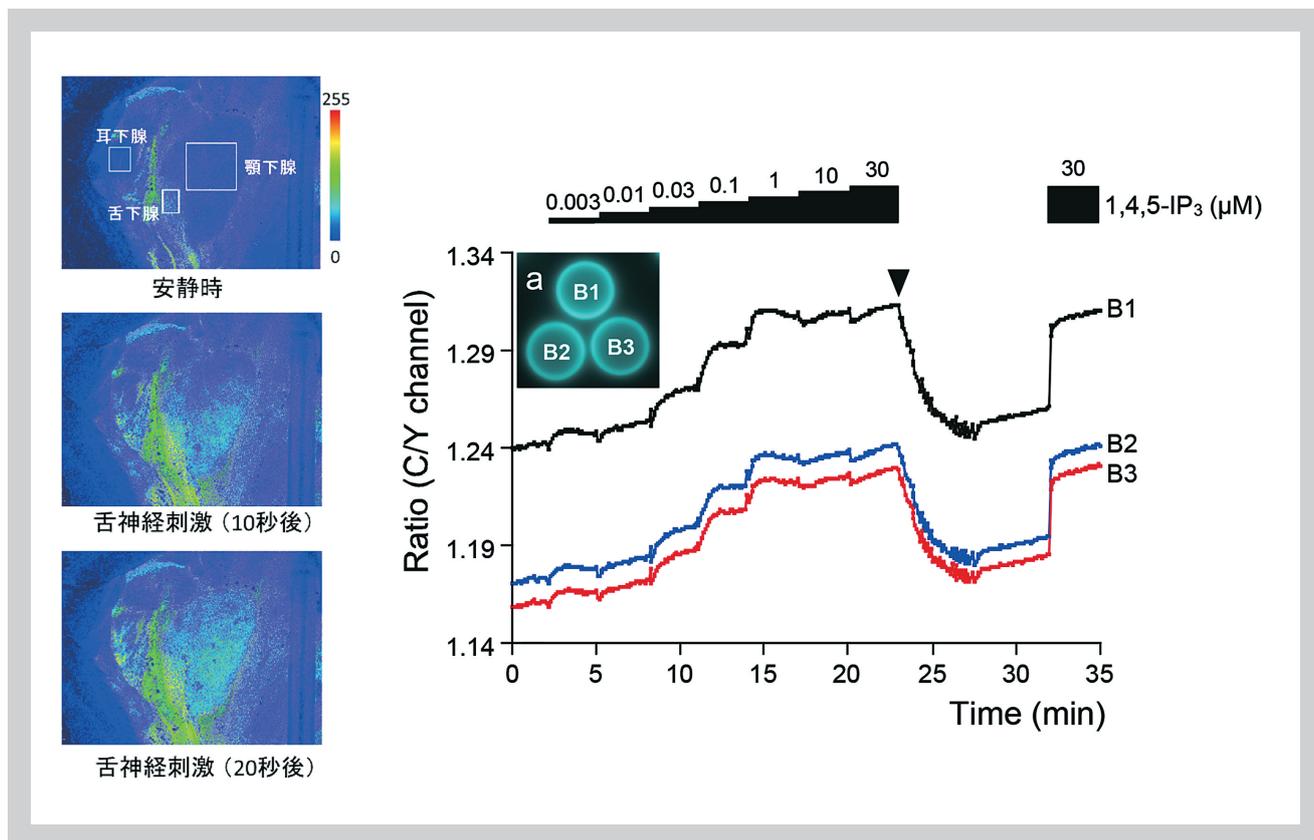


# 北海道医療大学歯学雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北 医 療 大 歯 誌  
第35卷 第2号 平成28年12月



# 北海道医療大学歯学会役員

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

## The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Futoshi NAKAZAWA

Vice President : Morio OCHI

Directors : Eiji NAKAYAMA, Kazuhiro HIKITA,

Itsuo CHIBA, Kazuharu IRIE,

Hisayoshi ISHII, Hisashi KOSHINO,

Hiroki NAGAYASU, Takeo MAITA

Auditors : Yasunori SAKAKURA, Kazuhiko ENDO

## Editorial Board

Editor-in-Chief : Hisayoshi ISHII

Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Takanori SHIBATA,

Itaru MIZOGUCHI

## Address of Editorial Board

Hisayoshi ISHII

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

Health Sciences University of Hokkaido,

Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

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

Phone/Fax: +81 133-23-1239

北海道医療大学歯学雑誌  
第35巻 第2号 平成28年12月  
目 次

〔原著〕

- 1 2型糖尿病がラット唾液腺の副交感神経性血管拡張反応に与える影響  
佐藤 寿哉, 石井 久淑……………(97)
- 13 細胞質型イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) バイオセンサー “cLIBRAvIIS” を用いた  
唾液腺腺房細胞のIP<sub>3</sub>測定法の開発  
根津 顕弘, 森田 貴雄, 谷村 明彦……………(109)
- 23 リゾホスファチジン酸は歯根膜での細胞情報伝達や歯牙発生シグナルに関与する  
荒川 俊哉, 小原 伸子, 岡山 三紀, ナタカーン ホシリラック, 溝口 到, 入江 一元,  
田隈 泰信……………(119)

〔REVIEW〕

- 33 Effects of Melatonin on Periodontitis and Alveolar Bone Loss : a Review  
Nazmus SHALEHIN, Md Riasat HASAN, Kazuharu IRIE……………(129)

〔症例報告〕

- 37 Temporary anchorage deviceを用いて治療した開咬症例  
岡山 三紀, 岡 由紀恵, 溝口 到……………(133)
- 45 口蓋に発生した筋上皮腫の1例  
森川 哲郎, 瀧本 紘佑, Bhoj Raj Adhikari, Puja Neopane, 原田 文也, 宇津宮 雅史,  
中條 貴俊, 吉田 光希, 佐藤 惇, 西村 学子, 永易 裕樹, 安彦 善裕……………(141)

〔歯学情報〕

- 51 最近のトピックス……………(147)
- 54 北海道医療大学歯学会会則……………(150)
- 56 北海道医療大学歯学雑誌 投稿規程……………(152)
- 63 編集後記……………(159)

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido  
VOL. 35, NO. 2, DECEMBER, 2016  
CONTENTS

ORIGINAL

- 1 **Influence of type 2 diabetes on parasympathetic vasodilation in salivary glands in rats.**  
Toshiya SATO, Hisayoshi ISHII ..... (97)
- 13 **Development of a method for measurement of intracellular IP<sub>3</sub> concentrations in salivary acinar cells using the cytosolic type IP<sub>3</sub>-biosensor “cLIBRAvIIS”.**  
Akihiro NEZU, Takao MORITA, Akihiko TANIMURA ..... (109)
- 23 **Lysophosphatidic acid is involved in a cellular signaling of periodontal ligament and tooth development**  
Toshiya ARAKAWA, Nobuko OBARA, Miki OKAYAMA, Nattakarn HOSIRILUCK,  
Itaru MIZOGUCHI, Kazuharu IRIE, Taishin TAKUMA ..... (119)

REVIEW

- 33 **Effects of Melatonin on Periodontitis and Alveolar Bone Loss : a Review**  
Nazmus SHALEHIN, Md Riasat HASAN, Kazuharu IRIE ..... (129)

CLINICAL REPORT

- 37 **A case with open bite treated by temporary anchorage device (TAD)**  
Miki OKAYAMA, Yukie OKA, Itaru MIZOGUCHI ..... (133)
- 45 **A case of Myoepithelioma of the palate**  
Tetsuro MORIKAWA, Kosuke TAKIMOTO, Bhoj Raj ADHIKARI, Puja NEOPANE,  
Fumiya HARADA, Masafumi UTSUNOMIYA, Takatoshi CHUJO, Koki YOSHIDA, Jun SATO,  
Michiko NISHIMURA, Hiroki NAGAYASU and Yoshihiro ABIKO ..... (141)

DENTAL INFORMATION

- 51 **Recent topics** ..... (147)

〔原著〕

## 2型糖尿病がラット唾液腺の副交感神経性血管拡張反応に与える影響

佐藤 寿哉, 石井 久淑

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野

## Influence of type 2 diabetes on parasympathetic vasodilation in salivary glands in rats.

Toshiya SATO, Hisayoshi ISHII

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

Key words : OLETF, Trigeminal-autonomic reflex, Laser speckle imaging, Hemodynamics

## Abstract

We examined the hemodynamics in the major salivary glands during rest and electrical stimulation of the central cut end of the lingual nerve (LN) in urethane-anesthetized spontaneously-developed type 2 diabetic rats and nondiabetic control rats using a laser speckle imaging flow meter. The blood glucose level was significantly higher in diabetic rats than nondiabetic rats indicating the pathogenesis of diabetes. There was no significant difference between diabetic and nondiabetic rats in body and salivary gland weight. The resting blood flow in submandibular and sublingual gland was significantly lower in diabetic rats than that in nondiabetic rats. Although LN stimulation induced intensity- and frequency-dependent blood flow increases in salivary glands in both diabetic and nondiabetic rats, the magnitude of the blood flow increase in the parotid

gland of diabetic rats was significantly lower than that of nondiabetic rats. The blood flow increase in parotid gland was markedly inhibited by intravenous administration of the autonomic ganglion blockade hexamethonium or antimuscarinic agent atropine. Although intravenous administration of acetylcholine elicited the glandular blood flow increases in dose dependent manner, the response in parotid gland of diabetic rats was significantly lower than that in nondiabetic rats. Our results indicate that type 2 diabetes causes a reduction in submandibular and sublingual glands blood flow at rest and selectively impairs parasympathetic vasodilation in the parotid gland, and suggest that a disturbance in the cholinergic vasodilator pathway may contribute to impairment of parasympathetic vasodilation in parotid gland of diabetic rats.

## 抄 録

ウレタン麻酔した自然発症型の2型糖尿病ラットおよびコントロールラットの大唾液腺における安静時血流および舌神経の求心性電気刺激時の血流動態をレーザースペックルイメージング血流計を用いて検討した。血糖値はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に高く糖尿病の発症が確認された。体重、唾液腺重量に糖尿病ラットとコントロールラットの間で有意な差は認め

られなかった。顎下腺および舌下腺の安静時血流はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった。舌神経刺激は糖尿病ラットおよびコントロールラットの唾液腺に刺激強度と頻度に依存した血流増加反応を誘発させたが、耳下腺における反応はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった。耳下腺における反応は自律神経節遮断薬であるヘキサメソニウムおよびアトロピンの静脈内投与により著しく抑制され、アセチルコリンの静脈内投与は耳下腺に濃度依存的な血

流増加反応を誘発させたが、その反応はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった。我々の結果から2型糖尿病ラットにおける顎下腺および舌下腺の安静時血流の低下と耳下腺のコリン作動性副交感神経性血管拡張反応の低下が示され、糖尿病が耳下腺におけるコリン作動性血管拡張反応の反応経路に与える障害が耳下腺で誘発される副交感神経性血管拡張反応の低下に重要であることが示唆された。

## 緒 論

唾液の水成分は血漿に由来し、唾液分泌量は唾液腺血流量の影響を受けることから、唾液分泌における唾液腺血流動態の重要性が示唆されている (Hanna et al., 1999; Harrison et al., 2002; Lung, 1990, 1998; Proctor & Carpenter, 2007; Rourke & Edwards, 2000; Thakor et al., 2003)。唾液腺では口腔顎顔面領域を支配する三叉神経の感覚入力により反射性の唾液分泌と副交感神経性血管拡張反応が誘発される (Izumi & Karita, 1994; Mizuta et al., 2000; Sato & Ishii, 2015)。この血管拡張反応は唾液腺に急峻な血流増加を生じさせ、唾液分泌様式が異なる大唾液腺の間では血流増加量や反応機序が異なることから唾液腺の血流調節において重要な役割をはたしていると考えられる (Sato & Ishii, 2015)。

2型糖尿病は本邦の糖尿病患者の90%以上を占め、網膜症や腎症、末梢神経障害など様々な合併症を伴う。このうち口腔乾燥症は糖尿病患者の半数近くで認められ (Mortazavi et al., 2014)、唾液分泌量の減少は口腔内環境を悪化させ、う蝕や歯周疾患などの口腔内疾患を招きやすい (Leite et al., 2013)。糖尿病に伴う唾液分泌量の減少の原因としては糖代謝異常に起因する唾液腺の萎縮や微小循環障害などの器質的な変化、腺房細胞の各種受容体および細胞内シグナリングの障害、多尿による脱水などが考えられている (Saleh et al., 2015)。しかし、糖尿病が唾液腺血流動態に重要であると考えられる副交感神経性血管拡張反応に与える影響についてはよく知られていない。

本研究ではウレタン麻酔した2型糖尿病ラットおよびコントロールラットの唾液腺の安静時血流および三叉神経 (舌神経) を求心性に電気刺激することで誘発させた副交感神経性血管拡張反応をレーザースペックルイメージング血流計を用いて記録し、2型糖尿病が唾液腺の血流動態に与える影響について検討した。

## 方 法

### 1. 実験動物

実験には40~45週齢の自然発症型の2型糖尿病ラットである雄性OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) ラット (795~425 g) およびコントロールラットである雄性LETO (Long-Evans Tokushima Otsuka) ラット (660~480 g) を用いた。糖尿病ラットおよびコントロールラットはワイヤーゲージ内にて昼夜12時間サイクルの環境下で飼育し、水と固形試料は自由摂取とした。血糖値はラットの尾静脈から微量の血液を採取し血糖値測定器 (Antsense Duo, HORIBA) を用いて測定した。空腹時血糖の測定ではラットは12時間前から絶食とした。ラットはイソフルレンで沈静化させウレタン (1 g/kg) を頸背部に皮下注射して麻酔した。大腿動脈と大腿静脈にカニューレを挿入しそれぞれ体幹血圧および心拍数の測定と各種薬物の投与を行った。気管切開にて挿管し、臭化パンクロニウム (0.6 mg/kg, ミオブロック; Organon Teknika, Netherlands) の静脈内投与により筋弛緩させ継続的に人工呼吸下 (酸素50%, 空気50%) で管理した。実験中は臭化パンクロニウムを持続投与 (0.4 mg/kg/hr) した。カプノメーター (Capnomac Ultima; Datex, Helsinki, Finland) を用いて終末呼気二酸化炭素分圧が35~40 mmHgとなるように人工呼吸器 (SN-480-7, シマノ) の1回換気量 (5.0~7.5 cm<sup>3</sup>/kg) および呼吸数 (20~30回/分) を調節した。ラットをヒーティングパッド上で仰臥位にし直腸温が37°Cを維持するように調節した。頸部の正中を切開し、周囲の神経や血管の損傷を避けながら耳下腺、顎下腺および舌下腺を露出させた。実験終了後はペントバルビタール (ソムノペンチル; 共立製薬) の過量投与 (100 mg/kg以上) によりラットを安楽死させた。本研究は北海道医療大学動物実験規定に基づき、北海道医療大学動物実験センター管理運営委員会の審査並びに学長の承認を得て行った (承認番号: 第045号)。またすべての実験はNational Research Council guideに準拠して行った。

### 2. レーザースペックル血流イメージング

ラットの耳下腺、顎下腺および舌下腺の血流はレーザースペックルイメージング血流計 (OMEGAZONE; Omegawave) を用いて記録した。本血流計は秒単位で高解像度な二次元血流イメージングを描出する。組織に照射された半導体レーザー (780 nm) の散乱光をCCDカメラで撮影し、スペックル (斑点状の格子) 内の赤血球の数や移動速度の変化に基づくレーザー光線のドップラー効果を血流変化として測定する。血流変化は2次元画像 (638×480 pixel) で描出され、最短で約0.4秒ごとの連続測定が可能である。スペックル画像の解析では任

意に設定した観察範囲 (ROI; Region of Interest) に含まれる各々のスペックルが示す輝度の値の平均から相対的な血流値が算出される。レーザースペックルイメージングに関する詳細については最近の総説を参照されたい (Basak et al., 2012)。また下口唇の血流動態はレーザードップラー血流計 (FLO-C1, Omegawave) を用いて記録した。各測定部位における血流動態は血圧の変動による影響を避けるため血流量を平均血圧で除した血管コンダクタンスを算出し評価した。

### 3. 舌神経の電気刺激

唾液腺および下口唇の副交感神経性血管拡張反応は三叉神経 (舌神経) の電気刺激により誘発させた。舌神経は末梢側を切断し両極性電極を用いて求心性 (中枢性) に刺激した。刺激には電気刺激装置 (SEN-7103, 日本光電) を用い、2 msec 間隔にて各種刺激強度 (1-30 V) と刺激頻度 (1-30 Hz) で20秒間刺激した。刺激毎に15分間の間合いを置いた。すべての実験において頸部交感神経幹と迷走神経を頸部にて両側性に切断し、両神経の影響を排除した。

### 4. 各種薬物の投与

すべての薬剤は生理食塩水 (大塚製薬) に溶解して投与した。血糖値の変動が舌神経の電気刺激により唾液腺および下口唇で誘発される血流増加反応に与える影響を検討するためにウレタン麻酔時にインスリン (5単位, 和光純薬) を頸背部に皮下注射した。また舌神経の電気刺激により誘発される血管拡張反応が自律神経系およびムスカリン受容体を介した反応であるかを検討するために以下に示す薬物を静脈内投与した: ヘキサメソニウム (自律神経節遮断薬; 10 mg/kg, Sigma, St. Louis, MO), アトロピン硫酸塩 (ムスカリン受容体拮抗薬; 0.1 mg/kg, 三菱田辺), アセチルコリン (ムスカリン受容体作動薬; 10-1000 ng/kg, Sigma, St. Louis, MO)。ヘキサメソニウム, アトロピン硫酸塩およびアセチルコリンはそれぞれ0.1 ml量で投与後, 速やかに生理食塩水を1 ml投与することでカニューレ内から押し流した。1 mlの生理食塩水の投与は唾液腺の血流や体幹血圧に影響を与えなかった (data not shown)。ヘキサメソニウムの投与量は唾液腺で生じる副交感神経性血管拡張反応をほぼ完全

に抑制することが我々の研究で確認されている (Mizuta et al., 2000)。またアトロピン硫酸塩の投与量は舌神経刺激で生じる最大の血管拡張反応と同程度のアセチルコリンの静脈内投与で誘発される血管拡張反応を抑制するのに十分な量である (data not shown)。

### 5. 統計解析

すべての数値は平均値 ± 標準誤差 (SE) で示した。平均値の差の検定は2群間の比較ではt検定を行った。また他群間の比較では分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った。危険率  $p < 0.05$  で有意差ありと判定した。統計解析にはSPSS Statistics23 (日本IBM) を用いた。

## 結 果

#### 1. 血糖値と体重, 耳下腺, 顎下腺および舌下腺重量

コントロールラットおよび糖尿病ラットにおける麻酔導入前の空腹時血糖値と体重, 耳下腺, 顎下腺および舌下腺重量を表1に示す。麻酔導入前の空腹時血糖値はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に高かった。体重と耳下腺, 顎下腺および舌下腺重量にコントロールラットと糖尿病ラットの間で有意な差は認められなかった。

#### 2. 安静時の顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンス

コントロールラットおよび糖尿病ラットの安静時の顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンスを図1A, BおよびCに示す。コントロールラットおよび糖尿病ラットの顎下腺と舌下腺の全体および耳下腺の一部のレーザースペックルイメージングが記録された (図1A)。コントロールラットおよび糖尿病ラットの安静時の血管コンダクタンスは一定で変動はなかった (図1B)。コントロールラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンスはそれぞれ,  $0.37 \pm 0.03$ ,  $0.49 \pm 0.05$ ,  $0.30 \pm 0.03$ ,  $0.09 \pm 0.01$  で有意な差が認められ [ $F(3, 73) = 47.1$ ,  $n = 11$ ,  $P < 0.01$ ], 顎下腺の血管コンダクタンスと比較して舌下腺の血管コンダクタンスは有意に高く, 下口唇の血管コンダクタンスは有意に低かった (図1C,  $P < 0.05$ , ANOVA, Bon-

表1 体重, 血糖値および唾液腺重量

ラット	体重 (g)	血糖値 (mg/dl)	耳下腺 (mg)	顎下腺 (mg)	舌下腺 (mg)
コントロールラット	554.4 ± 15.7	52.5 ± 4.4	459.1 ± 39.8	332.5 ± 14.4	53.8 ± 7.2
糖尿病ラット	537.5 ± 82.9	165.7 ± 11.1*	425.0 ± 18.6	327.4 ± 12.5	43.8 ± 5.3

平均 ± 標準誤差, \* $P < 0.01$ , コントロールラット vs 糖尿病ラット

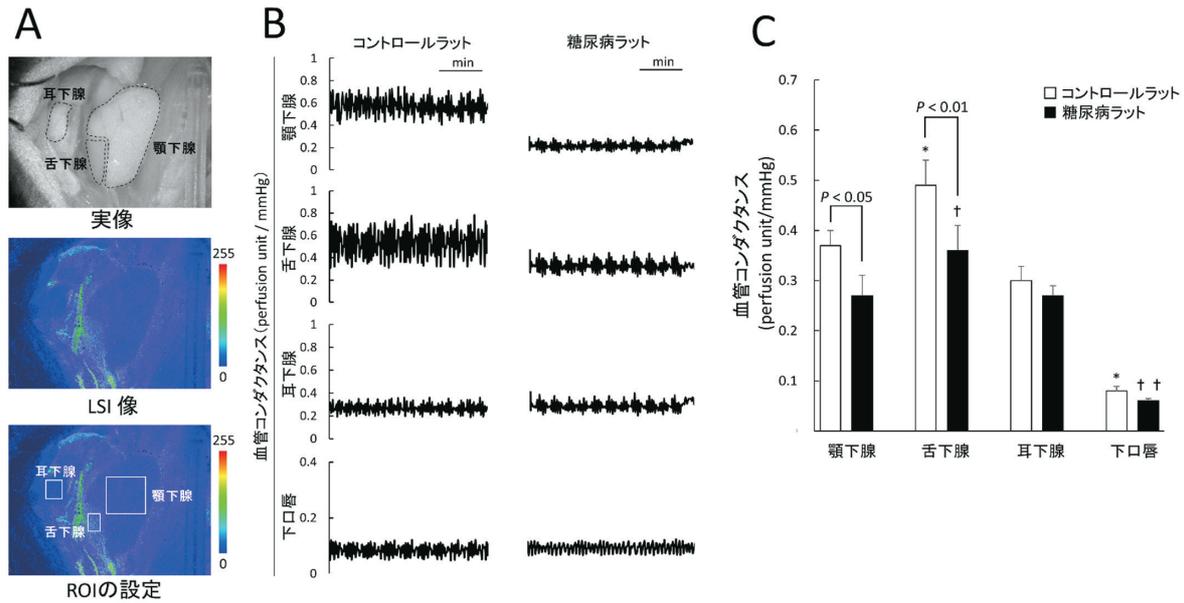


図1. 安静時の顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンス

(A) 顎下腺, 舌下腺および耳下腺の実像とレーザースペックルイメージング像および各唾液腺に設定されたROIの位置. (B) 安静時のコントロールラットおよび糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの経時変化の典型例. (C) コントロールラットおよび糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における安静時の血管コンダクタンスの平均±標準誤差 (n=11). 平均値の差の検定は分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った. \* $P < 0.01$ , vs. 顎下腺 (コントロールラット). † $P < 0.05$ , †† $P < 0.01$ , vs. 顎下腺 (糖尿病ラット).

ferroni post-hoc test). 糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンスはそれぞれ,  $0.27 \pm 0.04$ ,  $0.36 \pm 0.05$ ,  $0.27 \pm 0.02$ ,  $0.06 \pm 0.00$  で有意な差が認められ [ $F(3, 73) = 28.5$ ,  $n = 11$ ,  $P < 0.01$ ], 顎下腺の血管コンダクタンスと比較して舌下腺の血管コンダクタンスは有意に高く, 下口唇の血管コンダクタンスは有意に低かった (図1C,  $P < 0.05$ ). 顎下腺, 舌下腺の安静時の血管コンダクタンスはそれぞれコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった (図1C, 顎下腺;  $n = 11$ ,  $P < 0.05$ , 舌下腺;  $n = 11$ ,  $P < 0.05$ )

### 3. 舌神経刺激が顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンスに与える影響

様々な刺激強度 (1~30 V) と刺激頻度 (1~30 Hz) の舌神経刺激で生じた顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの変化を図2A, BおよびCに示す. 舌神経刺激はコントロールラットおよび糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇に急峻な血流増加反応を誘発した (図2AおよびB). 様々な刺激強度での舌神経刺激では顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスは, コントロールラットでは10 V以上の刺激で有意な変化が認められ [顎下腺;  $F(5, 101) = 20.0$ ,  $n = 10$ ,

$P < 0.01$ , 舌下腺;  $F(5, 101) = 20.8$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ , 耳下腺;  $F(5, 98) = 58.9$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ , 下口唇;  $F(5, 81) = 5.6$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ ], 糖尿病ラットでは5ないし10 V以上の刺激で有意な変化が認められた [顎下腺;  $F(5, 101) = 12.2$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ , 舌下腺;  $F(5, 101) = 16.0$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ , 耳下腺;  $F(5, 98) = 10.5$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ , 下口唇;  $F(5, 81) = 4.3$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ ] (図2C). 耳下腺では20 V以上の刺激においてコントロールラットと糖尿病ラットの間で血管コンダクタンスの変化に有意な差が認められた (図2C,  $P < 0.01$ ). 様々な刺激頻度での舌神経刺激では顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスは, コントロールラットでは10 Hz以上の刺激で有意な変化が認められ [顎下腺;  $F(5, 101) = 8.2$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ , 舌下腺;  $F(5, 101) = 7.5$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ , 耳下腺;  $F(5, 94) = 35.4$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.01$ , 下口唇;  $F(5, 81) = 4.1$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ ], 糖尿病ラットでは5ないし10 Hz以上の刺激で有意な変化が認められた [顎下腺;  $F(5, 101) = 5.2$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ , 舌下腺;  $F(5, 101) = 6.5$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ , 耳下腺;  $F(5, 94) = 4.1$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ , 下口唇;  $F(5, 81) = 2.5$ ,  $n = 9$ ,  $P < 0.01$ ] (図2C). 耳下腺では20 Hz以上の刺激においてコントロールラットと糖尿病ラットの間で血管コンダク

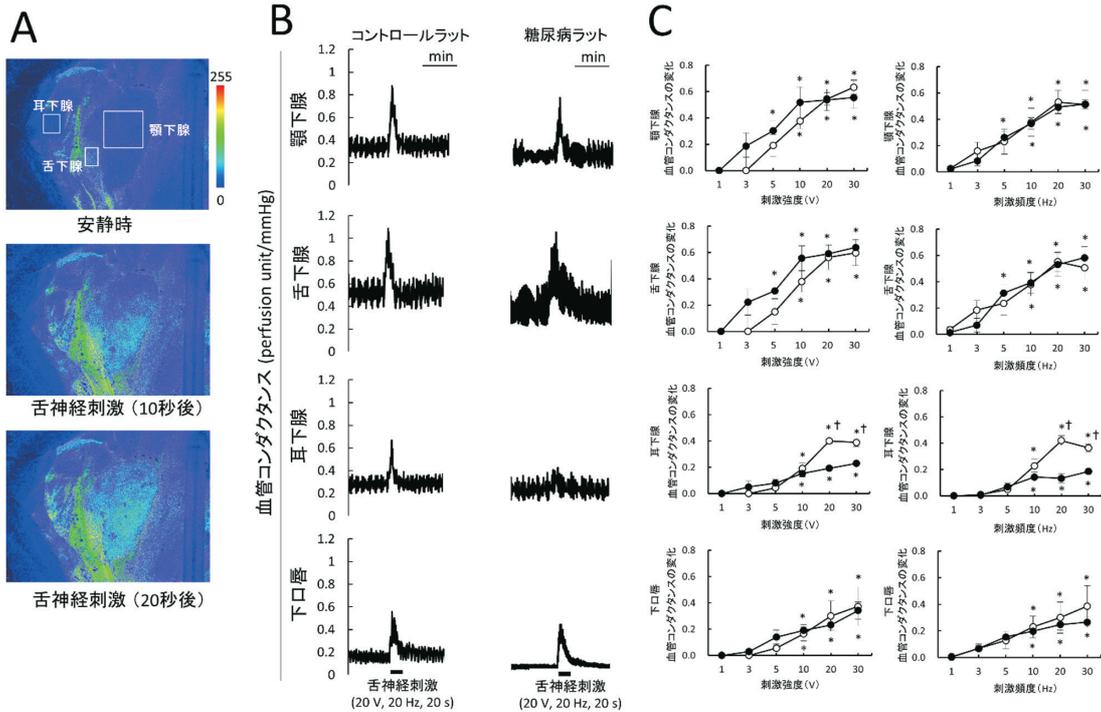


図2. 舌神経刺激が顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンスに与える影響 (A) 舌神経刺激前, 刺激10秒後および20秒後の顎下腺, 舌下腺および耳下腺のレーザーベックルイメージング像の典型例. (B) 舌神経刺激によるコントロールラットおよび糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの経時的変化の典型例. (C) 各種刺激強度 (1-30 V) および刺激頻度 (1-30 Hz) におけるコントロールラット (○, n=10) および糖尿病ラット (●, n=9) の顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇の血管コンダクタンスの変化. 各種刺激強度による刺激では刺激頻度は20 Hz, 各種刺激頻度による刺激では刺激強度は20 Vとし, 平均±標準誤差で示した. 平均値の差の検定は分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った. \* $P < 0.01$ , vs. 1 Vおよび1 Hz刺激時の血管コンダクタンスの変化. † $P < 0.05$ , コントロールラットvs糖尿病ラット.

表2 ウレタン麻酔時およびインスリンを共投与したウレタン麻酔時における血糖値の変化

ラット	血糖値 (mg/dl)		
	空腹時	ウレタン麻酔	ウレタン麻酔+インスリン
コントロールラット	52.5±4.4	265.9±29.8*	23.7±1.7†
糖尿病ラット	165.7±11.1	588.7±77.5*	191.0±39.1†

平均±標準誤差, \* $P < 0.01$ , 空腹時vsウレタン麻酔, † $P < 0.01$ , ウレタン麻酔vsウレタン麻酔+インスリン

タンスの変化に有意な差が認められた (図2 C,  $P < 0.01$ ).

