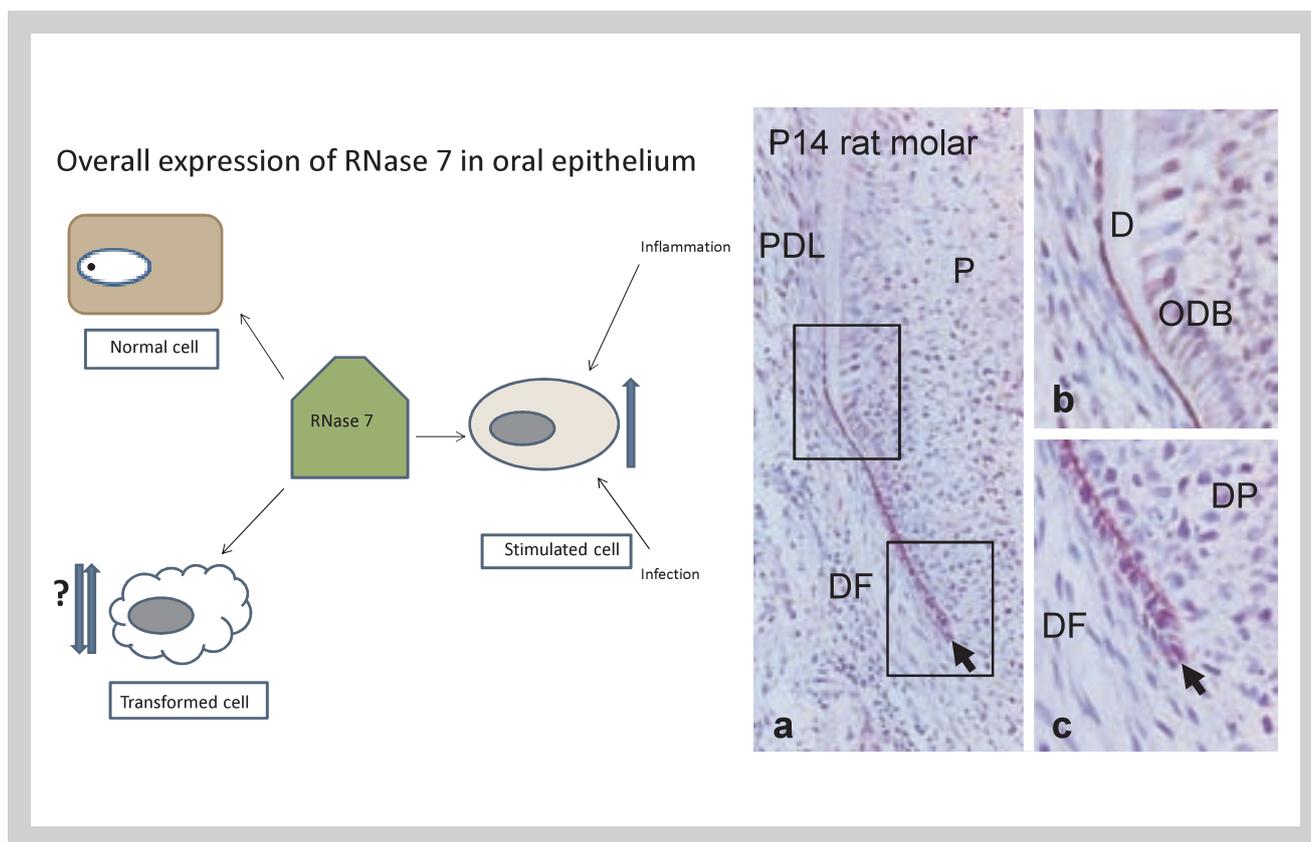


北海道医療大学歯学雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北 医 療 大 歯 誌
第36卷 第2号 平成29年12月



北海道医療大学歯学会役員

会 長 中 澤 太
専 務 理 事 越 智 守 生
常 任 理 事 中 山 英 二・疋 田 一 洋 (庶務担当)
千 葉 逸 朗・入 江 一 元 (会計担当)
石 井 久 淑・越 野 寿 (編集担当)
永 易 裕 樹・舞 田 健 夫 (企画担当)
監 事 坂 倉 康 則・遠 藤 一 彦

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Futoshi NAKAZAWA

Vice President : Morio OCHI

Directors : Eiji NAKAYAMA, Kazuhiro HIKITA,

Itsuo CHIBA, Kazuharu IRIE,

Hisayoshi ISHII, Hisashi KOSHINO,

Hiroki NAGAYASU, Takeo MAITA

Auditors : Yasunori SAKAKURA, Kazuhiko ENDO

Editorial Board

Editor-in-Chief : Hisayoshi ISHII

Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Itaru MIZOGUCHI

Address of Editorial Board

Hisayoshi ISHII

Division of Physiology, Department of Oral Biology, School of Dentistry,

Health Sciences University of Hokkaido,

Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

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

Phone/Fax: +81 133-23-1239

北海道医療大学歯学雑誌
第36巻 第2号 平成29年12月
目 次

〔総説〕

- 1 Prospects and Significance of Oral *Veillonella*
Futoshi NAKAZAWA (75)

〔原著〕

- 17 部分床義歯補綴学基礎実習の小テストで抽出した3つの自己評価領域の比較
～形成的評価と総括的評価との関連性～
川西 克弥, 會田 英紀, 河野 舞, 佐々木 みづほ, 朝廣 賢哉, 中本 雅久, 山崎 真郎,
菅 悠希, 中村 健二郎, 松原 国男, 豊下 祥史, 伊東 由紀夫, 越野 寿..... (91)

〔Mini Review〕

- 27 Epithelium-derived antimicrobial peptide RNase 7 in oral health and disease : A mini-review
Puja NEOPANE, Koki YOSHIDA, Bhoj Raj ADHIKARI, Fumiya HARADA, Durga PAUDEL,
Tetsuro MORIKAWA, Aya ONISHI, Daichi HIRAKI, Jun SATO, Michiko NISHIMURA, Yoshihiro ABIKO
..... (101)

〔実験プロトコール〕

- 35 次世代シーケンサーによる16S rRNA口腔細菌叢解析の概要
植原 治, 高井 理衣, 原田 文也, 大西 綾, 虎谷 齊子, 平木 大地, 森川 哲郎, 倉重 圭史,
梶 美奈子, 北市 伸義, 齊藤 正人, 安彦 善裕, 千葉 逸朗 (109)

〔歯学情報〕

- 47 最近のトピックス (121)
- 49 北海道医療大学歯学会会則 (123)
- 51 北海道医療大学歯学雑誌 投稿規程 (125)
- 58 編集後記 (132)

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido
VOL. 36, NO. 2, DECEMBER, 2017
CONTENTS

REVIEW

- 1 **Prospects and Significance of Oral *Veillonella***
Futoshi NAKAZAWA (75)

ORIGINAL

- 17 **The relationship between formative and overall evaluations in the self-assessments of students through prosthodontics practical training of partial dentures**
Katsuya KAWANISHI, Hideki AITA, Mai KONO, Mizuho SASAKI, Kenya ASAHIRO, Masahisa NAKAMOTO, Masao YAMAZAKI, Yuki KAN, Kenjiro NAKAMURA, Kunio MATSUBARA, Yoshifumi TOYOSHITA, Yukio ITO, Hisashi KOSHINO (91)

Mini Review

- 27 **Epithelium-derived antimicrobial peptide RNase 7 in oral health and disease : A mini-review**
Puja NEOPANE, Koki YOSHIDA, Bhoj Raj ADHIKARI, Fumiya HARADA, Durga PAUDEL, Tetsuro MORIKAWA, Aya ONISHI, Daichi HIRAKI, Jun SATO, Michiko NISHIMURA, Yoshihiro ABIKO (101)

Protocol

- 35 **Analysis of 16S rRNA oral bacterial flora using next-generation sequencer : A tutorial paper**
Osamu UEHARA, Rie TAKAI, Fumiya HARADA, Aya ONISHI, Seiko TORAYA, Daichi HIRAKI, Tetsuro MORIKAWA, Yoshihito KURASHIGE, Minako KAJI, Nobuyoshi KITAICHI, Masato SAITOH, Yoshihiro ABIKO, Itsuo CHIBA (109)

DENTAL INFORMATION

- 47 **Recent topics** (121)

[REVIEW]

Prospects and Significance of Oral *Veillonella*

Futoshi NAKAZAWA

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

Key words : Oral *Veillonella*, Early colonizer, Biofilm, Microbiome, Novel species

Abstract

Oral biofilm causes many oral infections, such as dental caries and periodontal disease. Oral *Veillonella* has been suggested to have important roles in the early stages of oral biofilm formation. Therefore, it is necessary to reveal the functional mechanisms of oral *Veillonella* in oral biofilm formation to prevent many oral infections.

In this article, I summarize the characteristics of genus *Veillonella*, especially the oral *Veillonella* species, based on classification and phenotypical identification methods. This article also reviews recent findings, such as specific PCR primers to identify oral *Veillonella* at the genus and species level, the distribution and frequency of oral *Veillonella* on the tongue, in the saliva, and in subgingival biofilm, and the relationship, involv-

ing autoinducers, between oral *Veillonella* species and oral *Streptococcus* species reported as initial colonizers in biofilm formation produced by *Veillonella* species. Furthermore, this review introduces interesting results obtained by 16S rRNA metagenomic analysis of salivary samples, and the possibility of the occurrence of many novel oral *Veillonella* species demonstrated in phylogenetic studies based on *rpoB* and *dnaK* gene sequence analysis.

Although these new findings reviewed in this article are very important, they are not sufficient to understand the role of oral *Veillonella* in oral biofilm formation. New knowledge on oral *Veillonella* needs to be gathered which might help in the preventing oral biofilm formation and cure of oral infections.

Introduction

The human oral cavity contains more than 19,000 microbial phylotypes (Keijsers et al., 2008). Bacterial communities in oral cavities are the second most complex bacterial flora in the human body (Human Microbiome Project Consortium, 2012). These bacterial members of the communities form biofilms in the human oral cavities. Dental plaque is a well-recognized example of a natural biofilm as oral biofilm. It is generally known that bacteria, which form biofilms, are not easily eliminated by the immune response and are resistant to antimicrobial agents (Bjarnsholt et al., 2013).

Oral biofilms are composed of multiple species of bacteria, whose development is initiated by the adherence of pioneer species to salivary proteins and glycoproteins adsorbed on tooth enamel. The biofilm is not formed by the random simultaneous colonization of these species, but rather by se-

lective, reproducible, and sequential colonization (Bjarnsholt et al., 2013 ; Nyvad & Kilian, 1987). In addition, oral biofilm is the source of bacteria that causes oral infections, such as dental caries and periodontal disease, and sometimes leads to systemic diseases or makes them worse (Maddi & Scannapieco, 2013).

Periasamy & Kolenbrander (2010) reported that *Veillonella* species has a central role in oral biofilm formation as an early colonizer together with *Streptococcus* species reported as initial colonizer to be involved in establishing multispecies oral biofilm communities. Therefore, it is important to understand the role of oral *Veillonella* species for oral biofilm formation for treatment and prevention of oral infectious diseases. However, both the pathogenic and congenital roles of oral *Veillonella* species in oral biofilm formation has not been sufficiently revealed, nor has the distribution and frequency of oral *Veillonella* species been clari-

fied at the species level.

This article reviews recent studies related to oral *Veillonella* species, including our studies, and reflects upon the current state of oral *Veillonella* research.

1. Genus *Veillonella*

The genus *Veillonella*, named after Adrien Veillon, contains multiple species of gram-negative, obligately anaerobic, non-motile, non-spore-forming, small cocci belonging to the family Veillonellaceae, order Clostridiales, class Clostridia, and phylum Firmicutes (Jean-Philippe, 2009).

Thirteen species are established within the genus including *Veillonella atypica*, *Veillonella caviae*, *Veillonella criceti*, *Veillonella denticariosi*, *Veillonella dispar*, *Veillonella magna*, *Veillonella montpellierensis*, *Veillonella parvula*, *Veillonella ratti*, *Veillonella rodentium*, *Veillonella rogosae*, *Veillonella seminalis*, and *Veillonella tobetsuensis* (Arif et al., 2008 ; Aujoulat et al., 2014 ; Byun et al., 2007 ; Jumas-Bilak et al., 2004 ; Kraatz & Taras, 2008 ; Mashima et al., 2013 ; Mays et al., 1982 ; Rogosa, 1965).

Veillonella species, except *V. criceti*, *V. ratti*, and *V. seminalis*, do not ferment carbohydrates or amino acids, and they lean the fermentation of pyruvate, lactate, malate, fumarate, and/or oxaloacetate as a source of carbon and energy. Major metabolic end products of members of the genus *Veillonella* are acetic acid and propionic acid from trypticase-glucose-yeast extract. Their DNA G+C content is 36–43% mole, and the type species is *V. parvula* (Jean-Philippe, 2009).

Veillonella species are present in the oral cavity, intestinal tracts, and genitourinary and respiratory systems of humans and animals as commensal organisms. Some *Veillonella* species have been reported as rare causative organisms of meningitis, endocarditis, bacteremia, discitis, vertebral osteomyelitis, and prosthetic joint infection (Isner-Horobeti, 2012 ; Liu, 1998 ; Marriott et al., 2007). In addition, *Veillonella* species are known as opportunistic pathogens with the ability to take advantage of a host's weakened immune function to cause infections (Aas et al., 2007 ; Fisher and Denison, 1996).

Generically, *Veillonella* species are resistant to tetracycline and sensitive to penicillin and ampicillin. However, some *Veillonella* strains have recently been found to be resistant to these two antibiotics (Ready et al., 2012). Furthermore, it is reported that one of the pathogenicity of *Veil-*

lonella species is related to its lipopolysaccharide (LPS). Fructose is incorporated into LPS of *Veillonella*, and may be of major significance in the production of endotoxic LPS (Tortorello & Delwiche, 1983).

2. Oral *Veillonella*

1) Classification and Biology

Of the 13 established species, *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* have been isolated from human oral cavities, and these oral *Veillonella* species are mainly located in the dental biofilms, tongue biofilms, buccal mucosa, saliva, periodontal pockets, and caries lesion of dentin (Dongyou, 2011).

Oral *Veillonella* species have diverse roles in polymicrobial disease. These species utilize lactate produced by carbohydrate-fermenting *Lactobacillus* species and *Streptococcus* species, and the lactate is converted into the weaker acid and propionic acid. Consequently, *Veillonella* species reduce the concentration of lactate, and ameliorate the process of dental caries because the weaker acid has less capability to decalcify teeth (Dongyou, 2011).

Oral *Veillonella* species produce volatile sulfur compounds, which causes oral malodors in the polymicrobial community of the oral biofilm. In addition, hydrogen sulfide produced by oral *Veillonella* from L-cysteine in the presence of human serum is toxic to host cells and contributes to its disease-inducing potential (Washio et al., 2005).

Porphyromonas gingivalis, *Prevotella intermedia*, and *Treponema denticola* are known as pathogenic microorganisms for periodontal disease (Dongyou 2011 ; Socransky & Haffajee, 1992). Oral *Veillonella* species produce menaquinones, and supply the essential nutritional requirement for growth of *Porphyromonas* and *Prevotella* species. In addition, oral *Veillonella* species provides different peptidases, which complements the activity and promotes the growth of *T. denticola* (Dongyou, 2011).

2) Phenotypic Identification

Veillonella species are isolated on a selective medium, *Veillonella* agar, which is composed of Bacto tryptone, Bacto yeast extract, sodium thioglycolate, basic fuchsin, sodium lactate, agar, and vancomycin (Rogosa et al., 1958). The inoculated plate is incubated under obligately anaerobic conditions, such as 80% N₂, 10% CO₂, and 10% H₂, at 37°C for 5 days. Colonies on *Veillonella* agar are presumptively

identified as *Veillonella* strains on the basis of their ability to grow on the selective medium. Typical colonies are opaque or grayish–white, 2–4 mm in diameter, regular, and slightly domed in shape with an entire edge. In addition, they lack hemolytic activity in blood agar (Jean–Philippe et al., 2009).

Conventional biochemical analysis was performed on cells grown on *Veillonella* agar using the rapid ID 32A identification kit and API ZYM (bioMérieux) (Jean–Philippe et al., 2009). For further examination of the *Veillonella* strain, an electron microscope was used. The ultrathin sections revealed cell structural components, such as outer membrane, a thin peptidoglycan layer, and cytoplasmic membrane, which are characteristic of a gram–negative bacterial cell wall and consistent with the genus *Veillonella* (Jean–Philippe et al., 2009).

In some cases, cellular fatty acids of *Veillonella* were analyzed after methyl esterification. Major cellular fatty acids are C_{13:0} and C_{17:1 ω 8}, and minor or trace fatty acids are C_{11:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{15:0}, C_{16:1 ω 9c}, C_{16:0}, C_{17:0}, C_{18:1 ω 9c}, and C_{18:0} (Byun et al., 2007 ; Jean–Philippe et al., 2009 ; Jumas–Bilak et al., 2004 ; Mashima et al., 2013).

3) Genotypic Identification

Phenotypic methods are effective to identify members of *Veillonella* species at genus level, but do not allow differentiation among members of the genus *Veillonella* at species level. Therefore, molecular techniques, such as DNA–DNA hybridization, PCR with specific primers, PCR–random fragment length polymorphism analysis, and sequencing based on the 16S rRNA gene, have been developed for identification of *Veillonella* species (Marchandin et al., 2003 ; Rolph, 2001 ; Sato et al., 1997 ; Siqueira, 2001). Although it is known that 16S rRNA gene is useful for identification of some bacterial species, 16S rRNA gene comparison of *Veillonella* has not been reliable for identification at the species level. This is because *Veillonella* species have highly conserved sequences in 16S rRNA gene. In addition, there is a high level of intrachromosomal heterogeneity in some oral *Veillonella* species (Byun et al., 2007 ; Jumas–Bilak et al., 2004).

Therefore, some housekeeping genes, such as *rpoB*, *dnaK*, *gyrB*, and *gltA*, have been used for more veracious identification of *Veillonella* species (Arif et al., 2008 ; Aujoulat et al., 2014 ; Byun et al., 2007 ; Dongyou, 2011 ;

Kraatz & Taras, 2008 ; Mashima et al., 2013 ; Michon et al., 2010). The *dnaK* gene, coding heat–shock protein 70 kD, has higher interspecies variability than 16S rRNA gene. Comparison of *dnaK* gene sequences aids classification of the known members of genus *Veillonella*. Furthermore, sequencing of the *rpoB* gene, which encodes an enzyme that synthesizes RNA polymerase subunit B, appears to be more effective than *gyrB* and *gltA* gene sequencing for identification of *Veillonella* at species level (Aujoulat et al., 2014 ; Dongyou L. 2011 ; Jean–philippe et al., 2009).

4) *Veillonella* Genus–specific PCR Primers

Classification of *Veillonella* species at the genus level is not difficult based on the phenotypic characteristics of bacteria, such as colony appearance, arrangement and size of the bacterial cells, and gram–negative cocci, cultured on the selective medium *Veillonella* agar under the strictly anaerobic conditions. On the other hand, Arif et al. (2008) established a genus–specific PCR primer set based on the sequence of *rpoB* gene for members of genus *Veillonella* : Veill–*rpoBF* (5'–GTAACAAAGGTGTCGTTTCTCG–3') and Veill–*rpoBR* (5'–GCACCR TCAAATACAGGTGTAGC–3') (Arif et al., 2008). Thereafter, Mashima et al. (2011 ; 2013 ; 2015) and Theodorea et al. (2017) demonstrated the availability and accuracy of the genus–specific PCR primer set (Mashima et al., 2011, Mashima et al., 2013 ; Mashima et al., 2015 ; Theodorea et al., 2017).

5) Distribution and Frequency with the Species–specific PCR Primers

Beighton et al. (2008) reported the predominant cultivable *Veillonella* species in tongue biofilm from healthy adults using *rpoB* gene sequence analysis. In their report, *V. atypica*, *V. dispar*, and *V. rogosae* were the predominant species, and *V. denticariosi* was not identified at all. In addition, Arif et al. (2008) investigated the diversity of *Veillonella* species in caries sites in children using 16S rRNA, *dnaK*, and *rpoB* gene sequence analysis. The proportion of *Veillonella* species was not significantly different between the caries and caries–free groups, but *V. denticariosi* was only detected in the caries group and *V. rogosae* was only detected in the caries–free group (Arif et al., 2008). Although this study was beneficial to help discriminate among oral *Veillonella*, more affordable, time–saving, and easy handling methods are needed to identify oral *Veillonella* species.

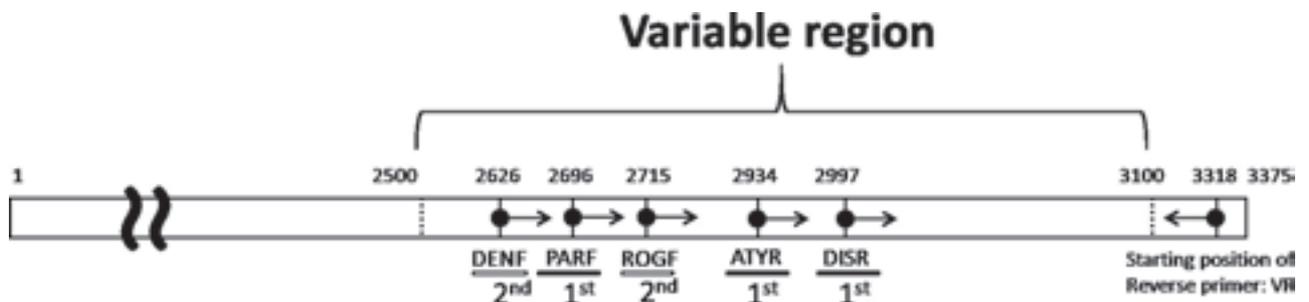
Igarashi et al. (2009) showed that five oral *Veillonella* species, *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, and *V. rogosae*, could be readily identified via two-step PCR using five forward primers from a highly variable region of the *rpoB* gene and one common reverse primer shown in Table 1. Mashima et al. (2011) examined the distribution and frequency of oral *Veillonella* species in the tongue biofilm of healthy 20 adults. They isolated 416 strains from 27 subjects, and 404 isolates were identified using the species-specific primer sets designed by Igarashi et al. (2009) as either *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, or *V. rogosae*. They demonstrated that *V. atypica*, *V. dispar*, and *V. rogosae* were detected as the predominant oral species throughout all samples, and *V. parvula* and *V. denticariosi* were isolated from limited subjects. Furthermore, they reported that the tongue biofilms of these subjects were divided into two groups based on the distribution and frequency of oral *Veillonella* species, which meant that *V. rogosae* was the predominant species in one group; the other group consisted mainly of *V. atypica* and *V. dispar* (Mashima et al., 2011). This result partially supported the report by Beighton et al. (2008).

Recently, *Veillonella tobetsuensis* isolated from human tongue biofilm was established as a novel *Veillonella* spe-

cies (Mashima et al., 2013). Thereafter, the distribution and frequency of *V. tobetsuensis* in human tongue biofilms were determined using a *V. tobetsuensis*-specific PCR primer pair designed based on the sequence of the *dnaK* gene (position 424–1048). The forward primer was VTF (5'-CTCTCAACGTCAAGCAACAAAAGATGC-3'). The reverse primer was VTR (5'-GATAAGGTAGTTCATGATGCGTTGG-3'). In that study, it was demonstrated that *V. tobetsuensis* was detected in 5 of 27 subjects (19%), and its prevalence ranged from 7.6% to 20.0% (Mashima et al., 2013).

The distribution and frequency of six oral *Veillonella* species *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* in the subgingival biofilm from periodontal pockets were also determined by PCR with the species-specific primers (Igarashi et al., 2009; Mashima et al., 2013). In the study, it was demonstrated that the frequency of *V. parvula* was significantly higher in the periodontal pockets than that in the gingival sulcus at the species level, which suggested that *V. parvula* is associated with a state of chronic periodontitis (Mashima et al., 2015).

Recently, the relationship between the frequency of six oral *Veillonella* species and different oral hygiene states was determined in Thai children divided into three groups, Good, Moderate, and Poor oral hygiene group, based on the Sim-



Primer name	Target	Sequence
ATYF	<i>V. atypica</i>	5'-TCTCTTTGGGAAGAATTAGAACGC-3'
DENF	<i>V. denticariosi</i>	5'-GAAAGAAGCGCGCACCGACAGT-3'
DISF	<i>V. dispar</i>	5'-AACGCGTTGAAATTCGTCATGAAC-3'
PARF	<i>V. parvula</i>	5'-GAAGCATTGGAAGCGAAAGTTTCG-3'
ROGF	<i>V. rogosae</i>	5'-ATTGCAGAAGATGTAACATGAAGC-3'
VR	All 5 species	5'-GTGTAACAAGGGAGTACGGACC-3'

Table 1 : Primer sequences for two-step species-specific PCR (Igarashi et al., 2009) designed using the variable region of the *rpoB* gene.

ATYF, DISF, PARF, and VR are used for the 1st step PCR, and DENF, ROGF, and VR are used for the 2nd step PCR.

plified Oral Hygiene Index (OHI-S) (Mashima et al., 2016 ; Theodorea et al., 2017). Tongue biofilms from 89 children and saliva samples from 107 children were collected in these studies, and the distribution and frequency of six oral *Veillonella* species were examined by PCR identification. Mashima et al. (2016) established a novel one-step PCR method with one forward primer and six reverse primers designed using the sequence of the conserved region or variable regions in the *rpoB* gene of oral *Veillonella* species shown in Table 2.

In case of tongue biofilms, oral *Veillonella* isolates were detected predominantly in subjects who had Poor oral hygiene compared to those with Good or Moderate oral hygiene. At the species level, although *V. atypica*, *V. dispar*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* were detected in only 10 of the 89 subjects, *V. rogosae* was the predominant species in all groups. *V. dispar* was detected mainly from subjects who had Good or Moderate oral hygiene group. However, *V. parvula* and *V. denticariosi* were not isolated from any subjects. As conclusion, they suggested a possibility that these *Veillonella* species might be an index for a person's oral hygiene state (Mashima et al., 2016).

In case of saliva samples, *Veillonella* species were detected in all subjects from three groups ; the total number of

isolates was 1609 from 107 subjects. Six oral *Veillonella* species were identified in 1442 of 1609 isolates, and 167 isolates were unclassified. The prevalence of *V. rogosae* was significantly lower in the Poor oral hygiene group than that in the Good oral hygiene group. On the other hand, *V. tobetsuensis* was not detected in the Good oral hygiene group. Although *V. rogosae* was the predominant species in all groups, *V. parvula*, *V. tobetsuensis*, and the unclassified *Veillonella* isolates were significantly more prevalent in the Poor oral hygiene group, which suggested that the detection rate of *V. parvula* and *V. tobetsuensis* in saliva indicates the oral hygiene state in children (Theodorea et al., 2017).

