

# ラット耳下腺スライス標本および分離導管細胞を用いたカルシウム応答の検証(東日本歯学会第23回学術大会 一般講演抄録)

著者名(日)	設楽 彰子, 谷村 明彦, 根津 顕弘, 森田 貴雄, 東城 庸介
雑誌名	北海道医療大学歯学雑誌
巻	24
号	1
ページ	111-112
発行年	2005-06-30
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00009904/">http://id.nii.ac.jp/1145/00009904/</a>

(ICLS) コースを歯科医師用にアレンジした。歯科診療中の意識消失、呼吸・循環なしでの対処法について、シミュレーターを用いた研修計画を立案した。第一回目のコースは患者急変に対する最初の10分間の蘇生処置を行動目標として、2004年3月20日(日)に開催し、6名が受講した。インストラクターは歯科麻酔科医(歯科麻酔学会指導医と認定医、救急医学会ACLS基礎コース受講済)が務め、自動体外式除細動器(AED)を用いた一次救命処置(BLS)、気道確保・気管挿管、生体情報モニターの使用、静脈確保、治療薬静注のスキルをトレーニングした後、歯科救急シナリオでのチーム医療を実践した。研修の最後にはシナリオによる実技試験を個別に実施した。なお、実技テストにおいて、意識なしの発見から人(応援者)と器材(救急カート、心電図モニタ、自動体外式除細動器:AED)の要請に16秒以上、心臓マッサージ開始まで91秒以上、発見からAED開始まで181秒以上の受講者は、CP(Critical Problem)と評価して再試験を実施した。

【結果および考察】受講者全員がCPに抵触し、再試験を必要とした(表)。今後は定期的にコースを開催することで研修内容の充

化と定着を図り、コメディカルとの連携による早急な普及が必須と考える。また、将来的には外部評価者を迎えたコース開催が必要である。

	修了試験	再試験
人と器材を集める 目標:15秒以内	27.0±10.8秒 (12.6~41.9秒)	22.6±5.9秒 (17.1~29.9秒)
発見から心臓マッサージ開始まで 目標:60秒以内	109.6±17.2秒 (91.0~130.8秒)	104.4±15.2秒 (87.0~123.5秒)
発見からAED開始まで 目標:180秒以内	299.6±5.0秒 (295.0~306.4秒)	270.0±42.1秒 (238.0~330.8秒)

mean±S.D. (最小~最大)

【結語】平成16年度、受講者6名、インストラクター2名、タスク1名で、独自にBLSとACLS研修を開始した。第1回研修の修了実技試験では受講者全員がCP(Critical Problem)に抵触した。受講者全員が研修の継続を希望し、当専門外来でのBLSとACLS研修が定例化された。

### マイクロアレイを用いたブタマラッセ上皮特異的遺伝子単離の試み

○倉重 圭史\*, 安彦 善裕\*, 齋藤 正人\*\*, 西村 学子\*, 山崎 真美\*, 竹嶋麻衣子\*, 中村寿実子\*, 荒川 俊哉\*\*\*, 田隈 泰信\*\*\*, 五十嵐清治\*\*, 賀来 亨\*

\*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座, \*\*北海道医療大学歯学部小児歯科学講座, \*\*\*北海道医療大学口腔生化学講座

【目的】歯根膜中に存在するマラッセ上皮遺残は、歯周組織の再生を促進するといわれている物質を含むヘルトウィヒ上皮鞘が断裂したものである。マラッセ上皮遺残にも歯周組織再生に関与した成分が含まれているものと考えられるが、この細胞が発現している遺伝子については詳細な検索が行われていない。本研究では、口腔上皮とマラッセ上皮のmRNAの発現を比較することから、マラッセ上皮が発現している特異的な遺伝子の単離を行うことを目的とした。

【方法】マラッセ上皮(PLE)と口腔上皮(GE)を培養するために、生後6ヶ月齢のブタ小白歯を用いた。Nishimuraらの方法(Med. Electron Microsc. 1999)に従い単離を行い、それぞれ両者からoligoTM-d30(super)mRNA purification Kit RNによりmRNAを抽出した。cDNAを作製の後、GEをCy3に標識したものとPLEをCy5