#### 4. 血糖値の変動が舌神経で誘発される唾液腺の血流増加反応に与える影響

ウレタン麻酔前後およびインスリンを共投与したウレタン麻酔時における血糖値の変化を表2に示す. ウレタン麻酔はコントロールラットと糖尿病ラットの血糖値を有意に上昇させた (表2, コントロールラット;  $P < 0.01$ , 糖尿病ラット;  $P < 0.01$ ). この血糖値の上昇はウレタン麻酔時にインスリンを共投与することで有意に抑制されたが (表2, コントロールラット;  $P < 0.01$ , 糖尿病ラット;  $P < 0.01$ ), 糖尿病ラットではインスリンによる血糖値抑制効果が低くインスリン抵抗性が認め

られた. ウレタン麻酔時およびインスリンを共投与したウレタン麻酔時において舌神経刺激により誘発される唾液腺の血管コンダクタンスの変化を図3 AおよびBに示す. ウレタン麻酔したコントロールラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの変化はそれぞれ $0.52 \pm 0.06$ ,  $0.60 \pm 0.05$ ,  $0.42 \pm 0.06$ ,  $0.34 \pm 0.09$ で有意な差が認められ [ $F(3, 44) = 1.78$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ], 下口唇の血管コンダクタンスの変化は顎下腺および舌下腺の変化と比較して有意に低かった (図3 A,  $P < 0.05$ ). インスリンを共投与してウレタン麻酔したコントロールラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの変化はそれぞれ $0.53 \pm 0.09$ ,  $0.58 \pm 0.08$ ,  $0.39 \pm 0.09$ ,  $0.40 \pm 0.05$ で有意な差は認められなかった (図3 A). ウレ

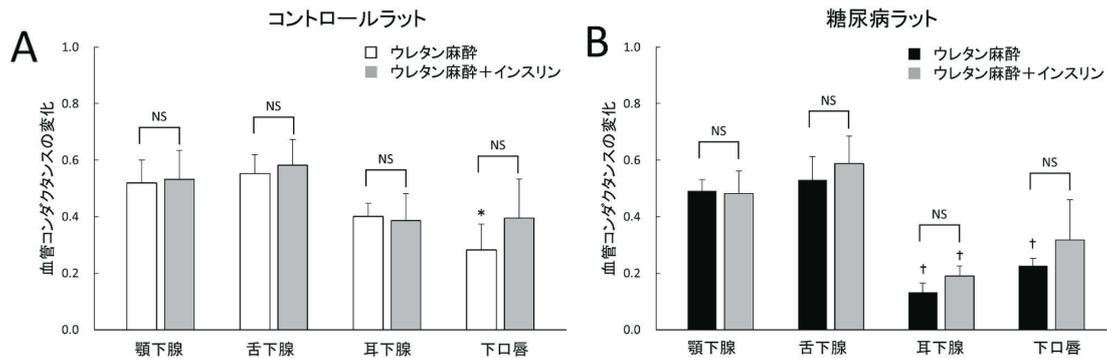


図3. 血糖値の変動が舌神経で誘発される唾液腺の血流増加反応に与える影響

(A) コントロールラットにおけるウレタン麻酔時 ( $n=7$ ) およびインスリンを共投与したウレタン麻酔時 ( $n=6$ ) の舌神経刺激 (20 V, 20 Hz, 20 s) で顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇で生じる血管コンダクタンスの変化。(B) 糖尿病ラットにおけるウレタン麻酔時 ( $n=5$ ) およびインスリンを共投与したウレタン麻酔時 ( $n=4$ ) の舌神経刺激 (20 V, 20 Hz, 20 s) で顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇で生じる血管コンダクタンスの変化の平均 $\pm$ 標準誤差。平均値の差の検定は分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った。\* $P<0.01$ , vs. 顎下腺 (ウレタン麻酔)。† $P<0.01$ , vs. 顎下腺 (インスリン共投与ウレタン麻酔)。NS: 有意差なし。

タン麻酔時とインスリンを共投与したウレタン麻酔時における舌神経刺激による血管コンダクタンスの変化には有意な差は認められなかった (図3A)。ウレタン麻酔した糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの変化はそれぞれ $0.49 \pm 0.04$ ,  $0.53 \pm 0.08$ ,  $0.13 \pm 0.03$ ,  $0.33 \pm 0.03$ で有意な差が認められ [ $F(3, 26) = 4.12$ ,  $n=5$ ,  $P<0.05$ ], 耳下腺および下口唇の変化が顎下腺および舌下腺の変化と比較して有意に低かった (図3B,  $P<0.05$ )。インスリンを共投与してウレタン麻酔した糖尿病ラットの顎下腺, 舌下腺, 耳下腺および下口唇における血管コンダクタンスの変化はそれぞれ $0.48 \pm 0.08$ ,  $0.59 \pm 0.10$ ,  $0.19 \pm 0.04$ ,  $0.32 \pm 0.09$ で有意な差が認められ [ $F(3, 26) = 3.66$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ], 耳下腺の変化が顎下腺および舌下腺の変化と比較して有意に低かった (図3B,  $P<0.05$ )。ウレタン麻酔時とインスリンを共投与したウレタン麻酔時における舌神経刺激による血管コンダクタンスの変化には有意な差は認められなかった (図3B)。

##### 5. 各種薬物が耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇の血流増加反応および血流動態に与える影響

ヘキサメソニウムおよびアトロピンの静脈内投与が舌神経刺激 (20 V, 20 Hz, 20 s) により誘発される耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇の血流増加反応に与える影響を図4AおよびBに示す。またアセチルコリンの静脈内投与が耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇の血流動態に与える影響を図4Cに示す。ヘキサメソニウムの静脈内投与は舌神経刺激によりコントロールラットおよび糖尿病ラットの耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口

唇で生じた血流増加反応を有意に抑制した [図4A, 耳下腺: コントロールラット;  $5.9 \pm 5.1\%$ ,  $F(1, 12) = 51.4$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 糖尿病ラット;  $0.0 \pm 0.0\%$ ,  $F(1, 12) = 57.9$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 顎下腺: コントロールラット;  $11.6 \pm 6.6\%$ ,  $F(1, 16) = 83.3$ ,  $n=5$ ,  $P<0.01$ , 糖尿病ラット;  $19.7 \pm 12.4\%$ ,  $F(1, 16) = 68.8$ ,  $n=5$ ,  $P<0.01$ , 舌下腺: コントロールラット;  $25.3 \pm 16.5\%$ ,  $F(1, 12) = 23.1$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 糖尿病ラット;  $36.4 \pm 12.5\%$ ,  $F(1, 12) = 16.8$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 下口唇: コントロールラット;  $27.7 \pm 16.2\%$ ,  $F(1, 12) = 31.1$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 糖尿病ラット;  $14.5 \pm 7.5\%$ ,  $F(1, 12) = 43.4$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ ]。コントロールラットと糖尿病ラットの間でヘキサメソニウムの抑制効果に有意な差は認められなかった (図4A)。アトロピンの静脈内投与は舌神経刺激によりコントロールラットおよび糖尿病ラットの耳下腺, 顎下腺, 舌下腺で生じた血流増加反応を有意に抑制した [図4B, 耳下腺: コントロールラット;  $21.8 \pm 12.6\%$ ,  $F(1, 12) = 46.6$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 糖尿病ラット;  $15.6 \pm 5.6\%$ ,  $F(1, 12) = 54.3$ ,  $n=4$ ,  $P<0.01$ , 顎下腺: コントロールラット;  $34.2 \pm 23.0\%$ ,  $F(1, 10) = 11.9$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ , 糖尿病ラット;  $48.0 \pm 6.5\%$ ,  $F(1, 10) = 9.9$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ , 舌下腺: コントロールラット;  $73.4 \pm 24.9\%$ ,  $F(1, 10) = 6.1$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ , 糖尿病ラット;  $85.7 \pm 6.8\%$ ,  $F(1, 10) = 6.4$ ,  $n=4$ , NS, 下口唇: コントロールラット;  $84.5 \pm 20.7\%$ ,  $F(1, 10) = 8.2$ ,  $n=4$ , NS, 糖尿病ラット;  $76.4 \pm 5.8\%$ ,  $F(1, 10) = 2.5$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ]。コント

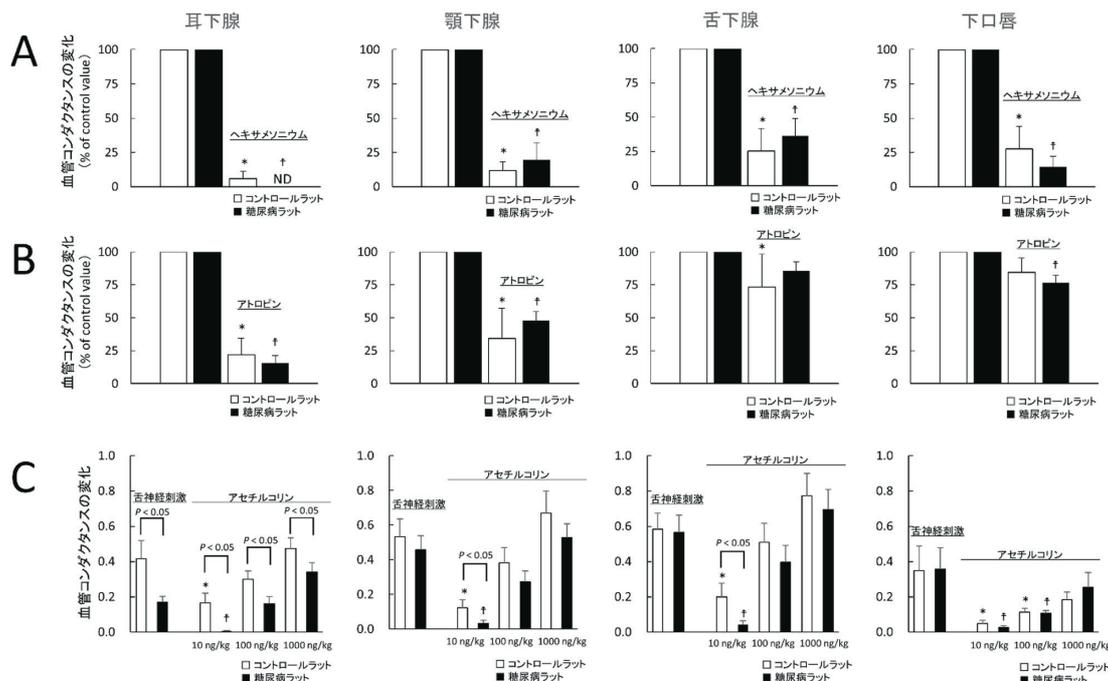


図4. 各種薬物が耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇の血流増加反応および血流動態に与える影響  
 (A) ヘキサメソニウムの静脈内投与が舌神経刺激でコントロールラットおよび糖尿病ラットの耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇で生じた血管コンダクタンスの変化の平均±標準誤差 (コントロールラット;  $n = 5$ , 糖尿病ラット;  $n = 5$ ). 薬物投与前の舌神経刺激による血管コンダクタンスの変化を100%とする. 平均値の差の検定は分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った. \* $P < 0.01$ , vs. コントロール (コントロールラット), † $P < 0.05$ , vs. コントロール (糖尿病ラット). (B) アトロピンの静脈内投与が舌神経刺激でコントロールラットおよび糖尿病ラットの耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇で生じた血管コンダクタンスの変化の平均±標準誤差 (コントロールラット;  $n = 5$ , 糖尿病ラット;  $n = 5$ ). 薬物投与前の舌神経刺激による血管コンダクタンスの変化を100%とする. 平均値の差の検定は分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った. \* $P < 0.01$ , vs. コントロール (コントロールラット), † $P < 0.05$ , vs. コントロール (糖尿病ラット). (C) アセチルコリンの静脈内投与により耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇で生じた血管コンダクタンスの変化の平均±標準誤差 (コントロールラット;  $n = 5$ , 糖尿病ラット;  $n = 5$ ). 平均値の差の検定は分散分析を行い, その後にBonferroniテストを行った. \* $P < 0.01$ , vs. 舌神経刺激 (コントロールラット), † $P < 0.05$ , vs. 舌神経刺激 (糖尿病ラット).

コントロールラットと糖尿病ラットの間でアトロピンの抑制効果に有意な差は認められなかった (図4B). アセチルコリン (Ach) の静脈内投与はコントロールラットおよび糖尿病ラットの耳下腺, 顎下腺, 舌下腺および下口唇の血管コンダクタンスを濃度依存的に変化させた [図4C, 耳下腺: コントロールラット, 舌神経刺激;  $0.42 \pm 0.10$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.17 \pm 0.05$ ,  $0.30 \pm 0.05$ ,  $0.47 \pm 0.06$ ,  $F(3, 44) = 5.6$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 糖尿病ラット, 舌神経刺激;  $0.17 \pm 0.03$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.01 \pm 0.00$ ,  $0.16 \pm 0.04$ ,  $0.34 \pm 0.05$ ,  $F(3, 44) = 6.9$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 顎下腺: コントロールラット, 舌神経刺激;  $0.53 \pm 0.10$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.12 \pm 0.05$ ,  $0.38 \pm 0.09$ ,  $0.67 \pm 0.13$ ,  $F(3, 44) = 6.5$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 糖尿病ラット, 舌神経刺激;  $0.46 \pm 0.08$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.03 \pm 0.02$ ,  $0.27 \pm 0.06$ ,  $0.53 \pm 0.08$ ,  $F(3, 44) = 6.6$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 舌下腺: コントロー

ラット, 舌神経刺激;  $0.58 \pm 0.09$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.20 \pm 0.08$ ,  $0.51 \pm 0.11$ ,  $0.77 \pm 0.13$ ,  $F(3, 44) = 4.5$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 糖尿病ラット, 舌神経刺激;  $0.56 \pm 0.10$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.04 \pm 0.02$ ,  $0.40 \pm 0.10$ ,  $0.69 \pm 0.11$ ,  $F(3, 44) = 7.2$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 下口唇: コントロールラット, 舌神経刺激;  $0.35 \pm 0.14$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.05 \pm 0.02$ ,  $0.11 \pm 0.02$ ,  $0.18 \pm 0.04$ ,  $F(3, 44) = 2.7$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ , 糖尿病ラット, 舌神経刺激;  $0.36 \pm 0.12$ , Ach 10, 100, 1000 ng/kg;  $0.03 \pm 0.01$ ,  $0.11 \pm 0.02$ ,  $0.25 \pm 0.08$ ,  $F(3, 44) = 4.6$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.01$ ]. 耳下腺における血管コンダクタンスの変化は10, 100, 1000 ng/kgのアセチルコリンの投与でコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった ( $P < 0.05$ ). 顎下腺および舌下腺における血管コンダクタンスの変化は10 ng/kgのアセチルコリンの投与でコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かつ

た ( $P < 0.05$ ).

## 考 察

40~45週齢の糖尿病ラットの空腹時血糖値は同週齢のコントロールラットと比較して有意に高く糖尿病の発症が認められた(表1). 体重と唾液腺重量にはコントロールラットと糖尿病ラットの間で有意な差は認められなかった(表1). 本研究に用いた糖尿病ラットは自然発症型の2型糖尿病モデルラットで5~12週齢を境界型糖尿病(前糖尿病段階)のモデル動物として, 30~40週齢を糖尿病モデル動物として, 40週齢以降をさまざまな糖尿病合併症を伴う糖尿病モデル動物として用いられている(Hashimoto et al., 2009; Hosomi et al., 2002; Matsumoto et al., 2009). 本ラットは離乳直後から過食と内臓脂肪蓄積型肥満を認め, 25週齢でほぼすべての個体で経口ブドウ糖負荷試験によって糖尿病と診断され, 40週齢以降では体重は徐々に減少する(Kawano et al., 1992). この体重変動の傾向は我々の結果や50週齢以上まで飼育した我々の予備的実験の結果(data not shown)とも一致しており, 本研究で用いた糖尿病ラットはこれまでに報告されている同系統のラットが発症した糖尿病と同様な病態経過をたどったと考えられる. ストレプトゾトシンの投与による実験糖尿病ラットでは顎下腺, 舌下腺および耳下腺の萎縮(Stewart et al., 2016; Takai et al., 1983), 耳下腺におけるトリグリセライドと考えられる脂肪滴の蓄積(Anderson & Garrett, 1986; Hand & Weiss, 1984)など唾液腺の器質的変化が報告されているが, 本研究に用いた糖尿病ラットの唾液腺に萎縮は認められなかった.

糖尿病ラットの顎下腺および舌下腺の安静時血流量はコントロールラットと比較して有意に低く, 耳下腺および下口唇の安静時血流にはコントロールラットと糖尿病ラットの間で有意な差は認められなかった(図1BおよびC). 組織における基礎血流量には毛細血管密度や血管壁に対する収縮性および拡張性のトーン調節が関与する. 唾液腺における毛細血管密度は顎下腺で最も高く, 舌下腺, 耳下腺の順に低い(Sato & Miyoshi, 1990). しかし, コントロールラットおよび糖尿病ラット唾液腺の安静時血流は顎下腺および耳下腺と比較して舌下腺で有意に高く(図1BおよびC), この結果は我々がこれまでにWistar系ラットで示した報告とも一致している(Sato & Ishii, 2015). したがって, 舌下腺における高い基礎血流量の機序や生理学的な意義については明らかにされていないが, 唾液腺における安静時血流調節機序の存在が示唆される. 基礎血流調節には交感神経血管収縮線維が

関与することが知られているが, 本研究では交感神経を頸部で切断しているため交感神経による血管収縮性トーン調節の影響は排除される. 一方, 我々はこれまでに口腔顔面領域における血管拡張性トーン調節の存在を示唆する報告をしている(Niioka & Ishii, 2013). この調節機序が唾液腺間で異なることが糖尿病による安静時血流に対する影響が唾液腺間で異なることと関係しているのかもしれない.

舌神経の求心性刺激は唾液腺に刺激強度と頻度に依存した血流増加反応を誘発し, 耳下腺における血管コンダクタンスの変化は20 V以上の刺激強度と20 Hz以上の刺激頻度ではコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低かった(図2A, BおよびC). ウレタン麻酔はラットの血糖値を著しく上昇させたが(表2), 血糖値の変動は舌神経刺激で唾液腺に生じる血管コンダクタンスの変化に影響を与えなかった(図3AおよびB). これらの結果から唾液腺の副交感神経性血流増加反応は糖尿病により耳下腺における反応が障害されることが示され, この障害は麻酔による一過性の血糖値上昇に起因するものではなく慢性的な高血糖による影響であることが示唆された. ウレタン麻酔は交感神経系を活性化させ血糖値を上昇させることが知られている(Reinert, 1964; Maggi & Meli, 1986). 我々はウレタン麻酔による血糖値の上昇は唾液腺の副交感神経性血流増加反応に影響を与えないことを示したが(図3AおよびB), 胃運動や胃酸分泌は麻酔による血糖値の上昇により抑制されることから研究対象によっては麻酔薬の選択が重要となる(Takeuchi et al., 1994). イソフルランやハロタン, セボフルランなどの吸入麻酔薬やバルビタール系の静脈麻酔薬を用いることで過度な血糖値の上昇を避けることができるが, これらの麻酔薬は口腔顔面領域で生じる体性-副交感神経反射血管拡張反応を著しく抑制するため本実験系には好ましくない(和泉, 1997). 本研究では唾液腺を支配する副交感神経性血管拡張線維を活性化させる方法として, 三叉神経(舌神経)を求心性に電気刺激し脳幹の諸核を経由して反射的に副交感神経を活性化させる反射法を用いた. 本法は唾液腺を支配する副交感神経線維を遠心性に刺激する方法よりも唾液腺周囲組織への侵襲が少なく, 反射を用いることでより生理的に副交感神経線維を活性化させることが可能である. これまでに我々はこの方法を用いて口腔顔面領域における副交感神経性血管拡張反応の重要性を報告してきた(Ishii et al., 2005; Izumi & Karita, 1992; Sato & Ishii, 2015). 舌神経の求心性電気刺激で耳下腺に誘発される血流増加反応は低い刺激強度や刺激頻度の条件では非常に弱い反応で

あったことから、耳下腺の血流増加反応を誘発する感覚入力には顎下腺や舌下腺よりも限られることが示唆される。耳下腺に血流増加反応を生じさせる感覚入力については明確にされていないが、糖尿病ラットでは顕著な血流増加反応が認められた刺激強度と頻度（20–30 Vおよび20–30 Hz）における血流増加反応が抑制されたことから、糖尿病が耳下腺の血流増加反応に与える影響は非常に大きいと考えられる。

舌神経刺激による耳下腺、顎下腺、舌下腺および下口唇の血流増加反応は自律神経節細胞のアセチルコリン受容体（ニコチン受容体）に結合して興奮伝達を遮断するヘキサメソニウムとの投与により著しく抑制され、ムスカリン受容体拮抗薬であるアトロピンの投与により耳下腺および顎下腺の反応は抑制されたが舌下腺および下口唇の反応はほとんど影響を受けなかった（図4AおよびB）。これらの結果は舌神経刺激で糖尿病ラットおよびコントロールラットの唾液腺および下口唇に生じる血流増加反応は、1）大部分が自律神経系を介した反応であるが自律神経系を介さない反応も部分的に含まれる、2）副交感神経性コリン作動性線維および非コリン作動性線維が関与することを示しており、我々がWistar系ラットを用いて示した結果と一致している（Izumi & Karita, 1992; Mizuta et al., 2000; Sato & Ishii, 2015; Takahashi et al., 1995）。自律神経系を介さない血管拡張反応としては唾液腺を支配する感覚神経線維による逆伝導性血管拡張の可能性が考えられるが、この反応に関する知見は少なく更なる検討が必要である（Izumi, 1999）。口腔顔面領域の副交感神経性血管拡張反応にはコリン作動性線維と非コリン作動性線維が関与するが、その関与は唾液腺によって異なり顎下腺の血管拡張反応には主にコリン作動性線維が関与する一方で舌下腺や下口唇の反応には非コリン作動性線維の関与が大きい（Sato & Ishii, 2015）。しかし動物種による違いもあり、コリン作動性と非コリン作動性血管拡張反応の関係性や生理学的意義は明確にされていない。

アセチルコリンの静脈内投与は耳下腺、顎下腺、舌下腺および下口唇に濃度依存的な血流増加反応を誘発したが、耳下腺に誘発された血管コンダクタンスの変化はコントロールラットと比較して糖尿病ラットで有意に低く、顎下腺および舌下腺における変化は10 ng/kgの投与ではコントロールラットよりも糖尿病ラットで低かったが、100, 1000 ng/kgの投与ではコントロールラットと糖尿病ラットの間で有意な差は認められなかった（図4C）。したがって糖尿病が耳下腺におけるコリン作動性血管拡張反応に与える障害が舌神経刺激により耳下腺で

誘発される副交感神経性血管拡張反応の低下に重要であることが示唆された。また顎下腺および舌下腺におけるコリン作動性血管拡張反応の障害も示唆されたが、耳下腺では血管拡張反応の大部分をコリン作動性の反応に依存しているため糖尿病による障害の影響を強く受けることが考えられる。ストレプトゾトシン糖尿病ラットを用いた研究では唾液腺のムスカリン受容体の感受性の低下（Watanabe et al., 2001）、細胞内シグナルトランスダクションの変化（Yamamoto et al., 1996）、アセチルコリンエステラーゼの増加（Anderson & Garrett, 1994）、NOを介した血管拡張反応への影響（Anderson & Garrett, 2004）など受容体や細胞内シグナリングへの影響に関する報告があり、我々の研究結果はOLETFラットが発症する糖尿病においてもコリン作動性血管拡張反応への障害が重要であることを示唆している。

唾液腺の基礎血流量の減少や副交感神経性血管拡張反応の低下は副交感神経刺激による唾液分泌を減少させることから、唾液分泌と唾液腺血流動態との関係性が示唆されている（Hanna et al., 1999; Harrison et al., 2002; Lung, 1990, 1998; Rourke & Edwards, 2000; Thakor et al., 2003）。糖尿病患者を対象とした唾液分泌量に関する研究では、各々の実験方法が異なるため唾液腺ごとの分泌量を比較することは難しいが、全唾液として安静時唾液および刺激唾液の減少が示されていることは一致している（Bernardi et al., 2007; Chavez et al., 2001; Dodds et al., 2000; Izumi et al., 2015; Mata et al., 2004）。安静時唾液の分泌には顎下腺の関与が大きく、刺激唾液の分泌時には耳下腺の重要性が増すことが知られており（Ferguson, 1975）、本研究結果で示された糖尿病ラットの顎下腺および舌下腺の安静時血流量の低下と耳下腺の副交感神経性血流増加反応の低下（図1, 2）は、糖尿病における唾液分泌減少に唾液腺血流障害が重要であることを示唆している。糖尿病が唾液腺に与える影響については、これまでに腺房細胞や導管の器質的および機能的な変化に関する多くの知見が示されているが、糖尿病が唾液腺血流動態に与える影響に関するさらなる研究は唾液分泌障害のより詳細な機序の解明と新たな治療方法の確立に寄与することが期待される。

## 結 論

2型糖尿病ラットの唾液腺では顎下腺および舌下腺における基礎血流量の減少と耳下腺における副交感神経性血管拡張反応の低下が認められ、糖尿病に伴う口腔乾燥症の発症要因のひとつとして糖尿病が唾液腺血流動態に与える影響の重要性が示唆された。

## 謝 辞

本研究の一部は平成25年度北海道医療大学歯学会研究奨励金（研究テーマ名：2型糖尿病の唾液分泌障害機序の解明における唾液腺血流障害の関与）、平成25～27年度科学研究費補助金基盤研究C（課題番号25462896；石井久淑）、平成26～27年度科学研究費補助金若手B（課題番号26861557；佐藤寿哉）、平成28年度～科学研究費補助金若手B（課題番号16K20425；佐藤寿哉）からの助成を受けて実施された。

## 参考文献

- Anderson LC & Garrett JR. Lipid accumulation in the major salivary glands of streptozotocin-diabetic rats. *Arch Oral Biol*, 31(7), 469-475, 1986.
- Anderson LC & Garrett JR. The effects of streptozotocin-induced diabetes on norepinephrine and cholinergic enzyme activities in rat parotid and submandibular glands. *Arch Oral Biol*, 39(2), 91-97, 1994.
- Anderson LC & Garrett JR. Neural regulation of submandibular gland blood flow in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for impaired endothelium-dependent vasodilatation. *Arch Oral Biol*, 49(3), 183-191, 2004.
- Basak K, Manjunatha M & Dutta PK. Review of laser speckle-based analysis in medical imaging. *Med Biol Eng Comput*, 50(6), 547-558, 2012.
- Bernardi MJ, Reis A, Loguercio AD, Kehrig R, Leite MF & Nicolau J. Study of the buffering capacity, pH and salivary flow rate in type 2 well-controlled and poorly controlled diabetic patients. *Oral Health Prev Dent*, 5(1), 73-78, 2007.
- Chavez EM, Borrell LN, Taylor GW & Ship JA. A longitudinal analysis of salivary flow in control subjects and older adults with type 2 diabetes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 91(2), 166-173, 2001.
- Dodds MW, Yeh CK & Johnson DA. Salivary alterations in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus and hypertension. *Community Dent Oral Epidemiol*, 28(5), 373-381, 2000.
- Ferguson DB. (1975). Salivary glands and Saliva. In: *Applied Physiology of the Mouth*, edited by Lavelle CLB. Bristol, UK: Wright, 1975.
- Hand AR & Weiss RE. (1984). Effects of streptozotocin-induced diabetes on the rat parotid gland. *Lab Invest*, 51(4), 429-440.
- Hanna SJ, Brelen ME & Edwards AV. Effects of reducing submandibular blood flow on secretory responses to parasympathetic stimulation in anaesthetized cats. *Exp Physiol*, 84(4), 677-687, 1999.
- Harrison AP, Cunningham ME & Edwards AV. Effects of endothelin on submandibular salivary responses to parasympathetic stimulation in anaesthetized sheep. *Auton Neurosci*, 99(1), 47-53, 2002.
- Hashimoto S, Yamada K, Kawata T, Mochizuki T, Schnermann J & Koike T. Abnormal autoregulation and tubuloglomerular feedback in prediabetic and diabetic OLETF rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 296(3), 598-604, 2009.
- Hosomi N, Noma T, Ohyama H, Takahashi T & Kohno M. Vascular proliferation and transforming growth factor-beta expression in pre- and early stage of diabetes mellitus in Otsuka Long-Evans Tokushima fatty rats. *Atherosclerosis*, 162(1), 69-76, 2002.
- Ishii H, Niioka T, Sudo E & Izumi H. Evidence for parasympathetic vasodilator fibres in the rat masseter muscle. *J Physiol*, 569(2), 617-629, 2005.
- 和泉博之. 自律神経研究における麻酔薬選択の重要性. *循環制御*, 18(3), 341-351, 1997.
- Izumi H. Nervous control of blood flow in the orofacial region. *Pharmacol Ther*, 81(2), 141-161, 1999.
- Izumi H & Karita K. Somatosensory stimulation causes autonomic vasodilatation in cat lip. *J Physiol*, 450, 191-202, 1992.
- Izumi H & Karita K. Parasympathetic-mediated reflex salivation and vasodilatation in the cat submandibular gland. *Am J Physiol*, 267(3), 747-753, 1994.
- Izumi M, Zhang BX, Dean DD, Lin AL, Saunders MJ, Hazuda HP & Yeh CK. Secretion of salivary statherin is compromised in uncontrolled diabetic patients. *BBA Clin*, 3, 135-140, 2015.
- Kawano K, Hirashima T, Mori S, Saitoh Y, Kurosumi M & Natori T. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long - Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes*, 41(11), 1422-1428, 1992.
- Leite RS, Marlow NM & Fernandes JK. Oral health and type 2 diabetes. *Am J Med Sci*, 345(4), 271-273, 2013.
- Lung MA. Variations in blood flow on mandibular glandular secretion to autonomic nervous stimulations in anaesthetized dogs. *J Physiol*, 431, 479-493, 1990.
- Lung MA. Autonomic nervous control of venous pressure

- and secretion in submandibular gland of anesthetized dogs. *Am J Physiol*, 275(2), 331–341, 1998.
- Maggi CA & Meli A. Suitability of urethane anesthesia for physiopharmacological investigations in various systems. Part 1 : General considerations. *Experientia* 42, 109–114, 1986.
- Mata AD, Marques D, Rocha S, Francisco H, Santos C, Mesquita MF & Singh J. Effects of diabetes mellitus on salivary secretion and its composition in the human. *Mol Cell Biochem*, 261(1–2), 137–142, 2004.
- Matsumoto T, Ozawa Y, Taguchi K, Kobayashi T & Kamata K. Chronic treatment with losartan (angiotensin II type 1 receptor antagonist) normalizes enhanced acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in isolated perfused hearts of type 2 diabetic OLETF rats. *J Smooth Muscle Res*, 45(5), 197–208, 2009.
- Mizuta K, Karita K & Izumi H. Parasympathetic reflex vasodilatation in rat submandibular gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 279(2), 677–683, 2000.
- Mortazavi H, Baharvand M, Movahhedian A, Mohammadi M & Khodadoust A. Xerostomia due to systemic disease : a review of 20 conditions and mechanisms. *Ann Med Health Sci Res*, 4(4), 503–510, 2014.
- Nioka T & Ishii H. Effects of substance P on basal blood flow regulation in rat masseter muscle. *Dent J Health Sci Univ Hokkaido*, 32(1), 21–31, 2013.
- Proctor GB & Carpenter GH. Regulation of salivary gland function by autonomic nerves. *Auton Neurosci*, 133(1), 3–18, 2007.
- Reinert H. Urethane hyperglycemia and hypothalamic activation. *Nature* 204, 889–891, 1964.
- Rourke K & Edwards AV. Submandibular secretory and vascular responses to stimulation of the parasympathetic innervation in anesthetized cats. *J Appl Physiol* (1985), 89(5), 1964–1970, 2000.
- Saleh J, Figueiredo MA, Cherubini K & Salum FG. Salivary hypofunction : an update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Arch Oral Biol*, 60(2), 242–255, 2015.
- Sato T & Ishii H. Differences in control of parasympathetic vasodilation between submandibular and sublingual glands in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 309(11), 1432–1438, 2015.
- Sato A & Miyoshi S. Morphometric study of the microvasculature of the main excretory duct subepithelia of the rat parotid, submandibular and sublingual salivary glands. *Anat Rec*, 226(3) : 288–294, 1990.
- Stewart CR, Obi N, Epame EC, Akbari AA, Halpern L, Southerland JH & Gangula PR. Effects of Diabetes on Salivary Gland Protein Expression of Tetrahydrobiopterin and Nitric Oxide Synthesis and Function. *J Periodontol*, 87(6), 735–741, 2016.
- Takahashi H, Izumi H & Karita K. Parasympathetic reflex salivary secretion in the cat parotid gland. *Jpn J Physiol*, 45(3), 475–490, 1995.
- Takai N, Uchihashi K, Yoshida Y & Kakudo Y. Salivational and histological damage of submandibular and sublingual glands in Streptozotocin-induced diabetic rats. *J Osaka Dent Univ*, 17(2), 65–72, 1983.
- Takeuchi K, Niida H, Ohuchi T & Okabe S. Influences of urethane anesthesia on indomethacin-induced gastric mucosal lesions in rats. *Dig Dis Sci* 39(12), 2536–2542, 1994.
- Thakor AS, Brown CN & Edwards AV. Effects of prolonged reduction in blood flow on submandibular secretory function in anesthetized sheep. *J Appl Physiol* (1985), 95(2), 751–757, 2003.
- Watanabe M, Yamagishi-Wang H & Kawaguchi M. Lowered susceptibility of muscarinic receptor involved in salivary secretion of streptozotocin-induced diabetic rats. *Jpn J Pharmacol*, 87(2), 117–124, 2001.
- Yamamoto H, Sims NE, Macauley SP, Nguyen KH, Nakagawa Y & Humphreys-Beher MG. Alterations in the secretory response of non-obese diabetic (NOD) mice to muscarinic receptor stimulation. *Clin Immunol Immunopathol*, 78(3), 245–255, 1996.



佐藤 寿哉

北海道医療大学歯学部口腔生物学系生理学分野 講師

平成20年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成25年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了（歯学博士）

平成25年4月 北海道医療大学歯学部生理学分野 助教

平成28年4月 北海道医療大学歯学部生理学分野 講師

〔原著〕

細胞質型イノシトール三リン酸 (IP<sub>3</sub>) バイオセンサー “cLIBRAvIIS” を用いた唾液腺腺房細胞のIP<sub>3</sub>測定法の開発

根津 顕弘, 森田 貴雄, 谷村 明彦

北海道医療大学歯学部薬理学分野

Development of a method for measurement of intracellular IP<sub>3</sub> concentrations in salivary acinar cells using the cytosolic type IP<sub>3</sub>-biosensor “cLIBRAvIIS”.

Akihiro NEZU, Takao MORITA, Akihiko TANIMURA

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

**Key words** : Inositol 1, 4, 5-trisphosphate, salivary acinar cells, IP<sub>3</sub>-biosensor, Measurement method for IP<sub>3</sub>**Abstract**

We examined agonist-induced changes in cytosolic concentrations of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) in rat salivary acinar cells using the cytosolic IP<sub>3</sub>-biosensor “cLIBRAvIIS”, containing a histidine tag. We constructed a cLIBRAvIIS-expressing plasmid vector, and transfected this plasmid into COS-7 cells. Fluorescent proteins were collected by TALON® beads in cytosolic proteins from cLIBRAvIIS-transfected cells. To evaluate the binding properties with IP<sub>3</sub> on purified cLIBRAvIIS, IP<sub>3</sub>-induced changes in the fluorescence ratio (Ratio) were measured using an imaging system and a microplate reader. Various concentrations of IP<sub>3</sub> (0.003–30 μM) induced elevations in the Ratio in a

concentration-dependent manner ( $K_d$  value : 66 nM), indicating that purified cLIBRAvIIS has a sufficient binding function as an IP<sub>3</sub>-biosensor. We then attempted to inject purified cLIBRAvIIS into rat parotid acinar cells using a micro-electroporation system, and observed fluorescence in approximately 12% of acinar cells. When cLIBRAvIIS-injected acinar cells were stimulated with carbachol (100 μM), a muscarinic acetylcholine receptor agonist, sustained elevations in the Ratio were observed during the stimulation. Our results show that purified cLIBRAvIIS would be a useful tool in the monitoring of changes in IP<sub>3</sub> in isolated living cells.

