

## 8. アメロゲニンが骨髄細胞の分化に与える影響

○泉川 昌宣, 小川 真史, 豊田 将吾, 小池 俊之, 小林 文人, 斎藤 隆史  
(北海道医療大学歯科保存学第二講座)

【目的】近年, 多分化能細胞である骨髄由来の間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cells) は細胞工学分野への応用の可能性が注目されている. これまで我々は, 象牙質再生材料及びその医療技術の開発を目的に研究を行ってきた. 今回我々は, エナメルマトリックスの主要タンパク質であるアメロゲニンに着目し, 骨髄細胞を組織工学に応用する際のアメロゲニンの細胞分化への影響を検討することを目的として, アメロゲニン添加時の骨髄細胞によるmRNA発現の変化について定量PCRにより検討を行った.

【材料及び方法】7週齢の雄性Fischer344ラットの大腿骨を採取し, 付着性の細胞を15%ウシ胎児血清含有 $\alpha$ -MEMにて, 37℃, 5%CO<sub>2</sub>, 湿度100%の条件下で培養した. 培地交換は3日ごとに行った. 継代後コンフルエントになったところで実験を開始した. アメロゲニンをそれぞれ0, 10, 100, および1000ng/mlの濃度で無血清培地中に加えた. 添加後, 30分, 24時間後にTRIZOLにて細胞を回収した. さらにAGPC変法を用いて全RNAを抽出し, cDNAを合成した. その後, LightCycler™ (Quick system3301, Roche Diagnostics, Germany) を用いた定量

PCR法により, アメロゲニンにより刺激された骨髄細胞における硬組織関連mRNA (BMP-2, BMP-4, osteonectin, osteopontin, osteocalcin, type I collagen, DMP-1, mRNA) の発現の変化についての分析を行った. また, アメロゲニン添加後の骨髄細胞のアルカリフォスファターゼ活性測定, およびvon Kossa染色を行った.

【結果および考察】定量PCRの結果より, 硬組織関連mRNAの発現は, アメロゲニンの添加により増強がみられた. また, コントロール群と比較してアメロゲニン添加後20日のアルカリフォスファターゼ活性は促進されていた. さらに, von Kossa染色においてはアメロゲニン添加後11日で強く染色され, 石灰化の促進が確認された. これまで, プタエナメル基質抽出物 (商品名EN-DOGAIN, EMD, BIORA社) が骨芽細胞や歯根膜細胞の分化を促進することは報告されていたが, その正確な有効成分は不明であった. 本研究において我々は, 精製度の高いアメロゲニンを使用して, 骨髄細胞の分化について検討した結果, アメロゲニンが骨髄細胞の硬組織関連mRNA発現を増強し, 骨芽細胞への分化を強力に促進することを明らかにした.

## 9. NEVA METER®を用いた唾液粘稠度と喫煙状態の関連

○衣笠 裕紀, 小林 孝雄, 増田 貴大, 山下 浩朗, 池田 雅美, 中島 啓介, 小鷲 悠典  
(北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座)

【目的】口腔内に分泌される唾液は, 口腔内細菌に対する免疫防御機構において重要な役割を果たすと共に細菌性プラークの形成自体にも関与している. その分泌は自律神経系の働きにより調節されており, 副交感神経が刺激されると漿液性に, 交感神経が刺激されると粘液性に変化する. 近年, 喫煙が歯周炎の病態に及ぼす影響が注目されているが, 喫煙と唾液の粘稠度の関連を検討した研究は少ない. 本研究では, 唾液の粘稠度を簡易に測定できるNEVA METER®を使用して, 喫煙が唾液の粘稠度を与える影響を検討することを目的とした.

### 【材料および方法】

(実験1) 唾液中コチニン濃度と唾液粘稠度の関連

### 1. 被験者と唾液サンプル採取

北海道医療大学歯学部在籍する職員, 学生に研究の内容を説明しインフォームドコンセントが得られた184名を被験者とした. 被験者に対して喫煙状態に関するアンケート調査を行い, 下顎安静位で3分間開口させ口腔底に貯留した唾液を滅菌スポイトで採取しサンプルとした.

### 2. 粘稠度の測定

採取した唾液サンプルについて, NEVA METER®を使用して5回測定し最大値と最小値を除外した3回分のデータの平均値を粘稠度の指標とした.

