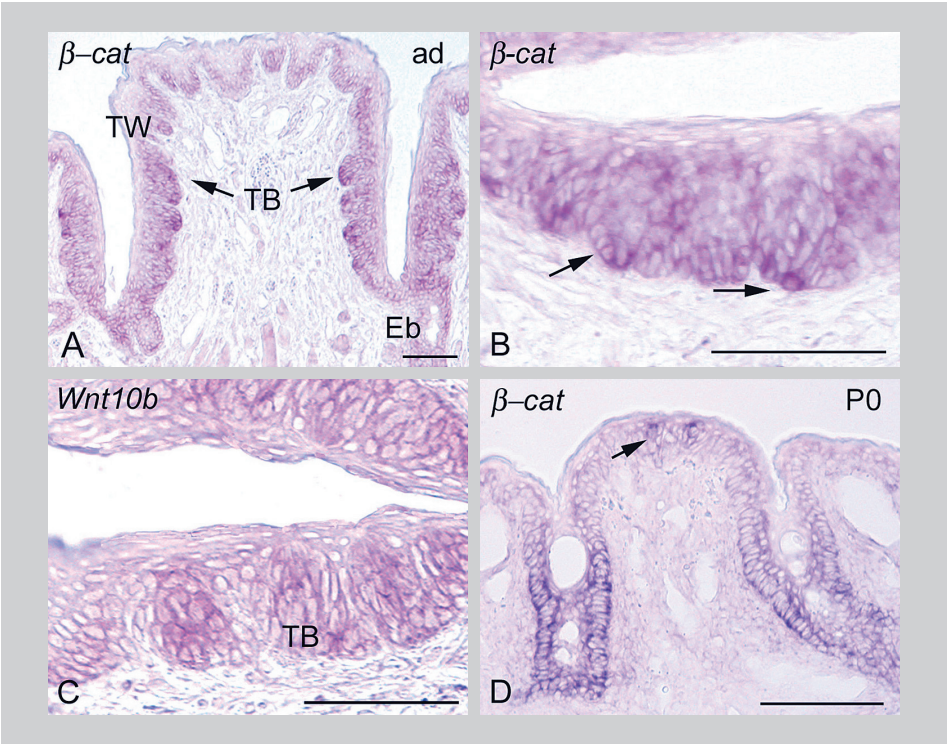
第31巻／第２号

平成24年12月
ISSN 1880-5892

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31巻　第２号　平成24年12月



北医療大歯誌
第31巻／第2号
pp. 63–138
平成24年12月

北海道医療大学歯学会
The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

北海道医療大学歯学会役員

会　　長　有末　眞
専務理事　越智守生
常任理事　安彦善裕・齊藤正人（庶務担当）
　　遠藤一彦・谷村明彦（会計担当）
　　田隈泰信・坂倉康則（編集担当）
　　越野　寿・入江一元（企画担当）
監　　事　江口正尊・東城庸介

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Makoto ARISUE
Vice President : Morio OCHI
Directors : Yoshihiro ABIKO, Masato SAITO,
Kazuhiko ENDO, Akihiko TANIMURA,
Taishin TAKUMA, Yasunori SAKAKURA,
Hisashi KOSHINO, Kazuharu IRIE
Auditors : Masataka EGUCHI, Yosuke TOJYO

Editorial Board

Editor-in-Chief : Taishin TAKUMA
Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Takanori SHIBATA,
Yosuke TOJYO, Itaru MIZOGUCHI

Address of Editorial Board

Taishin TAKUMA
Division of Biochemistry, Department of Oral Biology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido,
Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan
E-mail:takuma@hoku-iryo-u.ac.jp
Phone:+81 133-23-2394; Fax:+81 133-23-1391

北海道医療大学歯学雑誌
第31巻　第２号　平成24年12月
目　　次

〔原著〕

1　Expression and activation of β-catenin in developing and denervated taste buds
Yuko SUZUKI, Hiroaki TSUNEKAWA, Nobuko OBARA, Kazuharu IRIE, and Shunichi SHIBATA ……(63)

11　The wire method for generating experimental biofilms formed by oral *Streptococcus* and *Veillonella* species
Izumi MASHIMA & Futoshi NAKAZAWA ……(73)

19　ヒト歯根膜由来線維芽細胞におけるfibrillin-１の発現抑制がversicanのmRNAとタンパク質発現およびタンパク質の局在へ及ぼす影響
永坂　　萌，鳥谷奈保子，敦賀　英知，坂倉　康則，溝口　　到……(81)

27　表面形状基準法により抽出した顔面正中矢状平面の再現性と妥当性–CT DICOMデータを用いた検討–
辻　　祥之，上地　　潤，武田　成浩，今野　正裕，北所　弘行，溝口　　到，柴田　考典……(89)

〔総説〕

41　A Description of Dental Health in Indonesia
Herastuti SULISTYANI and Futoshi NAKAZAWA ……(103)

〔学位論文〕

47　ヒト歯根膜由来線維芽細胞の伸展刺激に対するfibrillin-1およびversicanの発現変化
永坂　　萌 ……(109)

49　矯正学的歯の移動に伴うセメント質関連細胞の細胞死と歯根吸収の組織学的観察
松沢　史宏 ……(111)

52　FGF-2及びBMP-2がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響
上與那原　朝秀 ……(114)

55　化学修飾法によるチタン表面の生体活性化
門　　貴司 ……(117)

58　歯周病関連細菌*Porphyromonas gingivalis*の血管内皮への付着機構の解析
小松　寿明 ……(120)

61　ヒト角化上皮細胞の分化誘導における物理的・化学的防御機構の変化
村井　雄司 ……(123)

〔歯学情報〕

64　最近のトピックス ……(126)

67　北海道医療大学歯学会会則 ……(129)

69　北海道医療大学歯学雑誌　投稿規程 ……(131)

76　編集後記 ……(138)

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido
VOL. 31, NO. 2, DECEMBER, 2012

CONTENTS

ORIGINAL

1 **Expression and activation of β-catenin in developing and denervated taste buds**
Yuko SUZUKI, Hiroaki TSUNEKAWA, Nobuko OBARA, Kazuharu IRIE, and Shunichi SHIBATA ……(63)

11 **The wire method for generating experimental biofilms formed by oral *Streptococcus* and *Veillonella* species**
Izumi MASHIMA & Futoshi NAKAZAWA ……(73)

19 **Effects of underexpression of fibrillin-1 on mRNA and protein expression and protein localization of versican in human periodontal ligament fibroblasts**
Moe NAGASAKA, Naoko TORIYA, Eichi TSURUGA, Yasunori SAKAKURA, Itaru MIZOGUCHI ……(81)

27 **Reproducibility and appropriateness of the facial midsagittal plane extracted by a surface−based method −Evaluation using the CT DICOM data−**
Yoshiyuki TSUJI, Jun UECHI, Shigehiro TAKEDA, Masahiro KONNO, Hiroyuki KITAJO, Itaru MIZOGUCHI and Takanori SHIBATA ……(89)

REVIEW

41 **A Description of Dental Health in Indonesia**
Herastuti SULISTYANI and Futoshi NAKAZAWA ……(103)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

47 **Effect of stretching stimulus on fibrillin-1 and versican expression in human periodontal ligament fibroblasts**
Moe NAGASAKA ……(109)

49 **Histological observation of the cell death of cementum−related cell and the root resorption of the during experimental tooth movement**
Fumihiro MATSUZAWA ……(111)

52 **Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells**
Tomohide UEYONAHARA……(114)

55 **Chemical modification of titanium surface**
Takashi KADO……(117)

58 **E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to human endothelial cells**
Toshinori KOMATSU ……(120)

61 **Effect of differentiation enhances barrier function in human keratinocyte**
Yuji MURAI……(123)

DENTAL INFORMATION

64 **Recent topics** ……(126)

〔Original〕

Expression and activation of β-catenin in developing and denervated taste buds

Yuko SUZUKI,[1)] Hiroaki TSUNEKAWA,[2)] Nobuko OBARA,[3)] Kazuharu IRIE,[3)] and Shunichi SHIBATA[4)]

1）Division of Biostatistics, Department of Clinical Psychology, School of Psychological Science, Health Sciences University of Hokkaido
2）Tsunekawa Dental Clinic
3）Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
4）Maxillofacial Anatomy, Department of Maxillofacial Biology, Graduate School, Tokyo Medical and Dental University

Abstract

Wnt/β-catenin signaling is critical for the development of a broad range of epithelial tissues, including taste papillae. The taste buds are also responsive to Wnt/β-catenin signaling ; however, its involvement in developing and denervated taste buds has not been explored. In the present study, the expression patterns of activated β-catenin, Wnt, and its receptor, Frizzled (Fzd), in the mouse taste buds were determined by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. Activated β-catenin, detected as a cytoplasmic accumulation, and its translocation to the nucleus were observed in sonic hedgehog (Shh)-immunoreactive (IR) basal cells and in a few intragemmal cells. Among Fzd molecules, immunoreactive Fzd-1 and -3 were observed in the entire membranes of the taste bud cells. Also, *Wnt10b* mRNA was expressed in throughout the cytoplasm of the taste bud cells. After bilateral glossopharyngeal nerve transection, nuclear β-catenin and Fzd-1 and -3 were expressed in the entire of regenerating taste buds at 21 days. At 28 days, β-catenin positive nuclei were found in basal half of the taste buds, involving in the basal cells and Sox2-IR cells. At postnatal day (P) 2, nuclear β-catenin was expressed in the immature, developing taste buds. Immunoreactive Fzd-1 and -3 were observed in some of the β-catenin-IR cells. At P4-P10, cells with β-catenin-positive nuclei became restricted to the basal region of the taste buds ; whereas Fzd-1 and -3 became expressed in the entire taste buds. Fzd-7- and -8-immunopositive cells were observed in the taste buds at P3-P10, but these cells in the adult were negative for these receptors or weakly immunopositive for them. These data suggest that increased β-catenin transcriptional activity during early development and regeneration processes promoted the differentiation of basal cells and immature cells to become elongated taste bud cells. Moreover, the expression of several Fzd receptors was either up- or down-regulated during taste bud development.

Key words：β-catenin, *Wnt10b*, Frizzled, taste buds, *in situ* hybridization, immunohistochemistry

Introduction

β-catenin is the cytoplasmic protein in adhesions junctions and interacts with the cadherin proteins (Weis and Nelson, 2006) and it is also the key protein in the canonical Wnt signaling pathway. Wnt comprises a large family of secreted ligands that activate several receptor-mediated pathways (Cadigan and Liu, 2006). In the Wnt/β-catenin pathway, the binding of Wnt ligands to Frizzled (Fzd) receptors and low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP) family coreceptors causes the accumulation of cytoplasmic β-catenin and its translocation to the nucleus, resulting in transcriptional activation effected by complexes of β-catenin and Lef or Tcf transcription factors. Wnt/β-catenin signaling is a key pathway in development, adult tissue homeostasis and disease (Clevers, 2006), e.g., controlling stem cell proliferation and differentiation in the nervous system

受付：平成24年9月6日　受理：平成24年10月22日

(Galceran et al., 2000 ; Hirabayashi et al., 2004), in hair follicles (Van Mater et al., 2003), in tooth germs (Obara et al., 2006 ; Liu and Millar, 2010), and in tongue epithelium (Schneider et al., 2010).

Lingual taste buds develop within 3 different types of tongue papillae : fungiform, foliate and circumvallate. In the mouse, fungiform papillae form in a stereotypical array on the dorsal lingual surface. Wnt/β-catenin signaling is known to regulate papilla induction and number during embryonic development (Liu et al., 2007), and it is also required for embryonic taste bud development (Iwatsuki et al., 2007 ; Liu et al., 2007). Among the Wnt family, which includes 19 members in mammals, *Wnt10b* is known to activate Wnt/β-catenin signaling during formation of embryonic gustatory papillae (Iwatsuki et al., 2007). However, its expression in the taste buds in the adult has not been examined. *Wnt5a* is a member known to act in the non-canonical Wnt pathway ; and in mice with its mutated form, their tongue is severely shortened, thus affecting the number of papillae (Liu et al., 2012). As regards the receptors for Wnt proteins, the Fzd family, includes 10 members in mammals ; and yet, little is known about their expression in gustatory papillae formation and in the taste buds. Mature taste buds are composed of different cell types, i.e., types-I, -II, -III, and basal cells. The basal cells are the progenitors of type-I, -II, and -III cell and express sonic hedgehog (Shh, Miura et al., 2006). Using the BAT-gal mouse line (Maretto et al., 2003), which expresses β-galactosidase (β-gal) in the presence of activated β-catenin, Gaillard and Barlow (2011) found β-catenin activity in the basal cells and in a subset of each of the type-I, -II, -III cell populations. They suggested that the presence of activated β-catenin in these cell types was for the renewal of taste bud cells.

Taste buds develop postnatally in the trench wall of circumvallate papillae of mice (Suzuki et al., 2010a ; Suzuki et al., 2011). After glossopharyngeal nerve transection, taste buds die and disappear from the trench wall and subsequently regenerate after regenerated nerve fibers appear in the trench wall (Yee et al. 2005 ; Suzuki, 2008 ; Suzuki et al., 2010b). As little is yet known about the expression of activated β-catenin in the taste buds during postnatal development or after nerve transection, in the present study we examined the expression patterns of β-catenin, Wnt10b, Wnt5a and Fzd family members in the mouse taste buds.

Materials and methods

Animals and tissues

Adult and pregnant ICR mice were obtained from Sankyo Laboratories (Tokyo, Japan). They were maintained in a heat- and humidity-controlled vivarium with food and water provided *ad libitum*. Experimental protocols concerning animal handling were reviewed and approved by the Animal Ethics and Research Committee of the Health Sciences University of Hokkaido.

For immunohistochemistry and *in situ* hybridization, mice of postnatal day (P)2-P10 and those of 1.5-3 months of age were deeply anesthetized and then perfused through the left ventricle with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate-buffered saline (PBS). Tongues were then removed and fixed further in the same fixative for several hours or overnight at 4°C. Each specimen was washed in PBS, cryoprotected with 25% sucrose, embedded in OCT compound (Tissue Tek, Miles Elkhart, IN), and frozen in a spray freezer (Oken, Tokyo). The tissues were sectioned sagittally or frontally at a thickness of 8-10 μm in a cryostat. The sections were then collected and placed on silane-coated slides.

Glossopharyngeal nerve transection

To assess the effects of nerve loss on the expression of β-catenin in taster bud cells, the glossopharyngeal nerves were bilaterally transected after the mice had been anesthetized by an intraperitoneal injection of Somnopentyl (Kyoritsu, Tokyo ; 50 mg/kg body weight). An incision was made in the ventral aspect of the neck. The submandibular and sublingual glands were retracted with the skin to expose the digastrics muscles. The stylohyoid muscle, which lies beneath the digastrics muscles, was pulled aside to expose the glossopharyngeal nerve. The bilateral glossopharyngeal nerves were then cut. Groups of animals were sacrificed at 11, 21, and 28 days after surgery.

Riboprobes and *in situ* hybridization

Sections were washed in PBS and treated for 10 minutes with 0.2N HCl and then for 5 minutes with protein-

ase K (1 μg/ml). They were then washed in PBS and refixed for 20 minutes in 4% PFA. Next, the sections were prehybridized for 1 hour at room temperature in a hybridization buffer containing 50% formamide, 1.3 x standard saline citrate (SSC), 5 mM EDTA, 0.5% CHAPS, 0.1% Tween-20, 1% blocking reagent, 100 μg/ml tRNA, and 50 μg/ml heparin. Hybridization was performed overnight at 65°C in a hybridization buffer containing antisense riboprobe. For the control, other sections were hybridized with sense riboprobe. The hybridized sections were washed at 65° C in 2×SSC for 1 hour and thereafter in 0.1×SSC for 1 hour. After a wash in PBS, they were next incubated with a 1% concentration of blocking reagent (Roche Diagnostics, Manheim, Germany) for 1 hour at room temperature and subsequently incubated overnight at 4° C with alkaline-phosphatase-conjugated anti-digoxigenin (DIG) Fab fragments (Roche) diluted 1 : 500 in PBS. After 3 washes in PBS, chromogenic reactions were carried out by using nitro-blue tetrazolium / 5-bromo-4-chrolo-3-indolyl-phosphate (Roche). We used the cDNA of the following genes as *in situ* hybridization probes : 5'-CCTTTCAGATGCAG CGACTAA-3' and 5'-GTCCTCGGATACAATCCGG-3' (617bp NM_007614) for β-catenin, 5'-AGGGGCTG CACATCGCCGTT-3' and 5'-GCAGCGCTCCACTCG CGTCT-3' (872bp NM_011718) for Wnt10b, and 5'-CAGTCAGACCGAACGCTGT-3' and 5'-CACCGGCT CCCCAATATCA-3' (901bp NM_009524) for Wnt5a. The PCR products were cloned into *Hind* III / *Eco* RI (Wnt10b, Wnt5a) *Hind* III/*Bam* HI (β-catenin) sites of pT7/T3 DH5α (TOYOBO, Osaka, Japan) and sequenced. DIG-labeled antisense and sense probes were produced by use of an RNA transcription kit (Roche).

Immunohistochemistry

Prior to immunostaining, the sections were reacted with a protein-blocking reagent (Dako, Glostrup, Denmark) for 20 minutes at room temperature. For double-staining, sections were co-incubated overnight at 4°C with the following commercially obtained primary antibodies at a dilution of 1 : 100 : (1) mouse anti-β-catenin antibody (BD Transduction Laboratories, San Jose, CA) +goat anti-shh antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN), (2) mouse anti-β-catenin antibody + goat anti-Fzd-1 antibody (R&D Systems), (3) mouse anti-β-catenin antibody + goat anti-Fzd-3 antibody (R&D Systems), (4) mouse anti-β-catenin antibody + goat anti-Fzd-4 antibody (R&D Systems), (5) mouse anti-β-catenin antibody + goat anti-Fzd-6 antibody (R&D Systems), (6) mouse anti-β-catenin antibody + goat anti-Fzd-7 antibody (R&D Systems), (7) mouse anti-β-catenin antibody + goat anti-Fzd-8 antibody (R&D Systems), (8) mouse anti-β-catenin antibody + anti-PGP 9.5 polyclonal sheep antibody (Ultraclone, Wellow, UK), (9) mouse anti-β-catenin antibody + anti-Sox2 polyclonal rabbit antibody (Chemicon, Temecula, Calif.). Propidium iodide (PI, Molecular Probes, Eugene, OR) was used to stain cell nuclei. Some sections were processed for antigen retrieval with target retrieval solution (Dako) for 5 minutes at 105°C before treatment with primary antibody. After having been rinsed in PBS, the sections were incubated for 2 hours at room temperature with the following secondary antibodies : donkey anti-mouse IgG labeled with Alexa Fluor 568 + donkey anti-goat IgG labeled with Alexa Fluor 488 (Molecular Probes), donkey anti-mouse IgG labeled with Alexa Fluor 488 + donkey anti-goat IgG labeled with Alexa Fluor 568, donkey anti-mouse IgG labeled with Alexa Fluor 488 + donkey anti-rabbit IgG labeled with Alexa Fluor 568 at a dilution of 1 : 200. For fluorescence microscopic observation, the sections were washed in PBS, mounted on slides with PermaFluor (Thermo, Pittsburgh, PA), and viewed with a Leica TCS-NT confocal laser scanning microscope with a Leica Plan Apo×40 objective (NA= 1.25-0.75). As a control, PBS was used instead of primary antibodies.

Results

***In situ* hybridization**

In adult mice, *β-catenin* expression was observed in the epithelium and in the taste buds of circumvallate papillae (Fig.1A). At higher magnification of the trench wall, *β-catenin* was seen to be strongly expressed in the basal region of the taste buds (Fig.1B). *Wnt10b* was expressed throughout the taste buds (Fig.1C). At P0, strong expression of *β-catenin* was observed in elongating trenches and taste bud primordia at the papillary surface (Fig.1D). *Wnt5a* was not expressed in the taste buds of the circumvallate papillae. Sections incubated with sense riboprobes for β-*catenin* and *Wnt10b* dis-

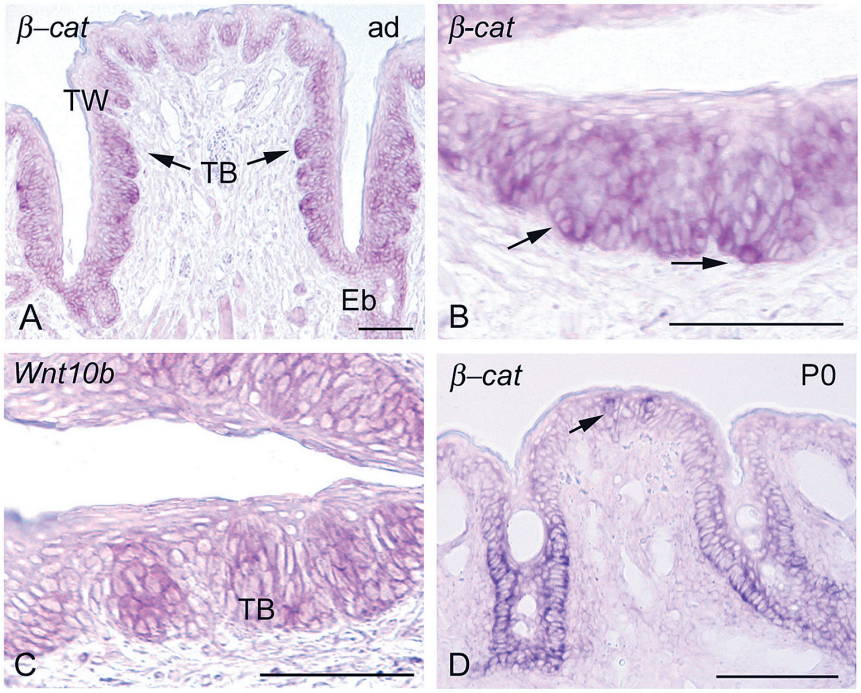


Fig.1 *In situ* hybridization with *β-catenin* and *Wnt10b* antisense probes of sections of circumvallate papillae of adult **(A-C)** and P0 mice **(D)**. **A**. Expression of *β-catenin* in the taste buds (TB) and the epithelium of a circumvallate papilla. **B**. Higher magnification of trench wall epithelium in "**A**", showing strong expression in the basal region of the taste buds (arrows). **C**. *Wnt10b* is expressed throughout the taste buds (TB). **D**. Expression of *β-catenin* at P0 is evident in the trench wall epithelium and in the taste bud primordia (arrow). Eb, von Ebner's gland. Scale bar, 100 μm

played no reactivity (not shown).

Activated β-catenin in the taste buds

Anti-β-catenin antibody reacted with membranes of the taste bud cells and weakly with the trench wall epithelium. A strong reaction was observed in a cell population in the basal region of the taste buds (Fig.2A). Double labeling with anti-β-catenin antibody and PI, a nuclear marker (Fig.2B), revealed the presence of β-catenin in the nucleus of cells in the basal region of the taste buds, roughly 3 immunopositive cells per bud section (Fig.2C). Anti-Shh antibody was used to detect the basal cells (Fig.2E). The basal cells, and also Shh-negative, intragemmal cells were positive for nuclear β-catenin-, namely activated β-catenin (Fig.2D, F). Fzd-1 imunoreactivity was observed in the cell membranes of all taste bud cells (Fig.2H). Cells positive for nuclear β-catenin (Fig.2G) were also Fzd-1-IR ones (Fig.2I). Also, Fzd-3-immunoreactivity was observed in the cell membranes of all taste bud cells (Fig.2K). The Fzd-3-IR cells contained β-catenin positive nuclei (Fig.2J, L). Fzd -7 immunoreactivity was observed in the basal cells of the surrounding epithelium (Fig.2N), but not in the β-catenin-positive nuclei (Fig.2M, O). Antibodies against other Fzd molecules, such as Fzd-4 and -6, were not immunoreactive with the taste buds. Anti-Fzd-8 antibody stained taste buds very weakly (not shown).

Activated β-catenin in the regenerating taste buds

After bilateral transection of the glossopharyngeal nerve, cells of taste buds die and disappear progressively from the trench wall epithelium. By 11 days after transection, most of the taste buds had disappeared from the trench wall. A few regenerated taste buds appeared at 21 days, and nerve fibers had entered into the taste buds (Fig.3B). The regenerated taste buds were located from the basal to middle region of the epithelium and showed nuclear β-catenin (Fig.3A, C). Also at this stage, Fzd-1 immunoreactivity was observed in the papillary epithelium and in the regenerated taste bud cells (Fig.3E). These Fzd-1-IR cells possessed β-catenin-positive nuclei (Fig.3 D, F). Also, Fzd-3 immunoreactivity was observed to be similar to that for Fzd-1 (not shown). At this stage, other Fzd-1-IR-cells were found apically in the trench wall (Fig.3E), probably remaining, surviving taste cells (Suzuki et al. 2010b). By 28 days after transection, the regenerated taste buds had increased in number, and β-catenin-positive nuclei were

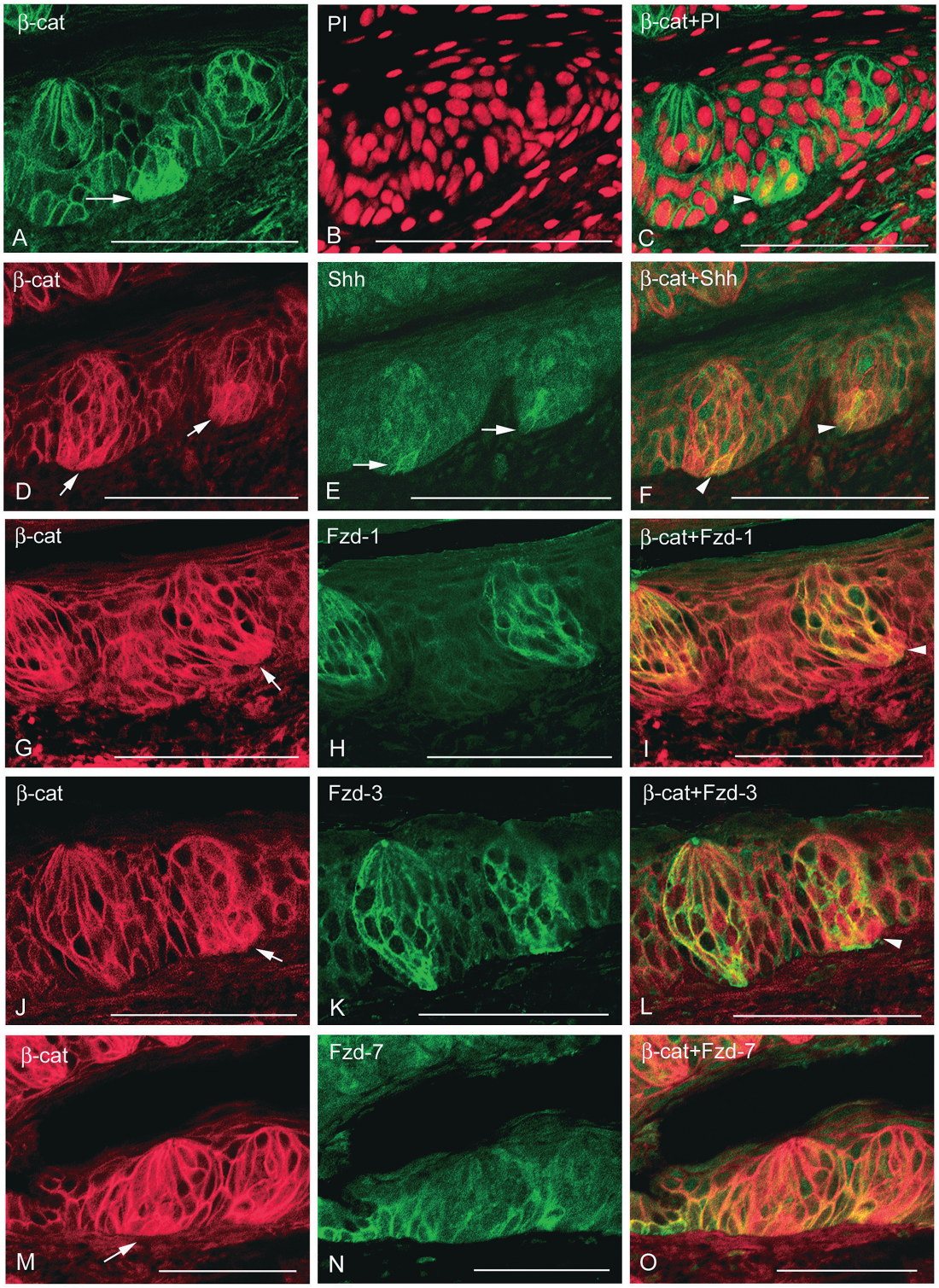


Fig.2 Confocal laser scanning microscopic images of sections of taste buds of circumvallate papillae from the adult mice. **A-C**. Double labeling with anti-β-catenin antibody **(A)** and PI, a nuclear marker **(B)**. β-catenin immunoreactivity is seen in the membrane of the taste bud cells **(A)**, strongly in a few basally located cells **(A**, arrow). Merged image **(C)** shows the presence of nuclear β-catenin in the basal region **(C**, arrowhead). **D-F**. Double labeling with anti- β-catenin **(D)** and anti-Shh **(E)** antibodies, showing activated β-catenin **(D**, arrows) and Shh-positive basal cells **(E**, arrows). Merged image **(F)** shows the basal cells possess β-catenin positive nuclei **(F**, arrowheads). **G-I**. Double labeling with anti-β-catenin **(G)** and anti-Fzd-1 **(H)** antibodies, showing activated β-catenin **(G**, arrow) and Fzd-1-IR cells in the membrane of all of the taste bud cells **(H)**. Merged image **(I)** shows Fzd-1-IR cells with nuclear β-catenin in the basal region (arrowhead). **J-L**. Double labeling with anti-β-catenin **(J)** and anti-Fzd-3 **(K)** antibodies. Nuclear β-catenin is seen **(J**, arrow). Merged image **(L)** shows Fzd-3-IR cells with nuclear β-catenin in the basal region **(L**, arrowhead). **M-O**. Double labeling with anti-β-catenin **(M)** and anti-Fzd-7 **(N)** antibodies. Merged image **(O)** shows Fzd-7-IR cells are devoid of nuclear β-catenin **(M**, arrow). Scale bar, 100 μm

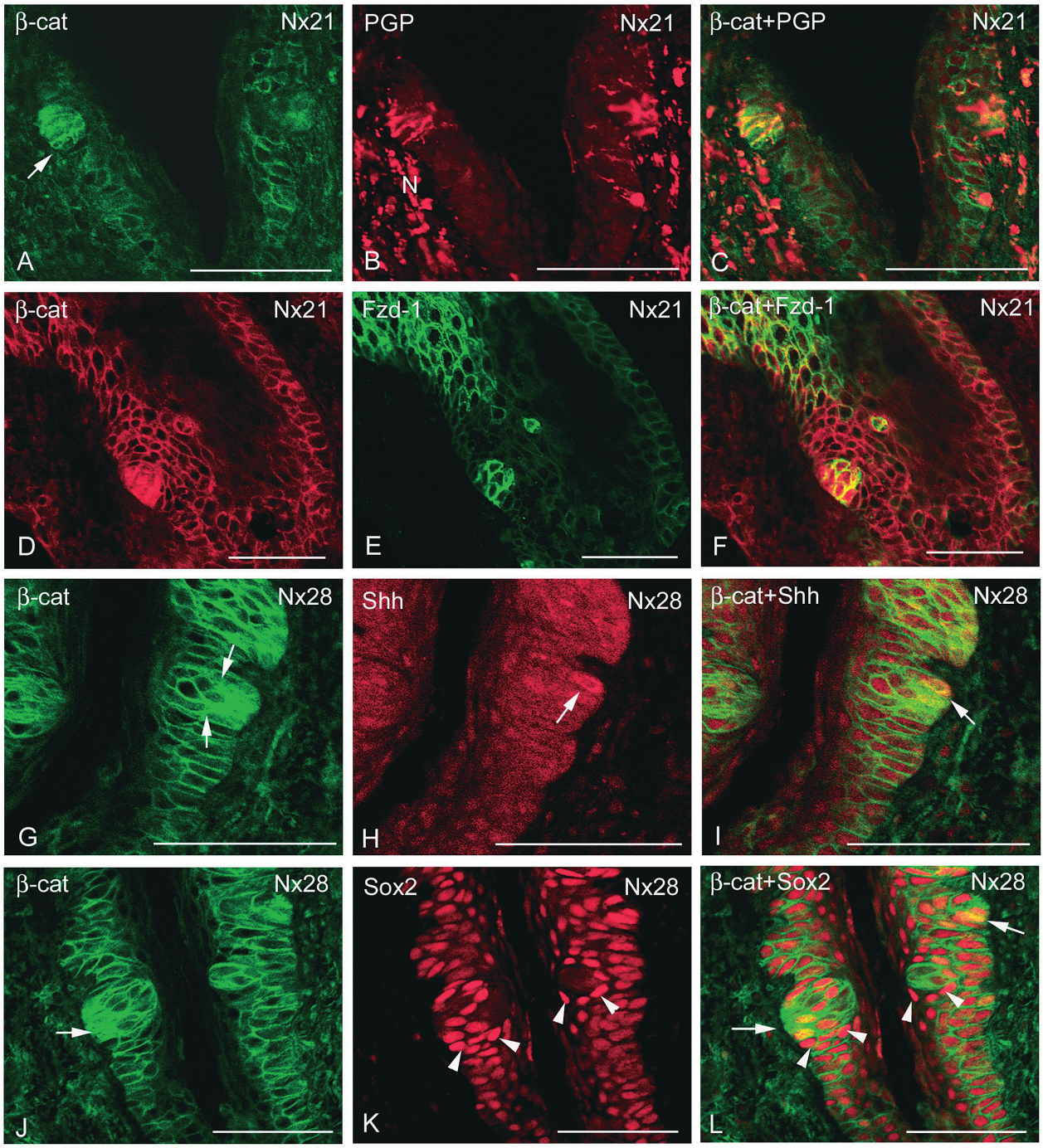


Fig.3 Confocal laser scanning microscopic images of sections of taste buds of circumvallate papillae after glossopharyngeal nerve transection (Nx). **A-F**. 21 days after transection. **A-C**. Double labeling with anti-β-catenin **(A)** and anti-PGP 9.5 **(B)** antibodies. Merged image **(C)** shows nerve fibers (**B**, N) that had entered into the regenerated taste bud cells having β-catenin-positive nuclei (**A**, arrow). **D-F**. Double labeling with anti-β-catenin **(D)** and anti-Fzd-1 **(E)** antibodies. Merged image **(F)** shows Fzd-1-immunoreactivity is seen throughout the regenerating taste buds, the cells of which possess β-catenin-positive nuclei. **G-L**. 28 days after transection. **G-I**. Double labeling with anti-β-catenin **(G)** and anti-Shh **(H)** antibodies. An Shh-positive basal cell is seen (**H**, arrow). Merged image **(I)**shows the presence of β-catenin-positive nuclei (**G**, arrows) and Shh-positive basal cells (**I**, arrow) in the basal half of the taste buds. **J-L**. Double labeling with anti-β-catenin **(J)** and anti-Sox2 **(K)** antibodies. The basal half of the taste buds contains cells positive for nuclear β-catenin (**J**, arrow). Sox2-IR cells are seen both in the perigemmal (**K**, arrowheads) and intragemmal regions. Merged image **(L)** shows intragemmal Sox2-IR cells that contain nuclear β-catenin (arrows). Sox-2-IR perigemmal cells are negative (arrowheads). Scale bar, 100 μm

observed in the middle to basal region of the taste buds (Fig.3G), which included the basal cells (Fig.3H, I). Strong Sox2 immunoreactivity was observed in the nuclei of the perigemmal epithelial cells and in some of the taste bud cells (Fig.3K). The nuclei of intragemmal Sox2-IR cells were β-catenin positive (Fig.3J, L),

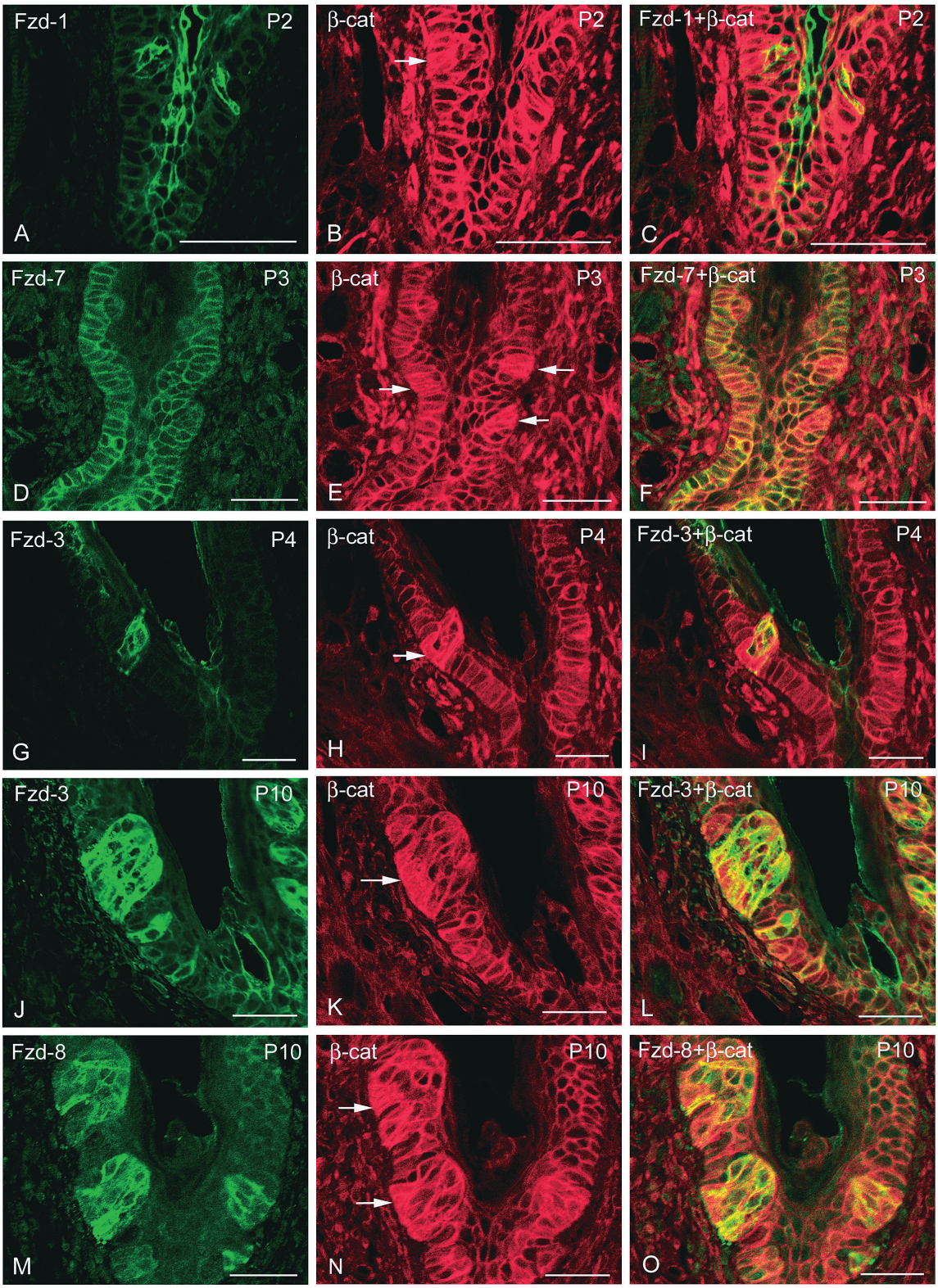


Fig.4 Confocal laser scanning microscopic images of sections of taste buds of circumvallate papillae of developing mice. **A-C**. P2. Double labeling with anti-Fzd-1 (**A**) and anti-β-catenin (**B**) antibodies. Merged image (**C**) shows Fzd-1-IR cells with β-catenin-positive nuclei (arrow in **B** and **C**). **D-F**. P3. Double labeling with anti-Fzd-7 (**D**) and anti-β-catenin (**E**) antibodies. Merged image (**F**) shows Fzd-7-IR cells contain β-catenin positive nuclei (**E**, arrows). **G-I**. P4. Double labeling with anti-Fzd-3 (**G**) and anti-β-catenin (**H**) antibodies. Merged image (**I**) shows nuclear β-catenin in cells in the basal region (**H**, arrow), which cells are partly devoid of Fzd-3-IR. **J-L**. P10. Double labeling with anti-Fzd-3 (**J**) and anti-β-catenin (**K**) antibodies. Merged image (**L**) shows β-catenin positive nuclei (**K**, arrow) within Fzd-3-IR cells. **M-O**. P10. Double labeling with anti-Fzd-8 (**M**) and anti-β-catenin (**N**) antibodies. Merged image (**O**) shows β-catenin-positive nuclei (**N**, arrows) within Fzd-8-IR cells. Scale bar, 50 μm

whereas those of perigemmal Sox2-IR cells were negative for nuclear β-catenin (Fig.3L).