に標識したものを2つ(test1,2)、反対にPLEをCy3、GEをCy5に標識したものを(test3)を用い、DNA microarray上でhybridizationを行った。それぞれの蛍光強度を数値化し、Cy3とCy5の発現強度の違いとその再現性から、それぞれに特異的に発現しているmRNAを同定した。同定されたmRNA発現の信頼性を確認するために、再度、両者の細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法を行った。

【結果および考察】test1,2,3の結果比較検討したところ、GEに特異的な遺伝子が5種類、PLEでは26種類の特異的な遺伝子があることが明らかになった。PLE特異的と判断された遺伝子の中には、既知の成長因子、転写因子などのもの以外に遺伝子情報のみで、機能の不明なものも含まれていた。今後の詳細な機能解析により新たな歯周組織再生誘導因子のみつかる可能性があるものと思われた。

### ラット耳下腺スライス標本および分離導管細胞を用いたカルシウム応答の検証

○設楽 彰子, 谷村 明彦, 根津 顕弘, 森田 貴雄, 東城 庸介  
北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

【目的】唾液腺の導管細胞はイオンの再吸収および分泌によって原唾液の組成を変化させる。我々は、ラット耳下腺導管細胞のCa<sup>2+</sup>情報伝達機構を明らかにするため、多光子レーザー顕微鏡を用いてエピネフリン(Epi)刺激による細胞内遊離Ca<sup>2+</sup>濃度([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)の変化を検証した。

【方法】マイクロサイザーを用いてラット耳下腺から300μmの標本を作製した。分離耳下腺細胞は、細切した耳下腺をコラゲナーゼとヒアルロニダーゼで処理して調製した。これらのサンプルにCa<sup>2+</sup>蛍光指示薬であるfura-2/AMを取り込ませ、蛍光強度の変化を多光子レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果および考察】耳下腺スライス標本を10 μM Epiで刺激すると

導管細胞の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇がみられた。[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇が始まるタイミングは個々の細胞でわずかにずれがあり、数個の細胞から始まったCa<sup>2+</sup>反応が導管全体へ広がる細胞間Ca<sup>2+</sup>ウェーブ様の反応も観察された。同様の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>変化は分離耳下腺導管細胞においてもみられた。また、高速測定により腺腔側から基底側へ向かってCa<sup>2+</sup>シグナルが伝播していく細胞内Ca<sup>2+</sup>ウェーブが観察された。これらの反応を定量的に検証したところ、1.0μM Epi刺激で全体の約80%の細胞が最大の[Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>上昇を示した。そのうち約1/2は0.1μM Epiでは最大反応を示すEpi高感受性細胞であることがわかった。細胞外液のCa<sup>2+</sup>を除去しても同様の反応が観察されたことから、これらの反応は主に細胞内ストアからのCa<sup>2+</sup>放出反応であること

が確認された。このようなEpiに対する反応性の違いには導管細胞の細胞膜表面のアドレナリン受容体やCa<sup>2+</sup>ストアのイノシトール三リン酸受容体の発現量が関与していると考えられる。今後はこれ

ら受容体の発現とCa<sup>2+</sup>反応の関係について検討していく予定である。

### マウス味蕾細胞における、神経栄養因子のNGF、NTN、およびそれらのレセプターTrkA、GFRα2の発現

○川越俊太郎\*, 奥村 一彦\*, 内田 暢彦\*, 伊藤 昭文\*, 柴田 考典\*, 鈴木 裕子\*\*, 武田 正子\*\*

\*北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座, \*\*北海道医療大学歯学部口腔解剖学第2講座

**【目的】** NGF (nerve growth factor) とNTN (neurturin) は、ニューロンの増殖、分化、生存維持に関与する神経栄養因子 (neurotrophic factor) である。本研究は二重免疫染色法を用いて味蕾細胞に、NGFとNTN、およびそれらのレセプターのTrkAとGFRα2が発現するかどうかを検索した。また、これらが発現した場合、味蕾の中のどの型の細胞に発現するかを合わせて検索した。

