

# 博士學位論文

論文内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

第2号 (2007年3月授与)

---

松本歯科大学大学院歯学独立研究科

---

## は し が き

学位規則第8条の規定による公表を目的として、2007年3月に本学において博士の学位を授与した者の論文内容の要旨及び論文審査結果の要旨を集録したものである。

# 目 次

◇大学院博士課程修了によるもの

学位記番号	氏 名	論 文 題 目	頁
第3号	片瀬 志穂	覚醒時の噛みしめに関する臨床生理学的研究—覚醒時噛みしめ自覚の有無における口腔顔面運動と咬筋筋活動の特性，臨床的要因，精神的要因についての比較—	1
第4号	安東 孝治	咬合圧除去による歯周組織の変化—特に加齢による比較—	4
第5号	飯田 吉郎	Chin Cup Treatment Outcomes in Skeletal Class III Dolicho- Versus Nondolichofacial Patients (長頭型と非長頭型を伴う反対咬合患者の長期治療効果—オトガイ帽装置を用いて—)	6
第6号	石和田敏貴	脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収と炎症性サイトカイン	8
第7号	内山真紀子	ヒト歯髄細胞および歯根膜細胞はヒト破骨細胞(破歯細胞)の分化を促進する	11
第8号	大河 和子	精神鎮静法における鎮静レベルの客観的評価法—PAMRの変化による評価—	14
第9号	大森由里子	ダウン症候群における歯周疾患発症関連遺伝子の検索	17
第10号	落合 隆永	歯肉上皮の異型変化によるサイトケラチンの異常発現	20
第11号	小野 裕輔	口腔乾燥症に対する漢方薬の効果—臨床評価と漢方薬の作用に関する検討—	23
第12号	金山 隼人	成長期咬合挙上動物における咀嚼運動の解析	26
第13号	久野 知子	エムドゲイン®ゲルを用いた低侵襲性歯周外科手術の研究	29
第14号	小池 秀行	噛みしめ時の下顎頭変位に対する矢状顎路傾斜角の影響	32
第15号	飯島 暁子	急性炎症時におけるサイトカインの関与—ラット三叉神経節細胞でのSTAT3の変化—	36
第16号	佐藤 将洋	New 19-nor-(20S)-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> analogs strongly stimulate osteoclast formation both <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (新規19-ノル-ビタミンD <sub>3</sub> 誘導体の強力な破骨細胞分化誘導作用の解析)	40
第17号	清水 貴子	Participation of Runx2 in Mandibular Condylar Cartilage Development (下顎頭軟骨発生におけるRunx2の関与)	43
第18号	正村 正仁	マウスガードの歯および歯周組織への効果	46

第19号	富田 真貴	NK1 receptor activation by geniohyoid primary afferents modulates parasympathetic postganglionic neuronal excitability in the rat (オトガイ舌骨筋一次求心線維の入力による副交感神経節後ニューロンのNK1受容体活性化)	49
第20号	谷本 英之	Further development of a versatile computer-assisted learning program for dental education with an exemplifying application on how to logically arrange and mount periapical and bitewing radiographs (歯科教育における汎用性のあるコンピュータ支援学習プログラムの開発—口内法エックス線写真を整理してマウントする方法を例としたアプリケーション—)	52
第21号	田村 集	<i>in vitro</i> 歯周病バイオフィルムモデルに対する抗菌薬の効果	56
第22号	富田 郁雄	三叉神経中脳路核ニューロンhチャンネル活性の5-HT依存性神経修飾作用に関する検討	58
第23号	中村 哲	慢性歯周炎に対する炭酸ガスレーザーの作用	61
第24号	楢本 浩子	Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. (唾液腺癌細胞におけるドセタキセル交差耐性に関与するMRP7の発現)	64
第25号	姫野 勝仁	顎顔面領域における炎症モデルラット三叉神経節細胞の遺伝子発現動態—カルモジュリンキナーゼとK <sup>+</sup> チャンネルの解析—	68
第26号	影山 康子	Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary molar roots in male rats : A histomorphometric study (ラットによる加齢に伴う上顎臼歯根周囲歯槽骨の改造変化：組織学的研究)	71
第27号	浅見 彩路	球状ヒドロキシアパタイトの加熱処理による骨芽細胞への効果	74
第28号	矢ヶ崎利衣子	口腔顔面慢性疼痛モデルラットの副腎皮質における機能的ならびに微細構造学的解析	77

氏名	片瀬 志穂
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第3号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	覚醒時の嘔みしめに関する臨床生理学的研究 —覚醒時嘔みしめ自覚の有無における口腔顔面運動と咬筋筋活動の特性，臨床的 要因，精神的要因についての比較—
指導教員	(主) 教授 森本 俊文 (副) 教授 山下秀一郎 (副) 教授 新井 嘉則 (副) 助教授 熊井 敏文
論文審査委員	主査 教授 古澤 清文 副査 教授 加藤 一誠 副査 教授 山下秀一郎 副査 助教授 安田 浩一

## 学位論文の内容の要旨

### 目的

本研究では、覚醒時に生じる自発的な口腔顔面運動と咬筋筋活動の発生様式や顎関節症の臨床徴候、精神的要因を、覚醒時の嘔みしめ自覚の有無による被験者2群間で比較することによって覚醒時嘔みしめの病態生理を解明することを目的とした。

### 実験方法

覚醒時の嘔みしめを自覚する健常被験者15名、自覚しない被験者18名を用い、30分間黙読中の咀嚼筋および前脛骨筋筋電図、胸部呼吸運動、体動、喉頭運動、嚙下音の記録を行い、同時に音声ビデオカメラによる記録を行った。記録に基づいて同定した自発的な口腔顔面運動を口腔顔面イベントと定義し、嚙下イベント、その他の機能的な口腔顔面イベント（発声・あくび・ため息・深呼吸・微笑など）、口唇イベントの3種に分類して、その発生数を算出した。また安静時筋活動量の平均+2SDを超える咬筋バーストを検出し、それらの発生数や活動量、持続時間を口腔顔面イベントごとに分析し、2群間で比較した。さらに、顎関節症の臨床徴候の有無や性格特性・心理状態を収集し、2群間で比較した。

### 結果および考察

2群間において、自発的な口腔顔面イベントの発生数、咬筋バーストの発生数・活動量・持続時間に有意差は認められなかった。しかし、非機能的な咬筋バーストの発生数は嘔みしめ自覚群では非自覚群より有意に多く発生した。嘔みしめ自覚群は非自覚群に比べ過去のクリック音や顎顔面の痛み疲労不快感、最大開口時の痛み、心配性を自覚する割合が有意に高かった。また、咬筋バーストの発生

数が高い被験者群と低い被験者群の2群を比較すると、咬筋バーストの発生数が高い被験者群は低い群に比べて噛みしめの自覚率は高く、過去の起床時の顎の痛みこわばりの自覚率が高かったが、心理的要因には2群間で有意差は認められなかった。

覚醒時の噛みしめを自覚する被験者は自覚しない被験者に比べ、咬筋活動量が多いことから、咀嚼筋や顎関節に臨床的症状を生じる原因となっている可能性がある。また、覚醒時の噛みしめを自覚するためには、咬筋筋活動の増加に加え、過去の臨床徴候や性格特性が要因となる可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

覚醒時の噛みしめ習癖は顎関節機能障害の発症因子あるいは増悪因子の一つとして考えられている。しかし、覚醒時の噛みしめ習癖に関して生理学的手法を用いた研究は非常に少ない。本論文では、覚醒時の自発的に生じる口腔顔面運動を分類し、それらの咬筋筋活動を定量解析する手法を確立した上で、過去の臨床的徴候や性格的特性から、覚醒時の噛みしめの病態利の解明と噛みしめの自覚に寄与する要因の検討を行っている。

本研究では、生体信号記録と音声ビデオカメラ記録を用いた生理学的手法と臨床徴候や性格的特性を記録する臨床的手法を組み合わせて、以下の結論を導き出している。

1. 自発的に生じる機能的な口腔顔面イベントの発生数は、覚醒時の噛みしめ自覚の有無による被験者2群間で差はない。しかし、これらとは関連のない非機能的な咬筋バーストの発生数が噛みしめ自覚者では非自覚者より高いことから、覚醒時の噛みしめ自覚には、咬筋バーストの発生数が誘因となる事を示した。
2. 覚醒時の噛みしめ自覚を持つ被験者は、非自覚者と比較すると過去の臨床的徴候を有する頻度や心理的要因を有する頻度が高いことから、噛みしめの自覚は、咬筋バーストの増加に加えて過去の臨床的徴候や性格的特性の有無が混在因子になることが示唆された。

覚醒時の噛みしめに焦点を絞った研究方法は独創的で、ここで導き出された結果は、顎関節機能障害を解明する上で重要な知見を与えるものであると考える。

以上より、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

審査員の質問に対して以下のごとく明確な回答が得られた。

1. 本研究を遂行するに当たっての仮説について簡潔に説明してください。  
→覚醒時の噛みしめを自覚する被験者と自覚しない被験者では、覚醒時の咬筋筋活動の臨床的要因あるいは心理的要因に相違があるのではないかと、という仮説に基づきました。
2. 本研究における咬筋の筋活動は深層筋の活動を捉えているのか？  
→表面筋電極を用いているので、深層筋の活動記録は出来ないと考えられます。
3. 噛みしめの自覚と関連をもつ心理的要因に、「心配性」とあるがどのような意味ですか？  
→RDC/TMDの質問表における「過去一ヶ月間において心配性で悩んだことがありますか？」と言う質問項目に「はい」と回答した場合に「心配性」を心理的要因としました。

4. 被験者一人について一回の記録ですが、再現性はあるのですか？

→予備実験を基に再現性の高い実験条件を設定し、さらに被験者の選択基準を統一したプロトコルを用いて本実験を行いました。

5. 夜間ブラキシズムを想定して覚醒時の噛みしめを研究したのですか？

→「覚醒時の噛みしめ」は顎関節機能障害の原因の一つとされていることから、本研究では夜間ブラキシズムを想定せず、あくまで「覚醒時の噛みしめ」を単独で取り上げ研究しました。

以上の結果から、本審査会は学位請求者が博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	安東 孝治
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第4号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	咬合圧除去による歯周組織の変化—特に加齢による比較—
指導教員	(主) 教授 佐原 紀行 (副) 教授 小澤 英浩 (副) 教授 川上 敏行
論文審査委員	主査 教授 中村 浩彰 副査 教授 長谷川博雅 副査 教授 音琴 淳一 副査 助教授 小林 泰浩

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景と目的】

咬合機能の喪失により、さまざまな歯周組織の変化が生じることが知られている。高齢化社会における歯科臨床では、機能喪失に伴う変化に加え、加齢による歯周組織の変化をも考慮する必要がある。本研究は加齢に伴う咬合圧除去後の歯周組織の変化を明らかにすることを目的として行われた。

### 【材料と方法】

10、50、80週齢のラットの上顎第一臼歯の歯冠削除により咬合圧除去モデルを作製し、下顎第一臼歯の歯周組織変化を組織学的に検索し、加齢による比較検討を行った。また、対照群には未処置の下顎を用いた。軟X線による確認、テトラサイクリンのラベリングによる骨形成解析、パラフィン切片を用いたH-E染色、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）活性染色による骨吸収解析を各週齢において行った。

### 【結果】

対照群では、加齢に伴い歯根膜腔の狭窄、細胞性セメント質の肥厚、固有歯槽骨の改造活性の低下が確認できた。実験群では、すべての週齢において根間中隔と根尖部の歯槽骨において新生骨の形成が認められたが、その形成量は加齢に伴い減少していた。また、実験群では、対照群にくらべ歯根膜腔の狭窄が著しい傾向を示した。一方、テトラサイクリンのラベリングがセメント質には認められないことから、実験期間においてセメント質形成はほとんどみられないことが確認された。

### 【考察と結論】

咬合圧除去後に見られる歯根膜腔の狭窄は、歯の挺出に伴う新生骨の形成によることが示唆された。また、その形成量は加齢に伴い減少することから、咬合喪失後の歯周組織の変化は加齢と密接な

関連を持つと結論づけている。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、咬合喪失後の歯周組織の変化を加齢変化と関連づけて解析することを目的とし、組織学的に解析したものである。

咬合圧除去モデルを作製するにあたり、上顎第一臼歯を両側削除することにより、咬合圧が加わらない下顎第一臼歯を用いている点、下顎運動に左右の変位が生じないようにしている点において工夫が見られる。また、歯周組織の変化を、歯槽骨、歯根膜、セメント質および歯肉に分類して観察し、それぞれの部位において加齢との関連を結びつけている。方法は軟X線解析、H-E染色に加え、テトラサイクリンのラベリングによる骨形成の解析、TRAP染色による破骨細胞の骨吸収の解析などの形態学的解析を加えることにより、詳細な検討を行っている。このような解析法は、本研究において最適な手法であると考えられる。

咬合圧除去により、根間中隔や根尖部歯槽骨に骨形成が見られることがテトラサイクリンラベルにより明確に示され、形成量は加齢に伴い減少することが明らかとなった。また、咬合圧除去群では、歯根膜腔の狭窄が顕著であり、これは歯の挺出により固有歯槽骨内面に新生骨が形成されたためと結論づけている。結果は明確に示されており、結論も適切であると思われる。

以上により、本論文は学位論文に値するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「咬合圧除去による歯周組織の変化 —特に加齢による比較—」を中心に、本研究に関する基礎的知識、論文の内容に関する事項について口答と筆答による試験を行い、回答が得られた。

質問事項は次のとおりである。

1. 患者さんの治療において、歯周組織の加齢変化を考慮した治療とはどのようなものがあるか
2. 咬合機能喪失に伴う速やかな歯周組織の変化はどのくらいの期間で生じるのか
3.  $^3\text{H}$ -prolin 投与により何がわかるのか
4. 歯根膜の改変について
5. テトラサイクリンのラベリング機序と意義について
6. 10、50、80週齢ラットを実験に用いた理由について
7. ヘマトキシリン - エオジン染色の染色機序について
8. 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 活性の意義および活性強度について

以上の結果から、本審査会は学位申請者が博士（歯学）としての知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏 名	飯田 吉郎
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第5号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Chin Cup Treatment Outcomes in Skeletal Class III Dolicho-Versus Nondolichofacial Patients (長頭型と非長頭型を伴う反対咬合患者の長期治療効果—オトガイ帽装置を用いて—)
指導教員	(主) 教授 出口 敏雄 (副) 教授 塩島 勝 (副) 教授 伊藤 充雄
論文審査委員	主査 教授 宮沢 裕夫 副査 教授 塩島 勝 副査 教授 伊藤 充雄 副査 助教授 小林 泰浩

## 学位論文の内容の要旨

長顔型と非長顔型の2つの異なった歯・顎顔面形態の異常を示す反対咬合患者にオトガイ帽装置を使用し、その長期的治療の効果を検索した。資料は反対咬合を示す Angle Class III 不正咬合をオトガイ帽装置にて治療した男子33症例、女子32症例で、治療前(T0)、動的治療終了時(T1)、保定終了時(T2)で口腔模型、顔面・口腔写真、側面セファログラムがととのっており、満足な結果を得た症例を抽出した。各男女のセファロ分析から男子資料33症例の17症例を長顔群に16症例を非長顔群に、女子資料32症例は長顔群と非長顔群ともに16症例に分類し、T0、T1 および T2 のセファロ分析値を算出して、各段階での2群間の有意差検定を行った。両群の症例で、1) アンクル III 級の形態異常の著明な改善が見られ、患者の協力を得て後戻りを最小に抑えることが出来た。2) 長顔型群と非長顔型群の間に、上下顎骨の前後関係を示す SNA、SNB、SNP 角の各項目に有意差 ( $p < 0.01$ 、 $0.001$ ) を示し、下顎骨のみならず前頭蓋、上顎骨部にも形態の相違が認められた。垂直方向の関係を示す下顎下縁平面角、Y 軸角値にも有意差を認めた ( $p < 0.001$ )。両群で、3) 上下顎骨の前後の異常を示す ANB 角 ( $0.9^\circ < \text{mean} < 1.4^\circ$ ) および Wits appraisal 値 ( $-6.1 \text{ mm} < \text{mean} < -5.6 \text{ mm}$ ) は skeletal Class 3 の特徴を示した。4) 両群で治療前に有意差を示した顎顔面形態を維持しながら形態異常の改善が見られた。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究の特徴は下顎骨に対する長期にわたる整形力の効果を検索したものであり、歯科矯正学の臨床に貢献する意義のある研究である。長顔群と非長顔群の顔面形態の異なる下顎前突症に対する整形力の作用機序を解明するものであり、本来の顎顔面形態を維持しながら形態異常の改善がみられると

いう結果を得た。本学位論文は Angle Orthodontist に受理されており、学位授与に相応しい。

## 最終試験の結果の要旨

最終試験の結果、試験委員の質問に対し満足のいく回答が得られ、人格も優れ、また全員の審査委員が本論文は学位授与に相応しいと判断した。

氏名	石和田敏貴
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第6号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収と炎症性サイトカイン
指導教員	(主) 教授 佐原 紀行 (副) 教授 小澤 英浩 (副) 教授 川上 敏行
論文審査委員	主査 助教授 小林 泰浩 副査 教授 宇田川信之 副査 助教授 上松 隆司 副査 助教授 岩崎 浩

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景及び目的】

ヒト乳歯の脱落前に認められる内部吸収は、付着歯肉部の炎症に起因することが示唆されている。しかし、どのような炎症性サイトカインが、この内部吸収に重要な役割を果たしているか不明なままである。本研究では、ヒト乳歯の内部吸収進行過程において、炎症性サイトカインの中でも特に骨吸収能を示す IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の3種類のサイトカインの局在について免疫組織化学的に観察した。

### 【材料と方法】

乳歯は抜歯前にX線写真を撮影し、歯根がほとんど吸収されていることを確認した。齶触のない健全な乳歯56歯(前歯12例、犬歯18例、臼歯26例)を観察に用いた。乳歯は、抜歯後直ちに通法に従い固定後、10% EDTA 溶液で脱灰した。脱灰終了後、マイクロスライサーを用いて100  $\mu$ mのスライスを作製した。各スライスは、破骨細胞や破歯細胞のマーカー酵素として用いられている酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP) 活性染色を行い、内部吸収の程度と破歯細胞の分布状態を観察した。次に、マウス抗ヒト-IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体を用い蛍光抗体法で免疫染色した。免疫染色後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

### 【結果と考察】

脱落前のヒト乳歯の内部吸収を観察モデルとし、破歯細胞の分化過程、炎症性サイトカイン産生細胞の動態について免疫組織化学的手法を用い検討し、以下のような結果を得た。

1. 吸収開始前の歯髄内には炎症性サイトカイン陽性細胞はほとんど観察されなかった。
2. 破歯細胞による吸収が最初に認められる歯冠底部の象牙質表面付近には、吸収前に IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞が多数観察された。しかし、IL-6 陽性細胞は歯髄中央部に多く局在した。

3. 内部吸収の進行に伴い吸収部位に隣接した IL-1 $\alpha$ 、IL-6 や TNF- $\alpha$  陽性細胞が観察された。また、歯髄中央部でも炎症性サイトカイン陽性細胞が増加し、一部の陽性細胞は TRAP 陽性の単核細胞と隣接していた。
4. 一部の吸収窩表面とそれに隣接した単核細胞が IL-6 抗体で陽性を示し、IL-6 は破菌細胞の分化形成に関与するだけでなく、吸収窩表面の硬組織による修復過程にも関与している可能性が示唆された。

#### 【結論】

以上の結果から、IL-1 $\alpha$ 、IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインは脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収過程において、破菌細胞やその前駆細胞の分化、誘導あるいは活性化に密接に関与している可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は脱落前のヒト乳歯の内部吸収に炎症性サイトカインがどのように関与しているか検討する目的で行われた。破菌細胞の分布によって、吸収時期を吸収前期、吸収初期、吸収後期の3段階に分けた。各吸収段階の乳歯をヒト IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  に対する抗体を用い、陽性細胞の分布変化を観察している。また、TRAP 活性染色の発色剤が赤色の蛍光をもつことを利用し、破菌細胞あるいはその前駆細胞と炎症性サイトカインの分布変化を同一標本で観察する試みをしている。この結果、炎症性サイトカイン陽性細胞が象牙質を吸収している破菌細胞の周囲だけでなく、歯髄中央部の単核の前駆細胞とも密接して分布していることを明らかにしている。さらに、歯髄内の IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞はほぼ同様な分布変化を示したのに対し、IL-6 陽性細胞は内部吸収過程では歯髄中央部に分布していたが、吸収後期になると吸収面に多く観察されることも明らかにしている。これらの結果から、ヒト乳歯の内部吸収に関しては、炎症性サイトカインが破菌細胞の分化、誘導あるいはその活性化に密接に関与していることを示唆している。また、IL-6 は IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  の働きとは異なった吸収表面の修復機構に関与している可能性を示唆している。

本論文は、破菌細胞の分化、誘導、活性化などを *in vivo* で観察できるモデルを用いて、炎症性サイトカインの局在を明らかにした独創的な研究である。本論文の結論は、歯科医学の研究に大きく貢献したと評価できる。

また申請者は、組織化学、免疫組織化学染色法さらには共焦点レーザー顕微鏡、電子顕微鏡などの観察手法を修得しており、博士課程修了者として十分な専門知識を習得しているものと判断した。

以上のことより、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文・ヒト乳歯の内部吸収と炎症性サイトカイン・を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事項について、口頭および筆頭による試験を行った。

質問事項は、次のとおりである。

1. IL-1、IL-6 は、どのような細胞が産生しているのか？また、その根拠は？
2. 乳歯の脱落時に細菌感染が起こっているのか？歯髄内に細菌は認められたのか？
3. 蛍光抗体法の原理を説明しなさい？
4. 免疫組織化学的手法におけるポジティブコントロールとネガティブコントロール実験の意味について？
5. 乳歯の脱落時に、なぜ炎症性サイトカインが産生されるのか？
6. 感染がなくても内部吸収が起こるといふ以前の報告はあるのか？
7. IL-1α の局在を調べようと思った理由は？
8. 破歯細胞による歯の吸収における TNF、IL-1 の作用機構について？
9. 乳歯の内部吸収前期以前の歯根吸収は、どのような機構で起こっているか？
10. 単核および多角 TRAP 陽性細胞と炎症性サイトカインの関係は、どのようなものか？