Activated β-catenin and Frizzled in the developing taste buds

At P0, weak immunoreactivity indicating Fzd-1 appeared in the epithelia of papillae and the trench wall as well as that for β-catenin. At this stage, *β-catenin* mRNA was strongly expressed in the trench wall epithelium (Fig.1D), but nuclear β-catenin was not observed in it (not shown). The taste bud primordia were present at the papillary surface, but soon disappeared from that region. At P2, a few taste buds appeared in the trench wall. Strong immunoreactivity for Fzd-1 was observed in the trench wall (Fig.4A). Also, staining for nuclear β-catenin was positive probably in the entire region of developing taste buds (Fig.4B). Double labeling revealed that Fzd-1 immunoreactivity was present in some of the cells with β-catenin-positive nuclei (Fig.4C). At P3, Fzd -7 immunoreactivity was observed in the epithelium including taste buds (Fig.4D). β-catenin-positive nuclei were found in Fzd-7-IR cells (Fig.4E, F). Fzd-7 immunoreactivity disappeared from the taste buds progressively into the adult stage. At P4, expression of nuclear β-catenin was observed mainly in the basal region of the taste buds (Fig.4H). Fzd-3 immunoreactivity was also observed at that time (Fig.4G), but some were devoid of nuclear β-catenin (Fig.4I). At P10, β-catenin-positive nuclei were reduced in number and restricted to the basal region of the taste buds (Fig.4K). Fzd-3 immunoreactivity was observed in all of the taste buds (Fig.4J), and these cells were positive for nuclear β-catenin (Fig.4L). Also, Fzd-1 immunoreactivity was observed in similar manner to Fzd-3 at P4-P10. Fzd-8 immunoreactivity was evident at P4 (not shown) and at P 10 (Fig.4M), and progressively disappeared up to the adult stage. At P10, Fzd-8-IR cells contained nuclear β-catenin (Fig.4N, O).

Discussion

Using *in situ* hybridization and immunohistochemistry, we showed in the present study the expression of activated β-catenin, *Wnt10b* and Fzd family members in the taste buds of mouse circumvallate papillae. In the adult, non-operated mice, the localization of nuclear β-catenin in the basal region of the taste buds was consistent with that found in the previous study using BAT-gal reporter mice (Gaillard and Barlow, 2011). However, cells with nuclear β-catenin were fewer in number than β-gal-positive cells (roughly 3 versus 7 per bud section). Also, by *in situ* hybridization, strong expression of β-catenin mRNA was restricted to a few basally located cells. Wider expression of signals of reporter proteins was observed in nestin/GFP-positive cells in the central nervous system (Yamaguchi et al., 2000), and in Six1/GFP- and Six4/β-gal-positive cells in the taste buds (Suzuki et al., 2010b). The half-life of β-gal is reported to be approximately 13 hours (Jacobson and Willumsen, 1995), but the life-span of taste bud cells including basal cells is from a day to over 3 weeks (Hamamichi et al., 2006 ; Miura et al., 2006). The undetectable level of β-catenin expression might have been amplified to a detectable one in the BAT-gal mice. In the present study, the cell population including Shh-positive basal cells was also positive for nuclear β-catenin. Also, double-labeling for β-catenin and Sox2, the latter being expressed in basal cells and in immature type-I cells (Suzuki, 2008), revealed that β-catenin-positive nuclei might have been those of immature type-I cells. The present study clarified that β-catenin was activated throughout the taste buds in the early stages of regeneration and postnatal development, which activation likely triggered the transcription of target genes in immature taste cells to induce their differentiation. In cultured oligodendroglial cells, insulin-like growth factor (IGF)-I increases the expression of β-catenin protein (Ye et al., 2010). It is likely that β-catenin mediates IGF-I action, which is essential to the growth and development of the taste buds, since *IGF-I receptor* mRNA is expressed in the taste buds at P6 (Suzuki et al., 2005). Moreover, in later stages of development and during the regeneration process, β-catenin showed reduced expression. When its expression ceased, the protein would have been degraded as the cells completed their differentiation.

The present study clarified that *Wnt10b* mRNA was expressed in all of the taste bud cells. *Wnt5a*, which is a non-canonical family member (Grumolato et al., 2010), was not detected. We did not examine other Wnts ; however, Iwatsuki et al (2007) examined the expression

of 15 Wnts (*Wnt1, 2b, 3, 3a, 4, 5a, 5b, 6, 7a, 7b, 9a, 10a, 10b, 11,* and *16*) during formation of embryonic taste papillae. Only *Wnt10b* showed expression in embryonic fungiform papillae (Iwatsuki et al., 2007). Wnt proteins bind to Fzd proteins, which are seven transmembrane G-protein-coupled receptors ; and the canonical Wnt/β-catenin pathway activates β-catenin. Various combinations of Wnt and Fzd families are reported to act in canonical and non-canonical Wnt pathways : Fzd-1, -3, -7, and -8 are coupled to the β-catenin canonical signaling pathway (e.g., Zaghetto et al., 2007). The expression of Fzd-1 and -3 and that of *Wnt10b* in all of the taste bud cells revealed that these proteins comprised Wnt/β-catenin pathway in the adult taste buds. In early postnatal days, a few cells were immmunoreactive for Fzd-1 and -3 and came to be expressed in all of the taste bud membranes as development proceeded. In contrast, Fzd-8 immunoreactivity was found in the taste buds up to P10, and then became weak in the adult. Also, Fzd-7 immunoreactivity was found in the taste buds at P3, and disappeared from the taste buds until adult stage. Fzd-7 and -8 may activate β-catenin in the taste buds together with Fzd-1 and -3 during postnatal development. A change in Fzd expression during development was also reported to occur in the olfactory neurons and olfactory bulb in relation to synapse formation between them (Rodriguez-Gil and Greer, 2008). Moreover, Fzd-7 immunoreactivity was found in both the taste buds and the epithelium in early postnatal days, and only that in the latter remained in the adult. Fzd-7 may be associated with the proliferative/stem cell compartment, as revealed to be the case in the mouse gut epithelium (Gregorief et al., 2005).

In summary, *Wnt10b* and its receptors, Fzd-1 and -3, comprised the Wnt/β-catenin pathway in mouse taste bud cells, which pathway would activate β-catenin to up-regulate the expression of genes involved in early stages of postnatal development and regeneration.

Acknowledgements

This study was supported by the following grants ; 1) HAITEKU Research Center Project for Private Universities : matching fund subsidy from MEXT, 2007-2011 ; 2) Grant-in-Aid for Scientific Research (No.22592044) from Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

References

Cadigan KM, Liu YI. Wnt signaling ; complexity at the surface. J Cell Sci 119 : 395-402, 2006.

Clevers H. Wnt/β-catenin signaling in development and disease. Cell 127 : 469-480, 2006.

Gaillard D, Barlow LA. Taste bud cells of adult mice are responsive to Wnt/β-catenin signaling : implications for the renewal of mature taste cells. Genesis 49 : 295-306, 2011.

Galceran J, Miyashita-Lin EM, Devaney E, Rubenstein JL, Grosschedl R. Hippocampus development and generation of dentate gryrus granule cells in regulated by LEF1. Development 127 : 469-482, 2000.

Gregorieff A, Pinto D, Begthel H, Destree O, Kielman M, Clevers H. Expression pattern of Wnt signaling components in the adult intestine. Gastroenterol 129 : 626-638, 2005.

Grumolato L, Liu G, Mong P, Mudbhary R, Biswas R, Arroyave R, Vijayakumar S, Economides AN, Aaronson SA. Canonical and noncanonical wnts use a common mechanism to activate completely unrelated coreceptors. Genes & Dev 24 : 2517-2530, 2010.

Hamamichi R, Asano-Miyoshi M, Emori Y. Taste bud contains both short-lived and long-lived cell populations. Neurosci 141 : 2129-2138, 2006.

Hirabayashi Y, Itoh Y, Tabata H, Nakajima K, Akiyama T, Masuyama N, Gotoh Y. The Wnt/beta-catenin pathway directs neuronal differentiation of cortical neural precursor cells. Development 131 : 2791-2891, 2004.

Iwatsuki K, Liu H-X, Gründer A, Singer MA, Lane TF, Grosschedl R, Mistretta CM, Margolskee RF. Wnt signaling interacts with Shh to regulate taste papilla development. PNAS 104 : 2253-2258, 2007.

Jacobson KD, Willumsen BM. Kinetics of expression of inducible beta-galactosidase in murine fibroblasts : high initial rate compared to steady-state expression. J Mol Biol 252 : 289-295, 1995.

Liu F, Thirumangalathu S, Gallant NM, Yang SH, Stoick-Cooper CL, Reddy ST, Andl T, Taketo MM, Dlugosz AA, Moon RT, Barlow LA, Millar SE. Wnt-β-catenin signaling initiates taste papilla development. Nature Genesis 39 : 106-112, 2007.

Liu F, Millar SE. Wnt/β-catenin signaling in oral tissue development and disease. JDR 89 : 318-330, 2010.

Liu HX, Grosse AS, Iwatsuki K, Mishina Y, Gumucio DL, Mistretta CM. Separate and distinctive roles for Wnt5a in tongue, lingual tissue and taste papilla development. Dev Biol 361 : 39-56, 2012.

Maretto S, Cordenonsi M, Dupont S, Braghetta P, Broccoli V, Hassan AB, Volpin D, Bressan GM, Piccolo S. Mapping Wnt/Beta-catenin signaling during mouse development and in colorectal tumors. PNAS 100 : 3299-3304, 2003.

Miura H, Kesakabe Y, Harada S. Cell lineage and differentiation in taste buds. Arch Histol Cytol 69 : 209-225, 2006.

Obara N, Suzuki Y, Takeda M. Gene expression of *β-catenin* is up-regulated in inner dental epithelium and enamel knots during molar tooth morphogenesis in the mouse. Cell Tissue Res 325 : 197-201, 2006.

Rodriguez-Gil DJ, Greer CA. Wnt/Frizzled family members mediate olfactory sensory neuron axon extension. J Comp Neurol 511 : 301-317, 2008.

Schneider FT, Schänzer A, Czupalla C, Thom S, Engels K, Schmidt MHH, Plate KH, Liebner S. Sonic Hedgehog acts as a negative regulator of β-catenin signaling in the adult tongue epithelium. Am J Pathol 177 : 404-414, 2010.

Suzuki Y, Takeda M, Sakakura Y, Suzuki N. Distinct expression pattern of insulin-like growth factor family in rodent taste buds. J Comp Neurol 482 : 74-84, 2005.

Suzuki Y. Expression of Sox2 in mouse taste buds and its relation to innervation. Cell Tissue Res 332 : 393-401, 2008.

Suzuki Y, Ikeda K, Kawakami K. Regulatory role of *Six1* in the development of taste papillae. Cell Tissue Res 286 : 513-525, 2010a.

Suzuki Y, Ikeda K, Kawakami K. Expression of Six1 and Six4 in mouse taste buds. J Mol Hist 41 : 205-214, 2010b.

Suzuki Y, Ikeda K, Kawakami K. Development of gustatory papillae in the absence of *Six1* and *Six4*. J Anat 219 : 710-721, 2011.

Van Mater D, Kolligs FT, Dlugosz AA, Fearon ER. Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice. Genes Dev 17 : 1219-1224, 2003.

Weis WI, Nelson WJ. Re-solving the cadherin-catenin-actin conundrum. J Biol Chem 281 : 35593-35597, 2006.

Yamaguchi M, Saito H, Suzuki M, Mori K. Visualization of neurogenesis in the central nervous system using nestin promoter-GFP transgenic mice. NeuroReport 11 : 1991-1996, 2000.

Ye P, Hu Q, Liu H, Yan Y, D'ercole A. Beta-catenin mediates insulin-like growth factor-I actions to promote cyclin D1 mRNA expression, cell proliferation and survival in oligodendroglial cultures. Glia 58 : 1031-1041, 2010.

Yee CL, Bartel DL, Finger TE. Effects of glossopharyngeal nerve section on the expression of neurotrophins and their receptors in lingual taste buds of adult mice. J Comp Neurol 490 : 371-390, 2005.

Zaghetto AA, Paina S, Mantero S, Platonova N, Peretto P, Bovetti S, Puche A, Piccolo S, Merlo GR. Activation of the Wnt-βcatenin pathway in a cell population on the surface of the forebrain is essential for the establishment of olfactory axon connections. J Neurosci 27 : 9757-9768, 2007.

鈴木　裕子

昭和47年３月　弘前大学理学部生物学科卒
昭和49年３月　北海道大学大学院理学研究科動物学専攻修士課程修了
昭和54年９月　同上博士課程修了
昭和54年10月　北海道大学理学部研究生
昭和55年４月　北海道医療大学歯学部口腔解剖Ⅱ助手
昭和58年４月　同上講師
昭和60年４月　同上助教授
平成23年４月　北海道医療大学心理科学部臨床心理学科（大学教育開発センター）教授

〔Original〕

The wire method for generating experimental biofilms formed by oral *Streptococcus* and *Veillonella* species

Izumi MASHIMA & Futoshi NAKAZAWA

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

Abstract

Complex interactions between microorganisms result in the formation of microbial biofilms as dental plaque and tongue surface debris, leading to caries, periodontal disease, and oral malodor. It is important to know the microbial composition of oral biofilms for the diagnosis and rational treatment of these diseases. In human oral cavities, *Streptococcus* species, especially *S. gordonii, S. mutans*, and *S. salivarius*, are suggested to be the initial colonizers of dental biofilms. Oral *Veillonella* spp., including *V. atypica*, *V. dispar*, *V. denticarosi*, *V. parvula*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis*, are also suggested to be early colonizers of dental biofilms. The formation of biofilms in *in vitro* experiments has been previously studied using 96−well microtiter plate−based biofilm assays or a flow cell system. However, limitations of the technical sensitivities or the high cost of these methods is prohibitive to their routine use. To circumvent these limitations, "the wire method" was used in this study. A cobalt−chrome alloyed wire was used as the scaffold for biofilm formation and quantitative real−time PCR was applied to quantify the number of bacterial cells in the biofilms. Moreover, the above−mentioned *Streptococcus* and *Veillonella* spp. were used as initial and early colonizers for developing biofilms on wires. The amounts of biofilm formed by *S. gordonii* increased in the presence of *Veillonella* spp. The amount of biofilm formed by *S. mutans* was less in the presence of *Veillonella* spp. than in the control, which contained *S. mutans* alone. The biofilm formation increased in co−cultures of *S. salivarius* and *V. dispar*, and *S. salivarius* and *V. denticariosi*. In the present study, we demonstrated that the wire method is appropriate for generating experimental biofilms, especially at early stages, such as the biofilms formed by *Streptococcus* and *Veillonella* spp. Furthermore, our data showed that the amount of biofilm formed by *Streptococcus* spp. depends on the *Veillonella* spp. that is used as the partner species.

Key words：Biofilm, *Streptococcus*, *Veillonella*, The wire method, Quantitative real time PCR

Introduction

The human oral cavity contains more than 19,000 microbial species (Keijser et al., 2008). These microorganisms interact with each other and with their host tissues (Kroes et al., 1999 ; Paster BJ et al., 2001). These complex interactions result in the formation of microbial biofilms as dental plaque and tongue surface debris, leading to caries, periodontal disease, and oral malodor. Biofilms are surface−adherent populations of microorganisms consisting of cells, water, and extra−cellular matrix material (Costerton et al., 1995 ; Sutherland, 2001). It is now known that organisms living in biofilms behave very differently from those living in a free−floating or planktonic state (Bhardwaj et al., 2009). The ability of bacterial cells to adhere to a privileged site to build protective structures and to communicate through chemical signals enables them to counteract the host's natural defenses (Bhardwaj et al., 2009). Recent studies have suggested that several oral bacteria are opportunistic pathogens that cause systemic diseases and adverse health outcomes, such as bacterial endocarditis

受付：平成24年10月12日　受理：平成24年11月 6 日

(Douglas et al., 1993 ; Berbari et al., 1997 ; Tao & Herzberg, 1999), aspiration pneumonia (Scannapieco, 1999), pre−term low birth weight of infants born to mothers with periodontal disease (Offenbacher et al., 1998), and cardiovascular diseases (Genco et al., 2002). Consequently, it is important to know the microbial composition of oral biofilms for the diagnosis and rational treatment of these diseases.

Streptococcus mutans, the principal pathogen in dental caries, co−exists with over 500 other species of bacteria (Kroes et al., 1999 ; Moore & Moore, 2000 ; Paster et al., 2001) in an interactive community known as the dental biofilm, making it an organism of particular interest in the study of microbial interactions in biofilms. Furthermore, it has been suggested that many *Streptococcus* spp., especially *S. gordonii*, *S. mutans*, and *S. salivarius*, are initial colonizers of dental biofilms (Aas et al., 2005 ; Diaz et al., 2006 ; Saravanan & Kolenbrander, 2009 ; Saravanan & Kolenbrander, 2010).

The genus *Veillonella* consists of small, strictly anaerobic, gram−negative cocci that lack flagella, spores, and capsules. Members of this genus have been isolated from the oral cavity and intestinal tract of humans and from other animals that obtain energy by the utilization of short−chain organic acids (Delwiche et al., 1985 ; Sutter, 1984). The genus *Veillonella* is currently subdivided into 12 species : *V. atypica*, *V. caviae*, *V. criceti*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. magna*, *V. montpellierensis*, *V. parvula*, *V. ratti*, *V. rodentium*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* (Arif et al., 2008 ; Byun et al., 2007 ; Jumas et al., 2004 ; Kolenbrander & Moore, 1992 ; Mareike & David, 2008 ; Mashima et al., 2012 ; Mays et al., 1982 ; Rogosa, 1984). Of these species, *V. atypica*, *V. denticariosi*, *V. dispar*, *V. parvula*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* have been isolated from the human oral cavity (Arif et al., 2008 ; Byun et al., Kolenbrander & Moore, 1992 ; Mareike & David, 2008 ; Mashima et al., 2012 ; Mays et al., 1982 ; Rogosa, 1984). Moreover, it has been suggested that oral *Veillonella* spp. are early colonizers of dental biofilms (Saravanan & Kolenbrander, 2009 ; Saravanan & Kolenbrander, 2010).

In the past, 96−well microtiter plate−based biofilm assays (Christensen et al., 1985) have been most widely used in many *in vitro* biofilm experiments. However, almost all 96−well microtiter plates are made of polystyrene. The dissimilarities between polystyrene and the materials found in dental plaque make it difficult to extrapolate the results of such biofilm assays to the natural behavior of bacterial biofilms in the oral cavity. Moreover, the force of gravity is involved with a large part of forming biofilms in this biofilm assays. It is unnatural circumstance for bacterial biofilms. In addition, to quantify the biofilm adhering to the wells in the microtiter plates, planktonic cells are removed using a generalized washing procedure. This procedure is likely to introduce a large margin of experimental error because it is possible to accidentally remove the biofilm formed on the well with such washing procedures. Furthermore, it is difficult to accurately estimate the total number of individual bacterial cells in biofilms in this plate−based assay method.

A flow cell system (Foster & Kolenbrander, 2004) has also been frequently used for *in vitro* biofilm experiments. The force of dynamic flow is involved with a large part of forming biofilm in this method. It is also unnatural circumstance for bacterial biofilms. Then, the flow cells are typically made of a high−density polyethylene block with a glass coverslip. The flow cell system is expensive to establish and difficult to maintain. Moreover, the bacterial composition in the biofilm is determined using fluorescence in situ hybridization (FISH), with which the mixed−species communities in the flow cells can be examined without disruption of the growing biofilm. The analyses of biofilms by using the flow cell system and FISH assays are expensive and tedious, making this method unsuitable for routine use in laboratory settings. There is a need for a low−cost assay for studying biofilm formation that can circumvent some of the limitations of the assays in current use.

In this study, a wire that is commonly used in orthodontic treatment was applied as the scaffold for biofilm formation. Bacteria use only their force to form biofilms in this wire method. We used a protocol for generating experimental biofilms on the wire by using *Streptococcus* and *Veillonella* spp. Moreover, we also quantified a number of individual bacterial cells in the experimental biofilms by using quantitative real−time PCR (q−PCR).

The aim of this study was to verify the practical application of the wire method for biofilm formation and to quantitatively analyze the biofilm formed by *Strepto-*

coccus and *Veillonella* spp., which were used as initial and early colonizers of oral biofilms.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

S. gordonii ATCC 10558^T, *S. mutans* Ingbritt, and *S. salivarius* ATCC 9222 were cultured on TY agar (TY ; Bacto™ Tryptic Soy Broth and Bacto™ Yeast Extract) in anaerobic conditions (N_2 : CO_2 : H_2, 80 : 10 : 10) at 37°C for 3 days. *V. atypica* ATCC 17744^T, *V. dispar* ATCC 17748^T, *V. denticariosi* JCM 15641^T, *V. rogosae* JCM 15642^T, *V. parvula* ATCC 10790^T, and *V. tobetsuensis* ATCC BAA−2400^T were cultured on BHI blood agar (BHI ; Bacto™ Brain Heart Infusion) supplemented with 5% defibrinated sheep blood and 2% sodium lactate in anaerobic conditions at 37°C for 5 days.

Wire preparation

Cobalt−Chrome alloyed wires of 0.9 mm diameter and 15 cm length were used in this study. The wire was made fine chase by filing. After fixing a rubber plug and flexible plastic tubing (TYGON® Saint−Gobain) to the wire ends, the wire apparatus was sterilized in an autoclave.

Biofilm formation on the wire

Two milliliters of a suspension of each *Streptococcus* spp., whose turbidity had been determined by measuring the absorption at OD_{660}, was inoculated into 18 mL BHI broth containing 10% sucrose and 2% sodium lactate in a test tube. A wire treated with artificial saliva (Saliveht® TEIJIN) was inserted in the test tube as a base for biofilm formation. After incubation in anaerobic conditions at 37°C for 3 days, the wire with the *Streptococcus* biofilm was transferred into suspensions of individual *Veillonella* cultures, whose turbidity had also been determined by measuring the absorption at OD_{660}, in test tubes containing the same media. The co−cultures were incubated in anaerobic conditions at 37°C for 4 days to generate mixed biofilms with *Streptococcus* and *Veillonella* spp. The media in the test tubes were replaced with fresh media every day. Biofilms containing *S. gordonii*, *S. mutans*, and *S. salivarius* alone were generated on the wires under the same conditions for 7 days, as controls.

DNA Extraction

All of the biofilm on the wire was removed into a sterilized tube, and DNA was extracted from the biofilms by using a modified alkaline lysis protocol (Chalmers et al., 2008 ; Hoshino et al., 2005 ; Periasamy et al., 2009). Briefly, the biofilm was immersed in 1400 μL of sterilized water, 5600 μL of 0.05 M sodium hydroxide was added, and the mixtures were incubated at 60°C for 60 min, after which 64.4 μL of 1 M Tris−HCl (pH 7.0) was added to neutralize the pH. This extract was used as the template DNA for quantitative real−time PCR (q−PCR) analyses (Chalmers et al., 2008 ; Hoshino et al., 2005 ; Periasamy et al., 2009). Bacterial genomic DNA for standard curves was extracted from 3−day−old pure cultures of the 3 *Streptococcus* spp. and 5−day−old pure cultures of the 6 *Veillonella* spp. with the InstaGene Matrix Kit (Bio−Rad) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was stored at −20°C until further analysis.

Preparation of q−PCR standards and quantification of species in biofilms

For construction of standard curves, 10−fold serial dilutions (from 300 to 1.0×10^8) of target species genomic DNA preparations were analyzed by q−PCR by using previously described primers (Yoshida et al., 2003 ; Hoshino et al., 2004 ; Rinttilä et al., 2004). Primers specific for *S. gordonii* were designed using the *gtfG* gene as the species−specific reference gene. The sequence of the forward *gtfG* primer was 5'−CTATGCG GATGATGCTAATCAAGTG−3', and the sequence of the reverse *gtfG* primer was 5'−GGAGTCGCTA-TAATCTTGTCAGAAA−3' (Hoshino et al., 2004). Primers specific for *S. salivarius* were designed using the *gtfK* gene. The sequence of the forward *gtfK* primer was 5'−CTGTTGCCACATCTTCACTCGCTTCGG−3', and the sequence of reverse *gtfK* primer was 5'−CGTT GATGTGCTTGAAAGGGCACCATT−3' (Hoshino et al., 2004). Primers specific for *S. mutans* were designed using the *gtfB* gene. The sequence of the forward *gtfB* primer, Smut3368−F, was 5'−GCCTACAGCTCAGA-GATGCTATTCT−3', and the sequence of the reverse *gtfB* primer, Smut3481−R, was 5'−GCCATACAC-CACTCATGAATTGA−3' (Yoshida et al., 2003). Primers specific for the *Veillonella* spp.−*V. atypica*, *V. dis-*

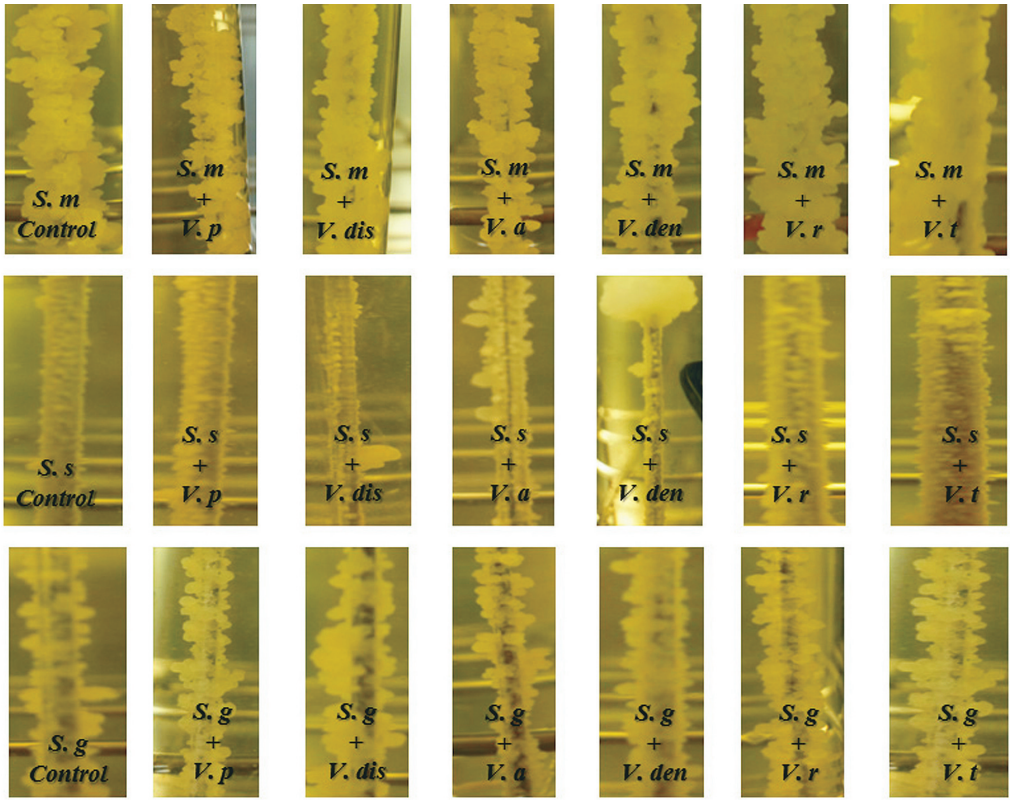


Fig.1, The biofilm formation with *Streptococcus species* and *Veillonella* species on the wire.
S. m (*S. mutans*), *S. s* (*S. salivarius*), *S. g* (*S. gordonii*), *V. p* (*V. parvula*), *V. dis* (*V. dispar*), *V. a* (*V. atypica*), *V. den* (*V. denticariosi*), *V. r* (*V. rogosae*), *V. t* (*V. tobetsuensis*).

par, *V. denticariosi*, *V. rogosae*, *V. parvula*, and *V. tobetsuensis*－were designed using the 16S rDNA gene, which is conserved among these *Veillonella* spp. The sequence of the 16S rDNA forward primer was 5'－A(C/T)CAACCTGCCCTTCAGA－3', and the sequence of 16 S rDNA reverse primer was 5'－CGTCCCGATTAACAG AGCTT－3' (Rinttilä et al., 2004). Quantification of *S. gordonii*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *V. atypica*, *V. dispar*, *V. denticariosi*, *V. parvula*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* cells in biofilms was performed with q－PCR, using the SYBR green dye to detect the *gtfB*, *gtfK*, *gtfG*, and 16S rDNA gene amplicons. Each reaction (final reaction volume, 50 μL) contained 4 μL of template, 16 μL of sterilized water, 25 μL of KAPA SYBR® FAST qPCR MasterMix Universal (KAPA BIOSYSTEMS), 2 μL each of the forward and reverse primers at 400 nM, and 1.0 μL of ROX Low. q－PCR was performed in a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) by using the following thermocycles recommended for the Fast SYBR green Master mix (KAPA BIOSYSTEMS)： 95°C for 30 s, 40 cycles of 5 s at 95°C, and 34 s at 60°C. Dissociation curves were generated by incubating the reaction products at 95°C for 15 s and 60°C for 1 min, and incrementally increasing the temperature to 95°C. Fluorescence data were collected at the end of the 60°C primer－annealing step for 40 amplification cycles and throughout the dissociation curve analysis. The analysis of the melting curves with all the primer sets showed a single sharp peak. The standard curves were determined in triplicate to ascertain the accuracy and consistency of the q－PCR assay.

Data Analysis

Kruskal Wallis H－test post hoc Mann－Whitney U－test with Bonferroni correction was used to determine statistical significance. A p－value of < 0.05, < 0.01, and < 0.001 were considered statistically significant.

Results

The formation of biofilms formed on the wires after 7 days of incubation of the single or mixed cultures is shown in Fig. 1.

Ten－fold serial dilutions of genomic DNA extracted from *S. mutans* (Fig. 2) and *V. parvula* (Fig. 3) demonstrated a linear relationship when the copy number per milliliter was compared with Ct values generated from

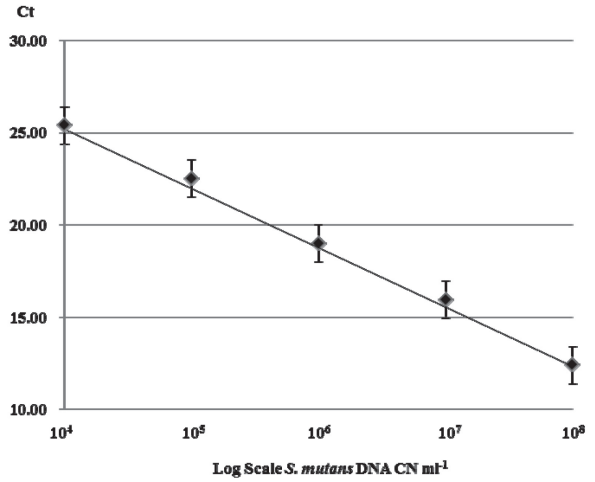


Fig.2, The standard curve of *Streptococcus* mutans.
Quantitative PCR (qPCR) of standardized *S. mutans* DNA. Ct values are plotted against DNA copy number (copy number ml^{-1}). 10−fold dilutions of DNA extracted from *S. mutans* cells (10^8 cells ml^{-1}) were used as the copy number standard. The Ct values were determined from the diluted copy number (n=3) for each dilution. Bar means standard error. CN, *S. mutans* copy number.

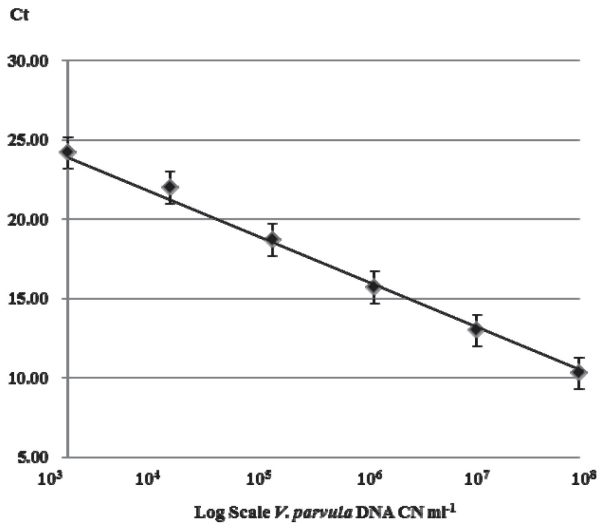


Fig.3, The standard curve of *Veillonella parvula*.
Quantitative PCR (qPCR) of standardized *V. parvula* DNA. Ct values are plotted against DNA copy number (copy number ml^{-1}). 10−fold dilutions of DNA extracted from *V. parvula* cells (10^8 cells ml^{-1}) were used as the copy number standard. The Ct values were determined from the diluted copy number (n=3) for each dilution. Bar means standard error. CN, *V. parvula* copy number.

the q−PCR analyses. Similarly, standard curves for *S. gordonii*, *S. salivarius*, *V. atypica*, *V. dispar*, *V. denticariosi*, *V. rogosae*, and *V. tobetsuensis* were also obtained (data not shown).