**緒 論**

α<sub>1</sub>アドレナリン受容体やM<sub>3</sub>ムスカリン受容体などのGタンパク質共役型受容体の活性化は、G<sub>q/11</sub>タンパク質を介してホスリパーゼCを活性化し、ホスファチジルイノシトール4,5二リン酸の加水分解によってイノシトール1,4,5-三リン酸 (IP<sub>3</sub>) を産生する (Berridge, 1993). IP<sub>3</sub>は細胞内Ca<sup>2+</sup>チャネルであるIP<sub>3</sub>受容体を活性化することにより細胞内Ca<sup>2+</sup>ストアからのCa<sup>2+</sup>放出を調節する重要な情報伝達分子である. Ca<sup>2+</sup>は様々な細胞反応を制

御する細胞内メッセンジャーで、細胞増殖やエネルギー産生、アポトーシス、分泌などの細胞機能の調節に関わっており (Berridge et al., 2000), 唾液腺腺房細胞ではIP<sub>3</sub>産生系を介するCa<sup>2+</sup>放出が水分泌に必要なイオンチャネル (Cl<sup>-</sup>やK<sup>+</sup>チャネル) の開口を起し、その後活性化されるイオントランスポーター (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup>共輸送体やNa<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換体等) の機能調節に重要な役割を果たすと考えられている (Ambudkar, 2014).

このような細胞内Ca<sup>2+</sup>シグナルに関する研究は、fura-2に代表されるCa<sup>2+</sup>プローブの開発によって急速に発達

した (Grynkiewicz et al., 1985). また, 高速かつ高解像度なイメージング技術の発達によって細胞内の Ca<sup>2+</sup> 応答をリアルタイムで可視化することが可能となり, 様々な細胞で複雑なパターンをもった Ca<sup>2+</sup> シグナルが発生することが明らかとなってきた. 唾液腺腺房細胞では腺腔側から始まった Ca<sup>2+</sup> 上昇が基底膜まで波のように変化する Ca<sup>2+</sup> ウェーブや, 腺腔側で Ca<sup>2+</sup> 濃度が周期的に上下に振動する Ca<sup>2+</sup> オシレーションが報告されている (Tojyo et al., 1997, 1998, Bruce et al., 2002, Nezu et al., 2002, Harmer et al., 2005).

一方で IP<sub>3</sub> 濃度測定法は, 放射性同位元素を使った [<sup>3</sup>H]-D-ミオイノシトールの代謝で生成された IP<sub>3</sub> を陰イオン交換カラムや高速液体クロマトグラフィーを使って分離・定量する方法や IP<sub>3</sub> 結合タンパク質を使ったバインディングアッセイが使われてきた. しかし Ca<sup>2+</sup> ウェーブや Ca<sup>2+</sup> オシレーションに代表される時間・空間的に制御された Ca<sup>2+</sup> 応答と IP<sub>3</sub> 濃度変化との関係を明らかにするには, 単一細胞レベルでの細胞内 IP<sub>3</sub> 濃度変化の測定が可能な蛍光センサーが必要である.

IP<sub>3</sub> 受容体は IP<sub>3</sub> に高い選択性をもつ天然の IP<sub>3</sub> センサーであり, その構造のアミノ末端側の 1 から 604 番までのアミノ酸からなる領域が IP<sub>3</sub> 結合部位と考えられている (Yoshikawa et al., 1996). 我々は type 3 IP<sub>3</sub> 受容体のリガンド結合部位の両端に GFP の変異体である CFP と YFP を結合させた最初の IP<sub>3</sub> バイオセンサー “LIBRA” シリーズを開発した (Tanimura et al., 2004). LIBRA は蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 技術を利用したバイオセンサーで, IP<sub>3</sub> の結合に伴うリガンド結合部位の構造変化により FRET 効率が変化し, CFP と YFP の蛍光比 (Ratio) 変化を起こすと考えられている. その後, type 1 IP<sub>3</sub> 受容体のリガンド結合部位の一部を使った IP<sub>3</sub> センサー “Fretino” (Sato et al., 2005) や “IRIS” (Matsu-ura et al., 2006) が発表され, FRET 型蛍光プローブの有効性が確認されている. “LIBRA” シリーズはセンサータンパク質の IP<sub>3</sub> に対するキャリブレーションを可能にするために細胞膜局在シグナル (GAP43) が付加されている膜発現型 IP<sub>3</sub> センサーである (Tanimura et al., 2004). 我々はこの LIBRA の特徴を利用して細胞内 IP<sub>3</sub> 濃度を算定し, Ca<sup>2+</sup> オシレーションによって起こる IP<sub>3</sub> オシレーションの定量的解析に成功した (Tanimura et al., 2009).

一方, “LIBRA” シリーズを含む IP<sub>3</sub> センサーは, 遺伝子を目的細胞に導入することでセンサータンパク質を細胞に発現させて利用する. しかし唾液腺細胞は分泌機能や細胞極性を維持したまま長期間培養することが難しいことからプラスミドによる IP<sub>3</sub> センサーの発現は困難で

ある. このような細胞の場合, マイクロインジェクションやエレクトロポレーション法によりセンサータンパク質を直接注入する必要がある.

本研究では, この “LIBRA” シリーズを基に細胞質に発現する高感度 IP<sub>3</sub> センサー “cLIBRAvIIS” を作成し, これが IP<sub>3</sub> センサーとして機能することを確認した. さらに, この cLIBRAvIIS を耳下腺腺房細胞に注入することで, 受容体刺激を介した細胞レベルの IP<sub>3</sub> 動態をリアルタイムで測定することに成功したので報告する.

## 方 法

### 1) 緩衝液

Equivalent wash buffer (EWB, 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 6 M 塩酸グアネチジン, 300 mM NaCl, 25 mM イミダゾール, pH 7), Equivalent buffer (EB, 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 6 M 塩酸グアネチジン, 300 mM NaCl, pH 7), Elution buffer (ELB, 50 mM Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM イミダゾール, pH 7), Intracellular-like medium (ICM, 123 mM KCl, 19 mM NaCl, 10 mM HEPES-KOH, 1 mM EGTA, 330 μM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.3), Hanks balanced salt solution (HBSS-H, 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.41 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.49 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> リン酸水素二ナトリウム, 0.44 mM KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5.5 mM グルコース, 20 mM HEPES-NaOH, pH 7.4)

### 2) 細胞質発現型 IP<sub>3</sub> バイオセンサー “cLIBRAvIIS” 発現ベクターの作成

図1に細胞質発現型 IP<sub>3</sub> バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の作成の手順を示す. 小胞体 (ER) 局在シグナル, ヒスチジンタグ (His-tag), Cerulean および type 3 IP<sub>3</sub> 受容体の一部 (1-45 番目のアミノ酸) の融合した cDNA 配列を合成し (GenScript Corp., Piscataway, NJ, USA), 制限酵素 NheI および PpuMI で処理した (図1A). 切り出された断片を, 同じ酵素を用いて我々の開発した LIBRAvIII 発現プラスミド (図1B, Tanimura et al., 2009) から GAP43, CFP および IP<sub>3</sub> 受容体の一部を含む配列をプラスミドから切断した部位に挿入し合成 LIBRAvIII を作成した (図1C). 合成 LIBRAvIII (図1C) を SacI で処理し, ER 局在シグナルを除去した (図1D). LIBRAvIIS 発現プラスミド (図1E, Tanimura et al., 2009) のリガンド結合部位を BssHII および NotI で処理し, 切り出された配列を同じ酵素で切り出した His-tag 付き細胞質発現型 LIBRAvIII (図1D) から切断した部位に挿入した (図1F).

### 3) 細胞培養

COS-7細胞はRIKEN Cell Bank (東京) から入手した。グルコース (1000 mg/l), 10%牛胎児血清, L-グルタミン (584 mg/l), ビルビン酸ナトリウム (110 mg/l), ペニシリン (100 units/mL) およびストレプトマイシン (100 µg/mL) を含むDulbecco's modified Eagles's medium (全てThermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 中にて37 °C, 5% CO<sub>2</sub>で維持されたインキュベータ内にて培養した。

### 4) TALON®ビーズを用いたcLIBRAvIISの分離

80%コンフルエントのCOS-7細胞に, 10 cmカルチャーディッシュ当たり1.5 µg/mLのcLIBRAvIIS発現プラスミドと4 µL/mLのLipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific社) 含むOpti-MEM (Thermo Fisher Scientific Inc.) を5 mL加えて, 2日間遺伝子を発現させた。通常は1回の精製に3枚の10 cmカルチャーディッシュを用いた。1 mM EDTAを加えたCa<sup>2+</sup>とMg<sup>2+</sup>を含まないDulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Thermo Fisher Scientific Inc.) の20分間処理によりcLIBRAvIISを発現させた

COS-7細胞を浮遊させ, タンパク質低吸着チューブ (プロテオセーブSS, 住友ベークライト株式会社, 東京) 中で4 °C, 700×g, 2分間遠心分離し, Equivalent wash buffer (EWB) で2回洗浄した。洗浄後, 250 µL/mL (w/v) サポニン (ICN,Cleveland, OH, USA) を含むEWB中で再懸濁し, 4 °Cで20分間細胞を処理した。サポニン処理した細胞を4 °C, 2500×g, 30分間遠心分離後, 上清をタンパク質吸着制御サンプリングチューブ (ザルスタット株式会社, 東京) に採取した。採取した上清に150 µLのTALON®ビーズ (タカラバイオ株式会社, 滋賀) のスラリーを添加し, 4 °Cで12時間インキュベータによりcLIBRAvIISタンパク質をビーズに吸着させた。cLIBRAvIISを吸着させたビーズはEquivalent buffer (EB) を用いて, 4 °Cで2500×g, 5分間遠心分離により2回洗浄し, 実験に用いるまで4 °Cで保存した。

### 5) cLIBRAvIISタンパク質の精製

cLIBRAvIISが吸着したビーズをEWB中で4 °C, 5000

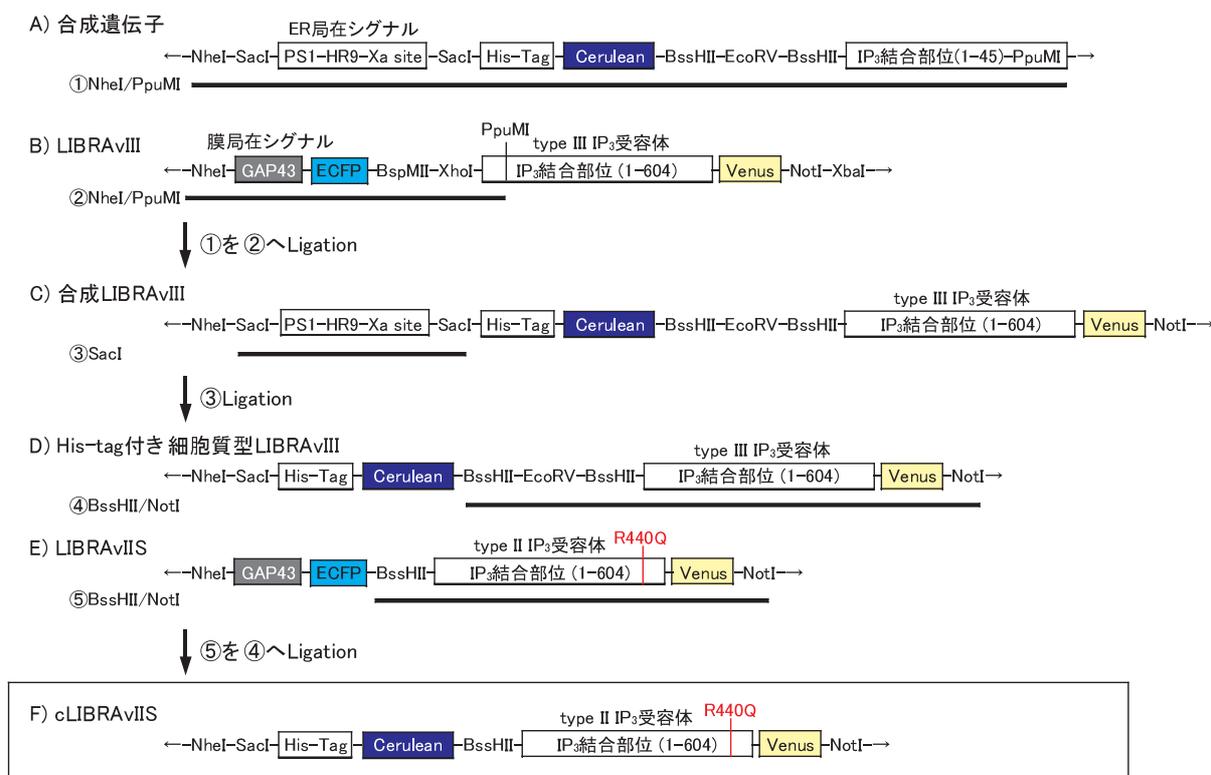


図1. 細胞質発現型IP<sub>3</sub>バイオセンサー“cLIBRAvIIS”の作成

制限酵素を用いたcLIBRAvIISプラスミド作成は方法に示した。A) GenScript社に依頼して作成した合成cDNAの構造。B) 膜発現型LIBRAvIII。C) A) およびB) の制限酵素処理 (NheIおよびPpuMI) により作成した合成LIBRAvIII。D) SacI処理により小胞体 (ER) 局在シグナルを除いたHis-tag付き細胞質型LIBRAvIII。E) 膜発現型LIBRAvIIS。F) D) およびE) の制限酵素処理 (BssHIIおよびNotI) によって作成された細胞質発現型IP<sub>3</sub>バイオセンサー“cLIBRAvIIS”。cLIBRAvIISは, ヒスチジンタグ (His-Tag), Cerulean, IP<sub>3</sub>受容体type IIの440番目のアルギニン (R) をグルタミン (Q) に置換したりガンド結合部位およびVenusで構成される。IP<sub>3</sub>受容体のリガンド結合部位の変異 (R440Q) によって, リガンド結合部位のIP<sub>3</sub>に対する感受性を向上させた。

×gで5分間の遠心分離により2回洗浄後、Elution buffer (ELB) で4℃、1時間処理し、4℃、12000×gで10分間の遠心分離後、上清を回収して実験に使用した。採取したサンプル中のタンパク質濃度をQubit® Protein Assay kitを用いて、Qubit 2.0 fluorometer (全て Thermo Fisher Scientific Inc.) にて測定し実験に用いた。

培養細胞、ビーズおよび精製タンパク質溶液の蛍光は、Blue-LEDユニット (励起波長、440–500 nm) を搭載した可視光LED搭載光源装置 (ビジレイズ, アトー株式会社, 東京) によって励起された蛍光をライトキャプチャーII (アトー株式会社) により検出した。

## 6) cLIBRAvIISの機能解析

### (1) Talon®ビーズに吸着したcLIBRAvIISの機能解析

ビーズに吸着したcLIBRAvIISのIP<sub>3</sub>に対する機能解析は、IP<sub>3</sub>バイオセンサーを用いた測定法に従って行った (Nezu et al., 2006, 2010)。cLIBRAvIISの吸着したビーズをCell Takでコートした7×7mmのプラスチックシリンダーとカバーガラスで構成された測定用チャンバーに固着した。ビーズをintracellular-like medium (ICM) で洗浄後、様々な濃度のIP<sub>3</sub> (0.003–30 μM) を含むICMを添加した。吸引器を測定用チャンバーに固定し、チャンバー内の溶液量をおよそ200 μLになるように調整した。溶液交換は800 μLの新しい溶液を加えることで2秒以内に交換した。

IP<sub>3</sub>添加によるcLIBRAvIISの蛍光はS Fluor40油浸対物レンズを装着したEclipse TE300型倒立顕微鏡 (全てニコン株式会社, 東京) で構成されたAQUACOSMOS/ASHURAシステム (浜松ホトニクス株式会社, 浜松) にて測定した。cLIBRAvIISを吸着させたビーズは430 nmの励起光を照射し、得られたCFPシグナル (420–500 nm) をC channel, YFPシグナル (500–565 nm) をY channelで測定し、蛍光比画像 (Ratio, C/Y channel) を作成した。全ての実験は室温で行った。

### (2) 精製cLIBRAvIISの機能解析

精製cLIBRAvIISのIP<sub>3</sub>に対する反応性は、マイクロプレートリーダー (Infinit F2000, TECAN Trading AG, Seestrasse, スイス) を用いて行った。1ウェルあたりに45 μLの精製タンパク質 (500 μg/mL) をガラスボトム製384ウェルプレート (Thermo Fisher Scientific Inc.) に入れ、そこに5 μLのIP<sub>3</sub>溶液を加えピペティングにより穏やかに混和した。プレート下面より430 nmの励起光を照射し、480および535 nmの蛍光を同時に測定した。

得られた蛍光強度から蛍光比 (Ratio: 480/535 nm) を計算し、IP<sub>3</sub>に対するcLIBRAvIISの蛍光比変化を算出した。全ての実験は室温で行った。

## 7) ラット単離耳下腺腺房細胞の調製

ラット耳下腺腺房細胞はウイスターST系雄性ラット (300–400 g, 三共ラボサービス株式会社) からトリプシンとコラゲナーゼを用いた方法にて調製した (Nezu et al., 2002)。単離した腺房細胞は最終的に0.1% BSAを含むHBSS-H (200 μM, Sigma-Aldrich Corp. LLC, St. Louis, MO, USA) 中に懸濁し、実験に用いるまで室温で保存した。

動物実験は「北海道医療大学動物実験規定」に基づき、「北海道医療大学動物実験委員会」の審査を経て、北海道医療大学長の承認を得て行った (承認番号: 第042号)。

## 8) cLIBRAvIISの耳下腺腺房細胞への導入

精製したcLIBRAvIISの耳下腺腺房細胞への導入はマイクロエレクトロポレーターシステム (Microporator, MP-100, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用い、製品のプロトコルに従って行った。1匹のラットから調製した腺房細胞の全量の1/5を採取し、700×gで2分間遠心分離を行い上清は廃棄した。腺房細胞に144 μLのSolution R (Thermo Fisher Scientific Inc.) と120 μLの精製cLIBRAvIIS溶液 (1 mg/mL) を混和し、1500V, 20 msecで2回の電圧を加え腺房細胞へcLIBRAvIISタンパク質を導入した。

## 9) cLIBRAvIISを用いた細胞内IP<sub>3</sub>濃度変化のリアルタイム測定

cLIBRAvIISタンパク質を導入したCOS-7細胞と腺房細胞における細胞内IP<sub>3</sub>動態のリアルタイム測定は、S Fluor40油浸対物レンズを装着したEclipse TE300型倒立顕微鏡 (全てニコン株式会社) で構成されたAQUACOSMOS/ASHURAシステム (浜松ホトニクス株式会社) にて測定した。cLIBRAvIIS導入した細胞に430 nmの励起光を照射し、得られたCFPシグナル (420–500 nm) をC channel, YFPシグナル (500–565 nm) をY channelで測定し、Ratio画像 (C/Y channel) 作成した。全ての実験は室温で行った。

測定用チャンバー内で培養したCOS-7細胞あるいはCell Takで測定用チャンバーに固着した腺房細胞に様々な試薬を溶解したHBSS-Hを添加して測定した。いくつかの実験では、COS-7細胞あるいは腺房細胞をICMで洗

浄し、その後200  $\mu\text{M}$   $\beta$ -エスチン (Sigma-Aldrich Corp. LLC) 処理により細胞膜を穿孔した後、高濃度 $\text{IP}_3$  (10–30  $\mu\text{M}$ ) を含むICMを添加した。

## 10) データ解析

全ての結果は3例以上の異なる実験から得られた平均値および標準誤差 (means  $\pm$  SEM) として示した。K<sub>d</sub>値およびHill係数 (n) は、Sigmaplot (Systat Software Inc, San Jose, CA, USA) を用いて解析した。

## 結 果

### 細胞質発現型 $\text{IP}_3$ バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の作成と機能解析

図1Fに作成した細胞質発現型 $\text{IP}_3$ バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の構造を示す。 $\text{IP}_3$ センサー “LIBRAvIII” (Tanimura et al., 2009) は、ラット $\text{IP}_3$ 受容体type IIIの $\text{IP}_3$ 結合部位 (1–604番目のアミノ酸) をECFPとYFPの変異体 (Venus) で挟み込み、CFP側に細胞膜局在シグナル (GAP43) を有するため細胞膜に発現する。本研究では精製した $\text{IP}_3$ バイオセンサーを使用するために、LIBRAvIIIのGAP43を精製用のヒスチジンタグ (His-tag) に置換した。またFRET効率を向上させるためにCFPをCFP変異体のCerulean (Rizzo et al., 2004) に置換した。さらにLIBRAvIIIのリガンド結合部位を $\text{IP}_3$ に対する感受性を向上させたLIBRAvIIS (Tanimura et al.,

2009) のものと置換した。

cLIBRAvIIS発現プラスミドをCOS-7細胞に導入すると、細胞質全体に435 nmの励起波長によって生じる蛍光シグナルが観察された (図2Aa)。cLIBRAvIIS発現細胞をATP (100  $\mu\text{M}$ ) で刺激すると蛍光タンパク質の蛍光比が上昇し、ATPを洗浄すると安静時レベルまで低下した。さらに $\beta$ -エスチン (200  $\mu\text{M}$ ) 処理により分子サイズの大きな蛍光タンパク質をとどめたまま細胞膜を穿孔し、細胞内へ $\text{IP}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ) を導入したところ、 $\text{IP}_3$ によりcLIBRAvIISの蛍光比の大きな上昇が観察された (図2A)。これらの結果から発現させたcLIBRAvIISが $\text{IP}_3$ に反応することが確認された。

細胞質に発現させたcLIBRAvIISを漏出させるため0.01%のサポニン処理により細胞膜を穿孔すると (Tanimura et al., 2004), cLIBRAvIISの蛍光が消失することが確認された (図2B)。His-tagでラベルされたcLIBRAvIIS (図2C) は、サポニンによる細胞膜穿孔により細胞外に漏出され、Talon®ビーズと特異的に結合する。cLIBRAvIIS発現細胞の細胞質と処理したビーズは435 nmの励起波長によりC channel (図3Aa) とY channel (data not shown) でも観察された。

### cLIBRAvIISタンパク質の $\text{IP}_3$ バイオセンサー機能解析

COS-7細胞に発現したcLIBRAvIISタンパク質の機能を解析するため、細胞質に発現したcLIBRAvIISを単離

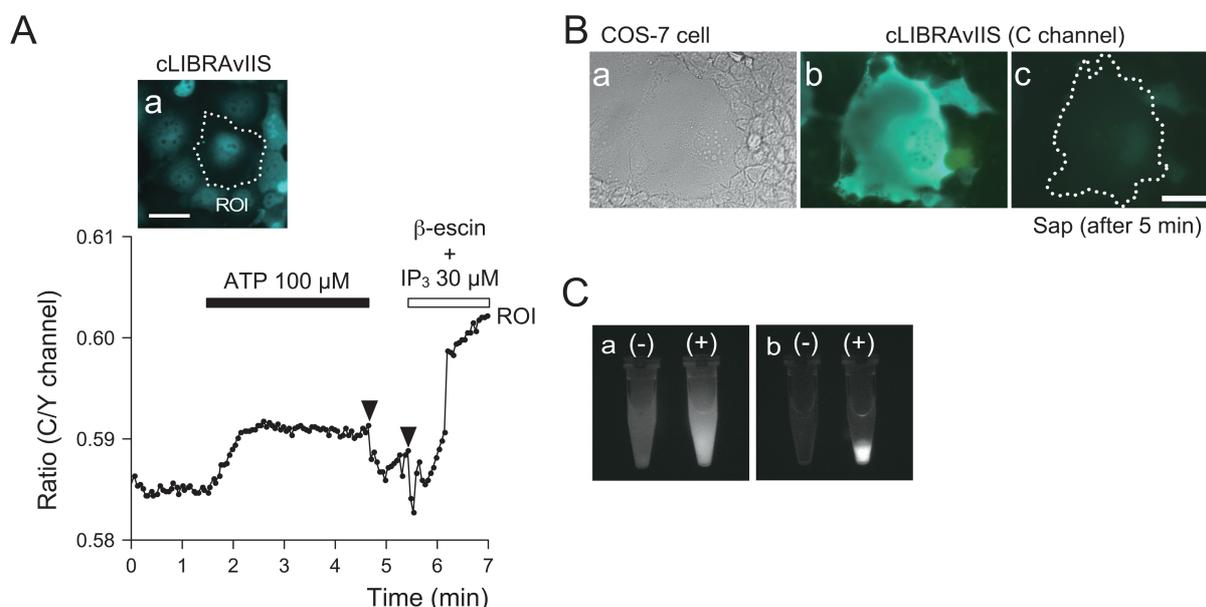


図2. 細胞質発現型 $\text{IP}_3$ バイオセンサー “cLIBRAvIIS” の培養細胞への発現

A) cLIBRAvIISを用いたATP (100 $\mu\text{M}$ ) および $\beta$ -エスチン処理 (200  $\mu\text{M}$ ) による膜穿孔後の $\text{IP}_3$  (30  $\mu\text{M}$ ) によるcLIBRAvIIS発現細胞 (ROI) の蛍光比 (Ratio) 変化。スケールバー: 20  $\mu\text{m}$ 。B) COS-7細胞に発現したcLIBRAvIIS (b) と、サポニン (Sap) 穿孔処理5分の細胞内分布 (c)。C) (a) cLIBRAvIISプラスミド非導入 (-) および導入 (+) したCOS-7細胞。 (b) cLIBRAvIIS非発現細胞 (-) および発現細胞 (+) の細胞質溶液と処理したTalon®ビーズ。3例の異なるサンプルを用いて実験を行った。

し IP<sub>3</sub> に対する反応性を検討した。

図3はビーズに結合したcLIBRAvIIS蛍光比に対するIP<sub>3</sub>の作用である。cLIBRAvIIS蛍光比はIP<sub>3</sub>濃度に依存して上昇し、10 μM IP<sub>3</sub>で最大値に達した。IP<sub>3</sub>の繰り返し添加で同等の上昇が観察された(図3A)。図3BはcLIBRAvIISの蛍光比に対するIP<sub>3</sub>の作用をまとめたもので、1日後(1day)のビーズではIP<sub>3</sub>のK<sub>d</sub>値は9 nM、Hill係数(n)は0.897であった。4℃で1週間保存したビーズでもIP<sub>3</sub>に対する反応性は大きく変化しなかった(図3B, 1week, K<sub>d</sub>値: 19 nM)が、冷凍したサンプルはIP<sub>3</sub>に対する反応性を消失した(data not shown)。

次に、ビーズから遊離させた精製cLIBRAvIISの蛍光比に対するIP<sub>3</sub>の反応性をマイクロプレートリーダーを用いて測定すると、その蛍光比はIP<sub>3</sub>濃度(0.003–30 μM)に依存して上昇し、最大の蛍光比変化は30 μM IP<sub>3</sub>で観察された(図4A)。精製cLIBRAvIISにおいて、IP<sub>3</sub>濃度に依存した蛍光比変化の範囲は0.017–0.042で(図4C)、cLIBRAvIISに対するIP<sub>3</sub>のK<sub>d</sub>値は66 nM、Hill係数(n)は1.609であった。精製cLIBRAvIISではビーズによる保存と異なり、1週間の保存でIP<sub>3</sub>に対する反応性が大きく低下した(図4B)。

さらに精製cLIBRAvIISのIP<sub>3</sub>に対する特異性を調べるため、他のイノシトールリン酸である4,5-IP<sub>2</sub>(IP<sub>2</sub>)および1,3,4,5-IP<sub>4</sub>(IP<sub>4</sub>)に対する反応性を検討した(図4C)。IP<sub>2</sub>およびIP<sub>4</sub>のK<sub>d</sub>値はそれぞれ1.6および3.4 μMで、cLIBRAvIISはIP<sub>3</sub>に対する特異性が高いセンサーであることが示された。

### 精製cLIBRAvIISを用いたラット耳下腺腺房細胞のIP<sub>3</sub>動態測定

唾液腺腺房細胞における受容体刺激を介したIP<sub>3</sub>動態を調べるため、精製cLIBRAvIISを用いて測定を試みた。図5Aは単離したラットの耳下腺腺房細胞の透過像(a)と蛍光像(b)である。

マイクロエレクトロポレーション法によってラットの耳下腺腺房細胞に精製cLIBRAvIISが導入され、蛍光が確認された(図5A)。この方法では、腺房細胞の約12%に蛍光が観察された。このcLIBRAvIIS導入細胞の細胞膜をβ-エスチン(200 μM)で穿孔し、IP<sub>3</sub>(10 μM)を添加すると蛍光比上昇が観察された。IP<sub>3</sub>の繰り返し添加により同等の蛍光比上昇が観察されたことから(図5B)、腺房細胞に導入された蛍光タンパク質はIP<sub>3</sub>センサーとして機能することが確認された。さらにcLIBRAvIISを導入した耳下腺腺房細胞をムスカリン受容体作動薬のカルバコール(CCh, 100 μM)で刺激したところ蛍光比上昇が観察され、この上昇はCCh添加後およそ1分で最大値に達し、CChを除くまで持続した(図5C)。このことからマイクロエレクトロポレーションでcLIBRAvIISを導入細胞が受容体による反応性を維持していることが示された。

## 考 察

今回我々は、細胞質発現型IP<sub>3</sub>バイオセンサー“cLIBRAvIIS”を開発し、このIP<sub>3</sub>センサーの細胞内導入により耳下腺腺房細胞のIP<sub>3</sub>濃度変化のリアルタイム測定に成功した。

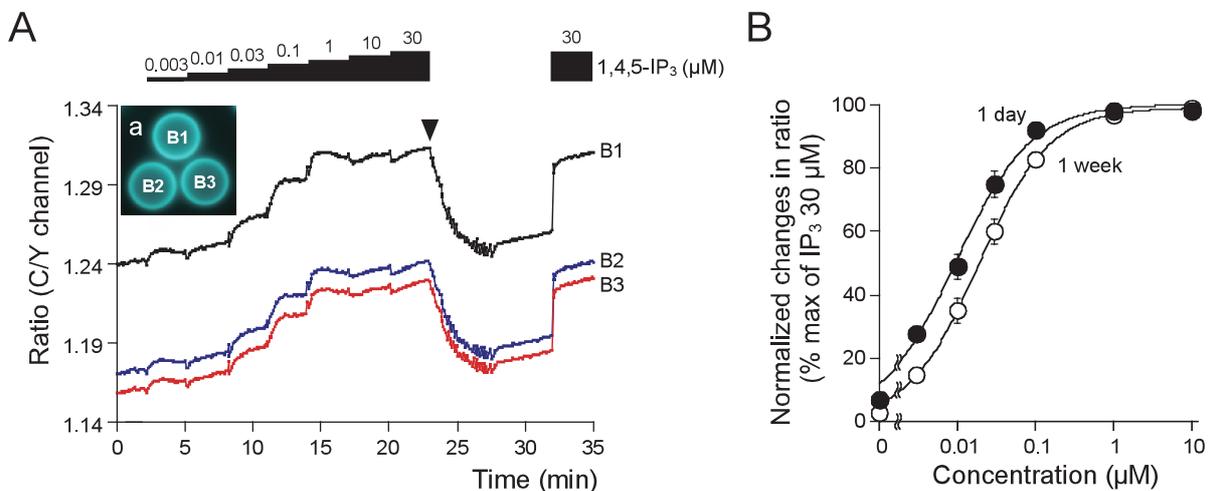


図3. 蛍光タンパク質のIP<sub>3</sub>に対する反応性

A) イメージングシステムを用いたIP<sub>3</sub>によるcLIBRAvIIS結合ビーズの蛍光比(Ratio)変化。(a) cLIBRAvIISの吸着したビーズの蛍光顕微鏡像。測定用チャンバーに固着したビーズに様々な濃度のIP<sub>3</sub>(0.003–30 μM)を処理し、その蛍光比変化を測定した。B) cLIBRAvIIS吸着後1日後および7日後のビーズにおけるIP<sub>3</sub>(0.003–30 μM)に対する反応。Mean±SE, 4–7例の異なるサンプルを用いて実験を行った。

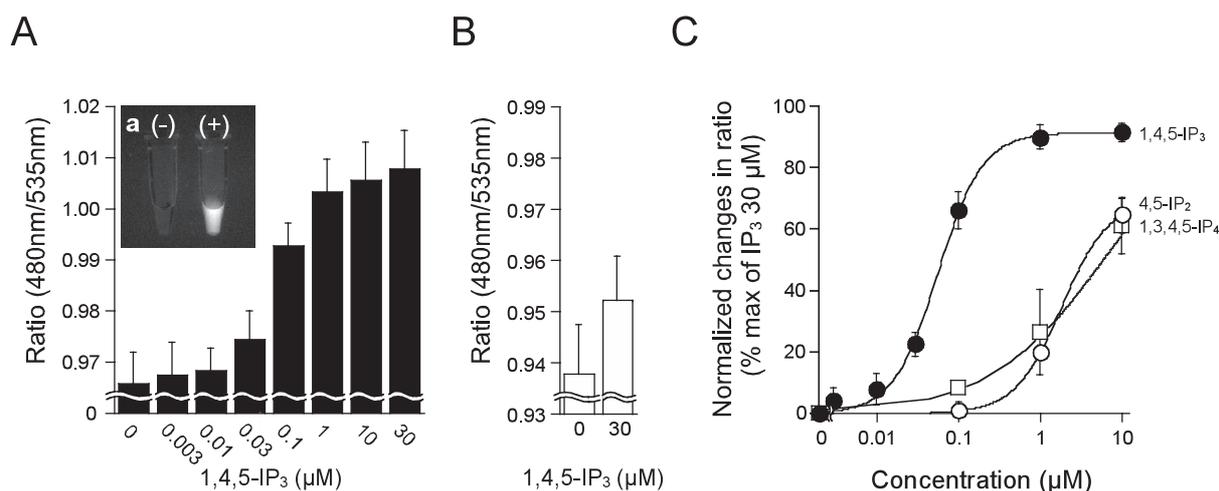


図4. 精製cLIBRAvIISタンパク質のIP<sub>3</sub>-バイオセンサー機能解析

A) マイクロプレートリーダーを用いた精製cLIBRAvIISタンパク質のIP<sub>3</sub>に対する反応性. (a) cLIBRAvIIS非発現細胞 (-) および発現細胞 (+) から調製したビーズをELB処理した後の上清. 精製cLIBRAvIISタンパク質溶液と様々な濃度のIP<sub>3</sub> (0.003–30 μM) を混和し, その蛍光比 (Ratio) を算出した. B) 精製1週間後のcLIBRAvIISのIP<sub>3</sub>に対する反応性. ビーズから精製cLIBRAvIISを4℃にて1週間保存したサンプルを高濃度IP<sub>3</sub> (30 μM) と処理した時の蛍光比変化. C) 精製cLIBRAvIISに対するIP<sub>3</sub>とその他のイノシトールリン酸 (4,5-IP<sub>2</sub>および1,3,4,5-IP<sub>4</sub>) によるRatio変化. IP<sub>3</sub> 30 μMを最大反応とした時の蛍光比変化. Mean ± SE, 3–4例の異なるサンプルを用いて測定した.

