocytes were treated with

trypsin, a 46-kDa glycoprotein band disappeared from the SDS-PAGE gel when visualized with CBB and PAS staining. Furthermore, a 42-kDa protein band also disappeared. However, it is considered that the 42-kDa protein may be a scaffold protein as a part of the erythrocyte membrane, because this protein was not visualized by PAS staining. Additionally, a 31-kDa band was detected following trypsin treatment. It is being investigated whether this protein is a product from the 46-kDa protein. The intensity of the 23-kDa band was higher in the erythrocyte membrane treated with trypsin. It is assumed that the recovery of the erythrocytes membrane proteins was affected by trypsin treatment. Therefore, the 46-kDa glycoprotein is most likely to behave as a binding site for *P. oris* hemolysin. Further investigations are in progress to identify the 46-kDa glycoprotein.

Previously, glycophorin, one of the main proteins on the erythrocyte surface, was identified as a receptor for *E. coli*  $\alpha$ -hemolysin (Aitziber et al., 2001) and *Vibrio cholera* El Tor hemolysin (Zhang et al., 1999). Furthermore, it has been shown that the receptor for *Aeromonas sobria* hemolysin is a glycoprotein on the intestine cell (Wang et al., 1999). In the case of oral bacteria, there are only few reports describing the hemolysin receptor, although it has been proposed that the erythrocyte receptor for *Fusobacterium necrophorum* hemolysin is phosphatidylcholine (Amoako et al., 1998).

Because the erythrocytes treated with glycosidase had not undergone hemolysis by *P. oris* hemolysin, the sugar chain of the 46-kDa protein may be involved in hemolysin binding. However, the saccharides comprising the cell surface sugar chain (glucose, galactose, mannose, arabinose, xylose, fucose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine and *N*-acetylneuraminic acid) did not affect the hemolytic activity (data not shown). Thus, there is the possibility that *P. oris* hemolysin does not have an affinity against the monosaccharide but instead against the conformation of the sugar chain.

Previously, we reported the release of GAPDH from erythrocyte membranes following treatment of the cell with *P. oris* hemolysin (Sato et al., 2012). GAPDH is a glycolytic enzyme that catalyzes the conversion of glyceraldehyde-3-phosphate to 1, 3-diphosphoglycerate. Furthermore, recent studies demonstrated that GAPDH has many other important roles including the cellular re-

sponse to oxidative stress (Hara et al., 2006), apoptosis (Huang et al., 2009), transcriptional (Zheng et al., 2003) and posttranscriptional gene regulation (Backlund et al., 2009), chromatin structure (Demarse et al., 2009), maintenance of DNA integrity (Azam et al., 2008), vesicular transport (Tisdale, 2001), and receptor-mediated cell signaling (Raje et al., 2007). The glycolytic activity of GAPDH is inhibited upon binding to the polyanionic *N*-terminus of anion exchanger/Band 3, and activated when it is released from Band 3 to the cytosol (Tsai et al., 1982; Mallozzi et al., 1995). Therefore, a significant release of free GAPDH into the cytosol may alter cellular homeostasis, and thereby lead to hemolysis. However, we consider that there is not direct interaction between *P. oris* hemolysin and GAPDH, because cell membrane GAPDH is one of a scaffold protein as a part of the erythrocyte membrane. After the hemolysin binding to 46-kDa erythrocytes glycoprotein, GAPDH may be released from cell membrane through some intracellular reactions. Further studies are in progress to understand the detailed mechanism of hemolysin-driven cell damage due to *P. oris*.

In this study, we examined the N-terminal amino acids sequence of *P. oris* hemolysin and its interaction with erythrocytes. Our findings are useful for better understanding the mechanisms underlying *P. oris* hemolysin-driven cell damage.

## Conclusion

It was suggested that h *P. oris* hemolysin may have a short peptide. This hemolysin binds to erythrocytes membrane in a temperature-dependent manner before hemolysis. Further, there is the possibility that the hemolysin-binding site is a 46-kDa glycoprotein on the erythrocytes membranes.

## Acknowledgment

We thank Dr. Hiroshi Miyakawa and Dr. Mari Fujita, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, for their technical support and helpful discussions. This study was supported in part by research scholarships from The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido (23 Dec 2011).

## Reference

- Aitziber L, Cortajarena, Felix M, Goni & Helena Ostolaza. Glycophorin as a receptor for *Escherichia coli* alpha-hemolysin in erythrocytes. *J Biol Chem* 276 (16) : 12513-12519, 2001.
- Amoako KK, Goto Y, Misawa N, Xu DL & Shinjo T. Interactions between *Fusobacterium necrophorum* hemolysin, erythrocytes and erythrocyte membranes. *FEMS Microbiol Lett* 150 : 101-106, 1997.
- Amoako KK, Goto Y, Misawa N, Xu DL & Shinjo T. The erythrocyte receptor for *Fusobacterium necrophorum* hemolysin : phosphatidylcholine as a possible candidate. *FEMS Microbiol Lett* 168 : 65-70, 1998.
- Azam S, Jouvret N, Jilani A, Vongsamphanh R, Yang XM, Yang S, et al. Human Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase Plays a Direct Role in Re-activating Oxidized Forms of the DNA Repair Enzyme APE1. *J Biol Chem* 283 : 30632-30641, 2008.
- Backlund M, Paukku K, Daviet L, De Boer RA, Valo E, Hautaniemi S, et al. Posttranscriptional regulation of angiotensin II type 1 receptor expression by glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. *Nucleic Acids Res* 37 : 2346-2358, 2009.
- Bhakdi S, Bayley H, Valeva A, Walev I, Walker B, Weller U, Kehoe M & Palmer M. Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin : prototype of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* 165 : 73-79, 1996.
- Bhakdi S, Tranum-Jensen J & Szegoleit A. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun* 47 : 52-60, 1985.
- Beem JE, Nesbitt WE & Leung KP. Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol Immunol* 13 : 97-105, 1998.
- Brito LCN, Teles FR, Teles RP, Franca EC, Ribeiro-Sobrinho AP, Haffajee AD & Socransky SS. Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hybridization to examine the microbiota of endodontic infections. *J Clin Microbiol* 45 : 3039-3049, 2007.
- Chu L & Holt SC. Purification and characterization of a 45 kDa hemolysin from *Treponema denticola* ATCC 35404. *Microb Pathog* 16 : 197-212, 1994.
- Civen R, Jousimies-Somer H, Marina M, Borenstein L, Shah H & Finegold SM. A retrospective review of cases of anaerobic empyema and update of bacteriology. *Clin Infect Dis* 20 : S224-S229, 1995.
- Demarse NA, Ponnusamy S, Spicer EK, Apohan E, Baatz JE, OGREIMEN B, et al. Direct Binding of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase to Telomeric DNA Protects Telomeres against Chemotherapy-Induced Rapid Degradation. *J Mol Biol* 394 : 789-803, 2009.
- Deshpande RG & Khan MB. Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436. *FEMS Microbiol Lett* 176 : 387-394, 1999.
- Dymock D, Weightman AJ, Scully C & Wade WG. Molecular analysis of microflora associated with dentoalveolar abscesses. *J Clin Microbiol* 34 : 537-542, 1996.
- Frandsen EV, Theilade E, Ellegaard B & Kilian M. Proportions and identity of IgA1-degrading bacteria in periodontal pockets from patients with juvenile and rapidly progressive periodontitis. *J Periodont Res* 21 : 613-623, 1986.
- Frat JP, Godet C, Grollier G, Blanc JL & Robert R. Cervical spinal epidural abscess and meningitis due to *Prevotella oris* and *Peptostreptococcus micros* after retropharyngeal surgery. *Intens Care Med* 30 : 1695-1695, 2004.
- Grenier D & Michaud J. Evidence for the absence of hyaluronidase activity in *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Microbiol* 31 : 1913-1915, 1993 ; .
- Haake DA. Spirochaetal lipoproteins and pathogenesis. *Microbiol-Uk* 146 : 1491-1504, 2000.
- Hara MR, Cascio MB, Sawa A. GAPDH as a sensor of NO stress. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease* 1762 : 502-509, 2006.
- Huang JS, Hao LJ, Xiong N, Cao XB, Liang ZH, Sun SG, et al. Involvement of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in rotenone-induced cell apoptosis : Relevance to protein misfolding and aggregation. *Brain Research* 1279 : 1-8, 2009.
- Iwahara K, Kuriyama T, Shimura S, Williams DW, Yanagisawa M, Nakagawa K & Karasawa T. Detection of *cfxA* and *cfxA2*, the beta-lactamase genes of *Prevotella* spp., in clinical samples from dentoalveolar infection by real time PCR. *J Clin Microbiol* 44 :

- 172-176, 2006.
- Kimizuka R, Miura T & Okuda K. Characterization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* hemolysin. *Microbiol Immunol* 40 : 717-723, 1996.
- Kovacs-Simon A, Titball RW & Michell SL. Lipoproteins of Bacterial Pathogens. *Infect Immun* 79 : 548-561, 2011.
- Mallozzi C, Distasi AMM, Minetti M. Free-radicals induce reversible membrane-cytoplasm translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in human erythrocytes. *Arch Biochem Biophys* 321 : 345-352, 1995.
- Okuda S & Tokuda H. Lipoprotein Sorting in Bacteria, In : Gottesman S, Harwood CS, eds. *Annual Review of Microbiology*. Palo Alto : Annual Reviews 65 : 239-259, 2011.
- Palmer M. The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 1681-1689, 2001.
- Prigent D & Alouf JE. Interaction of streptolysin O with sterols. *Biochim Biophys Acta* 443 : 288-300, 1976.
- Raje CI, Kumar S, Harle A, Nanda JS, Raje M. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *J Biol Chem* 282 : 3252-3261, 2007.
- Rezwan M, Grau T, Tschumi A & Sander P. Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiol-Sgm* 153 : 652-658, 2007.
- Riggio MP, Aga H, Murray CA, Jackson MS, Lennon A, Hammersley N & Bagg J. Identification of bacteria associated with spreading odontogenic infections by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontol* 103 : 610-617, 2007.
- Sato T, Kamaguchi A & Nakazawa F. Purification and characterization of hemolysin from *Prevotella oris*. *J Oral Biosci* 54 : 113-118, 2012.
- Sato T, Kamaguchi A & Nakazawa F. The release of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) from human erythrocyte membranes lysed by hemolysin of *Prevotella oris*. *Anaerobe* 18 : 553-555, 2012.
- Sato T & Nakazawa F. Coaggregation between *Prevotella oris* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Microbiol Immunol Infect* 2012 in press.
- Sutcliffe IC & Russell RRB. Lipoproteins of gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 177 : 1123-1128, 1995.
- Takada K, Fukatsu A, Otake S & Hirasawa M. Isolation and characterization of hemolysin activated by reductant from *Prevotella intermedia*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 35 : 43-47, 2003.
- Tisdale EJ. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is required for vesicular transport in the early secretory pathway. *J Biol Chem* 276 : 2480-2486, 2001.
- Tsai IH, Murthy SN, Steck TL. Effect of red cell membrane binding on the catalytic activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Biol Chem* 257 : 1438-1442, 1982.
- Wang A, Wada A, Yahiro K, Nomura T, Fujii Y, Okamoto K, Mizuta Y, Kohno S, Moss J & Hirayama T. Identification and characterization of the *Aeromonas sobria* hemolysin glycoprotein receptor on intestine 407 cells. *Microbial Pathogenesis* 27 : 215-221, 1999.
- 薬師寿治, 松山伸一, 徳田元. グラム陰性細菌におけるリポ蛋白質の生合成機構. *日本細菌学雑誌*. 55 (3) : 517-526, 2000.
- Yousefimashouf R, Duerden BI, Eley A, Rawlinson A & Goodwin L. Incidence and distribution of nonpigmented *Prevotella* species in periodontal pockets before and after periodontal therapy. *Microbial Ecol Health Dis* 6 : 35-42, 1993.
- Zhang DY, Tkahashi J, Seno T, Tani Y & Honda T. Analysis of receptor for *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin with a monoclonal antibody that recognizes glycoporphin B of human erythrocyte membrane. *Infect Immun*. 5332-5337, 1999.
- Zheng L, Roeder RG, Luo Y. S phase activation of the histone H2B promoter by OCA-S, a coactivator complex that contains GAPDH as a key component. *Cell* 114 : 255-266, 2003.



佐藤 寿哉

経歴

平成14年 4月	北海道医療大学歯学部	入学	
平成20年 3月	同	卒業	
平成20年 4月	北海道医療大学歯科内科クリニック	臨床研修歯科医	
平成21年 3月	同	修了	
平成21年 4月	北海道医療大学大学院歯学研究科	入学	
平成25年 3月	同	修了	



〔原著〕

## ラットにおける咀嚼動態の変化に伴う酸化ストレス誘導に関する研究

鈴木 裕仁

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

### Alteration of masticatory performance caused by diet change induces oxidative stress in Wistar rats

Hirohito SUZUKI

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

#### Abstract

Mastication is essential for homeostasis maintenance. Mastication disturbance induces physical and psychological stress. The levels of free radicals, such as superoxide, have been shown to increase following physical and psychological stress and lead to various disorders, including cancer and gastrointestinal ulcers. In this study, we investigated whether masticatory dysfunction causes oxidative stress by changing the feeding style from solid to liquid in a rat model. Seven days after the diet was changed from solid to liquid, serum adrenaline and noradrenaline concentrations increased 205% and

158%, respectively, compared to basal levels. Superoxide production was higher in rats fed a liquid diet than in rats fed a solid diet. Furthermore, serum superoxide dismutase (SOD) activity was lower in rats fed a liquid diet. Decreased serum SOD activity was observed from day 21 to day 84 after the diet was changed from solid to liquid. In rats fed a liquid diet, serum SOD activity returned to normal levels 7 days after the liquid diet was changed back to solid diet. These results show that oxidative stress continues when mastication is disturbed.

**Key words** : mastication, oxidative stress, superoxide dismutase, animal feed, occlusion

#### 1. 緒 言

円滑で調和のとれた咬合・咀嚼機能の営みは、Quality of life (QOL) の確立に重要な因子の一つで、生体情報伝達系である「神経系-内分泌系-免疫系」を賦活し、生体のホメオスタシスに深く関与している。ヒトにおける検討で歯の喪失などによる咬合障害が、顎口腔系機能の低下を引き起こすことのみならず、痴呆の発現、さらには全身の病的老化を促進させ、体幹・四肢の運動機能低下など全身の健康状態を憎悪させることが報告されて

いる (Yoshida, 2006)。ラットにおける検討では、臼歯の切除や飼育飼料形態の変更による咬合・咀嚼機能障害が、大脳の対角帯核・内側中隔核のコリン作動性ニューロン数の減少を引き起こすこと (Makiura et al., 2000)、さらに、海馬におけるアセチルコリン濃度の低下により、記憶・学習機能が低下する (Terasawa et al., 2002) など、中枢神経系との関連が報告されている。

現代社会において、精神的・物質的な因子が複雑に絡み合う社会環境が、我々に身体的・精神的ストレスを与え、活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) の産生

受付：平成25年4月10日 受理：平成25年5月23日

亢進、酸化力が抗酸化力を上回った酸化ストレスを誘導する。酸化ストレスはレドックスバランスが破綻し、臓器機能の異常を導くため、虚血性疾患、脳神経疾患、肝疾患、発癌などの病態の関連要因として注目されている (Moller et al., 1998)。ROSの最上流に位置するスーパーオキシド ( $O_2^-$ ) は、細胞障害が強く、好中球、好酸球、単球、マクロファージなどの血液細胞でNADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) オキシターゼやミトコンドリア呼吸鎖などから多く産生されている (Miyano et al., 2005)。一方、産生された $O_2^-$ は抗酸化酵素のスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) により消去される。酸化ストレスは、身体的ストレスで好中球 $O_2^-$ 産生の亢進や、心理的ストレス下によるSOD活性の変化など、 $O_2^-$ やSODを指標として評価されている (Sanchez et al., 2006)。

しかし、咬合や咀嚼機能の低下と酸化ストレスの関連は未だ明らかにされていない。そこで、本研究ではラットに液体飼料のみを摂取させ、咀嚼動態に変化を与えることが、酸化ストレスを誘導するのか、活性酸素発生機構として好中球 $O_2^-$ 生成能、および酸化に対する防御代謝として血清SOD活性の両面から酸化ストレスを評価した。

## 2. 実験方法

### 1) 実験動物と飼育条件

実験動物はWistar/ST雄性ラット (三協ラボサービス社製) 9週齢96匹を、1ケージ2匹を上限で飼育した。飼育条件Aとして、すべてのラット (計64匹) は通常の固形飼料 (オリエンタル酵母社製) で飼育を開始し、10週齢になった時点で、液体飼料 (ヒト経腸栄養剤エンシユア・リキッド, アボットジャパン社製) で飼育する液体飼料飼育群と、液体飼料と同一成分で作製された固形飼料で飼育する固形飼料飼育群の2群を設定し各々の検討を行った (図1)。飼育条件Bとして、10週齢になった時点で、液体飼料飼育群と固形飼料飼育群の2群 (計16匹) を設定し、飼育飼料変更後4週目以降に、液体飼料飼育群では、液体飼料から通常の固形飼料へと戻した (図1)。飼育条件Cは、咬合挙上を4週間施行した咬合挙上群と、正常の咬合で飼育した対照群の2群 (計16匹) を設定した (図1)。

飼育飼料および水は自由摂取とした。飼育条件は、室温 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $65 \pm 5\%$ 、換気回数10回以上/時間、白色蛍光灯による人工照明とし、午前8時から午後8時までを明期に、午後8時から午前8時までを暗期に維持された明暗環境下の本学動物実験センターにて飼育し

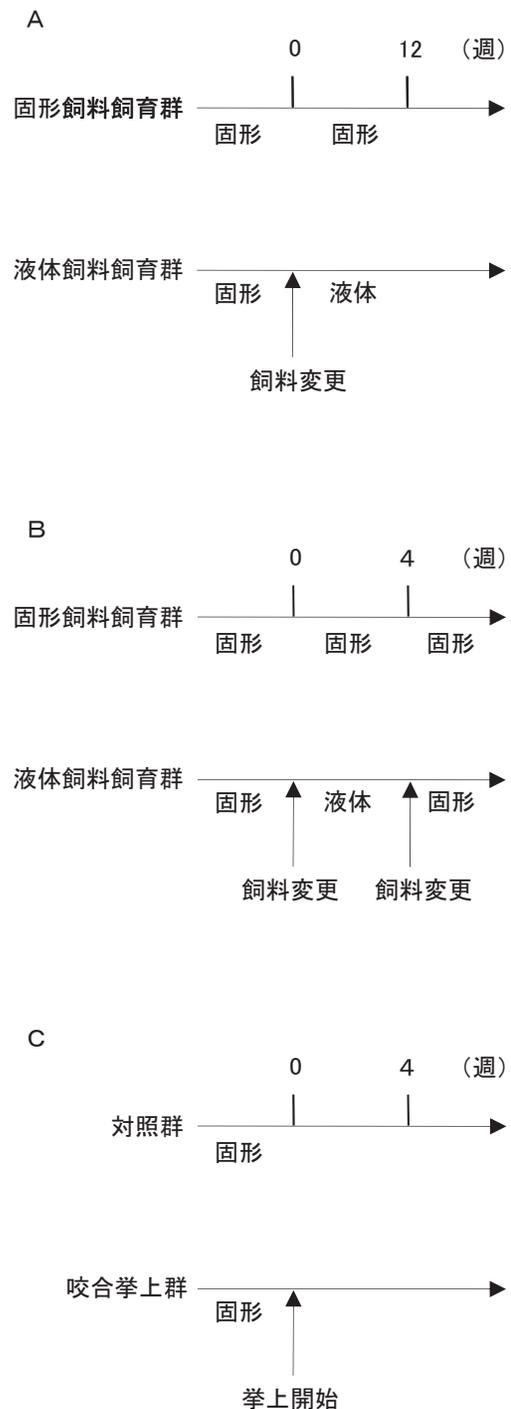


図1  
A: 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の飼育条件  
B: 液体飼料から固形飼料へ飼料変更した飼育条件  
C: 咬合挙上群と対照群の飼育条件  
各図上記記載の週齢は飼料変更後の週齢を示す。

た。

### 2) 体重測定

飼育飼料変更後1週間隔で、12週目まで、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群のラットの体重測定を、明期である午後8時に行った。

### 3) 血中カテコールアミン濃度の測定

飼料変更後1週間隔で、ジエチルエーテル麻酔下、定

時刻に尾部より採血し血漿を回収した。アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン濃度の測定は、電気化学検出器付高速液体クロマトグラフィー (High Performance Liquid Chromatography-Electrochemical Detector; HPLC-ECD) を用いてアルミナ吸着法により行った。1.5M Tris buffer (pH8.6) 1 ml, 0.1M EDTA・2 Na100 $\mu$ l, 酸化アルミナ30 $\mu$ g, 内部標準物質としてイソプロテレノール (Isoproterenol・HCl) に、血漿を加え、5分間振盪させ、アルミナに吸着させた。その後、アルミナを水洗し、遠心分離式ディスポーサブル限外濾過器 (Ultrafree-MC, MILLIPORE社製) に移し替え、4 $^{\circ}$ C, 2000rpmで5分間、遠心分離した。アルミナに2%酢酸を反応させ、受器を交換後2000rpmで5分間、遠心分離し、ろ液をHPLC-ECDに注入した。測定には、電気化学検出器ECD-300 (エイコム社製, 京都), カラム (EICOMPAK SC-5 ODS  $\phi$ 3.0mm $\times$ 150mm), プレカラム (PREPAK  $\phi$ 4.0mm $\times$ 5.0mm), 送液ポンプ (EP-300), カラム恒温槽 (ATC-300), 脱気装置 (DG-300), データ処理装置 (EPC-500) によって構成されているHPLC-ECDを使用した。移動相は、EDTA・2 Na (5 mg/l), 1-オクタンスルホン酸ナトリウム (100mg/l), およびメタノール (17%), を含む0.1Mクエン酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH3.5) を用いた。条件は、流速 (0.5ml/min), 作用電極 (WE-3 G, ガスケットGS-25), 印加電圧 (+750mV vs Ag/AgCl), 設定温度 (25 $^{\circ}$ C) とした。アドレナリン, ノルアドレナリン, およびドーパミン濃度は、クロマトグラムピーク高さより内標準法を用いて算出した (Hamaue et al., 1999)。

#### 4) 好中球O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能の測定

O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能は、二波長分光光度計 (556型, 日立製作所社製) を用いてシトクロムc (Cyt c) 還元法により測定した。ジエチルエーテル麻酔下において、5%カゼイン (和光純薬社製) 溶液 (in0.9%saline) 100ml/kg量を、腹腔内投与し16時間後に好中球を含む腹腔内滲出液を回収し、2000rpm, 5分間, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離を行った。その後、下層の細胞層を0.1%NaCl溶液 (低張) と1.7%NaCl溶液 (高張) にて溶血させ、リン酸緩衝液にて洗浄し、好中球懸濁液を作成した (Mege et al., 1986; Laurent et al., 1991)。好中球数と生存率の測定は、自動血球カウンター (Nucleo counter, 株式会社エムエステクノシステムズ社製) を用いた。好中球懸濁液に細胞膜を破壊する目的の細胞処理試薬 (株式会社エムエステクノシステムズ社製) を加え、蛍光染色された細胞核を測定する自動血球カウンターにて全細胞数を測定した。同時に死細胞数も測定して生存率 (全細胞数-死細胞) を

求め、好中球数を算出した。1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/mlに調整した好中球懸濁液に、Cyt c (1 mg/ml) (Sigma社製) を添加し、刺激前のベースラインを記録した。好中球の刺激物質であるホルボール12-ミリスチン酸13-酢酸塩 (PMA) (Sigma社製) を25 $\mu$ g/mlの濃度で、好中球懸濁液に加えて攪拌し、Cyt cとの還元反応を開始させ、550nmの吸光度の増加 (Cyt c還元速度) を10分間計測した。各測定はウマ赤血球由来のSOD (10 $\mu$ g/ml) (Sigma社製) を加え、Cyt cとO<sub>2</sub><sup>-</sup>の還元反応が停止することを確認した。好中球O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能 (nmol/min/10<sup>7</sup> cells) は、計算式 [各測定で得られた反応曲線の最大傾斜線の傾き $\div$ Cyt cの吸光度係数19.1 $\times$ 1000と、1 $\times$ 10<sup>7</sup> cells/ml $\times$ 0.2ml (好中球懸濁液添加量)] より、10<sup>7</sup> cells当たりで算出し、その平均値を求めた (Hattori et al., 2005)。

#### 5) 血清SOD活性の解析

ジエチルエーテル麻酔下、尾部より採血を行い、血清を回収した。測定は電子スピン共鳴装置 (Electron Spin Resonance spectrometer, 日本電子社製) を使用した。O<sub>2</sub><sup>-</sup>産生は、hypoxanthine (ヒポキサンチン, HX, 和光純薬社製) とxanthine oxidase (キサンチンオキシダーゼ, XOD, Roche社製), O<sub>2</sub><sup>-</sup>の捕捉剤にはCYPMPO (5-(2,2-dimethyl-1,3-propoxy cyclophosphoryl)-5-methyl-1-pyrrolineN-oxide, ラジカルリサーチ社製) (Kotake et al., 2006), 安定剤にはDTPA (Diethylene Triamine Pentaacetic Acid, Sigma社製) を用い電子スピン共鳴 (ESR)・スピントラッピング法にてO<sub>2</sub><sup>-</sup>の消去能を測定した (Hujii et al., 2006; Kohno, 2010)。ESR装置の測定条件は、Sweep width = 5 mT, Sweep Time = 2 min, Gain = 6.3 $\times$ 100, Modulation Width = 1.0 $\times$ 0.1 mT, Time constant = 0.1 sec, Center Field = 335.5 mT, Power = 10 mW, Frequency = 9.43GHzで、測定は室温で行った。マイクロチューブに、リン酸緩衝液 (100mM), CYPMPO (200mM), DTPA (10mM), HX (10mM), および、10 $\mu$ lの血清と10 $\mu$ lのXOD (0.2U/ml) を加え30 $^{\circ}$ Cで5分間静置させた。反応液を毛细管に移し、30秒後よりESR装置にてCYPMPO-スーパーオキシド-スピンアダクトのシグナル強度を得た。その解析は、リン酸緩衝液によるESRスペクトラム量をコントロールの100%とし、血清のESRスペクトラム量を、計算式 [血清のスーパーオキシド抑制率 = control- sample/sample; control (リン酸緩衝液), sample (血清)] から抑制率を求めて行った。得られた各検体の抑制率を、ウマ赤血球由来の標準SOD (Sigma社製) で作成した検量線を用いて、血清SOD活性を解析した (Naito et al., 1994; Owada, 2005)。

