

RESEARCH REPORTS

Biological

A. Dohmoto, K. Shimizu, Y. Asada, and T. Maeda*

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan; *corresponding author, maeda@mascad.nihon-u.ac.jp

J Dent Res 81(7):501-504, 2002

Quantitative Trait Loci on Chromosomes 10 and 11 Influencing Mandible Size of SMXA RI Mouse Strains

ABSTRACT

Predicting the mandible size before the termination of growth of the maxillofacial bones is essential in pedodontics as well as for the predictions needed for genetic analysis. Here, Quantitative Trait Locus (QTL) analysis was used to detect the chromosomal regions responsible for the mandible length between the menton and gonion in an SMXA recombinant inbred strain of mice. Around the region 60 cM from the centromere in chromosome 10, the logarithm of the odds score showed a higher than suggestive level. Around the regions 13 cM and 16 cM in chromosome 11, two significant QTLs were detected. Analysis of genotypes from loci corresponding to those QTLs revealed a large mandible when the region between the markers *Hba* and *D11Mit163* and *D10Mit70* and *D10Mit136* indicated the genotype from the *A/J* and *SM/J* alleles, respectively. These results suggest that the major gene(s) responsible for mandible length are located in these regions.

KEY WORDS: mandible length, QTL analysis, SMXA recombinant inbred strain.

INTRODUCTION

The analysis of mandible shape has long been utilized for strain identification by discriminant analysis (Festing, 1972). In such studies, 11 to 13 measurement points set on the outline of the mandible are used for the characterization of mandible shape. Statistical analysis is carried out for the identification of the strain or sub-line (Goto *et al.*, 1993). However, genetic analysis has not been added to the discriminant analysis.

Previous research has suggested that the effects of genes on the mandible should be spatially patterned (Klingenberg *et al.*, 2001). Signaling interactions coordinate the outgrowth of the facial primordia from buds of undifferentiated mesenchyme into the intricate series of bones and cartilage structures that, together with muscle and other tissues, form the adult face (Francis-West *et al.*, 1998). The relationship between phenotypes and the genes responsible for the mandible shape is difficult to reveal, because polygenes are involved during facial development, including the growth of the mandible. Quantitative trait locus (QTL) analysis has been very successful in identifying chromosomal regions, with quantitative effects depending on the polygene such as body weight, alcoholism susceptibility, etc. (Nadeau and Frankel, 2000; Cheverud *et al.*, 2001).

Recombinant inbred (RI) strains of mice are valuable tools for the study of complex traits such as body weight (Liu *et al.*, 2001). RI strains are derived from systematic inbreeding of randomly selected pairs of the F₂ generation of a cross between two different inbred strains of mice. The SMXA RI strain is an existing RI strain derived from the mouse *SM/J* and the mouse *A/J* strains as progenitor strains. Both strains have been well-characterized and show differences in a variety of phenotypes, such as body weight (Nishimura *et al.*, 1995). Presently, 26 SMXA RI strains have been generated (Mori *et al.*, 1998). When RI strains are taken as a set, the segregation and gene mapping of a given trait can be analyzed based on the linkage of known marker genes (Anunciado *et al.*, 2000).

In this study, the focus is on the identification of the chromosomal regions involved in the regulation of the anteroposterior length of the mandible, as indicated by the distance between the sites corresponding to the menton and the gonion. We report on the genetic analysis of mandible size in the SMXA RI strain using QTL analysis.

MATERIALS & METHODS

Mice

A total of 230 mice obtained from parental strains (5 males and 5 females of each of *A/J* and *SM/J*) and 21 out of the 26 SMXA RI strains (5 males and 5 females of each of the 21 RI strains) was used. Five SMXA RI strains (SMXA-3, -6, -11, -21, and -23) were excluded from this study due to an insufficient number of samples being available. All mice were obtained from the Institute for Experimental Animals, Hamamatsu University School of Medicine (Hamamatsu, Japan), and were maintained under conventional conditions: 25 ± 2°C, 55 ± 5% humidity, and 12L/12D light. The mice were fed a commercial diet (MR Breeder, Nihon Nohsan Co., Kanagawa, Japan) and tap water *ad libitum*. The animal-use protocol in this study was reviewed and approved by the Nihon University Institutional Review Board.

Received November 12, 2001; Last revision May 6, 2002; Accepted May 15, 2002

Preparation and Measurement of Mandibles

The mice used were 90 days old, and each was anesthetized with ether immediately before death. The heads were soaked in 10% KOH at 43°C for 48 hrs, and the soft tissue was removed. The mandible bones were then washed with water and dried.

The left and right sides of the dried mandible were put on sectional paper with a 1 mm graduation, and the size of the mandible was scaled up to double its original size by means of a duplicator (Canon Co., Japan). The distance between the menton and gonion points was measured as shown in Fig. 1. From these results, the mean values in the left and right sides of the mandibles of each strain were calculated.

QTL Analysis

The Strain Distribution Pattern (SDP) of 789 polymorphic markers reported in a previous study (Mori *et al.*, 1998) was used in the QTL analysis, but because of the clustering of the marker loci, the net number of loci showing a different SDP was 400. Interval mapping was performed with the use of Map Manager QT b28 (Manly, 1993). With the results of interval mapping, the Likelihood Ratio Statistic

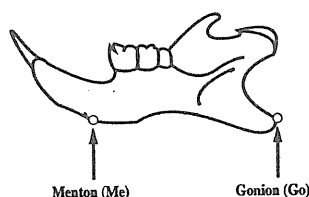


Figure 1. Measurement landmarks on the mandible. Outline of a mouse mandible showing the 2 landmark points that were measured. The point located at the anterior region is the menton and that at the posterior region is the gonion.

may be obtained, a value of additive effect and trait variance. At each marker locus, the significance of the trait association was tested by the logarithm of the odds (LOD) statistic. We obtained the LOD score by dividing the Likelihood Ratio Statistic by 4.605 (Anunciado *et al.*, 2000). The significance threshold for the genome-wide scan was computed by means of a permutation test with 1000 permuted

datasets (Doerge and Churchill, 1996). The permutation test is a method of establishing the significance of the Likelihood Ratio Statistic generated by interval mapping. As a result of these tests, the LOD scores used for detecting suggestive/significant associations for the mandible length were 2.2/3.8 in males and 2.3/4.0 in females.

RESULTS

Measurements of Mandible Size in Each Strain

The mean values of the menton-gonion measurements in each strain are shown in Fig. 2. The mandible was extremely large in males of the SMXA-25 strain (18.2 ± 0.1 mm) and small in females of the SMXA-1 strain (15.7 ± 0.1 mm). For the mean values for males and females, the mandible was large in A/J (17.9 ± 0.1 mm) and small in SM/J (15.9 ± 0.2 mm). The mandible sizes formed a continuous size distribution.

QTL Analysis

Fig. 3 shows the results of the QTL analysis for mandible length. Three suggestive QTLs and two significant QTLs were detected in males and females. Around the region 60 cM from the centromere in chromosome 10, the LOD score showed a higher than suggestive level (LOD, 2.9; additive effect, 0.43; trait variance, 40% in females). The 95% confidence interval was located between the markers *D10Mit2* and *D10Mit14*.

In the proximal region of chromosome 11, two significant QTLs were detected in females. The first peak LOD score was located at the region 13 cM from the centromere between the markers *D11Mit152* and *Hba*, and the second peak LOD score was located at the region 16 cM between the markers *D11Mit229* and *D11Mit163*. These regions correspond to the 95% confidence interval. The LOD scores were 5.1 at the two peaks in females (additive effect, -0.49; trait variance, 66%). The LOD scores from males, 2.6 and 2.3 at the two peaks, indicate suggestive levels in the same regions of chromosome 11 (additive effect, -0.32; trait variance, 36%). Significant or suggestive QTLs were not obtained in the other chromosomes.

DISCUSSION

We have reported that F1 mice obtained by the crossbreeding of mice with small and large mandibles showed the characteristics of the parent strain mice with larger mandibles. From measurement of 24 reference points in the mandible, the distance between the menton and gonion showed a significant dominant inheritance compared with other distances between reference points. This finding suggests that the distance between the menton and gonion was available as a phenotype for analyzing the genes that determined mandible length (Okamoto *et al.*, 1997).

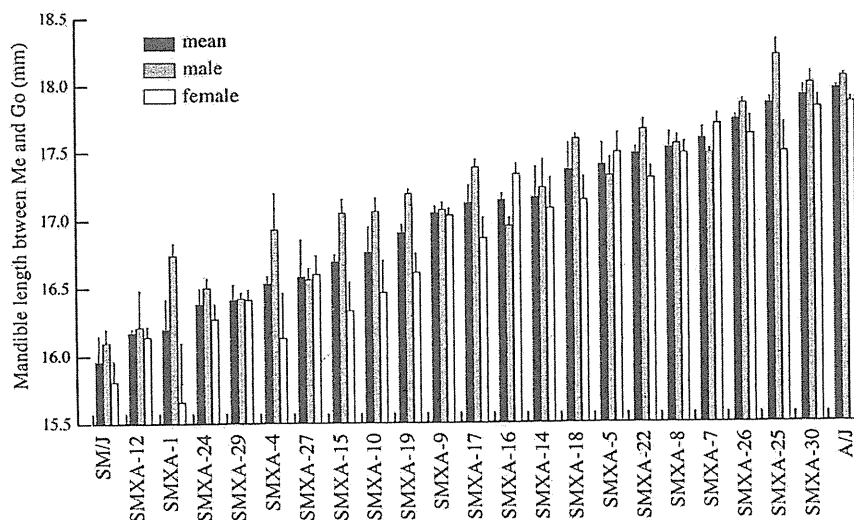


Figure 2. Distribution of the mandible sizes in 21 of the SMXA RI strains and 2 parental strains (SM/J and A/J). The bars colored black, white, and gray indicate data from the means of males ($n = 5$), females ($n = 5$), and males and females ($n = 10$), respectively. The histogram is arranged in order of increasing mean sizes. The data represent means \pm SD. The mandible size in the Fig. is scaled up to double the actual size (see MATERIALS & METHODS).

The SDP corresponding to this genotype was reported in a previous study (Mori *et al.*, 1998). Fig. 4 shows the genotypes in the proximal region of chromosome 11. The genotypes of SMXA-12, -1, -24, -29, -4, -27, -15, -10, and -19 were derived from the SM/J allele between the markers *Hba* and *D11Mit163*. These SMXA RI strains showed a small or intermediate-sized mandible. Moreover, the SMXA RI strains show a large mandible (SMXA-7, -26, -25, and -30), indicating genotypes derived from the A/J allele in the same region except for the locus of *D11Mit229*. These results suggest that the major gene(s) responsible for mandible length were located in the region between markers *Hba* and *D11Mit163*, a distance that was 3 cM, except at *D11Mit229*.

In chromosome 10 of the SMXA-26, -7, and -30, which had large mandibles, it was indicated that the genotype was derived from the SM/J allele. In the SMXA-1, -4, and -12, which had small mandibles, it was indicated that the genotype was derived from the A/J allele between the markers *D10Mit70* and *D10Mit136*. The effect of this region was opposite that of chromosome 11. The SM/J allele on chromosome 10 for the QTL is associated with a large mandible size.

The mandible size was determined not only by genes located in chromosomes 10 and 11, since there were also several effects that were weak in other chromosomes. Because the number of strains in an RI set is limited in the mouse (26 strains for the SMXA), with use of a more stringent α level (which reduces the acceptable false-positive risk; $\alpha = 0.0001$), only effective QTLs were detected in this study (Belknap *et al.*, 1996).

The Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org/>) was searched for candidate genes according to their position at around 60 cM of chromosome 10 and between 13 cM and 16 cM of chromosome 11. The Mouse Genome Database scan revealed more than 10 genes as candidates for mandible size in chromosomes 10 and 11 (for example, *Syt*, *Myf5*, *Myf6*, *Kera*, *Lum*, *Kcnc2*, and *Kifc4b* on chromosome 10; *Mor2*, *Otx1*, *Cct4*, *Spnb2*, *Gek1*, *Hba*, and *Stk10* on chromosome 11). It is of interest that a candidate gene near the QTL for mandible size on chromosome 11 is *Otx1* (orthodenticle), a gene highly related to *Otx2*. Mouse embryos homozygous for a knockout allele of *Otx2* display a striking phenotype in which the entire brain rostral to rhombomere 3 is missing (Ang *et al.*, 1996). This clearly demonstrates the importance of this gene in rostral head development. The knockout

mice of *Otx1* display a less severe phenotype, but nonetheless indicate a critical role for *Otx1* in vertebrate head development (Acampora *et al.*, 1997). Interestingly, *Otx1* is also post-natally transcribed and translated in the pituitary gland. Cell culture experiments indicate that *Otx1* may activate transcription of the growth, follicle-stimulating, and luteinizing hormones, and of α -glycoprotein subunit genes (Acampora *et al.*, 1998). These studies and the results in this study suggest that *Otx1* is a potential candidate for the gene controlling mandible size.

The positions around 60 cM of the mouse chromosome 10 and between 13 cM and 16 cM of the mouse chromosome 11 correspond to regions 12q21 and 2p13 in human chromosomes, respectively. In this study, the experimental conditions were simplified by use of the SMXA RI strain whose chromosome was homozygous. If the result of this study is to be applied to clinical diagnoses, the effects of heterozygous chromosomes must be analyzed. However, focus can be placed on the two chromosomal regions 12q21 and 2p13. It might be possible to predict the mandible size of a patient before the termination of the growth of the maxillofacial bones by searching for the polymorphisms of these chromosomal regions, whether derived from large or small mandibles.