以上の質問に対して申請者から明確な回答が得られた。

以上により、本学位審査会は、申請者が博士（歯学）として十分な学力及び見識を有するものと認め、最終試験を合格と判断した。

氏名	内山真紀子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第7号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	ヒト歯髄細胞および歯根膜細胞はヒト破骨細胞(破歯細胞)の分化を促進する
指導教員	(主) 教授 宮沢 裕夫 (副) 教授 藤村 節夫 (副) 教授 平岡 行博 (副) 助教授 岩崎 浩
論文審査委員	主査 教授 高橋 直之 副査 教授 中村 浩彰 副査 教授 佐原 紀行 副査 助教授 岩崎 浩

## 学位論文の内容の要旨

### 目的:

歯根の外部吸収や歯髄における内部吸収の際に、破歯細胞はその中心的役割を担う。破歯細胞と破骨細胞が具備する特異形質は同一であり、破歯細胞と破骨細胞の分化誘導機構は類似していると考えられている。しかし、破歯細胞の形成部位に存在する歯髄細胞や歯根膜細胞が、破歯細胞の形成に関わるか否かは不明である。破骨細胞の分化とその骨吸収機構には、各種骨吸収促進因子の刺激によって、骨芽細胞または骨髄間質細胞の細胞膜表面に発現誘導される破骨細胞分化因子(RANKL)が必須であることが明らかとなっている。本学位申請者は、破骨細胞の分化誘導に、歯根膜細胞や歯髄細胞由来の間質細胞が関与しているのか否かを明らかにすることを目的に、ヒト由来の各種細胞を用いた培養系を用いて実験を行った。

### 実験材料および方法:

インフォームドコンセントを得た後、抜去ヒト第三大臼歯より歯根膜および歯髄組織を採取し、コラゲナーゼ処理を行い、それぞれの細胞群を調製した。また、ボランティアより得た末梢血から単核細胞群を比重遠心分離法を用いて調製した。さらに、MACSシステムを用い、末梢血単核細胞から、CD14陽性細胞(破骨細胞・破歯細胞の前駆細胞)を単離した。CD14陽性細胞と歯髄細胞あるいは歯根膜細胞の共存培養は、以下のとおり行なった。歯髄細胞あるいは歯根膜細胞を48穴プレートに播種し、10% FBSを含む $\alpha$ -MEM培地にて1日間培養後、さらにヒトCD14陽性細胞を播種し、各種試薬[OPG(osteoprotegerin), PGE<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>), RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand), M-CSF(macrophage colony-stimulating factor)]を添加し、14日間共存培養した。培養後、抗ビトロネクチンレセプター(VNR)抗体を用いた免疫染色にて、破骨細胞(破歯細胞)の同定を行った。VNR陽性細胞のうち3核以上の多核細胞を破骨細胞(破歯細胞)として計測した。

## 結果と考察：

(1)CD14細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞、いずれの単独培養において、VNR陽性細胞は全く認められなかったが、CD14細胞を歯髄細胞または歯根膜細胞と共存培養することにより、VNR陽性の多核破骨細胞（破歯細胞）の形成が認められた。(2)共存培養系で形成された破骨細胞（破歯細胞）の形成は、RANKLのデコイ受容体であるOPGの添加によってほぼ完全に抑制された。(3)PGE<sub>2</sub>はRANKLとM-CSFによって誘導されるヒト破骨細胞分化を強く抑制することが報告されている。PGE<sub>2</sub>をこれらの共存培養系に添加すると、破骨細胞（破歯細胞）の形成は強く抑制された。(4)歯根膜細胞と歯髄細胞からRNAを調製し、RT-PCR法にて破骨細胞分化因子（RANKL）の発現を検討したところ、いずれの細胞においてもRANKL mRNAの発現が認められた。

## 結論：

以上の実験結果より、ヒト由来の歯根膜細胞と歯髄細胞は、RANKLシグナルを介して、ヒト破骨細胞を誘導することが示された。この知見は、破骨細胞と破歯細胞の形成機構がともに類似していることを示すものである、さらに、歯根の外部吸収や歯髄における内部吸収に、歯根膜細胞と歯髄細胞が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

破歯細胞の分化調節機構については、不明な点が多い。本論文では、破歯細胞の形成機構を解明することを目的に、ヒトCD14細胞、歯髄細胞および歯根膜細胞を用いて破歯細胞形成実験を行なった。一連の実験を通して、本学位申請者は、歯髄細胞および歯根膜細胞はRANKLを発現して破歯細胞の形成を支持する活性があることを発見した。OPGを添加することにより破歯細胞形成が阻害されることで、破歯細胞の形成は、RANKL依存性であることを証明した。また、PGE<sub>2</sub>を添加することにより破歯細胞形成が阻害されることで、ヒト破骨細胞の形成との類似性を示した。

以上、本論文は、(1)研究目的が明確に記載されている、(2)実験方法が妥当であり今日的な手法が用いられている、(3)得られた結果は重要である、(4)結論が結果を反映したもので明確に記載されている、(5)臨床知見と今回の実験結果の関連性および今後の研究課題が考察されていることから、学位論文にふさわしいと判断した。

## 最終試験の結果の要旨

2007年1月30日、総合歯科医学研究所セミナー室にて、本学位申請者、主指導教員（司会）、主査および副査の同席にて、学位論文の審査および最終試験が行なわれた。各審査委員から、提出された論文に対する訂正と加筆事項が述べられ、本学位申請者と主指導教員の同意のもとで、訂正と加筆事項が決められた。次に、本申請者に対して、口頭試問および筆記試験が行われた。

口頭試問における質問事項は以下のとおりである。

1. 本研究が歯科臨床にどの様に役立つのか。

2. 破骨細胞様細胞の出現を見る培養日数はどの様にして決めたのか。
3. 歯牙から歯髓細胞と歯根膜細胞の採集法について、細菌感染をどの様に防止しているか。
4. 内部吸収と外部吸収のメカニズムは、どのように違うのか。
5. 破骨細胞と破歯細胞に違いはあるのか。
6. 今後どの様にして、内部吸収と外部吸収の違いを明らかにするのか。

筆記試験では、以下の二点についてレポート提出を求めた。

1. VNR はどのような構造と基質認識機構をまとめなさい。
2. 破骨細胞が硬組織を吸収するために備えている特徴を列挙しなさい。

口頭試問において、上記の質問に対して、本申請者は明確に回答した。また、筆記試験で求められた課題に対して、完成度の高いレポートが提出された。以上より、本学位審査会は、本学位申請者は、博士（歯学）として十分な専門知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏 名	大河 和子
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第8号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	精神鎮静法における鎮静レベルの客観的評価法—PAMRの変化による評価—
指導教員	(主) 教授 廣瀬伊佐夫 (副) 教授 森本 俊文 (副) 教授 澁谷 徹 (副) 助教授 熊井 敏文
論文審査委員	主査 教授 金銅 英二 副査 教授 宮沢 裕夫 副査 教授 王 宝禮 副査 助教授 小笠原 正

## 学位論文の内容の要旨

### 【緒言】

後耳介筋（post auricular muscle）は耳介の運動に関与する筋であるが、ヒトでは痕跡的でその作用はほとんど失われている。しかし近年、後耳介筋反射（post auricular muscle response, PAMR）は聴性誘発反応の中潜時反応（middle latency response, MLR）を測定する時にしばしば現れる筋原性の反応波として注目され、その性質が検討された。これまでPAMRは、睡眠により振幅（Amplitude, AMP）が減少する<sup>1,2,4</sup>ことが知られていたが、本研究では、PAMRが覚醒時の笑気や鎮静薬の鎮静作用にも振幅が変化することに注目し、臨床応用を考えた。

歯科臨床では精神鎮静法（conscious sedation）が、快適で円滑な歯科治療を提供できるとともに、脳血管障害、循環器疾患の合併症発症予防に有用であり繁用される。精神鎮静法の至適鎮静レベルの判定は、バイタルサインにより行われているが、薬剤効果に個人差のあることをよく経験する。

本研究では、笑気（N<sub>2</sub>O）やミダゾラム（ベンゾジアゼピン系鎮静薬）がPAMRに対し、どのように影響するのかを明らかにするとともに、PAMRが精神鎮静法の鎮静度モニタとなり得るかどうかの検討を行った。

### 【研究方法】

対象は、手術時に精神鎮静法の適応としたASA分類1度の成人で、研究目的、検査内容を説明し、インフォームドコンセントを得た笑気吸入鎮静法10名、静脈内鎮静法14名とした。歯科臨床で繁用している笑気吸入鎮静法、およびミダゾラム静脈内投与による精神鎮静法でのPAMR変化と笑気吸入濃度、血漿ミダゾラム濃度および臨床的至適鎮静レベルとの関連を検索した。PAMR波形の誘出にはシグナルプロセッサ（7S12、日本電気三栄製、日本）を用いて、音刺激および加算平均法により行った。

## 【結果】

### 1. 笑気吸入濃度と PAMR 変化

PAMR の振幅変化は対照（純酸素吸入時）に比し、笑気吸入濃度10%では $153.7 \pm 34.7\%$ と増加したが、20%および30%では有意に減少し、それぞれ $88.7 \pm 21.5\%$ および $44.3 \pm 6.3\%$ であった。PAMR 潜時は対照値に比し、30%笑気吸入時において N 波が有意に延長した。

### 2. 血漿ミダゾラム濃度と PAMR 変化

- 1) ミダゾラム投与量は、レベル 1 では $0.02 \text{ mg/kg}$ 、レベル 2 における総投与量は $0.04 \pm 0.00 \text{ mg/kg}$ 、臨床的至適鎮静であるレベル 3 では $0.1 \pm 0.01 \text{ mg/kg}$ であった。
- 2) 対照値の PAMR 潜時は、症例により異なり平均 $12.3 \pm 0.7 \text{ msec}$ であった。
- 3) レベル 3 における血漿ミダゾラム濃度と PAMR 振幅に相関関係は認められなかった。

## 【結論】

聴性誘発反応のうち、誘出が比較的容易で再現性に富む後耳介筋反射（PAMR）の変化、特に振幅変化と臨床的至適鎮静レベルとの関連性に着目し、客観的な鎮静レベルモニタとしての有用性を検討して次の結果を得た。

### 1. PAMR の振幅について

笑気濃度30%時には PAMR 振幅は、 $44.3 \pm 6.3\%$ に減少した。

ミダゾラム静脈内鎮静法における臨床的至適鎮静レベルでの PAMR の振幅は、 $16.2 \pm 10.0\%$ に減少した。また、臨床的至適鎮静レベルでの PAMR の振幅減少と血漿ミダゾラム濃度には相関関係は認めなかった。

### 2. PAMR の潜時について

笑気濃度30%時の N 波は、対照値に比し有意に延長した。

ミダゾラム静脈内鎮静法における、臨床的至適鎮静レベルでの N 波、および P 波の潜時は、対照値に比し有意に延長し、ピーク間潜時も対照値に比し有意に延長した。

### 3. 睡眠に陥る深度の鎮静では PAMR 波形は消失した。

以上の結果より、PAMR は精神鎮静法の至適鎮静レベル判定に有用であり、特に薬剤効果に個体差の多い有病者や高齢者の精神鎮静法のモニタとして、有用性が高いと思われる。

## 学位論文審査結果の要旨

歯科臨床において精神鎮静法は、安全で快適な医療を提供する補助手段として、広く応用されている。精神鎮静法の主流は、笑気や静脈内鎮静法であるが、適正な鎮静状態の評価法はまだ確立されていない。これまでに全身麻酔における適正な麻酔状態を評価する方法を応用した評価法の開発も試みられているが、課題が多いのが現状である。

本研究は、精神鎮静の適正状態の有効な評価法の開発を目指したものである。評価対象として着目したのは、後耳介筋反射（post auricular muscle response）である。同部位に電極を装着し、音刺激に対する波形変化を記録解析する方法である。

対象は、健常人ボランティアで、笑気を用いて基礎データを構築している。その後、笑気に加え静

脈内鎮静法（ミダゾラム投与）でも解析を行なっている。

その結果、PAMR 波形の振幅が至適鎮静度と相関しており、精神鎮静法の深度モニタとして有用であることを示唆している。今後、小児患者、高齢者、有病者などの歯科治療時の精神鎮静法の深度モニタとして有効であるかどうか？を含め多くの可能性を持つ研究分野であると判断した。

以上より、本論文は学位論文として評価があると認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請論文を中心に、本研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事項についての口頭試問と筆記試験を行った。

質問事項は次のとおりである。

1. 血中濃度と鎮静レベルに、相関があった方が良かったのではないか。
2. 予備検査において、PAMR 波形を検出する数値の根拠は何か。
3. 至適鎮静レベルの判定は、症状が一つでもあれば良しとしたのか。
4. 検定方法は、よりの確な方法を使用すべき。
5. 一般的な麻酔モニタとは何か。
6. 鎮静用モニタはないのか。
7. チオペンタールやケタミンの使い分けは何か。
8. プロポフォールとミダゾラムの使い分けは何か。
9. ミダゾラムの半減期はどのくらいか。
10. 至適鎮静レベル時の PAMR 波形の変化はどのようであったのか。
11. PAMR を検出する際、電極装着の位置は難しいのか。

以上の項目について明確な回答が得られたことより、本審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な学力と見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏 名	大森由里子
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第9号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	ダウン症候群における歯周疾患発症関連遺伝子の検索
指導教員	(主) 教授 笠原 浩 (副) 教授 宮沢 裕夫 (副) 教授 王 宝禮
論文審査委員	主査 教授 平岡 行博 副査 教授 中田 稔 副査 助教授 柴田 幸永 副査 助教授 小笠原 正

## 学位論文の内容の要旨

**【目的】** ダウン症候群（以下ダウン症とする）は21番染色体トリソミーによる染色体異常で、精神発達遅滞を伴う疾患である。その特徴は特有な身体表現型と共に呼吸器系感染症、慢性肝炎、白血病などの発症頻度が高く、免疫機能低下を示唆する報告が多い事である。口腔内では顎骨、歯牙の形態異常の他、齲蝕と共に若年期から発症・増悪化傾向の歯周疾患が多数報告されている。これらは精神発達遅滞や筋緊張低下などによる口腔内清掃不良に加え、免疫機能低下による感染抵抗性の減弱が一因と考えられる。しかしながら、同程度の知的障害であってもダウン症では歯周疾患の罹患率が高い。一方、歯周疾患の発症要因は、細菌感染をはじめとした多因子性であることから、現在これらを特定するには至っていない。そこで本研究では、免疫応答の一連の情報伝達経路に関わる Interleukin (IL)-1A、IL-1B、Toll-like receptor (TLR)2、TLR4 および細胞接着分子に参与する  $\beta$ 2 インテグリンの各遺伝子について一塩基多型（Single nucleotide polymorphisms (SNPs)）解析を行い、ダウン症における歯周疾患発症ならびに進行に関わる遺伝的要因を明らかにすることを目的とした。

**【方法】** 被験者は、標準型21番染色体トリソミーと診断されたダウン症患者34名、ダウン症ではない健常者30名を抽出した。健常者で歯周疾患に罹患していない者以外は、松本歯科大学（以下本学とする）病院に外来受診或いは施設出張診療で治療管理されている者とした。本学倫理委員会の指針に従い、被験者からインフォームドコンセントを得た後、診査と細胞の採取を行った。歯周疾患の評価基準は World Health Organization (WHO) に定められた指数 Community Periodontal Index (CPI) を用い、出血 (BOP) (+)、歯周ポケット (PD) 4 mm 以上を歯周疾患罹患グループとし、BOP(-)、PD 4 mm 未満を歯周疾患でない“コントロール”グループとした。歯ブラシを使用して採取した被験者の舌上皮剥離細胞からゲノム DNA を抽出し、それを鋳型として polymerase chain reaction and restriction length fragment analysis (PCR-RFLP) 解析を行った。

【結果】 各候補遺伝子の SNPs 発現率は、IL-1A ではダウン症のコントロールで 1 例 (8.33%)、歯周疾患で 3 例 (13.64%)、健常者のコントロールで 2 例 (20.00%)、歯周疾患で 3 例 (15.00%) の変異を確認した。IL-1B ではダウン症のコントロール、歯周疾患ともに 0 例、健常者でコントロールのみに 1 例の変異を確認した。TLR2、TLR4 及び  $\beta$ 2 インテグリンでは、全てにおいて変異は確認されなかった。

【考察】 今回の結果からは、ダウン症患者の歯周病発症における IL-1A、IL-1B、TLR4、TLR2、および  $\beta$ 2 インテグリンの遺伝子については、相関性の可能性は低いものと考えられた。今後はこれら以外の歯周病発症に関連すると思われる他の遺伝子について、本症候群患者の歯周病易罹患性が本症候群特有の染色体異常や免疫異常に関連した遺伝子との関わりを含めて引き続き検討、解析していく予定である。

## 学位論文審査の結果の要旨

本論文の一部は、“Analysis of mutations of inflammatory cytokine and Toll-like receptor genes in periodontitis in Down syndrome patients” というタイトルで、2007年発行の「Pediatric Dental Journal」誌第 17 巻 1 - 8 に掲載されている。

本研究は、ダウン症患者にしばしば見られる歯周疾患の多発や急速な進行が、本症特有の免疫機能異常と関連しているとの仮説の下に、炎症、自然免疫関連因子 IL-1A、IL-1B、トール様受容体 (Toll-like Receptor : TLR) 2、TLR4 および細胞接着因子  $\beta$ 2 インテグリンの各遺伝子について、SNPs 解析を行い検討した。

被験対象者は日本人で、何れも本学病院特殊診療科と歯周病科で治療管理されている者であり、齲蝕と歯周疾患以外の疾患に罹患し加療中で遺伝子に影響を与えらるる者は除外している。また、本研究は、松本歯科大学倫理委員会に研究目的及びその概要を提出し、承認を得ている (許可番号 第0012号)。

被験者からの細胞採取は、本学歯科薬理学教室で考案された歯ブラシを用いる簡便法である。これを本研究においても用いた結果、重度の知的障害を伴い、意思疎通が困難と思われる被験者に対しても不安・痛みを与えず、抽出に十分な細胞を採取することが可能であることを実証できた。歯学・医学領域の研究で、人を材料とした実験がますます困難になる傾向の中、この報告は貴重である。

ダウン症における歯周疾患発症ならびに進行に関わる遺伝子の選定は、研究目的に鑑みて妥当である。また、PCR-RFLP 法による解析で、各遺伝子の増幅に用いたプライマーはオリジナルに設定した物であり、後続研究に大きな示唆を与え得ると高く評価できる。

当初の目的である、ダウン症患者における歯周疾患発症・進行に関わる遺伝子の SNPs を明らかにすることは出来なかったものの、IL-1A 遺伝子のプロモーター領域に存在する SNPs が、他の標的遺

伝子に対して比較的頻繁に発生することを示唆する結果を得ている。申請者は、当該領域が血清応答因子と結合できることを指摘し、この SNPs が細胞の形質転換の制御に関わる可能性を示唆した。この知見は、IL-1 $\alpha$  の新規な機能の発見を導き得ると評価できる。

本研究は、症例数の限られた中で貴重な成果を得、先駆的な研究で当該分野における貢献度が大きいと評価できる。さらに、本研究は、現在臨床で行われている一般的診査項目の限界を見定め、簡便な遺伝子検査による将来の病態予測が障害を持つ人の健康管理にこそ用いられるべきであると主張している。この点は、申請者が属する口腔健康政策学講座の存在意義を確認しつつ、当該分野における研究の方向性を示唆するものと、高く評価したい。

本申請者は、多岐にわたる臨床上、また基礎歯科医学上の知識を習得しており、博士課程修了者として十分な知識と技能を修得していると判断された。以上の所見により、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「ダウン症候群における歯周疾患発症関連遺伝子の検索」を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄について、口頭質問による試験を行った。

質問事項は、次のとおりである。

1. ダウン症の歯周疾患の重篤度と年齢の分布について解説せよ。
2. 目的変数である歯周疾患の病態を PD 4 mm と BOP の有無で区分した根拠は何か。それは、ダウン症の歯周疾患の特徴を表現できうるか、また、年齢、重篤度、喪失歯などは考慮して行われたか。
3. 標的遺伝子を IL-1A、IL-1B、TLR2、TLR4、 $\beta$ 2 インテグリンに絞った理由は何か。
4. データの統計処理は適切と考えているか。
5. 転座型、モザイク型を考慮に入れると、どのような結果が予測されるか。研究の着眼点は、ダウン症に多数の病型があることか。
6. 変異が認められた被験者で、さらに臨床的所見が得られないか。
7. 今回の研究で最も困難な事はどのような事であったか。
8. 本研究は、今後どのように展開されるのか。
9. この研究で得られたことは何か。

以上の質問が出されたが、申請者は論文の内容およびそれに関連する歯科医学上の諸問題に対する確に回答した。

本審査会委員合議の結果、申請者は博士（歯学）として十分な学力および知識を有する者と認め、全員一致して最終試験を合格と判定した。

氏名	落合 隆永
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第10号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	歯肉上皮の異型変化によるサイトケラチンの異常発現
指導教員	(主) 教授 長谷川博雅 (副) 教授 藤村 節夫 (副) 教授 川上 敏行
論文審査委員	主査 教授 古澤 清文 副査 教授 藤村 節夫 副査 教授 太田 紀雄 副査 助教授 上松 隆司

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景と目的】

口腔粘膜の前癌病変の病理診断には非常に苦慮する症例が多く、いまだに客観的な診断基準が確立されていない。上皮組織に存在する cytokeratin（以下 CK）は、機能的および形態的な分化により局在する組織の種類が異なることが知られる。口腔上皮の悪性化により CK 発現に変化が起こることは知られるが、口腔上皮の部位特異性を考慮した報告は少なく、歯肉に限定した悪性化と CK の関連に言及した報告はない。そこで本研究では、歯肉上皮の悪性化を客観的に診断するために、歯肉上皮と異型上皮の CK 発現を免疫組織学的に検討した。

