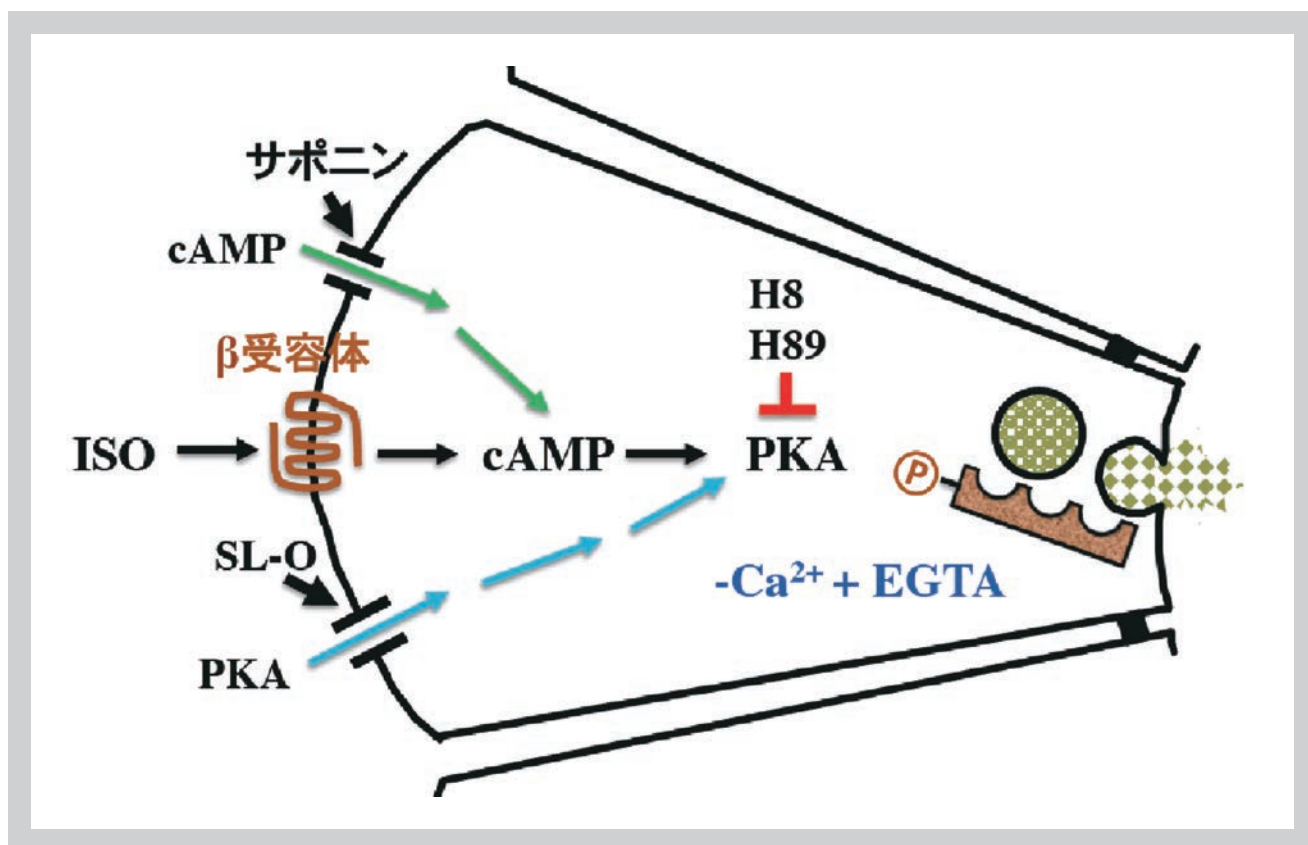


北海道医療大学歯学雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北医療大歯誌
第34卷 第2号 平成27年12月



北海道医療大学歯学会役員

会 長 田 隈 泰 信
専 務 理 事 越 智 守 生
常 任 理 事 齊 藤 正 人・中 山 英 二 (庶務担当)
谷 村 明 彦・千 葉 逸 朗 (会計担当)
坂 倉 康 則・石 井 久 淑 (編集担当)
入 江 一 元・永 易 裕 樹 (企画担当)
監 事 中 澤 太

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Taishin TAKUMA

Vice President : Morio OCHI

Directors : Masato SAITO, Eiji NAKAYAMA,
Akihiko TANIMURA, Itsuo CHIBA,
Yasunori SAKAKURA, Hisayoshi ISHII,
Kazuharu IRIE, Hiroki NAGAYASU

Auditors : Futoshi NAKAZAWA

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34巻 第2号 平成27年12月
目 次

〔総説〕

- 1 サイクリックAMPと唾液分泌の謎
田隈 泰信……………(73)

〔原著〕

- 17 *Porphyromonas gingivalis*由来Lipopolysaccharide長期刺激による
ヒト歯根膜線維芽細胞における老化抑制関連遺伝子のDNAメチル化解析
高井 理衣, 原田 文也, 森川 哲郎, Bhoj Raj Adhikari, 伊藤 - 小原 純, 中條 貴俊,
宇津宮 雅史, 植原 治, 吉田 光希, 佐藤 惇, 西村 学子, 千葉 逸朗, 安彦 善裕……………(89)
- 23 Light forceによる矯正学的歯の移動の三次元非線形有限要素法解析
岡 由紀恵, 小林 優, 林 一夫, 溝口 到……………(95)
- 37 歯原性上皮細胞株の分化における活性型ビタミンD₃の作用
村田 佳織, 谷村 明彦, 齊藤 正人……………(109)
- 45 A combination of oral care and 23-valent-pneumococcal vaccination is able to reduce pneumonia incidence
in nursing homes
Masahiro HATTA D.D.S., Takahiro ICHIKI M.D., Hiroyuki MORITA M.D.,
Masako HATTA D.D.S., Tomohiko MURAKAMI M.D. ……(117)

〔症例報告〕

- 55 口蓋に発生した明細胞型粘表皮癌の1例
中條 貴俊, 瀧本 紘佑, Bhoj Raj Adhikari, 森川 哲郎, 原田 文也, 高井 理衣,
吉田 光希, 佐藤 惇, 淀川慎太郎, 西村 学子, 永易 裕樹, 安彦 善裕……………(127)

〔MINI REVIEW (機器分析入門)〕

- 61 エックス線回折による材料および生成物の分析
飯嶋 雅弘, 遠藤 一彦……………(133)

〔歯学情報〕

- 65 最近のトピックス……………(137)
- 69 北海道医療大学歯学会会則……………(141)
- 71 北海道医療大学歯学雑誌 投稿規程……………(143)
- 78 編集後記……………(150)

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido
VOL. 34, NO. 2, DECEMBER, 2015
CONTENTS

REVIEW

- 1 **The enigma of cyclic AMP mediated salivary exocytosis**
Taishin TAKUMA (73)

ORIGINAL

- 17 **DNA methylation analysis of Anti-aging related genes in Human Periodontal Ligament Fibroblasts by long-term stimulus of Lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis***
Rie TAKAI, Fumiya HARADA, Tetsuro MORIKAWA, Bhoj Raj ADHIKARI, Jun ITOH-OBARA,
Masafumi UTSUNOMIYA, Osamu UEHARA, Koki YOSHIDA, Jun SATO, Michiko NISHIMURA,
Itsuo CHIBA, Yoshihiro ABIKO (89)
- 23 **Three-dimensional nonlinear finite element analysis of orthodontic tooth movement with a light force**
Yukie OKA, Masaru KOBAYASHI, Kazuo HAYASHI, Itaru MIZOGUCHI (95)
- 37 **Effect of active form of vitamin D₃ in the differentiation of rat dental epithelial cell line**
Kaori MURATA, Akihiko TANIMURA, Masato SAITOH (109)
- 45 **A combination of oral care and 23-valent-pneumococcal vaccination is able to reduce pneumonia incidence in nursing homes**
Masahiro HATTA D.D.S., Takahiro ICHIKI M.D., Hiroyuki MORITA M.D.,
Masako HATTA D.D.S., Tomohiko MURAKAMI M.D. (117)

CLINICAL REPORT

- 55 **A case of Clear cell variant of Mucoepidermoid carcinoma of the palate**
Takatoshi CHUJO, Kosuke TAKIMOTO, Bhoj Raj ADHIKARI, Tetsuro MORIKAWA,
Fumiya HARADA, Rie TAKAI, Koki YOSHIDA, Jun SATO, Shintaro YODOGAWA,
Michiko NISHIMURA, Hiroki NAGAYASU and Yoshihiro ABIKO (127)

MINI REVIEW (Introduction to Instrumental Analysis)

- 61 **Analysis of Materials and Products by a X-ray diffractometry**
Masahiro IJIMA, Kazuhiko ENDO (133)

DENTAL INFORMATION

- 65 **Recent topics** (137)

〔総説〕

サイクリックAMPと唾液分泌の謎

田隈 泰信

北海道医療大学歯学部生化学分野

The enigma of cyclic AMP mediated salivary exocytosis

Taishin TAKUMA

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

Abstract

Cyclic AMP is a classical signal transduction molecule that covers a wide variety of organisms including bacteria, cellular slime molds, and mammals. In this review I focus the role of cAMP in the mechanism of the salivary protein exocytosis. The mechanism still remains an enigma, and I have evaluated it trying to an-

swer 4 different questions, 1) is the final exocytic stimulus Ca^{2+} or cAMP? 2) Is protein phosphorylation necessary? 3) What mechanisms are involved in Epac and PKA in insulin and amylase secretion? And 4) what SNAREs are involved in salivary exocytosis?

はじめに：情報伝達分子としてのcAMP

シグナル伝達分子としてのサイクリックAMP (cAMP) は、細菌や細胞性粘菌から哺乳類まで、生命進化を広範にカバーし、多様な役割を果たしている (表1, cAMPの構造は図3をご参照ください)。細菌では、栄養源として最も利用しやすいブドウ糖が“枯渇”したとき、代わりに乳糖が利用できるようにするため、ラクトース・オペロンの転写を促進するシグナルとしてcAMPは登場する。

アメーバーに似た単細胞生物として生活する細胞性粘菌では、餌の細菌が枯渇して“飢餓状態”に陥ったと

き、危機的状況を周囲のアメーバー達に知らせるため、走化性因子としてcAMPが放出される。この場合、cAMPは細胞内に情報を伝える“セカンド”メッセンジャーではなく、細胞間で情報を交換する“ファースト”メッセンジャーとして機能している。

哺乳類を含む高等生物では、cAMPは“飢餓シグナル”の役回りから解放され、細胞内でセカンドメッセンジャーの役割を果たすようになる。その代表的な例は鼻粘膜に存在する嗅細胞である。嗅細胞には嗅覚受容体が発現しており、ここに匂い分子が結合するとcAMPが合成される。cAMPは細胞膜に存在する特殊な陽イオンチャンネルに結合してこれを開き、その電気信号は中枢へ

表1 cAMPの多様なシグナル伝達機構

| 細胞 | cAMPの結合相手 | 機能 |
|-----------|-------------|-------------------|
| 細菌 | CAP* | ラクトース・オペロンの転写促進 |
| 細胞性粘菌 | 細胞膜のcAMP受容体 | 細胞の走化性因子 |
| 嗅細胞, ほか | 陽イオンチャンネル | チャンネルを開く (脱分極) |
| 唾液腺細胞, ほか | PKA* | タンパク質リン酸化 |
| | Epac* | Rap1, Rap2*の活性化など |

CAP: Catabolite Activator Protein.

PKA: Protein Kinase A (cAMP-dependent protein kinase).

Epac: Exchange Proteins directly Activated by cAMP.

Rap1, Rap2: 低分子量Gタンパク質. EpacによりGDPがGTPに置き換わり活性化.

と伝達され、脳で匂いが識別される。生物が嗅覚をいかに重視しているかは、嗅覚受容体の遺伝子を数えると理解できる。その数、ヒトで約400、犬で800、アフリカゾウではなんと2000に達し、これだけで全遺伝子の数%~10%を占めるといわれている (Niimura et al., 2014)。

細菌から嗅細胞までのcAMPのシグナル伝達機構は、専門分野でないせいもあって、スッキリと疑問の余地なく解明されているような印象を受ける。最後に登場するPKAとEpacは、cAMPによって調節される生体機能の大部分に関わっていると推察されるが、作用機構がスッキリと解明されている分野は、私の知る限り必ずしも多くない。私が30年余り関わってきた唾液分泌における役割も、いまだ深い謎に包まれている。これを4つの謎に分けて解説しようというのが本稿の目的である。

1. 第1の謎：cAMPかCaイオンか？

1984年、米国NIH留学から当別町に戻り、私が唾液分泌機構の研究を始めたころ、世はまさにカルシウム・ブームの真っただ中であつた。前年、イノシトール1,4,5トリスリン酸 (IP₃) による細胞内Ca²⁺動員実験の成功がNature誌に報じられ (Streb et al., 1983)、この結果と、神戸大学の西塚泰美教授が発見したプロテインキナーゼC (PKC) の偉大な研究成果が、この年Berridgeによって美事に統合された (Berridge, 1984)。すなわち、Ca²⁺動員性のホルモンによって活性化されたホスホリパーゼCは、細胞膜のイノシトールリン脂質を加水分解してIP₃とジアシルグリセロール (DAG) を生成する。IP₃は細胞内Ca²⁺ストアである小胞体からCa²⁺を遊離し、DAGは遊離したCa²⁺とともにPKCを活性化する。現在あらゆる生命科学の教科書に記載されている理論である。そして、翌1985年、札幌医科大学の竹村晴夫博士は、カルバコール刺激によって引き起こされる唾液腺細胞内のCa²⁺濃度変化を、世界で初めて、Ca²⁺蛍光指示薬Quin2を用いて測定した (Takemura, 1985)。この強烈な衝撃波は当別町を直撃した。驚いた私は図書館を飛び出し、直後に竹村先生の研究室を訪問して実験を見せて頂いたことを思い出す。この間の状況は東城庸介教授の総説に詳しい (東城, 2014)。

留学期間の後半、私は主としてパーコール密度勾配遠心法を用いて耳下腺の基底側細胞膜を精製し、Na⁺濃度勾配と共役したアミノ酸とCa²⁺の輸送を研究していた (Takuma et al., 1984; Takuma & Baum, 1985; Takuma et al., 1985; Helman et al., 1986)。帰国後、私はカルシウム・ブームに乗り遅れまいと、耳下腺細胞からアミラーゼ分泌を促進するセカンドメッセンジャーがcAMPか

Ca²⁺かという、今でも時々幽霊のように現れる“未解決”の問題に取り組むことにした (Messenger et al., 2014)。研究はButcherとPutneyの有名な総説 (Butcher & Putney, 1980) の精読から始まった。この総説には、1980年以前の唾液腺分泌機構研究のエッセンスが凝縮されている。ラット耳下腺のアミラーゼ分泌は、Schrammらによって1960年代からcAMP研究の実験モデルとして盛んに利用されていた。しかし、総説ではcAMPよりもむしろ勃興し始めたカルシウム・イオンの役割が強調されている。唾液タンパク質の分泌は、表面的にはcAMPが調節しているように見える。しかし、神経分泌や内分泌ばかりでなく、耳下腺とよく似た膵臓の外分泌でさえ、分泌シグナルの主役は明らかにCa²⁺である。BucherやPutneyらは、cAMPは(1)細胞内のCa²⁺を動員し、(2)Ca²⁺にたいする感受性を高めることによって、間接的に作用しているのであり、分泌に直接関与しているのは唾液腺においてもCa²⁺であると考えていた。他方、SchrammやQuissellらは、EGTAで長時間Ca²⁺を除去してもcAMPによるアミラーゼ分泌が残存することから、Ca²⁺の役割は必須ではないと主張していた。

この論争に一石を投ずべく、私は売り出されたばかりの極めて高価なIP₃をシグマ社から購入し、実験を開始した。50 µg/mlのサポニンで細胞膜に“穴をあけた”耳下腺細胞にMg-ATPを添加するとCa²⁺ポンプが動きだし、小胞体に放射性のカルシウムイオン (⁴⁵Ca²⁺) が汲み上げられる。ここに10 µMのIP₃を投入すると小胞体から⁴⁵Ca²⁺が明瞭に放出されるが、100 µMのcAMPでは全く放出されないことを1986年に証明することができた (図1) (Takuma & Ichida, 1986a)。同時に、プロテインキナーゼC (PKC) を直接活性化するフォルボールエステルを用い、PKCが耳下腺アミラーゼ分泌を促進することを明らかにすることができた (Takuma & Ichida, 1986b)。一方、東城先生のグループは、最新の蛍光分光光度計と改良されたCa²⁺蛍光指示薬Fura2を用い、細胞内Ca²⁺濃度を高感度にリアルタイム測定する実験系を確立し、βアゴニストのイソプロテレノールがCa²⁺濃度を上昇させずに分泌促進することを、疑問の余地なく証明した (Tojyo & Matsumoto, 1990; Tojyo et al., 1998)。これらの研究から、耳下腺細胞では、cAMPにCa²⁺動員作用がないことは明らかとなったが、cAMPが“Ca²⁺にたいする感受性を高める”ことによって分泌を促進するという説は、完全には否定されていない。

穴あき細胞の利用

IP₃の実験で、私は細胞膜を透過できないIP₃を耳下腺

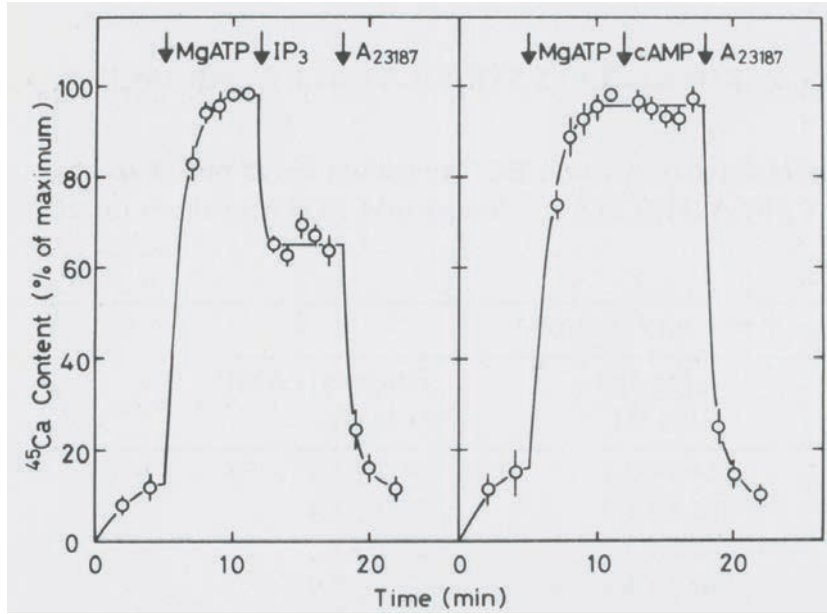


図1 サポニン (50 μg/ml) で細胞膜を透過性とした耳下腺細胞の小胞体に、Mg-ATPで放射性カルシウムイオン (⁴⁵Ca) を取り込ませた後、IP₃ (10 μM)、cAMP (100 μM)、A23187 (5 μM) を加え、細胞の⁴⁵Caを迅速濾過法で測定した。

細胞内に導入するため、サポニンを用いた。サポニンは細胞膜のコレステロールと結合してミセルを形成し、細胞膜に直径約10 nmの細孔をあけることが知られている。その後の7年間、私はこの“穴あき細胞”を用いて耳下腺アミラーゼ分泌におけるcAMPとPKA (cAMP依存性プロテインキナーゼ) の役割を研究した (図2) (Takuma & Ichida, 1988)。

“穴あき細胞”の利点をあげると、

1) EGTA存在下、Ca²⁺無添加でもcAMPによるアミ

ラーゼ分泌が誘導されることから、Ca²⁺とは無関係にcAMPによる分泌機構を研究できる。

2) 無傷細胞の場合、膜透過性のcAMP誘導體でも、アミラーゼ分泌にはmMオーダーの非生理的な濃度を必要とする。しかし、“穴あき細胞”ではホスホジエステラーゼ阻害剤を共存させると、1 μMという生理的な濃度から分泌が認められる。

3) 無傷細胞でタンパク質リン酸化を検出するには、細胞を極めて高濃度の放射性無機リン酸³²Pとともに長時

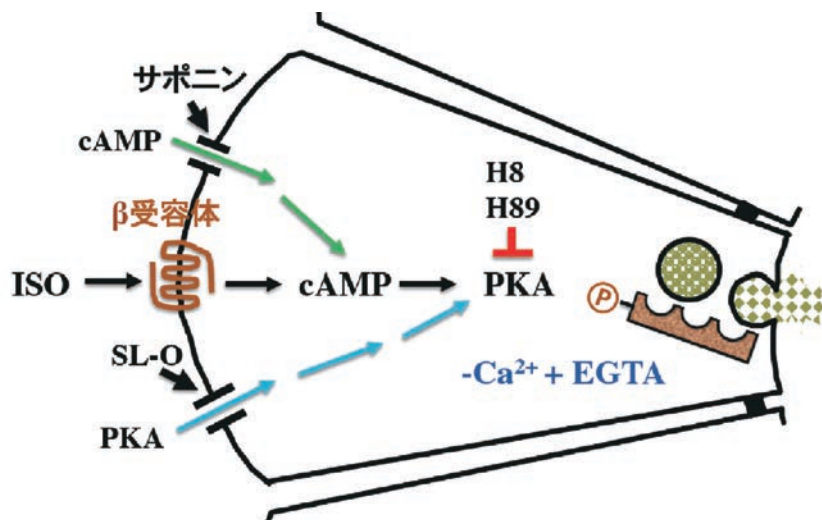


図2 “穴あき”耳下腺細胞を用いたアミラーゼ分泌機構研究の概要。サポニンやストレプトリシン-O (SL-O) を用いて調製した“穴あき細胞”に、イソプロテノール (ISO) などのβ作動薬が受容体に結合した後に合成され、活性化される分子、または、それらの阻害分子を導入し、アミラーゼ分泌が再現できるかどうかを調べた。cAMPによる分泌は、Ca²⁺非存在下 (+EGTA) でも問題なく起こることが確認された。H8、H89はPKA阻害剤。

間インキュベートし、細胞内のATPを ^{32}P でプレラベルする必要がある。しかし、“穴あき細胞”では直接 ^{32}P -ATPを導入することができる。

4) 細胞膜を透過しないPKA特異的阻害ペプチド (PKI) を導入することが可能であり、また膜透過性の化学合成阻害剤を使用する場合でも、無傷細胞より低濃度で効果が得られる。

このような“穴あき細胞”の特性を利用し、様々なcAMP誘導体の導入実験を計画した。cAMP誘導体は、当時既に600種類以上も合成されていたが、新たにcAMPアンタゴニストと呼ばれるユニークな誘導体が登場した(図3)。サイクリックAMPには名前の由来となった環状構造を形成するリン酸基がある。このリン酸基の酸素原子を1箇所、硫黄原子Sに置換した誘導体(cAMPS)で、Sの置換位置によってSp-cAMPSとRp-cAMPSという2種類の異性体が生じる。このうちSp-cAMPSは元のcAMPと同様にPKAを活性化するが、Rp-cAMPSはPKAの調節サブユニットに結合するものの触媒サブユニットを遊離しないため、競合阻害分子として機能する(cAMPアンタゴニスト)。これらの誘導体は元のcAMPより細胞膜透過性が高く、肝細胞では無傷細胞でもアンタゴニスト効果が確認された。しかし、唾液腺の細胞膜はRp-cAMPSを透過せず、サポニン処理細胞を用いることによって始めて、Sp-cAMPSによるアミラーゼ分泌をRp-cAMPSが競合的に阻害することを証明することができた(図4)(Takuma & Ichida, 1991a)。実

験では、cAMPによるアミラーゼ分泌とタンパク質リン酸化は大変よく相関し、アミラーゼ分泌にPKAが関与していることを強く支持した。

2. 第2の謎：PKAによるリン酸化は必要か？

cAMPはPKAの調節サブユニットに結合し、タンパク質リン酸化活性をもつ触媒サブユニットを解放することによってPKAを活性化する。しかし、細胞にはPKAとは無関係にリン酸化されるタンパク質が数多く存在するため、PKAによるリン酸化を検出するには、分泌刺激後の細胞にひと手間かける必要があった。私は、タンパク質リン酸化研究のパイオニアの一人である愛知学院大学の金森孝雄先生にお電話し、検出方法を伝授して頂いた(Kanamori et al., 1974)。教わった通り、耳下腺細胞をホモジナイザーで破碎後、遠心分離機で膜画分を分画・濃縮することにより、cAMP依存性のタンパク質リン酸化を検出することができた。

当時、名古屋大学の日高弘義教授は、それまでのものより強力でしかも特異性の高いプロテインキナーゼ阻害剤を次々と開発し、脚光を浴びていた。私は、アミラーゼ分泌におけるPKAの役割を確立するため、日高研究室で1984年に開発されたH8と呼ばれるPKA阻害剤(Hidaka et al., 1984)を、おそらく世界で初めて分泌実験に使用した。H8は耳下腺細胞の上清と膜画分のPKA活性を濃度依存性に阻害した。また、H8は β アゴニストであるイソプロテレノール(ISO)による21 kDaと26 kDaの

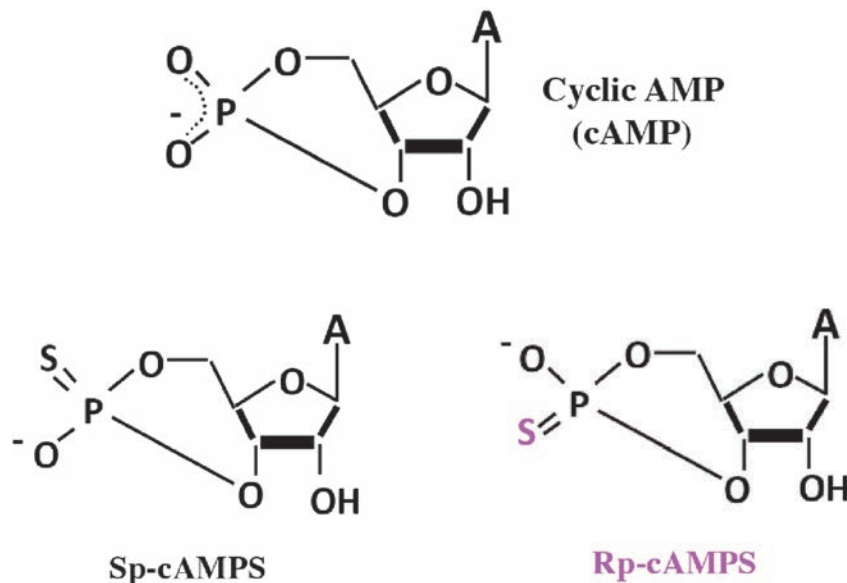


図3 cAMPとcAMPアンタゴニストの構造。サイクリックAMPの環状構造を形成するリン酸基の酸素原子を1箇所、硫黄原子に置換したもの。Sp-cAMPSの作用は元のcAMPと変わらないが、Rp-cAMPSはPKAの調節サブユニットに結合するものの触媒サブユニットを遊離しないため、cAMPの作用を競合阻害する。Aはアデニン塩基。

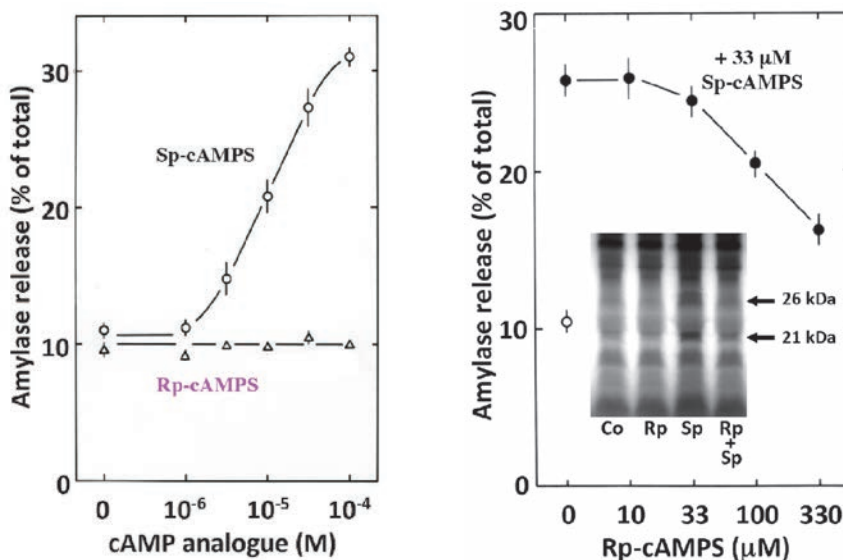


図4 Sp-cAMPSは“穴あき”耳下腺細胞からアミラーゼ分泌を促進するが、Rp-cAMPSには分泌促進作用がない。Rp-cAMPSは、Sp-cAMPS (33 μM) によるアミラーゼ分泌と21、26 kDa膜タンパク質のリン酸化を濃度依存性に阻害した。

膜タンパク質のリン酸化を強く阻害した。しかし、大変驚いたことに、H8はISOやcAMPによるアミラーゼ分泌を全く阻害しなかった(図5)。これは、cAMPによるアミラーゼ分泌にPKAによるタンパク質リン酸化が必要ないことを示す想定外の結果であった。私はこの結果を1987年、東日本学園大学が主管した第29回歯科基礎医学学会学術大会の前日、現在のサテライトシンポジウムのような形で開催された第1回唾液腺談話会で、「cAMPによるアミラーゼ分泌にセントラルドグマは有効か?」という、今から思うと随分と気負った題をつけて発表したものである。当時の私には、タンパク質リン酸化を介さないcAMPの作用は“セントラルドグマの否定”のよう

に感じられたのである(Takuma, 1988)。1988年夏、カナダのモントリオールで開催された第4回国際細胞生物学会に参加する旅の途中、私は米国NIHのDr. Baumの研究室とコロラド州デンバーのDr. Quissellの研究室でも講演した(図6)。Quissellは、βアゴニストやアンタゴニストによるアミラーゼ分泌の増減と、26 kDa膜タンパク質のリン酸化レベルの消長がよく相関することから、この膜タンパク質がアミラーゼ分泌に関与することを示唆する論文をPNAS誌に発表していた(Quissell et al., 1985)。今から思うとDr. Quissellには大変気の毒なことをしたが、私の講演は彼の主張を正面から否定する内容であった。

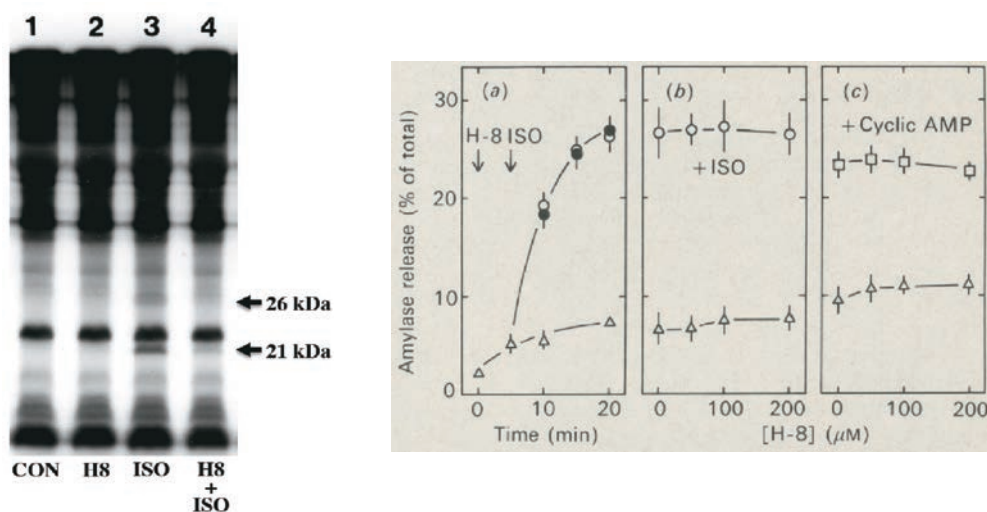


図5 PKA阻害剤のH8は、イソプロテレノール (ISO) 刺激によるタンパク質リン酸化を強く阻害したが、驚いたことに、ISOとcAMPによるアミラーゼ分泌を全く阻害しなかった。H8はISOまたはcAMPを加える5分前に添加した。



図6 1988年、モントリオールで開催された第4回国際細胞生物学会に参加する旅の途中、東城先生、瀬川先生とベセスダのNIHに立ち寄り講演した。筆者の隣はDr. Bruce Baum。背後の壁面には、当時の研究所の名称National Institute of Dental Researchと書かれている。

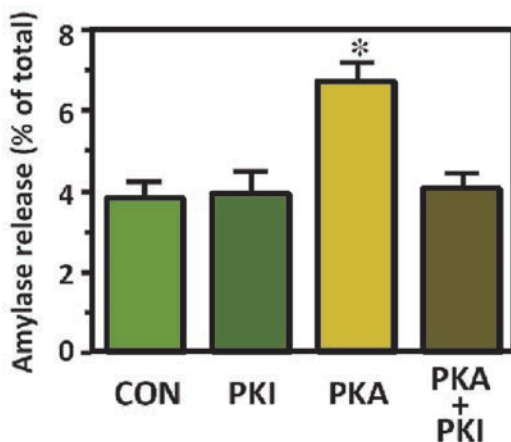
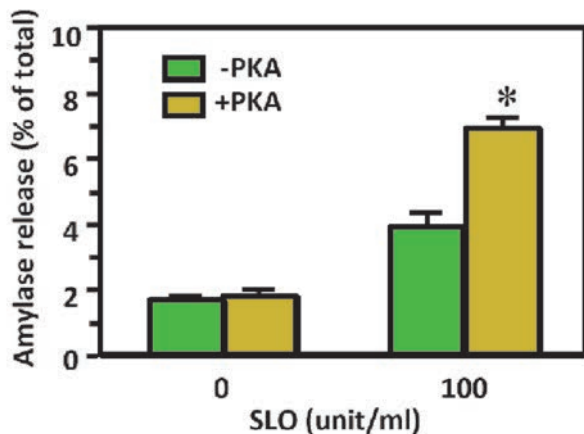


図7 サポニンより一回り大きい穴をあけるストレプトリシン-O (SLO) を用い、PKAの触媒サブユニット (分子量38 kDa) を耳下腺細胞に導入し、分泌の割合は低いが統計的に有意な分泌促進効果を確認した。触媒サブユニットによる分泌はSLOの存在下でしか起こらず、また、PKAの阻害ペプチド (PKI) によって完全に阻害された。

上述の実験結果は、その後、400 μM のH8で15分間前処理した耳下腺細胞でも確認された (Takuma & Ichida, 1994b)。さらに、 ^{32}P を使わず、転写因子CREBに対する抗リン酸化抗体を用いて、PKA活性をよりリアルタイムに近い条件でモニターしたところ、400 μM のH8は、現在PKA阻害剤のスタンダードとなっているH89 (10 μM) よりも強いPKA阻害効果を示した (Takuma et al., 1997b)。

オカダ酸の効果

PKAはタンパク質のセリンまたはスレオニン残基をリン酸化することでその活性や機能を調節する。リン酸化されたタンパク質は、細胞内に存在するプロテイン・ホスファターゼによって脱リン酸化され、その活性は元のレベルに戻る。従って、プロテイン・ホスファターゼ活性を阻害するとタンパク質リン酸化レベルが上昇し、アミラーゼ分泌が誘導されることが予想された。当時、強力なプロテイン・ホスファターゼ阻害物質が日本人の手でクロイソカイメンから抽出され、オカダ酸と命名された。私は、市販される前のオカダ酸を藤沢薬品の築谷康榎博士から譲り受け、その効果を調べた (Takuma & Ichida, 1991b)。耳下腺細胞をオカダ酸で処理すると、タンパク質のリン酸化レベルは確かに上昇するが、アミラーゼ分泌は上昇せず、逆にcAMPによるアミラーゼ分泌を阻害した。同様の阻害効果は、オカダ酸とは全く構造の異なるカリクリンAというプロテイン・ホスファターゼ阻害剤によっても確認された (Takuma et al., 1993)。タンパク質リン酸化レベルの非特異的な上昇は、分泌を促進するどころかむしろ阻害することから、cAMPによる分泌促進にタンパク質リン酸化は必要ないか、あるいは極めて特異性の高いリン酸化が必要と考えられた。

PKA触媒サブユニットの導入

アミラーゼ分泌におけるPKAの役割を確立するには、PKAの触媒サブユニット (分子量38 kDa) を直接耳下腺細胞に導入するのが最も確実である。1990年代に入り、サポニンよりひと回り大きい直径約15 nmの穴を細胞膜にあけるストレプトリシン-O (SL-O) を使い、細胞内に高分子物質を導入する論文をしばしば見かけるようになった。しかし、論文で使用されているウエルカム社製のSL-Oは日本では手に入らない。私は、カタログを徹底的に調べ、数社のSL-Oを取り寄せ、細胞膜穿孔活性を調べた。その結果、GIBCO社製のSL-Oに良好な穿孔活性が認められた。ただし、耳下腺細胞膜の穿孔に必要な