The amounts of biofilm formed by *S. mutans* and the 6 *Veillonella* spp., including a control, as determined from the results of the q−PCR analyses, are shown in Fig. 4. The amount of biofilm formed by *S. mutans* in

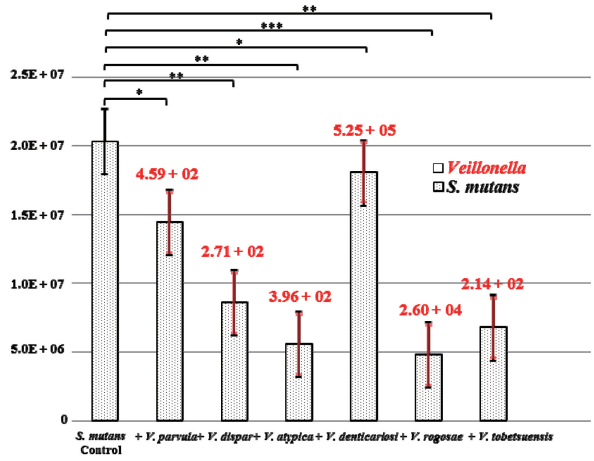


Fig.4, The amount of biofilm formation with *S. mutans* and 6 oral *Veillonella* species.
* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001
The red number in figure shows the average number of *Veillonella* species.
Bar means standard error.

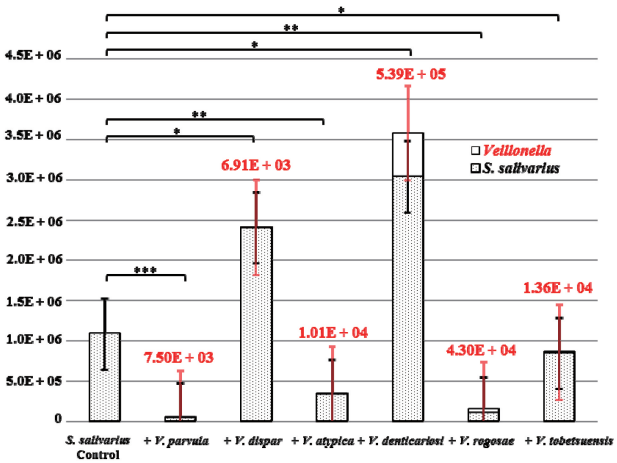


Fig.5, The amount of biofilm formation with *S. salivarius* and 6 oral *Veillonella* species.
* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001
The red number in figure shows the average number of *Veillonella* species.
Bar means standard error.

the presence of the 6 *Veillonella* spp. were less than that formed in the control, which contained *S. mutans* alone. On the other hand, in the case of *S. salivarius*, the presence of *V. dispar* and *V. denticariosi* increased the amount of biofilm formed on the wire (Fig. 5). Furthermore, the amount of biofilm formed by *S. gordonii* in the presence of the 6 *Veillonella* spp. was greater than that in the control, especially in the presence of *V. rogosae* (Fig. 6).

When the ratio of *Veillonella* to *Streptococcus* in the biofilm was analyzed, *S. mutans* constituted a large portion of the biofilms, accounting for more than 99% of the bacteria (data not shown). On the other hand, in

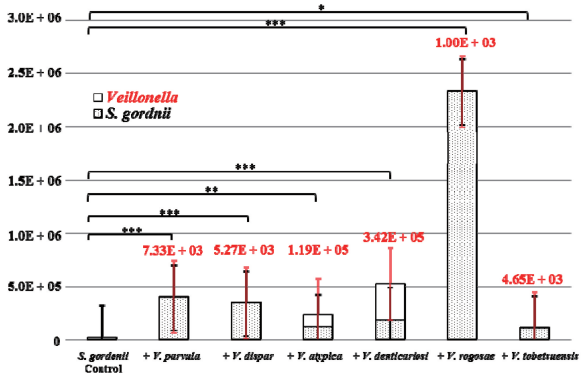


Fig.6, The amount of biofilm formation with *S. gordonii* and 6 oral *Veillonella* species.
* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001
The red number in figure shows the average number of *Veillonella* species.
Bar means standard error.

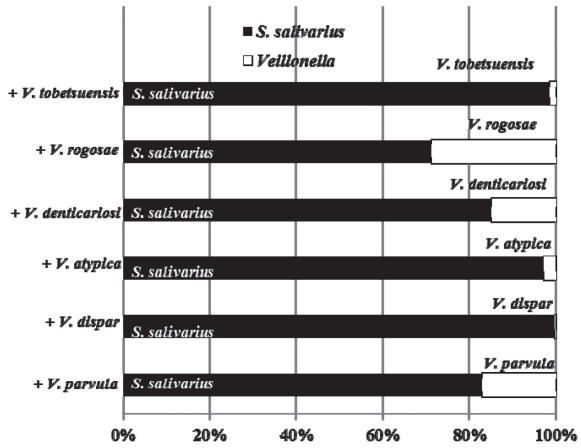


Fig.7, The ratio of 6 oral *Veillonella* species to *S. salivarius*.

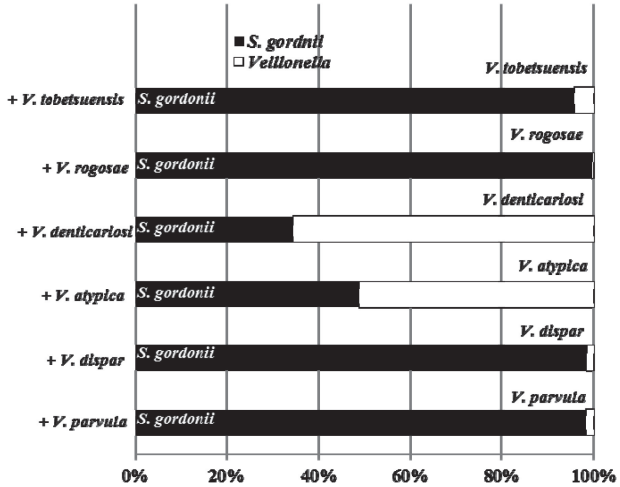


Fig.8, The ratio of 6 oral *Veillonella* species to *S. gordonii*.

case of the pairs of *S. salivarius* and *V. rogosae*, *S. salivarius* and *V. parvula*, *S. gordonii* and *V. denticariosi*, and *S. gordonii* and *V. atypica*, *Veillonella* spp. constituted 30%, 20%, 60%, and 50% of the respective biofilms (Figs. 7 and 8).

Discussion

From experiments in this time, it is suggested that this wire method has physical limits of the amount of biofilm formation to form biofilms at all stage. For this reason, in the present study, we demonstrated that the wire method is appropriate for generating experimental biofilms, especially biofilms at the early stages, such as those formed by *Streptococcus* and *Veillonella* spp. Our results indicate that this method may be useful for generating biofilms and quantifying the number of bacterial cells in the biofilm by using q−PCR. The wire method described here does not share the technical sensitivities or the high cost of other biofilm assays, such as the 96−well microtiter plate−based biofilm assays (Christensen et al., 1985) or the flow cell system (Foster & Kolenbrander, 2004), making it more suitable for routine use. Also, in the case of wire method, biofilms on the wire are formed by only bacterial properties.

The amount of biofilm formation with *Streptococcus* and the bacterial ratio in the biofilm depends on the particular *Veillonella* spp. used as the partner species. Our results suggest that *Veillonella* spp. plays important roles in the formation of the oral biofilm at the early stages. The data also suggest that *Veillonella* spp. assist the growth of *S. gordonii* and inhibit the growth of *S. mutans* on the wires in the biofilms formed after 7 days. Furthermore, the data suggest that oral *Veillonella* spp. have the ability to inhibit the caries activities caused by *S. mutans* because they inhibit their growth in biofilms. This fact may provide support for the findings of Mikx et al. (1972).

In this study, “the wire method” was used as a useful technique to generate biofilms for *in vitro* experiments. This method could be useful for investigating the relationship between biofilm formation and oral infections such as caries, periodontal diseases, and also systemic infectious diseases caused by oral biofilms. Moreover, this is the first report on the use of the wire method for generating early−stage biofilms from oral bacteria, using *Streptococcus* and *Veillonella* spp.

Acknowledgments

We are grateful to Arihide Kamaguchi, Hiroshi Miyakawa, and Mari Fujita of the Department of Oral Mi-

crobiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, for technical assistance. This study was supported in part by a "High−Tech Research Center" project grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan ; a research grant from The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido ; and the Iwadare Scholarship from Iwadare Scholarship Foundation.

References

Aas AJ, Paster JB, Storkes NL, Olsen I & Dewhirst EF. Defining the normal bacterial Flora of the oral cavity. J clin Microbiol Nov, 5721−5732, 2005.

Arif N, Do T, Byun R, Sheehy E, Clark D, Gilbert CS & Beighton D. *Veillonella rogosae* sp. nov., an anaerobic Gram−negative coccus isolated from dental plaque. Int J Syst Evol Microbiol 58 : 581−584, 2008.

Berbari EF, Cockerill FR 3rd & Steckelberg JM. Infective endocarditis due to unusual or fastidious microorganisms. Mayo Clin Proc 72 : 532−542, 1993.

Bhardwaj BS, Mehta M & Gauba K. Nanotechnology : Role in dental biofilms. Indian J Dent Res 20(4) : 511 −513, 2009.

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 Jr. RJ, Cisar JO, & Kolenbrander PE. Characterization of *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.

Costerton JW, Lewandowaki Z, Caldwell DE, Korber DR & Lappin−Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol 49 : 711−745, 1995.

Delwiche EA, Pestka JJ & Tortorello ML. The Veillonellae : gram negative cocci with a unique physiology. Annu Rev Microbiol 39 : 175−193, 1985.

Diaz IP, Chalmers IN, Rickard HA, Kong C, Miburn LC, Palmer JR, Jr. & Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject−specific oral microflora during initial colonization of enamel. Appl Environ Microbiol Apr : 2837−2848, 2006.

Douglas CW, Health J, Hampton KK & Person FE. Identify of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. J Med Microbiol 39 : 179−182, 1993.

Foster JS & Kolenbrander PE. Development of Multispecies Oral Bacterial Community in a Saliva−Conditioned Flow Cell. Appl Environ Microbiol 70(7) : 4340−4348, 2004.

Genco R, Offenbacher S & Beck J. Periodontal disease and cardiovasucular disease : epidemiology and possible mechanisms. J Am Dent Assoc 133(Suppl) : 14S−22S, 2002.

Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, Hoshino N, Ooshima T & Fujiwara T. PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes. Diagn Microbial Infect Dis 48 : 195−199, 2004.

Hoshino T, Fujiwara T & Kilian M. Use of phylogenetic and phenotypic analyses to identify nonhemolytic streptococci isolated from bacteremic patients. J Clin Microbiol 43 : 6073−6085, 2005.

Jumas BE, Carlier JP, Jean PH, Teyssier C, Gay B, Campos J & Marchandin H. *Veillonella montpellierensis* sp. nov., a novel anaerobic Gram−negative coccus isolated human clinicalsamples. Int J Syst Evol Microbiol 54 : 1311−1316, 2004.

Keijser BJF, Zaura E, Huse SM, Van der Vossen JMBM, Schuren FHJ, Montijn RC, Ten Cate JM & Crielaard W. Pyrosequencing Analysis of the Oral Microflora of Healthy Adults. J Dent Res 87 : 1016−1020, 2008.

Kolenbrander PE & Moore LVH. The genus *Veillonella*. In Balows HG, Trüper M, Dworkin W, Harder W, Schleifer KH (eds) The prokaryotes, 2nd edn. Springer, New York, 2034−2047, 1992.

Kroes I, Lepp PW & Relman DA. Bacterial diversity within the human subgingival crevice. Proc Natl Acad Sci USA 96 : 14547−14552, 1999.

Mareike K & David T. *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.

Mashima I, Kamaguchi A, Miyakawa H & Nakazawa F. *Veillonella tobetsuensis* sp. nov., a novel, anaerobic, Gram－negative coccus isolated from human tongue biofilm. Int J Syst Evol Microbiol 2012 ; in press.

Mays TD, Holdeman LV, Moore WEC Rogosa M & Johnson JL. Taxnomy of the genus *Veillonella* Prèvot. Int J Syst Bacteriol 32 : 28–36, 1982.

Mikx FHM, Hoeven JS, König KG, Plasschaert AJM & Guggenheim. Establishment of Defined Microbial Ecosystems in Germ–Free Rats. Caries Res 6 : 211–223, 1972.

Moore WE & Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000 5 : 66–77, 1994.

Offenbacher S, Jared HL, O'Reilly PG, Wells SR, Salvi GE, Lawrence HP, Socransky SS & Beck JD. Potential pathogenic mechanisms of periodontitis associated pregnancy complications. Ann Periodontol 3 : 233–250, 1998.

Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A & Dewhirst FE. Bacterial Diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol 183 : 3770–3783, 2001.

Perisamy S, Chalmers NI, Du－Thumm L & Kolenbrander PE. *Fusobacterium nucleatum* ATCC 10953 requires *Actinomyces naeslundii* ATCC 43146 for growth on saliva in a three–species community that includes *Streptococcus oralis* 34. Appl Environ Microbiol 75 : 3250–3257, 2009.

Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L & Palva A. Development of an extensive set of 16S rDNA–targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in fecal samples by real time PCR. J Appl Microbiol 97 ; 1166–1177, 2004.

Rogosa M. Anaerobic Gram–negative cocci. In : Krieg NR, Holt JG (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore, 680–685, 1984.

Saravanan P, Kolenbrander PE. Mutualistic biofilm communities develop with *Porphyromonas gingivalis* and initial, early, and late colonizers of enamel. J Bacteriol 191 : 6804–6811, 2009.

Saravanan P, 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 : 2965–2972, 2010.

Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. J Periodontol 70 : 793–802, 1999.

Sutherland IW. The biofilm matrix －an immobilized but dynamic microbial environment. Trends Microbiol 9 : 222–227, 2001.

Sutter VL. Anaerobes as normal oral flora. Rev Infect Dis 4 : 406–425, 1984.

Tao L & Herzberg MC. Identifying in vivo expressed streptococcal genes in endocarditis. Methods Enzymol 310 : 109–116, 1999.

Yoshida A, Suzuki N, Nakano Y, Kawada M, Oho T & Koga T. Development of a 5' nuclease–based real–time PCR assay for quantitative detection of cariogenic dental pathogens *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. J Clin Microbiol 41 ; 4438–4441, 2003.

眞島　いづみ

北海道医療大学大学院歯学研究科微生物学専攻博士課程第２学年

平成13年３月　富士見丘高等学校　卒業
平成16年４月　北海道医療大学歯学部歯学科　入学
平成22年３月　北海道医療大学歯学部歯学科　卒業
平成23年４月　北海道医療大学大学院歯学研究科　入学
平成24年現在　北海道医療大学大学院歯学研究科　在籍中

〔原著〕

ヒト歯根膜由来線維芽細胞におけるfibrillin-1の発現抑制がversicanのmRNAとタンパク質発現およびタンパク質の局在へ及ぼす影響

永坂　萌[1)]，鳥谷奈保子[1)]，敦賀　英知[3)]，坂倉　康則[2)]，溝口　到[1)]

1）北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野
2）北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系解剖学分野
3）福岡歯科大学生体構造学講座機能構造学分野

Effects of underexpression of fibrillin-1 on mRNA and protein expression and protein localization of versican in human periodontal ligament fibroblasts

Moe NAGASAKA[1)], Naoko TORIYA[1)], Eichi TSURUGA[3)], Yasunori SAKAKURA[2)], Itaru MIZOGUCHI[1)]

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

Abstract

The periodontal ligament (PDL) contains a number of extracellular matrix (ECM) components, such as collagen, proteoglycans (PG)s, elastic system fibers and non-collagenous glycoproteins. These ECM components are essential for tissue integrity and for the physiological functions of the PDL. To analyze the functional relationships among ECM components in the PDL, the expression and localization of a large modular PG, versican, in human PDL fibroblasts with under-expression of fibrillin-1, a main component of elastic system fibers, by knockdown with short interfering RNA was investigated. In the suppressed fibrillin-1 condition here, the mRNA and protein expression of fibrillin-1 decreased to approximately 35% and 60%, compared with a control without fibrillin-1 suppression, while the mRNA expression of versican remained almost unchanged. A quantitative analysis of the immunostaining indicated that the staining intensity of fibrillin-1 decreased to approximately 60% under the fibrillin-1 suppressed condition of fibrillin-1 mRNA, compared with a control, while the staining intensity of the GAG-α and GAG-β domains were almost unchanged. Also, the immunostaining with antibodies of GAG-α and GAG-β domains showed that a thick fibrous staining pattern rather than thin textiform increased under the fibrillin-1 suppressed condition. These results suggest that fibrillin-1 functions as a scaffold for the assembly of versican molecules and act as a regulator in its distribution. Also, the binding of both molecules in appropriate amounts appears important for the reticular distribution in the PDL.

Key words：歯根膜，線維芽細胞，fibrillin-1，versican，siRNA

緒　　言

歯周組織の構成要素のひとつである歯根膜は歯の固定，支持および咀嚼力や咬合力に対する緩衝材として機能し，絶えず咬合力などの機能力にさらされている．組織学的にみると，歯根膜は線維性結合組織に分類される

受付：平成24年９月30日　受理：平成24年11月６日

が，組織内には線維芽細胞，骨芽細胞，破骨細胞，セメント芽細胞，Malassezの上皮遺残などの様々なcell populationが存在する．また，歯根膜の細胞外基質成分はコラーゲン，弾性系線維やプロテオグリカンなどから構成されている．

弾性系線維は歯周組織，大動脈，肺，皮膚などの様々な組織に分布し（Rosenbloom et al., 1993），組織に弾性と柔軟性を付与し，組織の反復性復位（伸展と収縮の繰り返し）を可能としている．絶えず機械的刺激にさらされる歯根膜において弾性系線維の性質は重要である．生化学的にみると，弾性系線維はエラスチンとミクロフィブリルからなり（Greenlee et al., 1966 ; Carmichael & Fullmer, 1966 ; Ross & Bornstein, 1969 ; Cleary & Gibson, 1983 ; Mecham & Davis, 1994），両者の相対的比率によってオキシタラン線維，エラウニン線維と弾性線維の３タイプに分類される（Böck & Stockinger, 1984 ; Mecham & Davis, 1994）．オキシタラン線維は歯根膜で初めて発見され（Fullmer & Lillie, 1958），歯根膜の構成要素の一つとして認められている（Sims,1973 ; Simmons et al., 1980 ; Edmunds et al., 1979 ; Beertsen et al., 1974 ; Fullmer et al., 1974）．歯根膜でのオキシタラン線維は，主線維であるコラーゲン線維に直交するように配列しており（Sims, 1973），ブリッジの支台歯としての使用などメカニカルストレスの負荷により，また矯正力の負荷により，太くなり増加することが報告されている（Edwards, 1968 ; Fullmer et al., 1974）．また，オキシタラン線維は350kDaの糖タンパクであるfibrillin-１を主に含むミクロフィブリルを主成分とする（Sakai et al., 1986 ; 1991 ; Tsuruga et al., 2002 ; Böck & Stockinger, 1984）．ヒト歯根膜由来線維芽細胞の培養系ではfibrillin-１が発現し，細胞・基質層でオキシタラン線維を形成することが報告されている（Tsuruga et al., 2002 ; 2007 ; 2009）．

一方，歯根膜に存在する主要なプロテオグリカンはversicanである（Larjava et al., 1992）．このプロテオグリカンは，様々な機能を有したドメインが連結した大型のmodular PGに属する（Iozzo & Murdoch, 1996）．Versicanのコアタンパク質は３つの領域に分けられ，N末端領域であるヒアルロン酸結合領域（G１domain, HABR），GAG鎖が付属する２つの中心領域（GAG-α domainとGAG-β domain）およびC末端領域（G3 domain）から構成される．また，versicanは組織の形態維持，細胞増殖，細胞接着（Yamagata et al., 1989 ; 1993 ; 1994 ; Ang et al., 1999 ; Yang et al., 1999），細胞遊走（LeBaron et al., 1992 ; Yamagata et al., 1993 ; Landolt et al., 1995 ; Zhang et al., 1998a ; 1998b ; Ang et al., 1999）などの機能に関与している．

近年，fibrillin-１上の*FBN1*遺伝子が存在する領域にversicanの結合領域が存在することが報告されている（Isogai et al., 2002）．*FBN1*遺伝子の変異は細胞外基質の異常から結合組織を脆弱にするMarfan症候群の重症型をもたらしうることが報告されている（Putnam et al., 1996）．そのため，結合組織におけるミクロフィブリル，fibrillinとversicanとの関連性が特に注目されている（Ohno-Jinno et al., 2008）．しかし，歯根膜におけるfibrillin-１とversicanの機能的関連性に関する研究は少なく，不明な点が多い．そこで本研究では，歯根膜におけるfibrillin-１とversicanとの生物学的関連性を明らかにするために，ヒト歯根膜由来線維芽細胞のfibrillin-１のmRNA発現を抑制し，versicanの動態変化について免疫組織化学的，分子生物学的に検討した．

実験材料および方法

１．ヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPLF）の培養系

歯根膜組織は本学歯科・内科クリニック矯正歯科で抜歯治療が必要とされ，研究内容に同意を得た患者の抜去した小臼歯から得た．細切した歯根膜組織をプラスチックシャーレ上に静置し，10％新生仔仔牛血清（Invitrogen）を添加したminimum essential medium（MEM, Invitrogen：ペニシリン100units/ml，ストレプトマイシン100 μg/ml，L-グルタミン含有）中で37℃，５％CO_2環境下にて培養し，３代継代してヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPLF）として単離した．単離したHPLFは，細胞の表現型を保持するために４～６代継代のものまでを使用した．また同様に，患者の抜去歯の歯肉組織からヒト歯肉由来線維芽細胞（HGF）を単離し，継代培養後にHPLFの同定について対照実験に供した．

さらに，*PLAP-1*と*periostin*が歯根膜に特異的に発現することが知られていることから（Yamada et al., 2001 ; 2006 ; 2007 ; Horiuchi et al., 1999），単離したHPLFの*PLAP-1*および*periostin*の発現をRT-PCR法を用いて検討した．使用したprimerの配列を表１に示す．

なお，本研究は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会にて承認を得て実施された．

２．Small interference RNA（siRNA）設計と一過性形質転換

ヒトfibrillin-１に対するsiRNAは，Sigma Aldrich Japanによって設計・合成したものを使用した．合成したsiRNAはfibrillin-１のC末端側の非翻訳領域（9392-9414）に対応させた．Fibrillin-１に対するsiRNA配列と

表１　*PLAP -1*と*periostin*のprimerの配列

human-PLAP-1	forward：5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' reverse：5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3'
human-periostin	forward：5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' reverse：5'-TCCAAAGGTCTTGGCATTTTCTA-3'
human-GAPDH	forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3' reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3'

表２　Fibrillin-１ siRNAの塩基配列

siRNA	sense　: 5'-CAGUACUAGGUUGUCCAUUU-3' anti-sense : 5'-AUGGACAACCUAGUACUUGUA-3'
scrambled order	sense　: 5'-UGUCUACCUUGUAACCAGUCA-3' anti-sense : 5'-ACUAAUUACAAGGUAGACAUC-3'

表３　Fibrillin-1とversicanのprimerおよびTaqMan probeの配列

human-fibrillin-1	forward : 5'-GCATCATGCGTCGAGG-3' reverse : 5'-GGACGCTAAAAGCACGGTAA-3' TaqMan probe : 5'-CGTCTGCTGGAGATCGCCCT-3'
human-versican	forward : 5'-ACGTGCAAGAAAGGAACAGTTG-3' reverse : 5'-TCCAAAGGTCTTGGCATTTTCTA-3' TaqMan probe : 5'-TTGCGGCCAGCCCCCTGTT-3'
human-GAPDH	forward : 5'-GCGGATCCCTCTGCTCCTCCTGTTCGAC-3' reverse : 5'-GGAATTCTGACAAAGTGGTCGTTGAGG-3' TaqMan probe : 5'-CTCCTCCTGTTCGACAGTCAGCCGC-3'

ネガティブコントロール（scrambled order siRNA）の配列を表２に示す．プラスチックシャーレ（φ35mm）に１×10^{6}cells/mLの細胞密度で播種し，80％サブコンフルエント状態を０日目とした．siRNAはHiPerFect Transfection Reagent（QIAGEN）を使用してHPLF中に導入した．まず，Opti MEM medium（99.25μl, Invitrogen）で150ng siRNAを希釈し，12. 0μl HiPerFect Transfection Reagentを添加した．その後，トランスフェクション・コンプレックスの形成のため，15～25℃の室温で５～10分インキュベートした．その後，最終濃度が５nMとなるようにfibrillin-１ siRNAとfibrillin-１ scrambled order siRNAをそれぞれ培養液に添加した．siRNAを加えずにトランスフェクション試薬のみを添加し，疑似導入したものを対照群とした．トランスフェクション・コンプレックスの添加はNakashimaらの手法（Nakashima et al., 2009）に従い，培養の１日目と４日目に行い，それぞれ12時間インキュベートした後，培養液を通常培養液に交換した．72時間間隔で２回siRNAを導入し，HPLFを７日目に回収した．

３．Fibrillin-１とversicanのmRNA発現

siRNA処理を施したHPLFを回収し，RNeasy Mini Kit（Qiagen）を用いてtotal RNAを抽出した．なお，genomic DNAの試料への混入を防止するため，total RNAの抽出の過程でRNase-free DNase（Qiagen）処理を施した．抽出したtotal RNAに対しOmniscript reverse transcriptase protocol（Qiagen）を用いてRT反応を行い，cDNAを合成した．

各HPLFサンプルについてfibrillin-１およびversicanのmRNA発現を検討した．mRNAの検出はGeanAmp5700 Sequence Detection System（Applied Biosystems）を用いてTaqMan probeによるReal-Time PCR法にて実施した．結果は比較Ct法により相対的に定量し検討した．Ct値は，それぞれ蛍光強度が0. 1の時のサイクル数として算出し，①⊿Ct＝ターゲット遺伝子Ct－内部標準遺伝子Ct，②⊿⊿Ct＝各サンプル⊿Ct－キャリブレータサンプル⊿Ct，③未知サンプルはキャリブレータサンプルの$2^{-\Delta\Delta Ct}$倍により，相対定量した．統計学的有意差はStudent's *t*-testを用いて検定した．

なお，fibrillin-1，versicanおよび内部標準としてのGAPDHに対するprimerとTaqMan probe（exonuclease probe）は，Primer Express software（version 2.0, Applied Biosystems）を用いて設計した．PrimerとTaqMan probeの塩基配列を表３に示す．

４．Fibrillin-１とversicanの免疫蛍光染色

７日間培養したHPLFを２％パラホルムアルデヒドで10分間固定した．Phosphate-buffered saline（PBS）で洗浄し，fibrillin-１とversicanについてそれぞれ単染色を行った．一次抗体［goat anti-human fibrillin-１polyclonal antibody（１：100, Santa Cruz），rabbit anti-mouse versican（GAG-α domain）polyclonal antibody （ab1032，１：100, Millipore），rabbit anti-mouse versican（GAG-β domain）polyclonal antibody（ab1033, 1 : 100, Millipore）］でそれぞれ室温にて１時間反応させた．PBSで洗浄した後，二次抗体としてAlexa Fluor® 488 donkey anti-goat IgG（H+L）（１：100，Invitrogen），Alexa Fluor® 568 goat anti-rabbit IgG（H+L）（1：100, Invitrogen）をそれぞれ室温にて40分反応させた．なお，抗体の希釈には１％bovine serum albumin/PBSを用いた．PBSでの最終的な洗浄後，共焦点レーザー顕微鏡を使用して観察した．

次にsiRNA処理を施したHPLFを上記の抗体を用いて二重染色した．

Fibrillin-１およびversican（GAG-α domain, GAG-β domain）の集積量は画像解析ソフト（Image J, NIH, Bethesda, ML, USA）を用いて，蛍光強度に閾値を設定し計測した．

結　　果

１．HPLFの歯根膜線維芽細胞としての同定

単離したHPLFが歯根膜由来線維芽細胞であることを

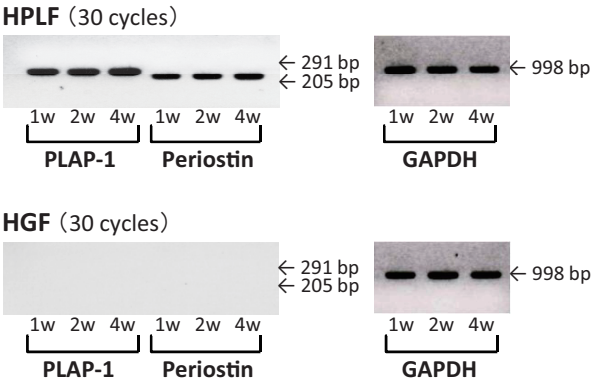


図１　ヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPLF）とヒト歯肉由来線維芽細胞（HGF）における*PLAP -1*と*periostin*のmRNA発現
歯根膜細胞で特異的に発現する*PLAP -1*（291bp）と*periostin*（205 bp）はHPLFにおいてのみ発現しており，その発現は培養期間を通して継続している．GAPDHはほぼ同等の発現を示している．

確認するために，歯根膜に特異的に発現する*PLAP - 1*と*periostin*についてRT-PCR法にて検討した（図１）．比較対照としてHGFを用いた．PCRの結果，HPLFは培養１，２，４週後において*PLAP - 1*（291bp）および*periostin*（205bp）のmRNAが継続的に発現しており，歯根膜に特異的な形質発現が認められた．一方，HGFでは培養期間を通して両形質の発現は全く認められなかった．内部標準として用いたGAPDHにおいては，発現の差異は確認されなかった．この結果より，単離したHPLFは歯根膜由来線維芽細胞の形質を保持していると考え，これ以降の実験に用いた．

２．siRNAによるfibrillin-１の発現抑制実験

１）Fibrillin-１とversicanのmRNA発現に対する相対的変化

Versicanのタンパク質発現におけるfibrillin-１の関連性を検討するため，siRNAによりfibrillin-１発現抑制実験を行い，versicanのmRNA発現について検討した（図２）．siRNAの導入はfibrillin-１のmRNA発現を対照群およびscrambled order群に対して約34%（n＝５，p＜0.005）にまで減少させた（図２a）．一方，versicanのmRNA発現においては，fibrillin-１siRNA導入は対照群とscrambled order群とにほとんど影響を与えなかった（図２b）．

２）免疫組織化学的観察と蛍光強度の解析

まず対照群のHPLFにfibrillin-１とversican GAG-α domain，GAG-β domainに対する抗体を用いてそれぞれ単染色を行い，fibrillin-１とversican GAG-α domain，GAG-β domainの線維状の局在を確認した（図３a-c）．さらにfibrillin-１に対する一次抗体，二次抗体，versicanに用いた二次抗体の順で反応させた染色像では，fibrillin-１の緑色蛍光が線維状に発現したが，versican GAG-β domainの赤色蛍光はほぼ観察しなかった．Mergeでは緑色蛍光の染色像を観察した（図３d-f）．GAG-α domainについても同様の結果が得られた（結果は示していない）．

次に，siRNAによるfibrillin-１mRNA発現抑制fibrillin-１mRNA発現抑制時におけるfibrillin-１とversicanのタンパク質の局在を観察した（図４）．Fibrillin-１とGAG-α domeinの局在を示す蛍光は対照群とscrambled order群との間では差異は認められず，いずれも繊細な細網状の染色パターンを示した（データは示していない）．またその強度にも差は認められなかった（図５）．一方，fibrillin-１のmRNA発現抑制によりfibrillin-１の局在を示す緑色蛍光の繊細な細網状の染色パターンは減少し，一部で太い線維状の染色パターンを示した（図４a，d）．蛍光強度は対照群の60%に減少していた（図５）．GAG-β domainの局在を示す赤色蛍光はfibrillin-１に一致し，細網状のパターンが減少し，太い線維状を示すパターンとその間にびまん性の発色が観察された（図４c，f）．fibrillin-１のmRNAの発現を抑制したときのGAG-α domainの局在もGAG-β domainと同様であった（データは

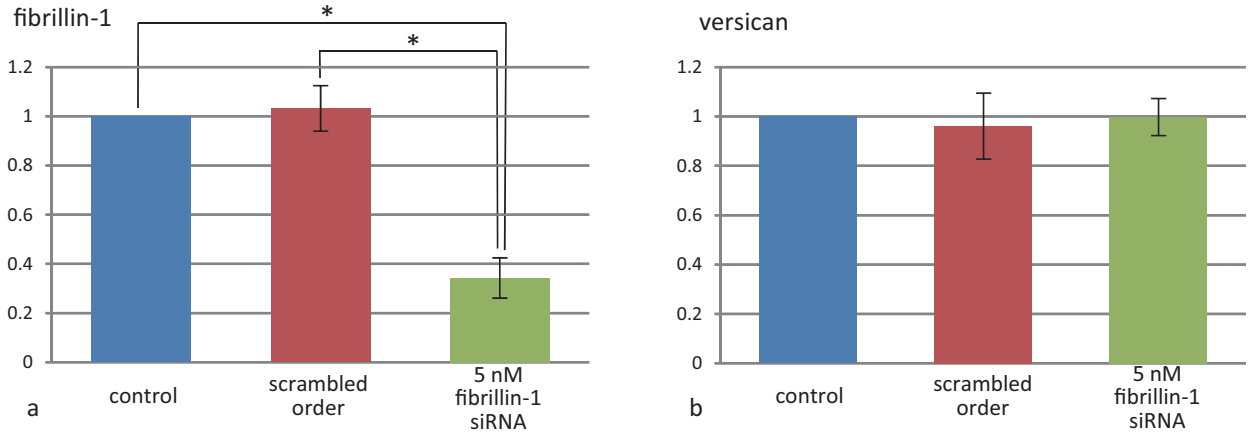


図２　Fibrillin-１siRNAによるfibrillin-１とversicanのmRNA発現の相対的変化
siRNAの導入の結果，fibrillin-１mRNA発現は対照群およびscrambled order群におけるmRNA発現の約34%まで激減する（a）．これに対してversican mRNA発現にはほとんど影響がみられない（b）．＊p＜0.01（n＝５）

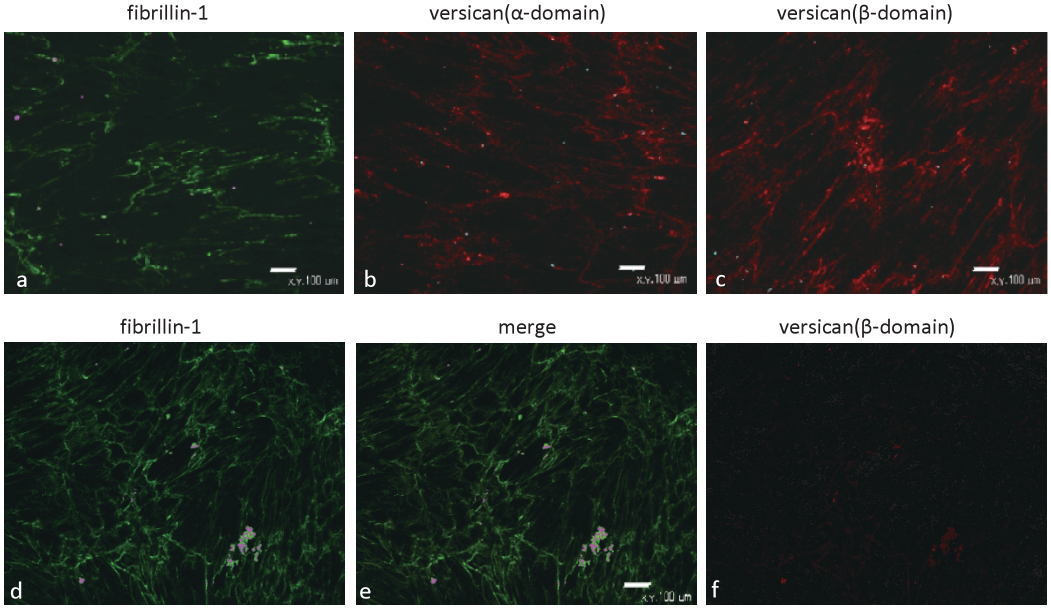


図３　HPLFにおけるfibrillin-１とversican GAG–α domain，β domainの免疫組織化学的局在
単染色ではfibrillin-１，versican GAG–α domainおよびβ domainそれぞれの局在が確認できる（a，b，c）．また，versicanに対する二次抗体はfibrillin-１に対する抗体に反応していない（d–f）．Scale bars：100μm.