### 【材料・方法】

対照群は、成人性歯周炎の初期治療後に歯周外科処置によって採取された歯肉で、明らかな異型を欠き、炎症の軽微な外縁上皮（80例）を選択した。異型上皮群（22例）は、軽度上皮異形成症を軽度異型上皮（14例）とし、中等度上皮異形成症、重度上皮異形成症および上皮内癌を重度異型上皮（8例）と分類した。対照群はティッシュアレイヤーにて2～3mm大の組織片を採取し、組織アレーを作成後に薄切した。異型上皮群は検体毎に薄切切片を作成した。通法に従い、各種 CK を1次抗体に用いる免疫染色を行った。

### 【結果と考察】

対照群で CK4、CK7、CK8、CK18 および CK20 は全例で陰性であった。CK5 と CK14 は全例で上皮の全層に陽性所見を認めた。CK16 は、全例で傍基底細胞から表層にかけて発現していた。CK1 は、94%の症例で陽性を示し、傍基底細胞から表層細胞まで発現していた。CK10 は、41%の症例陽性であり有棘細胞から角化細胞で発現していたが、斑状の陽性部位や部分的な全層性の陰性部位が混在していた。CK15 は、15%の症例で基底細胞に限局して発現がみられた。CK13 は、21%の症例で

傍基底細胞から表層細胞に発現していた。CK17は、45%の症例で上皮の中層に弱い発現が認められた。CK19は、38%の症例で基底細胞に限局して発現していた。

異型上皮群でCK7、CK18およびCK20は全例陰性であった。CK5とCK14は、全例で全層が陽性を示した。CK16は、95%の症例で、傍基底細胞から表層細胞で発現した。CK1は全例に陽性を示し、中層細胞から角化細胞まで陽性であった。しかしCK1の67%の症例で、傍基底細胞から表層細胞に発現しない細胞が多数みられた。CK10は77%の症例で傍基底細胞から表層細胞まで発現していたが、斑状の陽性部位や全層にわたる陰性部位が混在した。CK4は23%の症例で有棘細胞から表層細胞に陽性を認めた。CK13は77%の症例で傍基底細胞から表層細胞に発現した。CK15は55%の症例で基底細胞に限局して陽性反応を認めた。CK17は86%の症例で傍基底層から表層細胞まで発現し、特に角化異常を示す細胞に強い陽性所見を認めた。CK19は45%の症例で基底細胞から表層細胞に発現した。CK8は32%の症例で上皮全層に陽性を認めた。

対照群で傍基底細胞から表層細胞まで発現するCK1は、異型上皮で陰性細胞が散在性にみられた。CK10は、対照群と異型上皮群ともに散在性に陰性細胞がみられ、発現様式に差はみられなかった。通常角化重層上皮に局在するCK1とCK10の歯肉上皮での陰性細胞の存在は角化重層上皮の性格を失った上皮へと脱分化したと考えられる。しかし、炎症などの修復を受けたCK10の発現は変化すると考えられ、対照群で発現していることから脱分化以外にも原因があるものとする。CK4は対照群では発現しないが、異型上皮群では表層細胞に発現した。CK13は多くの対照群で陰性であったが、異型上皮群では傍基底細胞から表層細胞まで発現が増加した。CK17は傍基底細胞から表層細胞で、CK19は基底細胞から表層細胞で異所性発現していた。CK8は対照群で陰性であったが、異型上皮群では上皮全層に発現した。非角化重層上皮や単純上皮に存在するCK4、CK8、CK13、CK17およびCK19の発現は脱分化に伴う異所性発現と考えられた。

#### 【結語】

歯肉ではCK1の発現減少やCK4、CK8、CK13、CK17およびCK19の異所性発現は重層扁平上皮の分化異常の客観的指標となり、形態学的に判定の困難な異型上皮の診断に有用な情報をもたらすことが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究論文は、口腔癌の多くを占める扁平上皮癌の前癌状病変や上皮内癌の診断に関わる臨床病理学的研究である。扁平上皮癌は、デノボ癌と多段階発癌経路から発生するものがあり、後者の治療にとって、前癌病変や上皮内癌の診断は極めて重要である。しかし、これらの病変の診断基準は必ずしも明確でなく、治療に難渋することが少なくない。本研究はこのような外科病理学的な問題を背景とし、診断基準の確立を企図したものであり、その目的は明確かつ適切である。

本研究は、上皮の代表的な中間径フィラメントであるサイトケラチン（CK）に着目し、14種類の抗CKモノクローナル抗体を用いて発現を検索した。CKは部位特異性があることが知られていることから、研究対象を歯肉に限定した。すでに、悪性転化とサイトケラチン発現の関連を検討した研究は散見するが、歯肉の特異性を考慮して検討されたものは少ない。また本研究のように多種のCK発

現をパラフィン切片上で網羅的に検索した報告は、臨床上有益な情報を提供するものと評価できる。

本研究において、角化重層扁平上皮に本来発現すべき CK1 や CK10 の発現減少がみられ、本来、単純上皮や非角化重層扁平上皮に発現し、角化重層扁平上皮である歯肉上皮には本来発現しない CK 4、CK8、CK13、CK17、CK19 などが異所性に発現していた。これらは異型変化にともなう脱分化や形質の転換と考えられたが、CK10 に関しては異型のない対照群でも発現が減弱しており、炎症性変化も否定できなかった。これらのことから、CK1 の発現減少や CK4、CK8、CK13、CK17 および CK19 の異所性発現は重層扁平上皮の分化異常の客観的指標となり、口腔癌および前癌病変の診断・治療に有用な知見を提供するものと考えられる。また、本研究は、CK 発現異常の分子レベルでの解明など今後の発展も期待できる。

以上の結果、本論文は学位論文に値すると判定した。

## 最終試験の結果の要旨

本研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄について、申請者に対して口頭試問を行った。質問事項は、次の通りである。

1. 付着上皮、歯肉溝上皮、外縁上皮でのサイトケラチン発現の違いと悪性化との関連はあるか。
2. 上皮組織でのサイトケラチン発現様式はどのようなものか。
3. サイトケラチンとはどのようなものか。
4. サイトケラチンはどのような働きがあるか。
5. 組織内でのサイトケラチンの局在は。
6. WHO 基準とサイトケラチンの染色性に相関性はあるか。

本申請者は以上の質問に的確に回答するとともに、論文の内容およびそれに関連する諸問題に対しても明確に返答した。

以上より、申請者は博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、全員一致して最終試験を合格と判定した。

氏名	小野 裕輔
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第11号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	口腔乾燥症に対する漢方薬の効果—臨床評価と漢方薬の作用に関する検討—
指導教員	(主) 教授 古澤 清文 (副) 教授 金銅 英二 (副) 助教授 上松 隆司
論文審査委員	主査 教授 長谷川博雅 副査 教授 宮沢 裕夫 副査 教授 王 宝禮 副査 教授 澁谷 徹

## 学位論文の内容の要旨

### 【研究の背景と目的】

口腔乾燥症は、唾液腺の機能低下、自己免疫疾患、薬物投与など様々な要因で発症する疾患で、高齢化社会を迎えた今日、増加傾向にある。本症は、唾液分泌量の低下に加え、飲水切望感、口腔灼熱感、舌痛などの随伴症状が多岐にわたることから、診断と治療に苦慮することがある。さらに、唾液分泌を選択的に促進する治療薬が少ないことから、口腔乾燥症を克服するためには種々のアプローチが必要となる。近年、東洋医学が様々な疾患に対して用いられ、口腔乾燥症に対しても漢方薬が応用されつつある。しかし、その有効性について客観的に評価した報告はみられない。そこで、本研究では漢方薬の口腔乾燥症に対する臨床効果を判定するとともに、漢方薬の唾液腺細胞への直接作用について実験的な検討を行った。

### 【研究方法】

- 1) 被験者：2004年1月から2006年5月の2年5か月間に、口腔乾燥を主訴とし本学口腔外科を受診し、インフォームドコンセントを得た164名（男性25名、女性139名、平均年齢65.6歳）を対象とした。
- 2) 診査項目：問診に加え、粘膜保湿度、ガム試験、Saxonテスト、Schirmer試験、蛍光色素試験、血液一般、血液生化学検査、血清免疫学検査（抗Ro/SS-A抗体、抗La/SS-B抗体）、生検病理組織検査（口唇）、唾液腺造影、唾液腺シンチグラフィを行った。シェーグレン症候群（以下Sjsと略す）の診断は、Sjs症候群の改定診断基準を適用した。
- 3) 治療法：唾液腺マッサージ、外用薬としてアズレンスルホン酸ナトリウム、内服薬として塩酸セビメリン、麦門冬湯、加味逍遙散、半夏厚朴湯を用いた。
- 4) 臨床症状の改善度評価：唾液分泌量の評価は、ガム試験またはSaxonテストで行った。治療前後の症状の改善度は、レーティングスケールを用いて数値化した。

- 5) 正常唾液腺における水分泌膜蛋白の局在：正常唾液腺細胞におけるアクアポリン (AQP) の局在を免疫組織学的に検討した。
- 6) 耳下腺由来細胞における AQP mRNA と AQP 蛋白の発現：漢方薬抽出液を含む増殖培地でヒト耳下腺由来 HSY 細胞を72時間培養した後、AQP mRNA 発現を RT-PCR で、AQP 蛋白の発現をウエスタンブロットで検討した。

### 【結果と考察】

#### 1) 臨床症状の改善度：

- (1) Sjs 患者に塩酸セビメリンを投与したところ、自覚症状のうち口腔乾燥感のみ改善がみられた。
- (2) 麦門冬湯は、Sjs, 非 Sjs 患者ともに口腔乾燥感に加え、随伴症状である飲水切望感と口腔内灼熱感の改善がみられ、加味逍遙散、八味地黄丸では、非 Sjs で口腔乾燥感と口腔内灼熱感と舌痛の改善がみられた。

#### 2) 平均唾液増加量：

- (1) Sjs に塩酸セビメリンまたは麦門冬湯を投与したところ、平均唾液増加量に投与前後で有意な差はみられなかった。
- (2) 非 Sjs に麦門冬湯、加味逍遙散を投与したところ、平均唾液増加量はともに増加傾向を示した。

#### 3) 正常唾液腺細胞における水分泌膜蛋白の局在

AQP を免疫組織染色したところ AQP3 は腺房細胞基底側、AQP5 は腺房細胞管腔側と導管上皮細胞に、AQP1、2、4、6-9 は導管上皮細胞の細胞質に染色がみられた。

#### 4) 漢方薬の唾液腺細胞への作用：麦門冬湯、加味逍遙散、桔梗湯、五苓散、八味地黄丸の抽出物を増殖培地に添加して、HSY 細胞を72時間培養したところ AQP3 と AQP5 の mRNA および AQP 蛋白の発現が増加した。

以上の結果から、口腔乾燥症の主たる自覚症状である口腔乾燥感は、塩酸セビメリン、麦門冬湯、加味逍遙散、八味地黄丸の投与によって改善されるが、飲水切望感や口腔内灼熱感などの随伴症状の改善には漢方薬が有効であることが明らかになるとともに、麦門冬湯と加味逍遙散、八味地黄丸の薬理作用には AQP の関与することが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

近年、口腔乾燥症に対して漢方薬が適用されつつあるものの、その有効性について客観的に評価した報告はみられなかった。本論文は、口腔乾燥症患者に対して漢方薬を適用し、その臨床効果を評価するとともに、アクアポリン (AQP) に着目して漢方薬の唾液腺細胞への作用を *in vitro* で検討することを目的としたもので評価できる。

臨床効果判定は、口腔乾燥を主訴として来院し、研究の趣旨を説明してインフォームドコンセントを得た164名を対象としている。診断では、シェーグレン症候群の改定診断基準を適用し、治療では、唾液腺マッサージの他、外用薬としてアズレンスルホン酸ナトリウム、内服薬として塩酸セビメリン

ン、麦門冬湯、加味逍遙散、半夏厚朴湯を用いている。薬剤投与後の症状の評価は、レーティングスケールを用いて数値化し、客観的な薬剤の効果判定をしている。

漢方薬の作用機序についての実験的な検討では、まず正常唾液腺における水分泌膜蛋白の局在を免疫組織学的に検討して、AQP の局在を明らかにした上で、耳下腺由来細胞を用いて AQP mRNA と AQP 蛋白の発現をそれぞれ RT-PCR 法とウエスタンブロット法で検討している。このように、本論文の研究方法は合理的かつ独創的である。

その結果、漢方薬は口腔乾燥感以外の飲水切望感や口腔内灼熱感の改善にも有効であること、さらに *in vitro* で、局在部位の異なる AQP3 と AQP5 の mRNA 発現と蛋白発現が漢方薬抽出物の添加によって増加することを明らかにした。

以上の結果から、「漢方薬は口腔乾燥症の随伴症状の改善に有効であること、唾液量の増加には AQP が関与している可能性が示唆される」という結論は妥当性がある。また、本論文は漢方薬の作用機序として水チャンネルである AQP3 と AQP5 の関与を示唆した初めての研究で、今後の発展性が期待される内容である。

以上の結果、本論文を学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請論文を中心に、本研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事項についての口頭試問を行い明確な回答が得られた。

質問事項は次のとおりである。

- 1) ガム試験の結果は残存歯数によって影響があったか。
- 2) 自然唾液と刺激唾液の違いは何か。
- 3) 口腔乾燥症の定義はどのようになっているか。
- 4) 凍結切片とパラフィン切片を用いて染色している理由は何か。
- 5) HSY 細胞はどのような細胞か。
- 6) 症状改善度の「悪化」の定義は何か。
- 7) AQP の mRNA と蛋白発現に相違があったのは何故か。

以上より、本審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な学力、見識あるいは実験手技を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	金山 隼人
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第12号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	成長期咬合挙上動物における咀嚼運動の解析
指導教員	(主) 教授 森本 俊文 (副) 教授 金銅 英二 (副) 教授 新井 嘉則
論文審査委員	主査 教授 山下秀一郎 副査 教授 加藤 一誠 副査 教授 金銅 英二 副査 教授 倉澤 郁文

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景】

臨床上、患者にとって不適切な咬合高径を設定すると口腔機能に障害をきたすことが知られている。このメカニズムを知る第一段階として、咬合高径を変化させた場合の咀嚼時の顎運動や咀嚼筋活動の変化を明らかにすることが求められる。従来の研究からモルモットの前歯部に咬合挙上装置を装着して、臼歯部に空隙を作ると、数日以内に臼歯が萌出し、高められた咬合高径で臼歯が咬合することが報告されている。また、このような動物で挙上装置を撤去すると、数日以内に装置を装着しなかった対照動物とほぼ同じ咬合高径にまで低下させることも明らかにされている。そこで、本研究では、咬合挙上装置撤去後、咀嚼時の顎運動および咀嚼筋活動の変化を経日的に調べることにより咬合高径の変化に伴う咀嚼運動の変化を明らかにすることを目的とした。

### 【実験方法】

実験には Hartley 系雄性モルモットを用いた。天然歯列の咬合を挙上するために咬合挙上装置を下顎切歯に装着した。この操作によって上下臼歯間で約 3 mm の空隙ができるが、10日後には臼歯の萌出によりこの空隙はなくなり、挙上された咬合状態となる。そこで、マイクロ CT 画像にて上下臼歯が咬合していることを確認したのち、装置を撤去した。咀嚼運動の記録は咬合挙上装置装着前、装置撤去後 1 日目、4 日目、7 日目および 11 日目に行った。対照動物として咬合挙上を施さない同週齢の動物を用い、同様な経日的変化を記録した。動物の下顎骨に脱着式の LED を装着し、頭部を固定した状態で CCD カメラにて前頭面での顎運動を記録した。データの解析は、咀嚼中の最小開口位、最大開口位、開口量および 1 咀嚼サイクル時間（total cycle length 以下、TCL）について行った。咀嚼中の両側咬筋および顎二腹筋の筋電図活動は自由行動下で記録した。上記の実験では 5 時間の絶食の後、自由行動下で 1 時間自由に摂食させた。このようにして記録された筋電図については、咬筋および顎二腹筋の筋活動量と筋活動持続時間を、また、顎運動については TCL を解析した。

## 【結果および考察】

咬合挙上装置撤去直後の咬合高径は咬合挙上前に比べ平均20%増加していた。装置撤去後4日間で咬合高径は急激に低下し、その後暫減したが、11日目には対照群とほぼ同レベルの咬合高径となった。咀嚼運動中の最小開口位は、装置撤去後1日目には対照群に比べ有意に開口位にあった。しかし、最大開口位は、対照群に比べて有意な変化が認められなかった。開口量は、装置撤去後1日目で対照群に比べ有意に減少した。また、TCLは咬合挙上前と比較して有意な変化が認められなかった。咬筋筋活動量は装置撤去後1、7、11日目で有意に増大し、筋活動持続時間は、装置撤去後1日目で有意に増大した。また、顎二腹筋については、その筋活動量は、装置撤去後1日目で有意に増大したが、筋活動持続時間は、咬合挙上前と比較して有意な変化が認められなかった。これらの結果から、天然歯列の咬合高径が挙上されると、咀嚼中の顎運動および咀嚼筋活動が変化すること、および、装置撤去後の咬合高径の低下には咬筋活動の増大が重要な働きをしていることが明らかとなった。

## 学位論文審査の結果の要旨

咬合高径の変更に伴い顎口腔系の受ける影響に関して検討を行うことは、臨床上大変重要な意義を有していると判断される。従来の研究からモルモットの前歯部に咬合挙上装置を装着して、臼歯部に空隙を作ると、数日以内に臼歯が萌出し、高められた咬合高径で臼歯が咬合することが報告されている。本研究では人工物を介して咬合挙上を行うのではなく、このように天然歯列の咬合が挙上された環境を作り、咀嚼時の顎運動および咀嚼筋活動の変化を経日的に調べることにより咬合高径の変化に伴う咀嚼運動の変化を明らかにしたことに独創性を認める。

本研究は、咬合挙上を行った際の顎運動の変化を観察する実験1と、筋活動の変化を観察する実験2から構成されるが、それぞれの実験で被験群7匹、対照群7匹の4週齢モルモットを用いている。いずれも実験環境整備の困難さから判断し、十分な被験数であると判断され、また作製された実験プロトコールには綿密な計画性が認められる。さらに、本研究は松本歯科大学動物実験指針に則っていること、得られたデータに対する分析方法に関しても、明確な記載がなされていると判断される。

本研究結果より、咬合高径を変化させても基本的な顎運動パターンの形成には変化が認められなかったことが判明し、脳幹のパターンジェネレータで形成されているリズムは著しい影響を受けないことは、大変興味深い結果である。一方、咀嚼筋筋活動に関しては、これまでの研究では、咬合挙上を行うと筋活動は減少するとの報告が多かったが、本研究では逆の傾向が認められた。咬筋の筋活動量に関してはこの傾向が顕著であり、著者は咬合挙上に伴う歯の挺出分をすり減らすのにより大きな仕事量が必要であるためと考察している。これはモルモットを被験動物として用いたことによる特有の結果であると判断されるが、筋活動の変化が筋感覚からの情報に基づいているという考察は妥当である。さらに咬合高径がもとに戻った後においても咬筋筋活動量の上昇を認めたこと、咬筋の筋活動の上昇に伴って開口筋である顎二腹筋において活動量の上昇が観察されたことに対して、著者は的確な考察を行っている。

以上のように、本論文では咬筋活動の上昇が適切な咬合高径を維持している機構に重要な役割を持つ可能性があるという大変興味深い結論を導き出した。申請者は博士課程修了者として十分な知識と技能を修得していると判断され、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「成長期咬合挙上動物における咀嚼運動の解析」を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄、研究成果の今後の展開などについて、口頭試問を行い明確な回答が得られた。

質問事項は以下の通りである。

1. 咬合高径を一定に保つための神経生理学的な機序は何か。
2. 3ミリの咬合挙上量は臨床的には非常に大きな値であると考えられるが、この量を設定した理由は何か。
3. 顎二腹筋活動の記録は前腹と後腹のどちらを対象としているのか。
4. 筋電図の処理について、実効値ではなく積分値を用いたのはなぜか。
5. 統計分析を行う際にデータは正規分布していたのか。また、正規分布していないのであれば、グラフ上にエラーバーを付けるのはふさわしくないのではないか。
6. 咬合挙上装置装着から撤去するまでの期間に咬合高径が低下しているのはなぜか。
7. 安定した咀嚼パターンを5秒間ピックアップしているが、咬合高径が変化した場合は、乱れたパターンの発生頻度がこの5秒間以外の部分で実は増えているのではないか。
8. 咬合高径の変化に伴って筋活動が高くなるメカニズムは何か。特に咬筋では装置撤去後7日目以降でも高い筋活動が維持されていることについて、どのように考察するか。
9. 咬合高径の変化に伴って咬筋活動が高くなったが、それに合わせて顎二腹筋の活動もなぜ高くなったのか。
10. 咀嚼中の筋活動の増大と挺出した歯のすり減らしとを結びつけて考察しているが、歯の摩耗は咀嚼中だけでなくそれ以外の時にも起こっているのではないか。
11. 以前の論文では、咬合挙上に伴い咬筋活動が低下するとの報告があるが、本研究では逆に増大した理由として何を考えるか。
12. 咬筋では装置撤去後7日目以降でも高い筋活動が維持されたことについて、歯の萌出力の上昇とどのような関連があるのか。
13. 本研究結果からどのような臨床的示唆が得られるか。

以上より、本審査会は学位申請者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏 名	久野 知子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第13号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	エムドゲイン®ゲルを用いた低侵襲性歯周外科手術の研究
指導教員	(主) 教授 太田 紀雄 (副) 教授 王 宝禮 (副) 教授 平岡 行博 (副) 教授 佐原 紀行 (副) 教授 音琴 淳一 (副) 助教授 深澤加與子
論文審査委員	主査 教授 山下秀一郎 副査 教授 小澤 英浩 副査 教授 長谷川博雅 副査 教授 藤村 節夫

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景】

歯周組織再生療法の GTR 法には、その適応症に限界があるといわれており、1 壁性骨欠損、根分岐部病変 3 度に対して良好な結果が得られていない。また、保護膜による感染の危険性、歯肉線維がセメント質に埋入しない、術式が複雑である、患者への負担や手術侵襲が大きい等の多くの問題点を抱えている。そこで現在 Emdogain®(EMD) が歯周組織再生療法剤として新たな注目を浴びている。一方、ミニマムインターベンションのコンセプトが歯科医療に導入されるようになり、歯周病学の分野でも歯周組織に極力負担をかけない低侵襲性術式の開発が期待されている。しかし、EMD を用いた低侵襲性術式はいまだ確立されていないのが現状である。