なSL-Oの溶血単位は、論文に報告されているウエルカム社の値より二桁も高かった。

次に、市販されているPKAの品定めを行った。S社の製品は、酵素の安定化剤とともに凍結乾燥されており、安定化剤が分泌顆粒に悪影響を及ぼした。他方、プロメガ社のPKAは極めて純度が高く、安定化剤を含んでいなかった。GIBCO社製のSL-Oとプロメガ社製のPKA触媒サブユニットを組合せ、高価な試薬を節約するため液量を下げる実験系を工夫した。その結果、サポニン処理細胞にcAMPを導入した実験と比べアミラーゼ分泌の割合は明らかに低いが、統計的に有意な分泌促進効果が認められた(図7)。分泌は、熱変性したPKAやPKA阻害ペプチドで前処理したPKAでは起こらないことから、PKAの触媒活性、すなわちタンパク質リン酸化に依存していることが証明された。この研究成果は1994年のJBCに発表され(Takuma & Ichida, 1994a)、日本唾液腺学会の奨励賞を受賞した。日本歯科大学新潟生命歯学部の中井あかね先生は、SL-Oで穿孔した耳下腺細胞にRab27とその関連因子の特異抗体を導入し、アミラーゼ分泌におけるそれら調節因子の役割を次々と明らかにしている(Imai et al., 2004a; Imai et al., 2004b; Imai et al., 2006; Imai et al., 2011; Imai et al., 2012; Imai et al., 2013)。

これまで述べてきたように、PKA阻害剤のH8はタンパク質リン酸化を強く阻害するにもかかわらず、アミラーゼ分泌は全く抑制せず、また、H8より25倍強力といわれるH89によっても、分泌は部分的にしか阻害されなかった(Takuma & Ichida, 1994b)。H89はアミラーゼ分泌を確かに阻害するが、高濃度のH89には明らかに副作用が認められた。他方、耳下腺細胞に導入したPKAの触媒サブユニットはその触媒活性、すなわちタンパク質リン酸化活性に依存して分泌を惹起した。これらの実験結果は明らかに矛盾する。しかし、次章で述べるように、PKAに依存しないcAMPの新たなシグナル伝達分子Epacの発見により、部分的ではあるが、この矛盾は説明可能となった。

3. 第3の謎：PKAかEpacか？

情報ネットワークの研究が、生命活動の隅々まで急速に広がり、膨大かつ精密な情報が集積するにつれ、最古参のシグナル伝達系であるcAMP/PKAの研究は、過去の遺物と見なされ、陽の当たらない片隅に追いやられた。cAMPにふたたび光が当たるのは、1998年PKAを介さない新たな作用機構としてEpac (exchange proteins directly activated by cAMP) が発見されたこと(de Rooij et al., 1998)(Kawasaki et al., 1998)、そして、消化管ホルモン

のインクレチンによるインスリン分泌増強機構の研究が目覚ましく進展したおかげと言っても過言でない(Seino & Shibasaki, 2005)。

血糖が上昇すると膵臓のβ細胞からインスリンが分泌される。これは、グルコース代謝の亢進によって増加したATPがATP依存性Kチャンネルを閉鎖し、その結果、膜電位依存性のCa²⁺チャンネルが開き、β細胞内のCa²⁺濃度が上昇するためと考えられている。実際、β細胞の培養液を低グルコースから高グルコースへと“瞬時に”切り換えると、インスリン分泌は確かに増加する。しかし、培養液のグルコース濃度を生体内のように、ゆっくり時間をかけて徐々に上昇させると、驚いたことに、インスリン分泌はほとんど起こらない。このような状況で、消化管細胞から分泌される2種類のインクレチン、すなわちグルカゴン様ペプチド(GLP1)とグルコース依存性インスリン分泌刺激ペプチド(GIP)は、β細胞のcAMP濃度を上昇させ、PKA系とEpac系の両ルートを介して、Ca²⁺依存性のインスリン分泌を増強すると考えられている。インクレチンやcAMPは、血糖上昇がなければインスリン分泌を促進しないため、異常な低血糖を引き起こさない安全な糖尿病治療薬の開発を目指して、活発な研究が展開している。

Epacによるインスリン分泌増強機構

Epacは、別名cAMP-GEFともよばれ、低分子量Gタンパク質の一種RapをGDPと結合した不活性型からGTPと結合した活性型へと転換するGDP/GTP交換因子として働く。cAMPはEpacの調節ドメインに結合し、GDP/GTP交換作用をもつ触媒ドメインを露出させることでEpacを活性化する。Epacによるインスリン分泌増強機構として、以下のメカニズムが提唱されている(Shibasaki et al., 2014)。

- 1) cAMPによって活性化したEpacは、上述のRap1を活性化し、即分泌可能な分泌顆粒のプール(readily releasable pool: RRP)を増大させる。
- 2) EpacはCa²⁺動員に関わるIP₃受容体とリアノジン受容体に働き、Ca²⁺誘導性のCa²⁺遊離(Ca²⁺-induced Ca²⁺-release: CICR)機構を活性化し、細胞内Ca²⁺濃度を上昇させる。CICRの活性化には、Epacとは別にPKAによるタンパク質リン酸化も関与すると考えられている。
- 3) より複雑なところでは、Epacと結合しインスリン分泌を促進するRim2αの作用機構が、神戸大学の清野進教授のグループにより詳細に解析されている(Yasuda et al., 2010)。RimはRab3-interacting moleculeを意味し、もともとRab3を結合するタンパク質として同定された。

しかし、その後Rab3に加え、図8に示すような分泌に関わる多くのタンパク質と相互作用し、いわゆる足場（スキヤフォールド）タンパク質として機能することが明らかとなった。Rim2 α と結合したRab3Aは分泌顆粒のドッキングに関わり、Munc13-1とSNAREはプライミングを促進し、さらにATP依存性KチャンネルのSUR-1やCa²⁺センサーのPiccolo、そして図には示されていない膜電位依存性のCa²⁺チャンネルを調節し、膜融合を誘導すると考えられている。詳細なメカニズムは不明だが、cAMPと結合したEpacは、足場タンパク質Rim2 α の働きをオーケストラの指揮者のように巧妙に組織化し、Ca²⁺によるインスリン分泌を増強していると推察される。

PKAによるインスリン分泌増強機構

Epacの躍進に刺激されて、PKAによるリン酸化を介して分泌増強するタンパク質もいくつか発見されている（Brozzi et al., 2012 ; Song et al., 2011）。図8に示すMyRIPは、分泌顆粒の輸送に関わるミオシン、およびRab27と結合するタンパク質として同定された（Myosin-Rab27-interacting protein）。その後、PKAと結合してPKAの細胞内局在を規定するPKA anchoring proteinファミ

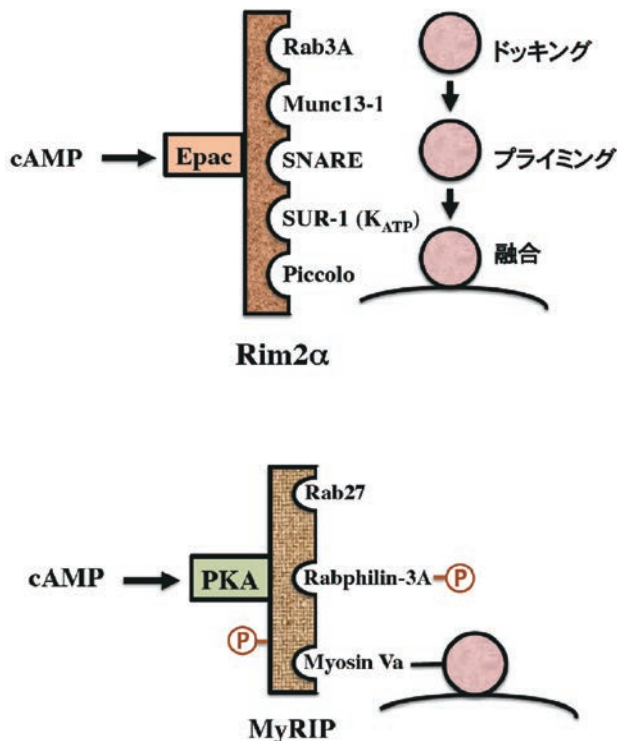


図8 インスリン分泌では、消化管ホルモンのインクレチンにより、EpacとPKAの2つのルートを通じて、Ca²⁺依存性の分泌が増強される。cAMP/Epacが結合するRim2 α とPKAがリン酸化するMyRIPは、ともに足場（スキヤフォールド）タンパク質であり、多くの分泌関連因子が結合し、それらの相互作用が効率化されることによってCa²⁺依存性の分泌が増強すると考えられている。

リーに属する“足場タンパク質”でもあることが明らかとなった（Goehring et al., 2007）。PKAと結合しリン酸化されたMyRIPは、分泌顆粒を連結したMyosin Vaとの結合が可能となり、引き続きPKAによるRabphilin-3Aのリン酸化を促進する（Brozzi et al., 2012）。上述したRim2 α と同様に、MyRIPは多数の分泌関連因子と結合する足場タンパク質であり、PKAによるリン酸化を介して、複合体を構成する各構成員の働きを効率化し、Ca²⁺によるインスリン分泌を増強すると考えられている。

日本歯科大学新潟生命歯学部の新井先生は、耳下腺にもMyRIP（別名Slac2-c）が発現しており、分泌顆粒の上でSlac2-cとRab27Bが複合体を形成していることを明らかにした（Imai et al., 2004b）。PKAによるリン酸化については検討されていないが、Slac2-cとRab27Bの複合体を壊す特殊な抗体をSL-Oで穿孔した耳下腺細胞に導入し、イソプロテレノールによるアミラーゼ分泌が阻害されるのを確認している。

Epacによる耳下腺アミラーゼ分泌

耳下腺アミラーゼ分泌におけるEpacの関与は、Epacに選択的に結合するcAMP誘導体を用いて調べられた。PKAへの結合にはcAMPのリボースの2'位がOHである必要があるため、この部位をメチル化（O-Me）したcAMP誘導体（8-pCPT-2'-O-Me-cAMP）はEpacを選択的に活性化する。日本歯科大学新潟生命歯学部の下村浩巳教授は、このEpac選択的誘導体が、cAMPの約30%程度ではあるが耳下腺アミラーゼ分泌を誘導すること、しかもPKA阻害剤のH89がこの分泌を阻害しないことを明らかにした（Shimomura et al., 2004）。耳下腺にはEpac1とRim2が発現しており、これらがPKA非依存性のアミラーゼ分泌に関与していると想像される。他方、cAMPのアデニン塩基のN6を修飾した誘導体は、PKAを選択的に活性化する。我々の過去の実験で、N6ベンゾイルcAMPはアミラーゼ分泌を強力に促進しており（Takuma, 1990）、耳下腺アミラーゼ分泌ではPKA系の役割がEpac系よりも大きいかも知れない。唾液腺におけるEpacの研究は、まだ端緒についたばかりである。

これまで見てきたように、アミラーゼ分泌とインスリン分泌におけるcAMPの役割には顕著な違いが認められる。PKA系とEpac系のいずれを介するにせよ、cAMPは単独でもアミラーゼ分泌を惹起できるのに対し、cAMP単独ではインスリン分泌を誘導できない点である。この違いを全く無視して、耳下腺アミラーゼ分泌においても、インスリン分泌と同様に、分泌に直接関与するのはCa²⁺であり、cAMPはCa²⁺による分泌を増強しているだ

けと解釈することに、私は強い違和感を禁じ得ない (Messenger et al., 2014).

4. 第4の謎：唾液分泌に関するSNAREは何か？

2013年のノーベル医学生理学賞は、神経分泌と細胞内小胞輸送における「SNARE仮説」(Sollner et al., 1993)の確立に貢献した3人の研究者、Rothman, Scheckman, Sudhofに授与された。SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) とは、細胞内の小胞輸送において、小胞膜とその輸送先の標的膜を融合させる過程に働く1群の膜タンパク質をさし、ヒトでは約40種類のSNARE遺伝子が知られている (図9) (Hong, 2005)。最も研究の進んでいる神経細胞では、神経伝達物質を含むシナプス小胞膜にv-SNARE (vesicle-SNARE) としてVAMP2、標的となるシナプス前膜にはt-SNARE (target-SNARE) としてSyntaxin1とSNAP25が存在する。各SNAREには、SNAREモチーフと呼ばれる約70アミノ酸からなるαヘリックス構造が存在し、適切な組合せのv-SNAREとt-SNAREでは、互いのSNAREモチーフ同士がしめ縄のように巻き付いてコイルドコイル構造を形成する (Qa,b,c + Rの法則)。このSNARE複合体形成により、ジッパーが閉じられるようにシナプス小胞とシナプス前膜が接触し、融合すると考えられている (Jahn & Scheller, 2006)。一般的な分泌タンパク質の場合、粗面小胞体で合成されたタンパク質を含む小胞はゴルジ装置に輸送され、ゴルジ装置での選別濃縮をへて分泌小胞となった後、細胞膜の特定領域と融合し細胞外へ放出される。複雑に入り組んだ細胞内物流において、SNAREは“お届け先”と“配達時刻”

を厳密に指定する“伝票”の役割を果たしている。

遺伝子ノックアウト (KO) マウスを用いた研究により、唾液タンパク質の開口分泌に関わることが確立しているSNAREは、今のところVAMP8だけである (Wang et al., 2004)。VAMP8 KOマウスの腺外分泌細胞には分泌低下による分泌顆粒の異常な蓄積が認められたが、2007年の続報で、唾液腺を含む他の外分泌腺にも同様の影響が確認された (Wang et al., 2007)。VAMP8はアミラーゼやムチンを含む分泌顆粒膜に発現するv-SNAREであるが、VAMP8が唾液腺におけるv-SNAREの主役かどうか、結論はまだ出ていない。実際、VAMP8をKOしてもアミラーゼ分泌は完全には停止しない。膵臓では、VAMP8は異常に強い分泌刺激により分泌顆粒同士が次々と数珠つなぎに融合する複合分泌や、アルコール性膵炎の際、分泌顆粒が正常な分泌とは逆方向の基底膜と融合する病的な分泌に関与することが知られている (Cosen-Binker et al., 2008 ; Gaisano, 2001 ; Lam et al., 2007)。

それでは正常な分泌に関わるv-SNAREは何であろうか。VAMP2がその有力候補と考えられている。日本大学松戸歯学部の吉垣純子先生は、SL-Oで細胞膜に穴をあけた耳下腺細胞に、VAMP2を特異的に加水分解するボツリヌス毒素Bを導入し、VAMP2の分解レベルに相当するアミラーゼ分泌の低下を観察している (Fujita-Yoshigaki et al., 1996)。他方、腺外分泌細胞にはVAMP2とVAMP8を個別に発現する2種類の分泌顆粒が存在するという報告もある (Weng et al., 2007)。VAMP2とVAMP8のどちらが主要なv-SNAREか、結論はまだ出ていない。

| 名称 | 細胞内局在 | アミノ酸 | SNAREモチーフ | タイプ |
|------------|------------|------|-----------------|--------|
| Syntaxin1 | PM | 288 | 202-254 | Qa |
| Syntaxin2 | PM | 288 | 201-253 | Qa |
| Syntaxin3 | PM | 289 | 201-253 | Qa |
| Syntaxin4 | PM | 297 | 210-262 | Qa |
| Syntaxin5 | Go | 301 | 219-271 | Qa |
| Syntaxin6 | TGN, End | 255 | 173-225 | Qc |
| Syntaxin7 | EE, LE | 261 | 175-227 | Qa |
| Syntaxin8 | EE, I.F. | 236 | 155-207 | Qc |
| Syntaxin10 | TGN | 249 | 167-219 | Qc |
| Syntaxin11 | TGN, LE | 287 | 214-266 | Qa |
| Syntaxin13 | EE | 276 | 188-240 | Qa |
| Syntaxin16 | TGN | 325 | 240-292 | Qa |
| Syntaxin17 | ER | 302 | 172-224 | Qa |
| Syntaxin18 | ER | 335 | 253-305 | Qa |
| SNAP-23 | PM | 211 | 24-76, 156-208 | Qb, Qc |
| SNAP-25 | PM | 206 | 29-81, 150-202 | Qb, Qc |
| SNAP-29 | Go, End | 258 | 60-112, 206-258 | Qb, Qc |
| VAMP1 | SV | 118 | 34-86 | R |
| VAMP2 | SV | 116 | 32-84 | R |
| VAMP3 | EE, RE | 100 | 15-67 | R |
| VAMP4 | TGN, EE | 141 | 53-105 | R |
| VAMP5 | PM | 116 | 6-58 | R |
| VAMP7 | LE, Ly, PM | 220 | 126-178 | R |
| VAMP8 | EE, LE | 100 | 13-65 | R |

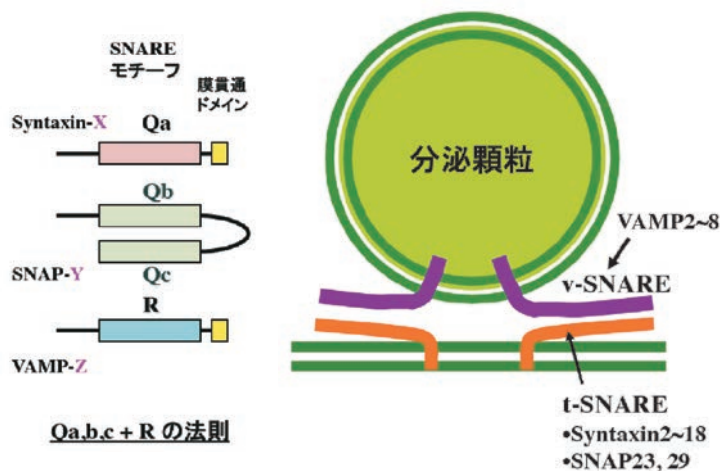


図9 SNARE仮説とおもなSNAREタンパク質。ヒトでは輸送小胞と輸送先となる膜系に約40種類のSNAREタンパク質が発現しており、SNAREモチーフがQa, b, c + Rとなる組み合わせで複合体が形成され、膜融合が起こると考えられている。

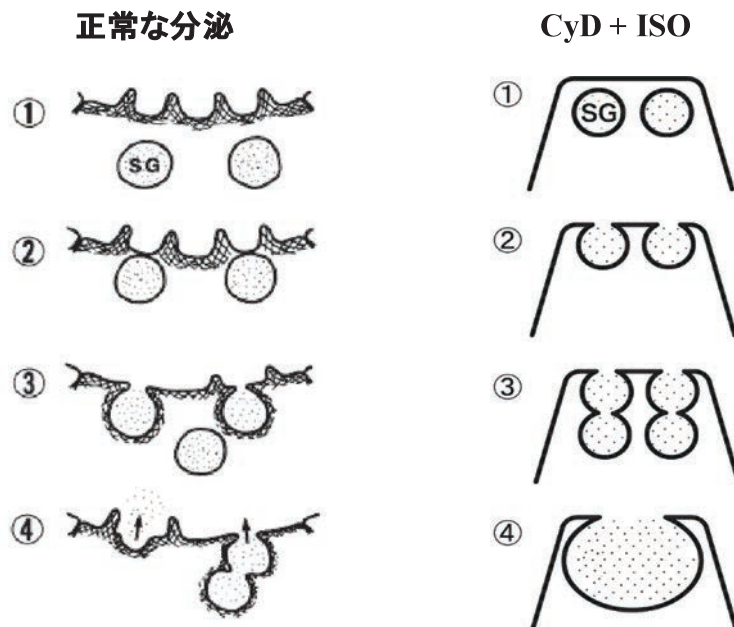
唾液腺のSNARE複合体

1997年の論文で、私はラットの耳下腺にVAMP2とNSF、 α SNAPを含む何らかのSNARE複合体が存在することを報告した (Takuma et al., 1997a). また2000年の論文では、免疫沈降によりSNAP23とSyntaxin4のt-SNARE同士の複合体は検出できるが、t-SNAREと分泌顆粒膜のv-SNAREが結合した“トランス型のSNARE複合体” (分泌顆粒膜と細胞膜の膜融合時に形成され、分泌後は解体・リサイクルされる複合体) は検出できないことを報告した (Takuma et al., 2000).

その後、SNAREの免疫沈降に使える良い抗体が多数作られ、またウエスタンブロット法に用いる化学発光液と検出装置の感度が格段に上昇した。これらの技術的進歩のおかげで、2012年、私達はHeLa細胞においてt-SNAREとv-SNAREが結合したトランス型複合体を検出することに成功した (Okayama et al., 2012). トランス型複合体を検出するには、複合体の解体・リサイクルに関わるNSFの働きを止めるため、N-エチルマレイミドという試薬を用い、細胞を低温で処理する必要があった。この方法を応用し、私は10年余り前に挫折した耳下腺細胞のトランス型複合体の検出に再チャレンジすることにした。

優秀な抗体のおかげで、耳下腺細胞に存在する多様なSNARE複合体を検出することができた。その中にはアミラーゼ分泌に関わるトランス型複合体の候補も含まれていたが、残念なことにN-エチルマレイミドで処理した耳下腺をISOで分泌刺激しても、SNARE複合体の増加は認められなかった。そこで、私はアクチン線維を脱重合するサイトカラシンD (CyD) の使用を思いついた。CyDのことは、10年間、夢のなかでずっと考えていたような気がする。過去の研究で、CyDは管腔側細胞膜直下のアクチン線維を脱重合することにより、分泌顆粒と細胞膜の接近を促進すること、また、融合した分泌顆粒膜の回収をストップすることにより、管腔側細胞膜を膨大させることが知られていた (図10) (Segawa & Yamashina, 1989; Tojyo et al., 1989; Okumura et al., 1990). CyDにより、私は分泌顆粒膜の回収・再利用系がストップすると同時に、SNARE複合体の解体・再利用系もストップするのではないかと考えたのである。

CyDの存在下、アミラーゼ分泌を促進するISOで耳下腺を刺激し、様々な抗体を用いてSNAREタンパク質を免疫沈降した。その結果、abcam社製のSNAP23抗体を使って免疫沈降し、長時間露光した時、それまでの一般的な露光時間では検出できなかった極めて微量のVAMP2を検出することに成功した。しかも、このSNAP23-



Segawa & Yamashina 1989

膜とSNAREのリサイクル停止?

図10 唾液腺の管腔側細胞膜の直下に存在するアクチン線維層は、分泌刺激がない場合、分泌顆粒と細胞膜の接近を妨げるバリアーとして機能しているが、ひとたび分泌が刺激されると、分泌物の排出と融合した分泌顆粒膜の迅速な回収・リサイクルに関与すると考えられている。アクチン線維を脱重合するサイトカラシンD (CyD) は、アクチン線維層を破壊するため、分泌物の排出と分泌顆粒膜の回収がストップし、管腔が膨大する。

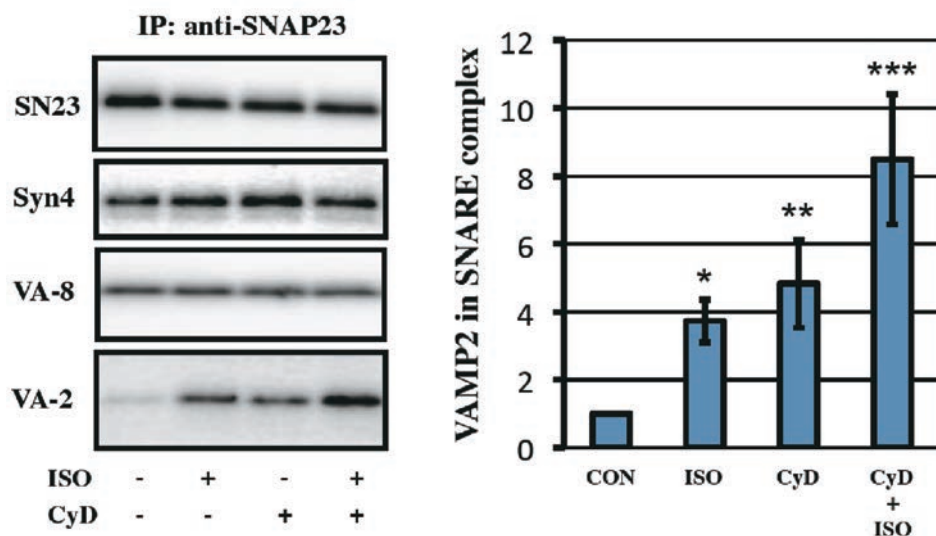


図11 サイトカラシンD (CyD) 存在下, 耳下腺をイソプロテレノール (ISO) で分泌刺激すると, 通常はほとんど検出できないSNAP23 (SN23) とVAMP2 (VA-2) のトランス型SNARE複合体が有意に増加し, 検出可能となる. Syn4, Syntaxin4; VA-8, VAMP8.

VAMP2複合体は, ISOとCyDの単独処理によりそれぞれ明瞭に増加し, 両者の同時刺激によってさらに相加的な増加が認められた (図11) (Takuma et al., 2013). 私は, この微量の複合体こそ, 分泌時に細胞膜上で一過性に形成されるが, その後の解体・再利用が極めてすみやかに行われるため, 正常な唾液腺では存在量が非常に少ない“トランス型SNARE複合体”ではないかと考えている.

この実験により, 細胞膜に存在するt-SNAREのSNAP23と分泌顆粒膜に存在するv-SNAREのVAMP2が唾液アミラーゼ分泌に関与している可能性が強く示唆されたが, 未解決の問題が2点残った. 第1に, トランス型SNARE複合体のもう一つのt-SNAREであるSyntaxinが何か不明であること. 第2に, VAMP8の役割を示唆する結果が得られなかったことである.

唾液分泌に関わるSyntaxinは何か?

分泌方向が厳密に規定されている外分泌細胞では, 主として基底側細胞膜に発現するSyntaxin4が正常な分泌におけるSyntaxinの候補から外されるのは仕方のないことである. 腺外分泌では, 管腔側細胞膜に発現するSyntaxin2と分泌顆粒膜に発現するSyntaxin3が有力候補に想定されているが, 確実な証拠はない (Pickett et al., 2007; Weng et al., 2007).

3種類の分泌顆粒 (α 顆粒, 有芯小胞, リソソーム顆粒) を含む血小板では, v-SNAREとしてVAMP8が主要な役割を果たし, VAMP2とVAMP3が補助的な役割を果たしている. 他方t-SNAREとしてはSNAP23に加えて, 中和抗体の導入実験からSyntaxin2またはSyntaxin4の関

与が想像されていた. ところが, 最近, 家族性血球貪食症候群 (familial hemophagocytic lymphohistiocytosis; FHL) という遺伝病の解析と, Syntaxin2, Syntaxin4のKO細胞を用いた解析から, 血小板分泌におけるSyntaxin2とSyntaxin4の役割は完全に否定され, Syntaxin11が必須の役割を果たしていることが証明された (Ye et al., 2012). Syntaxin11は, ほとんどの組織に発現しており, 膜貫通ドメインをもたないものの大部分膜画分に存在し, SNAP23と複合体を形成する. Syntaxin11は, 過去に外分泌への関与が想定されたことがなく, 唾液腺での研究が待たれる.

SNAP23のリン酸化による調節

副腎髄質のクロマフィン細胞では, SNAP23と遺伝子的に近いSNAP25がPKAによってリン酸化されることにより, 即分泌可能な分泌顆粒のプール (readily releasable pool: RRP) が増大するといわれている (Nagy et al., 2004). インスリン分泌細胞では, SNAP25の結合タンパク質であるsnapinをPKAがリン酸化し, その結果, SNAP25とVAMP2の相互作用が促進され, 分泌が増強すると考えられている (Song et al., 2011). SNAP23はSNAP25のユビキタスなホモログであり, PKAによってリン酸化されるかどうか大変興味深い. 実際, SNAP23のリン酸化が分泌を促進している証拠がある. ただし, リン酸化を触媒する酵素はPKAではなくIkBキナーゼ (IKK) であり, 分泌促進が確認されているのは肥満細胞と血小板である (Karim et al., 2013; Suzuki & Verma, 2008). IKK遺伝子のコンディショナル・ノックアウト

と薬物による阻害により、SNAP23の95番目のセリンまたは120番目のセリンのリン酸化がブロックされた肥満細胞と血小板では、分泌が著しく低下し、出血時間の延長が見られた。今の所、SNAP23のセリンがPKAによってもリン酸化されるかどうか、またIKKシグナルの上流にcAMPやPKAの関与があるかどうかは知られていない。前半で述べたISOによってリン酸化される26 kDa膜タンパク質とSNAP23の異同も、大変気になる所である。

おわりに

長年研究対象としてきたcAMPによる唾液タンパク質の分泌機構について、直接関わることできたわずかばかりの研究成果と背後に残された未解明の謎について述べてきた。最大の謎、PKAと開口分泌をつなぐPKAの基質は何かという課題は、唾液腺の分泌機構だけに留まらず、広く生物学的普遍性をもった課題と考えられるが、謎のまま埃をかむり、記憶の底に沈む可能性もある。日進月歩の生命科学研究が、副産物のような形であっても、この課題を解き明かす日が来ることを楽しみに待ちたいと思う。

謝 辞

総説執筆を許可して下さった石井久淑編集長に感謝申し上げます。総説の中にお名前を記させて頂いた諸先生と、紙幅の都合でお名前を割愛せざるを得なかった諸先生には、研究を進める上で大変お世話になりました。心から感謝申し上げます。また、研究についてディスカッションし、アドバイスを頂いた唾液腺ゼミの諸先生のご親切に感謝申し上げます。最後に、これまで長い間実験をサポートしてくれた生化学分野の荒川俊哉准教授、歯科矯正学分野の岡山三紀助教、そして旧教室員の設楽彰子博士に心から感謝致します。

文 献

- Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* 220 : 345–360, 1984.
- Brozzi F, Lajus S, Diraison F, Rajatileka S, Hayward K, Regazzi R, Molnar E & Varadi A. MyRIP interaction with MyoVa on secretory granules is controlled by the cAMP–PKA pathway. *Mol. Biol. Cell* 23 : 4444–4455, 2012.
- Butcher FR & Putney JW, Jr.. Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 13 : 215–249, 1980.
- Cosen–Binker LI, Binker MG, Wang CC, Hong W & Gaisano HY. VAMP8 is the v–SNARE that mediates basolateral exocytosis in a mouse model of alcoholic pancreatitis. *J. Clin. Invest.* 118 : 2535–2551, 2008.
- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A & Bos JL. Epac is a Rap1 guanine–nucleotide–exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396 : 474–477, 1998.
- Fujita–Yoshigaki J, Dohke Y, Hara–Yokoyama M, Kamata Y, Kozaki S, Furuyama S & Sugiya H. Vesicle–associated membrane protein 2 is essential for cAMP–regulated exocytosis in rat parotid acinar cells. The inhibition of cAMP–dependent amylase release by botulinum neurotoxin B. *J. Biol. Chem.* 271 : 13130–13134, 1996.
- Gaisano HY. Supramaximal cholecystokinin displaces Munc18c from the pancreatic acinar basal surface, redirecting apical exocytosis to the basal membrane. *J. Clin. Invest.* 108 : 1597–1611, 2001.
- Goehring AS, Pedroja BS, Hinke SA, Langeberg LK & Scott JD. MyRIP anchors protein kinase A to the exocyst complex. *J. Biol. Chem.* 282 : 33155–33167, 2007.
- Helman J, Kuyatt BL, Takuma T, Seligmann B & Baum BJ. ATP–dependent calcium transport in rat parotid basolateral membrane vesicles. Modulation by agents which elevate cyclic AMP. *J. Biol. Chem.* 261 : 8919–8923, 1986.
- Hidaka H, Inagaki M, Kawamoto S & Sasaki Y. Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23 : 5036–5041, 1984.
- Hong W. SNAREs and traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* 1744 : 120–144, 2005.
- Imai A, Nashida T & Shimomura H. Roles of Munc18–3 in amylase release from rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 422 : 175–182, 2004a.
- Imai A, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H & Fukuda M. The small GTPase Rab27B regulates amylase release from rat parotid acinar cells. *J. Cell Sci.* 117 : 1945–1953, 2004 b.
- Imai A, Yoshie S, Nashida T, Shimomura H & Fukuda M. Functional involvement of Noc2, a Rab27 effector, in rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 455 : 127–135, 2006.
- Imai A, Yoshie S, Ishibashi K, Haga–Tsujiyama M, Nashida T, Shimomura H & Fukuda M. EPI64 protein

- functions as a physiological GTPase-activating protein for Rab27 protein and regulates amylase release in rat parotid acinar cells. *J. Biol. Chem.* 286 : 33854–33862, 2011.
- Imai A, Yoshie S, Haga-Tsujimura M, Nashida T & Shimomura H. Exocyst subunits are involved in isoproterenol-induced amylase release from rat parotid acinar cells. *Eur. J. Oral Sci.* 120 : 123–131, 2012.
- Imai A, Ishida M, Fukuda M, Nashida T & Shimomura H. MADD/DENN/Rab3GEP functions as a guanine nucleotide exchange factor for Rab27 during granule exocytosis of rat parotid acinar cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 536 : 31–37, 2013.
- Jahn R & Scheller RH. SNAREs—engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 : 631–643, 2006.
- Kanamori T, Hayakawa T & Nagatsu T. Adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase and amylase secretion from rat parotid gland. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57 : 394–398, 1974.
- Karim ZA, Zhang J, Banerjee M, Chicka MC, Al Hawas R, Hamilton TR, Roche PA & Whiteheart SW. IkappaB kinase phosphorylation of SNAP-23 controls platelet secretion. *Blood* 121 : 4567–4574, 2013.
- Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, Toki S, Nakaya M, Matsuda M, Housman DE & Graybiel AM. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science* 282 : 2275–2279, 1998.
- Lam PP, Cosen Binker LI, Lugea A, Pandol SJ & Gaisano HY. Alcohol redirects CCK-mediated apical exocytosis to the acinar basolateral membrane in alcoholic pancreatitis. *Traffic* 8 : 605–617, 2007.
- Messenger SW, Falkowski MA & Groblewski GE. Ca(2+)-regulated secretory granule exocytosis in pancreatic and parotid acinar cells. *Cell Calcium* 55 : 369–375, 2014.
- Nagy G, Reim K, Matti U, Brose N, Binz T, Rettig J, Nehler E & Sorensen JB. Regulation of releasable vesicle pool sizes by protein kinase A-dependent phosphorylation of SNAP-25. *Neuron* 41 : 417–429, 2004.
- Niimura Y, Matsui A & Touhara K. Extreme expansion of the olfactory receptor gene repertoire in African elephants and evolutionary dynamics of orthologous gene groups in 13 placental mammals. *Genome Res.* 24 : 1485–1496, 2014.
- Okayama M, Shitara A, Arakawa T, Tajima Y, Mizoguchi I & Takuma T. SNARE proteins are not excessive for the formation of post-Golgi SNARE complexes in HeLa cells. *Mol. Cell Biochem.* 366 : 159–168, 2012.
- Okumura K, Tojo Y & Kanazawa M. Changes in microfilament distribution during amylase exocytosis in rat parotid salivary glands in vitro. *Arch. Oral Biol.* 35 : 677–679, 1990.
- Pickett JA, Campos-Toimil M, Thomas P, Edwardson JM (2007). Identification of SNAREs that mediate zymogen granule exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 359 (3) : 599–603.
- Quissell DO, Deisher LM & Barzen KA. The rate-determining step in cAMP-mediated exocytosis in the rat parotid and submandibular glands appears to involve analogous 26-kDa integral membrane phosphoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 3237–3241, 1985.
- Segawa A & Yamashina S. Roles of microfilaments in exocytosis : a new hypothesis. *Cell Struct. Funct.* 14 : 531–544, 1989.
- Seino S & Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis. *Physiol. Rev.* 85 : 1303–1342, 2005.
- Shibasaki T, Takahashi T, Takahashi H & Seino S. Cooperation between cAMP signalling and sulfonylurea in insulin secretion. *Diabetes Obes. Metab.* 16 Suppl. 1 : 118–125, 2014.
- Shimomura H, Imai A & Nashida T. Evidence for the involvement of cAMP-GEF (Epac) pathway in amylase release from the rat parotid gland. *Arch. Biochem. Biophys.* 431 : 124–128, 2004.
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Tempst P & Rothman JE. SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362 : 318–324, 1993.
- Song WJ, Seshadri M, Ashraf U, Mdluli T, Mondal P, Keil M, Azevedo M, Kirschner LS, Stratakis CA & Hussain MA. Snapin mediates incretin action and augments glucose-dependent insulin secretion. *Cell Metab.* 13 : 308–319, 2011.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ & Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 306 : 67–69, 1983.
- Suzuki K & Verma IM. Phosphorylation of SNAP-23 by IkappaB kinase 2 regulates mast cell degranulation. *Cell* 134 : 485–495, 2008.
- Takemura H. Changes in cytosolic free calcium concentra-

- tion in isolated rat parotid cells by cholinergic and beta-adrenergic agonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 131 : 1048–1055, 1985.
- Takuma T, Kuyatt BL & Baum BJ. Alpha 1-adrenergic inhibition of protein synthesis in rat submandibular cells. *Am. J. Physiol.* 247 : G284–289, 1984.
- Takuma T & Baum BJ. Na⁺-dependent transport of alpha-aminoisobutyrate in isolated basolateral membrane vesicles from rat parotid glands. *Biochim. Biophys. Acta* 812 : 453–459, 1985.
- Takuma T, Kuyatt BL & Baum BJ. Calcium transport mechanisms in basolateral plasma membrane-enriched vesicles from rat parotid gland. *Biochem. J.* 227 : 239–245, 1985.
- Takuma T & Ichida T. Does cyclic AMP mobilize Ca²⁺ for amylase secretion from rat parotid cells? *Biochim. Biophys. Acta* 887 : 113–117, 1986a.
- Takuma T & Ichida T. Phorbol ester stimulates amylase secretion from rat parotid cells. *FEBS lett.* 199 : 53–56, 1986b.
- Takuma T. Evidence against direct involvement of cyclic AMP-dependent protein phosphorylation in the exocytosis of amylase. *Biochem. J.* 256 : 867–871, 1988.
- Takuma T & Ichida T. Amylase secretion from saponin-permeabilized parotid cells evoked by cyclic AMP. *J. Biochem.* 103 : 95–98, 1988.
- Takuma T. Evidence for the involvement of cAMP-dependent protein kinase in the exocytosis of amylase from parotid acinar cells. *J. Biochem.* 108 : 99–102, 1990.
- Takuma T & Ichida T. Cyclic AMP antagonist Rp-cAMPS inhibits amylase exocytosis from saponin-permeabilized parotid acini. *J. Biochem.* 110 : 292–294, 1991a.
- Takuma T & Ichida T. Okadaic acid inhibits amylase exocytosis from parotid acini stimulated by cyclic AMP. *FEBS lett.* 285 : 124–126, 1991b.
- Takuma T, Ichida T, Okumura K & Kanazawa M. Protein phosphatase inhibitor calyculin A induces hyperphosphorylation of cytokeratins and inhibits amylase exocytosis in the rat parotid acini. *FEBS lett.* 323 : 145–150, 1993.
- Takuma T & Ichida T. Catalytic subunit of protein kinase A induces amylase release from streptolysin O-permeabilized parotid acini. *J. Biol. Chem.* 269 : 22124–22128, 1994a.
- Takuma T & Ichida T. Evidence for the involvement of protein phosphorylation in cyclic AMP-mediated amylase exocytosis from parotid acinar cells. *FEBS lett.* 340 : 29–33, 1994b.
- Takuma T, Tagaya M & Ichida T. Evidence for the putative docking/fusion complex of exocytosis in parotid acinar cells. *FEBS lett.* 404 : 34–36, 1997a.
- Takuma T, Tajima Y & Ichida T. Regulation of CREB phosphorylation by cAMP and Ca²⁺ in parotid acinar cells. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 43 : 563–570, 1997b.
- Takuma T, Arakawa T & Tajima Y. Interaction of SNARE proteins in rat parotid acinar cells. *Arch. Oral Biol.* 45 : 369–375, 2000.
- Takuma T, Shitara A, Arakawa T, Okayama M, Mizoguchi I & Tajima Y. Isoproterenol stimulates transient SNAP23-VAMP2 interaction in rat parotid glands. *FEBS Lett.* 587 : 583–589, 2013.
- 東城庸介. 蛍光指示薬を用いた唾液腺カルシウム動態の研究. その回顧と展望. *日唾誌* 55 : 59–68, 2014.
- Tojyo Y, Okumura K, Kanazawa M & Matsumoto Y. Effect of cytochalasin D on acinar cell structure and secretion in rat parotid salivary glands in vitro. *Arch. Oral Biol.* 34 : 847–855, 1989.
- Tojyo Y & Matsumoto Y. Inhibitory effects of loading with the calcium-chelator 1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid (BAPTA) on amylase release and cellular ATP level in rat parotid cells. *Biochem. Pharmacol.* 39 : 1775–1779, 1990.
- Tojyo Y, Tanimura A, Nezu A & Matsumoto Y. Activation of beta-adrenoceptors does not cause any change in cytosolic Ca²⁺ distribution in rat parotid acinar cells. *Eur. J. Pharmacol.* 360 : 73–79, 1998.
- Wang CC, Ng CP, Lu L, Atlashkin V, Zhang W, Seet LF & Hong W. A role of VAMP8/endobrevin in regulated exocytosis of pancreatic acinar cells. *Dev. Cell* 7 : 359–371, 2004.
- Wang CC, Shi H, Guo K, Ng CP, Li J, Gan BQ, Chien Liew H, Leinonen J, Rajaniemi H, Zhou ZH, Zeng Q & Hong W. VAMP8/endobrevin as a general vesicular SNARE for regulated exocytosis of the exocrine system. *Mol. Biol. Cell* 18 : 1056–1063, 2007.
- Weng N, Thomas DD & Groblewski GE. Pancreatic acinar cells express vesicle-associated membrane protein 2- and 8-specific populations of zymogen granules with distinct and overlapping roles in secretion. *J. Biol. Chem.* 282 : 9635–9645, 2007.