6) Biofilm Formation and Autoinducer

The human oral biofilm is a multispecies community formed by more than 700 bacterial species, including 19,000 microbial phylotypes (Hajishengallis & Lamont, 2012 ; Huang & Gregory, 2011). In the process of dental biofilm formation, oral *Streptococcus* species attach to the tooth surface covered by an acquired pellicle with specific interactions as pioneer colonizers. The growth of the pioneer colonizers establishes an environment conducive for the colonization by the bridging bacterial species, some of which are *Veillonella* species as early colonizers (Diaz et al., 2006 ;

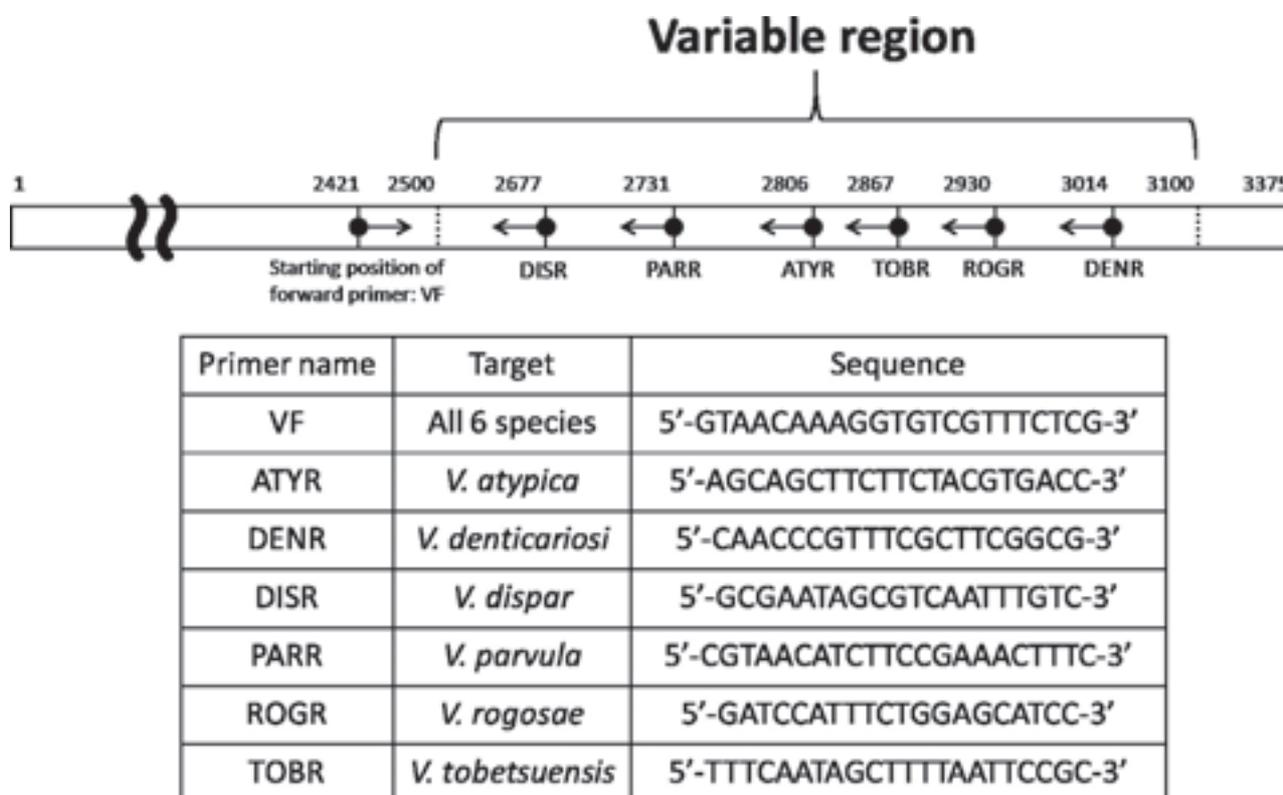


Table 2 : Primer sequences for the one-step PCR method (Mashima et al., 2016) designed using the variable region of the *rpoB* gene.

Kolenbrander et al., 2006 ; Kolenbrander et al., 2010). Subsequently, the bridging bacteria grow and create a local environment to facilitate attachment and growth of middle and late colonizers, such as periodontopathogenic bacterial species, for maturation of the oral biofilm (Zhou et al., 2016).

For *in vitro* biofilm experiments, microtiter plate-based biofilm assays have been widely used for long time (Christensen et al., 1985). A flow cell system has also been used frequently for *in vitro* biofilm experiments (Foster & Kolenbrander, 2004). Although these methods certainly have merit, many limitations, such as technical sensitivity or high cost performance, of these methods prohibit routine use. To overcome these limitations, Mashima & Nakazawa (2012) established a novel method for the formation of a biofilm in an *in vitro* experiment using the “wire method” (Fig. 1). In the wire method, a cobalt–chrome alloyed wire, 0.9 mm in diameter and 15 cm in length, was connected to a rubber plug on a test tube. The wire was inserted into a bacterial suspension in the test tube as a scaffold for biofilm formation. After incubation, the wire with biofilm was transferred to new tube, and the biofilm was removed from the wire using a short silicone tube (TYGON 3350) which was set on the wire. Afterwards, DNA was extracted from the bacterial cells of the harvested biofilm to quantify the number of bacteria in the biofilm. Currently, a wire at half the size (7.5 cm) with a silicone plug is used in our laboratory for easier handling, and similar results have been obtained in experiments as those obtained in experiments with the original size wire (15 cm) (Fig. 1).

The *Veillonella* species, one of the most predominant bac-

teria in the human oral microbiome, produces nutrients for growth of late colonizers (Aas et al., 2005 ; Aas et al., 2008 ; Becker et al., 2002). In addition, *Veillonella* species have two important characteristics as a “bridging species” for maturation of the oral biofilm community : 1) *Veillonella* species use lactate produced by *Streptococcus* and *Lactobacillus* species (Rogosa, 1964) and 2) *Veillonella* species can adhere to initial, middle, and late colonizers (Hughes et al., 1988 ; Chalmers et al., 2008 ; Periasamy & Kolenbrander, 2010 ; Zhou et al., 2015). Therefore, *Veillonella* species have an important role in the development of oral biofilm and the ecology of the human oral cavity.

To reveal the role of oral *Veillonella* species as early colonizers versus *Streptococcus* species as initial colonizers, biofilms formed by the co-culture of four oral *Streptococcus* species, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. salivarius*, or *S. sanguinis* in combination with six oral *Veillonella* species, *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, or *V. tobetuensis* for a total of 24 combinations were studied by the novel wire method (Mashima and Nakazawa, 2014). Type strains, except *S. mutans* ingbritt, were used, and it was demonstrated that the amount of biofilm formed by *S. mutans*, *S. gordonii*, or *S. salivarius* in the presence of six *Veillonella* species was greater than that formed without *Veillonella* species. On the other hand, in the case of biofilms formed by *S. sanguinis*, the presence of *Veillonella* species reduced the amount of biofilm except by *V. parvula* and *V. dispar*. Time-dependent changes in the amount of biofilm and the number of planktonic cells were grouped into four patterns from these 24 combinations (Fig. 2). Only

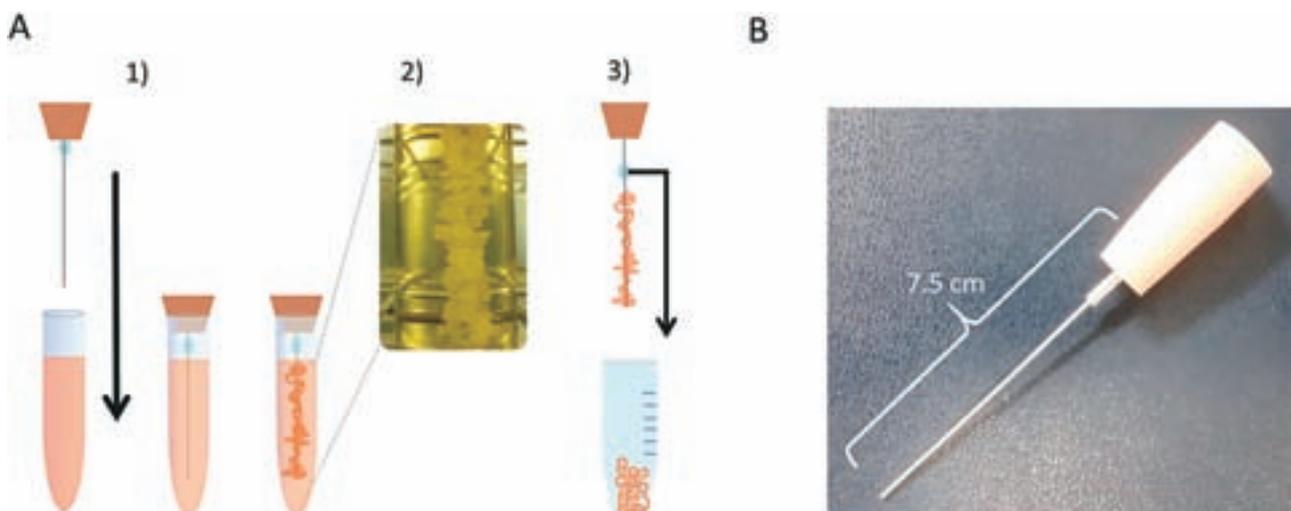


Fig. 1 : A) Scheme for the wire method : 1) the wire is inserted into a bacterial suspension in a test tube, 2) the biofilm forms on the surface of the wire during incubation, and 3) the biofilm is removed from the wire. B) The current wire size used in our laboratory.

that of *S. gordonii* with *V. tobetsuensis* had a unique pattern. In addition, the amount of the biofilm formed by *S. gordonii* alone decreased over time, whereas that formed by *S. gordonii* with *V. tobetsuensis* increased significantly over time. Furthermore, the proportion of *V. tobetsuensis* cells in this biofilm increased over time. These results indicated that *V. tobetsuensis* promotes the development of biofilms, which were initially formed by *S. gordonii* (Mashima & Nakazawa, 2014).

Taken together, two hypotheses were suggested: (1) coaggregation between *S. gordonii* and *V. tobetsuensis* leads to the formation of a biofilm and (2) *V. tobetsuensis* produces certain signals, such as autoinducers (AIs), that promote biofilm formation by *S. gordonii*.

V. tobetsuensis and *S. gordonii* showed no coaggregation (Mashima and Nakazawa, 2017), which indicates that coaggregation between *V. tobetsuensis* and *S. gordonii* was not a factor to promote their biofilm development. Zhou et al., (2015) investigated the sialic acid binding protein Hsa in *S. gordonii* DL1, which mediates intergeneric coaggregation with *Veillonella* spp. They showed that Hsa was essential for coaggregation between *S. gordonii* DL1 and *Veillonella* spp., but the detailed binding mechanism has not been clarified (Zhou et al., 2015). Hughes et al. (1992) suggested that a certain adhesin of *V. atypica* PK1910 mediated coaggregation with *Streptococcus* spp. (Hughes et al., 1992). These results suggest that coaggregation between *Veillonella* spp. and *Streptococcus* spp. depends on the kind of species or strain. Furthermore, the mechanism of coaggregation varies

and more investigation is needed.

It is well known that AIs, such as AI-1 and AI-2, have important roles in biofilm formation with quorum sensing (QS). In particular, AI-2 is produced by both gram-negative and gram-positive microorganisms, and is a universal QS signal to mediate interactions among bacterial species. In the case of oral bacteria, Rickard et al. (2006) demonstrated that *Streptococcus oralis* and *Actinomyces naeslundii* formed a small amount of biofilm when grown alone, but developed into dense biofilms when grown together via production of AI-2 from *Streptococcus oralis* (Rickard et al., 2006). Yoshida et al. (2005) suggested that AI-2 from *Streptococcus mutans* regulated sucrose-dependent biofilm formation through the expression of a glucosyltransferase gene (Yoshida et al., 2005). Furthermore, it was reported that amount of biofilm formed by *Porphyromonas gingivalis*, which causes periodontal disease, was controlled by AI-2 from *Streptococcus gordonii* (McNab et al., 2003). In addition, an AI-2-like molecule was detected by a *Vibrio harveyi* BB170 reporter assay in large amounts in the supernatant of *V. tobetsuensis* in the mid-exponential growth phase. The AI-2-like molecule was partially purified from *V. tobetsuensis* supernatant, the effect of the AI-2-like molecule from *V. tobetsuensis* on *S. gordonii* biofilm was examined using the wire method, and significantly inhibited *S. gordonii* biofilm development without bactericidal effects (Mashima & Nakazawa, 2017). Jang et al. (2013) reported similar results using *Fusobacterium nucleatum*. They showed that AI-2 from *F. nucleatum* reduced *S. oralis*

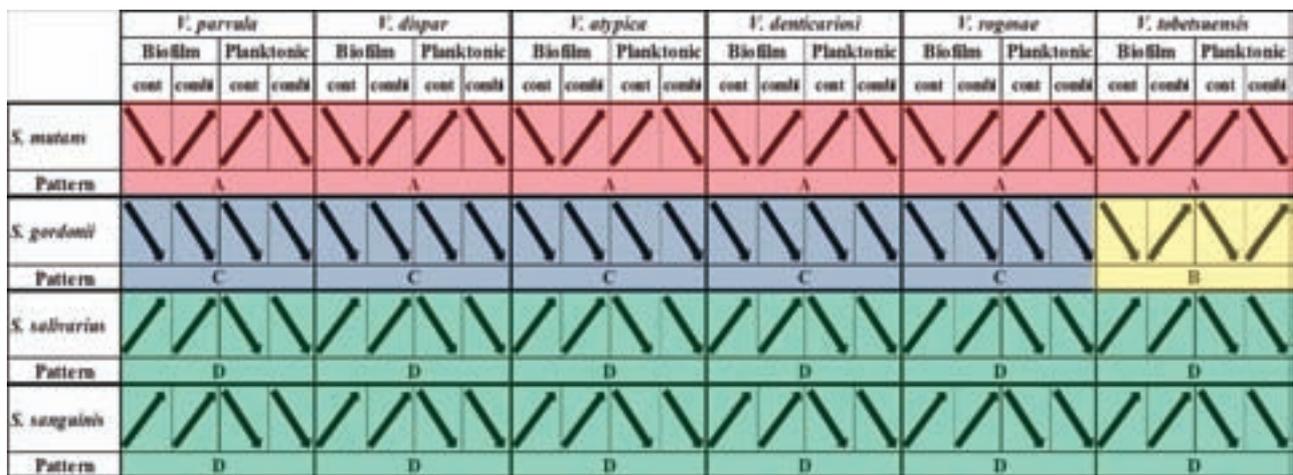


Fig. 2 : Four patterns A, B, C, and D based on time-dependent changes in biofilm formation and the number of planktonic cells among 24 combinations of four *Streptococcus* species and six *Veillonella* species. Arrows indicate increase or decrease of biofilm development or planktonic cell growth. Cont and Combi indicate Control and Combination, respectively.

biofilm development, as well as the attachment of *F. nucleatum* to preformed *S. oralis* biofilms (Jang et al., 2013). Our findings support the additional role of AI-2 as an inhibitor of oral biofilm formation.

Recently, cyclic dipeptides (also known as 2, 5-diketopiperazines), which are low molecular-weight compounds that have a multitude of bioactive properties produced by many gram-negative bacteria, have also been recognized as AIs (Gu et al., 2013). For example, Marchesan et al. (Marchesan et al., 2015) reported that two cyclic dipeptides, cyclo (-L-Leu-L-Pro) and cyclo (-L-Phe-L-Pro), inhibited the growth of commensal bacteria in the biofilm formed by *Synergistetes* in a biofilm-overgrowth model. In our latest study, a cyclic dipeptide was also detected in the culture supernatants from *V. tobetsuensis* at the late-exponential growth phase. It was identified as cyclo (-L-Leu-L-Pro) by GC-MS. In addition, it was demonstrated that although the cyclo (-L-Leu-L-Pro) had no effect on planktonic bacterial cells of *S. gordonii*, the development of biofilm formed by *S. gordonii* was inhibited by the cyclo (-L-Leu-L-Pro) (Mashima et al., unpublished data).

Our previous studies indicated that *V. tobetsuensis* promotes the development of biofilms initially formed by *S. gordonii* without coaggregation (Mashima & Nakazawa,

2014 ; Mashima & Nakazawa, 2017). However, the AI-2-like molecule and the cyclo(-L-Leu-L-Pro) produced by *V. tobetsuensis* inhibited biofilm development of *S. gordonii*. Therefore, other extra cellular molecules from *V. tobetsuensis* to promote *S. gordonii* biofilm development need to be investigated in the future.

7) Metagenome Analysis

Recently, high-throughput methods have been developed for epidemiologic investigation of microbiome profiles related to disease risk (Jo et al., 2016 ; Gao et al., 2017). In the latest study, we characterized the salivary microbiome in Thai children stratified by oral hygiene state. The samples were collected from 90 Thai children divided into three groups – Good, Moderate, and Poor – based on the results of oral examination using OHI-S. The bacterial community structure of saliva from each individual was analyzed using Illumina MiSeq high-throughput sequencing based on the V 3 and V4 region of bacterial 16S rRNA (Mashima et al., 2017). Twenty taxonomic groups including genera, families, and class for *Streptococcus*, *Veillonella*, *Gemellaceae*, *Prevotella*, *Rothia*, *Porphyromonas*, *Granulicatella*, *Actinomyces*, TM-7-3, *Leptotrichia*, *Haemophilus*, *Selenomonas*, *Neisseria*, *Megasphaera*, *Capnocytophaga*, *Oribacterium*,

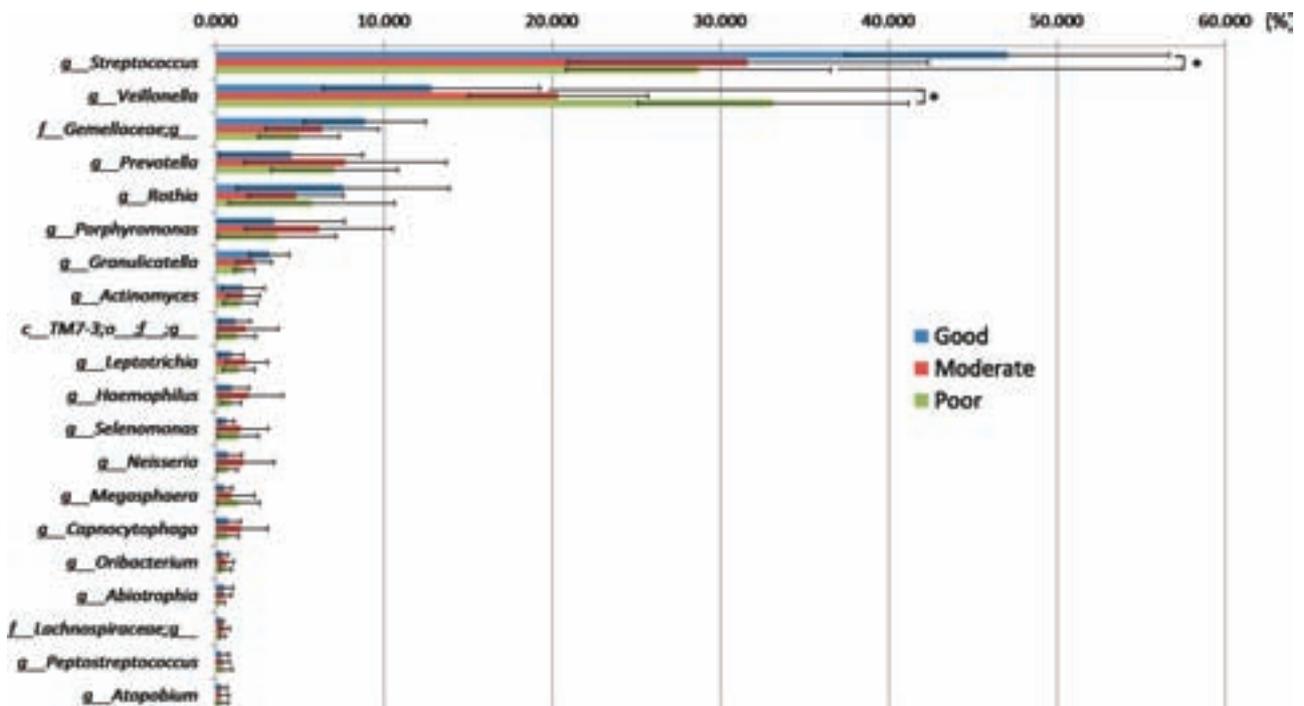


Fig. 3 : Relative abundance of the top 20 bacterial taxa (OTUs) among three oral hygiene groups.

c, f, and g indicated class, family, and genus, respectively. Some OTUs were not assigned to the genus level based on the database. Significant differences were evaluated using the Kruskal-Wallis H-test post hoc Mann-Whitney U-test with Bonferroni correction ($P < 0.05$). Error bars indicate 95% confidence intervals.

Abiotrophia, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcus*, and *Atopobium* were found in all subjects on the basis of 38,521 OTUs (Operating Taxonomic Units) with 97% similarity. Of these bacterial groups, genus *Streptococcus* had the highest relative abundance (47.5%) in the Good oral hygiene group, and genus *Veillonella* had the highest relative abundance (33.5%) in the Poor oral hygiene group. In other words, the proportion of *Streptococcus* decreased and *Veillonella* increased with poor oral hygiene (Fig. 3). Finally, the study demonstrated an important association between an increase of *Veillonella* and poor oral hygiene in children.

Previously, Takeshita et al. (2009) reported that salivary microbiomes with larger proportions of *Prevotella* and *Veillonella* were associated with periodontitis. Similarly, Elinav et al. (2011) demonstrated that oral dysbiosis (imbalances in commensal microbiome) is likely characterized by greater proportions of certain bacterial genera, including *Prevotella*, *Veillonella*, and TM7, which elicit an inflammatory response in the gingival mucosa. Furthermore, several studies showed that *Veillonella* species accounted for a large proportion of the microbiome in caries-affected subjects (Agnello et al., 2017; Arif et al., 2008; Chalmers et al., 2008; Jiang et al., 2016). It is known that oral infectious disease results in part from poor oral hygiene. Our findings support these reports, which suggests that *Veillonella* species might be useful in

the clinic to treat or prevent oral infectious diseases.

Because it is difficult to discriminate the species of *Veillonella* using 16S rRNA, the distribution and frequency of oral *Veillonella* species in the same saliva samples were examined at the species level by one-step PCR (Mashima et al., 2016) to clarify the oral *Veillonella* species that increase in a poor oral hygiene state. The prevalence of *V. rogosae* decreased as oral hygiene quality decreased, and the detection rate was 73%, 69%, and 58% in the Good, Moderate, and Poor oral hygiene groups, respectively, and *V. rogosae* was the predominant species in all groups. In contrast, the detection rate of *V. parvula* increased significantly as oral hygiene quality decreased, and the detection rate was 6%, 7%, and 17% in the Good, Moderate, and Poor oral hygiene groups, respectively (Fig. 4). These results suggest that changes in the detection rate of some oral *Veillonella* species, such as decreased *V. rogosae* and increased *V. parvula*, can be useful as a biomarker for deteriorating oral hygiene in children (Fig. 4) (Theodorea et al., 2017).

8) Novel Oral *Veillonella* species

As mentioned above, although 13 species of genus *Veillonella* have been established, only five species *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, and *V. rogosae* have been isolated from human oral cavities as oral *Veillonella*

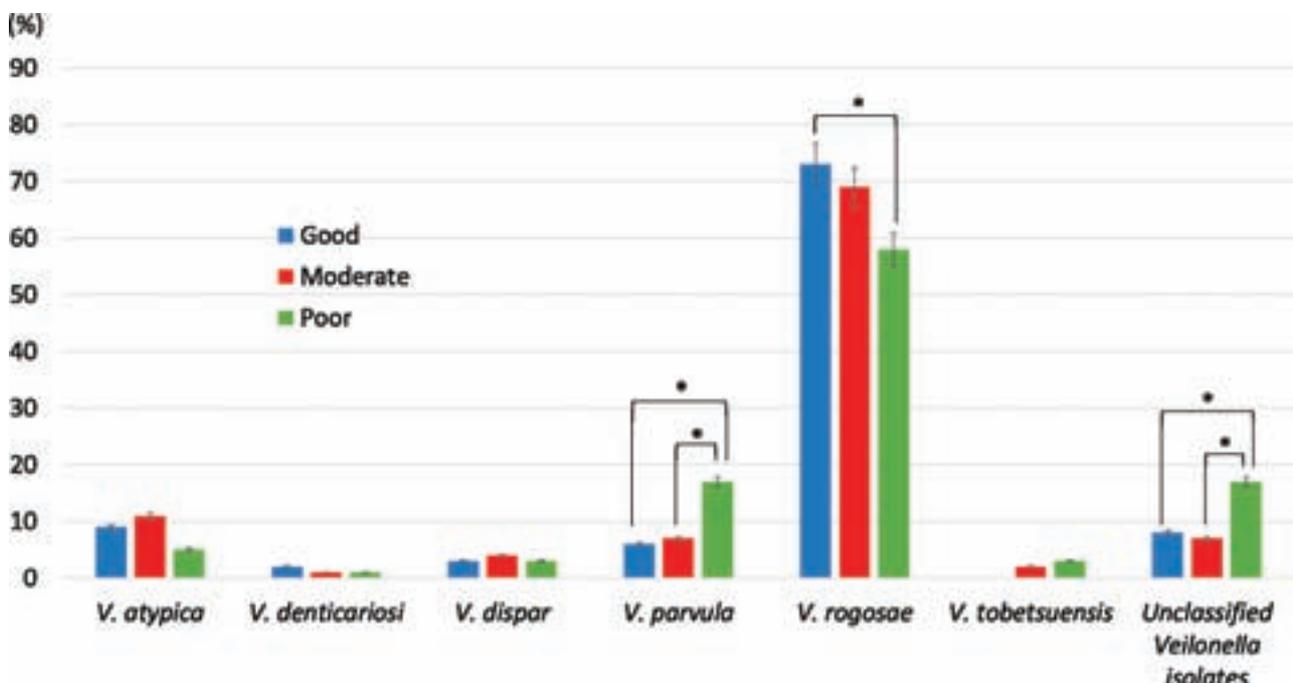


Fig. 4 : Percentages of *Veillonella* species isolated from saliva samples of the Poor, Moderate, and Good oral hygiene groups. Significant differences were evaluated using the Kruskal–Wallis H–test post hoc Mann–Whitney U–test with Bonferroni correction ($P < 0.05$). Error bars indicate 95% confidence intervals.

species, for a long time.

In 2013, Mashima et al. (2013) isolated *V. tobetsuensis* from human tongue biofilms of young adults as a novel *Veillonella* species (Mashima et al., 2013). And it was demonstrated *V. tobetsuensis* was clearly different from the 13 established *Veillonella* species in the *rpoB* and *dnaK* sequence comparison, but were indistinguishable in the 16S rRNA gene sequence analysis. In addition, the draft genome of the *V. tobetsuensis* type strain was sequenced by Illumina HiSeq with sequencing runs for paired-end sequences (Mashima & Nakazawa, 2015). In the study, it was indicated that the genome sequence of the strain was 2,161,277 bp, and contained 1,913 coding sequences, 48 tRNAs, and 3 rRNAs. The study suggested that some protein-coding genes contributed to biofilm formation with oral *Streptococcus* species (Mashima & Nakazawa, 2015).

After 2015, some studies suggested that many novel *Veillonella* species inhabit human oral cavities. For example, Mashima et al. (2015) isolated 442 strains of *Veillonella* from periodontal pockets of 18 subjects (Mashima et al., 2015). Forty-three strains of the 442 could not be identified

from six oral *Veillonella* species already reported by species-specific PCR primers (Igarashi et al., 2009, Mashima & Nakazawa, 2013). In addition, they isolated 101 *Veillonella* strains from tongue biofilms of 10 subjects from 89 Thai children (Mashima et al., 2016). In the study, 61 of the 101 strains were identified as either *V. atypica*, *V. dispar*, *V. rogosae*, or *V. tobetsuensis*. Forty strains had no PCR products with one-step PCR (Mashima et al., 2016), but these 40 strains had positive PCR products with *Veillonella* genus-specific primers. The representative 11 strains in the 40 unknown strains formed distinct taxa with robust bootstrap values in the phylogenetic tree constructed with the *rpoB* gene sequence. Therefore, the authors suggested that there were at least three novel *Veillonella* species in the 40 unknown strains based on the evolutionary trees of the *rpoB* gene (Fig. 5). In the future, *Veillonella infantum* will be proposed as a novel *Veillonella* species for some strains of those 11 representative strains.