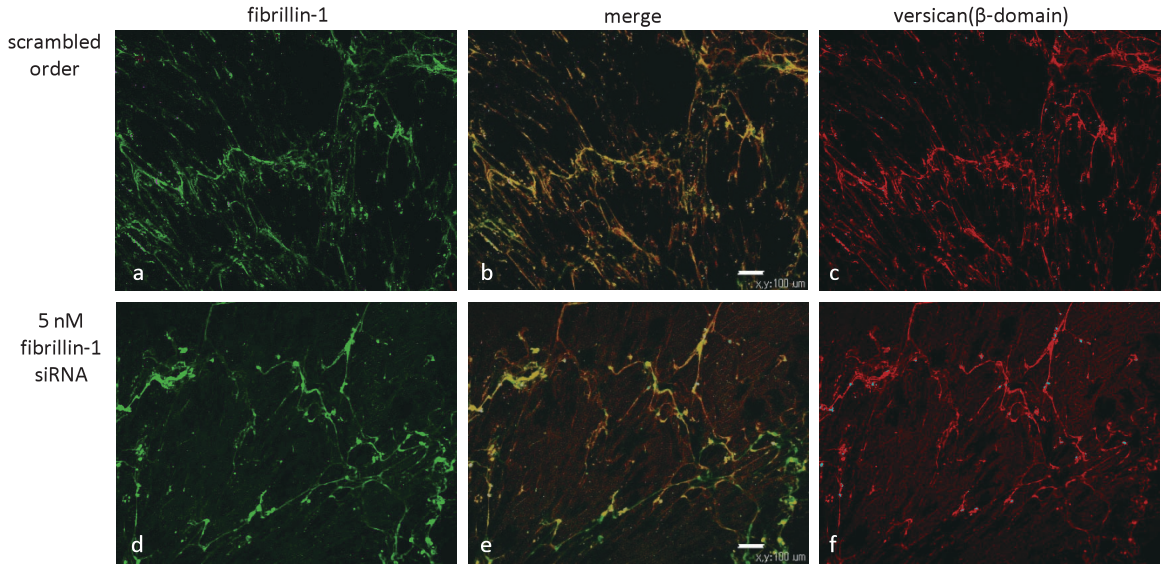


図４　siRNAによるfibrillin-１mRNA発現抑制におけるfibrillin-１とversican GAG–β domainの免疫組織化学的局在
Fibrillin-１siRNAの導入により，細い細網状の染色パターンは消失し，一部で太い線維状の染色パターンを示している（a，d）．Versican GAG–β domainも同様の傾向を示し，さらにその間にびまん性の赤色蛍光が認められる（c，f）．Scale bars：100μm.

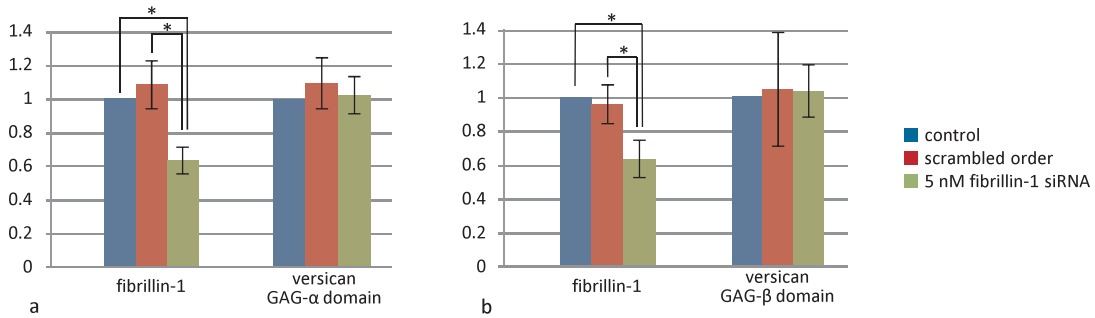


図５　siRNAによるfibrillin-１mRNA発現抑制におけるfibrillin-１とversican GAG–α，GAG–β domainの共焦点レーザー顕微鏡像の解析
Fibrillin-１siRNAにより，fibrillin-１のタンパク質発現量は約60％まで減少しているが，GAG–α，GAG–β domainには大きな変化は認められない．また，対照群とscrambled order群との間には差異はみられない．＊p＜0.01（n＝５）

示していない）．Fibrillin-１のmRNAを抑制したときの　　強度は対照群と変わらなかった（図５a，b）．免疫染色におけるGAG-β domainとGAG-α domainの蛍光

考　　察

１．歯根膜培養細胞における*PLAP-1*と*periostin*の遺伝子発現について

ヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPLF）の特性を明らかにするため，歯根膜組織に特徴的な遺伝子である*PLAP-1*（Periodontal-ligament-associated protein-1 ; Yamada et al., 2001 ; 2006 ; 2007）と*periostin*（Horiuchi et al., 1999 ; Wilde et al., 2003）の発現に関して，類似した結合組織系の歯肉由来線維芽細胞（HGF）と比較した．その結果，HPLFのみに両方のmRNA発現が認められた．

Small leucine-rich proteoglycan（SLRP）に属する*PLAP-1*遺伝子は歯根膜組織に特異的に発現し，歯肉，歯槽骨，骨膜などには全く発現していない（Yamada et al., 2001）．*PLAP-1*遺伝子は歯根膜組織に潜在する骨組織形成能を抑制し，軟組織としての恒常性を維持する機能を営んでいると考えられている（Yamada et al., 2001 ; 2006 ; 2007）．また，*periostin*遺伝子は骨芽細胞様培養細胞であるMC３T３-E１の遺伝子ライブラリより単離・同定された遺伝子であり，骨膜表面と歯根膜組織に局在し（Horiuchi et al., 1999），矯正学的歯の移動に伴う歯槽骨のリモデリングに関与していると考えられている（Wilde et al., 2003）．したがって，本研究で単離したHPLFは歯根膜由来線維芽細胞に特異的な形質を保持していると考えられる．

２．歯根膜培養細胞のfibrillin-１とversicanの発現と局在について

HPLFにfibrillin-１とversicanに対する抗体を用いてそれぞれ単染色を行い，さらにfibrillin-１に対する一次抗体，二次抗体，versicanに用いた二次抗体の順で二重染色を行った．その結果から，今回用いた抗体がターゲットであるfibrillin-１とversicanそれぞれに反応することを確認した．

生化学的分析から，HPLFが産生する主要なプロテオグリカンはversican，decorin，heparan sulphate proteoglycan（HSPG）と未知の91kDaのchondroitin sulphate proteogrycanであり，versicanはdecorinに次いで豊富に存在することが明らかにされている（Larjava et al., 1992）．

今回の研究で，siRNAによってfibrillin-１mRNAを抑制するとfibrillin-１の繊細な細網状の局在は減少し，太い線維状の局在を示した．また，蛍光強度からタンパク量は60％に減少していることが推定された．一方versicanのGAG-αおよびGAG-β domainの局在はfibrillin-１mRNAの抑制によりfibrillin-１に一致した太い線維状の局在を示すとともに，線維間にびまん性の局在を示した．蛍光強度からタンパク量に変化がないことが推定され，versicanの発現がfibrillin-１の発現に影響されないPCRの結果と一致する．このことはfibrillin-１mRNAの抑制によりfibrillin-１が減少したことにより，fibrillin-１に結合できないversicanが基質中に散在している可能性を示唆する．また一定量以上のversicanとの結合により，fibrillin-１が繊細な細網状の分布パターンを取れない可能性も考えられる．

Versicanは複数の構成domainによる多彩な機能を有している（Zimmermann & Ruoslahti, 1989 ; Wight, 2002）．G１domain（hyaluronate binding region；HBR）はGAGの一種であるヒアルロン酸との結合能を有し（LeBaron et al., 1992 ; Ang et al., 1999），細胞外空間のヒアルロン酸被膜（hyaluronate coat）を形成する（LeBaron et al., 1992）．最近の研究によると，視覚の遠近を調節する毛様体においてfibrillin-1, versicanおよびhyaluronateの複合体が柔軟性と含水性をもたらし，眼球の形を維持し圧力や刺激の吸収を行う硝子体においてはその複合体の分解産物が存在することが報告されている．このことから，fibrillin-１とversicanがこれらの組織での生理学的特性に関与していることが示唆されている（Ohno-Jinno et al., 2008）．

以上のことからHPLFはversicanのもつヒアルロン酸結合能力を介して（Zimmermann & Ruoslahti, 1989 ; LeBaron et al., 1992），大きい保水容量をもつヒアルロナンリッチマトリックスにミクロフィブリル（fibrillin-１）を結合させ，歯根膜組織に弾性を与える（Isogai et al., 2002）と推測される．

結　　論

ヒト歯根膜由来線維芽細胞のfibrillin-１発現を抑制すると，fibrillin-１およびversicanの局在が変化することから，歯根膜中のfibrillin-１がversican沈着の足場として機能し，その分布の制御に関わることが示唆された．また適正量のfibrillin-１とversicanの結合が歯根膜におけるfibrillin-１とversicanの細網状局在に重要であることが示された．

参 考 文 献

Ang LC, Zhang Y, Cao L, Yang BL, Young B, Kiani C, Lee V, Allan K & Yang BB. Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain. J Neuropathol Exp Neurol 58 : 597-605, 1999.

Beertsen W, Everts V & van den Hooff A. Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. Arch Oral Biol 19 : 1087-1098,1974.

Böck P & Stockinger L. Light and electron microscopic identification of elastic, elaunin and oxytalan fibers in human tracheal and bronchial mucosa. Anat Embryol 170 : 145-153, 1984.

Carmichael GG & Fullmer HM. The fine structure of oxytalan fibers. J Cell Biol 28 : 33-36, 1966.

Cleary EG & Gibson MA. Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. Int Rev Connect Tissue Res 10 : 97-209, 1983.

Edmunds RS, Simmons TA, Cox CF & Avery JK. Light and ultrastructural relationship between oxytalan fibers in the periodontal ligament of the guinea pig. J Oral Pathol 8 : 109-120, 1979.

Edwards JG. A study of the periodontium during orthodontic rotation of teeth. Am J Orthod 54 : 441-461, 1968.

Fullmer HM & Lillie RD. The oxytalan fiber : a previously undescribed connective tissue fiber. J Histochem Cytochem 6 : 425-430, 1958.

Fullmer HM, Sheetz JH & Narkates AJ. Oxytalan connective tissue fibers : a review. J Oral Pathol 3 : 291-316, 1974.

Greenlee TK Jr, Ross R & Hartman JL. The fine structure of elastic fibers. J Cell Biol 30 : 59-71, 1966.

Horiuchi K, Amizuka N, Takeshita S, Takamatsu H, Katsuura M, Oazwa H, Toyama Y, Bonewald LF & Kudo A. Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor β. J Bone Miner Res 14 : 1239-1249, 1999.

Iozzo RV & Murdoch AD. Proteoglycans of the extracellular environment : clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. FASEB J 10 : 598-614, 1996.

Isogai Z, Aspberg A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP & Sakai LY. Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. J Biol Chem 277 : 4565-4572, 2002.

Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH & Zimmermann DR. Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. Development 121 : 2303-2312, 1995.

Larjava H, Häkkinen L & Rahemtulla F. A biochemical analysis of human periodontal tissue proteoglycans. Biochem J 284 : 267-274, 1992.

LeBaron RG, Zimmermann DR & Ruoslahti E. Hyaluronate binding properties of versican. J Biol Chem 267 : 10003-10010, 1992.

Mecham RP & Davis EC. Elastic fiber structure and assembly. In : Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. Extracellular matrix assembly and structure. New York : Academic Press. 281-314, 1994.

Nakashima K, Tsuruga E, Hisanaga Y, Ishikawa H & Sawa Y. Stretching stimulates fibulin-5 expression and controls microfibril bundles in human periodontal ligament cells. J Periodont Res 44 : 622-627, 2009.

Ohno-Jinno A, Isogai Z, Yoneda M, Kasai K, Miyaishi O, Inoue Y, Kataoka T, Zhao JS, Li H, Takeyama M, Keene DR, Sakai LY, Kimata K, Iwaki M & Zako M. Versican and fibrillin-1 form a major hyaluronan-binding complex in the ciliary body. Invest Ophthalmol Vis Sci 49 : 2870-2877, 2008.

Putnam EA, Cho M, Zinn AB, Towbin JA, Byers PH & Milewicz DM. Delineation of the Marfan phenotype associated with mutations in exons 23-32 of the *FBN1* gene. Am J Med Gen 62 : 233-242, 1996.

Rosenbloom J, Abrams WR & Engvall E. Extracellular matrix 4 : The elastic fiber. FASEB J 7 : 1208-1218, 1993.

Ross R & Bornstein P. The elastic fiber. I. The separation and partial characterization of its macromolecular components. J Cell Biol 40 : 366-381, 1969.

Sakai LY, Keene DR & Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. J Cell Biol 103 : 2499-2509, 1986.

Sakai LY, Keene DR, Glanville RW & Bachinger HP. Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue of microfibrils. J Biol Chem 266 : 14763-14770, 1991.

Simmons TA & Avery JK. Electron dense staining affinities of mouse oxytalan and elastic fibers. J Oral Pathol 9 : 183-188, 1980.

Sims MR. Oxytalan fiber system of molars in the mouse mandible. J Dent Res 52 : 797-802, 1973.

Tsuruga E, Irie K, Sakakura Y & Yajima T. Expression of fibrillins and tropoelastin by human gingival and periodontal ligament fibroblasts in vitro. J Periodontal Res

37 : 23-28, 2002.

Tsuruga E, Irie K & Yajima T. Gene expression and accumulation of fibrillin-1, fibrillin-2, and tropoelastin in cultured periodontal fibroblasts. J Dent Res 81 : 771-775, 2002.

Tsuruga E, Irie K & Yajima T. Fibrillin-2 degradation by matrix metalloproteinase-2 in periodontium. J Dent Res 86 : 352-356, 2007.

Tsuruga E, Nakashima K, Ishikawa H, Yajima T & Sawa Y. Stretching modulates oxytalan fibers in human periodontal ligament cells. J Periodont Res 44 : 170-174, 2009.

Wight TN. Versican : a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. Curr Opin Cell Biol 14 : 617-623, 2002.

Wilde J, Yokozeki M, Terai K, Kudo A & Moriyama K. The divergent expression of periostin mRNA in the periodontal ligament during experimental tooth movement. Cell Tissue Res 312 : 345-351, 2003.

Yamada S, Murakami S, Matoba R, Ozawa Y, Yokokoji T, Nakahira Y, Ikezawa K, Takayama S, matsubara K & Okada H. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. Gene 275 : 279-286, 2001.

Yamada S, Ozawa Y, Tonoeda M, Matoba R, Mtsubara K & Murakami S. Regulation of PLAP-1 expression in periodontal ligament cells. J Dent Res 85 : 447-451, 2006.

Yamada S, Tomosawa S & Murakami S. PLAP-1/aspirin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. J Biol Chem 282 : 23070-23080, 2007.

Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM & Kimata K. Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. J Biol Chem 64 : 8012-8018, 1989.

Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M & Kimata K. Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. J Cell Sci 106 : 55-65, 1993.

Yamagata M & Kimata K. Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. J Cell Sci 107 : 2581-2590, 1994.

Yang BL, Zhang Y, Cao L & Yang BB. Cell adhesion and proliferation mediated through the G1domain of versican. J Cell Biochem 72 : 210-220, 1999.

Zhang Y, Cao L, Yang BL & Yang BB. The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermial growth factor-like motifs. J Biol Chem 273 : 21342-21351, 1998a.

Zhang Y, Cao L, Yang BL & Yang BB. The G3 domain of versican inhibits mesenchymal chondrogenesis via the epidermal growth factor-like motifs. J. Biol Chem 273 : 33054-33063, 1998b.

Zimmermann DR & Ruoslahti E. Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. EMBO J 8 : 2975-2981, 1989.

永坂　萌

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

平成19年３月　北海道医療大学歯学部卒業
平成24年３月　北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了
平成24年４月　北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野
任期制助手

〔原著〕

表面形状基準法により抽出した顔面正中矢状平面の再現性と妥当性 −CT DICOMデータを用いた検討−

辻　祥之[1)]，上地　潤[2)]，武田　成浩[1)]，今野　正裕[2)]，北所　弘行[3)]，溝口　到[2)]，柴田　考典[1)]

1）北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野
2）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
3）北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系顎顔面口腔外科学分野

Reproducibility and appropriateness of the facial midsagittal plane extracted by a surface−based method −Evaluation using the CT DICOM data−

Yoshiyuki TSUJI[1)], Jun UECHI[2)], Shigehiro TAKEDA[1)], Masahiro KONNO[2)], Hiroyuki KITAJO[3)], Itaru MIZOGUCHI[2)] and Takanori SHIBATA[1)]

1）Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
2）Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
3）Division of Oral and Maxillofacial Surgery, Department of Human Biology and Pathophysiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The accurate definition of the midsagittal plane is important to establish an objective criterion of the asymmetry in patients with facial asymmetry. The definition of the plane requires high reproducibility and precision.

To identify a reliable and objective definition of the midsagittal plane, three－dimensional surface models were generated from the CT−DICOM data of patients with facial asymmetry, and a midsagittal plane was extracted using the surface based method on the hard tissue and soft tissue models of these patients. Based on this, the reproducibility and appropriateness of the method to extract the midsagittal plane was evaluated.

The results may be summarized as follows :

1) For intra− and inter−examiner errors (n=10) in the extraction of the midsagittal plane on the hard and soft facial model using CT－DICOM data of one patient with facial asymmetry, the examiner reproducibility of the midsagittal plane extraction was significantly high.

2）The inter－object variability in the midsagittal plane extraction on the facial model using CT−DICOM data for twelve patients with facial asymmetry showed intra− and inter−examiner (n=10) reproducibility of the midsagittal plane extraction that was significantly high.

3）There were few differences in the midsagittal plane extraction between the method using the hard tissue models and that using the soft tissue models, and thus, high rates of concordance for the extraction was shown for both the soft and hard tissue models with the surface based method.

The results of the study suggests that the midsagittal plane extraction using the surface based method has significantly high and sufficiently reproducible and that it is appropriate to establish an objective criterion for the evaluation of facial asymmetry.

Key words：Midsagittal plane, Facial asymmetry, Three−dimensional, Computer−assisted diagnosis

受付：平成24年９月30日　受理：平成24年11月１日

緒　　言

顔面非対称を伴う顎変形症患者（以下，非対称患者）では，三次元的に複雑な顎顔面骨格形態を呈することが多い．そのため非対称患者では，従来使用されていた頭部X線規格写真（以下，セファログラム）に代表される二次元画像でその特徴を充分に把握することが困難であり（Trpkova et al., 2003 ; Maeda et al., 2006），三次元的に評価されなければならない（菅原，川村，2000；高根ら，2001）．顎顔面形態の三次元計測を行うため，非対称患者では硬組織と軟組織のデータを同時に取得できるX線CT画像（以下，CT）データを用いて，仮想化した三次元患者モデル（以下，三次元モデル）を生成する方法が多用されるようになってきた（Xia et al.,2000 ; Katsumata et al., 2005 ; Park et al., 2006 ; Uechi et al., 2006 ; Mizoguchi et al., 2008）．

三次元モデルにおける顔面の対称性の判定に関しては，その基準となる正中矢状平面の設定が重要である（Meyer–Marcotty et al., 2011 ; Damstra et al., 2012）．しかも，その設定には高い再現性が求められる（O'Grady & Antonyshyn, 1990）．しかし，これまで主として行われてきた正中矢状平面の設定法は，検者がマニュアル操作で解剖学的任意点を同定する方法であり，それらの再現性が低いことが指摘されている（De Momi et al., 2006）．さらに，対称性の判定基準として用いる平面には，臨床応用に耐える精度が必要となる（塙ら，2009）．

そこで，本研究では非対称患者の治療開始前における診断のためにCT撮像した時に記録されたDICOMデータを対象とし，三次元サーフェスモデルを生成した．それらサーフェスモデルにおいて表面形状基準法を用いて正中矢状平面の抽出を行い，その際の検者内誤差，検者間誤差，および検者内誤差の対象間変動を評価し，臨床応用の可能性について検討した．

方　　法

1．本研究の構成

本研究では，表面形状基準法を用いて非対称患者の硬・軟両組織モデルに適用できる正中矢状平面抽出法を考案し，その再現性を検討した．続いて同一撮像データから生成した硬・軟両組織モデルにおいて，前述した方法で抽出したそれぞれの正中矢状平面の差異を計測し，その妥当性を検討した（図1）．

2．研究対象

1）対象患者

本研究は，北海道医療大学歯科内科クリニックの顎変形症外来で顎変形症との診断を受けた患者のうち，個人情報保護のもと研究の基礎資料として使用されることに同意が得られた12名（女性9名，男性3名，平均年齢24歳2か月）で，術前診断のために撮像されたCT–DICOMデータ（以下，CTデータ）No. 1～No. 12を研究対象とした（表1）．なおCTデータは研究用に患者の性別と年齢以外のデータは消去した状態で使用し，本研究では正面頭部X線規格写真からオトガイ正中最下点が正中基準線に対し，3. 0mm以上10mm以内の側方偏位を認める軽度の非対称を持つ症例を選択した．

図1　研究方法の構成

2）対象CTデータの取得方法

CTデータの取得にはマルチスライスCT装置

表1　研究対象

対象	年齢	性別	診断
No. 1	15歳6か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 2	23歳2か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 3	25歳	男	非対称を伴う下顎前突症
No. 4	28歳	男	非対称を伴う開咬症
No. 5	38歳6か月	女	非対称を伴う開咬症
No. 6	17歳2か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 7	19歳7か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 8	48歳2か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 9	21歳2か月	男	非対称を伴う下顎前突症
No. 10	15歳2か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 11	18歳6か月	女	非対称を伴う下顎前突症
No. 12	20歳1か月	女	非対称を伴う下顎前突症

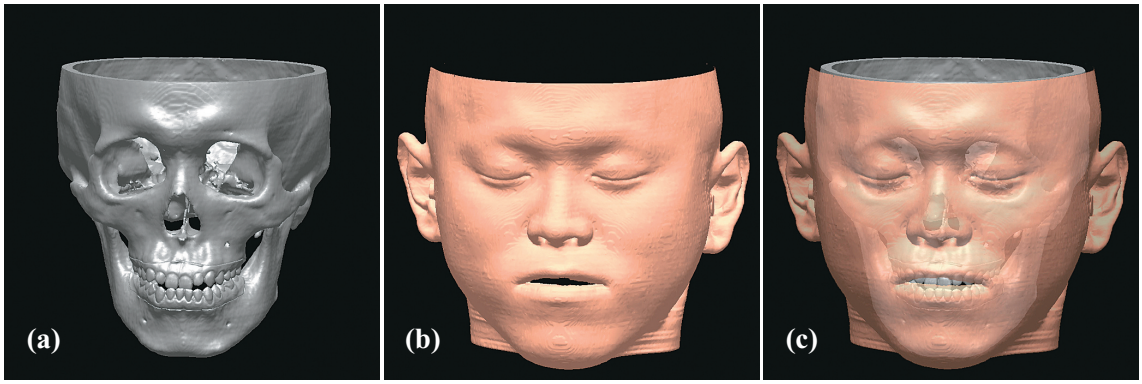


図2 三次元患者モデルの生成
（a）硬組織モデル，（b）軟組織モデル，（c）同一座標系に表示した硬・軟両組織モデル

（ProSpeed FII；GE Medical Systems）を用い，撮像条件をスライス幅1.0mm，移動速度3.0mm/sec，再構築間隔0.5mm，Field of view 256×256mmおよびmatrix 512×512と設定した．CT撮像時の患者体位は仰臥位とし，上顎咬合平面と床面が垂直となるように頭位固定装置を使用した．撮像範囲は眼窩上縁からオトガイ下までとした．なお，このとき撮像されたデータには，CT装置による固有の三次元座標系が自動で設定されている．

3．表面形状基準法を用いた正中矢状平面抽出法

1）三次元モデルの生成

1）−（1）頭蓋顎顔面骨格三次元モデルの生成

患者の硬組織形態分析に用いる頭蓋顎顔面骨格三次元モデル（以下，硬組織モデル）は，以前我々が報告した手法（上地ら，2010）と同様に，CTから得た頭蓋顎顔面骨格情報とサーフェススキャナ（VIVID910, コニカミノルタ）から得た歯列形態情報を融合することにより構築された．このときの硬組織表面データは，DICOM編集ソフトウェア（V−works4.0，CyberMed）に予め定められている骨条件の閾値（CT値：320−3072HU）を用い，サーフェスレンダリングにより抽出表示された（図2−a）．

1）−（2）顔面軟組織三次元モデルの生成

患者の軟組織形態分析に用いる顔面軟組織三次元モデル（以下，軟組織モデル）も同様に，ソフトウェアに規定されている皮膚条件の閾値（CT値：−400−3072HU）を用いて軟組織表面データを抽出した（図2−b）．

硬組織モデルおよび軟組織モデルの生成過程においては，CTデータを三次元サーフェスデータ汎用ファイル形式であるVRML（Virtual Reality Modeling Language）ファイルに変換する必要があり，そのため，硬組織表面データと軟組織表面データを別に抽出した．このときCTデータの位置情報をそのままに保存した．これにより2つのファイルを別の解析ソフトに読み込んだときに実際の患者の硬組織と軟組織の相対的位置関係を維持しながら，両モデルを同一座標系に同時表示することが可能である（図2−c）．

2）部分領域の選択による表面形状基準法を用いた正中矢状平面の抽出手順

硬・軟両組織モデルのVRMLファイルを三次元ポリゴン編集・解析ソフト（RapidForm 2006®, Inus Technology）に読み込み同一座標系に表示した．両モデルに対する正中矢状平面の設定には，部分領域の選択による表面形状基準法を適用した．本法は三次元モデルの左右に存在するどちらか一方の立体形状を任意に選択することで，基準像ならびにその左右反転像を作成し，左右反転像と元画像との位置合わせの結果から正中矢状平面を自動的に算出する方法である．設定手順の詳細を以下に示す．

2）−（1）硬組織正中矢状平面（MSPh）の設定

2）−（1）−a 基準領域の選択

本研究の硬組織モデルの基準領域は，右側眼窩口周囲の幅が10mm程度の環状領域とし，複雑な形状を示す眼窩下孔周囲，または病態や外傷の影響を受けたような左右で明らかに形状が異なる部位は除かれた．基準領域はディスプレイ上に表示された硬組織モデルの骨表面を，本ソフトウェアのペイントブラシツールを用いて“塗る”ことによって選択された（図3−a）．

2）−（1）−b 基準像の作成

選択した基準領域を基準像として作成した．さらにこれを複製し，複製像も作成した（図3−b）．

2）−（1）−c 左右反転像の作成

複製像を，任意の平面を基準に鏡面反転し，左右反転像を作成した（図3−c）．

2）−（1）−d 反転像の硬組織モデルへの位置合わせ（Rough registration）

反転像をマニュアル操作で左側眼窩口領域へと移動させ，三次元モデルとの大まかな位置合わせを行った（図

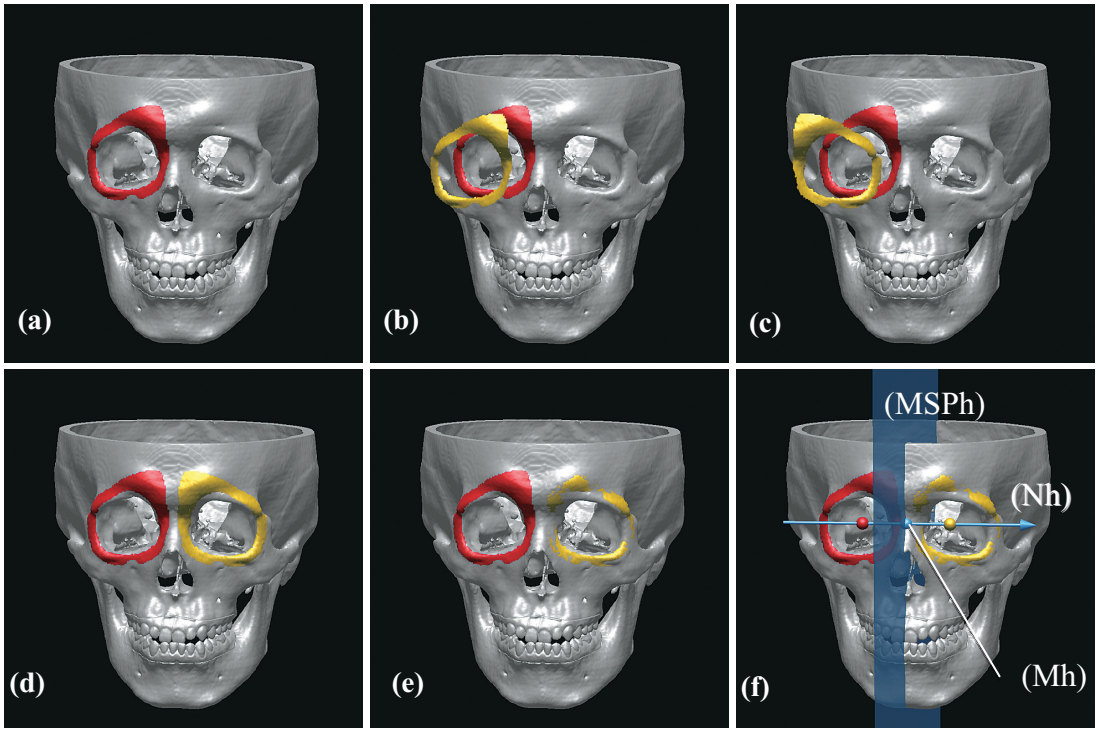


図３　部分領域の選択による表面形状基準法を用いた硬組織モデルへの正中矢状平面の抽出手順
（a）基準領域の選択，（b）基準像の作成，（c）左右反転像の作成，（d）反転像の硬組織モデルへの位置合わせ（Rough registration），（e）反転像の硬組織モデルへの位置合わせ（Fine registration），（f）正中矢状平面の抽出（MSPh）

３－d）.

２）－（１）－e　反転像の硬組織モデルへの位置合わせ（Fine registration）

つぎに本ソフトウェアに実装されているICP（Iterative Closest Point）アルゴリズム（Rusinkiewicz & Levoy, 2001）を使用して，硬組織モデルとの詳細な自動位置合わせを実行した．これにより，同じ面積で形状が鏡映対称である２つの像が左右眼窩口領域にそれぞれ位置づけられたことになる（図３－e）.

２）－（１）－f　正中矢状平面の抽出

基準像と反転像の重心点を結ぶ線分を引き，その中点（Midpoint of hard tissue model：以下，（Mh））を通り線分を法線ベクトル（Normal vector of hard tissue model：以下，（Nh））とする対称平面を算出する．法線ベクトル（Nh）＝（a, b, c），中点（Mh）＝（x_0, y_0, z_0）とするとき，平面が算出される方程式は

$$a(x-x_0)+b(y-y_0)+c(z-z_0)=0$$

で示される．本研究では，この平面を硬組織モデルから抽出した正中矢状平面（Mid-Sagittal Plane of hard tissue model：以下，MSPh）と規定した（図３－f）.

２）－（２）軟組織正中矢状平面（MSPs）の設定

軟組織モデルの基準像は，硬組織モデルの基準像に対応する右側眼部周囲で，検者が軟組織の厚みが比較的薄いと判断した領域から作成された（図４－a）．これ以降のステップは硬組織モデルの方法に準じて行い（図４－b，c，d，e），中点（Ms），法線ベクトル（Ns）から，求めた平面を軟組織正中矢状平面（Mid-Sagittal Plane of soft tissue model：以下，MSPs）と規定した（図４－f）.

４．再現性の検討

１）検者内誤差

同一検者が時を異にして，CTデータ（No. １）硬組織モデルから表面形状基準法を用いてMSPhを，CTデータ（No. １）軟組織モデルからMSPsを各々10回抽出した．なお，計測は少なくとも１日以上の間隔を開けることとした.

本研究ではまず，比較の対象となる標準平面を設定した．設定方法は抽出した10面のMSPhの中点（Mh）の座標値を平均し，硬組織平均中点（Reference－（Mh）：以下，R－(Mh)）を算出，MSPhの法線ベクトル（Nh）を平均し，硬組織平均法線ベクトル（Reference－(Nh)：以下，R－(Nh)）を算出した．R－(Nh）を法線とし，R－(Mh）を通る平面を生成し，これを硬組織標準平面（Reference- MSPh：以下，R-MSPh）とした．R-MSPhと各MSPh10面との硬組織二面角（以下，ϕh），中点（Mh）から標準平面までの硬組織法線距離（以下，Lh）を計測し（図５），それぞれ平均値と標準偏差を求めた.