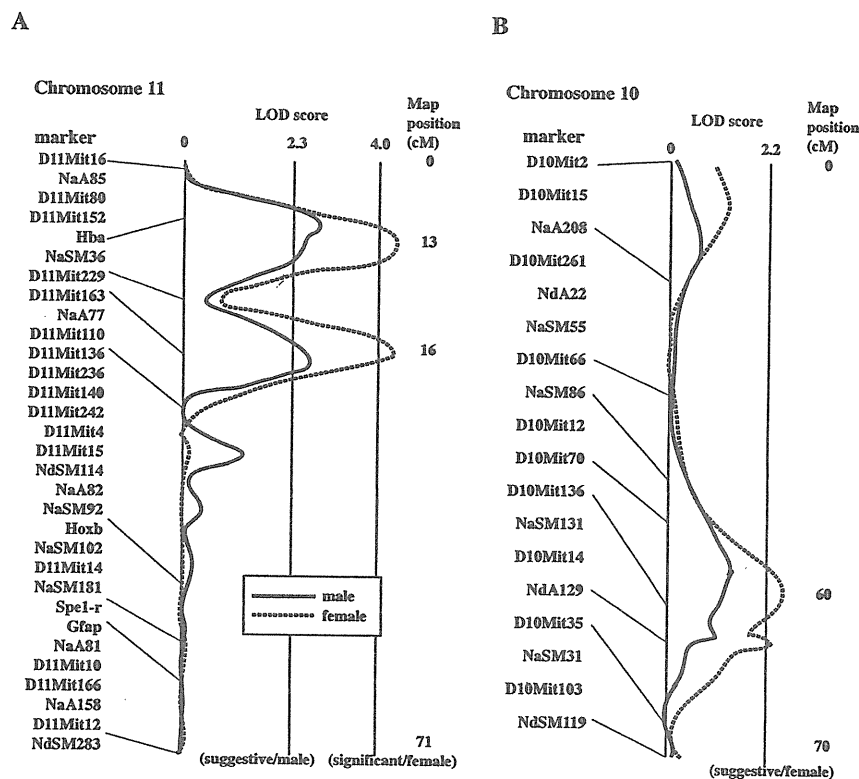


Figure 3. Plot of the LOD scores on chromosome 11 (A) and chromosome 10 (B). Shown in solid lines are the QTL data from males, and in the dotted lines are data from females. The vertical lines represented by the numeric values of 2.2, 2.3, and 4.0 indicate the suggestive levels in males, in females, and the significant levels in females, respectively. The top of the Fig. represents the centromere, and the bottom of the Fig. represents the telomere along the markers. Two significant QTLs in female and 2 suggestive QTLs are detected in the proximal region of chromosome 11 (A). In the distal region of chromosome 10, the suggestive QTL is detected in females (B). The map position in this Fig. represents the distance between the centromere and the marker that is near the peak LOD score.

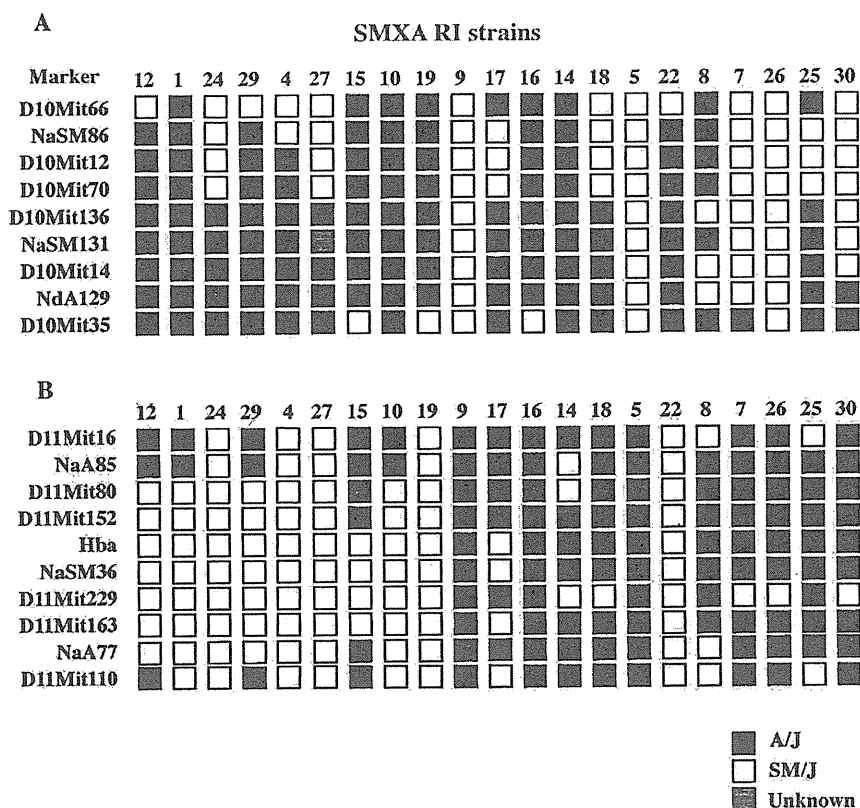


Figure 4. Strain distribution pattern (SDP) of chromosome 10 (A) and chromosome 11 (B) around the peak LOD scores. Genetic and microsatellite marker loci around the peak LOD scores are listed at the left side. Each column represents a genotype identified in each SMXA RI strain mouse. The black box indicates the A/J alleles, the white box indicates the SM/J allele, and the gray box indicates that the genotype was not determined.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. M. Nishimura (Hamamatsu University School of Medicine) for providing the SMXA RI strain mice. We also thank the members of the Department of Pediatric Dentistry for helpful discussions. This work was supported by a grant from Research for Frontier Science (The Ministry of Education, Science, Sports and Culture).

REFERENCES

- Acampora D, Avantsaggiato V, Tuorto F, Simeone A (1997). Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement. *Development* 124:3639-3650.
- Acampora D, Mazan S, Tuorto F, Avantsaggiato V, Tremblay JJ, Lazzaro D, *et al.* (1998). Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx1* reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH. *Development* 125:1229-1239.
- Ang SL, Jin O, Rhinn M, Daigle N, Stevenson L, Rossant J (1996). A targeted mouse *Otx2* mutation leads to severe defects in gastrulation and formation of axial mesoderm and to deletion of rostral brain. *Development* 122:243-252.
- Anunciado RV, Ohno T, Mori M, Ishikawa A, Tanaka S, Horio F, *et al.*

(2000). Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp Anim* 49:217-224.

- Belknap JK, Mitchell SR, O'Toole LA, Helms ML, Crabbe JC (1996). Type I and type II error rates for quantitative trait loci (QTL) mapping studies using recombinant inbred mouse strains. *Behav Genet* 26:149-160.
- Cheverud JM, Vaughn TT, Pletscher LS, Peripato AC, Adams ES, Erikson CF, *et al.* (2001). Genetic architecture of adiposity in the cross of LG/J and SM/J inbred mice. *Mamm Genome* 12:3-12.

- Doerge RW, Churchill GA (1996). Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* 142:285-294.
- Festing M (1972). Mouse strain identification. *Nature* 238:351-352.

- Francis-West P, Lander R, Barlow A, Graveson A (1998). Signaling interactions during facial development. *Mech Dev* 75:3-28.

- Goto N, Yamaoka A, Sudo T, Mannen H, Fukuta K, Nishimura M (1993). Morphometric profiles of the mandible of SMXA recombinant inbred strains of mice and strain identification on the basis of mandible measurements. *Jikken Dobutsu* 42:41-50.

- Klingenberg CP, Leamy LJ, Routman EJ, Cheverud JM (2001). Genetic architecture of mandible shape in mice: effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics. *Genetics* 157:785-802.

- Liu X, Oliver F, Brown SD, Denny P, Keightley PD (2001). High-resolution quantitative trait locus mapping for body weight in mice by recombinant progeny testing. *Genet Res* 77:191-197.

- Manly KF (1993). A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Mamm Genome* 4:303-313.

- Mori M, Akiyoshi S, Mizuno Y, Okuizumi H, Okazaki Y, Hayashizaki Y, *et al.* (1998). Genetic profile of the SMXA recombinant inbred mouse strains revealed with restriction landmark genomic scanning. *Mamm Genome* 9:695-709.

- Nadeau JH, Frankel WN (2000). The roads from phenotypic variation to gene discovery: mutagenesis versus QTLs. *Nat Genet* 25:381-384.

- Nishimura M, Hirayama N, Serikawa T, Kanehira K, Matsushima Y, Katoh H, *et al.* (1995). The SMXA: a new set of recombinant inbred strain of mice consisting of 26 substrains and their genetic profile. *Mamm Genome* 6:850-857.

- Okamoto K, Dohmoto A, Takei K, Ohta T, Komiya J, Matsubara K, *et al.* (1997). Study on hereditary pattern of the mandible shape in multiple models of inbred mouse strains. *Jpn J Pediatr Dent* 35:410-414.

Molecular Genetic Study of Dental Caries Susceptibility in Mice

Teruki Uematsu¹, Kunihiko Shimizu¹, Hitoshi Nakamura¹, Yosinobu Asada² and Takahide Maeda¹

¹Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 217-8587, JAPAN

²Department of Pediatric Dentistry, Tsurumi University School of Dental Medicine, Yokohama 230-8501, JAPAN

Correspondence to:

Dr. Teruki Uematsu

E-mail: akiraki@mascad.nihon-u.ac.jp

Key words

Inbred mice, Caries susceptibility, Molecular genetic study, DNA pooling method, *Streptococcus mutans*

Abstract

The purpose of this study was to identify the major candidate chromosome influencing susceptibility to dental caries in mice and to detect the region that contains it. Genetic factors affecting dental caries in mice were examined using two inbred strains of mice, C57BL/6J and C3H/HeJ, and these genetic crosses were inoculated with *Streptococcus mutans* serotype c (1.0×10^9 CFU/mouse). The caries scores for C3H/HeJ and C57BL/6J were 3.1 ± 2.6 and 39.8 ± 12.6 (Mean \pm S.D.), respectively. The mean caries score of the F1 hybrids was 17.6 ± 13.2 (Mean \pm S.D.) which was in the range 1 to 46. The caries scores of F2 [(C57BL \times C3H) \times (C57BL \times C3H)] mice had an extensive range from 0 to 68. These findings suggested that some genes play roles in caries development.

Based on our results with the genetic crosses, we used F2 intercross mice to investigate candidate chromosomal linkages using DNA pooling methods and obtained a valuable linkage on chromosomes 2 and 17. Thus, we concluded that one of the candidate genes controlling the genetic difference for the dental caries promoting ability between C3H/HeJ and C57BL/6J might be located on chromosomes 2 and 17.

Introduction

Dental caries is generated by common bacterial infection and is controlled by many complicated factors including oral flora, host and diet. For more than 100 years, the etiology of dental caries has been studied pathologically and bacteriologically, however, the relationship between host background and the progress of dental caries is not well understood(1, 2). With much attention now being focused on molecular genetic analysis of cariogenic microorganisms, the role of host genes in influencing susceptibility to caries needs further investigation. Increasing knowledge in this molecular genetic field will lead to identification of individuals at particular risk of dental decay, and will help in planning rational strategies for management and prevention. Although environmental factors such as diet and fluoride also clearly influence caries susceptibility(3-6), twin studies have shown that genetic factors also contribute to caries susceptibility(7, 8). The earliest and most convincing demonstration of a genetic contribution to caries came from breeding experiments in rats(9-14), but little was detailed about the host genetic background of this model. Previous studies showed that mouse models were powerful tools in

the study of genetic contribution to dental caries(15-17). A classic genetic study on the dental caries susceptibility in inbred strains of mice was reported by Maeda et al.(18), who performed genetic crosses using two strains of mice, C57BL/10J and AKR/J; it was suggested that a genetic factor with autosomal dominant inheritance affected the development of dental caries. There have also been studies of associations between caries in mice and known genetic markers such as H-2 type(19, 20). In the present study, to further investigate the relationship between host genes and cariogenicity, we estimated the genetic determination in mice for susceptibility to experimental dental caries under controlled environmental conditions. As an initial approach to detect a candidate gene controlling dental caries susceptibility to *Streptococcus mutans* JC-2 serotype c; (*S. mutans*), we performed chromosomal linkage analysis by using Simple Sequence Length Polymorphism (SSLP) marker on the whole chromosome.

Materials and Methods

Mice

C57BL/6J and C3H/HeJ were purchased from CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan). F1 (C57BL/6J x C3H/HeJ) and F2 intercross (F1 x F1) were obtained by mating mice in our laboratory. All mice were kept in clean racks (Nitto Air Tech., Japan) with HEPA filters at room temperature, 25 ± 1°C, and humidity of 55 ± 5%. Lighting was cycled in 12-hour intervals, and mice were fed ad lib on Diet 2000 (21) and pure bottled water. The growth and general health of individual strains were routinely monitored. The mouse-use protocol used in this study was reviewed and approved by the Nihon University Institutional Review Board.

Bacterial Strains and Culture Conditions

S. mutans JC-2 (serotype c), which is resistant to streptomycin (1.0 mg/ml), was used as the cariogenic agent. Before inoculation, the bacteria were cultured in 300 ml of brain-heart infusion broth (Difco, Detroit, Mich., USA) containing streptomycin (200 µg/ml) at 37°C for 18 h under an atmosphere of 95% N2 and 5% CO2. The cells were collected by centrifugation and suspended in 10 ml of the broth.

Experimental Design

1) Caries-Promoting Experiment.

The timetable of the experiment is presented in Figure 1. The mice were weaned at 21 days of age and fed on Diet 2000. From the 21st day after birth, they were infected for 7 days with *S. mutans* by inoculating 50 µl [10⁹ colony-

forming units (CFU)/ml] of a bacterial solution into the mouth of the animal. Colonization of the bacteria on the dental surface was confirmed at 28 days of age by placing a sterilized swab into the mouth to collect a sample, which was inoculated onto a Mitis salivarius agar (MS agar, Difco) plate supplemented with streptomycin (0.1 mg/ml). At 49 days of age, the animal was sacrificed under CO2, and the colonized bacteria recovered and caries lesions evaluated.

Calculation of Caries Score

After the soft tissues were removed, both sides of the mandible were immersed in murexide solution for 6 h for staining, washed with water, dried, and submitted to microscopic observation (x 60 magnification). Evaluation of the caries state was made according to the modified Keyes(22) [1958] method applicable to mice(17).

Molecular Analysis

DNA

Immediately after being killed, DNA was isolated from the spleen cells of the C57BL/6J, C3H/HeJ, F1 and F2 mice. Standard methods(23, 24) were used to prepare high molecular weight DNA.

SSLP.

53 MIT primers (Fig.2) were purchased from Research Genetic Inc., (Boston, MA) and were used to prime the polymerase chain reaction (PCR). These markers used in this study have been determined as an informative marker being polymorphisms between C57BL/6J and C3H/HeJ(25).

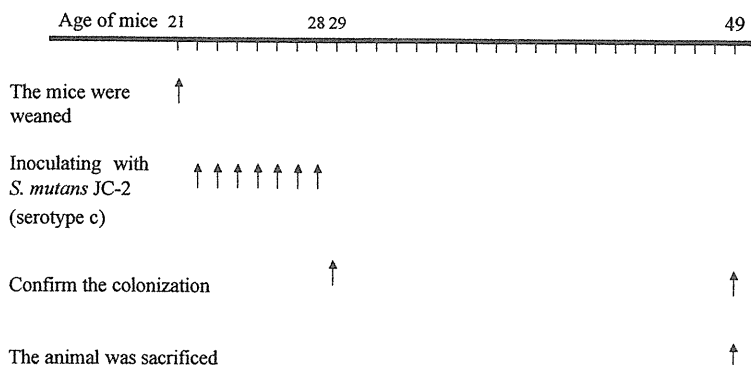


Fig. 1. Timetable of experiment.