Theodorea et al. (2017) isolated 1,609 strains from saliva samples of 107 Thai children and samples were assigned as members of genus *Veillonella* using *Veillonella* genus-spe-

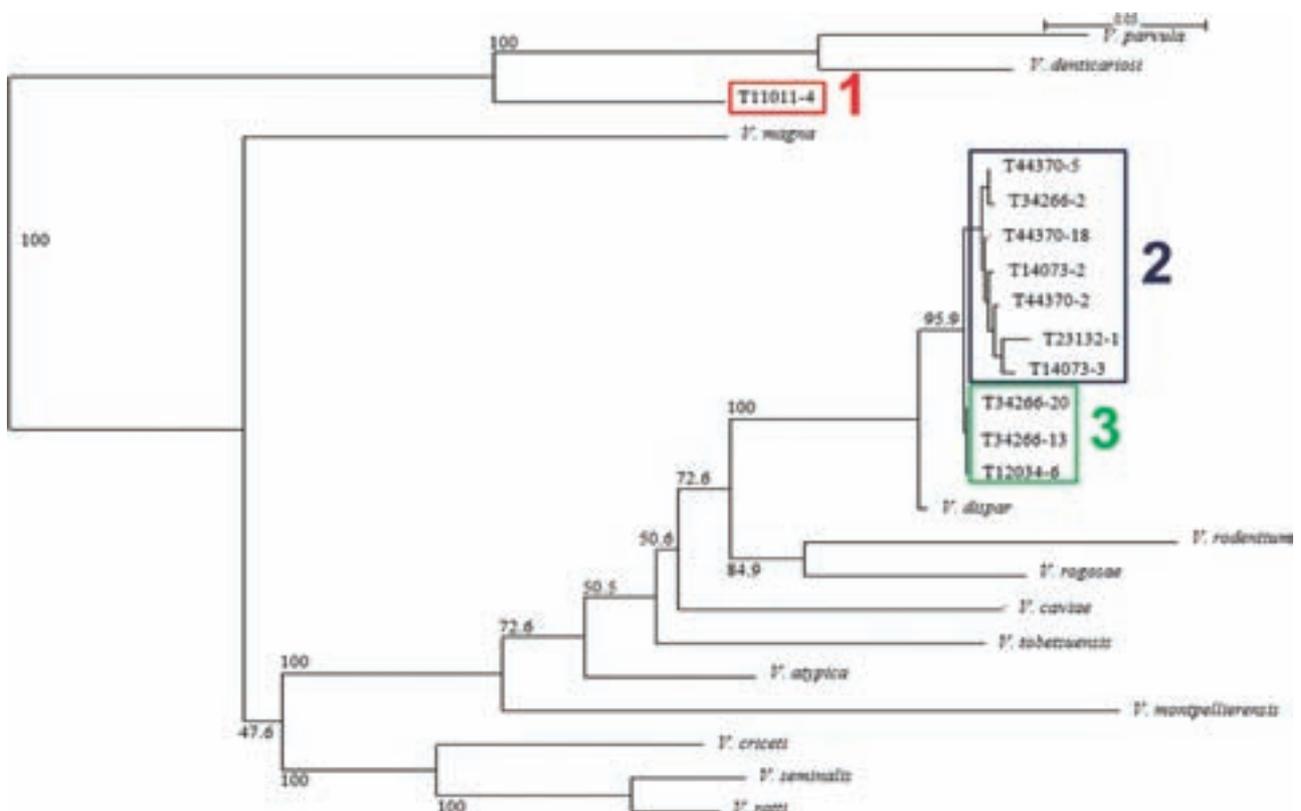


Fig. 5 : Phylogenetic tree based on *rpoB* gene sequences of 11 unclassified strains from tongue biofilms of Thai children and the type strains of 13 established species of *Veillonella*.

Three distinct lineages suggested novel species within *Veillonella*. Bar indicates phylogenetic distance. The number of corners indicates the bootstrap values.

cific PCR primers (Theodorea et al., 2017). One-hundred sixty-seven strains were not classified to any oral *Veillonella* species, but 1442 of the 1609 strains were identified as one of the six oral *Veillonella* species by one-step PCR (Mashima et al., 2016). Subsequently, they proposed several novel species of genus *Veillonella* in human saliva based on phylogeny with sequence analysis of *rpoB* genes of the representative 23 strains in the 167 unclassified strains (Theodorea et al., 2017) (Fig. 6).

Conclusion

Oral *Veillonella* should be investigated to prevent oral infectious diseases caused by oral biofilms. Dr. Morrison Rogosa (National Institute of Dental Research, Bethesda, USA), Dr. David Beighton (Dental Institute, King's College London, England, UK), Dr. Paul E. Kolenbrander (National Institute of Dental and Craniofacial Research, National Institutes of Health, Bethesda, USA), and their laboratory team studied oral *Veillonella*. However, there is still little understanding of the actual mechanisms of *Veillonella*. Although we outlined the latest findings on oral *Veillonella* species in this article, the number of studies on oral *Veillonella* remains small. This review will help promote increased research on oral *Veillonella*.

Acknowledgements

I am grateful to my research colleague Dr. Izumi Mashima, Postdoctoral Fellow of Japan Society for the Promotion of Science, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Department of Oral Biology, School of Dental Medicine, University at Buffalo, The State University of New York who has contributed to many studies cited in this review. The author also thanks many research colleagues including Dr. Citra Fragrantia Theodorea, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Universitas Indonesia, Dr. Hiroshi Miyakawa and Dr. Mari Fujita, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Dr. Boonyanit Thaweboon and Prof. Sroisiri Thaweboon, Department of Oral Microbiology, Faculty of Dentistry, Mahidol University.

Some of studies cited in this review were supported in part by grants-in-aid from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) Fellows (15J30007), Scientific Research from KAKENHI (grant number : 26462793), the Research Project of the Research Institute of Personalized

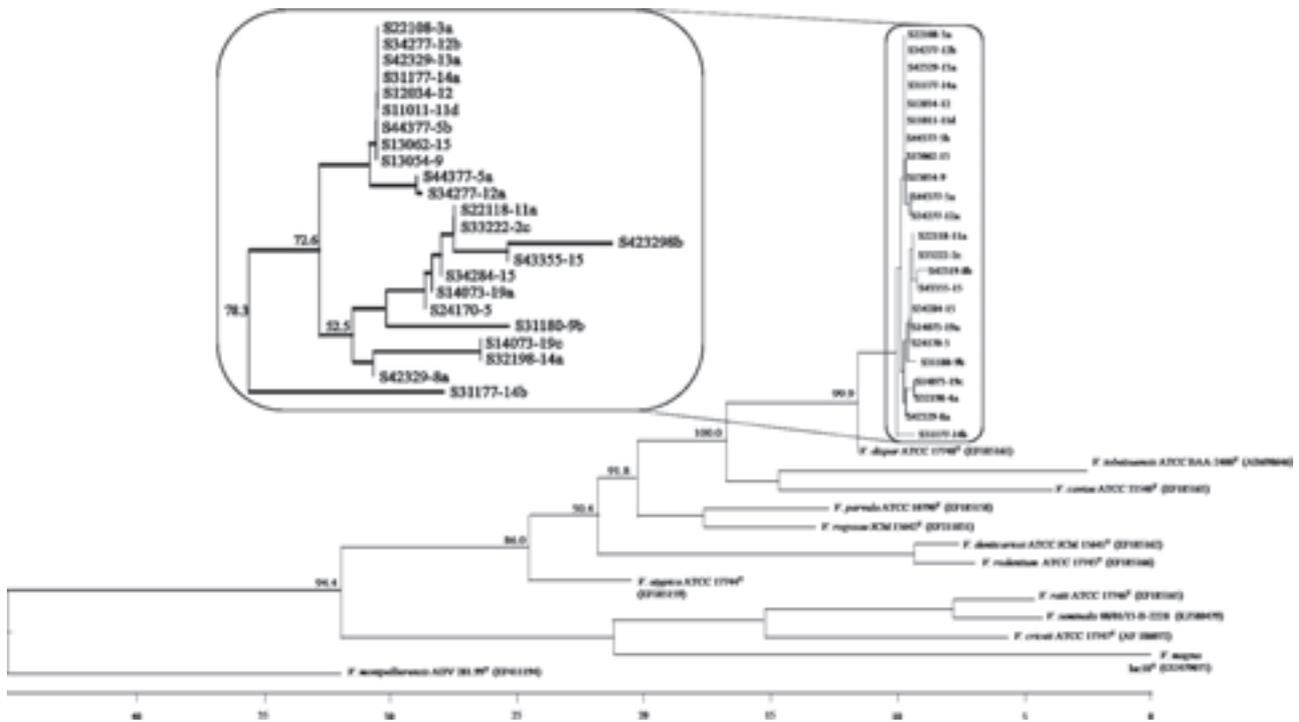


Fig. 6 : Phylogenetic tree based on *rpoB* gene sequences of the 23 representative unclassified strains from the saliva of Thai children and the type strains of the 13 established species of *Veillonella*. A distinct cluster suggested a novel species within *Veillonella*. Bar indicates the phylogenetic distance. The number of corners indicates the bootstrap values.

Health Sciences, 2014–2015 and 2016–2017, Health Sciences University of Hokkaido, and 2015, 2016, and 2017 research grants from the Institute for Fermentation, Osaka.

References

- Aas JA, Barbuto SM, Alpagot T, Olsen I, Dewhirst FE & Paster BJ. Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients. *J Clin Periodontol* 34(3) : 189–195, 2007.
- Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ & Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 46 : 1407–1417, 2008.
- Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I & Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43 : 5721–5732, 2005.
- Agnello M, Marques J, Cen L, Mittermuller B, Huang A, Chaichanasakul Tran N, Shi W, He X & Schroth RJ. Microbiome associated with severe caries in Canadian First Nations children. *J Dent Res* in press ; 2017.
- Arif N, Do T, Byun R, Sheehy EC, Clark D, Gilbert SC & Beighton D. *Veillonella rogosae* sp. nov., an anaerobic, Gram-negative coccus isolated from dental plaque. *Int J Syst Evol Microbiol* 58 : 581–584, 2008.
- Arif N, Sheehy EC, Do T & Beighton D. Diversity of *Veillonella* spp. from sound and carious site in children. *J Dent Res* 87(3) : 278–282, 2008.
- Ajoulat F, Bouvet P, Jumas-Bilak E, Jean-Pierre H & Marchandin H. *Veillonella seminalis* sp. nov., a novel anaerobic Gram-stain-negative coccus from human clinical samples, and emended description of the genus *Veillonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* 64 : 3526–3531, 2014.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE & Griffen AL. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40 : 1001–1009, 2002.
- Beighton D, Clark D, Hanakuka B, Gilbert S & Do T. The predominant cultivable *Veillonella* spp. of the tongue of healthy adults identified using *rpoB* sequencing. *Oral Microbiol Immunol* 23(4) : 344–347, 2008.
- Bjarnsholt T, Alhede M, Eickhardt-Sørensen RS, Moser C, Kühl M, Jensen. ØP & Høiby N. The *in vivo* biofilm. *Trend Microbiol* 21 : 466–474, 2013.
- Byun R, Carlier JP, Jacques NA, Marchandin H & Hunter N. *Veillonella denticariosi* sp. nov., isolated from human carious dentine. *Int J Syst Evol Microbiol* 57 : 2844–2848, 2007.
- Chalmers NI, Palmer RJ Jr, Cisar JO & Kolenbrander PE. Characterization of a *Streptococcus* sp.–*Veillonella* sp. community micromanipulated from dental plaque. *J Bacteriol* 190 : 8145–8154, 2008.
- Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM & Beachey EH. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates : A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol* 22 : 996–1006, 1985.
- Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr & Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol* 72(4) : 2837–2848, 2006.
- Dongyou L. *Veillonella*. In : Dongyou L. editor. *Molecular detection of human bacterial pathogens*. CRC Press 447–452, 2011.
- Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaïss CA, Booth CJ, Peaper DR, Bertin J, Eisenbarth SC, Gordon JI & Flavell RA. NLRP6 inflammasome regulates colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145(5) : 745–757, 2011.
- Fisher RG & Denison MR. *Veillonella parvula* bacteremia without an underlying source. *J Clin Microbiol* 34(12) : 3235–3236, 1996.
- Foster JS & Kolenbrander PE. Development of multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol* 70 (7) : 4340–4348, 2004.
- Foubert EL & Douglas HC. Studies on the anaerobic micrococci. The fermentation of lactate by *Micrococcus lacticus*. *J Bacteriol* 56 : 35–36, 1948.
- Gao R, Gao Z, Huang L & Qin H. Gut microbiota and colorectal cancer. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* in press ; 2017.
- Gu Q, Fu L, Wang Y & Lin J. Identification and characterization of extracellular cyclic dipeptides as quorum-sensing signal molecules from *Shewanella baltica*, the specific spoilage organism of *Pseudosciaena crocea* during 4°C storage. *J Agric Food Chem* 61 : 11645–11652, 2013.
- Hajishengallis G & Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity : the polymicrobial synergy and

- dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol* 27 : 409–419, 2012.
- Huang R, Li M & Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence* 2 : 435–444, 2011.
- Hughes CV, Kolenbrander PE, Andersen RN & Moore LV. Coaggregation properties of human oral *Veillonella* spp. : relationship to colonization site and oral ecology. *Appl Environ Microbiol* 54 : 1957–1963, 1988.
- Hughes CV, Andersen RN & Kolenbrander PE. Characterization of *Veillonella atypica* PK1910 adhesin-mediated coaggregation with oral *Streptococcus* spp. *Infect Immun* 60(3) : 1178–1186, 1992.
- Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486 : 207–214, 2012.
- Igarashi E, Kamaguchi A, Fujita M, Miyakawa H & Nakazawa F. Identification of oral species of the genus *Veillonella* by PCR. *Oral Microbiol Immunol* 24 : 310–313, 2009.
- Isner-Horobeti ME, Lecocq J, Dupeyron A, De Martino SJ, Froehlig P & Vautravers P. *Veillonella* discitis. A case report. *Joint Bone Spine* 73 : 113, 2005.
- Jiang S, Gao X, Jin L & Lo EC. Salivary microbiome diversity in caries-free and caries-affected children. *Int J Mol Sci* 25 : 17(12). pii : E1978, 2016.
- Jean-Philippe C. Genus *Veillonella* Prévot 1933, 118^{At} emend. Mays, Holdeman, Moore, Rogosa and Johnson 1982, 35. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Second Edition, vol. 3, pp.1059–1065. Edited by Paul DV, George MG, Dorothy J, Noel RK, Wolfgang L, Fred AR, Karl-Heinz S & William BW. Springer : Dordrecht, Heidelberg, London & New York, 2009.
- Jo JH, Kennedy EA & Kong HH. Topographical and physiological differences of the skin microbiome in health and diseases. *Virulence* in press ; 2016.
- Jumas-Bilak E, Carlier JP, Jean-Pierre H, Teyssier C, Gay B, Campos J & Marchandin H. *Veillonella montpellierensis* sp. nov., a novel, anaerobic, Gram-negative coccus isolated from human clinical samples. *Int J Syst Evol Microbiol* 54 : 1311–1316, 2004.
- Keijsers B, Zaura E, Huse S M, Van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC, Ten Cate J M & Crielaard W. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* 87 : 1016–1020, 2008.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S & Jakubovics NS. Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol* 8 : 471–480, 2010.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Rickard AH, Jakubovics NS, Chalmers NI & Diaz PI. Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontol* 2000 42 : 47–79, 2006.
- Kraatz M & Taras D. *Veillonella magna* sp. nov., isolated from the jejunal mucosa of a healthy pig, and emended description of *Veillonella ratti*. *Int J Syst Evol Microbiol* 58 : 2755–2761, 2008.
- Liu JW, Wu JJ, Wang LR, Teng LJ & Huang TC. Two fatal cases of *Veillonella* bacteraemia. *Eur J Clin Microbiol Dis* 17 : 62, 1998.
- Maddi A & Scannapieco FA. Oral biofilms, oral and periodontal infections, and systemic disease. *Am J Dent* 26 : 249–254, 2013.
- Marchandin H, Teyssier C, Siméon De Buochberg M, Jean-Pierre H, Carriere C & Jumas-Bilak E. Intra-chromosomal heterogeneity between the four 16S rRNA gene copies in the genus *Veillonella* : implications for phylogeny and taxonomy. *Microbiology* 149 : 1493–1501, 2003.
- Marchesan JT, Morelli T, Moss K, Barros SP, Ward M, Jenkins W, Aspiras MB & Offenbacher S. Association of *Synergistetes* and cyclodipeptides with periodontitis. *J Dent Res* 94(10) : 1425–1431, 2015.
- Marriott D, Stark D & Harkness J. *Veillonella parvula* discitis and secondary bacteremia : A rare infection complicating endoscopy and colonoscopy? *J Clin Microbiol* 45 : 672, 2007.
- Mashima I, Kamaguchi A & Nakazawa F. The Distribution and Frequency of Oral *Veillonella* spp. in the Tongue Biofilm of Healthy Young Adults. *Curr Microbiol* 63(5) : 403–407, 2011.
- Mashima I, Kamaguchi A, Miyakawa H & Nakazawa F. *Veillonella tobetsuensis* sp. nov., an anaerobic, Gram-negative coccus isolated from human tongue biofilms. *Int J Syst Evol Microbiol* 63(4) : 1443–1449, 2013.
- Mashima I, Fujita M, Nakatsuka Y, Kado T, Furuichi Y, Sulistyani H & Nakazawa F. The distribution and frequency of *Veillonella* spp. associated with chronic periodontal diseases. *Int J Curr Microbiol Appl Scien* 4(3) : 150–160, 2015.
- Mashima I, Nakazawa F. Identification of *Veillonella tobetsuensis* in tongue biofilm by using a species-specific

- primer pair. *Anaerobe* 22 : 77–81, 2013.
- Mashima I & Nakazawa F. The influence of oral *Veillonella* species on biofilms formed by *Streptococcus* species. *Anaerobe* 28 : 54–61, 2014.
- Mashima I & Nakazawa F. The wire method for generating experimental biofilms formed by oral *Streptococcus* and *Veillonella* species. *The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido* 31(2) : 11–18, 2012.
- Mashima I & Nakazawa F. Draft genome sequence of *Veillonella tobetsuensis* ATCC BAA–2400^T isolated from human tongue biofilm. *Genome Announcements* 3(4) : 1–2, 2015.
- Mashima I & Nakazawa F. Role of an autoinducer–2–like molecule from *Veillonella tobetsuensis* in *Streptococcus gordonii* biofilm formation. *Journal Oral Biosciences* 59 : 152–156, 2017.
- Mashima I, Theodora CF, Thaweboon B, Thaweboon S & Nakazawa F. Identification of *Veillonella* species in the tongue biofilm by using a novel one–step polymerase chain reaction method. *PLOS ONE*, 11(6) : e0157516, 2016.
- Mashima I, Theodora FC, Thaweboon B, Thaweboon S, Scannapieco FA & Nakazawa F. Exploring the salivary microbiome of children stratified by the oral hygiene index. *PLOS ONE* 12(9) : e0185274, 2017.
- Mays TD, Holdeman LV, Moore WEC, Rogosa M & Johnson JL. Taxonomy of genus *Veillonella* prévot. *Int J Syst Bacteriol* 32 : 28–36, 1982.
- McNab R, Ford SK, El–Sabaeny A, Barbieri B, Cook GS & Lamont RJ. LuxS–based signaling in *Streptococcus gordonii* : autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* 185 : 274–284, 2003.
- Michon AL, Aujoulat F, Roudière L, Oliver S, Zorogniotti I, Jumas–Bilak E & Marchandin H. Intragenomic and intraspecific heterogeneity in *rrs* may surpass interspecific variability in a natural population of *Veillonella*. *Microbio* 156 : 2080–2091, 2010.
- Nyvad B & Kilian M. Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res* 95(5) : 369–380, 1987.
- Periasamy S & Kolenbrander PE. Central role of the early colonizer *Veillonella* sp. in establishing multispecies biofilm communities with initial, middle, and late colonizers of enamel. *J Bacteriol* 192(12) : 2965–2972, 2010.
- Ready D, Bedi R, Mullany P & Witson M. Penicillin and amoxicillin resistance in oral *Veillonella* spp. *Int J Antimicrob Agents* 20 : 188–189, 2012.
- Rickard AH, Palmer RJ Jr, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Eglund PG, Bassler BL & Kolenbrander PE. Autoinducer–2 : a concentration–dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol* 60 : 1446–1456, 2006.
- Rogosa M. The genus *Veillonella*. General cultural, ecological, and biochemical considerations. *J Bacteriol* 87 : 162–170, 1964.
- Rogosa M. The genus *Veillonella*. Serological groupings, and genus and species emendations. *J Bacteriol* 90 : 704–709, 1965.
- Rogosa M, Fitzgerald RJ, Mackintosh ME & Beaman AJ. Improved medium for selective isolation of *Veillonella*. *J Bacteriol* 76 : 455–456, 1958.
- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L & Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol* 39 : 3282, 2001.
- Sato T, Sato M, Matsuyama J & Hoshino E. PCR–restriction fragment length polymorphism analysis of genes coding for 16S rRNA in *Veillonella* spp. *Int J Syst Bacteriol* 47 : 1268–1270, 1997.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Souto R, Uzeda M & Colombo AP. Microbiological evaluation of acute periradicular abscesses by DNA–DNA hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 92 : 451, 2001.
- Socransky SS & Haffajee AD. The bacterial etiology of destructive periodontal diseases : current concepts. *J Periodontol* 63 : 322–331, 1992.
- Takeshita T, Nakano Y, Kumagai T, Yasui M, Kamio N, Shibata Y, Shiota S & Yamashita Y. The ecological proportion of indigenous bacterial populations in saliva is correlated with oral health status. *ISME J* 3(1) : 65–78, 2009.
- Theodora CF, Mashima I, Thaweboon B, Thaweboon S & Nakazawa F. Molecular detection of oral *Veillonella* species in the saliva of children with different oral hygiene statuses. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 6(7) : 449–461, 2017.
- Theodora CF, Mashima I & Nakazawa F. Prospects of novel species of oral *Veillonella* in human saliva. *Adv Biotech Microbiol* 5(4) : 1–3, 2017.

Tortorello ML & Delwiche EA. Utilization of fructose and ribose in lipopolysaccharide synthesis by *Veillonella parvula*. *Infec Immun* 41 : 423–5, 1983.

Washio J, Sato T, Koseki T & Takahashi N. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. *J Med Microbiol* 54 : 889–893, 2005.

Yoshida A, Ansai T, Takehara T & Kuramitsu HK. LuxS-based signaling affects *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 71 : 2372–80, 2005.

Zhou P, Li X & Qi F. Identification and characterization of a heme biosynthesis locus in *Veillonella*. *Microbiol* 162 : 1735–1743, 2016.

Zhou P, Liu J, Li X, Takahashi Y & Qi F. The sialic acid binding protein, Hsa, in *Streptococcus gordonii* DL1 also mediates intergeneric coaggregation with *Veillonella* species. *PLoS ONE*, 10(11) : e0143898, 2015.

Zhou P, Liu J, Merritt J & Qi F. A YadA-like autotransporter, Hag1 in *Veillonella atypica* is a multivalent hemagglutinin involved in adherence to oral streptococci, *Porphyromonas gingivalis*, and human oral buccal cells. *Mol Oral Microbiol* 30 : 269–279, 2015.



Futoshi NAKAZAWA

1977. Assistant Professor, Department of Oral Microbiology, Dental School, Niigata University
1985. Visiting Assistant Professor, Department of Oral Biology, Dental School, State University of New York at Buffalo(USA)
1995. Lecturer, Department of Oral Microbiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University
1996. Overseas Researcher, Oral Microbiology Unit, University of London(UK)
1997. Associate Professor, Department of Oral Microbiology, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University
2004. Professor and Chairman, Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

〔原著〕

部分床義歯補綴学基礎実習の小テストで抽出した3つの自己評価領域の比較 ～形成的評価と総括的評価との関連性～

川西 克弥¹⁾, 會田 英紀²⁾, 河野 舞³⁾, 佐々木 みづほ¹⁾, 朝廣 賢哉¹⁾, 中本 雅久¹⁾, 山崎 真郎¹⁾, 菅 悠希¹⁾,
中村 健二郎¹⁾, 松原 国男⁴⁾, 豊下 祥史¹⁾, 伊東 由紀夫⁵⁾, 越野 寿¹⁾

- 1) 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
- 2) 北海道医療大学歯学部 生体機能・病態学系 高齢者・有病者歯科学分野
- 3) 千葉県立保健医療大学 歯科衛生学科
- 4) 北海道医療大学歯科クリニック 地域支援医療科訪問診療室
- 5) 伊東歯科医院

The relationship between formative and overall evaluations in the self-assessments of students through prosthodontics practical training of partial dentures

Katsuya KAWANISHI¹⁾, Hideki AITA²⁾, Mai KONO³⁾, Mizuho SASAKI¹⁾, Kenya ASAHIRO¹⁾,
Masahisa NAKAMOTO¹⁾, Masao YAMAZAKI¹⁾, Yuki KAN¹⁾, Kenjiro NAKAMURA¹⁾, Kunio MATSUBARA⁴⁾,
Yoshifumi TOYOSHITA¹⁾, Yukio ITO⁵⁾, Hisashi KOSHINO¹⁾

- 1) Department of Removable Prosthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
- 2) Department of Geriatric Dentistry, Division of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
- 3) Department of Dental Hygiene, Faculty of Health Care Sciences, Chiba Prefectural University of Health Sciences
- 4) Dental Clinic, Health Sciences University of Hokkaido
- 5) Dental Clinic Ito

Key words : subjective understanding of self-assessment, partial denture practical training, Pre-Posttests, formative evaluation, overall evaluation

Abstract

Purpose : The purpose of this study is to investigate whether formative evaluation through Pre-Posttests using the subjective understanding of self-assessment for undergraduate student in prosthodontics practical training of partial dentures is statistically related to overall evaluations such as by Computer Based Testing, acceptance criteria for Computer Based Testing.

Methods : Fourth year students were subjected Pre-Posttests used for computer based multiple-choice questions with visual materials. Each question was assessed by the subjective understanding of the self-assessment. Students were divided into self-assessment groups (an overvaluation group, an undervaluation group and a coincident evaluation group).

The relationship between the formative evaluation and overall evaluation was analyzed among the self-assessment groups.

Results : The percentage of questions answered correctly in an overvaluation group was significantly lower than that in the coincident evaluation group. There was a statistically significantly correlation between the formative evaluation and overall evaluation in the coincident evaluation group, but not in the overvaluation group.

Conclusions : Identifying an overvaluation group by the subjective understanding of self-assessments from the stage of formative evaluation may be useful for instruction in the education for an overall evaluation.