同様に（Ms），（Ns）から軟組織平均中点（Reference－(Mh)：以下，R－(Mh)）と軟組織平均法線ベクトル（Reference－(Nh)：以下，R－(Nh)）を算出した．これ

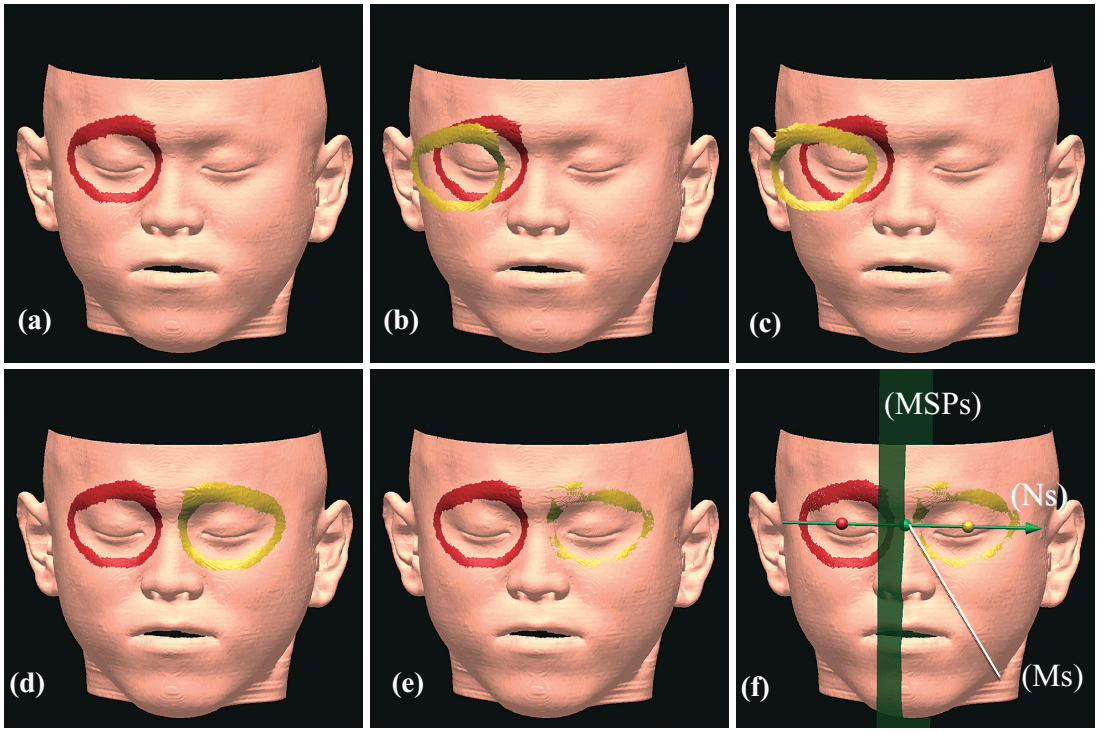


図 4　部分領域の選択による表面形状基準法を用いた軟組織モデルへの正中矢状平面の抽出手順
（a）基準領域の選択，（b）基準像の作成，（c）左右反転像の作成，（d）反転像の軟組織モデルへの位置合わせ（Rough registration），（e）反転像の軟組織モデルへの位置合わせ（Fine registration），（f）正中矢状平面の抽出（MSPs）

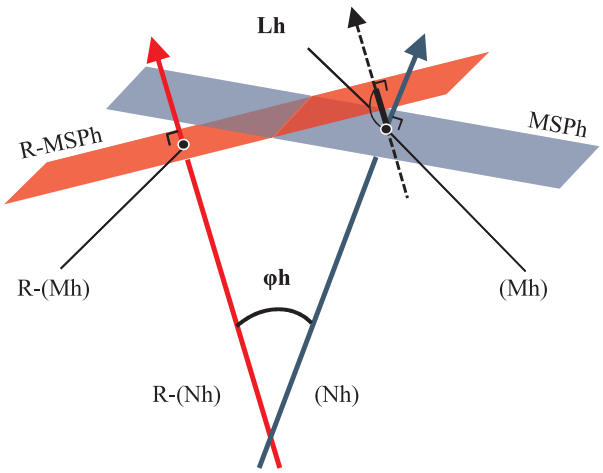


図 5　硬組織モデルにおける再現性の検討
MSPh：硬組織正中矢状平面，R–MSPh：硬組織標準平面，（Mh）：硬組織中点，R－(Mh)：硬組織平均中点，（Nh）：硬組織法線ベクトル，R－(Nh)：硬組織平均法線ベクトル，φh：硬組織二面角，Lh：硬組織法線距離

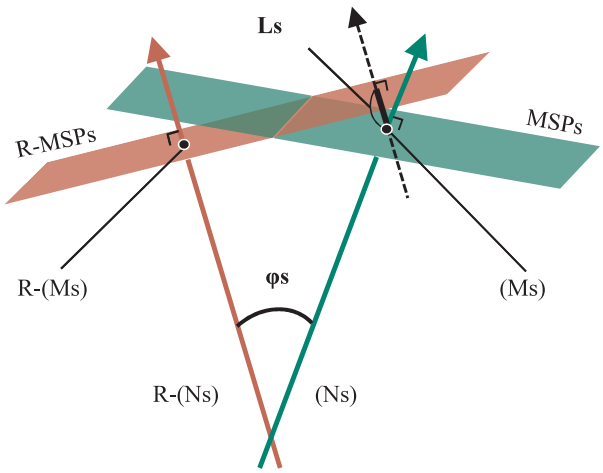


図 6　軟組織モデルにおける再現性の検討
MSPs：軟組織正中矢状平面，R–MSPs：軟組織標準平面，（Ms）：軟組織中点，R－(Ms)：軟組織平均中点，（Ns）：軟組織法線ベクトル，R－(Ns)：軟組織平均法線ベクトル，φs：軟組織二面角，Ls：軟組織法線距離

から軟組織標準平面（Reference– MSPs：以下，R–MSPs）を設定し，軟組織二面角φs，軟組織法線距離Lsを計測し（図 6），それぞれ平均値と標準偏差を求めた．

つぎに，求めた二面角と法線距離から硬組織と軟組織のデータ間の差を統計学的に検討した．統計ソフトJMP，Ver. 11. 0を用いて，Shapiro–WilkのW検定にて正規性を検定し，正規性を認めればStudentのt検定を，認めなければWilcoxon検定を行い，$p<0.05$を有意差ありと判定した．

2）検者間誤差

10名の検者（矯正歯科医 5 名，口腔外科医 5 名）がCTデータ（No．1）硬組織モデルと，CTデータ（No．1）軟組織モデルから 1 回ずつMSPhとMSPsを抽出した．

設定された標準平面R–MSPhと抽出された10面との二面角φh，中点（Mh）から標準平面までの法線距離Lhを計測し（図 5），それぞれ95％信頼区間を求めた．同様にMSPsから標準平面R–MSPsを設定し，二面角φs，法線距離Lsを計測し（図 6），それぞれ95％信頼区間を求め

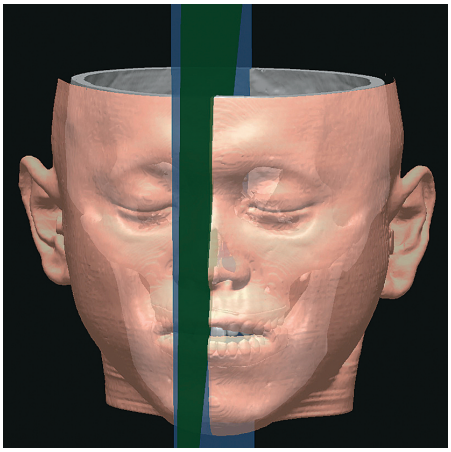


図 7　同一座標系に表示した硬・軟両組織モデルと抽出した二平面

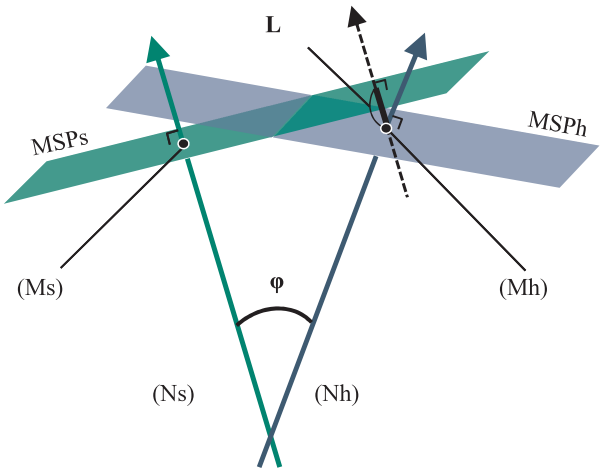


図 8　妥当性の検討
MSPh：硬組織正中矢状平面，MSPs：軟組織正中矢状平面，(Mh)：硬組織中点，(Ms)：軟組織中点，(Nh)：硬組織法線ベクトル，(Ns)：軟組織法線ベクトル，ϕ：二面角，L：法線距離

た．つぎに硬組織と軟組織のデータ間の有意差を検者内誤差と同様に検定した．

3）対象間変動

同一検者がCTデータ（No. 1 ～No. 12）硬組織モデルについて，それぞれMSPhを10回ずつ抽出した．

各硬組織モデルに10面のMSPhから標準平面R–MSPhを設定し，抽出された10面との二面角ϕh，中点（Mh）から標準平面までの法線距離Lhを計測し（図 5），それぞれの平均値と標準偏差を求めた．これにより検者内誤差の対象間変動を評価した．

5．妥当性の検討

同一検者がCTデータ（No. 1 ～No. 12）硬・軟両組織モデルからそれぞれMSPhとMSPsの抽出を 1 回ずつ行った．

硬・軟両組織モデルと抽出した二平面を同一座標系に表示し（図 7），二面角ϕ，MhからMSPsまでの法線距離Lを計測し（図 8），平均値と標準偏差を求めた．

表 2　再現性の検討　検者内誤差

	硬組織			軟組織	
計測	ϕh（°）	Lh（mm）	計測	ϕs（°）	Ls（mm）
1	0. 08	0. 00	1	0. 12	0. 07
2	0. 19	0. 12	2	0. 32	0. 14
3	0. 18	0. 04	3	0. 21	0. 17
4	0. 09	0. 01	4	0. 25	0. 17
5	0. 04	0. 03	5	0. 04	0. 03
6	0. 16	0. 14	6	0. 17	0. 13
7	0. 02	0. 19	7	0. 54	0. 11
8	0. 34	0. 12	8	0. 17	0. 10
9	0. 15	0. 30	9	0. 38	0. 03
10	0. 16	0. 08	10	0. 32	0. 24
平均	**0. 142**	**0. 104**	平均	**0. 253**	**0. 119**
標準偏差	**0. 091**	**0. 093**	標準偏差	**0. 145**	**0. 065**

ϕh：硬組織二面角　　ϕs：軟組織二面角
Lh：硬組織法線距離　　Ls：軟組織法線距離

結　　果

1．再現性の検討

1）検者内誤差

同一検者が抽出した10面から得られた平均値と標準偏差は，硬組織モデルで二面角ϕhが0. 142 ± 0. 091°，法線距離Lhが0. 104 ± 0. 093mmであり，軟組織モデルで二面角ϕsは0. 253 ± 0. 145°，法線距離Lsは，0. 119 ± 0. 065 mmであった（表 2）．

二面角ϕ，法線距離Lともに硬・軟組織モデル間データに有意差を認めなかった．

2）検者間誤差

95％信頼区間は，硬組織モデルで二面角ϕhが0. 138＜ϕh＜0. 315°，法線距離Lhが0. 018＜Lh＜0. 084mm，軟組織モデルで二面角ϕsが0. 123＜ϕs＜0. 341°，法線距離Lsが0. 055＜Ls＜0. 143mmであった（表 3）．

二面角ϕ，法線距離Lともに硬・軟組織モデル間データに有意差を認めなかった．

3）対象間変動

硬組織モデル（No. 1 ～No. 12）のうち，二面角ϕhの平均値が最も大きかったのはNo. 10の0. 257 ± 0. 145° であり，その法線距離Lhの平均値は0. 079 ± 0. 078mmであった．法線距離Lhの平均値が最も大きかったのはNo. 4の0. 155 ± 0. 073mmであり，その二面角ϕhの平均値は0. 198 ± 0. 066° であった（表 4）．

2．妥当性の検討

二面角ϕは，最大で0. 79°（No. 4），最小で0. 13°（No. 6）であり，平均値と標準偏差は，0. 505 ± 0. 219°であった．法線距離Lは，最大で0. 42mm（No. 3），最小で0. 03mm（No. 5，No. 12）であり，平均値と標準偏

表3 再現性の検討 検者間誤差

硬組織			軟組織		
検者	ϕh（°）	Lh（mm）	検者	ϕs（°）	Ls（mm）
1	0.11	0.04	1	0.10	0.24
2	0.47	0.12	2	0.51	0.15
3	0.30	0.12	3	0.30	0.08
4	0.25	0.05	4	0.05	0.14
5	0.15	0.05	5	0.06	0.05
6	0.06	0.01	6	0.36	0.05
7	0.31	0.10	7	0.37	0.05
8	0.13	0.01	8	0.20	0.11
9	0.17	0.01	9	0.16	0.08
10	0.30	0.01	10	0.22	0.05
95%信頼区間	$0.138<\phi<0.315$	$0.018<L<0.084$	95%信頼区間	$0.123<\phi<0.341$	$0.055<L<0.143$

ϕh：硬組織二面角　Lh：硬組織法線距離　ϕs：軟組織二面角　Ls：軟組織法線距離

表4 再現性の検討対象間変動

硬組織				
	ϕh（°）		Lh（mm）	
モデル	平均	標準偏差	平均	標準偏差
No. 1	0.142	0.091	0.104	0.093
No. 2	0.186	0.092	0.079	0.048
No. 3	0.148	0.078	0.074	0.061
No. 4	0.198	0.066	0.155	0.073
No. 5	0.124	0.075	0.051	0.055
No. 6	0.102	0.059	0.053	0.028
No. 7	0.084	0.063	0.022	0.017
No. 8	0.116	0.064	0.076	0.045
No. 9	0.208	0.086	0.089	0.058
No. 10	0.257	0.145	0.079	0.078
No. 11	0.257	0.145	0.079	0.078
No. 12	0.257	0.145	0.079	0.078

ϕh：軟組織二面角　Lh：軟組織法線距離

表5 妥当性の検討

モデル	ϕh（°）	L（mm）
No. 1	0.67	0.11
No. 2	0.70	0.26
No. 3	0.52	0.42
No. 4	0.79	0.22
No. 5	0.61	0.03
No. 6	0.13	0.08
No. 7	0.29	0.06
No. 8	0.72	0.37
No. 9	0.27	0.05
No. 10	0.63	0.08
No. 11	0.26	0.08
No. 12	0.49	0.03
平均	0.505	0.150
標準偏差	0.219	0.134

ϕ：二面角　L：法線距離

差は，0.150±0.134mmであった（表5）．

考　　察

1．先行研究と本研究の位置付け

非対称患者は，三次元的に複雑な顎顔面骨格形態を呈することが多い．従来その分析はセファログラムに代表される二次元画像で行われてきた（Proffit et al., 2002）．しかし側面セファログラムでは主に顎顔面形態の矢状面投影における前後的，垂直的特徴の把握が，正面セファログラムでは主に顎顔面形態の前頭面投影における水平的特徴の把握が行われ，個々に分析されてきた（Maeda et al., 2006）．さらに立体構造物である顎顔面頭蓋における各部の分析では，これら物体の局所座標系のx，y，z軸上における位置とともに，x，y，z軸を回転軸とするPitching，Rolling，Yawing運動を含む姿勢の要素を把握する必要がある．しかし側面セファログラムではRolling要素やYawing要素，正面セファログラムではPitching要素の把握が難しく，これらが複雑に組み合わさった非対称患者では二次元画像でその特徴の把握は不可能である（菅原，川村，2000；Trpkova et al., 2003；Maeda et al., 2006）．

三次元モデルを用いた解析では顎顔面頭蓋における各部の分析を，撮像時の絶対座標系を維持しながら局所座標系における位置と姿勢の要素を把握して行うことが可能と考えられる．高根らはX線CT三次元画像とセファログラムを正面像で比較し，前者が左右差の検出能及び計測の再現性に優れていたと報告している（高根ら，2001）．Adamsらはヒト乾燥頭蓋骨を用いてセファログ

ラムと三次元モデルの計測誤差を比較したところ，三次元モデルはセファログラムの４～５倍の正確性があったと報告している（Adams et al., 2004）．

顎顔面形態の三次元データ採取法には直接採取法と間接採取法があり，前者ではノギスによる直接計測，接触，非接触型サーフェススキャナによる計測などがある．これらは主に軟組織形態の把握に用いられるが，被検者の拘束時間が長く，呼吸などの生体運動によるブレを生じることから，臨床ではあまり用いられていない．また後者には顔面模型計測や，CTデータ，MRI画像データなどを対象として，三次元計測に用いる方法がある（香月，後藤，2001；葛西ら，2002；土井，2010）．なかでも顎変形症患者には硬組織と軟組織のデータを同時に取得できるCTデータを用いる方法が多用されている（山崎ら，2005；Jung et al., 2009；Cevidanes et al., 2010；Ryckman et al., 2010）．CTデータを用いて顎顔面形態の立体画像を作るためには，レンダリングと呼ばれる画像処理を行う必要がある．レンダリング法を大別すると，データに閾値を設けず，すべてのデータを利用するボリュームレンダリング法と，データに閾値を設けて二値化するサーフェスレンダリング法がある．どちらも三次元モデルができるが，モニター上には二次元画像として出力される．この時ボリュームレンダリング法では，視点変更，拡大，縮小の度に，再計算の必要があるのに比べ，サーフェスレンダリングではそれらの再計算を要さない利点がある（土井，2010）．

サーフェスレンダリングにより閾値で二値化を行う際，硬組織，軟組織のCT値を用いることで顎顔面の硬組織モデル，軟組織モデルとして生成することができる．しかし硬組織モデルにおいてCTから得られる画像では，主として歯列部分のエナメル質，骨のpartial volume effectにより境界が不鮮明となり，三次元モデル生成時の誤差が大きくなる（根本ら，1997；Nishii et al., 1998；Choi et al., 2002；Gateno et al., 2003）．そこでわれわれは，歯槽部についての情報を印象採得により作成した歯列模型をサーフェススキャナ（VIVID910，コニカミノルタ）により計測し，CTデータから得た骨格情報とのマルチモダリティ三次元画像融合法を用いて硬組織モデルを生成した．本法を用いた三次元モデルが高い精度を有していることは上地らの報告に詳しい（Uechi et al., 2006；上地ら，2010）．同様の融合モデルについてはその他多くの報告があり（Nishi et al., 1998；布留川ら，2000；Sohmura et al., 2005；Gateno et al., 2007；Nkenke et al., 2004, 2007），今後精度の高い顎顔面歯列モデルの生成において多用されると考えられる．

三次元モデルで再現性の高い正中矢状平面を設定することは，頭蓋顎顔面の対称性の評価において本質的要素である（O'Grady & Antonyshyn, 1990）．これまで主として行われてきた任意点に基づく正中矢状平面の設定には，篩骨垂直板突起の最もくびれた点や大後頭孔線上で棘孔間線に対する最前方点など顔面の正中にあるとされる点や，左右眼窩下縁の最下点や左右外耳孔の最上縁点など左右で対をなす点の中点など，セファログラムで用いられてきた計測点（宮下，1999）が利用されてきた．これらの計測点は二次元画像上で定義されているため，三次元画像上では一点に定まらないことがあり，有効性に疑問が残る．また，その再現性は，検者の識別能力に強く影響される（De Momi et al., 2006 ; De Oliveira et al., 2009）．三次元上の任意点の同定では，６自由度の仮想空間上で三次元モデルの位置と姿勢を制御した上で実施するため，操作がきわめて煩雑となる欠点がある．また軟組織には骨表面に比べ確立された解剖学的特徴点が少なく（向井，2009），しかも信頼性が低い．これらの不正確な任意点を用いることは，抽出された正中矢状平面の信頼性を大きく損ねることとなる（野口ら，1996；Hartmann et al., 2007）．

三次元モデルにおける任意点同定の欠点を解消するために，任意面を用いた表面形状基準法が考案された（野口ら，1996；Benz et al., 2000；De Momi et al., 2006）．表面形状基準法には正中矢状平面の抽出に三次元モデルの表面形状の全領域を基準とする方法（Benz，2005）と，表面形状の部分領域を選択し，基準とする方法（野口ら，1996；De Momi et al., 2006）がある．前者は三次元モデルの全領域を選択するため，ほぼすべての操作を自動で行うことができる．しかし膨大な演算能力を要するばかりではなく，経時的形態変化をきたす場合や著しい非対称患者などでは，再現性の高い正中矢状平面を抽出できない可能性が高い．後者は，検者の手動操作により，症例の特徴や状態に合わせて適宜基準に用いる領域を選択することができるため，病態または外傷の影響を受けない妥当性を有している．De Momiらは硬組織モデルの選択する部分領域の違いにより，眼窩上縁部，頬骨部，および上顎歯槽部で正中矢状平面の精度の相違を検証しており，上顎歯槽部に比べて眼窩上縁部と頬骨部の両者で高い再現性が得られるとした（De Momi et al., 2006）．しかし，これまでの研究は全て硬・軟組織モデルそれぞれについてなされたものであり，同一患者の硬・軟組織からえた２つの正中矢状平面の一致度を検討した報告はない．

人の顔が完全な対称性を示すことはほとんどないこと

が知られている（Profit et al., 2002）．すなわち完全な対称平面が存在することはない．そのため，得られた正中矢状平面が対称性の診断に妥当性があるか否かについて検討した報告は少ない（塙ら，2009）．

そこで本研究では，同一撮像CTデータから，硬組織と軟組織の形状データを取得し，それらデータから三次元モデルを生成した．その上で，部分領域を選択する表面形状基準法を用い硬・軟組織の正中矢状平面を各々に抽出することにより，再現性および近似性を検討した．

２．画像処理法について

本研究で対象とした三次元モデルは，CTデータから閾値を硬組織320HU，軟組織－400HUで固定し，サーフェスレンダリングにより生成した．骨のCT値は100～1000Hounsfield units（HU）であるので，この間の適切な閾値でデータを抽出し，サーフェスモデルを形成する方法が一般的に用いられている．CT値はX線減弱の相対値であるため，同一物質でも常に一定値を示すわけではなく，被写体の大きさ，X線源の管電圧，スライスの厚み，および画素の大きさ等により影響される（真野，金子，1990；槇，1988）．また，骨表面のCT値が一定ではないため，設定した閾値により生成したサーフェスモデルと実際の骨表面とに誤差が生じてしまう可能性がある．これまで，顎骨形態をサーフェスレンダリングした上で閾値を検討した報告のうち，根本らは閾値を410HU前後にすることで安定した下顎骨表面形状が得られるとし（根本ら，1997），齋藤らは530HUが顎関節部の再構築に適しているとした（齋藤ら，2010）．さらにParkらはわれわれと同じV−works4.0を用いて上下顎骨の歯槽骨とその基底骨のHUを検索し、上下顎ともに皮質骨は800HU以上であるが，海綿骨は100～400HUであると報告しているいる（Park et al., 2008）．また，本研究では三次元モデルの表面形状が欠落することのないように閾値を設定し、データ間の表面形状が一定となるようにした．

本研究における表面領域の選択条件は，可及的に左右対称であること，顎矯正手術後に形態変化が起こらないこと，軟組織厚径が一定で変化の少ないこと，硬・軟両組織モデルで共に使用できることとした．顎矯正手術により変化のない部位としては，LeFortI型骨切り線から可及的に離れている必要があり，軟組織では，前額部や鼻根部（比地岡，1998；中川ら，2001；寺嶋ら，2005；Baik & Kim, 2010）で影響が少ないという．ついで軟組織厚径は，一般に個人の栄養状態に左右されるとされるが，顔面正中線上や，眼窩部周辺ではほとんど影響がないとされ（宮坂，1990），厚径を計測した報告では，頭部，鼻骨先端部，眼部における計測点で薄かった（森ら，2003）．本研究ではこれらの先行研究から前頭部を含む眼周囲の環状部位を硬軟両組織の選択領域とした．

部分領域を選択した表面形状基準法では，モデルの左右に存在するどちらか一方の立体形状を任意に選択することと，選択した基準像の反転像を目標とする領域に大まかに位置合わせすることにおいて手動操作が必要である．ついで，反転像と元画像との詳細な位置合わせについては，自動的に行うことで正中矢状平面が抽出される．この自動で位置合わせを行う方法は，すべての三次元画像データを同時に位置合わせることにより，全体の誤差を最小限にする方法であるICPアルゴリズム（Besl & Mckay, 1992）を用いた．このICPアルゴリズムにはさまざまな改良型が報告されており，本研究では反転像の三次元画像データの点群と元画像の三次元データの面上に対応点を求める方法（Chen & Medioni, 1992）で，ポリゴン編集ソフト（RapidForm2006®, Inus Tech.）に実装されている改良型ICPアルゴリズムを使用した（Rusinkiewicz & Levoy, 2001）．

３．結果について

本法により抽出された正中矢状平面の誤差は，ICPアルゴリズムを含む表面形状基準法のアルゴリズムに起因する誤差（以下，アルゴリズム誤差），検者内誤差，検者間誤差，および対象間変動により構成されている．本研究ではアルゴリズム誤差は常に存在するので，それ以外の検者内誤差，検者間誤差および対象間変動を計測し，本法の正中矢状平面の再現性を検討した．

臨床応用における再現性および妥当性の検討においては，本研究で用いた三次元画像における空間分解能（0.5×0.5×0.5mm）を基準とした．すなわち，三次元モデルの上下方向を示すスライス厚が再構築間隔と同じ0.5mmで，三次元モデルの前後左右方向を示すピクセルサイズは，Field of view 256×256mmおよびmatrix 512×512であることから0.5×0.5mmとなる．

１）再現性の検討

検者内誤差の計測の軟組織モデルにおいて，標準平面R−MSPsと軟組織の正中矢状平面MSPsの二面角ϕsは二平面の傾きを示し，これは二平面の垂線のなす角と同じことから，各法線ベクトルをR－(Ns)，(Ns)とする時，二面角ϕは

$$|R-(N_S)||(N_S)|\cos\phi = R-(N_S)\cdot(N_S)$$

で定義され，ϕs＝0の時R−MSPsとMSPsは平行または同一平面となる．

また平面MSPs上の点（Ms）を（x_0, y_0, z_0），R−MSPsの平面式をax+by+cz+d＝0とした時，法線距離Lsは

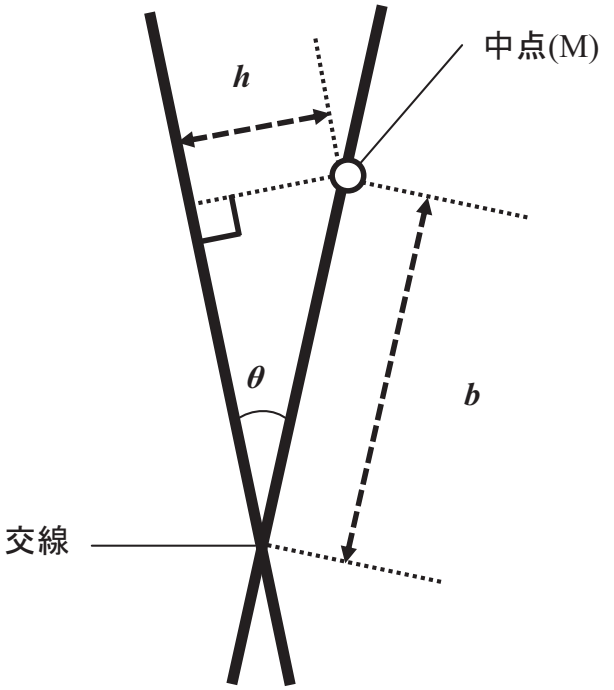


図9　二平面の交線と中点（M）
h：直角三角形の底辺の高さ（法線距離L），b：直角三角形の斜面の距離，θ：二面角ϕ

$$Ls = \frac{|ax_0 + by_0 + cz_0 + d|}{a^2 + b^2 + c^2}$$

で示される．すなわち，ϕsとLsの値がともに0に近づくほどR–MSPsとMSPsは近似し，ともに0であれば同一平面とみなすことができる．反対にϕsとLsのどちらかの値が大きくなれば，そのぶん二平面間に差異が存在することを意味する．

つぎに二面角ϕsを，法線距離Lsを直角三角形の高さhとした時，その斜面の距離bは，

$$b = \frac{h}{\sin\theta}$$

で計算される（図9）．斜面の距離は中点（M）から交線までの垂線の距離bとなる．三次元空間における面上の点と，もう一方の平面までの法線距離は，交線から離れる程その距離は広がる．つまり二面角が小さくても，交線から離れた面上の点では法線距離が大きくなってしまう．

検者内誤差において，R–MSPsとMSPsの二面角ϕsの平均は0.253±0.145°，法線距離Lsの平均は0.119±0.065mmであった．中点（Ms）から交線までの垂線の距離を計算すると，26.95mmになる．つぎに，二面角ϕsの0.253°をCTデータの空間分解能0.50mmの法線距離になる場合の中点（Ms）から交線までの垂線の距離は113.23mmとなる．つまり頭部の大きさを考慮すると，交線は三次元モデル内に存在する可能性が高く，交線からの距離が空間分解能を越えるまでは臨床上問題にならないと考えられた．

検者間誤差において，本研究では研究目的および方法について十分理解した検者10人で再現性の検討を行い，抽出した平面のばらつきの95%信頼区間を求めた．二面角ϕsの上限境界値0.341°を法線距離に換算すると二平面の交線から84.01mmの位置で0.50mmの法線距離となる．また二面角ϕsが0.341°で法線距離Lsが本研究の上限境界値0.143mmのとき，交線は，MSPsの中点から24.03mmに位置している．

対象間変動は12の硬組織モデルで検者内誤差を計測することで検討した．つまり検者内誤差の対象間変動を検討した．No.10において計測された二面角ϕhが最大値で，その0.257°は法線距離に換算すると，二平面の交線から111.47mmの位置で0.50mmの法線距離となる．このとき法線距離Lhの平均は0.079mmであり，二平面の交線の位置は，MSPhの中点から17.61mmに位置している．

これら3つの誤差の大きさから，本研究の正中矢状平面抽出法による正中矢状平面の再現性は高いことが示された．

2）妥当性の検討

本来CT撮像においてはガントリーに規定される絶対座標系を有し，同一撮像条件下であれば硬・軟組織モデルは共に同一座標系を有している．それら両モデル上の正中矢状平面は理論的には完全に一致する．そこで，表面形状基準法を用いて硬・軟組織の正中矢状平面を抽出した場合に，両者の相違が小さいほど，表面形状基準法を用いた正中矢状平面抽出法の精度が高いものと判定できると考え検証を行った．

本研究において，MSPhとMSPsの二面角ϕは0.505±0.219°であった．本研究と同様の手法で三次元モデルの正中矢状平面を調査した報告（Benz，2005）では，二面角の平均が二人の検者で0.29±0.14°と0.31±0.21°であり，本研究の結果と比較して小さかった．しかし，その研究は1つの軟組織モデルに対して正中矢状平面を11回設定し，その中から無作為に選んだ1つの平面とその他の平面との誤差を求め，設定の再現性を調査したものである．それに対し本研究では，同一患者の硬・軟組織モデル，すなわち2つの異なるモデルに設定した二平面間の差異からその一致度を調査したものである．しかしながら，その研究の値との差は僅かであった．またMSPhとMSPsの差異である二面角ϕ0.505°を法線距離に換算すると，二平面の交線から56.73mmの位置で0.50mmの法線距離となる．また二面角ϕが0.505°で法線距離Lが0.150mmのとき，交線は中点から17.02mmの距離

に位置している計算になる．MSPhとMSPsの二面角φは表面形状基準法で抽出された正中矢状平面の再現性よりも大きかったが，法線距離Lはほぼ同様の値を示した．これは交線の位置が中点から大きく離れないことを意味し，この二面角の大きさは三次元モデル内において臨床応用に十分耐えうると考えられた．

本研究では比較的軽度の非対称を伴う顎変形症患者を対象とした．今後，今回用いた方法を著しい非対称を伴う顎変形症患者に適用し，抽出された正中矢状平面の再現性と妥当性に差異が生じないことを確認することが必要と思われる．また，本研究では，表面形状基準法における基準像を右側眼窩周囲に設定し，反転像を左側同領域に位置付けることで正中矢状平面を算出した．これは眼窩周囲の形状が対称平面を挟んで左右対称であることを前提に行われており，左側眼窩周囲を基準像として，反転像を右側眼窩周囲に位置付ける方法でも本研究と同様の結果となることを確認することが必要と思われる．

結　　論

1，骨格性顎変形症患者1名の治療前診断のために撮像したCT−DICOMデータを用い，硬・軟両組織モデルを生成した．両モデルの正中矢状平面を表面形状基準法により抽出し，その検者内，検者間（n＝10）誤差を検討し，再現性が高いことを立証した．

2，骨格性顎変形症患者12名の治療前診断のために撮像したCT−DICOMデータを用い，それらの硬組織モデルを生成した．それらについて抽出した正中矢状平面の対象間変動を検討したところ，高い再現性を示した．

3，同時に，個々の撮像データから得られた硬・軟両組織モデルについて，表面形状基準法を用いて抽出した正中矢状平面間の差異はわずかで、高い近似性が証明された．

以上より，本研究における顎顔面撮像CT−DICOMデータにより生成された三次元モデルにおいて，表面形状基準法を用いて抽出した正中矢状平面は，十分な再現性と妥当性を有し，臨床応用が可能であることが明らかとなった．

文　　献

Adams GL, Gansky SA, Miller AJ, Harrell WE Jr & Hatcher DC. Comparison between traditional 2−dimensional cephalometry and a 3−dimensional approach on human dry skulls. Am J Orthod Dentofacial Orthop 126 : 397−409, 2004.

Baik HS & Kim SY. Facial soft−tissue changes in skeletal Class III orthognathic surgery patients analyzed with 3−dimensional laser scanning. Am J Orthod Dentofacial Orthop 138 : 167−78, 2010.

Benz M. Ergebnismodellierung und Qualitätskontrolle Krani−ofazialer Operationen auf Basis optischer Messtechnik. Frie−drich−Alexander−University Erlangen−Nuremberg, 2005.

Besl PJ & McKay ND. A method for registration of 3−D shapes. IEEE Trans Pattern Anal Mach Vision 14 : 239−256, 1992.

Cevidanes LH, Motta A, Proffit WR, Ackerman JL & Styner M. Cranial base superimposition for 3−dimensional evaluation of soft−tissue changes. Am J Orthod Dentfacial Orthop 137 : 120−129, 2010.

Chen Y & Medioni G. Object modelling by registration of multiple range images. Image and Vision Computing 10 : 1145−155, 1992.

Choi JY, Ckoi JH, Kim NK, Kim Y, Lee JK, Kim MK, Lee JH & Kim MJ. Analysis of errors in medical rapid prototyping models. Int J Oral Maxillofac Surg 31 : 23−32, 2002.

Damstra J, Fourie Z, De Wit M & Ren Y. A three−dimensional comparison of a morphometric and conventional cephalometric mid−sagittal planes for craniofacial asymmetry. Clin Oral Invest 16 : 285−94, 2012.

De Momi E, Chapuis J, Pappas I, Ferrigno G, Hallerman W, Schramm A & Caversaccio M. Automatic extraction of the mid−facial plane for craniomaxillofacial surgery planning. Int J Oral Maxillofac Surg 35 : 636−642, 2006.

De Oliveira AE, Cevidanes LH, Phillips C, Motta A, Burke B & Tyndall D. Observer reliability of three−dimensional cephalometric landmark identification on cone−beam computerized tomography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107 : 256−265, 2009.

土井章男．医療分野におけるボリュームビジュアライゼーションとその応用．日磁気歯会誌　19：1−10, 2010.

布留川創，本橋信義，黒田敬之，誉田栄一，佐々木武仁．顎矯正手術のコンピュータシミュレーションのための三次元情報統合システム．日顎変形誌　10：281−289，2000.

Gateno J, Xia J, Teichgraeber JF & Rosen A. A new technique for the creation of a computerized composite skull model. J Oral Maxillofac Surg 61 : 222−227, 2003.

Gateno J, Xia JJ, Teichgraeber JF, Christensen AM,

Lemoine JJ, Liebschner MA, Gliddon MJ & Briggs ME. Clinical feasibility of computer−aided surgical simulation (CASS) in the treatment of complex craniomaxillofacial deformities. J Oral Maxillofac Surg 65 : 728−738, 2007.

塙　総司，小山重人，佐藤奈央子，佐々木啓一．顔面の左右対称性評価に用いる正中基準平面に関する検討．顎顔面補綴　32：136－137，2009.

Hartmann J, Meyer−Marcotty P, Benz M, Häusler G & Stellzig−Eisenhauer A. Reliability of a method for computing facial symmetry plane and degree of asymmetry based on 3D−data. J Orofac Orthop 68 : 477−490, 2007.

比地岡浩志．下顎前突症患者の下顎後方移動前後における顔面形態の三次元分析．日顎変形誌　8 ：157－169，1998.

Jung YJ, Kim MJ & Baek SH. Hard and soft tissue changes after correction of mandibular prognathism and facial asymmetry by mandibular setback surgery : three−dimensional analysis using computerized tomography. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 107 : 763−771. 2009.

香月　武，後藤昌昭：第Ⅰ編診断，治療計画　顔面軟組織の評価，高橋庄二郎，黒田敬之，飯塚忠彦編：顎変形症治療アトラス，第１版，医歯薬出版，東京, 2001, p93－98.

葛西一貴，金田　隆，山城光明．X線被曝のない三次元セファログラムの開発と臨床応用．INNERVISION 17：53, 2002.

Katsumata A, Fujishita M, Maeda M, Ariji Y, Ariji E & Langlais RP. 3D−CT evaluation of facial asymmetry. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 99 : 212−220, 2005.

Maeda M, Katsumata A, Ariji Y, Muramatsu A, Yoshida K, Goto S, Kurita K & Ariji E. 3D−CT evaluation of facial asymmetry in patients with maxillofacial deformities, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 102 : 382−390, 2006.

槙宏太郎．三次元像再構築時の基準と骨塩定量機能をそなえたX線CT規格撮影方法についての研究．日矯歯誌　47：380－393，1988.

真野　勇，金子昌生．性能評価．：高橋信次，佐久間貞行編著．図解コンピュータ断層法．第３版，東京：秀潤社；1990，41－47.

Meyer−Marcotty P, Kochela J, Boehmb H, Linzb C, Klammertb U & Stellzig−Eisenhauer A. Face perception in patients with unilateral cleft lip and palate and patients with severe Class III malocclusion compared to controls. J Craniomaxillofac Surg 39 : 158−163, 2011.

宮坂祥夫．復顔法の現状と将来．バイオメカニズム会誌　14：207－215，1990.

宮下邦彦．頭部X線規格写真法の基礎．第１版，東京：クインテッセンス出版；1999.

Mizoguchi I, Uechi J, Shibata T, Tsuji Y, Okayama M, Muguruma T & Hayashi K. Three−dimensional (3−D) simulation of orthognathic surgery using a multimodal image−fusion technique : In silico Dentistry −the evolution of computational oral health science−. Osaka : Medigit, 2008, p125−128.

森　紀子，寺嶋雅彦，徳森謙二，中島昭彦，青木義満，橋本周司．三次元CT画像を用いた現代日本人成人男女の頭部生体計測と顔面標準三次元物理モデルの構築．Anthoropological Science，人類誌　111：35－49，2003.

向井陽祐．顔面マーキングを用いた顔軟組織三次元画像計測法の確立．岐阜歯会誌　36：１－11，2009.

中川公貴，寺田員人，稲見佳大，Carmen EG，森田修一，花田晃治．非接触型顔面三次元表面形状計測装置の計測特性に関する検討．新潟歯会誌　31：147－152，2001.

根本敏行，秋月弘道，中村　篤，高橋浩二，大野康亮，道　健一，関　健次，岡野友宏，柿市利男．CTの三次元構築像による顎骨形態の評価に関する研究　計測精度の検討．日口外誌　43：177－181，1997.

Nishii Y, Nojima K, Takane Y & Isshiki Y. Integration of the maxillofacial three−dimensional CT image and the three−dimensional dental surface image. Orthod Waves 57 : 189−194, 1998.

Nkenke E, Zachow S, Benz M, Maier T, Veit K, Kramer M, Benz S, Hausler G, Neukam FW & Lell M. Fusion of computed tomography data and optical 3D images of the dentition for streak artefact correction in the simulation of orthognathic surgery. Dentomaxillofacial Radiology 33 : 226−232, 2004.

Nkenke E, Vairaktaris E, Neukam FW, Schlegel A & Stamminger M. State of the art of fusion of computed tomography data and optical 3D images, Int J Comput Dent 10 : 11−24, 2007.

野口信宏，後藤昌昭，香月　武．顔面非対称の３次元分析（第１報）－顔面正中面の自動設定法の開発－．日口外誌　42：599－601，1996.

O'Grady K & Antonyshyn O. Facial asymmetry : three−di-

mensional analysis using laser surface scanning. Plast Reconstr Surg 104 : 928–937, 1990.

Park SH, Yu HS, Kim KD, Lee KJ & Baik HS. A proposal for a new analysis of craniofacial morphology by 3–dimensional computed tomography. Am J Orthod Dentofacial Orthop 129 : 600. e23–34, 2006.

Park JW, Kim N & Chang YI. Comparison of landmark position between conventional cephalometric radiography and CT scans projected to midsagittal plane. Korean J Orthod 38 : 427–436, 2008.

Profit WR, White RP Jr & Sarver DM. Dentofacial asymmetry. In : Contemporary treatment of dentofacial deformity. 1st ed. St. Louis : C. V. Mosby ; 2002, p574–644.

Rusinkiewicz S & Levoy M. Efficent variant of the ICP algorithm. Proceedings of the 3DIM 2001, 145–152, 2001.

Ryckman MS, Harrison S, Oliver D, Sander C, Boryor AA, Hohmann AA, Kilic F & Kim KB. Soft–tissue changes after maxillomandibular advancement surgery assessed with cone–beam computed tomography. Am J Orthod Dentofacial Orthop 137 : 86–93, 2010.