IP<sub>3</sub>に対する特異性が高く, 蛍光比測定が可能な利点をもつIP<sub>3</sub>受容体のリガンド結合ドメインを利用したFRET型プローブの“LIBRA”シリーズを改変した細胞質型cLIBRAvIISは, IP<sub>3</sub>に対するK<sub>d</sub>値が66 nMと, 他のイノシトールリン酸よりも25–50倍以上の親和性を有するIP<sub>3</sub>センサーであった (図4). 加えて, ビーズに吸着した状態の保存で採取後に比較的長期の保存が可能で (図3), 一旦調製すると1週間以内であればIP<sub>3</sub>センサーをビーズから精製し使用することが可能であることが明らかになった.

これまでに“LIBRA”シリーズを用いた実験により, 培養細胞では50–100 nMの細胞内IP<sub>3</sub>濃度 ([IP<sub>3</sub>]<sub>i</sub>) でCa<sup>2+</sup>応答が惹起されると考えられている (Tanimura et al., 2009, Nezu et al., 2010). また耳下腺腺房細胞では500nM caged IP<sub>3</sub>の光分解で生じる200 nM程度のIP<sub>3</sub>濃度でCa<sup>2+</sup>応答が惹起される (Tanimura et al., 1998) ことから, cLIBRAvIISはこれらのIP<sub>3</sub>濃度の測定に使用可能である.

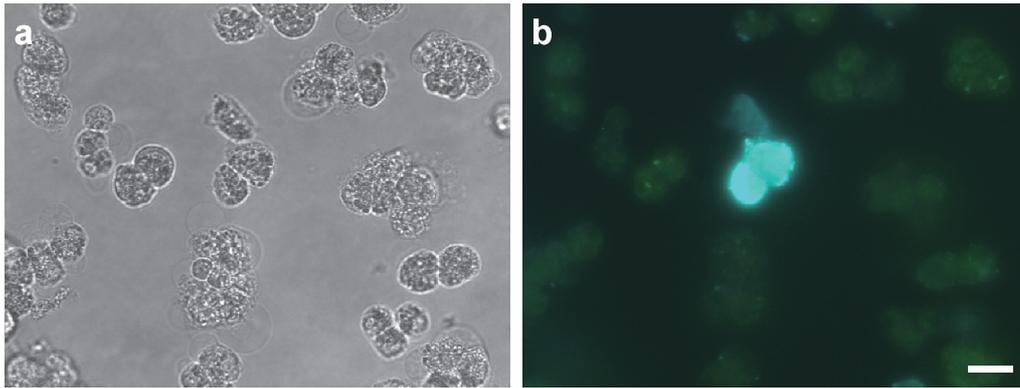
このcLIBRAvIISをマイクロエレクトロポレーションで導入することによって, ムスカリン受容体刺激による唾液腺腺房細胞の細胞内IP<sub>3</sub>動態のリアルタイムモニターに初めて成功した (図5C). CCh刺激 (100 μM) は腺房細胞の持続的なIP<sub>3</sub>上昇を起し, その反応は薬物洗浄で速やかに安静時レベルに低下する変化パターンを示した. これは高濃度 (100 μM) のAChやATP刺激による培養細胞 (SH-SY5YおよびCOS-7細胞) の反応とよく一致した (Tanimura et al., 2004, 2009, Nezu et al.,

2010). 唾液腺由来の培養細胞であるHSY-EA1細胞では3–30 μM ATPで周期的なIP<sub>3</sub>濃度の上昇と下降するIP<sub>3</sub>オシレーションが観察される (Tanimura et al., 2009). 一方で耳下腺腺房細胞では, 100 μM CCh刺激でIP<sub>3</sub>オシレーションは惹起されなかった.

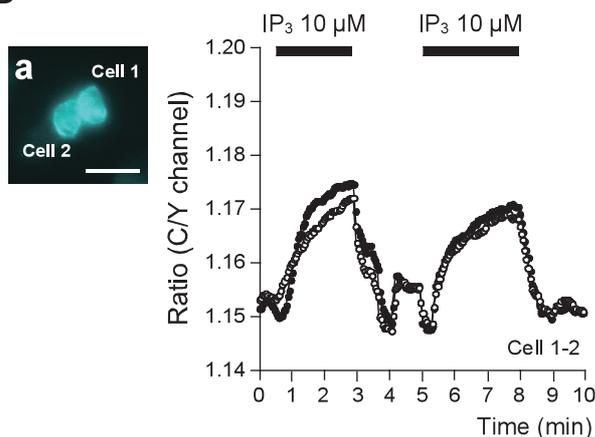
耳下腺腺房細胞において, 高濃度のCCh刺激はCa<sup>2+</sup>ウェーブを起し, この時CChによってCa<sup>2+</sup>濃度は約2秒で最大値に達する速いCa<sup>2+</sup>応答を起す (Tojyo et al., 1997, Nezu et al., 2002). 一方で同程度のCCh刺激による腺房細胞の [IP<sub>3</sub>]<sub>i</sub>上昇はプラトーに達するまでの時間はおよそ1分であった. これは耳下腺腺房細胞における最大のCa<sup>2+</sup>上昇は, 比較的低濃度のIP<sub>3</sub>によって惹起されたことを示唆している.

唾液腺腺房細胞は分泌機能や極性を保ったまま培養することが難しく, 培養細胞のように発現プラスミドを用いたセンサータンパク質の導入法を適用できない. 腺房細胞にバイオセンサーを導入するには, エレクトロポレーション法や微小ガラスピペットを用いたマイクロインジェクション法 (Kubota et al., 1987) がある. エレクトロポレーション法による精製cLIBRAvIISの腺房細胞への導入効率は約12%で顕微鏡による測定には十分であった (図5A). またアフリカツメガエルの卵母細胞などに用いられるマイクロインジェクション法 (Wasserman et al., 1980, Kubota et al., 1987) を検討したが, 腺房細胞の大きさが20 μm程度と卵母細胞 (1 mm) と比べ小さく, また細胞の固定が困難なため測定に必要な精製cLIBRAvIISを注入することはできなかった (data not

A



B



C

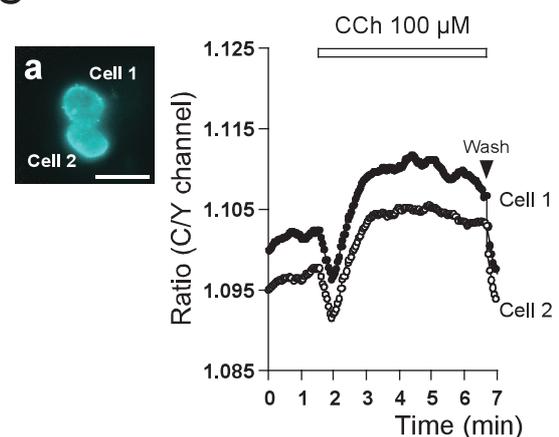


図5. 精製cLIBRAvIISを用いた単離耳下腺腺房細胞におけるIP<sub>3</sub>動態のリアルタイムモニター

A) (a) および (b) ラットから単離した耳下腺腺房細胞への精製cLIBRAvIISの導入. 耳下腺腺房細胞の透過像 (a) と435 nm励起によるC channel ((b), 420–500 nm) の蛍光像. B) IP<sub>3</sub>添加による腺房細胞内の精製cLIBRAvIISの蛍光比変化. 腺房細胞をβ-エスチン (200 μM) を用いて細胞膜を穿孔し, IP<sub>3</sub> (10 μM) 添加による蛍光比 (Ratio) 変化を測定した. C) カルバコール (CCh, 100 μM) による細胞内IP<sub>3</sub>動態. CChによる腺房細胞のcLIBRAvIISの蛍光比変化を測定した. スケールバー: 10 μm. 3例の異なるサンプルを用いて実験を行った.

shown). 標的タンパク質を細胞内に導入する方法として, アルギニンを多く含む配列 (TAT, R7およびR9) を付加した方法が知られている (Wender et al., 2000, Futaki et al., 2001). この配列を挿入したPHドメインタイプのIP<sub>3</sub>センサーのDT40細胞への導入に使用されており (Sugimoto et al., 2004), cLIBRAvIISにこれらのアミノ酸配列を挿入することで, 蛍光バイオセンサーの細胞内導入法の一つの選択肢になるだろう.

本研究では, マイクロプレートリーダーを用いてIP<sub>3</sub>による精製cLIBRAvIISの蛍光変化の検知に成功し, IP<sub>3</sub>結合部位に特異的な結合するIP<sub>3</sub>に対して高い選択性を持つ測定システムとして使用できることを示した. 本方法は放射性同位元素などを用いた従来法 (Bredt et al., 1989) と比べて, 簡便かつ極めて高精度にIP<sub>3</sub>濃度を測定可能である.

また我々は以前の報告で, “LIBRA” シリーズがIP<sub>3</sub>受

容体に特異的に結合する化合物のスクリーニングに利用できる可能性を示した (Nezu et al., 2006). IP<sub>3</sub>受容体に結合することが知られるヘパリンは, 高濃度では非特異的な結合によりLIBRAの蛍光比変化を起こすが, このようなりガンド結合部位に対する非特異的な反応は, IP<sub>3</sub>受容体のリガンド結合部位のアミノ酸変異によりIP<sub>3</sub>に対する結合性を無くしたcLIBRAvIIS-Nを作成することで解決できる (Nezu et al., 2006). マイクロプレートリーダーは簡便に大量のサンプルを一度に測定できると言う点で, 蛍光顕微鏡による測定システムには無い特徴を持っている. この方法は溶液中のIP<sub>3</sub>濃度の測定や新規IP<sub>3</sub>受容体リガンドスクリーニングをハイスループットに解析する測定法に応用が可能である.

最近我々は, IP<sub>3</sub>受容体に特異的に結合する蛍光リガンドを使った競合的蛍光リガンドアッセイ (CFLA) を開発し, LIBRAシリーズの約10倍の蛍光比変化を示す

IP<sub>3</sub>測定法の開発に成功した (Oura et al., 2016). ただし, CFLAでは蛍光リガンドを生きた細胞に注入する必要があるため細胞内のIP<sub>3</sub>測定に利用することができない. 本研究で確立した方法をCFLAに応用することによって, より高感度なハイスループット測定系を構築できると考えられる.

## 結 論

今回我々は, IP<sub>3</sub>を選択的かつ高感度に検知可能な細胞質発現型IP<sub>3</sub>バイオセンサー“cLIBRAvIIS”を開発した. このセンサーを用いることで, これまで測定できなかった唾液腺腺房細胞におけるIP<sub>3</sub>動態のリアルタイムモニターが可能となった. また, 本センサーを用いたマイクロプレートリーダー測定法は, セルフリー系の新規IP<sub>3</sub>濃度測定法およびIP<sub>3</sub>受容体のIP<sub>3</sub>結合部位へ特異的に作用する新規リガンドのスクリーニングへの応用が期待される.

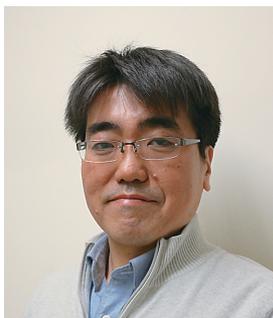
## 謝 辞

本研究の一部は, 平成16–19年度科学研究費補助金基盤研究B (課題番号16390532; 谷村明彦), 平成19–20年度科学研究費補助金若手研究B (課題番号19791369; 根津顕弘), 平成20–21年度歯学研究科ハイテク・リサーチ・センター整備事業 (東城庸介) からの助成を受けて行われた.

## 参 考 文 献

- Ambudkar IS. Ca<sup>2+</sup> signaling and regulation of fluid secretion in salivary gland acinar cells. *Cell Calcium* 55, 297–305, 2014.
- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315–325, 1993.
- Berridge MJ, Lipp P, and Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11–21, 2000.
- Bredt DS, Mourey, RJ, and Snyder, SH. A simple, sensitive, and specific radioreceptor assay for inositol 1,4,5–trisphosphate in biological tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 159, 976–982, 1989.
- Bruce JI, Shuttleworth TJ, Giovannucci DR, and Yule DI. Phosphorylation of inositol 1,4,5–trisphosphate receptors in parotid acinar cells. A mechanism for the synergistic effects of cAMP on Ca<sup>2+</sup> signaling. *J Biol Chem* 277, 1340–1348, 2002.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, and Sugiura Y. Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 276, 5836–5840, 2001.
- Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien RY. A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440–3450, 1985.
- Harmer AR, Smith PM, and Gallacher DV. Local and global calcium signals and fluid and electrolyte secretion in mouse submandibular acinar cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288, G118–G124, 2005.
- Kubota HY, Yoshimoto Y, Yoneda M, and Hiramoto Y. Free calcium wave upon activation in *Xenopus* eggs. *Dev Biol* 119, 129–136, 1987.
- Matsuura T, Michikawa T, Inoue T, Miyawaki A, Yoshida M, and Mikoshiba K. Cytosolic inositol 1,4,5–trisphosphate dynamics during intracellular calcium oscillations in living cells. *J Cell Biol* 173, 755–765, 2006.
- Nezu A, Tanimura A, Morita T, Irie K, Yajima T, and Tojyo Y. Evidence that zymogen granules do not function as an intracellular Ca<sup>2+</sup> store for the generation of the Ca<sup>2+</sup> signal in rat parotid acinar cells. *Biochem J* 363, 59–66, 2002.
- Nezu A, Tanimura A, Morita T, Shitara A, and Tojyo Y. A novel fluorescent method employing the FRET-based biosensor “LIBRA” for the identification of ligands of the inositol 1,4,5–trisphosphate receptors. *Biochim Biophys Acta* 1760, 1274–1280, 2006.
- Nezu, A., Tanimura, A., Morita, T., and Tojyo, Y. Visualization of Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> dynamics in living cells: two distinct pathways for Ins(1,4,5)P<sub>3</sub> generation following mechanical stimulation of HSY-EA1 cells. *J Cell Sci* 123, 2292–2298, 2010.
- Oura T, Murata K, Morita T, Nezu A, Arisawa M, Shuto S, and Tanimura A. Highly Sensitive Measurement of Inositol 1,4,5–Trisphosphate by Using a New Fluorescent Ligand and Ligand Binding Domain Combination. *Chem-biochem* 17, 1509–1512, 2016.
- Rizzo MA, Springer GH, Granada B, and Piston DW. An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat Biotechnol* 22, 445–449, 2004.
- Sato M, Ueda Y, Shibuya M, and Umezawa Y. Locating inositol 1,4,5–trisphosphate in the nucleus and neuronal dendrites with genetically encoded fluorescent indicators. *Analytical chemistry* 77, 4751–4758, 2005.

- Sugimoto K, Nishida M, Otsuka M, Makino K, Ohkubo K, Mori Y, and Morii T. Novel real-time sensors to quantitatively assess in vivo inositol 1,4,5-trisphosphate production in intact cells. *Chem Biol* 11, 475–485, 2004.
- Tanimura A, Matsumoto Y, and Tojyo Y. Polarized Ca<sup>2+</sup> release in saponin-permeabilized parotid acinar cells evoked by flash photolysis of 'caged' inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J* 332 (Pt 3), 769–772, 1998.
- Tanimura A, Morita T, Nezu A, Shitara A, Hashimoto N, and Tojyo Y. Use of Fluorescence Resonance Energy Transfer-based Biosensors for the Quantitative Analysis of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Dynamics in Calcium Oscillations. *J Biol Chem* 284, 8910–8917, 2009.
- Tanimura A, Nezu A, Morita T, Turner RJ, and Tojyo, Y. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1,4,5-trisphosphate in single living cells. *J Biol Chem* 279, 38095–38098, 2004.
- Tojyo Y, Tanimura A, and Matsumoto Y. Imaging of intracellular Ca<sup>2+</sup> waves induced by muscarinic receptor stimulation in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 22, 455–462, 1997.
- Tojyo Y, Tanimura A, and Matsumoto Y. Digital imaging of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in rat parotid acinar cells. *Life Sci* 62, 1635–1639, 1998.
- Wasserman WJ, Pinto LH, O'Connor CM, and Smith LD. Progesterone induces a rapid increase in [Ca<sup>2+</sup>] in of *Xenopus laevis* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1534–1536, 1980.
- Wender PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey ET, Steinman L, and Rothbard JB. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 13003–13008, 2000.
- Yoshikawa F, Morita M, Monkawa T, Michikawa T, Furuchi T, and Mikoshiba K. Mutational analysis of the ligand binding site of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J Biol Chem* 271, 18277–18284, 1996.



根津 顕弘

北海道医療大学歯学部薬理学分野 講師

平成5年3月 東日本学園大学 (現:北海道医療大学) 薬学部 衛生薬学科卒業

平成7年3月 北海道医療大学 薬学部薬学研究科修了 (薬学修士)

平成10年4月 北海道医療大学 歯学部 歯科薬理学講座 (現:薬理学分野) 助手

平成17年3月 北海道医療大学 歯学研究科 歯学博士

平成17年4月 米国NIH (Dr. R. James Turner) 留学 (平成19年3月まで)

平成19年4月 北海道医療大学 歯学部 薬理学分野 助教

平成19年11月 北海道医療大学 歯学部 薬理学分野 講師

〔原著〕

## リゾホスファチジン酸は歯根膜での細胞情報伝達や歯牙発生シグナルに関与する

荒川 俊哉<sup>1)</sup>, 小原 伸子<sup>2)</sup>, 岡山 三紀<sup>3)</sup>, ナタカーン ホシリラック<sup>1),3)</sup>, 溝口 到<sup>3)</sup>, 入江 一元<sup>2)</sup>, 田隈 泰信<sup>1)</sup>

- 1) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野  
 2) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系組織学分野  
 3) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系矯正学分野

## Lysophosphatidic acid is involved in a cellular signaling of periodontal ligament and tooth development

<sup>1)</sup>Toshiya ARAKAWA, <sup>2)</sup>Nobuko OBARA, <sup>3)</sup>Miki OKAYAMA, <sup>1),3)</sup>Nattakarn HOSIRILUCK,  
<sup>3)</sup>Itaru MIZOGUCHI, <sup>2)</sup>Kazuharu IRIE, <sup>1)</sup>Taishin TAKUMA

- 1) Division of Biochemistry, Department of Oral Biology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan  
 2) Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan  
 3) Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

**Key words** : lysophosphatidic acid (LPA), periodontal ligament (PDL), tooth development

## Abstract

Lysophosphatidic acid (LPA) is a chemical mediator synthesized from phospholipid, that induces cell growth, vascular development, and hair follicle development through six subtypes of G protein-coupled receptors, LPA<sub>1-6</sub>. However, little is known about the function of LPA signaling in oral tissue. We analyzed the expression of LPA receptors, synthetic enzymes of LPA and the intracellular signaling by LPA in human periodontal ligament fibroblasts (hPDLFs). The results showed a strong expression of LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>6</sub>, and lyso-PLD in hPDLFs. There was LPA induced phosphoryla-

tion of ERK1/2 in the hPDLFs. We also analyzed the expression of LPA receptors in mouse tooth germs at the cap and bell stages by RT-PCR, and found that all LPA receptors were expressed during tooth development. Further, we also analyzed LPA<sub>1</sub> in mouse tooth germs using *in situ* hybridization and determined LPA<sub>1</sub> expression in the dental mesenchyme at the initial stage and in both the mesenchyme and epithelium from the bud to the bell stages. These results suggest that LPA signaling would play an important role in tooth development and oral functions.

## 和文抄録

リゾホスファチジン酸はリン脂質から合成される脂質メディエーターの一つで、LPA<sub>1</sub>からLPA<sub>6</sub>の6種類のサブタイプを有するGタンパク質共役型受容体を介して、細胞増殖、血管形成、体毛形成などの様々な機能を誘導する。しかしながら、口腔組織でのLPAシグナルの働きについては十分に理解されていない。そこで我々は、ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体とLPA合成酵素

の発現および細胞内シグナル伝達について、またマウス歯胚におけるLPA受容体の発現とその分布について解析を行なった。その結果、ヒト歯根膜線維芽細胞ではLPA<sub>1</sub>とLPA<sub>6</sub>の2つの受容体の強い発現とLPA合成酵素lyso-PLDの発現が確認された。また、LPA刺激によりERK1/2のリン酸化が誘導されることが明らかになった。マウス歯胚においては、胎生14.5日齢でLPA<sub>5</sub>を除く全てのLPA受容体の発現が確認され、胎生18日齢で全てのLPA受容体の発現が確認された。更に歯胚組織での

LPA<sub>1</sub>受容体の発現分布では, *in situ* hybridization法により, 胎生12日齢で歯蕾を形成しつつある上皮と接する間葉に強い発現が認められ, この発現が胎生18日齢の鐘状期歯胚の咬頭頂付近では, 上皮のエナメル芽細胞分布部位にも観察された. 以上より, LPAシグナルは口腔組織において, 歯牙の発生から歯根膜の細胞シグナル伝達まで広く制御に関わっていることが示唆された.

## 緒 論

リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid, LPA) は, リン脂質から合成されるシグナル分子で, 主に, ホスファチジルコリン (PC) からホスホリパーゼA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) によって1つの脂肪酸が切り出された残りのリゾPCから, リゾPLD (lyso-PLD, Autotaxin, ENPP2) によって合成される (Aikawa *et al.*, 2015). LPAはこれまでその存在は知られていたものの, アラキドン酸代謝物のプロスタグランジン類に比較して, その役割が十分に明らかになっていなかった. しかし, 近年の研究の進展により, 細胞増殖, 血管形成, 抗アポトーシス, 細胞遊走, 神経細胞の突起退縮など, 様々な役割を担っていることが明らかになってきた (Kihara *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2001; van Meeteren *et al.*, 2006; Fotopoulou *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2006; Teo *et al.*, 2009).

LPAはGタンパク質共役型の受容体を介して作用し, 現在までLPA<sub>1</sub>からLPA<sub>6</sub>までの6つのサブタイプが同定されている (Kihara *et al.*, 2015). LPA受容体は, その大部分が内皮分化遺伝子 (endothelial differentiation gene, EDG) やATPをリガンドとするP2Yプリン受容体と共通であることが明らかになり, LPAだけでなく違った種類のリガンドにより機能選択されていることも示唆されている (Aikawa *et al.*, 2015). これまでそれぞれの受容体の機能には, LPA<sub>1</sub> (EDG2) が脳神経の発達や血管形成 (Harrison *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 2005), LPA<sub>2</sub> (EDG4) が肺の炎症や繊維化 (Huang *et al.*, 2013), LPA<sub>3</sub> (EDG7) が受精卵の着床と着床間隔 (Ye *et al.*, 2005), LPA<sub>4</sub> (P2Y9) が胎生期の血管やリンパ管の形成や細胞の遊走 (Sumida *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2008), LPA<sub>5</sub> (GPR92) が疼痛反応 (Callaerts-Vegh *et al.*, 2012), LPA<sub>6</sub> (P2Y5) が体毛形成 (Pasternack *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2008) に関与していることが報告され, 受容体のバリエーションにより様々な機能と関係していることが明らかになった. 歯の発生は上皮と間葉の接触が必要な点で体毛の発生と共通しているため, これらの受容体サブタイプの中で, LPA<sub>6</sub> (P2Y5) の関与の可能性が示唆される. Pasternackらおよび

Shimomuraらの2つのグループは, それぞれ毛髪に変異のある家系で, LPA<sub>6</sub> (P2Y5) の塩基配列に変異があることを見出し, 点変異で無毛症に, 挿入・欠失でワール毛になることを報告した (Pasternack *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2008). またLPAの合成酵素の一つであるホスファチジン酸特異的PLA<sub>1</sub>α (PA-PLA<sub>1</sub>α) (LIPH) の変異でも貧毛症を引き起こし, LPAシグナルが体毛形成で重要な働きをしていることが明らかになっている (Kazantseva *et al.*, 2006; Inoue *et al.*, 2011). しかしながら, これらの報告では, 発生で毛と類似している歯に明確な変異や欠失などがあることを示しておらず, PLA<sub>6</sub> (P2Y5) やLPA合成の変異による口腔組織への影響は不明なままである.

口腔領域においても, これまでLPAシグナルに関する研究がいくつか報告されている. Georgeらは, LPAがヒト歯根膜線維芽細胞でLPA<sub>1-3</sub>を介してERK1/2のリン酸化を誘導し, 同様にヒト歯肉線維芽細胞でLPA<sub>1</sub>を介することを報告している (George *et al.*, 2009). ERK1/2はMAPキナーゼファミリーの一つで, p38 MAPK, c-Jun N-terminal kinaseと並び, 細胞増殖を始め, 多くの細胞で様々な機能を制御している細胞内シグナル分子であり, LPAシグナルにおける中心的な役割を担っていると思われる. またCerutisらは, ヒト歯根膜線維芽細胞の損傷治癒実験においてLPAがplatelet derived growth factorの作用を増強させること (Cerutis *et al.*, 2004, 2007), LPA18:1がヒト歯肉線維芽細胞において炎症に関与する多くの新しい遺伝子や既知の遺伝子を制御していること (Cerutis *et al.*, 2015) を報告している. 口腔上皮細胞においては, Thorlaksonらが細胞遊走を促進することを報告している (Thorlakson *et al.*, 2016). さらに我々は, ヒト歯根膜線維芽細胞に重力によりメカニカルストレスを負荷し, ATPがメカニカルストレスのメディエーターとして誘導され, P2Y受容体を介してERK1/2のリン酸化を惹起していることを報告した (Ito *et al.*, 2014). これは, LPAの受容体としても同定されている, LPA<sub>4</sub> (P2Y9) およびLPA<sub>6</sub> (P2Y5) の関与を示唆するものでもある.

しかしながら, このようにいくつかの報告があるものの, 口腔組織でのシグナル伝達に関するLPAの役割については依然十分明らかになっていない. 特に, 歯牙の発生過程では, その可能性の報告すら見られない. そこで本研究では, 口腔でのLPAの役割を明らかにするために, ヒト歯根膜線維芽細胞での細胞情報伝達とマウスの歯牙発生でのLPA受容体を中心としたLPAシグナルの関与について検討したので報告する.

## 材料および方法

### 1) 材料

ヒト歯根膜線維芽細胞は、矯正治療のための抜歯より初代培養細胞 (primary cultured cells) として採取した (北海道医療大学歯学部・大学院歯学研究科倫理委員会内規第8条に基づき, 「ヒト歯根膜細胞を用いた歯根吸収関連遺伝子の研究」として申請・承認され (承認番号13), 歯根膜の使用はインフォームドコンセントを元に本人から承諾済み). ウシ血清 (CS) はギブコ社より購入した. Alpha modification of Eagle's medium ( $\alpha$ -MEM), suramin, ATP, ペニシリンG, ストレプトマイシンはシグマ社 (St Louis, MO, USA) より購入した. 1-oleoyl-リゾホスファチジン酸 (LPA) はケイマン・ケミカル社 (Ann Arbor, MI, USA) より購入した. Immobilon-P転写膜 (PVDF膜) およびImmobilon-HRPウエスタン化学発光試薬はミリポア社 (Bedford, MA, USA) から購入した. DIG Labelling mix (NO 11277073910) はロッシュ・ダイアグノスティックス社 (Basel, Switzerland) より, ブロックエースは雪印乳業 (東京, 日本) より, タンパク質定量試薬XL-Bradford [SDS-PAGE適応] はアプロサイエンス社 (徳島, 日本) より, 10%ポリアクリドアミドゲル (PAGE) はATTO社 (東京, 日本) より購入した. 抗p-ERK抗体 (E-4, マウスモノクローナル抗体) および抗ERK抗体 (K-23, ラビットポリクローナル抗体) はサンタクルズ社 (Santa Cruz, CA, USA) より購入した. HRP-2次抗体 (抗マウスまたは抗ラビットIgG), ProbeQuant G50 Micro ColumnsはGEヘルスケア社 (Hemel Hemstead, England) より購入した. その他の試薬は一般試薬を使用した.

### 2) 細胞培養, 細胞への薬剤刺激および重力負荷

歯根膜線維芽細胞の培養は,  $\alpha$ -MEM (10% CS, ペニシリン (1 mg/mL), ストレプトマイシン (1 mg/mL), グルタミン (200 mM) 含有) を用いて, 5% CO<sub>2</sub> 存在下, 37°CでHERACELL CO<sub>2</sub>細胞培養装置 (サーモ・サイエンティフィック社) に行なった. ERKのリン酸化実験における細胞への薬剤刺激は, ATP (10  $\mu$ M) で5分間およびLPA (10 ng/ml, 22.9 nM) で5分間行なった. 細胞への重力負荷は, 以前の報告 (Ito *et al.*, 2014) に従って行なった. Suramin添加は100  $\mu$ Mで刺激時の15分前に加えた.