緒 言

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：Computer Based Testing, OSCE：Objective Structured Clinical Examination）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（講義・基礎実習）が実践されるようになった（鈴木ら, 2006；村上ら, 2008）。とくに、補綴学系の基礎実習では、診療参加型臨床実習を視野に入れた実習内容への改善が求められている（安陪ら, 2013）ことから、平成18年度から従来の技工操作を主体とした実習から臨床に即した手技教育へのカリキュラム変更を行った（松実ら, 2007；豊下ら, 2009；豊下ら, 2010）。しかしながら、診療参加型臨床実習前までに臨床問題解決能力を習得させるためには、双方向型授業、PBL（Problem Based Learning）、チーム基盤型学習（TBL）などの導入が必要不可欠である。ところが、人的資源の不足や講義・実習時間の制約により、現場での教育体制には限界がある。また、視覚素材を活かしたWeb e-learningのような自己主導型学習の導入も、学生の関心や意欲を向上させるための有効な手段の一つであるが（河相ら, 2006；宗ら, 2007）、システム環境を整えるには費用がかかる。そのため本講座では、平成23年度より全部床義歯補綴学基礎実習および部分床義歯補綴学基礎実習において、基礎的知識の定着と診療問題解決能力を養うための形成的評価として、視覚素材を応用したプレ・ポストテストによる多肢選択式テストを導入した。ところが、多肢選択式テストは、幅広い知識の定着の確認とその評価の効率が優れているものの、あくまでも平均正答率の比較によって成績評価されることや、“当て推量”で回答する学習者の存在が指摘されていることから、正誤答を対象とした評価では真の学生理解度を把握するには不十分とされている（張, 2007）。我々は全部床義歯補綴学基礎実習において、多肢選択式テストに自己評価による確信度を応用することで、“当て推量”で回答する学習者の存在を抽出し、その情報をもとに作成した自己評価図から、過大評価領域者、過小評価領域者、一致評価領域者の3群に分けて形成的評価を行うことの有用性について報告している（川西ら, 2014）。今回、部分床義歯補綴学基礎実習に導入した形成的評価によって抽出された自己評価領域者間（過大評価領域者、過小評価領域者、一致評価領域者）において、総括的評価であるCBT判定基準試験トライアルおよびCBTの成績との関係について調査したので報告する。

研究方法

平成23年度本学歯学部第4学年の学生108名（男性87名、女性21名）に対し、平成23年8月24日～平成24年1月20日の期間に実施した部分床義歯補綴学基礎実習時に視覚素材を用いた多肢選択式による小テスト（プレテスト、ポストテスト）を実施し、各設問に対する学生の自己評価による確信度を調査した。各種試験の未受講、遅刻・早退により小テストの受験回数が著しく低かった学生6名は分析対象から除外した。

1. 小テストの実施概要～形成的評価～

全15回（80分間×4コマ／回）の実習のうち、13回にわたり実習開始時と終了時に各回10題の同一問題の小テストを実施した。小テスト問題は、メインホストのコンピュータから各実習台の個人専用端末コンピュータに一斉に配信し、各実習台に設置されたモニター上に提示した。各問題はカウントダウン方式で回答時間に制限を設け、自動的に次の問題に切り替わるよう設定した。プレテストの各問題の制限時間は25秒間とし、各問題に対する自己評価による確信度の回答時間を10秒間とした。一方、ポストテストでは、各問題の制限時間を20秒間に短縮し自己評価による確信度の回答時間に関してはプレテストと同様の10秒間とした。

小テスト問題は各回の講義および実習の範囲と一致した内容で作成し、視覚素材を用いた5肢択一の多肢選択式テストとした。また、各問題への回答終了後に、逐次“理解しているので解答できた”、“理解していないので適当に解答した”の2肢択一の設問を設定し、各問題の解答に対する学生の自己評価による確信度を調査した。ポストテストはプレテストの選択肢と同一の解答にならないよう選択肢の順番を変更した。プレテスト終了後は正答を示さないまま実習を開始し、ポストテスト終了後に解説を行った。

実際にモニターに映し出したプレテストおよび各問題に対する自己評価による確信度の設問例および実習小テスト実施状況を示す（図1）。

2. 小テスト問題の内容妥当性

小テストの各設問の内容妥当性を確認するため、プレテストにおける各設問の正答率と識別指数を算出した（池袋ら, 1998；赤根ら, 2006）。

3. 各学習者の自己評価図の作成

過大評価傾向にある学習者をスクリーニングするため、ポストテストの各設問で得られた自己評価による確信度の結果より、織田らの方法に従い自己評価図を作成した（織田, 下村, 1989）。まず、各学習者の自己評価

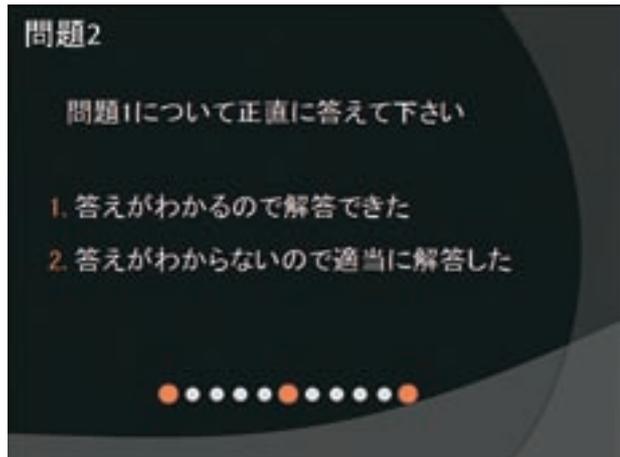


図 1
問題の例 (25秒間)
自己確信度の例 (10秒間)

状況を定量化するため、過小評価指数 (I_u) と過大評価指数 (I_o) を算出した。過小評価指数 (I_u) は、正答を選択し「理解していないので適当に解答した」合計数を解答数で除することで求め、過大評価指数 (I_o) は、不正答を選択し「理解しているので解答できた」合計数を解答数で除して求めた。なお、正答、不正答にかかわらず、自己評価による確信度の回答が欠落している場合、遅刻・早退・欠席等の理由により無回答であった場合の学習者については、対象となる設問数を解答数から減じて算出した。各学習者の過小評価指数 (I_u) と過大評価指数 (I_o) は、横軸に過小評価指数を、縦軸に過大評価指数をとった座標平面上にプロットした。織田らの方法に従い基準座標点を算出後 ($I_u', I_o' : 0.262, 0.136$)、各学習者の自己評価状況は以下の4領域に区分した。すなわち、正答を選択し「理解しているので解答できた」場合を一致評価領域者 ($I_u > I_u$ かつ $I_o > I_o$)、正答を選択し「理解していないので適当に解答した」場合を過小評価領域者 ($I_u < I_u$ かつ $I_o > I_o$)、不正答を選択し「理解しているので解答できた」場合を過大評価領域者

($I_u > I_u$ かつ $I_o < I_o$)、不正答を選択し「理解していないので適当に解答した」場合を逆評価領域者 ($I_u < I_u$ かつ $I_o < I_o$) とした。

4. 学内試験と共用試験の実施～総括的評価～

平成24年1月13日にCBT出題基準に準拠して本学オリジナルで作問したCBT判定基準試験トライアルを実施した。出題数は150問であり、そのうち有床義歯補綴学に関連する問題は15題であった。平成24年2月3日に共用試験実施機構の実施要項に則ったCBTを実施した。CBTの詳細については非公開であるため、出題数を確認することが出来なかった。

5. 各領域者群間での各種試験成績の比較および各領域者群における各種試験成績の相関関係

プレテスト、ポストテスト、CBT判定基準試験、CBTの成績について各領域者群間で比較した。さらに、各領域者群における各種試験成績の相関関係について調べた。なお、CBT判定基準試験とCBTは、部分床義歯補綴学領域の成績のみを抽出することができなかったため、全試験科目範囲を網羅した成績を分析対象とした。

6. 統計学的分析

全試験の成績における各領域者群間の比較には、一元配置分散分析を行い、その後の検定にTukey HSDを行った。各領域者群における各種試験成績の相関関係にはPearsonの積率相関係数を用いて調べた。有意水準は危険率5%未満とし、すべての統計分析はIBM SPSS Statistics ver 22.0 (エス・ピー・エス・エス, IBM Japan, 東京, 日本) を用いて行った。

結 果

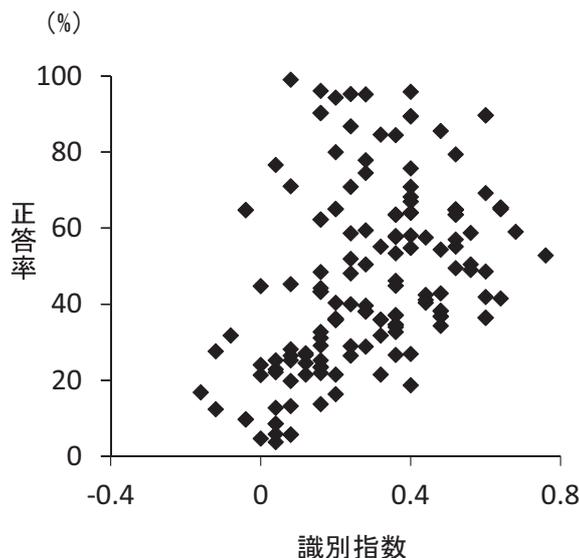
1. 小テストの各設問の正答率と識別指数

各設問の正答率を縦軸に、識別指数を横軸にプロットした散布図を示す (図2)。

全130問の各設問の識別指数は、0.50以上が20題、0.25以上0.50未満が46題、0.15以上0.25未満が32題、0.15未満が32題であった。正答率25%以下かつ識別指数0.15以下の設問を抽出したところ、18題が抽出された。その正答率は $14.18 \pm 7.50\%$ で、識別指数が 0.03 ± 0.07 と低い結果であったことから、赤根らの報告を参考に (赤根ら, 2006) 不適切設問として扱い、各学習者の自己評価図の作成および分析対象から除外した。

2. 各学習者の自己評価図の作成

不適切設問18題を除く112題を用いて作成した各学習者の自己評価図を示す (図3)。各学習者の内訳は、過大評価領域者群19名、過小評価領域者群25名、一致評価領域者群58名、逆評価領域者群は0名であった。各領域



識別指数	問題数
0.50 以上	20 問
0.25 以上 0.50 未満	46 問
0.15 以上 0.25 未満	32 問
0.15 未満	32 問

図2 小テスト問題の正答率と識別指数の分布

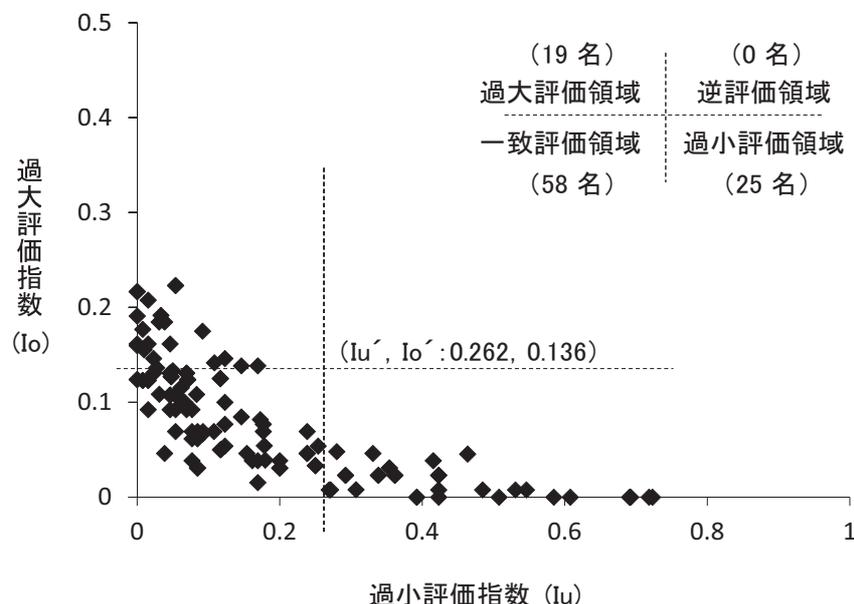


図3 自己評価図の作成と各自己評価領域者の抽出

者群における留年経験のある者の割合を調べたところ過大評価領域者群では63%であった(表1)。

3. 各領域者群間での各種試験成績の比較

各種試験成績を各領域者群間で比較した結果、全試験において過大評価領域者群が最も低い値を示した。プレ

テストおよびポストテストでは、過大評価領域者群と比較して一致評価領域者群と過小評価領域者群で有意に高い値を示した(一致評価領域者群:P<0.01, 過小評価領域者群:P<0.05)(図4, 5)。CBT判定基準試験トリアルおよびCBTの成績を各領域者群間で比較した結果、一致評価領域者群が過大評価領域者群と比較して有意に高い値を示した(P<0.05)(図6, 7)。CBTの本学平均は72.8%であり、全国平均の73.6%と比較するとやや低い傾向にあったが、一致評価領域者群は74.5%であり、全国平均よりも上回っていることが確認できた。また、過小評価領域者群と過大評価領域者群の成績は全国平均および本学平均よりも低い値を示した。過小評価領域者群の成績は全国平均よりも1.8%低く、過大評価領

表1 各領域者群における留年経験のある者の割合

	留年経験		
	ない者	ある者	ある者の割合
過大評価領域者群 (19名)	7名	12名	63%
過小評価領域者群 (25名)	17名	8名	32%
一致評価領域者群 (58名)	45名	13名	22%

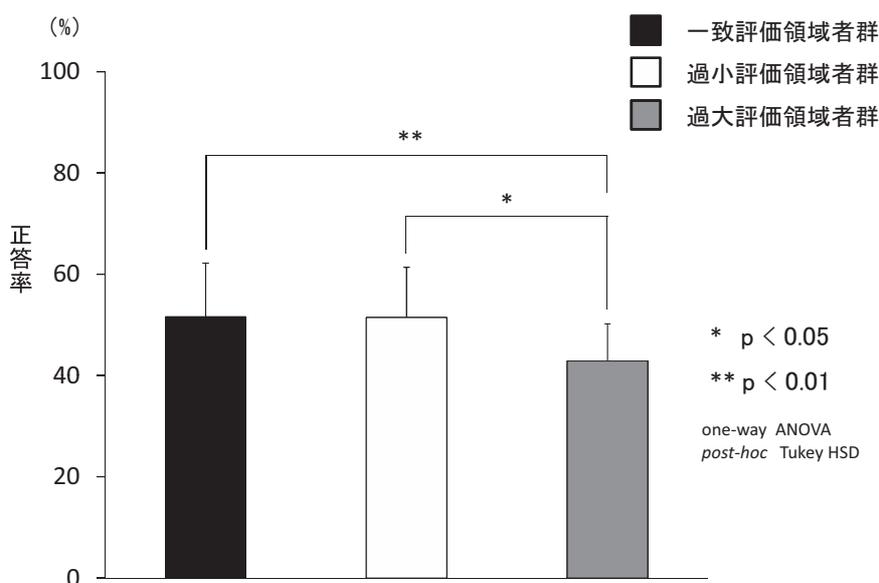


図4 プレテストの成績

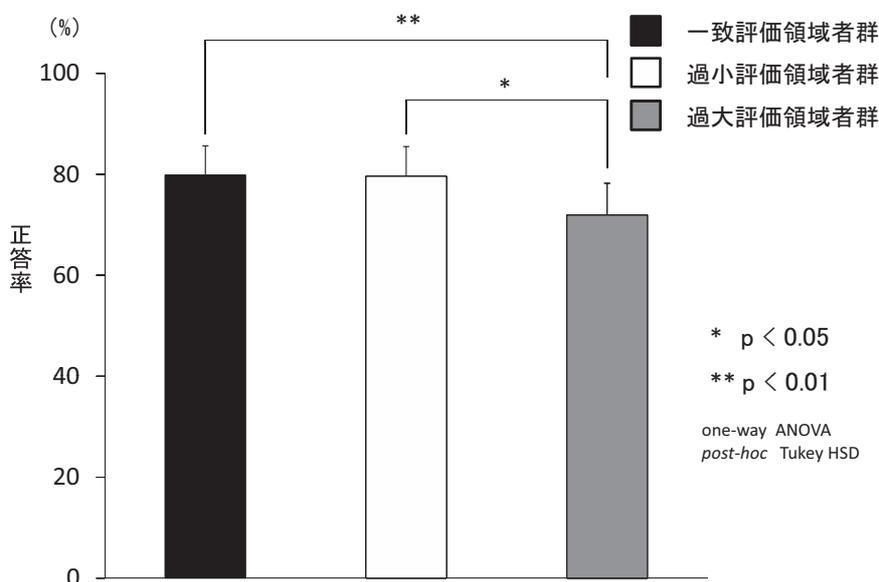


図5 ポストテストの成績

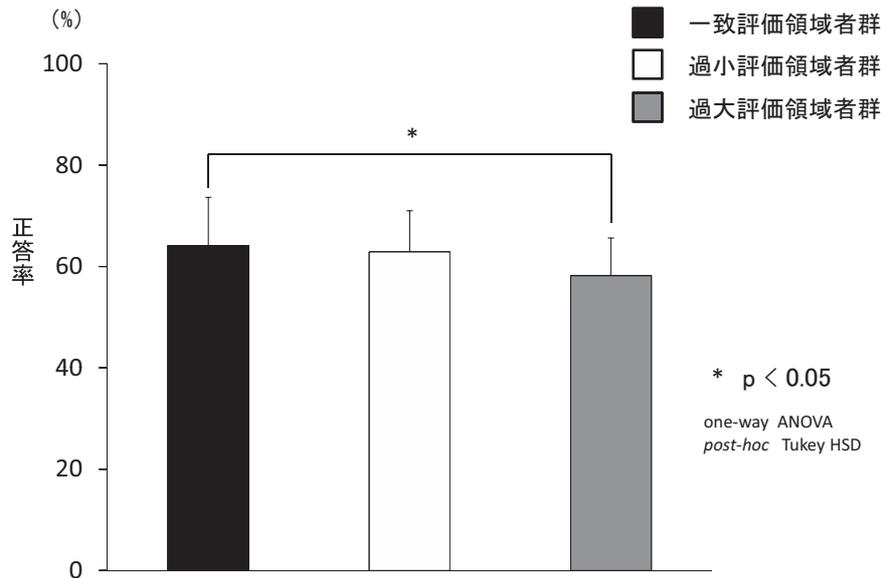


図6 CBT判定基準試験トライアルの成績

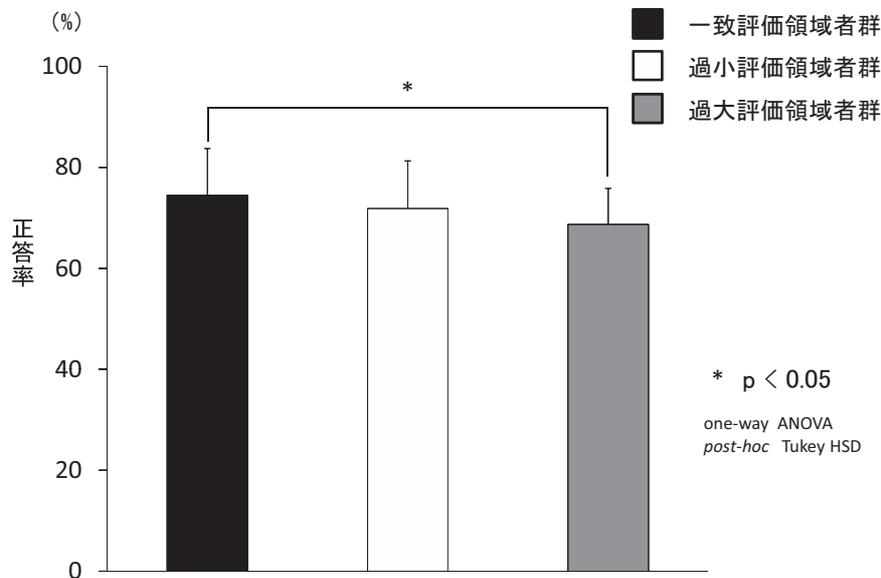


図7 CBTの成績

域者群では4.9%低い値を示した。

4. 各領域者群における各種試験成績の相関関係

各領域者群における各種試験成績の相関関係を分析した結果、過大評価領域者群はプレテストとポストテストとの間に相関が認められないだけでなく、プレテストもポストテストも総括的評価との相関は認めなかった(表2)。

過小評価領域者群では、ポストテストと総括的評価との間に有意な相関は認められなかった(表3)。一致評価領域者群は、ポストテストとCBTの成績との間に相関関係は認めなかったものの、それ以外の全項目間において有意な相関があることが認められた(表4)。

過大評価領域者群と過小評価領域者群と一致評価領域

表2 各種試験成績の相関関係 ～過大評価領域者～

	Pre-test	Post-test	CBT判定基準試験	CBT
Pre-test	-			
Post-test	.218	-		
CBT判定基準試験	.249	.222	-	
CBT	-.187	.126	.616**	-

*p<0.05 **p<0.01

者群の3群に共通して、CBT判定基準試験トライアルとCBTの成績との間に有意な相関関係が認められた。なかでも一致評価領域者群では非常に強い相関を認めた($r = 0.806$, $p < 0.01$)。

5. CBT判定基準試験とCBTにおける偏差値と各領域

表3 各種試験成績の相関関係 ～過小評価領域者～

	Pre-test	Post-test	CBT判定 基準試験	CBT
Pre-test	-			
Post-test	.410*	-		
CBT判定 基準試験	.589**	.311	-	
CBT	.313	.041	.712**	-

*p<0.05 **p<0.01

表4 各種試験成績の相関関係 ～一致評価領域者～

	Pre-test	Post-test	CBT判定 基準試験	CBT
Pre-test	-			
Post-test	.413**	-		
CBT判定 基準試験	.513**	.260*	-	
CBT	.515**	.251	.806**	-

*p<0.05 **p<0.01

者群の割合

CBT判定基準試験とCBTにおける過大評価領域者群と過小評価領域者群と一致評価領域者群の各学習者の偏差値を算出し、偏差値ごとに区分した結果を示す(表5)。各試験の偏差値が40以下になった学習者が、過大評価領域者群のみならず過小評価領域者群と一致評価領域者群にも存在していることが認められた。

考 察

多肢選択式テストを用いた形成的評価や総括的評価は、得点数を教育効果の判定として用いることが多い(石井ら, 2001; 砂川ら, 2002; 柳井ら, 2006; 麻生, 麻賀, 2007)。ところが、“当て推量”で回答する学習者が存在することから、必ずしも教育効果の指標として適

切であるとは限らない。我々は、全部床義歯補綴学基礎実習において、“当て推量”で回答する学習者の存在を抽出し、多肢選択式テストにおいて自己評価による確信度を導入することが形成的評価として有用性が高いことを報告している(川西ら, 2014)。今回、平成23年度に部分床義歯補綴学基礎実習を受講した学生に対し、自己評価による確信度を併用した多肢選択式テストを実施し、“当て推量”の学習者の存在を明らかにするとともに、統合評価法を用いて過大評価領域者群、過小評価領域者群、一致評価領域者群の3群に分け、形成的評価と総括的評価との関係について分析した。

全学習者のCBTの成績は全国平均と比較して0.8%低い値を示した。ところが、各自己評価領域者に分けて群間比較したところ、一致評価領域者群の成績は全国平均よりも高い値を示した。一方、過大評価領域者群の成績は全国平均および本学平均よりも低い値を示した。なお、CBT判定基準試験とCBTの成績との間には強い有意な相関が認められ、CBT判定基準試験の問題の質の担保および難易度の妥当性を確認できている。以下、各自己評価領域者群に分けて考察をする。

1) 一致評価領域者群について

一致評価領域者群の各種試験成績は、他の評価領域者群よりも成績が高くCBT全国平均点よりも高いことから自己評価判断能力が高く成績上位者の集団であることが窺える。ところが、各種試験成績の相関においてポストテストと総括的評価であるCBT判定基準試験とCBTの成績との相関の有無について着目したところ、ポストテストとCBT判定基準試験の成績との間には有意な弱い相関が認められたものの、CBTの成績との間には有意な差は認められなかった。そこで群内の学習者の偏差値を分析

表5 CBT判定基準試験とCBTにおける各領域者群の割合

	偏差値	一致評価領域者群	過小評価領域者群	過大評価領域者群
CBT判定 基準試験	21-30	2%	0%	0%
	31-40	12%	12%	26%
	41-50	31%	40%	53%
	51-60	38%	36%	16%
	61-70	7%	12%	5%
	71-80	10%	0%	0%
CBT	21-30	2%	8%	0%
	31-40	12%	8%	26%
	41-50	28%	44%	47%
	51-60	21%	28%	26%
	61-70	36%	12%	0%
	71-80	2%	0%	0%

したところ成績下位者が数名存在することが認められた。このことは、必ずしも一致評価領域者群の各個人の成績が高い値を示す訳ではないことを意味しており、本研究で用いた手法を使用する場合は、総括的評価における各個人成績から下位成績者を抽出しておく必要がある。柳井らは口腔外科学基礎実習にプレテストとポストテストを導入し、ポストテストの平均点と総括的評価である最終実習テストとの相関を調べており、ポストテストの平均点が高い学生ほど最終実習テストでも高い点数をとる傾向があるとしているが、両者間の相関係数が強い相関ではなかったと報告しており（柳井ら、2006）本研究の結果と類似している。

2) 過小評価領域者群について

過小評価領域者群のプレテストとポストテストの成績は、一致評価領域者群と近似しており、過大評価領域者群と比較して有意に高い値を示した。過小評価領域者群の各種試験成績の相関を調べた結果、プレテストとポストテストの成績との間に有意な相関が認められた。

過小評価領域者群の学習者は、プレテストとポストテストを受けた時点において、各設問に対する確信度の判断に迷いが生じていると考えられる。その理由として考えられるのが、CBT判定基準試験とCBTの成績との間には有意な相関が認められているにもかかわらず、CBTの成績とプレ・ポストテストの成績との間に相関が認められなかったことである。すなわち、過小評価領域者群は時間をかけて学習を積み重ねることによって、確信度に正確性を増していくため、一致評価領域に変動する可能性を備えていると考える。確信度の判断は、認知プロセスによるメタ認知判断によって行われるため、回答を導くまでの時間が短い場合（CM Kelley & DS Lindsay, 1993）や易しい課題ほど確信度が高くなる傾向にある（松尾、2005）。つまり確信度の判断は、課題の難易度に依存していることから、難易度が高い問題はリスク回避行動をとる傾向にある。そのため自己の回答に自信を持つことができない過小評価領域者の増加に注意が必要と考える。本研究で使用した設問の難易度は、正答率と識別指数を用いて評価しており、正答率25%以下かつ識別指数0.15以下の設問は除外したため、リスク回避行動が過小評価領域者の増減数に及ぼした影響は少なかったと考えられる。

3) 過大評価領域者群について

試験に確信度を付加することによる自己評価行動の変容を調査した報告によると、確信度の付加にかかわらず成績下位者は成績上位者よりも自己をより過大に評価しているとしている。また、成績下位者は適正な自己評価

能力に乏しく、学習内容や時間、姿勢が不十分とされている（有田ら、2013）。さらに長谷川らは、過大評価領域者は自己の実力より易しい設問に誤答している場合があることを指摘している（長谷川、2000）。本研究において、過大評価領域者群の全試験結果が一致評価領域者群と比較して成績が有意に低い値を示した。このことは、過大評価領域者群は他の自己評価領域者群と比較して留年経験のある者の割合が半数以上を占め、偏差値の低い学習者が多く存在することが原因と考えられる。