齋藤貞政，林　一夫，上地　潤，溝口　到．顎関節部X線CT画像の三次元再構築におけるCT値閾値設定について．北医療大歯誌　29：191－195，2010.

Sohmura T, Hojoh H, Kusumoto N, Nishida M, Wakabayashi K & Takahashi J. A novel method of removing artifacts because of metallic dental restorations in 3–D CT images of jaw bone. Clin Oral Implants Res 16 : 728–735, 2005.

菅原準二，川村　仁．顎変形症の分類．：三谷英夫監修．現代外科的矯正治療の理論と実際．第１版，東京：東京臨床出版；2000，11－28.

高根ユミ，一色泰成，西川慶一．顔面非対称のX線CT３次元画像診断における距離計測の信頼性．歯科学報　101：1195－1206，2001.

寺嶋雅彦，大関加奈子，青木義満，祐田京子，後藤多津子，徳森謙二，樋口　惣，中島昭彦．顎変形症患者における顎顔面形態の三次元統合システムの開発．Orthod Waves Jpn Edit 64 : 114–124, 2005.

Trpkova B, Prasad NG, Lam EW, Raboud D, Glover KE & Major PW. Assessment of facial asymmetries from posteroanterior cephalograms：validity of reference lines. Am J Orthod Dentofacial Orthop 123 : 512–20, 2003.

Uechi J, Okayama M, Shibata T, Muguruma T, Hayashi K, Endo K & Mizoguchi I. A novel method for the 3–dimensional simulation of orthognathic surgery by using a multimodal image–fusion technique. Am J Orthod Dentofacial Orthop 130 : 786–798, 2006.

上地　潤，辻　祥之，水上和博，林　一夫，柴田考典，中山英二，溝口　到．コンピュータ支援診断・手術（CAD/CAS）のための仮想患者モデルの生成－画像位置合わせの検討－．北医療大歯誌　29：73－81，2010.

Xia J, Ip HH, Samman N, Wang D, Kot CS, Yeung RW & Tideman H. Computer–assisted three–dimensional surgical planning and simulation : 3D virtual osteotomy. Int J Oral Maxillofac Surg 29 : 11–17, 2000.

山崎幸一，寺田員人，中村順一，中川公貴，川原のぞみ，松原大樹，森田修一，齊藤　力，高木律男，林　孝文，齋藤　功．顔面非対称を伴う骨格性下顎前突症患者における顎矯正手術後の硬組織変化に対する軟組織変化の三次元分析．日顎変形誌　15：87－94，2005.

辻　祥之

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野

略歴
平成12年３月　北海道医療大学歯学部卒業
平成12年４月　北海道医療大学歯学部口腔外科学第１講座　臨床研修医
平成13年４月　北海道医療大学歯学部口腔外科学第１講座　病院助手
平成15年10月　北海道医療大学歯学部口腔外科学第１講座　助手
平成19年４月　北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野　助教
現在に至る．

〔Review〕

A Description of Dental Health in Indonesia

Herastuti SULISTYANI and Futoshi NAKAZAWA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences Univ. of Hokkaido

Abstract

The condition of Indonesia as an archipelago country that has numerous islands and a huge population gives it a diversity of cultures and customs with different characteristic. Diversity is also associated with many aspects of health behavior. Although the Institution of Dentistry was founded long ago in Indonesia (1928), Indonesia still encounters problems in the field of dentistry, including a high prevalence of dental caries (72.1%), a high prevalence of periodontal disease (62.7%) and low public awareness of dental health. The fact that Indonesia consists of numerous islands also makes it difficult to achieve distribution of dental care. Rural communities in Indonesia have less access to dental care than urban communities do. To overcome these problems, the government of Indonesia has undertaken efforts to increase the promotion, preventive and basic dental care in community health centers, hospital, school (*UKGS*), in the community (*UKGMD*) and dental health partnerships. In addition, to produce an adequate quality and quantity of health personnel who are skilled and professional, the Indonesian Medical Council has prepared a set of Competency Standards for dentists since 2006. Therefore, Indonesian people are expected to obtain prime dental care.

Key words：Dental Health Problems, Indonesian Goverment Policy.

1. Regional Overview of Indonesia.

Indonesia is located between 6° north and 11° south latitude and 97°－141° east longitude ; it is located between two continents of Asia and Australia. Indonesia is the largest archipelago country in the world, consisting of 17,500 islands. There are five major islands : Sumatra, Java, Kalimantan, Sulawesi, Papua (bordering Papua New Guinea).More than 80% of Indonesia is covered with water ; the country's land area is about 1,860,360 km^2.

With a population of 237.56 million people (2010), Indonesia is the world's fourth−largest country in terms of population. Around 60% of the Indonesian population lives on Java, though Java comprises only 7% of the country's total area. Indonesia is administratively divided into provinces and districts. Between 2001 and 2006, the number of provinces expanded from 27 to 33. Each province is subdivided into districts : decentralized administrative units and municipalities (Ministry of Health, 2011).

To realize the national goals, national development need to proceed in a planned, organized, comprehensive, integrated, targeted and sustainable manner. It takes strong, independent, and qualified human resources for national development to be organized well ; also, for health development, it is necessary to raise awareness, willingness and the ability to live in a healthy manner among everyone (Article 3 of the Health Act., 2009).

2. History of Dentistry in Indonesia.

Before 1928, there were no institutions of dental education in Indonesia ; therefore, dental health professionals (dentists) needed to come directly from Europe (usually the Netherlands). However, the number of dentists who were willing and able to work in Dutch East Indies (Indonesia) at that time was very limited, and even then, they mostly served Europeans who lived in Indonesia. If

受付：平成24年７月５日　受理：平成24年10月11日

native Indonesian people suffered from dental disease, they were mostly taken to shamans or healers, who used traditional medicine or left the problems to heal by themselves. The common people assumed that dental hygiene was not important. To anticipate that condition, in April 1928, Dr. Lonkhuizen, Head of the Department of Public Health (Dienst den Volkgenzonheid) proposed to the Director of NIAS (Nederlandsch Indische Artsen School) that the school provide education in the field of dentistry. Therefore, the Institute of Dental Education was founded and named STOVIT (School Tot Opleiding Van Indische Tandartsen) in Surabaya. The first Director was Dr. Schoppe. In July 1928, the school officially opened with 21 students. The curriculum was designed such that students could complete their dental education in 5 years. When the Japanese army invaded Indonesia, STOVIT suspended operations for 1 year.

In 1943, the Japanese government reopened some of the education Institutions in Indonesia. In May 1943, Ika Daigaku Senmenbu Sika (Institute of Dentistry)was established in Surabaya. The first head was Dr. Takeda and in November 1943, he was succeeded by Prof. Dr. Imagawa.

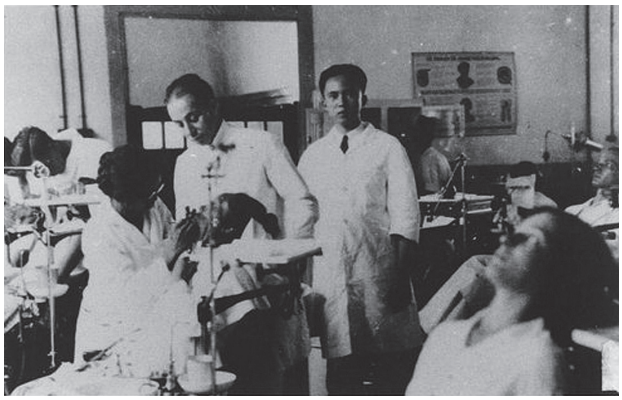


Fig. 1. STOVIT in 1928–1941

Fig.2. Symbol of NIAS 1942–1945

When Indonesia independence, Ika Daigaku and Ika Daigaku Sika Senmenbu were liquidated. In 1946, the government of Indonesia estabilised The Higher Education of Gadjah Mada in Yogyakarta. In 1949, The Higher Education of Gadjah Mada became Gadjah Mada University and The College of Dentistry changed its name to the Faculty of Dentistry (Rintoko, 2011).

Today, the disciplines of dentistry specialization in dentistry are conservative dentistry, orthodontics, oral surgery, periodontics, pediatric dentistry, oral medicine, prosthodontics and dental radiology. In addition, aesthetic dentistry has begun to be developed in Indonesia.

3. Dental Health Problems in Indonesia.

Despite the longstanding availability of the field of dentistry to the population of Indonesia, the prevalence of dental caries and periodontal disease are still high. According to *Riskesdas*, in 2007 (Basic Health Research), the prevalence of dental caries was 72.1% and as many as 46.5% were active caries that had not been treated. In addition, dental caries tend to be more prevalent and tooth decay tends to exist to a higher degree among older individuals. Dental caries is a chronic disease that generates frequent complaints. The disease is disruptive children and adults, having a profound impact on overall welfare, daily performance, and maintenance costs (Subagyo, 2010).

The prevalence of periodontal disease is also high, at around 62.7% (Maduratna, et al., 2010). Periodontal disease is chronic disease and usually painless ; therefore, people do not realize that they have it. If not treated, periodontal disease leads to premature tooth loss. This has an impairing impact on quality of life.

The other data from *Riskesdas*, 2007 indicated that

Fig.3. Faculty of Dentistry, Gadjah Mada University, Jogjakarta at present.

although 91.1% of Indonesian people over the age of 10 years brush their teeth daily, only 7.3% do so properly ; the results of this study indicate that the Indonesian people's awareness of dental health is still low (Wibowo, 2010).

The Chairman of the Indonesian Dental Association (*PDGI*) revealed that Indonesians have an average of 5 damaged teeth (DMF−T=5) per person, only 1% are successfully treated. Approximately 25% of these teeth are still in a state of decay, and 75% of them may contract gangrene or need to be extracted because their condition is too severe. These data reflect the lack of dental care accessible to the people of Indonesia. Therefore, a larger number of direct efforts to prevent caries and maintain healthy teeth must be made (Wibowo, 2010).

Another problem with dental health services in Indonesia is that an average of only 720 new dentists per year are generated, and the current ratio of dentist to the population of Indonesia is 1 : 30,000. Further, these dentists are not evenly distributed and tend to gather in urban areas, whereas 70% of the population of Indonesia is located in rural areas (Moeis, 2004).

4. Solving the Problems of Dental and Oral Health in Indonesia.

To solve the problems of dental and oral health in Indonesia, the government have taken some steps：

a. Promotion, prevention and basic dental health services in community health centers.

b. Promotion, prevention and individual dental health services in hospitals.

c. Promotion, prevention and dental health services in schools through The School Dental Health Effort from the kindergarten to senior high school.

d. Community− Based Health Efforts (*UKBM*).

e. National and international oral health partnerships (Sec. Gen. of Ministry of Health, RI, 2011).

To realize these steps certainly requires adequate levels of skilled, professional personnel in terms of both quantity and quality. To produce qualified healt workers, a quality educational process is needed as well. There are currently 16 institutes of dental education in Indonesia. To improve the quality of dentists in Indonesia, Competency Standard were implemented in 2006.

The objective of Indonesian Dentist Competency Standards is to stipulate minimal capabilities that need to be possessed by dentists who perform dental services in Indonesia. Because of these standards, the community of Indonesia is expected to obtain oral health care of almost uniform quality. The Competency Standards represent a statement of required competencies that attempts to describe the levels of knowledge, skills and attitudes that need to be held by new dentists.

The Standards of Competency are as follows：

Domain I : Professionalism.

Skilled, responsible, and ethical practice in the field of dentistry in accordance with relevant laws.

Main Competencies :

1. Ethics and jurisprudence
2. Critical, scientific and effective analysis of health information
3. Communication with patients, community, peers and other health professionals.
4. Sociocultural aspects of dental and oral health.

Domain II : Mastery of Medicine and Dental Science.

Main Competencies：

5. Basic medical sciences (to support for diagnosis and treatment).
6. Clinical medical sciences (for consideration during dental treatment of medically compromised patients).
7. Basic dental science (oral biology, biomaterials, etc.)
8. Clinical dental science.

Domain III : Physical Examination of General and Stomatognathic Systems

Examination, diagnosis and treatment intended to achieve optimal oral health through promotive, preventive, curative and rehabilitative activity.

Main Competencies：

9. Examination of the patient.
   - 9.1. General examination of physical and stomatognathic systems by using clinical, laboratory, radiologic, psycological, and social data in order to evaluate the patient's medical condition.
   - 9.2. Recognition and management of the behavior of patients in a professional man-

ner.

The agreed–upon Standards of Competency are useful for institutions providing education in dentistry, especially in the preparation of their curricula. Each educational institution may add to and develop the competencies, which are considered to be important to the graduates (as they are needed in local public services)(Indonesian Medical Council, 2006).

In recent years, oral health care in Indonesia has been considered in terms of aspects of environmental health. Hence, green dentistry has begun to be developed in Indonesia. Green dentistry is the provision of oral health care by using technology, procedures, and materials that maintain environmental health and care for the earth ; it uses technological innovations that improve efficiency and effectiveness of the treatment in addition to reducing the amounts of waste and pollution in the environment. The steps toward green dentistry can be summarized as follows : 1. Management of medical waste : using dental materials that are non–toxic in order to reduce waste. Some ways to reduce toxicity are to reduce or eliminate the use of hazardous materials through methods such as setting up equipment for environmentally safe disposal and the use of other materials that are safer ; 2. Reduction of energy consumption, for example by using energy– saving lamps and avoiding the use of air conditioning in dental practice ; 3. Reduction of water consumption, for example, by using mouthwash glasses that can be recycled ; 4. Use of recycled and environmentally friendly products ; 5. Understanding and application of the concept of green building : eco–friendly concept is to maximize the utility of ventilation and windows in order to reduce the use of air conditioning and artificial lighting ; 6. Use of digital X–rays : because they do not require processing with chemicals, they reduce the patient's and the operator's exposure to radiation (Sedyaningsih, 2011).

5. Conclusions

Dental and oral disease is an integral part of general health. By increasing life expectancy of Indonesia population, oral health plays an important role in quality of life. To overcome dental health problems in Indonesia, the cooperation among government, university and community must be increased. Government developes efforts to increase the promotion, preventive and basic dental care. Universities produce an adequate quality and quantity of health personnel that is based on the Standards of Competency. Community is expected to maintain and improve their awarness of dental health. Oral health care must consider in terms of aspect of enviromental health.

References

Indonesian Medical Council, 2006. Standar Kompetensi Dokter Gigi, Jakarta.

Maduratna, E., Suardita, K. And Prahasanti, C., 2010. Rekayasa Sel Puncak dengan Growth Factor Alami Platelet Rich Plasma untuk Periodontal regenerative Medicine. Repo.unair.ac.id.

Ministry of Health, Republic of Indonesia, 2009. Article 3 of the Health Act., Jakarta.

Ministry of Health, Republic of Indonesia, 2011. Indonesia Health Profile, Jakarta.

Moeis, E. F., 2004. Menuju Sehat Gigi dan Mulut Indonesia 2020. Dentamedia, no.4. vol.8.

Rintoko, B., 2011. Sejarah Pendidikan Kedokteran Gigi di Indonesia. //bimbimblues.blogspot.jp//

Secretariat General of The Ministry of Health, Republic of Indonesia, 2011. Tidak Sehat Jika Tidak Memiliki Gigi–Mulut Sehat. info@depkes.go.id.

Sedyaningsih, E.R., 2011. The speech of Ministry of Health on Indonesian Dentist Association National Congress. www.pdgi.or.id.

Subagyo, G., 2010. Obat Bahan Alam untuk Kesehatan Gigi dan Mulut, Tim Pengembangan Obat Bahan Alam dan PGTKI Press, Yogyakarta.

Wibowo, E.,2010. Mayoritas Orang Indonesia Salah Gosok Gigi. Go4HealthyLife.com.

Herastuti Sulistyani

Education

1988 Dentist from Gadjah Mada University.
2002 MPH from Tropical Medicine, Gadjah Mada University.

Experiences

1989 – 1992	As dentist in PHC, South Borneo.
1992 – 1995	Teacher in South Borneo.
1995 – 2001	Teacher in Yogyakarta.
2001 – Present	Lecturer in Polytechnic of Health in Yogyakarta.
2012 – Present	Ph. D student, Dept. of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

Membership in Professional Organization

Indonesian Dental Association.

〔学位論文〕

ヒト歯根膜由来線維芽細胞の伸展刺激に対するfibrillin-1およびversicanの発現変化

永坂　萌

北海道医療大学歯学部大学院歯学研究科　口腔構造・機能発育学系　歯科矯正学分野

Effect of stretching stimulus on fibrillin-1 and versican expression in human periodontal ligament fibroblasts

Moe NAGASAKA

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

Key words：Fibrillin-1, Versican, Mechanical stress, Human periodontal ligament fibroblast

緒　　言

歯根膜は線維性結合組織であり，絶えず咬合力などの機能力にさらされている．この組織の主な細胞外基質の一つである弾性系線維は歯周組織，大動脈，肺，皮膚などに広く分布し，組織に弾性と柔軟性を付与し，組織の反復性復位（伸展と収縮の繰り返し）を可能としている．また，弾性系線維の一つで歯根膜に存在するオキシタラン線維はミクロフィブリルのみからなり，そのミクロフィブリルは主にfibrillin-1から構成されている．歯根膜でのオキシタラン線維は，主線維であるコラーゲン線維に直行するように配列しており，ブリッジの支台歯としての使用などメカニカルストレスの負荷により，また矯正力の負荷により，太くなり増加することが報告されている．一方，プロテオグリカンの一種であるversicanは，線維芽細胞から産生され，脳，軟骨，大動脈，皮膚，腱などに分布し，組織の形態維持，細胞増殖，細胞接着，細胞遊走などの機能に関与している．

近年では，fibrillin-1におけるversicanの結合領域に生じる*FBN1*の変異がMarfan症候群の重症型をもたらしうることも報告されており，結合組織における弾性系線維とversicanの密接な関係が注目されてきている．しかしながら，常に機能力にさらされている歯根膜におけるfibrillin-1とversicanの動態変化についての研究は少なく不明な点が多い．

本研究では，歯根膜のメカニカルストレス応答機構を明らかにするために，ヒト歯根膜由来線維芽細胞に伸展刺激を加え，fibrillin-1とversicanの動態変化について免疫組織化学的，分子生物学的に検討した．

実験材料と方法

１．ヒト歯根膜由来線維芽細胞（HPLF）の培養系

細切された歯根膜組織はプラスチックシャーレ上に置き，10％新生仔仔牛血清を添加したminimum essential medium（MEM：ペニシリン100units/ml，ストレプトマイシン100μg/ml，L-グルタミン含有）中で37℃，５％CO_2環境下にて培養し，HPLFとして単離した．

２．周期的伸展状態を負荷したHPLF培養

I型コラーゲンをコーティングしたエラスティックシリコンチャンバー上にHPLFを播種した．７日間培養後，伸展幅４％，頻度は１秒間に１往復の設定で37℃，５％CO_2の培養環境下にて７日間伸展刺激を負荷した．

３．Fibrillin-1とversicanの免疫蛍光染色

各HPLFサンプルを，fibrillin-1およびversicanに対する抗体で室温にてそれぞれ60分間反応させ，その後各々に対する二次抗体で40分間反応させた．洗浄後，共焦点レーザー顕微鏡にて観察した．

４．Fibrillin-1とversicanのmRNA発現

各HPLFサンプルからtotal RNAを抽出し，RT反応を行い，TaqMan probeによるRT-PCR法を行った．結果は比

受付：平成24年10月１日

較Ct法により相対定量し，統計学的有意差はStudent's t–testを用いて検定した．

5．Small interference RNA（siRNA）設計と一過性形質転換

ヒトfibrillin-1に対するsiRNAを設計・合成し，HPLFに導入した．siRNAの導入は培養の1日目と4日目に行い，培養7日目にHPLFを回収した．

結　　果

1．周期的伸展刺激負荷によるHPLFのfibrillin-1とversicanの動態変化

伸展培養したHPLFでは，fibrillin-1の緑色蛍光強度は対照群と大きな差異を認めなかったが，網目状構造が大きさを増して観察された．また，versicanのα-domainとβ-domainの伸展刺激実験群の蛍光強度は対照群に比べて明らかに増していた．そして周期的伸展刺激の結果，fibrillin-1のmRNAは対照群と比較して3.6倍，versicanのmRNAは6.8倍に増強した．また，V0では対照群に対して17.8倍，V1は9.6倍，V3は8.7倍に増強した．

2．siRNAによるfibrillin-1の発現抑制実験

免疫組織化学的観察では，fibrillin-1とversicanのα-domainとβ-domainの蛍光強度は，対照群とscrambled order群との間に差異を認めなかった．一方，実験群ではfibrillin-1とversicanのα-domainとβ-domainの凝集は緩くなり，蛍光強度もやや低下していた．また，siRNAの導入7日後にfibrillin-1のmRNA発現は対照群およびscrambled order群の発現の約34％にまで激減した．一方，versicanのmRNA発現には，siRNAの導入は対照群とscrambled order群に影響を与えなかった．

考　　察

今回の実験では，免疫組織化学的観察から，fibrillin-1とversicanのα-domainとβ-domainが全般的に共局在した．そして，周期的伸展刺激の負荷はversicanのα-domainとβ-domainの蛍光強度を増大させた．このことから，伸展刺激がfibrillin-1よりもversicanの発現を増強させることが示唆され，実際fibrillin-1に比較してversicanのmRNA発現を著しく増強した．従って，伸展刺激を受けて歯根膜由来線維芽細胞は，versicanのもつヒアルロン酸結合能力を介して，大きい保水容量をもつヒアルロナンリッチマトリックスにミクロフィブリル（fibrillin-1）を結合させ，歯根膜組織に弾性を与えると推測される．

一方，versican isoformのmRNA発現の検討では，周期的伸展刺激はV0のmRNA発現を17.8倍に，V1とV3のmRNA発現を約9倍に増強した．これは，伸展刺激によるversicanの発現増強においてV0がその主体をなすと推測される．

さらに，fibrillin-1のmRNA発現抑制により，fibrillin-1と共にversicanのα-domainとβ-domainの免疫蛍光強度も減弱した．しかし，fibrillin-1のmRNAの相対的発現は減弱したのに対して，versicanのmRNAの相対的発現に変化はほとんどみられなかった．これに関して，fibrillin-1は弾性系線維におけるversicanのリガンドとして考えられていることから，fibrillin-1からなるミクロフィブリル束の凝集の低下の結果として，相当の発現をしているversicanがfibrillin-1に結合されていないことが示唆される．従って，fibrillin-1とversicanは歯根膜の特に弾性系線維を構成するうえで極めて密接な関係にあることを示している．

結　　論

本研究で，伸展刺激のようなメカニカルストレスに対してヒト歯根膜由来線維芽細胞はfibrillin-1とversicanのような歯根膜に特徴的な形質発現を増強し，咬合荷重などの継続的な機能力は弾性と柔軟性を伴う歯根膜特有の機能を維持するために重要であることが明らかとなった．

永坂　萌

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

平成19年3月　北海道医療大学歯学部卒業
平成24年3月　北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程修了
平成24年4月　北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野
任期制助手

〔学位論文〕

矯正学的歯の移動に伴うセメント質関連細胞の細胞死と歯根吸収の組織学的観察

松沢　史宏

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

Histological observation of the cell death of cementum−related cell and the root resorption of the during experimental tooth movement

Fumihiro MATSUZAWA

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Grows and Development, School of dentistry, Health Science University of Hokkaido.

緒　　言

矯正歯科治療における歯の移動は，圧迫・牽引というメカニカルストレスに起因し，圧迫側では骨吸収を，牽引側では骨形成を生じる．矯正歯科の臨床で認められる歯根吸収の多くは，歯根表層あるいは歯根の根尖に限局した小さなものであり，最終的にはセメント芽細胞による吸収窩の修復機転が起き，臨床上大きな問題とはならない．しかし，根尖が広範囲に吸収され，歯に著しい動揺をきたし，歯の機能と安定性に大きな影響を及ぼすことは臨床において稀に見られる．この正力，治療期間の長期化，歯根形態の異常，歯の外傷の既往，舌や口唇の習癖，全身的な代謝障害，ホルモンバランスの異常などのさまざまな要因が歯根吸収に関する危険因子として指摘されている．従来の歯根吸収に関する研究は，吸収の主役を担う吸収系細胞およびそれに関連する硝子様変性組織を対象としたものがほとんどであり，吸収される側のセメント質やセメント質関連細胞（セメント芽細胞とセメント細胞）に着目した研究は行われていない．本研究では，歯根吸収の機序に関して，セメント関連細胞のアポトーシスに伴うセメント関連細胞質の露出および器質的変化がおき，破歯細胞の誘導と歯根吸収がおきるという仮説をたて，矯正学的歯の移動に伴う歯根吸収のメカニズムを解析することを目的とした．

材料および方法

生後８周齢のWistar系雄性ラットを用いた．すべての実験動物は，本学動物実験センターにて飼育し，通常のラット用固形飼料と水道水を十分に与え，自由摂食させた．

実験装置は８週齢のラットの上顎を印象し，歯科用超硬石こうでラット上顎歯列を再現し，Igarashiら（1994）のを基に新しく作製した．筒状の金属にニッケルチタンワイヤー（直径0.012inch，Rockey Mountain Morita，東京）を挿入し，筒を圧接しニッケルチタンワイヤーを固定した．その後，切歯の側面に合うように筒状の金属を屈曲し，右側第一臼歯の舌側の遠心部に爪がかかるようにニッケルチタンワイヤーを屈曲し，口蓋側から頬側方向に初期荷重10gの矯正力が発現するように調整した．

ソムノペンチル（共立製薬株式会社）による麻酔下にて，ラット口腔内の上顎前歯近遠心面の歯頸部をダイヤモンドポイントにて切削し溝を形成した．エッチング・ボンディング処理を行った後，ニッケルチタンワイヤーをコンポジットレジンで固定した．初期荷重10gの矯正力が負荷されるように装着した後，12時間，１日，２日，４日，７日，14日間，各５匹ずつ，ラット上顎右側第一臼歯に矯正力を負荷した．

実験的歯の移動終了後，ラットはソムノペンチル（共立製薬株式会社）による麻酔下にて８％paraformaldehyde／0.2M phosphate buffer用いて，上行大動脈より灌流固定を約30分間行った．その後，上顎骨を摘出し同固定液に12時間浸漬した．固定後に10％EDTA脱灰液で４週間の脱灰後，通法に従い脱水処置をした後にパラフィンに包埋した．組織片は，臼歯部咬合平面に平行に厚さ７μmに薄切し連続切片を作製した．

受付：平成24年10月１日

Hematoxilin－Eosin染色（H－E染色），TdT－mediated dUTP nick end labeling（TUNEL）染色，酸性ホスファターゼ染色（TRAP染色），Single－standard DNAおよびcleaved caspase 3抗体による2重免疫染色を行い光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて組織の観察を行った．

結　　果

1．H–E染色による歯根膜と歯根吸収の経時的変化の観察

歯の移動を行っていない対照群のH–E染色像では，歯根膜は全周にわたってほぼ一定の幅を示していた．一方，実験群では装置による矯正力の付荷によって，歯根膜が圧迫され狭窄しているのが確認された．荷重付荷6時間目で第一臼歯近心根歯根膜に一部圧迫像がみられたが，組織の変性は確認されなかった．荷重付荷12時間目には，血流障害により歯根膜細胞が死に至り部分的に細胞成分が消失し，歯根膜がエオジンに好染し，硝子様を呈している．1日目には硝子様変性組織の範囲が拡大し，歯槽骨の吸収も認められた．その後の2日目，4日目では，硝子様変性組織の範囲の拡大が認められ，セメント質内のセメント細胞の核の消失がみられた．また，硝子様変性組織周囲において歯槽骨の吸収が認められた．さらに7日目には硝子様変性組織は吸収され小さくなっており，歯槽骨表面において破骨細胞による骨吸収が，硝子様変性部周囲において破歯細胞によるセメント質の吸収が認められた．14日目では歯の移動が終了し，血流が回復し硝子様変性は吸収され，全てのラットの歯根膜細胞が再生し歯根膜の幅は対照群と同程度までに回復しているのがみられた．

2．TUNEL法によるアポトーシスの観察

矯正力が付荷された部位は対照群と比較して，セメント質や歯根膜において6時間目から全てのラットでTUNEL陽性細胞が認められた．その後，全てのラットでTUNEL陽性細胞は経時的に増加傾向を示し，2日後まで陽性細胞は増加傾向が続いた．また，2日目では陽性細胞はセメント質表層に多くみられ，セメント質の表層でTUNEL陽性細胞が多く認められた．4日目以降は経時的にTUNEL陽性細胞は減少傾向を示し，14日目では歯根膜およびセメント質表層においてTUNEL陽性細胞は認められなかった．

3．single–stranded DNAとactivated caspase 3との免疫二重染色によるアポトーシスの観察

歯の移動を行っていない対照群ではsingle–stranded DNAとactivated caspase 3の反応はみられなかった．しかし，実験群では，荷重付荷12時間目から変性部位の直下のセメント質の表層と歯根膜で赤色蛍光のssDNAと緑色蛍光のactivated caspase 3の反応がわずかに認められた．また，ssDNAのみに反応している細胞がみられる．

1日目では，変性部位の直下のセメント質の表層・歯根膜で多くのアポトーシスの反応（赤色蛍光と緑色蛍光の反応）が認められ，その範囲も拡大していた．2日目にはセメント質や歯根膜でのアポトーシスの反応が減少していた．また，activated caspase 3だけに反応している細胞がみられた．その後，4日目以降はアポトーシスの反応はみられず，セメント質，歯根膜で，圧迫されていた部位での核の回復が認められた．

これらの染色像からアポトーシスの反応は1日目がピークであり，その後は経時的に減少することが確認された．

4．TRAP染色による破歯細胞と破骨細胞の観察

荷重付荷6時間・12時間目では，セメント質や歯根膜，歯槽骨においてTRAP陽性細胞は認められなかった．1日・2日・4日目から変性部位に隣接した歯槽骨表層において褐色に染まったTRAP陽性細胞の出現が確認された．7日目から硝子様変性組織の周囲においてセメント質表層に破歯細胞の出現が認められた．さらに14日目には破歯細胞の数が増加し，その出現部位は硝子様変性が強く出ていたと思われる部位の直下において顕著であり，セメント質の広範な吸収が認められた．

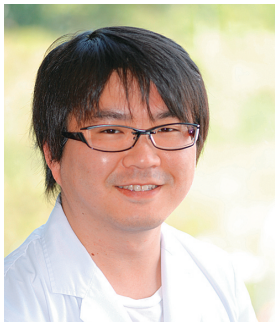
考　　察

本研究においては，歯に加重付荷6時間目から2日目にかけて，硝子様変性組織に隣接したセメント質表層のセメント細胞に核の濃縮，TUNEL陽性反応細胞の出現，およびssDNAとactivated caspase 3抗体に陽性反応などのアポトーシスの特徴を示す細胞が硝子様変性組織周囲に観察された．虚血により細胞がアポトーシスに陥ることは広く知られていることから，これは本研究で使用した装置によりラット右側第一臼歯に持続的に力が付与され，根尖側は口蓋側に傾斜し歯根膜が圧迫され血流の流れがなくなり，酸素や栄養が細胞に行きわたらなかったことによるものだと考えられる．これらのことより，歯の移動初期に認められたセメント質細胞の細胞形態の変化は，アポトーシスであると考えられた．また，セメント細胞にアポトーシス反応がみられた後に，セメント質表層にTRAP陽性細胞が出現しセメント質の吸収がみられた．これは歯を移動させた際の骨吸収の反応とよく類似しており，アポトーシスを起こした部位の近くに破歯細胞が出現してることを考えると，セメント細胞のア

ポトーシスが歯根吸収に関係していることを示唆している.

結　　論

実験的歯の移動時の圧迫側におけるセメント細胞の細胞死（アポトーシス）を認めることが出来た．12時間より陽性反応がみられ，１日後にアポトーシス反応を認めた．また，歯槽骨同様にセメント細胞のアポトーシスが生じた後にセメント質の器質的変化が生じセメント質に吸収を引起こされることが示唆された.