PCR conditions

A TaKaRa 480 thermalcycler was used for PCR. The reaction mixture for PCR was as follows: 0.05 ul (1 unit) of Ex *Taq* polymerase (TaKaRa, Tokyo, Japan), 1.0 ul 10 x reaction buffer, 0.8 ul dNTPs mixture (2.5 mM each), 2.0 ul (total 25 ng) template DNA, 3.0ul MIT primer mixture (final concentration 0.52 uM) and 3.15 ul distilled water in a final volume of 10 ul. Amplification conditions were as follows: DNA denaturation 94°C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 55°C for 2 min, extension at 72°C for 2 min and a final extension

at 72°C for 10 min. The gels were stained with ethidium bromide for 8 min and the PCR products examined and photographed in ultraviolet light. DNA pooling methods (26,27).

Pooled genomic DNA from F2 intercross mice was tested to identify candidate chromosomal linkages. Genomic DNA extracted from 13 F2 mice, which had caries scores higher than the mean volume of those in C57BL/6J mice was pooled (pool A), and genomic DNA extracted from 14 F2 mice, which had caries scores lower than the mean volume of those in C3H/HeJ was also pooled (pool B). Pool A and

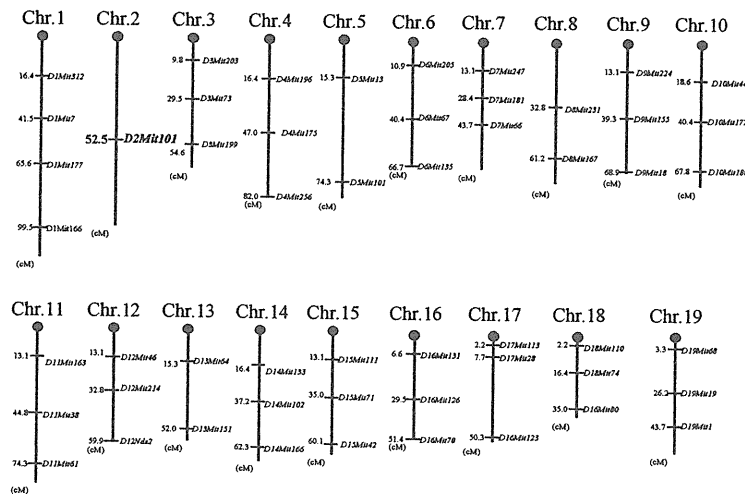


Fig. 2. Chromosomal locations of MIT markers.

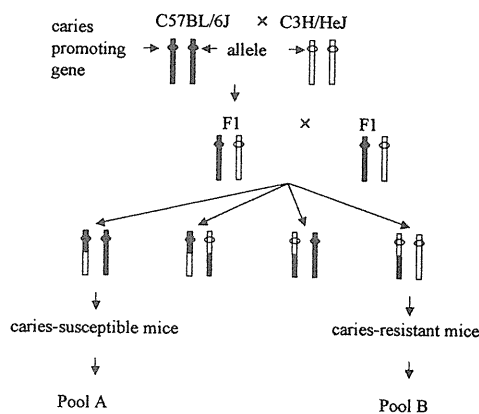


Fig. 3A. Interchromosomal recombination of homologous chromosomes in the genetic crosses and trends of caries promoting alleles.

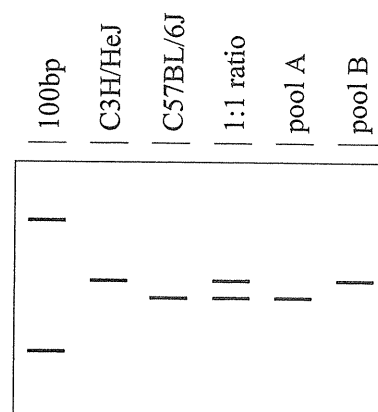


Fig. 3B. The schema of linkage analysis with DNA pooling method.

pool B DNAs were amplified by PCR with 53 MIT markers and the PCR products were separated by electrophoresis in 10% polyacrylamide gels. Interchromosomal recombination of homologous chromosomes in the genetic crosses and trends in the caries-promoting related alleles are shown in Fig.3A. If a genetic factor that affected caries development was linked to an MIT marker, the probability of interchromosomal recombination between the two loci was

very low. By contrast, if the related gene and the marker locus were not linked, the probability of interchromosomal recombination between the two loci was high. If marker loci were linked to a caries-promoting related allele the pool A DNA would be homozygous for the C57BL allele, whereas the pool B DNA would tend be homozygous for the C3H allele (Fig.3B).

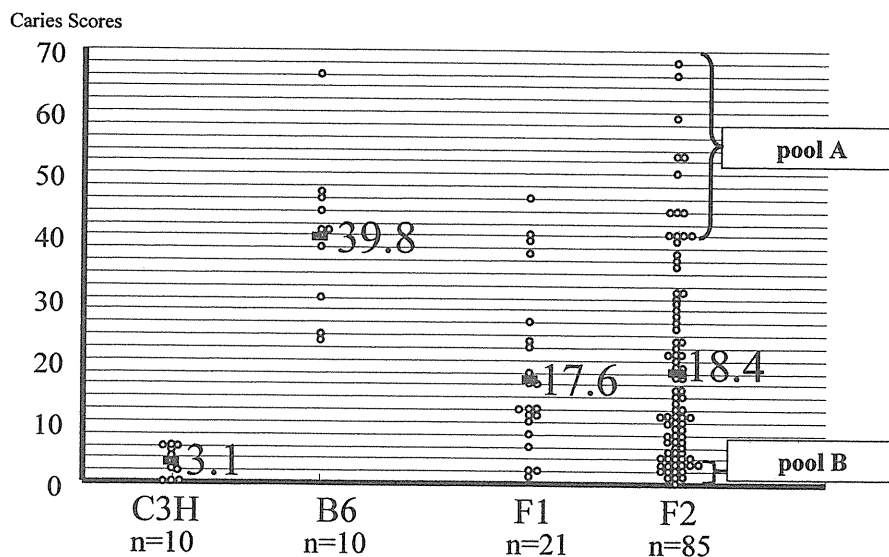


Fig. 4. Caries Scores of C3H, B6, F1 (C3H x B6) and F2 (F1 x F1) mice

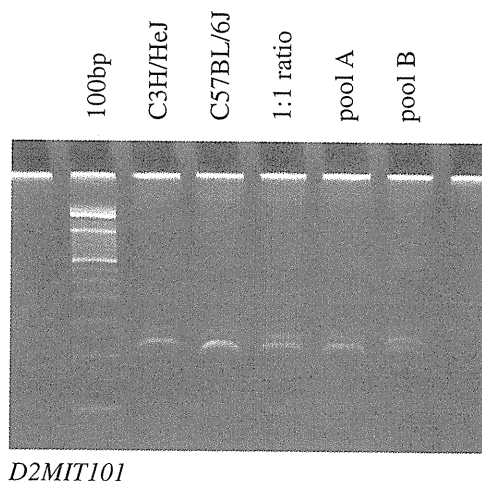


Fig. 5. PCR products for the DNA pools and for the C3H/HeJ , C57BL/6J and 1:1 mix controls

Results

Caries Susceptibility

C3H/HeJ (male) and C57BL/6J (female) mice were chosen for examination of inheritance of caries susceptibility. The caries scores for C3H/HeJ and C57BL/6J were 3.1 ± 2.6 and 39.8 ± 12.6 (Mean \pm S.D.), respectively. As shown in Fig.4, there was a 13-fold difference between C3H/HeJ and C57BL/6J in terms of caries development. The mean caries score of the F1 hybrids was 17.6 ± 13.2 (Mean \pm S.D.), in the range from 1 to 46. The F1 hybrids from crosses between susceptible and resistant mice had an intermediate level of caries scores. The F2 mice were obtained by mating F1 females and F1 males. The mean caries score of F2 intercross mice was 18.4 ± 16.5 (Mean \pm S.D.). The caries score of F2 mice had an extensive range from 0 to 68. Colonization of *S.mutans* in infected mice was also examined at the end of the experimental period. CFU values from C3H/HeJ and C57BL/6J mice were over 10^5 CFU/mandible (data not shown).

Candidate Linkage Tests by Typing Pooled DNA

To investigate the candidate linkage quickly and easily, pooled genomic DNA, rather than DNA samples from individual mice, were tested. In this study, candidate chromosomal linkage analysis with pooled DNA revealed that an MIT marker, *D2MIT101* was linked to caries-promoting related genes. *D2MIT101* identified homozygous alleles of C57BL in the pool A DNA and homozygous alleles of C3H in the pool B DNA (Fig.5). *D17MIT28* identified homozygous alleles of C57BL in the pool A DNA, but heterozygous alleles in the pool B DNA (data not shown).

Discussion

It has been determined that genetic and environmental factors contribute to dental caries prevalence in many ways(28, 29). In humans, the direct evidence for a genetic contribution comes from family studies of normal subjects including twin studies(30-32). Indirect evidence comes from the known genetic control of the various anatomical, physiological and immunological attributes implicated in the caries process. The associations between caries and known genetic markers such as ABO blood groups and major histocompatibility complex (MHC) alleles have also been studied(1, 2, 33-35). Some reports have suggested a

more significant contribution by genetic factors to dental caries than from environmental ones. As it is impossible to control experimental factors affecting human beings, experimental dental caries under controlled environmental conditions are essential to investigate the contribution of genetic factors in caries susceptibility. Hunt et al.(9) developed caries-susceptible and caries-resistant strains of rats, and suggested that heredity was an important factor in the prevalence of caries in these animals. A crossbreeding study between a caries-susceptible female and a caries-resistant male rat indicated that the caries susceptibility was determined to a great extent by genetic factors when investigated under controlled conditions(14). Inbred strains of mice have several advantages in dental and biomedical research compared to rat models. Navia and Hunt(36) and Ooshima et al.(37) also induced caries independently in PBB mice and ICR mice, respectively, after an inoculation with *S.mutans*. Even more systematic caries-promoting experiments were carried out by Kamp et al.(38), Obayashi (17), Kurihara et al. (19) and Maeda et al.(18). These studies reported reproducible caries induction in BALB/cJ, C57BL/6J, C57BL/10J and DBA/2NJ strains, which are well-characterized mouse strains. However, the caries-promoting ability of the three strains examined (AKR/J, C3H/HeJ and CBA/J) was significantly lower under the same experimental conditions. The effect of MHC on susceptibility to dental caries in mice was examined(20). To determine the H-2 effect on dental caries development in mice, they carried out caries-promoting experiments for BALB.K mice, a H-2 congenic strain in which the H-2 region was introduced from C3H/HeJ into BALB/cJ. Their findings showed a significant reduction of caries scores in the H-2 congenic mice. However, genetic factors other than the H-2 region located on chromosome 17 might also be involved in caries development because the caries scores of BALB/K were relatively high compared to C3H/HeJ. Therefore, in mice as well as in humans, the effect of MHC on dental caries development remains unclear. The possibility of the existence of other genes regulating caries promotion ability by using BXH recombinant strains established from systemic inbreeding between C3H/HeJ and C57BL/6J strains was also examined by Asada et al.(39). They demonstrated that the genetic factors associated with caries promoting ability might be located on chromosomes 2, 7

and 17. The aim of this study has been to identify the major candidate chromosome, and to detect the region that includes this candidate gene controlling dental caries susceptibility in mice. Candidate chromosomal analysis using the DNA pooling method was performed on genetic crosses of C3H/HeJ mice (caries-resistant strain) and C57BL/6J mice (caries-susceptible strain).

In this study, the mean caries scores for C3H and C57BL were 3.1 and 39.8, respectively. There was a 13-fold difference between C3H and C57BL in terms of caries development. The F1 hybrids had an intermediate level of caries scores for parental strains and the caries score of F2 mice had an extensive range from 0 to 68. These findings suggested that some genes play roles in caries development.

Based on our results from the genetic crosses, we searched for a candidate chromosome using pooled DNA from F2 intercross mice. For a wide scan of genome, using a pooled DNA method is faster and simpler because fewer PCR runs and gels are required. In the present study, we strongly identified candidate linkages on chromosome 2 using MIT markers and obtained the suggestive data through linkages on chromosome 17. Our findings also found support in previous studies(19, 20). Hence, we concluded that one of the candidate genes controlling the difference between C3H/HeJ and C57BL/6J in their dental caries promoting abilities was strongly located on chromosome 2 and suggestively so on chromosome 17. Linkage analysis using interval mapping of the candidate chromosomes that we have identified should provide new clues about the genetic control of caries development in mice.

Acknowledgments

This work was supported in part by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology to promote multi-disciplinary research projects and by a Nihon University Research Grant in 2001.

References

1. Lehner T, Lamb JR, Welsh KL, Batchelor RJ: Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries. *Nature*, 292: 770-772, 1981.
2. Yosiba N, Yosiba K, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H: Immunohistochemical localization of HLA-DR-positive cells in unerupted and erupted normal and carious human teeth. *J Dental Res*, 75:1585-1589, 1996.
3. Clark JK: On the bacterial in the etiology of dental caries. *Br J Exper Path* 5: 141-147, 1924.
4. Keyes PH: The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol*, 1: 304-320, 1960.
5. Caufield PW: Dental caries—a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. *Pediatr Dent*, 19: 491-498, 1997.
6. Caufield PW, Cutter GR, Dasanayake AP: Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res*, 72: 37-45, 1993.
7. Boraas JC, Messer LB, Till MJ: A genetic contribution to dental caries, occlusion, and morphology as demonstrated by twins reared apart. *J Dent Res*, 67: 1150-1155, 1988.
8. Corny JP, Messer LB, Boraas JC, Aeppli DP, Brouhard TJ Jr: Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol*, 38: 937-943, 1993.
9. Hunt HR, Hoppert CA, Erwin WG: Inheritance of susceptibility to caries in albino rats (*Musnorvegicus*). *J Dent Res*, 23: 385-401, 1944.
10. Shaw JH, Griffiths D: Evaluation of the degree of caries-susceptibility in a strain of rats. *Arch Oral Biol*, 3: 15-27, 1960.
11. Shaw JH, Griffiths D: Studies on the inheritance of dental caries in the Harvard strains of caries-susceptible and caries-resistant rats. *Arch Oral Biol*, 3: 247-257, 1961.
12. Larson RH, Simms ME: Genetic and environmental influence on dental caries in the Osborn-Mendel and the NIH black rat. *Arch Oral Biol*, 10: 663-668, 1965.
13. Chai CK, Hunt HR Hoppert CA, Rosen S: Hereditary basis of caries resistance in rats. *J Dent Res*, 47: 127-138, 1968.
14. Rosen S, Gerald TC, Anand CS, Hunt RH, Hoppert CA: Effect on caries of cross-breeding caries-resistant and caries-susceptible rats. *J Dent Res*, 41: 1033-1036, 1962.
15. Suzuki T: Caries Susceptibility of Mice of Different Strains Infected with *Streptococcus mutans*. *Jpn J Ped Dent*, 23: 198-203, 1985.
16. Naito T: Genetic Study in the Development of Dental Caries in Mice. *Nihon Univ J oral Sci*, 14: 393-399, 1988.
17. Obayashi K: Caries Susceptibility of Balb/c Mice to Caries Induction by *Streptococcus Serotype c, d, g* Strains. *Jpn J Ped Dent*, 22: 87-95, 1984.
18. Maeda T, Ogiwara K, Kurihara Y: Study on the Inheritance Patterns of Caries Susceptibility in Inbred Mice. *Jpn J Ped Dent*, 30: 618-623, 1992.
19. Kurihara Y, Naito T, Obayashi K, Hirasawa M, Kurihara Y, Moriwaki K.: Caries susceptibility in inbred mouse strains and inheritance patterns in F1 and backcross (N2) progeny from strains with high and low caries susceptibility. *Caries Res*, 25: 341-346, 1991.
20. Suzuki N, Kurihara Y, Kurihara Y.: Dental caries susceptibility in mice is closely linked to the H-2 region on chromosome 17. *Caries Res*, 32: 262-265, 1998.
21. Keyes PH, Jordan HV: Periodontal lesions in the Syrian hamster- $\bar{a}V$ findings related to an infections and transmissible