### 【実験方法】

本研究では、EMD と剥離および翻転を行わない改良型の ENAP (新付着術) をベースとした低侵襲性外科手術とを組み合わせ、生体への負担を極力抑えた新たな歯周組織再生療法を考案した。そして、この術式による効果を臨床学的 (プロービングデプス、クリニカルアタッチメントレベル、BOP、GI、動揺度、歯槽骨吸収等の改善率、侵襲および疼痛の程度) および生化学的 (アルカリフォスファターゼ: Alp および骨代謝マーカー: オステオカルシン) に評価した。

### 【結果および考察】

この EMD を併用した ENAP においては、臨床パラメーターは術前より改善され、生化学的マーカーにおいても代謝回転が上がることで歯槽骨再生が促進される傾向が見られた。術後疼痛消失時間および手術後の疼痛は早期に消失し、疼痛の程度も他の術式よりも低く、また手術時間も剥離を行わ

ないため短縮された。このことは、従来の歯肉剥離掻爬術式と比較して臨床効果に遜色が無く、侵襲が少ないことを示唆している。

## 学位論文審査の結果の要旨

歯周外科手術では、これまでは複数あるいは広範囲にメスを加えることで、生体に対して長時間にわたる侵襲を加えているのが常であったが、近年、切開創の縮小や疼痛の軽減を目的に、低侵襲性手術法を用いた術式が注目されるようになってきた。さらに歯周組織再生の観点からはEMDの応用が効果的な治療法として多数の臨床例が報告されている。本研究では、低侵襲性手術法とEMDの両者を組み合わせることで、新たな歯周疾患に対する治療法の可否について検討を行っており、この点に関して独創性を認めると同時に明確な方向性が示されていると考えられる。

本研究はヒトを対象とした研究手法を用いている。被験数に関しては、コントロール群を含めた3群それぞれが15例の計45例となっており、実験環境の整備の困難さから判断して、必要十分と判断される。本研究を遂行するにあたり、適切な実験プロトコルが作製され綿密な計画性が認められる。さらに、得られたデータに対する分析方法に関しても、明確な記載がなされていると判断される。

本研究結果より、低侵襲性手術法とEMDの両者を組み合わせた新たな手術法を、従来からの術式を併用したものと比較すると、まず、臨床学的な評価では、クリニカルアタッチメントの獲得量において、歯肉の退縮を引き起こさずにかつ良好な成績が得られ、本術式の有効性が確認された。また、生化学的マーカーにおいても、本術式では代謝回転が上がることで歯槽骨再生が促進される傾向が見られた。術後疼痛消失時間および手術後の疼痛では、他の術式より早期に消失し、疼痛の程度も低く、手術時間も剥離を行わないため短時間であった。このように多くのパラメータにおいて本術式は良好な結果を示しており、新たな治療法としての多くの可能性が得られている。これらの結果に対して、著者は的確な文献的考察を行うことで、本研究データの妥当性について十分な検討を加えている。

以上のように、本論文では低侵襲性手術法とEMDの両者を組み合わせた新たな治療法の可否について大変興味深い結論を導き出した。申請者は博士課程修了者として十分な知識と技能を修得していると判断され、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「エムドゲイン<sup>®</sup>ゲルを用いた低侵襲性歯周外科手術の研究」を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄、研究成果の今後の展開などについて、口頭試問を行い明確な回答が得られた。

質問事項は以下の通りである。

1. GTRに対する適応症は。また行なわれた歴史的背景を述べよ。
2. EMDのアレルギー反応を調べた論文はあるのか。
3. 臨床パラメータは歯周病学的には規定のものとして評価法に使用してもよいのか。
4. 被験歯の条件を記載する必要はないのか。

5. データ分析の統計は適切か。
6. 現在主に用いられている骨形成マーカー、及び骨吸収マーカーにはどのようなものがあるか。
7. 今回の研究で用いた3種類の手術法についてそれぞれの利点・欠点は何か。
8. 新たに提示した手術法を今後の臨床に適用していくべきと考えるか。

以上より、本審査会は学位申請者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	小池 秀行
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第14号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	咬みしめ時の下顎頭変位に対する矢状顆路傾斜角の影響
指導教員	(主) 教授 山下秀一郎 (副) 教授 森本 俊文 (副) 教授 古澤 清文
論文審査委員	主査 教授 加藤 一誠 副査 教授 塩島 勝 副査 教授 増田 裕次 副査 教授 倉澤 郁文

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的および背景】

臼歯部の咬合支持が喪失し、遊離端欠損となったときに顎機能障害の要因となるかについては未だに明らかにされていない。本研究では特に下顎頭の変位と咬合支持状態および顎関節部の解剖学的形態要素との関係に注目し、臼歯部の咬合支持が喪失した状態における咬みしめ時の下顎頭の変位は矢状顆路傾斜角に代表される顎関節の形態的要素の影響を受けるという仮説を立て、これを証明することを目的とした。

### 【方法】

健全歯列を有する19名の被験者に対して上顎歯列に適合するアクリルレジン製スプリントを装着し、両側性に後方より順次これを切除してゆくことによって擬似的な短縮歯列の条件を設定した。下顎頭の変位は6自由度下顎運動測定装置を用いて測定した。それぞれの咬合条件において測定したデータは矢状顆路傾斜角および擬似的な短縮歯列条件における最大咬みしめ時の下顎頭の変位である。

### 【結果】

1. 上下顎天然歯列同士の咬みしめ時の下顎頭の変位方向は後上方から前上方に分布したが、咬合条件の違いによる影響は認められなかった。
2. スプリントを装着し、後方から咬合支持を順次に喪失させてゆくと、咬みしめ時の下顎頭の変位量は大きくなったが、スプリントで擬似的に与えた咬合支持喪失範囲の拡大と共に被験者間のばらつきが増大した。
3. スプリントを装着しない上下顎天然歯列同士の咬みしめ時の下顎頭変位量と、スプリントを装着した状態での擬似的咬合支持喪失条件における咬みしめ時の下顎頭の変位量の差との間には、正の

相関が認められた。

4. 矢状顆路傾斜角とスプリントを装着しない上下顎天然歯列同士の咬みしめ時の下顎頭の変位量、さらに、矢状顆路傾斜角とスプリントで擬似的に与えた咬合支持喪失条件における下顎頭変位量の変化との間にはそれぞれ負の相関が認められた。
5. 咬みしめ時の下顎頭の変位量は矢状顆路傾斜角で代表される関節結節後斜面の形態と関わりのあることが明らかになり、スプリントを装着した擬似的な短縮歯列条件ばかりでなく、装着していない場合にもあてはまることが示唆された。

#### 【結論】

スプリントによる擬似的な咬合支持喪失範囲が拡大すると共に下顎頭変位量は増大し、被験者間のばらつきも大きくなった。また、咬みしめ時の下顎頭の変位量が本研究で定めた矢状顆路傾斜角で代表される関節結節後斜面の形態に関係があることが明らかになった。これは擬似的な短縮歯列条件においてばかりでなく、上下顎天然歯列の場合にもあてはまることが考えられた。

これによって、臼歯部の咬合支持が喪失した状態における咬みしめ時の下顎頭の変位は矢状顆路傾斜角に代表される顎関節の形態的要素の影響を受けるといふ仮説は証明された。しかし、この結果をそのまま遊離端欠損症例にあてはめ、補綴処置の適応についての判定基準とすることはできず、他の顎口腔の諸条件との関連も合わせて考えなくてはならない。

## 学位論文審査の結果の要旨

臼歯部の咬合支持が喪失して、遊離端欠損が生じた場合には欠損部位に対して可及的速やかに適切な補綴処置を行うというこれまでの考え方に対し、補綴治療に伴う歯や歯周組織に対するリスクが大きくなることから遊離端欠損部に取って補綴処置を行わないとする短縮歯列 (Shortened Dental Arch : SDA) の考え方がある。1980年頃から北欧を中心にして提唱されているが、本邦ではこの概念に対して懐疑的であり、遊離端欠損に対する補綴処置の適応症を明確に判断することのできるガイドラインの策定が一刻も早く待たれている。欠損補綴の必要性を論ずる場合に、咬合支持が喪失すると咬合が不安定になることによって最終的には顎関節の機能障害にまで至るのではないかと懸念がその根拠となっている。すなわち、咬合支持が喪失した状態での咬みしめによって下顎頭の変位が生じることがこれまでに明らかにされているが、さらに、顎関節の形態的要素も深く関与していると考えられている。

本研究では、咬合支持条件と下顎頭の変位に関する先行研究に加え、関節結節後斜面の形態的要素が下顎頭の変位量に関係があることを明らかにした。これを説明するにあたり、関節結節後斜面の軟組織の厚みと傾斜角 (本研究における矢状顆路傾斜角) との間傾斜角が急であるほど軟組織の厚みが薄いという関係があるとする形態学的報告 (Pullinger ら、1993) に関連付けて説明しているが、本研究結果から得られた矢状顆路傾斜角が急な場合に下顎頭の変位が小さく、緩いときに変位が大きかったという結果は、上記の報告にも矛盾しないと考えられた。

すなわち、咬みしめ時の顎関節における下顎頭変位という機能的現象を関節結節後斜面の解剖学的形態要素に関連付けて説明できたことは、これまでにない新しい知見であると考えられた。

以上より、本論文は学位論文に相当するものと認める。

## 最終試験結果の要旨

本申請者の学位申請論文「咬みしめ時の下顎頭変位に対する矢状顎路傾斜角の影響」を中心にこの研究に関する基礎知識、論文の内容に関係する事柄、研究成果の今後の展開、歯科医学的知識などについて口頭試問を行った。さらに、課題として下記の質問事項に対する解答をレポートとして提出することを課した。なお、付随する小問（\*）は追加課題である。

### 【質問事項】

- 短縮歯列の定義について説明せよ。
  - \* 短縮歯列を説明するにあたり、ユニットとはどのようなものを意味するか。
  - \* 小臼歯と大臼歯の咬合接触の場合にユニットはどのように計算されるか。
  - \* 1歯対1歯、1歯対2歯、および2歯が小臼歯と大臼歯のときのユニットの計算方法を示せ。
  - \* Käyserらは4ユニットの咬合接触で70%近くの口腔機能が確保されるとしているが、それで良いとする根拠は何か。
  - \* Käyserらの短縮歯列を容認する概念とはどのような概念か。説明せよ。
- 咬みしめの定義について説明せよ。
  - \* 咬みしめの定義に関する文献を示せ。
  - \* 咬みしめとクレンチングの用語に違いがあるか。説明せよ。
- 3秒間の最大咬みしめを指示したとあるが、実際に発揮される力が一定であるということの検証についてどのように考えたか。説明せよ。
  - \* 最大咬みしめを行う位置でのタッピングポイントがばらついていないからといって発揮される力が一定である保証は無いと考えられるか。説明せよ。
- 本研究では6自由度顎運動測定装置を使って下顎頭の変位を測定しているが、この測定法の問題点とそれらにどのように対応したかを述べよ。また、下顎頭の変位を測定する方法に他にどのような方法が他に報告されているか。説明せよ。
  - \* 6自由度顎運動測定装置を用いて下顎頭の変位を測定する場合の問題点として剛体条件と歯周組織のひずみ、およびてこ作用による変位の問題が上げられているが、求めようとしているものに「てこ作用による変位」も含まれるのではないか。説明せよ。
- 左右顎関節における下顎頭の変位の分析を行うとき、両側の平均値を求める方法も考えられるが、右側のみで分析した理由を述べよ。
  - \* 左右に相関があるから右側を選んだとしているが、左右の下顎頭は繋がっている一つの骨であるから相関があるのは当然ではないか。説明せよ。
- 短縮歯列における咬みしめ時の下顎頭の変位には顎顔面形態の影響を考慮する必要があるというFriasの総説(2004)を引用している。具体的にはどのようなことが述べられているのか説明せよ。
- 先行するKozawaら(2003)、桐原ら(2003)の研究をどのように発展させ、どのように独創性を得るに至ったかについて述べよ。

8. 関節結節後斜面の傾斜と切端咬合位のときの矢状顎路傾斜角との関係を具体的に説明せよ。
- \* ) 矢状顎路傾斜角は関節結節後斜面の傾斜角よりも小さくその差は7. 6度であるという報告はどの位置における傾斜角をいっているのか。
9. 本研究の結果から矢状顎路傾斜角の急な被験者が臼歯の咬合支持を失い、短縮歯列となった場合に補綴処置の必要性が小さいと考えてよいか。
10. 本研究で用いた統計手法の Two-factor ANOVA、および Friedman test を選択した理由をそれぞれについて説明せよ。
- \* ) 検定するデータがどういうデータであるのか（正規分布に関して、分散に関して、検定する群の数に関して、要因は何であるか、対応のある要因か、繰り返しの有無に関してなど）、およびなぜ多重比較検定を行う必要があったのかについて説明せよ。

これらの質問に対して本申請者から回答が得られ、その内容を評価した結果、博士（歯学）としての学力および知識を有すると認められた。

以上、本審査委員会の合議の結果、最終試験において合格と判定した。

氏 名	飯島 暁子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第15号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	急性炎症時におけるサイトカインの関与—ラット三叉神経節細胞でのSTAT3の変化—
指導教員	(主) 教授 金銅 英二 (副) 教授 井上 勝博 (副) 助教授 安田 浩一
論文審査委員	主査 助教授 上松 隆司 副査 教授 高橋 直之 副査 教授 王 宝禮 副査 助教授 安田 浩一

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的】

近年、消炎鎮痛を目的とする治療薬の開発が進み、様々な治療法が確立されつつあるものの、薬剤による副作用や宿主の薬剤感受性の違いなど、未だ解決すべき課題は多い。この「痛み」の克服には、疼痛の発生メカニズムを解明することが必須である。

三叉神経節細胞では、IL-6ファミリーの受容体複合体のシグナル伝達に必須とされる gp-130 や Janus kinase (JAK)-tyrosin kinase (Tyk) ファミリーの JAK1、JAK2、Tyk2 が誘導されることから、急性炎症時には、その下流に存在する signal transducer and activator of transcription (STAT)3 経路のシグナル伝達が亢進することが示唆される。しかし、炎症性サイトカインが三叉神経節細胞に与える影響についての詳細な報告はみられない。

本研究では、急性炎症による三叉神経節細胞への影響を明らかにすることを目的とし、炎症性サイトカインの受容体シグナル伝達分子である STAT3 の発現についてラット急性炎症モデルを用いて検討した。

### 【方法】

SD 雄性ラット(6週齢)の右側上口唇にカプサイシン(Cap)を50 µl 注入した。注入後、30分、3時間、1日、3日、7日と経時的に三叉神経節を深麻酔下にて摘出した。免疫組織化学に供する組織は灌流固定後摘出した。蛋白定量(Western blotting)に供する組織は、断頭後速やかに凍結し、その後蛋白の抽出精製をおこなった。免疫組織化学用三叉神経節は、後固定した後シュクロース置換して脱水を行い、粉末状ドライアイスにて凍結、15~20 µm 厚径の切片を作成し免疫組織化学を行った。一方、Western blotting 用組織は、通法にて蛋白の抽出を行った。

## 1. 免疫組織化学染色による STAT3 およびリン酸化 STAT3 の発現細胞の検討

STAT3 抗体 (Cell Signaling 社 #9132) とリン酸化 STAT3 抗体 (Cell Signaling 社 #9134) を用いた。一次抗体反応 (4℃、108–120時間) 後、洗浄しビオチン化した二次抗体 (biotinylated anti-rabbit IgG ; BA-1000、Vector 社) の反応を行った (4℃、48–60時間)。その後、ABC キット (Vector 社) にて反応し DAB (3,3'-diaminobenzidine、同仁化学研究所) にて発色し光学顕微鏡 (OLYMPUS BX51) 下で観察した。

## 2. Western blotting による STAT3 およびリン酸化 STAT3 蛋白の検出

各タイムコースの三叉神経節より調製したサンプルは、吸光度計を用いて蛋白濃度を一定に調整し、アクリルアミドゲル (7.5%) に装填した。次に、電気泳動により展開した蛋白を polyvinylidene fluoride membrane (PVDF 膜) に転写し、STAT3 抗体とリン酸化 STAT3 抗体を用いて免疫反応をおこなった。その後、二次・三次抗体反応さらに発色反応を行い可視化した。明らかになったバンドは全て画像解析装置 (VersaDoc5000, Bio Rad 社) にて数値化した。

### 【結果と考察】

#### 1. 免疫組織化学染色による STAT3 およびリン酸化 STAT3 の発現

- 1) カプサイシン注入後 3 時間のラット三叉神経節の第 1 枝と第 2 枝領域では、神経節細胞の細胞質に、STAT3 が濃染する傾向がみられた。STAT3 が染色された細胞は、主に痛覚伝達に関与するといわれている中型 (直径 30–40 μm) や小型 (直径 30 μm 以下) の神経細胞であった。
- 2) カプサイシン注入後 3 時間のラット神経節細胞では、注入側において 67.3% の神経節細胞が陽性反応を示したが、注入側と対側間、または、カプサイシン注入 (Cap : 急性炎症モデル) 動物群と無処置動物群 (Cont) 間で有意な差は認められなかった。さらに、カプサイシン注入後 30 分、3 時間、1 日、3 日、7 日の経時的変化を検討したところ、STAT3 陽性細胞の割合は、Cont では全神経節細胞に対し約 30% 前後であったのに対し、急性炎症モデル動物群 (30m–7d) では、注入 3 時間 (3h) 後に STAT3 陽性細胞の割合が Cap 注入側で 67.3% まで増加した。その後、STAT3 陽性細胞は Cap 注入側では 60% 台を維持し 7 日 (7d) には 66% となった。対側は 3 時間まで 20–30% とコントロール値に近い割合であったが、1 日で 44.9%、3 日で 63.7%、7 日で 57.5% と上昇した。
- 3) p-STAT3 陽性細胞の割合は、Cont では約 80% あった。カプサイシン注入以降、徐々に低下し 7 日では 69.4% であった。対側は注入 30 分で 64.8% に低下し、その後 60–70% を変動した。

#### 2. Western blotting による STAT3 およびリン酸化 STAT3 蛋白の検出

- 1) 抗 STAT3 抗体または p-抗 STAT3 抗体を用いた Western blotting では、それぞれ 79 kDa または 80 kDa の蛋白バンドが検出された。検出された蛋白バンドの濃度を Cont を 1.0 としてデンストメトリーで比較したところ、カプサイシン注入側三叉神経節の STAT3 蛋白量は、Cont 群と差が認められなかった。これに対し、対側では 30 分後に 0.8 に減少し、3 日、7 日と増加した。
- 2) p-STAT3 蛋白バンドの濃度は、カプサイシン注入側において、30 分で 1.38、3 時間で 1.3 と増加した後、3 日目以降に Cont 値まで減少した。これに対し、対側では 3 日、7 日に再び増加する傾向がみられた。

以上の結果より、急性炎症時の三叉神経節細胞では、STAT3の活性化は、炎症側のみならず対側の神経節細胞にも及ぶこと、さらにSTAT3の発現とリン酸化の経時的変動は、疼痛の誘発のほか、疼痛の抑制や神経修復などに関与する複数の炎症性サイトカインに影響されることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

歯科疾患の多くは炎症性病変であり、急性炎症では激しい疼痛を伴うことが多い。近年、消炎鎮痛を目的とした治療薬の開発が進み、治療法が確立されつつあるものの、薬剤による副作用や宿主の薬剤感受性の違いなど、未だ解決すべき課題は多い。本研究は、このような臨床的背景から、顎口腔領域の「痛み」の克服には、三叉神経を介する疼痛の発生メカニズムを解明することが必須と考え研究が進められている。本研究では、カプサイシンをラット上口唇に注入する急性炎症モデルを用い、三叉神経節細胞におけるIL-6ファミリーの受容体複合体のシグナル伝達過程で関与するsignal transducer and activator of transcription(STAT)3の発現とそのリン酸化を指標として検討されている。この*in vivo* 実験モデル動物から摘出した三叉神経節を用いて免疫組織化学染色とウエスタンブロット法を用いて定性的および定量的評価を行っており、研究手法は妥当であると評価した。

免疫組織化学的検討では、カプサイシン処理3時間後の神経節細胞の細胞質に、STAT3が濃染する傾向がみられ、STAT3が染色された細胞は、主に中型や小型の神経節細胞であることが明らかとなった。一方、リン酸化STAT3では、注入側と対側間、またはカプサイシン処置群と無処置群間で有意な差は認められなかったもののリン酸化したSTAT3が核内移行した状態を形態学的に証明した。さらにカプサイシン注入後のSTAT3の経時的変化を検討したところ、三叉神経節におけるSTAT3陽性細胞の割合は、カプサイシン注入後3時間において対側に比べ約2倍に増加した。3日目には対側も陽性細胞率が上昇し、7日目でも認めた。Western blotting法による検討では、カプサイシン注入後の対側三叉神経節では、STAT3蛋白量が3日、7日目に増加した。一方、リン酸化STAT3蛋白バンドは、カプサイシン注入側において、30分で1.38、3時間で1.30と増加した後、3日目以降に対照値まで減少し、対側では3日、7日に増加傾向がみられた。これらは、急性炎症時の三叉神経節細胞では、STAT3の活性化が炎症側のみならず対側の神経節細胞に及ぶこと、さらにSTAT3の発現とリン酸化の経時的変動には、急性炎症における複数のサイトカインが関与している可能性を示した。

これらの研究成果と文献的考察から、「急性炎症時の三叉神経節細胞では、STAT3の活性化は炎症側のみならず対側の神経節細胞に及ぶこと、さらにSTAT3の発現とリン酸化の経時的変動は、複数の炎症性サイトカインにより影響を受けることが示唆された」とする結論は妥当であると評価した。

以上より、本論文は学位論文として価値があると認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請論文を中心に、本研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事項についての口頭試問と筆記試験を行い明確な回答が得られた。

質問事項は次のとおりである。

- 1) カプサイシンとは何か。
- 2) 神経節細胞の小型細胞や中型細胞の大きさはどれくらいか。
- 3) ブラジキニンなどの疼痛誘発物質との関係はあるか。
- 4) 細胞内の STAT3 が核内に移行する理由は何か。
- 5) カプサイシン受容体によって STAT3 は活性化されるか。