### 3) RNA抽出, ゲノムDNAの抽出, 逆転写反応, Po-

### lymerase chain reaction (PCR)

ヒト歯根膜線維芽細胞およびマウス歯胚からのtotal RNAの抽出は, Tryzol試薬を用いて, メーカー指定のプロトコールに従って抽出した. ゲノムDNAの抽出はキアゲン社のGenomic DNA purification kitを用いて, メーカー指定のプロトコールに従って抽出した. 逆転写反応はギブコ社のSuperscript IIを用いて, 1  $\mu$ gのtotal RNAからメーカー指定のプロトコールに従って合成した. PCR反応は, それぞれの特異的プライマーとタカラバイオ社のExTaq polymeraseを用いて, 94°C 10秒, 55°C 30秒, 72°C 30秒の熱サイクルを35サイクル (ただし, GAPDHの場合は25サイクル) で, メーカー指定のプロトコールに従って行なった. 使用した特異的プライマーは以下の表1から3に示す (hはヒト, mはマウス, Fはforward primer, Rはreverse primerを表す). PCR法にて

表1: ヒトLPA受容体検出用PCRプライマーデザイン

遺伝子名/番号	プライマー配列	位置
hLPA <sub>1</sub>	F: 5' -ctgaagactgtgtcattgtgc-3'	1117-1138
[NM_001401.3]	R: 5' -aaccacagagtgtcattgtgc-3'	1440-1419
hLPA <sub>2</sub>	F: 5' -gtcaagactgtgtcattcattct-3'	857-879
[NM_004720.5]	R: 5' -ggaagcatgatgcgagtcgc-3'	1158-1140
hLPA <sub>3</sub>	F: 5' -gattgttttgggttggac-3'	309-329
[NM_012152.2]	R: 5' -tggtcagttgtctatggacc-3'	640-621
hLPA <sub>4</sub>	F: 5' -caccaatctagctctctgatt-3'	854-876
[NM_001278000.1]	R: 5' -gcattgtgacattagttgga-3'	1171-1148
hLPA <sub>5</sub>	F: 5' -ctctctacgcactgcaccact-3'	684-700
[NM_020400.5]	R: 5' -gaagctctcgaagcatagggcga-3'	978-956
hLPA <sub>6</sub>	F: 5' -agaattgtgagaagcgcaccct-3'	929-950
[NM_005767.5]	R: 5' -tctgtgaccagaatgaaccac-3'	1286-1265

表2: ヒトLPA合成酵素検出用PCRプライマーデザイン

遺伝子名/番号	プライマー配列	位置
hPA-PLA <sub>1</sub> $\alpha$	F: 5' -ccatgctctgaaggaattt-3'	493-512
[NM_139248.2]	R: 5' -acagacctctgtgtcaca-3'	866-846
hLyso-PLD(ENPP2)	F: 5' -ggaccatggaagttgaaat-3'	1819-1838
[NM_006209.4]	R: 5' -ggaatccgtagacactctgc-3'	2283-2264
hPS-PLA <sub>1</sub>	F: 5' -gacgtctctggtgattctt-3'	938-957
[NM_015900.3]	R: 5' -tggttatctgacattgtgg-3'	1253-1234

表3: マウスLPA受容体検出用PCRプライマーデザイン

遺伝子名/番号	プライマー配列	位置
mLPA <sub>1</sub>	F: 5' -ctgaagactgtgtcattgtgc-3'	955-976
[NM_010336.2]	R: 5' -aaccacagagtgtcattgtgc-3'	1278-1257
mLPA <sub>2</sub>	F: 5' -gtgaagactgtgtcattcattct-3'	868-887
[NM_020028.3]	R: 5' -gaagctgtatccgcgtct-3'	1165-1147
mLPA <sub>3</sub>	F: 5' -acaagctgtgtatctctgt-3'	290-311
[NM_022983.4]	R: 5' -tcattgtgacattgtgttcc-3'	605-583
mLPA <sub>4</sub>	F: 5' -aacctggccctctctgattt-3'	787-806
[NM_175271.4]	R: 5' -gcattgtgacattgtgttga-3'	1100-1078
mLPA <sub>5</sub>	F: 5' -cagactaattctctccaccct-3'	310-332
[NM_001163268.1]	R: 5' -ccgtacatgtctctggaagat-3'	671-649
mLPA <sub>6</sub>	F: 5' -gtcatctctgtttctgttggcc-3'	1416-1441
[NM_175116.4]	R: 5' -tcactcttaaccgaccattttt-3'	1648-1622
mGAPDH	F: 5' -ctaccccccaatgtctcctgtg-3'	793-815
[NM_001289726.1]	R: 5' -gatggaattgtgaggagatgc-3'	1192-1170

DNAを増幅後、1.5%のアガロースゲルにて電気泳動後、ATTO社ライトキャプチャーIIにより、ゲルの泳動を撮影した。

#### 4) p-ERKとERKのウエスタン解析

細胞のタンパク質は2xサンプルバッファー(2% SDS, 100 mM Tris-HCl, 20% Glycerol, 1.7Mβ-mercaptoethanol, BPB)にて抽出し、沸騰水にて熱変性後(5分)、XL-Bradfordタンパク質定量試薬を用いてタンパク質を定量した。10 μgのタンパク質を10% SDS-PAGEにて電気泳動後、プロットング装置Trans-Blot Turbo (BIO-RAD)にてPVDF膜に転写した。転写後のPVDF膜をブロックエースでブロッキング後、1次抗体(抗p-ERK抗体または、抗ERK抗体)、2次抗体および化学発光検出試薬を用いて、定法に従ってウエスタン解析を行った。化学発光検出試薬により同定されたバンドは、ATTO社ライトキャプチャーIIにより検出した。

#### 5) *in situ* hybridization法

マウス歯胚を含む組織を4%パラフォルムアルデヒドで4℃で一晩固定後、20%スクロースを含むPBSに6時間浸漬し、Tissue-Tek O.C.T. Compound (サクラフインテック, Tokyo, Japan)に包埋し、Cryon Spray Freezer (応研商事, Tokyo)を用いて凍結した。クリオスタットを用いて作成した厚さ10ミクロンの凍結切片をシランコートしたスライドグラスに貼り付け*in situ* hybridizationに用いた。切片は無水エタノールと0.2N塩酸による前処理後、プロテインースK処理と4%パラフォルムアルデヒドによる再固定を行い、洗浄、風乾して、ジゴキシゲニン(DIG)でラベルしたRNAプローブ(500 ng/ml)を含むハイブダイゼーションバッファー(50% formamide, 5 × SSC, 10 mM EDTA, 5% dextran sulphate, 1 × Denhardt's solution, 250 μg/ml yeast tRNA, 500 μg/ml fish sperm DNA (Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and 0.02% SDS)を用いて65℃で14時間ハイブダイゼーションを行った。その後、0.2 X SSCによる洗浄(65℃ 30分)を3回行い、室温にてPBSによる洗浄、20%Block Aceを含むPBSによるブロッキングを行った後、1:500で希釈したアルカリフォスファターゼ結合抗DIG抗体と4℃で一晩反応させ、NBT/BCIPによる発色を行った。LPA<sub>1</sub>のcDNAはpT7/T3α-18プラスミドに繋ぎこみ、リニアライズしたプラスミドを鋳型として、ロッシュ社DIG Labelling mix (NO 11277073910)存在下でT7 RNA polymeraseまたはT3 RNA polymeraseを用いてセンスおよびアンチセンスプ

ローブの合成を行った。

## 結 果

### 歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体とLPA合成酵素のmRNA発現の検討

LPAの受容体のmRNA発現を検討するために、LPA<sub>1-6</sub>のそれぞれに特異的なプライマーを用いて、RT-PCR法によりmRNAでの発現を検討した。その結果図1Aに示すように、LPA<sub>1</sub>とLPA<sub>6</sub>の強い発現が認められ、LPA<sub>3</sub>とLPA<sub>4</sub>に僅かな発現が認められた。LPA<sub>2</sub>とLPA<sub>5</sub>の発現は認められなかった。またゲノムDNAを鋳型にしたPCRで特異的発現が確認され(図1C)、RT(-)ではバンドが認められなかった(図1B)ことから、これらの増幅された発現は特異的であることが確認された。次に、LPA合成に関しての検討を行った。LPAの合成経路にはlyso-PLDの他、ホスファチジン酸(PA)からPA-PLA<sub>1α</sub>によって合成される経路もあるため、2つの合成酵素、lyso-PLDとPA-PLA<sub>1α</sub>の発現検討をRT-PCR法にて行った。その結果、図2に示すように、lyso-PLDの強い発現が認められたが、PA-PLA<sub>1α</sub>は認められなかった。

### ヒト歯根膜線維芽細胞における細胞内シグナルの検討

緒論に記載したように、歯根膜線維芽細胞への重力負荷ではATPの誘導によって、ERK 1/2がリン酸化される(Ito *et al.*, 2014)。その結果をコントロールとして、ATP添加と重力負荷を検討した結果、図3に示すように以前と同様にERK 1/2のリン酸化が確認された。これらと同じタイムコースでLPAの添加によりERK 1/2のリン酸化を検討した結果、ATP添加と重力負荷とほぼ同様なリン酸化結果が得られた。さらにGタンパク質共役型受容体の阻害剤であるSuraminを添加し、ATP添加、重力負荷、LPA添加を行った結果、いずれの場合も同様にリン酸化は消失したことから、これらのリン酸化反応は全てGタンパク質共役型受容体を介したもので、ATPとLPAは共にシグナル分子(アゴニスト)として歯根膜線維芽細胞で機能していることが明らかになった。

### マウス胎児歯牙におけるLPA受容体の発現検討

マウスの胎生14.5日齢と胎生18日齢の歯胚からRNAを抽出し、RT-PCRによりLPA受容体の発現の検討を行った。その結果図4Aに示すように、胎生14.5日齢では、LPA<sub>5</sub>を除く全ての受容体の発現が認められ、特にLPA<sub>4</sub>の発現が強く認められた。次に図4Bに示すように、胎生18日齢では全ての受容体の発現が認められた。胎生14.5日齢と胎生18日齢での発現を比較すると、胎生

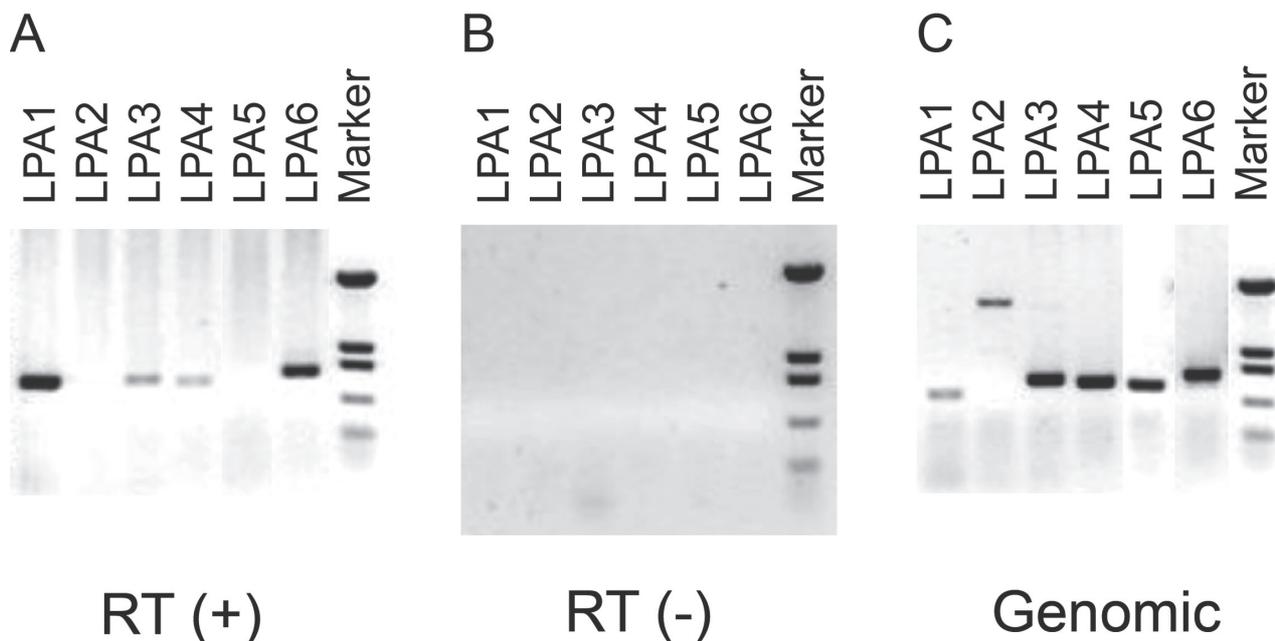


図1 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA受容体発現検討

LPA受容体の6つのサブタイプ, LPA<sub>1</sub>~LPA<sub>6</sub>のPCRによる解析を行った。(A) ヒト歯根膜線維芽細胞から抽出した1 μgのtotal RNAを使用したRT (RT (+))をPCRの鋳型とした。(B) ネガティブコントロールとして, 1 μgのtotal RNAをのみを使用し, RT酵素無しでRT反応を行い (RT (-)), PCRの鋳型とした。(C) ポジティブコントロールとして, ヒト歯根膜線維芽細胞から抽出したゲノムDNA (Genomic)を鋳型とした。ただし, LPA<sub>1</sub>とLPA<sub>2</sub>は, プライマー間にイントロンを挟むためgenomicでコントロールバンドを示すことができなかった (イントロンは, LPA<sub>1</sub>のexon 4と5の間で656,700 bp, LPA<sub>2</sub>のexon 2と3の間で1,973 bp)。(A)のLPA<sub>1</sub>の特異性は制限酵素により確認済み (データ示さず)。Marker: サイズマーカーは上から順に, 1419 bp, 517 bp, 396 bp, 214 bp, 75 bp。

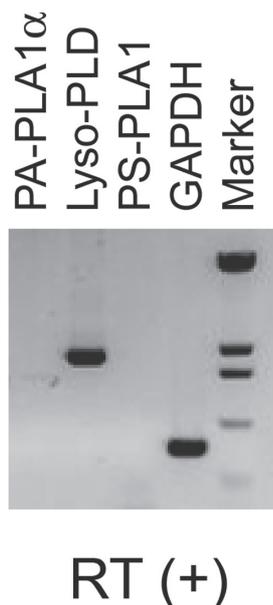


図2 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるLPA合成酵素の発現検討

LPA合成酵素のRT-PCRによる解析を行った。鋳型にはヒト歯根膜線維芽細胞から抽出した1 μgのtotal RNAを使用したRT (RT (+))を用いた。PA-PLA1α: ホスファチジン酸特異的ホルホリパーゼA1α, Lyso-PLD: リゾホスホリパーゼD, PS-PLA1: ホスファチジルセリン特異的ホスホリパーゼA1, GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Marker: サイズマーカーは図1と同様。

18日齢でLPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>, LPA<sub>6</sub>の発現が増加し, LPA<sub>3</sub>の発現が減少し, 日齢の経過で受容体のサブタイプの発現に変化が生じることが認められた。

マウス胎児歯牙におけるLPA<sub>1</sub>の発現部位の検討

*in situ* hybridization法によるLPA<sub>1</sub>の歯胚における発現分布の検討を行った。図5Aに示すように, 胎生12日齢において, LPA<sub>1</sub>は歯蕾を形成しつつある上皮と接する間葉に強い発現が認められた (図5A)。蕾状期以降は歯小嚢とエナメル器に発現がみられ (図5B, C, E, F), 胎生18日の鐘状期歯胚では内エナメル上皮とエナメル芽細胞および象牙芽細胞にのみ発現が見られるようになった (図5H)。

考 察

LPAはリゾPCから合成されるケミカルメディエーターで, リゾPCと共に血清に存在するが, 他の体液と同様に唾液にも存在することが示されている (Bathena *et al.*, 2011)。にもかかわらず, 口腔組織でのLPAの働きについての知見は僅かで, 未だ不明な点が多い。歯根膜は歯槽骨と歯根の間であって, クッションとしての役割を担っていると同時に, 歯槽骨と歯根のメンテナンスの役割を果たしていると考えられている。我々はこれま

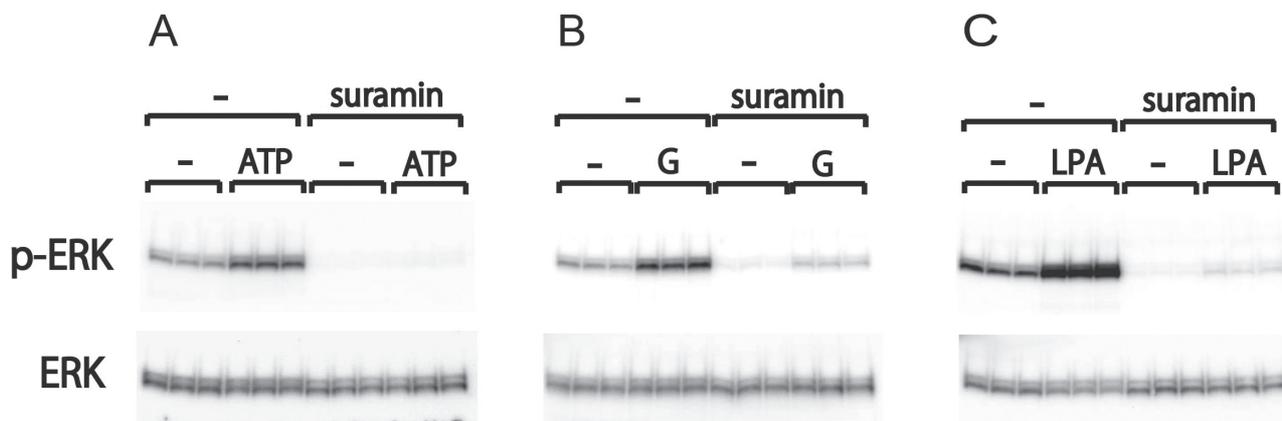


図3 ATP添加, 重力負荷, LPS添加によるERK 1/2のリン酸化解析

ウエスタン解析によりERK 1/2のリン酸化を解析した. p-ERK:リン酸化されたERK, ERK:リン酸化されていないERK, SuraminはGタンパク質共役型受容体の阻害剤をそれぞれ表す. (A) ATPの添加 (10  $\mu$ M) によるERK 1/2のリン酸化を解析. (B) 重力負荷 (25 G) によるERK 1/2のリン酸化を解析. (C) LPA添加 (10 ng/ml) によるERK 1/2のリン酸化を解析.

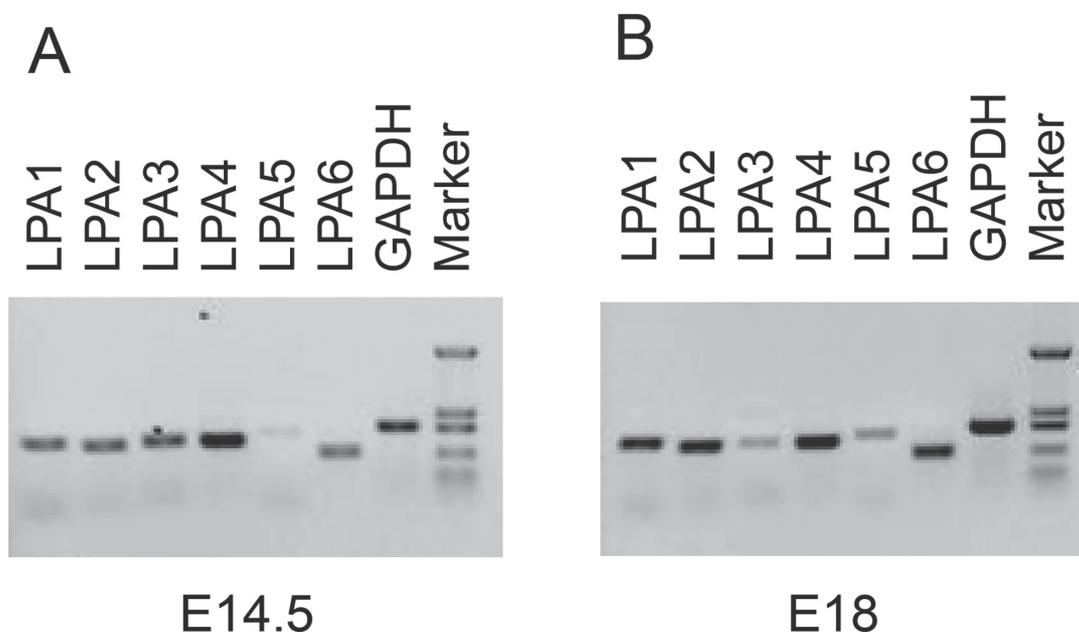


図4 マウス歯胚における, LPA受容体のRT-PCRによる解析

(A) マウス胎生14.5日齢の歯胚組織からtotal RNAを抽出し, 1  $\mu$ gのtotal RNAをRTに使用しPCR解析を行った. (B) マウス胎生18日齢の歯胚組織からtotal RNAを抽出し, 1  $\mu$ gのtotal RNAをRTに使用しPCR解析を行った. GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Marker: サイズマーカーは図1と同様.

で, 歯根膜線維芽細胞にメカニカルストレスを負荷し, 細胞内シグナルの解析を行ってきた (Ito *et al.*, 2014). その結果, P2Yプリン受容体を介したATPがメカニカルストレス・シグナルとして重要な働きをしていることを示した. LPAの受容体はP2Yプリン受容体としてもLPA<sub>4</sub> (P2Y<sub>9</sub>) およびLPA<sub>6</sub> (P2Y<sub>5</sub>) が同定されており, ATPとLPAが同じ受容体を共有して機能していると考えられる. 実際Georgeらは, ヒト歯根膜線維芽細胞において, LPAがLPA<sub>1-3</sub>を介してERK 1/2のリン酸化を誘導することを報告している. しかしLPA<sub>1-3</sub>はP2Yプリン受容体としては同定されていないことから, 我々はヒ

ト歯根膜線維芽細胞において, LPA<sub>4-6</sub>を含めたLPA受容体mRNA発現の検討を行った. その結果, 図1Aに示すように, LPA<sub>1</sub>とLPA<sub>6</sub>の強い発現が認められた. この結果は以前報告のあったLPA<sub>1</sub>に加えて, LPA<sub>6</sub>が歯根膜線維芽細胞で強く発現していることを示した初めての報告である. LPA<sub>6</sub>はもともとP2Y<sub>5</sub>プリン受容体としても同定されており, ATPとLPAの2つのリガンドによって同じシグナル経路を支配している (Yanagida *et al.*, 2009). LPA<sub>6</sub> (P2Y<sub>5</sub>) は体毛の形成に重要な働きをすることが示されており (Pasternack *et al.*, 2008; Shimomura *et al.*, 2008), また体毛形成は間葉と上皮の接触

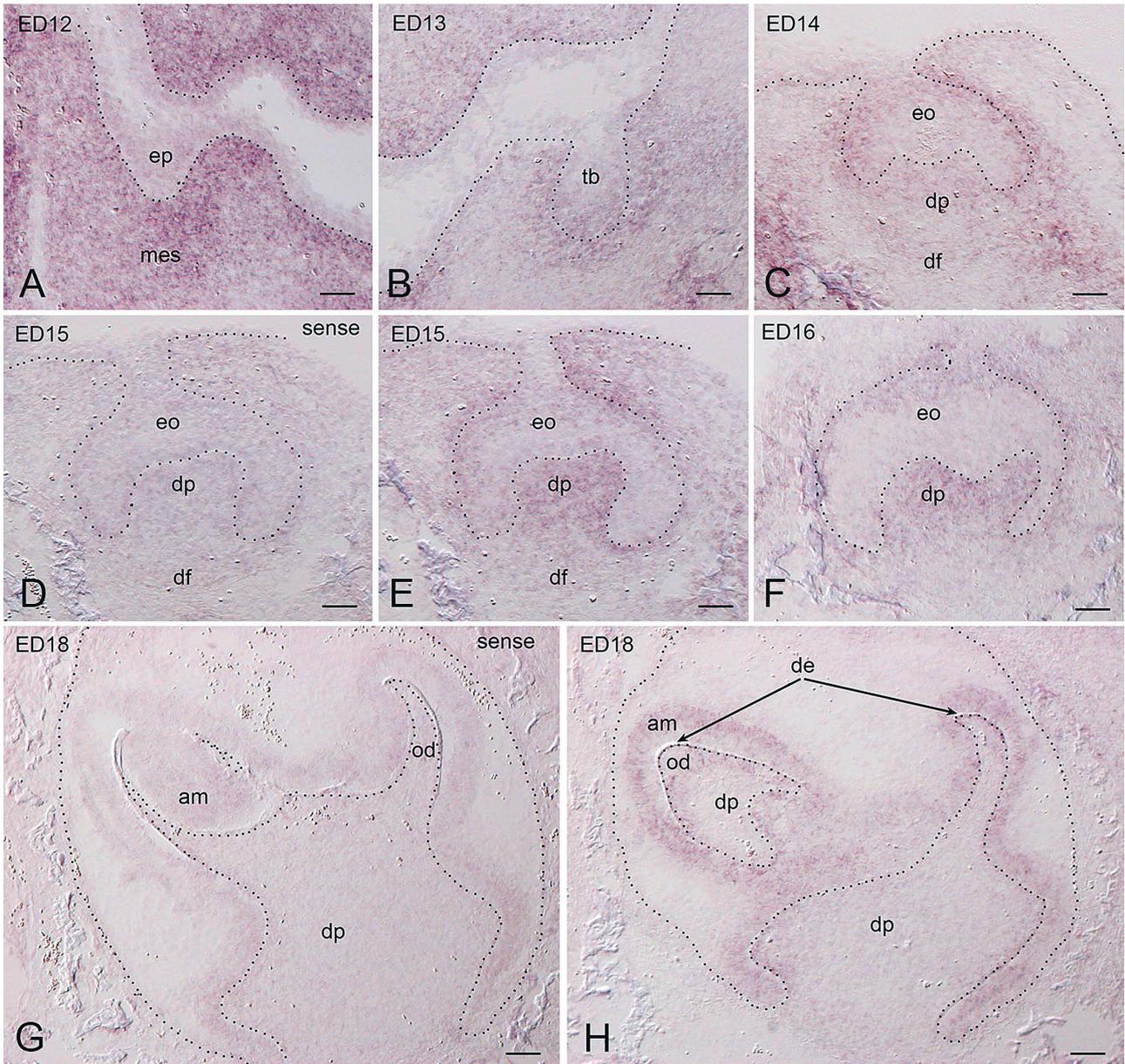


図5 マウス歯胚組織でのLPA<sub>1</sub>の*in situ* hybridization解析

胎生12 (A), 13 (B), 14 (C), 15 (D, F), 16 (F), 18 (G, H) 日の下顎歯胚。センス (D, G) およびアンチセンスプローブ (A, B, C, E, F, H) を用いたハイブリダイゼーション。(A) 肥厚した上皮 (ep) が歯堤を形成している。LPA<sub>1</sub>は間葉 (mes) で強く発現している。(B) 蕾状期。LPA<sub>1</sub>の発現は上皮性の歯蕾 (tb) の先端付近と周囲の間葉にみられる。(C) 帽状期。LPA<sub>1</sub>の発現はエナメル結節および内エナメル上皮を除くエナメル器 (eo), 歯乳頭 (dp), 歯小囊 (df) にみられる。(E) 後期帽状期。LPA<sub>1</sub>は歯乳頭で比較的強く発現し、エナメル器全般と歯小囊にも発現している。(F) 初期鐘状期。エナメル器内のLPA<sub>1</sub>の発現は歯堤側の領域以外は弱い。歯乳頭では比較的強い発現がみられ、歯小囊でも発現している。(H) 鐘状期歯胚。咬頭頂付近では象牙質 (de) の薄層が形成され、エナメル芽細胞 (am) も分化している。LPA<sub>1</sub>はエナメル芽細胞を含む内エナメル上皮全般と象牙芽細胞 (od) で発現している。(D, G) のセンスプローブを用いたハイブリダイゼーションではシグナルはみられない。scale bar, 100 μm.

とシグナル交換という点で歯牙の形成と同じシステムを持っている。このような視点から、LPA<sub>6</sub>が歯根膜線維芽細胞で発現していることは、歯根膜が歯牙・歯根の再生能力を残しているのかもしれない。また図3Cに示すように、歯根膜線維芽細胞でLPA刺激するとERK 1/2がリン酸化され、suraminの添加で、そのリン酸はほぼ消失した。SuraminはGタンパク質共役受容体の阻害剤

で (Beindl *et al.*, 1996; Chung *et al.*, 2005), P2受容体やドーパミンD2受容体など、多くの受容体シグナルを阻害し、またLPA受容体もGタンパク質共役型受容体である。この結果はATP刺激や重力負荷の場合と全く同じであった。図1Aに示すように歯根膜線維芽細胞では、主にLPA<sub>1</sub>とLPA<sub>6</sub>の2つの受容体が発現していることから、LPAの刺激はこの2つの受容体を介してERK 1/2

のリン酸化を伝達することが示された。しかし、このどちらの受容体が優位に作用するか、またどのような機能と結びついているのかなど不明な点も多く、さらなる研究が必要である。

次に我々は、LPAの合成系の検討を行った。図2に示すように、RT-PCRによって歯根膜線維芽細胞ではlyso-PLDが検出されたがPA-PLA<sub>1</sub>αは検出されなかった。したがって歯根膜線維芽細胞はLPAの合成系 (lyso-PLD) と受容体系 (LPA<sub>1</sub>及びLPA<sub>6</sub>) の両方持つことが明らかになり、LPAシグナル系が歯根膜線維芽細胞内でも機能している可能性があることが示唆された。血清中には大量に基質となるリゾPCが存在する。歯根膜線維芽細胞はこれを利用してLPAを合成し、オートクライン及びパラクラインによってLPAを作用させる要素を備えていることになる。

更に我々は、歯胚でのLPAシグナルの発現について検討した。LPA合成のKey酵素であるlyso-PLD (autotaxin) の欠損マウスは、胎生8.5日~10.5日で死亡すると報告されている (van Meeteren *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006)。従ってLPAシグナルのマウス初期胚発生での必須性は明らかであり、胎生死の原因は、主に重篤な血管形成不全に起因していることが示されている (van Meeteren *et al.*, 2006; Tanaka *et al.*, 2006)。また同様に神経管閉鎖不全が認められる (Tanaka *et al.*, 2006; Fotopoulou *et al.*, 2010)。それに対して、LPA受容体のそれぞれのノックアウトマウスの実験では、胎生致死はほぼ見られないことから、LPAシグナルが複数のLPA受容体で機能分担していると推定されている (青木ら, 2015)。ただし、LPA<sub>1</sub>は血管形成に関与し、そのノックアウトマウスでは、その半数が新生仔期に死亡することから (Teo *et al.*, 2009)、発生・成長期ではLPA<sub>1</sub>が最も重要な役割を担っているのかもしれない。このようにLPAシグナルがマウス胎生期において、重要な役割を果たしていることが明らかである。そこで我々は歯牙の発生におけるLPAシグナルの役割を検討するために、マウス歯胚でのLPAシグナルの可能性の検討を行った。LPA<sub>1-6</sub>のマウス歯胚での発現をそれぞれの特異的プライマーを用いてRT-PCRにて検討した結果、図4Aに示すように、胎生14.5日齢の帽状期ではLPA<sub>5</sub>の発現のみが見られなかったが、図4Bに示すように、胎生18日齢の鐘状期では全ての受容体の発現が確認された。このことは歯胚発生において、LPAシグナルが重要な働きをしていることを示しており、6つの受容体がそれぞれに機能分担しながら複雑な歯牙の発生を制御していることを強く示唆するものである。また、それぞれのサブタイプの

受容体が時間経過と共に発現が変化することは、歯牙形成における時期的な機能分担を示唆するもので非常に興味深い。次に我々はマウス歯胚組織を用いて、*in situ* hybridization法によりLPA<sub>1</sub>の歯胚での発現分布を検討した。図4のRT-PCRの結果では、全ての受容体に強い発現が認められ、特にLPA<sub>6</sub>は体毛と歯牙の発生の類似点から興味あるところではあるが、致死性がより重要と考え、本研究ではLPA<sub>1</sub>に焦点を絞った。その結果、図5Aに示すように、強いシグナルが胎生12日齢の歯堤形成の上皮と接する間葉 (mes) に見られた。このことはLPA<sub>1</sub>からのシグナルが、歯牙の発生の中心を担っている間葉において重要な制御シグナルとして働いていることを示唆するものである。また図5B-図5Eに示すように、LPA<sub>1</sub>の発現は次第に減弱した後、図5Hに示すように、胎生18日齢の鐘状期歯胚では内エナメル上皮とエナメル芽細胞にも発現が見られるようになった。このようなLPA<sub>1</sub>の発現部位の変化は、歯牙発生における間葉と上皮のシグナル交換の一部を担っているように見える。以上のように、歯牙の発生期におけるLPA受容体の発現と変化が明らかとなり、歯牙形成でのLPAシグナルの重要性が明らかとなった。歯牙の発生におけるLPAシグナルの関与の可能性を示した報告は本研究が初めてである。しかしながら、歯牙の発生におけるLPAシグナルの役割の解明には未だ多くの不明な点も多く、LPA<sub>1</sub>以外の受容体の発現分布や発現時期の変化、ノックアウトマウスでの歯胚発生の検討など、更なる研究が必要である。

## 結 論

本研究において、ヒト歯根膜線維芽細胞で、LPAシグナルに関与するLPA合成酵素のlyso-PLDと受容体のLPA<sub>1</sub>とLPA<sub>6</sub>の遺伝子が強く発現していることが明らかになった。またマウス歯胚において、全てのサブタイプのLPA受容体遺伝子が発現していること、また*in situ* hybridization法により、LPA<sub>1</sub>が胎生12日齢において間葉 (mes) で強く発現し、その発現が次第に減弱した後、胎生18日齢では上皮 (ep) の部分 (特にエナメル芽細胞 (am) の分布部位) にも発現が見られるようになった。これらの結果から、LPAシグナルの口腔領域での重要性が明らかになった。

## 謝 辞

本研究は、平成22年度から平成24年度科学研究費補助金基盤研究C (課題番号22592074; 荒川俊哉) から助成を受けて行われた。

## 参考文献

- Aikawa S, Hashimoto T, Kano K, Aoki J. Lysophosphatidic acid as a lipid mediator with multiple biological actions. *J Biochem* 157 : 81–89, 2015.
- 青木淳賢, 川名裕己, 木瀬亮次. 第2世代脂質メディエーター: リゾリン脂質. *実験医学* 33 : 2349–2360, 2015.
- Bathena SP, Huang J, Nunn ME, Miyamoto T, Parrish LC, Lang MS, McVane TP, Toews ML, Cerutis DR, Alnouti Y. Quantitative determination of lysophosphatidic acids (LPAs) in human saliva and gingival crevicular fluid (GCF) by LC–MS/MS. *J Pharm Biomed Ana* 110 : 402–407, 2011.
- Beindl W, Mitterauer T, Hohenegger M, Ijzerman AP, Nanoff C, Freissmuth M. Inhibition of receptor/G protein coupling by suramin analogues. *Mol Pharmacol* 50 : 415–423, 1996.
- Callaerts–Vegh Z, Leo S, Vermaercke B, Meert T, D’Hooge R. LPA5 receptor plays a role in pain sensitivity, emotional exploration and reversal learning. *Genes Brain Behav* 11 : 1009–1019, 2012.
- Cerutis DR, Dreyer A, Cordini F, McVane TP, Mattson JS, Parrish LC, Romito L, Huebner GR, Jabro M. Lysophosphatidic acid modulates the regenerative responses of human gingival fibroblasts and enhances the actions of platelet–derived growth factor. *J Periodontol* 75 : 297–305, 2004.
- Cerutis DR, Dreyer AC, Vierra MJ, King JP, Wagner DJ, Fimple JL, Cordini F, McVane TP, Parrish LC, Wilwerding TM, Mattson JS. Lysophosphatidic acid modulates the healing responses of human periodontal ligament fibroblasts and enhances the actions of platelet–derived growth factor. *J Periodontol* 78 : 1136–1145, 2007.
- Cerutis DR, Weston MD, Alnouti Y, Bathena SP, Nunn ME, Ogunleye AO, McVane TP, Headen KV, Miyamoto T. A Major Human Oral Lysophosphatidic Acid Species, LPA18 : 1, Regulates Novel Genes in Human Gingival Fibroblasts. *J Periodontol* 86 : 713–725, 2015.
- Chung WC, Kermod JC. Suramin disrupts receptor–G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 313 : 191–198, 2005.
- Contos JJA, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. Characterization of lpa2 (Edg4) and lpa1/lpa2 (Edg2/Edg4) Lysophosphatidic Acid Receptor Knockout Mice : Signaling Deficits without Obvious Phenotypic Abnormality Attributable to lpa2. *Mol Cell Biol* 22 : 6921–6929, 2002.
- Fotopoulou S, Oikonomou N, Grigorieva E, Nikitopoulou I, Paparountas T, Thanassopoulou A, Zhao Z, Xu Y, Kontoyiannis DL, Remboutsika E, Aidinis V. ATX expression and LPA signalling are vital for the development of the nervous system. *Dev Biol* 339 : 451–464, 2010.
- George J, Headen KV, Ogunleye AO, Perry GA, Wilwerding TM, Parrish LC, McVane TP, Mattson JS, Cerutis DR. Lysophosphatidic Acid signals through specific lysophosphatidic Acid receptor subtypes to control key regenerative responses of human gingival and periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontol* 80 : 1338–1347, 2009.
- Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B, Davies CH, Dawson LA, Grau E, Heidbreder C, Hemmati P, Hervieu G, Howarth A, Hughes ZA, Hunter AJ, Latcham J, Pickering S, Pugh P, Rogers DC, Shilliam CS, Maycox PR. LPA1 receptor–deficient mice have phenotypic changes observed in psychiatric disease. *Mol Cell Neurosci* 24 : 1170–1179, 2003.
- Huang LS, Fu P, Patel P, Harijith A, Sun T, Zhao Y, Garcia JG, Chun J, Natarajan V. Lysophosphatidic acid receptor–2 deficiency confers protection against bleomycin–induced lung injury and fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Bio* 149 : 912–922, 2013.
- Inoue A, Arima N, Ishiguro J, Prestwich GD, Arai H, Aoki J. LPA–producing enzyme PA–PLA(1)alpha regulates hair follicle development by modulating EGFR signalling. *EMBO J* 30 : 4248–4260, 2011.
- Ito M, Arakawa T, Okayama M, Shitara A, Mizoguchi I, Takuma T. Gravity loading induces adenosine triphosphate release and phosphorylation of extracellular signal–regulated kinases in human periodontal ligament cells. *J Invest Clin Dent* 5 : 266–274, 2014.
- Kazantseva A, Goltsov A, Zinchenko R, Grigorenko AP, Abrukova AV, Moliaka YK, Kirillov AG, Guo Z, Lyle S, Ginter EK, Rogaev EI. Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH. *Science* 314 : 982–985, 2006.
- Kihara Y, Mizuno H, Chun J. Lysophospholipid receptors in drug discovery. *Exp Cell Res* 333 : 171–177, 2014.
- Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee

- A, Windle JJ, Chen CK, Fang X. Role of LPA4/p2y9/GPR23 in negative regulation of cell motility. *Mol Biol Cell* 19 : 5435–5445, 2008.
- Pasternack SM, von Kugelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nothen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nature genetics* 40 : 329–334, 2008.
- Roberts C, Winter P, Shilliam CS, Hughes ZA, Langmead C, Maycox PR, Dawson LA. Neurochemical Changes in LPA1 Receptor Deficient Mice – A Putative Model of Schizophrenia. *Neurochem Res* 30 : 371–377, 2005.
- Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, Shapiro L, Petukhova L, Gordon D, Christiano AM. Disruption of P2RY5, an orphan G protein-coupled receptor, underlies autosomal recessive woolly hair. *Nature genetics* 40 : 335–339, 2008.
- Sumida H, Noguchi K, Kihara Y, Abe M, Yanagida K, Hamano F, Sato S, Tamaki K, Morishita Y, Kano MR, Iwata C, Miyazono K, Sakimura K, Shimizu T, Ishii S. LPA4 regulates blood and lymphatic vessel formation during mouse embryogenesis. *Blood* 116 : 5060–5070, 2010.
- Tanaka M, Okudaira S, Kishi Y, Ohkawa R, Iseki S, Ota M, Noji S, Yatomi Y, Aoki J, Arai H. Autotaxin Stabilizes Blood Vessels and Is Required for Embryonic Vasculature by Producing Lysophosphatidic Acid. *J Biol Chem* 281 : 25822–25830, 2006.
- Teo ST, Yung YC, Herr DR, Chun J. Lysophosphatidic acid in vascular development and disease. *IUBMB Life* 61 : 791–799, 2009.
- Thorlakson HH, Schreurs O, Schenck K, Blix II. Lysophosphatidic acid regulates adhesion molecules and enhances migration of human oral keratinocytes. *Eur J Oral Sci* 124 : 164–171, 2016.
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J. Autotaxin, a secreted lysophospholipase D, is essential for blood vessel formation during development. *Mol Cell Biol* 26 : 5015–5022, 2006.
- Xu Y, Xiao YJ, Baudhuin LM, Schwartz BM. The role and clinical applications of bioactive lysolipids in ovarian cancer. *J Soc Gynecol Investig* 8 : 1–13, 2001.
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. Identification and characterization of a novel lysophosphatidic acid receptor, p2y5/LPA6. *J Biol Chem* 284 : 17731–17741, 2009.
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. LPA3-mediated lysophosphatidic acid signalling in embryo implantation and spacing. *Nature* 435 : 104–108, 2005.



