

リンカーおよび蛍光タンパク質の最適化によるIP₃プローブ“LIBRA”の改良

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

【目的】 非興奮性細胞のCa²⁺シグナルは, 主にイノシトール三リン酸 (IP₃) によって調節されている。我々は, 細胞内のIP₃動態を調べるために, IP₃受容体のIP₃結合部位の両端に蛍光タンパク質 (CFPとYFP) を結合させた蛍光プローブ“LIBRA”を開発した。今回は, その蛍光変化率を増加させるための改変について報告する。

【方法】 分子生物学的手法を用いて, LIBRA発現ベクターを改変した。リポフェクション法でCOS-7細胞に改変したベクターを導入し, それらの細胞をサポニンで穿孔して, IP₃刺激による蛍光変化を顕微鏡画像解析システム (AQUACOSMOS) にて測定した。

【結果】 蛍光ドナーであるCFPとIP₃結合部位をつなぐ部分 (リンカ

ー1) 及び, 蛍光アクセプターであるVenus (YFPの変異体) とIP₃結合部位をつなぐ部分 (リンカー2) を最適化するための改変を行った。その結果リンカー1を短いαヘリックスにし, さらにリンカー2に13個の直鎖状のアミノ酸を用いたものが最も大きな蛍光比変化率を示した。次に, Venus及びCFPを, それぞれの円順列変異体 (cp-Venus, cp-CFP; 50, 157, 173, 195, 229番目のアミノ酸をそれぞれ新たなN末端とする蛍光タンパク質) に置換した。その結果Venusをcp50Venusあるいはcp229Venusに置換したもののや, CFPとVenusをそれぞれcp157CFPとcp195Venusに置換したもので, 約40%の蛍光比変化率の増加が認められた。

ニコチンが及ぼすβディフェンシンの発現変化の検索

○中村寿実子*, 安彦善裕**, 西村学子*, 倉重圭史*, 竹嶋麻衣子*
山崎真美*, 齋藤正人**, 荒川俊哉***, 田隈泰信***, 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 個体差医療科学センター

***北海道医療大学歯学部口腔生化学講座

【緒言】 βディフェンシン (hBD) は, 主に上皮から産生されている抗細菌性蛋白質で, 細菌の感染を抑制する事が報告されている。またニコチンはタバコを介して口腔粘膜に悪影響を及ぼすことが知られている有害物質であるが, ニコチンがhBD発現に及ぼす影響については明らかにされていない。本研究では, ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaT細胞にニコチンを添加し, hBD-1-2-3の発現変化とその時の細胞内のpathwayについて検索した。

【方法】 ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaT細胞を10%FBS含有DMEMにて培養し, ニコチンを2.5, 0.5, 10, 25μg/ml添加後, 経時的にRNAを抽出した。RT-PCR法によりcDNAを作製, hBD-1, -2, -3の発現量と分化傾向の変化をTaqMan probeを用いたreal-time PCR法で観察した。細胞内のpathwayを明らかにするために, インヒビターを添加し, 経時的にRNAを抽出, 同様にhBD-

1, -2, -3の発現変化をreal-time PCR法によって検索した。蛋白抽出は上記同様にそれぞれ培養したヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaTを用いて行った。蛋白抽出後ウエスタンブロッティング法, ELISA法にて検索した。

【結果および考察】 ヒトケラチノサイト由来細胞株HaCaT細胞にニコチンを添加したところ, RNA, 蛋白はニコチン濃度および時間依存的にhBD-2の発現の上昇し, 分化傾向も認められた。hBD-1はMG132, SB203580のインヒビター添加により, hBD-2はSB203580のインヒビター添加による発現の抑制が確認され, これらのpathwayにはp38, JNK及びNF-κBの関与が考えられた。以上のことから, 口腔粘膜上皮では, 歯周病プロモーターとなるニコチン刺激によりp38/JNK pathwayを介してhBDsが上昇することで, 細菌感染を回避していることが示唆された。

先天性アンチトロンビン欠損症家系の遺伝子解析

○佐藤陽美*, 垂水隆志**, 金澤 香***, 水上和博*,
油井知雄****, 中林 透**, 家子正裕**, 溝口 到*

*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座

**北海道医療大学歯学部内科学講座

***北海道医療大学口腔外科学第一講座

****北海道医療大学補綴学第二講座

【目的】 血栓症予防のため抗血栓薬の内服症例に対する一般歯科の観血的処置では出血傾向への配慮が必要となる。抗血栓薬が投与される疾患としては脳梗塞や心筋梗塞のほかに先天性血栓性疾患が重

要である。今回我々は先天性アンチトロンビン (AT) 欠損症家系の遺伝子診断を行ったので報告する。

【方法】 発端者および家族のATの抗原量および活性はそれぞれラ

テックス凝集法, 合成基質法にて測定した. また, 末梢血白血球からDNAを抽出し, AT遺伝子のすべてのエクソンとその近傍, およびプロモーター領域をPCR法にて増幅し塩基配列を解析した.