Yasuda T, Shibasaki T, Minami K, Takahashi H, Mizoguchi A, Uriu Y, Numata T, Mori Y, Miyazaki J, Miki T & Seino S. Rim2alpha determines docking and priming states in insulin granule exocytosis. *Cell Metab.* 12 : 117–129, 2010.

Ye S, Karim ZA, Al Hawas R, Pessin JE, Filipovich AH & Whiteheart SW. Syntaxin–11, but not syntaxin–2 or syntaxin–4, is required for platelet secretion. *Blood* 120 : 2484–2492, 2012.



田隈 泰信

昭和49年 3月 北海道大学理学部生物学科 卒業
 昭和49年 4月 城西歯科大学口腔解剖学第1講座（久米川 正好 教授）助手
 昭和55年12月 北海道大学 理学博士
 昭和56年 4月 東日本学園大学歯学部口腔生化学講座（市田 篤郎 教授）講師
 昭和58年 3月 米国NIH（Dr. Bruce Baum）留学
 平成10年 6月 北海道医療大医学歯学部生化学分野 教授

〔原著〕

*Porphyromonas gingivalis*由来Lipopolysaccharide長期刺激による ヒト歯根膜線維芽細胞における老化抑制関連遺伝子のDNAメチル化解析

高井 理衣¹⁾, 原田 文也¹⁾, 森川 哲郎¹⁾, Bhoj Raj Adhikari¹⁾, 伊藤 - 小原 純¹⁾, 中條 貴俊¹⁾,
宇津宮 雅史¹⁾, 植原 治²⁾, 吉田 光希¹⁾, 佐藤 惇¹⁾, 西村 学子¹⁾, 千葉 逸朗²⁾, 安彦 善裕¹⁾

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 口腔構造・機能発育学系 保健衛生学分野

DNA methylation analysis of Anti-aging related genes in Human Periodontal Ligament Fibroblasts by long-term stimulus of Lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis*

Rie TAKAI¹⁾, Fumiya HARADA¹⁾, Tetsuro MORIKAWA¹⁾, Bhoj Raj ADHIKARI¹⁾, Jun ITOH-OBARA¹⁾,
Masafumi UTSUNOMIYA¹⁾, Osamu UEHARA²⁾, Koki YOSHIDA¹⁾, Jun SATO¹⁾, Michiko NISHIMURA¹⁾,
Itsuo CHIBA²⁾, Yoshihiro ABIKO¹⁾

1) Division of Oral Medicine and Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
2) Division of Disease Control and Molecular Epidemiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : DNA methylation, *Porphyromonas gingivalis*, Lipopolysaccharide, Human periodontal ligament fibroblasts, Periodontal disease

Abstract

Objectives : Details of how DNA methylation is involved in periodontal disease are not fully understood. Lipopolysaccharide (LPS) derived from *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) is involved in the progress of periodontal diseases, and we have recently developed an in vitro model of LPS infection in human periodontal fibroblast cells (HPdLFs) for 1 month. In this study, we examined DNA methylation in HPdLFs stimulated with LPS derived from *P. gingivalis* for 1 month. We investigated the hypermethylation of Aging-related genes and examined whether hypermethylation affect their transcription levels.

Methods : The HPdLFs were grown in Dulbecco's Modified Eagle's medium containing 10% fetal bovine serum. The culture was repeated, alternating 3 days with LPS derived from *P. gingivalis* and 3 days without LPS for 1 month. Untreated samples were used as

controls. The DNA was analyzed using human CpG island microarrays. A quantitative methylation-specific polymerase chain reaction was carried out to confirm the reproducibility of the microarray data. The expression levels of mRNA of the selected Aging-related genes from the data were analyzed by quantitative RT-PCR.

Results : We identified 4 Aging-related genes with hypermethylation at the CpG islands of the promoter region that exhibited 4-fold hypermethylation over the controls. Among these genes, the hypermethylation of the Klotho gene induced a significantly downregulated expression of the mRNA.

Conclusions : These results indicate that LPS derived from *P. gingivalis* may cause DNA hypermethylation of the Klotho gene followed by a downregulated expression of the transcriptional level.

緒 論

歯周炎の発症, 進行には, 細菌感染を始めとする外的要因以外に, 老化や全身疾患, ホルモン, 遺伝的な素因

などの内的な要因も大きく関わっていると言われている(吉江ら, 2013). 最近になり, 外的要因が遺伝子の表現様式を変化させるエピジェネティクスが, 歯周炎の発症, 進行に関与していることが報告されてきている

(Larsson L et al., 2014 ; Barros SP & Offenbacher S, 2014).

エピジェネティクスとは、DNA塩基配列の変異を伴わず、遺伝子の化学的修飾によって発現を変化させ、遺伝子機能を後天的に制御する現象であり、DNAメチル化やヒストン修飾、クロマチン構造の形成、リモデリングなどが知られている (Eggar G et al., 2004). 中でもDNAのメチル化は、一旦、変化が及ぼされると遺伝子機能に長期的な影響を与える可能性があり、疾患の発症、進行に深く関わるとされている (Eggar G et al., 2004). 特に、プロモーター領域の高メチル化は、転写因子の結合を阻害し、遺伝子発現を強く抑制されることから、がん抑制遺伝子のプロモーター領域の高メチル化と発がんとの関係について広く研究が行われてきた (Baylin SB & Jones PA, 2011 ; Dawson MA & Kouzarides T, 2012). 近年、この領域の研究が糖尿病、肥満、アレルギー、自己免疫疾患、精神神経疾患などのがん以外の疾患へと広がりを見せている (Abiko Y et al., 2014). 口腔領域でも、口腔がんや前癌病変の発症、進行への関与について、報告がなされてきており、最近になり歯周病にもエピジェネティクスが関与するという報告がみられるが、その詳細は未だ不明な点が多い (Larsson L et al., 2014 ; Barros SP & Offenbacher S, 2014). 歯周炎の際に形成される歯周ポケットには、歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) を代表とする多くのグラム陰性菌が存在している。それらの細胞壁外膜には、Lipopolysaccharide (LPS) が存在し、生体に対して多様な生物活性を発現させ、歯周炎の病態を形成、進行させる一因になっていると言われている (Ding PH & Jin LJ, 2014). LPSを用いた研究の多くは、数時間や2, 3日程度の刺激によるものであり、DNAのメチル化に変化を及ぼすものとは考えにくい。そこで、最近我々は、*P. gingivalis*由来LPS長期刺激によりDNAのメチル化に変化を及ぼす新たな実験モデルを確立した (Takai et al., 2015).

本研究では、同実験モデルを用いて、*P. gingivalis*由来のLPSで長期間刺激した際のヒト歯根膜線維芽細胞における老化関連遺伝子のDNA高メチル化の解析を行った。

方 法

1. 細胞培養

ヒト歯根膜線維芽細胞HPdLFs (LONZA) を10% Fetal bovine serum (FBS, Sigma) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Sigma) にて24時間培養後、

DMEMに *P. gingivalis* (ATCC33277) 由来LPS (WAKO, 1 µg/ml) を添加したものと非添加したもので3日間ずつ交互に交換し、1ヶ月間培養したものをを用いた。また、コントロールにはLPSの代わりに滅菌水を添加し、同期間培養したものをを用いた。

2. メチレーションアレイ解析

培養した細胞からQiagen® DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いてDNAを抽出した。その後DNAを超音波処理により断片化、精製した後、cytidine 5-dUTP (Cy5) およびcytidine 3-dUTP (Cy3) にて蛍光ラベリング、Human CpG islands 224k arrayにDNAをハイブリダイズ、DNA Microarray Scanner (Agilent technology) にて検出、解析ソフトを用いて解析を行った。得られたアレイ解析結果から、老化に関連する遺伝子のプロモーター領域に位置し、なおかつメチル化レベルが4倍以上を示すものを選出した。

3. mRNA発現解析

培養細胞よりTRIzol® (Invitrogen) にてtotal RNAを抽出した後、濃度を2 µg/µlになるよう調整し、逆転写を行った (SuperScript reverse transcriptase, Invitrogen)。得られたcDNAを用いて、 $\Delta\Delta\text{CT}$ 法を用いた定量的real-time PCR (SYBR® Green, Applied Biosystems) およびRT-PCR (KAPA) により、mRNA発現解析を行った。

4. MSP解析

DNAメチル化の変化の再現性を確認するため、培養した細胞からQiagen® DNeasy Blood & Tissue Kitを用いてDNAを抽出し、Qiagen® Epiect Bisulfite Kit (Qiagen) を用いてBisulfite処理を行った。その後、Methylation-Specific PCR (SYBR® Green) にてメチル化レベル解析を行った。

表1 mRNA発現解析に用いたプライマー配列

| Name | Sequences | Size |
|--------|----------------------------|-------|
| TBX2-F | 5'-CATCCGAAGGTGTCTCTGGT-3' | 159bp |
| TBX2-R | 5'-CCAGTTTTATCACGCGGTCT-3' | |
| KL-F | 5'-AGGGTCCTAGGCTGGAATGT-3' | 158bp |
| KL-R | 5'-CCTCAGGGACACAGGGTTTA-3' | |
| TBX3-F | 5'-AAGACCTAGGGGCTGGAGAG-3' | 196bp |
| TBX3-R | 5'-GGCGAAAAATCAGCAAACAT-3' | |
| NPM1-F | 5'-TTGTTGAAGCAGAGGCAATG-3' | 158bp |
| NPM3-R | 5'-AATATGCACTGGCCCTGAAC-3' | |

表2 MSP解析に用いたプライマー配列

| Name | Sequences | Size |
|---------------|-------------------------------|-------|
| KL-Methyl-F | 5'-ACAAAACATTTCATAAACTCA-3' | 169bp |
| KL-Methyl-R | 5'-AAAACGTTTCGTAAACGCTC-3' | |
| KL-Unmethyl-F | 5'-GAGAGTAGGTGTTTTTTAGTGGT-3' | 169bp |
| KL-Unmethyl-R | 5'-AGTAGGTGTTTTTTAGCGGC-3' | |

5. タンパク質発現解析

タンパク質の発現は、CELISA法にて解析した。コントロール群、LPS刺激群の培養細胞を0.05%トリプシン溶液 (gibco) 処理にて回収後、96 well plateに 3×10^4 個/ml再度播種し、24時間培養した。その後、In Cell ELISA Kit (Cosmo Bio), Klotho抗体 (PEPROTECH) にて処理を行い、Bio-Rad® Model 680 Microplate Reader (Bio Rad) を用いて450nmの吸光度を測定、タンパク質発現量を解析した。

6. 5-AzaによるDNA脱メチル化解析

LPS刺激を加えた細胞群に、脱メチル化させるため100µM濃度の5-Aza-deoxycytidineを加え24時間処理を行った (Uehara et al., 2014)。その後、方法3と同様にtotal RNAを抽出し、逆転写後、脱メチル化処理前後のmRNA発現を比較した。また、方法5と同様にCELISA法を用いてタンパク質発現解析を行った。

7. 統計

得られた結果はすべて、IBM SPSS Statistics 20 (IBM) を用いたMann-Whitney U検定にて比較・検討した ($P < 0.05$)。

結果

1. メチレーションアレイ解析

メチレーションアレイの結果から、プロモーター領域で4倍以上の高メチル化がみられたものの中で老化抑制に関連する遺伝子を検索すると、T-box 2 (TBX 2), Klotho (KL), T-box 3 (TBX 3), Nucleophosmin 1

表3 アレイ解析結果より選出された老化抑制関連遺伝子

| Normalized ratio | Gene Symbol | Description | Position |
|------------------|-------------|-----------------|----------|
| 29.0 | TBX2 | T-box2 | -3874 |
| 21.29 | KL | Klotho | -460 |
| 10.02 | TBX3 | T-box3 | -3079 |
| 8.15 | NPM1 | Nucleophosmin 1 | -132 |

(NPM 1) の4遺伝子が見出された (表3)。

2. mRNA発現解析

アレイ解析により高メチル化のみられた老化抑制関連遺伝子について、mRNA発現解析を行ったところ、KLのみLPS長期刺激により有意な発現低下が認められた ($P < 0.05$, 図1)。

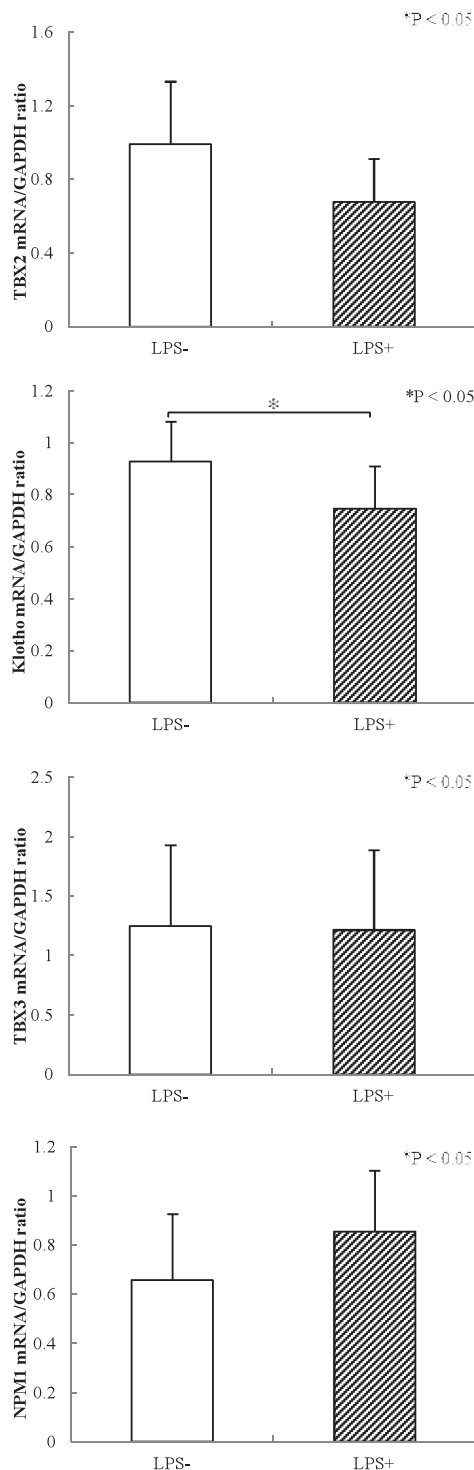


図1 定量的Real-Time RT PCR法による老化抑制関連遺伝子のmRNA発現解析

3. メチル化レベル解析

MSP法において、mRNA発現低下のみられたKLにおけるDNA高メチル化の再現性を確認したところ、コントロール群と比較してLPS長期刺激群ではメチル化レベルの有意な上昇が確認された (P<0.05, 図2)。

4. タンパク質発現解析

mRNA発現に差があってもタンパク質発現と一致しない場合も考えられるため、CELISA法によるタンパク質発現解析を行ったところ、KLはLPS長期刺激により有意な発現低下が認められた (P<0.05, 図3)。

5. 脱メチル化解析

5-Aza-deoxycytidineにより脱メチル化処理を加えたところ、LPS長期刺激群と比較してmRNA発現に有意な回復が認められた (P<0.05, 図4)。また、LPS刺激後に5-Aza-deoxycytidineにより脱メチル化処理を加えた群ではコントロール群と同等のタンパク質発現がみられた (図3)。

考 察

本研究では、歯根膜由来線維芽細胞を*P. gingivalis*由来のLPSで長期刺激をすることによって、老化抑制関連遺伝子であるKlothoが高メチル化し、そのmRNAとタンパクレベルの発現が低下することを明らかにした。歯

周病原菌がKlotho遺伝子を介した歯周組織の老化促進に関与していることが示唆された。

Klothoは、生体内で老化を抑制する働きを持つとされるタンパク質をコードする遺伝子である。主として腎尿管、パラトルモンを発現している副甲状腺の主細胞、脳脈絡膜などに発現し、欠損マウスでは短命であることから老化抑制遺伝子の一つとされてきた (Bian A et al., 2015 ; Sopjani M et al., 2015)。KlothoはFGF19ファミリーの一つであるFGF23とFGFR 4の結合を触媒し、生体内もしくは組織でのカルシウム (Ca) 代謝を調整する働きを持つとされており、発現が低下すると、カルシウム沈着による動脈硬化を引き起こすことが示唆されている。歯周病が動脈硬化のリスクとなることが知られており、本研究から歯周病原菌によるKlotho遺伝子の高メチル化とそれに伴う発現低下がその一因と推測されるが、このことを実証するためには、更なる研究が必要である。

最近我々は、歯根膜由来線維芽細胞の細胞外マトリックス関連遺伝子のいくつかにDNA高メチル化が起これ、遺伝子発現が低下することを報告した (Takai et al., 2015)。その一つのType XIIコラーゲンはメカニカルストレスにより発現が上昇し (Uno et al., 2001)、Type Iコラーゲンを保護する働きのあることが示されており (Nemoto et al., 2010)、この発現の低下は歯周組織の脆弱化につながるものと考えられている。Type XIIコラーゲンは、老化により発現の低下することが報告されている (山羽, 2010)。本研究でのLPSによるKlotho遺伝子の発現低下と、先に報告したType XIIコラーゲンの発現低下は、いずれも歯周病原菌が歯周組織局所の老化を促進するという考えに一致している。老化が歯周炎のリスク因子となることは広く知られているが、歯周病原菌が歯周組織の老化を促進するという新たな概念を提唱するものと考えられた。

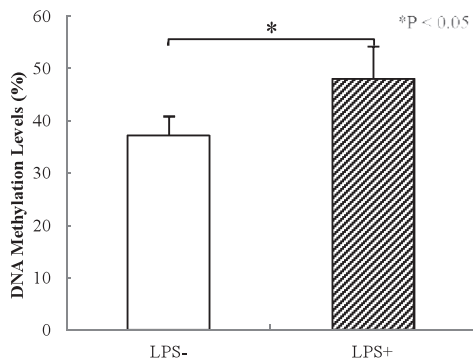


図2 MSP法によるKlotho遺伝子のDNAメチル化レベル解析

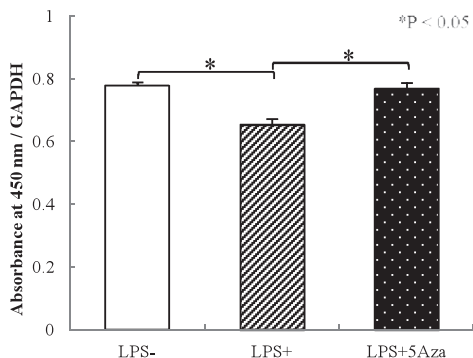


図3 CELISA法によるKlothoタンパク発現解析

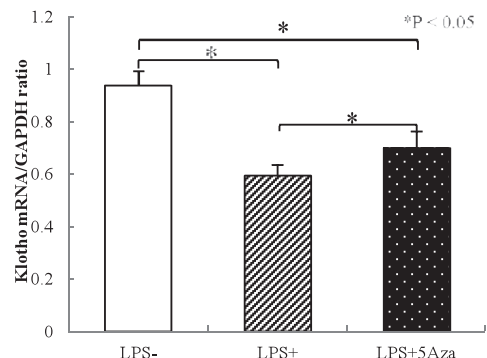


図4 脱メチル化処理によるKlotho遺伝子のmRNA発現解析

mRNAおよびタンパク質発現に回復が認められた。5-Aza-deoxycytidineは、DNAメチル基転移酵素 (DNMT) を阻害することにより脱メチル化を起こす薬剤であり、日本では骨髄異形成症候群に対するエピゲノム薬として2011年に承認されている (Ishikawa, 2014)。さらに、正常肺細胞のCpG islandではメチル化はみられないのに対し、肺癌では異常な高メチル化が起こることでKlothoの発現が低下するという報告がある (Rubinek et al., 2011)。正常な肺細胞と肺癌細胞に対し5-Aza-deoxycytidine処理を行うと、肺癌細胞は脱メチル化されKlotho mRNA発現が回復し、正常な肺細胞にはほとんど影響はみられなかったと報告されている (Rubinek et al., 2011)。5-Aza-deoxycytidineは、日本では腫瘍に対する治療薬として承認されて間もないが、今後歯周治療に対しての局所応用にも期待できる。

結 論

ヒト歯根膜線維芽細胞において歯周病原性細菌である *P. gingivalis* 由来のLPSで長期間刺激を加えたところ、老化に関連するKlotho遺伝子のプロモーター領域CpG islandsにDNA高メチル化を引き起こし、遺伝子発現およびタンパク質の発現を低下させた。これらの発現低下が歯周組織の老化を促進し、歯周疾患の発症、進行に影響を及ぼすことが示唆された。

謝 辞

本研究は、平成26年度北海道医療大学歯学会奨励研究金 (研究テーマ: LPS長期刺激による歯根膜線維芽細胞での老化関連遺伝子のDNAメチル化解析) の助成を受けて実施した。

文 献

- Abiko Y, Uehara O, Fukumoto S, Ohta T. Epigenetics of oral infection and inflammatory diseases – DNA methylation changes in infections and inflammation diseases. *J Oral Biosci* 56 : 105–109, 2014.
- Barros SP, Offenbacher S. Modifiable risk factors in periodontal disease : epigenetic regulation of gene expression in the inflammatory response. *Periodontol* 2000 64 : 95–110, 2014.
- Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11 : 726–734, 2011.
- Bian A, Neyra JA, Zhan M, Hu MC. Klotho, stem cells, and aging. *Clin Interv Aging* 10 : 1233–1243, 2015.
- Dawson MA, Kouzarides T. Cancer epigenetics : from mechanism to therapy. *Cell* 150 : 12–27, 2012.
- Ding PH, Jin LJ. The role of lipopolysaccharide-binding protein in innate immunity : a revisit and its relevance to oral/periodontal health. *J Periodontol Res* 49 : 1–9, 2014.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429 : 457–463, 2004.
- Ishikawa T. Novel therapeutic strategies using hypomethylating agents in the treatment of myelodysplastic syndrome. *Int J Clin Oncol* 19(1) : 10–15, 2014.
- Larsson L, Castilho RM, Giannobile WV. Epigenetics and its Role in Periodontal Diseases – A State-of-the-Art Review. *J Periodontol* 86(4) : 556–568, 2015 Apr.
- Nemoto T, Kajiya H, Tsuzuki T, Takahashi Y, Okabe K. Differential induction of collagens by mechanical stress in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Bio* 55 : 981–987, 2010.
- Rubinek T, Shulman M, Israeli S, Bose S, Avraham A, Zundeleovich A, Evron E, Gal-Yam EN, Kaufman B, Wolf I. Epigenetic silencing of the tumor suppressor klotho in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 133(2) : 649–657, 2012
- Sopjani M, Rinnerthaler M, Kruja J, Dermaku-Sopjani M. Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho. *Curr Mol Med* 15(1) : 27–37, 2015.
- Takai R, Uehara O, Harada F, Utsunomiya M, Chujo T, Yoshida K, Sato J, Nishimura M, Chiba I, Abiko Y. *J Periodontol Res*, in press.
- Uehara O, Abiko Y, Saitoh M, Miyakawa H, Nakazawa F. Lipopolysaccharide extracted from *Porphyromonas gingivalis* induces DNA hypermethylation of runt-related transcription factor 2 in human periodontal fibroblasts. *J Microbiol Immunol Infect* 47(3) : 176–181, 2014.
- Uno K, Abiko Y, Takita H, Ukegawa T, Satoh N, Ueda Y, Ohata N, Kaku T, Kuboki Y. Effects of mechanical stress on the expression of type XII collagen mRNA in human periodontal ligament cells. *J Hard Tissue Biol* 10 : 116–122, 2001.
- 山羽宏行. コラーゲン線維束構築におけるXII型コラーゲン機能と加齢変化. *FRAGRANCE JOURNAL* 1 : 41–46, 2010.
- 吉江弘正・伊藤公一・村上伸也・申基喆 編. 臨床歯周病学 第2版. 医歯薬出版 : 2013, 18–22



高井 理衣

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第4学年
平成17年3月 帯広柏葉高等学校 卒業
平成17年4月 北海道医療大学歯学部歯学科 入学
平成23年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業
平成23年4月～平成24年3月 つがやす歯科医院 臨床研修歯科医
平成24年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学
現在に至る

〔原著〕

Light forceによる矯正学的歯の移動の三次元非線形有限要素法解析岡 由紀恵¹⁾, 小林 優²⁾, 林 一夫¹⁾, 溝口 到¹⁾

1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

2) 神奈川歯科大学顎顔面外科学講座

Three-dimensional nonlinear finite element analysis of orthodontic tooth movement with a light forceYukie OKA¹⁾, Masaru KOBAYASHI²⁾, Kazuo HAYASHI¹⁾, Itaru MIZOGUCHI¹⁾

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

2) Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kanagawa Dental University

Key words : 生力学, 矯正学, 歯根膜, 歯の移動, 骨改造**Abstract**

The purpose of this study is to establish a new simulation method for predicting orthodontic tooth movement involving bone remodeling using three-dimensional (3D) non-linear finite element analysis. Actual clinical data obtained from the tooth movement of the maxillary canine elicited by sliding mechanics with a light force, where there was no lag phase, were used as the reference in developing the 3D simulation model. The 3D tooth model was obtained from the anatomical data of maxillary canines in Japanese subjects. Contact conditions were configured to allow free movement on a wire bracket attached to the labial surface of the canine. The center of the bracket was retracted to the distal direction with a load of 50 g. In this load condition, the force of the wire reaction was transmitted to the tooth when the wire came in contact with the bracket. For the verification of periodontal property settings, the validity of the model was determined by the behavior of displacement for the model without orthodontic appliances. After analysis of the initial displacement of

the canine, the remodeling process was analyzed as the second step in the procedure. At the third step, the second step was repeated until the movement of the tooth reached the predetermined position. Analysis was carried out by a locally developed program calculating the non-linear behavior of the periodontal ligament and automating the three steps. As a result, there was some difference, however, the validity of the model was confirmed with the behavior of the model, consistent with previous studies in the verification of periodontal property settings. In addition, long-term simulation of the remodeling analysis approximated previous studies well. In conclusion, the results of this study indicate that the newly developed analytical method involving complicated biological processes would be useful to predict numerical values of orthodontic tooth movement. However, the usefulness of the non-linear analysis with the simulation of a light force could not be conclusively shown.

緒 言

矯正歯科臨床において、歯の位置を三次元的に正確に

把握し、最適な矯正力により歯を移動でき、歯周組織への為害作用が可及的に少ない条件が確立すると、より効率的な歯の移動を行うことができる。しかし、歯根膜は

微細で複雑な構造であることから実際の生体での詳細な応力分布等の観察は不可能である (Badawi et al., 2009). そこで, 生体で観察不可能な応力を推定する方法として有限要素解析が挙げられる. 有限要素解析は, 複雑な形状や性質を有する対象物を数式化可能な小部分に分割することで, 全体の挙動を推測でき, 多くの力学研究に利用されてきた (Andersen et al., 1991; Tominaga et al., 2009).

現在の矯正学分野における生体力学研究は, 歯根膜が非線形挙動を示す (Mühlemann, 1954; 石橋, 1957; Picton, 1963; 梶井, 1967; Göllner et al., 2010.) にも関わらず線形解析が多く行われている (Kojima & Fukui, 2006; Poiate et al., 2009; Viecilli et al., 2008; Reimann et al., 2007). 過去の報告には, 歯根膜の非線形挙動を忠実に再現した研究 (Natali et al., 2003; Toms et al., 2002; Toms & Eberhardt, 2003) や, 非線形挙動をbilinear (歯根膜の二相性の変位挙動を双線形で表す方法) とした研究もある (Qian et al., 2009) が, それらのシミュレーションのほとんどは歯の初期変位のみに関したものである. しかし, 矯正力による長期的な歯の移動の予測は初期変位のみで予測するには限界があると考えられる.

Hayashi et al. (2007) の研究では, 100g荷重 (heavy

force) において移動効率の落ちる硝子化期が現れたのに対し, 50g荷重 (light force) においては硝子化期が現れなかったことを明らかにしている (図1). そこで, 初期変位だけでなく長期的な矯正力に対する歯の移動をシミュレーションするにあたり, light forceを解析モデルに適用するとより単純なモデルの解析が可能と考えられる. つまり, 特性が明らかにされていない硝子様変性組織をモデルに組み込む必要がない. 本研究の目的は, まず硝子化期が現れないlight forceにおける中期的な一連の歯の移動様相について, 歯根膜の非線形応答を考慮した歯の移動の非線形有限要素モデルを構築し, そのモデルの解析結果が過去の報告 (生体計測) の変位挙動に近似していることを確認すること, さらに, 骨改造による歯槽骨の経時的形態変化を考慮したシミュレーションを行うことである.

方 法

1. モデルの設定

本研究の有限要素解析には, 汎用プログラムMARC-Mentat2012 (MSCソフトウェア社) を用いた.

三次元有限要素モデルは, 上顎左側犬歯を想定するモデルを構築した. モデルの形状や寸法は日本人の解剖学

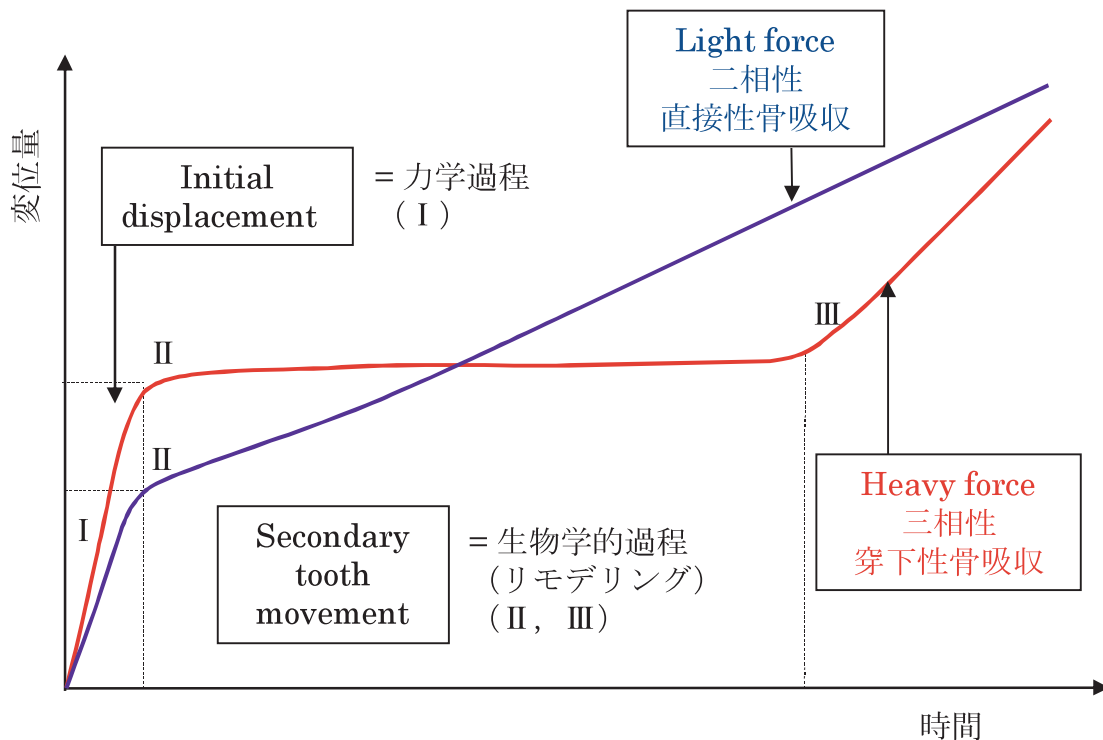


図1 矯正力に対する歯の移動様相

矯正学的歯の移動は, 主に歯根膜の変形による初期変位とその後の組織改造による二次変位の二段階から成る. I: 荷重の大きさにより初期変位量にも差があると考えられる. II: 歯根膜の初期移動後, 歯槽骨の組織改造が起きない限り歯は移動しない. III: 一般的に矯正力をかけると三相性を呈するといわれており, 骨改造が起きるには一定期間歯の移動が停滞する. しかし, 荷重の大きさによっては二相性を呈し, heavy forceに対してlight forceと呼ばれる.