- component. *Arch Oral Biol*, 19: 377-400, 1964.
22. Keyes PH: Dental caries in the molar teeth of rats. A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously. *J Dent Res*, 37: 1088-1099, 1958.
 23. Taylor BA, Rowe L: A mouse linkage testing stock possessing multiple copies of the endogenous ecotropic murine leukemia virus genome. *Genomics*, 5: 221-232, 1989.
 24. Nomura R, Nakamura H, Matsune K, Shimizu T, Asada Y, Maeda T: Detection of informative SSLP markers for searching a causative gene(s) of absence of the third molars in EL mice. *Ped Dent J*, 10: 75-79, 2000.
 25. Eppig TJ, Blake AJ, Davisson TM, Richardson EJ: Infomatics for mouse genetics and genome mapping. *Methods*, 14: 179-190, 1998.
 26. Asada Y, Varnum DS, Frankel WN, Nadeau JH: A mutation in the *Ter* gene causing increased susceptibility to testicular teratomas maps to mouse chromosome 18. *Nat Genet*, 6: 363-368, 1994.
 27. Asada Y, Maeda T: Utility of the interval Mapping technique Using DNA Pools of inbred Mice. *J Nihon Univ Sch Dent*, 38: 78-86, 1996.
 28. Sofaer JA: Host genes and dental caries. *Br Dent J*, 175: 403-409, 1993.
 29. Reich E, Lussi A, Newbrun E: Caries-risk assessment. *Int Dent J*, 49: 15-26, 1999.
 30. Goodman HO, Luke JE, Rosen S, Hackel E: Heritability in dental caries, certain oral microflora and salivary components. *Am J Hum Genet*, 11: 263-273, 1959.
 31. Finn SB, Caldwell RC: Dental caries in twins. 1. A comparison of the caries experience in monozygotic twins, dizygotic twins and unrelated children. *Arch Oral Biol*, 8: 571-585, 1963.
 32. Gedda L, Brenci G, Oddi G: The chronogenetics of caries in primary dentition. *Acta Genet Med Gemellol*, 26: 17-20, 1977.
 33. Aitchison J, Carmichael AF: The relationship between ABO blood mutations and dental caries. *Dent Prac*, 13: 93-95, 1962.
 34. Jorgensen G: The ABO blood group-polymorphism in the multifactorial genetic system. *Humangenetik*, 3: 264-268, 1967.
 35. Gawrzewska B: Blood groups ABO, Rh/D and MN, group substances ABH in the saliva in relation to dental caries. *Czas Stomatol*, 31: 437-444, 1978.
 36. Navia JM, Hunt CE: The PBB mouse. A new model for the dental caries research. *J Dent Res*, 51: 249 (Abst), 1972.
 37. Ooshima T, Sobue S, Hamada S, Kotani S: Susceptibility of rats, hamsters, and mice to caries infection by *Streptococcus mutans* serotype c and g organism. *J Dent Res*, 60: 855-859, 1972.
 38. Kamp EM, Drost J, Huis in 't Veld JH, van Palenstein Helderma WH, Dirks OB: Reproducibility of dental caries in BALB/c mice induced by the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*, 28: 153-158, 1983.
 39. Asada Y, Tani H, Kurihara Y: Genetic analysis of mouse dental caries in BXH RI strain. *J Dent Res*, 71: 572 (Abst), 1992.

Mapping of affected gene(s) to dental caries susceptibility on mouse chromosome 2

Teruki Uematsu, Megumi Nariyama, Kunihiko Shimizu and Takahide Maeda

Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
2-870-1 Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 217-8587, JAPAN

Abstract The purpose of this study was to detect the region of the gene(s) influencing susceptibility to dental caries on mouse chromosome 2. Genetic factor(s) affecting dental caries in mice were examined using two inbred strains of mice, C57BL/6J and C3H/HeJ, and these genetic crosses in which were orally inoculated with *Streptococcus mutans* serotype *c* (1.0×10^9 CFU/mouse). The caries scores for C3H/HeJ and C57BL/6J were 3.1 ± 2.6 and 39.8 ± 12.6 (Mean \pm S.D.), respectively. The mean caries score of the F1 hybrid mice (C57BL \times C3H) was 17.6 ± 13.2 (Mean \pm S.D.) which was in the range from 1 to 46. The caries score of F2 [(C57BL \times C3H) \times (C57BL \times C3H)] mice was in the range from 0 to 68. These findings suggest that several genes play roles in caries development. Based on our results using the genetic crosses, we used F2 intercross mice to investigate candidate chromosomal linkages using DNA pooling methods and obtained a valuable linkage on chromosomes 2. Therefore, we obtained the data of the caries scores and genotypes in each Mit markers which markers were searched out the polymorphism between C3H/HeJ and C57BL/6J on mouse chromosomes 2. In the present study Quantitative Trait Loci (QTL) analysis was used to detect the chromosomal regions responsible for carious susceptibility. Widespread region on chromosome 2 was showed a higher than significant level with the Likelihood Ratio Statistic score between the markers *D2Mit463* and *D2Mit48*, corresponded to 13 cM and 71 cM from centromere. These results suggest that the major gene(s) responsible for caries susceptibility is located in these regions on chromosome 2.

Key words

Caries susceptibility,
Inbred mice,
Molecular genetic study,
Quantitative Trait Loci (QTL)
analysis,
Streptococcus mutans

Introduction

It is important to predict the factor influencing the development of dental caries at the earlier moment in the stage of the growth in pediatric dentistry. It is useful to find a host genetic factor and a defense mechanism influencing the development of dental caries, and it will contribute to develop the preventive strategies.

Dental caries is generated by common bacterial infection and is controlled by many complicated factors including oral flora, host and diet. For more than 100 years, the etiology of dental caries has been

studied pathologically and bacteriologically, however, the relationship between host background and the progress of dental caries is not well understood^{1,2)}. As regards interesting research on inheritance view, twins studies have shown that genetic factors also contribute to caries susceptibility^{3,4)}.

With much attention now being focused on molecular genetic analysis, the role of host genes in influencing susceptibility to caries needs further investigation. Increasing knowledge in the molecular genetic field will lead to identification of individuals at particular risk of dental decay, and will help in planning rational strategies for management and prevention of oral diseases. It is clear in clinical experiences that not only host susceptibility affects caries development, but also environmental factors

Received on September 30, 2002

Accepted on November 22, 2002

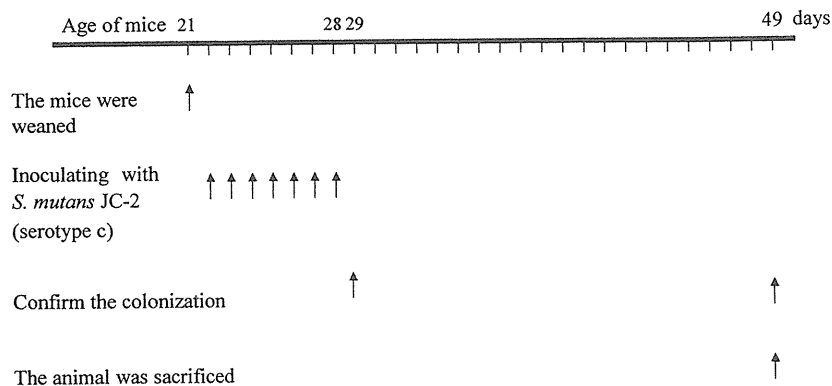


Fig. 1. Timetable of experiment

The horizontal line indicates the passage time of animal experiment. Performance timing of the mice weaning, *S. mutans* inoculation, confirmation of colonization and animal sacrificed are indicated by arrows.

such as diet and fluoride clearly influence caries development⁵⁻⁸). The earliest and most convincing demonstration of a genetic contribution to caries came from breeding experiments in rats⁹⁻¹⁴), however little was detailed about the host genetic background of this model. Previous studies showed that mouse models were powerful tools in the study of genetic contribution to dental caries¹⁵⁻¹⁷).

A classic genetic study on the dental caries susceptibility in inbred strains of mice was reported by Maeda *et al.*¹⁸), who performed genetic crosses using two strains of mice, C57BL/10J and AKR/J. Their study suggested that a genetic factor with autosomal dominant inheritance affected the development of dental caries. Furthermore there have also been studies of associations between caries in mice and known genetic markers such as H-2 type of major histocompatibility complex (MHC)^{19,20}).

To further investigate the relationship between host genes and cariogenicity, we estimated the genetic effects in mice for susceptibility to experimental dental caries under controlled environmental conditions. As an initial approach to detect a candidate gene controlling dental caries susceptibility depended on *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), JC-2 serotype c, the authors reported previously on the genetic analysis of caries susceptibility in inbred strains of mice using a pooled DNA method²¹). From the result of pooled DNA, chromosomes 2 was candidate significantly. In the present study, we examined the caries scores and the genotypes in MIT markers one of the genetic marker with polymorphism of simple

sequence length polymorphism (SSLP) between C3H/HeJ and C57BL/6J on chromosomes 2.

The purpose of this study was to detect the region that included the candidate gene(s) influencing dental caries susceptibility on chromosome 2 using Quantitative Trait Loci (QTL) analysis.

Materials and methods

Mice

C57BL/6J and C3H/HeJ were purchased from CLEA Japan Inc. (Tokyo, Japan). F1 hybrid (C57BL/6J × C3H/HeJ) and F2 intercross (F1 × F1) mice were obtained by mating the mice in our laboratory. All mice were kept in clean racks (Nitto Air Tech., Japan) with HEPA filters at room temperature, 25 ± 1°C, and humidity of 55 ± 5%. Lighting was cycled in 12-hour intervals, and mice were fed *ad lib* on Diet 2000²²) and pure bottled water. The growth and general health of individual strains were routinely monitored. The mouse-use protocol used in this study was reviewed and approved by the Nihon University Institutional Review Board.

Bacterial strains and culture conditions

S. mutans JC-2 (serotype c) which is resistant to streptomycin (1.0 mg/ml), was used as the cariogenic agent. Before inoculation to oral cavity of mouse, the bacteria was cultured in 300 ml of brain-heart infusion (BHI) broth (Difco, Detroit, Mich., USA) containing streptomycin (200 µg/ml) at 37°C for 18h under an atmosphere of 95% N₂ and 5%

CO₂. The cells were collected by centrifugation and re-suspended in 10 ml of the BHI broth.

Experimental design

1) Caries-Promoting Experiment

The timetable of the experiment is presented in Fig. 1. The mice were weaned at 21 days of age and fed on Diet 2000. From the 22nd day after birth, they were infected for 7 days with *S. mutans* by inoculating 1.0×10^9 CFU/mouse of a bacterial solution into the oral cavity of the animal. Colonization of the bacteria on the dental surface was confirmed at 29 days of age by placing a sterilized swab into the mouth to collect a sample, which was inoculated onto a Mitis Salivarius agar (Difco, Detroit, Mich., USA) plate supplemented with streptomycin (0.1 mg/ml). At 49 days of age, the animal was anesthetized with ether immediately before death and the mandible bone was removed, then colonized bacteria recovered and caries lesions evaluated.

2) Calculation of Caries Score

After the soft tissues were removed, both sides of the mandible were immersed in murexide solution for 6h for staining, washed with water, dried, and examine with a microscope ($\times 60$ magnification). Evaluation of the caries state was according to the modified Keyes method applicable to mice^{17,23}.

Molecular analysis

1. Extraction of genomic DNA

Genomic DNA was extracted from the spleen cells of the C57BL/6J, C3H/HeJ, F1 and F2 mice. Standard methods^{24,25} were used to prepare high molecular weight DNA.

2. Selection of the genetic marker for SSLP

Fourteen MIT primers (Fig. 2) were purchased from Research Genetic Inc., (Boston, MA) and were used to prime the polymerase chain reaction (PCR). These markers used in this study have been determined as an informative marker being polymorphisms between C57BL/6J and C3H/HeJ²⁶.

3. PCR conditions

A TaKaRa 480 thermalcycler was used for PCR. The reaction mixture for PCR was as follows: 0.05 μ l (1 unit) of Ex *Taq* polymerase (TaKaRa, Tokyo, Japan), 1.0 μ l $10 \times$ reaction buffer, 0.8 μ l dNTPs mixture (2.5 mM each), 2.0 μ l (total 25 ng) template DNA, 3.0 μ l MIT primer mixture (final concentration

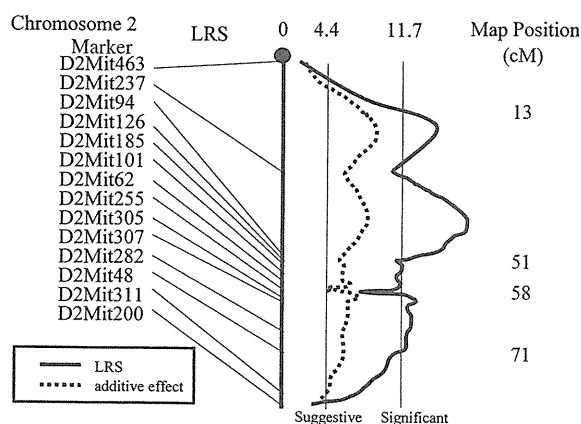


Fig. 2 Plot of the LRS scores on mouse chromosome 2. Shown in solid line is the QTL data from F2 mice. The left vertical line represented by mouse chromosome 2. The center and right vertical lines represented by the numeric values of 4.4 and 7.7 indicate the suggestive level and significant level, respectively. The top of the Fig. represents the centromere, and the bottom of the Fig. represents the telomere along the markers. The map position in this Fig. represents the distance between the centromere and the marker that is near the peak of LRS score.