### 6) 咬合挙上群の血清SOD活性の解析

ジエチルエーテル麻酔下、ラット上顎臼歯部（第1臼歯、第2臼歯、第3臼歯）両側咬合面を良く乾燥させて歯面処理を施した後、歯科用接着性レジン（スーパーボンド；サンメディカル株式会社製）を約1mmの高径にて築盛した咬合挙上モデルラット（咬合挙上群）を作製した（Yoshihara et al., 2001）。咬合挙上群と通常の固形飼料で飼育した対照群を設定し、飼育開始より1週間隔で4週目まで体重測定と尾部より採血を行い、血清を回収し、血清SOD活性を解析した。

### 7) 統計処理

実験結果は、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の2群間で、平均値をStudent *t* testを用いて統計処理を行った。有意水準は5%に設定し、統計解析ソフトSPSSを用いた。

なお、本研究におけるすべての動物実験は、北海道医療大学実験動物委員会、札幌医科大学実験動物委員会の承認を得て行った。

## 3. 結 果

### 1) 体重変化

体重測定は、飼育飼料変更前を0週とし、飼料変更後12週目まで測定した。固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の両群間での体重変化は、有意差を認めなかった（図2）。また、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群において、血液一般（赤血球数、白血球数、血色素、ヘマトクリット、平均赤血球容積、平均赤血球血色素、平均赤血球血色素濃度）、および生化学的検査（総タンパク、アルブミン、中性脂肪）は両群間に差異がなかった。

2) 固形から液体への飼料形態の変化は血中カテコールアミン濃度を上昇させる

固形から液体への飼料形態の変化が、ストレスとなりうるのか、ストレスマーカーの指標である血中カテコールアミン濃度をHPLC法にて測定した。血中アドレナリン濃度（pg/ml）は、液体飼料飼育群では827.1 ± 320.1（1週目）、866.1 ± 330.1（2週目）、692.1 ± 400.1（3週目）、854.5 ± 189.4（4週目）、固形飼料飼育群では378.1 ± 218.1（1週目）、278.1 ± 142.8（2週目）、214.1 ± 95.6（3週目）、316.3 ± 126.2（4週目）、および、血中ノルアドレナリン濃度（pg/ml）は、液体飼料飼育群では610.1 ± 47.6（1週目）、625.4 ± 114.1（2週目）、614.6 ± 115.5（3週目）、784.9 ± 339.9（4週目）、固形飼料飼育群では331.7 ± 69.7（1週目）、440.1 ± 106.4（2週目）、332.1 ± 118.6（3週目）、463.3 ± 107.2（4週目）であり、飼料変更後1, 2, 3, 4週目において、血中アドレナリンとノルアドレナリン濃度は固形飼料飼育群に比べ、液体飼料飼育群では有意に増加していた（ $p < 0.05$ ）（図3）。一方、血中ドーパミン濃度は、両群とも測定感度以下であり、測定不能であった。

3) 固形から液体への飼料形態の変化は好中球の $O_2^-$ 生成能を亢進する

固形から液体への飼料形態の変化が、好中球 $O_2^-$ 生成能に影響を与えるのか、Cyt c還元法にて検討した。固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の好中球の生存率は平均95%以上であった。 $O_2^-$ 生成能（nmol/min/10<sup>7</sup> cells）は、液体飼料飼育群では4.53 ± 0.34（1週目）、4.80 ± 1.76（2週目）、5.55 ± 1.66（3週目）、4.77 ± 1.79（4週目）、固形飼料飼育群では2.60 ± 0.23（1週目）、2.51 ± 0.26（2週目）、3.43 ± 1.50（3週目）、3.57 ± 1.75（4週目）であり、飼料変更後1, 2, 3週目において、液体飼料飼育群では固形飼料飼育群と比較し、有意

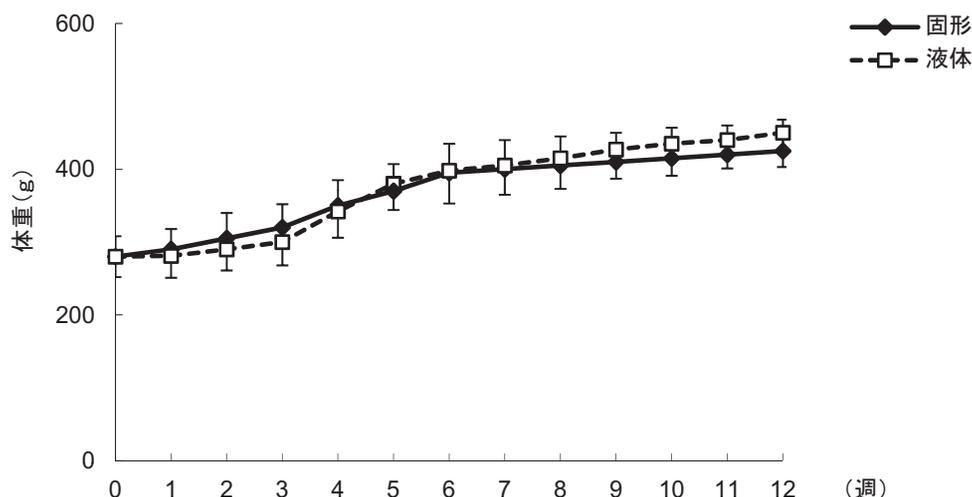


図2 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群における飼料変更後の体重標準偏差をエラーバーで示す。両群間での体重変化には有意差を認めなかった。

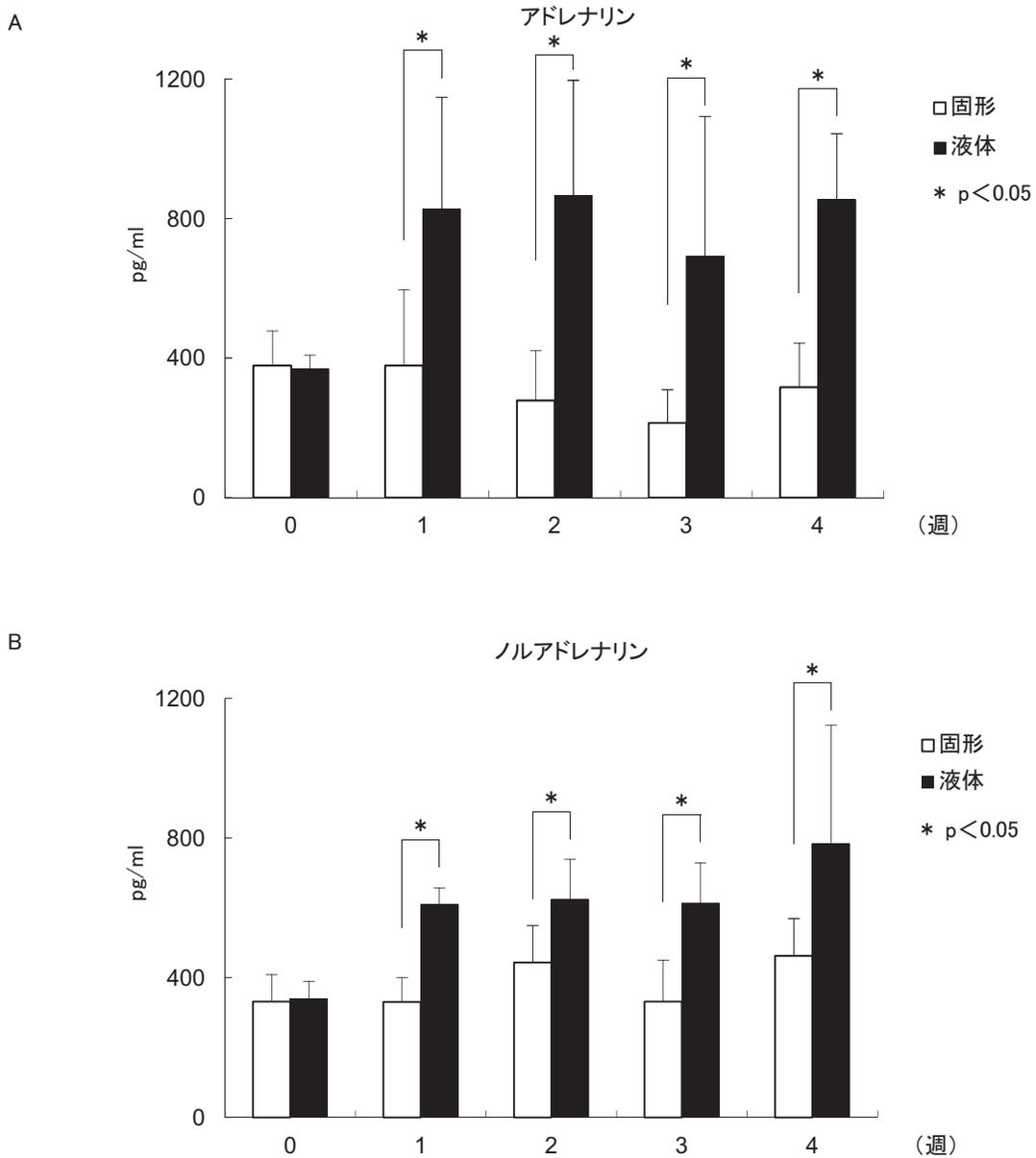


図3 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群のHPLC法による血中アドレナリン (A) とノルアドレナリン (B) 量の経時的变化標準偏差をエラーバーで示す。\*: 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

に亢進していた ( $p < 0.05$ )。飼料変更後4週目においても両群に有意差はなかったものの、液体飼料飼育群では好中球 $O_2^-$ 生成能の亢進がみられた (図4)。

4) 固形から液体への飼料形態の変化は血清SOD活性を低下させる

ESRスペクトラムは、CYPMPOで捕捉した $O_2^-$ に特異的な4番目のピークを解析した。血清の $O_2^-$ の消去率 (%) は、液体飼料飼育群では、 $52.7 \pm 6.6$  (1週目),  $49.5 \pm 5.8$  (2週目),  $42.7 \pm 8.7$  (3週目),  $39.8 \pm 7.5$  (4週目), 固形飼料飼育群では $56.3 \pm 4.6$  (1週目),  $55.5 \pm 5.6$  (2週目),  $54.6 \pm 4.7$  (3週目),  $54.8 \pm 6.5$  (4週目)であった。固形飼料飼育群に比べ、液体飼料飼育群ではESRスペクトラムのピークが高く、 $O_2^-$ 消去能の低下が認められた (図5)。検量線 (図5)

から解析した血清SOD活性は、飼料変更後、1, 2週目において、両群間に有意差を認めなかった。しかし、3週目以降、12週目まで液体飼料飼育群は、固形飼料飼育群と比較して、血清SOD活性の有意な低下が認められた ( $p < 0.05$ ) (図6)。

さらに、液体飼料飼育から固形飼料飼育へと、飼育飼料形態を元に戻した時の血清SOD活性を検討した。10週齢で飼料変更を行い、固形飼料飼育群と液体飼料飼育群の2群を設定した。飼育飼料変更後4週目に、液体飼料飼育を固形飼料へと戻し血清SOD活性を解析した。飼育飼料を固形飼料飼育へと戻した5週目以降で、固形飼料飼育し続けた群と同程度まで血清SOD活性は明らかに上昇し、両群間において有意な差は認められなくなった (図7)。

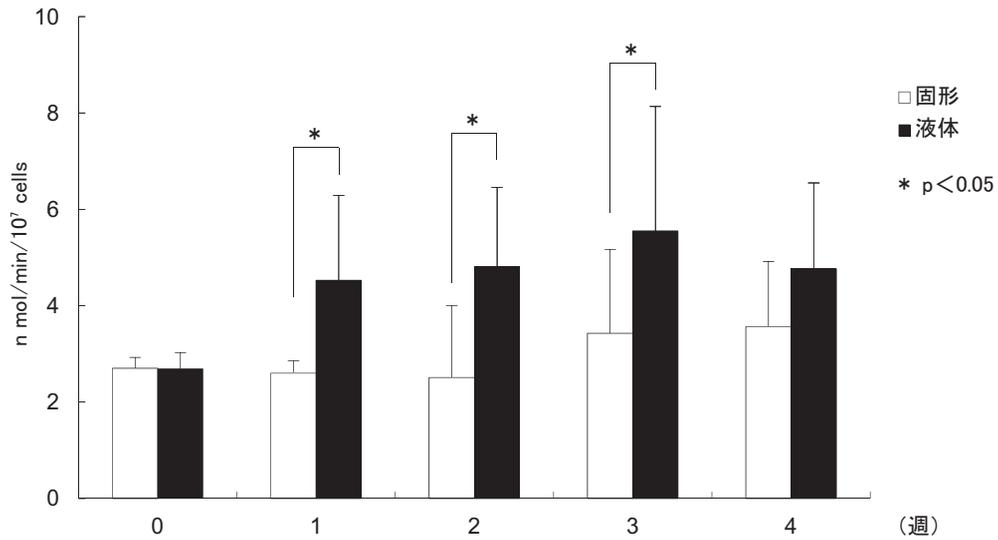


図4 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群における好中球スーパーオキシド ( $O_2^-$ ) 生成能の経時変化  
標準偏差をエラーバーで示す。\* : 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

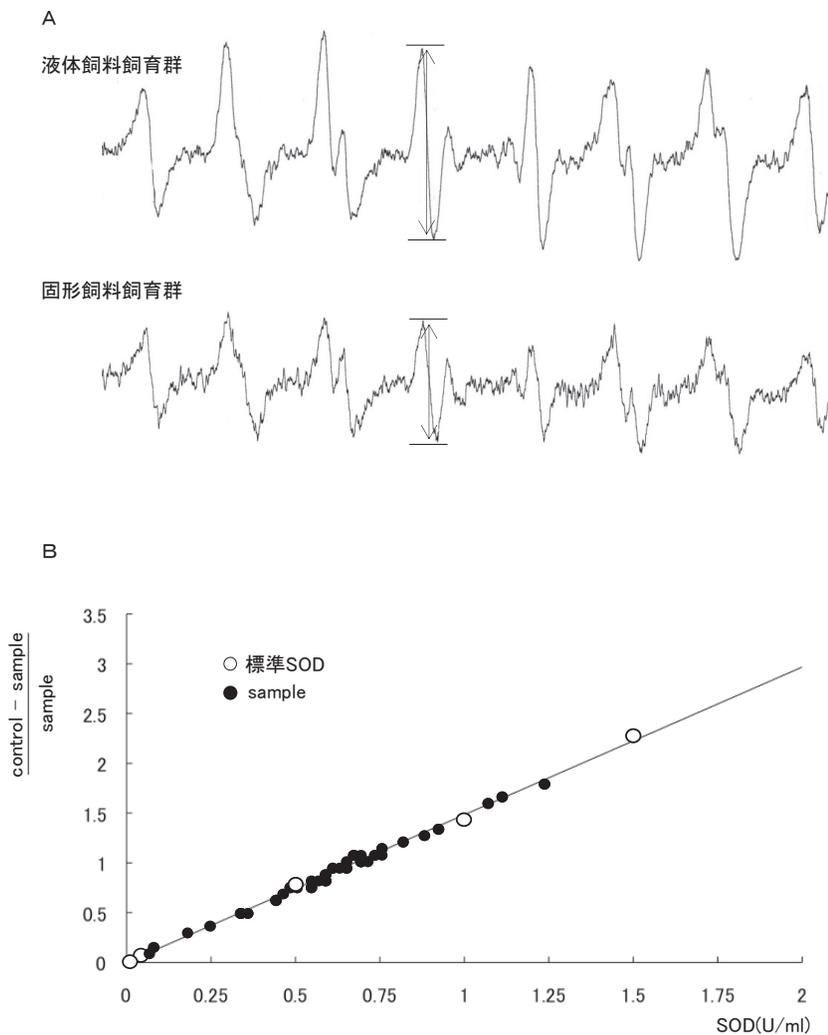


図5

A : 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群のESR (Electron Spin Resonance) スペクトラム

上段は液体飼料飼育群, 下段は固形飼料飼育群のESRスペクトラムを示す。

ESRスペクトラムは, CYPMPDで捕捉した $O_2^-$ に特異的な左から4番目のピークを解析した。固形飼料飼育群に比べ, 液体飼料飼育群ではスペクトラムのピークが高く,  $O_2^-$ 消去能の低下が認められた。

B : SOD活性の検量線

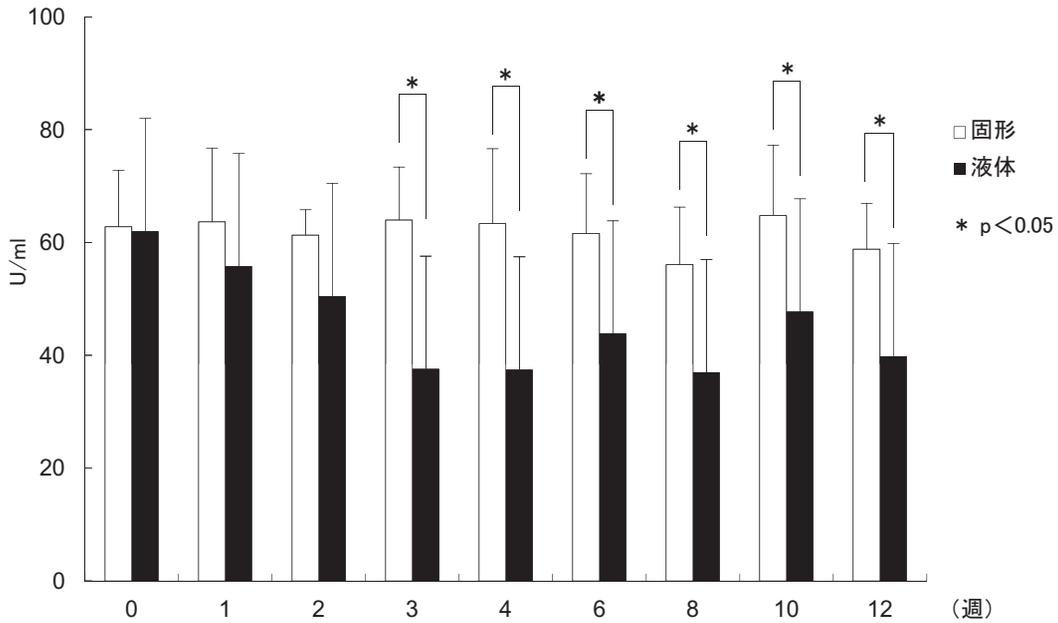


図6 固形飼料飼育群と液体飼料飼育群における血清SOD活性の経時的変化  
標準偏差をエラーバーで示す。\*：固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

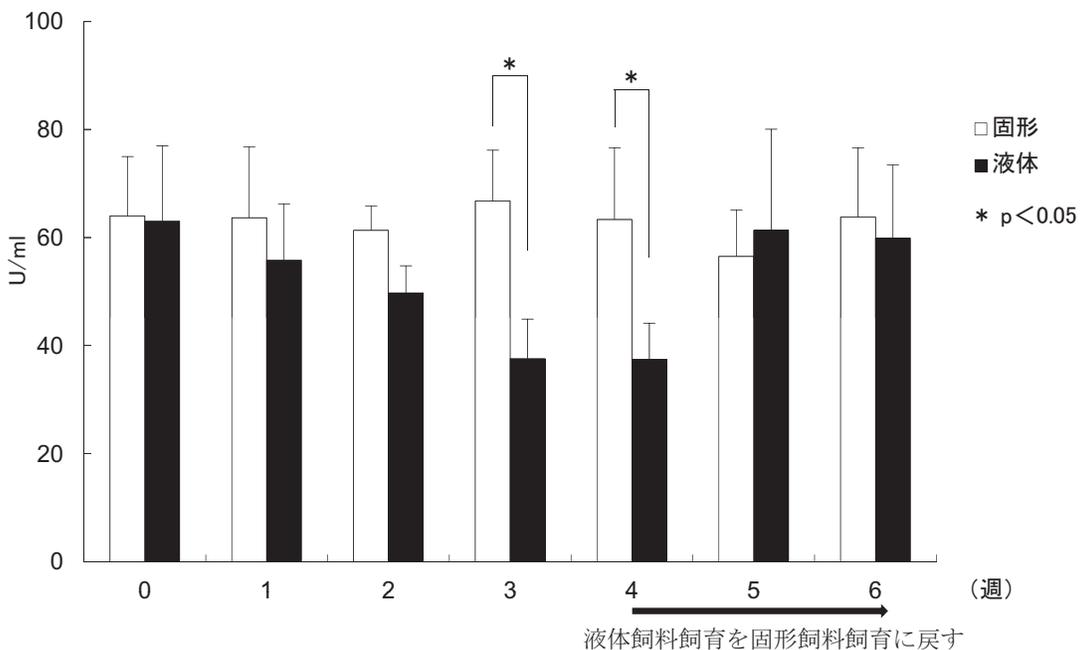


図7 液体飼料から固形飼料へと飼育飼料を戻した時の血清SOD活性  
標準偏差をエラーバーで示す。\*：固形飼料飼育群と液体飼料飼育群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。  
しかし、飼育飼料を固形飼料飼育へと戻した5週目以降で、固形飼料飼育し続けた群と同程度まで血清SOD活性は明らかに上昇し、両群間において有意差は認められなくなった。

5) 咬合挙上は血清SOD活性を低下させる

咬合挙上が酸化ストレスを誘導するのか否か、血清SOD活性を検討した。体重測定は、飼育開始から4週目まで測定し、咬合挙上群と対照群の両群間で差異を認めなかった。また、咬合挙上を行った1週目以降で、咬合挙上群は、対照群と比較し血清SOD活性の有意な低下を認めた ( $p < 0.05$ ) (図8)。

4. 考 察

咬合・咀嚼の機能異常とカテコールアミンに関する基礎的研究は、ラットを用いた粉末飼料飼育、および、臼歯の歯冠切除や咬合挙上モデルにより検討されている (Takigami, 2002 ; Ichihashi et al., 2008)。噛むことが習性であるラットを液体飼料で飼育すると、脳内の神経伝達機構の障害により行動リズムの変化が生じること、ストレス応答としてHPA (Hypothalamic-Pituitary-

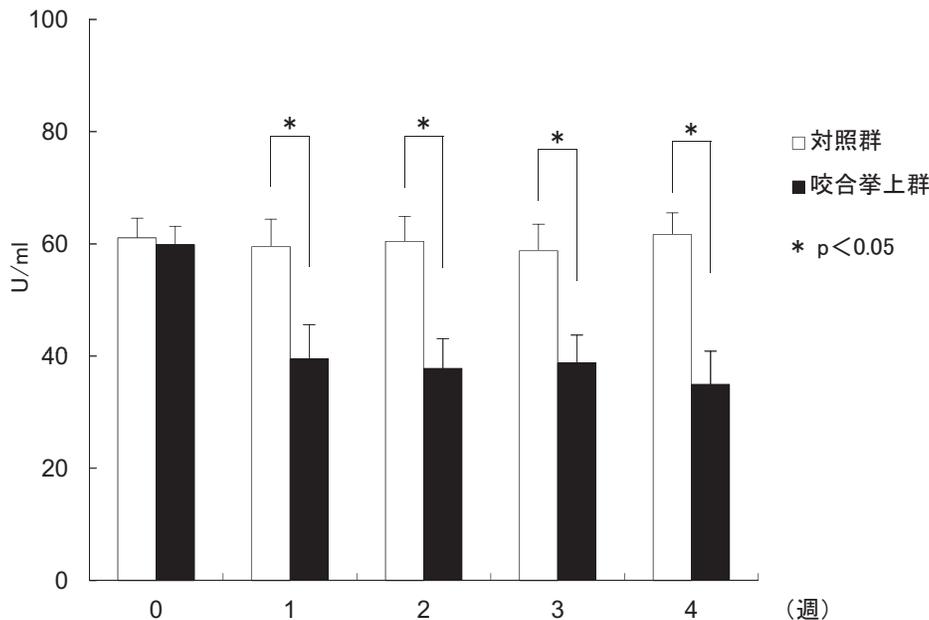


図8 咬合拳上群と対照群における血清SOD活性の経時的変化  
標準偏差をエラーバーで示す。\*：咬合拳上群と対照群との間で有意差を認めた ( $p < 0.05$ )。

Adrenocortical) 系が活性化することが報告されている (吉原ら2001, )。さらに, 咬合干渉がSAM (Sympathetic nervous-Adrenal Medullary) 系およびHPA系の活性化を促すことが, 明らかとなっている (Sasaki, 2002)。本研究では, 飼料を液体飼料に変更後, 1週目から4週目まで, 血中アドレナリンとノルアドレナリン濃度は固形飼料飼育群に比べて, 有意に増加していた。ラットの正常値は血中アドレナリン300~500pg/ml, ノルアドレナリン100~300pg/ml, ドーパミン10pg/ml以下である (Eldrup et al., 2000)。液体飼料飼育群で血中アドレナリン $827.1 \pm 320.1$ pg/ml (飼料変更後1週目), ノルアドレナリン $610.1 \pm 47.6$ pg/ml (飼料変更後1週目)と正常値より増加を示し, 咀嚼動態の変化がラットに対してストレスラーとなることが考えられた。液体飼料飼育は, 咀嚼時の感覚入力に変化を及ぼし, その情報が大脳皮質辺縁系から視床下部に伝わり, SAM系が活性促進したためにアドレナリンおよびノルアドレナリン量が増加したと推測される。また, 血中ドーパミンは速やかにノルアドレナリンに代謝されるため, 血中では低濃度であり, 本研究では測定できなかったと考えられる。

酸化ストレスの評価は, DNA, 脂質や糖などの酸化, 抗酸化関連酵素および抗酸化物質により生化学的, 免疫学的に行われているが, 日内変動や正常値・カットオフ値の設定など多くの問題を有している (渡辺ら, 2007; Matsumoto et al., 2008)。本研究では, カゼイン溶液を腹腔内投与して誘導された好中球をCyt c還元法により, 活性酸素産生系として $O_2^-$ 生成能を測定した。顆粒球を含む好中球は, 末梢血から採取するのが一

般的である。しかし, 齧歯類ではその回収効率が低いために, 腹腔内に誘導した好中球を用いた (Mathison et al., 2006)。Cyt c還元法は測定方法の簡便なこと, さらに酵素同士の連鎖反応が少ないことから $O_2^-$ の半定量的測定に適している (Kusakabe et al., 2008)。

$O_2^-$ 産生亢進は, ノルアドレナリンによりNADPHオキシターゼが活性化することで生じる (Xiong et al., 2012)。また, 拘束ストレス負荷時による血中カテコールアミンやコルチコイドの上昇が, IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカイン量を増加させる (Lan, 1995; Kopprasch et al., 1997; Pedersen et al., 2003)。液体への飼料変更は, 血中カテコールアミン量を増加させ, 好中球のNADPHオキシターゼを活性化し $O_2^-$ 産生が生じたと考えられる。

一方, 活性酸素消去系の検討は, 血清による $O_2^-$ 消去能を電子スピン共鳴 (ESR)・スピントラッピング法にて, 血清SOD活性の解析を試みた。SODは $O_2^-$ の消去酵素で, その活性の測定にはCyt c法, ニトロブルー・テトラゾリウム (NBT) 法, 亜硫酸法などの分光学的方法や, 抗原抗体反応を利用したRIA法, EIA法などが用いられている。しかしながら, 測定感度, 再現性, 特異性, コスト面および操作が煩雑であるなど様々な問題点がある。ESR・スピントラッピング法は, 操作性や感度が良く, しかも, 不安定なフリーラジカルをトラップ剤と反応させるため, 安定したスピニアダクトに返還させて解析する方法である (高山, 2002)。本研究は, ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼ系で人工的に $O_2^-$ を産生させ, トラップ剤としてCYPMPOを用い