以上より、本審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な学力と知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	佐藤 将洋
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第16号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	New 19-nor-(20S)-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D <sub>3</sub> analogs strongly stimulate osteoclast formation both <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> (新規19-ノル-ビタミン D <sub>3</sub> 誘導体の強力な破骨細胞分化誘導作用の解析)
指導教員	(主) 教授 宇田川信之 (副) 教授 小澤 英浩 (副) 教授 高橋 直之 (副) 教授 平岡 行博 (副) 助教授 小林 泰浩
論文審査委員	主査 教授 平岡 行博 副査 教授 長谷川博雅 副査 教授 川上 敏行 副査 教授 音琴 淳一

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景と目的】

2002年に DeLuca らは、骨形成を強力に誘導する新規ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体 1 $\alpha$ , 25-ジヒドロキシ-2-メチレン-19-ノル-ビタミン D<sub>3</sub> (2MD) を開発した。2MD は、血清 Ca 濃度を上昇させる作用が弱く、骨に対する作用が強力である誘導体として報告されたものである。2MD は、19位のエキソメチレン基が2位に移動し、さらに20位の立体配置が非天然型の S 配置 (20-epi) に置換した構造を有している。19位のエキソメチレン基が取り除かれ、ビタミン D に特徴的な共役トリエン骨格を持たない誘導体を19-ノル-ビタミン D と言う。そこで我々は、2MD の構造を参考にし、さらに強力なビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の開発を目指した。その目的で、19-ノル-ビタミン D で20位を 20-epi にし、さらに2位を修飾させた誘導体 (2MD 誘導体) 4 種類と、2MD 誘導体の2位の立体配置を天然型に置換した誘導体 (2MD 誘導体20位天然型) 4 種類、および更にこれらの誘導体に対応して22位炭素を酸素原子に置換した誘導体 (2MD-22-oxa 誘導体) 4 種類、計12種類の新規誘導体を合成し、破骨細胞分化に対する効果を検討した。

### 【材料と方法】

破骨細胞分化の評価は、マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いて行った。マウス骨芽細胞における RANKL、OPG、M-CSF、24-水酸化酵素 mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した。象牙質切片上で共存培養を行い各種ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体による吸収窩形成活性を検討した。また各種ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体を、RANKL のデコイ受容体である OPG の遺伝子欠損マウスに投与し、血清中の Ca と RANKL 濃度を測定し、骨、胸腺、脾臓での RANKL mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した。

また、大理石骨病を呈する c-fos 欠損マウスと正常マウス (C57BL/6J) に活性型ビタミン D<sub>3</sub> と各種ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体を投与し、脛骨における破骨細胞に関する組織学的解析と、血清中の Ca と RANKL 濃度を測定した。

#### 【結果】

(1) *in vitro* において、2MD 誘導体は活性型ビタミン D<sub>3</sub> と比較して約100倍の破骨細胞誘導活性を示した。さらに、骨芽細胞における24-水酸化酵素と RANKL mRNA 発現誘導作用を有する事が明らかとなった。(2) 2MD-20位天然型誘導体と 2MD-22-oxa 誘導体の破骨細胞形成活性は、2MD 誘導体より有意に低かった。(3) 2MD 誘導体の象牙質の吸収窩形成活性は、活性型ビタミン D<sub>3</sub> と比較して強力であった。(4) 2MD 誘導体のビタミン D 受容体 (VDR) 結合能および転写活性は、上記の破骨細胞形成活性ならびに吸収窩形成促進活性と相関性が認められなかった。(5) OPG 欠損マウスへの 2MD 誘導体投与では破骨細胞が多数形成され、活性型ビタミン D<sub>3</sub> 投与と比較して血清 Ca と可溶性 RANKL 濃度が有意に上昇した。(6) c-fos 欠損マウスへの 2MD 誘導体投与では、破骨細胞を全く誘導せず、血清 Ca 濃度も上昇しなかった。

#### 【考察と結論】

1. 我々が新規に合成した 2MD の 2 位の構造を変化させた新規ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体は、*in vivo* と *in vitro* において強力な破骨細胞分化促進活性を有することが明らかとなった。
2. ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体投与により上昇した血清 Ca 濃度は、破骨細胞による骨吸収を介する可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、骨形成を強力に促進する新規ビタミン D<sub>3</sub> 誘導体の開発を目指して、ビタミン D<sub>3</sub> の構造変化の破骨細胞への影響を明らかにすることを目的として行われた。ビタミン D の 19 位の二重結合を取り除き (19-ノル-ビタミン D)、20 位の立体配置を非天然型の S 配置にした 2MD 誘導体は、破骨細胞の形成を強く促進し、また吸収窩形成活性が上昇する事が明らかとなった。さらに 22 位炭素を酸素に置換 (2MD-22-oxa 誘導体) すると、破骨細胞形成活性が抑制され、吸収窩形成活性が低下する事が明らかとなった。骨芽細胞へのこれらの誘導体の作用を調べると、2MD 誘導体は RANKL と 24-水酸化酵素 mRNA を強く誘導した。一方、2MD-22-oxa 誘導体は、これらの発現促進作用は認められなかった。

OPG 欠損マウスへの 2MD 誘導体投与により、血清 Ca と RANKL 濃度は上昇し、脛骨において多数破骨細胞を誘導した。また、このときの骨組織で RANKL mRNA を誘導するものの、胸腺、脾臓では発現誘導しなかった。破骨細胞が全く存在しない c-fos 欠損マウスへ投与実験では、血清中の RANKL は上昇するものの、血清 Ca 濃度は変化が認められなかった。このとき脛骨では、全く破骨細胞が形成されなかった。これらの結果により、ビタミン D 投与により上昇した血清 Ca 濃度は、破骨細胞による骨吸収を介する可能性が示された。

以上のように本論文は、ビタミン D の構造と破骨細胞形成への影響を明らかとし、ビタミン D 投与

により上昇した血清 Ca 濃度は破骨細胞による骨吸収に起因する可能性を示した事は、学術的に高く評価できる。

当初の目的である 2MD よりも更に活性の強いビタミンD誘導体の検出には至らなかったが、2MD 誘導体は破骨細胞形成に強い促進活性を有し、結果的に血清 Ca 濃度を上昇させる作用が強いことも明らかにした。

この結果は、DeLuca らが示した 2MD の一方的な骨形成促進作用に疑問を呈したものである。つまり、骨代謝における骨形成と骨吸収は常に共役しており、血清 Ca 濃度を上昇させる主要因は破骨細胞による骨吸収である、という近年の有力な学説を本論文が支持したものである。この成果は、当該分野において非常に高い貢献をしたと評価できる。

本申請者は、本研究に用いた生化学、細胞生物学、分子生物学、骨形態学までの多岐にわたる実験方法を習得しており、博士課程修了者として十分な知識と技能を修得していると判断された。以上の所見により、本論文は学位論文に値するものと認める。

なお、本論文は、“New 19-nor-(20S)-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogs strongly stimulate osteoclast formation both *in vivo* and *in vitro*” というタイトルで、2007年発行予定の「BONE」誌第40巻第1号に掲載予定である。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文 “New 19-nor-(20S)-1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> analogs strongly stimulate osteoclast formation both *in vivo* and *in vitro*” を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄について、口頭質問による試験を行った。

質問事項は、次のとおりである。

1. ビタミンDの小腸への作用に関与しているカルペンディンの発現部位と機能について説明せよ。
2. ビタミンDの投与の際にプロピレングリコールを使用している理由は何か。
3. 骨芽細胞における M-CSF 発現をビタミンDが促進する意義は何か。
4. ビタミンD受容体結合能と破骨細胞誘導活性は相関するのか。
5. 何故ビタミンDの20位と22位の構造を変換させたのか。
6. 2MD および今回用いた関連誘導体の臨床応用における利点は何か。
7. ビタミンD活性の強力な合成体が薬剤として果たして有用なのか。
8. 本研究で用いた破骨細胞によるピットアッセイで使用した象牙切片の作製方法について説明せよ。
9. 参考論文（2編）について、内容を説明せよ。
10. 学位論文の共著者が果たしたそれぞれの役割および筆頭著者のエフォートについて説明せよ。

以上の質問が出されたが、本申請者は論文の内容およびそれに関連する歯科医学上の諸問題に対し的確に回答した。

本審査会委員合議の結果、申請者は博士（歯学）として十分な学力および知識を有する者と認め、全員一致して最終試験を合格と判定した。

氏名	清水 貴子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第17号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Participation of Runx2 in Mandibular Condylar Cartilage Development (下顎頭軟骨発生における Runx2 の関与)
指導教員	(主) 教授 川上 敏行 (副) 教授 長谷川博雅 (副) 教授 佐原 紀行
論文審査委員	主査 教授 高橋 直之 副査 教授 長谷川博雅 副査 教授 佐原 紀行 副査 教授 中村 浩彰

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景と目的】

一次軟骨である関節軟骨と異なり、遅れて分化する二次軟骨としての下顎頭軟骨は、細胞外基質成分が相違すること、および形態形成の制御機構が異なることなど、骨の特徴を強く有していることを、本大学院生が所属する研究グループは報告してきた。本研究は、骨の発生に必要な転写因子 Runx2 に着目し、発生時における下顎頭軟骨での Runx2 発現状態を、タンパク質および mRNA レベルにて追究した。

### 【材料と方法】

胎生14日齢 (E14) から出生直後までの ddY マウスを、通法により固定した。下顎頭軟骨の中央部分で、厚さ 4  $\mu$ m の矢状断連続切片を作製し、toluidine blue 染色 (TB)、免疫組織化学 (immunohistochemistry, IHC) および遺伝子組織化学 (*in situ* hybridization, ISH) 的手法を用い検索した。IHC は、一次抗体として anti-rabbit Runx2 monoclonal antibody : PEB2  $\alpha$  A-m-70 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) を用い、Dako Envision™ Kit により行なった。ISH には、0.82 kb の DIG 標識 RNA プローブを用いた。ハイブリダイズ後、DIG 抗体を用いて NBT により発色させた。

### 【結果】

下顎頭軟骨の初期発生は、E14 において下顎骨体遠心上部に未分化間葉細胞の凝集および増殖細胞塊として認められた。しかし、TB による異染性は示さなかった。E15 では、明瞭な TB 異染性を示し、E16 からは軟骨内骨化が開始していた。同時期に下顎頭軟骨の鞘部分において、軟骨外骨化(直接骨化)が始まっていた。E14 の IHC 検索より、Runx2 ペプチドは凝集した未分化間葉細胞の核および細胞質に観察された。E15 になると、増殖する細胞の核および細胞質に Runx2 ペプチドが強発現

していた。E16～E18の前肥大軟骨細胞層に、Runx2陽性産物が観察された。E17以降、Runx2ペプチドは、下顎頭軟骨の鞘部分に存在する細胞に出現した。E14～E15におけるISH検索より、Runx2シグナルは、凝集間葉細胞あるいは増殖する軟骨細胞の細胞質に認められた。E16～E18において、全ての細胞層の細胞にRunx2 mRNAは発現していた。

#### 【考察と結論】

以上のTB、IHCおよびISHの結果から、Runx2は下顎頭軟骨の発生、とくに二次軟骨の初期分化ならびにその後の分化発育に、以下のような役割を果たしていることが示唆された。①E14に発現するRunx2は、未分化間葉細胞の軟骨細胞への初期分化を調節する。②E17の下顎頭軟骨の鞘部分に存在する細胞に発現するRunx2は、この時期に開始される軟骨外骨化（直接骨化）の開始を司る。③E16～E18の前肥大軟骨細胞層に発現するRunx2は、軟骨内骨化に関与する。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、骨の発生に必須な因子と知られているRunx2に着目し、マウスの下顎頭軟骨発生時のRunx2ペプチドとmRNAの発現を解析し、下顎頭軟骨発生におけるRunx2の役割を明らかにすることを目的に行われた。従来、Runx2ノックアウトマウスを用いた総括的研究や一次軟骨である関節軟骨におけるRunx2の発現は解析されてきたが、二次軟骨である下顎頭軟骨でのRunx2の発現の詳細な解析はなされていない。また、Runx2の発現している細胞を特定できる明確なIHCやISHの顕微鏡写真を示したのもみられない。本研究は、これらの点を鑑みても意義深いものであると評価できる。

本研究では、胎生14日齢（E14）から出生直後までのddYマウスから研究材料を採取し、通法により固定した。下顎頭軟骨の中央部分で厚さ4μmの矢状断連続切片を作製し、TB、IHCおよびISHの手法によって検索している。本研究は、松本歯科大学「動物実験指針」に則っておこなわれていること、また用いた研究手法は合理的であると判断した。

IHCによる解析より、①凝集した細胞の核と細胞質に出現していること（E14）、②下顎頭軟骨の鞘部分にある細胞に出現していること（E17）、③前肥大軟骨細胞層に出現（E16～18）していることが示された。ISHによる解析も、これらのIHCにより得られた所見を支持していた。更に、これらの知見はTBによる組織化学的検討により裏打ちされていた。以上の観察より、①E14において発現するRunx2は、未分化間葉細胞の軟骨細胞への初期分化を調節している、②E17の下顎頭軟骨の鞘部分にある細胞に発現するRunx2は、この時期に開始される軟骨外骨化（直接骨化）の開始を司っている、③E16～E18において前肥大軟骨細胞層に発現するRunx2は、軟骨内骨化の進行に関与している、ことが示唆された。

以上のように本論文では、二次軟骨である下顎頭軟骨の発生過程におけるRunx2の発現状態を検討し、Runx2は下顎頭軟骨細胞への初期分化および同部における軟骨外骨化に関与する、という重要な結論を導き出した。仮説と実験手法は妥当であり、得られた結果は、結論を支持するものであった。また本申請者は、本研究に用いた組織化学的染色法や免疫組織化学的染色法、および遺伝子組織

化学的染色法などの形態学的実験方法を習得しており、博士課程修了者として十分な知識と技能を修得していると判断された。以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認める。

なお、本論文は、“Participation of Runx2 in Mandibular Condylar Cartilage Development” というタイトルで、2006年発行の European Journal of Medical Research 誌11巻に掲載されたものである。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文“Participation of Runx2 in Mandibular Condylar Cartilage Development”を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄および研究成果の今後の展開などについて、口頭試問および一部について筆答による試験を行った。

質問事項は、次のとおりである。

1. 下顎頭軟骨研究の基盤として、下顎全体の発生過程はどのようになっているか。
2. 一次軟骨としての関節軟骨と、二次軟骨としての下顎頭軟骨の相違点はどのようなものか。
3. 下顎の発生に関連して、二次軟骨の定義を明確にせよ。
4. 関節軟骨と下顎頭軟骨の Runx2 の局在は、どのように違うのか。
5. Runx2 ノックアウトマウスにおいて、一次軟骨、二次軟骨を含めて軟骨細胞は同様な所見を呈するのか。
6. どのような目的で、対照として用いた OPN の免疫染色を行ったのか。
7. メッケル軟骨では、Runx2 の出現はどのようになっているのか。
8. 下顎頭軟骨は、II型コラーゲンとともにI型コラーゲンを発現しているのか。
9. 今後の課題として、成熟マウスでの下顎頭軟骨における Runx2 発現も検討すべきではないか。
10. 今後の課題として、二次軟骨のうちで関節形成するものとししないものとの比較を行ってはどうか。

以上の質問や意見が出されたが、本大学院生は最新の文献的知見も踏まえて適切に回答した。本審査会は、この研究を本学大学院硬組織疾患制御再建学講座の学位論文として、歯科とくに基礎歯科医学のみならず、臨床歯科医学とりわけ歯科矯正領域に多くの示唆を与える内容を含んだ意義のある研究であると評価した。また、本大学院生は博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	正村 正仁
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第18号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	マウスガードの歯および歯周組織への効果
指導教員	(主) 教授 宮沢 裕夫 (副) 教授 伊藤 充雄 (副) 助教授 岩崎 浩
論文審査委員	主査 教授 増田 裕次 副査 教授 伊藤 充雄 副査 教授 黒岩 昭弘 副査 助教授 岩崎 浩

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景および目的】

スポーツに起因する外傷は、それ本来の目的とは相反するものであり、予防対策が必要となる。そのため、各種スポーツに適した様々な防具の開発がなされており、顎口腔領域の保護装置としてのマウスガードもその代表的なものの一つである。

マウスガードには優れた顎口腔外傷予防効果があるとされ、コンタクトスポーツを中心とした多くのスポーツで使用する事が推奨されている。しかし、その外傷予防効果についての研究の多くは、単にマウスガード材に衝撃を加えたり、頭蓋骨模型や牛の抜去歯などにマウスガードを装着することにより、その衝撃吸収能についての検討を行ったものであり、実際の生体への衝撃を想定し、歯根膜、歯槽骨、歯肉といった歯周組織が存在する条件でなされたものではない。当然、歯周組織に対してのマウスガード効果も、現在まで明らかとはなっていない。そこで、本研究では実際の生体に近い状態で歯周組織が保存されている牛下顎骨体に対し、衝撃試験を行い、マウスガードの有無、マウスガードの厚みの違い、およびマウスガード材の違いが、歯と歯周組織に対して及ぼす効果についての検討を行った。

### 【実験方法】

実験には生体に近い状態で歯周組織が保存されている牛下顎骨体を用いた。マウスガードは1) 厚みの異なる4種類(1~4mm)、2) マウスガード材の異なる4種類を作製した。振り子式の衝撃試験機を用いて、一定の衝撃を歯に加えるようにした。歯(唇側と舌側)および歯槽骨にSTRAIN GAGEを設置し、衝撃時に生じるひずみを記録した。マウスガードの有無、マウスガードの厚みの違い、およびマウスガード材の違いによる生じるひずみの大きさを検討した。また、試験を行った際に生じた衝撃力を衝撃試験機の鉄球部に付与した超小型定容量加速度変換器で記録した。

### 【実験結果および考察】

実験の結果以下のような結果が得られた。

1. マウスガード装着時は非装着時に比べて、歯に加わる衝撃力と同部に生ずるひずみの値が有意に減少した。
2. 同様に、マウスガード装着時においては非装着時に比べて、歯周組織である歯槽骨部に生ずるひずみの値も有意に減少した。
3. 1 mm のマウスガード装着時に比べて、4 mm のマウスガード装着時では、歯に加わる衝撃力と同部に生ずるひずみの値が有意に減少した。
4. 同様に、1 mm のマウスガード装着時に比べて、4 mm のマウスガード装着時では、歯周組織である歯槽骨部（舌側）に生ずるひずみの値も有意に減少した。
5. マウスガード材の違いにより、歯に加わる衝撃力と同部に生ずるひずみの値に有意差が生じることはなかった。
6. マウスガード材の違いにより、歯周組織である歯槽骨部に生ずるひずみの値に有意差が生じることはなかった。

これらの結果から、マウスガードは、歯および歯槽骨部に加わる衝撃力に対して、それらのひずみと衝撃加速度を減少させ、歯および歯周組織に対して保護的に働くことが示唆された。加えて、マウスガードの厚みが増すにつれて、歯と歯周組織に対する衝撃吸収効果も増大することが確認された。また、マウスガードの歯と歯周組織に対する衝撃吸収効果には、使用したマウスガード材の違いによる明らかな差は生じないことが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

スポーツ時にマウスガードを着用することは、顎口腔の外傷予防に効果があると考えられている。本研究は歯に加えられた衝撃に対するマウスガードの効果が、歯のみならず歯周組織にまで、どのように及んでいるかを調べることを第一の目的とし、さらに、その効果がマウスガードの厚みやマウスガード材の違いによりどのように変化するかを調べることを第二の目的としている。過去の研究では、歯周組織に対するマウスガードの保護作用については調べられていないことを考えると、本研究の目的としては妥当なものと考えられる。

被検体として実際の生体に近い状態で歯周組織が保存されている牛下顎骨体を用いている点および衝撃試験機に振り子式のものをを用いて一定の衝撃を繰り返し与えている点は、本研究の目的に合った実験方法として価値があると考えられる。

本研究の結果から、衝撃試験によって生じる歯および歯周組織のひずみは、マウスガードによって減少することができること、さらにマウスガードの厚みによってそれらが影響を受けることを明らかとしており、顎口腔の外傷予防にマウスガードが有効であることを実験的に示したものである。スポーツ時のマウスガード装着を推進する上でも重要な知見が得られたと考えられる。

本論文はマウスガードの実験的研究の発展性を含めて学位論文に十分に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「マウスガードの歯および歯周組織への効果」を中心に、本研究に関する基礎知識、論文内容および研究の今後の発展などについて、口頭試問による試験を行った。

以下の質問を行い明確な解答が得られた。

1. 歯と歯槽骨に生じるひずみに対するマウスガードの影響の違いはあるのか？さらに相違があるなら、そのメカニズムをどのように考えるか？
2. 同様に唇側（衝撃が加わった側）と舌側に生じるひずみに対するマウスガードの影響の違いはあるのか？さらに相違があるなら、そのメカニズムをどのように考えるか？
3. マウスガードの装着・非装着ならびに厚さの違いなどが、運動能力にどのような影響を与えるか？
4. 本研究の衝撃試験機で加えた衝撃の大きさは具体的にはどの程度の衝撃になるのか？
5. 本研究での被検体の包埋することの利点と問題点はどのようなものか？
6. 論文で使用した専門用語の定義は適しているのか？
7. 本研究で用いた統計処理は妥当かどうか？
8. 本研究の今後の発展性はどうか？

以上より、本審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格とした。

氏名	富田 真貴
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第19号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	NK1 receptor activation by geniohyoid primary afferents modulates parasympathetic postganglionic neuronal excitability in the rat (オトガイ舌骨筋一次求心線維の入力による副交感神経節後ニューロンのNK1受容体活性化)
指導教員	(主) 助教授 安田 浩一 (副) 教授 古澤 清文 (副) 教授 金銅 英二
論文審査委員	主査 教授 森本 俊文 副査 教授 金銅 英二 副査 教授 井上 勝博 副査 教授 長谷川博雅

## 学位論文の内容の要旨

### 背景

当研究室ではこれまでに、ラットのオトガイ舌骨筋は舌下神経本幹を末梢軸索経路とする体性運動神経と、頸神経ワナを経由する副交感神経によって二重の遠心性支配を受けることを明らかにするとともに、この副交感神経系が舌骨の位置調節に関与していることを示した(Exp. Brain Res. 2003)。