的データ（上条，1962）に基づき，歯冠長11.0mm，歯根長13.0mm，歯冠頬舌径6.95mm，歯冠近遠心径7.75mm，歯根頬舌径6.25mm，歯根近遠心径5.5mmとなるように手動でモデルを作成した．細部については任意の形状とした（図2a）．また，歯根膜における各部分の厚みを250 μ mとした．モデルの要素分割には，8節点6面体のアイソパラメトリック要素を使用した．各モデルの総節点数ならびに総要素数は3315節点，2266要素となった（図2b）．また，歯冠唇側面にブラケット（0.022inchスロット）を配置した．ワイヤー（0.016 \times 0.022inch）をブラケットスロットに通し，ブラケットがワイヤー上を自由に移動でき，さらに節点が要素の平面（surface）の内部へ嵌入しないという接触条件を設定した（図2c）．

境界条件について，拘束条件はモデルの骨基底面およびワイヤーの両端を完全拘束し，骨側面を頬舌近遠心方向の拘束とした（Cattaneo et al., 2005）．荷重条件はブラケット中央部に作用させた遠心方向への持続的荷重とした．また，その荷重はlight forceとして50gに設定した．

材料特性はエナメル質，象牙質，皮質骨，海綿骨，歯根膜，ブラケットおよびワイヤー（ステンレス鋼）の構成要素を想定し，その物質特性値をすでに報告されているデータに基づいて設定した（Tanne et al., 1998；Vollmer et al., 1999；Assis et al., 2013）（表1）．

2. 歯根膜の材料条件

有限要素モデルについて，手動で作成したモデルの歯根は咬合面観では24分割，上下的には13分割し，312の主線維要素と312の非線維性成分要素，併せて624の要素から成る．上下的な歯根膜の要素を13段階にし，主線維の仰角（ θ ）ならびに方位角（ ϕ ）の平均値を上下的な要素段階毎に設定した．また，各段階に存在する要素毎に仰角で5°，方位角で45°のバラツキ（分散）を与えた

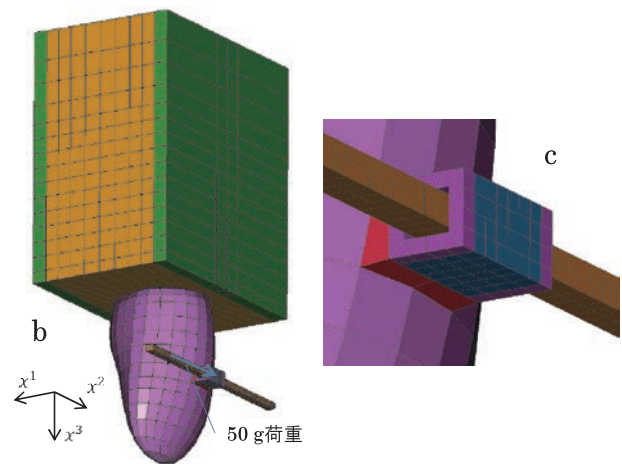
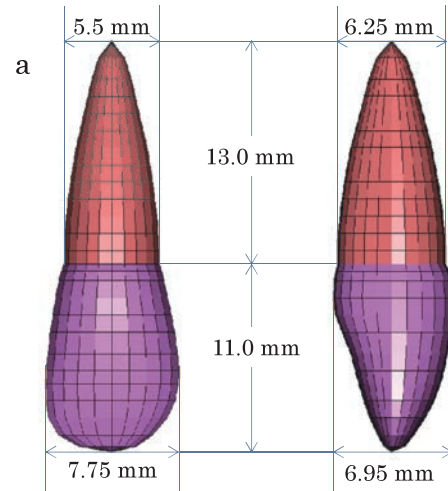


図2 作成した三次元モデル
(a) 歯のモデル設定，(b) モデルの全体像，(c) 矯正装置部分の拡大像．

（図3）．

また，計算で考慮する歯根膜の特性の詳細については論文末の付録に記述した（図4）．

3. 歯根膜の物性設定の検証

リモデリング解析を行なう前に，単純モデルの犬歯の

表1 本研究の材料条件

| 材料 | ヤング率 (GPa) | ポアソン比 | 材料の種類 | 要素の種類 (アイソパラメトリック) |
|------------------|-------------------------------|-------|-------------|--------------------|
| エナメル質 | 6.0 \times 10 | 0.3 | 等方性 | 8節点要素 |
| 象牙質 | 1.4 \times 10 | 0.3 | 等方性 | 8節点要素 |
| 皮質骨 | 1.1 \times 10 | 0.3 | 等方性 | 8節点要素 |
| 海綿骨 | 5.0 | 0.3 | 等方性 | 8節点要素 |
| 歯根膜 主線維 | 1.0 | - | 超弾性 | 8節点要素 |
| 歯根膜 非線維性成分 | 7.0 \times 10 ⁻⁴ | 0.49 | 非圧縮性 等方性 | ハーマン要素 9節点要素 |
| ステンレス鋼 (矯正装置) | 2.0 \times 10 ² | 0.3 | 等方性 | 8節点要素 |

| 歯根レベル | 歯根膜厚さ (μm) | 主線維 | | | |
|-------|------------|----------------------|----|------------------------|----|
| | | 仰角 θ (degree) | | 方位角 φ (degree) | |
| | | 平均値 | 分散 | 平均値 | 分散 |
| 1 | 250 | -45 | 5 | 0 | 45 |
| 2 | | 0 | | | |
| 3 | | 20 | | | |
| 4 | | 45 | | | |
| 5 | | 45 | | | |
| 6 | | 45 | | | |
| 7 | | 45 | | | |
| 8 | | 45 | | | |
| 9 | | 45 | | | |
| 10 | | 45 | | | |
| 11 | | 45 | | | |
| 12 | | 20 | | | |
| 13 | | 0 | | | |

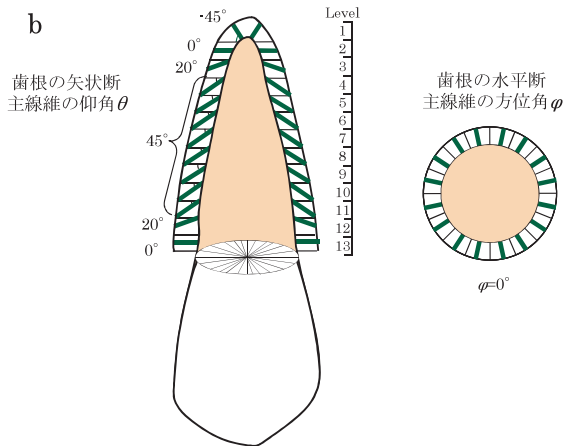


図3 歯根膜の構造
(a) 歯根膜の厚さおよび線維の角度設定, (b) 歯根膜の模式図.

尖頭相当部へ近心から遠心方向 (以下, 遠心方向), 唇側から舌側方向 (以下, 舌側方向), 歯冠切端から根尖方向 (以下, 根尖方向) へ500gの荷重を加え, 初期変位における荷重-変位曲線を得た. 初期変位における荷重-変位曲線の結果 (図5) と過去の報告における生体計測データ (Mühlemann, 1954; Picton, 1963; Göllner, 2010) における荷重-変位曲線との比較を行い, 変位挙動が近似しているか確認した.

4. リモデリング解析

1) リモデリング解析方法

矯正モデルにおけるリモデリングの解析は次の3つの段階を基本とした.

まず第1段階では, 50g荷重によって歯の変位が始まり, 最初の応力平衡に至るまでの初期変位を解析した.

第2段階では, 前段階の応力平衡状態の下で歯根膜の厚みを250μmに自動修正した後, 歯周組織の内部応力を初期化して, 外荷重とワイヤー・ブラケットの内部応力により新たな応力平衡に至る過程を解析した.

第3段階以降は, 上記の第1と第2段階を繰り返し解析した. さらに各解析段階では矯正装置の接触による外力も考慮した解析とした.

また, 第1段階と第2段階それぞれの段階で応力平衡に至るまでの解析回数を1stepとした. 現実の事象ではstepは時間軸に対応している.

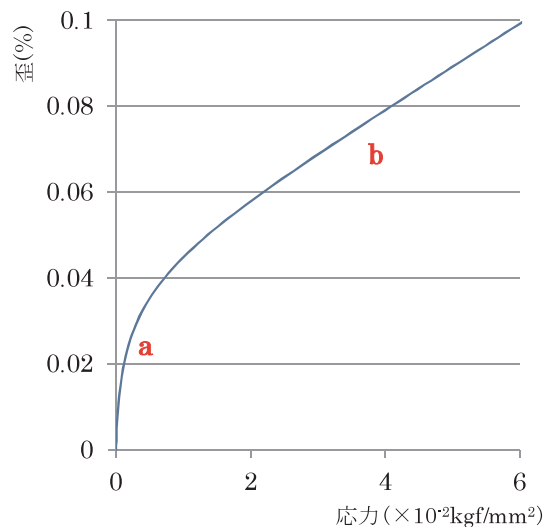
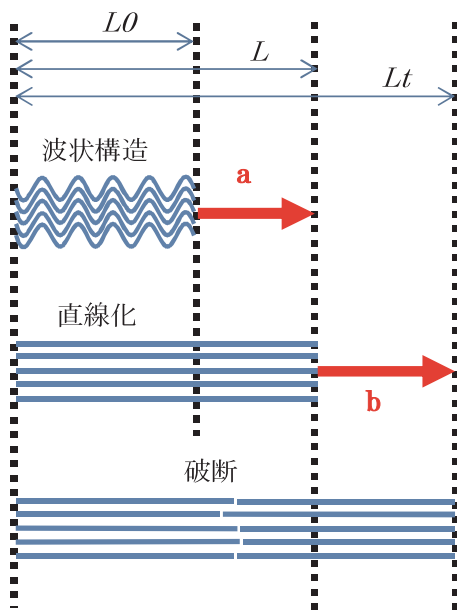


図4 歯根膜線維の張力に対する応答
歯根膜線維は安静時には波状構造を呈している. そのため線維が直線化するまではほとんど張力を発揮することなく, 応力-歪曲線では急勾配な曲線が現れる (a). さらに牽引力が作用すると張力が発揮され (b), 最後には破断する (小林, 2014., 改変).

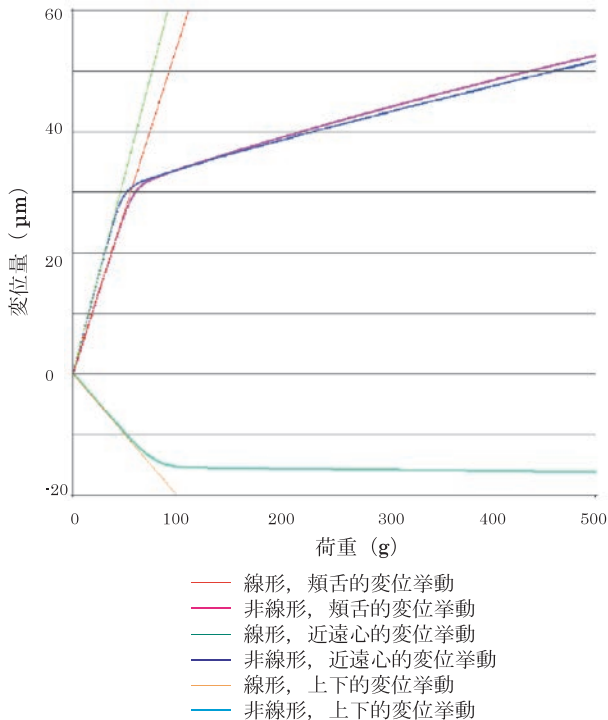


図5 単純モデルにおける初期の荷重-変位曲線(非線形解析と線形解析)

同条件下で非線形解析と線形解析を行い比較を行った結果、非線形解析における変位第1相の増分と、線形解析の増分が一致していた。しかし、非線形解析の頬舌的、近遠心的変位挙動では50g付近、上下の変位挙動では80g付近で張力が発揮され変位量が急激に減少した。その結果、荷重が増えるに従って、非線形解析と線形解析の変位量の差が大きくなっていった。

2) プログラム

歯根膜の応力-歪関係の設定と上記の段階における解析方法の自動化のため、プログラムのサブルーチンをメインプログラムであるMARC-Mentat 2012 (MSCソフトウェア社)に組み込んだ。解析はUpdated Lagrange形式の大歪問題とし、繰り返し増分計算にはFull Newton-Raphoson法を用いた。

3) 単純モデルにおけるリモデリング解析

矯正装置の影響を調べるために、まず矯正装置のない単純モデルのリモデリング解析を行なった。結果はstep毎の変位曲線と傾斜角度についてグラフにまとめた。

4) 矯正モデルにおけるリモデリング解析

さらに、矯正モデルのリモデリング解析を行なった。結果をstep毎の変位曲線と傾斜角度についてグラフにまとめ、単純モデルにおけるリモデリング解析結果および、過去の文献における実測値データ (Hayashi et al., 2007) と結果の比較を行った。

結 果

1. 歯根膜の物性設定の検証

単純モデルにおける初期変位の荷重-変位曲線において、変位量は荷重が加わると同時に大きく変位し、一定の変位量に達するとその後は緩やかに増加した。この変位第一相と第二相の変曲点は頬舌の変位挙動と近遠心的変位挙動では30 μ m付近であり、上下の変位挙動では-15 μ m付近であった。また、500g荷重時の変位量は頬舌的変位挙動と近遠心的変位挙動で50 μ m付近、上下の変位挙動で-17 μ m付近であった (図5)。

比較対象の生体計測データは、側方荷重に対する上顎犬歯のデータ (Mühlemann, 1954) として変曲点24 μ m、500g荷重時の変位量37 μ mであった。垂直荷重に対する上顎中切歯のデータ (Picton, 1963) として変曲点-25 μ m、500g荷重時の変位量は-35 μ mであった。

生体計測データとの比較の結果、その差は頬舌の変位挙動と近遠心的変位挙動の変曲点で+6 μ m、500g荷重時で+13 μ mであった。垂直的変位挙動では-10 μ m、500g荷重時で-18 μ mであった。荷重変位曲線の変位挙動は近似していたが、やや異なる値となった。

2. リモデリング解析

1) 負荷時間-変位および傾斜曲線

単純モデルにおけるリモデリング解析は変位量、傾斜角共に単調増加を示した。step160の最終的な数値は、4.2mm、傾斜角は13.8°となった (図6 a, b)。

矯正モデルのリモデリング解析においても変位量、傾斜角は共に単調増加を示したが、解析stepが進むにつれて増分が低下していった。Step160の最終的な数値は、変位量で2.4mm、傾斜角は7.6°となった (図7 a, b)。

過去の報告における生体計測データでは、最終計測した8週間時で変位量3.1mm、傾斜角7.0°であった (Hayashi et al., 2007)。単純モデルとの差は、変位量で+1.1mm、傾斜角で+6.8°である。また、矯正モデルとの差は変位量で-0.7mm、傾斜角度で+0.6°であった。

2) 応力分布図

矯正モデルによるリモデリング解析結果のvon Mises応力分布図を示す (図8)。図は矯正モデルの矢状断を唇側から観た図であり、ブラケット装置は省略している。step0の遠心歯頸部付近の歯槽骨(牽引側)にわずかに応力が認められ、その後はほぼ一定の応力が発生していた。そして、160stepでは前段階よりも応力が低く

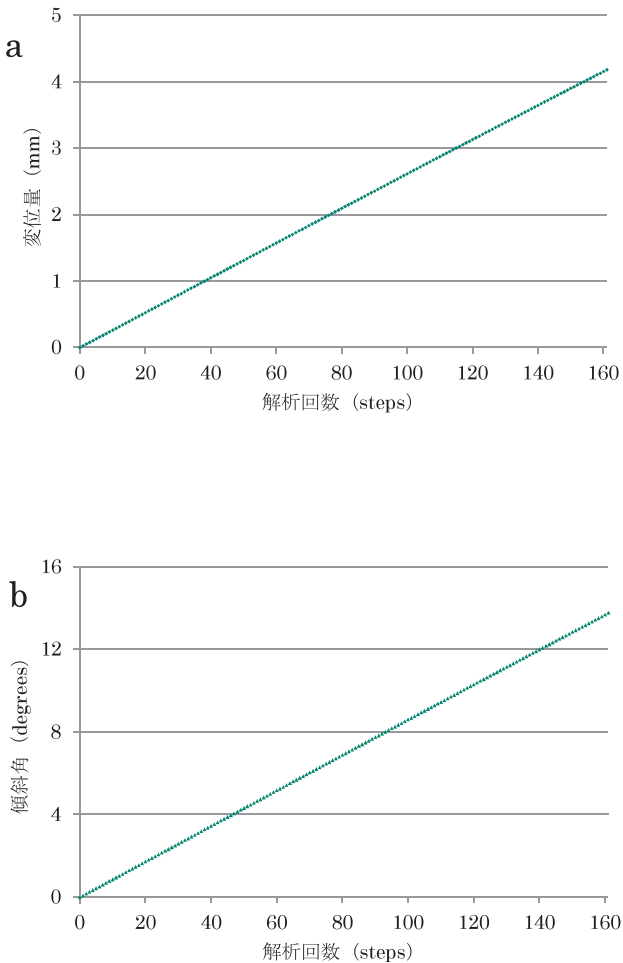


図6 単純モデルにおけるリモデリング解析
(a) 変位量, (b) 傾斜角.
50g荷重による変位量および傾斜角は単調増加した。

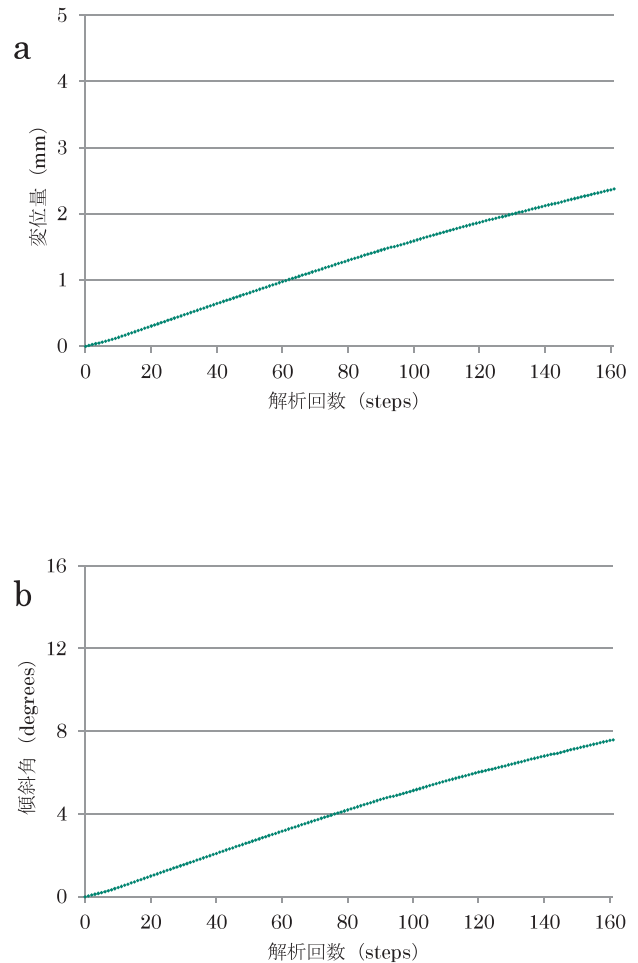


図7 矯正モデルにおけるリモデリング解析
(a) 変位量, (b) 傾斜角.
50g荷重の変位量および傾斜角がほぼ単調に増加した。
変位量, 傾斜角共にstepsが進むにつれて増分が緩やかになった。

なっていた。

次にstep 0, 50, 160の矯正装置に焦点を当てた応力分布図を示す(図9)。咬合面観ではstep 0ではほぼ応力が発生しておらず, step50においては矯正装置とワイヤーとスロットが接触している部分と拘束している部分に大きな応力が認められた。さらに解析が進みstep160になると, 歯の遠心捻転に伴ってワイヤーがたわみ, 遠心捻転に抵抗していた(図9 a)。また, 頬側面観ではstep 0ではほぼ応力が発生していない様子と, step50で矯正装置に応力の発生が認められた。Step160では歯の遠心傾斜に伴いワイヤーがたわみ, 内部応力が発生していることが示された(図9 b)。

考 察

1. 矯正力による歯の移動と副作用

矯正歯科治療において最もよく用いられるマルチブラケット装置は, 三次元的に正確かつ効率的な歯の移動を

可能にする。しかし, 本装置を用いて設定した治療目標に基づいた歯の移動を行うためには, 歯の移動様相を想定した装置の力系の設計を正確に行う必要がある。Burstone (2000)によれば, 初期の歯の移動様相は, 歯に作用するモーメント, 力および歯の固有の抵抗中心によって決定されること, さらにはモーメントと力を調整することによって, 根尖側1/3に回転中心のあるuncontrolled tipping, 根尖に回転中心のあるcontrolled tippingおよび歯冠に回転中心のあるtorqueという3つの基本的な移動を行えることを理論的に示した。しかし, 生体での歯の移動様相をfinite helical axisを用いて三次元的に検討した研究(Hayashi et al., 2003; 2007)では, 実際の歯の移動は, 前述した二次元的な移動様相の予測とは大きく異なり三次元的に複雑なものであることを明らかにした。また, 歯の移動を複雑にしている要因として歯周組織の性状や隣接歯との位置関係が関与していることを示唆した。

さらに、矯正歯科治療では、効率的かつ可及的に少ない歯周組織への為害作用を考慮した最適な大きさの矯正力を歯に作用させることも重要な考慮事項となる (Owman-Moll, 1995). 矯正治療に伴う歯周組織への為害作用のなかで、最も頻度の高いものは歯根吸収である (Reitan, 1974; Lupi et al., 1996; Segal et al., 2004). Segal et al. (2004) のメタ・アナリシスによれば、マルチブラケット装置を用いた治療に対する歯根吸収の感受性が最も高い上顎中切歯でみると、矯正治療後の歯根吸収の頻度は軽度のもので含めると約76%に達し、歯根長減少の平均値は1.421mmと報告している。矯正治療を終了すると、歯根吸収の進行は止まり、吸収窩は修復される (Reitan, 1974; Owman-Moll and Kuroi, 1998; Cheng et al., 2010). しかし、矯正臨床においては、稀に歯の安定性と機能に影響を及ぼす重度の歯根吸収に遭遇することがある (Owman-Moll and Kuroi, 1998). 歯根吸収の原因に関してはさまざまな危険因子が指摘されているが (Brezniak and Wasserstein, 1993), その中でも矯正力の大きさと治療期間の長さが吸収の程度に大きく関係していることが指摘されている (Segal et al., 2004; Cheng et al., 2010). しかし残念ながら、現在のところ個々の症例における歯根吸収の危険性や治療後の重篤度を予測、あるいは個々の症例に対して為害作用を最小に抑え、歯が最も大きく移動するような適切な強度の力を設定するまでには至っていない。

2. 矯正分野における有限要素法

歯の移動において中心的な役割を担っているのは歯根膜および歯根膜に存在する多様な細胞であり、歯の移動過程は矯正力という生力学的力に対する歯根膜の一連の生体反応によって特徴づけられている (Pavlin et al., 1974; King et al., 1991; Proffit and Field, 1991). 歯の移動を組織学的にみると、歯に作用した力は歯周組織に2つの異なる生力学環境、すなわち圧迫側と牽引側を生じる。圧迫側では、(1) 歯根膜内に存在する血管の圧迫による血流障害、虚血、貧血、(2) 歯根膜の細胞外基質の分解と細胞死 (硝子様変性)、(3) マクロファージによる変性組織の吸収と破骨細胞による歯槽骨の吸収、および(4) 歯根膜組織の再形成という一連の変化がみられる (Pavlin et al., 1974; King et al., 1991; Proffit and Field, 1991; Brudvik and Rygh, 1993; 1994; Terai et al., 1999; Niklas et al., 2013). 一方牽引側では、(1) 歯根膜線維の牽引による血流と血管透過性の亢進、(2) 骨芽細胞の集積と骨形成の促進、および(3) 歯根膜線維の形成と再配列がみられる (Pavlin et al., 1974; King et

al., 1991; Proffit and Field, 1991; Brudvik and Rygh, 1993; 1994; Terai et al., 1999; Niklas et al., 2013). このように矯正学的歯の移動は、歯周組織の一連の変化を伴う複雑な生物学的過程であり、このことは歯の移動の力学的解析を困難にする要因の一つと考えられる。特に圧迫側で認められる硝子様変性は、歯の移動速度と密接に関連しており、過大な矯正力により硝子様変性が広範に出現すると、歯の移動は一時的に著しく停滞する (Kohno et al., 2002).

歯の移動の力学的解析を困難にする他の要因として、外から見えない硬組織の内部を対象とする上に歯根膜の厚さが菲薄なこと等の解剖学的制約から歯根膜における応力の直接的観察が困難であることが挙げられる (Badawi et al., 2009). これらの問題点を克服する方法として、生力学的な解析に有用な有限要素解析が考えられる。有限要素解析は複雑な形状や性質を有する対象物を数式化可能な小部分に分割することで対象物の挙動を推測できる。その歴史は、1956年Turnerらが剛性法 (Stiffness method) を提案し、航空機の設計に応用したことからはじまる (Turner et al., 1956). 現在コンピュータ技術の発展によりさらに多様な力学研究に用いられており (Andersen et al., 1991; Tominaga et al., 2009), 矯正歯科の領域においても矯正力に対する歯や骨の移動様相 (Tanne et al., 1993; 1998; Kojima & Fukui, 2006; Poiate et al., 2009; Viecilli et al., 2008; Reimann et al., 2007; Tominaga et al., 2009), 矯正用アンカースクリューの応力分布 (Holberg et al., 2014) などの解析に広く利用されてきている。

歯の移動に関する有限要素解析を用いた研究の多くは、解析モデルを単純化する必要性から歯根膜の特性を単純な弾性体 (負荷と変形の線形挙動) として扱っているものがほとんどである (Tanne et al., 1993; Kojima & Fukui, 2006; Poiate et al., 2009; Viecilli et al., 2008; Reimann et al., 2007). しかし、歯根膜はコラーゲン線維、プロテオグリカン等の非コラーゲン性タンパクおよび弾性線維などの多様な細胞外基質から構成される不均一な組織であり、非線形挙動を示すことが明らかにされている (Mühlemann, 1954; Göllner et al., 2010). 現時点では細胞と歯の移動というミクロとマクロを共に解析する方法はない。そのため、まずは過去の文献を参考に長期的な歯の移動について解析することにした。

3. 歯根膜の構成式とモデル化

生体材料のモデル化には材料試験で得られた物性を外挿する現象論的方法と、組織構造の特徴をモデル化し現

象を推定する構造論的方法がある。極めて菲薄な組織である歯根膜は、材料試験が困難であるため現状では利用可能で信頼できるデータはない。本研究では、歯根膜を主線維とそれ以外の非線維性成分の二重要素とし、主線維を力学的特性としてひずみエネルギー密度関数を有する超弾性体、非線維性成分を非圧縮性等方体でモデル化する構造論的方法を用いた。

4. 非線維性成分の構成式

歯根膜の非線維性成分は、細胞や血管網、細胞外基質や細胞外液から成るゲル状物質である (Lindhe, 1989; Ramfjord et al., 1984; Kronka, 2001)。その性状から、他の軟組織と同様に非圧縮性かつ等方性の材料特性を有すると仮定する。ただし、等方弾性体の構成式に非圧縮性の材料条件として0.5近くのポアソン比を与えると、要素剛性が異常に増大して実際の解よりも過大評価するロッキング現象を引き起こすことが知られている (Li and Cescotto, 1997; Rong and Lu, 2001)。このような現象を回避し、より精度の高い解析を行うために、歯根膜非線維性成分にはハーマン要素を使用した (Herrmann, 1965; Shariff, 1997; Ladeveze, 1992) (表1)。

5. 歯根膜の物性設定の検証

ヒトの歯に荷重を加え歯の初期変位を観察した研究では、非線形挙動を示すことが報告されている (Mühlemann, 1954; Picton, 1963; Göllner, 2010)。これらの研究によると、歯根膜は荷重に対する変形量が大きく、比例関係を示す変位第一相と、荷重に対する歯の変位量が徐々に低くなりほとんど増加の認められない第二相とが存在する。上顎犬歯の変曲点でみると、水平荷重下で24 μm 付近、500g荷重時の変位量は水平荷重で37 μm 、上顎中切歯についての負荷時間-変位曲線に現れる変曲点は垂直荷重下では-25 μm 付近、500g荷重時の変位量は-35 μm であったとしている。

本研究における初期変位の荷重-変位曲線は、荷重初期において歯根膜線維の波状構造に起因する大幅な変位量を示す (図4のa領域) 第一相が認められた。さらに、歯根膜線維の張力が機能すると荷重が増加しても荷重初期ほど大きな変位を示さない第二相が認められた。垂直荷重における変曲点や500g荷重時の比較を行うと、過去の論文とやや数値が異なる。しかし、過去の論文の比較した歯種が中切歯であったこと、上顎犬歯の900g荷重時の変位量が18 μm であったとする論文 (梶井, 1967) があること、および論文によって数値が様々であることを考慮に入れ、本研究における荷重-変位曲線は

過去の報告 (生体計測) の非線形挙動 (Mühlemann, 1954; Picton, 1963; Göllner, 2010) と近似していると考えられる。

また、線形解析の荷重-変位曲線は比例関係を示し、非線形解析の荷重-変位曲線の変位第一相の変化と一致した。非線形解析の荷重-変位曲線は50gより大きな荷重で伸展歯根膜線維の張力が機能するが (図4のb領域)、今回の研究のように荷重が50gの場合、線形解析と非線形解析の変位量の差はほとんど認められないことになる (図5)。このことから、本研究にて検証した50g荷重による初期変位の解析に関しては、線形解析を用いても大きな違いはないと考えられる。

しかし、歯の大きな変位を伴うシミュレーションを線形解析にて行う場合 (50g以上の荷重) には、線形解析の結果と非線形解析の変位量の結果に大きな差がみられ、それは荷重が大きくなればなるほどその差が大きくなっている。この結果より、歯根膜における応力分布だけでなく実際の歯の移動と比べても誤差が大きくなる可能性が示唆された。このことを踏まえ、今後は100g荷重 (heavy force) における歯の移動についても検証する必要があると考えられた。

6. リモデリング解析

1) 矯正モデルのリモデリング解析における von Mises 応力

図8におけるstep160で、その前段階よりも応力が低かった。これは、歯の傾斜量が大きくなることによってワイヤーとブラケット (特に歯に直接配置したブラケット) に大きな応力が発生し、その分歯に発生する応力が低くなったと考えられる。事実、図9aにおいて、特にブラケットの遠心部に発生した応力が顕著に現れていた。

2) 生体計測データとの比較

現在、矯正力に対する長期的な歯の移動についての標準的な生体計測データは存在しない。ヒトを対象とした数少ない生体計測データより、歯の移動を不動の基準点を設定し荷重をかけてから1週間毎にサンプリングし8週間にわたって観察した論文を参考にした (Hayashi et al., 2007)。

生体計測データによると、light forceによる変位量は荷重をかけた期間 (8週間) に対して単調な増加を示した (Hayashi et al., 2007)。本研究のリモデリング解析においても、light forceの移動様相がほぼ単調な増加を示し、長期的な歯の移動様相を推測することができた (図

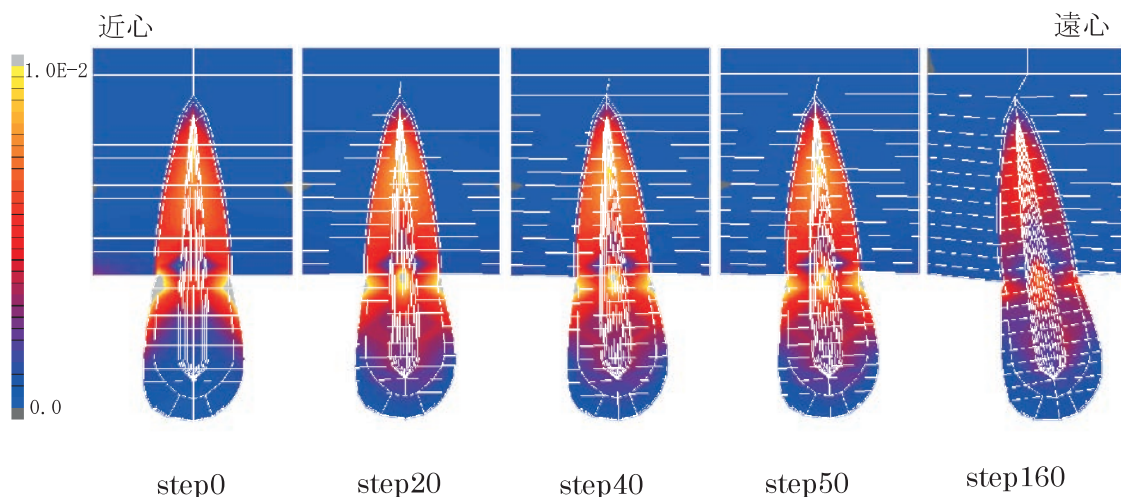


図8 矯正モデルによるリモデリング解析のvon Mises応力
50g荷重のリモデリングモデル。モデルの矢状断を唇側から観ている図荷重はブラケット装置中心部に遠心方向にかけている。

(図中ではブラケット装置は省略されている。)
応力は歯頸部に大きく発生している。Step 0 からstep50までほぼ一定の応力が発生していた。Step160では歯冠が遠心に傾斜しているが、歯根は近心へ移動していた。また、step160では前段階よりも応力が低くなっていた。

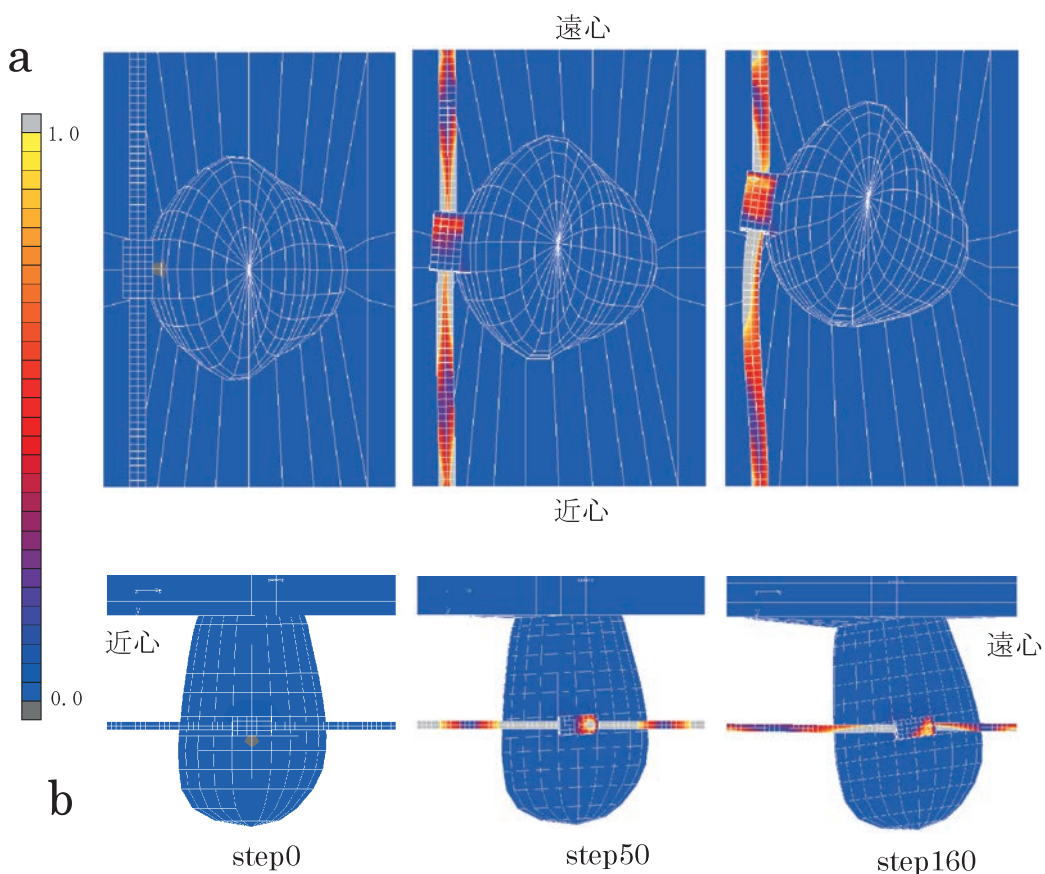


図9 解析最終stepのワイヤーのたわみと、ワイヤーに生じるvon Mises応力
(a) 50g荷重による歯の移動の咬合面観, (b) 50g荷重による歯の移動の頬側面観。それぞれ左からstep 0, step50, step160.