CYPMPO-O<sub>2</sub><sup>-</sup>スピアダクトに返還し、ESR装置にて画像化し検討した。Kamibayashi (2010) が開発したCYPMPOは、ヒドロキシラジカル (OH<sup>-</sup>) とO<sub>2</sub><sup>-</sup>の区別がスペクトラムの波形より可能で、O<sub>2</sub><sup>-</sup>アダクトの半減期が長く、さらに、室温での安定性が高いことなどの特徴を有している。

SODは、Cu, Zn-SOD (細胞質内)、Mn-SOD (ミトコンドリア内)、EC-SOD (細胞外分泌型) の3種類のアイソザイムがある。Cu, Zn-SODやMn-SODは細胞内に存在しているが、Marklandら (1996) により血中に存在するEC-SODが発見された。EC-SODは、血管壁にヘパラン硫酸を介して結合している。しかしながら、血清中では、C末端プロテアーゼ分解され、様々な親和性をもった分画を有するEC-SODも存在すると考えられている (Adachi T et al., 1996)。炎症疾患や虚血-再還流時にO<sub>2</sub><sup>-</sup>は、好中球から多量に産生し (Roberto, 1989)、血管内皮細胞に障害を与える。液体飼料飼育による好中球O<sub>2</sub><sup>-</sup>生成能の亢進は飼料変更後1週目以降、SOD活性の低下は飼料変更後3週目以降に生じた。この経時的動態の差違は、好中球から生成されるO<sub>2</sub><sup>-</sup>が持続的に増加したことにより、血管内皮細胞が損傷を受け、EC-SOD活性が低下したと考えられる。

飼育飼料を液体から固形へと戻すことで、固形飼料で飼育し続けた群と同程度まで血清SOD活性が回復した。これは、飼料形態を元に戻すことで好中球の活性化が抑制され、活性酸素の産生系と消去系のバランスが平衡状態を呈し、生体が受けていた酸化ストレスから解放されたためであると予想される。生体は咀嚼動態の変化に順応することなく、生体で適応した咀嚼が営まれるようになると、早期にストレス負荷が軽減されることが推察された。

また、顎口腔系の機能異常を解析することは、咀嚼動態の変化に留まらず、咬合も考慮することが重要である。咬合挙上による咬合干渉が生体に与える影響は、動物モデルのみならずヒトの研究で多く報告されているが (Ibaraki, 1992)、酸化ストレスとの関連は明らかにされていない。本研究では、咬合干渉が血清SOD活性を低下させることで、酸化ストレスを誘導している可能性が示唆された。

## 5. 結 論

本研究では、液体飼料飼育による咀嚼動態の変化に伴う生体への影響を、ラットを用いた動物モデルで、酸化ストレスを指標に、活性酸素発生機構 (産生系) と防御代謝 (消去系) の両面から検討した。本研究の結果か

ら、ラットの飼料形態の変更による咀嚼障害がストレスとなり、生体に酸化ストレスを誘導することが示唆された。健康の維持・向上のためにも、適正な咬合・咀嚼機能の保持が必要不可欠であり、QOLの阻害因子を取り除くために、歯科医学からのアプローチも重要であると考えられる。

## 文 献

- Adachi T, Yamada H, Kato K & Hirano K. Substitution of glycine for arginine-213 in extracellular-superoxide dismutase impairs affinity for heparin and endothelial cell surface. *J Biol Chem* 313 : 235-240, 1996.
- Angela G, Alicia B, Susanne K, Florian H & Johannes M. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels : involvement of corticotropin-releasing hormone. *Neuroscience* 21 : 4822-4829, 2001.
- Eldrup E & Erik A. DOPA, dopamine, and DOPAC concentrations in the rat gastrointestinal tract decrease during fasting. *J Physiol Endo* 279 : 815-822, 2000.
- Hamaue N, Yamazaki N & Minami M. Effect of isatin, an endogenous MAO inhibitor, on acetylcholine and dopamine levels in the rat striatum. *Biol Amines* 15 : 367-377, 1999.
- Hattori H, Imai H, Hanamoto A, Furuhashi K & Nakagawa Y. Up-regulation of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat casein-induced polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 389 : 279-287, 2005.
- Hori N. Biting suppresses stress-induced expression of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat hypothalamus. *J Dent Res* 83 : 124-128, 2004.
- Hujii H, Aoki M, Haishi T, Itoh K & Sakata M. Development of an ESR/MR dual-imaging system as a tool to detect bioradicals. *Magnetic Res Med Sci* 5 : 17-23, 2006.
- Ibaraki R. Effect of in occlusal vertical dimension on chewing movements part I. Influence on the rhythm of chewing movements. *J Jpn Prosthodont Soc* 36 : 1273-1278, 1992.
- Ichihashi Y, Arakawa Y, Kurata C, Iinuma M, Tamura Y, Kubo K & Iwaku F. Participation with occlusal disharmony and stress. *Dent J Health Sci Univ Gifu* 34 : 87-92, 2008.
- Kamibayashi M. Influences of organic solvents on CYPMPO-electron spin resonance spectrain in radical generation systems. *Magnetic Res Med Sci* 10 : 1-12, 2010.

- Kohno M. Application of electron spin resonance spectrometry for reactive oxygen species and reactive nitrogen species research. *J Clin Biochem Nutr* 47 : 1-11, 2010.
- Kopprasch S, Gatzweiler A, Graessler J & Schroder HE.  $\beta$ -adrenergic modulation of FMLP-and zymosan-induced intracellular and extracellular oxidant production by polymorphonuclear leukocytes. *Mol Cell Biol Chem* 168 : 133-139, 1997.
- Kotake Y. Synthesis and characterization of a practically better DEPMPO-type spin trap, 5-(2, 2-dimethyl-1, 3-propoxy cyclophosphoryl) -5-methyl-1-pyrroline N-oxide (CYPMPO). *Free Radic Res* 40 : 1166-1172, 2006.
- Kusakabe M, Kambayashi I, Hujii H & Takeda H. Measurement of superoxide-generating activity of neutrophils using electron spin resonance spectroscopy. *Hlth Sci Med Univ Sapporo* 11 : 21-29, 2008.
- Lan HC. Effect of stress on interleukin-2 receptor expression by bovine mononuclear leukocytes. *Immunopathol* 49 : 241-249, 1995.
- Laurent F, Benoliel AM, Capo C & Bongrand P. Oxidative metabolism of polymorphonuclear leukocytes : modulation by adhesive stimuli. *J Leu Biol* 49 : 217-226, 1991.
- Makiura T, Ikeda Y & Hirai T. Influence of diet and occlusal support on learning memory in rats behavioral and biochemical studies. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 107 : 269-277, 2000.
- Markland SL & Carlsson LM. The rat extracellular superoxide dismutase dimer is converted to a tetramer by the exchange of a single amino acid. *J Biol Chem* 93 : 5219-5222, 1996.
- Mathison RD & Davison JS. The tripeptide feG regulates the production of intracellular reactive oxygen species by neutrophils. *J Infla* 143-9, 2006.
- Matsumoto Y, Ogawa Y, Yoshida R, Kasai H & Ohta H. The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), when stored at room temperature. *J Occup Health* 50366-50372, 2008.
- Mege JL, Capo C, Benoliel AM & Bongrand P. Self-limitation of the oxidative burst of rat polymorphonuclear leukocytes. *J Leu Biol* 39 : 599-616, 1986.
- Miyano K, Tamura M & Sumimoto H. Molecular mechanism for production of reactive oxygen species by neutrophils. *Infla Reg* 25 : 113-118, 2005.
- Moller P, Wallin H & Knudsen LE. Oxidative stress associated with exercise, psychological stress and life-style factors. *J Biol Chem* 102 : 17-36, 1996.
- Nicole G, Schommer MS & Clemens K. Dissociation between reactivity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic-adrenal-medullary system to repeated psychosocial stress. *Psychosomatic Med* 65 : 450-460, 2003.
- Okimoto K. Influence of function immune system-effect of denture on immunological parameters. *J Jpn Prosthodont Soc* 42 : 591-596, 1998.
- Pedersen BK, Plomgaard P & Febbraio MA. Muscle-derived interleukin-6 : lipolytic, anti-inflammatory and immune regulatory effects. *Pflugers Arch* 446 : 9-16, 2003.
- Roberto B. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Med Sci* 86 : 4695-4699, 1989.
- Sanchez R, Santiago E & Mendoza-Nunez VM. Relationship between oxidative stress and cognitive impairment in the elderly of rural vs. urban communities. *Life Sci* 78 : 1682-1687, 2006.
- Sasaki K. Effects of loss of occlusal support on the central nervous system in rats. *J Jpn Prosthodont* 46 : 185-194, 2002.
- 高山房子. フリーラジカルと酸化ストレス - ESRによる測定法を中心に -. *Folia Pharmacol* 120 : 229-236, 2002.
- Takeichi T. Psychological stress caused by occlusal appliances which increased vertical dimension. *Dent J Aichi Gakuin* 38 : 605-609, 2000.
- Takigami K. The influences of different feed forms and altered feed nutrition on the growth and development of the masticatory organs of rats. *Hlth Sci Med Univ Shiga* 17 : 29-41, 2002.
- Terasawa H, Hirai T, Ninomiya T, Ikeda Y, Ishijima T, Yajima T, Hamaue N, Nagase Y, Kang Y & Minami M. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats. *Neurosci Res* 43 : 373-379, 2002.
- 渡辺明治, 新田早実 & 木野山真紀. 心理的ストレスによる酸化ストレス発現のメカニズム. *日本病態栄養学会誌* 10 : 5-23, 2007.
- Xiong F, Xiao D & Zhang L. Norepinephrine causes epigenetic repression of PKCepsilon gene in rodent oxygen species production. *FASEB J* 26 : 2753-2763, 2012
- Yoshida M. Relationship between dental occlusion and falls among the elderly with dementia. *Prosthodont Res*

5 : 52-56, 2006.

Yoshihara T, Matsumoto Y & Ogura T. Occlusal disharmony affects plasma corticosterone and hypothalamic noradrenaline release in rats. J Dent Res 80 : 2089-2092, 2001.

吉原俊博, 松本祐子 & 小椋正. 液体飼料による周期的制限給餌がラット行動リズムに及ぼす影響. 小児歯科学雑誌 39 : 449, 2001.



鈴木 裕仁

昭和56年1月生まれ, 北海道函館市出身  
平成11年3月 函館中部高等学校卒業  
平成18年3月 北海道医療大学歯学部歯学科卒業  
平成23年3月 北海道医療大学歯学研究科博士課程修了  
現在 札幌市内歯科医院勤務



〔原著〕

## 小児における唾液流量, pH, 緩衝能および無機イオン濃度の経年的変化

福田 敦史, 広瀬 弥奈, 村田 幸枝, 八幡 祥子, 首藤 かい, 近藤 有紀, 齊藤 正人

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

## Study of variation in salivary flow rate, pH, buffer capacity, and inorganic ion concentrations obtained from 3, 4 and 5 year-old children

Atsushi FUKUDA, Mina HIROSE, Yukie MURATA, Shoko YAHATA,  
Kai SHUDOHO, Yuki KONDOH, Masato SAITOH

Division of Pediatric dentistry, Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

## Abstract

The aim of this study was to determine the variation in salivary flow rates, pH levels, buffer capacity and ion concentration in children from 3 consecutive age groups. Whole unstimulated saliva samples were collected from 152 healthy children from 3 age groups ; 3 year-old, 4 year-old and 5 year-old children. The saliva was collected into a pre-weighed sampling tube over a predetermined period of 5 minutes. After collecting the saliva, we measured flow rates (ml/min). Salivary pH levels and buffer capacity were determined using Checkbuff<sup>®</sup>. The inorganic ion concentrations were ana-

lyzed using an ion chromatography. The highest salivary flow rates were found in the samples taken from the 5 year-old age groups ( $p<0.01$ ). No differences in pH levels or buffer capacity were found among the 3 groups. The inorganic ion concentrations of sodium and phosphate were variable, and were significantly different between the 4 year-old and the 5 year-old age groups ( $p<0.01$ ). Based on the results of this study, it became clear that some salivary factors in children changed with age.

Key words : saliva, children, variation with age

## 緒 言

唾液は口腔内を健康に保つ上で極めて重要であり, 唾液流量, pH, 緩衝能, 成分 (無機イオン濃度, タンパク, 酵素), 細菌などの因子を分析することにより, 個々のう蝕リスクを診断することが可能である. しかし, 唾液成分は, 唾液分泌を促す刺激の種類や強さ, 時間帯, 食事, 年齢, 性別, 病気などにより影響を受ける (Mandel, 1974 ; Hay, 1995) ため, 唾液成分とう蝕との関係性については明確ではない点が多い. 乳歯や幼若永久歯のエナメル質は, 成熟したエナメル質と比べて脱灰しやすい反面, イオンを取り込みやすい特徴を有してい

ることから, 唾液イオン濃度を指標としたう蝕リスク診断は小児において極めて意義があるといえる. 唾液イオンを指標としたう蝕リスク診断法を確立するためには, まず基準値を明確にする必要がある. しかし, 唾液イオン濃度に関する報告のほとんどは成人を対象としたものであり, 小児を対象とした報告は少ない. Gutman and Ben-Aryeh (1974) は, 安静時唾液の流量, 無機イオン濃度 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) を小児グループ (6-12歳), 若年者グループ (15-21歳), 高齢者グループ (60-76歳) で比較し, 高齢者グループは $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ が最も高く, 流量が最も少なかったと報告している. また Ben-Aryeh et al. (1990) は, 安静時唾液のタンパク,

受付:平成25年4月11日 受理:平成25年5月29日

IgA, アミラーゼ, 無機イオン濃度 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) を乳児グループ (7-11か月), 幼児グループ (2-3歳), 児童グループ (6-8歳), 青年グループ (12-14歳), 成人グループ (25-63歳) で比較し, タンパク以外は経年的変化がみられたと報告している. これらは小児における唾液因子 (流量, pH, 緩衝能, 無機イオン濃度) を検討する上で経年的な成長発達を考慮しているが, 年齢が異なる被験者を同一グループとしている. 小児における成長発達は著しいことから, 経年的変化を調べるには, 歴年齢別に検討する必要があると思われる. そこで, 今回は小児における唾液因子を指標としたう蝕リスク診断法を確立する上で必要となる基礎データの一部を明らかにすることを目的とし, 3歳児, 4歳児, 5歳児を対象とした唾液因子の経年的変化について検討した.

## 方 法

対象は札幌市内の某幼稚園へ通園していた幼児のうち, 保護者から本研究への理解と同意を得られた3歳児30名, 4歳児54名, 5歳児68名のべ152名である.

唾液採取にあたり, 朝食後1時間以上経過していることを確認した後, 午前10時から11時30分の間にて, 事前に計量したポリプロピレン製試験管 (IWAKI) を座位での吐出法にて安静時唾液を5分間採取した. 採取した安静時唾液は計量し, 毎分流量 (ml/min) を求めた. 唾液のpHと緩衝能はチェックバフ® (モリタ) にて通法に従い測定した (広瀬ら 2006). 残りの唾液はミリポアマイクロチューブ® (0.45 $\mu\text{m}$ , ミリポア) に入れ, 5000g, 4°C, 30分間遠沈操作後, 濾過した唾液を超純水にて2倍希釈したものをサンプルとし, 無機イオン濃度 ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ) を高速イオンクロマトグラフィ (SCL-10Asp, 島津) にて測定した. 分析条件を表1に示す. 無機イオン濃度測定に使用した唾液は測定まで-20°Cで凍結保存したが, 凍結すると測定が困難になるといわれている  $\text{Ca}^{2+}$  (Tenovuo, 1998) は, 即日測定した.

統計学的解析は, 各唾液因子における年齢別の比較について Kruskal-Wallis testを行い, 有意差が認められた因子についてはさらにMann-Whitney U-test with Bonferroni correctionにて多重比較検定を行った.

なお, pHについては $10^{-\text{pH}}$ に変換後検定を行った.

## 結 果

年齢別における唾液流量, pH, 緩衝能, 無機イオン濃度の結果を表1に示す. Kruskal-Wallis testにおいて, 唾液流量は危険率1%で有意差が認められ, 5歳児が最

表1 分析条件

	陽イオン	陰イオン
カラム	Shim-pack IC-C 3	Shim-pack IC-SA 2
ガードカラム	-	Shim-pack IC-SA 3 (G)
移動相	12mM炭酸水素ナトリウム 0.6mM炭酸ナトリウム	3.0mMシュウ酸
流量	1.2ml/min	1.0ml/min
温度	30°C	30°C
検出感度	0.1 $\mu\text{s/cm}$	0.1 $\mu\text{s/cm}$
注入量	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$

も高かった. pHは統計学的有意差が認められなかったが, 経年的低下の傾向を示した. 緩衝能も統計学的有意差が認められなかったが, 経年的上昇の傾向を示した. 無機イオン濃度については,  $\text{Na}^+$ において危険率5%で有意差を認め, また $\text{PO}_4^{3-}$ において危険率1%にて有意差を認めた. その他の無機イオンは統計学的有意差を認めなかった.

そこで, 統計学的有意差が認められた唾液流量,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ における年齢別の比較について多重比較検定を行った. その結果, 唾液流量においては, 3歳児と5歳児との間, 4歳児と5歳児との間に危険率1%, 3歳児と4歳児との間に危険率5%で有意差が認められた (図1).  $\text{Na}^+$ においては, 4歳児と5歳児との間に危険率1%で有意差が認められた (図2). また $\text{PO}_4^{3-}$ においても4歳児と5歳児との間に危険率1%で有意差が認められた (図3).

## 考 察

### 1. 唾液流量, pH, 緩衝能について

唾液流量は統計学的有意差を認め, 5歳児が最も多く, 3歳児が最も少なかった. この理由として, 唾液腺の成長発達が考えられ, 成長とともに分泌能も高くなるためと考えられた. Crossner (1984) は, 唾液腺は15歳までに十分な発達を遂げ, 分泌量も成人とほぼ同等になるとしている. 過去の研究では, Gutman et al. (1974) は小児 (6~12歳) 群, 若年 (15~21歳) 群, 高齢 (60~76歳) 群における安静時唾液流量の相違について調べたところ, 小児群が最も多く, 高齢群が最も少なかったと報告している. またAnderson et al. (2001) は小児 (6~12歳) と成人 (19~44歳) における安静時唾液流量に有意差を認めなかったと報告している. さらに, Wu et al. (2008) は小児における唾液流量を3~5歳群, 6~11歳群, 12~14歳群に分けて調べた結果, 3~5歳群, 6~11歳群との間に統計学的有意差を認め, 6~11歳群の方が高かったことを報告している. これらの報告からも, 唾液流量は思春期頃まで経年的に増加すると推

表2 年齢別における唾液流量, pH, 緩衝能, 無機イオン濃度

	3歳児 (n=30)	4歳児 (n=54)	5歳児 (n=68)	Kruskal-Wallis test
flow rate (ml/min)	0.32±0.18	0.45±0.26	0.63±0.28	P<0.01
pH	7.73±0.43	7.60±0.27	7.59±0.27	NS
buffer capacity (pH)	5.48±0.61	5.64±0.76	5.77±0.66	NS
Na <sup>+</sup> (ppm)	121.89±101.21	96.81±60.81	118.30±56.21	P<0.05
Mg <sup>2+</sup> (ppm)	2.05±1.65	1.52±0.61	1.54±0.70	NS
Ca <sup>2+</sup> (ppm)	35.89±22.74	35.21±13.00	35.65±12.33	NS
K <sup>+</sup> (ppm)	870.36±263.76	779.54±201.80	809.10±173.83	NS
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (ppm)	143.03±91.71	129.28±104.03	136.73±89.92	NS
F <sup>-</sup> (ppm)	0.08±0.15	0.08±0.13	0.05±0.12	NS
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (ppm)	23.81±13.60	23.56±9.38	22.56±10.07	NS
Cl <sup>-</sup> (ppm)	3518.42±1915.11	2791.58±715.14	2757.50±822.25	NS
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> (ppm)	515.93±230.13	421.51±129.22	500.10±155.76	P<0.01
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (ppm)	3.27±3.21	3.17±4.96	2.75±4.55	NS

mean±SD

年齢別における唾液因子の相違は、唾液流量、Na<sup>+</sup>、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>において統計学的有意差を認めた。

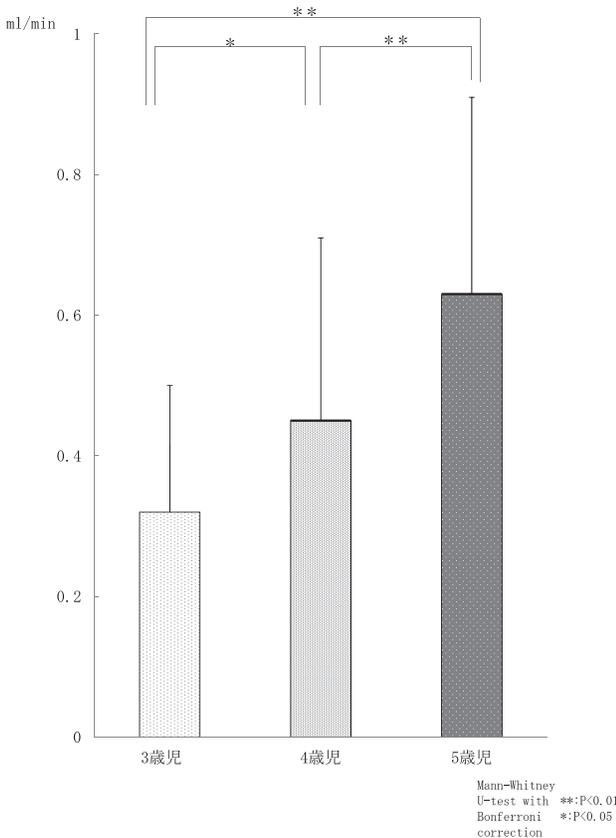


図1 年齢別における唾液流量の比較

年齢別における唾液流量は3歳児と5歳児、4歳児と5歳児との間に統計学的有意差 (p<0.01) を認め、3歳児と4歳児との間に統計学的有意差 (p<0.05) を認めた。

察された。

pHと緩衝能については統計学的有意差を認めなかったが、緩衝能においては経年的に高くなる傾向がみられた (p=0.08)。すなわち、唾液流量が増加するにつれ、緩衝能は上昇する傾向が認められた。一般に、唾液pH

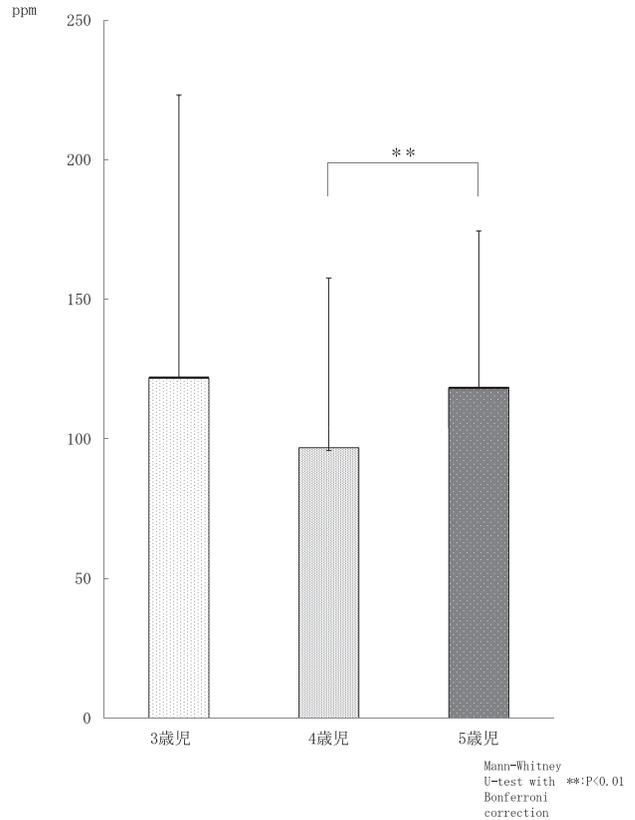


図2 年齢別におけるNa<sup>+</sup>の比較

年齢別におけるNa<sup>+</sup>濃度は4歳児と5歳児との間に統計学的有意差 (p<0.01) を認めた。

を司る重炭酸塩は唾液分泌速度に依存し、分泌速度が速いと唾液pHは高くなる (Lilienthal, 1955) といわれている。したがって、成長発育とともに唾液分泌量が増加し、緩衝能も徐々に増加するものと推察された。

2. 唾液中無機イオン濃度について

我々は過去に成人 (平均年齢23.6歳) における安静時

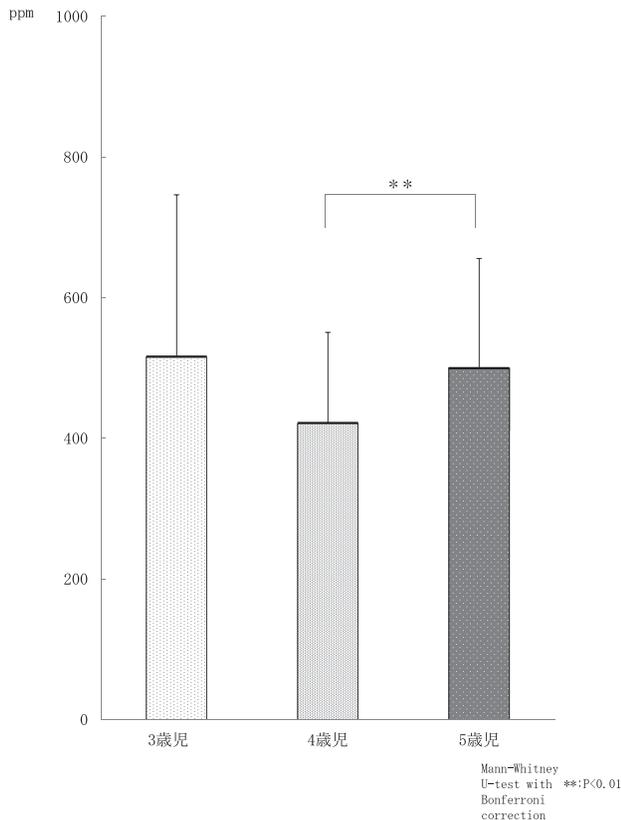


図3 年齢別におけるPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>の比較

年齢別におけるPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>濃度は4歳児と5歳児との間に統計学的有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた。

唾液の無機イオン濃度について調べている。その結果と比較すると、小児の方が高い値を示したのはF<sup>-</sup> ( $0.02 \pm 0.04$ ), SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ( $15.53 \pm 4.93$ ), NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ( $2.27 \pm 4.64$ )であった(福田ら, 2011)。我々の結果や過去の報告から、無機イオン濃度は小児と成人では異なると考えられ、成長発達が著しい小児に対して、成人は身体的機能が緩やかに低下していくことが影響していると推察される。