松沢　史宏

平成12年３月　北海道医療大学歯学部　卒業
平成24年３月　北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程　修了
平成24年４月　北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系　歯科矯正学分野
任期制助手

〔学位論文〕

FGF-2及びBMP-2がヒト歯根膜細胞群において組織再生に与える影響

上與那原　朝秀

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系　歯周歯内治療学分野

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

Tomohide UEYONAHARA

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

Key words：ヒト歯根膜細胞群，FGF-２，BMP-２

緒　　言

近年，塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）や骨形成タンパク（BMP-2）などのサイトカインが歯周組織再生療法において注目されている．FGF-2は，皮膚，血管，骨，軟骨など，さまざまな組織の形成に関与する細胞成長因子の一つであり，その働きは主に，創傷の治癒，血管新生を促すことである．BMP-2は，骨，軟骨の発生と維持に深く関与しており，それ以外にも多彩な機能を有しているタンパク質であるが，その働きは主に異所性の骨誘導能であると報告されている．FGF-2やBMP-2は歯根膜中の細胞増殖と分化を促進し，歯周病により失われた歯周組織を再生することに大きく関与することが報告されている．しかし，ヒト歯根膜細胞群（HPDL細胞群）においてFGF-2及びBMP-2の相互作用についての知見は少ない．そこで，本研究では，FGF-2及びBMP-2がHPDL細胞群において組織再生に，特に血管組織形成や骨様組織形成にどのような影響を及ぼすのか検討することを目的とした．

方　　法

１．実験動物と飼育

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

２．HPDL細胞群の採取

HPDL細胞群は北海道医療大学歯科内科クリニックを受診した患者において，治療上抜歯が必要と判断し抜去した３本の歯の歯根膜組織からoutgrowth法にて増殖させ，３細胞群を採取し，それぞれHPDL１，HPDL２，HPDL３とした．この実験計画は北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会の承認を得ている（承認受付番号：18）．

３．ヒト凍結乾燥脱灰象牙質の製作

ヒト抜去歯を低温骨粉砕機（NS-101，岡田鉄工所）を用いて液体窒素冷却下で粉砕し，完全脱灰12時間（２％HNO_3，pH2. 0），洗浄60分（冷蒸留水），凍結乾燥を12時間行い，凍結乾燥脱灰象牙質顆粒（Demineralized Dentin Matrix：DDM）を得た．

４．成長因子

成長因子として，リコンビナントヒトBMP-２（R&D Systems），リコンビナントヒトFGF-２（科研製薬）を使用した．溶媒としてPBSを用い，FGF-２溶液は２μg/site，BMP-2溶液は５μg/siteとなるように調整した．

５．埋植体の調整

埋植体には，担体としてDDM（20mg/site）を用い，移植する細胞としてHPDL１，HPDL２，HPDL３のそれぞれを用い，無細胞群も設定した．成長因子の付与には，①無添加群，②FGF-2群，③BMP-2群，④FGF-２＋

受付：平成24年10月11日

BMP-2併用群の４条件を設定した．埋植体として，DDMと３つのHPDL細胞群および無細胞群からなる４群に４条件の成長因子を付与することによって，16条件の埋植体を調整した．

６．埋植体の皮下埋植法

ヌードマウスに全身麻酔を行った後，１匹あたり背部皮下に２カ所ポケットを形成し，１条件あたり４カ所，計32匹64カ所埋植体を埋植した．

７．薄切切片の作製

埋植４週後に屠殺し，埋植体を摘出し，10％中性緩衝ホルマリン液に24時間浸漬固定した．10％EDTA溶液中で脱灰した後，パラフィン包埋し，厚さ３μmの切片を作製した．

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

摘出した組織をISOGEN（Nippon gene）に浸漬，ホモジナイズし，全RNAを添付プロトコールに従い抽出した後，cDNAをcDNA reverse transcription kit（Applied Biosystems）を用いて合成した．PCRはTaq PCRコアキット（Qiagen）を用いて行った．標的遺伝子としてヒトglyceraldehyde-３-phosphatedehydrogenase（GAPDH）を用い，forward/reverseプライマーを作製した．PCR反応産物は1.５％（w/v）アガロース（Sigma-Aldrich）に電気泳動後，エチジウムブロマイドで染色し，Light Capture（Atto）を用いて観察した．

９．摘出した埋植体の組織学的観察と血管数・新生骨形成割合の分析

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

10．統計解析

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

結　　果

GAPDH mRNAの発現を調べた結果，HPDL１，HPDL２，HPDL３の成長因子無添加群から摘出した組織の全てから，ヒトGAPDH mRNAの発現がみられた．HPDL細胞群の有無に関わらずFGF-2群では無添加群，BMP-2群と比較して有意に多くの血管がみられたが新生骨形成はみられなかった．さらにFGF-2群では，無細胞群はHPDL細胞群を含む群よりも有意に多くの血管が観察された．HPDL細胞群を含むBMP-2群では無添加群，FGF-2群およびFGF-2＋BMP-2併用群と比較して有意に新生骨形成割合が増加した．さらに，HPDL細胞群を含むBMP-2群では，無細胞BMP-2群と比較して有意に新生骨形成割合が増加していたが，血管数には差を認めなかった．HPDL細胞群を含むFGF-2＋BMP-2併用群では，血管数は無添加群やBMP-2群と比較して有意に増加した．またFGF-2群と比較しても同程度の血管数であった．一方，同様の条件において，新生骨形成割合はBMP-2群と比較して有意に減少したものの，HPDL細胞群を含む無添加群と比較すると有意に増加した．HPDL１，HPDL２を含むFGF-2＋BMP-2併用群では血管を取り囲むように新生骨の形成がみられた．

考　　察

RT-PCRの結果，HPDL細胞群を含む成長因子無添加群による埋植体から，ヒトGAPDH mRNAの発現が確認されたが，無細胞無添加群ではGAPDH mRNAの発現が認められなかった．このことより，ヌードマウス背部皮下に移植したHPDL細胞群が生着し組織形成に関与したことが考えられる．

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

埋植体中のHPDL細胞群の有無に関わらず，FGF-2を含む群ではFGF-2未添加群と比較して有意に多くの血管がみられた．本研究ではFGF-2を含む埋植体の働きによりhost由来，donor由来細胞両方に対して血管の形成を促すことにより血管数の増加に関与したことが考えられる．また，FGF-2群においてHPDL細胞群を含む群と無細胞群を比較すると，無細胞群の方が有意に多く血管がみられた．FGF-2はHPDL細胞群に対して作用するよりもヌードマウス背部皮下の場の細胞に働きかけた方が効果的に血管数は増加することが考えられる．

骨新生においては，無細胞群では各条件間において新生骨形成割合に有意な差はみられなかった．一方，HPDL細胞群を含む４群のうち，BMP-2群は他群と比較して有意に高い新生骨形成割合を示した．また，FGF-2＋BMP-2併用群における新生骨形成割合は無添加群と比較して有意に高い値を示したが，BMP-2群より有意

に低い値を示した．BMP-2はHPDL細胞群中に存在する未分化間葉系細胞と骨芽細胞に作用し骨分化を促したが，FGF-2＋BMP-2の併用群ではFGF-2が未分化間葉系細胞に作用し，BMP-2の骨芽細胞への分化および骨形成促進作用を抑制したものと考えられる．BMP-2群では，新生骨形成割合は無細胞群よりもHPDL細胞群を含む群で統計学的に有意に高い値を示した．HPDL細胞群中には骨芽細胞や骨芽細胞に分化しうる未分化間葉系細胞など様々な細胞を含むとされており，BMP-2による骨分化促進効果が際立って出現したと考えられる．

本研究によりヒト歯根膜細胞群にFGF-2とBMP-2を併用添加すると，担体のみと比較して血管および骨形成を増加させ，内部に新生血管を含む骨新生が形成されることが示された．また増加した血管および骨形成はヒト歯根膜細胞群に由来する可能性が示唆された．以上のことからHPDL細胞群を含むFGF-2及びBMP-2の併用による移植は組織再生に有用である可能性が示された．

上與那原　朝秀

平成19年３月　北海道医療大学歯学部　卒業
平成24年３月　北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程　修了
平成24年４月　北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系
歯周歯内治療学分野　任期制助手

〔学位論文〕

化学修飾法によるチタン表面の生体活性化

門　貴司

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系　歯周歯内治療学分野

Chemical modification of titanium surface

Takashi KADO

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

Key words：Titanium, Implant, Chemical modification, Biofunctinal molecules

緒　　言

インプラント周囲の組織構築には，インプラント表面が重要な役割を担うため，インプラント表面に対する様々な改質法が検討されている．インプラント周囲に目的の組織を構築するには，その中でも生体機能性分子をインプラント表面に固定化する手法が適しているが，純チタン表面に固定化した生体機能性分子による影響を種々の細胞に対して比較検討した報告はない．

そこで本研究では，まず純チタン表面に生体機能性分子を簡便かつ低温においても固定化できる化学修飾法を検討した．さらに，純チタン表面に生体機能性分子として細胞外マトリクスであるⅠ型コラーゲン（Col），フィブロネクチン（pFN）またはフィブロネクチンの主要活性部位であるGly–Arg–Gly–Asp–Ser（GRGDS）ペプチドを固定化し，ヒト骨髄間葉系幹細胞（hBMMSC）およびヒト歯根膜細胞群（hPDLCs）の動態と分化に与える影響を比較検討した．

方　　法

表面を鏡面に仕上げた純チタン（JIS第２種）試料をコントロールとした．実験群として，研磨した純チタン試料を１％p–Vinylbenzoic acid（pVBA）溶液に室温で２時間浸漬し，その後，GRGDS，pFNあるいはColを脱水縮合反応によってチタン表面に固定化した試料を用いた（GRGDS–im，pFN–im，Col–im）．

pVBAの結合と生体機能性分子の固定化は，フーリエ変換型赤外分光高感度反射法（FT–IR–RAS）とX線光電子分光分法（XPS）を用いて確認した．チタン表面に固定化された生体機能性分子はアミノ酸に加水分解し，さらにfluorescamineを結合させ，蛍光分光光度計を用いて定量した．

細胞動態は，hBMMSCとhPDLCsを用いて，初期付着細胞数の計測およびSEMと共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞の形態観察によって評価した．また，hBMMSCの骨芽細胞への分化は，RT–PCR法を用いた骨関連遺伝子発現の解析，アルカリフォスファターゼ（ALP）活性の測定およびアリザリン染色による石灰化物形成量の定量を行って調べた．

結果および考察

pVBAを結合させた純チタン表面では，超音波洗浄後においてもチタン表面に結合したpVBAに由来するメチレン基，ベンゼン環およびカルボキシル基による吸収のピークがFT–IR–RASにより観察され，本化学修飾法によりpVBAがチタン表面に結合されていることが確認された．また，XPSによる分析の結果，超音波洗浄後においてもコントロールおよびGRGDSを物理吸着させた試料と比較して，GRGDS–imでは400. 3eVにN１sスペクトルの明瞭なピークが観察された．この結果から本化学修飾法によりGRGDSが純チタン表面に固定化されていることが確認された．さらに，物理吸着したGRGDSは容易に脱着することも分かった．

チタン表面に固定化された生体機能性分子の定量を行

受付：平成24年10月12日

ったところ，それぞれの分子の固定化密度は，GRGDSは4.46μg/cm^2（2.61×10^{15} GRGDS molecules/cm^2），pFNは2.92μg/cm^2（7.66×10^{12} GRGDS molecules/cm^2），Colは6.73μg/cm^2（4.06×10^{13} GRGDS molecules/cm^2）であることが分かった．この結果より，GRGDSはpFNよりも多くの分子が固定化されていることが明らかとなった．

hBMMSCおよびhPDLCsの各チタン表面に対する初期付着細胞数を計測したところ，両細胞ともpFN–imおよびCol–imでは，コントロールと比較して2倍以上の細胞が付着していた．さらに，両細胞ともpFN–imおよびCol–imでは，コントロールおよびGRGDS–imと比較して明らかに細胞骨格が発達していた．pFN–imおよびCol–imにおけるhBMMSCのビンキュリンの発現は，コントロールおよびGRGDS–imと比較して，アクチンフィラメントに沿って広範囲に強く発現していた．また，Col–imにおけるhPDLCsのビンキュリンの発現は，コントロール，GRGDS–imおよびpFN–imと比較して，アクチンフィラメントに沿って広範囲に強く発現していた．これらの結果から，pFNおよびColを固定化したチタン表面は，hBMMSCの付着および伸展を促進し，ビンキュリンの発現から接着斑の形成を促進することが明らかとなった．また，pFNおよびColを固定化したチタン表面は，hPDLCsの付着および伸展を促進し，ビンキュリンの発現からColを固定化したチタン表面はhPDLCsの接着斑様構造の形成を促進する可能性が示唆された．

Col–imにおける骨関連遺伝子の発現を調べたところ，骨芽細胞分化初期に発現する転写因子の遺伝子であるRanx－2とOsterixの発現量は，コントロールと比較して有意に上昇した．ALP活性を測定したところ，Col–imおよびpFN–imでのALPの活性は，コントロールおよびGRGDS–imと比較して有意に上昇していた．また，アリザリン染色では，Col–imおよびpFN–imにおける石灰化物の形成量は，コントロールおよびGRGDS–imと比較して増加していることが分かった．これらの結果より，pFNおよびColを固定化したチタン表面は，hBMMSCの骨芽細胞への分化を促進していることが明らかとなった．

本研究では3種類のペプチドおよびタンパク質の細胞に対する応答を詳細に調べた結果，pFNの主用な活性部位であるRGD配列を持ったGRGDS–imでは，pFN–imに比較して，細胞の付着，伸展，接着斑様構造の形成および骨分化の活性が低いことが明らかとなった．この理由は，RGD配列は相乗部位であるPro–His–Ser–Arg–Asn（PHSRN）配列が必要であることが推測される．従って，GRGDSとPHSRNの両方を純チタン表面に固定することによりpFNと同等の活性に近付く可能性が考えられるが，固定量や比率をコントロールしてGRGDSとPHSRNの位置関係を制御する必要があると考えられる．

現在，インプラントの表面改質法は物理学的手法および形態学的手法が主流であり，これらは，主にオッセオインテグレーションの早期獲得を目的とした表面改質である．物理学的手法および形態学的手法は，様々なものが提案されており，様々な実験が行われている．今回の実験は，生化学的手法にp－ビニル安息香酸を用いた生体機能性分子をチタン表面に固定化する新規の化学修飾法を提案している．今回の実験の結果から，オッセオインテグレーションの早期獲得を目的とする場合はColあるいはpFNを固定化し，歯根膜様組織の構築を目的とする場合は，Colを固定化することで，インプラント周囲に目的の組織を構築することができる可能性を示唆している．

結　　論

1．本研究で検討した簡便かつ低温においても反応可能な化学修飾法を応用し、生体機能性分子を純チタン表面に本来の機能を維持した状態で固定化できることが明らかとなった。
2．コラーゲンおよびフィブロネクチンを固定化した純チタン表面は、鏡面研磨およびGRGDSを固定化した純チタン表面と比較して、ヒト骨髄間葉系幹細胞の付着、伸展および接着斑の形成が促進されることが明らかとなった。また、骨芽細胞への分化を促進していることも明らかとなった。
3．コラーゲンおよびフィブロネクチンを固定化した純チタン表面は、鏡面研磨およびGRGDSを固定化した純チタン表面と比較して、ヒト歯根膜細胞群の付着および伸展が促進されることが明らかとなった。また、コラーゲンを固定化した純チタン表面はヒト歯根膜細胞群の接着斑の形成を促進していることも明らかとなった。
4．早期オッセオインテグレーションの獲得にはコラーゲンおよびフィブロネクチンを固定化したチタン表面が適していることが示唆され，チタン表面への歯根膜様組織の構築にはコラーゲンを固定化したチタン表面が適していることが示唆された．

門　貴司

平成19年３月　北海道医療大学歯学部歯学科卒業
平成24年３月　北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程卒業

〔学位論文〕

歯周病関連細菌*Porphyromonas gingivalis*の血管内皮への付着機構の解析

小松　寿明

北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系　歯周歯内治療学分野

E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to human endothelial cells

Toshinori KOMATSU

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

Key words：periodontitis, atherogenesis, outer membrane protein, vascular inflammtion

緒　　言

アテローム性動脈硬化症は，炎症性細胞やコレステロールなどの脂質が血管内腔に集積した状態を呈し，これが慢性に経過すると虚血性心疾患や脳梗塞などの発症へと繋がる．アテローム性動脈硬化症は様々な要因により引き起こされるが，近年歯周病との関連を報告している．また，歯周組織の慢性炎症が全身に波及し，血管の炎症や脂質代謝の異常が誘発され，アテローム性動脈硬化症が惹起される可能性があると報告している．一方，ヒトのアテローム性動脈硬化巣から，*P. gingivalis*等の歯周病関連細菌が検出されることが報告されている．しかし，歯周病関連細菌が，血管内皮細胞にどのような機序で付着するのかについての詳細は，十分には解明されていない．

本研究では，歯周病のアテローム性動脈硬化症への関与として，血流に侵入した*P. gingivalis*の血管内皮細胞への付着に，E-selectinを介しているという仮説を立て，ヒト臍帯静脈血管内皮細胞（Human Umbilical Vein Endothelial Cells，HUVEC）を用い，*P. gingivalis*の付着機序について検討した．

方　　法

血管内皮細胞は３～７回継代したHUVECを用いた．*P. gingivalis*は，ATCC33277（野生株）およびその派生株であるFimA線毛欠損株（Δ*fimA*），FimA/Mfa１線毛欠損株（Δ*fimA* Δ*mfa1*），およびOmpA様タンパク質Pgm６/７欠損株（Δ*pgm6/7*）を用いた．感染実験は，TNF-α（10ng/ml）で刺激，あるいは未刺激のHUVECに，*P. gingivalis*を接種し，CO_2インキュベータに静置して行った．未付着の*P. gingivalis*を洗浄除去後，蛍光免疫染色し，顕微鏡観察像を画像解析して付着菌数を定量した．また，競合的付着阻害実験として，菌接種と同時に，抗E-selectin抗体，精製可溶型E-selectinおよび精製sLeXを投与した．同様に，野生株および各変異株由来の表層膜画分，精製FimA線毛，および精製Pgm６/７の投与による阻害実験を行った．HUVECの細胞応答を検討するため，培養液中に分泌されるinterleukin（IL）-8，von Willebrand factor（vWF）およびNO_2^-をELISAで測定した．

結果および考察

まず，TNF-α刺激によりHUVECに誘導されるE-selectinの発現を検討した．E-selectinの産生はTNF-α添加３時間後にピークを示したので，TNF-α添加３時間後に，*P. gingivalis*を接種することにした．次に，*P. gingivalis*の接種菌数を検討した．MOI（multiplicity of infection，１細胞当たりの接種菌数）＝1000ではHUVECの傷害が激しかった．一方，MOI＝100では感染５時間後においても細胞への傷害はほとんど認められなかった．そこで，以降の検討ではMOI＝100で行うことにした．

受付：平成24年10月12日

*P. gingivalis*野生株をTNF-α刺激および未刺激のHUVECに接種し，0.5，1および3時間後に付着菌数を測定した．その結果，いずれの時間においても未刺激に比してTNF-α刺激では，付着菌数が顕著に増加した．この付着におけるE-selectinの関与を検証するため，抗E-selectin抗体による競合的付着阻害実験を試みた．すなわち，*P. gingivalis*の接種と同時に抗E-selectin抗体を投与し，0.5時間後に付着菌数を評価した．その結果，TNF-α刺激により増加する付着菌数が抗E-selectin抗体投与で著明に抑制された．同様の阻害効果が精製E-selectinの投与によっても認められた．さらに，sLeXの投与でも著明な阻害がみられた．以上のことより，*P. gingivalis*はE-selectinとの結合を介することで，HUVECへの付着が促進されることが示された．また，E-selectinの*P. gingivalis*が結合する部位は，sLeXの結合部位であることも示唆された．

次に，E-selectinとの相互作用に関連する*P. gingivalis*の分子を検討した．初めに，*P. gingivalis*の上皮細胞への付着やバイオフィルム形成に重要な役割を演じることが知られているFimA線毛の欠損株（Δ*fimA*）のHUVECへの付着を検討した．予想に反し，TNF-α未刺激および刺激のいずれにおいても付着菌数は野生株と同等あるいはやや多い傾向を示した．さらに，*P. gingivalis*のもう一つの付着性線毛であるMfa 1 線毛の影響も検討するため，FimAおよびMfa 1 の両線毛欠損株の付着を検討したが，やはり付着菌数は減少せず，むしろ増加した．次に，*P. gingivalis*の菌体表面に大量に発現し，本菌の形態の安定性に寄与していることが報告されているPgm 6 / 7 （Pgm 6 とPgm 7 の複合体）の欠損株とHUVECとの相互作用を検討した．その結果，同欠損株のTNF-α刺激HUVECへの付着は野生株のそれと比べ有意に減少することが明らかとなった．次に，野生株，Δ*fimA*，およびΔ*pgm6/7*のそれぞれの菌株から調整した表層膜画分を，野生株接種と同時に投与する競合的付着阻害実験を行った．その結果，野生株およびΔ*fimA*由来膜画分の投与では，TNF-α刺激で誘導される付着増加が抑制されたが，Δ*pgm6/7*由来膜画分では抑制されなかった．さらに，精製FimA線毛および精製Pgm 6 / 7 を用いて同様の阻害実験を行なった．その結果，精製FimA線毛の添加では野生株のHUVECへの付着に変化がみられなかったのに対し，精製Pgm 6 / 7 の添加ではHUVECへの野生株の付着が顕著に抑制された．以上のことから，TNF-α刺激HUVECへの*P. gingivalis*の付着には，Pgm 6 / 7 が関与することが示された．Pgm 6 / 7 の相同分子である大腸菌OmpAは菌体表面に露出しており，上皮細胞への付着や侵入に機能することが報告されている．Pgm 6 / 7 も菌体表面に露出していることから，OmpAと同様に細胞と相互作用することは予想されるが，これまでそのような報告はない．今回の研究は，Pgm 6 / 7 と宿主細胞の相互作用を示す初めての報告である．

最後に，本研究で観察した*P. gingivalis*の付着亢進により，HUVECの炎症応答が誘導されるか否かについて検討した．HUVECをTNF-αで 3 時間刺激した後に*P. gingivalis*野生株を接種した．さらに 1 時間培養後，培養上清中のIL‐8，vWFおよびNO_2^-の濃度をそれぞれ測定した．TNF-αで前処理したHUVEC培養系において，*P. gingivalis*の接種によりIL‐8，vWFおよびNO_2^-の有意な産生増強が認められた．加えて，*P. gingivalis*の接種でみられたNO_2^-の分泌上昇は，抗E−selectin抗体の投与で抑制された．以上の結果から，E−selectinを介した血管内皮細胞への*P. gingivalis*の付着は，同細胞の炎症応答を促進することが明らかになった．

結　　論

*P. gingivalis*は，OmpA様分子Pgm 6 / 7 とE-selectinとの結合を介して血管内皮細胞に付着することが示された．また，*P. gingivalis*の付着により血管内皮細胞の炎症応答が増強された．したがって，アテローム性動脈硬化症の発症あるいは進行の要因の一つとして，歯周組織から血管内に流入した*P. gingivalis*の血管内皮細胞への直接的な付着が関与する可能性があると考えられる．

小松　寿明

平成19年３月　北海道医療大学歯学部歯学科卒業
平成24年３月　北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程卒業

〔学位論文〕

ヒト角化上皮細胞の分化誘導における物理的・化学的防御機構の変化

村井　雄司

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

Effect of differentiation enhances barrier function in human keratinocyte

Yuji MURAI

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

Key words：タイトジャンクション，上皮細胞，分化，抗菌ペプチド

緒　　言

口腔粘膜重層扁平上皮は，最下層にある基底膜と接する基底細胞層から順次体外に向かって，有棘細胞層，顆粒細胞層，そして錯角化層へと分化し生体内を保護している．小児において重層扁平上皮は薄く，成人と比較して角化が乏しく細胞間結合も疎であり，分化の途上にあると考えられている．細胞の分化を促すことにより，病原微生物や毒素等の侵入を防ぐ物理的防御機構とともに，抗菌ペプチドの発現上昇による化学的防御機構も亢進することが予想される．活性型ビタミンD３（VD３）は，角化上皮細胞の分化を促進するという報告はあるものの，タイトジャンクション等の細胞間結合装置や抗菌ペプチドの発現に関する詳細については不明である．

本研究では，VD３を角化上皮細胞に添加・培養し，物理的防御に関与するタイトジャンクションタンパクおよび化学的防御に関与する抗菌ペプチドの発現を観察することにより，VD３が口腔粘膜上皮の防御機構にどのように関与するか検討することを目的とした．

方　　法

１．ヒト正常口腔粘膜上皮におけるタイトジャンクションタンパクの発現の観察

第三大臼歯の抜歯が必要とされ，歯肉切除の適応となった患者より，同意を得たうえで歯肉片の採取を行った．採取した歯肉は４％パラホルムアルデヒドにて固定後，脱水し，パラフィン包埋した．薄切後，通法により脱パラフィン処理を行った．その後ブロッキング処理し，一次抗体の抗Claudin（CLDN）‐１抗体，および抗CLDN‐４抗体を反応させた．二次抗体を反応させた後，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察，撮影を行った．また，採取したヒト正常口腔粘膜上皮の状態を確認するため，ヘマトキシリン・エオジン染色を行った．

２．培養ヒト角化上皮細胞株におけるタイトジャンクションタンパクのmRNA発現量の定量的評価

VD３を添加した際の培養ヒト角化上皮細胞株におけるタイトジャンクションタンパクの発現変化を検証するために，タイトジャンクションタンパクの特異的プライマーを用いた定量的RT-PCR法にてmRNA発現を評価した．ヒト角化上皮細胞株（HaCaT）を60～80％コンフレントになるまで37℃，5％CO_2下にて培養後，VD３を１，10，100μM濃度でそれぞれ添加し，４，８，24，48，72時間培養を行った．controlにはVD３の溶媒であるDimethyl sulfoxideを用いた．培養後Total RNAを抽出し，逆転写後，cDNAを作成した．その後，定量的RT-PCRにてCLDN‐1，‐４におけるmRNAの発現を観察した．

３．培養ヒト角化上皮細胞株におけるタイトジャンクションタンパクの発現の観察

培養ヒト角化上皮細胞株のタイトジャンクションタンパク発現を免疫蛍光染色にて観察した．

Lab-Tek® Ⅱ Chamber Slideを用いてHaCaTを100％コンフレントになるまで培養し，上記と同様の方法で培養を

受付：平成24年11月７日

行った．４％パラホルムアルデヒドで固定後，ブロッキング処理を行い，一次抗体の抗CLDN‐１抗体，抗CLDN‐４抗体，および抗Occludin（OCDN）抗体を反応させた．二次抗体を反応させた後，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察，撮影した．

４．培養ヒト角化上皮細胞株における経上皮電気抵抗の測定

タイトジャンクションによる機械的防御機構の機能評価として，経上皮電気抵抗（TER）の測定を行った．

HaCaTをDMEMで100％コンフレントになるまでセルカルチャーインサートにて培養した後，10μMの濃度でVD３を添加し，24，48，72時間におけるTER値をMillicell® ERS‐２で測定を行った．

５．タイトジャンクション発現減弱細胞における機能および発現の観察

タイトジャンクションタンパクの機械的防御機構への関与を確認するために，タイトジャンクションタンパク発現減弱細胞を作成した．

CLDN‐１，‐４siRNAの作製は，siRNA target finderにてそれぞれのsiRNAをデザインし，インサートをpSilencer™4.１‐CMV Expression Vectorに組み込んだ．大腸菌にトランスフォーメーション後，大腸菌をLB/amp寒天培地に播種し，14時間後，単一コロニーを採取し，通法に従いラージプレップを行い，siRNAを回収した．回収したCLDN‐１とCLDN‐４のsiRNAはリポフェクション法にてHaCaTに導入後，hygromicinB含有DMEMにて細胞のセレクションを行った．同様にcontrolとしてhygromicin negative controlをHaCaTに導入した．

作製したsiCLDN‐１，siCLDN‐４HaCaTおよびcontrolからtotal RNAを抽出し，cDNAを作製した．作製したそれぞれのcDNAにCLDN‐１，‐４特異的プライマーを使用しRT-PCR法により，CLDN‐１，‐４の発現確認を行った．その後０，24，48，72時間におけるsiCLDN‐１およびsiCLDN‐４HaCaTのTERを測定した．

６．培養ヒト角化上皮細胞株における抗菌ペプチドのmRNA発現量の定量的評価

VD３を添加した際の培養ヒト角化上皮細胞株における抗菌ペプチドの発現状況を検証するために，プライマーを用いた定量的RT-PCR法にてmRNA発現を評価した．

前述と同様の方法で培養を行い，その後Total RNAを抽出し，逆転写後，cDNAを作成した．その後，定量的RT-PCRにてβ‐ディフェンシン（hBD）‐１，‐２，‐３およびCathelicidin /LL37（LL‐37）におけるmRNAの発現を観察した．

結　　果

１．ヒト正常口腔粘膜上皮における免疫染色において，CLDN‐１は有棘層に，またCLDN‐４は顆粒層にそれぞれ発現が認められた．

２．タイトジャンクションのmRNAの発現は，CLDN‐４は８時間の10および100nMに有意な発現上昇が認められ，CLDN‐１は添加後24時間で全ての濃度に有意な発現の減少が認められた．抗菌ペプチドのmRNAの発現は，hBD‐２はVD３添加後24時間の10および100nM，LL‐37は８，24および48時間の全ての濃度で有意な発現上昇が認められた．

３．HaCaTにおける免疫蛍光染色では，controlに比べ，VD３添加によりタイトジャンクションタンパクであるCLDN‐４の強発現，およびCLDN‐１の発現の低下が認められた．

４．VD３添加時のTERを測定した結果，controlと比較して，24時間では全ての濃度において有意なTER値の増加を認めたが，48，72時間ではTER値は減少した．

５．タイトジャンクション発現減弱細胞では，controlに比べ，48，72時間においてsiCLDN‐１HaCaTは有意に高いTER値を示したものの，siCLDN‐４HaCaTでは48，72時間で有意な減少が認められた．

６．　抗菌ペプチドのmRNAの発現は，hBD‐２はVD３添加後24時間の10および100nM,LL‐37は8，24および48時間の全ての濃度で有意な発現上昇が認められた．

考　　察

今回の研究から，ヒト正常口腔粘膜上皮においてCLDN‐１は有棘層細胞膜に，またCLDN‐４は顆粒層細胞膜にそれぞれ局在を認め，CLDN‐１からCLDN‐４へタンパク発現がスイッチしていることが確認された．HaCaTにおいてもVD３添加によりCLDN‐１からCLDN‐４へタンパクの発現が変化し，TER値の上昇もみられたため，物理的防御機構の向上が認められ，さらにVD３添加により抗菌ペプチドの発現も上昇し，化学的防御機構の亢進がみられたため，VD３添加によりHaCaTが分化誘導されることが明らかとなった．

結　　論

VD３添加による角化上皮細胞の分化誘導は，生体における物理的および化学的防御機構において非常に有用であることが示唆された．

村井　雄司

平成18年３月　北海道医療大学歯学部　卒業
平成24年３月　北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程　修了
平成24年４月　北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野
任期制助手

［最近のトピックス］

デスフルラン

三浦　美英

北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系歯科麻酔科学分野

麻酔科学・歯科麻酔学の分野において，半年毎にご報告できるほどのトピックスはなかなか生まれてこないのが現状だが，幸いなことにここ数年は画期的な新薬の登場が相次ぎ，そのたびに本欄でご紹介させていただいてきた．新薬の紹介は安易と見る向きもあるかもしれないが，これまで取り上げたレミフェンタニル（オピオイド），ロクロニウム臭化物（非脱分極性筋弛緩薬），そしてスガマデクス（非脱分極性筋弛緩薬の拮抗薬）はいずれもまさに画期的薬剤であり，私どもの臨床を大きく変え，麻酔管理の質を大きく向上させてきた．今回ご紹介するデスフルラン（スープレン®）も今後の我が国の麻酔診療を変えてゆく薬剤である[1)2)]．

デスフルランは新しい揮発性麻酔薬である．欧米では1992年から用いられ，本邦では2011年４月に認可された．その優れた特性ゆえに，本剤はおそらく“最後”の揮発性麻酔薬になるだろうと言われている．揮発性麻酔薬は亜酸化窒素と同じ吸入麻酔薬に分類されるが，亜酸化窒素とは異なり常温で揮発性の液体である．揮発性麻酔薬を投与するためにはそれぞれに専用の気化器を用いなければならない．特に，デスフルランは電気的な加温ができる専用の気化器が必要である．揮発性麻酔薬を患者に吸入させると，麻酔ガスは肺胞から血流にのって中枢神経系に至り，中枢神経系で一定の分圧を占めることで全身麻酔作用を示す．中枢神経系での麻酔薬分圧を決定するのは肺胞内の麻酔ガス分圧であることが知られており，肺胞内ガス濃度上昇が速やかな薬剤は麻酔の導入と覚醒が速やかである．この肺胞内ガス濃度上昇を決める因子の一つが血液/ガス分配係数である．血液/ガス分配係数とは吸入麻酔薬の血液への“溶けやすさ”の指標であり，血液に溶けにくい吸入麻酔薬ほど麻酔作用の発現が速い．これまで，血液/ガス分配係数が最も小さい麻酔薬は亜酸化窒素であり，その数値は0.47である．これに対しデスフルランは0.424である．すなわち，デスフルランによる麻酔の導入と覚醒は亜酸化窒素よりも速やかである．このことは，現代の外科診療の事情にマッチしている[3)]．欧米では日帰り全身麻酔が非常に盛んであり，予定手術の60％以上が日帰りで行われる．デスフルランは手術症例の回転率を良くしなければならない現場で力を発揮している．当院の現状は手術が立て込むほどではないが，特に歯科・口腔外科処置の全身麻酔において日帰りしたいとの患者・家族からの要望は高い．患者が全身麻酔から速やかに覚醒するということは，術後の観察時間に余裕ができることであり，帰宅許可が看護師の夜勤体制にかかるリスクを軽減することにもつながる．

デスフルランの他の特徴は高いMACである．MACとは最小肺胞濃度のことであり，臨床的には外科的切開時に50％の患者が体動を示さない濃度を示す．医療大学病院で専ら用いているセボフルランのMACは1.71％であるのに対し，デスフルランは5.2～10.0％である（年齢により異なる）．このことは，同じ流量（酸素－空気，酸素－亜酸化窒素）で全身麻酔を行った場合に，デスフルランはセボフルランのそれのおよそ３～６倍の薬液量を消費するということである．揮発性麻酔薬は高価であり，デスフルラン使用にあたっては薬液消費量を抑える工夫が必要である．デスフルランは気道刺激性が強いため，麻酔導入を静脈麻酔薬やセボフルランで行い，気道確保後にデスフルランに変更し，消費量を抑えるために麻酔維持を低流量で行うことが行われている．

小児の全身麻酔において覚醒時の興奮は一般的であるが，喉頭痙攣や手術台からの転落といったリスクがある．デスフルランは覚醒時興奮の頻度を減らすとの報告があったが（Anesth Analg 2006 ; 102 : 400–4），その論文は取り下げられていた．最近の報告は麻酔薬間に覚醒時興奮の頻度に差はないとしており[4)]，覚醒時興奮への麻酔薬の影響は未解決の臨床的課題にとどまっている．小児や障害者を取り扱うことの多い当科では覚醒時興奮は大きな問題であり，本件について検討してみたいと考えている．

１）スープレン添付文書（2011年７月改訂第２版）．バクスター株式会社

２）安田伸彦．デスフルラン麻酔．Anesthesia 21 Century 2009 ; 11 : 58–61

３）Gupta A, Stierer T, Zuckerman R, Sakima N, Parker SD, Fleisher LA. Comparison of recovery profile after ambulatory anesthesia with propofol, isoflurane, sevoflurane and desflurane : a systematic review. Anesth Analg 2004 ; 98 : 632–41

４）Singh R, Kharbanda M, Sood N, Mahajan V, Chatterji C. Comparative evaluation of incidence of emergence agitation and post–operative recovery profile in paediatric patients after isoflurane, sevoflurane and desflurane anaesthesia. Indian J Anesth 2012 ; 56 : 156–161

［最近のトピックス］

安静時唾液分泌量と口腔水分計の測定値について

村田　幸枝，広瀬　弥奈

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

う触の発生に深く関与している唾液の分泌量の測定には，安静時唾液分泌量を測定する場合と刺激唾液分泌量を測る場合とがある。前者で用いられる方法として，排液法，吐出法，吸引法，綿球法があり，後者では，咀嚼刺激法，味覚刺激法がある．また，粘膜湿潤度の検査法として口腔水分計による水分量の測定がある．今回唾液分泌量と粘膜湿潤度との関係を調べるために，吐出法を用いて安静時唾液分泌量を測定し，口腔水分計ムーカス®（図１　ライフ社，埼玉）による水分量の測定値と比較検討した．

対象は実験の主旨に同意したボランティア23名（男性14名，女性９名，平均年齢24.3歳）とした．水分量はセンサー部に専用のセンサーカバーを装着した口腔水分計ムーカス®を用いて，舌粘膜（舌先端から約10mmおよび中央部の舌背部，舌先端から約10mmの舌の裏），頬粘膜（口角部から内側に約10mmの部位）の４か所を測定した．なお，測定は安静時唾液を採取し，その後，５分間安静にしてから各部位５回繰り返し行い平均値を算出した．安静時唾液分泌量と水分計の測定値との相関はスピアマンの順位相関係数を用いて検定を行った．安静時唾液分泌量と各測定部位の測定値の平均値を表１に示す．

唾液量の検査として吐出法が広く行われているが，唾液量と水分計の測定値に相関が認められたことから，口腔水分計の使用は小児や障がい者など吐出法の施行が困難な対象にも有用な方法と考えられた．しかし，舌背部での口腔水分計の測定値が29.0未満の場合は口腔内が乾燥状態であることが疑われる[1]ことから，今回安静時唾液分泌量が正常値にも関わらず，舌尖において乾燥状態が疑われる値を示したことは，測定者による測定誤差も考えられるので，センサー部の圧接方法など事前の訓練が重要だと思われた．また，測定部位間では，舌尖と頬粘膜，舌中央と舌下面，舌中央と頬粘膜との間に有意差が認められ，部位特異性がある可能性が示唆されたため，今後，舌尖以外の測定部位に関しても基準値の設定を検討する必要があると考えられた．

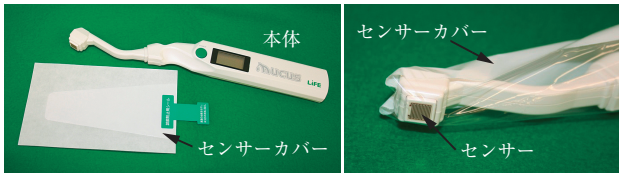


図１　口腔水分計ムーカス®
測定法：舌を突出した状態で，舌背の測定部位（先端から約10mmの舌背中央部）に垂直になるように一定の測定圧（200g程度）で圧接する．約２秒で音が鳴り測定値が表示される．

表１　安静時唾液量と各測定部位との比較

安静時唾液量（ml/min）	口腔水分計値			
	舌尖	舌中央	舌下面	頬粘膜
0.4±0.2	27.8±3.2	27.3±2.9	30.8±2.3	30.8±2.2

(0.43) *
(0.47) *
(0.55) * *
(050) *

Spearman順位相関係数検定：*p＜0.05　**p＜0.01
（相関係数）

参考文献

１）福島洋介，依田哲也，荒木隆一郎，村田翼，北川善政ほか：口腔水分計を用いた口腔乾燥度の診断基準値の設定に関する臨床試験．日本臨床口腔病理学会総会・学術大会プログラム・抄録集　Vol. 21st：106－107，2010

［最近のトピックス］

深度コントロールを有した安全な上顎洞底挙上用機材

仲井　太心，越智　守生

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

Taishin NAKAI, Morio OCHI

Division of Fixed Prosthodontics and Oral Implantology, Department of Oral Rehabilitation, School of Dentistry, Health Sciences Univercity of Hokkaido

近年，歯を欠損した部位にブリッジや義歯ではなく，顎骨に人工歯根を埋入するインプラント治療が行われている．しかし，日本人の顎骨はコーカソイドと比較して高径が少ないため適切な長さのインプラント体を埋入することが困難な症例がある．上顎臼歯部におけるインプラント埋入において，上顎洞の存在は臼歯部上顎骨の高径が不足する原因となる．

上顎洞と上顎骨の距離が近接し骨高径が不足している症例において，上顎洞内に骨増生を行い十分な高径を獲得する上顎洞底挙上術が行われている（Wheeler et al., 1996）．しかしこれまでの方法は，上顎洞底粘膜にアクセスする際，回転切削器具を用いて粘膜面が視認できるまで注意しながら切削し上顎洞前壁を開窓しなければならない（Stern et al., 2012）．また上顎洞底粘膜を損傷せずに骨増生を行うには十分な訓練とテクニックが必要である．しかし，今回導入したLateral Approach-Sinus KIT（OSTEM JAPAN・以後LASK）を用いることで，CTを精査し対応した器具を用いることで高度なスキルを必要とせずとも安全に上顎洞前壁の開窓を行うことが可能となる（図１）．

初めにインプラントを埋入する部位の上顎洞前壁の骨幅をCTで確認する．計測した上顎洞前壁の骨幅だけを切削できるようにドリルにストッパーを装着する（図２）．そうすることで計測した以上の深さを削ること無く，粘膜を傷つけずに安全に骨の切削が可能となる（図３）．さらに切削の効率が上がるため，手術時間の短縮に伴う患者の負担を削減することができる．また，すべてのドリルにおいて，粘膜面を損傷しないように刃が内面を向けて作られているので，安心して上顎洞前壁の骨切削が可能である．

今回LASKを使用することにより安全で短時間に上顎洞底粘膜にアクセスすることができた．CTとLASKを用いることで安全かつ短時間に上顎洞底挙上術が可能になると考えられる．しかし，CTの精度やその読影，トラブルに対応できる知識および技術を常に訓練し高めることが必要と考える．

文献

Stern A, Green J. Sinus Lift Procedures : An Overview of Current Techniques. Dent Clin N Am 56 : 219–233, 2012.