Step 0 ではほぼ応力が発生しておらず、step50ではワイヤーとブラケットの接している部分とワイヤーの拘束部に特に応力が認められた。Step160では歯の傾斜移動に伴ってワイヤーがたわみ、内部応力が増加している。

7).

3) 単純モデルと矯正モデルにおける解析結果

単純モデルおよび矯正モデルの解析はほぼ単調な増加

を示した。また、単純モデルは終始一定の増加を示していたのに対し、矯正モデルについてstep数の増加につれて変位量がやや減少した(図6, 7)。これは、stepが進むにつれて歯の傾斜が大きくなりスロットとワイヤーが接触したことにより歯の変位量が減少したと考えられる。単純モデルにおける変位量は4.2mm、傾斜角は13.8°であった(step160)。対して、矯正モデルでは、変位量で2.4mm、傾斜角は7.6°となった(step160)。

過去の報告における生体計測データでは、最終計測した8週間時で変位量3.1mm、傾斜角は7.0°であった(Hayashi et al., 2007)。単純モデルとの差は、変位量で+1.1mm、傾斜角で+6.8°である。また、矯正モデルとの差は変位量で-0.7mm、傾斜角で+0.6°であった。以上の結果より、単純モデルよりも矯正モデルの解析結果が変位量、傾斜角共に生体計測データに近似した。これは、節点が要素の平面(surface)の内部へ嵌入しないという接触条件を設定したことによって、生体計測データの条件と近似したためと考えられる。

結 論

本研究の結果より次のことが明らかとなった。

(1) 歯根膜要素を考慮した歯の移動の有限要素解析における非線形モデルの荷重-変位曲線は過去の報告(生体計測)の非線形挙動と近似していた。

(2) 歯根膜の物性を線形解析で行った場合、歯に加わる荷重の増加に伴い、線形解析結果の変位量が非線形解析結果よりも大きく認められた。しかし、50g荷重においては変位量にほとんど差は認められなかった。

(3) 歯の移動に伴う歯根膜厚さの回復を考慮することによって、長期的な歯の移動のシミュレーションが可能となった。

(4) リモデリング解析について、矯正装置の接触を考慮した矯正モデルが単純モデルよりも実測値データに近似しており、より現実的な解析が可能となった。

以上より、歯根膜要素の厚みを自動修正することによって、骨改造による歯槽骨の経時的形態変化を考慮した長期的な歯の移動シミュレーションの有効性が示唆された。ただし、light forceにおける非線形有限要素解析の有効性は本研究では確認できなかった。

参 考 文 献

Andersen KL, Pedersen EH, Melsen B. Material parameters and stress profiles within the periodontal ligament. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 99: 427-440, 1991.

Assis DS, Xavier TA, Noritomi PY, Gonçalves AG, Ferreira

O Jr, de Carvalho PC, Gonçalves ES. Finite element analysis of stress distribution in anchor teeth in surgically assisted rapid palatal expansion. *Int J Oral Maxillofac Surg* 42: 1093-1099, 2013.

Badawi HM, Toogood RW, Carey JP, Heo G, Major PW. Three-dimensional orthodontic force measurements. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 136: 518-528 2009.

Brezniak N, Wasserstein A. Root resorption after orthodontic treatment: Part 2. Literature review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 103: 138-146, 1993.

Brudvik P, Rygh P. Non-clast cells start orthodontic root resorption in the periphery of hyalinized zones. *Eur J Orthod* 15: 467-480, 1993.

Brudvik P, Rygh P. Root resorption beneath the main hyalinized zone. *Eur J Orthod* 16: 249-263, 1994.

Burstone CJ, Marcotte MR. *Problem Solving in Orthodontics: Goal-Oriented Treatment Strategies*. L. Bywaters (ed), Quintessence Publishing Co., Inc., Hanover Park, USA, 2000.

Cattaneo PM, Dalstra M, Melsen B. The finite element method: a tool to study orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 84: 428-433, 2005.

Cheng LL, Türk T, Elekdağ-Türk S, Jones AS, Yu Y, Darendeliler MA. Repair of root resorption 4 and 8 weeks after application of continuous light and heavy forces on premolars for 4 weeks: a histology study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 138: 727-734, 2010.

Eley BM, Soory M, Manson JD. *Periodontics*. 6th ed. Elsevier: 2010, p5-9.

Göllner M, Holst A, Berthold C, Schmitt J, Wichmann M, Holst S. Noncontact intraoral measurement of force-related tooth mobility. *Clin Oral Invest* 14: 551-557, 2010.

Hayashi K, Araki Y, Uechi J, Ohno H, Mizoguchi I. A novel method for the three-dimensional (3-D) analysis of orthodontic tooth movement-calculation of rotation about and translation along the finite helical axis. *J Biomech* 35: 45-51, 2003.

Hayashi K, Uechi J, Lee SP, Mizoguchi I. Three-dimensional analysis of orthodontic tooth movement based on XYZ and finite helical axis systems. *Eur J Orthod* 29: 589-595, 2007.

Herrmann LR. Elasticity equations for nearly incompressible materials by a variational theorem. *AIAA J* 3: 1896-1900, 1965.

Holberg C, Winterhalder P, Rudzki-Janson I, Wichelhaus

- A. Finite element analysis of mono- and bicortical mini-implant stability. *Eur J Orthod* 36 : 550-556, 2014.
- 上条雍彦. 日本人永久歯の解剖学第1版, アナトーム社, 東京, 1962, 93-94, 166-173.
- King GJ, Kleeling SD, Wronski TJ. Histomorphometric study of alveolar bone turnover in orthodontic tooth movement. *Bone* 12 : 401-409, 1991.
- 小林優. 矯正臨床に関わる歯周病学的背景—歯根膜のバイオメカニクス・前. *J Orthod Practice* 3 : 37-45, 2014.
- 小林優. 矯正臨床に関わる歯周病学的背景—歯根膜のバイオメカニクス・後. *J Orthod Practice* 7 : 35-45, 2014.
- Kohno T, Matsumoto Y, Kanno Z, Warita H, Soma K. Experimental tooth movement under light orthodontic forces : rates of tooth movement and changes of the periodontium. *J Orthod* 29 : 129-135, 2002.
- Kojima Y, Fukui H. A numerical simulation of tooth movement by wire bending. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130 : 452-459, 2006.
- Kronka MC, Watanabe I, Silva MCP. Scanning electron Microscopy of angioarchitecture of palatine gingiva in young rabbits. *Braz Dent J* 12 : 163-166, 2001.
- Ladeveze P, Marin P, Pelle JP, Gastine JL. Accuracy and optimal meshes in finite element computation for nearly incompressible materials. *Comput Methods Appl Mech Eng* 94 : 303-315, 1992.
- Li KP, Cescotto S. An 8-node brick element with mixed formulation for large deformation analyses. *Comput Methods Appl Mech Eng* 141 : 157-204, 1997.
- Lindhe J. Textbook of clinical periodontology. 2nd ed. Munksgaard. 47-51, 1989.
- Lupi JE, Handelman CS, Sadowsky C. Prevalence and severity of apical root resorption and alveolar bone loss in orthodontically treated adults. *Am J Orthod* 109 : 28-37, 1974.
- Mühlemann HR. Tooth mobility changes through artificial alteration of the periodontium. *J Periodontol* 25 : 199-202, 1954.
- Natali AN, Pavan PG, Scarpa C. Numerical analysis of tooth mobility : formulation of a non-linear constitutive law for the periodontal ligament. *Dent Mater* 20 : 623-629, 2004.
- Niklas A, Proff P, Gosau M, Römer P. The role of hypoxia in orthodontic tooth movement. *Int J Dent* : 841840, 2013.
- Owman-Moll P. Orthodontic tooth movement and root resorption with special reference to force magnitude and duration. A clinical and histological investigation in adolescents. *Swed Dent J* 105 : 1-45, 1995.
- Owman-Moll P, Kurol J. The early reparative process of orthodontically induced root resorption in adolescents—location and type of tissue. *Eur J Orthod* 20 : 727-732, 1998.
- Pavlin D, Dove SB, Zadro R, Gluhak-Heinrich J. 2000. Mechanical loading stimulates differentiation of periodontal osteoblasts in a mouse osteoinduction model : effect on type I collagen and alkaline phosphatase genes. *Calcif Tissue Int* 67 : 163-172.
- Picton DCA. The effect on normal vertical tooth mobility of the rate of thrust and time interval between thrusts. *Arch Oral Biol* 8 : 291-299, 1963.
- Poiate IA, de Vasconcellos AB, de Santana RB, Poiate E. Three-dimensional stress distribution in the human periodontal ligament in masticatory, parafunctional, and trauma loads : finite element analysis. *J Periodontol* 80 : 1859-1867, 2009.
- Proffit W, Fields HWJr. 1991. The biology basis of orthodontic therapy. In : Proffit WR, Fields HWJr (eds) Contemporary orthodontics, Mosby Year Book, St Louis, p 265-288.
- Qian L, Todo M, Morita Y, Matsushita Y, Koyano K. Deformation analysis of the periodontium considering the viscoelasticity of the periodontal ligament. *Dent Mater* 10 : 1285-1292, 2009.
- Ramfjord SP, Ash MM著, 加藤熙, 小林義典, 山田好秋訳. 歯周病の基礎と臨床. 医歯薬出版 : 1984, p31-45.
- Reimann S, Keilig L, Jäger A, Bourauel C. Biomechanical finite-element investigation of the position of the centre of resistance of the upper incisors. *Eur J Orthod* 29 : 219-224, 2007.
- Reitan K. Initial tissue behavior during apical root resorption. *Angle Orthod* 41 : 68-82, 1974.
- Rong TY, Lu AQ. Generalized mixed variational principles and solutions of ill-conditioned problems in computational mechanics : Part I. Volumetric locking. *Comput Methods Appl Mech Eng* 191 : 407-422, 2001.
- Segal GR, Schiffman PH, Tuncay OC. Meta analysis of the treatment-related factors of external apical root resorption.

- Orthod Craniofac Res 7 : 71–78, 2004.
- Shariff MHB. An extension of Herrmann's principle to nonlinear elasticity. Appl Math Model 21 : 97–107, 1997.
- Tanne K, Lu YC, Tanaka E, Sakuda M. Biomechanical changes of the mandible from orthopaedic chin cup force studied in a three-dimensional finite element model. Eur J Orthod 15 : 527–533, 1993.
- Tanne K, Yoshida S, Kawata T, Sasaki A, Knox J, Jones ML. An evaluation of the biomechanical response of the tooth and periodontium to orthodontic forces in adolescent and adult subjects. Br J Orthod 25 : 109–115, 1998.
- Terai K., Takano–Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, et al. 1999. Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. J Bone Miner Res 14 : 839–849, 1994.
- Tominaga J, Tanaka M, Koga Y, Gonzales C, Kobayashi M, Yoshida N. Optimal Loading Conditions for controlled movement of anterior teeth in sliding mechanics. Angle Orthod 79 : 1102–1107, 2009.
- Toms SR, Dakin GJ, Lemons JE, Eberhardt AW. Quasi-linear viscoelastic behavior of the human periodontal ligament. J Biomech 35 : 1411–1415, 2002.
- Toms SR, Eberhardt AW. A nonlinear finite element analysis of the periodontal ligament under orthodontic tooth loading. Am J Orthod 123 : 657–665, 2003.
- Turner MJ., Clough RW., Martin HC., Topp LJ. Stiffness and deflection analysis of complex structures. J Aero Sci 23 : 805–823, 854, 1956.
- Viecelli RF, Katona TR, Chen J, Hartsfield Jr. JK, Roberts WE. Three-dimensional mechanical environment of orthodontic tooth movement and root resorption. Am J Orthod Dentofacial Orthop 133 : 791.e11–791, e26, 2008.
- Vollmer D, Bourauel C, Maier K, Jäger A. Determination of the centre of resistance in an upper human canine and idealized tooth model. Eur J Orthod 21 : 633–648, 1999.

付 録

主線維の張力に対する応答

主線維は、コラーゲン細線維が平行に寄り集まった強靱な線維束で、歯根膜容積の40~50%を占める (Eley et al., 2010)。その弾性率は約 1 GPaで、歯根と歯槽骨を強固に連結する働きを担っている。歯が適度な可動性をもつためには、線維自体にある程度の緩みが必要であり、主線維は無負荷状態で波状構造を呈している (小林, 2014) (図 4)。本研究では、細線維の緩みが、正規

分布と同様に対称なシグモイド型の分布関数、釣鐘型の確立密度関数を持つロジスティック分布に従うものと仮定 (小林, 2014) して、まず線維束の 1 次元構成式を以下のように導出した。

緩みをもつ細線維の見掛けの長さを L_0 、真の長さを L 、伸長後の長さを L_t とし (図 4)、緩みの解消に必要な伸びを $\lambda_w = L/L_0$ 、見掛けの伸びを $\lambda = L_t/L_0$ とすると、真の伸びは $\lambda_t = L_t/L = \lambda/\lambda_w$ となるから、細線維の対数歪は

$$\varepsilon_t = \ln(\lambda_t) = \ln\left(\frac{\lambda}{\lambda_w}\right) = \ln(\lambda) - \ln(\lambda_w) = \varepsilon - \varepsilon_w$$

で表される。ここで ε は見掛けの歪、 ε_w は緩みの解消に必要な歪を表す。緩みのない場合には、応力 σ は対数歪 ε_t に比例すると考えられるから、弾性定数を k として $\sigma = k\varepsilon_t$ が成り立つ。したがって、緩みのある場合の応力 - 歪関係は

$$\sigma = k(\varepsilon - \varepsilon_w)$$

で表される。また、各細線維の緩みにはある程度のバラツキがあると考えられる。線維束は細線維が束となって形成されるため、 ε_w の確率密度分布関数 (以下、緩み分布関数) を $f(x)$ とすると、線維束の応力 - 歪関係は

$$\sigma = k \int_0^\varepsilon (\varepsilon - x) f(x) dx$$

で表される。ここで、細線維の緩みが以下のようなロジスティック分布

$$f(x) = \frac{\exp\left(-\frac{x-\mu}{s}\right)}{s \left\{ 1 + \exp\left(-\frac{x-\mu}{s}\right) \right\}^2}$$

に従うものと仮定すると、線維束の 1 次元構成式は

$$\sigma = k \left[s \cdot \ln \left\{ \frac{A + \lambda^{\frac{1}{s}}}{A + 1} \right\} - \frac{\ln(\lambda)}{A + 1} \right]$$

と表される。ここで μ はロジスティック分布の位置パラメータ、 s は尺度パラメータで、 $A = \exp(\mu/s)$ である。

次に、主線維の 3 次元構成式を以下のように導出した。

まず、全体座標系として、頬側から舌側に向かう座標軸を x^1 、近心から遠心に向かう軸を x^2 、歯軸に沿い根尖から歯冠に向かう座標軸を x^3 とするデカルト座標系を設定 (図 4 b) し、線維束に沿う動径を r 軸、同軸の x^1 、 x^2 平面への射影が $s^3 x^3$ と成す角を仰角 θ 、同じく x^1 と成す角

を方位角 φ とすると、全体座標系における線維束の応力は、テンソル変換則から

$$\begin{aligned}\sigma_{11} &= \sigma_{rr} \cos^2 \theta \cos^2 \varphi \\ \sigma_{22} &= \sigma_{rr} \cos^2 \theta \sin^2 \varphi \\ \sigma_{33} &= \sigma_{rr} \sin^2 \theta \\ \sigma_{12} &= \sigma_{rr} \cos^2 \theta \sin \varphi \cos \varphi \\ \sigma_{23} &= \sigma_{rr} \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \\ \sigma_{31} &= \sigma_{rr} \sin \theta \cos \theta \cos \varphi\end{aligned}$$

と表される。ここで σ_{rr} は r 方向の直応力で、上述の1次元構成式より

$$\sigma_{rr} = k \left[s \cdot \ln \left\{ \frac{A + \lambda^{\frac{1}{s}}}{A + 1} \right\} - \frac{\ln(\lambda)}{A + 1} \right]$$

である。

次に、仰角および方位角の確率密度関数（以下、方向分布関数）をそれぞれ $f_1(\theta)$ および $f_2(\varphi)$ で表すと、主線維の3次元構成式は以下となる。

$$\sigma_{ij} = V_f \int \int_{-\infty}^{\infty} \sigma_{rr} f_1(\theta) f_2(\varphi) h_{ij} d\theta d\varphi$$

ただし、

$$\begin{aligned}h_{11} &= \cos^2 \theta \cos^2 \varphi \\ h_{22} &= \cos^2 \theta \sin^2 \varphi \\ h_{33} &= \sin^2 \theta \\ h_{12} &= \cos^2 \theta \sin \varphi \cos \varphi \\ h_{23} &= \sin \theta \cos \theta \sin \varphi \\ h_{31} &= \sin \theta \cos \theta \cos \varphi\end{aligned}$$

ここで V_f は歯根膜に対する主線維の容積率で、ヒトでは $V_f \approx 0.5$ である。本研究では、 $f_1(\theta)$ および f_2 がそれぞれ $N(\mu_1, \sigma_1^2)$ および $N(\mu_2, \sigma_2^2)$ の正規分布で表されると仮定し、計算はガウス・エルミート数値積分で行った。



岡 由紀恵

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野 任期制助手

平成13年3月 北海道札幌手稲高等学校 卒業

平成16年3月 北海道医療大学歯学部 入学

平成22年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成27年3月 北海道医療大学歯学部歯学研究科博士課程 修了

平成27年4月 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野 任期制助手

〔原著〕

歯原性上皮細胞株の分化における活性型ビタミンD₃の作用村田 佳織¹⁾, 谷村 明彦²⁾, 齊藤 正人¹⁾

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

Effect of active form of vitamin D₃ in the differentiation of rat dental epithelial cell lineKaori MURATA¹⁾, Akihiko TANIMURA²⁾, Masato SAITOH¹⁾1) Division of Pediatric Dentistry, Department of Oral Growth and Development,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

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

Key words : Active form of vitamin D₃, Ameloblast, Ameloblastin, Calcification**Abstract**

The active form of vitamin D (1,25-dihydroxyvitamin D₃; VD₃) regulates growth and differentiation in many cell types, through the activation of the VD₃ receptor (VDR) which is a nuclear receptor that is known to change various genetic expressions. In the present study, we examined the effect of VD₃ in the differentiation of ameloblasts using a rat dental epithelial cell line, SF2 cells. The VD₃ inhibited the proliferation of the SF2 cells in a concentration-dependent manner, and the cell number was reduced to approximately 50% of the control by 100 nM VD₃ at 3 days of cell culture. The VD₃ had enhanced the expression of ameloblastin

and connexin 43 at 24 hours after incubation, implying that VD₃ promotes the differentiation of SF2 cells; SF2 cells were also cultured in osteogenic media for 10 days, and the effects of VD₃ on the calcification and the differentiation of the SF2 cells were examined with Alizarin red S staining and alkaline phosphatase activity. The VD₃ promoted the formation of calcium nodules in the presence of 1.0–2.0 mM CaCl₂. In addition, ALP activity increased 6-fold in the presence of 100 nM VD₃. Overall, these results indicate that VD₃ induced differentiation of SF2 cells.

緒 言

ビタミンDは脂溶性ビタミンの一つで、小腸からのカルシウム吸収の促進、腎臓からのカルシウム排出抑制、骨から血中へのカルシウム放出促進などによって、血中カルシウムの恒常性維持に関与しており、ビタミンDの不足によって、くる病や、骨軟化症が引き起こされることが古くから知られている。ビタミンD₃は紫外線照射された皮膚上で作られ、肝臓での水酸化により25-ヒドロキシビタミンD₃ [25(OH)D₃] となり、さらに腎臓の近位尿細管での水酸化によって1α, 25-ジヒドロキシビタミンD₃ (活性型ビタミンD₃: VD₃) となる。

VD₃は核内受容体であるVD₃受容体(VDR)に結合して、様々な細胞の遺伝子発現を変化させることが知られている。骨形成におけるVD₃の作用として、VD₃が骨芽細胞のVDRを介するWnt/β-cateninの発現上昇によって、骨形成を誘導することが報告されている(Larriba, et al., 2013)。また、げっ歯類の骨芽細胞では、VD₃とNotch経路が協調してオステオポンチンの転写を誘導し、骨のリモデリングを行っている可能性が報告されている(Shen & Christakos, 2005)。

一方、エナメル質形成におけるVD₃の直接的な作用についてはよく分かっていない。Molar-Incisor Hypomineralization (MIH)は近年ヨーロッパを中心に提唱

されている第一大臼歯と切歯の限局したエナメル質形成不全であり、血清中の25(OH)D₃濃度の低下により起こることが報告された (Kuhnisch, et al., 2015). また、ビタミンD₃がエナメル上皮腫由来細胞の分化に関与する可能性も示唆されている (山本, et al., 2007). これらのことからビタミンDは、エナメル芽細胞の分化や石灰化にも関係すると考えられが、詳細は不明である。

歯の原基である歯胚は、口腔上皮由来の歯原性上皮細胞と神経堤由来の間葉細胞から形成される。これらの上皮-間葉相互作用を通して、規則正しい細胞の配列や細胞移動、一定の細胞増殖と細胞分化、さらに細胞死の調節が行われ、歯の形態形成が進行する。この過程において、内エナメル上皮から形成される前エナメル芽細胞が、アメロジェニン、アメロプラスチン (AMBN)、エナメルリンといったエナメルマトリックスタンパクを分泌するエナメル芽細胞に分化する。エナメル質は、これらのタンパク質の厳密な時間的・空間的調節により形成されると考えられている。

SF 2 細胞は前エナメル芽細胞株として歯の発生メカニズムの研究に用いられている。特にAMBN高発現型のSF 2 細胞であるSF 2-24細胞が、マウス由来iPS細胞をエナメル芽細胞へ分化誘導することや、歯髄幹細胞を象牙質シアロリントタンパク質発現細胞へ分化誘導することが報告されている (Arakaki, et al., 2012). しかし、SF 2 細胞のエナメル芽細胞への分化過程については明らかにされていない。

そこで、本研究では前エナメル芽細胞の分化におけるVD 3の作用を明らかにするために、SF 2 細胞を用いてエナメル芽細胞の分化におけるVD 3の作用を検討した。

材料および方法

1. 材料

ラット歯原性上皮細胞 (SF 2 細胞) は東北大学福本教授より供与された。培養液には10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Buckinghamshire, England) 含有 Dulbecco's Modified Eagle Medium : Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F12, Gibco, MA, U.S.A) を使用した。石灰化実験での培養液は 2 mM L-Glutamine (Gibco), 50 µg/ml L (+) - Ascorbic Acid (Kanto Chemical, Tokyo, Japan), 10mM β-Glycerophosphate disodium salt hydrate (Sigma, MO, U.S.A), 10% FBS 含有 MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM EAGLE (Sigma) を使用した。

2. 試薬

1 α, 25 - Dihydroxyvitamin D₃ (VD 3, Sigma) は Dimethyl Sulfoxide (DMSO, Wako Pure Chemical Industries) にて100 µMとなるように調整し、実験に用いる時に 3, 10, 30および100 nMとなるように調整した。

3. 細胞増殖能の測定

VD 3 添加による細胞増殖能の変化を確認するために、経時変化とVD 3 濃度による変化を観察した。経時変化の解析では、SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/ml で播種し、細胞定着後 (24時間後)、VD 3 を 100 nM 添加し、1, 3, 5, 7 および10日培養後の細胞数を血球計算板にてカウントした。濃度による変化の解析では、SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/ml で播種し、細胞定着後 (24時間後)、VD 3 を 3, 10, 30 および100 nM 添加して3日間培養後の細胞数を血球計算板にてカウントした。コントロールにはVD 3 の溶媒のDMSOを添加した。

4. 免疫蛍光組織化学染色

SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/ml で Nunc™ Lab-Tek™ II Chamber Slide (Thermo Scientific, Yokohama, Japan) に播種し、24時間後にVD 3 を 100 nM 添加した。VD 3 添加24時間後および72時間後にPBSで洗浄し、20分間固定 (アセトン:メタノール = 1 : 1) した。固定したサンプルをPBSで洗浄して、4%スキムミルクで30分間ブロッキングを行った。その後PBSで洗浄し、一次抗体として Rabbit polyclonal 抗アメロプラスチン抗体 (Santa-Cruz, Texas, U.S.A) および抗コネキシン43 (CX43) 抗体 (Invitrogen, Yokohama, Japan) を 1% BSA 含有 PBS で 200 倍希釈し、4℃にて over night で反応させた。その後、0.1% BSA 含有 PBS で洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) を 1% BSA 含有 PBS で 200 倍希釈し、室温にて 1 時間反応させた。洗浄後、核を Dapi Fluoromount-G (Dapi, Southern-Biotech, AL, U.S.A) を用いて染色し、組織封入剤にて封入後、x40油浸対物レンズ (NA = 1.30) を取り付けた共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon EZ-C 1) を用いて観察を行った。

5. 石灰化誘導能の解析

1) アリザリンレッドS染色

SF 2 細胞を 1 x 10⁵ cells/ml で播種し、DMEM/F12 で 24 時間培養後、VD 3 および CaCl₂ を加えた石灰化実験用培養液で 10 日間培養した。この実験で使用した VD 3 は 100 nM で、CaCl₂ は 0 mM, 1 mM もしくは 2 mM 添加し、

CaCl₂の総量を1.8 mM, 2.8 mMおよび3.8 mMとした。培養後の細胞を70%エタノールで冷却固定, 洗浄し, アリザリンレッドS (Sigma) で5分間染色した。

2) アルカリフォスファターゼアッセイ (ALP assay)

アリザリンレッドS染色後のプレートをpH7.0に調整したCetylpyridinium chloride (Sigma) で脱色を行い, ラボアッセイ™ ALP (Wako Pure Chemical Industries) にてALP assayを行った。検体をp-ニトロフェニルリン酸を含む緩衝液中で15分間作用させ, 検体中のアルカリフォスファターゼによりp-ニトロフェニルリン酸がp-ニトロフェノールとリン酸に分解される反応により, 検体中のアルカリフォスファターゼ活性を測定した。生成したp-ニトロフェノールはBIO-RAD model 680 micro plate readerで405 nmの吸光度を測定し求めた。

6. 統計処理

一元配置分散分析を行ったのち, Tukey法, Scheffe法, Fisher法にて検定を行い, 有意差検定を行った。なお, 有意水準P<0.05で有意差ありとした。

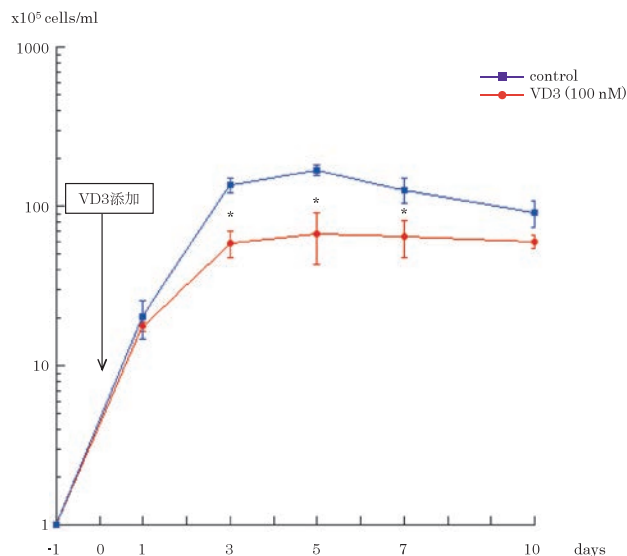
結 果

1. SF2細胞の増殖に対するVD3の作用

VD3の増殖能への影響を調べるために, VD3の存在下および非存在下でSF2細胞の培養を行い, 細胞数を測定した。図1は100 nMのVD3存在下および非存在下で, 1, 3, 5, 7および10日間の培養後の細胞数を測定した結果である。VD3添加によって, 培養3日目からSF2細胞の増殖抑制が認められた (図1)。SF2細胞に3, 10, 30および100 nMのVD3を添加した3日間培養後の細胞数は, コントロール群では約80x10⁵ cells/mlなのに対して, VD3添加群では約60x10⁵, 55x10⁵, 50x10⁵および40x10⁵ cells/mlとVD3濃度に依存した増殖抑制が認められ, 血中正常値の中央値である100 nMのVD3によって約50%に低下することが分かった (図2)。

2. VD3によるAMB NおよびCX43発現への影響

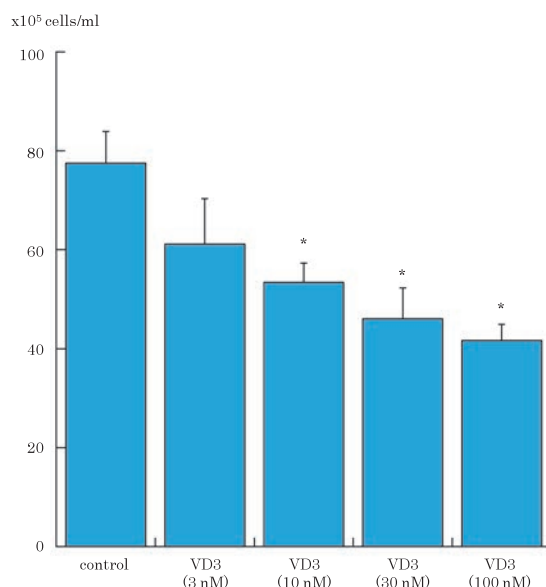
VD3添加時の細胞の分化程度を観察するために, AMBNとCX43の発現を免疫蛍光組織化学染色で観察した。エナメル芽細胞の分化マーカーであるAMB NはVD3 (100 nM) 添加群で, VD3添加後24時間, 72時間ともにコントロール群 (DMSO添加群) と比較して細胞質での発現の増強が認められた (図3)。VD3添加群では24時間後からAMB Nの発現が認められ, 72時間後では更に発現が増強された。それに対してコントロール群では24時間後ではAMB Nの発現はほぼ認められず, 72時間後



* P < 0.05

図1. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加による増殖能の経時的变化

VD3の増殖能への影響を調べるために, VD3 (100 nM)の存在下および非存在下でSF2細胞を1, 3, 5, 7および10日間培養し, 細胞数を比較した。コントロールにはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。細胞増殖はVD3添加群で3日目から抑制された。値は4~16回の実験の平均値±標準誤差を示す。



* P < 0.05

図2. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3濃度による増殖能の変化

SF2細胞にVD3を3, 10, 30および100 nM添加し, 3日間の培養後の細胞数を比較した。コントロールにはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。

細胞増殖はVD3濃度が10, 30および100 nMのとき抑制された。

値は4回の実験の平均値±標準誤差を示す。

で発現が認められた。

ギャップジャンクションの構成タンパク質であるCX43はVD3添加群で, 添加後24時間で発現の増強が認め

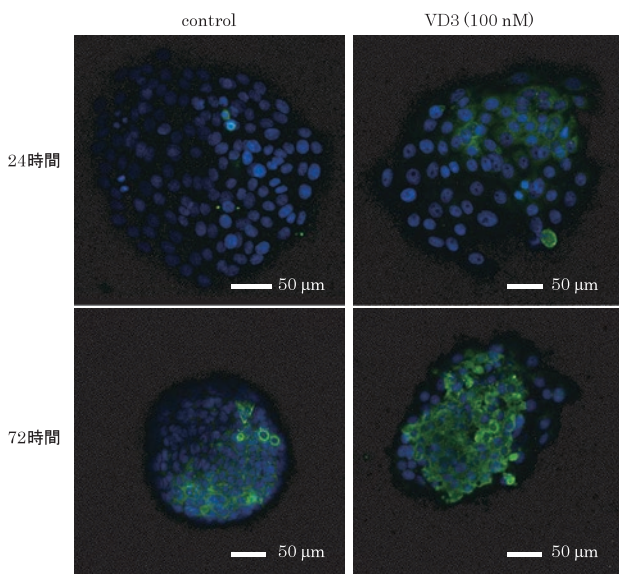


図3. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるアメロプラスチンの発現および局在の変化

細胞の分化程度を観察するために、VD3 (100 nM) 添加によるエナメルマトリックスタンパク (アメロプラスチン: AMBN) の発現を免疫蛍光組織化学染色で観察した。AMBNは緑、核はDapi (青) で染色した。AMBNはVD3添加後24時間後、72時間後ともにコントロールと比較して細胞質での発現が増強された。コントロールにはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。

られた。72時間ではコントロール群、VD3添加群ともに発現が認められたが、VD3添加群ではコントロールと比較して、細胞膜への局在が顕著であった。また、コントロールのCX43が細胞膜全体に均一に分布するのに対し、VD3添加群では斑状の強い蛍光として観察された (図4)。

3. VD3による石灰化への影響

VD3によるSF2細胞の石灰化誘導能を観察するために、アリザリンレッドS染色と、ALP assayをおこなった。アリザリンレッドS染色では、VD3添加群でCaCl₂濃度が2.8 mM以上のとき (CaCl₂ 1.0 mM以上添加時) に顕著な石灰化物の沈着がおこることが示された (図5)。さらに、ALP assayによってVD3による石灰化誘導能を定量的に解析した。生成されたp-ニトロフェノールはVD3添加群では0.7~0.8 mMなのに対して、コントロール群では約0.1~0.2 mMであり、ALP活性は、VD3添加群においてコントロール群と比較して3~8倍の顕著な増加が認められた。また、このALP活性の増加は、細胞外へのCaCl₂の添加を必要としなかった。これらのことから、VD3によるSF2細胞のALP活性の増加は細胞外へのCaCl₂の添加の影響を受けないことが明らかとなった (図6)。

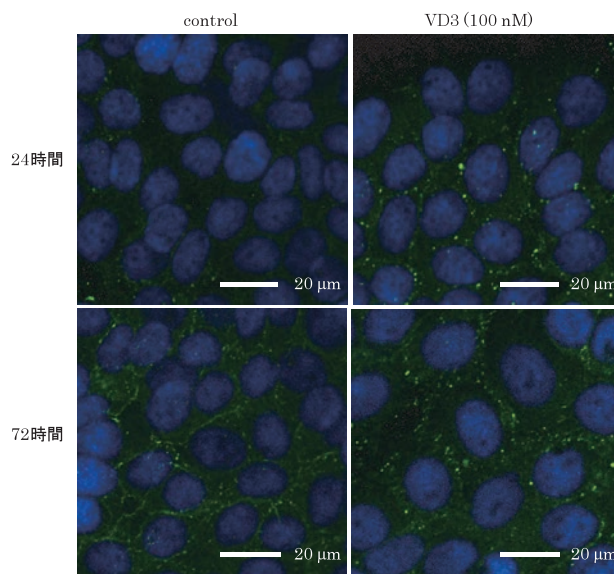


図4. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるギャップジャンクションタンパクの発現および局在の変化

細胞の分化程度を観察するために、VD3 (100 nM) 添加によるギャップジャンクション (コネキシン43: CX43) の発現を免疫蛍光組織化学染色で観察した。CX43は緑、核はDapi (青) で染色した。CX43はVD3添加後24時間で発現増強が認められた。72時間後ではコントロール、VD3添加群ともに発現が認められた。VD3添加群ではコントロールと比較して膜への局在が顕著であった。コントロールはVD3の溶媒であるDMSOを添加した。

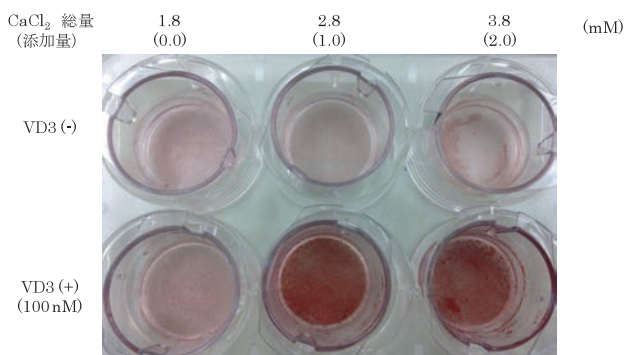


図5. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるアリザリンレッドS染色の変化

VD3による石灰化誘導能を観察するために、石灰化物の沈着をアリザリンレッドS染色で観察した。石灰化物の沈着はVD3と1.0 mM以上のCaCl₂添加群で顕著に認められた。

考 察

本研究ではSF2細胞をVD3存在下で培養すると、細胞増殖能の抑制、石灰化能の亢進、エナメル芽細胞の分化マーカーであるAMBNやCX43の発現上昇を起こすことが明らかになった。

VD3を添加すると、SF2細胞の増殖が添加後3日目から抑制されること、AMBNの発現がコントロール群と比較して早い段階から観察されたこと、CX43の膜への局在が早期に認められることから、VD3は分化を早め