オトガイ舌骨筋に分布する一次求心線維については、その末梢軸索経路は頸神経ワナと報告されているが、中枢投射部位や機能特性については不明である。そこで、本研究では電気生理学的及び形態学的手法を用いて検討した。

### 実験方法

実験には10週齢のWistar系ラット(224±16g)を38匹用いた。

- 1) 電気生理学検討 (*in vivo*): オトガイ舌骨筋に分布する神経枝からの求心性神経放電を、頸神経ワナあるいは舌下神経本幹の末梢側切断端から導出し、神経放電パターンの解析を行った。
- 2) Horseradish peroxidase (HRP) 神経標識法による検討: 頸神経ワナあるいは舌下神経本幹の切断と HRP 神経標識法を組み合わせることによって、オトガイ舌骨筋一次求心線維の中枢投射部位と細胞体の局在について検討した。なお、HRP は tetramethylbenzidine (TMB) を用いて可視化した。
- 3) 免疫組織化学染色による検討: 副交感神経節後ニューロン局在部位を中心に神経幹を一塊として摘出し、Zamboni 液で固定後、連続切片を作製した。一次抗体としてサブスタンス P (SP) 抗体(一次求心線維標識用)と Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) 抗体(副交感神経節後ニューロン標識用)を用いた一連の免疫組織化学染色を行った。

4) 電気生理学検討 (*in vitro*): 副交感神経節後ニューロンからの神経放電の導出し、NK1 受容体の作動薬 (SP) や拮抗薬 (GR82334) の投与による神経放電の変化について検討した。

#### 結果および考察

電気生理学検討 (*in vivo*) によって、オトガイ舌骨筋の一次求心線維は頸神経ワナを経由することが確認された。HRP 神経標識法では、第2 脊髄神経節に HRP 標識細胞が認められたことから、一次求心線維の細胞体の局在が明らかになった。しかし、中枢内に HRP 標識終末は認められず、これは一次求心線維が直接中枢に投射しないことを示していた。

免疫組織化学染色では VIP 陽性を示す副交感神経節後ニューロンの周囲に、オトガイ舌骨筋一次求心線維と考えられる SP 陽性終末が観察された。更に、電気生理学検討 (*in vitro*) では、節後ニューロンの神経放電数は SP の投与によって増加し、GR82334 の前投与によって SP の作用は block された。これらより、オトガイ舌骨筋一次求心線維からの感覚情報は、副交感神経節後ニューロンの NK1 受容体を活性化することによって節後ニューロンの活動を興奮性に修飾していると考えられた。

### 学位論文審査の結果の要旨

ラットのオトガイ舌骨筋は、舌下神経本幹を末梢軸索経路とする体性運動神経と、頸神経ワナを経由する副交感神経によって二重の遠心性支配を受ける。また、この副交感神経系は舌骨の位置調節に関与するとされている。申請者は、オトガイ舌骨筋一次求心線維の中枢投射部位や機能特性について明らかにするとともに、その過程で新しい神経系の発見に至っている。

本研究では、電気生理学的手法、神経トレーサー法 (HRP 神経標識法) および免疫組織化学染色法など多岐にわたる実験手法によって結論を導いている。従って、申請者は博士課程において十分な神経学的実験手法を習得していると考えられる。

申請者は、本研究から以下の結果を得ている。

- ① オトガイ舌骨筋の一次求心線維の細胞体は第2 脊髄神経節に局在するが、この一次求心線維は直接中枢に投射せず、同筋に分布する副交感神経節後ニューロンとシナプス接合する。
- ② オトガイ舌骨筋一次求心線維からの入力、副交感神経節後ニューロンの NK1 受容体を活性化する。

これらの結果から、舌骨の位置調節に関わる副交感神経の活動が、一次求心線維からの感覚情報によって修飾されることを明らかにしたものである。

副交感神経節後ニューロンに体性感覚ニューロンが入力するという神経系はこれまで未知であり、本研究は新知見を示したものである。なお、本論文は Brain Research 1112, 106-113, 2006 に掲載されている。

以上のことより、本論文は学位論文に値するものと認める。

### 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「NK1 receptor activation by geniohyoid primary afferents modulates parasympa-

thetic postganglionic neuronal excitability in the rat」について、以下の質問を行い明確な回答が得られた。

1. 副交感神経の活動が、一次求心線維からの感覚情報によって修飾されることの臨床的な意義は？
2. 副交感神経節後ニューロンと一次求心線維とのシナプス接合の観察は、光学顕微鏡所見だけで良いか？
3. 副交感神経節後ニューロンへ一次求心線維が入力していることを、神経トレーサー法と免疫組織化学染色によって間接的に証明しているが、直接証明する方法はないか？
4. この副交感神経と一次求心線維の神経システムは出生後どのくらいの時期に形成されるのか？
5. 節後ニューロンの数は？
6. 節前ニューロンの中枢局在は検討しているか？

以上より、本審査会は、学位請求者が博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	谷本 英之
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第20号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	Further development of a versatile computer-assisted learning program for dental education with an exemplifying application on how to logically arrange and mount periapical and bitewing radiographs （歯科教育における汎用性のあるコンピュータ支援学習プログラムの開発—口内法エックス線写真を整理してマウントする方法を例としたアプリケーション—）
指導教員	（主）教授 新井 嘉則 （副）教授 小澤 英浩 （副）教授 宇田川信之
論文審査委員	主査 教授 塩島 勝 副査 教授 宮沢 裕夫 副査 教授 黒岩 昭弘 副査 教授 金銅 英二

## 学位論文の内容の要旨

### 緒言)

口内法エックス線写真を整理することができる、インタラクティブなコンピュータ支援学習ソフトウェアの開発をした。

### 方法)

マイクロソフト社の Visual Basic<sup>®</sup>.NET プログラミング言語を用いて、オブジェクト指向のあるメニューウィンドウ、作業画面および関数を開発した。関数は一般関数と特定関数に分けて開発した。一般関数は、*Select* 関数、*Shuffle* 関数、*Clock* 関数、*Evaluation* 関数、*Answer* 関数、*Score* 関数、*Question* 関数、*Teacher* 関数、*Conditions* 関数、*Message* 関数、*Color* 関数、*Sound* 関数、*Initialization* 関数、*Help* 関数に分けて開発した。特定関数は、*Rotate* 関数（特定関数1）と *Mount* 関数（特定関数2）に分けて開発した。また、メニューウィンドウ、作業画面およびそれぞれの関数と口内法エックス線写真（以下；フィルム）を加えて、「フィルムをフォルダーにマウントする」という課題を行うプログラム（以下；プログラム）を開発した。

### 結果)

プログラムを開始すると、メニューウィンドウが表れた。そのメニューウィンドウから、それぞれの作業画面を開けることができた。メニューウィンドウでは *Select* 関数によって、5つのセーブデータから1つを選択することができた。メニューウィンドウ内のスタートボタンを押すと、*Mount* 作業画面が表示され、プログラムが開始された。*Shuffle* 関数によって全てのフィルムがランダムに並べ

られ、*Clock* 関数によってタイマーがスタートした。制限時間内に学生はフィルムを1枚ずつ選び、専用フォルダーに置くことができた。*Rotate* 関数（特定関数1）によって、そのイメージを90度ずつ回転および反転することができた。*Mount* 関数（特定関数2）によって全てのフィルムをマウントすれば、*Evaluation* 関数によって仮想上の先生がその結果をチェックすることができた。全てのフィルムを正確にマウントできない場合、あるいは制限時間内にマウントできなければ、コンピュータ上の先生に注意され、先程と同じマウントの状態から2回まで再トライすることができた。もし不正解あるいは時間切れを3回すると、“You lost.”と表示し、プログラムを停止することができた。*Answer* 関数によって、どこを間違えたのか確認することができた。もし全て正解したら、マウントしたフィルムの枚数をポイントとして加算することができた。そのポイントがある域まで達したら、特別な画面を見ることができた。メニュー画面上で *Score* 作業画面を表示することができた。*Score* 関数によって過去の操作日時とスコアは自動で記録できた。

メニュー画面上で設定の作業画面を表示することができた。*Question* 関数および *Teacher* 関数を用いることで、出題のフィルムと先生の写真を新たに追加することができた。*Conditions* 関数、*Message* 関数、*Color* 関数、*Sound* 関数、*Initialization* 関数も同様にそれぞれ設定することができた。*Help* 関数によって、これらの操作方法についてすぐに確認することができた。

#### 考察)

このプログラムは上記の関数を用いることによって、パーソナルコンピュータ上で仮想的に動作することができた。単一ユーザーのみならず、グループでの使用も可能にした。毎回のスタート時にフィルムをランダムに表示させることで、問題の順番を暗記して正解を求めることを不可能にした。フィルムの向きもランダムに表示させることで、学生の知識レベルが真の実力かどうか確認することができるようにした。また、実際に箱の中からフィルムを取り出しているかのような動作をさせることができた。それらのフィルムを正しい方向に直して、特定のフォルダー上にマウントすることで、実際の状況のようにシミュレートできた。制限時間を設けることで、学生のレベルに応じた時間で学習することができるようになった。全フィルムのマウントを終了した後に評価を行った。全問正解できない場合は2回まで再チャレンジさせることで、自分の不正解の部位を確認し学習できるようにした。正解すればポイントや学習した時間などが記録され、そのスコアを見ることで自分の学習過程を知ることができると考えた。それによって、学生に達成感や自信を持たせることが期待できた。さらに出題や先生の画像の追加、各設定変更を短時間で行うことが可能となった。学生がプログラムに飽きてしまっても、これらの設定変更によりレベルを変化させることで、より興味のあるものを作成できると考えた。そして、これらの関数は学生とコンピュータの間でインタラクティブに動作することがわかった。

## 学位論文審査の結果の要旨

本論文は最新の構造化言語のひとつである Visual Basic.NET を使用して、教育用コンピュータソフトウェアを構築する上で必要な一般関数の開発に加えて、歯科教育のテーマに沿った特殊関数を設計制作した。さらに、それらの関数を用いて、ひとつの教育用ソフトウェアとして完成させた。コン

ピュースクリーン上にて、口内法エックス線写真を正しい方向に直して、特定のフォルダー上にマウントすることができた。問題の追加、時間の設定などが容易に変更可能となった。

本論文について、工学的分野からの評価を行うために、2006年11月10日に名古屋大学大学院情報科学研究科メディア科学専攻知能メディア工学講座にて、口頭発表および口頭試問が行われた。その結果、本論文は情報工学の分野から独創的な関数を開発し、それらを応用して実際に歯科教育ソフトウェアの開発に成功した点が高く評価された。従って、申請者は博士課程において十分な構造化プログラミング言語を習得していると考えられた。

このソフトウェアの評価に関しては、現在スウェーデンのイエテボリ大学で歯科学学生34人を対象に比較検討している。彼らに簡単なアンケートに答えてもらい、その結果を公表する予定で、その結果が期待されている。

なお、論文は Oral Radiology (2006) に印刷中である。

以上のことより、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「Further development of a versatile computer-assisted learning program for dental education with an exemplifying application on how to logically arrange and mount periapical and bitewing radiographs」について、以下の質問を行い明確な回答が得られた。

1. 論文の表題の英文と和文に相違が見られます。なぜですか。
2. 参考論文に「s/he」とありますが、どういう意味ですか。
3. 本論文のソフトは学生とコンピュータの間でインタラクティブではないと思います。実際に学生に使用した時点で上記の評価になるとは思いますがいかがですか。
4. 本論文のソフトは、参考論文のソフトと比較して、何が大きく変わったのですか。
5. 回転の関数について、論文上では長々と書いてあります。動作を言葉で表現するためにこのように書いたのですか。
6. 論文に Conclusion がありません。つまり結果、評価がありません。それらはどのように考えていますか。
7. 開発研究に価値を見出してくれる専門分野の先生、つまり工学部の先生を審査員として一言入れていただくように最終発表会のときに提案しました。実際に専門の方に論文を審査していただきましたか。
8. 現在イエテボリ大学にソフトの評価を依頼しているそうですが、そこではどのように評価をなさっていますか。
9. 今回のソフトでは、学生 ID と名前を入力することで、個別のスコアを表示することはできますか。
10. どのような点を苦勞し、また工夫しましたか。
11. 今回のソフトあるいは関数の開発では、すでに出来上がった枠組みのようなものを単に足して開発しましたか。それとも、最初から自分で書き上げて開発しましたか。

以上より、本審査会は、学位請求者が博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	田村 集
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第21号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	<i>in vitro</i> 歯周病バイオフィルムモデルに対する抗菌薬の効果
指導教員	(主) 教授 王 宝禮 (副) 教授 平岡 行博 (副) 教授 太田 紀雄 (副) 教授 伊藤 充雄 (副) 助教授 服部 敏己 (副) 助教授 深澤加與子
論文審査委員	主査 教授 藤村 節夫 副査 教授 長谷川博雅 副査 教授 音琴 淳一 副査 助教授 上松 隆司

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景と目的】

細菌は浮遊したプランクトニック状態と細菌自身が合成し菌体外に分泌した多糖に付着しバイオフィルムを形成した状態で存在する場合がある。近年、歯周病は口腔内細菌が歯周ポケット内において形成されたバイオフィルム表面より放出された浮遊細菌が歯周組織に付着、侵入することで発生すると考えられるようになった。歯周病治療時の薬物療法として用いられるテトラサイクリン系抗菌薬はバイオフィルムに対する浸透性が低いと考えられている。一方、マクロライド系抗菌薬は緑膿菌などのバイオフィルムに対して形成抑制能をもつことが明らかにされており、バイオフィルム感染症に対して有用な抗菌薬であることが多数報告されている。本研究では歯周病関連細菌由来によるバイオフィルムモデルを作製し、抗菌薬の薬理効果を検討することを目的とした。

### 【材料と方法】

唾液処理したプレート上で初期付着に関与する *Streptococcus gordonii* を37℃で嫌気培養した。さらに代表的な歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* を共培養し、*in vitro* 歯周病バイオフィルムモデルとした。このモデルに、ミノサイクリン、エリスロマイシン、ジョサマイシン、及びアジスロマイシンの抗菌薬を添加した。バイオフィルムの形成前と形成後の二群に分け、抗菌薬の影響を比濁定量により生菌数を定量し、表面形状を走査型電子顕微鏡（SEM）で、各薬剤の浸透能を共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）を用いて解析した。

### 【結果】

ミノサイクリン、エリスロマイシン、ジョサマイシン及びアジスロマイシンの4種類全ての抗菌薬

にバイオフィーム形成抑制能が認められ、エリスロマイシンとアジスロマイシンにはバイオフィーム破壊能が認められた。SEMによりエリスロマイシンとアジスロマイシンを投与したバイオフィーム表面において性状の違いが観察できた。また CLSM の結果からはエリスロマイシン、アジスロマイシンはジョサマイシン、ミノサイクリンよりバイオフィームに対する高い浸透能が認められた。

#### 【考察と結論】

エリスロマイシン、アジスロマイシンがバイオフィーム感染症としての歯周病に対して有用な抗菌薬である可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、歯周病がバイオフィーム感染症であるとの観点から *in vitro* バイオフィームモデルを構築し、マクロライド系およびテトラサイクリン系抗菌薬のバイオフィームへの効果を生菌数の比濁定量、SEM、CLSM などによる斬新な研究方法によって解明された。エリスロマイシン、アジスロマイシンがバイオフィームモデルに対して著明な破壊効果を示すことを明らかにした。本研究の所見は歯周病学の臨床分野に対しても貢献する、非常に意義のある研究である。

以上により、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文“*in vitro* 歯周病バイオフィームモデルに対する抗菌薬の効果”を中心に、本研究に関する基礎知識、論文の内容に関する事柄および研究成果の今後の展開などについて、口頭試問による試験を行った。

質問事項は、

1. 論文中の科学的表現について
2. 人工ペリクルの作製法について
3. 検定方法について
4. *in vitro* 実験と *in vivo* 実験の相関性について
5. マクロライド系抗菌薬の薬理作用について

以上の質問や意見が出されたが、本大学院生は最新の文献的知見も踏まえて適切に回答した。本審査委員会は、この研究を本学大学院硬組織疾患制御再建学講座の学位論文として、歯科とくに基礎歯科医学のみならず、臨床歯科医学とりわけ歯周病学領域に多くの示唆を与える内容を含んだ意義のある研究であると評価した。また、本大学院生は博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	富田 郁雄
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第22号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	三叉神経中脳路核ニューロンhチャンネル活性の5-HT依存性神経修飾作用に関する検討
指導教員	(主) 教授 古澤 清文 (副) 教授 金銅 英二 (副) 助教授 安田 浩一
論文審査委員	主査 教授 森本 俊文 副査 教授 金銅 英二 副査 教授 井上 勝博 副査 助教授 安田 浩一

## 学位論文の内容の要旨

### 背景および目的

一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンは感覚受容器からの求心性情報を統合するとともに、種々の神経伝達物質の投射を受けて脳幹内の pattern generation により引き起こされる咀嚼や吸啜などのリズムカルな顎運動を修飾することが推察されている。脳幹スライス標本を用いた研究において、神経伝達物質の一つであるセロトニン(5-HT)は、三叉神経運動核ニューロンの膜興奮性を促通するが、感覚性入力に関与する中脳路核ニューロンに対しては、他の感覚-運動系同様に抑制的に作用することが明らかとされている。しかしながら、抑制に関わる中脳路核ニューロンの膜電流特性変化についての詳細は未だ不明である。電位依存性のhチャンネル活性に伴ってみられる内向き整流性K電流(h-電流)は、中脳路核ニューロンにおいて静止膜電位の維持、スパイク発射調節、周波数依存性膜応答特性形成に関与していることから、神経伝達物質によるhチャンネル特性の変化を調べることは、中脳路核ニューロンからの感覚性入力が入力が三叉神経運動核より出力される咀嚼運動パターンを如何に制御しているか明らかにしていく上で極めて重要である。そこで本研究では5-HTによるh電流の修飾様相について電気生理学および形態学的に種々の検討を行った。

### 実験方法

実験には生後2-12日齢(P2-P12)のSD系ラットを用いた。ハロセン深麻酔下で脳幹を摘出、厚さ300 $\mu$ mの冠状スライス標本を作製後、赤外線透視条件下で三叉神経中脳路核ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ法を用いて膜電位、膜電流を記録した。標準細胞外液中にchannel blockerを前投与し、voltage-clamp条件下でh電流を誘発して以下の検討を行った。

- 1) 5-HTによるh電流の最大振幅値(最大コンダクタンス値)、活動曲線定数の変化について検討した。

- 2) 5-HT による h 電流修飾作用に関与する細胞内セカンドメッセンジャー機構を明らかにする目的で cyclic AMP-Protein kinase A、Protein kinase C、細胞内  $Ca^{2+}$  を介する伝達経路についてそれぞれ検討した。
- 3) 5-HT による h 電流修飾作用に関与している 5-HT 受容体のサブタイプを解析・同定する目的で、免疫組織化学染色を用いて中脳路核における 5-HT<sub>1-7</sub> 受容体陽性細胞の発現様相を形態学的に検討するとともに、各種サブタイプの作動薬、拮抗薬を用いて、h 電流抑制効果の発現様相を電気生理学的に比較検討した。

#### 実験結果および考察

- 1) 5-HT 投与により h 電流の最大振幅値は有意に減少し、抑制効果は生後発達的に増大した (P2-4 < P10-12)。また 5-HT 投与前後で活動曲線の偏位は殆ど見られなかったことから、抑制効果は h チャンネルの開閉率ではなく、電流密度の減少に伴う最大コンダクタンス値の変化によることが示唆された。
- 2) アデニル酸シクラーゼ (AC) 活性あるいは Protein kinase A (PKA) 活性の低下に伴い、5-HT の h 電流抑制効果は有意に低下した。また Protein kinase C 活性低下による抑制効果への影響は殆どみられなかったが、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度低下は一部の細胞で抑制効果を低下させたことから、本修飾に AC-cyclic AMP-PKA 或いは細胞内  $Ca^{2+}$  を介する細胞内情報伝達機構が関与していることが示唆された。
- 3) 免疫組織化学染色において中脳路核ニューロンには 5-HT<sub>1,2</sub> 受容体の陽性細胞の発現が有意に認められた。パッチクランプ法を用いて 5-HT<sub>1,2</sub> 受容体の各種作動薬、拮抗薬を用いた結果、5-HT<sub>1</sub> 受容体活性が h 電流の抑制機序に最も強く関与していることが示唆された。

### 学位論文審査の結果の要旨

一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核ニューロンは、脳幹内に細胞体を持つ特異性から介在ニューロンとしての機能を有することが知られている。このことから末梢感覚受容器からの入力のみならず、脳幹内の他のニューロンからの投射や各種神経伝達物質により、ニューロンの興奮性は複雑に調節されていることが推察されている。しかしながら、これまで中脳路核ニューロンの神経伝達物質による修飾様態について詳細は不明であった。本研究は patch-clamp recording 法を用いて、最近明らかとされた知見をもとに 5-HT による中脳路核ニューロンの膜修飾作用を詳細に追求したものである。

研究の遂行には、豊富な神経生理学的知識と種々の channel blocker を用いた voltage-clamp recording 条件下での極めて繊細な実験テクニックが要求される。申請者は大学院博士課程修了にあたり、これらの要件を満たす卓越した実験技術と、それを裏付ける基礎的学力を有している。

本研究より中脳路核ニューロンにおける h-電流活性は 5-HT により抑制的に修飾されていることが明らかとなった。運動核ニューロンにおいては同コンダクタンスが興奮性に修飾されていること、また関与している受容体サブタイプが両者で全く異なっていることから、運動-感覚系での、それぞれ独立した神経修飾機構の存在を示唆するものである。また、5-HT による h-電流への修飾作用が生

後発達的に増大することを考え合わせると、吸啜から咀嚼運動への移行、あるいは sleep bruxism や各種 oral dyskinesia などの顎口腔機能異常に対して本修飾作用が何らかの役割を果たしている可能性があり、今後の研究の発展性を含めて本論文は学位論文に十分に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者に対して、以下の質問を行い明確な回答が得られた。