Wheeler, S.L, Holmes, R.E and Calhoun, C.J. Six－year clinical and histologic study of sinus−grafts. Int J Oral Maxillofac Implants 11 : 26–34, 1996.

図１：Lateral Approach-Sinus KIT（OSSTEM JAPAN）

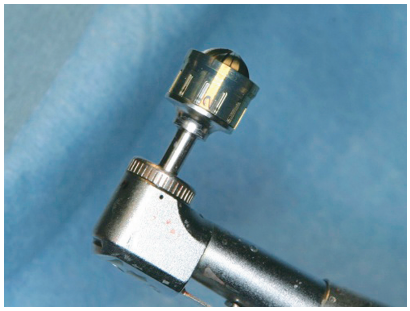


図２：ドリルおよびストッパー
ドリルにストッパーを装着することで一定幅の骨を切削することが可能.

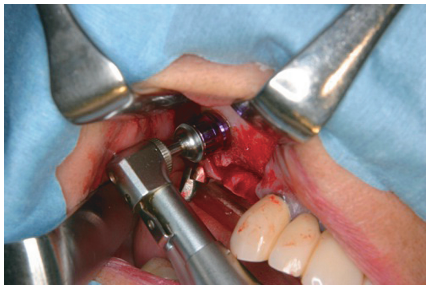


図３：上顎洞前壁のLASKによる切削

北海道医療大学歯学会会則（2006年12月15日現在）

第1章　総　　則

（名　称）

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

（目　的）

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

第2章　会　　員

（会　員）

第３条　本会は以下の会員よりなる．

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

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

３．準会員
歯学教育・診療関係者で理事会の承認を得た者．

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

５．賛助会員
本会の目的および事業に賛同し，協力・支援する個人・団体等で，理事会の承認を得た者．

（入　会）

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

（退　会）

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

（会員資格喪失）

第６条　会員は以下の事由によりその資格を喪失する．

１．２年以上会費の未納，所在不明または連絡のつかいない者．

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

（再入会）

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

第3章　役員および運営

（役　員）

第８条　本会に以下の役員をおく．
会長１名，専務理事１名，常任理事 若干名，理事 若干名，監事２名，評議員 若干名，および常任委員若干名

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

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

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

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

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

６．評議員は本学部教授，助教授，専任講師で構成するほか，会長の推薦により理事会の承認を得た者とする．評議員は評議員会を組織し，会長の諮問に応じて必要事項を審議する．

７．常任委員は理事会の議を経て，会長がこれを委嘱する．常任委員は常任理事を補佐し，会務の分掌処理にあたる．

（会議の成立条件）

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

（任　期）

第10条　各役員の任期は２年を原則とする．ただし，再任を妨げない．

第4章　事　　業

第11条　本会は第２条の目的を達成するために以下の事

業を行う.

1．総　会
　総会は会長の召集により年１回学術大会を開催し，会務等について報告する．また，必要に応じ会長は臨時総会を開催することがある.

2．学術大会
　学術大会は年１回以上開催し，会員の研究発表，その他学術発展に関する行事を行う.

3．学術講演会，研修会

4．会　誌
　本会は機関誌“北海道医療大学歯学雑誌（The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido)”を年２回発行し，会員に配布する．会誌は逐次増刊することが出来る．北海道医療大学歯学雑誌の投稿規定ならびに論文査読規定については別に定める.

5．その他
　本会の目的達成に必要と認めた事業.

第５章　会　　計

（運営経費，会計）

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

2　各会員の会費は以下の通りとする.

イ　正会員
　入会金　3,000円　年会費　5,000円

ロ　準会員，学生会員
　年会費　3,000円

ハ　賛助会員
　入会金 10,000円　年会費 30,000円
ただし新入会員（正会員，賛助会員）で，会費３年以上を前納した者に対しては入会金を免除する．なお事業の目的に応じ，臨時会費を徴収することがある.

3　本会の会計年度は１月１日より12月31日とする.

（会計報告）

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

第６章　雑　　則

（事務局）

第14条　本会の事務局は本学部内におく.

（会則の改廃）

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

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

附　　則

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

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿規程（2012年６月30日現在）

１．投稿資格

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

２．生命倫理への配慮

１）臨床研究は，ヘルシンキ宣言の主旨にそったもので,「北海道医療大学倫理委員会」の承認を得たものとする．

２）人の遺伝子解析を含む場合は，本学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の計画および実施に関する倫理規程」に基づき,「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」の審査をへて学長の許可を得たものとする．

３）動物実験は，「北海道医療大学動物実験規程（Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals in Health Sciences University of Hokkaido）」に基づき，「動物実験センター管理運営委員会」の審査を経たものとする．

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

３．論文の種類及び内容

１）論文の種類は，原著論文（Original），症例報告（Clinical report），総説（Review），解説（Comment），システマティックレビュー（Systematic review），臨床統計（Clinical statistical survey）とする．

２）論文の内容は，他の刊行物に未発表のものに限る．

３）本誌はその他に，ミニレビュー，最近のトピックス，歯学情報，本学会講演抄録，学会関係記事，学位論文などを掲載する．

４．査読および採否

１）投稿論文は，編集委員会および編集委員会の依頼する専門家により査読される．

２）採否については，査読の結果に基づき編集委員会が決定する．

５．投稿論文の作成

１）投稿論文は，投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること．

２）投稿論文は，表紙，チェックリストシート，英文抄録（300語以内），本文，表，図および図表説明文の順番にまとめる．

３）投稿原稿は，２部（正１部，コピー１部）とする．最終的に論文掲載を認められた際には投稿原稿とともにUSBメモリー（USBメモリーは印刷終了後にお返しします）を提出すること．

４）和文論文の本文については，原則として，緒論（緒言），方法（材料および方法），結果，考察，結論（結語），謝辞（必要な場合のみ），文献の順に記載するものとする．

５）英文論文の本文については，原則として，Abstract（300語以内），Introduction，Materials and Methods，Results，Discussion，Conclusion，Acknowledgment（必要な場合のみ），Referencesの順に記載するものとする．

６）投稿論文のヘッダーに右詰めで，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の添付文書として編集委員会まで送信すること．e−mailでの送信が不可能な場合は，作成した文書ファイルをUSBメモリーに保存して提出すること．

メールアドレス；takuma＠hoku−iryo−u.ac.jp
件名；歯学雑誌，最近のトピックス
ファイル名；最近のトピックス，講座名，著者名

３）最近のトピックスは，原則１トピックスにつき１ページでの掲載とする．

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

例：本文のみ1800字程度
（第28巻／第１号　35頁　参照）
本文1300字程度＋片段サイズの図・表１つ＋図・表の説明文
（第27巻／第１号　37頁　参照）
本文800字程度＋片段サイズの図・表２つ＋それぞれの図・表の説明文
（第27巻／第２号　109頁　参照）
本文800字程度＋両段サイズの図・表１つ＋図・表の説明文

７．投稿論文の校正

１）投稿論文に対する著者校正は原則として１回とする．

２）修正論文は，特別な事情がない限り一週間以内，校正は48時間以内に返却するものとする（返却，連絡が無い場合は，投稿を取り下げたものと判断する）．

８．証明書等の発行

１）投稿原稿の受付日は，編集委員会に到着した日付とする．

２）受理証明が必要な場合には，掲載が決定した後に受理証明書を発行する．

９．掲載料および別刷料

１）掲載料は，刷り上がり10頁まで無料とする．これを超過した場合には，編集委員会が依頼したものを除き，１頁１万円の著者負担とする．

2）カラー頁は，無料とする．
3）別刷料については，50部まで無料とし，これを超過する場合（50部単位）には著者の実費負担とする．

10. 著作権の帰属

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

11. 著者のプロフィール

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

12. 原稿の送付および本誌に関する問い合わせ

住所：〒061－0293 北海道石狩郡当別町宇金沢1757番地
北海道医療大学歯学部・口腔生物学系・生化学分野
北海道医療大学歯学雑誌編集委員会（田隈　泰信）
Tel；0133－23－2394
e-mail；takuma@hoku-iryo-u.ac.jp

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿の手引き（2012年６月30日現在）

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

原稿はすべてＡ４版とし，下記の項目１）～７）のすべてを，２部提出して下さい．査読後，論文掲載が認められた際には，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

⑴ 一般固有名詞として通用していない商品名は用いない．

⑵ 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．

⑶ 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．

⑷ 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

⑴ 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））．

⑵ 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）→ ⑶ → a → a）→ ⑷

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

６）数字はアラビア数字とし，単位の記号はJIS・Z 8202およびZ8203に準じ，国際単位系（SI）を使用するよう努める．また単位にピリオドをつけない．（例：GHz，MPa，kW，cm，mV，μm，nA，pF，mL，mmol，N（kgf），K，℃，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℃)

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: R 168–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 leagal 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，脚注に置かずに図中に入れる．

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-iryo-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31回学術大会一般演題募集のご案内

第31回学術大会・平成25年度歯学会総会ならびに講演会を開催致します.

記

日時：　平成25年３月９日㈯　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）

講演会：「臓器再生をめざした唾液腺形成機構の解析～新たな制御因子を求めて～」
講師：　阪井丘芳（たかよし）　先生　（大阪大学大学院歯学研究科　高次脳口腔機能講座　顎口腔機能治療学分野　教授）

演題・抄録申込み要領

申込み期限：平成25年１月31日㈭　必着
抄録作成方法と提出先
　MS–Word形式（A４サイズ，明朝体，12p，余白：上下左右30mm）で記載
　＊裏面の原稿作成要領を参照
　抄録はarakawa@hoku–iryo–u.ac.jp宛に送信して下さい．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，今年度のみの会員制度（5000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25年３月６日
　発表スライドをCD–Rに入れて生化学分野（荒川）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，プロジェクターで試写して下さい.
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］　口演のみ：発表７分，質疑応答３分（予定）
　発表はプロジェクター１台と会場で用意するPCを使用
　OS：Windows 7　Power Point 2010使用（変更しました）

北海道医療大学歯学会　抄録原稿作成要領

MS−Word形式（A 4 サイズ，明朝体，12p，余白上下左右30mm）で記載

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つ以上の場合は，アスタリスク（*）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】

LL－37は・・・・・・抗菌ペプチドである

○奥村一彦*，平　博彦**

*北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野，

**顎顔面口腔外科学分野

【目的】・・・

【方法】・・・

【結果】・・・

【結論】・・・

＊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・抄録に関するお問い合わせ・申込み先
北海道医療大学歯学部口腔生物学系
生化学分野
第31回学術大会事務局：荒川　まで
〒061-0293 石狩郡当別町金沢1757番地
TEL：0133-23-2404
E−mail：arakawa@hoku−iryo−u.ac.jp

編 集 後 記

平成24（2012）年は，歯学会会員の皆様にとりまして，どんな年だったでしょうか．野田総理の「近いうち解散」を受け，年末に行われた本物の「総選挙」で，主権者である国民の厳粛な審判が下されました．この１年をざっと見渡しますと，ユーロ危機から世界全体に広がった景気後退，修復の見通しが立たない日・中・韓の関係，新総理の政策で脱出なるのか円高・デフレ・家電不況，等々，困難な課題が次から次と現れた１年でした．そんな中，iPS細胞の作成で山中伸弥教授がノーベル医学生理学賞を受賞されたことは，日本国全体に明るい希望の輪を広げました．来年は村上春樹氏のノーベル文学賞で，また盛り上がることでしょう．ノーベル賞といえば，６人のノーベル賞受賞者と国内・外の優秀な大学院生が同じホテルに１週間缶詰となり，英語でディスカッションする「HOPE meeting」への参加を申し込み，みごと難関を突破した微生物学分野大学院生の眞島いづみさんには，大舞台に臆することなく，この貴重な交流の機会に将来の独創的な発想につながる多くの「驚き」を体験されることを期待します．

例年６月に発刊される１号と比べ，ほぼ半分の厚さとなる２号ですが，第31巻２号では，多くの会員のご投稿に支えられて１号よりもむしろ厚くなりました．萌芽的・挑戦的な研究と格闘する若い研究者からの原著論文とともに，ベテランの諸先生からは滋味あふれる総説を多数ご投稿頂くことによって，超一流の国際的英文雑誌とは趣の異なる，学内学会誌としての特色ある役割を果たしていきたいと考えておりますので，今後とも活発なご投稿をお願い申し上げます．（田隈記）

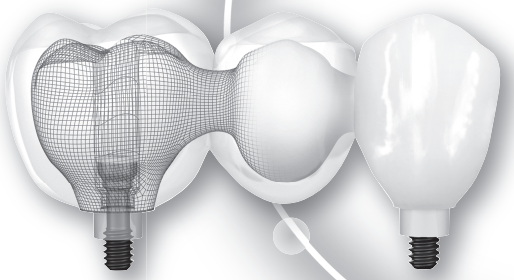
次号（第32巻，第１号）の発行は平成25年６月30日です．
投稿原稿募集の締め切りは平成25年３月31日必着と致します．期日厳守の上，ご投稿をお願いします．本誌投稿規定は，2012年第31巻，第２号の巻末をご参照ください．

Digital Dentistry by Nobel Biocare

治療プロセス全体にデジタルの共通プラットフォームを

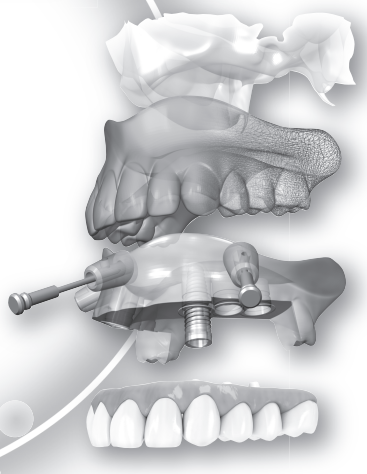
新ノーベルクリニシャン ソフトウェア

CTデータを取り込み、
立体の骨画像による
診査･治療計画から
外科用コンポーネントの
オーダーまでを
ひとつのソフトウェアで



ノーベルプロセラ システム

個々の症例に合わせて
CADCAM技術でカスタム作製する、
審美性に優れた補綴物



ガイディッド･サージェリー

治療計画をもとに症例に合わせて
サージカルテンプレートをカスタム作製、
安全なインプラント埋入をサポートする
ノーベルガイド･コンセプト

ノーベルバイオケアはデジタル･デンティストリーのコンセプトを通じて、一人ひとりの患者様の治療に沿ったソリューションを提供いたします。ノーベルクリニシャン･ソフトウェアを用いれば、立体の骨画像をもとに診査、シミュレーション、補綴主導型の治療計画が行えます。個別製作のサージカル･テンプレートによるガイディッド･サージェリーにも応用ができ、治療プロセス全体をシームレスにサポートします。骨移植を伴う症例から即時負荷まで全ての症例に適用可能です。さらに、ノーベルプロセラシステムと連携すれば、CAD/CAMテクノロジーによる機能性と審美性に優れた最終補綴物が提供できます。

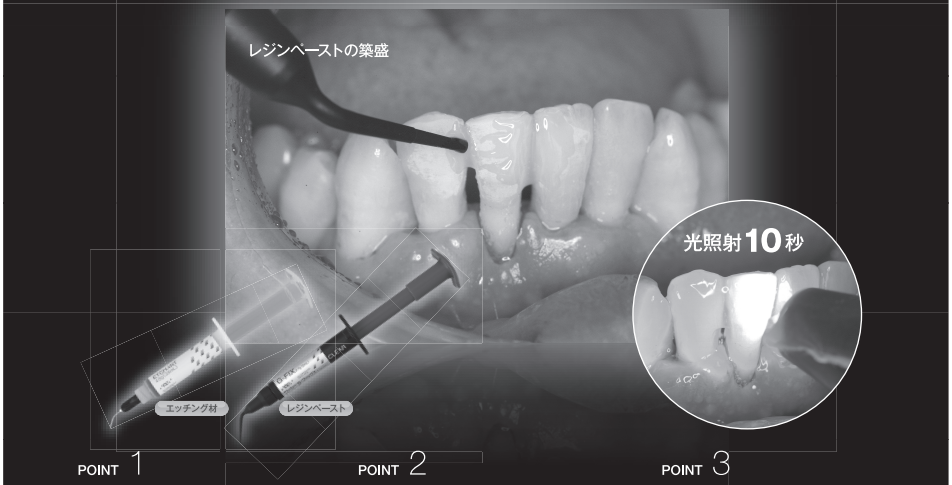
すべては、患者様の笑顔のために ――
Their smile, your skill, our solutions.

詳細な情報については、当社のウェブサイト **http://www.nobelbiocare.co.jp** をご覧ください。
ノーベル･バイオケア･ジャパン株式会社　TEL 03-6717-6191（代表）
〒108-0075　東京都港区港南 2-16-4 品川グランドセントラルタワー 8F

これからの動揺歯固定は1ペースト、光照射10秒*!

ワンペースト、光硬化タイプで操作性良好！ 審美性にもすぐれた動揺歯固定専用のコンポジットレジン系接着材。

ジーシー G-フィックス



POINT 1
1ペースト、
光硬化で操作簡便！

POINT 2
動揺歯の固定に適した
柔軟性と粘靭性を付与

POINT 3
ボンディング材不要、
強い接着力を発揮！

*LED照射器の場合

動揺歯固定接着材
ジーシー G-フィックス

包装・希望医院価格
●1歯：レジンペースト（クリア）2.7g（2mL）2本、エッチング材4.8g（3.6mL）、フィリングチップⅢプラスチック4個、フィリングチップ用キャップ1個、フィリングチップニードルタイプ20個、テクニカルチャート1枚＝¥15,000

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3-2-14　　愛知県春日井市鳥居松町2-285

管理医療機器　224AABZX00104000

DIC（デンタルインフォメーションセンター）
東京都文京区本郷3-2-14　〒113-0033
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）
※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。
www.gcdental.co.jp/

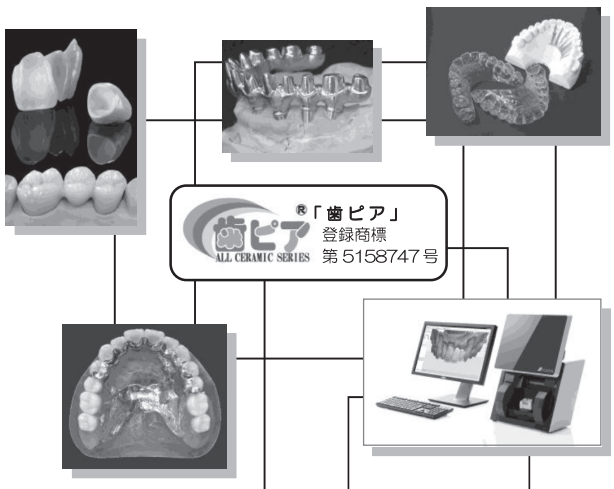
支　店 ●東京 (03)3813-5751 ●大阪 (06)4790-7333　営業所 ●北海道 (011)729-2130 ●東北 (022)207-3370 ●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286

※掲載の希望医院価格と情報は2012年11月現在のものです（価格には消費税は含まれておりません）。

患者様の笑顔のために、咬める喜びを!!

歯科補綴物（保険・一般）全般

歯ピアクラウン（ジルコニア・e-max 等）
ホワイトクラウン（フルジルコニアクラウン）
歯科用 CAD/CAM 製品
（GC・ストローマン・ノーベルバイオケア　他）
インプラント各種上部構造・PIB
アバットメント各種　（ジルコニア・チタン）
メタルボンド（セミプレシャス・Co-Cr・プレシャス）
各種矯正装置・マウスピース型矯正装置「アソアライナー」
ノンクラスプ義歯（エステショットブライト 他）
金属床　（コバルト・チタン）　　その他



株式会社 札幌デンタル・ラボラトリー

FM558217/ISO9001：2008

本　　社　〒001-0024　北海道札幌市北区北24条西2丁目3-26　TEL 011-747-3336　FAX 736-3336
大通ラボ　〒001-0024　北海道札幌市北区北24条西2丁目4-13　TEL・FAX 011-757-3336
苫小牧ラボ　〒053-0021　北海道苫小牧市若草町1丁目3-12　TEL・FAX 0144-36-3336

URL　http://www.sapporo-d.co.jp/　E-MAIL；sapporo@sapporo-d.co.jp

PROVINICE FAST

SHOFU

短期間の笑顔も大切に。

暫間インレー、クラウン、ブリッジ等の作製、義歯床の修理等

プロビナイス ファスト

歯科汎用アクリル系レジン

管理医療機器
医療機器認証番号 219AIBZX00084000

【色調】 歯冠色4種(A1、A2、A3、Inc)、歯肉色2種(U3、8S)

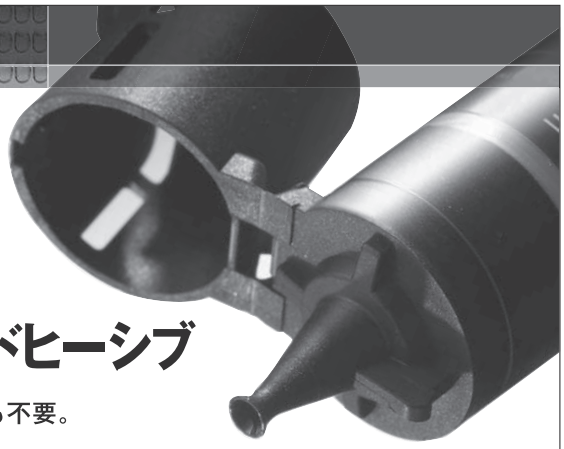
【包装・価格】
粉　50g(粉量計付) ¥2,800
粉250g(粉量計付) ¥9,000
液100mL(液用ワンタッチキャップ、スポイト付) ¥2,800
液250mL(液用ワンタッチキャップ、スポイト付) ¥6,000

液瓶は新規
ワンタッチキャップ
採用

2009年 4月現在の標準医院価格(消費税抜き)です。

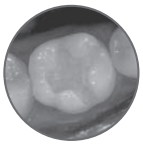
世界の歯科医療に貢献する
株式会社 松風
●本社:〒605-0983京都市東山区福稲上高松町11・TEL(075)561-1112㈹
●支社:東京(03)3832-4366 ●営業所:札幌(011)232-1114/仙台(022)713-9301/名古屋(052)709-7688/大阪(06)6252-8141/福岡(092)472-7595
http://www.shofu.co.jp

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



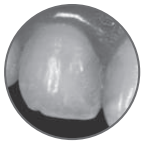
多種多様なプライマーの在庫管理も複雑なプライマー処理も不要。
これ1本でワンステップ処理できるので、
テクニカルエラーの発生リスクを大幅に軽減できます。

この1滴で

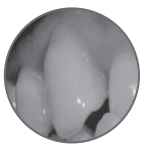


コンポジットレジン
修復時の接着材

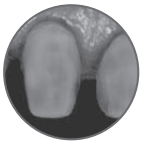
ポーセレンリペア
時の前処理剤



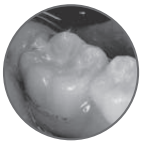
コンポジットレジン
リペア時の前処理剤



知覚過敏抑制材



窩洞・支台歯の
シーリング材



小窩裂溝填塞時
の歯面処理剤

ポーセレンラミネート
ベニアの前処理剤

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

☆ホームページで7つの症例をご紹介!
スコッチボンド ユニバーサル　検索
http://www.mmm.co.jp/hc/dental/

スリーエム ヘルスケア株式会社
歯科用製品事業部

当事業部取扱製品のお問い合わせは
3M ESPE コールセンター
0120-332-329
※受付時間/9:00~17:00 月~金(土・日・祝を除く)
※フリーダイヤルが繋がらない場合は、03-3709-9739をご利用ください。

3M ESPE

MANI® GPR
ガッタパーチャリムーバー
FOR ADVANCED TREATMENT — 高度な治療のために —

NEW

驚きの除去力！
より速く、より簡単に、より効率よく

ココが POINT
- 軽い力で簡単操作。
- より速く大まかな除去を可能に。
- トルク制御不要！トルクリバース不要！ガッタパーチャ溶解剤不要！

許容回転数 1000±500min⁻¹

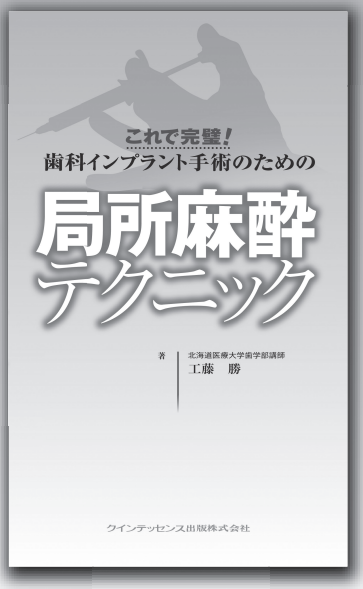
規格	サイズ	テーパー	作業部長	材質	入数	標準価格
1S	#70	0.04	16mm	ステンレス	4本入	2,100円
2S	#50	0.04	18mm	ステンレス	4本入	
3N	#40	0.04	21mm	ニッケルチタン	4本入	4,200円
4N	#30	0.04	21mm	ニッケルチタン	4本入	
アソート[ASS]	各種	0.04	各種	ステンレス2本 ニッケルチタン2本	4本入	3,150円

▲製品ご使用前に添付文書を必ずお読みください。

MANI®
MANI, INC. マニー株式会社
〒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

これで完璧！
歯科インプラント手術のための
局所麻酔テクニック

患者さんに無痛と安心，術者には良好な手術環境を！
斯界初！インプラント手術に特化した局所麻酔の実践マニュアル



著 北海道医療大学歯学部
歯科麻酔科学分野講師
工藤 勝

●サイズ:A5判変型
●152ページ
●定価:6,720円（本体6,400円･税5%）

クインテッセンス出版株式会社
〒113-0033 東京都文京区本郷3丁目2番6号 クイントハウスビル
TEL. 03-5842-2272（営業） FAX. 03-5800-7592 http://www.quint-j.co.jp/ e-mail mb@quint-j.co.jp

ビクトリーワンで
自由診療率をアップ！

自由診療へのスイッチングを強力にサポートします。

1. 学ぶ

【スキルアップビデオ】
提案型カウンセリングを
学習します

2. 使う

【説明用模型】
治療方法を
比較説明します

【治療提案書作成ソフト】
作成した資料で
治療方法などを説明します

3. 結果が出る

自由診療率の向上

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

デンタル プロポーザル システム
Victory
学ぶ、使う、結果が出る

提案型カウンセリングのノウハウを習得し、すぐに実践できるシステムです。

■標準価格　￥299,000

まずは資料のご請求を

ビクトリーワン　検索
www.victoryclub.jp

イベント/セミナー情報もチェック!!

NISSIN

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

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

sandosanyo
山藤三陽印刷株式会社

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

SUN MEDICAL

“使いやすさ”をつめこんだ
スーパーボンドの新セット！

S B 30 Super-Bond Series

ポリマー粉末筆積F3

フッ素を配合した筆積用ポリマー粉末です。
適用面周辺の脱灰抑制を期待できます*。

ポリマー粉末混和クリア

クリア色の混和用ポリマー粉末です。
ジルコニアやオールセラミックなど透過性の高い修復物のセットの際、色調に影響を与えません。

ティースプライマー

ティースプライマーはエナメル質・象牙質兼用のセルフエッチングプライマーです。
水洗不要で、エアーブローの強弱や処理時間の影響を受けにくいプライマーです。

ディスポチップ筆積3L(オレンジ)

一度にたくさんのポリマー粉末を採取する際に便利なディスポチップです。

※フッ素配合スーパーボンド試作品による評価

P. LINGSTRÖM, P. PENNY, S. TRANÆUS, H. KJELLBERG, D. BIRKHED: A New Fluoride-Containing Bonding Material for Orthodontic Brackets in Vivo; #0157, AADR/CADR Meeting, March 8-11, 2006

P. LINGSTRÖM, M.-C. HUYSMANS, J. RUBEN, D. BIRKHED: Effect of a Fluoride-Containing Resin on Dentine Demineralization in Situ; #0107, IADR 86th General Session, July 2-5, 2008

歯科接着用レジンセメント
スーパーボンド
筆積混和SEセット
(管理医療機器)
医療機器認証番号 221AABZX00115000

標準価格 ¥25,000

クイックモノマー液 …… 1本(10mL)
キャタリストV …… 1本(0.7mL)
ポリマー粉末筆積F3 …… 1本(3g)
ポリマー粉末混和クリア …… 1個(3g)
ティースプライマー …… 1本(3mL)
スポンジ(L・S) …… 1箱
ダッペンスタンド(3穴) …… 1個
ディスポダッペンカップ …… 20枚
計量スプーン Standard …… 1本
ディスポ用筆柄(曲) …… 1本
ディスポチップ筆積(ピンク) …… 1ケース
ディスポチップ筆積LL(紫) …… 1ケース
ディスポチップ筆積3L(オレンジ) ―― 1袋(3本)
ディスポチップ混和(青) ―― 1ケース

スーパーボンド
筆積混和SEセット

スーパーボンドをサポート!

関連製品

NEW

歯科セラミックス用接着材料
スーパーボンド PZプライマー
(管理医療機器)
医療機器認証番号 224AFBZX00102000

セット
標準価格 ¥7,600
A液 ―― 1本(5mL)
B液 ―― 1本(5mL)

NEW

筆クリーナー
スーパーボンド 筆洗い液II

セット
標準価格 ¥2,300
筆洗い液II ―― 1本(100mL)
洗浄用ポット ―― 1個
ワンタッチキャップ(白) ―― 1個

■標準価格・表示記載は2012年10月22日現在のものです。価格に消費税は含まれておりません。

■資料請求・お問い合わせ先
サンメディカル株式会社
本　社／〒524-0044 滋賀県守山市古高町571-2 ☎077(582)9980

スーパーボンドの情報がご覧いただけます。
www.sunmedical.co.jp サンメディカル 検索

スマートフォンからのアクセスはコチラ →

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

Renewal

カートリッジシリンジ タイプ2

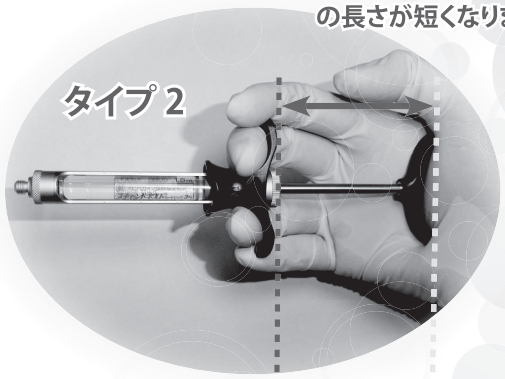
THE BEST PARTNER OF DENTISTS
YDM CORPORATION SINCE 1948

手のひらに収まりのよいサイズ

手のひらに入ってすみません

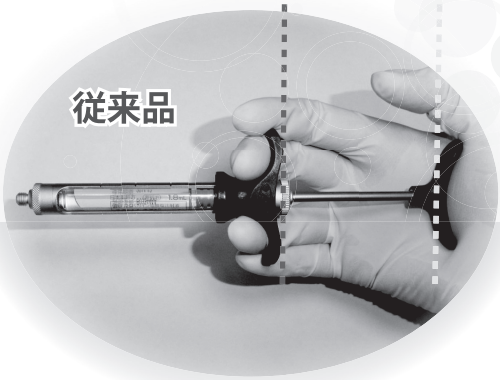
麻酔注入始動時に、目一杯に手を広げなくて良いため、スムーズに操作できます。

◆指かけから押棒後部までの長さが短くなりました。



手が小さい力の弱い女性もラクに操作!

麻酔注入の始動時に力が入れやすい!



圧力のコントロールがしやすく手ぶれ軽減!

小型・軽量化
A：45 g
B：46 g

ネジタイプ

A
コード NO.101116
標準価格 ￥4,800

B
コード NO.101117
標準価格 ￥6,000

ロックタイプ

A
コード NO.101118
標準価格 ￥4,800

B
コード NO.101119
標準価格 ￥6,000

※ 1.8ml カートリッジ用　※材質／黒色部 PPS　耐熱温度 271℃

医療機器届出番号 11B1X1000648D002　一般的名称　歯科麻酔用注射筒

製造販売元　株式会社YDM
〒355-0042 埼玉県東松山市今泉28 医療機器許可番号 11B1X10006
問 合 先　本社 営業部 〒114-0014 東京都北区田端6-5-20 TEL03-3828-3161 FAX03-3827-8991
http://www.ydm.co.jp/ E-mail ydm@ydm.co.jp

発売　株式会社モリタ
大阪 〒564-8650 吹田市垂水町3丁目33番18号 TEL06-6380-2525
東京 〒110-8513 台東区上野2丁目11番15号 TEL03-3834-6161
http://www.dental-plaza.com/

kuraray

Noritake

管理医療機器 歯科充填用コンポジットレジン

クリアフィル®マジェスティ®ES-2

管理医療機器 歯科充填用コンポジットレジン

クリアフィル®マジェスティ®ES-2 Premium

保険適用外

●メーカー希望小売価格の後の6ケタの数字は株式会社モリタの商品コードです。●掲載商品のメーカー希望小売価格は2012年11月現在のものです。メーカー希望小売価格には消費税等は含まれておりません。
●印刷のため実際の色調と異なる場合があります ●仕様及び外観は、製品改良のため予告無く変更することがありますので、予めご了承下さい。●ご使用に際しましては添付文書を必ずお読み下さい。

製品・各種技術に関するお問い合わせ

》クラレノリタケデンタル インフォメーションダイヤル

0120-330-922 月曜～金曜 10:00～17:00 www.kuraraynoritake.jp

製造販売元 クラレノリタケデンタル株式会社
〒959-2653 新潟県胎内市倉敷町2-28

連絡先 クラレノリタケデンタル株式会社
〒100-0004 東京都千代田区大手町1-1-3(大手センタービル)
フリーダイヤル:0120-330-922

販売元 株式会社モリタ
〒564-8650 大阪府吹田市垂水町3-33-18 TEL.(06)6380-2525
〒110-8513 東京都台東区上野2-11-15 TEL.(03)3834-6161
http://www.dental-plaza.com

●「クリアフィル」及び「マジェスティ」は株式会社クラレの登録商標です。●「VITA」はVITA Zahnfabrik,Bad Sackingen, Germanyの商標です。

11／2012-01

編集委員会

委員長　田隈泰信

越智守生・斎藤隆史・柴田考典

東城庸介・溝口　到

（アイウエオ順）

北海道医療大学歯学雑誌　第31巻　第２号

平成24年12月31日

発行者　有末　眞

編　集　北海道医療大学歯学会

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757番地
北海道医療大学内
電　話　0133－23－1211(内線2563)
電話/FAX　0133－23－1345(直通)
メールアドレス：iryo-ds@hoku-iryo-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)

Vol.31 No.2 DECEMBER 2012

Dent J Health Sci Univ Hokkaido

ORIGINAL

1 **Expression and activation of β-catenin in developing and denervated taste buds**
Yuko SUZUKI, Hiroaki TSUNEKAWA, Nobuko OBARA, Kazuharu IRIE, and Shunichi SHIBATA … (63)

11 **The wire method for generating experimental biofilms formed by oral *Streptococcus* and *Veillonella* species**
Izumi MASHIMA & Futoshi NAKAZAWA …… (73)

19 **Effects of underexpression of fibrillin-1 on mRNA and protein expression and protein localization of versican in human periodontal ligament fibroblasts**
Moe NAGASAKA, Naoko TORIYA, Eichi TSURUGA, Yasunori SAKAKURA, Itaru MIZOGUCHI … (81)

27 **Reproducibility and appropriateness of the facial midsagittal plane extracted by a surface-based method -Evaluation using the CT DICOM data-**
Yoshiyuki TSUJI, Jun UECHI, Shigehiro TAKEDA, Masahiro KONNO, Hiroyuki KITAJO, Itaru MIZOGUCHI and Takanori SHIBATA …… (89)

REVIEW

41 **A Description of Dental Health in Indonesia**
Herastuti SULISTYANI and Futoshi NAKAZAWA …… (103)

ABSTRACT OF DOCTORAL DISSERTATION

47 **Effect of stretching stimulus on fibrillin-1 and versican expression in human periodontal ligament fibroblasts**
Moe NAGASAKA …… (109)

49 **Histological observation of the cell death of cementum-related cell and the root resorption of the during experimental tooth movement**
Fumihiro MATSUZAWA …… (111)

52 **Effects of FGF-2 and BMP-2 on the tissue regeneration using PDL derived cells**
Tomohide UEYONAHARA…… (114)

55 **Chemical modification of titanium surface**
Takashi KADO…… (117)

58 **E-selectin mediates *Porphyromonas gingivalis* adherence to human endothelial cells**
Toshinori KOMATSU …… (120)

61 **Effect of differentiation enhances barrier function in human keratinocyte**
Yuji MURAI…… (123)

DENTAL INFORMATION

64 **Recent topics** …… (126)

Dent J Health Sci Univ Hokkaido
Vol. 31, No. 2, pp. 63-138
DECEMBER 2012