0.52 μ M) and 3.15 μ l distilled water in a final volume of 10 μ l. Amplification conditions were as follows: DNA denaturation 94°C for 3 min, followed by 25 cycles of denaturation at 94°C for 15 sec, annealing at 55°C for 2 min, extension at 72°C for 2 min and a final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were electrophoresed in polyacrylamid gel and the gels were stained with ethidium bromide for 8 min, and photographed in ultraviolet light.

QTL analysis

Interval mapping that was one of the QTL analysis was performed with the use of MapManager QTXb11. With the results of interval mapping, the likelihood ratio statistic (LRS) score may be obtained, a value of additive effect and trait variance. The permutation test is a method of establishing the significance of the LRS generated by interval mapping^{27,28}.

Results

Caries susceptibility

C3H/HeJ and C57BL/6J mice as parent generation were selected to study the inheritance of caries susceptibility. The caries scores for C3H/HeJ and C57BL/6J were 3.1 ± 2.6 and 39.8 ± 12.6 (Mean \pm S.D.), respectively. As shown in Fig. 3, there was a 13-fold difference between C3H/HeJ and C57BL/

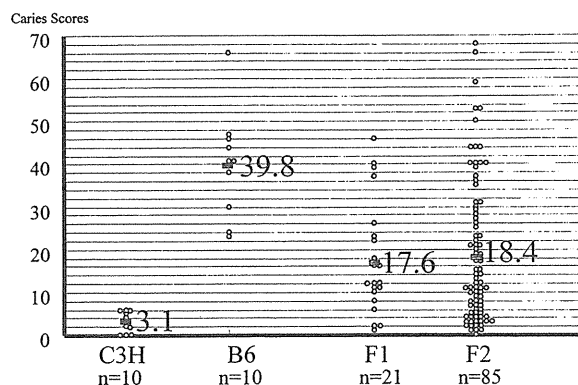


Fig. 3 Distribution of the caries scores from C3H, B6, F1 and F2 mice

Each point in four groups indicate the individual caries scores from C3H (n = 10), B6 (n = 10), F1 (n = 21) and F2 (n = 85) mice, respectively. In the each group, the data represent the means value.

6J in terms of caries development. The mean caries score of the F1 hybrids was 17.6 ± 13.2 (Mean \pm S.D.) in the range from 1 to 46. The F1 hybrids from crosses between susceptible (C57BL/6J) and resistant (C3H/HeJ) mice had an intermediate level of caries scores. The F2 mice were obtained by mating F1 females and F1 males, and in which mean caries score was 18.4 ± 16.5 (Mean \pm S.D.). The caries score of F2 mice had an extensive range from 0 to 68. Colonization of *S. mutans* in infected mice was also examined at the end of the experimental period. CFU values from C3H/HeJ, C57BL/6J, F1 and F2 mice were over 10^5 CFU/mandible (data not shown).

QTL analysis

Fig. 2 shows the results of the QTL analysis for caries score. As a result of the permutation test, the LRS used for detecting suggestive/significant associations for the caries score were 4.4/11.7. As a result of the QTL analysis, few significant QTLs were detected. The LRS showed a higher than significant level ($P < 0.01$) between the markers *D2Mit463* and *D2Mit48*.

Discussion

It has been determined that genetic and environmental factors contribute to dental caries prevalence in many ways^{29,30}. In humans, the direct evidence for a genetic contribution comes from family studies of

normal subjects including twins studies³¹⁻³³. Indirect evidence comes from the known genetic control of the various anatomical, physiological and immunological attributes implicated in the caries process. The associations between caries and known genetic markers such as ABO blood groups and MHC alleles have also been studied^{1,2,34-36}. It is impossible to clarify which factors of genetic and environmental affect strongly to dental caries. As it is not allow to control experimental factors affecting human beings, experimental dental caries under controlled environmental conditions are essential to investigate the contribution of genetic factors in caries susceptibility.

Hunt *et al.*⁹) developed caries-susceptible and caries-resistant strains of rats, and suggested that heredity was an important factor in the prevalence of caries in these animals. A crossbreeding study between a caries-susceptible female and a caries-resistant male rat indicated that the caries susceptibility was determined to a great extent by genetic factors when investigated under controlled conditions¹⁴. Inbred strains of mice have several advantages in dental and biomedical research compared to rat models. Navia and Hunt³⁷) and Ooshima *et al.*³⁸) also induced caries independently in PBB mice and ICR mice, respectively, after an inoculation with *S. mutans*. Even more systematic caries-promoting experiments were carried out by Kamp *et al.*³⁹), Obayashi¹⁷), Kurihara *et al.*¹⁹) and Maeda *et al.*¹⁸) These studies reported reproducible caries induction in BALB/cJ, C57BL/6J, C57BL/10J and DBA/2NJ strains, which are well-characterized mouse strains. However, the caries-promoting ability of the three strains examined (AKR/J, C3H/HeJ and CBA/J) was significantly lower under the same experimental conditions.

The effect of MHC in susceptibility to dental caries in mice was examined. To determine the H-2 effect on dental caries development in mice, Suzuki *et al.*²⁰) carried out caries-promoting experiments for BALB/K mice, a H-2 congenic strain in which the H-2 region was introduced from C3H/HeJ into BALB/cJ. Their findings showed a significant reduction of caries scores in the H-2 congenic mice. However, gene(s) except the H-2 region located on chromosome 17 might also be involved in caries development because the caries scores of BALB/K were relatively high compared to C3H/HeJ. Therefore, in mice as well as in humans, the effect of MHC on dental caries development remains unclear. The possibility of the existence of other genes regu-

lating caries promotion ability by using BXH recombinant strains established from systemic inbreeding between C3H/HeJ and C57BL/6J strains was also examined by Asada *et al.*⁴⁰⁾ They demonstrated that the genetic factors associated with caries promoting ability might be located on chromosomes 2, 7 and 17. Although some candidate chromosomes to relate caries development have been reported, previously we narrowed down chromosome 2 by the result of candidate chromosomal analysis using the DNA pooling method in genetic crosses of C3H/HeJ and C57BL/6J²¹⁾. For a wide scan of genome, using a pooled DNA method is faster and simpler because fewer PCR runs and gels are required. From an extensive range of the caries score of F2, it was cleared that some genes play roles in caries development.

QTL analysis has been very successful in identifying chromosomal regions in which gene(s) controlled the trait with quantitative effects depending on the multiple genes⁴¹⁻⁴³⁾. The use of inbred mice for genetic studies is advantageous, because it is easy to control the environmental conditions and the mouse genome has a high homology with human genes.

In this study, QTL analysis was performed on genetic crosses using two strains of mice and their genetic crosses: C57BL/6J (caries-susceptible strain), C3H/HeJ (caries-resistant strain), F1 (C57BL/6J × C3H/HeJ) and F2 intercross (F1 × F1) mice. An initial genome-wide screen with microsatellite markers was conducted by use of the DNA from F2 intercross (F1 × F1) mice.

As shown in Fig. 2, some region in chromosome 2 showed a higher than significant level with the LRS score. These results suggest that the one of the major gene(s) responsible for caries susceptibility is located in these regions on chromosome 2. The Mouse Genome Database (<http://www.informatics.jax.org/>) revealed some genes might be candidates for caries susceptibility in chromosomes 2 (for example, *B2m*, *Ir2*, *Gm3*, *Cacnb2* and *Ssb*).

As previous studies have shown that some genes within H-2 region regulate caries susceptibility, some genes related immune responses are paid attention. *B2m* (beta 2 microglobulin) reported as candidate gene to caries development by Asada *et al.*⁴⁰⁾ binds with heavy chain of MHC class I proteins, and associates with antigen presentation cell membrane⁴⁴⁾. *Ir2* (immune response-2) linked with H-2 regulate balance of helper T cell and suppressor T cell⁴⁵⁾ and *Gm 3* (granulocyte-macrophage antigen-3) is the major GSL (glycosphingolipid) of activated T cells

and T cell lines⁴⁶⁾. It is quite interest that those genes are located on chromosome 2. The other hands *Cacnb2* (calcium channel beta 2 subunit) has been shown to be a central player in most, if not all, functional aspects of Ca²⁺ channel⁴⁷⁾ and *Ssb* (Sjögren syndrome antigen B) which is one of autoantibodies to a polymerase III transcription factor, are frequently detected in the serum of patients with Sjögren syndrome⁴⁸⁾. Above two genes are related with salivary flow, and might be control the susceptibility to caries development.

Based on our results it is strongly suggested that the candidate gene(s) determining the susceptibility of caries development are located in the region from *D2Mit463* to *D2Mit311* on chromosome 2 in mice.

References

- 1) Lehner, T., Lamb, J.R., Welsh, K.L. and Batchelor, R.J.: Association between HLA-DR antigens and helper cell activity in the control of dental caries. *Nature* **292**: 770-772, 1981.
- 2) Yoshida, N., Yoshida, K., Nakamura, H., Iwaku, M. and Ozawa, H.: Immunohistochemical localization of HLA-DR-positive cells in unerupted and erupted normal and carious human teeth. *J Dent Res* **75**: 1585-1589, 1996.
- 3) Boraas, J.C., Messer, L.B. and Till, M.J.: A genetic contribution to dental caries, occlusion, and morphology as demonstrated by twins reared apart. *J Dent Res* **67**: 1150-1155, 1988.
- 4) Corny, J.P., Messer, L.B., Boraas, J.C., Aeppli, D.P. and Brouhard, T.J. Jr.: Dental caries and treatment characteristics in human twins reared apart. *Arch Oral Biol* **38**: 937-943, 1993.
- 5) Clark, J.K.: On the bacterial in the etiology of dental caries. *Br J Exper Path* **5**: 141-147, 1924.
- 6) Keyes, P.H.: The infectious and transmissible nature of experimental dental caries. *Arch Oral Biol* **1**: 304-320, 1960.
- 7) Caufield, P.W.: Dental caries—a transmissible and infectious disease revisited: a position paper. *Pediatr Dent* **19**: 491-498, 1997.
- 8) Caufield, P.W., Cutter, G.R. and Dasanayake, A.P.: Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res* **72**: 37-45, 1993.
- 9) Hunt, H.R., Hoppert, C.A. and Erwin, W.G.: Inheritance of susceptibility to caries in albino rats (*Mus norvegicus*). *J Dent Res* **23**: 385-401, 1944.
- 10) Shaw, J.H. and Griffiths, D.: Evaluation of the degree of caries-susceptibility in a strain of rats. *Arch Oral Biol* **3**: 15-27, 1960.
- 11) Shaw, J.H. and Griffiths, D.: Studies on the inheritance of dental caries in the Harvard strains of caries-susceptible and caries-resistant rats. *Arch Oral Biol* **3**: 247-257, 1961.

- 12) Larson, R.H. and Simms, M.E.: Genetic and environmental influence on dental caries in the Osborn-Mendel and the NIH black rat. *Arch Oral Biol* 10: 663–668, 1965.
- 13) Chai, C.K., Hunt, H.R. Hoppert, C.A. and Rosen, S.: Hereditary basis of caries resistance in rats. *J Dent Res* 47: 127–138, 1968.
- 14) Rosen, S., Gerald, T.C., Anand, C.S., Hunt, R.H. and Hoppert, C.A.: Effect on caries of cross-breeding caries-resistant and caries-susceptible rats. *J Dent Res* 41: 1033–1036, 1962.
- 15) Suzuki, T.: Caries susceptibility of mice of different strains infected with *Streptococcus mutans*. *Jpn J Ped Dent* 23: 198–203, 1985.
- 16) Naito, T.: Genetic study in the development of dental caries in mice. *Nihon Univ J Oral Sci* 14: 393–399, 1988.
- 17) Obayashi, K.: Caries susceptibility of Balb/c mice to caries induction by *Streptococcus serotype c, d, g* strains. *Jpn J Ped Dent* 22: 87–95, 1984.
- 18) Maeda, T., Ogiwara, K. and Kurihara, Y.: Study on the inheritance patterns of caries susceptibility in Inbred Mice. *Jpn J Ped Dent* 30: 618–623, 1992.
- 19) Kurihara, Y., Naito, T., Obayashi, K., Hirasawa, M., Kurihara, Y. and Moriwaki, K.: Caries susceptibility in inbred mouse strains and inheritance patterns in F1 and backcross (N2) progeny from strains with high and low caries susceptibility. *Caries Res* 25: 341–346, 1991.
- 20) Suzuki, N., Kurihara, Y. and Kurihara, Y.: Dental caries susceptibility in mice is closely linked to the H-2 region on chromosome 17. *Caries Res* 32: 262–265, 1998.
- 21) Uematsu, T., Shimizu, K., Nakamura, H., Asada, Y. and Maeda, T.: Molecular genetic study of dental caries susceptibility in mice. *Int J Oral-Med Sci* 1: 79–85, 2002.
- 22) Keyes, P.H. and Jordan, H.V.: Periodontal lesions in the strain hamster-III findings related to an infections and transmissible component. *Arch Oral Biol* 19: 377–400, 1964.
- 23) Keyes, P.H.: Dental caries in the molar teeth of rats. A method for diagnosing and scoring several types of lesions simultaneously. *J Dent Res* 37: 1088–1099, 1958.
- 24) Taylor, B.A. and Rowe, L.: A mouse linkage testing stock possessing multiple copies of the endogenous ecotropic murine leukemia virus genome. *Genomics* 5: 221–232, 1989.
- 25) Nomura, R., Nakamura, H., Matsune, K., Shimizu, T., Asada, Y. and Maeda, T.: Detection of informative SSLP markers for searching a causative gene(s) of absence of the third molars in EL mice. *Ped Dent J* 10: 75–79, 2000.
- 26) Eppig, T.J., Blake, A.J., Davisson, T.M. and Richardson, E.J.: Informatics for mouse genetics and genome mapping. *Methods* 14: 179–190, 1998.
- 27) Rikke, B.A. and Johnson, T.E.: Towards the cloning of genes underling murine QTLs. *Mamm Genome* 9: 969–968, 1998.
- 28) Manly, K.F.: A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data. *Mamm Genome* 4: 327–334, 1993.
- 29) Sofaer, J.A.: Host genes and dental caries. *Br Dent J* 175: 403–409, 1993.
- 30) Reich, E., Lussi, A. and Newbrun, E.: Caries-risk assessment. *Int Dent J* 49: 15–26, 1999.
- 31) Goodman, H.O., Luke, J.E., Rosen, S. and Hackel, E.: Heritability in dental caries, certain oral microflora and salivary components. *Am J Hum Genet* 11: 263–273, 1959.
- 32) Finn, S.B. and Caldwell, R.C.: Dental caries in twins. 1. A comparison of the caries experience of monozygotic twins, dizygotic twins and unrelated children. *Arch Oral Biol* 8: 571–585, 1963.
- 33) Gedda, L., Brenci, G. and Oddi, G.: The chronogenetics of caries in primary dentition. *Acta Genet Med Gemellol* 26: 17–20, 1977.
- 34) Aitchison, J. and Carmichael, A.F.: The relationship between the ABO blood mutations and dental caries. *Dent Prac* 13: 93–95, 1962.
- 35) Jorgensen, G.: The ABO blood group-polymorphism in the multifactorial genetic system. *Humangenetik* 3: 264–268, 1967.
- 36) Gawrzewska, B.: Blood groups ABO, Rh/D and MN, group substances ABH in the saliva in relation to dental caries. *Czas Stomatol* 31: 437–444, 1978.
- 37) Navia, J.M. and Hunt, C.E.: The PBB mouse. A new model for the dental caries research. *J Dent Res* 51: 249(Abst), 1972.
- 38) Ooshima, T., Sobue, S., Hamada, S. and Kotani, S.: Susceptibility of rats, hamsters, and mice to caries infection by *Streptococcus mutans* serotype c and g organism. *J Dent Res* 60: 855–859, 1972.
- 39) Kamp, E.M., Drost, J., Huis, in 't Veld J.H., van, Palenstein, Helderma, W.H. and Dirks, O.B.: Reproducibility of dental caries in BALB/c mice induced by the bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 28: 153–158, 1983.
- 40) Asada, Y., Tani, H. and Kurihara, Y.: Genetic analysis of mouse dental caries in BXH RI strain. *J Dent Res* 71: 572(Abst), 1992.
- 41) Nadeau, J.H., Singer, J.B., Matin, A. and Lander, E.S.: Analyzing complex genetic traits with chromosome substitution strains. *Nature Genet* 24: 221–225, 2000.
- 42) Anunciado, R.V.P., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, A., Horio, F., Nishimura, M. and Namikawa, T.: Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp Anim* 49: 217–224, 2000.
- 43) Nadeau, J.H. and Frankel, W.N.: The roads from phenotypic variation to gene versus QTLs. *Nature Genet* 25: 381–384, 2000.
- 44) Bard, J., Yamazaki, K., Curran, M., Boyse, E.A. and Beauchamp, G.K.: Effect of B2m gene disruption on MHC-determined odortypes. *Immunogenetics* 51: 514–518, 2000.
- 45) Sadegh-Nasseri, S., Dessi, V. and Sercarz, E.E.: Selective reversal of H-2-linked genetic unrespon-