年齢別にみると、全体的に3歳児の値が高い傾向にあった。Ben-Aryen et al. (1990) は、安静時唾液中Na<sup>+</sup>濃度を乳児グループ(7-11か月)、幼児グループ(2-3歳)、児童グループ(6-8歳)、青年グループ(12-14歳)、成人グループ(25-63歳)で比較したところ、幼児グループでは乳児グループよりも一旦低値を示すが、児童グループには上昇に転ずると報告している。我々の結果において、Na<sup>+</sup>濃度は3歳児よりも4歳児の方が低値を示したが、5歳児で上昇しており、Ben-Aryen et al. の結果とほぼ一致した。今回の実験ではNa<sup>+</sup>の他にPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>においても統計学的に同様の傾向を示したことから、これらの安静時唾液中無機イオン濃度は乳児期から3歳頃までは上昇傾向を示すが、その後減少傾向を示した後、再度上昇傾向を示すと推察された。

PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>に関する過去の報告では、乳児における安静時

唾液は、経時的増加傾向のあることが示されている(Ben-Aryen et al., 1984)。しかし、Mazengo et al. (1994) は、小児(12歳)群と成人(35-44歳)群、高齢(65-74歳)群における刺激時唾液中のPO<sub>4</sub><sup>3-</sup>濃度に差はなかったことを報告している。またWu et al. (2008) は、3-5歳群、6-11歳群、12-14歳群における安静時唾液中PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>濃度を調べたところ、有意差が認められなかったことを報告している。PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>は年齢による影響はないとされている(Wu et al., 2008)が、我々の結果やBen-Aryen et alの報告から、PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>は小児の成長発達の過程で変化することが示唆された。

Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, F<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>は年齢による統計学的有意差を認めなかった。過去の報告において、Mg<sup>2+</sup>は経年的変化を示さなかった(Ben-Aryen et al., 1984; 平石ら1999)ことから、今回の結果と一致した。Ca<sup>2+</sup>については小児期における経年的変化がなかった(Ben-Aryen et al., 1984; 平石ら1999; Wu et al., 2008)との報告があるが、小児と成人の唾液中Ca<sup>2+</sup>濃度を比較すると、成人の方が有意に高かった(Anderson et al., 2001)との報告もある。したがって、小児期におけるCa<sup>2+</sup>の経年的変化は幼児期においては認められないことが推察された。

K<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>については、小児における経年的変化を示唆する報告がみられる。Wu et al. (2008) は、K<sup>+</sup>において幼児群と学童群との間に有意差を認め、経年的に増加したと報告しており、このような経年的変化は、成長に伴うホルモンの発達・変化と関連すると述べている(Sippell et al., 1980)。今回は3歳児、4歳児、5歳児を対象に検討した結果、経年的増加はみられなかったが、年齢とともに高くなるといわれていることから、今後さらに検討する必要があると思われる。Ben-Aryen et al. (1984) は、Cl<sup>-</sup>において新生児から幼児にかけて、経年的に減少していることを報告している。今回の結果は、Cl<sup>-</sup>は有意差がみられなかったものの、経年的に減少傾向を示しており ( $p = 0.06$ )、過去の報告と同様の傾向を示した。

以上の結果から、小児の成長発達に伴い、唾液流量や無機イオン濃度の一部には有意差が認められた。今後は調査対象となる年齢を広げ、小児における唾液因子の経年的変化についてさらに明らかにしていきたい。

## 結 論

小児における唾液因子を指標としたう蝕リスク診断法を確立する上で必要となる基礎データの一端を明らかにすることを目的とし、3歳児、4歳児、5歳児を対象と

した唾液因子（流量，pH，緩衝能，無機イオン濃度）の経年的変化について検討したところ，以下の結果が得られた。

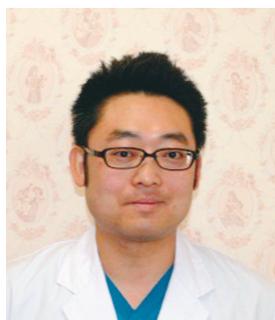
1. 幼児期の唾液流量は経年的な増加が認められた。
2. 幼児期における唾液イオン濃度は $\text{Na}^+$ ， $\text{PO}_4^{3-}$ において経年的な変化が認められ，4歳児よりも5歳児の方が有意に高い値を示した。

## 謝 辞

本研究は平成22年度北海道医療大学歯学会奨励研究金により行われた。

## 文 献

- Anderson P, Hector M. P & Rampersad M. A : Critical pH in resting and stimulated whole saliva in groups of children and adults. *Int J Paediatr Dent* 11 : R266-R273, 2001.
- Ben-Aryen H, Fisher M, Szargel R & Laufer D : Composition of whole unstimulated saliva of healthy children : changes with age. *Archs Oral Biol* 35 : R929-R931, 1990.
- Ben-Aryen H, Lapid S, Szargel R, Benderly A & Gutman D : Composition of whole unstimulated saliva of human infants. *Archs Oral Biol* 29 : R357-R362, 1984.
- Crossner CG : Salivary flow rate in children and adolescents. *Swed Dent J* 8 : R271-R276, 1984.
- Gutman D & Ben-Aryen H : The influence of age on salivary content and rate of flow. *Int J Oral Surg* 3 : R314-R317, 1974.
- Hay D. I : Salivary factors in caries models. *Adv Dent Res* 9 : R239-R243, 1995.
- 広瀬弥奈，福田敦史，八幡祥子，松本大輔，五十嵐清治：チェックバフ®による唾液緩衝能検査の変動値および唾液分泌量，唾液pH，緩衝能，リン酸イオン濃度，タンパク濃度の相互関係について。口腔衛生会誌 56 : R220-R227, 2006.
- 平石典子，田中光郎，高木裕三：小児唾液中無機イオンとう蝕との関連性。口病誌 66 : R249-R253, 1999.
- 福田敦史，広瀬弥奈，村田幸枝，八幡祥子，五十嵐清治：唾液中無機イオン濃度における小児と成人との比較。小児歯誌 49 : R389, 2011.
- Jorma O. Tenovuo (石川達也・高江洲義矩) : 唾液の科学 (Human saliva clinical chemistry and microbiology). 一世出版 : 1998, 4-5.
- Lilienthal B : An analysis of the buffer system in saliva. *J Dent Res* 34 : R516-R530, 1955.
- Mandel I. D : Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res* 53 : R246-266, 1974.
- Mazengo M.C, Söderling E, Alakuijala P, Tiekso J, Tenovuo J, Simell O & Hausen H : Flow rate and composition of whole saliva in rural and urban Tanzania with special reference to diet, age, and gender. *Caries Res* 28 : R468-R476, 1994.
- Sippell Wolfgang G., Dörr Helmuth G., Bidlingmaier Frank & Knorr Dietrich : Plasma levels of aldosterone, corticosterone, 11-deoxycorticosterone, progesterone, 17-hydroxyprogesterone, cortisol, and cortisone during infancy and childhood. *Pediatr Res* 14 : R39-R46, 1980.
- Wu Katie P, Ke Jyh-Yuh, Chung Chia-Ying, Chen Chia-Ling, Hwang Tsong-Long, Chou Ming-Yen, Wong Alice M. K, Hu Ching-Fang & Lee Yu-Cheng : Relationship between unstimulated salivary flow rate and saliva composition of healthy children in Taiwan. *Chang Gung Med J* 31 : R281-R286, 2008.



福田 敦史

平成15年 3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成19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19年 4月 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 助教

## [Mini Review]

## The fifth HOPE meeting with Nobel laureates

Izumi MASHIMA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## Abstract

HOPE Meeting is a special program offered by Japan Society for the Promotion of Science for excellent doctoral students and young researchers in the Asia-Pacific region. During the Meetings, the participants share a living space with Nobel Laureates and attend a variety of programs. The aim of this meeting is to inspire and

motivate the participants to be excellent scientists.

It was a very valuable experience for me to spend five days at the 5th HOPE Meeting, interacting closely with many young investigators and Nobel Laureates. My experiences at the HOPE Meeting greatly inspired my research.

## What are the HOPE Meetings with Nobel Laureates?

HOPE Meetings give opportunities to excellent doctoral students and young researchers selected from the Asia-Pacific region to participate in interdisciplinary discussions with Nobel Laureates and other distinguished scientists working at the frontiers of knowledge. It is hoped that the experience of the students gained at the meeting will inspire and motivate them to become excellent scientists and enable them to take on the mantle of contributing to the future of science and technology in the region (JSPS Home Page).

## Outline of the 5th HOPE Meeting

The 5th HOPE Meeting was held between February 26 and March 2, 2013, at the Grand Prince Hotel New Takanawa (Tokyo, Japan). This was the first time the HOPE Meetings had selected “Life Sciences (and related fields)” as the Subjected Field. The organizer of the 5th HOPE Meeting was Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) and it was held under the auspices of the Yomiuri Shimbun (newspaper). The official language of the meeting was English.

The participants were 104 doctoral students and post-doctoral researchers from the following countries/areas in the Asia-Pacific region including Australia, Bangladesh, China, Egypt, India, Indonesia, Israel, Japan, Korea, Malaysia, New Zealand, Philippines, Singapore,

South Africa, Taiwan, Thailand, and Vietnam. The ratio of participants' nationality is shown in Figure 1. During the Meeting, hotel rooms were shared by two or three participants who came from different countries. The research fields of participants were diverse. Only I was chosen from the dental field. The most common participants were doctoral students or young researchers in the Life Sciences. The number of Japanese participants was 25. The institutions of the Japanese participants are shown in Figure 2. In this Meeting, many Japanese who are studying abroad attended as participants. The male-female ratio of participants is shown in Figure 3. Compared with the previous data of HOPE Meetings (JSPS Home Page), the number of female participants was higher in this Meeting. The Subjected Fields of the 1<sup>st</sup> to

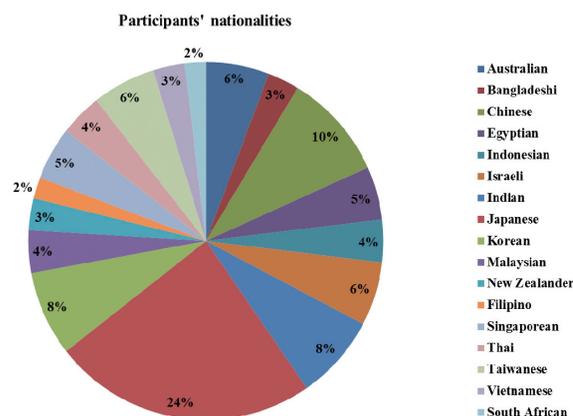


Figure 1. Participants' nationalities (percentages) in the 5th HOPE Meeting.

受付：平成25年4月5日 受理：平成25年4月23日

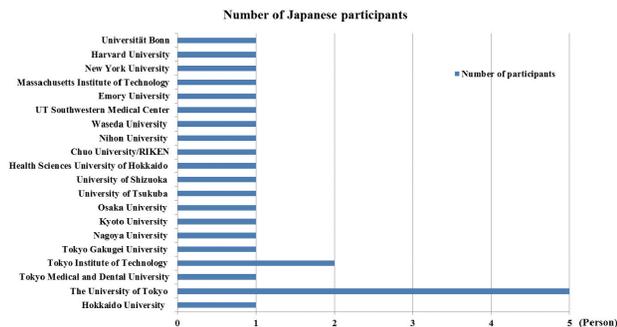


Figure 2. Institutions of Japanese participants in the 5th HOPE Meeting.

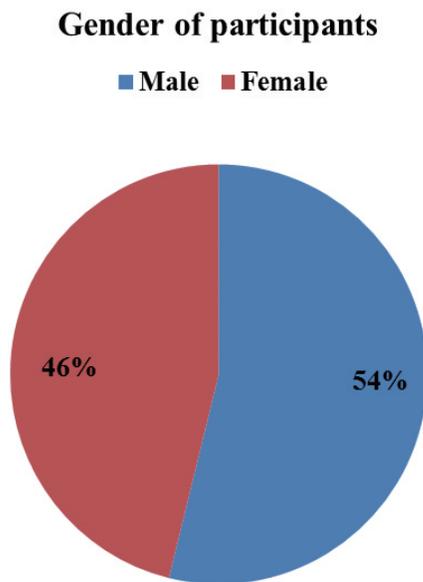


Figure 3. Gender of participants (percentages) in the 5th HOPE Meeting.

4<sup>th</sup> HOPE Meetings were Nanoscience and Nanotechnology (1st), Chemistry (2nd, 4th), and Physics (and related fields, 3rd), and there were few female researchers in the other Subject Fields. Since many female researchers are playing important roles in the Life Sciences, the selection of the Life Sciences as the Subject Field of the 5<sup>th</sup> HOPE Meeting provided the opportunity to attend for many women from the Life Sciences arena as well as myself from the Dental area.

The 5th HOPE Meeting was attended by the following lecturers : Prof. Susumu TONEGAWA (Nobel Laureate in Physiology or Medicine 1987), Prof. Mario Renato CAPECCHI (Nobel Laureate in Physiology or Medicine 2007), Prof. Hideki SHIRAKAWA (Nobel Laureate in Chemistry 2000), Prof. Ryoji NOYORI (Nobel Laureate in Chemistry 2001), Prof. Aharon Jehuda CIECHANOVER (Nobel Laureate in Chemistry 2004), Prof. Leo ESAKI (Nobel Laureate in Physics 1973), Prof. Makoto KOBAYASHI (Nobel Laureate in Physics 2008), Prof. Gunnar QUIST (Former Secretary General, The Royal Swedish Academy of Sciences), and Dr. Suzanne SHALE (Senior Researcher/Fellow of Harris Manchester College, University of Oxford).

**Program**

The program for the Fifth HOPE Meeting with Nobel

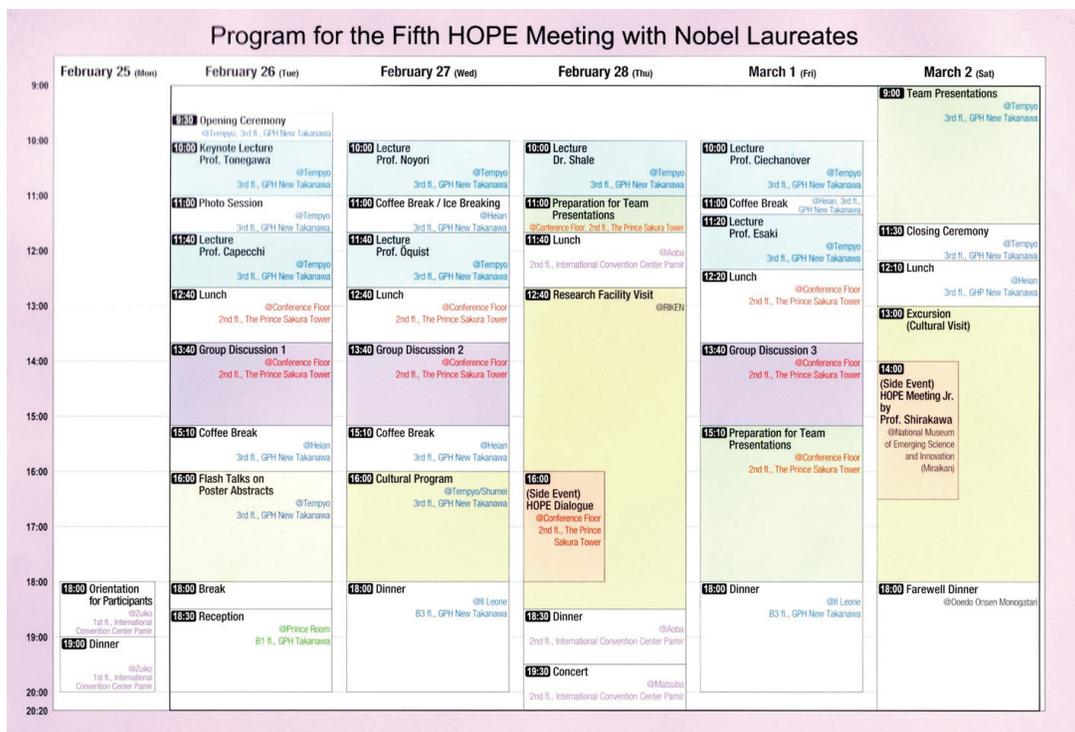


Figure 4. Program for the 5th HOPE Meeting.



Figure 5. Flash Talks on Poster Abstracts.

Laureates is shown in Figure 4. We had a tight schedule during this Meeting.

To enable interactions with the Nobel Laureates, seven Lectures and three Group Discussions were scheduled. Each lecture lasted an hour including a Q&A period and each group discussion lasted 90 minutes. Discussion groups of about 20 members each were set up based on the participants' registration information. I attended three group discussions with Prof. Leo ESAKI's, Dr. Suzanne SHALE's, and Prof. Makoto KOBAYASHI. The lectures of Nobel Laureates and group discussions with them were wonderful opportunities for me, and I have great memories of them. Especially, I could ask my questions directly to Nobel Laureates and in English which greatly strengthened my confidence in using English in the group discussions.

In Flash Talks on Poster Abstracts, one-minute oral presentations on poster abstracts were delivered by all the participants individually (Figure 5). Each participant talked about their abstract clearly and plainly using fluent English. At first, I was very nervous about discussing my poster abstracts in English in front of these excellent participants and Nobel Laureates from all over the world. But, I was filled with a feeling of accomplishment after my presentation.

On the final day of this Meeting, the participants gave their team presentations in the 5th HOPE Meeting, and it was the most impressive accomplishment. On the final day of this Meeting, the participants gave their team presentations. All the participants were divided into 12 groups from Team A to Team L by the Secretariat before the Meeting. I belonged to Team I. Each team member was requested to contact the other members of

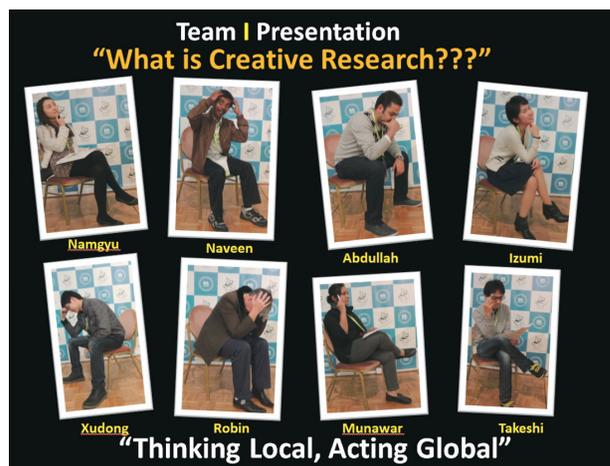


Figure 6. A part of a power point slide from Team I's presentation.



Figure 7. The finale of Team I's presentation.

their team and discuss the topic, style, and method of team presentation before and during the HOPE Meeting. Life Science in Global Future was given as a main theme of the presentation. Also, each team had to select Key Terms from following categories : new discoveries, creative research, researchers' roles within society, fusion and linkage with other fields, frontiers of human knowledge, global environment, energy issues, life ethics, and biodiversity. I belonged to Team I, and our team selected "creative research" as the key term and Role Play with Power Point Slide as the presentation style (Figure 6). We discussed and practiced the contents of the presentation until late every night. Sometimes we got into conflicts with each other. However, through discussion and practice with our team members, we developed strong and trusting relations with each other. I am sure that this connection will continue in the future. We are keeping in touch with each other using Facebook and e-mail now (Figure 7).

### After the 5th HOPE Meeting

I learnt many things through the course of the 5th HOPE Meeting. I learnt many things. First, I discovered that one must be aggressive to be a good global researcher. If the participants in the 5th HOPE Meeting were not aggressive, we could not attend this kind of Meeting, nor make the valiant relationship in this Meeting. I think many Japanese are not good at being aggressive as compared to foreign people. It may be our national character : we even have a concept in Japan called “the virtue of modesty.” However, five days of the Meeting has made me firmly believe that we should state our intent clearly to be a good researcher, scientist, and professional.

Second, I found that my ideas and indeed my life changed by interacting with great people. Third, I realized that we have to understand the world to be a good researcher, and we have to meet many highly motivated researchers from a variety of fields. I was very happy to meet many highly motivated young investigators from many countries including Japan, and I was inspired by them in the Meeting.

I spent five full and intense days in close association with many young investigators (who are now my good friends) and Nobel Laureates. If I had not attended this HOPE Meeting, I would not have had these inspiring and life-changing experiences. I deeply appreciate having had this opportunity to attend the Fifth HOPE Meeting. And I would like to contribute to making these HOPE Meetings even better in the future. Also, I strongly recommend students in the Postgraduate School of the Health Sciences University of Hokkaido to grab the chance to apply for this program. Through it, I believe you will have valuable and inspiring experiences that you will remember forever.

### Acknowledgements

I am grateful to Chairman and Professor Futoshi NAKAZAWA, the Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, for his help in preparing my applications for the 5th HOPE Meeting. Also, I appreciate Professor Taishin TAKUMA, Chief Editor of Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido, for publishing this article.

### Reference

JSPS Home Page ; [http : //www.jsps.go.jp/hope/index.html](http://www.jsps.go.jp/hope/index.html)



眞島 いづみ

北海道医療大学大学院歯学研究科微生物学専攻博士課程第3学年

平成13年3月 富士見丘高等学校 卒業

平成16年4月 北海道医療大学歯学部歯学科 入学

平成22年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業

平成23年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学

平成25年現在 北海道医療大学大学院歯学研究科 在籍中

## 〔Mini Review〕

## DLC成膜ブラケットの特性と臨床応用

六車 武史, 飯嶋 雅弘, 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

## Property and clinical application of DLC coating bracket

Takeshi MUGURUMA, Masahiro IJIMA and Itaru MIZOGUCHI

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development,  
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

## 1. DLC膜について

矯正治療に用いるマルチブラケット装置はブラケットを歯面に接着し、矯正用ワイヤーを介して三次元的な歯の移動を行う装置である。矯正用ワイヤーやブラケットを構成する合金にはNi, Ti, Mo, Zr, Fe, Cr, Coなどが含まれており（湯浅ら, 2004）、口腔内の唾液や食渣が存在する環境で腐食することにより金属イオンが溶出することが考えられる。また矯正治療では、矯正用ワイヤーやブラケット等の異種金属が口腔内に存在することから、ガルバニック電流が生じることが考えられ、矯正用ワイヤーやブラケットの局所から高濃度の金属イオンが溶出する可能性がある。溶出金属イオンがタンパク質と結合し抗原となった場合、抗原抗体反応により金属アレルギーの原因となり、湿疹、口内炎、腫脹、扁平苔癬、掌握膿疱症などを引き起こす可能性がある（Johansson et al., 1986）。

DLC（Diamond-like carbon）膜は、AisenbergとChabot（1971）により報告されたダイヤモンドと類似した炭素系の被膜であり、優れた摩擦特性や耐摩耗性を発揮することから、工学分野において広く用いられている（太刀川ら, 2005）。DLC膜は、生体親和性にも優れることが証明されている（Lappalainen et al., 1998 ; Santavirta et al., 1999）。これにより、医療分野、特に整形外科領域では人工関節（Kawalec et al., 1998 ; Cook et al., 1999）に応用され、循環器系では、血液適合性や耐久性を活かし人工心臓弁（Gott et al., 2003）、さらに人工血管やステント（Gutensohn et al., 2000 ; Schaefer et al., 2004）に

応用されている。歯科領域では、デンタルインプラントへの応用（Kim et al., 2005）が検討されている。

## 2. DLC膜の矯正用ブラケット／ワイヤーへの応用

これまで我々は、矯正用ワイヤーとブラケットについてプラズマイオン成膜法（PEKURIS-HI, 栗田製作所）によりDLC成膜を試み、その摩擦特性について調べた（Muguruma et al., 2011 ; Muguruma et al., 2013）。それらに関連する結果を以下に紹介する。図1にはDLC成膜後の矯正用ワイヤーとブラケットのSEM像を示す。ワイヤー表面には約0.5 μmのDLC層が、ブラケットの表面には約1 μmのDLC層が認められる。これらのDLC層についてナノインデンテーション試験を行い、機械的特性を調べた（表1, 2）。各試料に成膜したDLC層の硬さ

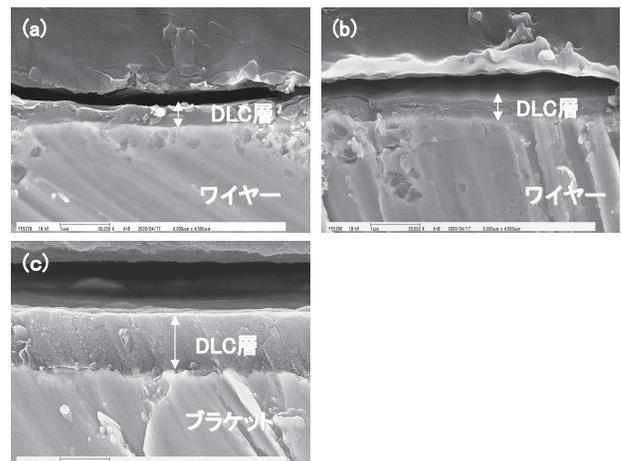


図1 DLC成膜後のSEM像。

(a) NiTi合金ワイヤー, (b) SSワイヤー, (c) ブラケット

受付：平成25年1月8日 受理：平成25年4月30日

表1 ワイヤー表面の硬さ

Wire	計測項目	未処理		DLC成膜		P value
		Mean	SD	Mean	SD	
SS	押し込み深さ (nm)	157.4	6.2	146.8	5.0	0.001
	硬さ (GPa)	11.6	1.0	17.6	1.7	0.000
	弾性係数 (GPa)	277.4	16.3	194.4	9.1	0.000
NiTi	押し込み深さ (nm)	253.1	13.2	215.3	4.4	0.000
	硬さ (GPa)	4.7	0.6	9.1	0.5	0.000
	弾性係数 (GPa)	82.9	6.2	74.9	2.8	0.002

表2 ブラケットのウイング表面とスロット内面の硬さ

部位	計測項目	未処理		DLC成膜		P value
		Mean	SD	Mean	SD	
ウイング表面	押し込み深さ (nm)	302.9	12.1	199.9	6.6	0.000
	硬さ (GPa)	5.0	0.4	18.9	1.0	0.000
	弾性係数 (GPa)	229.7	13.5	155.7	19.3	0.000
スロット内面	押し込み深さ (nm)	427.5	10.6	354.6	15.8	0.000
	硬さ (GPa)	2.4	0.1	6.7	0.6	0.000
	弾性係数 (GPa)	158.6	6.4	45.0	4.5	0.000

値は、ワイヤーの種別、ブラケットの部位を問わず未処理の試料と比べ、有意に高い硬さを示した。硬さの向上によりブラケットとワイヤー間のバインディング効果の改善により摩擦特性が向上することが予測された。一方、弾性係数は、未処理の試料に比べDLC成膜試料で有意に低い値を示した。これはDLC膜がある程度の変形に対しても元に戻るから、繰り返される摩擦に対して耐久性を有していることが考えられる。