各領域者群における各種試験成績の相関関係において、過大評価領域者群が他の自己評価領域者群と比較して特徴的だった点を3つ挙げる。1点目は形成的評価のプレテストの成績とポストテストの成績との間に相関を認めなかったことである。これはプレテストとポストテストの問題内容が同様であったため、成績下位者が成績上位者の解答情報を収集し能動的な学習ではなく解答そのものを丸暗記する学習者が存在したことが原因と考えられる。一度出題されたことのある客観的試験問題のデメリットを示している。2点目は、形成的評価と総括的評価との間に相関を認めなかったことである。学習者は“当て推量”で回答している可能性は高いが、知識を修得する上での記憶との関連も影響していると考えられる。記憶とは、記録、保存、再生の行程の全てを達成して初めて得られるものである。講義や実習はあくまでも記録に過ぎず、その後の保存の過程において自己学習による復習に励まない限り、折角得た知識も忘却曲線を辿ることとなる。すなわち、同日に行われる小テストのうち、ポストテストに関しては短期的な記憶さえあれば十分に対応できるが、CBT判定基準試験やCBTなど長期記憶を必要とする試験では通用しない。保存と再生は学習者が能動的に行う過程であり（渡部ら、2015）、保存能力を養うためには教員からの支援だけではなく学生自身の努力が重要と考える。成績下位者ではこの保存能力を保つ努力が不足していると考えられ、反復学習をより強化するための学習方法を教育指導する必要がある。とくに本研究のような多肢選択テストを用いた評価の際は、“当て推量”で回答している学習者の存在が認められるため、過大評価領域者群は自己評価領域者群の中でとくに注意を払う必要がある。3点目はCBT判定基準試験とCBTの成績との相関は認めてはいるものの、他の自己評価領域者群と比較して相関係数が低い値を示したことである。このことは過大評価領域者群の成績が安定していないことを裏付けるデータであり、複数の総括的評価が実施された場合において、1回目の総括的評価の成績が良好であったとしても、2回目以降の異なる総括的評価

において好成績を得ることができないと考えられる。

4) 学習評価について

本研究に用いた学習評価は統合評価法である。統合評価法とは通常理解度テストにおいて、学習者の自己評価で得られる自信度データを同時に収集して、これを客観評価である正誤データと統合して有用な情報を取り出す評価手法である。織田らによると、この結果から作成された自己評価図を用いて、学習者と教育者にフィードバックすることで、教育者側の問題点の抽出や学習者側の自己評価の改善に役立つとされている(織田, 下村, 1989)。本研究では部分床義歯補綴学基礎実習時に教員と学習者とが対話を介して小テストに関連するフィードバックを行っており、教育環境は適切であると考えられる。越智はDynamic Assessmentの概念をもとに、学習者との対話を介した指導がフィードバックとして有効であることを報告している(越智, 2013)。また、形成的評価に用いた多肢選択式テストは、CBTのマーク試験の練習問題としても活用できることから、ヒューマンエラーによるマークミスの発生率を軽減できる役目も担っている。さらに試験開始時に小テストを導入しているため、学習者の緊張を促し学習意欲を高めるきっかけになっているとも考えられる。

本研究において実施した多肢選択式テストを用いた形成的評価から、“当て推量”によって回答している学習者が、いずれの自己評価領域者群にも存在しており、さらに自己評価能力に乏しい学習者が存在することも判明した。自己評価能力は自己の学習状況を客観的に評価する上で重要であり、問題解決能力と自己評価能力に確信性を増していくことで、学習者の成績は向上すると考えられる。とくに、過大評価領域者群のように、自己評価能力に乏しく成績も下位にある学習者を形成的評価の時点で早期に抽出することは教育指導をする上でも意義は高いが、総括的評価までに一致評価領域にどの程度まで移行させることができるかが重要な課題である。

結 論

部分床義歯補綴学基礎実習の小テストに導入した統合評価法を応用した形成的評価方法は、各自己評価領域に区分することができ、各々の特徴から各学習者の問題点を抽出できることから、総括的評価までの学習支援に活用できる有効な手段であると考えられる。

利益相反

本研究において開示すべき利益相反関係はない。

文 献

- 安陪 晋, 河野文昭, 河相安彦, 池田和博, 北川昇, 西 恭宏, 野村修一, 古谷野潔. 平成24年度日本補綴歯科学会主催 部分床義歯学臨床基礎実習改善ワークショップ報告. 補綴誌 5 (2): 149-155, 2013.
- 赤根 敦, 伊藤 圭, 林 篤裕, 椎名久美子, 大澤公一, 柳井晴夫, 田栗正章. 識別指数による総合試験問題の項目分析. 大学入試センター研究紀要 35: 19-47, 2006.
- 有田和恵, 有田 彰, 森田孝夫, 別所正美, 大野良三. 学生の自己評価行動に与える確信度の影響. 医学教育 44 (3): 113-119, 2013.
- 麻生智子, 麻賀多美代. 歯科診療補助実習における教育方法の検討ープレテスト・ポストテストの導入ー. 千葉県立衛生短期大学紀要 26 (2): 137-141, 2007.
- CM Kelley & DS Lindsay: Remembering mistaken as knowing: Ease of generation as a basis for confidence in answers to general knowledge questions. Journal of Memory and Language 32(1): 1-24, 1993.
- 張 一平. 確信度テスト法と項目反応理論ー新たなモデルと実践的応用ー東京: 東京大学出版会; 1-24, 2007.
- 長谷川勝久. 自己評価力を高めるための学習理解度診断個票とその効果. 日本教育工学雑誌 24: 177-182, 2000.
- 池袋賢一, 森田倫子, 三井利夫, 草刈 潤, 坂内四郎, 久保武士, 田中直見. X形式問題導入による成績評価の検討. 医学教育 29: 209-213, 1998.
- 石井拓男, 岡田真人, 大川由一, 高橋義一, 村居正雄, 宮武光吉. 歯学部学生への講義におけるSBOsの設定と形成的評価の試み. 日歯教誌 17 (1): 56-59, 2001.
- 河相安彦, 宗 邦雄, 木本 統, 小林喜平. 総義歯実習支援Web-based e-learningと技能および知識領域の理解度に関する自己評価との関連. 日歯教誌 22 (1): 3-8, 2006.
- 川西克弥, 河野 舞, 會田英紀, 佐々木みづほ, 小池智子, 中村健二郎, 菅 悠希, 豊下祥史, 池田和博, 松原国男, 伊東由紀夫, 越野 寿. 全部床義歯補綴学基礎実習時の多肢選択式テストに自己評価による確信度を応用した形成的評価. 北医療大歯誌 33 (1): 9-17, 2014.

松実珠千, 越野 寿, 平井敏博, 横山雄一, 牧浦哲司, 田中慎介, 田中真樹, 須藤恵美, 川西克弥, 佐藤絹江, 伊東由紀夫. 全部床義歯補綴学基礎実習への新たな試み－第3報 咬合採得と水平的顎間関係記録－. 補綴誌 51:383, 2007.

松尾太加志. 課題の難易度情報がリスク回避行動に及ぼす効果. ヒューマンインターフェース学会誌 1:371-374, 2005.

村上 格, 西 恭宏, 丸山浩美, 小野原昌弘, 鎌下祐次, 長岡英一. 全部床義歯補綴学の基礎実習におけるシミュレーション実習と講義との連携についてのアンケート調査. 日歯教誌 24(3):292-299, 2008.

越智健太郎. Group Dynamic Assessment—高校の授業における適切なフィードバック—. ARCLE REVIEW 7:34-43, 2013.

織田守矢, 下村 勉. 概念形成と評価. 東京:コロナ社:126-136, 1989.

宗 邦雄, 河相安彦, 木本 統, 矢崎貴啓, 小林喜平. 総義歯実習支援Web-based e-learningの改善前後における受講学生による自己および質的評価の検討. 日歯教歯 23:17-23, 2007.

砂川光宏. 本学歯学部附属歯科衛生士学校における歯科保存学(歯内治療学)の授業へのプレテスト・ポストテストの導入とその教育効果. 日歯教誌 18(1):106-110, 2002.

鈴木丈一郎, 長野孝俊, 金指幹元, 湯浅茂平, 柳澤隆, 五味一博, 新井 高. マルチメディアを活用した歯周治療学基礎実習から抽出された問題点. 日歯教誌 22(1):90-95, 2006.

豊下祥史, 佐藤絹江, 越野 寿, 額 論史, 會田英紀, 平井敏博. 全部床義歯補綴学基礎実習での仮想咬合平面の設定時に使用するために試作した指導・評価用ジグの効果. 日歯教誌 25(1):64-70, 2009.

豊下祥史, 佐藤絹江, 越野 寿, 田中真樹, 會田英

紀, 須藤恵美, 岩崎一生, 額 論史, 會田康史, 平井敏博. 患者を「診る」ための全部床義歯補綴学基礎実習の試み. 補綴誌 2(1):1-9, 2010.

牛場大蔵, 畑尾正彦, 堀 原一, 山下文雄, 石井哲夫, 植村研一, 岡島道夫, 尾島昭次, 酒井 紀, 高久史磨, 田中 勸, 真島英信. 試験の合格水準の理論と実際. 医学教育 16(3):175-182, 1985.

柳井智恵, 熊澤康雄, 山田 幸, 吉田和正, 足立雅利. 口腔外科学基礎実習へのプレテストとポストテストの導入. 日歯教誌 22(2):145-149, 2006.

渡部俊彦, 伊藤邦郎, 川村俊介, 佐藤厚子, 八百板康範, 諸根美恵子, 奥山祐子, 町田浩一, 米澤章彦. 学生の知識修得状況の調査と解析. 東北薬大研誌 62:61-68, 2015.



川西 克弥

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

平成17年3月 北海道医療大学歯学部卒業

平成18年3月 北海道医療大学歯科内科クリニック歯科医師臨床研修科修了

平成18年4月 北海道医療大学歯学部任期制助手(歯科補綴学第一講座)

平成22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22年4月 北海道医療大学歯学部助教(口腔機能修復・再建学系咬合再建補綴学分野)

平成25年7月 同講師(口腔機能修復・再建学系咬合再建補綴学分野)

現在に至る

[Mini Review]

Epithelium-derived antimicrobial peptide RNase 7 in oral health and disease : A mini-review

Puja NEOPANE¹, Koki YOSHIDA¹, Bhoj Raj ADHIKARI¹, Fumiya HARADA¹, Durga PAUDEL¹, Tetsuro MORIKAWA¹, Aya ONISHI¹, Daichi HIRAKI¹, Jun SATO¹, Michiko NISHIMURA¹, Yoshihiro ABIKO¹

¹Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : RNase 7, antimicrobial peptide

Abstract

The oral epithelium is normally protected from various stimuli within the diverse environment of the oral cavity. This review focuses on RNase 7, a potent epithelium-derived antimicrobial peptide, and discusses its importance in oral health and disease. RNase 7 exhibits high antimicrobial activity against a broad spectrum of microorganisms. The expression of RNase 7 in the oral epithelium is induced by stimulation with oral bacterial

biofilms and several cytokines. Studies have identified numerous beneficial effects of this peptide, such as the prevention of bacterial infections and its use as a potential therapeutic agent. However, there is little information on the alternative expression and roles of RNase 7 in oral inflammatory disease and cancer, which merits further investigations.

Introduction

Antimicrobial peptides (AMPs) are small, positively charged, amphipathic structures possessing both hydrophobic and hydrophilic regions of variable amino acid composition (length < 100 amino acids) (Brogden, 2005). They are also known as host defense peptides because of their essential role in the innate immunity system. AMPs exhibit broad-spectrum antimicrobial activities against various microorganisms, including Gram-positive and Gram-negative bacteria, fungi and viruses (Hancock & Diamond, 2000). Several AMPs are known to be effective against multi-drug resistant bacteria, and possesses a low propensity for resistance development (van t Hof W et al., 2001). Among the 112 host defense peptides identified in humans, the cathelicidins, defensins and ribonuclease families are the most prominent (Wang et al., 2009). RNase A superfamily is one of the best-characterized ribonucleases and consists of 13 subtypes (Becknell et al., 2015). Among them, RNase 7 is most abundantly found in the skin and expressed in various epithelial tissues such as the genitourinary, respiratory, and gastrointestinal tissues (Amatngalim et al., 2015 ; Eberhard J et

al., 2008 ; Harder & Schroder, 2002 ; Spencer et al., 2011). RNase 7 expression has been reported in the oral epithelium, and it is suggested to be involved in host defense in the oral cavity (Eberhard et al., 2008). Although certain types of host defense peptides including cathelicidins, defensins and ribonucleases may contribute to causing several diseases, there is little information about the involvement of RNase 7 in oral epithelial diseases. Therefore, this mini-review mainly focuses on the roles of RNase 7 in epithelial health and disease with emphasis on its involvement in oral epithelial diseases.

Overview of RNase 7

All 13 RNase subtypes are encoded in a single gene cluster in chromosome 14. RNases 1–8 are called as canonical RNases (true RNases), while the remaining five (RNase 9–13) are known as non-canonical RNases (Boix & Nogues, 2007 ; Cho et al., 2005 ; Sorrentino, 2010), which lack the catalytic triad and may therefore be incapable of catalyzing RNA degradation. Besides their ribonucleolytic activity, canonical RNases have been shown to play roles in angiogenesis, neurotoxicity, immunomodulation, and host defense

(Boix & Nogue, 2007 ; Goo & Cho, 2013 ; Simanski et al., 2012 ; Rosenberg, 2008). RNase 7 is a canonical RNases found most abundantly in the skin (Harder & Schroder, 2002), where the keratinocytes are the major source of RNase 7 and the RNase inhibitor (RI). Structurally, RNase 7 is composed of three α -helices and two triple-stranded anti-parallel β -sheets (Harder & Schroder, 2002 ; Huang et al., 2007). The lysine residue from flexible N and C terminal cationic cluster has a key role in antimicrobial activities ; RNase 7 has the special capacity to permeate and disrupt the bacterial membrane independent of its RNase activity, thus differentiating it from the other RNases (Huang et al., 2007). Instead of interacting with internal microbial targets, RNase 7 forms a complex with the surface proteins on some bacteria (Torrent et al., 2010).

Role of RNase 7 in host defense of oral cavity

The oral epithelium is constantly exposed to various microorganisms, including commensals and pathogens present in the diverse environment of the oral cavity (Presland & Dale, 2000). A healthy oral status is maintained by the innate immune system, which augments physical and chemical barriers in the oral epithelium (Dale, 2002 ; Ganz, 2004 ; Eberhard et al., 2008 ; Rakoff-Nahoum et al., 2004). The rigid intercellular connections between the epithelial cells act as a physical barrier, while AMPs produced by the epithelial cells function as a chemical barrier against pathogenic organisms (Abiko Y et al., 2007 ; Chung et al., 2007). AMPs often play a significant role in adaptive immunity by recruiting adaptive immune cells (Abiko Y et al., 2007). As shown in Figure 1, the RNase 7 peptide is mainly localized in the keratinized layers of normal skin and oral epithelium (Scola et al., 2012 ; Rademacher et al., 2016). The expression of RNase 7 is inhibited when it forms a complex with RI in the basal and lower spinous layers. Furthermore, RNase 7 activity is unveiled following the degradation of RI by serine proteases in the stratum corneum, thereby exerting its antimicrobial effects during the process of keratinocyte differentiation (Fig.2) (Abtin et al., 2009). The expression of RNase 7 can be further enhanced by incubation with TNF α , IL-1 β or interferon γ (IFN γ), or by subjection to microbial challenge with *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, and *Trichophyton rubrum* (Harder & Schroder, 2002). RNase 7 expression has also been induced by bacte-

rial biofilms and protozoa in gingival and corneal epithelial cells, respectively (Eberhard et al., 2008 ; Otri et al., 2010). RNase 7 activity is more pronounced in early formed biofilms than in matured biofilm (Eberhard et al., 2008), and the induction of this peptide depends on the types of bacterial species present in the biofilm (Eberhard et al., 2009).

RNase 7 in oral inflammatory diseases

There is very little information about the involvement of RNase 7 in oral inflammatory diseases, thus far. Several types of microbes are known to induce the expression of this peptide (Harder & Schroder, 2002 ; Rademacher et al., 2016) ; alternatively, upregulated RNase 7 expression has been observed in other inflammatory diseases without microbial infection. In psoriasis (chronic inflammatory skin disease), RNase 7 was found to be expressed in the psoriatic scales, thus contributing to the low rates of infection. (Harder & Schroder, 2005 ; Rademacher et al., 2016). The increased expression of RNase 7 is induced by its immunoregulatory effects on activated T cells and on cytokines such as TNF- α , and IFN- γ (Kopfnagel et al., 2017). Atopic dermatitis also presented with increased levels of RNase 7 expression, which may have been induced by the disturbed skin barrier (Harder et al., 2010).

Expression of T cell cytokines including TNF- α and IFN- γ plays a role in the pathogenesis of oral lichen planus ;

Normal oral epithelium

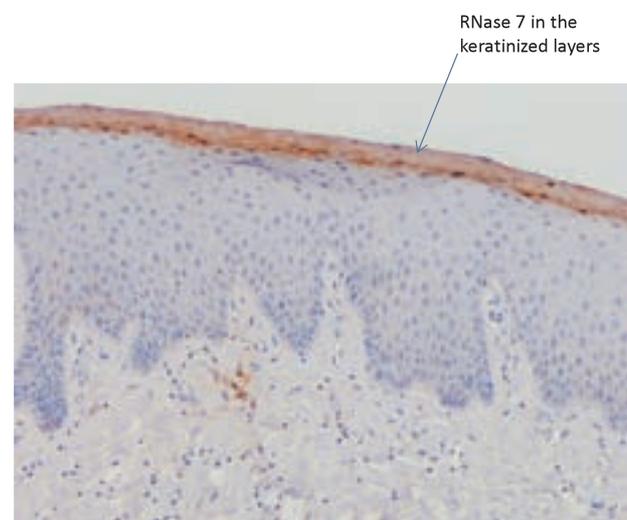


Figure 1. Normal oral epithelium
Immunohistochemical staining showing positive staining of RNase 7 in the keratinized layers of the normal oral epithelium.

Healthy oral epithelium

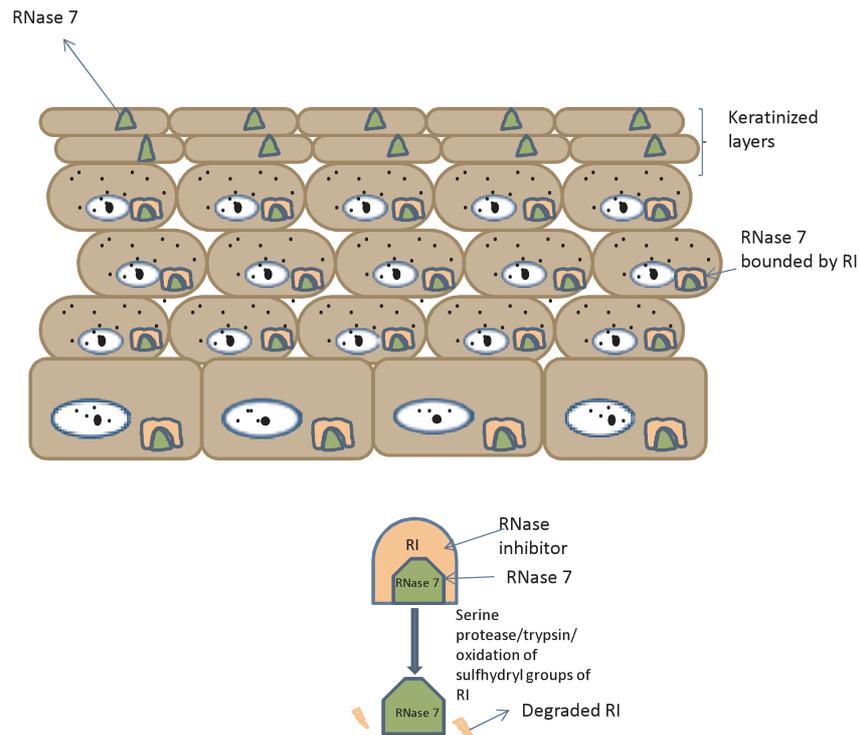


Figure 2. Healthy oral epithelium

RNase 7 is constitutively expressed in the keratinized layer but inhibited by the horseshoe-shaped RNase inhibitor (RI) in other keratinocytes in healthy oral epithelium. RNase 7 is released after degradation of the RNase inhibitor (RI). RI is degraded by protease and by the oxidation of its sulfhydryl groups, thus enabling RNase 7 activity.

moreover, disturbed skin barriers due to T cell infiltration are often observed in this condition (Nogueira et al., 2015). Further studies investigating the significance of increased RNase 7 expression levels in the pathogenesis of oral lichen planus are warranted.

Role of RNase 7 in tumors

Certain types of AMPs demonstrate anticancer activities, whereas others may exhibit oncogenic activities (Mader & Hoskin, 2006 ; Gasper et al., 2013) such as the disruption of the cell membrane. The cancer cell membrane typically carries a net negative charge, which has an affinity towards cationic AMP (Cruciani et al., 1991). AMPs kill cancer cells due to differences in cell membrane composition, cell surface area, and fluidity when compared with the normal cells (Leuschner & Hansel, 2004 ; Hoskin & Ramamoorthy, 2008). Thus, they may be clinically applied as potent anticancer agents that kill the cancer cells and prevent metastasis without causing damage to normal cells and tissues (Papo & Shai, 2005). The expression level of RNase 7 in

cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) has been found to decrease with the malignant transformation indicating its role as a tumor suppressor gene (Scola et al., 2012). On the other hand, some AMPs have been found in progressing tumors, and may be suitable for use as a tumor marker. In head and neck cancer, the gene expression level of RNase 7 was higher in SCC than in normal tissues (Muehleisen et al., 2012). Furthermore, the expression level of peptide was higher in SCC than in basal cell carcinoma, which presented with lower malignant potential in the skin (Muehleisen et al., 2012). These reports imply that RNase 7 may function as an oncogene. The phenotype of the tumor cells varies among the different types and sites of tumors. The expression levels and functions of RNase 7 may depend on the location and types of the tumor. Therefore, further studies are needed to better understand the mechanisms underlying the variations in RNase 7 expression in different types of carcinoma. Studies in the oral cavity, which is largely polluted by several microbes, can provide more about inflammatory diseases and their association with carcinoma. Knowledge

about the details of the expression patterns and functions of RNase 7 in oral carcinoma may prove useful for the development of cancer-targeted immune therapy.

Future aspects of RNase 7

RNase 7 is produced by the oral epithelium, and is known to possess broad-spectrum antimicrobial activities against oral pathogenic microbes. Studies undertaken in the area of oral health have identified numerous beneficial effects of this peptide, such as prevention of bacterial infections and development of potential therapeutic agents ; however, there is not enough evidence about its effect in oral diseases including inflammatory diseases and tumors. Other types of epithelial antimicrobial peptides such as beta-defensins are directly involved in cancer prevention and in causing allergy as well as autoimmune diseases (Prado-Montes de Oca E, 2010). Nevertheless, owing to limited information regarding the involvement of RNase 7 in oral diseases, further investigations clarifying its role are needed (Fig 3).

References

Abiko Y & Saitoh M. Salivary defensins and their importance in oral health and disease. *Curr Pharm Des* 13(30) : 3065–3072, 2007. Review.

Abiko Y, Saitoh M, Nishimura M, Yamazaki M, et al. Role of beta-defensins in oral epithelial health and disease. *Med Mol Morphol* 40 (4) : 179–184, 2007. Review.

Abtin A, Eckhart L, Mildner M, Ghannadan M, et al. Degradation by stratum corneum proteases prevents endogenous RNase inhibitor from blocking antimicrobial activities of RNase 5 and RNase 7. *J Invest Dermatol* 129 : 2193–2201, 2009.

Amatngalim GD, Broekman W, Daniel NM, van der Vlugt LE, et al. Cigarette smoke impairs basal cell mediated epithelial wound repair and induces expression of the antimicrobial protein RNase 7 via oxidative stress. *Eur Respiratory Soc* 46 : PA5047, 2015.

Bechara FG, Sand M, Skrygan M, Kreuter A, et al. Acne inversa : evaluating antimicrobial peptides and proteins. *Ann Dermatol* 24 : 393–397, 2012.

Becknell B, Schwaderer A, Hains DS, Spencer JD. Amplifying renal immunity : The role of antimicrobial peptides in pyelonephritis. *Nat Rev Nephrol* 11 : 642–655, 2015.

Boix E & Nogues MV. Mammalian antimicrobial proteins and peptides : overview on the RNase a superfamily members involved in innate host defence. *Mol Biosyst* 3 : 317–335, 2007.

Brasch J, Morig A, Neumann B, Proksch E. Expression of

Overall expression of RNase 7 in oral epithelium

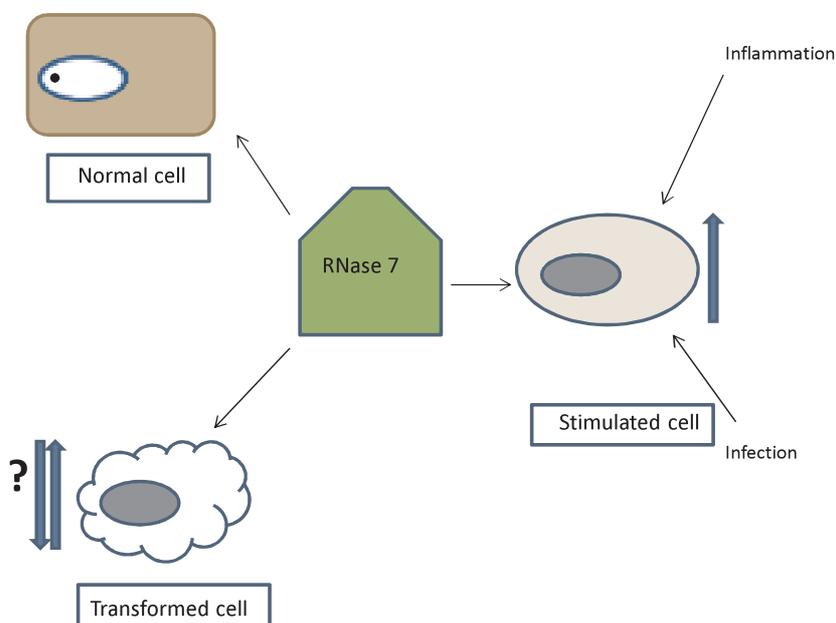


Figure 3. Overall expression of RNase 7 in the oral epithelium

Expression of RNase 7 is constitutive in normal epithelial cells, upregulated during inflammation and infection, and either upregulated or downregulated in tumors.

- antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in tinea and pityriasis versicolor. *Mycoses* 57 : 147–152, 2014.
- Brogden KA. Antimicrobial peptides : pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol* 3 : 238–250, 2005.
- Carrozzo M, Ubaldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, et al. Tumor necrosis factor- α and interferon- γ polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol* 122(1) : 87–94, 2004.
- Cho S, Beintema JJ, Zhang J. The ribonuclease a superfamily of mammals and birds : identifying new members and tracing evolutionary histories. *Genomics* 85 : 208–220, 2005.
- Chung WO, Dommisch H, Yin L, Dale BA. Expression of defensins in gingiva and their role in periodontal health and disease. *Curr Pharm Des* 13 : 3073–3083, 2007.
- Cruciani RA, Barker JL, Zasloff M, Chen HC, et al. Antibiotic magainins exert cytolytic activity against transformed cell lines through channel formation. *Proc Natl Acad Sci* 88 : 3792–3796, 1991.
- Dale BA. Periodontal epithelium : a newly recognized role in health and disease. *Periodontol* 2000 30 : 70–78, 2002.
- Eberhard J, Menzel N, Dommisch H, Winter J, et al. The stage of native biofilm formation determines the gene expression of human β -defensin-2, psoriasin, ribonuclease 7 and inflammatory mediators : a novel approach for stimulation of keratinocytes with in situ formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 23 : 21–28, 2008.
- Eberhard J, Pietschmann R, Falk W, Jepsen S, et al. The immune response of oral epithelial cells induced by single-species and complex naturally formed biofilms. *Oral Microbiol Immunol* 24 : 325–330, 2009.
- Firat YH, Simanski M, Rademacher F, Schroder L, et al. Infection of keratinocytes with *Trichophyton rubrum* induces epidermal growth factor-dependent RNase 7 and human beta-defensin-3 expression. *PloS one* 9 : e93941, 2014.
- Gambichler T, Skrygan M, Tigges C, Kobus S, et al. Significant upregulation of antimicrobial peptides and proteins in lichen sclerosus. *Br J Dermatol* 161 : 1136–1142, 2009.
- Ganz T. Defensins : antimicrobial peptides of vertebrates. *C R Biol* 327 : 539–549, 2004.
- Gaspar D, Veiga AS, Castanho MA. From antimicrobial to anticancer peptides. A review. *Front Microbiol* 4 : 294, 2013.
- Goo SM & Cho S. The expansion and functional diversification of the mammalian ribonuclease a superfamily epitomizes the efficiency of multigene families at generating biological novelty. *Genome Biol Evol* 5 : 2124–2140, 2013.
- Hancock RE & Diamond G. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol* 8 : 402–410, 2000.
- Hancock RE & Sahl HG. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* 24 : 1551–1557, 2006.
- Harder J, Dressel S, Wittersheim M, Cordes J, et al. Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *J Invest Dermatol* 130 : 1355–1364, 2010.
- Harder J & Schroder JM. RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem* 277 : 46779–46784, 2002.
- Harder J & Schroder JM. Psoriatic scales : a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol* 77 : 476–486, 2005.
- Hoskin DW & Ramamoorthy A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta* 1778 : 357–375, 2008.
- Huang YC, Lin YM, Chang TW, Wu SJ, et al. The flexible and clustered lysine residues of human ribonuclease 7 are critical for membrane permeability and antimicrobial activity. *J Biol Chem* 282 : 4626–4633, 2007.
- Kopfnagel V, Wagenknecht S, Brand L, Zeitvogel J, Harder J, Hofmann K, et al. RNase 7 downregulates TH2 cytokine production by activated human T cells. *Allergy*. 2017. doi : 10.1111/all.13173. [Epub ahead of print]
- Laudien M, Dressel S, Harder J, Glaser R, et al. Differential expression pattern of antimicrobial peptides in nasal mucosa and secretion. *Rhinology* 49 : 107–111, 2011.
- Leuschner C & Hansel W. Membrane disrupting lytic peptides for cancer treatments. *Curr Pharm Des* 10 : 2299–2310, 2004.
- Mader JS & Hoskin DW. Cationic antimicrobial peptides as novel cytotoxic agents for cancer treatment. *Expert Opin Investig Drugs* 15 : 933–946, 2006.
- Mohammed I, Yeung A, Hopkinson A, Dua HS. Signalling pathways involved in ribonuclease-7 expression. *Cell Mol*

- Life Sci 68 : 1941–1952, 2011.
- Muehleisen B, Jiang SB, Gladsjo JA, Gerber M, et al. Distinct innate immune gene expression profiles in non-melanoma skin cancer of immunocompetent and immunosuppressed patients. *PloS one* 7 : e40754, 2012.
- Nogueira PA, Carneiro S, Ramos-e-Silva M. Oral lichen planus : an update on its pathogenesis. *Int J Dermatol* 54 (9) : 1005–1010, 2015. Review.
- Otri AM, Mohammed I, Abedin A, Cao Z, et al. Antimicrobial peptides expression by ocular surface cells in response to *Acanthamoeba castellanii* : an in vitro study. *Br J Ophthalmol* 94(11) : 1523–1527, 2010.
- Papo N & Shai Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci* 62 : 784–790, 2005.
- Prado-Montes de Oca E. Human beta-defensin 1 : a restless warrior against allergies, infections and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 42(6) : 800–804, 2010. Review.
- Presland RB & Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity : function in health and disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 11(4) : 383–408, 2000. Review.
- Rademacher F, Simanski M, Harder J. RNase 7 in Cutaneous Defense. *Int J Mol Sci* 17(4) : 560, 2016.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, et al. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 118 : 229–241, 2004.
- Rosenberg HF. RNase A ribonucleases and host defense : an evolving story. *J Leukoc Biol* 83 : 1079–1087, 2008.
- Scola N, Gambichler T, Saklaoui H, Bechara FG et al. The expression of antimicrobial peptides is significantly altered in cutaneous squamous cell carcinoma and precursor lesions. *Br J Dermatol* 167 : 591–597, 2012.
- Simanski M, Koeten B, Schroder JM, Glaser R et al. Antimicrobial RNases in cutaneous defense. *J Innate Immun* 4 : 241–247, 2012.
- Simanski M, Rademacher F, Schroder L, Schumacher HM, et al. IL-17A and IFN- γ synergistically induce RNase 7 expression via STAT3 in primary keratinocytes. *PloS one* 8 : e59531, 2013.
- Sorrentino S. The eight human “canonical” ribonucleases : Molecular diversity, catalytic properties, and special biological actions of the enzyme proteins. *FEBS Lett* 584 : 2194–2200, 2010.
- Spencer JD, Schwaderer AL, Dirosario JD, McHugh KM et al. Ribonuclease 7 is a potent antimicrobial peptide within the human urinary tract. *Kidney Int* 80 : 174–180, 2011.
- Spencer JD, Schwaderer AL, Eichler T, Wang H, et al. An endogenous ribonuclease inhibitor regulates the antimicrobial activity of ribonuclease 7 in the human urinary tract. *Kidney Int* 85 : 1179–1191, 2014.
- Steven FS, Williams LA, Maier H, Arndt J, et al. The status of trypsin-like enzymes in squamous-cell carcinoma of the head and neck region. *J Cancer Res Clin Oncol* 116 : 57–64, 1990.
- Surasombattana P, Hamel R, Patramool S, Luplertlop N et al. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *Infect Genet Evol* 11 : 1664–1673, 2011.
- Torrent M, Badia M, Moussaoui M, Sanchez D, et al. Comparison of human RNase 3 and RNase 7 bactericidal action at the Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall. *FEBS J* 277 : 1713–1725, 2010.
- van t Hof W, Veerman EC, Helmerhorst EJ, Amerongen AV et al. Antimicrobial peptides : properties and applicability. *Biol Chem* 382 : 597–619, 2001.
- Wang G, Li X, Wang Z. APD2 : the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* 37(database issue), D933–D937, 2009.
- Wanke I, Steffen H, Christ C, Krismer B, et al. Skin commensals amplify the innate immune response to pathogens by activation of distinct signaling pathways. *J Investig Dermatol* 131 : 382–390, 2011.
- Yeaman MR & Yount NY. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol Rev* 55 : 27–55, 2003.



Puja NEOPANE

Education :

2005 : Graduated from Rajiv Gandhi University of Health Sciences, Bangalore, India (Bachelor of Medical Laboratory Technology)

2015 : Post graduation from Tribhuvan University, Nepal (MSc. Clinical Microbiology)

2016 : Graduate student in Division of Oral medicine and Pathology, Health Sciences University of Hokkaido, Japan. (running)

Professional Experiences :

2006 to 2012 : Senior medical laboratory technologist, Medicare National Hospital and Research Centre Ltd, Kathmandu, Nepal.

2015 : Teaching assistant for medical student, Chitwan Medical College and Teaching Hospital, Nepal.

〔実験プロトコール〕

次世代シーケンサーによる16S rRNA口腔細菌叢解析の概要

植原 治^{1,2)}, 高井 理衣³⁾, 原田 文也⁴⁾, 大西 綾⁴⁾, 虎谷 斉子^{1,5)}, 平木 大地⁴⁾, 森川 哲郎⁴⁾, 倉重 圭史⁶⁾,
梶 美奈子⁵⁾, 北市 伸義⁷⁾, 齊藤 正人⁶⁾, 安彦 善裕⁴⁾, 千葉 逸朗¹⁾

- 1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野
- 2) 北海道医療大学がん予防研究所
- 3) 北海道医療大学健康科学研究所
- 4) 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
- 5) 北海道医療大学病院歯科衛生部
- 6) 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
- 7) 北海道医療大学予防医療科学センター医学部門眼科学系

Analysis of 16S rRNA oral bacterial flora using next-generation sequencer: A tutorial paper

Osamu UEHARA^{1,2)}, Rie TAKAI³⁾, Fumiya HARADA⁴⁾, Aya ONISHI⁴⁾, Seiko TORAYA^{1,5)}, Daichi HIRAKI⁴⁾,
Tetsuro MORIKAWA⁴⁾, Yoshihito KURASHIGE⁶⁾, Minako KAJI⁵⁾, Nobuyoshi KITAICHI⁷⁾, Masato SAITOH⁶⁾,
Yoshihiro ABIKO⁴⁾, Itsuo CHIBA¹⁾

- 1) Division of Disease Control and Molecular Epidemiology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
- 2) Research Institute of Cancer Prevention, Health Sciences University of Hokkaido
- 3) Research Institute of Health Sciences, Health Sciences University of Hokkaido
- 4) Division of Oral Medicine and Pathology, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
- 5) Department of Dental Hygiene, Health Sciences University of Hokkaido Hospital
- 6) Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido
- 7) Department of Ophthalmology, Institute of Preventive Medical Science, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Oral bacterial flora, 16S rRNA, Next-Generation Sequencing (NGS)

Abstract

Traditionally, oral bacteria have been identified mainly in laboratory cultures. However, numerous difficult-to-cultivate bacteria are required with these methods, and the associated long culture time is a disadvantage. In addition, a limited number of bacteria can be targeted using the polymerase chain reaction (PCR) method, and since only the anticipated bacterial species is detected, the analysis is limited. In contrast to the conventional Sanger sequence method, the next-generation sequence (NGS) enables whole genome se-

quencing without cloning in *Escherichia coli* or host cells. Therefore, analysis using NGS is a novel approach to directly elucidating bacterial species using bioinformatics, which directly determines the genomic base sequence of the oral flora without culturing.

In this tutorial paper, we introduce a DNA preparation method for oral bacteria and the workflow of 16S rRNA bacterial flora analysis using a next-generation sequencer, MiSeq.

はじめに

従来、口腔細菌は、実験室での嫌気グローブボックスなどを用いた主に培養を要する手法により同定されてき

た。しかし、これらの方法では、培養が困難な細菌が多く、培養に長時間かかることも欠点であった。また、PCR法ではターゲットにできる細菌数が限られており、既知の菌種のみが検出されるため解析に限界があった。

一方、次世代シーケンス (NGS) は、従来行われてきたサンガーシーケンスと比較して、プラスミドなどのベクターにクローニングすることなく全ゲノムの配列を決定することができる。NGSを用いた解析は、培養を行わないで口腔細菌叢のゲノム塩基配列を直接決定し、バイオインフォマティクスによりその細菌種を明らかにする新たなアプローチである。

口腔細菌叢の構成を解析する方法として、細菌の必須遺伝子である16SリボソームRNA (16S rRNA) 遺伝子を指標とした16S rRNA細菌叢解析がある。これにより、従来は解析困難であった難培養性細菌が大部分を占める口腔細菌叢を包括的に解析することが可能になった。最近のNGSを用いた16S rRNA細菌叢解析の報告では、歯周炎やう蝕に関連する局所的な口腔細菌叢の構成が、以前の培養法やPCR法を用いた報告よりもはるかに複雑であることが示されてきている (Costalonga M & Herzberg, 2014; Sato Y et al., 2015)。

本解説では、口腔細菌のDNA調製法、本学に導入された次世代シーケンサーMiSeq (Illumina, 図1) を用いた16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフローを紹介する。

1. 16S rRNAとは

rRNAとは、リボソームを構成するRNAである。細菌では、5S rRNA、16S rRNAおよび23S rRNAに分類されている。それらをコードするのがrRNA遺伝子 (rDNA) である。rRNAは全生物に存在し (ウイルス除く)、タンパク質合成に関わる。16S rRNAは点変異の蓄積という観点から進化速度が遅く、種のレベルにおいて高い相同性を示すことが知られている (Palys T et al., 1997)。

Small subunit rRNA (原核生物では16S rRNA、真核生物では18S rRNA) 遺伝子配列を用いた全生物の系統分



図1 本学に導入された次世代シーケンサーMiSeq

類法が提案され、細菌の系統分類には、1,542塩基長の16S rDNA配列が用いられている (Woese CR et al., 1990)。現在では200万配列以上の16S rDNA配列が決定され、GreenGene ([http://http://greengenes.lbl.gov](http://greengenes.lbl.gov)), DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>), GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) およびEMBL (<http://www.embl.org>) などの公共データベースに登録されている。

16S rRNA細菌叢解析では、16S rRNAの保存領域間に存在する9つの可変領域 (V1~V9領域) を利用し、細菌叢を形成する微生物の属や種レベルまでの系統分類ができる (Scannapieco FA & Cantos A, 2016; Vogtmann E & Goedert JJ, 2016)。本解析法は、1回のシーケンスで多くのサンプルを組み合わせたことが可能な方法である。

2. メタゲノム研究分野を開拓した大規模プロジェクトと多様なヒト試料を用いたメタゲノム研究

ヒトは自身の細胞数と同じかそれ以上に相当する数の微生物を体内や体表に有しているといわれている。これら微生物がヒトの健康に及ぼす影響は非常に大きい。宿主の遺伝子と微生物との相互作用は、慢性疾患の発症に関わる主要な環境因子となっている。これまでに消化管の細菌叢が大きな注目を集めているが、口腔細菌叢、膈微生物叢および皮膚微生物叢など、その他の部位のヒト微生物叢に関する研究の数も近年増加してきている (Belizário JE & Napolitano M, 2015)。表1に示すように大規模なHuman Microbiome Project (HMP) では、人体の複数の異なる部位として、口腔、咽頭、皮膚、鼻孔、消化管および膈などからサンプルを採取している。これらのプロジェクトにより、ヒトの健康におけるメタゲノム解析の複雑性および重要性に対する認識が近年高まってきている。さらにHMPで蓄積された健常者と患者の

表1 メタゲノム研究分野を開拓した大規模プロジェクト

プロジェクト	期間	内容
MetaHIT	2008-2012	健常者、肥満者、炎症性腸炎患者の糞便を解析
NIH Human Microbiome Project (HMP)	2008-2013	健康な242名 (米国) の様々な組織からサンプリングし、細菌叢ゲノムリファレンスを構築
Earth Microbiome Project (EMP)	2010-現在	地球上の様々な環境サンプルを集積し、約200,000サンプルを解析
NIH The Integrate Human Microbiome Project (iHMP)	2013-現在	早産、炎症性腸疾患、2型糖尿病を対象とした疾患コホートの立ち上げ

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

データベースを用いて、早産、炎症性腸疾患および2型糖尿病を対象とした解析を行っている (iHMP, 表1, Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium, 2014). iHMPでは、腸内細菌叢とホストの相互反応を解析するために、複数の組織からサンプリングし、16S rRNA, Lipidomic, Metatranscriptome, ProteomicsおよびMetabolicを解析している。また、これらの大規模プロジェクトでは、細菌叢解析に関する詳細なプロトコールも公開している。HMPでは、口腔由来の検体も分析しており、その詳細なプロトコールが公開されている。他にもThe Microbiome Quality Control Project (<http://www.mbqc.org/>)により、サンプル採取、16S rRNA増幅、シーケンスおよびバイオインフォマティクスに関する標準プロトコールが作成されている。

3. 16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフロー

1) サンプリングおよびDNAの抽出

唾液は0.5 ml程度あれば、16S rRNA解析による細菌叢解析を行うのに十分なDNAが抽出できると言われている。唾液細菌叢は、時間帯や食事などの影響を受けやすいため、サンプリングを行う時間帯を同時刻にする必要がある。

サンプルの保存は、糞便サンプルを室温で保存すると、DNAの分解が進むとの報告 (Cardona S et al., 2012) や、細菌叢に変化がみられたとの報告 (Gorzalak MA et al., 2015) があることから、 -80°C で保存するのが望ましい。我々は、海外でも唾液を採取している。輸送等を考慮し、OMNIgene・ORAL (DNA Genotek) のキット

(図2)を用いてサンプリングと保存を同時に行っている。このキットには、DNAの保存液が付属しており、常温保存であっても -80°C で保存するサンプルと概ね同様の結果が得られる (Nishimoto Y et al., 2016)。

DNA抽出キットの違いにより、糞便サンプルやデンタルプラークの細菌叢に検出差が認められた報告もある (Kennedy NA et al., 2014)。種々のDNA抽出キットが販売されているが (表2)、解析するサンプルに最適なキットを選択することが重要となる。

2) 16S解析用ライブラリー調製

16S rRNA細菌叢解析の増幅用プライマーは種々の領域で設計されている (表3)。V1およびV2領域を含むF27-R338プライマーのセットは、細菌への特異性が高い一方で、腸内細菌叢の主要コミュニティである*Bifidobacterium*属の検出感度が低い。また、V4領域を含むF515-R806プライマーセットは細菌や古細菌など多様

表2 主なDNA抽出キット

キット名
・ Dneasy PowerSoli Kit (QIAGEN) Human Microbiome Projectに採用
・ MagAttract PowerSoil DNA Kit (QIAGEN) Earth Microbiome Projectに採用
・ Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
・ GNOME DNA Isolation Kit (MP Biomedicals)
・ QIAamp DNA Stool mini Kit (QIAGEN)
・ FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals)
・ QIAasympphony DSP Virus/Pathogen Kit (QIAGEN)

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

サンプリングおよびDNAの抽出 (図2 唾液採取, DNA抽出)

【準備】

試薬

- ・ OMNIgene・ORAL (ORAL OM-501, DNA Genotek)
- ・ Dneasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)
- ・ Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

消耗品

- ・ Qubit assay tubes (Thermo Fisher Scientific)
- ・ 10 μl , 20 μl , 200 μl および1000 μl フィルター付きピペットチップ
- ・ 1.5 ml遠心チューブ

機器

- ・ 遠心機 (1.5 ml遠心チューブに対応)
- ・ Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)
- ・ ヒートブロック (1.5 ml遠心チューブに対応)

【プロトコール】

1. OMNIgene・ORALのプロトコールに従って処理し、保存したサンプルを1.5 mlの遠心チューブに200 μl 入れる。
2. 75°C で15分間、水浴または恒温槽でインキュベートする。
3. Dneasy Blood & Tissue Kitのプロトコールのステップ3 (Buffer ALの添加) から操作を行う。
4. 抽出したDNAの濃度をQubit 3.0で測定する。

表3 プロトコール比較

プロジェクト	試料	ターゲット	プライマー	システム
EMP	土壌	V 4	515F/806R	MiSeq/HiSeq2000
HMP	鼻腔, 口腔, 皮膚, 糞便, 膣	V 1 - V 3 V 3 - V 5	27F/534R 357F/926R	Roche454FLX Titanium
iHMP	鼻腔, 糞便, 膣, 尿	V 1 - V 3, V 3 - V 5	27F/534R 357F/926R	MiSeq (250 bp x 2)
IHMS SOP	糞便	V 4	515F/806R	HiSeq2000
Illumina Protocol		V 3 - V 4	341F/805R	MiSeq (300 bp x 2)

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

性の高いコミュニティを感度良く検出することができる。一方、F515-R806プライマーセットは、皮膚常在菌の*Propionibacterium*属の増幅が困難である (Kuczynski J et al., 2011)。我々は、Illuminaプロトコール (http://jp.support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf) のV3およびV4領域を含むF341-R805プライマーセットを採用している (図2 Amplicon Primers)。

PCRプライマーセットを用いて行う1回目のPCR反応 (Amplicon PCR) とサンプルインデックスを組み込むための2回目のPCR反応 (Index PCR) で行うことでAmpliconライブラリー調製を行う。MiSeqを用いた16S

16S解析用ライブラリー調製 (図2 Amplicon PCR, Index PCR, ライブラリーの調製)

【準備】

消耗品

- ・ 10 μ l, 20 μ l, 200 μ lおよび1000 μ lフィルター付きピペットチップ
- ・ 15 mlコニカルチューブ
- ・ 8連PCRチューブ
- ・ Qubit assay tubes (Thermo Fisher Scientific)

試薬

- ・ PCRグレードの滅菌水
- ・ 16S rRNA PCRプライマー
- ・ KAPA HiFi HS ReadyMix (KAPA)
- ・ Agencourt AMPure XP kit (Beckman CoulterGenomic)
- ・ 80%エタノール
- ・ 0.2 nM水酸化ナトリウム溶液
- ・ EBバッファー (Qiagen)
- ・ Nextera XT Index Kit v2 Set A (96 Indices, 384 Samples, illumina)
- ・ MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycles, illumina)
- ・ Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)

機器

- ・ サーマルサイクラー (96ウェルプレート対応)
- ・ ヒートブロック (1.5 ml遠心チューブに対応)
- ・ 遠心機 (8連PCRチューブ対応)
- ・ ボルテックスミキサー
- ・ NGS MagnaStand (日本ジェネティクス)
- ・ Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific)

【プロトコール】 ※Illuminaプロトコールを改変

Amplicon PCRおよびClean up

1. 8連PCRチューブ中で細菌叢から抽出したDNA, HiFi HotStart ReadyMixおよびPCRプライマーを図2の分量で混合し, 図2のプログラムを実行する。
2. PCR反応後のDNA溶液をアガロースゲルまたはバイオアナライザ電気泳動システムで, 産物を確認する。
3. Index PCRの工程を終えた8連PCRチューブを280 \times g, 20 $^{\circ}$ Cで1分間遠心する。
4. AMPure XPビーズを30秒間ボルテックスで攪拌し, 完全に懸濁させる。
5. Index PCRの工程を終えたサンプルDNA溶液に, 56 μ lのAMPure XPビーズを加える。
6. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
7. 8連PCRチューブを室温で5分間静置する。
8. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置き, 2分間静置する。
9. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま, マイクロピペットで上清を完全に取出し, 廃棄する。サンプル間でピペットチップは交換する。
10. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま, 新しく調製した80%エタノールで以下のようにビーズを洗浄する:
 - A) 8連PCRチューブを用いて, 200 μ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
 - B) チューブをマグネットスタンドの上で30秒間静置する。

- C) 注意深く上清を取り出し、廃棄する。
11. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、以下のように2回目のエタノール洗浄を実施する：
 - A) マイクロピペットを用いて、200 μ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
 - B) プレートをマグネットスタンドの上で30秒間静置する。
 - C) 上清を注意深く取り出し、廃棄する。P20のマイクロピペットを用いて、プレートに残ったエタノールを完全に除去する。
 12. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置いたまま、10分間静置してビーズを風乾させる。
 13. 8連PCRチューブをマグネットスタンドから下ろし、サンプルを含む各ウェルに27.5 μ lのEBバッファを加える。
 14. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
 15. 8連PCRチューブを室温で2分間静置する。
 16. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置き、室温で2分間静置する。
 17. 8連PCRチューブからマイクロピペットで注意深く上清25 μ lを取り出し、新しい8連PCRチューブの対応するウェルに移し替える。コンタミを防ぐため、サンプル間でピペットチップは交換する。

Index PCRおよびClean up

1. マイクロピペットを用いて、Amplicon PCR後のサンプルDNA 5 μ lを取り出し、新しい8連PCRチューブに分注する。
2. Index 1 および 2 のプライマーチューブをラック (TruSeq Index Plate Fixture) に以下のように並べる。
 - A) Index 2 プライマーチューブ (白キャップ) を縦方向 (row A~H) に並べる。
 - B) Index 1 プライマーチューブ (オレンジキャップ) を横方向 (column 1~12) に並べる。
3. 1st PCR後のサンプルDNA (5 μ l) が入ったPCRプレートをラック (TruSeq Index Plate Fixture) に置く。
4. 図2のように、DNA, Index 1 および 2 プライマー, HiFi HotStart ReadyMixおよびPCRグレードの滅菌水を加える。
5. マイクロピペットで10回穏やかにピペッティングする。
6. 8連PCRチューブの蓋を閉め、1,000 \times g, 20 $^{\circ}$ Cで1分間遠心する。
7. 8連PCRチューブをPCR装置にセットし、図2のプログラムを実行する。
8. Index PCRの工程を終えたPCRプレートを280 \times g, 20 $^{\circ}$ Cで1分間遠心する。
9. AMPure XPビーズを30秒間ボルテックスで攪拌し、完全に懸濁させる。
10. Index PCRの工程を終えたサンプルDNA溶液に、56 μ lのAMPure XPビーズを加える。
11. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
12. 8連PCRチューブを室温で5分間静置する。
13. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置き、2分間静置する。
14. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、マイクロピペットで上清を完全に除去し、廃棄する。サンプル間でピペットチップは交換する。
15. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、新しく調製した80%エタノールで以下のようにビーズを洗浄する：
 - A) マイクロピペットを用いて、200 μ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
 - B) プレートをマグネットスタンドの上で30秒間静置する。
 - C) 注意深く上清を取り出し、廃棄する。
16. 8連PCRチューブをマグネットスタンドの上に置いたまま、以下のように2回目のエタノール洗浄を実施する：
 - A) マイクロピペットを用いて、200 μ lの新しく調製した80%エタノールを各サンプルのチューブに加える。
 - B) チューブをマグネットスタンドの上で30秒間静置する。
 - C) 上清を注意深く取り出し、廃棄する。
 - D) P20のマイクロピペットを用いて、プレートに残ったエタノールを完全に除去する。
17. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置いたまま、10分間静置してビーズを風乾させる。
18. 8連PCRチューブをマグネットスタンドから下ろし、サンプルを含む各ウェルに27.5 μ lのEBバッファを加える。
19. マイクロピペットで上下に10回穏やかにピペッティングして攪拌する。
20. 8連PCRチューブを室温で2分間静置する。
21. 8連PCRチューブをマグネットスタンドに置き、室温で2分間静置する。
22. 8連PCRチューブからマイクロピペットで注意深く上清25 μ lを取り出し、新しい8連PCRチューブに移し替える。コンタミを防ぐため、サンプル間でピペットチップは交換する。

ライブラリーの調製

1. 作製したライブラリーは、Qubit 3.0で濃度を測定する。
2. 測定したDNA濃度は、前工程でチェックした平均ライブラリーサイズ [PCR産物 (2段階目) の平均サイズ] を基にnM単位に換算する：