MOLECULAR GENETIC STUDY OF DENTAL CARIES IN MICE CHROMOSOME 2

- siveness to lysozymes. II. Alteration in the T helper/T suppressor balance, owing to gene(s) linked to Ir-2, leads to responsiveness in BALB.B. *Eur J Immunol* **16**: 486–921, 1986.
- 46) Kniep, B., Cinek, T., Angelisova, P. and Horejsi, V.: Association of the GPI-anchored leucocyte surface glycoproteins with ganglioside GM3. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1069–1075, 1994.
- 47) Yamada, Y., Nagashima, M., Tsutsuura, M., Kobayashi, T., Seki, S., Makita, N., Horio, Y. and Tohse, N.: Cloning of a functional splice variant of L-type calcium channel beta 2 subunit from rat heart. *J Biol Chem* **276**: 47163–47170, 2001.
- 48) Bini, P., Chu, J.L., Okolo, C. and Elkon, K.: Analysis of autoantibodies to recombinant La (SS-B) peptides in systemic lupus erythematosus and primary Sjögren's syndrome. *J Clin Invest* **85**: 325–333, 1990.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery 44 (2006) 49–51



BRITISH
Journal of
Oral and
Maxillofacial
Surgery

www.bjoms.com

Short communication

Taste after reduction of the tongue in Beckwith–Wiedemann syndrome

Kensuke Matsune^{a,*}, Katsumi Miyoshi^a, Rika Kosaki^b,
Hirofumi Ohashi^b, Takahide Maeda^a

^a Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, 2-870-1 Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

^b Division of Medical Genetics, Saitama Children's Medical Center, Iwatsuki, Japan

Received 7 June 2004; accepted 28 March 2005

Available online 17 May 2005

Abstract

We tested the sensitivity of taste after reduction of the tongue in four girls with Beckwith–Wiedemann syndrome. No patient had taste blindness, but the ability to detect salty and bitter tastes declined after reduction of the tongue.

© 2005 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Macroglossia; Salty taste; Bitter taste; Taste disk

Introduction

Beckwith–Wiedemann syndrome is a congenital condition with characteristic abnormalities including: macroglossia (97%), prenatal and postnatal overgrowth (88%), and defects and hernias of the abdominal wall (80%).^{1–3} Previous studies have shown that macroglossia can cause dental problems including protruding mandible, anterior open bite, obtuse gonial angle, and increased mandibular length.⁴ To prevent these complications, reduction of the tongue together with early functional treatment may be effective.^{5,6} However, patients and families may have substantial concerns about possible changes in ability to taste after reduction of the tongue. We studied taste after reduction of the tongue in four patients with Beckwith–Wiedemann syndrome.

Patients and methods

Patients

Four girls with Beckwith–Wiedemann syndrome (aged 6–10 years) were followed-up at the Saitama Children's Medical Center (Saitama, Japan) for more than three years after they had had reduction of the tongue (Table 1).

Methods

Taste was tested by filter papers (Taste Disk, Sanwa kagaku kenkyusho). Filter disks were impregnated with each taste (Table 2); the disk was then applied to the central region and 2 cm on the right or left side of the central region of the tip of the tongue. The threshold of taste detection was scored by a six-stage system by testing increasing concentrations for each taste. All data were compared with values for normal Japanese children (eight girls and three boys, aged 4–15 years), and differences were evaluated by Student's *t*-test.

* Corresponding author. Tel.: +81 47 360 9430;
fax: +81 47 364 6295.

E-mail address: ken@mascad.nihon-u.ac.jp (K. Matsune).

Table 1
Signs and symptoms of the Beckwith–Wiedemann syndrome in four girls

	Case No.			
	1	2	3	4
Age (years)	6	6	8	10
Macroglossia	Yes	Yes	Yes	Yes
Somatic gigantism in infancy	Yes	Yes	Yes	Yes
Abdominal wall defects and hernias	Yes	Yes	Yes	Yes
Technique of partial glossectomy	Rheinwald	Egydi and Obwegeser	Rheinwald	Rheinwald
Years after tongue reduction	3	3	3	7

Table 2
Concentrations of the taste and six stage evaluations

Taste	1	2	3	4	5	6
Sweet 4000	15 (0.35)	125 (2.5)	500 (10)	1000 (20)	4000 (80)	>4000
Salty	15 (0.35)	62.5 (1.25)	250 (5)	500 (10)	1000 (20)	>1000
Acid	1 (0.02)	10 (0.2)	100 (2)	200 (4)	400 (8)	>400
Bitter	0.05 (0.001)	1 (0.02)	5 (0.1)	25 (0.5)	200 (4)	>200

Data are mg (%). Sweet = refining white sugar; salty = sodium chloride; acid = tartaric acid; bitter = quinine chloride.

Table 3
Mean (S.D.) score of each taste at three points

		Taste			
		Sweet	Salty	Acid	Bitter
Central	BW	3.00 ± 2.45	4.50 ± 1.29 ^a	3.00 ± 1.63	4.00 ± 1.41 ^a
	Control	2.18 ± 0.75	2.09 ± 1.51 ^a	2.45 ± 1.37	2.18 ± 0.98 ^a
Right	BW	2.25 ± 1.26	4.00 ± 2.16	2.00 ± 0.82	3.50 ± 1.73
	Control	2.45 ± 0.52	2.73 ± 1.74	2.45 ± 0.93	2.73 ± 1.56
Left	BW	2.00 ± 1.41	4.00 ± 1.63 ^b	2.50 ± 0.58	4.00 ± 1.63
	Control	2.27 ± 0.47	1.82 ± 0.60 ^b	2.64 ± 1.43	2.91 ± 1.30

BW = Beckwith–Wiedemann syndrome.

^a $p < 0.05$.

^b $p < 0.01$.

Results

The scores for salty and bitter tastes in the central region and the scores for the salty taste in the left side were significantly higher than the values for normal Japanese children (Table 3).

Discussion

As the tip of the tongue is highly sensitive to various tastes, when the volume of the tongue is reduced including this area, the changes in taste are a substantial concern for patients and families. Niki et al. reported that tastes for acidity and bitter was in the central region of the tip of the tongue in a patient with Beckwith–Wiedemann syndrome and declined after reduction of the tongue.⁷ Our study showed significantly higher taste thresholds for salty and bitter tastes in the central region and for salty taste in the left side region than those values

in normal Japanese children. These studies suggest that the tastes of patients with Beckwith–Wiedemann syndrome decline after reduction of the tongue. Further study is required to decide whether the decline in taste after reduction of the tongue influences the diet of patients.

References

- Engström W, Lindham S, Schofield P. Wiedemann–Beckwith syndrome. *Eur J Pediatr* 1998;147:450–7.
- Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y. An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith–Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 1996;14:171–3.
- Elliott M, Bayly R, Cole T, Temple IK, Maher ER. Clinical features and natural history of Beckwith–Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases. *Clin Genet* 1996;46:168–74.
- Dios PD, Posse JL, Sanroman JF, Garia EV. Treatment of macroglossia in a child with Beckwith–Wiedemann syndrome. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58:1058–61.

5. Miyawaki S, Oya S, Noguchi H, Takano-Yamamoto T. Long-term changes in dentoskeletal pattern in a case with Beckwith–Wiedemann syndrome following tongue reduction and orthodontic treatment. *Angle Orthod* 2000;**70**:326–31.
6. Amino K, Kobayashi K. A case reported of openbite malocclusion with Beckwith–Wiedemann syndrome. *Nishinon Kyousei shikagaku Zasshi* 1995;**40**:74–82 [in Japanese].
7. Niki H, Uchida H, Nakamura S, Ogawa F, Matsumoto K, Kakudo K. A case of Beckwith–Wiedemann syndrome in a patient undergoing partial tongue resection for macroglossia. *Jpn J Oral Maxillofac Surg* 2000;**46**:93–5, [in Japanese].

11614

Porphyromonas gingivalis gingipain 遺伝子マイクロアレイの開発

平塚 浩一 荒木 誠

江間 みどり 安孫子 宣光

(日本大学松戸歯学部生化学講座, 口腔科学研究所)

口腔内細菌の *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*) は, 成人性歯周炎の有力な原因菌であるとされている¹⁾. 歯周病の発症機序として歯周病原細菌が直接的に宿主の歯周組織破壊を引き起こすことが示唆されており²⁾, 特に本菌の赤血球凝集活性を有する gingipain グループが重要な働きを持つと言われている. 本酵素について, 補体成分を分解することで補体系依存性の殺菌作用を低下させる³⁾, カリクレインを活性化してキニン産生を促進することで炎症を進展させる⁴⁾ また TNF- α を分解することでサイトカインネットワークを破壊する⁵⁾, などの役割が報告されている. 近年, 本酵素の遺伝子構造が解明された結果, 同一遺伝子上にプロテアーゼの酵素活性中心と赤血球凝集部位の機能ドメインを合わせ持つており, Arg 残基を切断する *rgp A*, *rgp B* と Lys 残基を切断する *kgp* 遺伝子が存在することが知られている⁶⁾.

一方, 歯周病態とくに疾病活動性の診査に感染病原菌の同定が必須であるといわれているが, 近年, 同菌種であっても個々の患者分離株で病原性の強さに差異があることが示唆されている. 病原因子の遺伝子発現レベルが異なれば, 遺伝子産物の発現量も異なり, 病原性の差異が生じると考えられる. したがって疾病活動性の診断には細菌種の同定だけでは不十分であり, 病原因子遺伝子の mRNA レベルの診査が有効と考えられる. 本研究では, *P. gingivalis* の gingipain 遺伝子の発現量レベルをモニターできる検査システムの構築をめざして *rgp A*, *rgp B*, *kgp* 遺伝子のデータベースから特異領域を設計し DNA マイクロアレイを開発した.

材料と方法

設計した *rgp A*, *rgp B* および *kgp* 遺伝子 PCR 用プライマーを表1に示した. また *rgp A* および *rgp B* 遺伝子に共通の領域もまた *rgp* として設計した. PCR による増幅は

English Title for No. 11614: Development of DNA microarray for *Porphyromonas gingivalis* gingipain genes. Koichi Hiratsuka, Makoto Araki, Midori Ema and Yoshimitsu Abiko [Department of Biochemistry and Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba.] *Medicine and Biology*. 144(4): 133-137, April 10, 2002. (著者校正)

Taq DNA ポリメラーゼを用いて 94°C (30 秒), 55°C (30 秒), 72°C (30 秒) の繰返しを 30 回行った. 精製後, マイクロアレイスポッター (GEMIII, molecular dynamics 社製) にてアレイ上にスポットティングした. *P. gingivalis* 菌体を early log, mid log, late log および stationary phase にて集菌し, Trizol (インビトロジェン社製) を加え, 菌体破砕器 (FastPrep, BIO101 社製) を用いて全 RNA を抽出した. ランダムプライマーを用いて蛍光色素 (Cy5) 標識 dUTP 存在下, RT を行い, 蛍光標識 cDNA を作成した. 蛍光標識 cDNA をアレイ上で 16 時間ハイブリダイゼーションを施し, 洗浄後, 蛍光スキャナー (GenePix 4000A, molecular dynamics 社製) にて検出し, 遺伝子発現解析ソフト (GeneSpring, Silicon Genetics 社製) にて発現解析を行った. 16S rRNA の PCR 産物をアレイ上に貼付けたものを標準化の指標遺伝子として取り扱った.