摩擦特性を調べるために、DLC成膜を施したワイヤーと未処理のワイヤーを用いて、ブラケットに10°のアンギュレーションを加えたときの静摩擦力を計測した(表3)。未処理のワイヤーに比べDLC成膜ワイヤーで低い摩擦力を示したが、一部で統計学的に有意な違いが認められなかった。また、DLC成膜を施したブラケットと未処理のブラケットを用いて静摩擦力と動摩擦力を求めた(表4)。DLC成膜ブラケットは、動摩擦力に関しては未処理ブラケットと比較して有意に低い値を示したが、静摩擦力については差はなかった。

### 3. DLC成膜の生体為害性の評価

DLC成膜ブラケットの生体為害性を評価するために、インフォームドコンセントの得られた20歳6か月の女性を対象にした。試料には、DLC成膜ブラケットと未処理のブラケットを用い、評価期間はブラケット装着後8週間とした。評価項目は、ブラケットに接する粘膜の発赤の有無、擦過創および水疱形成を調査した。その結果、ブラケットに接する粘膜は、試験期間を通して発赤など

表3 3種類のブラケットにおける静摩擦試験

ブラケットの種類	ワイヤーサイズ	摩擦力 (gf)				P value
		未処理		DLC成膜		
		Mean	SD	Mean	SD	
	.016"	54.6	14.1	31.6	5.8	0.001
	.018"	139.2	40.7	110.9	15.9	0.063
Damon Q	.019" × .025"	298.0	45.8	254.4	37.2	0.019
	.016"	41.3	11.8	26.0	3.6	0.000
In-Ovation	.018"	117.5	43.6	88.2	11.4	0.063
	.019" × .025"	235.0	41.8	187.9	22.1	0.002
Victory	.016"	191.5	30.2	114.0	14.5	0.000
	.018"	211.1	29.6	182.8	22.5	0.043
	.019" × .025"	353.8	68.6	336.0	43.0	0.739

.016"はNiTi合金, .018"と.019" × .025"はステンレススチール

表4 DLC成膜ブラケットと未処理のブラケットの静摩擦力と動摩擦力の比較

摩擦の種類	ワイヤーサイズ	摩擦力 (gf)				P value
		未処理		DLC成膜		
		Mean	SD	Mean	SD	
静摩擦力	.018"	118.0	16.0	112.9	9.3	0.763
	.017" × .025"	152.5	12.9	168.0	20.4	0.082
動摩擦力	.018"	158.6	9.5	109.2	4.2	0.000
	.017" × .025"	160.6	12.6	114.8	15.5	0.000

ワイヤーはステンレススチール

の炎症所見、擦過創および水疱形成などは認められなかった(表5, 図2, 3)。これらのことから、DLC成膜ブラケットは未処理のブラケットと比較しても、粘膜に対する影響に差はなく、生体への為害性はなく、安全性に支障のないことが示唆された。今後は、低摩擦特性が有利に働く力系(スライディングメカニクス)について検討する予定である。

なお、本研究は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究所倫理委員会の承認(受付番号第79号)を得ている。

### 参考文献

- Aisenberg S and Chabot R. Ion-beam deposition of thin films of diamondlike carbon. J Appl Phys 1971 ; 42 : 2953-2958.
- Cook SD, Beckenbaugh RD, Redondo J, Popich LS, Klawitter JJ and Linscheid RL. Longterm follow-up of pyrolytic carbon metacarpophalangeal implants. J Bone Joint Surg 1999 ; 81A : 635-648.
- Gott VL, Alejo DE and Cameron DE. Mechanical heart valves : 50 years of evolution. Ann Thorac Surg 2003 ; 76 : S2230-2239.
- Gutensohn K, Beythien C, Bau J, Fenner T, Grewe P, Koester R Padmanaban K and Kuehnl P. In vitro analysis

表5 ブラケットに接する頬粘膜の評価

	部位	装着前	装着後 30分	装着後 4週	装着後 8週
発赤	5]	-	-	-	-
	4]	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5]	-	-	-	-
擦過創	5]	-	-	-	-
	4]	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5]	-	-	-	-
水疱形成	5]	-	-	-	-
	4]	-	-	-	-
	4	-	-	-	-
	5]	-	-	-	-

5] : DLC成膜ブラケット、4] : 未処理のブラケット



図2 装着前から装着後8週までの口腔内写真。(a) 装置装着前、(b) 装着後30分、(c) 装着後4週、(d) 装着後8週、上顎第一小臼歯は未処理のブラケット、第二小臼歯はDLC成膜ブラケット

of diamond-like carbon coated stents : Reduction of metal ion release, platelet activation, and thrombogenicity. *Thromb Res* 2000 ; 99 : 577-585.

Johansson BI, Stenman E and Bergman M. Clinical registration of charge transfer between dental metallic materials in patients with disorders and/or discomfort allegedly caused by corrosion. *Scand J Dent Res* 1986 ; 94 : 357-363.

Kawalec JS, Hetherington VJ, Melillo TC and Corbin N. Evaluation of fibrocartilage regeneration and bone response at full-thickness cartilage defects in articulation

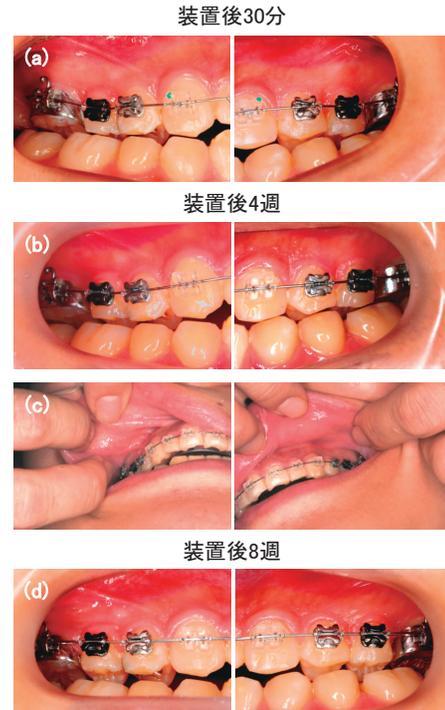


図3 装置装着後のブラケット部の拡大写真。(a) 装着後30分、(b) 装着後4週、(c) ブラケットに接する粘膜、(d) 装着後8週

with pyrolytic carbon or cobalt-chromium alloy hemiarthroplasties. *J Biomed Mater Res* 1998 ; 41 : 534-540.

Kim SK, Lee JB, Koak JY, Heo SJ, Lee KR, Cho LR and Lee SS. An abutment screw loosening study of a diamond like carbon-coated CP titanium implant. *J Oral Rehabil* 2005 ; 32 : 346-350.

Lappalainen R, Anttila A and Heinonen H. Diamond coated total hip replacements. *Clin Orthop Relat Res* 1998 ; 352 : 118-127.

Muguruma T, Iijima M, Brantley WA and Mizoguchi I. Effects of a diamond-like carbon coating on the frictional properties of orthodontic wires. *Angle Orthod* 2011 ; 81 : 143-150.

Muguruma T, Iijima M, Brantley WA, Nakagaki S, Endo K and Mizoguchi I. Frictional and mechanical properties of diamond-like carbon-coated orthodontic brackets. *Eur J Orthod* 2013 ; 35 : 216-222.

Santavirta S, Lappalainen R, Pekko P, Anttila A and Kontinen YT. The counterface, surface smoothness, tolerances, and coating in total joint prostheses. *Clin Orthop Relat Res* 1999 ; 369 : 92-102.

Schaefer O, Lohrmann C, Winterer J, Kotter E and Langer M. Endovascular treatment of superficial femoral artery occlusive disease with stents coated with diamond-like carbon. *Clin Radiol* 2004 ; 59 : 1128-1131.

太刀川英男, 森広行, 中西和之, 長谷川英雄, 舟木義

行. Si含有ダイヤモンドライクカーボンによる高性能  
トライボコーティング技術の開発. まてりあ 2005 ;  
44 : 245-247.

湯浅壽大, 遠藤一彦, 飯嶋雅弘, 米倉康之, 大野弘  
機, 溝口到. 矯正用金属製装置の異種金属接触腐食挙  
動に関する研究—生理食塩水中における腐食電位の測  
定—. 東日本歯誌 2004 ; 23 : 223-235.



六車 武史

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

1996 北海道医療大学歯学部卒業  
1996-1997 北海道医療大学歯学部附属病院 卒後研修医  
1997-2001 北海道医療大学歯学部附属病院 病院助手  
2001-2007 北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座 助手  
2007- 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 助教

[最近のトピックス]

## Moonlighting proteinについて

鎌口 有秀

北海道医療大学歯学部微生物学分野

Moonlightingの意味をご存じでしょうか。私はこの語句を最初に目にした時、月の光を想定しましたが、残念ながらこのイメージは全く違っていました。昨年、A菌とB菌を混合すると共凝集し、それにC菌の培養上清を添加することにより、その共凝集が解離する現象をみつけ、C菌の培養上清の成分について検討していました (Fig. 1)。この現象からbiofilm形成過程における detachmentやchannel formationへと繋がるのが想定されました (Fig. 1)。この現象を起こす物質を精製後、アミノ酸配列の解析より、glutamate dehydrogenase (GDH) であることがわかりました。GDHはグルタミン酸から2-オキソグルタル酸とアンモニアへの反応、またはその逆の反応を触媒する酵素であり、今回の現象を起こすには、ほど遠い物質と思われました。そこで知ったのが、moonlighting proteinの存在でした。ここで、文頭にもどりますが、私はこの語句を見たとき、月の光の様に輝くタンパク質を想定しました。しかし、moonlightingとは辞書によると『内職』とか『アルバイト』という意味で、moonlighting proteinとは昼間は本職をもち、夜は月の光の下で内職をするタンパク質、つまり、1つのタンパク質が2つの機能をもつものであることがわかりました。Moonlighting proteinと称するには、少し制約があり、2つの機能がgene fusionの結果であるものやhomologous proteinのfamilyであるものやsplice variantの結果であるもの等は含まれないことになっています。最初にmoonlighting proteinが見いだされたのは1988年のことで、アヒルの目の水晶体のタンパク質が代謝酵素のarginosuccinate lyaseそのものであることの発見でした。セ

ントラルドグマが修正されたのは逆転写酵素の発見が大きな要因ですが、moonlighting proteinの発見も1つの要因になったようです。その後、moonlighting proteinはeukaryoteとprokaryoteに広く存在することがわかってきました。細菌におけるmoonlighting proteinの例としては糖代謝に関与する一連の酵素がmoonlighting proteinとして作用することでした。例えば、phosphoglucose isomeraseは菌体内での本職以外に菌体外では内職としてneuroleukinとして作用すること (Fig. 2)、また、aldolaseは菌体表層ではadhesinとして働く等です。この様に代表的なmoonlighting proteinは細胞内での本職以外に細胞外では内職として別の作用をしています (Fig. 2)。これ以外にも、moonlighting proteinの機能の切り替えの機構として、同一細胞内での存在部位の違い、存在する細胞の種類の違い、cofactorの結合の有無、oligomerizationの有無、complex formationの有無、multiple binding siteの有無等が関与することが報告されています。今回供試したC菌のGDHは、菌体内で機能する酵素として知られていましたが、以前から菌体外にも多量存在することが報告されていました。しかし、何故、菌体外に存在し、何をしているか全くわからないままでした。今回、ちょっとした偶然から、このGDHはmoonlighting proteinとして働くことが示唆されました。今後、細菌のmoonlighting proteinについてさらに多くのことが明らかになるものと思われます。

本文中のA菌は*Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*, B菌は*Propionibacterium acnes*, C菌は*Porphyromonas gingivalis*のことで、

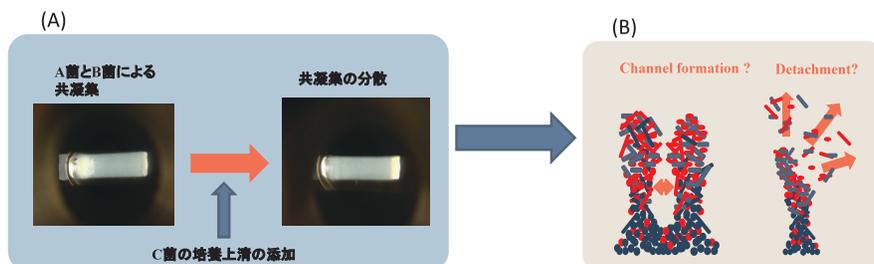


Fig. 1 A菌とB菌による共凝集とC菌の培養上清による共凝集の解離 (A) とこの現象より想定されることbiofilm形成過程におけるdetachmentとchannel formationへの関与の模式図 (B)



Fig. 2 Moonlighting proteinの機能切り替えの1例  
 1. 細胞内に存在する時 (本職: phosphoglucose isomerase)  
 2. 細胞外に存在する時 (内職: neuroleukin)

## [最近のトピックス]

## 中心体の非対称性と細胞分裂

小原 伸子

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

中心体 (centrosome) は 2 個の中心小体 (centriole) とこれを取り囲む中心小体周辺物質 (pericentriolar matrix, PCM) からなる細胞内小器官で、動物細胞の主要な微小管形成中心 (microtubule organizing center, MOC) として働き、細胞分裂、細胞の移動、極性化などを含む非常に多くの現象に関与している。有糸分裂の結果 2 個の娘細胞ができると、染色体とともに中心体も娘細胞に分配されるが、中心小体を含む中心体の複製は細胞分裂に備えて間期 ( $G_1 \sim G_2$  期) におこなわれ、DNA の複製には依存しない。中心体は中心小体が存在することにより形成されるので、その数は中心小体の複製を制御することにより調節されている。複製がおこなわれる前から存在した中心小体を mother centriole、複製の結果あらたにできた中心小体を daughter centriole といい、細胞分裂でできた 2 つの娘細胞はそれぞれ 1 個の mother centriole と 1 個の daughter centriole を受け継ぐが、一方が受け継ぐ mother centriole はもう一方が受け継ぐそれより古い (図 1)。2 つの細胞は異なる中心体、すなわち、より古い mother centriole を含む mother centrosome か、新しい mother centriole を含む daughter centrosome のどちらかを受け継ぐことになる。2 個の中心小体のうち、mother centriole は一次繊毛形成の際に基底小体となり、その末端側から繊毛が伸びる。一次繊毛はいくつかのシグナルを受けるセンサーとして働くことが知られているが、分裂後の細胞において、mother centrosome を受け継いだ細胞のほうが明らかに速く一次繊毛を形成し、mother centriole の古さ (age) により Shh のシグナルに対する反応が異なることが報告されている<sup>1)</sup>。細胞分裂で生じた 2 つの娘細胞の運命には、受け継いだ中心体の違いにより差が生まれる可能性があるということになる。

幹細胞の分裂は非対称的であり、分裂により生じた 2 つの細胞の一方のみが分化し、もう一方は幹細胞のままである。さまざまな幹細胞の分裂において、mother centrosome か daughter centrosome かどちらか一方を受け継いだ細胞だけが幹細胞であり続けることが知られている<sup>2)</sup>。例えばショウジョウバエの雄の生殖細胞系列では

mother centriole は常に幹細胞に受け継がれ、同じショウジョウバエでも雌の生殖細胞系列や神経系の幹細胞では mother centriole を受け継いだほうの細胞が必ず分化することが知られている。どちらの中心体が幹細胞の性質を維持するかは、このようにまちまちであるが、受け継がれる中心体の差異が非対称的な細胞分裂に寄与していることは興味深い。

中心小体を取り囲む PCM は 100 種以上のタンパクを含むと考えられているが、そのすべてが知られている訳ではなく、知られている個々タンパクの役割についてもまだ一部が分かり始めたばかりである。中心体の構造と機能をめぐる研究の今後の進展は、細胞分化の機構に対してより深い理解をもたらしてくれるとおもわれる。

1. Anderson CT, Stearns T (2009) Centriole age underlies asynchronous primary cilium growth in mammalian cells. *Curr Biol*. 2009 Sep 15; 19(17): 1498-502.
2. Pelletier L, Yamashita YM (2012) Centrosome asymmetry and inheritance during animal development. *Curr Opin Cell Biol*. 24(4): 541-6.

## 中心小体の複製

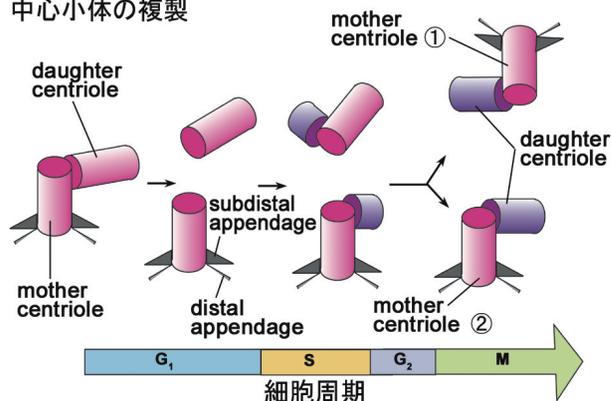


図 1. 細胞周期と中心小体の複製。

中心小体は 3 本の微小管 9 本からなる筒状の構造物で、2 個が直角に配列する。mother centriole は daughter centriole と構造が異なり基部に 2 種の付属物 (distal appendage と subdistal appendage) が付いている。複製によって生じた 2 つの mother centriole のうち mother centriole ① は前の細胞周期で新しくつくられたものなので、mother centriole ② のほうが ① よりも古い。

## [最近のトピックス]

## ねらった遺伝子をKOする人工ヌクレアーゼTALENの有望なタレント

田隈 泰信, 設楽 彰子, 荒川 俊哉

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野

Taishin TAKUMA, Akiko SHITARA, Toshiya ARAKAWA

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

## 1. 人工ヌクレアーゼTALEN

遺伝子KOマウスの作製は、「相同組換え」という高等生物では極めてまれにしか起こらない現象に依存しているため、高度な専門技術または高額な費用、加えて長い時間を必要とする。しかし、最近、相同組換えを必要としない「人工ヌクレアーゼ」による遺伝子改変技術が開発され、比較的容易に、これまで作製が困難とされてきたマウス以外の動物や培養細胞の遺伝子KOが実施可能となった。今回とりあげるTALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) は、キサントモナス属の植物病原性細菌が、植物細胞の遺伝子発現を攪乱するために用いるTALEタンパク質 (DNA結合ドメイン) と制限酵素ForkI (DNA切断ドメイン) を融合した人工ヌクレアーゼである。図に示すようにTALENのDNA結合ドメインは「芋虫の体節」に似た繰り返し構造をもつ。各体節は34アミノ酸残基からなり、その12番目と13番目のアミノ酸はDNAの4種類の塩基を認識し結合する「足」の役割をはたす。例えば、アスパラギン (N)、イソロイシン (I) の足 (NI) はアデニンを認識し結合する。この「芋虫の体節」を任意の組合せで造るコンピューター制御のDNA合成ロボットは既に完成しており、目的の遺伝子をKOする「人工ヌクレアーゼ発現ベクター」の供給が、商業・非商業ベースで始まっている。

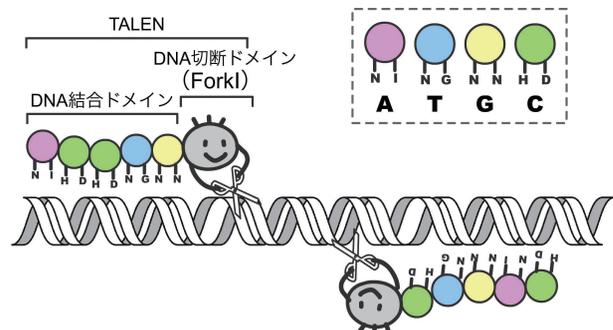
## 2. siRNAからTALENへ

我々はこれまで、HeLa細胞に様々なSNAREタンパク質のsiRNAを導入し、構成的分泌におけるSNAREタンパク質の役割を調べてきたが、SNAP23の遺伝子発現を90%抑制しても構成的分泌は全く阻害されなかった(1, 2)。ところが最近、SNAP23の遺伝子KOマウスが胎生3.5日目 (胚盤胞期) に死滅することが明らかとなった(3)。遺伝子KO細胞が得られていないため、発生停止が分泌の破綻によるものか、因果関係は解析されてい

ない。siRNA実験の限界 (遺伝子発現を100%抑制できない) と遺伝子KOマウスの限界 (発生の初期に死滅すると機能解析が困難、また解析が超複雑) の狭間を埋める研究方法として、我々はTALENによる細胞レベルでの遺伝子KO実験に着目し、現在各種SNARE遺伝子KO用TALENを作製中である。今後TALEN法の広範な導入により、siRNA実験の曖昧な結果が、遺伝子KOによるクリアな結論へと置換されて行くことが想像される(4)。

## 文献

1. SNAP-23 is not essential for constitutive exocytosis in HeLa cells. Okayama M, Arakawa T, Mizoguchi I, Tajima Y, Takuma T. FEBS Lett. 581(24): 4583-4588, 2007
2. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. Okayama M, Shitara A, Arakawa T, Tajima Y, Mizoguchi I, Takuma T. Mol Cell Biochem. 366: 159-168, 2012
3. Deletion of SNAP23 results in pre-implantation embryonic lethality in mice. Suh YH, et. al. PLoS One 6(3): e18444, 2011
4. A library of TAL effector nucleases spanning the human genome. Kim Y, et. al. Nature biotech. doi: 10. 1038/nbt. 2517, 2013



## [学会記録]

## 北海道医療大学歯学会第31回学術大会 特別講演

## 「臓器再生をめざした唾液腺形成機構の解析～新たな制御因子を求めて～」

大阪大学 大学院歯学研究科 顎口腔機能治療学教室 教授  
阪井丘芳

胎生期において、唾液腺、肺、腎臓、前立腺などの器官は上皮組織が枝分かれ（分枝）を繰り返すことにより形成される。分枝形態形成は三次元的な立体構造を有する器官形成にとって重要な現象であり、器官再生をめざした研究にとって有用な情報が含まれている。その分枝形成の過程において、上皮細胞が細胞-細胞間接着から細胞-細胞外マトリックス接着へと変換することにより、クレフト（裂け目）が形成されることが知られているが、その詳細な分子機構は明らかにされていない。

我々は唾液腺の分枝形成の初期に生じる上皮組織のクレフトに着目し、唾液腺上皮からレーザーマイクロダイセクションにて、クレフト部位とクレフト以外の部位の組織を取り出し、それぞれに発現する遺伝子群をT7-SAGE法で網羅的に同定した。クレフトから同定した細胞外マトリックスFibronectinと転写因子Btbd7 (clefтин)

は、唾液腺および肺の発生時期に強く発現し、上皮の分枝形態形成を制御していた。Btbd7はSnailの発現を高め、E-cadherinの発現を抑制することにより、細胞-細胞間接着を阻害し、上皮細胞の遊走性を高めることにより、分枝形成を誘導している。また、Fibronectinはクレフト形成に必要とされているが、Btbd7の発現はFibronectinによって誘導された。本研究により、器官形成の初期過程におけるFibronectin-Btbd7-E-cadherinの関連性が明らかになった。

若い研究者・学生でも理解しやすいように動画を交えながら、わかりやすい解説を心掛ける予定である。さらに、口腔外科医が基礎研究にあこがれ、大阪とアメリカで落胆したり、感動しながら、どのようにして研究生活を続けているかについても触れてみたい。

## 北海道医療大学歯学会第31回学術大会 一般講演抄録

## 1. 歯科医師が舌痛症患者の治療の一環として認知行動療法を行った1症例

○佐藤英樹\*\*\*, 松岡紘史\*\*\*\*, 吉田光希\*\*\*, 高井理衣\*, 佐藤 惇\*\*\*, 山崎真美\*\*\*, 西村学子\*, 川上智史\*\*\*\*, 千葉逸朗\*\*\*, 安彦善裕\*\*\*

\*北海道医療大学歯学部生態機能・病態学系臨床口腔病理学分野, \*\*北海道医療大学病院歯科口腔内科相談外来, \*\*\*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, \*\*\*\*北海道医療大学病院医療心理室, \*\*\*\*\*北海道医療大学歯学部高度先進機能保存学分野

**【目的】** 舌痛症は、一般的に他覚的所見が否定されているにも関わらず舌の痛みが持続する疾患である。発症頻度は全人口の1～5%強にまで及ぶといわれ(Lopez et al., 2009), 口腔内に症状を訴えるものとしては発生頻度の高い疾患である。治療法として抗うつ薬, 抗不安薬, カプサイシン,  $\alpha$ リポ酸, 心理療法などが行われてきた(Zakrzewska et al., 2005)。当院では現在、舌痛症への心理療法として認知行動療法(以下CBT)を取り入れている。CBTは訓練が必要なため、主に精神科医や臨床心理士によって行われているが、舌痛症患者では歯科医師によるCBTが望ましい。今回われわれは、舌痛症患者に歯科医師がCBTを行い、症状の緩解がみられた症例を経験したので報告する。

**【症例】** 30代女性。患者はX年5月に舌の痛みを経験し、X年6月に当院ホームページをみて自分の症状が舌痛症と思い当科を来院した。初診時、口腔内所見にて症状と一致する客観的所見はみられず、問診、心理テ

スト、口腔症状と総合的に判断して舌痛症と診断した。初診時はロフラゼブ酸エチルを処方し経過観察とした。X年7月再来院時、舌痛は緩解傾向であった(VAS10→3)が、時々強い痛みがみられることがあった(VAS7)。患者の希望によりロフラゼブ酸エチルを中止し、CBTを行うこととした。X年8月より歯科医師主導のもと、CBTの専門家である臨床心理士の助言を得ながらCBTによる治療を開始した。CBTのプログラムに従い、①舌痛症の原因、治療法について説明、②リラクゼーション法(漸進的筋弛緩法)の練習・実践、③気ぞらしの練習・実践、④認知の修正(行動変容)の練習・実践という順序で行った。X年11月プログラム終了時、舌痛は緩解し(VAS10→0)、強い痛みがみられることもほとんどなくなった(VAS1)。

**【考察】** 舌痛症患者の治療に認知行動療法が有効であることが改めて確認された。また認知行動療法は歯科医師による舌痛症の治療の選択肢となることが示唆された。

## 2. 咬合挙上における咬合変化が成長期ラット顎関節円板に及ぼす影響

○中尾友也, 松沢史宏, 永坂 萌, 鳥谷奈保子, 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

**【目的】**近年, 顎関節症患者の増加とその若年化傾向が歯科全体で問題となっているが, 顎関節症の発症に関する正確な機序は不明なままである. 顎関節症の病態は様々であるが, その多くは顎関節円板の転位や変形に起因するものが多い. 顎関節円板はcollagenとproteoglycanなどの細胞外マトリックスから構成され, collagen線維は牽引に対する抵抗性を示し, proteoglycanはそれに結合する硫酸鎖を介して剪断や圧縮に対する抵抗性を示すことが知られている. Proteoglycanの中でもmodular proteoglycanに属するversicanは, コンドロイチン硫酸側鎖をもつ大型のproteoglycanであり, N末端側にヒアルロン酸結合部位 (HABR), 中間に2つのglycosaminoglycan (GAG) 鎖結合領域, C末端側にEGF領域, レクチン様領域を有する. 本研究では, 機械的刺激に対する顎関節円板の反応性を明らかにすることを目的として, 成長期ラットの切歯部咬合挙上モデルを用いて, 顎関節円板におけるversicanのmRNA発現量, GAGの定量, DNAの定量および顎関節円板の厚径の変化を計測した.