荒川 俊哉

北海道医療大学歯学部生化学分野 准教授  
 平成2年3月 琉球大学医学部保健学科 卒業  
 平成4年3月 徳島大学大学院栄養学研究科博士前期課程 修了  
 平成7年3月 徳島大学大学院栄養学研究科博士後期課程 修了  
 平成7年4月 米国ミシガン州立大学 (Dr. William L. Smith) 博士研究員 (平成10年5月まで)  
 平成10年6月 明海大学歯学部解剖学第二講座 助手  
 平成11年4月 北海道医療大学歯学部口腔生化学講座 (現口腔生物学系生化学分野) 助手  
 平成12年7月 北海道医療大学歯学部口腔生化学講座 (現口腔生物学系生化学分野) 講師  
 平成20年3月 小樽商科大学大学院アントレプレナーシップ専攻修了  
 平成26年7月 北海道医療大学歯学部口腔生物学系生化学分野 准教授

[REVIEW]

## Effects of Melatonin on Periodontitis and Alveolar Bone Loss : a Review

Nazmus SHALEHIN<sup>1</sup>, Md Riasat HASAN<sup>1,2</sup>, Kazuharu IRIE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

<sup>2</sup> Division of Clinical Cariology and Endodontology, Department of Oral Rehabilitation, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

**Key words** : Effects of Melatonin

### Abstract

Alveolar bone loss is a very common phenomenon in periodontal disease. Previous studies have suggested that melatonin decreases aggressive inflammation and alveolar bone loss in periodontitis. This article will re-

view the advanced effects of melatonin that might be clinically beneficial for the treatment of diabetic or non-diabetic periodontitis.

### Introduction :

Periodontitis is a term that describes a group of inflammatory diseases affecting the periodontium. In cases of periodontitis, alveolar bone loss is very common and recent papers have suggested that melatonin (chemical name : N-acetyl-5-methoxy tryptamine) decreases aggressive inflammation and alveolar bone loss in periodontitis. Melatonin is a pineal gland indoleamine hormone with anti-inflammatory and immunomodulatory effects (Kara et al., 2013 ; Arabaci et al., 2015). Melatonin possesses antimicrobial properties against a variety of bacteria and viruses (Tekbas et al., 2008 ; Boga et al., 2012) and its lipophilic nature allows the easy and rapid contact with cells and cellular components (Menendez-Pelaez et al., 1993). Melatonin is present in some foods including cherries, bananas, grapes, rice, cereal, herbs, plums, olive oil, wine, beer, orange, and pineapple (Hattori et al., 1995 ; Catherine, 2011). It is medically used in sleep disorders, jet lag, headaches, cancer, gallstones, protection from radiation, tinnitus, and psychiatric disorders (Srinivasan et al., 2009). It causes very few side effects, including dizziness and drowsiness (Buscemi et al., 2005).

### Antioxidant effects :

Melatonin is a wide-spectrum antioxidant and a powerful scavenger of free-radical oxygen and nitrogen species (Arnao and Hernandez-Ruiz , 2006 ; Tan et al., 1993). Mela-

tonin is an antioxidant that easily crosses cell membranes and the blood-brain barrier (Poeggeler et al., 1994). Melatonin was reported to be twice as active as vitamin E, which was thought to be the most effective lipophilic antioxidant (Lowes et al., 2013). An important characteristic of melatonin that distinguishes it from other classic radical scavengers is that its metabolites are also scavengers ; this is termed “the cascade reaction” (Tan et al., 2007). Another study indicated that melatonin also protects against mitochondrial oxidative stress (Carrillo-Vico et al., 2005). In addition to its scavenger effects, melatonin indirectly stimulates various antioxidant enzymes (Kara et al., 2013 ; Arabaci et al., 2015 ; ). Furthermore, melatonin is superior to other antioxidants because it does not become pro-oxidative when it loses an electron during interactions with free radicals (Czesnikiewicz-Guzik et al., 2007).

### Antidiabetic effects :

Many studies have also highlighted the potent antidiabetic properties of melatonin (Golbidi et al., 2011 ; Zephy and Ahmad, 2015 ; Muhlbauer et al., 2007 ; Picinato et al., 2002 ). Melatonin administration significantly reduced plasma glucose levels in rats with diabetes mellitus (DM), providing evidence that melatonin is a potent antidiabetic (Limson et al., 1998 ; Dubocovich et al., 2010). It directly affects insulin release by interacting with MT1 and MT2 receptors located on the surface of pancreatic beta cells (Muhlbauer et al., 2007). Melatonin inhibits adenylate cyclase-cy-

clic adenosine monophosphate (MT1 and MT2) and guanylate cyclase–cyclic guanosine monophosphate systems (MT2) via a Gi–protein signaling cascade to reduce the release of insulin (Limson et al., 1998 ; ). In addition, melatonin synthesis was decreased when insulin release was increased (Kemp et al., 2002) and insulin release was decreased after melatonin administration (Picinato et al., 2002). This close relationship between insulin and melatonin levels indicates that melatonin supplementation might be beneficial for controlling insulin levels and preventing diabetic complications (Kose et al., 2016).

### Immunomodulatory effects :

Melatonin interacts with the immune system (Arusanian and Beier, 2002). However, the details of these interactions are unclear. The anti–inflammatory effects of melatonin seem to be the most relevant and most documented in the literature to date. However, there have been few trials designed to judge the effectiveness of melatonin in disease treatment. Most existing data are based on small, incomplete clinical trials. Another study suggested melatonin might be useful against infectious diseases (Limson et al., 1998) including viral disease such as HIV, bacterial infections, and cancer.

### Effects on Periodontitis and Alveolar Bone Loss

A recent study evaluated the potential effects of melatonin administration on myeloperoxidase (MPO) activity and alveolar bone destruction. MPO activities, osteoclasts, the RANKL/osteoprotegerin (OPG) ratio and neutrophil densities were increased in periodontitis, which might be responsible for alveolar bone loss (Kose et al., 2016). Melatonin administration significantly reduced gingival tissue MPO levels and stimulated the proliferation of osteoblasts to promote bone formation (Roth et al.,1999). Gingival tissue neutrophil density, RANKL–positive osteoclast density, and the cemento–enamel junction/alveolar bone rest distance were significantly higher in cases of periodontitis with and without DM, but were significantly reduced following melatonin administration. Although melatonin is a popular antioxidant and antidiabetic agent, a limited number of studies have investigated the influence of melatonin on periodontitis (Kose et al., 2016). Recent studies showed that melatonin decreased inflammation and alveolar bone loss in rats with periodontitis through its immunomodulatory and antioxidant

effects (Kara et al., 2013 ; Arabaci et al., 2015). Following the treatment of mice with melatonin, the mineral apposition rate and osteoid volume were increased, indicating that melatonin predominantly increases bone mass, and suppresses osteoclast number and bone resorption ; however, it did not increase the histomorphometric bone formation parameters (Koyama et al., 2002).

### Topical use of Melatonin :

Cudanto et al. evaluated the effects of topical melatonin (1% orabase cream formula) administered to the surface of attached gingiva for 20 days in cases of periodontitis with DM or healthy individuals (Cutando et al., 2014). The topical melatonin administration significantly decreased clinical periodontal parameters (gingival index and probing depth), alkaline and acid phosphatase enzyme levels, and RANKL levels while increasing OPG levels (Cutando et al., 2013).

### Systemic administration of Melatonin :

Kose et al. evaluated the effects of systemic melatonin treatment on hyperglycemia–induced oxidative stress and alveolar bone loss (Kose et al., 2016). The study showed that melatonin administration decreased neutrophil density and MPO activity in cases of periodontitis with and without DM. These effects might be associated with the ability of melatonin to decrease neutrophil counts and phagocytic activity in the periodontal field during the inflammatory activity of periodontitis, which might prevent alveolar bone loss (Kose et al., 2016). Furthermore, melatonin regulates the number and activities of osteoblasts and osteoclasts ( Kose et al., 2016). A significant reduction in alveolar bone loss after melatonin administration might be related to its regulation of oxidative and inflammatory balances via its antioxidant, immunomodulatory, and antidiabetic effects ( Kose et al., 2016).

### Summary :

Melatonin might be clinically beneficial for the treatment of diabetic or non–diabetic periodontitis. However, additional studies are required to explain the effectiveness of melatonin for the treatment of periodontitis and bone loss.

### References

Arabaci T, Kermen E, Ozkanlar S, et al. Therapeutic effects of melatonin on alveolar bone resorption after ex-

- perimental periodontitis in rats : A biochemical and immunohistochemical study. *J Periodontol* 86 : 874–881, 2015.
- Arnao MB, Hernandez–Ruiz J. The physiological function of melatonin in plants. *Plant Signal Behav.* 1 (3) : 89–95, 2016.
- Arushanian EB, Beier EV Immunotropic properties of pineal melatonin. *Eksp Klin Farmakol (in Russian)* 65 (5) : 73–80, 2002.
- Boga JA, Coto–Montes A, Rosales–Corral SA, Tan DX, et al. Beneficial actions of melatonin in the management of viral infections : a new use for this “molecular handyman”? *Rev Med Virol* 22 : 323–38, 2012.
- Buscemi N, Vandermeer B, Hooton N, Pandya R, et al. The efficacy and safety of exogenous melatonin for primary sleep disorders. A meta–analysis. *J Gen Intern Med* 20 (12) : 1151–58, 2005.
- Carrillo–Vico A, Guerrero JM, Lardone PJ, Reiter RJ “A review of the multiple actions of melatonin on the immune system”. *Endocrine* 27 (2) : 189–200, 2005.
- Catherine Saint Louis. “Dessert, Laid–Back and Legal”. *New York Times* 2011.
- Cutando A, Lo´pez–Valverde A, de Diego RG, et al. Effect of topical application of melatonin to the gingiva on salivary osteoprotegerin, RANKL and melatonin levels in patients with diabetes and periodontal disease. *Odontology* 102 : 290–296, 2014.
- Cutando A, Lo´pez–Valverde A, Go´mez–de–Diego R, Arias–Santiago S, de Vicente–Jime´nez J. Effect of gingival application of melatonin on alkaline and acid phosphatase, osteopontin and osteocalcin in patients with diabetes and periodontal disease. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 18 : 657–663, 2013.
- Czesnikiewicz–Guzik M, Konturek SJ, Loster B, Wisniewska G, et al. Melatonin and its role in oxidative stress related diseases of oral cavity. *J Physiol Pharmacol* 58(3) : 5–19, 2007.
- Dubocovich ML, Delagrangre P, Krause DN, Sugden D, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein–coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev* 62 : 343–380, 2010.
- Golbidi S, Ebadi SA, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Curr Diabetes Rev* 7 : 106–125, 2011.
- Hattori A, Migitaka H, Iigo M, Itoh M, et al. Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 35 (3) : 627–34, 1995.
- Kara A, Akman S, Ozkanlar S, et al. Immune modulatory– and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic Biol Med* 55 : 21–26, 2013.
- Kose O, Arabaci T, Kara A, Yemenoglu H, et al. Effects of Melatonin on Oxidative Stress Index and Alveolar Bone Loss in Diabetic Rats With Periodontitis. *J Periodontol* 87 (5) : 82–88, 2016.
- Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, et al. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down–regulation of the RANKL–mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res* 17(7) : 1219–29, 2002.
- Limson J, Nyokong T, Daya S. The interaction of melatonin and its precursors with aluminium, cadmium, copper, iron, lead, and zinc : an adsorptive voltammetric study. *Journal of Pineal Research* 24 (1) : 15–21, 1998.
- Lowes DA, Webster NR, Murphy MP, Galley HF. Antioxidants that protect mitochondria reduce interleukin–6 and oxidative stress, improve mitochondrial function, and reduce biochemical markers of organ dysfunction in a rat model of acute sepsis. *Br J Anaesth* 110 (3) : 472–80, 2013.
- Menendez–Pelaez A, Poeggeler B, Reiter RJ, Barlow–Walden L, et al. Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues : Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence *J Cell Biochem* 53 : 373–382, 1993.
- Muhlbauer E, Peschke E. Evidence for the expression of both the MT1– and in addition, the MT2–melatonin receptor, in the rat pancreas, islet and beta–cell. *J Pineal Res* 42 : 105–106, 2007.
- Picinato MC, Haber EP, Cipolla–Neto J, Curi R, et al. Melatonin inhibits insulin secretion and decreases PKA levels without interfering with glucose metabolism in rat pancreatic islets. *J Pineal Res* 33 : 156–160, 2002.
- Poeggeler B, Saarela S, Reiter RJ, Tan DX, et al. Melatonin – a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor : new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed in vitro. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 738 : 419–20, 1994.
- Roth JA, Kim B–G, Lin W–L, Cho M–I. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J*

Biol Chem 274 : 22041–7, 1999.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Traht I, Spence DW, et al. "Melatonin and melatonergic drugs on sleep : possible mechanisms of action". Int. J. Neurosci 119 (6) : 821–46, 2009.

Tan DX, Chen LD, Poeggeler B, Manchester LC, et al. Melatonin : a potent, endogenous hydroxyl radical scavenger. Endocrine J 1 : 57–60, 1993.

Tekbas OF, Ogur R, Korkmaz A, Kilic A, et al. Melatonin as an antibiotic : new insights into the actions of this ubiquitous molecule. J Pineal Res 44 : 222–6, 2008.

Zephy D, Ahmad J. Type 2 diabetes mellitus : Role of melatonin and oxidative stress. Diabetes Metab Syndr 9 : 127–131, 2015.



Nazmus SHALEHIN

**Education**

2013 *Bachelor of Dental Surgery* (BDS) from City Dental College, under Dhaka University

**Professional Experiences**

2015 to 2016 Medical Officer (OPD), City Dental College, Dhaka, Bangladesh.

2016–Present Division of Histology, Department of Oral Growth and Development, Health Sciences University of Hokkaido, Japan

## 〔症例報告〕

## Temporary anchorage deviceを用いて治療した開咬症例

岡山 三紀, 岡 由紀恵, 溝口 到

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

## A case with open bite treated by temporary anchorage device (TAD)

Miki OKAYAMA, Yukie OKA, Itaru MIZOGUCHI

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

Key words : temporary anchorage device, severe anterior open bite, molar intrusion

## Abstract

At the initial examination a female 20 years 4 months old patient was diagnosed with a skeletal Class I jaw relationship, angle Class II molar relationship, bi-maxillary protrusion, and severe anterior open bite. She was treated with maxillary molar intrusion by a tempo-

rary anchorage device (TAD) after extraction of 4 pre-molars. Active treatment was completed in 1 year 11 months. The result was the achievement of a satisfactory improvement of the overjet, overbite, and optimal occlusion.

## 緒 言

1990年代以降, temporary anchorage device (TAD) が矯正治療に使用され始め, 2012年にTADの薬事承認後, 固定源に用いた矯正治療が急速に普及した(本吉ら, 2014). TADを固定源に用いることにより不動固定源が確実かつ簡単に確保することが可能となった. これにより患者に依存する治療方法や困難とされていた大白歯の圧下や遠心移動が可能となり, 治療の質と幅を大きく広げた(Creekmore et al., 1983).

開咬症例では, 臼歯部の挺出による下顎骨の後下方回転が多く見られ, 従来の治療方法では, 外科的治療併用による下顎骨の前上方回転や, ハイプルヘッドギアを用いた上顎大白歯の圧下により開咬を改善していた. 後者においては, 顎外可撤式装置で一定の装置使用時間が必要のため患者への依存が大きく, 十分な治療効果を得られることは困難であった(Schudy., 1965; Proffit., 1993). また, 前歯部顎間ゴムによる代償的な前歯部挺出により改善することが多い(Bell et al., 1980).

2012年以降TADを応用した開咬治療が多く報告されている(Umemori et al., 1999; Sugawara et al., 2002;

Sherwood et al., 2002; Erverdi et al., 2004; Kuroda et al., 2004; Park et al., 2004; Paek et al., 2004; Sherwood et al., 2005; Paek et al., 2005; Xun et al., 2007; Erverdi et al., 2007; 谷本ら., 2013). これはTADにより大白歯を圧下することにより, 下顎骨のオートローテーションが生じる. 従来の外科的治療が必要な開咬症例において, TADを用いることにより, 外科的処置を伴わない矯正治療のみで開咬治療が可能となった(谷本ら., 2013).

今回, 我々は重度開咬を伴う叢生症例に対し, 外科的治療を併用しないでTADを用いて上下顎左右第一小臼歯を抜去して治療を行い, 良好な咬合関係を得たので報告する.

## 症 例

初診時年齢: 20歳4か月

性別: 女性

主訴: 叢生と前歯で噛めない

既往歴: 幼稚園児の頃にアデノイドを切除, アレルギー性鼻炎

機能所見: 舌突出癖が認められた.

顔貌所見(図1): 正貌はoval typeを呈し, 正面形態は



図1 初診時顔貌写真および口腔内写真

左右対称であった。側貌はstraight typeを呈し、口唇閉鎖時軽度のオトガイの緊張を認めた。スマイル時の上顎切歯の露出度は平均的であった。

口腔内所見（図1）：上下顎第一臼歯咬合関係は両側Angle II，軟組織正中線に対して上顎前歯の正中線は一致，下顎前歯の正中線は1.0mm右側偏位していた。Over jetは3.0mm，overbiteは-3.0mmで前歯部が開咬で

あった。模型分析の結果，上顎に-9.3mm，下顎に-3.5mmのアーチレンジスクレパンシー（A.L.D.）を認めた。

口腔内X線所見（図2）：上下顎左右第三大臼歯を認め，下顎左右第三大臼歯は水平埋伏していた，その他歯数，歯根形態，顎骨疾患等の異常は認められなかった。側面頭部X線規格写真所見（表1）：骨格系ではSNA角



図2 初診時パノラマX線写真

表1 側面頭部X線規格写真の分析値

計測項目 (° /mm)	治療開始時	動的治療終了時	成人女性 標準値
	20歳4か月	22歳5か月	
SNA	80.3	80.3	82.3
SNB	76.9	77.3	78.9
ANB	3.4	3.0	3.4
Facial angle	82.7	84.0	84.8
Y-axis	69.5	68.0	65.4
FMA	30.4	28.1	28.8
SN-MP	36.5	34.7	35.0
Gonial angle	118.7	118.7	131.0
U1 to SN	114.1	103.9	107.1
IMPA (L1 to MP)	106.0	96.8	96.3
FMIA	43.6	55.1	54.9
Interincisal angle	103.4	124.6	124.1
U1 to A-Pog (mm)	12.0	9.0	4.9
L1 to A-Pog (mm)	9.0	6.0	4.7
E-line : Upper (mm)	-2.5	-4.0	0.0
E-line : Lower (mm)	3.0	-1.0	-1.0
Overjet (mm)	3.0	3.0	3.66
Overbite (mm)	-3.0	2.0	2.25

は80.3°, SNB角は76.9°, Facial angle 82.7°とA点, B点ともに標準的であった。ANB角は3.4°と標準的な値を示した。FMA30.4°, Y-axis angle 69.5°とnormal angleであった。結果より, 前後的にはskeletal Class I, 垂直的にはnormal angleであった。

### 診断および治療方針

機能系は舌突出癖が認められ, 骨格系は前後的にはskeletal Class Iであった。上下顎第一大臼歯の近遠心的関係はAngle II級であり, 上下顎中切歯は唇側傾斜, 上下顎前歯部に叢生および前歯部のopen biteを認めた。以上の所見より, 「舌突出癖を伴い上下顎叢生および上下顎前歯唇側傾斜を有する臼歯関係Angle II級開咬症例」と診断した。

分析の結果より, 上下顎中切歯は唇側傾斜しており, さらに負のA.L.D.があったため上下顎左右第一小臼歯を抜去し, マルチブラケット装置を用いたoptimal occlusionの確立を目標とした。また, 開咬の程度が大きいため, 上顎臼歯部を圧下し下顎骨をオートローテーションさせ前歯部の挺出量を少なくするように治療を行うこと

とした。大臼歯関係がAngle II級のため, TADを利用して上顎臼歯部の加強固定を行う計画とした。舌突出癖にはMFTを行うこととした。

治療方針は上下顎左右第一小臼歯を抜去したセットアップ模型を作製し, 上顎前歯: 3.0mm口蓋側移動, 下顎前歯: 4.5mm舌側移動, 下顎臼歯: 1.5mm近心移動, 上顎臼歯: 1.0mm近心移動, 2.0mm圧下と設定した。上顎臼歯部を2.0mm圧下より下顎骨のオートローテーションをすることにより, Meが1.5mm前上方移動し, 下顎前歯および大臼歯が1.5mm前方にシフトすることを考慮し臼歯の近心移動量を設定した。

### 治療経過および結果

上顎骨左右第一大臼歯口蓋側根尖部付近にTAD (長さ: 6.0mm, 径1.6mm, デュアルトップ・オートスクリュー, プロシード, 東京) を植立後, 上顎第一大臼歯にトランスパラタルアーチ (T.P.A.) を装着した。上下顎左右第一小臼歯を抜去後, 上下顎にマルチブラケット装置を装着 (.022" slot preadjusted bracket) しT.P.A.とTADをelastic chainを用いて連結し臼歯部に圧下力を加え, 動的治療を開始した (図3A)。

上下顎leveling後, sliding mechanicsにより上下顎抜歯空隙閉鎖時には, TADを上顎臼歯部の加強固定として用いた。上下顎にideal archを装着し細部調整と, 側方歯の咬合緊密にするために垂直ゴムを併用した。動的治療期間1年11か月後に保定装置に移行した。動的治療終了時の顔面写真, 口腔内写真 (図4) およびパノラマX線写真を示す (図5)。主訴であった開咬と叢生は改善された。側貌はU1-SNが10.2°, IMPAが9.2°減少したことによりE-lineに対し上唇-1.5mm, 下唇-4.0mm後退した。左右臼歯関係はAngle I級, overjet + 3.0mm, overbite + 2.0mm正常な被蓋関係となった。側方頭部X線規格写真の重ね合わせでは (図6), 上顎中切歯は3.0mm口蓋側移動, 上顎両側第一大臼歯は1.0mm近心移動, 1.5mm圧下し, 下顎中切歯は4.0mm舌側移動, 下顎両側第一大臼歯は2.0mm近心移動した。この結果, 下顎骨のオートローテーションが生じ (Me: 1.5mm上方, 1.0mm前方), 下顎中切歯および下顎大臼歯部が1.0mm前方へシフトした。

上顎中切歯歯軸はU1 to SNが114.1°から103.9°と, 下顎中切歯歯軸はFMIAが43.6°から55.1°, IMPAが106.0°から96.8°と唇側傾斜から標準的な値となった。初診時に設定した治療目標の結果を得ることができた。(表1)

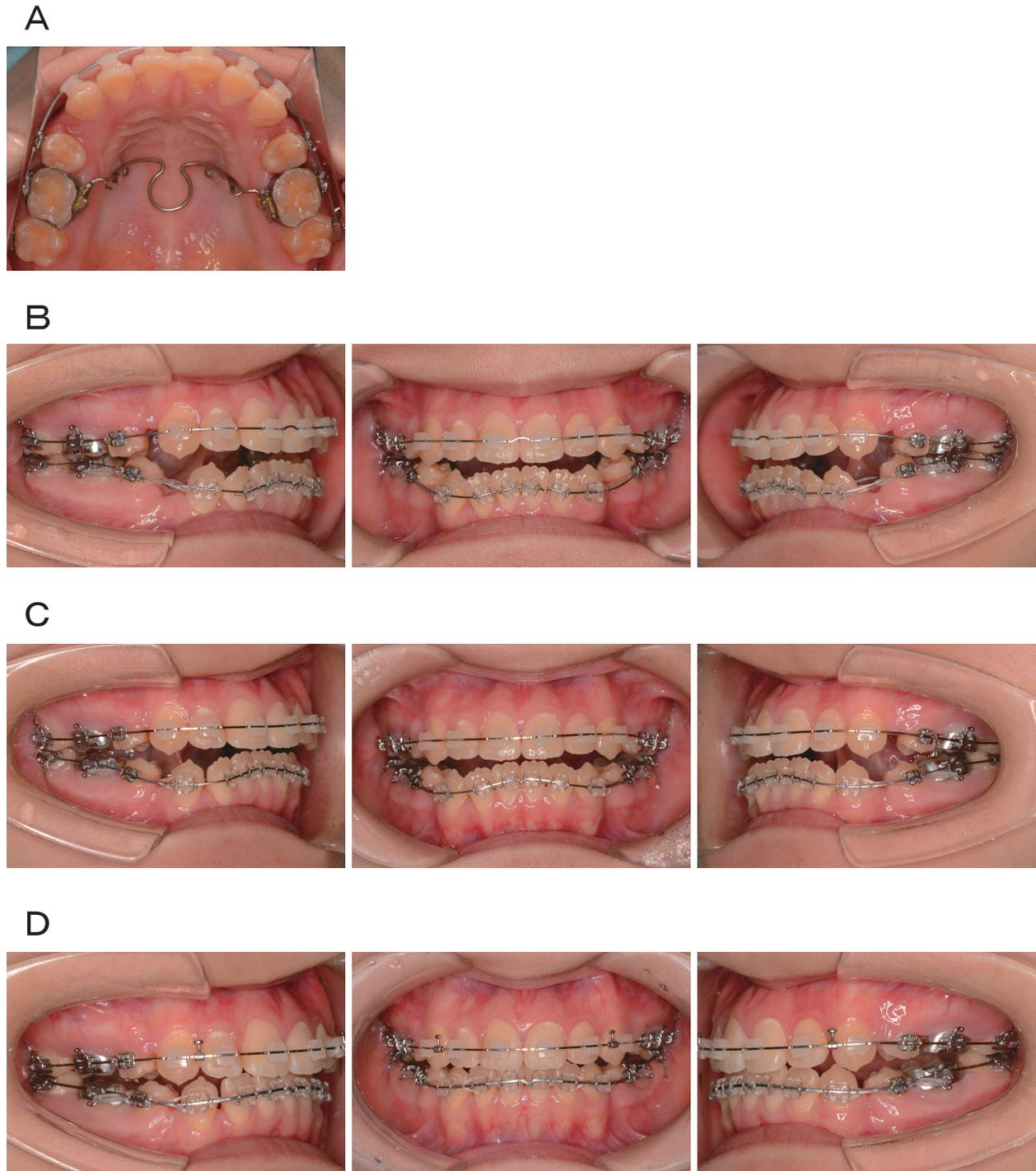


図3 A 口蓋側にTADを植立，トランスパラルアーチ装着  
 B 動的治療期間5か月後  
 C 動的治療期間10か月後  
 D 動的治療期間14か月後

### 考 察

開咬症例は，FMAや下顎角の開大による下顎骨の後方回転した骨格性原因，上下顎前歯部低位や臼歯の挺出による歯槽性原因がある．また顎関節変形による下顎頭の吸収，変形による下顎骨後方回転によって位置

的变化により開咬が生じることがある (Schellhas et al., 1989).