- $$\frac{\text{concentration in ng/}\mu\text{l}}{660 \text{ g/mol} \times \text{平均ライブラリーサイズ}} \times 10^6 = \text{concentration in nM}$$
3. 測定値を基に、ライブラリー濃度をEBバッファーで4 nMに調整する。
 4. 複数サンプルをMiSeq 1 ランで同時に解析する場合は、4 nMに合わせたライブラリー溶液を5 μl ずつ取り出し、新しい1.5 mlチューブ中で混合する。
 5. ヒートブロックを96°Cに予熱する。
 6. MiSeqReagent Cartridgeを-20°Cの冷凍庫から取り出し、室温で溶解させる。
 7. 約1時間前、Reagent Cartridgeを水に浸したまま室温で置いておく。
 8. 1.5 ml遠心チューブ中で、以下の分量で4 nMライブラリー溶液と、新しく調製した0.2 nM NaOH溶液を混合する：
 - 4 nMライブラリー溶液 (5 μl)
 - 0.2 nM NaOH (5 μl)
 9. サンプル溶液をボルテックスで攪拌し、280 \times g, 20°Cで1分間遠心する。
 10. 室温で5分間インキュベートし、ライブラリーを一本鎖DNAに変性する。
 11. 変性後のライブラリー溶液に、氷冷したHT 1 バッファーを以下の分量で加える：
 - 変性後のライブラリー溶液 (10 μl)
 - 氷冷したHT 1 (990 μl)
 12. 最終希釈の準備が整うまで、20 pM変性済みライブラリーは氷上に静置しておく。
 13. 20 pMの変性済みライブラリーを以下の分量で8 pMに追加希釈する。
 - 20 pMの変性済みライブラリー (240 μl)
 - 氷冷したHT 1 (360 μl)
 14. HT 1 バッファーを追加したら、チューブを4～5回転倒攪拌する。
 15. 最終希釈を終えたライブラリー溶液を氷上に静置する。
 16. 10 nM PhiXを以下の分量で混合し、4 nMまで希釈する：
 - 10 nM PhiX library (2 μl)
 - 10 mM Tris pH 8.5 (3 μl)
 17. 4 nM PhiX溶液と0.2 nM NaOHを以下のように混合する。
 - 4 nM PhiX library (5 μl)
 - 0.2 nM NaOH (5 μl)
 18. 混合後のPhiX溶液をボルテックスで軽く攪拌する。
 19. 室温で5分間インキュベートし、PhiXライブラリーを一本鎖DNAに変性する。
 20. 変性後のPhiX溶液に氷冷したHT 1 バッファーを以下のように加え、20 pMの変性済みPhiX溶液を得る：
 - 変性済みPhiXライブラリー-library (10 μl)
 - 氷冷したHT 1 (990 μl)
 21. 変性後の20 pM PhiX溶液を以下の分量で8 pMに追加希釈する。
 - 20 pMの変性済みPhiX (240 μl)
 - 氷冷したHT 1 (360 μl)
 22. HT 1 バッファーを追加したら、チューブを4～5回転倒攪拌する。
 23. 最終希釈を終えたPhiX溶液を氷上に静置する。
 24. 新しい1.5 ml遠心チューブ中で、以下のように変性・濃度調整済みのライブラリーおよびPhiX溶液を混合する。
 - 変性・濃度調整済みPhiX (30 μl)
 - 変性・濃度調整済みライブラリー (570 μl)
 25. MiSeqReagent Cartridgeとライブラリーの熱変性の準備が整うまで、ライブラリー混合液は氷上に置いておく。
 26. ライブラリー混合液を96°Cに予熱したヒートブロックで2分間インキュベートし、熱変性する。
 27. インキュベート後のライブラリー混合液を1～2回転倒攪拌してから氷上に置く。
 28. ライブラリーの入ったチューブを氷上で5分間静置する。5分経ったら、600 μl 全量をReagent Cartridgeに分注する。
 29. Reagent Cartridgeを水浴から取り出し、実験機の上でペーパータオルの上にたたきつけて水を落とす。
 30. 溶解した試薬を混ぜるために、Reagent Cartridgeを10回上下反転させ、目視ですべての個所の試薬が溶けていることを確認する。
 31. 試薬チューブから気泡を取り除くために、カートリッジを実験台に軽く叩きつける。
 32. サンプルロードする準備ができるまで、Reagent Cartridgeを氷上あるいは2～8°Cの冷蔵庫で保管する。
 33. きれいな新しい空の1 mLピペットチップを用いて、「Load Samples」(17番)とラベルがあるチューブのホールに穴をあける。
 34. 600 μl のサンプルライブラリーを「Load Samples」のチューブに移す。
 35. Reagent Cartridgeを机などに軽く叩きつけてライブラリーのチューブ底の気泡を取り除く。

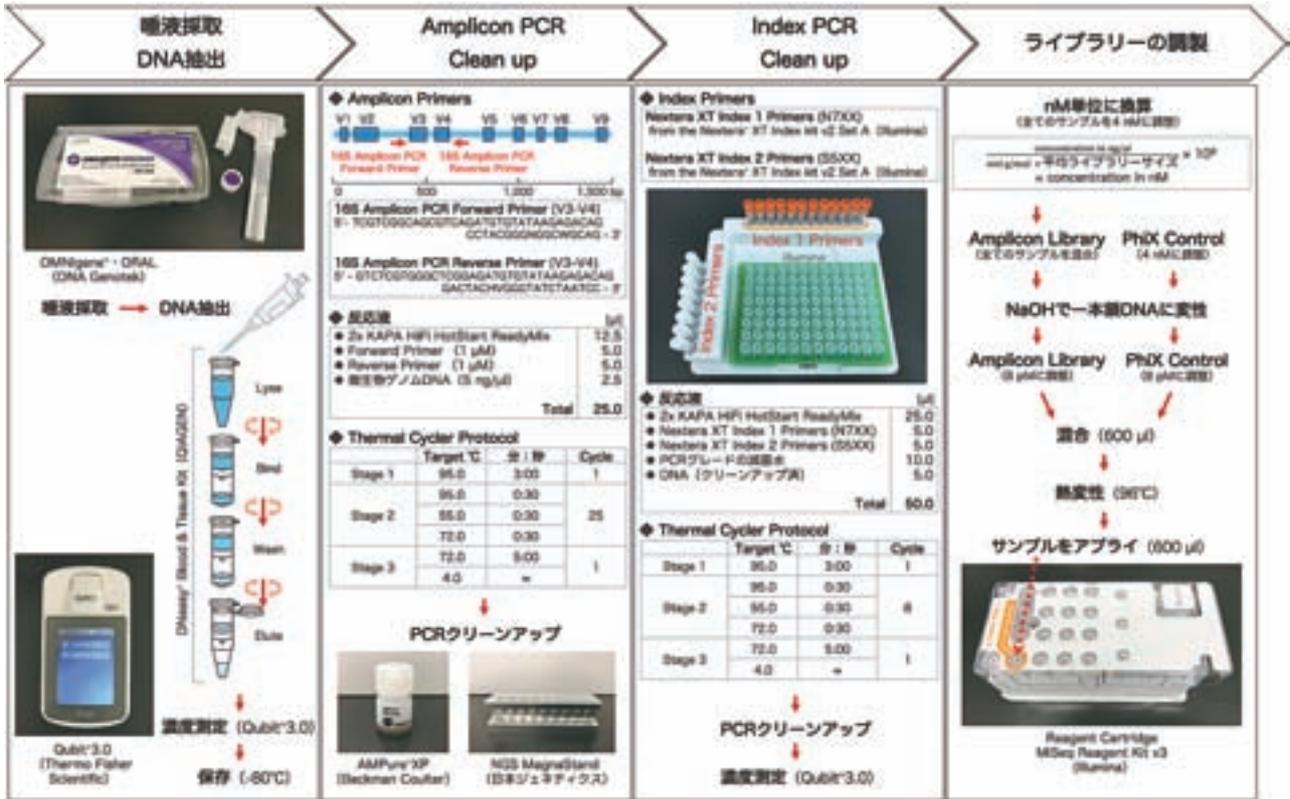


図2 16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフロー (1)

rRNA口腔細菌叢解析でのAmpliconライブラリー調製は、前述のF341-R805プライマーセットでAmplicon PCRを行った後、Nextera XT Index kit v2 Set A (Illumina)を用いてサンプルDNAにilluminaシーケンサー用アダプターおよびインデックス配列を付加する(図2)。AMPure XPビーズ(Beckman Coulter)を用いてライブラリーを精製した後、二重鎖DNA特異的な検出が可能なQubit 3.0(Thermo Fisher Scientific)で濃度を確認する。測定したDNA濃度は、MiSeqの最終入力濃度(pM)に調製するために、平均ライブラリーサイズ(PCR産物(Index PCR)の平均サイズ)を基にnM単位に換算する必要がある。平均ライブラリーサイズが500 bpで、Qubit 3.0で測定した濃度が4.0 ng/μlの場合、約12 nMに相当する。

ライブラリー調製後、AmpliconライブラリーとPhiX Control(Illumina)を混合する。MiSeqでのクラスター形成およびシーケンスにあたり、NaOHで変性、ハイブ

リダイゼーションバッファーでの希釈が必要となる。Ampliconライブラリーは塩基の多様性が低いので、MiSeqでシーケンスする際には15%のPhiX Controlを混合してMiSeq Reagent Cartridgeにアプライする。

3) シーケンシング

シーケンスランのセットアップは、MiSeq装置上のMiSeq Control Software(MCS)で行う(図3)。MCSの表示に従い、Flow Cell、Reagent CartridgeおよびPR 2 bottleをセットする。シーケンシングをスタートさせるとMiSeq Reporter(MSR)での2次解析までが約55時間で自動的に実行される。シーケンシング終了後、Sequence Analysis Viewer(SAV)で得られたデータのクオリティーチェックを行う。V3試薬利用時の標準的なサンプル(PhiX)では、クオリティー値30以上の割合が、70%以上となるのが好ましい(図3)。

シーケンシング (図3 シーケンシング)

【準備】

消耗品

- ・パウダーフリーグローブ
- ・プラスチック製のピンセット
- ・MilliQ水
- ・0.5% Tween20
- ・レンズ紙

【プロトコール】

1. MiSeqのIllumina Experiment Manager (IEM) を起動し、Create Sample Sheetをクリックする。
2. MiSeqを選択後、Metagenomics16S rRNAを選択する。
3. Reagent Cartridge Barcodeを入力する。
4. サンプル調製に使用したキットを選択する (Nextera XT Index Kit v2 Set A)。
5. Index Readsを指定する (2)。
6. Read Typeを指定する (Paired End)。
7. Cycle Readsを指定する (301)。
8. Sample Sheetを作成する。
9. MiSeqのMiSeq Control Software (MCS) を起動し、SEQUENCEをクリックする。
10. Use BaseSpace for storage and analysisのボックスを空欄にしたままNextをクリックする。
11. 新しいパウダーフリーグローブを着ける。
12. プラスチック製のピンセットを使って、Flow Cellを取り出す。
13. 塩を残さないように注意しながらMilliQ水でFlow Cellを軽くすすぐ。
14. Flow Cellポートのガスケットに気をつけながら、レンズ紙でFlow Cellとカートリッジの水分を除く。ガスケットとガラスの境界部分は軽くたたいて乾かす。
15. アルコールを湿らせたレンズ紙を使い、Flow Cellのガラス部分をきれいにする。Flow Cellのガスケット部分にはレンズ紙を使わない。
16. Flow Cell区画のドアを開け、Flow Cellステージに埃などがいないか確認する。
17. Flow Cellをステージに載せ、区画のドアを閉める。
18. PR 2 bottleをセットし、廃液bottleを空にする。
19. Reagent Cartridgeをセットし、区画のドアを閉める。
20. 設置確認後、ランをスタートさせる。
21. ランの終了後、0.5% Tween 20で洗浄する。
22. Sequence Analysis Viewer (SAV) でシーケンスデータのクオリティー値30以上の塩基の割合をチェックする。

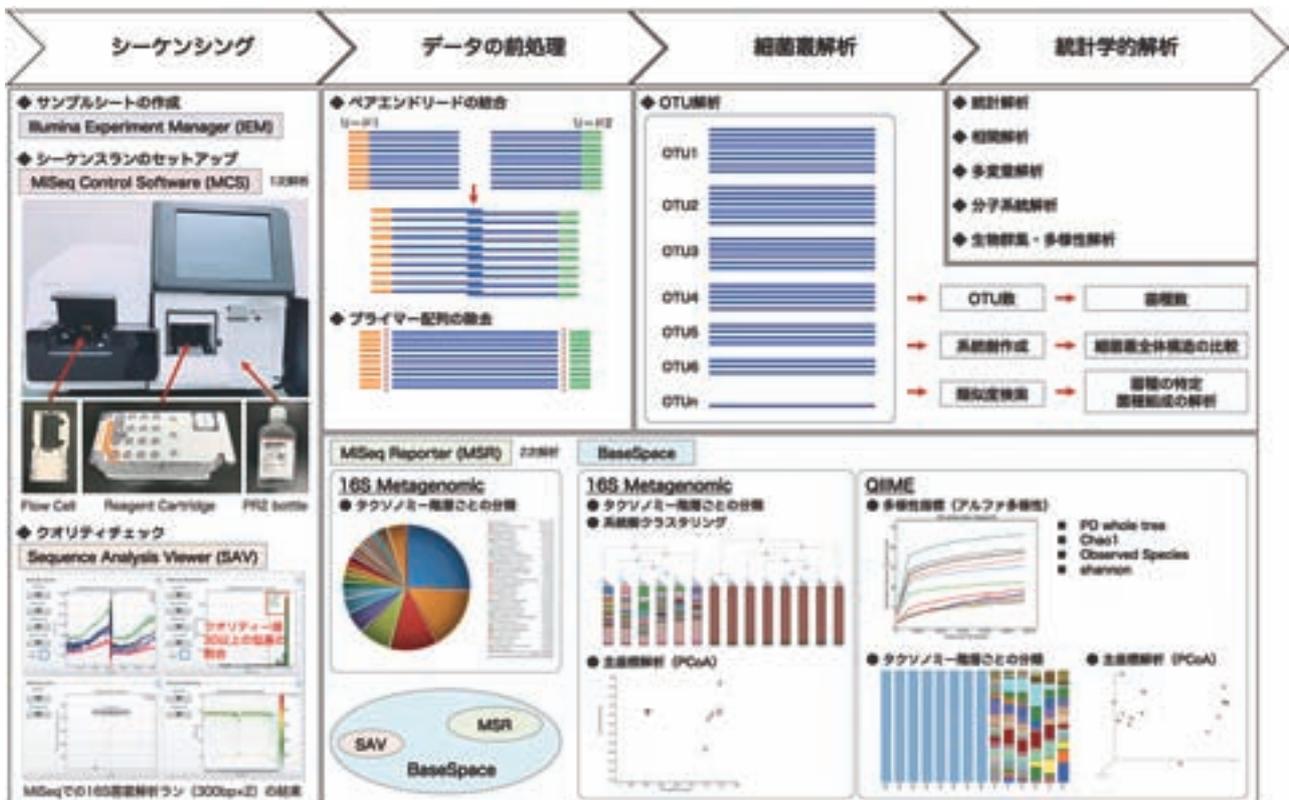


図3 16S rRNA口腔細菌叢解析のワークフロー (2)

4) 情報解析

16S rRNAの特定領域をシーケンス解析し、その配列データから細菌叢を明らかにしている。膨大な数の菌種が検出されるが、門 (phylum) および属 (genus) レベル

で分類されることが多い。配列同士の類似性がある配列をグループ化するための分類単位をOTU (operational taxonomic unit) という (図3, 服部ら, 2014)。16S rRNA遺伝子の場合、96%以上の類似性を持つグループ

情報解析 (QIIME) (図3 細菌叢の解析, 統計学的解析)

【準備】
機器

- ・ポータブルHDD (USB接続)
- ・PC (インターネット環境)

【プロトコール】

1. MiSeqのシーケンスデータをHDDにコピーする。
2. Google chromeを起動し, BaseSpace (basespace.illumina.com) にログインする。
3. BaseSpace Sequence Hubをクリック後, PROJECTタブをクリックし, HDDのシーケンスデータをアップロードする。
4. APPSタブをクリックし, QIIME Preprocessingを選択する。
5. Launchを選択し, 結果の保存先および解析サンプルを選択する。
6. Continueをクリックし, 解析をスタートさせる。
7. 解析終了後, データの確認を行う。この時, 最少リード数 (Min) をメモしておく。
8. Google Spreadsheetでウェブ上にサンプル名記載のリストを作成 (一列目のタイトルに# SampleID, 二列目以降にサンプル情報などを記入), ウェブに公開する。
9. Mapping FileのURLをコピーする。
10. APPSタブをクリックし, QIIME Visualizationsを選択する。
11. Google key where your mapping file is locatedにMapping FileのIDを入力する。
12. Even rarefaction depthに使用リード数を指定するため7. でメモした値 (Min) を入力する。
13. QIIME Preprocessing Resultsに出力データを選択する。
14. Save Results Toに保存先を指定する。
15. 解析終了後, 解析結果をダウンロードする (Download Analysisをクリック)。

表4 16S rRNA細菌叢解析アプリ

MiSeq Reporter 16S Metagenomic	BaseSpace 16S Metagenomic	BaseSpace QIIME
<ul style="list-style-type: none"> ・MiSeqに内蔵されているため, データの移動不要 ・各サンプルの菌種割合のみ解析 	<ul style="list-style-type: none"> ・クラウドプラットフォーム上で解析 ・各サンプルの菌種割合およびサンプル間比較が可能 	<ul style="list-style-type: none"> ・クラウドプラットフォーム上で解析 ・各サンプルの菌種割合およびサンプル間比較が可能 ・16S解析で実績

※16S rRNA細菌叢解析ソリューション (イルミナ) の配布資料を参考に作成

を1つのOTUとして定義する場合が多い。NGSを用いた解析において, 全配列を解析するには膨大な時間を要するため, あらかじめOTUに分類し, 各OTUから代表配列を1つずつ選び, その後の解析を行っている。

OTUの代表的な配列を用いて, 比較するサンプルの系統樹解析を行い, OTUの枝長と各サンプル固有な枝長の割合から, 距離として構造類似度を解析する手法をUniFrac解析という。UniFrac解析で算出された距離を用いて, 主座標分析 (PCoA) によるクラスタリング解析を行うことで, サンプル間の相違度を2次元または3次元の座標軸に配置することで視覚化できる。これらの配置は, 類似したサンプルは近く, 類似していないものは遠くに配置される (図3)。サンプル中に存在する細菌種の数を推定する解析のことを多様性解析という。1つのサンプル中における細菌の多様性を α 多様性, また, 複数のサンプル間における種構成の類似度を β 多様性という (図3)。

前述した一部の解析を行うためのソフトウェアMiSeq Reporter (Illumina) が, 装置に搭載されている。また, インターネット環境では, クラウドサービスBaseSpace (Illumina) に接続することで16S MetagenomicsおよびQIIMEなどを利用して解析することができる (表4, 図3)。16S MetagenomicsおよびQIIMEは, データベースを利用して, 図式化して表示できる。我々は, 16S解析で実績のあるQIIMEを用いて解析を行っている (表4, 図3)。

おわりに

口腔細菌叢は, う蝕, 歯周病および口腔がんなど種々の口腔疾患に関与していることが知られている。さらに, 肺炎, 心疾患, 膵臓がんおよび肝硬変などの全身的な疾患にも口腔細菌叢が関連していることも近年報告されている (Scannapieco FA & Cantos A, 2016; Vogtmann E & Goedert JJ, 2016)。しかし, 全身的な疾患と口腔細菌叢に関する報告は少数であり, 健康との関連性に十分な知見があるとはいえない。NGSを用いた口腔細菌叢の解析データの蓄積によって, 全身的な疾患の高リスク群を明らかにできれば, 高リスク群を対象に適切な口腔保健管理を行うことができる。すなわち, 1次予防や2次予防対策を講じることが可能となり, 疾病予防や早期発見も可能になると考えられる。

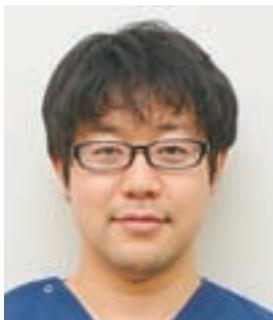
本解説の公表に当たって, 開示すべき利益相反はない。

謝 辞

本実験プロトコルのデータの取得にあたり、北海道医療大学がん予防研究所の次世代シーケンサーMiSeqを使用させて頂きました。浅香正博学長をはじめとする関係者の皆様にこの場を借りて深く御礼申し上げます。

文 献

- Belizário JE & Napolitano M. Human microbiomes and their roles in dysbiosis, common diseases, and novel therapeutic approaches. *Front Microbiol* 6 : 1050, 2015.
- Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, Azpiroz F, Roca J, Guarner F & Manichanh C. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol* 12 : 158, 2012.
- Costalonga M & Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett* 162 : 22–38, 2014.
- Gorzalak MA, Gill SK, Tasnim N, Ahmadi-Vand Z, Jay M & Gibson DL. Methods for Improving Human Gut Microbiome Data by Reducing Variability through Sample Processing and Storage of Stool. *PLoS One* 10 : e0134802, 2015.
- 服部正平：NGSアプリケーション今すぐ始める！メタゲノム解析実験プロトコル～ヒト常在細菌叢から環境メタゲノムまでサンプル調製と解析のコツ（実験医学別冊），羊土社，2014，p28–38.
- Integrative HMP (iHMP) Research Network Consortium. The Integrative Human Microbiome Project : dynamic analysis of microbiome–host omics profiles during periods of human health and disease. *Cell Host Microbe* 16 : 276–289, 2014.
- Kennedy NA, Walker AW, Berry SH, Duncan SH, Farquarson FM, Louis P, Thomson JM ; UK IBD Genetics Consortium, Satsangi J, Flint HJ, Parkhill J, Lees CW & Hold GL. The impact of different DNA extraction kits and laboratories upon the assessment of human gut microbiota composition by 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* 9 : e88982, 2014.
- Kuczynski J, Lauber CL, Walters WA, Parfrey LW, Clemente JC, Gevers D & Knight R. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet* 13 : 47–58, 2011.
- Nishimoto Y, Mizutani S, Nakajima T, Hosoda F, Watanabe H, Saito Y, Shibata T, Yachida S & Yamada T. High stability of faecal microbiome composition in guanidine thiocyanate solution at room temperature and robustness during colonoscopy. *Gut* 65 : 1574–1575, 2016.
- Palys T, Nakamura LK & Cohan FM. Discovery and classification of ecological diversity in the bacterial world : the role of DNA sequence data. *Int J Syst Bacteriol* 47 : 1145–1156, 1997.
- Sato Y, Yamagishi J, Yamashita R, Shinozaki N, Ye B, Yamada T, Yamamoto M, Nagasaki M & Tsuboi A. Inter–Individual Differences in the Oral Bacteriome Are Greater than Intra–Day Fluctuations in Individuals. *PLoS One* 10 : e0131607, 2015.
- Scannapieco FA & Cantos A. Oral inflammation and infection, and chronic medical diseases : implications for the elderly. *Periodontol* 2000 72 : 153–175, 2016.
- Vogtmann E & Goedert JJ. Epidemiologic studies of the human microbiome and cancer. *Br J Cancer* 114 : 237–242, 2016.
- Woese CR, Kandler O & Wheelis ML. Towards a natural system of organisms : proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 4576–4579, 1990.



植原 治

平成20年3月 北海道医療大学歯学部 卒業
 平成20年4月 北海道医療大学病院 研修歯科医
 平成21年4月 北海道医療大学病院 臨床助手
 平成25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25年4月 北海道医療大学歯学部口腔機能・発育学系保健衛生学分野 助教
 平成29年10月 北海道医療大学がん予防研究所 兼務

[最近のトピックス]

分泌タンパク質REL β /FIZZ2の歯根形成における役割

細矢 明宏, 建部 廣明, 入江 一元

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

REL β /FIZZ2 as a potential inducer of tooth root development

Akihiro HOSOYA, Hiroaki TAKEBE, Kazuharu IRIE

Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, Health Sciences University of Hokkaido

歯周組織は、歯胚の外側に存在する歯小囊組織から形成され、形成後もセメント芽細胞へ分化する未分化な細胞を含むと考えられている (Thesleff, 2003)。しかし、歯小囊および歯周組織における未分化細胞からセメント芽細胞への分化機構については不明な点が多い。Resistin-like molecule- β /found in inflammatory zone 2 (REL β /FIZZ2) は消化管や肺の上皮組織で局在が認められる分泌タンパク質で (Artis et al., 2004; McVay et al., 2006)、未分化細胞に対して正の走化性を有することが報告されている (Liu et al., 2011)。そこで我々は、REL β /FIZZ2の歯根形成における役割を検討する目的で、歯胚発生過程におけるREL β /FIZZ2局在を検討した (Hosoya et al., 2017)。

蕾状期歯胚において、歯槽骨周囲でREL β /FIZZ2の陽性反応が認められたが、歯胚内部に特異的な反応は認められなかった。帽状期および鐘状期では、一部の内エナメル上皮で弱い陽性反応が観察されたが、他のエナメル器、歯乳頭および歯小囊は陰性であった。

歯根が伸張すると、Hertwig上皮鞘の細胞が強い陽性反応を示し、歯乳頭および根尖部象牙質との間にREL β /FIZZ2陽性の基質が線状に認められた。この線状の陽性反応は、歯根上部ではみられなかった (図1)。

そこで、歯根上部でのREL β /FIZZ2局在の消失と、セメント質形成の開始に関連があるのではないかと考え、セメント質形成に関連する因子の局在を検討した。歯根形成期歯胚の根尖部において、REL β /FIZZ2局在は歯小囊に面する象牙質表面に局限して観察された。この陽性の象牙質周囲には、Osterix陽性のセメント芽細胞の前駆細胞様細胞がみられた。また、セメント質の基質タンパクであるOsteopontinと骨シアロタンパクは、REL β /FIZZ2局在が消失した歯根表面で認められた。

以上から、REL β /FIZZ2はHertwig上皮鞘の細胞が歯乳頭側へ分泌し、セメント質形成前の根尖部象牙質の表面に局在することが示された。さらに、分化マーカーの検索から、このタンパクは根尖部におけるセメント質形成を調節していることが示唆された。今後、REL β /FIZZ2のセメント芽細胞分化への機能が明らかとなり、歯周組織再生療法へ応用されることを期待したい。

文献

Artis D et al. REL β /FIZZ2 is a goblet cell-specific immune-effector molecule in the gastrointestinal tract. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 13596-13600, 2004.

Hosoya A et al. Localization of REL β /FIZZ2 Is Associated with Cementum Formation. Anat Rec 300: 1865-1874, 2017.

Liu T et al. FIZZ2/REL β induction and role in pulmonary fibrosis. J Immunol 187: 450-461, 2011.

McVay LD et al. Absence of bacterially induced REL β reduces injury in the dextran sodium sulfate model of colitis. J Clin Invest 116: 2914-2923, 2006.

Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. J Cell Sci 116: 1647-1648, 2003.

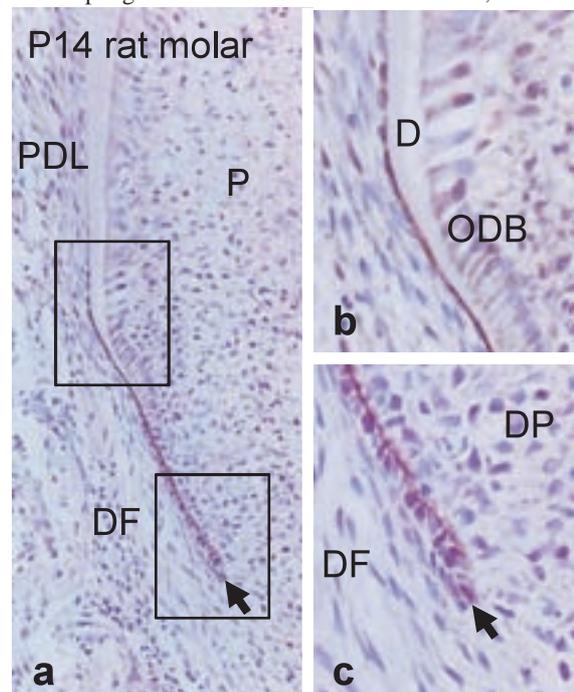


図1 14日齢ラット臼歯根尖部におけるREL β /FIZZ2局在。Hertwig上皮鞘の細胞が陽性を示す (a, c矢印)。また、根尖部の歯根象牙質 (D) 表面においても局在が観察される (b)。DF, 歯小囊; DP, 歯乳頭; ODB, 象牙芽細胞; P, 歯髓

[最近のトピックス]

口腔粘膜を傷つけにくい唾液吸引チューブの紹介

廣瀬 知二

伊東歯科口腔病院

ALS（筋萎縮性側索硬化症）は、いくつか病型があるだけでなく、症状の個人差が大きい。しかし、いずれの型であっても嚥下障害が現れ、進行すると自身の唾液を飲み込むことも困難となり、誤嚥から肺炎へつながる可能性が高くなる（高橋ら，2014）。また、唾液が口腔内に貯留するようになると口角から流涎し、外見上も苦痛となりうるため、軽減を図る必要がある（高橋ら，2014）。

対応として、抗コリン作用を有する三環系抗うつ薬が有効な場合があるが、口渇やほかの副作用のため使用困難なことも少なくない。

対症療法ではあるが、低圧持続吸引器による唾液の持続吸引は、誤嚥や流涎を防ぐために有用とされている（日本神経学会，2013）。先端がスネイル（うずまき）状に加工された製品が市販されており（図1）、通常の吸引チューブと比較して口腔内に留置しやすく、口腔外への押し出しも減少できる。しかし、問題点として、粘稠性が高い唾液では吸引チューブが詰まることがあり、それを防ぐために吸引圧を強くすると、口腔粘膜にチューブが吸着して発赤や時に出血を起こすことがある。

2017年、口腔粘膜を傷つけにくい唾液吸引チューブが製品化された（図2）。この製品は吸引管と保護管からなる2重管構造となっている。そのため口腔粘膜に吸着しにくく、傷つけにくい。使用にあたっては、保護管を患者が歯で穴を開けたり、噛み切ることがあるので監視を怠らないよう十分注意する。また必要に応じてバイトブロックの使用を検討する。

歯科医療は単に症状を治すだけが目標ではない。症状を治せない場合であっても、いかにQOLを高めるかが問われている。嚥下障害を有する患者をサポートする器具のさらなる開発、改良が望まれる。

文献

- 1) 高橋 卓ら. ALS患者の唾液処理支援. 難病と在宅ケア 20(5):36-40, 2014.
- 2) 日本神経学会. 筋萎縮性側索硬化症診療ガイドライン2013. 東京:南江堂, 2013, p90.