**【資料および方法】**生後7週齢のWistar系雄性ラットを用い, 顎関節部への機械的負荷を増大させるため, 上顎

切歯部にレジン製咬合板を装着し, 切歯部咬合モデルを作製した. 実験期間は2, 4, 7, 14, 21, 28日とし, 装置未装着同週齢ラットを対象群として用いた. 各実験期間終了後, 採取した顎関節円板からtotal RNA, GAG, およびDNAを抽出した. versicanのmRNA発現はqPCR法, GAGはDMB法, DNAはHoechst法を用いてそれぞれ定量した. また, 通法に従い厚さ7 $\mu$ mの連続組織切片を作製し, Lei Sunら(2009)の方法に従って, 顎関節円板の厚径を計測した.

**【結果および考察】**切歯部咬合挙上を行った実験群では, mRNA発現, GAG量, およびDNA量それぞれにおいて, 経時的な増加が認められた. また, 顎関節円板の厚径においては対照群と比較し, 実験群で厚径の増加が認められた.

**【結論】**成長期ラット顎関節円板におけるmRNA発現, GAG量, およびDNA量は, 咬合挙上に伴う機械的負荷の亢進によって変化することが明らかとなった. また, 組織学的にも顎関節円板厚径が変化することが明らかとなった. これらの変化は, 顎関節に生じる複雑な生体力学的な力を反映していることが示唆された.

## 3. $\beta$ ディフェンシン2の強発現によるIL-17関連遺伝子群の発現上昇

○山崎真美\*, 西村学子\*, 佐藤 惇\*, 吉田光希\*, 佐藤英樹\*, 高井理衣\*, 齊藤正人\*\*, 安彦善裕\*  
\*北海道医療大学歯学部 生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野  
\*\*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】** $\beta$ ディフェンシン (hBDs) は主に上皮細胞 (ケラチノサイト) で発現する抗菌性ペプチドである. 特にhBD-2は, 炎症性刺激やケラチノサイトの分化などにより発現が上昇する. しかしながら, hBD-2の発現上昇がケラチノサイトの動態に与える影響については不明である. そこで, 本研究では, ケラチノサイトにhBD-2を強発現させた際の遺伝子の発現変化を検索した.

**【方法】**ヒト正常皮膚ケラチノサイトHaCaT細胞を用い, Flp-In™ System (Invitrogen) にてhBD-2強発現細胞を作成した. コントロールにはEmpty pcDNA/FRT-CATプラスミドを遺伝子導入したHaCaTを用いた. コントロールと比較して, hBD-2強発現細胞がhBD-2を強発現していることを, RT-PCR, TaqMan-PCR, ELISA法にて確認した. 各細胞からtotal RNAを抽出し, マイクロアレイ (Agilent Technologies) にて遺伝子発現変化の網羅的

解析を, Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Tomy Digital Biology) にてネットワーク解析を行った. 得られた遺伝子発現の変化はRT-PCRにて確認した.

**【結果および考察】**マイクロアレイでは, hBD-2強発現細胞での発現がコントロールの2倍以上の遺伝子が2440個であった. マイクロアレイのデータを用いたIPAによるネットワーク解析により, ケラチノサイトにおけるhBD-2の強発現で, 多い割合で発現上昇が認められた遺伝子群として「IL-17関連遺伝子群」があげられた. RT-PCRによっても, IL-17受容体とその下流遺伝子の発現上昇が確認された. IL-17はTh17細胞から産生されることから, hBD-2の強発現が免疫系疾患の病態に関与していることが示唆された.

**【結論】**hBD-2の強発現は, IL-17受容体とその下流遺伝子の発現を上昇させた.

#### 4. ナノメタル粒子曝露後の細胞の形態変化

○橋本正則, 戸島洋和, 長野二三, 井田有亮, 遠藤一彦  
北海道医療大学歯学部生体材料工学分野

**【目的】** ナノ粒子表面へポリマー素材を被覆させることにより, 粒子の特性とポリマーが持つ機能(水分散性など)を組み合わせた新規機能性材料が得られる。さらに, 粒子表面を被覆することにより細胞内でのイオンの放出が抑制され, 毒性が軽減する可能性がある。それら新規材料の医科・歯科の応用が考えられているが, 新規ナノ材料の生体および細胞に対する影響については不明な点が多い。そこで, 本研究では, ナノ粒子が細胞に与える影響について, 主に形態観察を行って調べた。

##### 【方法】

(材料) 細胞にはマクロファージ様細胞 (RAW264.7) および骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を用いた。ポリマーを分散剤として粒子表面に被覆した3種類の水分散性・ナノメタル粒子を実験に供した。①親水性ポリマー被覆ナノ銀粒子 (Ag-NPs), ②親水性ポリマー被覆ナノ金粒子 (Au-NPs), ポリビニルピロリドン被覆ナノ銀粒子 (Ag-PVPs)

(方法) ナノメタルの形態はTEM (H-7100, Hitachi) で観察, 分散液の性状は紫外可視分光光度計 (Ultraspec 3100 pro, GE) にて評価した。培養液は, 10% FBS配合の $\alpha$ -MEMまたはD-MEM (Wako) を使用した。12-well

plate ( $5 \times 10^4$  cells/well) および96-well plate ( $1 \times 10^4$  cells/well) の条件にて細胞を播種し72時間培養後, ナノ粒子を10, 100および500 $\mu$ g/mLになるように培地に加え, さらに24時間培養した。ナノメタル粒子および粒子の細胞内局在を光学顕微鏡 (TS100, Nikon), SEM/EDX (SSX-550, Shimadzu) およびTEMにて観察した。

**【結果】** Au-NPsにおいては, 粒子が細胞表面に付着し凝集する像が特徴的に観察された。細胞に取り込まれたナノメタル粒子は, 細胞質およびリソソーム内に局在する 경우가多く, 細胞内での粒子は凝集したものが多かった。さらに, レセプター依存性のエンドサイトーシス (Ag-PVPs) やリソソームが肥大化した細胞 (Ag-NPs) なども観察された。

**【結論】** 粒子の種類や被覆するポリマーの種類によって, 細胞の反応は形態観察においても明らかに異なることが明らかとなった。今後, 種々の分析方法を用いて, 詳細にナノメタル粒子の細胞に対する影響を明らかにする必要がある。

**【謝辞】** 本研究は北海道大学工学院・材料科学およびミヨシ油脂株式会社の協力により行いました。ここに感謝の意を表します。

#### 5. Effects of Dentin Phosphophoryn on Odontoblast Differentiation in vitro

○POLAN Mohammad Ali Akbor, HANDA Keisuke, KOIKE Toshiyuki,  
HAYASHI Keiji, TANG Jia and SAITO Takashi

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

**【Purpose】** The ultimate goal of vital pulp therapy is to rapidly regenerate dentin of excellent quality by using an external agent that possesses novel properties such as biocompatibility and bioactivity. Dentin phosphophoryn (DPP), a member of small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLING) family, is the most abundant of the non-collagenous polyanionic proteins in dentin. The purpose of this study was to examine the effects of DPP on differentiation and mineralization of odontoblasts in vitro.

**【Materials & Methods】** Mouse Dental Papilla Cells-23 (MDPC-23) given by Prof. Nör in Michigan University was used in this study. The cells were cultured with DMEM supplemented with 10% FBS containing DPP at different concentrations (0, 0.1, 1, and 10 $\mu$ g/ml). The cell-morphology and proliferation were evaluated. Furthermore, cells were analyzed for mRNA expression of dentinogenesis-related proteins by RT-PCR. Moreover, ALPase activity and Aliza-

rin red staining were performed for confirmation of mineralization induced by DPP.

**【Results and Discussion】** The addition of DPP did not affect on proliferation or morphology of MDPC-23. The mRNA expressions of DSPP, ALP and Osteorix in MDPC-23 were promoted by 1 and 10 $\mu$ g/ml of DPP at 3 days. The high ALPase activity in MDPC-23 was induced by 1 and 10 $\mu$ g/ml of DPP at 5 and 7 days. The number of mineralized nodules was higher by addition of 1 and 10 $\mu$ g/ml of DPP at 7 days. It was previously reported that DPP induces the differentiation of osteoblasts via MAPK and Smad pathway. In the present study, it is suggested that DPP promotes the differentiation and mineralization of odontoblasts via the pathways likewise.

**【Conclusion】** These results indicate that DPP promotes the differentiation and mineralization of odontoblasts.

## 6. *S. mutans* と *V. tobetsuensis* の口腔バイオフィーム形成能の解析

○眞島いづみ\*, 鎌口有秀\*\*, 宮川博史\*\*, 藤田真理\*\*, 中澤 太\*\*

\*北海道医療大学大学院歯学研究科

\*\*北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野

**【目的】** 歯科の二大疾患であるう蝕や歯周病の原因は口腔バイオフィームであり、その形成開始菌として *Streptococcus* 属、初期定着菌として *Veillonella* 属が知られている。しかしバイオフィーム形成に及ぼすこれら2属菌種間の相互作用は未だに明らかになっていない。これまでの研究経過から、*Streptococcus mutans* と口腔 *Veillonella* 属各菌種との組み合わせでバイオフィーム形成を試みた結果、*V. tobetsuensis* との共培養時に最も多くバイオフィームを形成することが判明した。そこで本研究では *S. mutans* を形成開始菌、*V. tobetsuensis* を初期定着菌として使用し、ワイヤー法を用いてこれら2菌種間のバイオフィーム形成能をより詳細に解析した。

**【方法】** 菌株は *S. mutans* *ingbritt*, *V. tobetsuensis* ATCC BAA-2400<sup>T</sup> を使用した。*S. mutans* を10% スクロース、2% 乳酸ナトリウム添加BHI液体培地の入った試験管に播種後、人口唾液処理したワイヤーを挿入し、3日間嫌気培養した。3日後、*V. tobetsuensis* を播種した培地入り試験管に *S. mutans* の付着したワイヤーを挿入し、6日間嫌気培養した。全9日間の培養期間中、培地は毎日

交換した。9日後、ワイヤー上に形成されたバイオフィームを回収し、DNAを抽出した。また試験管内のバイオフィーム形成に関与しなかった菌（プランクトニック細胞）も回収し、そのDNAを抽出した。抽出したDNAにより定量的real-time PCRを用いて、バイオフィーム形成量と2菌種の構成比を解析した。

**【結果及び考察】** 全9日間の *S. mutans* と *V. tobetsuensis* のバイオフィーム形成傾向は *S. mutans* 単独で形成されるバイオフィームよりも *V. tobetsuensis* との共培養により形成されたバイオフィームの方が継続的に増加した。一方、*S. mutans* のプランクトニック細胞は *S. mutans* の単独バイオフィーム形成時には継続的に増加したが、*V. tobetsuensis* との共培養時には継続的に減少した。これらの結果から、*V. tobetsuensis* は *S. mutans* とのバイオフィーム形成において、その形成を促す役割を果たしていることが示唆された。

**【結論】** *V. tobetsuensis* は *S. mutans* とのバイオフィーム形成初期段階において、その成熟に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

## 7. Effects of phosphoryn-derived RGD peptides on the proliferation and differentiation of odontoblasts

○TANG Jia, HANDA Keisuke and SAITO Takashi

Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

**【Purpose】** Calcium hydroxide has been considered as the gold standard in direct pulp capping currently. However, it has some unavoidable shortcomings like high alkalinity, porous reparative dentine formation and long reparation time. To overcome these problems, new biocompatible reagents that induce sound reparative dentine formation need to be developed. Dentin phosphoryn is the most abundant extracellular matrix in dentin, and is reported to be involved in the initiation of mineralization of dentin. Previously, we showed the ability of phosphoryn-derived RGD short peptides artificially synthesized for induction of differentiation of human bone marrow stem cells in vitro. The purpose of this study was to examine whether the peptides have any effects on the proliferation and differentiation of odontoblasts.

**【Materials and Methods】** Polystyrene cell culture dishes were coated with 200µg/ml of phosphoryn-derived RGD peptides (RGD-1 : SESDNSSSRGDASYNSDES ; RGD-2 : ANSESDNSSSRGDA ; RGD-3 : SRGDASYNSDESKD). Mouse Dental Papilla Cells-23 (MDPC-23), odontoblast-like cell line given by Prof. Nör in Michigan University was cul-

tured on the peptide-coated dishes with DMEM supplemented with 10% FBS. The cell-morphology and proliferation were evaluated. Furthermore, cells were analyzed for mRNA expression of dentinogenesis-related proteins by conventional RT-PCR and real-time PCR.

**【Results and Discussion】** These peptides did not affect the morphology or proliferation of MDPC-23. The RGD-3 significantly promoted the DSPP, DMP-1, ALP, OCN, BSP gene expressions at the concentration of 200µg/ml, while RGD-1 and RGD-2 showed comparatively weaker effect than RGD-3, still it was higher than control. It was previously reported that DPP promotes cell-differentiation via MAPK and Smad signal pathway after RGD motif binds to integrin existing on the cell surface. From the results of this study, it was speculated that peptide-conformation is important for induction of differentiation of odontoblasts.

**【Conclusion】** This study show that 200µg/ml of RGD peptides have positive effect on the differentiation of MDPC-23, and that RGD-3 is the most potential in enhancing the odontogenic gene expression among the peptides in vitro.

## 8. 口腔乾燥症状改善薬ピロカルピンによる唾液腺のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌

○根津顕弘\*, 森田貴雄\*, 東城庸介\*\*, 谷村明彦\*  
北海道医療大学・歯学部・薬理学, 同・生物物理学

**【目的】**ムスカリン受容体 (mAChRs) の活性化は, 細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度 ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) 上昇を介して唾液分泌を起こす. 口腔乾燥症状改善薬であるピロカルピン (Pilo) は, mAChRsの活性化を介したCa<sup>2+</sup>応答を起こすと考えられているが, その応答はカルバコール (CCh) やベタネコール (Bet) などの他のmAChRs作動薬と比べ非常に小さい. 今回我々は, PiloがCChやBetによるCa<sup>2+</sup>応答や唾液分泌を低下させることを見出した. さらにPiloとBetによる唾液腺のCa<sup>2+</sup>応答と唾液分泌との関係を調べた.

**【方法】**顎下腺細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 変化の測定: 酵素処理により調製したラット顎下腺単離細胞にfura-2を取り込ませ, 薬物による蛍光比変化を蛍光光度計にて測定した. 唾液分泌量の測定: 麻酔下のラットに薬物を腹腔内投与し, 分泌された唾液を口腔内に挿入した綿球で拭い取り10分毎に重量を測定した.

**【結果および考察】**Piloは濃度依存的に顎下腺細胞の [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> を上昇させ, 100μMで最大の上昇を起こしたが, この上昇はCChによる最大反応の約15%であった. また, Piloは100μM CChによる [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 上昇を濃度依

的に抑制し, 高濃度 (300μM) でCChの作用を約75%抑制した. これらの結果から, PiloはmAChRsの部分作動薬として作用することで, CChによるCa<sup>2+</sup>応答を抑制することが明らかとなった. Pilo (3 mg/kg) やBet (10mg/kg) による唾液分泌は, 神経節遮断薬のヘキサメトニウム (20mg/kg) では抑制されず, mAChRs遮断薬のアトロピン (0.1mg/kg) により抑制されたことから, Piloは顎下腺のmAChRsの活性化を介して唾液分泌を起こすことが確かめられた. さらに, Pilo (3 mg/kg) とBet (10mg/kg) との併用は, Bet単独と比べて約22%の分泌低下が観察された. 以上の結果から, PiloはmAChRs部分作動薬として唾液腺に小さなCa<sup>2+</sup>応答を起こすが, この応答は唾液分泌に十分であることが示唆された. 唾液腺のCa<sup>2+</sup>応答と分泌との関係をさらに調べるため, 生きた動物の唾液腺のCa<sup>2+</sup>動態の測定を試みており, 今回その結果も紹介する.

**【結論】**PiloはCChの約15%という効力の弱い部分作動薬であり, 小さなCa<sup>2+</sup>応答による唾液分泌作用に加えて, 完全作動薬によるCa<sup>2+</sup>応答や唾液分泌を減弱させる.

## 9. Black stainにおける歯周病原性細菌叢との関連性

○山崎さや夏, 首藤かい, 植原 治\*, 梶美奈子\*\*, 村田佳織, 村井雄司, 倉重圭史, 齊藤正人  
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, \*北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野,  
\*\*北海道医療大学病院歯科衛生部

**【目的】**平成23年の歯科疾患実態調査においては, 12歳児のDMFT指数は1.4本と減少傾向を示している. そのため小児歯科の外来では, 予防処置や歯列, 口臭および歯の着色などの相談が増加してきている. 着色に関しては, 口腔内環境の良好な人にみられる黒色沈着物 (Black stain) がある. Black stainは, これまでに様々な国や地域で口腔内状態の比較などの報告はあるものの, 関連菌や構成成分など詳細は不明である. 本研究では, Black stainにおける歯周病原性細菌叢の関連性および構成成分の解析をすることを目的とした.

**【方法】**本学大学院小児歯科を受診し, 本研究に対して保護者の理解と同意の得られた者を対象とした (北海道医療大学個別差医療科学センター倫理委員会: 第2011-012号). 対象者にPMA indexを用いた口腔内診査を行い, プラークは綿棒にて, Black stainはエキスカバーターにて採取した. 採取したプラークからDNAを採取し, Real-time PCR法にて歯周病原性細菌の測定および

総菌数を定量し, Black stain保有者と非保有者との比較を行った. Black stainは, エネルギー分散型分光器を用いて含有物の元素分析を行い, 一部をレジン樹脂包埋し, 透過電子顕微鏡にて観察した.

**【結果】**PMA indexでは, Black stain保有者および非保有者に優位な差は認められなかった. また, PMA index低スコア群でのBlack stain保有者において, *P. nigrescens* が多く認められた. Black stainの元素分析では, カルシウムが主体であり歯石の成分に酷似していた. また, 透過電子顕微鏡像では, Black stain内部に細菌様構造が認められた.

**【考察】**Black stainは, 元素分析および透過電子顕微鏡により, 歯石に類似したものであり, 細菌が関与していることが示唆された. *P. nigrescens* は, 黒色集落形成嫌気性菌として知られており, Black stainの原因菌の可能性が示唆された.

## 10. 口腔外科における抗菌薬の使用状況に関する検討

○鬼頭秀和\*, 植村太輔\*, 佐野聖子\*, 田崎純一\*\*, 淀川慎太郎\*, 北所弘行\*, 永易裕樹\*, 柴田考典\*\*, 有末 眞\*  
\*北海道医療大学歯学部生体機能病態学系顎顔面口腔外科分野, \*\*同組織再建口腔外科分野

**【目的】** 抗菌薬の使用は、感染症の制御のために必要不可欠である。一方、抗菌薬の安易な使用は耐性菌を増加させる要因となる。そのため、抗菌薬の適正使用の推進は重要な課題である。今回、当科での抗菌薬の使用状況を評価する目的で本調査を実施したので、その概要を報告する。

**【方法】** 2012年1月～12月までの1年間、当院歯科口腔外科の入院患者146例に使用した抗菌薬の適用率、適用例、用量、細菌検査件数等を調査した。

**【結果】** 当科の該当期間中の入院症例に対して、5種類の抗菌薬（計601本）が用いられていた。全ての症例で抗菌薬が点滴投与されており、その使用率は、ペニシリン系薬が33.3%、第一世代セフェム系薬が43.8%、第三世代セフェム系薬が15.8%、リンコマイシン系薬が6.7%、カルバペネム系薬が0.4%であった。抗菌薬使用症例は、抜歯後の予防投与症例は42症例で、全てにおいて第一世代セフェム系薬が使用されていた。顎骨周囲炎、術後感染などの炎症に対する消炎投与例は18症例あ

り、その内15症例に対し第三世代セフェム系薬が使用されていた。顎骨形成術に対する予防投与症例は23症例あり、22症例に対しペニシリン系薬が使用されていた。悪性腫瘍手術症例は10症例あり、その内8症例でリンコマイシン系薬と第三世代セフェム系薬が併用で使用されていた。当科での抗菌薬単剤使用例は、単剤使用例は94.5%（138症例）、多剤使用例は4.5%（8症例）であり、多剤使用例は術後単剤で改善を認めないあるいは、増悪した場合に使用された。細菌検査件数は11症例に計51件行っており、3症例にMRSAが検出された。ただ、この3症例は再検査にてMRSAは検出されず、抗MRSA薬も使用していない。

**【結論】** 当科では、今日まで3症例にMRSAの報告があったのみで、抗菌薬は適正に使用されていると考えられた。今後、抗菌薬の使用状況に関して、継続的な調査と評価を行い、使用量、使用期間などの更なる適正化を推進する所存である。

## 11. 歯槽骨欠損の3次元的な診断能におけるコーンビームCTとマルチスライスCTの比較

○南 誠二, 大西 隆, 佐野友昭, 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

**【目的】** 顎顔面領域を検査対象としたコーンビームCT（以下CBCT）は空間分解能に優れ、3次元的な多断面画像の観察が標準的に可能であることから、インプラント術前診査を含めた歯科的診断に有用である。一方、全身用のCTにおいてもマルチスライスCT（以下MDCT）が普及し、空間分解能においても3次元的な多断面画像の観察においてもCBCTと同様な観察が可能である。しかし、今までにその両者の微細な歯槽骨欠損における診断能を比較した研究はほとんどなされていない。そこで、本研究の目的は、微細な歯槽骨欠損の診断能についてCBCTとMDCTと比較検討し、その診断能に差があるかを明らかにすることである。

**【方法】** 歯科用CBCT装置（CB Mercuray, (株)日立メディコテクノロジー, 東京）及び、MDCT装置（Aquilion 16-slice system, (株)東芝メディカルシステムズ, 栃木）を使用した。CBCT画像についてはFilterを硬組織用（以下CBCT-H）と軟組織用（以下CBCT-S）に分け、MDCT画像と比較した。撮影条件はFOVが5cm, 10cm, 15cm（以下それぞれFOV5, FOV10, FOV15）、電圧が80kV, 100kV, 120kV、電流がCBCTは10mA, 15mA, MDCTは100mA, 150mAとした。なお、MDCTにおいては、FOV、スライス厚をCBCTに一致させるために、撮像可能な最小条件であるFOV18cmスライス厚0.5mmの画像をまず取得し、その後FOVと再構成pitchを5cm/0.1mm, 10cm/0.2mm, 15cm/0.3mmに再構成した各画像を作成した。ヒト乾燥下顎骨の左下6遠心側の歯槽骨に人工的に微細な骨欠損を4段階の深さで作製

し、未削除と合わせて5段階の試料についてCT撮影を行なった。得られた画像を、画像処理ソフトOsiriXを用いて5人の歯科放射線科医が骨欠損の有無を連続確信度法にて判定した。その判定結果からROC解析を行ない、骨欠損の診断能をROC曲線下面積（Az値）として求めた。その平均値のCBCTとMDCT間の差をノンパラメトリック検定で有意差検定（危険率5%）を行い、両者の人工的歯槽骨欠損の診断能の差を明らかにした。

**【結果および考察】** ①MDCT, CBCT-H, CBCT-Sの3者の間に、全体の比較では有意差は無かった。FOVごとの比較ではFOV5, FOV10においてMDCTとCBCT間で有意差が無いが、FOV15においてMDCTとCBCT-S間で有意差が認められた（MDCT>CBCT-S, P=0.033）。②FOVによる差は、CBCT-H, CBCT-SにおいてはFOV5, 10, 15の間に有意差無いが、MDCTにおいてFOV5とFOV15の間に有意差が認められた（15>5, P=0.033）。以上の結果から、①CBCTはMDCTと比較して全体的には有意差は認めないが、FOVが大きく、あるいはFilterがSoftの場合は診断能が劣る傾向にあると考えられる。②MDCTは再構成画像において、FOVやスライス厚を小さくしすぎると診断能が低下すると考えられる。

**【結論】** 人工的歯槽骨欠損の診断能において、CBCTとMDCTの間に全体的には有意差は認められない。しかし、CBCTはFOVを大きくすると診断能が低下傾向にあるので、被曝低減の見地からも不必要にFOVを拡大するべきではないと考えられる。

## 12. 北海道医療大学病院口腔インプラント科における光機能化インプラントの現状報告

○上田修平, 北所弘行, 杉村佳洋, 今枝明子, 佐藤里織, 榊原 豪, 工藤 勝, 大桶華子, 仲西康裕, 広瀬由紀人, 會田英紀, 舞田健夫, 越智守生  
北海道医療大学病院口腔インプラント科

**【目的】**北海道医療大学病院口腔インプラント科においてインプラント体表面(チタン)の生物学的活性を回復する光機能化装置(セラビーム<sup>®</sup>アフィニー, ウシオ電機株式会社)を導入した。今回, インプラント体への光機能化の効果について調査したので報告する。

**【方法】**北海道医療大学病院口腔インプラント科において, 2012年6月から2012年12月までの6ヶ月間に光機能化し埋入したインプラント87本, 患者数28名を対象に性別, 年齢, 埋入部位, 骨質(タイプI, II, III, IV Lekholm・Zarbの分類), 骨造成(GBR)の有無について調査を行った。また2次手術を終了している12本について共鳴振動周波数分析装置Osstell<sup>™</sup>menter(Integration Diagnostics社)を用いてImplant Stability Quotient(以下ISQ)値の経時的(1次手術時と2次手術時)変化を計測し, 調査した。なお, 本研究は北海道医療大学病院倫理委員会で承認を得て行った。

**【結果】**性別では男性10名, 女性18名, 平均年齢は58歳(男性62歳, 女性55歳)であった。埋入部位では, 上顎

大臼歯部17本(19.5%), 上顎小臼歯部11本(12.6%), 上顎前歯部18本(20.7%), 下顎大臼歯部20本(23.0%), 下顎小臼歯部16本(18.4%), 下顎前歯部5本(5.8%)であった。骨質タイプ別では, タイプIが8本(9.2%), タイプIIが8本(9.2%), タイプIIIが36本(41.3%), タイプIVが35本(40.3%)であった。GBRを併用したのは17本(19.5%)であった。また1次手術時のISQ値平均は上顎67.6であり, 下顎で72.8であった。また, 2次手術時のISQ平均は上顎で71.3であり, 下顎で75.2であった。経時的ISQ値では, 1次手術時に比べ2次手術時では上昇する傾向がみられた。

**【結論, 考察】**インプラント表面を光機能化することにより, ぬれ性等が向上しオッセオインテグレーションの早期獲得が得られるという會田らの報告がある。このため治療期間の短縮と, 患者のQOL向上が期待できる。現在, 半年間の実用化であるため今後, さらなる症例数を積み重ね, 光機能化インプラントの臨床的な検討を行っていく予定である。

## 13. 北海道医療大学病院麻酔科ならびに歯科麻酔外来の全身管理症例に関する臨床統計学的検討(2005年5月~2012年12月)

○内澤理恵, 吉本裕代, 金澤 香, 大桶華子, 工藤 勝, 三浦美英  
北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系歯科麻酔科学分野