本症例は，TADを上顎骨左右第一大臼歯口蓋側根尖部付近に植立することにより，上顎第一大臼歯を1.5 mm圧下と1.0mm近心移動量であった．過去の報告では，TADを用いた上顎第一大臼歯の平均圧下量は2.64



図4 動的治療終了時顔貌写真および口腔内写真

mm, 下顎大白歯の平均圧下量は1.94 mmであった (Umemori et al., 1999; Sugawara et al., 2002; Paek et al., 2004; Xun et al., 2007; Erverdi et al., 2007; Kaku et al., 2007; Yanagita et al., 2007; Kuroda et al., 2007; Sakai et al., 2008; 谷本ら., 2013). 本症例は, 上顎第一大白歯の圧下と近心移動防止の加強固定として必要があり, 動的治療開始時直後にTADを植立したため, 十分な大白

歯のコントロールをすることができたため, 初診時治療目標. また, TADを用いた矯正治療により歯槽性的変化だけでなく骨格性的変化があることが報告され, 垂直的变化として $\angle$ FMAは平均 $2.0^\circ$ 減少, 水平的変化として,  $\angle$ ANBは平均 $1.6^\circ$ 減少している (Sherwood et al., 2002; Erverdi et al., 2004; Kuroda et al., 2004; Park et al., 2004; Paek et al., 2004; Xun et al., 2007; Erverdi et al.,



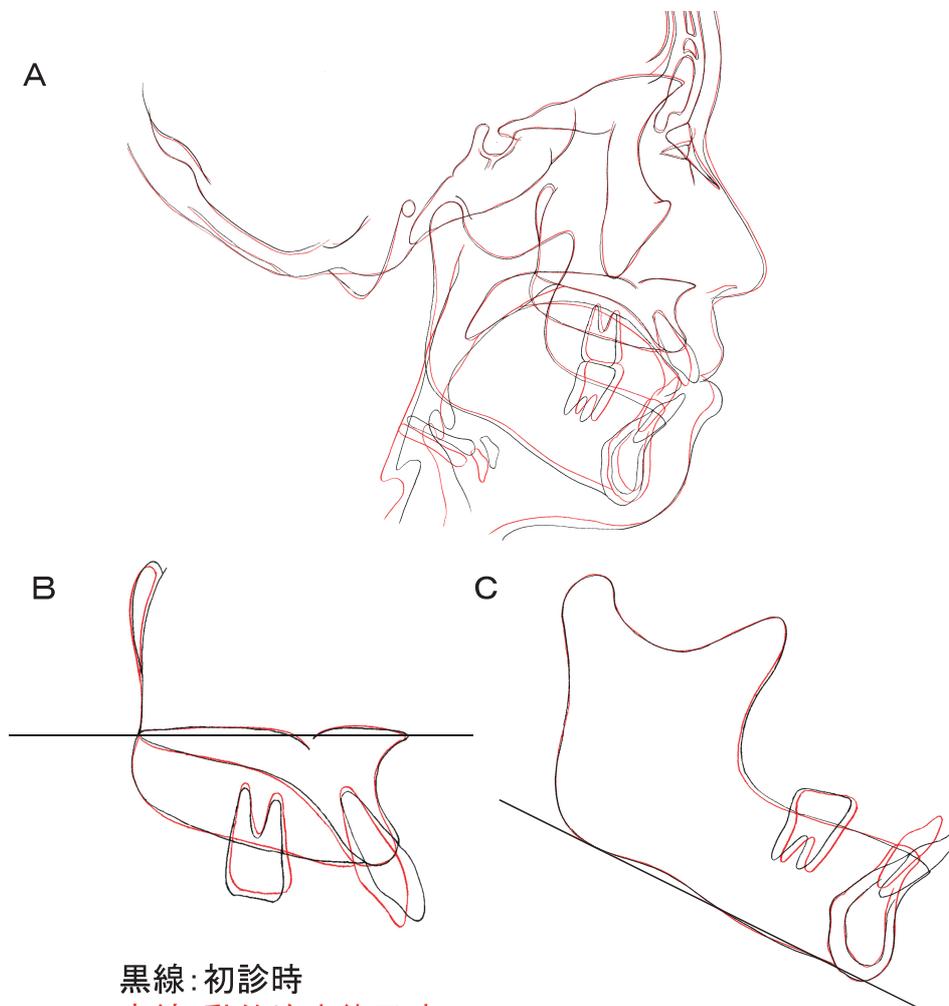
図5 動的治療終了時パノラマX線写真

2007 ; Kuroda et al., 2007 ; Kaku et al., 2007 ; Yanagita et al., 2007 ; Sakai et al., 2008 谷本ら., 2013). 本症例の初診時と比較してより,  $\angle ANB$ は $0.4^\circ$ の減少,  $\angle FMA$ は $2.3^\circ$ 減少したことで,  $\angle ANB$   $3.0^\circ$ ,  $\angle FMA$   $28.1^\circ$ と標準値内への変化が認められ, 歯槽性の変化だけでなく下顎骨のオートローテーションを伴う骨格性の変化により

良好な側貌が得られた (表1).

大臼歯の圧下量にともなう下顎骨のオートローテーションは, 下顎骨の垂直および前後的位置変化の正確な予測は必要であるが非常に困難である, そのため抜歯をともなう開咬症例では, 大臼歯圧下による顎位の変化を確認後, 抜歯部位や抜歯時期を再検討し抜歯治療へ移行する二段階治療や, 下顎骨のオートローテーションによる骨格的不調が改善しない場合, 外科的手術の適応も考慮する必要がある (Umemori et al., 1999 ; 谷本ら., 2013).

2012年にTADの薬事承認後, TADを用いた開咬治療の方法や報告が多くされているが, 長期保定や後戻りについての報告は少ない. 本症例では, 大臼歯の挺出および後戻りを考慮して, 上下顎固定式保定装置とマウスピース型リテーナーを併用し使用した. 今後, TADによる矯正治療後の保定方法や長期的咬合安定性について詳



黒線: 初診時

赤線: 動的治療終了時

図6 側面頭部X線規格写真トレース図の重ね合わせ

A : S, S-N平面重ね合わせ

B : ANS, 口蓋平面重ね合わせ

C : Me, 下顎下縁平面重ね合わせ

細な検討が必要であると考えられる。

## 結 語

上下顎叢生および上下顎前歯唇側傾斜を有する臼歯関係Angle II級開咬症例に対し、上顎骨左右第一大臼歯口蓋側根尖部付近にTADを植立し、大臼歯の圧下と加齢固定を目的として治療を行った。

TADにより大臼歯の圧下を伴う下顎骨のオートローテーションによる前方移動がみられた。また、上顎臼歯の近心移動量抑制により目標の前歯部後退をすることができた。

TADを用いることにより、前歯部の挺出防止を含めた綿密な治療計画立案とメカニクスに配慮して治療を行うことで良好な結果を得ることが出来た。

## 文 献

- Bell, W.H., Proffit, W. R. : Openbite. ; Bell, W. H., Proffit, W.R. White, R. P. Eds. Surgical Correction of Dentofacial Deformities, Philadelphia, PA, 1980, Saunders, 1058–1209.
- Creekmore, T.D., Eklund M.K. : The possibility of skeletal anchorage, J Clin Orthod 17 : 266–269, 1983.
- Erverdi, N., Keles, A., Nanda, R. : The use of skeletal Anchorage in open bite treatment : acephalometric evaluation, Angle Orthod 74 : 381–390, 2004.
- Erverdi, N., Usumez, S., Solak, A., Koldas, T. : Noncompliance open-bite treatment with zygomatic anchorage. Angle Orthod 77 : 986–990, 2007.
- Kuroda, S., Katayama, A., Takano-Yamamoto, T. : Severe anterior open-bite case treated using titanium screw anchorage, Angle Orthod 74 : 558–567, 2004.
- Kuroda, S., Sakai, Y., Tamamura, N, Deguchi, T., Takano-Yamamoto, T. : Treatment of severe anterior open bite with skeletal anchorage in adults : comparison with orthognathic surgery outcomes, Am J Orthod Dentofacial Orthop 132 : 599–605, 2007.
- Park, H. S., Kwon, T. G., Kwon, O. W. : Treatment of open bite with microscrew implant anchorage, Am J Orthod Dentofacial Orthop 126 : 627–636, 2004.
- Park, H. S., Jang, B. K., Kyung, H. M. : Maxillary molar intrusion with micro-implant anchorage (MIA). Aust Ortho J 21 : 129–135, 2005.
- Proffit, W. R., Fields, H. : Contemporary Orthodontics. 2<sup>nd</sup>., St.Louis, MO, 1993, Mosby, 128446.
- Sakai, Y., Kuroda, S., Murshid, S. A., Takano-Yamamoto, T. : Skeletal Class III severe openbite treatment using implant anchorage, Angle Orthod 78 : 157–166, 2008
- Schellhas, K. P. : Internal derangement of the temporomandibular joint : radiologic staging with clinical, surgical and pathologic correlation, Magn Reson Imaging 7 : 495–515, 1989.
- Schudy, F. F. : The rotation of the mandible resulting from growth : its implications in orthodontic treatment, Angle Orthod 35 : 36–50, 1965.
- Sherwood, K. H., Burch, J. G., Thompson, W. J. : Closing anterior open bites by intruding molars with titanium miniplate anchorage, Am J Orthod Dentofacial Orthop 122 : 593–600, 2002.
- Sherwood, K. H., Burch, J. G. : Skeletally based miniplate supported orthodontic anchorage, J Oral Maxillofac Surg 63 : 279–284, 2005.
- Sugawara, J., Baik, U.B., Umemori, M., Takahashi, I., Nagasaka, H., Kawamura, H., Mitani, H. : Treatment and posttreatment dentoalveolar changes following intrusion of mandibular molars with application of a skeletal anchorage system (SAS) for open bite correction, Int J Adult Orthodon Orthognath Surg 17 : 243–253, 2002.
- 谷本幸太郎, 吉岡基子, 鷺見圭輔, 栗田哲也, 廣瀬尚人, 丹根由起, 丹根一夫 : 矯正用アンカースクリューを用いた成人開咬の一治療例. 中・四国矯正歯科学会雑誌 25 : 29–36, 2013.
- Umemori, M., Sugawara, J., Mitani, H., Nagasaka, H., Kawamura, H. : Skeletal anchorage system for open-bite correction, Am J Orthod Dentofacial Orthop 115 : 166–174, 1999.
- 本吉満 : 歯科矯正用アンカースクリューの基礎と臨床 東京, クインテッセンス出版 : 2014.
- Xun, C., Zeng, X., Wang, X. : Microscrew anchorage in skeletal anterior open-bite treatment, Angle Orthod 77 : 47–56, 2007.



岡山 三紀

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野 助教

1999年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

2003年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

2003年4月 北海道医療大学 特別研究員

2004年5月 北海道医療大学歯学部

口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野 助教

## 〔症例報告〕

## 口蓋に発生した筋上皮腫の1例

森川 哲郎<sup>1)</sup>, 瀧本 紘佑<sup>2)</sup>, Bhoj Raj Adhikari<sup>1)</sup>, Puja Neopane<sup>1)</sup>, 原田 文也<sup>1)</sup>, 宇津宮 雅史<sup>1)</sup>,  
中條 貴俊<sup>1)</sup>, 吉田 光希<sup>1)</sup>, 佐藤 惇<sup>1)</sup>, 西村 学子<sup>1)</sup>, 永易 裕樹<sup>2)</sup>, 安彦 善裕<sup>1)</sup>

- 1) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系臨床口腔病理学分野  
2) 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

## A case of Myoepithelioma of the palate

Tetsuro MORIKAWA<sup>1)</sup>, Kosuke TAKIMOTO<sup>2)</sup>, Bhoj Raj ADHIKARI<sup>1)</sup>, Puja NEOPANE<sup>1)</sup>,  
Fumiya HARADA<sup>1)</sup>, Masafumi UTSUNOMIYA<sup>1)</sup>, Takatoshi CHUJO<sup>1)</sup>, Koki YOSHIDA<sup>1)</sup>, Jun SATO<sup>1)</sup>,  
Michiko NISHIMURA<sup>1)</sup>, Hiroki NAGAYASU<sup>2)</sup> and Yoshihiro ABIKO<sup>1)</sup>

- 1) Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido  
2) Division of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

**Key words** : myoepithelioma, plate, salivary gland tumor

## Abstract

We report a case of myoepithelioma of the palate.

The frequency of occurrence of myoepithelioma is 1.5% in all salivary gland tumors. A 52-year-old woman was referred to our hospital with the chief complaint of swelling on the right palate. After various examinations, removal of the tumor was carried out under general anesthesia. Microscopically, the tumor was surrounded by fibrous membrane. The solid growth of neoplastic myoepithelial cells was seen as main compo-

nent, virtually surrounding hyaline-like eosinophilic substance. Immunohistochemical studies revealed strongly positive reactions by the tumor cells for Cytokeratin Wide, Vimentin and S-100 protein. CK7, smooth muscle actin (SMA), p63 and Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) were weakly positive.

From the results described above, the pathological diagnosis of myoepithelioma was made.

## 抄 録

口蓋に発生した筋上皮腫のケースを報告する。筋上皮腫は、発生頻度は全唾液腺腫瘍における1.5%と稀な疾患である。52歳の女性は、口蓋の右側の腫脹を主訴に当院紹介となった。検査の後、全身麻酔下で腫瘍の切除を行った。

病理組織学的に腫瘍組織は境界明瞭な線維性被膜に包まれており、その内部は紡錘形細胞と形質細胞様の腫瘍性筋上皮細胞の充実性増殖を主体としていた。免疫組織化学染色の結果から、CK Wide染色、Vimentin染色、S-100蛋白染色で強陽性、CK 7染色、SMA染色、p63染色、GFAP染色では弱陽性であった。

以上の結果から、病理診断は、筋上皮腫であった。

## 緒 言

筋上皮腫は、良性上皮性腫瘍であり、発生頻度は全唾液腺腫瘍における1.5%と稀な疾患である。好発部位としては耳下腺や口蓋で無痛性の腫瘍である (Cardesa & Alos, 2005)。組織学的には、腫瘍性筋上皮細胞の増殖を特徴とし、腫瘍細胞の形態は紡錘形、形質細胞様、硝子細胞様、上皮様、明細胞ないしはそれらの混在する多彩な組織像を呈する (森永ら, 2015; 日本唾液腺学会, 2005)。今回われわれは、52歳女性の口蓋に発生した筋上皮腫の1例を経験したので、病理組織学的検討を加え、その概要を報告する。

## 症 例

患者：52歳，女性。

初診：20XX年4月。

主訴：右側口蓋部の腫脹

既往歴：子宮内膜症

家族歴：特記事項なし。

現病歴：X-1年12月頃より右側口蓋部に粘膜色の小指頭程の腫瘤を自覚したが、疼痛はなく大きさに変化がないため放置していた。翌年、4月上旬より、同部に違和感が生じるようになり、その数日後同部に圧迫感を生じ、舌で押すと疼痛を伴うようになり、近医歯科医院を受診したところ、精査治療を目的に当科受診となった。

現症：口腔外は、特に異常所見を認めなかった。口腔内は口蓋正中よりやや右側に直径10mmの腫瘤を認めた。腫瘤は境界明瞭、色調は正常粘膜色で一部は赤色を呈し、潰瘍等は認められず、弾性やや硬であった(図1)。また、圧痛はごく軽度に認められた。上顎残存歯の打診痛、及び根尖相当付近の圧痛等も認めなかった。

画像所見：パノラマX線写真、CT検査(図2)、MRI検査のいずれでも軟組織及び骨組織に明らかな異常所見は認めなかった。

臨床診断：右側口蓋腫瘍

処置および経過：全身麻酔下にて右側正中中部付近の腫瘍



図1 初診時口腔内写真(ミラー像)  
口蓋正中よりやや右側に直径10mmの弾性やや硬で一部は赤色の粘膜色をした腫瘤を認める。

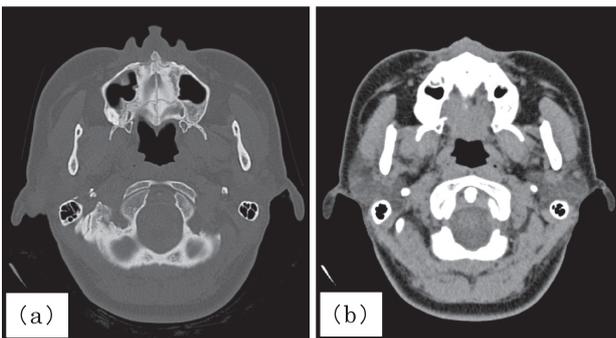


図2 CT画像：水平断(a：硬組織 b：軟組織)  
明らかな異常所見は認めなかった。

周囲に2mmのsurgical marginを設定し、骨膜下まで切開を加え腫瘍の切除を施行した後、人工皮膚を用い縫合した。

病理組織学的所見：H.E.染色では、腫瘍組織は境界明瞭な線維性の被膜に包まれており、その内部は唾液腺の筋上皮に由来する腫瘍細胞の充実性増殖を主体とし、実質周囲には好酸性の硝子様物質を散在性に認めた。腺管構造や粘液様の像はほとんど認めなかった(図3)。特殊染色及び免疫組織化学染色を行ったところPeriodic Acid Schiff (PAS)染色、Mucicarmine染色では陰性であり、腫瘍内部に粘液物質は認めなかった。Cytokeratin Wide

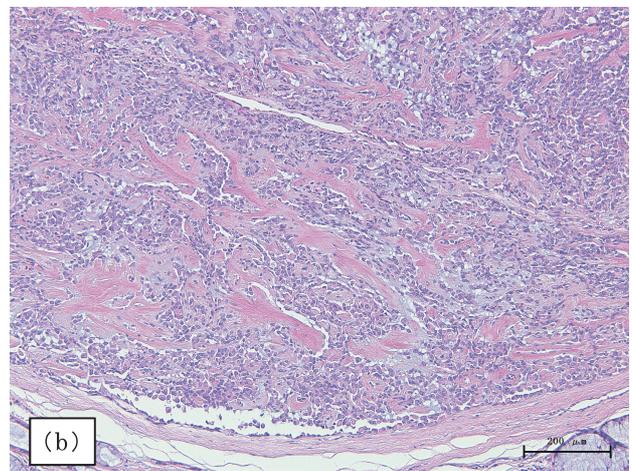
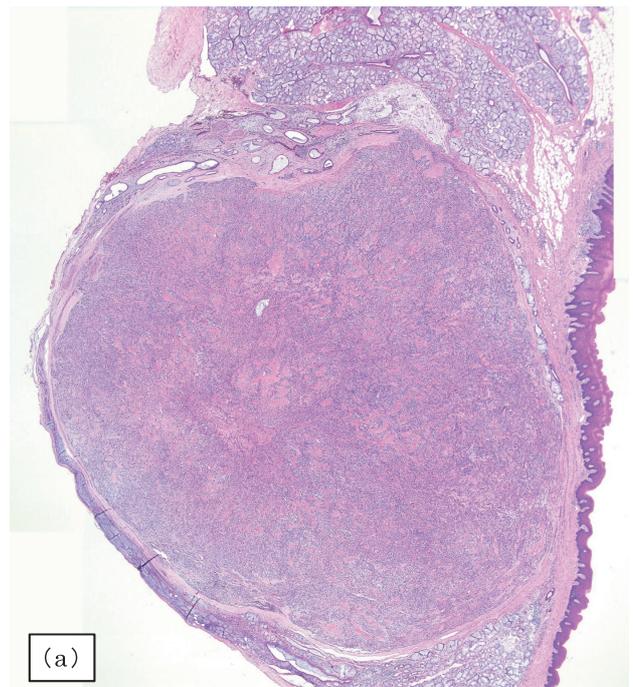


図3 摘出標本H.E.染色像：(a：20x b：100x)  
(a) 腫瘍組織は境界明瞭な薄い線維性の被膜に囲まれている。  
(b) 唾液腺の筋上皮に由来する腫瘍細胞の充実性増殖を認めた。その周囲には好酸性の硝子様物質を散在性に認め、腺管構造や粘液様の像は認めなかった。

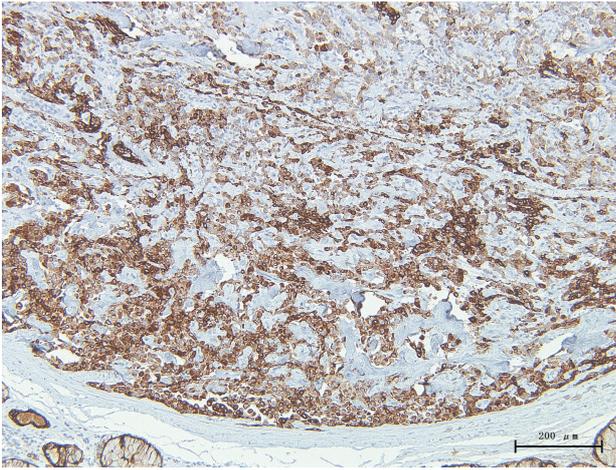


図4 摘出標本CK Wide免疫組織化学染色像  
CK Wide染色では腫瘍性筋上皮細胞が腫瘍全体の広範囲に強陽性を示している。

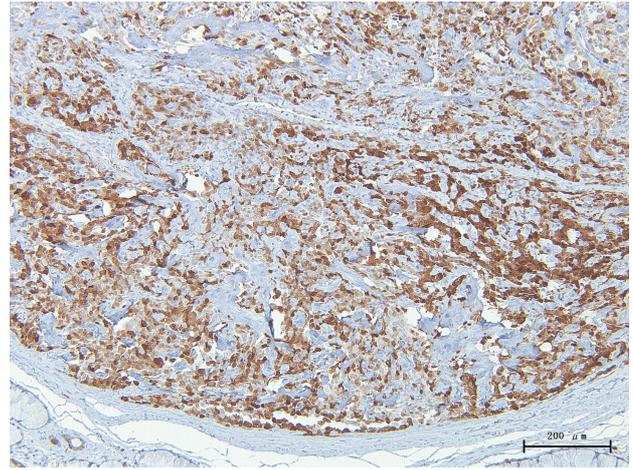


図6 摘出標本S-100免疫組織化学染色像  
S-100染色では筋上皮細胞が強陽性を示している。

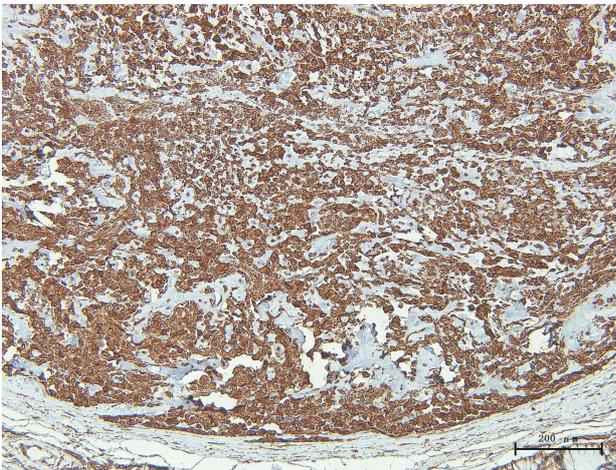


図5 摘出標本Vimentin免疫組織化学染色像  
Vimentin染色では筋上皮細胞が腫瘍の広範囲に強陽性を示している。

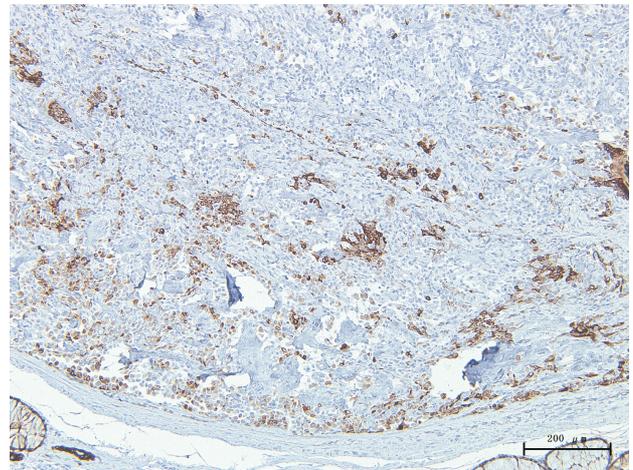


図7 摘出標本CK 7免疫組織化学染色像  
CK 7では腫瘍細胞にびまん性の陽性像を呈している。

(CK Wide) 染色 (図4) 及びVimentin染色 (図5), S-100蛋白染色 (図6) で強陽性, CK 7 染色 (図7),  $\alpha$ -smooth muscle actin (SMA) 染色, p63染色, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 染色 (図8) で弱陽性であった。

病理組織学的診断：筋上皮腫

## 考 察

筋上皮腫の発生頻度は、全唾液腺腫瘍の1.5%を占め、好発部位としては耳下腺に多く、次に口蓋に多く発生する無痛性の腫瘍である (Cardesa & Alos, 2005)。WHO分類では筋上皮腫は構成成分の大部分が腫瘍性筋上皮細胞からなると定義している (Cardesa & Alos, 2005)。一般に薄い線維性の被膜で覆われるが小唾液腺発生症例では被膜が明瞭でないこともある。組織学的に

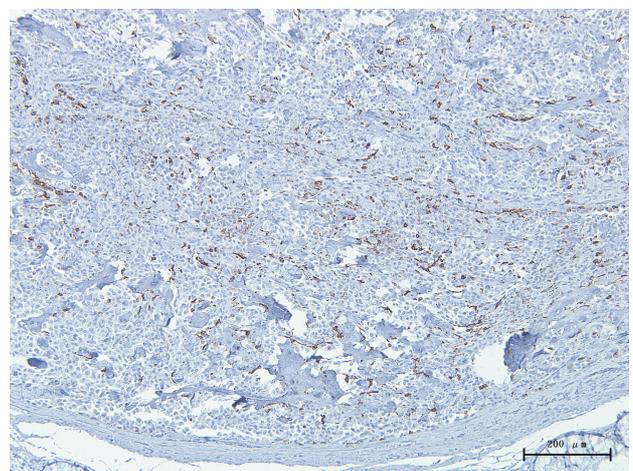


図8 摘出標本GFAP免疫組織化学染色像  
GFAP染色では間質様を呈する腫瘍性筋上皮細胞に弱陽性を示している。

腫瘍細胞の形態のタイプは紡錘形，形質細胞様，硝子細胞様，上皮様，明細胞ないしはそれらの混在する組織像を示す（森永ら，2015）。

本症例では，腫瘍組織は境界明瞭な線維性被膜に包まれており，その内部は紡錘形細胞と形質細胞様の腫瘍性筋上皮細胞の充実性増殖を主体とし，実質周囲には好酸性の硝子様物質を散在性に認めた．文献的には，耳下腺発生例では紡錘細胞型が，口蓋発生例では，形質細胞様細胞型が多いと報告されているが，本症例においては両タイプの混在型であった（Cardesa & Alos, 2005；長谷川ら，2006）．筋上皮腫では多形腺腫でみられるような軟骨・粘液腫様軟骨の間質は認められないことが多形腺腫との鑑別の手助けになる．本症例においても腫瘍内部には腺管形成や軟骨・粘液腫様軟骨の間質は認められない．mixed appearanceなどの粘液様の間質は認めず，PAS染色，Mucicarmine染色においても陰性を示し粘液成分は確認されなかった．このことから多形腺腫は否定された．また，周囲や被膜内への浸潤や細胞・核異型，核分裂像などの悪性所見も確認されなかった．免疫組織化学染色を行うことにより，正常筋上皮細胞ではCytokeratinが陽性となり，その他に非特異的筋上皮マーカーであるVimentin，S-100蛋白，GFAP，筋上皮系に特異的なマーカーであるSMA，筋上皮／基底細胞型マーカーであるp63などに陽性を呈するとされる．今回の症例で行った免疫組織化学染色の結果からは，CK Wide染色，Vimentin染色，S-100蛋白染色で強陽性，CK7染色，SMA染色，p63染色，GFAP染色では弱陽性であった．腫瘍性筋上皮細胞の形態のタイプによってはS-100蛋白，Vimentinには明瞭な染色を示すがさまざまな程度にCKの反応を示し，actinの染色性は弱くGFAPは染まらないという報告もある（二階ら，1989；岡田ら，2004）．

以上の所見から，本症例は筋上皮腫と判断された．多形腺腫との臨床態度の差異はほとんどない．筋上皮腫の再発率は低く，予後は良好であるとされているが，長期存在例や再発を繰り返す症例では稀に悪性化をきたすという報告もある（Ellis & Auclair, 2008；神出ら，1998；日本唾液腺学会，2005；Sciubba & Brannon, 1982）．病理組織学的には間質様構造（粘液腫様，軟骨様など）や腺管形成の有無が鑑別となり，しばしば境界病変が見られることがある．また，発生頻度も唾液腺腫瘍の1%以下と稀なことから，他の唾液腺腫瘍と的確に鑑別し評価することが，治療後の経過観察においても重要である．

## 結 語

今回われわれは，52歳女性の口蓋に発生した筋上皮腫の一例を経験したので文献的考察を加えて報告した．本論文に関して開示すべき利益相反はない．

## 文 献

- Cardesa A & Alos L. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours (World Health Organization Classification of Tumours). International Agency for Research on Cancer (IARC): 259-260, 2005.
- Ellis GL & Auclair PL. AFIP atlas of tumor pathology series 4: tumors of the salivary glands. Armed Forces Institute of Pathology Washington, DC: 123-133, 2008
- 長谷川陽一，服部賢二，宇野吉裕，岡崎鈴代．筋上皮腫および悪性筋上皮腫症例の免疫組織学的検討．耳鼻咽喉科臨床 99: 945-949, 2006.
- 神出敏影，古賀賢三郎，木下基司，斎藤輝海，外山正彦，高橋洋平．口蓋に発生した筋上皮腫の1例，日口外誌 44: 70-72, 1998.
- 森永正二郎，高田隆，長尾俊孝．腫瘍病理鑑別診断アトラス頭頸部腫瘍 I 唾液腺腫瘍第1版: 128-131, 2015.
- 二階宏昌，小川郁子，高田隆，伊集院直邦．唾液腺腫瘍の免疫組織化学-腫瘍性筋上皮の染色所見を中心に-．病理と臨床 7: 574-581, 1989.
- 日本唾液腺学会．唾液腺腫瘍アトラス第1版: 51-56, 2005.
- 岡田宗久，重松久夫，志田裕子，鈴木正二，草間薫，坂下英明．口蓋に発生した筋上皮腫の1例．日口外誌 50: 87-90, 2004.
- Sciubba JJ & Brannon RB. Myoepithelioma of salivary glands: report of 23 cases. Cancer 49(3): 562-572, 1982.



森川 哲郎

北海道医療大学大学院歯学研究科臨床口腔病理学専攻博士課程2学年  
平成18年3月 北海道札幌北陵高等学校 卒業  
平成20年4月 北海道医療大学歯学部 入学  
平成26年3月 北海道医療大学歯学部 卒業  
平成26年4月～平成27年3月 北海道医療大学病院 臨床研修歯科医  
平成27年4月 北海道医療大学大学院歯科研究科 入学  
現在に至る



## [最近のトピックス]

## 歯科での低出力パルス超音波治療法の応用について

建部 廣明

北海道医療大学 歯学部 口腔構造・機能発育学系 組織学分野

LIPUS治療法は物理療法の一種で、骨折部に物理刺激を与えることにより骨や軟骨修復を促進させる方法として、1983年にDuarteによって報告された<sup>1)</sup>。LIPUSによる新生骨形成促進の詳細なメカニズムは未だに明らかになっていないが、LIPUSによって物理刺激が加えられた細胞は活性化することが知られており、培養骨芽細胞へLIPUS照射を行うと、骨芽細胞および、前骨芽細胞の分化、増殖を促進させることが報告されている<sup>2)</sup>。また骨折部に30mW/cm<sup>2</sup>の強さでLIPUS照射すると骨折治癒が促進することが動物実験で示されている<sup>3)</sup>。LIPUSの振動周波数は低値であるほど、到達距離が長くなり高値であれば到達距離が短い。臨床では、皮膚から骨折部までの深さに応じて1～3 MHzの振動周波数が設定されている。LIPUSの到達距離は、照射される組織ごとに吸収係数や超音波の反射の程度が異なる。

本邦では、LIPUS治療の有効性が評価され2006年から整形外科の骨折患者に対して適用可能となった。使用方法はLIPUS照射プローブを骨折部皮膚上に置き、ゲルを介して毎日15分間照射することにより、非侵襲的且つ、簡便に骨折治癒を促進することができる。最近では歯科治療にLIPUS治療法が応用されている。口腔インプラント手術後に、インプラント体埋入部にLIPUS照射を行うとインプラント体周囲の新生骨組織形成が促進することが報告されている<sup>4)</sup>。LIPUSはインプラント手術だけではなく、骨増生術にも応用されている。骨増生術の1つである上顎洞底挙上術は、上顎洞底粘膜を挙上後、歯槽骨と挙上した上顎洞底粘膜との間にできたスペースに自家骨や人工骨を填入することにより上顎臼歯部の骨幅を確保する術式である。我々は実験動物を用いて上顎洞底挙上術後にLIPUS照射を適用し、術部の新生骨組織形成促進を認めることを報告した<sup>5)</sup>。上顎洞底挙上術後のLIPUS照射による新生骨形成促進は明らかになったが、骨増生部位は幅があるためLIPUS到達距離の違いにより新生骨形成促進効果にも差があることが考えられる。そこで、LIPUS到達距離と新生骨形成との関係を明らかにするためLIPUS照射距離を変化させ、新生骨形成促進作用

がどのように変化するかについて培養細胞を用いて比較、検討した。その結果、LIPUS照射プローブから培養細胞までの距離の違いにより新生骨形成促進作用が異なることが明らかとなった。今後は、症例に応じた適切なLIPUS照射条件やLIPUSの新生骨形成促進のメカニズムを明らかにすることが重要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Duarte L.R. Arch Orthop Trauma Surg. **101**: 153–159, 1983
- 2) Kokubu et al.. Biochem Biophys Res Commun. 256: 284–287, 1999
- 3) Wang, S.J. et al.. J orthop Res. 12: 40–47, 1994
- 4) Liu Q. et al.. Br J Oral Maxillofac Surg. 50: 244–250, 2011
- 5) Takebe H et al.. Clin Oral Implants Res. 25: 735–741, 2014

## [最近のトピックス]

## アメロジェニンの生理活性配列を同定するための研究

高橋 亜友美<sup>1)</sup>, 村田 佳織<sup>1)</sup>, 谷村 明彦<sup>2)</sup>, 齊藤 正人<sup>1)</sup>

1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野

2) 北海道医療大学歯学部口腔生物学系薬理学分野

エナメルマトリックスの1つであるアメロジェニンは、疎水性のN末端と親水性のC末端が共存しており、全体では疎水性を呈している。生体内では、全長のアメロジェニンがMMP-20やKLK4により、様々なフラグメントに分解されるが、これらフラグメントの機能は明らかにされていない。アメロジェニン全長の機能分析に加え、近年ではアメロジェニンの活性領域の同定やアメロジェニン・フラグメントの生理活性に関する研究が行われている。

do Espirito Santo<sup>1)</sup>らは、C末端側ドメインがアメロジェニンの自己凝集やナノスフィア構造に必要な領域であると報告している。また、Kunimatsu<sup>2)</sup>らはアメロジェニンの全長からN末端側を省いた領域、C末端側を省いた領域、あるいはC末端側のみ、それぞれ3領域のリコンビナントタンパク質を作製し、セメント芽細胞の分化誘導に対する作用を報告している。この報告では、C末端側を有するタンパク質がALP活性、OCN、BSPの上昇や石灰化物の沈着を起こすのに対して、C末端側をもたないタンパク質では石灰化物の沈着を起こさなかったことから、アメロジェニンC末端側がセメント芽細胞の骨様分化を促進する領域であると考察している。アメロジェニンのC末端側が生理活性に重要であるとする報告がある一方で、N末端領域の重要性を示す報告もある。R. Olivares-Navarrete<sup>3)</sup>らは、N末端領域のみをもつリコンビナントタンパク質 (NTAP) がヒト間葉系幹細胞のALP活性やオステオカルシン活性の上昇に加えて、RUNX2のmRNA発現の強い上昇を起こすことを報告している。この研究では、NTAPが全長リコンビナントアメロジェニンタンパク質よりも強い分化促進作用を示す結果が得られている。