【結果および考察】発端者のAT活性は41.3%, AT抗原は89.2%でTypeII AT欠損症と診断した. 発端者にはAT遺伝子の一方のアレルのエクソン3 aに, 塩基番号5342においてTからCへの一塩基置換が認められた. これにより本症例は, Ser116からProのアミノ酸変異

をヘテロ接合体で保有していることが確認された. また, 母と兄も同様のアミノ酸変異をヘテロ接合体で保有していた. Ser116はヘパリン結合領域に存在し, Pro116変異体はヘパリンとの結合能が障害されていると考えられた.

【結論】本症例はSer116Pro変異によるTypeII AT欠損症と診断した.

Culture kit for obligate anaerobe at chair side in the dental clinic

○Yukiko ITO*, Osamu UEHARA*, Toshimitsu OHSAKO*, Toshiya SATO*, Yuko NAKATSUKA*, Hiroshi MIYAKAWA**, Futoshi NAKAZAWA**

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

【Objective】The anaerobic bacteria those cause oral infections are found at about 70–80% in the infected root canals. Thus, it is important to examine that the root canal is sterile before root canal filling. However, this process has rarely been done for the general clinical treatment because of the difficulties with the device and the method of culturing anaerobic bacteria. In a general way, a specific chamber(anaerobic glove box)is necessary for culturing them, but that is inconvenient for the chair side treatment. Therefore, we have developed a simple culture kit for obligate anaerobe at chair side, which is practical in the general dental clinic.

【Methods】Development of culture kit : For the culture of obligate anaerobic bacteria, the BHI B.M. with vitamin K, glucose and BCG was used. And as the next step, the polyethylene bag was processed. It has a small sack to put subjects and the tap to infuse the mixed gas for culturing the obligate anaerobic bacteria. Inside of it, the small sack has two zipper up and down side, and there are an oxygen absorber, an oxygen detector which change color when oxygen exist, and resin ball to open the zipper easily. To keep out of the air, the mixed gas is injected with a nozzle of a can through the resin cap. Besides, it is possible for our kit to put into the incubator with stood because of its figure. Culture kit test : 5 obligate anaerobic bacterial species, which had been isolated frequently from the infected root canals, were inoculated in the kit sepa-

rately. After incubation for 72h at 37degrees, we examined the pH of the B.M. and the color of the indicator in the kit to find out whether those bacteria could be cultured or not. And we compared the results of culturing by our kit with those by the anaerobic glove box. In addition, we cultured bacteria in the clinical samples taken from the infected root canals by using a paper point.

【Results & Discussions】These 5obligate anaerobes and bacteria in the clinical samples could grow well in all of the cases. The pH of the B.S. decreased and that color changed from green to yellow. These results indicated that our kit is useful for the examination of the existence of the obligate anaerobic bacteria. Our kit is very simple and low-cost. Moreover, it can easily show the existence of the obligate anaerobe visually. Thus, it is extremely practical tool for the chair side treatment. However, there are problems, such as ; 1.It is difficult to show bacteria quantitatively. 2.It is impossible to detect bacteria those do not produce acid so that the color changes depending on pH. So we are processing those disadvantages at the moment.

【Conclusion】It became possible to confirm whether it is sterile or non-sterile by our culture kit easily. Therefore, our kit is expected to make a big progress of the chair side infected root canal treatment at the general dental clinic.

当医院における10年間のインプラント診療の実態

○南 誠二**, 細川洋一郎**, 篠崎広治**, 内海 治**, 佐藤尚武**, 越智守生**

*みなみ歯科医院

**北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

***北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座

【目的】近年, インプラント治療は欠損補綴の有用な手段として開業医にも広く普及してきている. 当院でも1995年より導入し10年が経過した. これら10年の経験を今後の診療に生かすため, その診療実態をまとめ, 検討を行ったので報告する.

【方法】1995年10月から2005年12月まで, 当院にてインプラントを埋入した96名236本のインプラントについて検討を行った.

【結果および考察】埋入手術は160回で1回の平均本数は1.48本,

一人当たりの手術回数は1.67回であった. 男女別では男30人, 女66人. 初回埋入時平均年齢は50.4歳(男51.8歳, 女49.8歳)で, 高齢になるにしたがい男の比率が大きくなる傾向がみられた. これは, 女性や若年者では審美的な要求が強く, 男性や高齢者では咀嚼機能改善への要求が高まるためと思われる. 部位別では上顎121本, 下顎115本. 歯種別では下顎6番が50本と最も多く, ついで上顎6番(33本), 上顎4番および下顎5番(各28本)の順であった. また,