**【方法】** 正常マウスの有郭、葉状、および茸状乳頭の凍結切片を作製し、それぞれの抗体を用いて蛍光抗体法を行った。味蕾のⅢ型細胞は神経との求心性シナプス接合を持つが、この細胞にNCAMが発現し、またⅢ型細胞と一部のⅡ型細胞にPGP9.5が、他のⅡ型細胞にα-gustducinが発現することが報告されている。そこで本研究では、味蕾の細胞型を決めるためのマーカーとしてNCAM、PGP9.5、およびα-gustducinの抗体を使用して二重染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

**【結果】** 正常の味蕾細胞は、NGF、NTN、TrkA、およびGFRα2を発現した。二重免疫染色後では、ほとんどすべての抗NCAM、抗PGP9.5、および抗α-gustducin免疫陽性細胞は、NGFにも陽性を示した。このことから、NGF免疫陽性細胞にはⅡ型とⅢ型細胞、そしておそらくはⅠ型細胞も含まれることがわかった。ほぼすべての抗PGP9.5陽性細胞は、TrkA、NTN、そしてGFRα2に陽性を示した。これはⅢ型細胞がTrkA、NTN、GFRα2を発現することを示している。しかし他の型の細胞もこれらのレセプターやNTNを発現した。

**【結論】** これらのことから、味蕾細胞に発現するNGFとNTNは、自己および近隣の細胞のレセプターのTrkAとGFRα2に結合することにより栄養効果を及ぼし、さらにⅢ型細胞から味覚神経へのシナプス伝達にも関与するのではないかと推測された。

### 癌細胞の同所移植法による頸部リンパ節転移の観察 —組織片移植と細胞注入移植の比較—

○伊藤 昭文\*, 奥村 一彦\*, 村岡 勝美\*\*, 川越俊太郎\*, 荒川 俊哉\*\*\*, 安彦 善裕\*\*\*\*, 細川洋一郎\*\*\*\*\*, 柴田 考典\*

\*北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座, \*\*口腔外科学第2講座, \*\*\*口腔生化学講座, \*\*\*\*口腔病理学講座, \*\*\*\*\*歯科放射線学講座

**【目的】** すでに我々は、高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1に緑色蛍光蛋白 (GFP)、本GFP遺伝子を導入し、GFP高発現安定化細胞であるSAS-H1/GFPを作製後、ヌードマウスの舌へ同所移植すると、原発巣の局所浸潤と頸部リンパ節転移が認められることを報告した。そこで今回は、先に行った細胞注入移植法と比較し、組織片移植法を用いて、原発巣の進展度と転移巣の発現頻度について検討することを目的とした。

**【方法】** SAS-H1/GFP細胞を、ヌードマウスの背部皮下に2×10<sup>6</sup>個/20μl: PBS (リン酸緩衝液) の細胞浮遊液を注入し、1週経過後に形成された腫瘍塊を摘出後、各組織片 (0.5×0.5×0.5 mm, 1×1×1 mm, 2×2×2 mm) を切り出した。得られた組

織片を舌粘膜下に埋入し、経時的に実体蛍光顕微鏡による観察を行った。また、同時に転移巣と周辺組織を0.2% glutaraldehyde添加2% formaldehydeで固定後、凍結切片を作製し蛍光顕微鏡で微小転移の検討を行った。

**【結果】** 細胞注入移植法と比較して組織片移植法は、原発巣の腫瘍増殖性が高く、膨脹性に発育するため、局所浸潤の観察には適さないことが示された。また、組織片移植法による頸部の観察においては、リンパ管内の癌細胞の微小集団が観察されるとともに、細胞注入移植法と比較して、早期に頸部リンパ節転移が認められた。

これらのことから、組織片移植法において、頸部リンパ節転移を早期に観察できることが明らかとなった。

### ラットにおける固形から粉末飼料への変更が自発運動に及ぼす影響

○岩崎 一生, 横山 雄一, 平井 敏博, 牧浦 哲司, 越野 寿, 田中 慎介  
北海道医療大学歯学部歯科補綴学第1講座

**【目的】** ストレス応答に関して、視床下部-下垂体-副腎皮質系が重要な役割を果たしている。また、神経-内分泌-免疫系の相互作用が指摘されている。われわれはラットにおける咬合・咀嚼障害が

対角帯核・内側中隔核のコリン作動性ニューロン数を減少させること、記憶・学習機能を低下させることなどを報告した。一方、ラットの習性に反する飼料による飼育が情動ストレスとなり、日常動作