1. 三叉神経中脳路核ニューロンにおける h-電流特性は 5-HT により抑制性に修飾されるが、視床、顔面神経核ニューロン、脊髄神経節ニューロンにおいては如何なる理由で h-電流振幅は増大するのか。
2. 三叉神経節ニューロンにおいても本研究と同様の報告はあるのか。
3. 5-HT 受容体サブファミリーの分子生物学的な（分子構造的な）相違点は如何なるものか。
4. 5-HT 受容体サブファミリーの種類によって h-電流に対する作用機序も特異的に異なるのか。
5. 考察において「5-HT による三叉神経運動—感覚系の独立した神経修飾機構が存在する」とは如何なる内容を指すか。
6. 記録した全ての中脳路核ニューロンにおいて h-電流の発現はみられたか。
7. 記録した全ての中脳路核ニューロンにおいて 5-HT により h-電流は抑制性に修飾されたか。
8. 記録の対象となったのは主に歯根膜、筋紡錘いずれの末梢感覚入力の投射を受けたニューロンであったと考えるか。
9. 筋肉へのペルオキシダーゼ注入などの方法により歯根膜、筋紡錘いずれの末梢感覚の入力を受けているニューロンであるか同定して記録することは可能であるか。

以上より、本審査会は、学位請求者が博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	中村 哲
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第23号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	慢性歯周炎に対する炭酸ガスレーザーの作用
指導教員	(主) 助教授 上松 隆司 (副) 教授 長谷川博雅 (副) 教授 川上 敏行
論文審査委員	主査 教授 王 宝禮 副査 教授 藤村 節夫 副査 教授 黒岩 昭弘 副査 教授 音琴 淳一

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的・背景】

近年、歯科領域において各種レーザーが応用されつつある。特に炭酸ガス(CO<sub>2</sub>)レーザーは深部組織への影響が少なく、効率的に切開や蒸散が可能であることから、口腔外科処置や歯周病治療などに使用されている。このように、CO<sub>2</sub>レーザーは歯科臨床に広く応用されているものの、臨床効果と組織への作用について検討した報告は少ない。本研究では、CO<sub>2</sub>レーザーの慢性歯周炎に対する作用を明らかにすることを目的とし、1) ヒト歯肉線維芽細胞と歯周病関連菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に対する CO<sub>2</sub> レーザーの作用、2) CO<sub>2</sub> レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動について検討した。

### 【実験方法】

- 1) ヒト歯肉線維芽細胞と *P. gingivalis* に対する CO<sub>2</sub> レーザーの作用：96穴のマルチウェルプレートの各ウェルに  $5 \times 10^3$  個のヒト歯肉線維芽細胞を含む100  $\mu$ l の DMEM を分注し、24時間培養した。培養上清を吸引し、Panalas C05 $\Sigma$ <sup>®</sup> CO<sub>2</sub> レーザーと 4A チップを用いてレーザーを照射後、増殖培養液(DMEM)を添加してさらに72時間培養した。レーザー照射後の生細胞数を MTT 法で算定した。*P. gingivalis* に対する CO<sub>2</sub> レーザーの作用では、BHI 寒天上で形成された *P. gingivalis* のコロニーを PBS で懸濁して菌液とし、レーザー照射した。嫌氣的条件下で96時間培養後、相対菌数を透過光濁度法で算定した。
- 2) CO<sub>2</sub> レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動：名古屋市高辻歯科クリニックを受診し、臨床研究の主旨を説明してインフォームドコンセントが得られた全身疾患を有しない慢性歯周炎患者のうち、6 mm 以上の歯周ポケットが4歯以上存在する、男性13名、女性13名、計26名(平均年齢52.6歳)を被験者とした。CO<sub>2</sub> レーザーは、発振波長10.6  $\mu$ m の Panalas<sup>®</sup>C05 $\Sigma$  を用いた。レーザーの照射条件は、2W、スーパーパルスモード、エアー冷却、30 sec/tooth とし、

7A チップを用いて歯周ポケット内に照射した。レーザー照射前と照射後1～4週における Pocket Probing Depth (PPD)、Gingival Index (GI)、Clinical Attachment Level (CAL)、Bleeding on Probing (BOP) を診査するとともに歯肉溝滲出液 (GCF) を採取して炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  ならびにそれらの阻害物質である IL-1ra、IL-1sR II、sTNF R I、sTNF R II の濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で定量した。

#### 【結果と考察】

##### 1) ヒト歯肉線維芽細胞と *P. gingivalis* に対する CO<sub>2</sub> レーザーの作用

CO<sub>2</sub> レーザーを照射していない対照の吸光度を100%として相対生細胞数を比較すると、ヒト線維芽細胞の生細胞数は、2.5 J では有意な減少はみられなかったが、7.5 J では78.1% (p<0.05)、12.5 J で61.6% (p<0.05)、25 J で33.0% (p<0.01) とそれぞれエネルギー依存的に生細胞数の減少がみられた。一方、*P. gingivalis* に対する作用を検討したところ、2.5 J の照射で12%の増殖抑制がみられ、照射エネルギー量の増加とともに菌数は減少し、25 J では *P. gingivalis* の増殖は阻止された。

##### 2) CO<sub>2</sub> レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動

臨床パラメータの PPD、BOP ならびに GI は、照射後2週で改善がみられたが CAL には変化は認められなかった。GCF パラメータを測定したところ、IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は照射後1週で有意に濃度が上昇し、その後減少した。TNF- $\alpha$  濃度も統計学的有意差はないものの、レーザー照射後に上昇し、その後経時的に減少した。一方、IL-1ra 濃度は、レーザー照射後1週と2週で上昇し、IL-1 活性比は、レーザー照射後3週まで有意に低値を示した。また、sTNF R II 濃度は、照射後1週と2週に上昇し、sTNF R II/sTNF R I 比は、照射後1週と2週に高値を示した。

以上の結果から、慢性歯周炎に対する炭酸ガスレーザーの作用として消炎効果が期待されること、さらに、この消炎効果は、炎症性サイトカインに対する阻害物質の誘導により、炎症の進展を抑制している可能性が示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

近年、炭酸ガス (CO<sub>2</sub>) レーザーは、歯科領域において汎用されているものの、臨床効果と歯周組織への作用については明らかにされていなかった。本研究は、1) ヒト歯肉線維芽細胞と歯周病関連菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に対する CO<sub>2</sub> レーザーの作用、2) CO<sub>2</sub> レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動について検討することにより、CO<sub>2</sub> レーザーの効果を客観的に明らかにすることを目的としており、研究の着想と目的が大変興味深いものと評価した。

本研究では、CO<sub>2</sub> レーザーのヒト歯肉線維芽細胞への影響を MTT 法で、さらに、*P. Gingivalis* に対する作用は透過光濁度法で検討している。CO<sub>2</sub> レーザーの低エネルギー照射では、ヒト歯肉線維芽細胞に著しい影響を与えずに抗菌作用が得られることを示した上で、臨床研究を開始している。臨床研究では、高辻歯科クリニックのスタッフによって実験計画書に基づいた倫理に関わる検討が行われ、臨床研究の主旨を説明してインフォームドコンセントが得られた慢性歯周炎患者を被験者としている。CO<sub>2</sub> レーザーの照射による歯肉組織の反応は、臨床パラメータとして Pocket Probing Depth

(PPD)、Gingival Index (GI)、Clinical Attachment Level (CAL)、Bleeding on Probing (BOP) について検討され、炎症反応は歯肉溝滲出液 (GCF) を採取して炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  ならびにそれらの阻害物質である IL-1ra、IL-1sR II、sTNF R I、sTNF R II の濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で定量している。このように、臨床所見と基礎医学的手法によって病態を評価しており、研究方法は合理的で妥当であると評価した。

本研究により、CO<sub>2</sub> レーザーを2.5 J照射すると、ヒト線維芽細胞の生細胞数の有意な減少はみられないものの、*P. gingivalis* は12%の増殖抑制がみられることが示された。臨床的研究では、CO<sub>2</sub> レーザー照射により PPD、BOP ならびに GI は、照射後2週で有意に改善されたが、歯肉溝滲出液中の IL-1 $\alpha$  と IL-1 $\beta$  は照射後1週で有意に濃度が上昇し、その後減少すること、さらに TNF- $\alpha$  濃度もレーザー照射後に上昇し、その後経時的に減少することが示された。この臨床パラメータと GCF パラメータの矛盾を明らかにすべく、サイトカイン阻害物質について検討した結果、IL-1ra 濃度は、レーザー照射後1週と2週で上昇し、IL-1 活性度は、レーザー照射後3週まで有意に低値を示すこと、さらに、sTNF R II 濃度は、照射後1週と2週に上昇し、sTNF R II/sTNF R I 比は、照射後1週と2週に高値を示すことを明らかにした。これらの研究結果は、CO<sub>2</sub> レーザーの照射によってサイトカインインヒターが発現し、抗炎症作用を示すという新たな知見を示している。さらに、「歯周炎の進行は、炎症性サイトカインとその阻害物質の imbalance に影響を受ける」とする最新の病態論を説明しうる興味深い結果であると評価した。一連の研究成果によって得られた、「慢性歯周炎に対して CO<sub>2</sub> レーザーを照射すると、IL-1ra と sTNF R II の発現が亢進し、IL-1 と TNF- $\alpha$  の活性が低下することが示唆される」とする結論は妥当であると評価した。

本論文は、日常の臨床で汎用されながら、作用機序が明らかにされていなかった CO<sub>2</sub> レーザーの作用を、臨床検査と基礎医学的方法を用いて明らかにしたもので、研究手法と戦略が明確であること、さらに CO<sub>2</sub> レーザー照射によるサイトカイン阻害物質の発現に関する新たな研究課題を提示した研究として評価できる。以上より、本論文は、学位論文としての価値を認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位論文「慢性歯周炎に対する炭酸ガスレーザーの作用」を中心に、本研究に関する基礎知識、論文内容に関わる事項について、口頭試問を行い明確な回答が得られた。

質問事項は次のとおりである。

1. CO<sub>2</sub> レーザーとはどのようなものか。
2. O'Leary PCR を約30%にした理由はなぜか。
3. レーザーの種類にはどのようなものがあるか。
4. 4週間で歯周組織の状態を評価した理由は何か。
5. PPD の測定を毎週行った理由は何か。
6. スーパーパルスモードとは何か。

以上より、本審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な学力と見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	楢本 浩子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第24号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines. (唾液腺癌細胞におけるドセタキセル交差耐性に関する MRP7 の発現)
指導教員	(主) 助教授 上松 隆司 (副) 教授 宇田川信之 (副) 教授 高橋 直之 (副) 教授 平岡 行博
論文審査委員	主査 教授 長谷川博雅 副査 教授 高橋 直之 副査 教授 川上 敏行 副査 教授 藤村 節夫

## 学位論文の内容の要旨

### 背景と目的

頭頸部癌における抗癌剤多剤併用療法では、唾液腺癌 (SGA) は口腔扁平上皮癌 (SCC) に比べ、治療抵抗性を示すことから、SGA と SCC では薬剤感受性や抗癌剤耐性獲得機構が異なっていると推測される。癌細胞の薬剤耐性には様々な機構が関与し、そのひとつとして、ATP binding cassette (ABC) transporter の関与が考えられる。本研究では、頭頸部癌の主な組織型である SCC と SGA における ABC transporter の発現と抗癌剤耐性獲得機構について検討した。

### 実験方法

- 1) 頭頸部癌細胞株：頭頸部癌細胞として、マウス SCC 細胞株 Sq-1979、ヒト SCC 細胞株 SCCHA、マウス SGA 細胞株 NR-PG ならびにヒト SGA 細胞株 HSY を用いた。
- 2) 薬剤感受性試験：各細胞株に対して、ドセタキセル (DOC)、ビンクリスチン (VCR)、シスプラチン (CDDP)、ドキソルビシン (DOX) を異なる濃度で添加して培養し、MTT 法で生細胞数を算定した。
- 3) VCR 処理モデル (*in vitro*)：20%増殖抑制濃度 (IC<sub>20</sub>) の VCR 含有増殖培地で反復処理し、VCR 耐性細胞を得た。
- 4) RT-PCR 法による遺伝子発現の解析：培養細胞から total RNA を抽出し、cDNA を合成後、各種トランスポーターの特異的プライマーを用いて RT-PCR を行った。内部標準には、GAPDH を用いた。
- 5) 細胞膜の調製：各培養癌細胞の膜蛋白を抽出し、蛋白定量後 Western blot に供した。
- 6) MRP7 polyclonal antibody の作製：合成ペプチドの配列を決定し、ペプチドを合成した。合成ペ

プチドを KLH 蛋白と結合させ、New Zealand rabbit に接種して、抗血清を採取した。Protein A カラムを用いて IgG を精製した。

- 7) Western blot 法：20  $\mu\text{g}$  の抽出膜蛋白を SDS-PAGE で電気泳動した後 PVDF 膜に転写した。特異抗体と HRP 標識二次抗体で標識後、化学発光させて特異的バンドを検出した。
- 8) 培養癌細胞を用いたヌードマウス異種移植モデル：培養癌細胞をヌードマウスの側背部皮下に移植し、腫瘍換算重量が100mg となった時点で、VCR を腹腔内に投与した。
- 9) 異種移植腫瘍における MDR1、MRP1、MRP7 の免疫細胞化学的検出：ヌードマウスから腫瘍組織を摘出し、4  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製した。1次抗体として抗 MDR1 抗体 (C219)、抗 MRP1 抗体 (MRPm5)、抗 MRP7 抗体 (MRP7 polyclonal antibody) を用い、2次抗体は、HRP 標識ビオチン化抗マウスまたは抗ラビット IgG を用いた。発色は DAB で行い、メチルグリーンで対比染色した。
- 10) フローサイトメトリーによる細胞内 DOX 蓄積の検出：細胞を  $1 \times 10^6$ 個/ml に調製し、10  $\mu\text{M}$  の濃度で DOX を含有する増殖培地中で37 $^{\circ}\text{C}$ 、30分間培養した。DOX を含まない増殖培地に MDR1 と MRP1 の阻害剤である Cyclosporin A または MRP7 の阻害剤である E<sub>2</sub>17 $\beta$ G を50  $\mu\text{M}$  の濃度で添加し、60分間培養した。その後、細胞を回収し、細胞内 DOX の自己蛍光をフローサイトメーターで検出した。

## 結果と考察

- 1) 頭頸部癌細胞における ABC transporter の発現：RT-PCR による検討では、Sq-1979/VCR は、MDR1、MRP1、MRP4、MRP5 を発現し、NR-PG/VCR では、MDR1、MRP1、MRP3、MRP5、MRP7 を発現した。HSY/VCR と NR-PG/VCR は VCR 処理によって MRP7 の発現が誘導された。Western blot 法では、頭頸部癌培養細胞は VCR 処理によって MDR1 と MRP1 の発現が増加した。また、HSY/VCR と NR-PG/VCR は MRP7 の発現がみられた。
  - 2) ヌードマウス可移植性腫瘍モデルを用いた MDR1、MRP1、MRP7 の発現：SCCHA/VCR と HSY/VCR に MDR1 と MRP1 の発現がみられたが、MRP7 は HSY/VCR のみに発現した。
  - 3) E<sub>2</sub>17 $\beta$ G と Cyclosporin A による HSY/VCR の DOC 感受性の変化：Cyclosporin A を添加して培養すると、SCCHA/VCR と HSY/VCR の DOX と DOC に対する IC<sub>50</sub> 値が低下した。E<sub>2</sub>17 $\beta$ G を添加して培養すると MRP7 が発現している HSY/VCR の DOC と DOX に対する IC<sub>50</sub> 値が低下した。また、HSY/VCR では、Cyclosporin A と E<sub>2</sub>17 $\beta$ G を添加して培養すると Cyclosporin A 単独に比べ、DOC に対する IC<sub>50</sub> 値は著しく低下した。
  - 4) E<sub>2</sub>17 $\beta$ G と Cyclosporin A による細胞内 DOX の蓄積：Cyclosporin A は、SCCHA/VCR と HSY/VCR の DOX の細胞内蓄積を増加させた。一方、E<sub>2</sub>17 $\beta$ G と Cyclosporin A の存在下では、HSY/VCR における DOX の細胞内蓄積がさらに増加した。すなわち、MRP7 の阻害剤である E<sub>2</sub>17 $\beta$ G によって HSY/VCR の DOC に対する感受性が増加することが明らかとなった。
- 以上の結果から、頭頸部癌の薬剤耐性獲得機構には、MDR1、MRP1、MRP7 が関与し、特に SGA では MDR1 と MRP1 に加え、MRP7 の発現がドセタキセル感受性に影響を与えたと考えられた。

## 学位論文審査の結果の要旨

日常の臨床では、頭頸部癌に対して抗癌剤多剤併用療法が適用されている。癌化学療法の臨床効果を頭頸部癌の主な組織型である口腔扁平上皮癌（SCC）と唾液腺癌（SGA）で比較すると、唾液腺癌では薬剤耐性形質を獲得する傾向がみられるが、現在までその原因は解明されていなかった。本研究では、薬剤を細胞内から細胞外へ排出する膜結合型蛋白である ATP binding cassette (ABC) transporter が唾液腺癌の抗癌剤耐性獲得機構に関与するという仮説を明らかにすることを企図しており、目的は妥当かつ重要であると判断した。

研究手法は、頭頸部癌細胞として、マウス SCC 細胞株 Sq-1979、ヒト SCC 細胞株 SCCHA、マウス SGA 細胞株 NR-PG ならびにヒト SGA 細胞株 HSY の親株細胞とそれらのシングルセルクローンを樹立して実験系を構築し、Flow cytometry、Western blot 法などの細胞生物学的検討や RT-PCR などの分子生物学的アプローチを駆使して研究が遂行されている。さらに、*in vitro* 実験の結果をヌードマウス可移植性腫瘍モデルで validation を行っており、研究手法は適切であると評価した。

本研究により、1) VCR 処理した口腔扁平上皮癌細胞と唾液腺癌細胞では、ともに ABC transporter の MDR1 と MRP1 の発現が誘導されること、2) 唾液腺癌では、薬剤処理によって MRP7 遺伝子の転写とその遺伝子産物の発現が亢進すること、3) 臨床を想定したヌードマウス可移植性腫瘍モデルにおいて、VCR を投与したマウスの唾液腺癌細胞では MRP7 が発現すること、4) MDR1、MRP1 ならびに MRP7 の阻害物質によって薬剤感受性が亢進すること、5) MRP7 の発現によってドセタキセルに対する交差耐性が生じることが示された。このように、頭頸部癌の主な組織型である口腔扁平上皮癌と唾液腺癌では、薬剤耐性獲得機構が異なることなど妥当な結論が得られた。さらに MRP7 の発現は、唾液腺癌に特徴的であるというきわめて興味深い結果も得られ、独創的研究であると評価できる。

これらの研究結果から導き出された「口腔扁平上皮癌と唾液腺癌の薬剤耐性獲得機構に MDR1 と MRP1 が関与し、唾液腺癌では MRP7 の発現による薬剤排出作用がドセタキセルに対する薬剤感受性に影響を与える」という結論は妥当であると評価した。

本論文は、頭頸部癌の抗癌剤耐性という現象が、薬剤排出蛋白の誘導によって生じること、さらに頭頸部癌化学療法において、ABC transporter による薬剤耐性獲得機構が存在することを示した論文として価値のあるものである。

なお、本論文は、「Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines」というタイトルで International Journal of Oncology 誌 [30(2):393-401, 2007] に掲載されたものである。

以上より、本論文は学位論文として価値があると認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位論文「Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines」の内容に加え、本研究に関連した基礎知識や研究

成果から考察できる事項などについて口頭試問および筆記試験を行い回答が得られた。

質問事項は次のとおりである。

1. MRP7 の発現調節機構は、明らかにされていますか。
2. ビンクリスチンによる薬剤排出蛋白の発現はどのような機構ですか。
3. 癌化した細胞は、すべて薬剤耐性になるのですか。
4. 組織型によって抗癌剤に対する感受性が異なりますか。
5. 培養細胞の由来組織は、どのような病理組織診断でしたか。
6. E<sub>2</sub>17βG と CsA の作用は、どのような機序によるものですか。
7. E<sub>2</sub>17βG と CsA が抗癌剤の排出を阻害する機序はどのようなものですか。

以上より、本学位審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な専門的知識を有するものと認め、審査員全員一致で最終試験を合格と判定した。

氏 名	姫野 勝仁
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第25号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	顎顔面領域における炎症モデルラット三叉神経節細胞の遺伝子発現動態—カルモジュリンキナーゼとK <sup>+</sup> チャンネルの解析—
指導教員	(主) 教授 金銅 英二 (副) 教授 山下秀一郎 (副) 教授 澁谷 徹
論文審査委員	主査 助教授 安田 浩一 副査 教授 井上 勝博 副査 助教授 服部 敏己 副査 助教授 熊井 敏文

## 学位論文の内容の要旨

### 目 的)

顎顔面領域における炎症発痛メカニズムの解明を目的に、ラット炎症モデル動物を用いて炎症発痛関連遺伝子の動態解析を行った。我々は、これまでに三叉神経節細胞の遺伝子動態をマイクロアレイにて網羅的に解析し、約420遺伝子の発現変化を明らかにしている。また熱刺激装置により、本研究で用いた炎症モデル動物が、起炎症物質投与後1日から5日まで熱刺激開始から逃避するまでの時間短縮が認められた。この結果は、本モデル動物の痛覚過敏やアロディニア発症を示した。これらの結果に基づき個々の細胞レベルにおける発現パターンを形態学的手法 (*in situ* ハイブリダイゼーション) にて追跡調査し、また、経時的変化についても定量性に優れた Real Time-PCR を行い解析した。今回は、マイクロアレイの結果で遺伝子動態変化を認めた遺伝子のうち、特に動態変化の大きかったカルモジュリンキナーゼ (CaMKII $\beta$ ) および K<sup>+</sup>イオンチャンネル (KCNK3) に着目し、これら分子と炎症メカニズムの関連性を明らかにする事を目的とした。

### 方 法)

SD 雄性ラット (6 週齢) の左側上口唇に CFA (Complete Freund's Adjuvant) を 50  $\mu$ l 注入した。注入後、1日、3日、5日、7日と経時的に三叉神経節を摘出した。新鮮凍結切片 (厚径 8  $\mu$ m) を作成し *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。また、Real Time-PCR 用として組織から total RNA の抽出精製も行った。