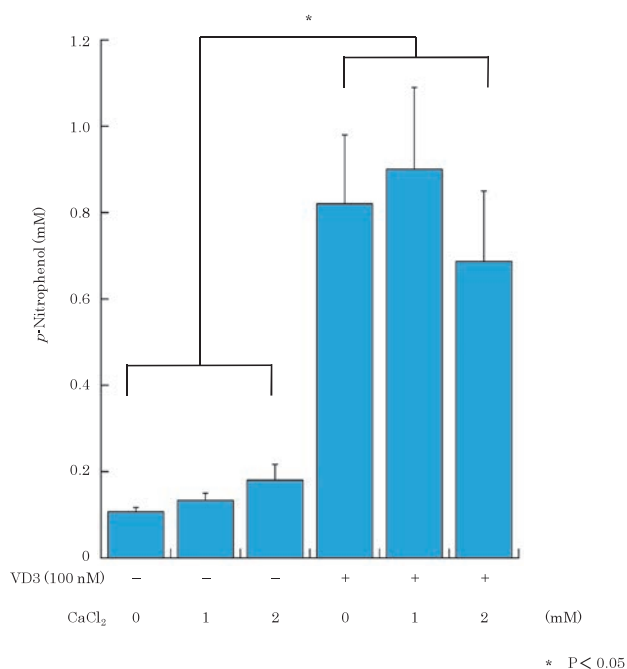


図6. ラット歯原性上皮細胞におけるVD3添加によるALP活性の変化

VD3による石灰化誘導能を観察するために、ALP活性の変化を観察した。ALP活性はVD3添加群で顕著な増加が認められた。値は12回の実験の平均値±標準誤差を示す。

る作用があることが示唆された。AMBNは分化中のエナメル芽細胞で発現するエナメルマトリックスタンパクであり (Fincham, et al., 1999), 分泌期のエナメル芽細胞で多く分泌され、エナメル芽細胞の増殖を抑制して、分泌期のエナメル芽細胞の分化を維持する働きを担っていると考えられている (Sonoda, et al., 2009)。エナメル質形成においてAMBNは必要不可欠なタンパク質であり、AMBN欠損マウスではエナメル質形成不全が生じることが報告されている (Fukumoto, et al., 2004)。

CX43はギャップジャンクションを構成する主要なタンパク質であり、6量体になることによりコネクソンを構成する。隣接する細胞のコネクソン同士が連結することで、チャンネル機能を司るギャップジャンクションが形成される。ギャップジャンクションは、分子量1200以下の分子を通過させる通路であり、これらが多数集合して斑状のギャップ結合を形成し、セカンドメッセンジャーの交換など細胞間情報伝達が行われる。VD3の存在下で培養した細胞では、早期にCX43の発現が見られただけでなく、斑状の分布が顕著であったことから、VD3はギャップ結合の形成を促進すると考えられる。コネクシンは発生の初期から認められ、発生や分化過程への関与が推測されている。このCX43の欠損によりおこる眼歯指異形成症では、エナメル質形成不全をおこすことが報告されており (Jamsheer, et al., 2014), CX43欠損マウ

スではAMBNの形成が低下することが報告されている (Haku, et al., 2011, Toth, et al., 2010)。これらのことからVD3は、SF2細胞のエナメル芽細胞への分化を誘導し、エナメル質形成に関わるタンパク質を発現させたと考えられる。

SF2細胞に対するVD3の分化誘導能は、アリザリンレッドS染色およびALP assayによっても確認された。アリザリンレッドS染色による解析では、VD3による石灰化の亢進は1 mM以上添加時のCaCl₂存在下で認められた。この結果から、SF2細胞が石灰化能をもった細胞へと分化し、石灰化物の沈着が起こったことが明らかとなった。一方、ALP assayによる石灰化能の定量的解析では、VD3添加によるALP活性の上昇に細胞外へのCaCl₂の添加は影響しなかった。これらのことから高濃度の細胞外カルシウムはALPの誘導には必須ではないが、石灰化物の沈着には必要であると考えられる。ALPは分化中のエナメル器のエナメル芽細胞近位にある中間層の細胞で強く発現するといわれており、エナメル質の石灰化に重要な働きをもっている (Kawano, et al., 2002)。また、エナメル芽細胞同士はタイトジャンクションを形成して緊密に連結する。この細胞間に分泌された高濃度のエナメルマトリックスタンパクと細胞外Ca²⁺の反応によって石灰化が起こるとの報告がある (Hubbard, 2000)。アリザリンレッドS染色で検出された石灰化物の沈着は、このような過程を反映したものと考えられる。

VD3の存在により活性化する細胞内シグナル伝達経路には様々なものが報告されている (Gocek & Studzinski, 2009)。VD3はガン細胞の増殖を抑制するといわれており、例えばマウス基底細胞癌や、胎生期の横紋筋肉腫ではHedgehog経路の活性化により、分化を誘導することで増殖を抑制するとの報告がある (Larriba, et al., 2014, Uhmman, et al., 2011)。角化上皮細胞ではVDRとβ-cateninが相互作用により増殖と分化を制御しているとの報告もある (Hu, et al., 2014)。またWnt/β-cateninの発現上昇による骨形成誘導や (Larriba, et al., 2013)、Noch経路との共同による骨のリモデリングへの関与の可能性も報告されている (Shen & Christakos, 2005)。

本研究では、VD3が前エナメル芽細胞であるSF2細胞の分化を誘導し、エナメルマトリックスタンパクを多く分泌する細胞へと変化させるとともに、石灰化を誘導する作用をもつことが明らかになった。今後、VD3が活性化する様々なシグナル経路のうち、どの経路が関与しているかは検討が必要である。

結 論

VD₃は前エナメル芽細胞であるSF2細胞におけるAMBNやCX43の発現および石灰化能を上昇させ、前エナメル芽細胞からエナメル芽細胞への分化に関与することが示唆された。

謝 辞

本研究を行うにあたり、前エナメル芽細胞を提供して下さった東北大学小児歯科福本敏教授に感謝を述べるとともに、本稿を終えるにあたり、御助言、御協力をいただきました同学歯学部口腔生物学系薬理学分野の諸先生に心より御礼申し上げます。

また、本研究には、北海道医療大学個体差健康科学研究プロジェクトの助成金の一部が利用された。

文 献

- Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y & Fukumoto S. Role of epithelial–stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem* 287 : R10590–R10601, 2012.
- Fincham A G, Moradian–Oldak J & Simmer J P. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 126 : R270–R299, 1999.
- Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach P H, Nanci A, Kulkarni A B & Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. *J Cell Biol* 167 : R973–R983, 2004.
- Gocek E & Studzinski G P. Vitamin D and differentiation in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46 : R190–R209, 2009.
- Haku K, Muramatsu T, Hara A, Kikuchi A, Hashimoto S, Inoue T & Shimono M. Epithelial cell rests of Malassez modulate cell proliferation, differentiation and apoptosis via gap junctional communication under mechanical stretching in vitro. *Bull Tokyo Dent Coll* 52 : R173–R182, 2011.
- Hu L, Bikle D D & Oda Y. Reciprocal role of vitamin D receptor on beta–catenin regulated keratinocyte proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 144 Pt A : R237–R241, 2014.
- Hubbard M J. Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med* 11 : R437–R466, 2000.
- Jamsheer A, Sowinska–Seidler A, Socha M, Stembalska A, Kiraly–Borri C & Latos–Bielenska A. Three novel GJA1 missense substitutions resulting in oculo–dento–digital dysplasia (ODDD)–further extension of the mutational spectrum. *Gene* 539 : R157–R161, 2014.
- Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura N, Uchida T, Ohishi M, Toyoshima K & Harada H. Establishment of dental epithelial cell line (HAT–7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect Tissue Res* 43 : R409–R412, 2002.
- Kuhnisch J, Thiering E, Kratzsch J, Heinrich–Weltzien R, Hickel R & Heinrich J. Elevated serum 25(OH)–vitamin D levels are negatively correlated with molar–incisor hypomineralization. *J Dent Res* 94 : R381–R387, 2015.
- Larriba M J, Gonzalez–Sancho J M, Barbachano A, Niell N, Ferrer–Mayorga G & Munoz A. Vitamin D Is a Multi–level Repressor of Wnt/b–Catenin Signaling in Cancer Cells. *Cancers (Basel)* 5 : R1242–R1260, 2013.
- Larriba M J, González–Sancho J M, Bonilla F & Muñoz A. Interaction of vitamin D with membrane–based signaling pathways. *Frontiers in Physiology* 5, 2014.
- Shen Q & Christakos S. The vitamin D receptor, Runx2, and the Notch signaling pathway cooperate in the transcriptional regulation of osteopontin. *J Biol Chem* 280 : R40589–R40598, 2005.
- Sonoda A, Iwamoto T, Nakamura T, Fukumoto E, Yoshizaki K, Yamada A, Arakaki M, Harada H, Nonaka K, Nakamura S, Yamada Y & Fukumoto S. Critical role of heparin binding domains of ameloblastin for dental epithelium cell adhesion and ameloblastoma proliferation. *J Biol Chem* 284 : R27176–R27184, 2009.
- Toth K, Shao Q, Lorentz R & Laird D W. Decreased levels of Cx43 gap junctions result in ameloblast dysregulation and enamel hypoplasia in Gja1Jrt/+ mice. *J Cell Physiol* 223 : R601–R609, 2010.
- Uhmman A, Niemann H, Lammering B, Henkel C, Hess I, Nitzki F, Fritsch A, Pruffer N, Rosenberger A, Dullin C, Schraepfer A, Reifenberger J, Schweyer S, Pietsch T, Strutz F, Schulz–Schaeffer W & Hahn H. Antitumoral effects of calcitriol in basal cell carcinomas involve inhibition of hedgehog signaling and induction of vitamin D receptor signaling and differentiation. *Mol Cancer Ther* 10 : R2179–R2188, 2011.
- 山本浩貴, 山田龍男, 嶽北亜希, 有家巧, 正重裕一, 藤井隆史, 砂田典子, 本橋具和, 奥田勝也, 窪寛仁,

中嶋正博&覚道健治. 濾胞型エナメル上皮腫由来細胞
に対するレチノイン酸およびビタミンD3の影響. 歯
科医学 70 : R65-R71, 2007.



村田 佳織

平成16年3月 北海道滝川高等学校 卒業
平成17年4月 北海道医療大学歯学部歯学科 入学
平成23年3月 北海道医療大学歯学部歯学科 卒業
平成24年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学

[Original]

A combination of oral care and 23-valent-pneumococcal vaccination is able to reduce pneumonia incidence in nursing homes

Masahiro HATTA D.D.S.¹⁾, Takahiro ICHIKI M.D.²⁾, Hiroyuki MORITA M.D.³⁾,
Masako HATTA D.D.S.¹⁾, Tomohiko MURAKAMI M.D.⁴⁾

1) Department of Dentistry, Yubari Kibounomori

2) Hosanna Family Clinic

3) South Japan Health Research Lab

4) Murakami Internal Medicine-Pediatrics Clinic

Key words : Community medicine, Community health, Elderly, Nursing care level, Primary care

Abstract

Longevity places Japan among the leading nations in the world, and worldwide the number of the elderly is expected to increase both in developed and developing countries ; with an aging population comes increases in the incidence of diseases associated with old age, and here pneumonia is one of the most common causes of death in the elderly. In an effort to reduce the incidence of pneumonia, we conducted an interventional study with elderly residents of a nursing home in Yubari and compared the incidence of pneumonia with a similar nursing home in a neighboring town between 2009 and 2010. We provided a combination of oral care and

pneumococcal plus influenza vaccinations in the intervention group. The incidence of pneumonia was 2.0% in the intervention group while it was 22.3% in the non-intervention group. The death rate from pneumonia was 1.0% in the intervention group and 8.5% in the non-intervention group. The incidence of pneumonia and the death rate due to pneumonia were all significantly lower in the intervention group ($p < 0.05$). It is concluded that appropriate oral care combined with pneumococcal and influenza vaccination can be expected to result in a significant reduction in pneumonia in nursing homes.

Introduction

According to the World Health Organization (WHO), Japan was leading the world in longevity in 2015. The average global life span is 68 years for males and 73 years for females, while in Japan the average life span is 80 years for males and 87 years for females (http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2015/en/, Nov. 2015). The percentage of Japanese citizens over 65 years of age was estimated as 26.0% in 2014, the highest in the world. In the future, the percentage of the elderly is likely to increase both in developed and developing countries.

Many previous reports have shown that administration of pneumococcal vaccine (against *Streptococcus pneumoniae*) is effective as a prophylaxis for pneumococcal pneumonia. Pneumococcal vaccination has been associated with a 44.8

% reduction in the incidence of pneumonia in a nursing home (Maruyama et al., 2010) and has also reduced the incidence of pneumonia by 70% in high-risk patients (Shapiro & Clemens, 1984 ; Cornu et al., 2001). Pneumococcal vaccination in the time of year with high risks of influenza has been associated with a 27% reduction in the incidence of hospitalizations for pneumonia and a 34% reduction in the rate of death (Nichol, 1999). Further, combined pneumococcal and influenza vaccinations have been reported to result in a 50-60% reduction in the incidence of hospitalizations for pneumonia and a 81% reduction in the rate of death (Nichol, 1999 ; Chiba et al., 2004 ; Christenson et al., 2001 ; Christenson et al., 2004).

Oral bacteria may be aspirated into the respiratory tract, facilitating initiation and progression of systemic infectious diseases, such as pneumonia (Scannapieco, 1999 ; Scan-

napieco et al., 2001), and adequate oral hygiene has been reported to be associated with a reduction in the incidence of respiratory infections in the elderly (Yoneyama et al., 1996). Yoneyama et al. also reported that oral care was associated with a decrease in the incidence of pneumonia in the elderly (Yoneyama et al., 1999). These studies suggest that oral hygiene may be expected to play an important role in the care of the elderly in hospitals and nursing homes.

Yubari is a small city in Northern Japan with a population of 9900. It has the highest proportion of persons over 65 years of age in Japan, estimated as 46.5% in 2013. To evaluate the effects of combined oral care and pneumococcal plus influenza vaccinations, the present study was conducted as a prospective and interventional study, non-randomized and non-blinded, comparing elderly residents in a nursing home in Yubari with residents of a similar nursing home in the neighboring similar-sized town, Hobetsu, using the rate of incidence and survival rate from pneumonia to compare the two groups (residents of homes for elderly persons).

Materials and Methods

Study design

During a 1-year period from November 1, 2009, we conducted a prospective and interventional study comparing elderly residents of a nursing home residing here for the whole year, in Yubari (105 residents) and in a similar nursing home (98 residents) in a neighboring town 30 km away.

The entry criteria were obtained with the consent of the residents or a legal representative in each nursing home. Exclusion criteria were when vaccination of a resident was not advisable, like with suspicion of allergy to components of the vaccine.

Intervention

The intervention group in Yubari was provided with oral care and was inoculated with both pneumococcal vaccine 0.5ml (MSD) and influenza vaccine 0.5ml (Mitsubishi Tanabe Pharm). The non-intervention group was given only the influenza vaccine 0.5ml (Mitsubishi Tanabe Pharm).

In the intervention group, one dentist and two dental hygienists visited the nursing home once a week. After the residents agreed to be subjected to oral care, the dentist or dental hygienist spent 15 minutes brushing the teeth of the resident, performed scaling, oral wiping, and assisted with gargling and cleaning of removable prosthesis. The aim of

the intervention was to reduce dental plaque (mainly biofilms of oral bacteria) mechanically by cleaning utensils, including toothbrushes, interdental brushes, dental scalers, tongue, and sponge brushes. This took place at the washstand in the private room occupied by the resident. Residents and nursing care workers were also shown methods of administering responsible oral care and how to dye to identify dental plaque by using plaque disclosing compounds. Longer time was spent on the oral care of un-communicative residents. To improve daily oral care skills, a lecture on oral care for nursing care workers was given at the start of the study and at 6 months after the start of the trial. In the weekly visits during the six months, the nursing care workers and residents were instructed in the basics of daily mouth care and the importance of routine performance of such care. The nursing care workers cleaned the mouths of the residents using cleaning utensils after each meal every day. We evaluated the oral care with evaluation indices commonly used by dentists – the Oral Hygiene Index (OHI-S) (Greene & Vermillion, 1964), and the Community Periodontal Index of Treatment needs (CPITN) (Ainamo et al., 1982). In the non-intervention group, the nursing care workers cleaned the mouths of the residents using cleaning utensils after each meal, every day. In this group the residents did not receive oral care by the dentists and dental hygienists. Here the study was conducted in secret, to ensure that care staff did not change procedures or awareness of the value of oral care. Primary care physicians visited both facilities to determine the clinical state of the residents once a week.

Outcome measure

The primary endpoint was pneumonia diagnosis. The secondary endpoint was death from pneumonia. We diagnosed pneumonia on the basis of the Japanese Respiratory Society guidelines by the primary care physicians at both facilities.

Ethics

The study was approved by the Japan Medical Association Centre for Clinical Trials (ref. no. JMA-IIA00066) and the Clinical Trial gov. (ref. no. NCT01403805). The study was also declared ethically justified and approved by the Yubari Kibounomori, Yubari Medical Centre Review Board. All participating residents fulfilled the criteria of safety required for the vaccination.

Statistical analysis

The mean ± standard deviation (SD) and numbers (frequencies) are reported as the relevant measures throughout the manuscript. Differences between the two nursing homes were compared using Fisher’s exact test or the chi-square test for categorical variables and unpaired t test or Mann–Whitney test, as appropriate, for continuous variables according to the data distributions. Differences between the two subject groups with and without pneumonia were also compared. Survival plots were constructed using the Kaplan–Meier method with comparisons between plots based on the log–rank test. Univariate and multivariate regression analyses using the Cox proportional hazards model for primary pneumonia occurrence were also performed. Variables adjusted for in the multivariate analysis were vaccine inoculation, age, gender, care level, smoking, and presence of diabetes, congestive heart failure, cerebrovascular disease, and history of pneumonia. Age, a continuous variable, was divided into two categories in the univariate analysis (≥90 years old or others), and was categorized for every 10 years of age in the multivariate analysis. Relative risk ratios (RR) and the 95% confidential intervals (95% CI) before and after adjustment with variables were computed to measure the strength of the association. Log (events) – log (time) graphics on significant variables in the Cox proportional regression model were used to confirm the proportional hazard model. A p value of <0.05 was considered statistically sig-

nificant. The IBM SPSS Statistics ver. 19 software was used for all computations.

Results

Residents

Seven (6.6%) of the 105 eligible participants in the intervention group were excluded : 2 residents left the nursing home during the period of the study, 3 could not be vaccinated, 1 rejected oral care, and 1 died before the start of the oral care intervention, and so 98 residents comprised the intervention group (Fig. 1). In the non-intervention group, no one was excluded out of the 94 participants. None of the participants showed notable side effects after the vaccination. Table 1 shows the baseline characteristics of the residents of the 2 nursing homes (the participants of the two groups). There were no statistically significant differences in gender, age, Japanese care score, or incidence of diabetes mellitus. In the intervention group, the rate of heart failure, cerebrovascular disease, history of pneumonia, dentulous, and removable prosthesis use, are significantly higher than those of the non-intervention group.

Comparison of the incidence of pneumonia

The incidence of pneumonia in the intervention group was 2% (2 participants) and in the non-intervention group 22.3% (34 participants) (Table 2). The death rate from pneumonia was 1.0% in the intervention group and 8.5% in the non-intervention group. The death rate from all causes, in-

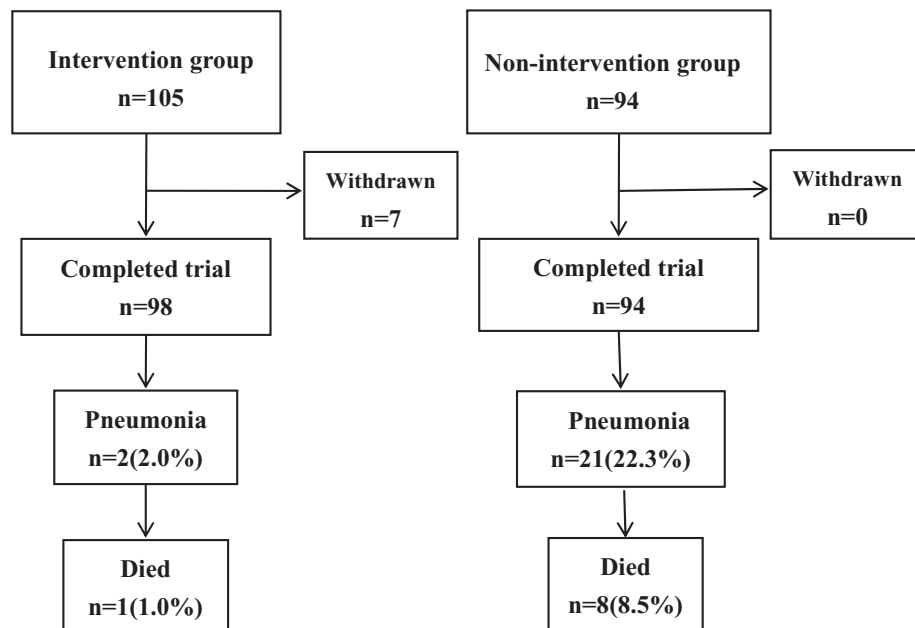


Figure 1 Flow diagram of enrolment and outcomes.

Table 1 Baseline Characteristics of Nursing Home Residents

| | Intervention group (n=98) | Non-intervention group (n=94) | P values |
|--|----------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Age, years old | 86.4 ± 7.5 | 85.0 ± 7.5 | 0.202 ¹⁾ |
| Gender male / female, number (%) | 24 / 74 (24.5/75.5) | 28 / 66 (29.8/70.2) | 0.422 ²⁾ |
| Care level 1 / 2 / 3 / 4 / 5, number (%) *(Japanese care score : level 1-5) | 2/11/32/33/20 (2/11/33/34/20) | 5/6/26/32/25 (5/6/28/34/27) | 0.342 ³⁾ |
| Smoker, number (%) | 0 (0.0) | 6 (6.3) | 0.013 ³⁾ |
| Diabetes Mellitus, number (%) | 14 (14.3) | 19 (20.2) | 0.340 ³⁾ |
| Congestive Heart Failure, number (%) | 21 (21.4) | 5 (5.3) | 0.001 ²⁾ |
| Cerebrovascular Disease, number (%) | 61 (62.2) | 23 (24.5) | <0.001 ²⁾ |
| History of pneumonia, number (%) | 15 (15.3) | 5 (5.4) | 0.032 ²⁾ |
| Dentulous, number (%) | 46 (46.9) | 28 (29.8) | 0.018 ²⁾ |
| Removable Prosthesis use, number (%) | 57 (58.1) | 40 (42.6) | 0.043 ²⁾ |

Continuous variables are expressed as means ± standard deviation. ¹⁾ Unpaired t test, ²⁾ Fisher's exact test, ³⁾ Mann-Whitney test

*Japanese care score (level 1 – 5 : level 5 is very serious) is assessed by the level of ADL, dementia, swallowing disorders, malnutrition, physical impairment.

Table 2 Clinical Outcomes One Year after the Start of the Study in the Two Groups

| | Intervention group (n=98) | Non-intervention group (n=94) | P values of between differences |
|--|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|
| Primary Pneumonia (No. %) | 2 (2.0) | 21 (22.3) | <0.001 ¹⁾ |
| Deaths caused by Pneumonia (No. %) | 1 (1.0) | 8 (8.5) | 0.017 ¹⁾ |
| All deaths (No. %) | 10 (10.2) | 19 (20.2) | 0.053 ²⁾ |
| Total No. of Pneumonia (No. residents) | 2 (2) | 34 (21) | <0.001 ³⁾ |

¹⁾ Fisher's exact test, ²⁾ Chi-square test, ³⁾ Mann-Whitney test

cluding pneumonia, was 10.2% in the intervention group and 20.2% in the non-intervention group. The incidence of pneumonia, death rate from pneumonia, and the number of pneumonia recurrences in the intervention group were statistically significantly lower than those in the non-intervention group ($p < 0.05$). The risk ratios for pneumonia before and after the adjustments with variables as determined using a Cox proportional hazards model are shown in Tables 3 and 4. Additionally, the Log (event) – log (time) graphics for two variables, both vaccine inoculations and care score \geq level 4 (Japanese standard), show approximately parallel survival curves, confirming the adequacy of the study based on the proportional hazard model (Table 4).

The Kaplan-Meier method was used to calculate the survival plots. There was a significant difference in the Kaplan-Meier survival plots for primary pneumonia occurrence between the 2 groups (2 residents in the intervention group vs. 21 residents in the non-intervention group) (Fig. 2-A). The mean follow-up periods in the intervention group and the non-intervention group were 11.4 ± 1.9 and 10.2 ± 3.5 months, respectively. There were no significant differences in the Kaplan-Meier survival plots for all-causes of death between the 2 groups (10 residents in the intervention group vs. 19 residents in the non-intervention group) (Fig. 2-B). The mean follow-up periods in the intervention and non-intervention groups were 11.4 ± 1.9 and 10.8 ± 3.1 months,

Table 3 Details of Baseline Characteristics of the Two Groups with and without Pneumonia vaccination

| | Pneumonia (+) (n=23) | Pneumonia (-) (n=169) | P values |
|--|------------------------------|---------------------------------|----------------------|
| Two vaccines and oral care, number (%) | 2 (8.7) | 96 (56.8) | <0.001 ¹⁾ |
| Age, years old | 86.2 ± 6.0 | 85.6 ± 7.7 | 0.737 ²⁾ |
| Male gender, number (%) | 8 (34.8) | 44 (26.0) | 0.453 ¹⁾ |
| Care level 1 / 2 / 3 / 4 / 5, number (%) *(Japanese care score : level 1-5) | 0/1/6/6/10 (0/4/26/26/44) | 7/16/52/59/35 (4/9/31/35/21) | 0.034 ³⁾ |
| Smoker, number (%) | 1 (4.3) | 5 (3.0) | 0.540 ¹⁾ |
| Diabetes mellitus, number (%) | 6 (26.1) | 27 (16.0) | 0.242 ¹⁾ |
| Congestive heart failure, number (%) | 1 (4.3) | 25 (14.8) | 0.325 ¹⁾ |
| Cerebrovascular disease, number (%) | 6 (26.1) | 78 (46.2) | 0.077 ¹⁾ |
| History of pneumonia, number (%) | 3 (13.0) | 17 (10.1) | 0.714 ¹⁾ |
| Dentulous, number (%) | 4 (17.4) | 70 (41.4) | 0.038 ¹⁾ |
| Removable Prosthesis use, number (%) | 11 (47.8) | 86 (50.9) | 0.827 ¹⁾ |

Continuous variables are expressed as means ± standard deviation. ¹⁾ Fisher's exact test, ²⁾ Unpaired t test, ³⁾ Mann-Whitney test

*Japanese care score (level 1 – 5 : level 5 is very serious) is assessed by the level of ADL, dementia, swallowing disorders, malnutrition, physical impairment.

Table 4 Relative Risk Ratios for Pneumonia before and after Adjustment with Variables

| Variables | Univariate analysis | | Multivariate Analysis | |
|--|---------------------|----------|-----------------------|----------|
| | RR (95%CI) | P values | RR (95%CI) | P values |
| Two vaccines and oral care | 0.07 (0.02 - 0.32) | 0.001 | 0.08 (0.01 - 0.41) | 0.003 |
| Age ≥90 years old ¹⁾ Categorized by every 10 years ²⁾ | 1.06 (0.62 - 1.81) | 0.844 | 1.20 (0.62 - 2.32) | 0.586 |
| Male gender | 1.52 (0.60 - 3.82) | 0.378 | 2.45 (0.72 - 8.33) | 0.153 |
| Care level ≥ level 4 *(Japanese care score : level 1-5) | 1.69 (1.04 - 2.74) | 0.034 | 1.90 (1.02 - 3.54) | 0.045 |
| Smoker | 1.49 (0.17 - 13.36) | 0.721 | 1.24 (0.10 - 15.37) | 0.865 |
| Diabetes mellitus | 1.86 (0.67 - 5.14) | 0.234 | 1.96 (0.59 - 6.49) | 0.271 |
| Congestive heart failure | 0.26 (0.03 - 2.03) | 0.200 | 0.25 (0.02 - 2.92) | 0.274 |
| Cerebrovascular disease | 0.41 (0.16 - 1.10) | 0.076 | 0.88 (0.27 - 2.90) | 0.837 |
| History of pneumonia | 1.34 (0.36 - 4.99) | 0.661 | 3.01 (0.59 - 15.34) | 0.185 |
| Dentulous | 0.30 (0.10 - 0.91) | 0.034 | 0.47 (0.12 - 1.80) | 0.269 |
| Removable Prosthesis use | 0.89 (0.37 - 2.12) | 0.783 | 1.31 (0.41 - 4.20) | 0.651 |

¹⁾ used in univariate analysis, ²⁾ used in multivariate analysis RR indicates relative risk ratios ; CI, confidential interval.

*Japanese care score (level 1 – 5 : level 5 is very serious) is assessed by the level of ADL, dementia, swallowing disorders, malnutrition, physical impairment.

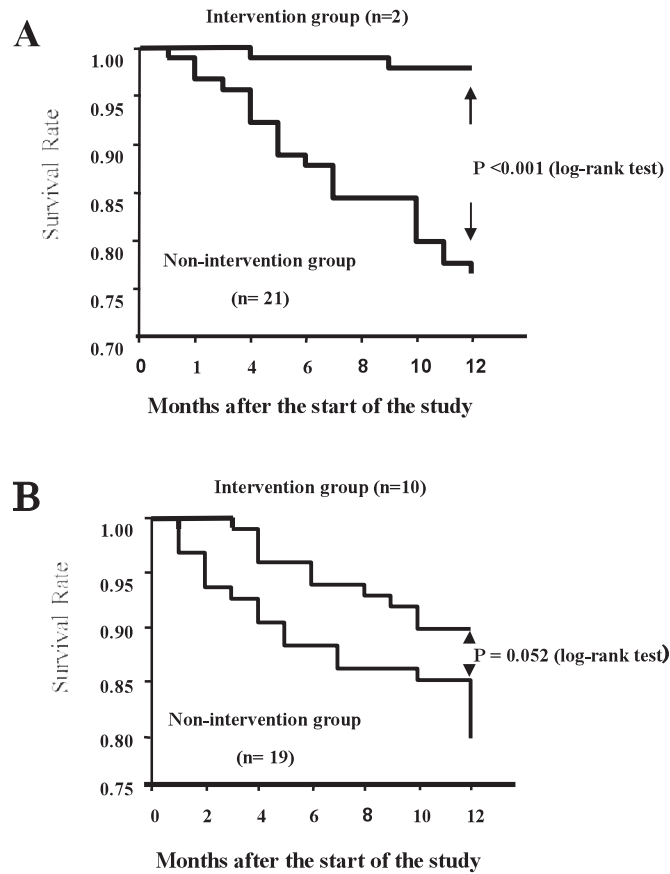


Figure 2 Kaplan–Meier survival plots of primary pneumonia occurrence (A) and all deaths (B)

Kaplan–Meier survival plots of primary pneumonia occurrence (A) and all deaths (B). There was a significant difference in the Kaplan–Meier survival rates for primary pneumonia occurrence in the intervention group and in the non–intervention group (A). There was no significant difference in the Kaplan–Meier survival rates for all–causes of death of the intervention group and the non–intervention group (B).

Table 5 Change of the OHI–S Mean Score and CPITN Mean Score of Every 6 Month after the Start of the Study in the Intervention Group

| | 0 Month (n=51) | 6 Months (n=45) | 1 year (n=38) |
|-----------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| OHI-S Score, mean(SD) | 2.45 (1.14) | 2.02 (1.42) | 1.26 (1.13) |
| CPITN Score, mean(SD) | 2.16 (1.37) | 2.2 (1.39) | 1.5 (1.33) |

Lower numbers indicate better conditions

respectively.

Evaluation of oral care

In the intervention group, the Hygiene Index (OHI–S) score results at the start of the study was 2.45 ± 1.14 , after 6 months 2.02 ± 1.42 , and after 1 year it was 1.26 ± 1.13 . The Community Periodontal Index of Treatment needs (CPITN) score results at the start of the study was $2.16 \pm$

1.37 , after 6 months 2.2 ± 1.39 , and after 1 year it was 1.5 ± 1.33 (Table 5). In both these measures lower numbers show “better” states.

Discussion

We examined the effects of a combination of oral care and pneumococcal plus influenza vaccinations on the pneumonia occurrence of elderly nursing home residents at a

small area in Japan. The results of the study showed that the combination of oral care and these vaccinations statistically significantly reduced the rate of pneumonia and reduced the death rate from pneumonia in these nursing home residents.

To the best of our knowledge, this study is the first trial showing the benefits of combined oral care and pneumococcal plus influenza vaccinations. In previous studies, either of the vaccination or oral care has been shown to prevent pneumonia in the elderly (Maruyama et al., 2010 ; Shapiro and Clemens, 1984 ; Cornu et al., 2001 ; Nichol, 1999 ; Chiba et al., 2004 ; Christenson et al., 2001 ; Christenson et al., 2004 ; Scannapieco, 1999 ; Scannapieco et al., 2001 ; Yoneyama et al., 1996 ; Yoneyama et al., 1999). Pneumococcal vaccination and influenza vaccination decrease the rate of pneumonia in the elderly by 50–60% (Nichol, 1999 ; Chiba et al., 2004 ; Christenson et al., 2001 ; Christenson et al., 2004). Oral care alone is reported to have decreased pneumonia incidence in nursing homes by about 40% (2009 Ministry of Health). We originally hypothesized that both oral care and vaccinations would reduce pneumonia and death from pneumonia more effectively than oral care or vaccination alone. The results of the study here show that with both oral care and vaccinations the incidence of pneumonia and the death rate from pneumonia reduced significantly. This would allow the conclusion that the combination of oral care with both vaccinations is a highly effective method for the prevention of pneumonia in the elderly. This points to the benefits of cooperation between physicians, dentists, para-medical staff, and the residents themselves as necessary for an optimal health care provision. The important factor in this study (the “Yubari Study”) was the cooperation of all staff involved in the caring for the elderly, including physicians, dentists, nurses, care staff, and family. In many instances it may be very difficult for the elderly to access dental services and receive oral care in other countries including Denmark, Germany, Norway, Sweden, United Kingdom, and the United States, because dental health services are not fully covered by national insurance and as the costs are very high (Holm-Pedersen et al., 2005). The Yubari Study here suggests a solution to this without substantially increasing costs. The procedure in the study here is that a dentist gives a lecture on oral care to the care staff, the care staff performs the daily oral care of the elderly and a dentist or dental hygienist periodically checks the quality of the oral care. As a result, the score on the Hygiene Index

(OHI-S) and Community Periodontal Index of Treatment needs (CPITN) improved. The only costs incurred would be the limited expense for regular dentist and dental hygienist visits. In this way, it would become possible to decrease the incidence of pneumonia as well as the cost of oral care without having to introduce significantly changes the present health care arrangements.

Among the elderly in Japan, the rate of pneumonia is 20% and death from pneumonia is 10% (Ministry of Health, 2014, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/suii04/>, Nov. 2015 ; Morimoto K et al., 2015), and treatment of pneumonia costs \$4,200 per patient (\$ 4,200 at Nov. 2015 exchange rates) in Japan (All Japan Hospital Association, <http://www.ajha.or.jp/guide/1.html#p8>, Nov. 2015). In the intervention group, there were only 2 pneumonia cases compared with the 34 in the non-intervention group. Therefore, in just this modestly-sized study, we succeeded in reducing medical costs by about \$135,000 (\$135,000 at Nov. 2015 exchange rates). Then, as the number of the elderly in nursing homes in Japan is 840,000 (Ministry of Health, 2015), such treatment may be able to prevent pneumonia in about 270,000 residents. Using these numbers, it seems possible that with administration of oral care and vaccinations to all elderly Japanese in nursing homes, medical costs could be reduced by a total of \$1.1 billion(\$1.1 billion at Nov. 2015 exchange rates). In summary, we suggest that the combination of oral care and vaccinations for pneumonia prevention will have a positive impact on morbidity, mortality, and the costs associated with health care in the elderly.

The study here suffers from a number of limitations. First, our results were obtained with a very small number of patients in only two Japanese nursing homes. It is not certain that it is possible to generalize the results to other settings. To follow up on the results here it will be necessary to collect more data to establish more details of the effects of the combination of oral care and vaccinations. Second, the long-term benefits of the intervention are unknown as the follow-up period was for only one year. We next plan to examine the longer-term (>1 year) effects of oral care and vaccines in other nursing homes in other parts of Japan. Third, our study did not involve true randomization and a next project including randomization in the study is necessary. Fourth, in present study, we cannot determine if the effects are due to oral care vs. pneumococcal vaccination. Finally, it is unclear whether differences in the skills of the staff of the two nurs-

ing homes are relevant. There is currently no accepted method to assess individual staff objectively in Japan, however, generally similar-sized nursing homes in Japan have a similar number of staff, including nurses, certified care workers and certified helpers. Further, the intervention at the nursing home was discontinued after one year and after the discontinuation of the intervention the number of pneumonia cases in that nursing home increased about six times in the intervention period (data not shown). This result suggests that the quality of the care is similar in the two nursing homes.