結果

rgp A, *rgp B*, *kgp* 遺伝子地図の特異領域から PCR 用 DNA プライマーを設計し (図 1), W83 株の染色体 DNA をテンプレートにして PCR 法により特異的領域の増幅を行った結果, いずれも期待される PCR サイズの単一バンドとして増

表 1 PCR 用プライマー

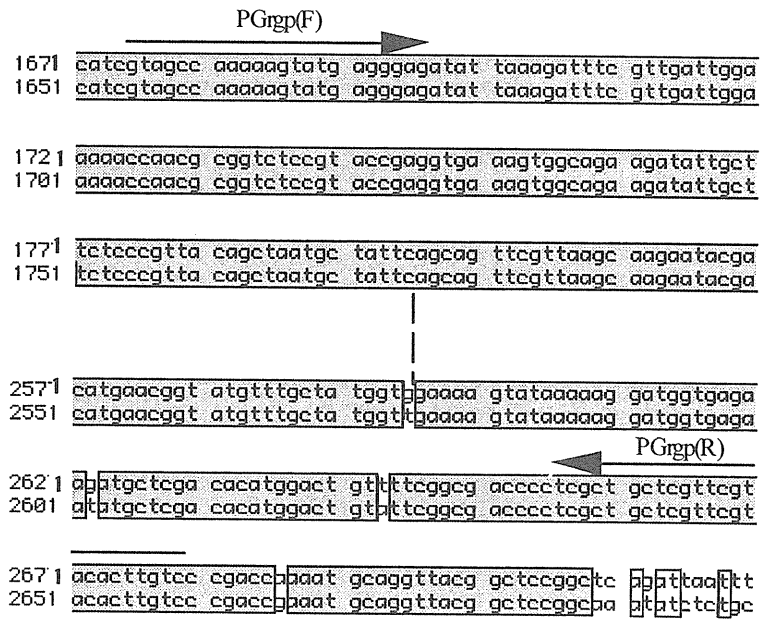
Gene	Genebank ID	Product		Forward/Reverse primer	PCR product(bp)
rgp	U15282/U85038 共通領域	Arg-gingipain (RGP)	PGrgp (F)	5'-CGTAGCCAAAAAGTATGAGGGAGA-3'	1,005
			PGrgp (R)	5'-ACAAGTGTACGAACGAGCAGCGAG-3'	
rgpA	U15282	Arg-gingipain-A, (RGP-A)	PGrgp1 (F)	5'-AGCACGCTTACCCTTACAGTAGTT-3'	275
			PGrgp1 (R)	5'-TCAAGAACAATCTCGGCTGACCG-3'	
rgpB	U85038	Arg-gingipain-B, (RGP-B)	PGrgp2 (F)	5'-TCGCTGATGAAACGAACCTTGACGC-3'	205
			PGrgp2 (R)	5'-TTCGAATACCATGCGGTTCTTAGC-3'	
kgp	U68468	Lys-gingipain (KGP)	PGkgp (F)	5'-TACTTTCGCCTCAGTCTCAATTCC-3'	749
			PGkgp (R)	5'-CAACCAAAGCCAAGAAGACCGGAG-3'	

幅された (図 2). 作成した cDNA マイクロアレイに対して, 各培養時期で採取した菌体から蛍光標識した cDNA 試料を作成し, アレイ上でハイブリダイズさせた結果の蛍光強度を測定し, 16s rRNA の蛍光強度で各遺伝子の蛍光強度を標準化した後の変化倍率と各培養時期との関連を図 3 に示した. その結果, late-log 期に *rgpA*, *rgpB*, *kgp* 遺伝子の発現が最も高いことが明らかになった.

考察

歯周病が口腔感染症であることから, また, 歯周病型-特異病原菌説が提唱されていることから歯周病感染菌の細菌検査が不可欠であり, 迅速で再現性のよい細菌検査法の開発が求められている. 従来, 細菌検査には培養法, 顕微鏡的検査, 特異抗体法が行われてきたが交差反応の可能性や煩雑な操作性から臨床レベルでのシステム化は難しい. 近年, バイオテクノロジー技術の進歩によって歯周病関連菌の特異性の高い遺伝子を量産できるようになった. 遺伝子プローブを応用し

A. *rgp* 共通プライマー



B. *rgp*-Aおよび*rgp*-B特異的プライマー

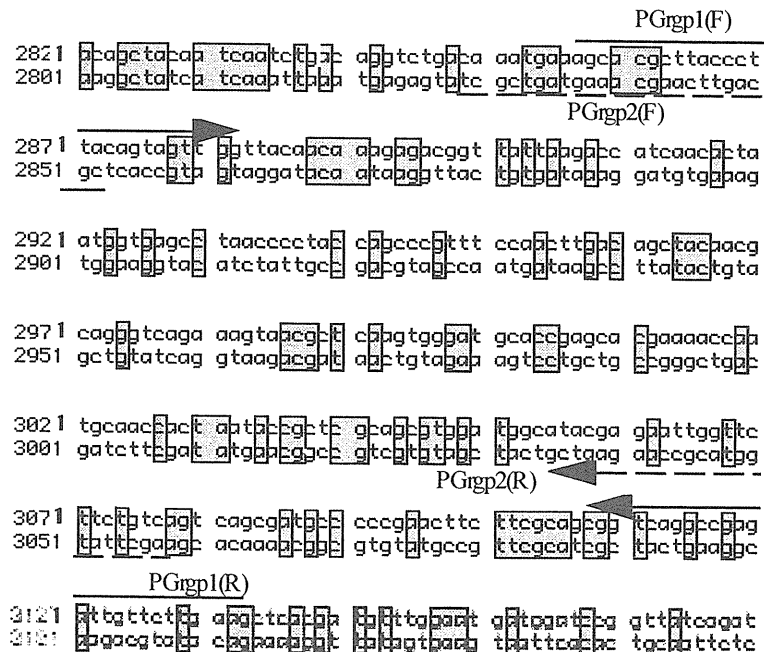


図1 PCR用プライマーの設計

rgpA (上段) と *rgpB* (下段) のアライメント検索を行った結果から *rgpA* と *rgpB* の共通プライマー (A) と *rgpA*, *rgpB* それぞれ特異的なプライマー (B) を矢印で示すところに決定した。

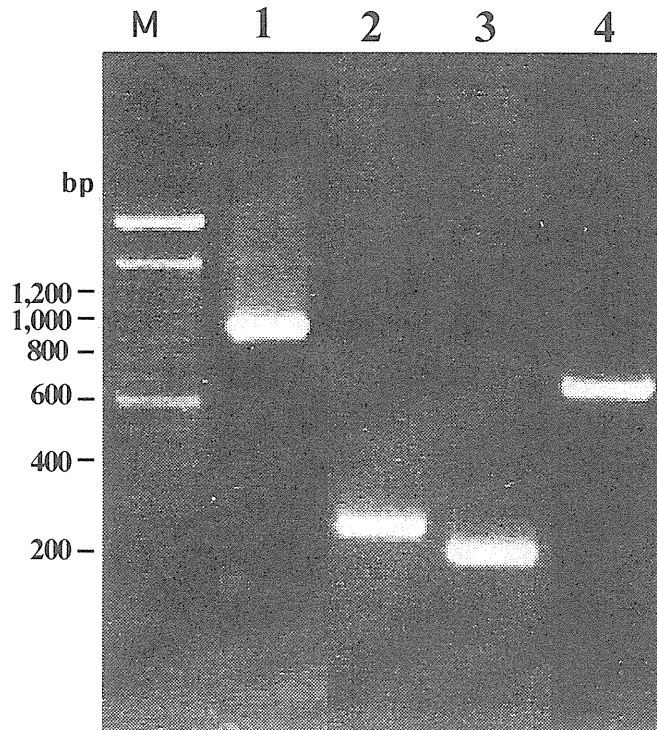


図 2 電気泳動パターン

M : 分子量マーカー (100bp ラダー), 1 : *rgp*, 2 : *rgp A*, 3 : *rgp B*, 4 : *kgp*

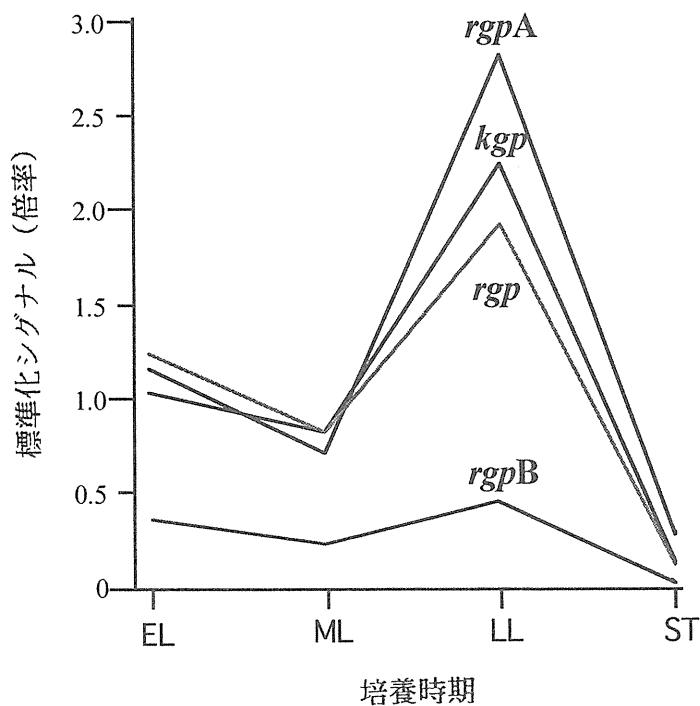


図 3 gingipain 遺伝子発現の変動

16S rRNA 遺伝子の蛍光強度で各遺伝子の蛍光強度を標準化した後の倍率変化と細菌増殖時期との関連を示した。EL : early-log phase, ML : mid-log phase, LL : late-log phase, ST : stationary phase.

た遺伝子診断法による細菌検査は、検査試料の採取を嫌気的条件化で行う必要もなく、検査法をシステム化することが可能になってくる。

一方、同一細菌種であっても、各臨床分離株間では病原性が異なることが知られている。従って、DNA 診断法を利用して詳細な細菌検査を行って菌種の同定を行っても、個々の患者に感染している病原細菌の病原性をモニターすることはできない。本研究では、歯周病の重要な病原菌である *P. gingivalis* の gingipain 遺伝子 *rgp A*, *rgp B*, また両者の共通領域 (*rgp*) および *kgp* を選択し、遺伝子発現レベルを診査できるマイクロアレイの試作を試みた。実験の結果、開発したマイクロアレイを利用して培養過程における遺伝子発現をモニターし、培養時期における mRNA レベルを比較的短時間にモニターすることが可能であった。本研究の推進によって歯周病巣から採取した試料から RNA を回収して病原性関連因子の遺伝子 cDNA マイクロアレイを応用し、個々の患者における歯周病感染菌の病原性を判定するカスタムメイド診断ができると期待される。

結語

Porphyromonas gingivalis の gingipain 遺伝子 *rgp A*, *rgp B*, *kgp* 遺伝子の特異領域を PCR 法により増幅し、mRNA レベルをモニターできる cDNA マイクロアレイを開発した。このアレイを利用して培養時期における遺伝子発現をモニターし、late-log 培養期に mRNA レベルが高いことが判明し、作成したマイクロアレイが有用であることが示唆された。

本研究は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (C) (2) (課題番号 13671981) および日本大学松戸歯学部平成 13 年度鈴木研究費 (課題番号 01-1002) の補助を受けた。

- 1) Holt, S. C. et al.: Virulence factors of *porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 20 : 168-238 1999 — 2) Holt, S.C. & Bramanti, T.E.: Factors in virulence expression and their role in periodontal disease pathogenesis, *Crit Rev Oral Biol Med*. 2:177-281 1991 — 3) Discipio, R.G. et al.: Cleavage of human complement component C5 by cysteine proteinases from *Porphyromonas* (*Bacteroides*) *gingivalis*. Prior oxidation of C5 augments proteinase digestion of C5. *Immunology* 87 : 660-667 1996 — 4) Imamura, T. et al.: Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J Clin Invest* 94:361-367 1994 — 5) Calkins, C.C. et al.: Inactivation of tumor necrosis factor-alpha by proteinases (gingipains) from the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. Implications of immune evasion. *J Biol Chem* 273 : 6611-6614 1998 — 6) Curtis, M. A. et al.: Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res* 34 : 464-472 1999

(受付 2002 年 2 月 28 日)

[通信先 安孫子宣光：日本大学松戸歯学部生化学教室，
千葉県松戸市栄町西 2-870-1 (〒 271-8587)]

コルチゾンにより誘導される マウス口蓋裂成因に対する遺伝学的検討

清水 武彦^{1,2)} 韓 娟¹⁾ 前田 隆秀^{1,2)}

要旨：コルチゾンにより誘導される口蓋裂発症に関与する遺伝的要因についての検討を目的に、A/WySn マウスと C3H/He マウスの遺伝的交配実験を行った。研究対象は A/WySn と C3H/He の系統内交配とその2系間の交配により得られた胎仔である。妊娠中期に、酢酸コルチゾンを妊娠マウスに皮下投与し、18日齢胎仔を摘出し本研究に用い、以下の知見を得た。

1. A/WySn における口蓋裂発症の頻度は 65.4%、C3H/He では 12.1% であった。F₁ ハイブリッドマウスにおける頻度は 13.3%、N₂ バッククロスマウスでは 20.7% であり、劣性遺伝性の遺伝的要因の関与が示唆された。
2. 唇顎口蓋裂の頻度は A/WySn で 23.1%、C3H/He および F₁ では発症が認められず、N₂ で 3.3% であり、劣性遺伝性要因の関与、また口蓋裂単独とは異なった遺伝的要因が付加され発症する可能性が示唆された。
3. 口蓋裂を発症した N₂ の性別を PCR 法により判定したところ発症率に性差はなく、常染色体性の遺伝的要因が示唆された。
4. 本実験系ではコルチゾン誘導口蓋裂発症における A/WySn の genetic maternal effect は明らかでなかった。
5. 2系統間のコルチゾン投与による口蓋裂発症率に明らかな差があることから、コルチゾン誘導口蓋裂に対する感受性座位のマッピングが連鎖分析により可能であることが示された。H-2 領域とコルチゾン誘導口蓋裂の責任遺伝子との連鎖を評価するために、H-2 領域に位置する DNA マーカーを用いて N₂ の遺伝子型判定を行った結果、H-2 S 領域と口蓋裂発症の責任遺伝子との間に示唆的な連鎖が認められた。

Key words：口蓋裂，マウス，遺伝学，コルチゾン

緒 言

口蓋裂は最も一般的な口腔奇形であり、口蓋裂による機能的、審美的、心理的問題は重大で、口蓋裂発症の原因を解明することは極めて重要である。口蓋裂は症候群の一症状として発症するものと、症候群と関連なく発症するものに大別され、症候群と関連なく発症する口蓋裂の病因は複雑であり、様々な環境要因とそれらに感受性の複数の遺伝的要因との相互作用により発症すると考えられている¹⁾。本研究は、口蓋裂発症を誘導する催奇物質の感受性に関与する遺伝的要因に焦点を絞った。様々な催奇物質²⁾が口蓋裂発症の原因として考えられているが、どの催奇物質が多く口蓋裂の原因であるか意見の一致

はみられず、また、どの遺伝子が様々な催奇物質に対する感受性に影響しているのかも不明である。報告されている口蓋裂の原因となる催奇物質は、一般的な被爆として妊娠中の母親の飲酒あるいは喫煙³⁾、また稀な被爆としてフェニトイン⁴⁾、レチノイン酸⁵⁾、コルチコステロイド⁶⁾などであり、これらの催奇物質被爆によって口蓋発育に関わる代謝経路が破壊されると考えられている。