以上の報告から、細胞の種類によって分化促進のために必要なアメロジェニンの領域が異なると予想される。今後、更なる研究で様々な細胞の分化に関わるアメロジェニンの領域が明らかになることや、またその領域を含むペプチドを用いた組織再生療法への可能性も期待される。

## 参考文献

- 1) do Espirito Santo AR et al. The enamel organic matrix : structure and function. *Braz J Oral Sci* 4 : 716-724, 2005
- 2) R. Kunimatsu et al. The C-terminus of amelogenin engages osteogenic differentiation of human cementoblasts lineage cells. *J. Periodontal Res* 10 : 1111, 2016
- 3) R. Olivares-Navarrete et al. Role of the N-terminal peptide of amelogenin on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater* 28 : 1-10, 2014

## [最近のトピックス]

## 頸部聴診における咽喉マイクの有効性

廣瀬 知二

伊東歯科口腔病院

摂食嚥下障害の正確な評価として、嚥下造影検査 (videofluoroscopic examination of swallowing : VF) または嚥下内視鏡検査 (videoendoscopic examination of swallowing : VE) が用いられる。しかし、嚥下障害が疑われるすべての症例にVEやVFを行うことは必ずしも容易ではない。そのため、摂食嚥下障害の診断目的に各種のスクリーニング検査が行われることも多い。

頸部聴診法は食塊を嚥下する際に咽頭部で生じる嚥下音ならびに嚥下前後呼吸音を頸部より聴診し、嚥下音の性状や長さおよび呼吸音の性状やタイミングを聴取して嚥下障害を判定する方法である。非侵襲的にベッドサイドでスクリーニングできることから、在宅や施設入所要介護高齢者の嚥下状態モニタリングに適している。

咽喉マイクは、騒音の中で話し声はマイクが音割れする問題を解決するため開発されたものである。空気の振動を拾わない為、周囲にノイズがあっても明瞭度が確保されるので消防隊が火災現場において、活動中に使用する通信システムにも採用されている。

摂食嚥下障害の現場で多職種複数の検査者で頸部聴診を行う場合には咽喉マイクを応用すると有効である (図1, 2) (大宿, 2014)。頸部聴診専用の製品も開発されているが、咽喉マイクと拡声器が比較的廉価で入手できるので組み合わせることも容易である。この方法を用いると聴診器の固定にともなう患者の負担は少なく、また検査者はハンズフリーとなるので、喉頭の触診や食事介助を同時に行うことができる。音声レコーダに接続すればデータの記録が可能であり、さらに音響学的解析への途も開ける。

## 参考文献

大宿茂：頸部聴診法。老年歯科医学。28。331 - 336。2014



図1 咽喉マイク (南豆無線電機社製)。



図2 頸部にマイクが密着するように装着する。

## 北海道医療大学歯学会会則（2015年3月7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送るほか会員の権利を保有し、年会費一切の費用を徴収しない。

3. 準会員

歯学教育・診療関係者で理事会の承認を得た者。

4. 学生会員

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

5. 賛助会員

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

（入 会）

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

（退 会）

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

（会員資格喪失）

第6条 会員は以下の事由により資格を喪失する。

1. 2年以上会費の未納。所在不明または連絡のつかない者。

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

（再入会）

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

### 第3章 役員および運営

（役 員）

第8条 本会に以下の役員をおく。

会長1名、専務理事1名、常任理事 若干名、理事 若干名、監事2名、評議員 若干名及び常任委員 若干名

1. 会長は本学部教授の中より、理事会が推薦し、評議員会の議を経てこれを決める。会長は本会を代表し、会務を総括する。
2. 専務理事は理事会の議を経て会長が委嘱する。専務理事は会務の運営処理を推進する。
3. 常任理事は理事の中より選出し、会長が委嘱する。常任理事は常任理事会を組織し、会務を分担し、執行する。分担する会務は、庶務、会計、編集、企画、その他とする。
4. 理事は本学部教授ならびに3名以上の理事の推薦を受け理事会の承認を得た者とする。理事は理事会を組織し役員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、准教授、専任講師で構成するほか、会長の推薦により理事会の承認を得た者とする。評議員は評議員会を組織し、会長の諮問に応じて必要事項を審議する。
7. 常任委員は理事会の議を経て、会長がこれを委嘱する。常任委員は常任理事を補佐し、会務の分掌処理にあたる。

（会議の成立条件）

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

（任 期）

第10条 各役員の任期は2年を原則とする。ただし、再任を妨げない。

### 第4章 事 業

第11条 本会は第2条の目的を達成するために以下の事

業を行う。

1. 総会

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

2. 学術大会

学術大会は年1回以上開催し、会員の研究発表、その他学術発展に関する行事も行う。

3. 学術講演会、研修会

4. 会誌

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

5. 研究活動の奨励

詳細は内規に定める。

6. その他

本会の目的達成に必要なと認めた事業。

## 第5章 会 計

(運営経費、会計)

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

1 各会員の会費は以下の通りとする。

イ 正会員

入会金 3,000円 年会費 5,000円

ロ 準会員

年会費 3,000円

ハ 賛助会員

入会金 10,000円 年会費 30,000円

ただし新入会員（正会員、賛助会員）で、会費3年以上を前納した者に対しては入会金を免除する。

なお、事業の目的に応じ、臨時会費を徴収することがある。

2 本会の会計年度は1月1日より12月31日とする。

(会計報告)

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

## 第6章 雑 則

(事務局)

第14条 本会の事務局は本学部内におく。

(会則の改廃)

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

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

## 附 則

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

## 「北海道医療大学歯学雑誌」投稿規程（2015年3月7日現在）

### 1. 投稿資格

著者は、原則として共著者を含め、本会会員に限る。  
（臨時会員は除く）

### 2. 生命倫理への配慮

- 1) 臨床研究は、ヘルシンキ宣言の主旨にそったもので北海道医療大学の各学部・大学院研究科倫理委員会の承諾を得たものとする。
- 2) 人の遺伝子解析を含む場合は、本学の「ヒトゲム・遺伝子解析研究の計画および実地に関する倫理規程」に基づき、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」の審査をへて学長の許可を得たものとする。
- 3) 動物実験は、「北海道医療大学動物実験規程（Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals in Health Sciences University of Hokkaido）」に基づき、「北海道医療大学動物実験委員会（Animal Ethics and Research Committee）」の審査を経て、北海道医療大学長の承認を得たものとする。

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

### 3. 論文の種類及び内容

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

### 4. 査読および採否

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

### 5. 投稿論文の作成

- 1) 投稿論文は、投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること。
- 2) 投稿論文は、表紙、チェックリストシート、英文抄録（300語以内）、本文、表、図および図表説明文の順番にまとめる。
- 3) 投稿原稿は、2部（正1部、コピー1部）とする。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（緒語）、方法（材料および方法）、結果、考察、結論（結語）、謝辞（必要な場合のみ）、文献の順に記載するものとする。
- 5) 英文論文の本文については、原則として、Abstract（300語以内）、Introduction, Materials and

Methods, Result, Discussion, Conclusion, 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での添付文書として編集委員会まで送付すること。e-mailでの送付が不可能な場合は、作成した文書ファイルをUSBメモリーに保存して提出すること。  
メールアドレス：委員長宛  
件名：歯学雑誌、最近のトピックス  
ファイル名：最近のトピックス、講座名、著者名

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

例：本文のみ1800字程度

（第28巻／第1号 35頁 参照）

本文1300字程度+片段サイズの図・表1つ+図・表の説明文

（第27巻／第1号 37頁 参照）

本文800字程度+片段サイズの図・表2つ+それぞれの図・表の説明文

（第27巻／第2号 109頁 参照）

本文800字程度+両段サイズの図・表1つ+図・表の説明文

### 7. 投稿論文の校正

- 1) 投稿論文に対する著者校正は原則として1回とする。
- 2) 校正論文は、特別な事情がない限り一週間以内、校正時間は48時間以内に返却するものとする。（返却、連絡がない場合は、投稿を取り下げたものと判断する）。

### 8. 証明書等の発行

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

### 9. 掲載料および別刷料

- 1) 掲載料は、刷り上り10頁まで無料とする。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. 優秀論文賞

その年の本誌に掲載された原著論文の中から「最優秀論文賞」(1編)、「優秀論文賞」(2編)を選び表彰する。  
選考は編集委員会が行う。

11. 著作権の帰属

本誌に掲載された著作物の著作権は北海道医療大学歯学会に帰属する。本会はいずれも著作物の全部また

は一部を、ネットワーク媒体を含む媒体に掲載・出版することが出来る。ただし、論文の内容については、著者がすべての責任を負う。

12. 著者のプロフィール

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

13. 原稿の送付および本誌に関する問い合わせ

住所：〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757番地  
北海道医療大学歯学部・口腔生物学系・生理学分野  
北海道医療大学歯学雑誌編集委員会(委員長 石井久淑)  
Tel：0133-23-1239  
e-mail：hisayosh@hoku-iryo-u.ac.jp

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

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

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

2. 遵守すべき倫理指針等\*

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

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

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

チェックリスト 北海道医療大学歯学会雑誌

論文名

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

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

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

## 「北海道医療大学歯学雑誌」投稿の手引き（2012年6月30日現在）

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

原稿はすべてA4版とし、下記の項目1)~7)のすべてを、2部提出して下さい。査読後、論文掲載が認められた際には、論文原稿を収めたUSBメモリー（USBメモリーは、印刷終了後にお返しします）をプリントした最終原稿1部とともに提出して下さい。

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

### 1. 投稿原稿表紙

表紙には以下の事項を和文および英文で記入する。

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

#### 1) 表題

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

和文・英文：-□□□□□□□□□-

#### 2) 著者名および所属

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

#### 3) キーワード

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

### 2. チェックリストシート

チェックリストの指示に従い、投稿原稿を確認する。著者全員のサインを取り、連絡先を記載する。

### 3. 英文抄録

300語以内の英文抄録を付ける。

### 4. 本文

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

#### ・ Windows Microsoft Word

余白は上下3cm、左右2.5cm

文字は12ポイント

1頁35文字×26行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

#### ・ Macintosh Microsoft Word

余白は上下3cm、左右2.5cm

文字は12ポイント

1頁30-35文字×22-25行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

- 2) 原稿の下段中央にページ番号を記す。
- 3) 論文の原則的な構成は、緒論（緒言）、方法（材料および方法）、結果、考察（結果および考察）、結論（結語）、謝辞、文献、図の説明、図表とする。
- 4) 見出しを用いるときは次の順に項目をたてる。  
3 → 3) → (3) → a → a) → (a)
- 5) 文章は、専門用語を除いて、常用漢字、新かなづかい、ひらがなは口語体とする。
- 6) 数字はアラビア数字とし、単位の記号はJIS・Z8202およびZ8203に準じ、国際単位系(SI)を使用するよう努める。また単位にピリオドをつけない。  
(例：GHz, MPa, kW, cm, mV, μm, nA, pF, mL, mmol, N (kgf), K, °C, min)
- 7) 学術用語は、原則として「文部省学術用語集」に準拠する。
- 8) 商品名、器械名などは、可能な限り一般化されている「カタカナ書き」とする。英文字で表す場合は、かしら文字のみ大文字にする。
- 9) 外国の人名などの固有名詞は原則として原綴とする。
- 10) 連続した数値は「,」でつなぎ、最後に単位をつける。(例：10, 20, 30°C)
- 11) 製造社の表記法は（ ）内に会社名のみを記し、社製および製作所、工業社製、株式会社などを入れない。  
例：（型式名、製造会社名）、（略号、製造会社名）  
（X-3010、日立）（EPMA、日本電子）
- 12) 図表の挿入場所を本文右欄外に朱書きする。

### 5. 文献

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

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

1999) (佐藤ら, 1988; 和泉, 1999) (Izumi, 1999a, b)

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

- 2) 文献として不適当なもの, 例えば未公表のデータや私信などは文献として引用しない。
- 3) 文献の著者または編集者が複数の場合にはet al., 他などとせず, その全部を記載する。
- 4) 著者名が欧字綴の場合は姓の後に名前の頭文字をつけ, また著者が複数の場合は最後の著者の前に&を入れる。  
※ 著者間の「and」は記号「&」を使用すること。
- 5) 文献の記載方法の基本は次のとおりとする。

(1) 雑誌の場合

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

例: Izumi H, Ito Y, Sato M, Karita K & Iwatsuki N. The effects of inhalation anesthetics on the parasympathetic reflex vasodilatation in the lower lip and palate of the cat. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 273: 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 legal implications of AIDS. Charlottesville: The Foundation; 1987.

v) 会議録全体を参考にした場合

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

(3) 分担執筆の場合

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

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

(4) 翻訳書の場合

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

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

## 6. 図

- 1) 用紙はA 4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A 4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, A 4判の用紙に貼り, 必要な文字, 記号などを記入する。写真の拡大率は, 単位長さのバーで表す。
- 8) 患者の顔や特徴ある身体の一部の写真を使用する場合は, 目隠し等により個人が特定できないように配慮するとともに, 患者本人あるいは後見人から文書により許可を得ること。
- 9) 記号は中心の明確な○●□■◇などを使用する。
- 10) 記号を使用する場合の凡例は, 脚注に置かず図中に入れる。

## 7. 表

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

(例：)

**Table1** Mechanical properties of specimen

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

( ) : SD

**表1** 試料の力学的性質

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

平均±標準偏差

**8. その他**

本規定ならびに「投稿の手引き」に規定されていない事項については、編集委員会にお尋ね下さい。  
 投稿の手引き、投稿規定、チェックリストのファイルは、ホームページ (<http://www.hoku-iryu-u.ac.jp/~dental-society/>) からダウンロード出来ます。

北海道医療大学歯学会会員 各位

## 北海道医療大学歯学会第35回学術大会一般演題募集のご案内

第35回学術大会・平成29年歯学会総会ならびに講演会を開催致します。

### 記

日時： 平成29年3月4日(土) 午前10時 - 午後5時 (予定)  
会場： アステイ45 12階 北海道医療大学札幌サテライトキャンパス  
札幌市中央区北4条西5丁目 (電話：011-223-0205)

定例講演会：『開拓使で麦酒を創った男～中川清兵衛伝』  
講師： 端田 晶 氏 エビスビール記念館館長

### 演題・抄録申込み要領

申込み期限：平成29年1月20日(金) 必着

抄録作成方法：裏面の原稿作成要領を参照ください。

抄録提出先：臨床口腔病理学分野 吉田 ([denty@hoku-iryo-u.ac.jp](mailto:denty@hoku-iryo-u.ac.jp)) に送信して下さい。

原則として、同一講座・機関から2演題までとします。

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

また、今年度だけの会員制度(5,000円)もあります。

### 発表スライド提出期限と発表形式

提出期限：平成29年3月2日(木) 17時

発表スライドをCD-Rに保存し、事前に臨床口腔病理学分野(吉田)までご持参下さい。

事前提出できない方は発表1時間前までに提出し、ご自身で試写確認して下さい。

発表補助(スライド進行係)を必要とされる方はご自身で手配をお願いします。

発表形式：口演10分 [発表7分, 質疑応答3分](予定)

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

## 北海道医療大学歯学会 抄録原稿作成要領

MS-Word形式（A4サイズ，明朝体，12p，余白上下左右30mm）で記載

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

<p>行政との連携で・・・・・・・・現状について</p> <p>○福田敦史<sup>1</sup>，・・・・・・・・，千葉逸朗<sup>2</sup>，齊藤正人<sup>1</sup></p> <p><sup>1</sup>北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系小児歯科学分野，</p> <p style="padding-left: 100px;"><sup>2</sup>保健衛生学分野</p> <p>【目的】・・・</p> <p>【方法】・・・</p> <p>【結果】・・・</p> <p>【結論】・・・</p>
---

\* 歯科医師生涯研修カードをお持ちの方はご持参下さい。

発表・抄録に関する問合せ・申込先  
北海道医療大学歯学部  
生体機能・病態学系  
臨床口腔病理学分野  
第35回学術大会事務局：吉田 まで

〒061-0293 石狩郡当別町金沢1757番地  
TEL：0133-23-1390（内線：3234）  
FAX：0133-23-1390  
E-mail：denty@hoku-iryo-u.ac.jp

## 編 集 後 記

平成28年度も終盤戦に突入し、皆様の教育・研究活動も大詰めを迎えて多忙な日々をお過ごしのこととお察しいたします。本年度も、北海道医療大学歯学雑誌に論文等の投稿並びにお忙しい中、論文の査読をお引き受けいただきました先生方のご支援ご協力を深く感謝申し上げます。

2016年の本学歯学部の特ピックスの一つとしては、基礎系分野が主幹として北海道（札幌コンベンションセンター）で行われた第58回歯科基礎医学会学術大会が挙げられます。本会では生化学分野の田隈泰信先生を会頭とし、サテライトシンポジウムを含めた3日間に及ぶ学術発表、特別講演並びに懇親会が、歯学会並びに歯学部同窓会のご支援をいただき成功裡に催されました。また、本学術大会では本学歯学部5年生の関有里さんと石田成美さんの研究発表がモリタ賞・優秀学生ポスター賞を見事受賞し、基礎系分野に喜ばしく、フレッシュなニュースを提供してくれました。さらに、本学術大会の前日には、斎藤隆史先生をはじめとする臨床系分野が主体となり、第1回北海道個性差口腔健康科学シンポジウムが開催され、海外提携大学の学生並びに職員との熱心な議論や情報交換が行われました。これらは、本学歯学部の今後の国内外での研究活動の発展の明るい未来を予見し、学生、教員並びに学部が一体となった研究・教育体制の一層の充実をもたらすことでしょう。

さて、本号では生理学分野の佐藤寿哉先生と薬理学分野の根津頭弘先生に原著論文を投稿していただきました。また、歯科矯正学分野の岡山三紀先生並びに病理学分野の森川哲郎先生からの症例報告を投稿していただき、若手の先生方の精力的な活躍を感じることが出来ました。次号以降も歯学雑誌のさらなる充実に努めていきたいと思っておりますので、今後ともご支援ご協力を賜りますようどうかよろしくお願いいたします。(石井 記)

次号（第36巻，第1号）の発行は平成29年6月30日です。

投稿原稿募集の締め切りは平成29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、2016年第35巻，第2号の巻末をご参照ください。



Thinking ahead. Focused on life.



# Soaric

人を大切にしたいデザインとテクノロジーから生まれました

## The New PdW Style

直感的で自然な動作での診療を可能にする、先進のトレーシステム。ユニットへの組み込みが可能な、マイクロスコープと根管長測定機器。小型ボディに根管治療機能が搭載された、新開発マイクロモーター。そのディテールに至るまで一貫して表現された、洗練のデザイン。



発売 株式会社 モリタ 大阪本社: 大阪府吹田市垂水町3-33-18 〒564-8650 TEL 06-6380-2525 東京本社: 東京都台東区上野2-11-15 〒110-8513 TEL 03-3834-6161  
製造販売・製造 株式会社 モリタ製作所 本社工場: 京都府京都市伏見区栗浜南町680 〒612-8533 TEL 075-611-2141 久御山工場: 京都府久世郡久御山町市田新珠城190 〒613-0022 TEL 0774-43-7594  
販売名: ソアリック 標準価格: 4,543,000円~(消費税別途) 2013年1月21日現在 一般的名称: 歯科用ユニット 機器の分類: 管理医療機器(クラスII) 特定保守管理医療機器 医療機器認証番号: 222ACBZ00016000  
[www.dental-plaza.com](http://www.dental-plaza.com)

THE BEST PARTNER OF DENTISTS



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

よりよい品質と  
新たな信頼を求めて

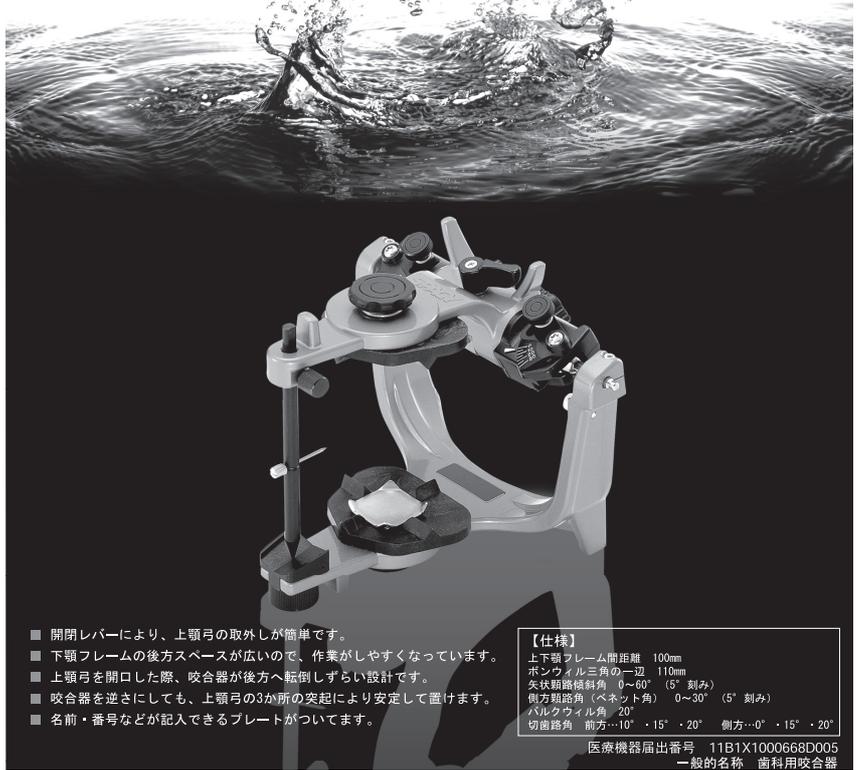


株式会社YDM

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

## Spacy Articulator (Semi-Adjustable) Wing

スペイシー咬合器(半調節)ウイング



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

【仕様】

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

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



## お口のトラブルはこれ1本! 6つの効果のリステリン

# LISTERINE<sup>®</sup> TOTAL CARE

薬用マウスウォッシュ 液体歯磨

標準医院価格(標準患者価格) /

リステリントータルケア 1.5L ¥1,380(¥1,660)、500mL ¥560(¥700)

価格は2016年12月現在の標準医院価格(消費税抜き)および標準患者価格(消費税抜き)です。

歯石の沈着予防

歯垢の沈着予防

自然な白い歯へ

歯肉炎の予防

口中の浄化

口臭の予防



世界の歯科医療に貢献する

株式会社 松風

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

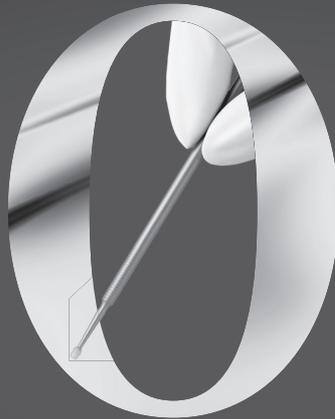
●支社:東京(03)3832-4366 ●営業所:札幌(011)232-1114/仙台(022)713-9301/名古屋(052)709-7688/大阪(06)6330-4182/福岡(092)472-7595

http://www.shofu.co.jp



Zero-sec. & Multi-use

塗布後の待ち時間  
「0秒」の簡便性



多目的光重合型1液性ボンディング材

ジーシー G-プレミア ボンド

コンポジットレジン修復

知覚過敏抑制

口腔内リペアー

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

管理医療機器 226AABZX00098000

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丁目2番14号 〒113-0033

お客様窓口 ☎ 0120-416480

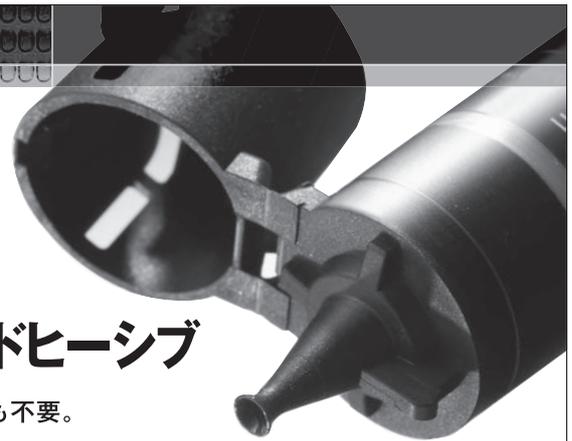
受付時間 9:00a.m.~5:00p.m.(土曜日、日曜日、祭日を除く)  
※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。

[www.gcdental.co.jp/](http://www.gcdental.co.jp/)

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

※掲載の価格は2016年12月現在のものです。※色調は印刷のため、現品と若干異なることがあります。※価格は希望委員価格です(価格には消費税は含まれておりません)。

# 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 アドヒージブ



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



この1滴で



コンポジットレジン  
修復時の接着材



知覚過敏抑制材



高洞・支台歯の  
シーリング材



小窩裂溝填塞時の  
歯面処理剤



コンポジットレジンの  
リペアー時の前処理剤



ポーセレンの  
リペアー時の前処理剤



ポーセレンラミネート  
ベニアの前処理剤

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

☆ ホームページで7つの症例をご紹介します!

スコッチボンド ユニバーサル

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、03-6409-3157をご利用ください。

3M ESPE

# MIステンレスバーCA

医療機器届出番号 09B1X00006001010  
一般医療機器 一般的名称: 歯科用スチールバー  
販売名 マニーステンレスバー



## 軟化象牙質を選択的に切削

MI重視

### ① MI(ミニマルインターベーション)

ステンレス材はスチール材よりも硬度が低い為軟化象牙質を的確に除去し、健全部位を過剰に削りすぎません。

### ② 錆びに強く、オートクレーブ可能

水に強く錆びにくい材質です。錆び(黒ずみ)の発生リスクを押さえ消毒のみとなっていた悩みを解消。また、錆によるチャックの損傷、患者へ使用する際の抵抗感が軽減されます。

	全長	最高許容回転数
	22mm	1,200 min <sup>-1</sup>
	28mm	1,200 min <sup>-1</sup>
	34mm	800 min <sup>-1</sup>

※34mmは、#2と#6のみ

サイズ	刃部最大径
1/2	0.6mm
1	0.8mm
2	1.0mm
3	1.2mm
4	1.4mm

サイズ	刃部最大径
5	1.6mm
6	1.8mm
7	2.1mm
8	2.3mm

#### MIステンレスバーの使い方

低速回転で押し付けず、フェーザータッチで使用。低速回転にすることで、柔らかい感染象牙質と健全象牙質の切削感の違いが感じやすくなります。切削感の違いという感覚にう蝕検知液を併用することで、感染象牙質をより選択的に除去することができます。



■標準価格(6本入/ケース)

**2,700円**(税別)

MANI®

■最小包装単位:6本入/ケース

■規格:22、28mm:1/2、1、2、3、4、5、6、7、8  
:34mm:2、6

22mm:アクセス可能な比較的浅いう蝕部位の治療に。

28mm:エナメルジャンクション、根管口明示、粗象の除去などに。また、拡大鏡、顕微鏡下での視野確保に有効です。

34mm:28mmの内容のほか、前歯部などの深い部位へのアクセスに有効です。

※MIステンレスバーは、MI(ミニマルインターベーション)をコンセプトに造られておりますので、スチールバーの使用感とは異なります。

# ステンレスバーハードCA

医療機器届出番号 09B1X00006001020  
一般医療機器 一般的名称: 歯科用スチールバー  
販売名 マニーステンレスバーハード

## ステンレスの時代到来! 錆びによる様々な悩みを解決!



■ステンレスバーハード22mm/原寸大

 #4 22mm

■ステンレスバーハード28mm/原寸大

 #4 28mm

■標準価格(6本入/ケース)

**2,700円**(税別)

MANI®

### ① 錆びを気にせずオートクレーブ可能!

### ② 衛生面向上!

### ③ 切削性持続!

### ④ 切れ味良好!

### ⑤ 拡大視野下でも見やすいネック設計

### こんな悩みをスッキリ解決!

- ① コントラチャックの損傷
- ② 患者様の口腔内に使用する抵抗感
- ③ 他の製品と分けての管理(貫い錆び防止)
- ④ 防錆剤の購入使用(余分なコストと労力)

切削性重視

■最高許容回転数:4,000min<sup>-1</sup>

■最小包装単位:6本入/ケース

■規格:1/2、1、2、3、4、5、6、7、8

■アソート:1~6



22mm



28mm

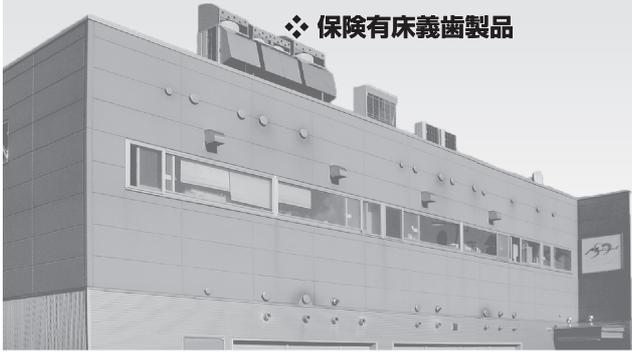
22mm:アクセス可能な比較的浅いう蝕部位の治療に。

28mm:エナメルジャンクション、根管口明示、粗象の除去などに。また、拡大鏡、顕微鏡下での視野確保に有効です。



けん こう し せい かつ  
**私達は健口な歯生活を応援します。**

- ❖ ジルコニアセラミックス CAD/CAM
- ❖ オールジルコニア CAD/CAM
- ❖ 抗菌デンチャー（銀イオンコーティング）
- ❖ ハッピーデンチャー（ノンクラスプデンチャー）
- ❖ 金属床義歯
- ❖ デンチャー（BPS）
- ❖ その他自費製品
- ❖ 保険歯冠修復製品
- ❖ 保険有床義歯製品



札幌医届出（医）第220号

**株式会社札幌メディカルラボ**

北海道札幌市手稲区西宮の沢1条4丁目10-17  
 TEL: 011(683)8681 FAX: 011(695)1712  
<http://www.medical-1081.com>  
[info@medical-1081.com](mailto:info@medical-1081.com)



FREE ARM **ARTEO**

口腔外用サククション  
 [フリーアーム・アルテオ]

医療機器 特許出願中



進化したフリーアームは  
 6つの特徴を搭載。



センサースイッチは  
 お好みの位置にセット可能



4灯のLEDライトは  
 照度10,000ルクス



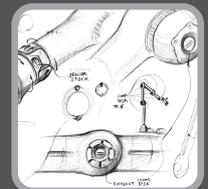
スムーズな操作性で  
 思い通りのポジションへ



サイレントフィルタで  
 高周波領域の騒音を低減



フードの脱着がワンタッチ  
 安全機構の設計



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

**株式会社 東京技研**

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

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

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



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



編集委員会

委員長 石井久淑  
越智守生・斎藤隆史・柴田考典  
溝口 到

(アイウエオ順)

北海道医療大学歯学雑誌 第35巻 第2号

平成28年12月31日

発行者 中 澤 太

編 集 北海道医療大学歯学会

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757番地  
北海道医療大学内

電 話 0133-23-1211(内線2563)

電話/FAX 0133-23-1345(直通)

メールアドレス：iryodsh@hoku-iryodsh-u.ac.jp

印刷 山藤三陽印刷株式会社  
札幌市西区宮の沢1条4丁目16番1号  
電話 011(661)7163(代)

# Dent J Health Sci Univ Hokkaido

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido  
VOL.35, NO.2, DECEMBER, 2016  
CONTENTS

## ORIGINAL

- 1 **Influence of type 2 diabetes on parasympathetic vasodilation in salivary glands in rats.**  
Toshiya SATO, Hisayoshi ISHII ..... (97)
- 13 **Development of a method for measurement of intracellular IP<sub>3</sub> concentrations in salivary acinar cells using the cytosolic type IP<sub>3</sub>-biosensor "cLIBRAvIIS".**  
Akihiro NEZU, Takao MORITA, Akihiko TANIMURA ..... (109)
- 23 **Lysophosphatidic acid is involved in a cellular signaling of periodontal ligament and tooth development**  
Toshiya ARAKAWA, Nobuko OBARA, Miki OKAYAMA, Nattakarn HOSIRILUCK,  
Itaru MIZOGUCHI, Kazuharu IRIE, Taishin TAKUMA ..... (119)

## REVIEW

- 33 **Effects of Melatonin on Periodontitis and Alveolar Bone Loss : a Review**  
Nazmus SHALEHIN, Md Riasat HASAN, Kazuharu IRIE ..... (129)

## CLINICAL REPORT

- 37 **A case with open bite treated by temporary anchorage device (TAD)**  
Miki OKAYAMA, Yukie OKA, Itaru MIZOGUCHI ..... (133)
- 45 **A case of Myoepithelioma of the palate**  
Tetsuro MORIKAWA, Kosuke TAKIMOTO, Bhoj Raj ADHIKARI, Puja NEOPANE,  
Fumiya HARADA, Masafumi UTSUNOMIYA, Takatoshi CHUJO, Koki YOSHIDA, Jun SATO,  
Michiko NISHIMURA, Hiroki NAGAYASU and Yoshihiro ABIKO ..... (141)

## DENTAL INFORMATION

- 51 **Recent topics** ..... (147)