**【目的】**北海道医療大学病院は病院整備拡充計画のもと, 旧歯学部附属病院と旧医科歯科クリニックの再編統合により, 2005年5月に診療業務開始となった。旧歯学部附属病院よりさらに機能拡充された2つの手術室では侵襲の大きな外科的手術が, 2つの歯科麻酔外来診療室では全身管理を要する患者の小手術や歯科治療が行なわれてきた。麻酔科ならびに歯科麻酔外来では全身麻酔や鎮静法, モニター監視を行なうことにより, 術中の患者管理に携わっている。今回我々は, 診療業務開始から7年間の北海道医療大学病院麻酔科ならびに歯科麻酔外来における全身管理症例について臨床統計的検討を行ったので報告する。

**【方法】**2005年5月から2012年12月までの期間における, 北海道医療大学病院麻酔科, 歯科麻酔外来の全身管理症例を対象とした。手術室管理症例(以下手術室群)と歯科麻酔外来診療室管理症例(以下外来群)に分類し, 各群における年齢分布, 男女比, 全身状態, 手術または処置内容, 全身管理方法, 全身管理時間, 入院率について, 各診療担当科に着目して検討した。

**【結果】**対象症例は2113例であった。手術室群は440

例, このうち医科部門症例は11例で, 眼科と耳鼻咽喉科の症例であった。手術室群中, 歯科部門は429例で, 97.9%は口腔外科症例であった。手術室群の平均年齢は41.2歳で10~20歳代が40.5%を占め, 男女比に大きな差はみられなかった。全身管理方法はほぼ全身麻酔であったがモニター監視や静脈内鎮静法も認められた。一方, 期間中の外来群は1673例で, 全例が歯科部門症例であり, 口腔外科が最も多く36.7%であった。外来群の平均年齢は37.0歳であり, 10.6%が10歳未満であった。全身状態の比較では, 全身的予備力の高いASA ps 1が58.8%を占めていた。全身管理方法のうち全身麻酔は41.0%で, このうち一般歯科, 小児歯科, 摂食嚥下外来症例の多くは歯科不適応を全身管理理由としていた。また, 静脈内鎮静法と吸入鎮静法を併用した症例の75.6%は口腔インプラント科であった。平均全身管理時間は111.8分で, 小児歯科症例に長い傾向がみられた。外来群の78.7%が入院管理であった。

**【結論】**今後一層, 当院各診療科や地域開業医に対する当科業務の認知向上に努め, 安全で快適な医療を希望する患者に貢献していきたい。

## 14. スパッターリング法による薄膜HAコーティングインプラントの臨床成績

### —7年経過の臨床評価—

○仲西和代\*, 仲西康裕\*, 松原秀樹\*, 廣瀬由紀人\*, 油井知雄\*, 舞田建夫\*\*, 村田 勝\*, 北所弘行\*\*, 草野 薫\*, 田崎純一\*\*, 工藤 勝\*, 大桶華子\*, 越智守生\*

\*北海道医療大学歯科内科クリニック口腔インプラント科

\*\*北海道医療大学病院口腔インプラント科

**【目的】** ハイドロキシアパタイトコーティングインプラントは高い骨伝導能を有し、早期のオッセオインテグレーションを可能にする。今回我々はスパッターリング法という技術でハイドロキシアパタイト層を均等な薄膜（1 μm）にコーティングしたインプラント（以下、ミューワンインプラント）を導入し7年を経過したので、その臨床評価を行い有効性を検討することを目的とした。

**【方法】** 調査は2004年12月からミューワンインプラントを埋入した患者を対象とした。本インプラントは臨床試験から導入された。検討項目を性別・年齢別分布、インプラント埋入部位、インプラント体のサイズ（直径、長径）、上部構造の種類、欠損部位・形態別分類、メンテナンス時のインプラント周囲粘膜の炎症程度、生存率の7項目に分類し、臨床的検討を行った。生存分析はKaplan-Meier法によりインプラント生存率を求めた。なお、埋入から下顎は2か月後、上顎は4か月後に上部構造を装着した。

**【結果および考察】** これまでにミューワンインプラントを埋入した症例は35症例で、埋入本数は59本であった。埋入した症例は50歳代が全体の31%、片側臼歯遊離端欠

損症例が51%で最も多かった。インプラント体の直径は3.7mm、長径は10mmが多かった。メンテナンスに応じた症例では、インプラント周囲粘膜の炎症所見はなく、機能的にも全く問題が生じなかったが、上部構造の前装冠に使用したハイブリット型コンポジットレジンが破折し、修理に至った症例が数例あった。インプラント体頸部の破折で除去し再埋入を行った症例は2症例2本で、上部構造装着後3年8か月と5年8か月であった。1症例は最後方臼歯で1症例は延長ブリッジの欠損側の支台であった。インプラント体の直径は3.7mmと3.3mmで、臼歯部への埋入においては比較的細い直径の選択であり、臨床的に咬合負荷が予想されるような症例ではインプラント体の選択をより慎重に行う必要があると考えられた。インプラント治療を行った35症例におけるKaplan-Meier法による生存率は87%、上顎100%、下顎85%であった。

**【結論】** ミューワンインプラント導入から7年経過の時点で、連絡不能や来院拒否の症例もあり、インプラント生存率は87%であった。しかしながら本インプラントの臨床経過は良好であり、有効性と安全性が示唆された。

## 15. 上顎に発生した骨巨細胞腫の一例

○植村太輔\*, 永易裕樹\*, 北所弘行\*, 淀川慎太郎\*\*, 田崎純一\*\*, 佐野聖子\*\*, 鬼頭秀和\*, 安彦善裕\*\*, 中山英二\*\*\*\*, 柴田考典\*\*, 有末 眞\*

\*北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野

\*\*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

\*\*\*北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野

\*\*\*\*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

**【目的】** 骨巨細胞腫は、一般的に長管骨の骨端部、特に大腿骨遠位端や脛骨近位端に好発し、次いで橈骨、尺骨、仙骨、腸骨に多く、頭蓋顔面部、特に上顎骨に発生した巨細胞腫の報告は稀である。今回われわれは、15歳女児の上顎骨に発生した骨巨細胞腫を経験したので、その概要を報告する。

**【症例】** (患者) 15歳、女児。(現病歴) 2012年1月頃より、145部の歯肉腫脹を自覚していたが、疼痛がなかったため放置していた。その後、徐々に同部の腫脹と軽度の疼痛を認めるようになり、近医歯科を受診したところ、X線写真において、145部から上顎洞に達するX線不透過像を指摘され、精査加療を目的に2012年4月16日に当科初診となった。(現症) 顔貌所見：左側上唇から鼻翼基部、頬部にかけて軽度の腫脹が認められた。口腔内所見：145相当の歯槽部に圧痛を伴う膨隆を認めた。

(画像所見) パノラマX線：145相当の歯槽骨を基部として上顎洞内に突出した類円形の不透過性病変を認め、145は病変により歯根が離開していた。CT：上顎洞内をほぼ充滿した病変は周辺一層のみが不透過性を示し、内部は均一な軟組織様透過像を示していた。左側上顎洞前壁は病変により膨隆、菲薄化しており、一部に骨欠損が認められた。(臨床診断) 左側上顎骨腫瘍。

**【経過および考察】** 生検の結果、骨巨細胞腫の病理組織学的診断を得た。2012年5月1日に全身麻酔下に腫瘍摘出術を施行した。摘出腫瘍の病理像は生検組織と同一で、種々の大きさを呈する多数の多核巨細胞を伴う細胞密度の高い類円形細胞の増殖を主体とした組織像であった。術後約8ヶ月経過したが再発なく経過良好であるが、本腫瘍の生物学的性状を考慮し、長期にわたる経過観察が必要と考えられる。

## 16. 糖尿病と歯周病との関連性 - 地域における医科歯科連携調査研究の結果から -

○藤原 正\*, 長澤敏行\*, 小松寿明\*, 妹尾智子\*, 川上智史\*\*, 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

\*\*北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系高度先進保存学

**【目的】** 北海道岩見沢市立総合病院内科に通院中の糖尿病患者を対象に、近隣の歯科治療担当歯科医師からそれぞれの歯周組織検査結果を含む歯科検査結果を収集し、それらと全身疾患および全身検査結果との関連性を分析した。

**【方法】** 研究参加に同意した糖尿病患者92名中41名（男性24名，女性17名，平均65.9歳）の患者について歯科関連データ（残存歯数，処置歯数，齶蝕歯数，歯周病診断結果（健康，歯肉炎，軽度歯周炎，中等度歯周炎，重度歯周炎の歯数））を回収した。それらの結果を内科的なデータ（年齢，BMI，総コレステロール，HDL，LDL，TG，hCRP，HbA1c，1.5AG，空腹時血糖，HOMA，糖尿病合併症（網膜症・腎症・神経障害）の有無）と比較・検討し，歯周病と全身の健康状態との関連性について解析を行った。

**【結果】** 重回帰解析の結果，糖尿病合併症の有無とHbA1c値，重度歯周炎罹患歯数とのそれぞれに有意な相関が認められた。他の歯科データと内科データとは有意な相関を認めなかった。

**【結論】** 今回の取り組みは，病院歯科のない総合病院内科における糖尿病患者の歯科データを地域の担当歯科医師から回収することで医科疾患と歯科疾患との関連性を分析したものである。各地域における医科歯科連携調査研究を今回と同様の方法で実施することによって，歯周病と全身の健康状態との相関を分析できる可能性が示唆された。

〔研究協力者〕：九津見紳一郎（医療法人社団学歯会九津見歯科医院）

吉村治彦（岩見沢市立総合病院内科）

辻 昌宏（北海道医療大学病院内科）

## 17. 当センターにおける歯科医療連携の現状と課題について

○関口五郎

東京都立心身障害者口腔保健センター

**【目的】** 当センターでは平成20年6月に医療連携室を立ち上げ，4年半が経過した。そして患者さんの紹介・逆紹介・返送といった医療連携を高次医療機関や地区口腔保健センター，地域歯科医療機関の間で行っている。今回は当センターにおける歯科医療連携の現状とその課題について報告する。

**【方法】** 平成20年4月から24年11月までに医療連携室でまとめた連携状況の集計，および当センター協力医を対象としたアンケート調査を基に，医療連携の件数，内容，紹介後の患者さんの動向，連携上の課題について調査した。

**【結果および考察】** 調査対象の期間に他医療機関からの紹介状を持参して当センターに来院した者（紹介）は515名，当センターから他医療機関に紹介した者（逆紹介）は425名であった。また治療の終了などで紹介元歯科医療機関に返送した者（返送）は99名であった。紹介元は地域歯科医療機関が最も多かったが，近年摂食・嚥下機能療法や言語療法の依頼目的で医科医療機関からの紹介も増加していた。逆紹介先は歯科大学病院，病院歯科等の高次医療機関が多く，さまざまな全身疾患を併発している者が多い当センターの状況を反映していた。総実績との比較では返送の者は多くなかったが，返送の約20%は当センターの協力医に依頼しており，地域歯科医

療機関との連携をめざして取り組んでいる。なお協力医を対象としたアンケート調査によれば，地域への紹介後は，おおむね継続的な定期健診や予防指導等を受けていたが，治療が困難で再度当センターに紹介されたケースもあった。協力医からは，返送時に詳細な医療情報を希望する意見や，返送後も必要な時には再度の依頼を希望する意見などが寄せられた。

さらに当センターでは定期的に医療連携の実績を全職員に周知し，実績の向上を目指している。患者さん向けには，待合室掲示のお知らせを活用することによって，地域のかかりつけ歯科医を紹介している他，障害者歯科の研修を受講した歯科医師を対象に協力医制度を設け，定期的に研修会の開催や情報の提供を行うなど，地域における障害者歯科医療の広がりを目指している。

**【結論】** 当センターでは今回報告したような歯科医療連携の体制をとっている。医療連携室開設後の期間がまだ短く，障害のある方を対象とした歯科医療連携はさまざまな課題が挙げられるものの，他医療機関との連携や情報の共有が今後とも重要であると思われた。そして今後は診療内容をより充実させ，障害者歯科医療の情報提供・管理を実施し，協力医や各地域の医療機関との連携をより深めてゆくことにしている。

## 18. 東日本大震災における身元確認作業について

○大熊一豊\*\*，岡久美子\*\*\*，石井義人\*\*\*\*，加我英史\*\*\*\*\*，斎藤隆史\*\*  
\*大熊歯科医院，\*\*北海道医療大学歯学部う蝕制御治療学分野，\*\*\*旭川医科大学医学部法医学講座，  
\*\*\*\*東栄ファミリー歯科，\*\*\*\*\*加我歯科医院

【目的】2011年3月11日14時46分，未曾有の大震災である「東日本大震災」が発生した。三陸沖を震源に国内観測史上最大のマグニチュード9.0の地震に加え，その後発生した巨大な津波が各地を襲い，戦後最悪の被害を及ぼした。4月28日北海道歯科医師会災害対策本部からの要請で，岩手県での身元確認作業に従事させていただく機会を与えていただいた。今回，岩手県歯科医師会での聞き取り情報，被災地で活動する警察の状況，身元確認作業の現状から，大規模災害発生時の歯科による個人識別に関する今後の課題等を報告させて頂く。

【方法】警察官らは遺体を発見すると最も近い遺体安置所に遺体を搬入する。歯科医師は詳細かつ正確に遺体の口腔内所見を記録しておくことが重要であり，そのためには口腔内写真，デンタルチャート，エックス線写真がいわば身元確認における三種の神器とも言えるものである。歯科医師はこれらのデータを採取後，不足がないことを確認した後に警察に提出する。

【経過および考察】今回の岩手県での活動から，大規模災害発生時の身元確認作業等について以下の点が重要であることが明らかになった。

1) 震災後，1週間単位で種々の状況が変化するため，

- それに応じたスピーディーな対応が要求される。
- 2) 前任チームからの直前情報が極めて有効である。
  - 3) 義歯を装着したままの遺体が多く，義歯に名前を入れると大きな手がかりとなり得る。
  - 4) デンタルチャートに口腔内写真を貼付する等，改良点があると思われる。
  - 5) 歯科医師も行方不明の場合，補綴物を製作した歯科技工士からの情報も重要である。
  - 6) 震災後，時間の経過とともに身元確認のための情報が少なくなるため，臨床経験豊富な歯科医師による口腔内情報を基にした年齢推定が，DNA情報による家族との照合作業の補助となり得る。
  - 7) 救護物資を透明ケースで送付すると，仕分け作業が効率化され，避難所において被災者が必要なものを選びやすい。

今回の貴重な経験が，今後警察歯科医活動をされる先生方の参考となることを願っている。最後に，東日本大震災により亡くなられた方々のご冥福をお祈り申し上げますとともに，被災された皆様，そのご家族の方々に対しまして，心よりお見舞い申し上げます。

## 19. 共用試験に向けた教育カリキュラムの効果と問題点 —事後アンケート調査からの考察—

○川西克弥\*，會田英紀\*，豊下祥史\*，額 諭史\*，会田康史\*，河野 舞\*，佐々木みづほ\*，小池智子\*，  
中村健二郎\*，池田和博\*\*，斎藤隆史\*\*\*，中山英二\*\*\*\*，坂倉康則\*\*\*\*\*，越野 寿\*  
北海道医療大学歯学部\*咬合再建補綴学分野，\*\*高齢者・有病者歯科学分野，  
\*\*\*う蝕制御治療学分野，\*\*\*\*歯科放射線学分野，\*\*\*\*\*解剖学分野

【目的】平成17年から正式導入された臨床実習開始前の共用試験（CBT・OSCE）の実施に伴い，知識の総合的理解力や臨床問題解決能力の習得を主眼においた歯科医学教育が実践されるようになった。本学では，歯学教育モデル・コア・カリキュラムの学習到達度を判定するために，1，2，3，5年次に総合学力試験を実施してきた。そして平成23年度には，更に充実した歯科医学教育の構築を目指し，4年次を対象とした歯科医学総合講義Ⅰの拡充およびCBT判定基準試験トライアルを導入した。その結果，本学のCBT成績は全国平均を上回り，著しい教育効果を得ることができた。そこで今回，本学で導入した教育指導システムに対する学生の評価を分析し，その改善点を抽出することを目的として，CBTに関連したアンケート調査を実施した。

【方法】平成24年度本学歯学部第5学年の学生86名に対し，4年次のCBTに関してアンケート法による振り返り調査を実施した。歯科医学総合講義Ⅰを基礎系科目と臨床系科目に区分して，講義の有用性，講義回数ならびに実施時期の適否，CBT判定基準試験とCBT本試験との難易度比較，およびCBT判定基準試験の有用性について Visual Analog Scale（VAS）法を用いて調査した。な

お，アンケートはすべて無記名とした。

【結果および考察】アンケートの回答に不備が認められた8名を除く78名（有効回答率は90.7%）に対して分析を行った。CBT実施要領を知った時期は2,3年次に高いピークが認められ，その情報源として上級生や教職員が大部分を占めた。また，CBTに向けて学習を開始した時期は4年次後期が最も多く，次いで4年生前期が多かった。試験対策に活用した教材では，市販のCBT問題集が最も多く，次いで講義プリントや教科書の順となっていた。歯科医学総合講義Ⅰの行う時期および講義回数については，基礎系科目と臨床系科目ともに「ほぼ適切」であったとの回答が得られた。また，CBT判定基準試験の有用性についてのVAS値は $46.6 \pm 27.3$ mmで，歯科医学総合講義Ⅰの臨床系科目が $60.1 \pm 23.9$ mm，基礎系科目が $53.2 \pm 26.3$ mmであり，臨床系科目はCBT判定基準試験と比較して有意に高い値を示した（ $p < 0.05$ ）。一方，CBT判定基準試験の難易度についてはCBT本試験と「ほぼ同程度」であったとの回答が得られ，作成した試験問題の妥当性がうかがえた。今回のアンケート結果は，今後の本学の教育方法改善やカリキュラムの改訂に役立つ重要な資料になると考えられる。

## 20. 東京医歯大における医・歯合同解剖学実習初年度の結果について

○柴田俊一

東京医科歯科大学大学院顎顔面解剖学分野

**【目的】** 東京医歯大では2011年入学の学生から新カリキュラムをスタートさせている。旧カリとの大きな変更点は教養課程を2年間から1年間に短縮したことと、医学歯学融合教育をスタートさせたことである。医・歯融合教育は入学時から開始されるが、骨格となるのは2年時に行われる「頭頸部基礎ブロック」と3年時以降に行われる「頭頸部臨床ブロック」である。新カリキュラム適応の学生が学部に進級した2012年4月より「頭頸部基礎ブロック」がスタートし、中でも医・歯両学部学生が一同に解剖学実習を行う「医・歯合同解剖学実習」は新カリのなかでも最も比重の高い科目として位置付けられている。演者は2011年10月に東京医歯大に赴任し、早速その準備に追われなんとか初年度の実習を追えたので、その結果報告と合同実習の意義について考察する。

**【方法】** 2012年度の医・歯合同解剖実習は移行期ということで両学部の学生が6人1体で合同の班を作り、6月29日から7月27日までの4週間ですべての日程を消化するという、変則かつ強行スケジュールで行われた。解剖の手順及び実習書は当年に限っては医学部のものをそのまま利用させていただいた。

**【結果と考察】** 合同実習を行う上で最大の問題は旧課程

の医学部、歯学部3年生の解剖実習が例年等通り行われる関係で、2学年分の実習を行うための日程調整と実習室のスペースの問題であった。旧カリでは両学部とも4人1体で医学部は春期、歯学部は秋期に実習を行っており、当年も旧カリの3年生は例年同様に実習を行ったため、夏休み前のこの時期しか時間が取れず、また4人で1体とすると実習室に入りきらないため、やむを得ずこの形態となった。実習は例年30回で行う者ものを20回に圧縮したため週に5日、毎日21-22時まで行うという厳しいものであった。学生は全体としてはしっかりやってくれたと思うが、当然細かい点まで指導が及ばない点があり学生の自主性に任せる点が多かった。「まじめで熱心な学生は放っておいても問題なく、不熱心な学生にはとにかく手がかかる」ということはどこの大学でも同様であるが、本年はその点で少し不十分な点があったことは否めない。歯学部学生も本当に充実した実習を行った者から医学部学生にうっとうしがられる者まで千差万別であった。合同講義、実習の功罪に関しては本年からの安定期での実習を行わないと本当の評価は下せないが、個人的には初年度としてはそれなりの意義はあったのではないかと感じている。

# 会 務 報 告

## 第31回北海道医療大学歯学会総会記録

### 1) 庶務報告

#### (1) 会員数

正会員	921名
準会員	10名
賛助会員	14名
臨時会員	9名
名誉会員	15名
	969名

#### (2) 役員

常任理事	8名
理 事	28名
監 事	2名
評 議 員	74名

#### (3) 会務報告

平成24年

第1回理事・監事会 平成24年1月11日(水)

特別講演①が承認された。

第2回理事・監事会 平成24年2月15日(水)

報告事項 庶務報告 編集報告 企画報告について

審議事項 平成24年決算報告と平成25年予算(案)について

その他 第31回学術大会担当講座

口腔生物学系・生化学分野 田隈泰信

特別講演②が承認された。

第3回理事・監事会 平成24年5月23日(水)

特別講演③が承認された。

第4回理事・監事会 平成24年6月13日(水)

審議事項 (1)歯学会誌表紙の意匠変更について

(2)歯学会雑誌カラーページの無料化

(3)ミニレビューの募集

第5回理事・監事会 平成24年8月8日(水)

特別講演④が承認された。

第6回理事・監事会 平成24年9月12日(水)

審議事項 (1)北海道医療大学歯学会第31回学術大会について

日時：平成25年3月9日(土)

場所：北海道医療大学札幌サテライトキャンパス

特別講演 仮題「再生をめざした唾液腺形成機構の解析」

講師 大阪大学大学院歯学研究科 高次脳口腔機能学講座

顎口腔機能治療学教室 阪井<sup>たかよし</sup> 丘芳 教授

(2)歯学会雑誌31巻第2号原稿募集

① 原著

② 総説<症例報告

③ ミニレビュー

④ 最近のトピックス

⑤ 学位論文

⑥ その他

## 2) 編集報告

北海道医療大学歯学雑誌 (31巻1号)

原著2編 症例報告1編 学位論文2編 最近のトピックス8編

学会記録 (本文61頁)

北海道医療大学歯学雑誌 (31巻2号)

総説1編 原著4編 学位論文6編 最近のトピックス3編 (本文76頁)

## 3) 企画報告

第30回学術大会

日 時：平成24年3月3日(土曜日)

場 所：北海道医療大学札幌サテライトキャンパス

担当講座：生体機能・病態学系 顎顔面口腔外科学分野

定例講演会

平成24年第30回学術大会と併催

演題名：オステオネットワークの維持と破綻

＜顎骨疾患の病態解明と新たな治療法の開発をめざして＞

講師：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科口腔病理学分野 教授

(GCOEプログラム：歯と骨の分子疾患科学の国際教育研究拠点)

山口 朗先生

＜特別講演＞

①平成24年1月17日(火曜日)担当講座 保健衛生学分野

演題名：スリランカ歯科医療事情～インプラントからBattle injuryまで

演者：Dr. Malsamtha Muthumala

General Hospital Kalutara Sri Lanka

②平成24年2月15日(水曜日)担当講座 生体材料工学分野

演題名：齲蝕予防材としてのガラスアイオノマーセメント

演者：小松久憲 先生 北海道大学大学院 歯科保存学分野 准教授

③平成24年5月30日(水曜日)担当講座 臨床口腔病理学分野

演題名：バーチェット病Bench to Clinic～

病態解明から診療ガイドライン作成へ

演者：北市伸義 先生 個体差医療科学センター 眼科 准教授

④平成24年8月29日(水曜日)担当講座 歯科矯正学分野

演題名：顎顔面のバイオメカニクス(機能解剖学)

演者：三谷英夫 先生 東北大学名誉教授

⑤平成24年12月13日(木曜日)担当講座 生体材料工学分野

演題名：材料から歯学へ

演者：亘理文夫 先生 北海道大学大学院 歯科研究科生体理工学分野 教授

## 4) その他 研究奨励金

生体機能・病態学系 臨床口腔病理学分野 佐藤 惇

研究テーマ：ホップ抽出成分の口腔上皮細胞におけるニュートリノゲノミクス解析

口腔機能修復・再建学系 生体材料工学分野 井田 有亮

研究テーマ：ポーラスな表面構造を有する14カラット金合金を応用した

HA被覆骨伝導型多孔質インプラントの開発

## 会計報告

## 北海道医療大学歯学会 平成24年 決算書 (平成24年1月1日～平成24年12月31日)

収入の部			
科 目	本年予算額	本年決算額	執行率
①会費等収入	4,150,000	4,301,000	104
正会員	3,100,000	3,100,000	100
本年納入分	(620名×5,000円)	(620名×5,000円)	
滞納分	500,000	630,000	126
(100名分×5,000円)		(126名分×5,000円)	
準会員			
本年納入分	30,000	21,000	70
滞納分	(10名×3,000円)	(7名×3,000円)	
賛助会員	0	6,000	
本年納入分	420,000	420,000	100
(14名×30,000円)		(14名×30,000円)	
滞納分	0	0	
新規会員			
新卒	100,000	35,000	35
(20名×5,000円)		(7名×5,000円)	
その他	0	40,000	
(0名×5,000円)		(8名×5,000円)	
臨時	0	43,000	
(0名×5,000円)		(1名×3,000円+8名×5,000円)	
入会金	0	6,000	
(0名×3,000円)		(2名×3,000円)	
②事業収入	300,000	407,955	136
広告料	300,000	390,000	130
別刷料	0	17,955	
掲載料	0	0	
③雑収入	15,000	10,938	73
利息	10,000	3,698	37
その他	5,000	7,240	145
当期収入(A)	4,465,000	4,719,893	106
前期繰越金(B)	16,412,650	16,412,650	
収入合計(C) = (A + B)	20,877,650	21,132,543	101

支出の部			
科 目	本年予算額	本年決算額	執行率
①学術大会及び定例講演会	600,000	569,195	95
開催費等	300,000	275,940	92
印刷費	100,000	107,100	107
宿泊費	20,000	21,815	109
旅費	80,000	64,340	80
謝礼	100,000	100,000	100
②特別講演会補助	300,000	150,000	50
③雑誌発行費	2,530,000	2,052,392	81
印刷費	2,200,000	1,808,100	82
発送費	200,000	143,892	72
査読費	100,000	63,000	63
英文添削費	30,000	37,400	125
④事務費	1,700,000	1,412,993	83
事務委託費	1,080,000	990,000	92
事務印刷費	20,000	9,588	48
事務通信費	300,000	218,202	73
事務用品費	300,000	195,203	65
⑤研究奨励金	500,000	500,000	100
⑥デンタルボックス補助	300,000	300,000	100
⑦会議費	10,000	4,488	45
⑧予備費	300,000	0	0
⑨諸雑費	50,000	21,000	42
⑩日本歯学系学会年会費	50,000	50,000	100
当期支出小計(D)	6,340,000	5,060,068	80
当期支出差額(E)	(A - D)	-340,175	
次期繰越金(H)	(B + E)	16,072,475	111
当期支出合計(D + H)	20,877,650	21,132,543	