図1 一般的な唾液持続吸引チューブ



図2 アモレ唾液ケアチューブ（トクソー技研）
2重管構造となっているため、口腔粘膜に吸着しにくく、傷つけにくい。また、吸引孔が3ヶ所あるので唾液が詰まりにくい。

北海道医療大学歯学会会則（2017年3月4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、特に功勞のあった者で、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送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。但し、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・支持する個人・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、納入済みの会費の返還は行わない。

（会員資格喪失）

第6条 会員は以下の事由により資格を喪失する。

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ものが再入会を希望する場合、2年分の未納会費を納入後入会手続きを取るものとする。

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 若干名及び常任委員 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、会務を総括する。
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. 常任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、准教授、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1以上の出席（委任状を含む）をもって成立し、議事は出席者の過半数によりこれを決する。

（任 期）

第10条 各役員の任期は2年を原則とする。ただし、再任を妨げない。

第4章 事 業

第11条 本会は第2条の目的を達成するために以下の事

業を行う。

1. 総会

総会は会長の招集により年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も行う。

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. 研究活動の奨励

詳細は内規に定める。

6. 委員会

本会に委員会を置くことが出来る。委員会は委員を持って組織する。構成、任務等必要事項は別に定める。

7. その他

本会の目的達成に必要と認めた事業。

第5章 会 計

(運営経費、会計)

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

1 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

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。

2 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、本会則の実地に必要な内規は理事会の議を経て別に定めるものとする。

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

附 則

1. 本会則は昭和61年8月1日より施行する。
2. 本会則は平成7年3月1日より施行する。
3. 本会則は平成8年4月1日より施行する。
4. 本会則は平成17年4月1日より施行する。
5. 本会則は平成27年4月1日より施行する。
6. 本会則は平成29年4月1日より施行する。

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿規程（2017年4月1日現在）

1. 投稿資格

著者は、原則として共著者を含め、本会会員に限る。
(臨時会員は除く)

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の各学部・大学院研究科倫理委員会の承諾を得たものとする。
- 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地に関する倫理規程」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、「北海道医療大学動物実験委員会 (Animal Ethics and Research Committee)」の審査を経て、北海道医療大学長の承認を得たものとする。

なお、本学以外の研究機関で行われた研究については、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。また、投稿原稿と著者プロフィールを電子ファイルにて編集長宛にe-mailで提出する。
- 4) 和文論文の本文については、原則として、緒論 (緒語)、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, Result, Discussion, Conclusion, Ac-

knowledge (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がわかるように記載する。
- 7) 投稿時、著者全員が編集委員会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での添付文書として編集委員会まで送付すること。e-mailでの送付が不可能な場合は、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：委員長宛
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頁での掲載とする。

- 4) 最近のトピックスは、全角文字1800字程度にまとめること。(参照文献リストを含む)。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文字程度に削減すること。

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) 校正論文は、特別な事情がない限り一週間以内、校正時間は48時間以内に返却するものとする。(返却、連絡がない場合は、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を発行する。

9. 掲載料および別刷料

- 1) 掲載料は、刷り上り10頁程度とする。
- 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。

る。

10. 優秀論文賞

その年の本誌に掲載された原著論文の中から「最優秀論文賞」(1編), 「優秀論文賞」(2編) を選び表彰する。

選考は編集委員会が行う。

11. 著作権の帰属

本誌に掲載された著作物の著作権は北海道医療大学歯学会に帰属する。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、著者がすべての責任を負う。

12. 著者のプロフィール (5. 投稿論文作成 3) 参照)

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。

13. 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金沢1757番地
北海道医療大学歯学部・口腔生物学系・生理学分野
北海道医療大学歯学雑誌編集委員会(委員長 石井久淑)
Tel：0133-23-1239
e-mail：hisayosh@hoku-iryo-u.ac.jp

患者のプライバシー保護ならびに研究倫理に関する指針 (2014年 2月26日)

北海道医療大学歯学雑誌に掲載される症例報告等を含む臨床研究論文では、患者のプライバシーを保護するため、以下の指針を遵守しなければならない。また、臨床研究等においては、患者ならびに被験者の尊厳と人権に配慮し、世界医師会によるヘルシンキ宣言と我が国が定めた下記の指針ならびに法的規範を遵守しなければならない。

1. 患者のプライバシー保護に関する指針

- 1) 氏名、カルテ番号、入院番号、イニシャル等、患者個人の特定が可能となる情報は記載しない。
- 2) 患者の住所は記載しない。ただし、疾患の発生場所が病態等に影響する場合は、区域(県、市など)までに限定して記載する。
- 3) 診療日等の記載は、年月までとする。
- 4) 診療科名と他の情報を照合することで患者が特定され得る場合、診療科名は記載しない。
- 5) 他施設でも診断・治療を受けている場合、その施設名と所在地は記載しない。ただし、救急医療などで搬送元の記載が不可欠の場合は、この限りではない。
- 6) 顔写真には目隠しをする。
- 7) 生検、剖検、画像情報などに含まれる番号等、症例を特定できる情報は削除する。
- 8) 以上の配慮をしても個人が特定される可能性のある場合は、発表に関する同意を患者本人(または遺族もしくは代理人、未成年者では保護者)から得る。
- 9) 前項の手続きが困難な場合は、筆頭著者または責任著者(corresponding author)の所属する施設の倫理委員会の承認を受ける。

2. 遵守すべき倫理指針等*

- 1) 「臨床研究に関する倫理指針」(厚生労働省)(平成20年7月31日改正)
- 2) 「疫学研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省)(平成25年4月1日改正)
- 3) 「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(文部科学省・厚生労働省・経済産業省)(平成25年2月8日改正)

- 4) 「遺伝子治療臨床研究に関する指針」(文部科学省・厚生労働省)(平成20年12月1日改正)
- 5) 「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」(厚生労働省)(平成25年10月1日改正)
- 6) 「厚生労働科学研究における利益相反 (Conflict of Interest : COI) の管理に関する指針」(平成20年3月31日厚生科学課長決定)

*なお、上記の指針等は、管轄官庁のHPに掲載されている最新版を参照すること。

チェックリスト 北海道医療大学歯学会雑誌

論文名

投稿原稿が「北海道医療大学歯学会雑誌投稿規程」および「投稿の手引き」に沿ったものであるか、もう一度チェックしてください。

著者チェック	チェック項目	編集委員会 チェック
<input type="checkbox"/>	患者のプライバシー保護に関する指針に沿っていますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	関連する倫理指針等を遵守していますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	文献の記載方法は「投稿の手引き」に沿っていますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	原稿は2部(正1部、コピー1部)所定の封筒に入れましたか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	原稿の第一枚目には必要項目が記載されていますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	和文論文には英文抄録(本文300語以内)とこれに対応する和訳が添付されていますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	英文論文には英文および和文抄録が添付されていますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	本文中の図や引用文献の番号とその内容は、図のファイルや文献欄と合致していますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	図、表、写真の大きさは、指示してありますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	図、表、写真の表題および説明がありますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	図、表、写真の挿入場所を本文原稿の右欄外に朱書きされてありますか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	著者および共著者は全員本学会会員ですか?	<input type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	著者の写真と経歴は添付されていますか?	<input type="checkbox"/>

Signature	Print Name	Tel	e-mail	Date
NO1				
NO2				
NO3				
NO4				
NO5				
NO6				
NO7				

「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¹⁾、²⁾、³⁾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3cm、左右2.5cm

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3cm、左右2.5cm

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・Z8202およびZ8203に準じ、国際単位系(SI)を使用するよう努める。また単位にピリオドをつけない。
(例：GHz, MPa, kW, cm, mV, μm, nA, pF, mL, mmol, N (kgf), K, °C, min)
- 7) 学術用語は、原則として「文部省学術用語集」に準拠する。
- 8) 商品名、器械名などは、可能な限り一般化されている「カタカナ書き」とする。英文字で表す場合は、かしら文字のみ大文字にする。
- 9) 外国の人名などの固有名詞は原則として原綴とする。
- 10) 連続した数値は「,」でつなぎ、最後に単位をつける。(例：10, 20, 30°C)
- 11) 製造社の表記法は（ ）内に会社名のみを記し、社製および製作所、工業社製、株式会社などを入れない。
例：（型式名、製造会社名）、（略号、製造会社名）
（X-3010、日立）（EPMA、日本電子）
- 12) 図表の挿入場所を本文右欄外に朱書きする。

5. 文献

- 1) 文献リストは、アルファベット順（A, B…Z順）で作成する。また本文中の引用箇所以下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-iryu-u.ac.jp/~dental-society/>) からダウンロード出来ます。

北海道医療大学歯学会会員 各位

北海道医療大学歯学会第36回学術大会一般演題募集のご案内

第36回学術大会・平成30年歯学会総会ならびに講演会を開催致します。

記

日時： 平成30年3月10日(土) 午前10時 - 午後5時 (予定)
 会場： アスティ45 12階 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス
 札幌市中央区北4条西5丁目 (電話：011-223-0205)

定例講演会：『現代人における歯科的諸問題とその予防 (仮題)』

講師： 葛西 一貴 氏 (日本大学松戸歯学部歯科矯正学講座教授)

演題・抄録申込み要領

申込み期限：平成30年1月17日(水)

抄録作成方法：原稿作成要領を参照ください。

抄録提出先：歯科矯正学分野 岡山 (s99i001@hoku-iryo-u.ac.jp) に送信して下さい。

原則として、同一講座・機関から2演題までとします。

発表者 (共同研究者含む) はすべて北海道医療大学歯学会会員および準会員に限ります。

また、今年度だけの会員制度 (5,000円) もあります。

発表スライド提出期限と発表形式

提出期限：平成30年3月7日(水) 17時

発表スライドをCD-Rに保存し、事前に歯科矯正学分野 (岡山) までご持参下さい。

事前提出できない方は発表1時間前までに提出し、ご自身で試写確認して下さい。

発表補助 (スライド進行係) を必要とされる方はご自身で手配をお願いします。

発表形式：口演10分 [発表7分, 質疑応答3分] (予定)

発表には、会場PC (OS: Windows 7 Power Point 2010) を使用します。

Mac PCにて発表ご希望の方は、ご自身でMac PCのご準備の手配をお願いします。

北海道医療大学歯学会 抄録原稿作成要領

MS-Word形式（A4サイズ，明朝体，12p，余白上下左右30mm）で記載して下さい。

1. 演題名
2. 発表者氏名：演者の前に○印をつける。
3. 所属：発表者の所属が2つ以上の場合，数字（^{1,2,...}）で所属を区別する。
4. 本文：一般発表の場合 【目的】，【方法】，【結果および考察】，【結論】
5. 本文：症例発表の場合 【目的】，【症例】，【結果および考察】あるいは【経過および考察】

<p>行政との連携で・・・・・・・・・・現状について</p> <p>○福田敦史¹，・・・・・・・・，千葉逸朗²，齊藤正人¹</p> <p>¹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，</p> <p>²保健衛生学分野</p> <p>【目的】・・・</p> <p>【方法】・・・</p> <p>【結果】・・・</p> <p>【結論】・・・</p>
--

* 歯科医師生涯研修カードをお持ちの方はご持参下さい。

発表・抄録に関する問合せ・申込先

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

第36回学術大会事務局：岡山

〒061-0293 石狩郡当別町金沢1757番地

TEL：0133-23-3041（内線：3383）

FAX：0133-23-3048

E-mail：s991001@hoku-iryo-u.ac.jp

編 集 後 記

平成29年度もあっという間に大詰めとなり、皆様におかれましては教育・研究並びに臨床活動において多忙な日々をお過ごしのこととお察しいたします。本年度も、北海道医療大学歯学雑誌に論文等の投稿並びにお忙しい中、論文の査読をお引き受けいただきました先生方のご支援ご協力に深く感謝申し上げます。

さて、本号では総説1編、原著論文1編、ミニレビュー1編、実験プロトコル1編及び最近のトピックス2編の投稿をいただきました。巻頭では、微生物学分野の中澤太先生にご自身のライフワークである口腔細菌とバイオフィルム形成機構（*Oral Veillonella*を中心に）に関する総説を投稿していただきました。先生方の長年にわたる研究によって積み重ねられた実験結果は、微生物学研究のおもしろさと広大さを物語っているような気がしました。また、Puja NEOPANE先生（臨床口腔病理学）による抗細菌ペプチド（RNase 7）に関するミニレビューと植原治先生（保健衛生学分野）による次世代シーケンサーを用いた口腔細菌叢の解析法を紹介する実験プロトコルの投稿もあり、今後の口腔病変に対する新たなアプローチの展開を感じることができました。一方、川西克弥先生（咬合再建補綴学分野）の原著論文は、部分床義歯補綴学基礎実習の小テストに導入した統合評価法を応用した形成的評価方法に関する報告であり、本法の教育改善における高い有用性が示されております。さらに、開業医の廣瀬知二先生並びに組織学分野の細矢明宏先生には、臨床と基礎歯学に関する興味深いトピックスを提供していただいております。このように、研究、教育及び臨床までを網羅したバリエーションに富む本巻が整ったのではないかと考えております。是非ご一読ください。

平成29年（2017年）の今年の漢字は「北」でした。その昔、北を冠する北極星は天空の中心に位置する航海の目標として重要だったようです。同じく北を冠する本学もまた、今後の大きな変革を迎える社会情勢の潮流の中で、一つの道標となり得る時代が訪れることを信じております。北海道医療大学歯学雑誌もまた然り。次号（第37巻1号、2018年3月31日締切）以降も歯学雑誌のさらなる充実に努めていきたいと思っておりますので、今後ともご支援ご協力を賜りますようどうかよろしくお願いいたします。（石井 記）

次号（第37巻、第1号）の発行は平成30年6月30日です。

投稿原稿募集の締め切りは平成30年3月31日必着と致します。期日厳守の上、ご投稿をお願いします。本誌投稿規定は、2017年第36巻、第2号の巻末をご参照ください。

Thinking ahead. Focused on life.



Utilio II

ユーティリオ 2

コンプレッサー、モーター、給排水装置を内蔵し
コンセントひとつで診療が開始できる
オールインワンモデル

可搬式歯科用ユニット「ユーティリオII」は、
エアを供給するコンプレッサーと吸引を行うための
バキュームモーター、給水タンクと汚水タンクを本体内にすべて内蔵。
ユーティリオIIを配置した瞬間、その場所が診療空間へと変わります。



ハンドピースホルダーは取り外しが可能で、
清掃性が向上しました。



給水タンク(1L)汚水タンク(1.2L)を
本体内に収納。着脱性や清掃性の良いタンク
を採用しました。



フットスイッチはコードリール式で
本体に簡単に収納でき、移動の際も
煩わしさを感じさせません。

装備内容

エアコンプレッサー 300W 冷却ファン・サーモスイッチ付
バキュームモーター 380W 冷却ファン・サーモスイッチ付
ツインパワータービン〈ライト付〉
トルックス TR-91-O〈ライト付〉
3WAY シリンジ WS201
バキュームシリンジ手元スイッチ式タイプ VS112
フットスイッチ (コードリール式)
水タンク 1L
汚水タンク 1.2L (フロートスイッチ付)
スケーラー ニュートロン・ニュートロンLED (オプション)
バキュームカップ (オプション)
バキュームカップホルダー (オプション)
HEPA フィルター (バキュームモーター排気用) (オプション)
本体カバー (ビニール製) (オプション)

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

製造販売・製造 株式会社モリタ東京製作所 本社工場: 埼玉県北足立郡伊奈町小室7129 362-0806 TEL 048-723-2621

販売名: ユーティリオII 標準価格 2,100,000 円~ (消費税別途) 2015年4月21日現在 一般的名称: 可搬式歯科用ユニット 機器の分類: 管理医療機器(クラスII) 特定保守管理医療機器
医療機器認証番号: 226AKBZX00170000 法定耐用年数 (償却年数): 7年

www.dental-plaza.com

MANI®

患者の為になり、医師の役に立つ
製品の開発・生産・提供を通して
世界の人々の幸福に貢献する。

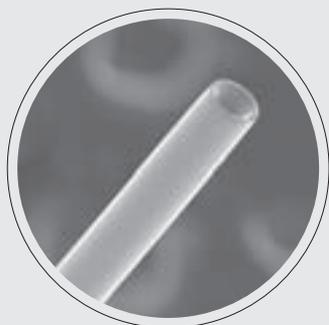
MANI has been contributing to the world welfare through development, production and distribution of its products beneficial to patients and doctors.

MANIの進化

人類の健康を願い、世界の医療に貢献して55年。
世界120ヶ国以上の医療現場で
MANIのインスツルメンツは厚い信頼を得ています。

MANIの55年は研究と技術開発の歴史です。

独創的微小加工技術や独自の管理システムが、確実に信頼性の向上に結びつき、製品が世界で広く採用されているのです。



微小加工技術
縫合針穴部拡大写真
針外径:70μm、穴直径:40μm



マイクロ刃付け技術
眼科ナイフ拡大写真 MSL30
Micro sharpening technology

MANIのネットワーク



ニーズの把握とともに、高品質と低原価が製造業の永遠の使命であり当然 MANIの課題でもあります。
人手を掛けるべきところに人手が掛けられるようにベトナムやミャンマー、ラオスなどでも生産しています。
海外生産だからこそ十分に手を掛けられ高品質を実現しています。

製造販売 **MANI®**
MANI, INC. マニー株式会社

発売 株式会社モリタ

〒321-3231 栃木県宇都宮市清原工業団地8-3
【デンタル営業】Tel: 028-667-8591 / Fax: 028-667-8593
Exp.Sec./Phone: 028-667-8592 Telefax: 028-667-8596 URL: <http://www.mani.co.jp>

大阪本社 ■ 〒564-8650 大阪府吹田市垂水町3丁目33番18号 Tel: 06-6380-2525
東京本社 ■ 〒110-8513 東京都台東区上野2丁目11番15号 Tel: 03-3834-6161

FREE ARM ARTEO

口腔外用サククション
【フリーアーム・アルテオ】

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: 222AHBZX00018000号 (管理医療機器)

株式会社 東京技研

URL: <http://www.tokyogiken.com> e-mail: TG@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。 ■ 高圧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。



大白歯CAD/CAM冠(健保適用)

セラスマート300はCAD/CAM冠用材料(Ⅱ)として523点を算定できるCAD/CAM冠用ブロックです

GC



CAD/CAM用高靱性ハイブリッドブロック

セラスマート®

300

「セラスマート」は第3世代へ



セラスマート 300

検索

発売元 株式会社 ジーシー / 製造販売元 株式会社 ジーシーデンタルプロダクツ
東京都文京区本郷3丁目2番14号 愛知県春日井市鳥居松町2丁目285番地

管理医療機器 歯科切削加工用レジン材料
228AABZX00116000

DIC(デンタルインフォメーションセンター) お客様窓口 ☎ 0120-416480 受付時間 9:00a.m.~5:00p.m.(土曜日、日曜日、祭日を除く)
東京都文京区本郷3丁目2番14号 〒113-0033 ※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。

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

※掲載の内容は、2018年1月現在のものです。※色調は印刷のため、現品と若干異なることがあります。

www.gcdental.co.jp/



歯科専用設計
だから使いやすい



より使いやすく
より高画質に
パワーアップして

新登場!!

デジタル口腔撮影装置

EyeSpecial C-III

アイスペシャルC-III

1台 ¥250,000

専用サイト

<http://www.shofu.co.jp/eyespecialc3/>

価格は2017年12月現在の標準医院価格(消費税抜き)

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



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)

●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



医療機器認証番号 228ALBZX00008000
管理医療機器 特定保守管理医療機器

チャンバーは 22ℓ の大容量!
クラス B オートクレーブ リサ 22ℓ

■エコドライブプラス機能

被滅菌物の重量に応じて乾燥時間を自動的に調節

■お急ぎサイクル機能

緊急時の滅菌に対応
(未包装のハンドピース0.6kgまで)

■22ℓの大容量チャンバー

チャンバーサイズは従来機種より30%アップ
しかも滅菌時間は約31分(2kgの被滅菌物の場合)

■EN規格適合

小型オートクレーブに関するEN規格
「EN13060」に適合



充実機能の

クラス B オートクレーブ
リサ



感染予防

500ℓ/分の循環水量による強力な洗浄力! ミーレジェットウォッシャー

■洗浄力

循環水量500ℓ/分と様々なモニタリング機能による確実な洗浄

■ハンドピース内部の洗浄・水分除去

(PG8581) ハンドピース内部の洗浄と余熱乾燥機能

(PG8591) ハンドピース内部の洗浄とホットエアによる強制乾燥機能

■充実の標準装備

軟水化装置、DOSモジュールを標準で内蔵装備

■ISO規格適合

ウォッシャーディズインフェクターに関するISO規格
「ISO15883/1」「ISO15883/2」に適合

ミーレジェットウォッシャーは3タイプ



PG8591

大容量タイプ
ドライブラス
(ホットエア乾燥機能)



PG8581

大容量タイプ
エコドライ
(余熱乾燥機能)



G7831

省スペースタイプ



製造販売届出番号 1482X10032000016, 1482X10032000017, 13B2X10032000010 一般医療機器



白水貿易株式会社

<http://www.hakusui-trading.co.jp/>

〒064-0824 札幌市中央区北4条西20丁目2番1号 Nord 420BLD1F ☎(011)616-5814
〒101-0052 東京都千代田区神田小川町1-11 千代田川南クロス212F ☎(03)5217-4618
〒464-0075 名古屋市千種区山3-10-17 今池セントラルビル2F ☎(052)733-1877
〒532-0033 大阪市淀川区新高1丁目1番15号 ☎(06)6396-4400
〒812-0013 福岡市博多区博多駅前2-18-30/A 重洲博多ビル5F ☎(092)432-4618

Intraoral Scanner
3Shape TRIOS®3 color



DIGITAL Solution TRIOS®3

フルデジタルワークフローの実現！

- ・高精度かつ高速な印象採得で快適なチェアタイムを提供
- ・デジタルスキャンで従来法でのエラーを最小化
- ・印象採得の簡便化
- ・デジタルワークフローによる効率化とチェアタイムの短縮
- ・印象マテリアルの削減
- ・オープンシステムがもたらす 将来への展望



販売名：TRIOS 3 オーラルスキャナ
 一般的名称：デジタル印象採得装置
 承認番号：22800RZ00042000
 外国製造医療機器特別承認取得者：3Shape TRIOS A/S (デンマーク)
 医療機器外国製造業者：3Shape TRIOS A/S (デンマーク)、3Shape Poland Spzoo. (ポーランド)
 選任外国製造医療機器製造販売業者：株式会社MICメディカル

ストローマン・ジャパン株式会社
 〒108-0014 東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル6階

straumann
 simply doing more

治すだけじゃない、守るという方法もあります。

全米スタンダードの
 予防歯科システム

【CAMBRA™】

※全米65校中40校導入

【CAMBRA™の詳細はここSS】



ハイドロキシアパタイト
 ナノ粒子

pH調整剤

抗菌剤

CAMBRA™
 SYSTEM

フッ化物

キシリトール

予防歯科 CAMBRA™ 支援システム
CariScreen 【カリスクリーン】
 チェアサイドで口腔内の清掃状態をわずか15秒で測定。
 口腔内の清掃状態を数値で見ることができ、
 患者さんのモチベーション向上に。

キシリトール・
 ハイドロキシアパタイト配合の
 歯みがきジェル

● pH調整剤
 ● ハイドロキシアパタイト
 ● キシリトール



BALANCE 患者と歯科医師のための口腔管理ガイド
 キム・クータ著
 Y Kim Kutsch, DMD アメリカ産「BALANCE」の著者
 フェザーストーン教育が提供された CAMBRA™ システムを
 病院で実践されている第一人者

歯みがきジェル
CTX3ジェル

販売元：株式会社 **354** 東京都台東区上野7-6-9 TEL.0120-178-148 (コンタクトセンター)



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

よりよい品質と
新たな信頼を求めて



株式会社YDM

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

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。
- 咬合器を逆さにしても、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
 ボンウィル三角の一辺 110mm
 矢状軸傾斜角 0~60° (5° 刻み)
 側方軸路角 (ペネット角) 0~30° (5° 刻み)
 ハルクウィル角 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

編集委員会

委員長 石井久淑
越智守生・斎藤隆史・溝口 到

(アイウエオ順)

北海道医療大学歯学雑誌 第36巻 第2号

平成29年12月31日

発行者 中 澤 太

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：iryu-ds@hoku-iryu-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

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido
VOL.36, NO.2, DECEMBER, 2017
CONTENTS

REVIEW

- 1 **Prospects and Significance of Oral *Veillonella***
Futoshi NAKAZAWA (75)

ORIGINAL

- 17 **The relationship between formative and overall evaluations in the self-assessments of students through prosthodontics practical training of partial dentures**
Katsuya KAWANISHI, Hideki AITA, Mai KONO, Mizuho SASAKI, Kenya ASAHIRO, Masahisa NAKAMOTO, Masao YAMAZAKI, Yuki KAN, Kenjiro NAKAMURA, Kunio MATSUBARA, Yoshifumi TOYOSHITA, Yukio ITO, Hisashi KOSHINO (91)

Mini Review

- 27 **Epithelium-derived antimicrobial peptide RNase 7 in oral health and disease : A mini-review**
Puja NEOPANE, Koki YOSHIDA, Bhoj Raj ADHIKARI, Fumiya HARADA, Durga PAUDEL, Tetsuro MORIKAWA, Aya ONISHI, Daichi HIRAKI, Jun SATO, Michiko NISHIMURA, Yoshihiro ABIKO (101)

Protocol

- 35 **Analysis of 16S rRNA oral bacterial flora using next-generation sequencer : A tutorial paper**
Osamu UEHARA, Rie TAKAI, Fumiya HARADA, Aya ONISHI, Seiko TORAYA, Daichi HIRAKI, Tetsuro MORIKAWA, Yoshihito KURASHIGE, Minako KAJI, Nobuyoshi KITAICHI, Masato SAITOH, Yoshihiro ABIKO, Itsuo CHIBA (109)

DENTAL INFORMATION

- 47 **Recent topics** (121)