Yubari City was declared bankrupt in 2007, and much of the publicly employed workforce was laid off. Medical care was scaled down from providing a large general hospital with 171 beds, to clinics with 19 beds, and residents had to be treated with fewer medical resources. As a result, the arrangements for providing support to the residents changed, now involving a smaller team of physicians, dentists, nurses, and medical staff. This team has focused on preventing diseases, especially chronic diseases. The combination of vaccinations and oral care is one of the primary care arrangements for the prevention of diseases. Recently, Landers has suggested that the health care would be going to home owing to the rapidly rising medical expenses for the increasing incidence of chronic diseases, advances in technology, and healthcare consumerism (Landers, 2010). By 2025, the population of the world will exceed 8 billion, and we need to take measures to deal with the aging society worldwide. The Yubari Study may aid in resolving some problems in the aging of society.

In Yubari 46.5% of the population are over 65 years of age. Yubari area is one of the areas with the highest fraction of elderly population in the world, and in some respects may represent a future state of the world, especially in developed countries. It is very important to consider the problem of aging. In an aging society, the prevalence of chronic diseases and disability is higher. Therefore, to maintain the Activities of Daily Livings and Quality Of Life, it will be necessary to change medical treatment strategies from speciality-based, to arrangements involving cooperation among physicians, dentists, nurses, and para-medical staff, who engage in medicine and care. We suggest that the Yubari Study could be a model case to support the health in the elderly and believe that the study can be a guide for considering the global problems of the aging population.

Conclusions

This study shows that a combination of oral care and vaccinations dramatically reduced the incidence of pneumonia in the elderly participants here. Our results, the Yubari Study, suggest that the creation of a comprehensive community health care system would be beneficial to improve the Activities of Daily Livings and Quality Of Life of the elderly as well as it would reduce medical expenses. In the present day aging society, the elderly should be cared for with an integrated, cooperative system involving all levels of community health resources.

Acknowledgements

We thank Dr. John Menzies (University of Edinburgh, UK) for a critical review of this paper. We thank also the staff of the Nursing Home Seikoen, Nursing Home Aiseien, and the Mukawa town National Health Insurance Hobetsu Clinic, Hobetsu. Further, Kaji Takahito for advice regarding the statistical analyses, and Yoko Chiba, Miho Yamaguchi, Hiromi Matoba, (all DH) and Satoru Kimura, (D.D.S.) for technical assistance is also gratefully acknowledged. This study was supported by a grant in aid from Pfizer Health Research Foundation.

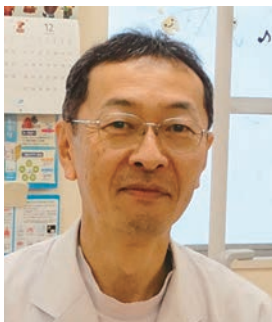
Conflict of Interest Statement

The authors of this manuscript have no conflicts of interest to declare.

References

- Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J* 32 : 281–291, 1982.
- Chiba H, Ohru T, Matsui T, Fukushima T, Sasaki H. Benefits of pneumococcal vaccination or bedridden patients. *Am Geriatr Soc* 52 : 1410, 2004.
- Christenson B, Lundbergh P, Hedlunf J, Ortqvist A. Effects of a large-scale intervention with influenza and 23-valent pneumococcal vaccines in adults aged 65 years or older. A prospective study. *Lancet* 357 : 1008–1011, 2001.
- Christenson B, Hedlunf J, Lundbergh P, Ortqvist A. Additive preventive effect of influenza and pneumococcal vaccines in elderly persons. *Eur Respir J* 23 : 363–368, 2004.

- Cornu C, Yzebe D, Leophonte P, Gaillat J, Boissel JP, Cucherat M. Efficacy of pneumococcal polysaccharide vaccine in immunocompetent adults : a meta-analysis of randomized trials. *Vaccine* 19 : 4780–4790, 2001.
- Greene JC, Vermillion JR. The simplified oral hygiene index. *J Am Dent Assoc* 68 : 7–13, 1964.
- Holm-Pedersen P, Vigild M, Nitschke I, Berkey DB. Dental Care for Aging Populations in Denmark, Sweden, Norway, United Kingdom, and Germany. *J Dent Educ* 69 : 987–997, 2005.
- Landers SH. Why health care is going home. *N Engl J Med* 363 : 1690–1691, 2010.
- Maruyama T, Taguchi O, Niederman MS, Morser J, Kobayashi H, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza C, Nakayama S, Nishikubo K, Noguchi T, Takei Y, Gabazza EC. Efficacy of 23-valent pneumococcal vaccine in preventing pneumonia and improving survival in nursing home residents. double blind, randomised and placebo controlled trial. *BMJ* 340 doi : <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.c1004> 2010.
- Morimoto K, Suzuki M, Ishifuji T, Yaegashi M, Asoh N, Hamashige N, et al. The burden and etiology of community-onset pneumonia in the aging Japanese population : a multicenter prospective study. *PLoS One* 2015 ; 10(3) : e 0122247.
- Nichol KL. The additive benefits of influenza and pneumococcal vaccinations during influenza seasons among elderly persons with chronic lung disease. *Vaccine* 17 : Suppl 1, S91–93, 1999.
- Scannapieco FA. Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* 70 : 793–802, 1999.
- Scannapieco FA, Wang B, Shiao HJ. Oral bacteria and respiratory infection : effects on respiratory pathogen adhesion and epithelial cell proinflammatory cytokine production. *Ann Periodontol* 6 : 78–86, 2001.
- Shapiro ED, Clemens JD. A controlled evaluation of the protective efficacy of pneumococcal vaccine for patients at high risk of serious pneumococcal infections. *Ann Intern Med* 101 : 325–330, 1984.
- Yoneyama T, Hashimoto K, Fukuda H, Ishida M, Arai H, Sekizawa K, Yamaya M, Sasaki H. Oral hygiene reduces respiratory infections in elderly bed-bound nursing home patients. *Arch Gerontol Geriatr* 22 : 11–19, 1996.
- Yoneyama T, Yoshida M., Matsui T, Sasaki H. Oral care and pneumonia. Oral Care Working Group. *Lancet* 354 : 515, 1999.



八田 政浩

1961年生まれ

1986年 東日本学園大学卒

1989年 夕張市立総合病院 歯科医長

2007年 医療法人財団 夕張希望の杜 歯科部長

2012年 医療法人財団 夕張希望の杜 理事長

〔症例報告〕

口蓋に発生した明細胞型粘表皮癌の1例

中條 貴俊¹⁾, 瀧本 紘佑²⁾, Bhoj Raj Adhikari¹⁾, 森川 哲郎¹⁾, 原田 文也¹⁾, 高井 理衣¹⁾,
吉田 光希¹⁾, 佐藤 惇¹⁾, 淀川慎太郎³⁾, 西村 学子¹⁾, 永易 裕樹²⁾, 安彦 善裕¹⁾

- 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
3) 北海道医療大学歯学部生体機能・病態学系組織再建口腔外科学分野

A case of Clear cell variant of Mucoepidermoid carcinoma of the palate

Takatoshi CHUJO¹⁾, Kosuke TAKIMOTO²⁾, Bhoj Raj ADHIKARI¹⁾, Tetsuro MORIKAWA¹⁾,
Fumiya HARADA¹⁾, Rie TAKAI¹⁾, Koki YOSHIDA¹⁾, Jun SATO¹⁾, Shintaro YODOGAWA³⁾,
Michiko NISHIMURA¹⁾, Hiroki NAGAYASU²⁾ and Yoshihiro ABIKO¹⁾

- 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
3) Division of Reconstructive Surgery for Oral and Maxillofacial Region, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Key words : Mucoepidermoid carcinoma, Clear cell variant

Abstract

This article reports a case of a clear cell variant of the mucoepidermoid carcinoma of the palate.

The patient was referred to our hospital with the chief complaint of a swelling on the left palate. After various examinations, removal of the tumor was carried out by resection of the maxilla under general anesthesia. Histopathologically, the tumor tissue revealed an image comprised of mucous cells, epidermoid cells and

intermediate cells, and were composed the enhancement-related increase of the kind of epidermic cells in the cancerous alveolar. In addition, this was recognized a lot of clear cells. From the above results, clear cell variants of the Mucoepidermoid carcinoma was diagnosed. After the operation, there has been no sign of recurrence during a 2 year 9 month follow-up period.

緒 言

粘表皮癌は唾液腺由来の悪性上皮性腫瘍で、大唾液腺では耳下腺に、小唾液腺では口蓋腺に好発する（日本唾液腺学会，2005）。組織学的には、粘液産生細胞、類表皮細胞および未分化な中間細胞で構成され、およそ10%で明細胞が認められ明細胞型と診断される。この明細胞型粘表皮癌は、同様の明細胞がみられる明細胞癌、上皮筋上皮癌、腺房細胞癌との鑑別が必要となる（高木，2006）。今回われわれは、口蓋に発生した明細胞型粘表皮癌の1例を経験したので、その概要を報告する。

症 例

患者：59歳，女性。

初診：2012年11月。

主訴：左側口蓋部の腫脹。

既往歴：第六頸椎損傷，喘息（発症時期不明，発作時バルミコート服薬）。

家族歴：特記事項なし。

現病歴：初診2ヶ月前から左側口蓋部の腫脹を自覚したが、疼痛がないため放置していた。その後2週間前から腫脹と接触時の違和感の増大を認めるようになったため、近歯科医院を受診し、精査加療を目的に当科を紹介され受診。

現症

全身所見：体格標準で栄養状態は良好であった。

口腔外所見：顔貌は左右対称性で、頸部で触知される腫瘤は認めなかった。

口腔内所見：開口距離は上下顎中切歯切縁間で40mmで、開口障害は認められなかった。┃7遠心後方端の口蓋から軟口蓋に、13mm×11mmの表面滑沢な暗褐色の半球状腫瘤を認めた。なお触知すると、弾性軟で圧痛を認めなかった(図1)。

画像所見

X線写真所見：パノラマX線ならびにデンタルX線写真では、異常所見が認められなかった。

CT所見：┃7遠心歯槽突起から正中にかけて周囲骨の圧迫吸収像がみられ、辺縁には一層の骨硬化縁を認めた。腫瘤は境界明瞭で、内部は均一の類円形不透過像を認め、翼状突起部に及んでいた(CT値：45HU)。上顎洞に異常所見はみられなかった(図2)。また、胸部のCT検査では、肺野に異常陰影を認めなかった。

MR所見：病変部においてT1強調画像で低信号、T2強調画像および脂肪抑制T1強調画像で、高信号を示し

た。Ga造影後では、脂肪抑制T1強調画像で増強効果が認められた(図3)。

FDG-PET所見：左側上顎で、対側と比べFDGの集積亢進がみられたが、他臓器では異常な集積像は認められなかった(図4)。

臨床診断：左側口蓋部腫瘍の疑い

生検時の病理組織学的所見：生検を施行したところ、Hematoxylin-Eosin (H.E) 染色では、粘液産生細胞、類表皮細胞、中間細胞からなる像を認め、胞巣構造の形成と一部に嚢胞状構造の形成もみられた。さらに明細胞が散見された(図5)。免疫組織化学染色を行ったところ、Cytokeratin Wide (CK Wide) 染色では、類表皮細胞を構成する導管上皮由来細胞が陽性となった(図6)。また、Diastase-Periodic Acid Schiff (D-PAS) 染色では、粘液産生細胞由来の粘液が陽性所見を示したものの、陰性所見を示す明細胞が多数みられた(図7)。Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP) 染色を施行し陰性所見を得たことから筋上皮細胞由来は否定された。以上の結果から、Goodeの病理組織学的悪性度分類(Goode et al., 1998)において、加算項目が20%未満の嚢胞形成がみられたことの2点のみであったため、低悪性度粘表皮癌と診断が得られた。



図1 初診時口腔内写真(下図はミラー像)

┃7遠心後方端口蓋から軟口蓋にかけて13mm×11mmの表面滑沢な暗褐色の半球状腫瘤を認める。



図2 CT画像：水平断(a：硬組織 b：軟組織)および矢状断(c：硬組織 d：軟組織)

┃7遠心歯槽突起から正中にかけて周囲骨の圧迫吸収像がみられ、辺縁には一層の骨硬化縁を認める。腫瘤部は境界明瞭で内部は均一の類円形不透過像(矢印)を認める(CT値：45HU)。

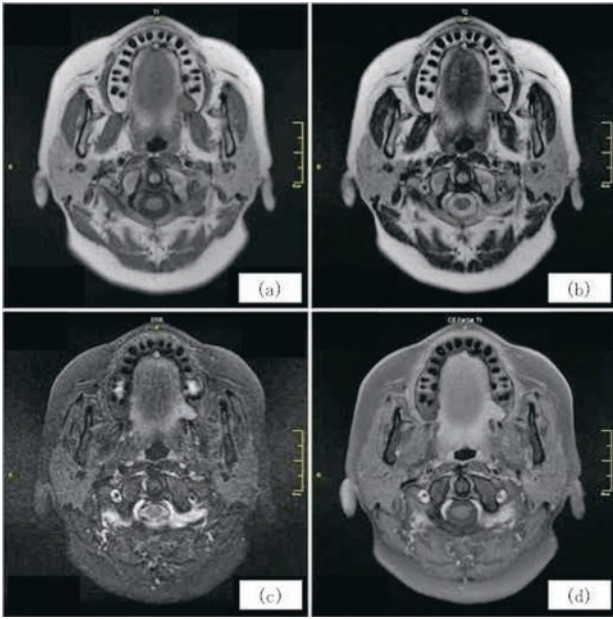


図3 MR画像

病変部はT1強調画像 (a) で低信号, T2強調画像 (b) および脂肪抑制T1強調画像 (c) で高信号. Ga造影後では, 脂肪抑制T1強調画像 (d) で増強効果が認められる.

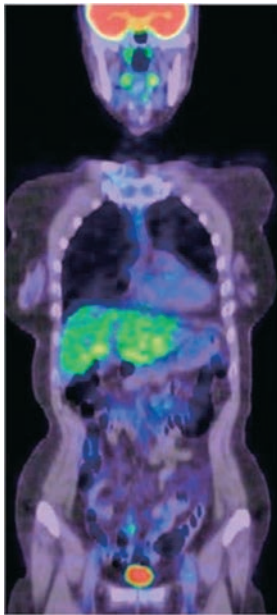


図4 PET画像

左側上顎で対側と比べFDGの集積が亢進していたが, 他臓器における異常な集積像はみられない.

処置および経過: 左側口蓋癌 (T1N0M0, Stage I) の診断のもと, 全身麻酔下に上顎部分切除術を施行した. なお 67 および翼状突起部を含めて切除を行った (図8). 術中, 鼻腔および上顎洞への穿孔は認めなかった. 術中迅速診で切除断端が陰性であることを確認した後, 創部保護のため真皮欠損用グラフトを切除面に圧接し周囲組織に縫合し, 手術を終了した (図9). 手術後2ヶ月経過し創部の上皮化が確認されたことから, 顎義

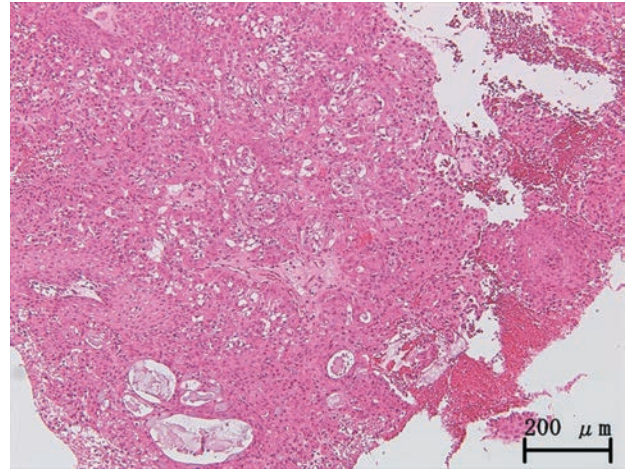


図5 生検時病理組織像 (H.E染色)

粘液産生細胞, 類表皮細胞, 中間細胞からなる像を認め, 胞巣構造の形成と一部に嚢胞状構造の形成もみられる. また, 明細胞が散見される.

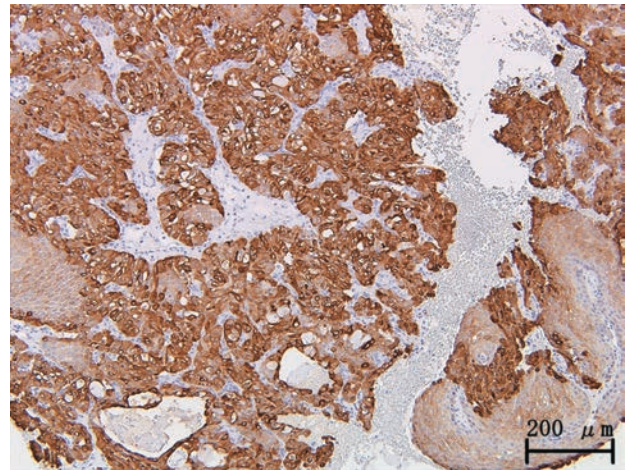


図6 生検時CK Wide免疫組織化学染色像

CK Wide染色では類表皮細胞を構成する導管上皮由来細胞が陽性を示す.

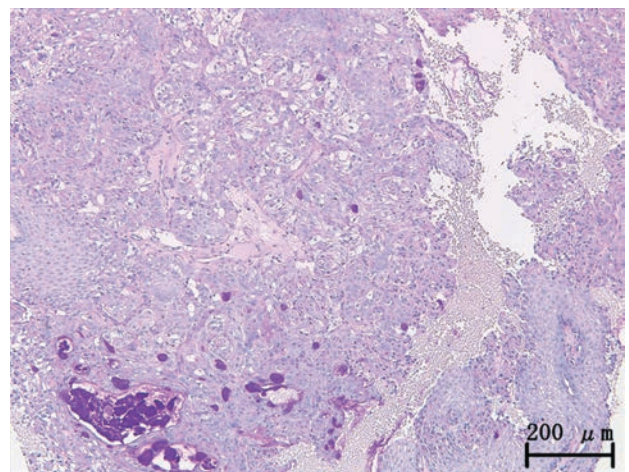


図7 生検時D-PAS染色像

D-PAS染色により, 粘液産生細胞由来の粘液が陽性を示すが, 明細胞は陰性を示す.

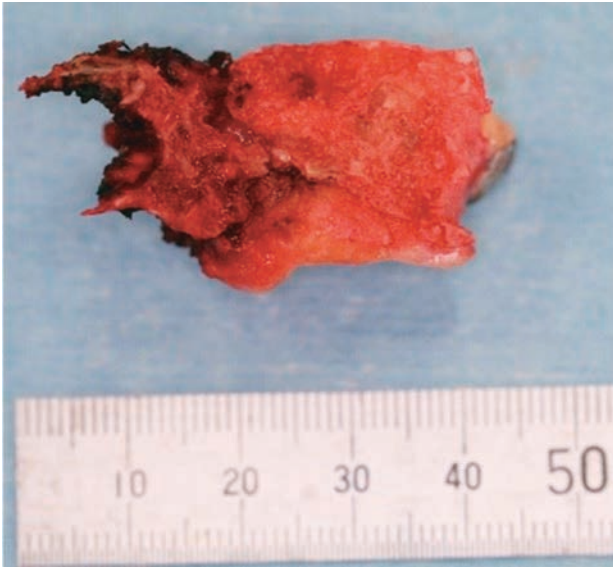


図8 摘出組織写真
| 67および翼状突起部を含めて切除した。

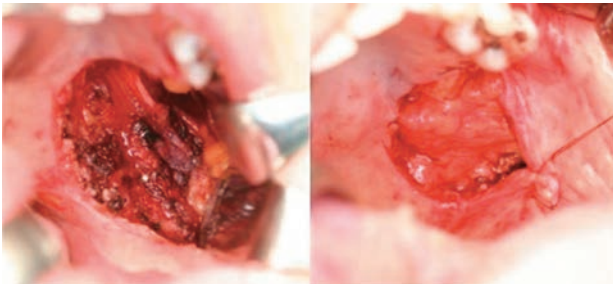


図9 術中口腔内写真
上顎部分切除術を施行した。術中、鼻腔および上顎洞への穿孔は認めなかった(左図)。真皮欠損用グラフトを切除面に圧接し周囲組織に縫合した(右図)。

歯を作製し、咬合機能を回復した。現在、術後2年9ヶ月経過したが、再発はみられない。

手術検材の病理組織学的所見：H.E染色では、腫瘍組織が類表皮細胞と粘液産生細胞，中間細胞から構成され，なかでも類表皮細胞が胞巣内で充実性に増殖しており，多数の明細胞も認められた(図10)。免疫組織化学染色所見では，CK Wide染色で，類表皮細胞を構成する導管上皮由来細胞が陽性所見を示し(図11)，また，D-PAS染色では，粘液産生細胞由来の粘液が陽性所見を示したが，陰性所見を示す明細胞が多数認められた(図12)。さらに，Ki-67染色にて腫瘍細胞の増殖能を判定したところ，陽性所見を示す細胞は極めて少なかった。以上の結果から，Goodeの病理組織学的悪性度分類(Goode et al., 1998)を指標とすると，加算項目は20%未満の嚢胞形成がみられたことからの2点のみであり低悪性度粘表皮癌の診断を得た。

病理組織学的診断：低悪性度明細胞型粘表皮癌

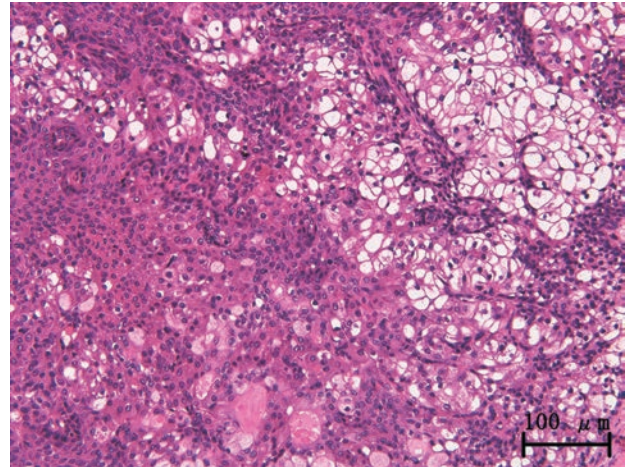


図10 摘出標本病理組織像(H.E染色)
腫瘍組織は類表皮細胞と粘液産生細胞，中間細胞から構成された像で，胞巣構造内部における類表皮細胞の充実性増殖を認める。また，明細胞を多数認める。

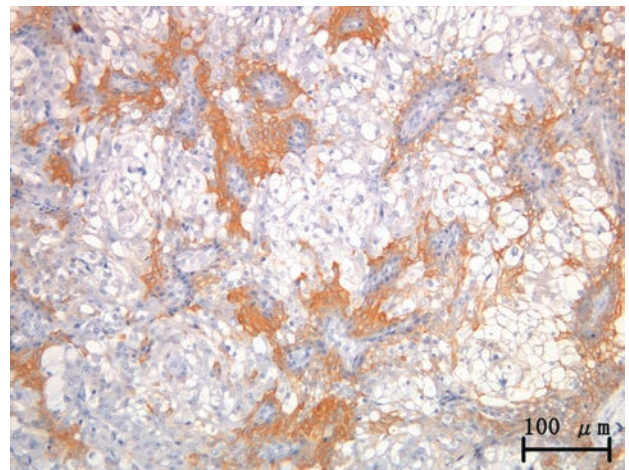


図11 摘出標本CK Wide免疫組織化学染色像
類表皮細胞を構成する導管上皮由来細胞が陽性を示す。

考 察

粘表皮癌は，唾液腺腫瘍の約5-12%を占めており，低悪性のものから高悪性まで様々なタイプが存在する。このため，鑑別診断が難しいとされるが(Plambeck et al., 1996)，2005年のWHO分類ではGoodeらの粘表皮癌の病理組織学的悪性度分類(Goode et al., 1998)をもとに，低悪性度，中悪性度，高悪性度の3段階に分類することが示された(Barnes et al., 2005)。

本症例では，生検標本ならびに手術検材で，粘液産生細胞，類表皮細胞，中間細胞から構成されており，多数の明細胞がみられた(図5，10)。腫瘍組織に認められた明細胞は，細胞質に豊富なグリコーゲンを含むことから，Eosin染色に染まらないことが知られている(Premalatha et al., 2012; Said-Al-Naief & Klein, 2008)。また，明細胞の発生由来については，上皮系または間葉系

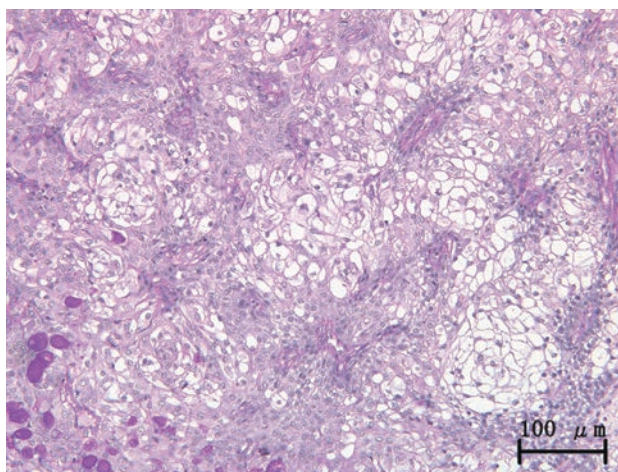


図12 摘出標本D-PAS染色像

粘液産生細胞由来の粘液がD-PAS染色陽性を示すが、D-PAS染色陰性を示す明細胞が多数認められる。

の由来が各々みられ (Said-Al-Naief & Klein, 2008), 特に唾液腺腫瘍で導管上皮細胞や筋上皮細胞が腫瘍性分化の表現型として淡明な細胞に形態変化することが知られている (森永ら, 2015: 日本唾液腺学会, 2005). 本症例でも、D-PAS染色は粘液産生細胞由来の粘液が陽性となるが、明細胞は陰性を示した (図7, 12). D-PAS染色では、本来PAS染色によってグリコーゲン等の多糖類や粘液が過ヨウ素酸シッフ反応に陽性となり、赤紫色を呈するが、diastaseによる前処理でグリコーゲンが分解され、粘液産生細胞内の粘液が陽性となるものの、明細胞内のグリコーゲンが消化したため陰性となることで、明細胞を特異的に鑑別する方法である。また、筋上皮性細胞マーカーであるGFAP染色を行ったところ、陰性で多形腺腫や筋上皮腫/癌、上皮性筋上皮癌が否定された。さらに、粘液産生細胞の存在から明細胞癌は否定された。また、本症例では腎細胞癌等の既往がなくFDG-PET検査で他臓器の異常集積像は認めなかったことから、転移性腎細胞癌も否定された。このことから、本症例は明細胞型粘表皮癌の診断が得られた。

粘表皮癌は、年齢が50歳代で好発しており、およそ3割の症例で再発を来すことが報告されている (Nance et al., 2008). 粘表皮癌の発生部位別では、大唾液腺では耳下腺、小唾液腺では口蓋腺に多く発生している (Lawal et al., 2013). 粘表皮癌は病理組織学的な悪性度によって予後の差があることが示されており、高悪性度のものではおよそ5~6割で死亡に至ることから予後の悪い疾患である (Nance et al., 2008: Goode et al., 1998). さらに、本症例で経験した明細胞型粘表皮癌の予後に関する報告は未だみられないため、病理組織学的悪性度を反映した治療方針の決定が可能となるよう、明細胞型粘表皮癌の悪性度と予後に関するデータの集積が

重要である。

結 語

今回われわれは、口蓋部に発生した明細胞型粘表皮癌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

- Barnes L, Eveson JW, Reichart P & Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours (World Health Organization Classification of Tumours). International Agency for Research on Cancer (IARC): 219-220, 2005.
- Goode RK, Auclair PL & Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 82: 1217-1224, 1998.
- Lawal AO, Adisa AO, Kolude B, Adeyemi BF & Olajide MA. A review of 413 salivary gland tumours in the head and neck region. *J Clin Exp Dent*. 5: e218-222, 2013.
- 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: 8-13, 2015.
- Nance MA, Seethala RR, Wang Y, Chiosea SI, Myers EN, Johnson JT & Lai SY. Treatment and survival outcomes based on histologic grading in patients with head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Cancer*. 113: 2082-2089, 2008.
- 日本唾液腺学会. 唾液腺腫瘍アトラス第1版: 8-13, 88-95, 2005.
- Plambeck K, Friedrich RE & Schmelzle R. Mucoepidermoid carcinoma of salivary gland origin: classification, clinical-pathological correlation, treatment results and long-term follow-up in 55 patients. *J Craniomaxillofac Surg*. 24: 133-139, 1996.
- Premalatha B, Rao RS, Patil S & Neethi H. Clear Cell Tumors of the Head and Neck: An Overview. *World Journal of DENTISTRY*. 3: 344-349, 2012.
- Said-Al-Naief N & Klein MJ. Clear cell entities of the head and neck: a selective review of clear cell tumors of the salivary glands. *Head Neck Pathol*. 2: 111-115, 2008.
- 高木實, 口腔病理アトラス第2版, 文光堂: 292, 295, 2010.



中條 貴俊

平成18年3月 北嶺高等学校 卒業

平成18年4月 北海道医療大学 歯学部歯学科入学

平成24年3月 北海道医療大学 歯学部歯学科卒業

平成25年3月 北海道医療大学病院 歯科医師臨床研修科終了

平成25年4月 北海道医療大学大学院歯学研究科 入学

〔MINI REVIEW (機器分析入門)〕

エックス線回折による材料および生成物の分析

飯嶋 雅弘¹⁾, 遠藤 一彦²⁾

1) 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系歯科矯正学分野

2) 北海道医療大学歯学部口腔機能修復・再建学系生体材料工学分野

結晶について

結晶とは、それを作り上げている原子、分子、あるいはイオンが空間的に規則正しく配列しているものをいう。歯科関連では、歯（エナメル質、象牙質、セメント質）、骨、金属、セラミックス等が結晶構造を有するものとして知られている。これらの結晶構造は、非常に小さなオンGSTROOM (Å) レベルの大きさをもつ原子から構成されており、その原子間距離は通常 2 Å 程度である。これを顕微鏡で観察するとなると 1 万倍程度の高倍率が必要となる。そのような高倍率を得ることは、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope; SEM) では難しく、透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope; TEM) を用いれば可能となるが、観察のための薄膜試料の作成に熟練を要する。そこで簡単に結晶構造を調べる方法としてエックス線回折法がある。

エックス線回折法の基本原理

原子が正しく配列している物質に原子間間隔と同程度の波長を持つエックス線 (CuK α 線で 1.541 Å) を入射すると、各原子で散乱されたエックス線がある特定の方向で干渉し合い、強いエックス線を生じる。これがエックス線の回折現象である。このエックス線の回折現象を発見した M. V. Laue は 1914 年にノーベル物理学賞を受賞した。同時期に Bragg 親子 (W. H. Bragg, W. L. Bragg) は、Bragg の公式を発表し、エックス線回折が生じる条件を理論的に明らかにし、翌年ノーベル物理学賞を受賞した。図 1 に示すように、第 1 格子面で散乱されるエックス線と第 2 格子面で散乱されるエックス線の行路差は、 $2d \sin \theta$ になるため (d は格子面間隔)、この行路差が入射エックス線 (λ) の整数 (n) 倍のときに波が干渉して強め合い強い回折エックス線となる。 θ は Bragg 角、 2θ (入射エックス線と回折エックス線とのなす角度) は回折角という。即ち、 $2d \sin \theta = n\lambda$ を Bragg の公式という。この公式からわかるように、既知波長 λ の入射エックス線を物質に入射し、回折角 2θ とそのエックス

線強度を測定することによって、図 2 のようなエックス線プロファイル図形を得ることができ、その回折ピーク の角度 (2θ) から、物質の格子面間隔 d を知ることができる。これがエックス線回折法の基本原理である。

エックス線回折装置を用いた分析法

本学ハイテクリサーチセンターのエックス線回折装置 (Rint 2500, Rigaku) は、ゴニオメータと呼ばれる角度計測器を用いて回折角を計測する従来型エックス線回折法とエックス線を小さなサイズに絞るコリメーターと散乱したエックス線を検出する位置敏感型計数管を用いて計測する微小領域エックス線回折法の 2 種類の計測が可能である。従来型エックス線回折法では、計測に 20mm³ 程度の平らな面が必要となる。試料は粉末形状が望ましいが、板状の試料でも計測可能である。微小領域エック

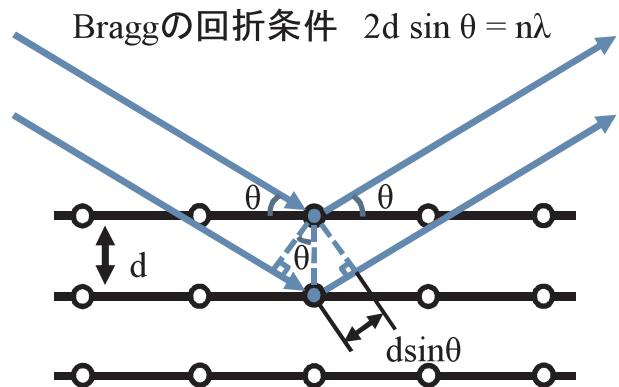


図 1 Bragg の回折条件

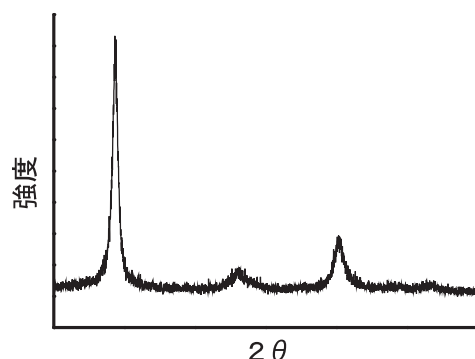


図 2 エックス線回折スペクトル

ス線回折法では、 $\phi 20\sim 200\mu\text{m}$ 領域の計測を行い、サンプルの量が少ない場合や平らな面が得られない試料でも計測が可能である。

エックス線回折法を用いたデータの解析（結晶構造の解析）

既知の結晶相からの回折スペクトルを世界的に収集したX線回折の一次標準データは、Powder Diffraction File™ (PDF®, 粉末回折ファイル)として知られている。これは1969年に粉末回折標準に関する合同委員会 (International Centre for Diffraction Data: JCPDS) の設立

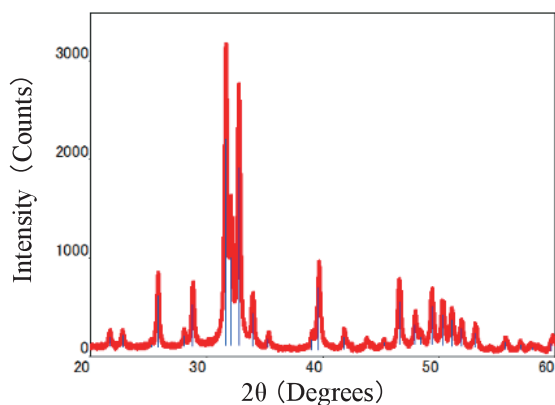


図3 ヒトエナメル質のエックス線回折スペクトル（赤線）とハイドロキシアパタイトの標準データ（青線）

により実現された。後にJCPDSは法人組織になり、組織名がInternational Centre for Diffraction Data (ICDD)に変更された。ICDDにより提供されるPDFは、さまざまな物質のd値、強度、 2θ （回折角）等を含むデータベースであり、我々研究者はエックス線回折測定により得られたスペクトルとPDFのd値、強度、 2θ を比較することにより物質の同定が可能となる。本学のエックス線回折装置には、エックス線回折解析ソフトウェア (PDXL-2, Rigaku) が備え付けられており、PDFを利用したエックス線回折スペクトルの同定ができる。図3には、ヒトエナメル質から得られたエックス線回折スペクトル（赤線）とハイドロキシアパタイト標準データ (PDF) の 2θ とその強度（青線）を示す。 2θ 及び強度ともに高い一致を示し、本エナメル質試料はハイドロキシアパタイトとして同定できる。

エックス線回折法の適用例

次に他のエックス線回折測定結果の一例を示す。図4にはNi-Ti合金ワイヤーの直線状態（未屈曲）と屈曲状態（屈曲部）の微小領域エックス線回折スペクトルを示す。Ni-Ti合金ワイヤーは、屈曲することにより応力誘起マルテンサイト変態が生じ、超弾性特性を発揮することが知られている。エックス線回折スペクトルから、ワ