本年度の帳簿等関連諸表を調査の結果、決算報告に誤りのないことを認めます。

平成24年2月14日

会計監事 東 成 陽 介 (印)

会計監事 江 口 正 博 (印)

## 北海道医療大学歯学会 平成24年 預かり金会計 決算書 (平成24年1月1日～平成24年12月31日)

収入の部		
科 目	本年予算額	本年決算額
①新規預かり金	200,000	135,000
新入会員	100,000	70,000
2013年分	(20名×5,000円)	(14名×5,000円)
2014年分	100,000	65,000
(20名×5,000円)		(13名×5,000円)
②前年度繰り越し金	330,000	330,000
2012年分	85,000	85,000
17名×5,000円		17名×5,000円
(2010年預かり金)		(2010年預かり金)
100,000		100,000
20名×5,000円		20名×5,000円
(2011年預かり金)		(2011年預かり金)
2013年分	100,000	100,000
20名×5,000円		20名×5,000円
(2011年預かり金)		(2011年預かり金)
その他(3年以上の預かり金)	45,000	45,000
2012年～2020年分	9年×1名×5,000円	9年×1名×5,000円
(2011年預かり金)		(2011年預かり金)
③収入合計(①+②)	530,000	465,000

支出の部		
科 目	本年予算額	本年決算額
2012年会費	190,000	190,000
85,000		85,000
17名×5,000円		17名×5,000円
(2010年預かり金)		(2010年預かり金)
100,000		100,000
20名×5,000円		20名×5,000円
(2011年預かり金)		(2011年預かり金)
5,000		5,000
1名×5,000円		1名×5,000円
(2011年その他預かり金)		(2011年その他預かり金)
④支出小計	190,000	190,000
次期繰り越し金		
⑤ = ③ - ④	340,000	275,000
支出合計 ④ + ⑤	530,000	465,000

次期繰越金  
一般会計繰越金(H) + 預かり金繰越金⑤  
16,072,475円 + 275,000円 = 16,347,475円

## 資産の部

現金		138,107円
北海道銀行当別支店 普通預金		2,622,294円
北海道銀行当別支店 定期預金		5,500,000円
北洋銀行当別支店 定期預金		8,047,914円
郵便局		39,160円
合計		116,347,475円

## 北海道医療大学歯学会 平成25年予算書(案)(平成25年1月1日～平成25年12月31日)

収入の部		
科 目	前 年 予 算 額	本 年 予 算 額
①会費等収入	4,150,000	3,941,000
正会員		
本年納入分	3,100,000 (620名×5,000円)	2,900,000 (580名×5,000円)
滞納分	500,000 (100名×5,000円)	500,000 (100名×5,000円)
準会員		
本年納入分	30,000 (10名×3,000円)	15,000 (5名×3,000円)
滞納分	0	
賛助会員		
本年納入分	420,000 (14名×30,000円)	420,000 (14名×30,000円)
滞納分	0	
新規会員		
新卒	100,000 (20名×5,000円)	50,000 (10名×5,000円)
新規会員 その他	0 (0名×5,000円)	25,000 (5名×5,000円)
新規会員 臨時	0 (0名×5,000円)	25,000 (5名×5,000円)
入会金	0 (0名×3,000円)	6,000 (2名×3,000円)
②事業収入	300,000	300,000
広告料	300,000	300,000
別刷料	0	0
掲載料	0	0
③雑収入	15,000	33,500
利息	10,000	3,500
その他	5,000	30,000
当期収入(A)	4,465,000	4,274,500
前期繰越金(B)	16,412,650	16,072,475
収入合計 (C) = (A + B)	20,877,650	20,346,975

支出の部		
科 目	前 年 予 算 額	本 年 予 算 額
①学術大会及び定例講演会	600,000	600,000
開催費等	300,000	300,000
印刷費	100,000	100,000
宿泊費	20,000	20,000
旅費	80,000	80,000
謝礼	100,000	100,000
②特別講演会補助	300,000	300,000
③雑誌発行費	2,530,000	2,510,000
印刷費	2,200,000	2,200,000
発送費	200,000	180,000
査読費	100,000	100,000
英文添削費	30,000	30,000
④事務費	1,700,000	1,600,000
事務委託費	1,080,000	1,080,000
事務印刷費	20,000	20,000
事務通信費	300,000	250,000
事務用品費	300,000	250,000
⑤備品費	0	1,000,000
⑥研究奨励金	500,000	500,000
⑦デンタルトビックス補助	300,000	300,000
⑧会議費	10,000	10,000
⑨予備費	300,000	100,000
⑩諸雑費	50,000	30,000
⑪日本歯学系学会年会費	50,000	50,000
当期支出合計(D)	6,340,000	7,000,000
当期支出差額(E) (A - D)	-1,875,000	-2,725,500
次期繰越金(H) (B + E)	14,537,650	13,346,975
総支出(H + D)	20,877,650	20,346,975

## 北海道医療大学歯学会 平成25年 預かり金会計 予算書(案)(平成25年1月1日～平成25年12月31日)

収入の部		
科 目	前 年 予 算 額	本 年 予 算 額
①新規預かり金	200,000	150,000
新入会員		
2014年分	100,000 (20名×5,000円)	75,000 (15名×5,000円)
2015年分	100,000 (20名×5,000円)	75,000 (15名×5,000円)
②前年度繰り越し金	330,000	275,000
2013年分	85,000	100,000
17名×5,000円 (2010年預かり金)		20名×5,000円 (2011年預かり金)
100,000 (20名×5,000円 (2011年預かり金)		70,000 (14名×5,000円 (2012年預かり金)
2014年分	100,000 (20名×5,000円 (2011年預かり金)	65,000 (13名×5,000円 (2012年預かり金)
その他(3年以上の預かり金) 2012年～2020年分	45,000 9年×1名×5,000円 (2011年預かり金)	40,000 8年×1名×5,000円 (2011年預かり金)
③収入合計(①+②)	530,000	425,000

支出の部		
科 目	前 年 予 算 額	本 年 予 算 額
2013年会費	190,000	175,000
85,000 17名×5,000円 (2010年預かり金)		100,000 20名×5,000円 (2011年預かり金)
100,000 20名×5,000円 (2011年預かり金)		70,000 14名×5,000円 (2012年預かり金)
5,000 1名×5,000円 (2011年その他預かり金)		5,000 1名×5,000円 (2011年その他預かり金)
④支出小計	190,000	175,000
次期繰り越し金 (⑤ = ③ - ④)	340,000	250,000
支出合計(④+⑤)	530,000	425,000

## 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。

## 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。

## 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。

## 「北海道医療大学歯学雑誌」投稿規程（2012年6月30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規程 (Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals in Health Sciences University of Hokkaido)」に基づき、「動物実験センター管理運営委員会」の審査を経たものとする。

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)、システマティックレビュー (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、ミニレビュー、最近のトピックス、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USBメモリー (USBメモリーは印刷終了後にお返しします) を提出すること。
- 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, Ac-

knowledgment (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で、名前、所属さらに初稿なのか修正論文なのかわかるように記載する。
- 7) 投稿時、著者全員が編集委員会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. 最近のトピックスの作成

- 1) 最近のトピックスは、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) 最近のトピックスは、作成した文書ファイル (Microsoft Word) をe-mailの添付文書として編集委員会まで送信すること。e-mailでの送信が不可能な場合は、作成した文書ファイルをUSBメモリーに保存して提出すること。

メールアドレス: takuma@hoku-iryo-u.ac.jp

件名: 歯学雑誌, 最近のトピックス

ファイル名: 最近のトピックス, 講座名, 著者名

- 3) 最近のトピックスは、原則1トピックスにつき1ページでの掲載とする。
- 4) 最近のトピックスは、全角文字で1800字程度にまとめること (参考文献リストを含む)。原稿に図・表を添える際は、以下の例に従って、片段サイズの図・表1つにつき本文の文字数を500文字程度削減すること。

例: 本文のみ1800字程度

(第28巻/第1号 35頁 参照)

本文1300字程度+片段サイズの図・表1つ+図・表の説明文

(第27巻/第1号 37頁 参照)

本文800字程度+片段サイズの図・表2つ+それぞれの図・表の説明文

(第27巻/第2号 109頁 参照)

本文800字程度+両段サイズの図・表1つ+図・表の説明文

### 7. 投稿論文の校正

- 1) 投稿論文に対する著者校正は原則として1回とする。
- 2) 修正論文は、特別な事情がない限り一週間以内、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)。

### 8. 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、掲載が決定した後に受理証明書を発行する。

### 9. 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) カラー頁は、無料とする。
- 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。

**10. 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。

**11. 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。

**12. 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・生化学分野  
北海道医療大学歯学雑誌編集委員会（田隈 泰信）

Tel：0133-23-2394

e-mail：takuma@hoku-iryo-u.ac.jp

## 「北海道医療大学歯学雑誌」投稿の手引き（2012年6月30日現在）

本誌の体裁を統一するために、「投稿の手引き」に準拠して、ご執筆下さいませ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、論文原稿を収めたUSBメモリー（USBメモリーは、印刷終了後にお返しします）をプリントした最終原稿1部とともに提出して下さい。

- 1) 投稿原稿表紙
- 2) チェックリストシート
- 3) 英文抄録
- 4) 本文
- 5) 文献
- 6) 図、表
- 7) 図表説明文

### 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
- 2) 表題
- 3) 著者名および所属
- 4) キーワード（5語以内）
- 5) 別刷数（50部単位）
- 6) 連絡先（郵便番号、住所、電話、e-mail）

#### 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。別にスペースも含めて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、別にスペースも含めて45字以内の英文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) 著者名および所属

- (1) 氏名の英文表記では、姓は大文字、名は先頭のみを大文字とする（例：Akira YAMADA（山田 昭））。
- (2) 著者の所属が2ヶ所以上の場合には、所属の著者に<sup>1), 2), 3)</sup>を付ける。

#### 3) 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）。

### 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。

著者全員のサインを取り、連絡先を記載する。

### 3. 英文抄録

300語以内の英文抄録を付ける。

### 4. 本文

- 1) 原稿はA4判用紙（縦）にワードプロセッサなどによる横書きとする。書式は以下に従うこと。

#### ・ Windows Microsoft Word

余白は上下3 cm, 左右2.5 cm

文字は12ポイント

1頁35文字×26行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

#### ・ Macintosh Microsoft Word

余白は上下3 cm, 左右2.5 cm

文字は12ポイント

1頁30-35文字×22-25行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

- 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・Z 8202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に以下の体裁に従い、文献内容を記載する。

例：単著者（Izumi, 1999）（和泉, 1999）、2名（Izumi & 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) (Izumi, 1999a, b)

※ 「,」や「;」の様な記号は, 日本文の場合は全角, 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&を入れる。

※ 著者間の「and」は記号「&」を使用すること。

- 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, Ito Y, Sato M, Karita K & 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 (縦) 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45-68 mm, 両段で100-150 mm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0.15-0.3 mmになるよう原図を作成する。
- 5) 図や表はA4縦で作成する。一ページに一つの図あるいは表とする。図のタイトルや表の説明 (Figure legends) は図の印刷を希望する位置に記載する。図と表の挿入箇所は投稿論文中の右余白に示すこと。
- 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-iryō-u.ac.jp/~dental-society/>) からダウンロード出来ます。

## 編集後記

今からちょうど30年前、アメリカ合衆国メリーランド州ベセスダにある国立衛生研究所（NIH）に留学しておりました。ベセスダという地名は、イエスが、安息日にもかかわらず、病に苦しむ人々に癒しを与えたエルサレムの泉に由来します。初めての海外経験で、何にでも驚きましたが、NIHの図書館に入ったとき、有名な科学雑誌の各号が、その月の初めにすべて書架に並んでいるのを見て大変驚いたのを鮮明に覚えています。インターネットのない当時、船便で送られてくる欧米の雑誌が日本の書架に並ぶのは、2ヶ月遅れが当たり前でした。しかし、NIHでは欧米の一流誌が、船便を使っている気配はありません。12月に新年特大号が読める「文藝春秋」のように、科学雑誌も刷り立ての“鮮度”を競っているように見えました。“先進国”日本から船便で届く2ヶ月遅れのJ. Biochem. (Tokyo) に手を伸ばす人がいるだろうか、と溜息が出たのを思い出します。科学雑誌の“鮮度”といっても、ネット配信の時代となっては意味のないことでしょう。蛇足ですが本誌の各巻1号の発行は6月31日、2号は12月31日のため、2号が皆さんの手元に届くのは、残念ながら、ほぼ確実に1年遅れ（翌年）となります。発行日を1日遅らせ、「2号」でなく「1号」を1月1日、「2号」を7月1日の発行にできたら、どんなにすっきりするだろうと考えているのは、おそらく私だけでしょうね。ふと30年前の懐かしい記憶がよみがえった次第です（田隈記）。

次号（第32巻、第2号）の発行は平成25年12月31日です。

投稿原稿募集の締め切りは平成25年9月30日必着と致します。期日厳守の上、ご投稿をお願いします。本誌投稿規定は、2012年第32巻、第1号の巻末をご参照ください。



# Meta Soft SEAL

歯科用根管充填シーラ

## メタシール Soft

簡単操作で「接着根充」を。

「メタシール Soft」とは接着性を有したレジン系根管充填用シーラーです。「メタシール Soft」を介して根管象牙質からガッタパーチャポイントまでを一体化させたモノブロック構造により、緊密な接着封鎖によって細菌の侵入を抑制できます。

### 「接着」で封鎖性を高める！

浸潤した根管象牙質でも良好な接着性能が得られます。樹脂含浸象牙質を形成し、ガッタパーチャポイントとも接着することで封鎖性を高めます。

### 万が一の再根管治療も可能！

硬化後も軟質な物性を実現。万が一の再根管治療でも、ファイルやリーマー等で容易に除去が可能です。



歯科用根管充填シーラ

**メタシール Soft**

(管理医療機器)

医療機器認証番号 224AFBZX00148000

**メタシール Soft セット 標準価格 ¥11,000**

リキッド	.....	1本 (3.5mL)
パウダー	.....	1個 (5g)
スパチュラ(グレー)	.....	1本
練和紙	.....	1冊
遮光カバー	.....	1個
メタシールSoftスプーン	.....	1本
メタシールSoft(レジスル・プラグ・ストップリング)	.....	各10個

歯科用根管充填シーラ メタシール Soft (管理医療機器) 医療機器認証番号 224AFBZX00148000  
 歯科用充填・修復材補助器具 エントンスルー(管理医療機器) 医療機器認証番号 2562X00005000002

**冷蔵庫保管**

室温で長期間保管すると、成分変化により十分な性能を発揮しない場合があります。購入後は直ちに冷蔵庫で保管してください。

■標準価格・表示記載は2013年5月21日現在のものです。価格に消費税は含まれておりません。

■資料請求・お問い合わせ先

 **サンメディカル株式会社**

本社 / 〒524-0044 滋賀県守山市古高町571-2 ☎077(582)9980

メタシール Softの情報がご覧いただけます。

[www.sunmedical.co.jp](http://www.sunmedical.co.jp) サンメディカル

検索

スマートフォンからのアクセスはコチラ→



フリーダイヤル 0120-418-303 (FAX共通) 電話受付時間 月~金(祝日を除く) 午前9:00~午後5:30

「機能性」「独自性」「快適性」「衛生性」を開発コンセプトに  
さらに進化を遂げた「G コンパクト<sup>i</sup> タッチ」。



- タッチパネル式のドクターユニット
- LED採用のオペレーティングライト
- 微調整可能なパワーヘッドレスト
- 多機能なフットコントローラ

**G・COMPACT<sup>i</sup> Touch** New  
Gコンパクト<sup>i</sup> タッチ

<http://www.gcdental.co.jp/gcompactitouch/>  
歯科用ユニット G コンパクト<sup>i</sup> 管理医療機器 特定保守管理医療機器 215006ZY00394000

発売元 **株式会社 ジーシー** / 製造販売元 **株式会社 ジーシー** / 製造元 **PLANMEGA**  
東京都文京区本郷 3-2-14 東京都板橋区蓮沼町 76-1

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 0120-416480 受付時間 9:00a.m.~5:00p.m. (土曜日、日曜日、祭日を除く) [www.gcdental.co.jp/](http://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)207-3370 ●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286  
※掲載は、2013年6月現在のものです。※製品の仕様および外観は、改良のため予告なく変更することがありますので、ご了承ください。※色調は印刷のため、現品と若干異なることがあります。※ソフトウェア画面写真は、ハミ込み合成のため実際とは若干異なります。※会社名、製品名称等は各社の商標または登録商標です。※写真には一部オプションを含みます。詳しくはパンフレットをご覧ください。

# この1本で 7つの用途に使える スコッチボンド™ ユニバーサル アドヒーシブ

多種多様なプライマーの在庫管理も複雑なプライマー処理も不要。  
これ1本でワンステップ処理できるので、  
テクニカルエラーの発生リスクを大幅に軽減できます。



この1滴で



コンポジットレジン  
修復時の接着材



知覚過敏抑制材



窩洞・支台歯の  
シーリング材



小窩裂溝充填時の  
歯面処理剤



コンポジットレジン  
のレベア時の前処理剤



ポーセレンの  
レベア時の前処理剤



ポーセレンラミネート  
ベニアの前処理剤

販売名:スコッチボンド ユニバーサル アドヒーシブ 認証番号:224AKBZX00054000  
3M、ESPE、スコッチボンドは3M社またはその関連会社の商標です。

☆ ホームページで7つの症例をご紹介します!

スコッチボンド ユニバーサル   
<http://www.mmm.co.jp/hc/dental/>

スリーエム ヘルスケア株式会社  
歯科用製品事業部

当事業部取扱製品のお問い合わせは  
3M ESPE コールセンター  
☎ 0120-332-329  
※受付時間/ 9:00~17:00 月~金(土・日・祝を除く)  
※フリーダイヤルが繋がらない場合は、03-6409-3157をご利用ください。

**3M ESPE**

# FREE ARM ARTEO

口腔外用サククション  
[フリーアーム・アルテオ]

医療機器 特許出願中

進化したフリーアームは  
6つの特徴を搭載。



センサースイッチは  
お好みの位置にセット可能



4灯のLEDライトは  
照度10,000ルクス



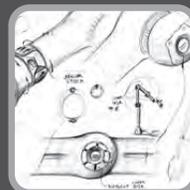
スムーズな操作性で  
思い通りのポジションへ



サイレントフィルタで  
高周波領域の騒音を低減



フードの脱着がワンタッチ  
安全機構の設計



最先端のデザイン|豊富な  
カラーバリエーションは  
様々な診療室にマッチ



販売名: フリーアーム・アルテオ  
一般的名称: 歯科用吸引装置  
医療機器認証番号: 222AHZX00018000号 (管理医療機器)



株式会社 東京技研

URL: <http://www.tokyogiken.com> e-mail: [TC@tokyogiken.com](mailto:TC@tokyogiken.com)

【東京本社】〒158-0087 東京都 世田谷区 玉堤 1-25-13  
tel: 03-3703-5581 fax: 03-3705-1760

【横浜工場】〒224-0023 横浜市 都筑区 東山田 4-42-37  
tel: 045-591-4441 fax: 045-591-4445



■ 性能向上の為、製品の仕様、価格等は予告なく変更する場合があります。 ■ 印刷の都合上、掲載写真と実物が異なる場合があります。 ■ 通称機種以外や指定方法以外の取り付け、ご使用方法などによるクレームには応じかねます。 ■ 本掲載商品は国内使用を前提に製造しております。日本国外にて発生したクレームは一切お受けできません。

THE BEST PARTNER OF DENTISTS

CORPORATION  
**YDM**  
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  
TEL.03-3828-3161 FAX03-3827-8991  
<http://www.ydm.co.jp/>

## Spacy Articulator (Semi-Adjustable) Wing

スペイシー咬合器(半調節)ウイング



- 開閉レバーにより、上顎弓の取外しが簡単です。
- 下顎フレームの後方スペースが広いので、作業がしやすくなっています。
- 上顎弓を開口した際、咬合器が後方へ転倒しづらい設計です。
- 咬合器を逆にしても、上顎弓の3か所の突起により安定して置けます。
- 名前・番号などが記入できるプレートがついています。

### 【仕様】

上下顎フレーム間距離 100mm  
ボシウィル三角の一边 110mm  
矢状軸路傾斜角 0°~60° (5°刻み)  
側方軸路角 (ベネット角) 0°~30° (5°刻み)  
ハシクウィル角 20°  
切歯路角 前方…10°・15°・20° 側方…0°・15°・20°

医療機器届出番号 11B1X1000668D005  
一般的名称 歯科用咬合器



プライマー不要\*のレジンセメントが  
**たっぷりサイズ**で**新登場!**

\*陶材と接着する場合は、ポーセレンプライマーの塗布が必要です。



# BeutiCem SA

[ビューティセム SA]自己接着性レジンセメント



**ビューティセム SA**  
ハンドミキシング  
¥9,000

【内容】  
ビューティセムSAペースト 9mL  
紙練板 1  
スパチュラ 1  
ステップカード 1  
色調:3色(クリア/ブルー/オフホワイト)



販売名	一般的名称	承認・認証・届出番号
ビューティセム SA	歯科接着用レジンセメント	管理医療機器 医療機器認証番号 223AKBZX00179000

価格は2013年6月現在の標準医院価格(消費税抜き)



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)713-9301/名古屋(052)709-7688/大阪(06)6330-4182/福岡(092)472-7595

届けたい想い 伝えたい情報をカタチに。

**山藤三陽印刷株式会社**  
sandosanyo

〒063-0051 札幌市西区宮の沢1条4丁目16-1  
 [本社営業部] 代表電話 (011) 661-7163 FAX (011) 661-7173  
 [東京支店] 代表電話 (03) 3518-4631 FAX (03) 3518-4633  
 [苫小牧営業所] 電 話 (0144) 84-5930 FAX (0144) 68-1851

# 刀 KATANA

NORITAKE  
Dental CAD/CAM System

カタナCAD/CAMシステム



## 多機能・コンパクトなカタナ新システム



歯科技工室設置型コンピュータ支援設計・製造ユニット

### ノリタケデンタルスキャナー SC-3

3shape<sup>▷</sup>  
(スリーシェイプ・エイエス社製)

- 医療機器届出番号 15B1X10001290003
- 医療機器の分類 一般医療機器(クラスI)

思いどおりのデザインを実現。

石こう歯列模型をスキャンし、高精度3Dデータとして専用PCに取り込みます。その後、専用のデザインソフト Dental Designer™でフレーム形状をデザインします。

### DentMILL Comp Plus

CAMソフト専門メーカーであるDelcam社製DentMILLをDWX-50用にカスタマイズしたCAMソフトです。



歯科技工室設置型コンピュータ支援設計・製造ユニット

### DWX-50

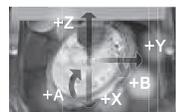
powered by Imagine. Roland

- 販売名 歯科用CAD/CAMマシン DWX-50
- 医療機器届出番号 22B3X10003000020
- 医療機器の分類 一般医療機器(クラスI)
- 製造販売 ローランド ディー・ジー株式会社  
静岡県浜松市北区新都田1-1-3

コンパクト設計の加工機に、5軸加工、ATC(オートマチックツールチェンジ)、エアブローなど、多彩な機能を搭載しています。切削材料には、ノリタケカタナジルコニアをはじめモデリングワックスやPMMA(発売予定)の加工も可能です。



ノリタケ カタナ ジルコニア  
ノリタケ カタナ ワックス



5軸制御



ミリングバー  
(Φ2.0mm、Φ0.8mm)



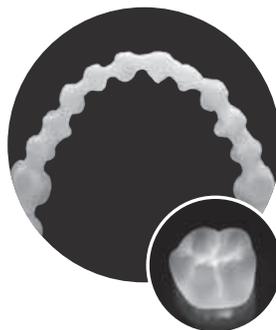
ジルコニア焼却炉

### ノリタケカタナ F-1

- 一般的名称 歯科技工用ポーセレン焼成炉
- 医療機器届出番号 25B2X10003000008
- 医療機器の分類 一般医療機器(クラスI)
- 製造販売 SKメテカル電子株式会社  
滋賀県浜北市七条町305-1

ノリタケカタナジルコニアの収縮及び強度を安定して供給するためのスケジュールをインプットしています。

フレーム  
完成



フレームカラー

	KT10	KT11	KT12	KT13	KT14	KT15	KT16	KT17	KT18
ブロン									
ティンク									

### ノリタケ カタナ ジルコニア

- 一般的名称 歯科切削加工用セラミックス
- 医療機器届出番号 223AFBZX001B5000
- 医療機器の分類 管理医療機器(クラスII)

製造販売 クラレノリタケデンタル株式会社  
新潟県胎内市倉敷町2-28

●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。  
●ご使用に際しましては、製品の取扱説明書と添付文書を必ずお読みください。

発売 株式会社モリタ

大阪本社 大阪府吹田市垂水町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

www.dental-plaza.com

編集委員会

委員長 田 隈 泰 信

越 智 守 生・斎 藤 隆 史・柴 田 考 典

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32巻 第1号

平成25年6月30日

発行者 有 末 眞

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

- 1 **The correlation among practical training components in preclinical training of complete denture prosthodontics**  
Yoshifumi TOYOSHITA, Katsuya KAWANISHI, Satoshi NUKA, Hideki AITA, Yasuhiro IKEDA, Hisashi KOSHINO ..... (1)
- 7 **Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells**  
Tomohide UEYONAHARA, Tatsuhiko HIDAKA, Kaname SHIRAI, Takashi KADO, Toshiyuki NAGASAWA, Yasushi FURUICHI ..... (7)
- 21 **Effects of substance P on basal blood flow regulation in rat masseter muscle**  
Takeharu NIIOKA and Hisayoshi ISHII ..... (21)
- 33 **Changes in expression and localization of fibrillin-1 and versican in human periodontal ligament fibroblast (HPLF) s induced by mechanical stimulation**  
Naoko TORIYA, Moe NAGASAKA, Eichi TSURUGA, Yasunori SAKAKURA, Itaru MIZOGUCHI ... (33)
- 43 **The characteristics of *Prevotella oris* hemolysin and its interaction with the erythrocyte membrane**  
Toshiya SATO, Herastuti SULISTYANI, Arihide KAMAGUCHI, Futoshi NAKAZAWA ..... (43)
- 53 **Alteration of masticatory performance caused by diet change induces oxidative stress in Wistar rats**  
Hirohito SUZUKI ..... (53)
- 65 **Study of variation in salivary flow rate, pH, buffer capacity, and inorganic ion concentrations obtained from 3, 4 and 5 year-old children**  
Atsushi FUKUDA, Mina HIROSE, Yukie MURATA, Shoko YAHATA, Kai SHUDOH, Yuki KONDOH, Masato SAITOH ..... (65)

## Mini Review

- 71 **The fifth HOPE meeting with Nobel laureates**  
Izumi MASHIMA ..... (71)
- 75 **Property and clinaical application of DLC coating bracket**  
Takeshi MUGURUMA, Masahiro IJIMA and Itaru MIZOGUCHI ..... (75)

## DENTAL INFORMATION

- 79 **Recent topics** ..... (79)