### 3. コチニン量の測定

喫煙状態の指標とするために、採取した唾液サンプルについてELISA法によってニコチンの代謝産物であるコチニンの濃度を測定した。

（実験2）喫煙停止による唾液粘稠度の経時的变化

#### 1. 被験者と唾液サンプル採取

喫煙者21名を被験者とした。アンケートを実施し、直後に唾液サンプルを採取しこの時点を書ライン時とした。書きラインから24時間喫煙を停止させ唾液サンプルをさらに採取し、その後48時間まで平常通りに喫煙を再開させた。喫煙再開24時間後、つまり書きライン時から48時間後に唾液サンプルを採取した。

#### 2. 唾液粘稠度の測定・唾液中コチニン濃度の測定

実験1と同様に唾液粘稠度と唾液中コチニン濃度を測定した。

#### 3. 唾液中細菌数の測定

採取した唾液を1/5000希釈し、羊血液寒天培地に播種した。好氣的、嫌氣的に24時間培養し、コロニー数をカウントしCFUを算出した。

#### 4. 唾液中コルチゾール濃度の測定

ストレスの指標とするために、採取した唾液サンプルについて唾液中コルチゾール濃度をCortisol EIA Kit (OXFORD BIOMEDICAL RESEARCH, INC.) を用いて測定した。

#### 【結果】

（実験1）被験者の唾液粘稠度は $10.80 \pm 5.19\text{mm}$ で、唾液中コチニン濃度は $12.17 \pm 21.05\text{ng/ml}$ であった。被験者152名を対象とした分析では、粘稠度とコチニン濃度との間に有意な弱い相関（相関係数 $=0.201$ ,  $p<0.05$ ）が認められた。

（実験2）喫煙再開時では喫煙停止時に比べ唾液粘稠度が有意に減少し、喫煙再開24時間では有意に増加した。

【考察】研究結果から、喫煙と唾液の粘稠度の間には何らかの関連がある可能性が示唆された。しかし、喫煙がどのような機序で唾液粘稠度に影響を与えているかは明らかにはならなかった。

## 10. アメリカ合衆国における歯内治療の卒後教育について —マイクロスコープの応用を中心に—

塚越 慎

（北海道医療大学歯学部歯科保存学第二講座）

アメリカ合衆国内の歯内療法卒後研修施設46ヶ所に対しアンケートを送付し、その結果をまとめた。

46施設の228名の研修医と45施設のプログラムディレクターに対しアンケート用紙を送付した。アンケートでは経験年数、研修ケース数、治療回数（1回法か2回法か）、使用ニッケルチタン製ファイル、根管充填方法、使用マイクロスコープの6項目について調査を行った。

研修医は卒後、平均3.5年経過しており48.5%はAdvanced Education General Dentistry (AEGD) またはGeneral Practice Residency (GPR) を行っていた。研修期間内に200~250症例の治療を行い、週に40~45時間の研修を行わなくてはならない。1回の治療回数で終了する施設が19施設と約半数あった。

ニッケルチタン製ファイルではロータリーファイルを用い、特にデンプライ社のプロファイルの使用頻度が高かった。69%の研修医が軟化ガッタパチャを用いた垂直加圧根管充填を行っており、9施設においては側方加圧根管充填を指導していた。逆根管充填材料としてはMTA (Mineral trioxide aggregate) とSuper EBAセメント (Super ethoxybenzoic acid) が用いられていた。使用マイ

クロスコープはほとんどの施設においてGlobal社製のみ、または複数社の製品を用いていた。11施設においてマイクロスコープを研修医自身に購入させていた。ペンシルベニア大学研修医外来におけるマイクロスコープの使用の割合について、研修医が治療を行った152症例についてまとめると2年目の研修医の根管拡大時の使用が82.1%と高い値であった。1年目では天蓋の除去時において32.4%と一番低い値を示していた。アメリカ合衆国の歯内療法専門医が行った上顎第一大臼歯を治療時の2根管性の近心頬側根の出現率は18.6%から33.3%と報告されていたが、ペンシルベニア大学ではマイクロスコープを使用することにより41.2%の出現率を認めた。また、ペンシルベニア大学では外科的歯内療法の全ての症例にマイクロスコープが用いられていた。

以上のことから歯内療法分野でマイクロスコープを応用することの有用性が認められると思われる。