#### ・ *in situ* ハイブリダイゼーション

CaMKII $\beta$  および KCNK3 のジゴキシゲニン (DIG) 標識の RNA プローブを作製した。その後、ハイブリダイゼーション反応 (55 $^{\circ}$ C, 20時間) をおこなった。洗浄した後、発色反応を行い光学顕微鏡下で観察した。

#### ・ Real Time-PCR

精製したサンプルより cDNA を作製し probe を用いて Real Time-PCR を行い反応蛍光物質を測定した。

#### 結 果)

##### ・ *in situ* ハイブリダイゼーション

三叉神経節において神経細胞のほぼ全てに反応がみられ、CaMKII $\beta$  及び KCNK3 共に生食群と CFA 群（3日目）を比較すると CFA 群（3日目）が濃く染色する傾向が認められた。

##### ・ Real Time-PCR

CaMKII $\beta$  の発現動態においては、1日、3日、5日、7日を通じて無処置動物群との有意な差は認められなかった。一方、KCNK3 においては、無処置動物群と比較して、3日目、5日目、7日目で上昇傾向を示した。

#### 考 察)

今回の炎症モデル動物の三叉神経節細胞において、CaMKII $\beta$  の mRNA 発現が *in situ* ハイブリダイゼーションでは強く認められた。一方、Real Time-PCR では著明な発現変化が検出できなかった。その理由として3つの可能性が考えられる。

まず本実験ならびにマイクロアレイチップそれぞれに使ったプローブ等の検出領域の差が挙げられる。もう一つは、炎症に対する応答としてのこれら分子の発現変動の不安定な点が原因と考えられる。更に、CFA 注入による刺激が、一旦中枢神経系に伝達され、その二次反応（下行性抑制系の賦活）などにより発現変化が抑制された可能性も示唆される。

#### 結 論)

CaMKII $\beta$  及び KCNK3 は、多くの三叉神経節細胞にて発現しており CFA 注入後3日目に強い反応が観察された。しかし、CaMKII $\beta$  における mRNA 発現量の著明な経時的変化は認められなかった。一方、KCNK3 における mRNA 発現量の経時的変化は3日目以降、上昇傾向がみられた。これらの分子は炎症との関連性が示唆されるものの、確証には至らなかった。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、臨床で問題となる顎顔面領域の「慢性痛」について、そのメカニズムを解明を目指したもので、炎症発痛時に三叉神経節細胞における遺伝子動態を網羅的に解析した cDNA マイクロアレイの結果を基に取り組まれたものである。

本研究では、慢性炎症モデルを用い、三叉神経節細胞における CaMKII $\beta$  および KCNK3 の遺伝子動態について特化し、検討している。その理由として、これら分子（細胞内情報伝達分子とイオンチャネル）は、先述の cDNA マイクロアレイの結果で CFA 投与3日目の三叉神経節で発現上昇しており、加えて痛みに関連している可能性が、他の研究により示唆されているものである。

具体的な解析方法として、慢性炎症モデル動物から摘出した三叉神経節を用いて *in situ* ハイブリ

ダイゼーションと Real Time-PCR にて形態学的、分子生物学的解析を行っている。本研究では、炎症時三叉神経節細胞での遺伝子動態を定性的解析と定量的解析の両面からアプローチし、検討する方法を選択しており、研究手法は妥当であると評価した。

本研究では以下の事を明らかにしている。

1) *in situ* ハイブリダイゼーション

CFA 処理 3 日後において 1、2 枝領域の神経節細胞の全体に、以下のことが、示された。

- ① CaMKII $\beta$  および KCNK3 が濃染する傾向がみられた。これは、マイクロアレイの結果とも一致していた。
- ② 注入側と対側間の比較では、両方に濃染が認められ、左右差は確認されなかった。
- ③ 生食群、sense probe 反応、においては染色が確認されなかった。

2) Real Time-PCR

- ① CaMKII $\beta$  および KCNK3 の経時変化で有意な差は確認できなかった。
- ② KCNK においては、注入後 3 日、5 日、7 日で上昇傾向がみられた。

以上の研究成果と文献的考察から、「慢性炎症時の三叉神経節細胞では、CaMKII $\beta$  および KCNK3 が、関係していることは示唆されるも、分子レベルにおいては、さらなる詳細の確認と検討が必要である」とする結論は、妥当であると評価した。

以上より、本論文は、学位論文として価値があると認める。

氏名	影山 康子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第26号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary molar roots in male rats : A histomorphometric study (ラットによる加齢に伴う上顎臼歯歯根周囲歯槽骨の改造変化:組織学的研究)
指導教員	(主) 教授 小澤 英浩 (副) 教授 佐原 紀行 (副) 教授 新井 嘉則
論文審査委員	主査 教授 新井 嘉則 副査 教授 宇田川信之 副査 教授 中村 浩彰 副査 助教授 小林 泰浩

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景、目的】

歯科臨床において、年齢により歯根周囲歯槽骨に相違があることを日々経験している。しかし、加齢に伴う歯根周囲歯槽骨の骨改造活性の基礎的なデータはあまりみられず、不明確な点が多く残されている。本研究では、加齢に伴うラット歯根周囲歯槽骨の骨改造活性を骨形態計測法により定量的に評価し、加齢に伴う骨改造活性の変化を明確にすることを目的として以下の実験を行い検討した。

### 【資料、方法】

6～100週齢のWistar系雄性ラットを10週間隔で11グループ用いた。実験期間は4週間で、歯根周囲の骨形成活性を計測するため骨ラベリング剤を2週間間隔で計3回投与した。観察部位は上顎M1の遠心舌側根で、咬合面と平行に根分岐部直下から60µmの厚さで切片を採取し研磨切片作製後、近心側と遠心側にわけて計測した。さらに同部位を用い、脱灰切片を作製しTRAP染色を行い、近心側と遠心側にわけて骨吸収活性の計測をし、加齢による骨改造変化を観察した。

### 【結果】

生理的条件下において、体重は6週齢で135g前後であり、50週齢まで増加し約560gとなりその後は100週齢まで大きな変化はみられなかった。一日における体重の増加率は6週齢から10週齢まで急激に増加し、その後30週齢にかけて急激に減少し、50週齢まで緩やかに減少し、その後は大きな変化はみられなかった。歯根周囲歯槽骨全周による検索では骨吸収系および骨形成系の全パラメーターは共に加齢に従い減少を示し、6週齢から30週齢にかけて有意に減少し( $P<.0001$ )、その後100週齢まで緩やかに減少した。近遠心側による検索においては、2重ラベリング面積および骨形成率では近心側に有意に認められ( $P<.0001$ )、破骨細胞数と骨吸収面積は遠心側に有意に認められた( $P$

く.0001)。また、遠心側における2重ラベリング面積および骨形成率と近心側における破骨細胞数および骨吸収面積は、加齢による有意差が認められなかった。

#### 【結論】

ラット歯槽骨の骨改造活性は加齢により急激な減少が認められた。しかし、100週齢のラットにおいても歯の機能を維持するために歯槽骨では骨吸収、骨形成が認められることが示唆された。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、生理現象である加齢変化に着目し、ラットを用い加齢に伴う歯根周囲歯槽骨の骨改造活性を骨形態計測法により定量的に評価し、加齢に伴う骨改造活性の変化を明確にすることを目的としている。

申請者は、6～100週齢のWistar系雄性ラットを用い、骨ラベリング剤を使用して骨形成活性を、また各種の染色を行い骨吸収活性の評価をしている。更に、これらを用いて骨形態計測法を行い加齢による骨改造変化を検索している。本研究は、松本歯科大学動物実験指針に従って行われており用いた研究手法は合理的であると評価できる。

一連の研究より、体重は6週齢から50週齢まで増加し、その後は100週齢まで大きな変化はみられず、一日における体重の増加率は6週齢から10週齢まで急激に増加し、その後30週齢にかけて急激に減少し、50週齢まで緩やかに減少し、その後は大きな変化はみられなかった。このことによりラットの旺盛な成長は10週齢前後であり、30週齢では緩やかな成長で、50週齢でほぼ成長は終了する。その後は、100週齢まで変化はなく経過していくことが示された。また、歯根周囲歯槽骨全周による骨形態計測法を用いた検索では骨形成系（dLS/BS, %, BFR/BS,  $\text{um}^2/\text{day}$ , MAR,  $\text{um}/\text{day}$ ）および骨吸収系（N.Oc/BS, number/mm, Oc.S/BS, %）の全パラメーターは共に加齢に従い減少を示し、6週齢から30週齢にかけて有意に減少し（ $P < .0001$ ）、その後100週齢まで緩やかに減少していることが示された。これら各種のパラメーターから得られた改造変化の結果は興味あるものと評価できる。

以上の結果から導き出された「ラット歯槽骨の骨改造活性は加齢により急激な減少が認められる。しかし、100週齢のラットにおいても歯の機能を維持するために歯槽骨では骨吸収、骨形成が認められることが示唆される」という結論は妥当であると評価できる。

本論文は、ラットにおける成長のピークを把握するとともに加齢変化に着目し、その現象を研究したものであり、その結果は非常に興味深い。さらに、本論文において述べられているように、ラット歯根周囲歯槽骨の年齢に関連した変化はラットを用いた基礎研究を行う際の一つの指標となり、今後の研究におおいに提供している。

また申請者は、ラットの組織学的、形態学的な知識および研究技術を習得しており、博士課程修了者として適切であると判断できる。

なお、本論文は「**Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary molar roots in male rats : A histomorphometric study**」というタイトルで *Archives of Oral Biology* 誌52:44-50(2007)に掲載される。

以上のことより、本論文に学位論文としての価値を認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「**Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary molar roots in male rats : A histomorphometric study**」を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄、研究成果の今後の展開などについて口答試問を行い明確な回答が得られた。

質問事項は次の通りである。

1. モデリングとリモデリングの定義を述べなさい。
2. 研究で歯根を近心と遠心に分けているが、分け方の定義を述べなさい。
3. 加齢に伴い歯根膜が狭窄しているが、加齢に伴う減少はどのぐらいか。
4. 改造活性の現象は何でおこると考えるか。
5. 研磨切片の作製方法を述べなさい。
6. 2重ラベリング面積の求め方はどのように行ったか。
7. この研究を行おうと思った理由は何か。
8. 研究で1番苦労した所、よかった所はどこか。
9. 今回の研究に加え、加齢に伴う歯の移動の関連性について研究していたが、加齢で歯の移動量が低下するのはなぜか。
10. 成人矯正とは何歳ぐらいか。また、それはラットの何週に相当するか。

以上より、本審査会は、学位申請者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏 名	浅見 彩路
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第27号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	球状ヒドロキシアパタイトの加熱処理による骨芽細胞への効果
指導教員	(主) 教授 宮沢 裕夫 (副) 教授 伊藤 充雄 (副) 助教授 岩崎 浩
論文審査委員	主査 助教授 深澤加與子 副査 教授 小澤 英浩 副査 教授 高橋 直之 副査 助教授 永澤 栄

## 学位論文の内容の要旨

### 【目的】

ヒドロキシアパタイトは、インプラント手術の際に骨補填材としてだけでなく、インプラント体表面のコーティング材としても使用されている。そこで、術後組織を早期に治癒促進させるアパタイトを開発することにより、インプラント手術の成功率が高められると考え本研究が計画された。外科的侵襲によって酸性化した組織を早期に中和させるため、Ca/P モル比を変え、さらに非晶質リン酸カルシウムを加熱処理することにより、結晶化度の高い強アルカリ性を有するアパタイトを試作した。また骨形成という観点から、アルカリホスファターゼを石灰化に関与する骨芽細胞の重要なマーカーとした。非晶質リン酸カルシウムと今回試作した結晶化アパタイトの形状・性状を調べるとともに、これらアパタイトの pH 付与の経時的変化、Ca 溶出性、アルカリホスファターゼをマーカーとして骨芽細胞の分化を検討した。

### 【材料と方法】

Ca/P モル比を変化させた試作ヒドロキシアパタイトを、900℃の温度で各々6時間の加熱処理を行い高結晶アパタイトを試作した。これらのアパタイトの pH および Ca イオンの溶出量を測定した。また、マウスの頭蓋骨からコラゲナーゼ・デイスパーゼ処理により採取した骨芽細胞に4種類の試作アパタイトを播種し、その後アルカリホスファターゼ活性の顕微鏡による観察および活性値の測定を行った。

### 【結果と考察】

試作ヒドロキシアパタイトを浸漬した溶液中の pH を1ヵ月にわたり測定した結果、加熱処理アパタイトは非加熱処理アパタイトに比べ高い pH を示した。また、同様に試作アパタイトを浸漬した溶液中の Ca イオン溶出量を測定した結果、加熱処理アパタイトは非加熱処理アパタイトに比較して Ca

溶出量が高値であった。各試作アパタイト添加後の骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性を測定した結果、非加熱処理アパタイトは骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性を強く阻害したが、加熱処理アパタイトは骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性を阻害せずむしろ促進する作用が認められた。これらの結果から新たに試作した加熱処理アパタイトが骨補填材などの臨床材料としてより改良された材料となることが証明された。今後、骨芽細胞分化促進作用の原理の探求ならびに in vivo での実験を行い臨床応用へ結び付けたいと考えている。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は Ca/P モル比を変化させた 4 種類の試作ヒドロキシアパタイトを作製し、アパタイトの形状・性状を調べるとともに、これらアパタイトの pH 付与の経時的変化、Ca 溶出性、アルカリホスファターゼをマーカーとする骨芽細胞の分化に対しての効果を解析することを目的としている。

ヒドロキシアパタイトを加熱処理することにより、浸漬した溶液中の pH をアルカリ性に付与する効果が認められた。すべてのヒドロキシアパタイトにおいて、経時的に pH の減弱を認めた。このことは、OH イオンが Ca イオンや生理食塩水中のイオンと化合物を形成したことに起因すると考えられ、術部の正常化亢進につながると考えられる。また、加熱処理したヒドロキシアパタイトは、非加熱処理ヒドロキシアパタイトに比較して、骨芽細胞においてより高いアルカリホスファターゼ活性の保持を促した。これは、加熱処理ヒドロキシアパタイトによる早期新生骨形成効果を裏付けるものと考えられる。

以上の実験結果は、外科的侵襲によって酸性化した組織を早期に中和させることにより、術後組織を治癒促進させるアパタイトの開発に寄与する可能性を示している。さらに、インプラント表面のコーティング材として加熱処理アパタイトを臨床応用し、インプラント手術の成功率を高められる可能性も秘めている。この点、本論文は当該分野において高い貢献をしたと評価できる。

本申請者は、本研究に用いた細胞生物学、生化学、材料学の多岐にわたる実験方法を習得しており、博士課程修了者として十分な知識と技能を修得していると判断された。以上の所見により、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位論文『球状ヒドロキシアパタイトの加熱処理による骨芽細胞への効果』をもとに、この研究に対する基礎知識、論文の内容に関わる事柄について、口答および筆答による試験を行った。

質問事項は以下の通りである。

- 1) アルカリホスファターゼの石灰化における役割について。

- 2) ヒドロキシアパタイトの骨芽細胞への効果について。
- 3) Ca イオンによる骨芽細胞分化促進のメカニズムについて。
- 4) リン酸イオンの骨芽細胞に対する効果の可能性について。
- 5) ヒドロキシアパタイトの結晶性とタンパク質の吸着性について。

以上の質問に対して申請者から明確な回答が得られた。

本審査会委員合議の結果、申請者は博士（歯学）として十分な学力および知識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。

氏名	矢ヶ崎利衣子
学位の種類	博士（歯学）
学位授与番号	第28号
学位授与の日付	2007年3月8日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当（博士課程修了）
学位論文題目	口腔顔面慢性疼痛モデルラットの副腎皮質における機能的ならびに微細構造学的解析
指導教員	(主) 教授 倉澤 郁文 (副) 教授 森本 俊文 (副) 教授 甘利 光治
論文審査委員	主査 教授 井上 勝博 副査 教授 古澤 清文 副査 教授 川上 敏行 副査 教授 中村 浩彰

## 学位論文の内容の要旨

### [背景・目的]

慢性疼痛に至る病態形成過程について慢性痛モデル動物を用いた内分泌調節系の関与の解明を目的とした研究は非常に少ない。Bennetらは、ラットの坐骨神経を軽く結紮する方法（Chronic Constriction Injury, CCI）により、当該神経支配領域に慢性痛様症状が長期間発現することを明らかにして以来、顎顔面領域の慢性疼痛様症状を誘発させるため眼窩下神経を結紮するCCIモデルラットも報告されている。そこで、本研究ではラットの眼窩下神経にCCIを施した慢性疼痛モデルラットを作成し、慢性疼痛と内分泌調節系の関連の解明を目的として、慢性疼痛下の副腎皮質ホルモンの血中濃度と副腎皮質の微細構造の変化を解析した。

### [実験材料および方法]

実験には、Wister系ラットのオスを用いた。ペントバルビタール麻酔下にて眼窩下神経をChronic gutで緩めに結紮する群と皮膚切開のみの偽手術対照群に分けて実験を行った。疼痛発症の評価には、眼窩下神経支配の顎顔面領域にvon Frey hairを用い、圧力をかけた時の逃避行動を術前と術後25、30、35、40、45日後の5回観察した。さらに、術後45日目に血液と副腎を採取し、血中コルチコステロンならびにACTH量の測定と副腎皮質の微細構造学的解析を行った。

### [結果]

慢性疼痛の発症を評価するタッチテストの結果、CCIモデルラット群で、術後25～45日目においてコントロール群と比較し逃避指数が増加し、結紮により慢性疼痛様症状が持続していることが確認された。

ラットの活性型グルココルチコイドであるコルチコステロンの血中濃度はCCIモデルラット群

で、コントロール群と比較して有意に低下していた。一方、血中 ACTH 濃度は CCI モデルラット群とコントロール群との間に有意な差は認められなかった。

CCI ラット、対照群ラットの副腎皮質の組織像を観察した結果、CCI モデルラットで、コントロールラットと比較して脂肪滴が増加し、さらにその異常な集積を示す Syncytial-lipid structures (SLS) が高頻度に観察された。また、透過電子顕微鏡の観察により、CCI ラット副腎皮質の束状帯細胞が、不規則な内部構造を持つ膨化した脂肪滴や変性したミトコンドリアで占められ、SLS が脂肪滴や変性ミトコンドリア、コレステリン結晶をも含む巨大な集合体であることが示された。

#### [考察]

これらの結果から、眼窩下神経を Chronic gut による CCI モデルラットは、顎顔面領域の機械的刺激に対して慢性疼痛様反応を発現し、HPA 系の内分泌異常を引き起こすことが示唆された。副腎皮質束状帯ではステロイドホルモンの原料となるコレステロールの貯蔵を示す脂肪滴の増加の他、多数のステロイドホルモン合成酵素の局在が指摘されているミトコンドリアの変性など認められ、ステロイドホルモン合成能が低下していることを示唆した。通常の組織像から合成されるステロイドホルモンを特定することは出来ないが、同ラットの血中コルチコステロン値が低下していることから、CCI モデルラットにおいて、コルチコステロンの産生能が低下しているということが示唆された。

慢性疼痛モデルラットにおいて観察された副腎皮質の機能および形態変化が、どのようなメカニズムで引き起こされたのか、今後の課題である。

#### [結論]

眼窩下神経に Chronic gut による CCI を施し、慢性疼痛モデルラットが得られた。このモデルラットでは副腎皮質の機能および形態に変化が認められた。これは慢性疼痛様症状が HPA 系が関与する何らかの内分泌異常を起こさせていることを示唆している。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は慢性疼痛モデルを作成し、慢性疼痛下の内分泌系、特に副腎の機能・形態を解析することを目的としている。

研究の背景にはストレスが神経内分泌の異常の引きがねとなり、その神経内分泌の異常は疼痛の引きがねとなるばかりでなく疼痛を慢性化させ、その疼痛が今度は神経内分泌機能に影響を及ぼすと言う、一連の循環型モデルが90年代前半に提唱されて、今日に至っていることがある。しかもこのモデルでは慢性疼痛による内分泌系の形態変化については明らかにされていなかった。

本研究では知覚線維で構成される眼窩下神経を糸で緩く結紮し、結紮後の経時的なタッチテストによる、行動実験によって慢性疼痛モデルであることを証明している。次に慢性疼痛モデルの副腎機能を検討するため、血中のコルチコステロン濃度を測り、対照群と比較し明らかな低下が見られることを報告した。さらに慢性疼痛後の副腎皮質の束状帯の細胞の細胞質内には脂肪が蓄積し、ミトコンド

リアに異常が見られることを形態学的に証明した。

以上のように本論文は顎顔面領域の慢性疼痛モデル作成し、慢性疼痛による、内分泌系、特に副腎の機能・形態に及ぼす影響を明らかにした。電子顕微鏡的所見は質が高く、組織像と ELISA の結果が対応できる結果は学術的に高く評価できる。また新たな実験モデルを構築した点は今後の歯科医学とくに顎関節症などの研究分野に大きく貢献したと高い評価ができる。

本申請者は本研究に用いた手術手技、行動学的・生化学的・形態学的実験手法に精通しており、博士課程修了者として十分な知識と技能を習得していると判断した。

以上のことより、本論文は学位論文に値するものと認める。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位論文「口腔顔面慢性疼痛モデルラットの副腎皮質における機能的ならびに微細構造学的解析」をもとに、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄について、口答と筆答による試験を行った。

質問事項は次の通りである。

- 1) 眼窩下神経を結紮して作成したラット慢性疼痛モデルと、同じように坐骨神経を結紮して作ったモデルでは、内分泌系の変化、特に副腎皮質の微細構造の変化に違いはあるのか。
- 2) 論文中の記載が不明確なので、逃避行動の実験方法を詳しく述べなさい。
- 3) ストレス反応系のモデルには形態学的な裏付けがあるのか。
- 4) コルチコステロンの低下が ACTH の分泌にフィードバックしない理由は何か。
- 5) タイトルが本研究の主たる結果と一致していないのではないか。
- 6) 研究内容は問題ないが、論文の緒言・結果・考察の文章については改善する必要があるのではないか。
- 7) 生化学的解析と形態学的解析が結びついた点において優れているが、文章についてはこれまでの研究と本研究との相違点を明確にすべきではないか。

以上の質問に対して申請者から明確な回答が得られた。

以上により本学位審査会は申請者が博士（歯学）として十分な学力および見識を有するものと認め、最終試験を合格と判定した。