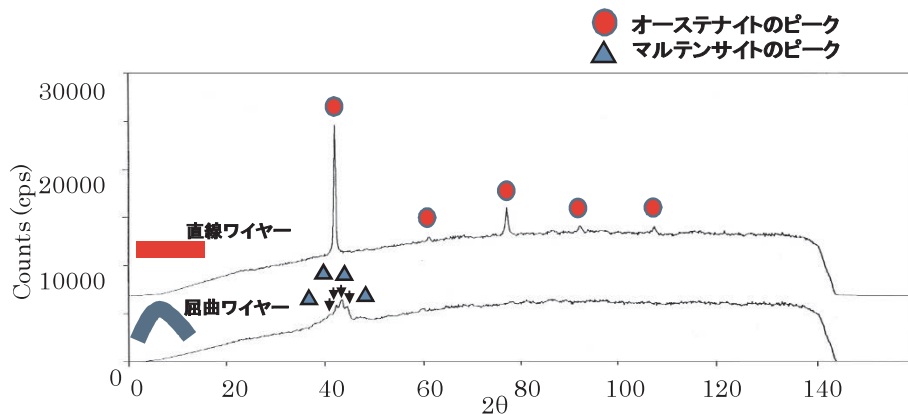


図4 Ni-Ti合金ワイヤーのエックス線回折スペクトル

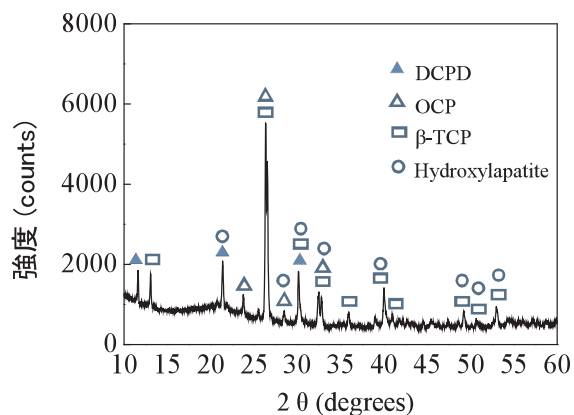
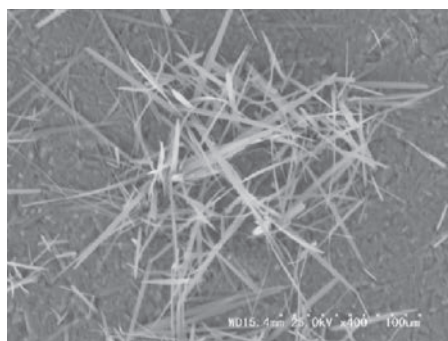


図5 人工唾液中で形成されたバイオガラス由来の石灰化物とそのエックス線回折スペクトル

イヤーは直線状態でオステナイトの結晶構造を有していたが、屈曲によりオステナイト層がマルテンサイト層に変態したことが確認された。

図5には、人工唾液中で形成されたバイオガラス由来の石灰化物のSEM像とそのエックス線回折スペクトルを示す。バイオガラスは人工唾液中で β -TCP, DCPD, OCPおよびハイドロキシアパタイト等のリン酸カルシウムの石灰化物を形成することから歯の脱灰抑制や再石灰化促進の機能を口腔内で発揮することが理解できる。

以上のように、エックス線回折法は、材料の結晶構造を同定するために非常に有用な分析方法である。

[最近のトピックス]

歯周組織に対するアメロジェニンの機能について

高橋 亜友美¹⁾, 村田 佳織¹⁾, 谷村 明彦²⁾, 齊藤 正人¹⁾

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

歯周病治療に用いられるエムドゲインの主要な成分はアメロジェニンであり、その他にエナメルリン、アメロプロラスチン、タフテリンなどがあげられるが、アメロジェニンの含有量が圧倒的に多く、治療効果に重要な役割を果たしていると推測される。最近では同治療に、リコンビナントアメロジェニンタンパクやアメロジェニン由来合成ペプチドを用いた実験も報告されている。

アメロジェニンは、エナメルマトリクスタンパク質の主要な成分であり、エナメル質形成時に大量に分泌され、エナメル質の石灰化と共に分解・除去される。その構造はN末端側に疎水性領域、またC末端側に親水性領域をもち全体的には疎水性が強い構造をしている。エナメル質の形成においては、アメロジェニン分子の集積したナノスフィア形成が重要であり、特にC末端側が必要不可欠であるといわれている。またアメロジェニンは、分解されていない完全長のサイズでエナメル芽細胞から分泌され、その後MMP-20やセリンプロテアーゼにより代謝され様々な長さに分解されていく。これらの分解されたフラグメントが、エナメル質の成長や伸長に重要な役割を果たすと考えられている¹⁾。

近年、アメロジェニンがエナメル質形成のみならず細胞の増殖や分化のシグナル分子としての作用が明らかにされている。Mitaniらは、全長のリコンビナントアメロジェニンを用いて骨系間様細胞に対する機能を報告し、マウス骨芽細胞株であるMC3T3E-1に対するアルカリフォスファターゼ活性の上昇や、骨芽細胞の分化マーカーであるRunx2, BSP, OPN等の発現への影響を示している²⁾。またKatoらは、アメロジェニンに含まれるアミノ酸配列(WYQNMIR)が、ヒト歯根膜由来線維芽細胞であるperiodontal ligament stem cells (PDLSCs) に対してアルカリフォスファターゼ活性や細胞増殖を上昇させることを報告し、さらにこのペプチドによって骨の形成に関与するosteocalcinおよびosteonectinのmRNAの発現上昇、硬組織形成の促進、そして歯周組織再生の誘導能を有すること等が示唆されている³⁾。その他にも、アメロジェニンのスプライシングバリエーションのひとつである

leucine rich amelogenin peptide (LRAP) を用いた細胞の分化誘導が報告されており、その機能が注目されている。

今後、リコンビナントアメロジェニンタンパク質を用いることで歯周組織の再生に関連した様々な実験が発展することが期待される。

参考文献

- 1) Yamakoshi Y. Porcine Amelogenin : Alternative Splicing, Proteolytic Processing, Protein - Protein Interactions, and Possible Functions. J Oral Biosci 53 : 275-283, 2011.
- 2) Mitani K, Haruyama N, Hatakeyama J, Igarashi K. Amelogenin splice isoforms stimulate chondrogenic differentiation of ATDC5 cells. Oral Dis 19 : 169-179, 2013.
- 3) Kato H, Katayama N, Taguchi Y, Tominaga K, Umeda M, Tanaka A. A synthetic oligopeptide derived from enamel matrix derivative promotes the differentiation of human periodontal ligament stem cells into osteoblast-like cells with increased mineralization. J Periodontol 84 : 1476-1483, 2013.

[最近のトピックス]

フッ化物バーニッシュからのフッ素の供給とう蝕予防効果の検証

松田 康裕

歯学部う蝕制御学分野

フッ化物によるう蝕予防法は広く知られており、フッ化物含有歯磨材 (1,000ppm以下) やフッ化物歯面塗布 (9,000ppm) 等が局所応用として日本で行われている。より積極的な方法として、欧米諸国ではフッ化物バーニッシュのよるフッ化物の局所応用が広く浸透している。

フッ化物バーニッシュは欧米諸国で1960年代後半頃から使用され、1980年代には広く使用されるようになったフッ化物含有塗布材料である。フッ化物バーニッシュは5%のNaF (22,600ppm) と高濃度のフッ素を含んでおり、塗布するだけで歯面表面に被膜を作り、停滞してフッ素を持続的供給する。一般的に、フッ化物バーニッシュはブラッシング等により1ヶ月ほどで脱離すると言われており、定期的な塗布が必要とされている。口腔内に塗布されたフッ化物バーニッシュは時間と共に脱落するが、その脱落したフッ化物バーニッシュの安全性についても報告されており、ほとんど体内に取り込まれないことが報告されている¹⁾。このフッ素バーニッシュはアメリカ小児歯科学会のみならず、アメリカ小児科学会からもう蝕予防材料として、出来るだけ早い時期からのフッ化物バーニッシュの塗布が推奨されている。実際にこのバーニッシュの効果を検討するため、フッ化物バーニッシュを塗布したヒト抜去歯を用いて口腔内pHシミュレーション装置による負荷試験²⁾を行い、脱灰抑制効果をTransverse Micro Radiography (TMR) にて分析を行った。歯面表層のミネラル変化ではフッ化物バーニッシュ群で表層の残存がみとめられ、脱灰抑制効果が確認された (図1)。

更に、脱灰抑制作用が認められた試料について歯面表層へのフッ素の浸透を分析した。フッ素の分析には日本原子力研究開発機構高崎量子応用研究所イオン照射研究施設 (Takasaki Ion Accelerators for Advanced Radiation Application: TIARA) に設置されているシングルエンド加速器による陽子ビームの照射を行った μ -PIGE/PIXE解析法を用いた。この測定方法は硬組織の非破壊での元素分析法として山本らによって開発されたIn-air μ PIXE/PIGE (In-air micro-beam Particle Induced X-ray/ Gamma-ray Emission) 測定法³⁾であり、右図に示すとおり、陽子が元素に衝突することで発生する特性X線および γ 線を測定することにより、歯質内のカルシウムおよびフッ素の分布および濃度を非破壊的かつ経時的に定量することができる。その結果、歯質表面の表層から70 μ mまでの深さに2,000ppm以上のフッ素浸透していることが明らか

かとなった。

これらの結果からフッ化物バーニッシュによるフッ素の供給とそれに伴う脱灰抑制効果が明らかとなった。今後は口腔内pHシミュレーション装置とIn-air μ PIXE/PIGE分析法の2つの軸として、さらなる分析方法を用いることにより効果的なう蝕予防法や、バイオミネラリゼーションを誘導する新規材料の開発に展開していくと考えられる。

参考文献

- 1) Milgrom, P., Taves, D. M., Kim, A. S., Watson, G. E. and Horst, J. A., Pediatrics : e870-874, 2014.
- 2) Matsuda, Y., Komatsu, H., Murata, Y., Tanaka, T. and Sano, H., Dent Mater J : 280-285, 2006.
- 3) Komatsu, H., Yamamoto, H., Nomachi, M., Yasuda, K., Matsuda, Y., Murata, Y., Kijimura, T., Sano, H., Sakai, T. and Kamiya, T., Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B : Beam Interactions with Materials and Atoms : 201-206, 2007.

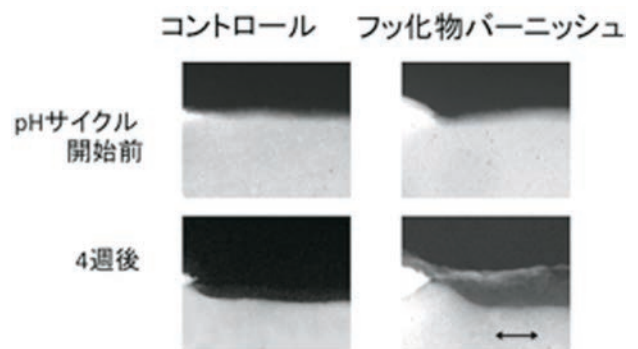


図1 : TMRの観察

フッ化物バーニッシュ群では、pHサイクル後に脱灰抑制されて表層が残存している像が認められる。

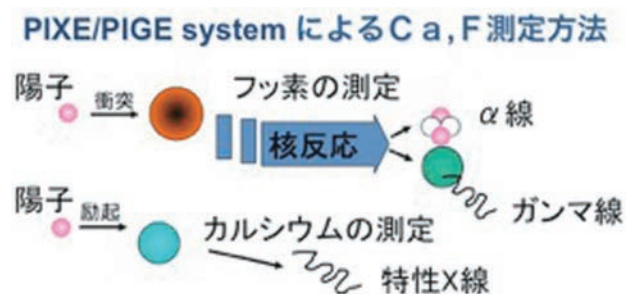


図2 : In-air μ PIXE/PIGEによるフッ素、およびカルシウムの測定方法の模式図を示す。

[最近のトピックス]

ストア作動性Ca²⁺流入によるエナメル質関連遺伝子の発現調節村田 佳織¹⁾, 高橋 亜友美¹⁾, 齊藤 正人¹⁾, 谷村 明彦²⁾

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

エナメル質を形成するエナメルマトリックスタンパクにはアメロジェニン (AMELX), アメロブラスチン (AMBN), エナメルリン (ENAM) があり, これらをコードする遺伝子の変異によってエナメル質形成不全が起こることが知られている. エナメル質の形成には, これらのタンパク質の厳密な時間的・空間的発現調節が必要と考えられている. 遺伝子変異解析でORAI 1やSTIM 1といった, 細胞内へのCa²⁺流入機構に関与するタンパク質をコードする遺伝子の変異によって, エナメル質形成不全症が発症すると報告されたことから, 細胞内Ca²⁺シグナルによるエナメル質形成の調節機構が注目されている¹⁾.

ORAI 1とSTIM 1は, 非興奮性細胞の主要なCa²⁺流入機構であるストア作動性カルシウム流入 (SOCE) の調節分子である. SOCEはIP₃受容体やリアノジン受容体を介したCa²⁺ストア (小胞体) からのCa²⁺放出によって活性化されるCa²⁺流入機構である. Ca²⁺放出による小胞体Ca²⁺の枯渇によってSTIM 1が細胞膜近傍に凝集し, Ca²⁺チャネルであるORAI 1を活性化する. SOCEを介する細胞内Ca²⁺シグナルは, 遺伝子発現, 細胞分裂, 細胞死といった様々な細胞活動の中でセカンドメッセンジャーとして働くことが知られている.

近年, エナメル質形成や歯の発生における細胞内Ca²⁺シグナルの役割に関する新しい知見が得られている. Nurbaevaらはマウス由来エナメル芽細胞様細胞であるLS 8細胞株を用いた実験で, SOCEがエナメルタンパクの遺伝子発現を調節することを初めて示した. LS 8細胞はSwiss-Webster系マウスから分離された分泌期エナメル芽細胞様細胞で, AMELX, AMBN, ENAM, マトリックスメタロプロテアーゼ20 (MMP20) といったエナメルタンパクを分泌する細胞である. この細胞を筋小胞体/小胞体カルシウムATPアーゼ (SERCA) の阻害剤であるthapsigargin (ThG) で処理すると, AMELX, AMBN, ENAMのmRNA発現上昇に加えて, これらのエナメルタンパクのプロセッシングに関与するMMP20のmRNA発現も上昇することが明らかになった. このThGによる遺伝子発現は, SOCE阻害剤である2-APBによって抑制されたことから, エナメルタンパクの発現は

SOCEを介したCa²⁺流入によって制御されることが示唆された. 同様にマウスエナメル器 (EO) 細胞でもThGの処理によりエナメルタンパクのmRNA発現増加が観察された. ラットEO細胞を使った実験ではAMBNのタンパク発現増加がウエスタンブロットティングでも確認されている. さらに転写因子であるCCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPa) はSOCE依存的なmRNA発現増加傾向を示した. エナメルタンパク質の遺伝子発現がこのC/EBPaの活性化を介するかどうか今後の検討が必要である. この論文によって, SOCEがエナメルタンパクの遺伝子発現を調節することが初めて明らかにされた²⁾. この実験ではSOCEの活性化にThGによる細胞内Ca²⁺ストアの枯渇という手法が用いられている. しかし, 実際の細胞や組織でこのような状態になることは考え難いため, 今後は受容体等を介する, より生理的な刺激と同様の結果がおこるか調べる必要がある.

エナメル形成には, エナメル芽細胞のマイグレーションによる細胞の正しい整列や, 上皮間葉相互作用の情報伝達などが必要だと考えられる. 我々は, SOCEの阻害剤であるLaCl₃の添加により細胞の運動性が低下するという結果を得ている. 細胞増殖, 細胞分化, マイグレーションにおけるCa²⁺シグナルの重要性は以前から指摘されてきた. しかし, Fura-2などを使った方法では長時間のCa²⁺イメージングを行うことは困難であった. 近年, Yellow Cameleon, G-GECO, G-CaMPなどの遺伝子でコードされるCa²⁺センサー (genetically encoded calcium indicators: GECI) によって長時間のイメージング観察が可能となりつつある. 今後, これらのGECIを使ったCa²⁺イメージングと細胞動態や遺伝子発現の同時解析によって, 細胞内Ca²⁺シグナルによるエナメル質形成の調節機構に関する研究の進展が期待される.

参考文献

- 1) Feske S. Immunodeficiency due to defects in store-operated calcium entry. *Ann N Y Acad Sci* 1238: 74-90, 2011
- 2) Nurbaeva MK, Eckstein M, Snead ML, Feske S & Lacruz RS. Store-operated Ca²⁺ entry modulates the expression of enamel genes. *J Dent Res* 94: 1471-1477, 2015

[最近のトピックス]

口腔バイオフィームにおける薬剤浸透性の評価法

藤田 真理

北海道医療大学歯学部口腔生物学系微生物学分野

口腔バイオフィームは菌体外多糖などに囲まれた口腔細菌凝集体が菌面上のペリクルに付着した三次元的集合体であり、抗菌薬や免疫細胞の内部への浸透が困難であることが知られている。近年、口腔バイオフィーム内部への薬剤の浸透・殺菌効果の評価には薬剤作用後のバイオフィーム中の生菌数の測定に加え、膜傷害性を指標とするCalcein-AM (CAM) 染色やLive/Dead染色などの蛍光染色試薬によるバイオフィーム底部の細菌の生死の判定などが応用されている。しかし、この蛍光染色を用いた判定には偽陽性の可能性 (Davey & Hexley, 2011) も報告されており、単独での判断ではなく、いくつかの方法を併用した評価が望ましいとされる。

現在までにCell culture insertを用いた*Pseudomonas aeruginosa*のバイオフィームにおける実際の薬剤浸透性を定量する簡易的定量法 (Shigeta et al., 1997) が報告されているが、近年我々はヘッドスペース固相マイクロ抽出 (HS-SPME) 法 (Osada et al., 2013) を応用したガスクロマトグラフィー質量分析法を用いて*Streptococcus mutans*の既成バイオフィーム中に実際に浸透・残留した天然精油由来テルペンアルコール量を定量する実験系を確立した。その結果から、浸透・残留テルペンアルコール量とバイオフィーム内の抗菌効果における正の相関を明らかにし、薬剤の浸透性によるバイオフィーム抗菌効果を実証している (図)。この方法はサンプル中の揮発性物質を抽出・濃縮して定量するため、実際にバイオフィーム中に残留した成分の定量することができる点が非常に画期的である。

今後、この化学分析法と微生物学的抗菌評価を併用することで、バイオフィームにおける浸透性ならびに抗菌効果を正しく評価することが可能となり、今後のバイオフィームを標的とした口腔ケア製品の開発等にも貢献するものと期待される。

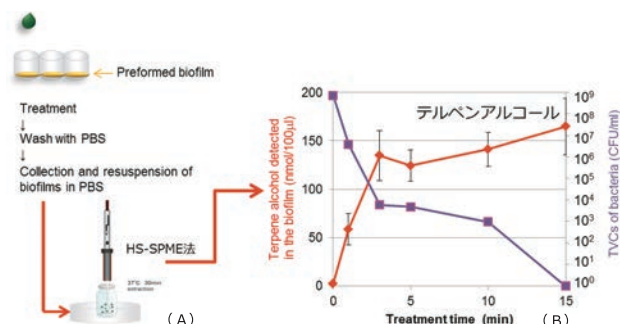


図. バイオフィームに浸透・残留したテルペンアルコールの定量方法 (A) ならびにその浸透量と抗菌効果の相関 (B)

参考文献

- Davey HM, Hexley P. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environ Microbiol* 13 : 163–171, 2011.
- Osada K, Kurihara K, Izumi H, Kashiwayanagi M. Pyrazine analogues are active components of wolf urine that induce avoidance and freezing behaviours in mice. *PLoS One*. 24 : 8(4), 2013
- Shigeta M, Tanaka G, Komatsuzawa H, Sugai M, Suginaka H, Usui T. Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms : a simple method. *Chemotherapy* 43(5) : 340–345, 1997

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、大学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の計画および実地に関する倫理規程」に基づき、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」の審査をへて学長の許可を得たものとする。
- 3) 動物実験は、「北海道医療大学動物実験規程（Regulations for the Care and Use of Laboratory Animals in Health Sciences University of Hokkaido）」に基づき、「北海道医療大学動物実験委員会（Animal Ethics and Research Committee）」の審査を経て、北海道医療大学長の承認を得たものとする。

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

3. 論文の種類及び内容

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

4. 査読および採否

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

5. 投稿論文の作成

- 1) 投稿論文は、投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること。
- 2) 投稿論文は、表紙、チェックリストシート、英文抄録（300語以内）、本文、表、図および図表説明文の順番にまとめる。
- 3) 投稿原稿は、2部（正1部、コピー1部）とする。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。本会はこちら著作物の全部または一部を、ネットワーク媒体を含む媒体に掲載・出版することが出来る。ただし、論文の内容については、著者がすべての責任を負う。

12. 著者のプロフィール

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(平成26年2月26日)

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

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

2. 遵守すべき倫理指針等*

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

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

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

チェックリスト 北海道医療大学歯学会雑誌

論文名

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

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

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

「北海道医療大学歯学雑誌」投稿の手引き（2012年6月30日現在）

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

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

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

1. 投稿原稿表紙

表紙には以下の事項を和文および英文で記入する。

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

1) 表題

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

和文・英文：-□□□□□□□□□-

2) 著者名および所属

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

3) キーワード

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

2. チェックリストシート

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

3. 英文抄録

300語以内の英文抄録を付ける。

4. 本文

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

・ Windows Microsoft Word

余白は上下3cm、左右2.5cm

文字は12ポイント

1頁35文字×26行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

・ Macintosh Microsoft Word

余白は上下3cm、左右2.5cm

文字は12ポイント

1頁30-35文字×22-25行

行間を1.5行

句読点は「.」と「,」（全角）を用いる。英文の場合は、半角文字を使用する。

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

5. 文献

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

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

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

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

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

(1) 雑誌の場合

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

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

(2) 単行本の場合

i) 章を参考にしたとき

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

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

ii) 個人または複数の著者の場合

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

iii) 編集者, 監修者が著者の場合

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

iv) 団体, 組織が著者で, かつ出版社の場合

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

v) 会議録全体を参考にした場合

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

(3) 分担執筆の場合

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

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

(4) 翻訳書の場合

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

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

6. 図

- 1) 用紙はA4版(縦)とし, 1枚ずつ別葉にする。
- 2) 各葉杖に, 図の番号, 著者名, 片段あるいは両段の指定, カラー印刷の有無を明記する。
- 3) 図の大きさは, 片段か両段一杯になることがのぞましい。刷り上がりを想定して, 図の大きさが片段で横幅45-68 mm, 両段で100-150 mmになるように縮小コピーし, 文字, 記号の大きさ, 線の太さなどをチェックする, 棒グラフなどのハッチングは識別可能なものにする。
- 4) 図中の文字は, 刷り上がりで本文とほぼ同じ10-13級 (7-9ポイント), 線の太さは0.15-0.3 mmになるよう原図を作成する。
- 5) 図や表はA4縦で作成する。一ページに一つの図あるいは表とする。図のタイトルや表の説明 (Figure legends) は図の印刷を希望する位置に記載する。図と表の挿入箇所は投稿論文中の右余白に示すこと。
- 6) 組図の原稿は, 貼込み間隔や角度を正確にする。
- 7) 写真は, A4判の用紙に貼り, 必要な文字, 記号などを記入する。写真の拡大率は, 単位長さのバーで表す。
- 8) 患者の顔や特徴ある身体の一部の写真を使用する場合は, 目隠し等により個人が特定できないように配慮するとともに, 患者本人あるいは後見人から文書により許可を得ること。
- 9) 記号は中心の明確な○●□■◇◆などを使用する。
- 10) 記号を使用する場合の凡例は, 脚注に置かずに図中に入れる。

7. 表

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

(例：)

Table1 Mechanical properties of specimen

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

() : SD

表1 試料の力学的性質

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

平均±標準偏差

8. その他

本規定ならびに「投稿の手引き」に規定されていない事項については、編集委員会にお尋ね下さい。
 投稿の手引き、投稿規定、チェックリストのファイルは、ホームページ (<http://www.hoku-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34回学術大会一般演題募集のご案内

第34回学術大会・平成28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28年3月5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：「口腔ケアと人間復活－多職種連携が拓く新しい時代」

講師： 米山 武義先生 米山歯科クリニック 医院長

演題・抄録申込み要領

申込み期限：平成28年1月15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：歯周歯内治療学分野 中塚 (yuko.n@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、今年度のみ会員制度(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28年3月3日(木) 17時

発表スライドをCD-Rに保存し、事前に歯周歯内治療学分野(中塚)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、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（^{1,2}…）で所属を区別する.
4. 本文：一般発表の場合 【目的】，【方法】，【結果および考察】，【結論】
5. 本文：症例発表の場合 【目的】，【症例】，【結果および考察】あるいは【経過および考察】

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

* 歯科医師生涯研修カードをお持ちの方はご持参下さい。

発表・抄録に関する問合せ・申込先
 北海道医療大学歯学部
 口腔機能修復・再建学系
 歯周歯内治療学分野
 第34回学術大会事務局：中塚 まで

〒061-0293 石狩郡当別町金沢1757番地
 TEL：0133-23-1414（内線：3323）
 FAX：0133-23-1414
 E-mail：yuko.n@hoku-iryo-u.ac.jp

編 集 後 記

平成27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。

2015年はノーベル医学生理学賞に北里大学の太田先生が、そして物理学賞には東京大学の梶田隆章先生が選出され、日本のサイエンスの明るい未来を予見させるようなすばらしい年になったのではないのでしょうか。私が特に印象に残ったのは両先生の受賞後の会見でのとても謙虚な自然科学に対する姿勢とお言葉でした。これらに研究者としてのあるべき姿の一端を垣間見たような気がいたしました。

さて、本号では生化学分野の田隈泰信先生に唾液分泌の分子機構（cAMPを中心に）に関する総説を投稿していただきました。生理学でも交感神経はcAMPを介してタンパク分泌、副交感神経はカルシウムによる水分分泌と授業で当たり前のように述べておりますが、それらの発見に至るまでの臨場感あふれる論争と先生ご自身の実験から得られた多数の所見を幅広く、わかりやすく説明していただいております。文中には名誉教授の東城庸介先生のお名前もところどころに見受けられ、歯科基礎医学の礎を築いた先生方の偉大な功績に深い感銘を受けました。また、歯科矯正学分野の飯嶋雅弘先生には新シリーズである「機器分析入門」としてエックス線回折に関するミニレビューを投稿していただきました。今後の先生方の研究のさらなる発展に向けて是非ご一読ください。さらに、本号には4編の原著論文（和文と英文）の投稿もいただきました。「優秀論文賞」の争いも一層激しくなってきた模様です。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35巻、第1号）の発行は平成28年6月30日です。

投稿原稿募集の締め切りは平成28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、2015年第34巻、第2号の巻末をご参照ください。

Thinking ahead. Focused on life.



100 Years +

A Century of Innovation

100年分の感謝

私たちは、ただ正解を求めればよいのだろうか
お客様に、ただ満足をしてもらうだけでよいのだろうか
正解の周りにあるもの
満足の先に見える未来
目には見えない大切なことを、大事にしていきたい

今年モリタは、100周年
A Century of Innovation - Today and Tomorrow
100年分の感謝とともに、進んでいきます

カフルール

レジン仮封材

優れた辺縁封鎖性と
良好な付形性を備えたレジン仮封材



歯科用高分子系仮封材材料

管理医療機器 医療機器認証番号 227AFBZX00108000

| | |
|------|-----------------------------------|
| 用途 | 窩洞形成後の仮封 |
| 色調 | アイボリー |
| 包装単位 | 粉末:250g 筆付 標準価格 ¥6,000(税抜) |
| | 液材:250ml スポイト付 標準価格 ¥6,000(税抜) |

適度な硬さを有し、
変形しにくさと取り外しやすさを両立!!



一括除去



良好な付形性

山八歯材最新情報はホームページで…健康は歯から～ (お問い合わせ・ご質問等もお待ちしております)



◆製造販売元

山八歯材工業株式会社

www.yamahachi-dental.co.jp

〒443-0105 愛知県蒲郡市西浦町大知柄54-1

TEL(0533)57-1721 FAX(0533)57-1764

E-mail box@yamahachi-dental.co.jp

Renewal!

smily :)

オサダスマイリープラスがお客様の
ニーズにおこたえし、さらに使いやすくなって新登場!



GMP2-S



NP2-L

操作性・耐久性がUPした、新インストゥルメントを装備



オサダトン F1-TP
トルクアップし、金属の切削の際にも
力強く削れます。5歳洗浄で冷却効果
もUPしました。耐久性に優れたチタ
ンコーティング仕様です。



オサダマイクロエンジン8SLセット
モータは従来品より小型・軽量に、
コンパクトハンドピースはコンビ
スタイルで握りやすく操作性がUP
しました。



エナック 11L
女性の手のひらにもフィットする
コンパクトサイズで、今まで治療し
にくかった部位にも楽にアプロー
チすることができます。



ルミナス LH-M188
ハログランプに比べて省エネで
長寿命。無影灯の把手は、取り外
して滅菌することができます。



OSADA

オサダスマイリーⅡプラス認証番号: 222AHBZX00001000
オサダスマイリーⅢプラス認証番号: 222AHBZX00002000
標準価格: ¥3,658,000 ~

販売元



長田電機工業株式会社 TEL 03(3492)7651 FAX 03(3492)7506
〒141-8517 東京都品川区西五反田5-17-5 <http://osada-group.jp/>

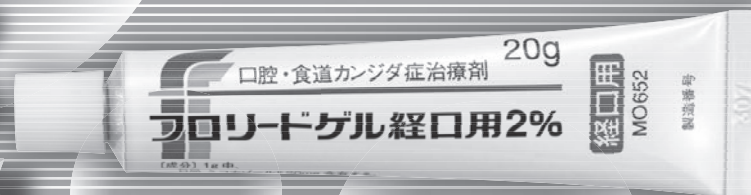
※詳しい資料ご希望の方は、商品名、掲載誌名を明記の上、本社お客様センターへご請求下さい。

※この広告掲載商品は改良の為、予告なしに仕様を変更することがありますので予めご了承下さい。 製造販売元/長田電機工業株式会社



※この広告掲載商品は改良の為、予告なしに仕様を変更することがありますので予めご了承下さい。
※詳しい資料ご希望の方は、商品名、掲載誌名を明記の上、本社お客様センターへご請求下さい。

口腔カンジダ症の治療に ゲル状の経口用抗真菌剤



原寸

口腔・食道カンジダ症治療剤

薬価基準収載

処方せん医薬品[※] 注) 注意—医師等の処方せんにより使用すること

フロリードゲル経口用2%

ミコナゾール・ゲル剤

20gチューブ

効能・効果、用法・用量、禁忌を含む使用上の注意等につきましては、製品添付文書をご参照ください。



販売
昭和薬品化工株式会社
資料請求先/東京都中央区京橋二丁目17番11号
TEL:0120-369-873
(月~金曜日 9:00~17:30/祝祭日当社休日を除く)
<http://www.showayakuhinkako.co.jp/>



製造販売元
持田製薬株式会社
〒160-8515
東京都新宿区四谷1丁目7番地

2013年8月(AA)



More than solid - Roxolid®.
進化したマテリアル、拡がるオプション

2016年1月 新発売

販売名：ストローマンインプラント (Roxolid SLActive) BLT 分類：高度管理医療機器 承認番号：227008ZX00208000
販売名：ストローマンインプラント (Roxolid SLActive) BL 分類：高度管理医療機器 承認番号：227008ZX00241000
販売名：ストローマンインプラント (Roxolid SLActive) TL 分類：高度管理医療機器 承認番号：227008ZX00428000

ストローマン・ジャパン株式会社
〒108-0014 東京都港区芝5-36-7 三田ベルジュビル6階
TEL.0120-418-995 FAX.0120-418-089

straumann
simply doing more

THE BEST PARTNER OF DENTISTS
CORPORATION
YDM
SINCE 1948

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

よりよい品質と
新たな信頼を求めて

Spacy Articulator. (Semi-Adjustable) Wing

スペイシー咬合器(半調節)ウィング



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

【仕様】

上下顎フレーム間距離 100mm
ボシクォール三角の一辺 110mm
矢状軸傾斜角 0°・60°・15° 刻み
側方軸路角(ベネット角) 0°~30° (5° 刻み)
バルクワイル角 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



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/>

GC

根管内への填入から支台の築盛まで
この1本。

UniFilCoreEM

デュアルキュア型支台築造用接着性コンポジットレジン

ジーシー ユニフィルコア EM

EASY MIXING

強く、しなやかで、そして美しい。

Fiber Post

支台築造用ファイバーポスト

ジーシー ファイバーポスト $\phi 1.2, \phi 1.4, \phi 1.6$

ジーシー ファイバーポスト N $\phi 0.8, \phi 1.0$

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

ジーシー ユニフィルコア EM 管理医療機器 220AKBZX00087000 単回使用 (EM ミキシングチップF、EM ミキシングチップ用ノズルRCのみ)
ジーシー ファイバーポスト 管理医療機器 217008ZZ00408000 単回使用 (ファイバーポストのみ)
ジーシー ファイバーポスト N 管理医療機器 220AKBZX00160000 単回使用

DIC (デンタルインフォメーションセンター) お客様窓口 ☎ 0120-416480 受付時間 9:00a.m.~5:00p.m. (土曜日、日曜日、祭日を除く) www.gcdental.co.jp/
東京都文京区本郷3丁目2番14号 〒113-0033 各アフターサービスについては、最寄りの営業所へお問い合わせください。
支 店 ●東京 (03)3813-6751 ●大阪 (06)4799-7333 営業所 ●北海道 (01)11729-2139 ●東北 (02)207-3370 ●名古屋 (052)757-6722 ●九州 (092)441-1286

※掲載の情報は2016年2月現在のものです。

FREE ARM ARTEO

口腔外用サククション
【フリーアーム・アルテオ】



特許出願中



進化したフリーアームは
6つの特徴を搭載。



センサースイッチは
お好みの位置にセット可能



4灯のLEDライトは
照度10,000ルクス



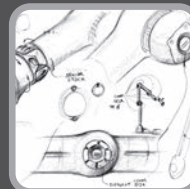
スムーズな操作性で
思い通りのポジションへ



サイレントフィルタで
高周波領域の騒音を低減



フードの脱着がワンタッチ
安全機構の設計



最先端のデザイン・豊富な
カラー/リネーションは
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

【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



販売名: フリーアーム・アルテオ
一般的名称: 歯科用吸引装置
医療機器認証番号: 222AHBZX00018000号 (管理医療機器)

■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。 ■過電圧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34巻 第2号

平成27年12月31日

発行者 田 隈 泰 信

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.34, NO.2, DECEMBER, 2015
CONTENTS

REVIEW

- 1 **The enigma of cyclic AMP mediated salivary exocytosis**
Taishin TAKUMA (73)

ORIGINAL

- 17 **DNA methylation analysis of Anti-aging related genes in Human Periodontal Ligament Fibroblasts by long-term stimulus of Lipopolysaccharide derived from *Porphyromonas gingivalis***
Rie TAKAI, Fumiya HARADA, Tetsuro MORIKAWA, Bhoj Raj ADHIKARI, Jun ITOH-OBARA, Masafumi UTSUNOMIYA, Osamu UEHARA, Koki YOSHIDA, Jun SATO, Michiko NISHIMURA, Itsuo CHIBA, Yoshihiro ABIKO (89)
- 23 **Three-dimensional nonlinear finite element analysis of orthodontic tooth movement with a light force**
Yukie OKA, Masaru KOBAYASHI, Kazuo HAYASHI, Itaru MIZOGUCHI (95)
- 37 **Effect of active form of vitamin D₃ in the differentiation of rat dental epithelial cell line**
Kaori MURATA, Akihiko TANIMURA, Masato SAITOH (109)
- 45 **A combination of oral care and 23-valent-pneumococcal vaccination is able to reduce pneumonia incidence in nursing homes**
Masahiro HATTA D.D.S., Takahiro ICHIKI M.D., Hiroyuki MORITA M.D., Masako HATTA D.D.S., Tomohiko MURAKAMI M.D. (117)

CLINICAL REPORT

- 55 **A case of Clear cell variant of Mucoepidermoid carcinoma of the palate**
Takatoshi CHUJO, Kosuke TAKIMOTO, Bhoj Raj ADHIKARI, Tetsuro MORIKAWA, Fumiya HARADA, Rie TAKAI, Koki YOSHIDA, Jun SATO, Shintaro YODOGAWA, Michiko NISHIMURA, Hiroki NAGAYASU and Yoshihiro ABIKO (127)

MINI REVIEW (Introduction to Instrumental Analysis)

- 61 **Analysis of Materials and Products by a X-ray diffractometry**
Masahiro IIJIMA, Kazuhiko ENDO (133)

DENTAL INFORMATION

- 64 **Recent topics** (137)