動物モデル、特にマウスは先天性あるいは催奇物質により誘導され発症する口蓋裂の両者において、その原因となる候補染色体領域と候補遺伝子の同定に貢献してきた。マウスは遺伝子と染色体領域の両者においてヒトに高い相同性を示すことから (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/Homology/>)、マウスモデルにおいて口蓋裂発症の責任遺伝子を同定できれば、ヒトにおける候補遺伝子を見出せる可能性が高い。顎顔面発育において重要な役割を持つとされる遺伝子である Msx 1⁷⁾、Tgfb 3⁸⁾、Ap-2⁹⁾、hox 1.5¹⁰⁾、GABAA receptor¹¹⁾、Pax 9¹²⁾、EGF¹³⁾などのノックアウトマウスは口蓋裂を有しているが³⁾、催奇物

¹⁾ 日本大学松戸歯学部小児歯科学講座

²⁾ 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(主任：前田隆秀教授)
(2002年12月24日受付)
(2003年1月25日受理)

質との関連は報告されていない。近交系マウスにおいて、口蓋裂の自然発症は稀であるが、A/J, A/WySn, A/HeJのようなA系統は、他のマウス系統に比較し高い頻度(5~8%)で胎仔に口唇裂および口蓋裂の発症がみられる¹⁴⁾。A系統を用いた遺伝学的研究において、口唇裂発症と関連がある遺伝子座位 *clf 1* と *clf 2* が同定されているが¹⁵⁻¹⁸⁾、口唇裂は口蓋裂とは異なった遺伝要因により発症すると考えられている¹⁹⁾。A/J と C57BL/6J のリコンビナント近交系マウスを用いたフェニトインと6-アミノニコチンアミドによる誘導口蓋裂のゲノム検索において、口蓋裂発症に関与する複数の座位が示唆されている¹⁾。これらの座位のいくつかは口蓋裂と口唇裂の両者の発症と関連し、またいくつかは2つの異なった表現型に個別に関与していた。

マウスにおけるグルココルチコイド投与による口蓋裂発症は少なからず注目を浴びてきた。マウス妊娠中期におけるコルチゾン投与により、多くのマウス系統においてその胎仔に口蓋裂を発症し、A系統は他のマウス系統よりもコルチゾン投与により高い頻度で口蓋裂が発症した^{20,21)}。主要組織適合遺伝子複合体のH-2領域とグルココルチコイド誘導口蓋裂との関連が報告されているが²²⁻²⁵⁾、一方H-2領域はH-2コンジェニックマウスにおいてグルココルチコイドレセプターの変動と関連が認められないとの報告もある²⁶⁾。多くの研究にも関わらず、グルココルチコイド誘導口蓋裂の原因となる主働遺伝子は同定されていない。

そこで本研究ではA/WySnマウスとC3H/Heマウスとの遺伝的交配実験により、胎仔に発症するコルチゾン誘導口蓋裂に関与する遺伝要因について検討した。

試料および方法

1. 試料

本研究のため6週齢のA/WySnマウスを国立遺伝学研究所より、C3H/Heマウスを三協ラボサービス株式会社より得た。A/WySnとC3H/He、および2系統の交配から得られた交雑第一世代(F_1)と、 F_1 をA/WySnに戻し交配したバッククロスマウス(N_2)を用いた。すなわち、A(雌)×A(雄)、C3H×C3H、(A×C3H) F_1 、(C3H×A) F_1 、(A× F_1) N_2 、(F_1 ×A) N_2 、の6群の交配を行った。

なお、本実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理規定に従った。

2. コルチゾン投与による口蓋裂発症の誘導

雌雄マウスを交配し、臍栓を確認した日を妊娠0.5日とした。妊娠10.5日から14.5日の5日間、妊娠マウス

にリン酸緩衝生理食塩水に溶解した酢酸コルチゾン100mg/kg/dayを皮下投与した。妊娠18日に妊娠マウスを麻酔下にて安楽死させ、胎仔を子宮から摘出した。実体顕微鏡下にて、正常口蓋、口蓋裂、唇顎口蓋裂の3種類の表現型に分類した。

3. PCRによる性判定

コルチゾン誘導口蓋裂の発症におけるX連鎖性遺伝の影響を調べるために、 N_2 の胎仔の性別をPCRにて判定した。 N_2 の胎仔の皮膚からQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。雄の判定、すなわちY染色体の存在の判定には、Y染色体上の*zfy 1*遺伝子の特異的に増幅するプライマー、5'-GTCATTGCCTACCCCTCTAC-3'と5'-CTCAACATCTACCGGACCT-ATC-3'を用いた。X染色体上のDNAの増幅はMIT (Massachusetts Institute of Technology) プライマーのDXMit 136を用いた。DXMit 136プライマーは雌雄両者のDNAを増幅するため*zfy 1*プライマーの対照とした。PCRの反応液は、50ngのDNA、0.1 unitのTaKaRa Ex Taq (TaKaRa)、10×Ex Taq buffer、200 μMのdNTPs、0.5 μMのプライマー、滅菌精製水にて総量20 μlとした。PCR温度条件は、94度3分後、94度30秒、55度30秒、72度30秒を35サイクル、その後72度10分とした。PCR産物は2%アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線ライト上でDNAバンドを観察した。

4. 連鎖分析によるH-2領域と口蓋裂発症との関連の検討

マウス染色体17番上のH-2領域とグルココルチコイド誘導口蓋裂との関連が報告されている²²⁻²⁵⁾ことから、H-2領域の関与の有無を本実験系で評価するため、口蓋裂を有した N_2 のH-2領域における遺伝子型をPCR法により判定した。PCRプライマーはマウス17番染色体H-2領域の近位(H-2S領域)に位置するD17Mit 33および遠位(H-2Q領域)に位置するD17Mit 49を用いた。これらのプライマーは2系統間でマイクロサテライト多型²⁷⁾を有し、PCR増幅物からA/WySnのホモ接合体かヘテロ接合体か判定が可能である。PCRの反応条件、電気泳動条件は前記3.の性判定と同様に行った。

5. 検定法

口蓋裂の出現頻度、雌雄比、およびH-2領域における遺伝子型比において、期待値と観察値の差を χ^2 検定で評価した。

結 果

1. 口蓋裂の発症頻度

各交配群から得られた胎仔を、正常口蓋、口蓋裂、唇顎口蓋裂の3種類の表現型に分類し、その写真を図1に示した。各群における口蓋裂の頻度を表1に示した。A/WySnのコルチゾン投与における口蓋裂発症頻度は65.4% (17/26)であった。一方C3H/Heでは12.1% (4/33)とコルチゾンに抵抗性を示した。F₁の頻度は13.3% (6/45)であった。65.4%の発現率のA/WySnの優性遺伝子を仮定すると、F₁における発症頻度の期待値は65.4% (29.4/45)であり、F₁における観察値13.3% (6/45)は期待値より有意に低かった (p<0.01)。N₂の頻度は20.7% (19/92)であった。N₂ではA/WySnホモ型となる遺伝子座位の頻度は50%であり、65.4%の浸透率のA/WySnの劣性単一遺伝子を仮定すると、N₂にお

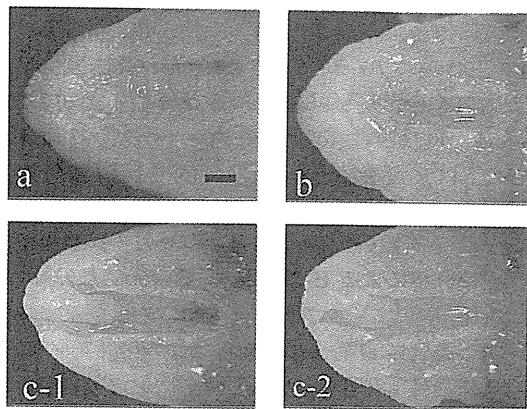


図1 胎生18.5日における正常口蓋 (a)、口蓋裂 (b)、片側性唇顎口蓋裂 (c-1)、両側性唇顎口蓋裂 (c-2)、バー：1mm。

る発症頻度の期待値は32.7% (30.1/92)であり、N₂の観察値は期待値より有意に低かった (p<0.05)。唇顎口蓋裂は口蓋裂単独と比較し発症頻度が低く、A/WySnに23.1% (6/26)認められ、6匹のうち5匹は片側性であった。C3H/HeおよびF₁において唇顎口蓋裂は認められなかった。N₂の頻度は3.3% (3/92)であった。23.1%の浸透率のA/WySnの劣性単一遺伝子を仮定すると、N₂における発症頻度の期待値は11.6% (10.7/92)であり、N₂の観察値は有意に低かった (p<0.05)。

2. Genetic maternal effect の評価

Genetic maternal effect, すなわち母親由来の染色体の関与を調べるため、本実験ではF₁とN₂作製において雌雄を代えて交配を行った。F₁において、(A×C3H)F₁の発症頻度は12% (3/25)、(C3H×A)F₁では15% (3/20)と有意な差はなく、またN₂においても(A×F₁)N₂の頻度は19.2% (5/26)、(F₁×A)N₂の頻度は21.2% (14/66)と両者に有意な差はなかった。唇顎口蓋裂においても(A×F₁)N₂では3.8% (1/26)、(F₁×A)N₂では3.0% (2/66)であり、両者の頻度に有意な差はなかった。

3. 性判定のための遺伝子型判定

口蓋裂を有したN₂のDNAを、XおよびY染色体上DNAの特異的プライマーを用いてPCRにて増幅した。PCR電気泳動像を図2に示した。19匹のN₂のうち雌9匹、雄10匹であり、期待値である雌雄比1:1と有意な差はなかった。

4. H-2領域の遺伝子型判定

N₂のH-2領域における遺伝子型を図3に示した。口蓋裂を有した19匹のN₂の、D17Mit33における遺伝子型比はホモ型：ヘテロ型=13:6であり、D17Mit49ではホモ型：ヘテロ型=12:7であり、期待値である1:1と有意な差 (有意水準5%)は認められなかった。

表1 コルチゾン投与により誘導される口蓋裂の発症頻度

母	父	母数	胎仔数	唇顎口蓋裂	口蓋裂単独	唇顎口蓋裂+口蓋裂単独			正常口蓋
						合計 (%)	♀	♂	
A	A	5	26	6	11	17 (65.4)			9
C3H	C3H	6	33	0	4	4 (12.1)			29
A	C3H	4	25	0	3	3 (12.0)			22
C3H	A	3	20	0	3	3 (15.0)			17
F ₁ 計		7	45	0	6	6 (13.3)			39
A	F ₁	6	26	1	4	5 (19.2)	2	3	21
F ₁	A	10	66	2	12	14 (21.2)	7	7	52
N ₂ 計		16	92	3	16	19 (20.7)	9	10	73

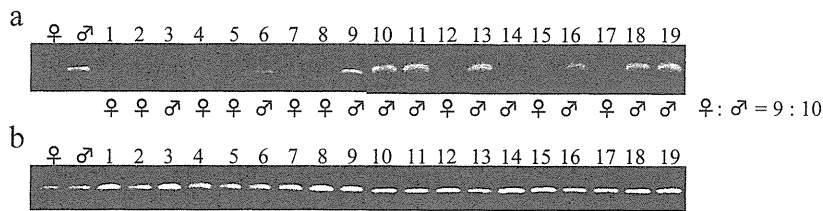


図2 Y染色体上 zfy 遺伝子の特異的プライマーを用いた PCR 電気泳動像 (a) および X染色体上 DNA の特異的プライマー DXMit 136 を用いた PCR 電気泳動像 (b)。1~19, N₂ サンプル。

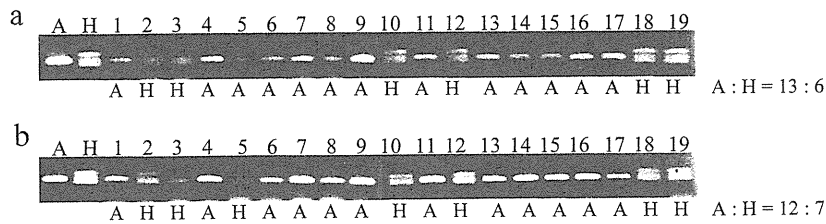


図3 H-2S 領域の D17Mit 33 による PCR 電気泳動像 (a) および H-2Q 領域の D17Mit 49 による PCR 電気泳動像 (b)。A, A/WySn ホモ型。H, ヘテロ型。1~19, N₂ サンプル。

考 察

グルココルチコイド投与により誘導されるマウス口蓋裂発症の機序は未だ不明である。コルチゾン投与量に依存して口蓋裂の発症頻度が増加することが報告されている²⁸⁾。コルチゾン誘導口蓋裂の発症は、口蓋棚の挙上時期の遅延が関与し²⁹⁾、コルチゾン高感受性の A/J において口蓋棚の挙上の時期は、C57BL/6J のようなコルチゾン抵抗性マウスよりも遅れて起こることが報告されている³⁰⁾。口蓋の挙上遅延とそれに結果として生じる左右口蓋突起の癒合不全が A/J のコルチゾン誘導口蓋裂の発症機序であることが示唆されている³¹⁾。妊娠マウスへのコルチゾン投与によって、胎仔の口蓋棚は細胞外マトリックスの含有量と細胞数においても明らかな減少を示していた²¹⁾。Montenegro ら³²⁾は、A/Sn と C57/BL の妊娠マウスにコルチゾンを投与し口蓋裂を誘導した際、両系統の胎生 13 日における口蓋突起間葉組織内のヒアルロン酸とコラーゲン量に明らかな差を見出し、これらが口蓋裂発症に何らかの関連があることを示した。またコルチゾン投与の A/J 胎仔の口蓋の cAMP とステロイドレセプターのレベルは C57BL/6J マウスよりも高く²⁹⁾、ステロイド誘導口蓋裂の頻度は口蓋の cAMP 濃度との関連があることが報告されている³³⁾。他の研究者らは、細胞増殖の制御因子である TGF-β2 の発達中の口蓋における mRNA レベルがグルココルチコイド投与により有意に減少していることを示し、TGF-β2 発現の低下とグルココルチコイド誘導口蓋裂との関連を示して

いる³⁴⁾。

本研究では、A/WySn と C3H/He との遺伝的交配により、胎仔に発症するコルチゾン誘導口蓋裂に影響する遺伝要因を検討した。本研究において A/WySn はコルチゾンに対して感受性を示し、一方 C3H/He は抵抗性を示した。F₁ における口蓋裂の頻度は、親系である A/WySn の発症頻度よりも有意に低く、コルチゾン感受性に関わる遺伝要因は劣性遺伝性であることが示唆された。さらに N₂ において劣性単一遺伝子の仮定が棄却されたこと、また口蓋裂は C3H/He および F₁ においても発症することから、異なった浸透率の複数の遺伝子の関与が示唆される。一方、唇顎口蓋裂は C3H/He および F₁ において認められず、完全な劣性遺伝性を示した。N₂ において劣性単一遺伝子の仮定が棄却されたことから、複数の遺伝子の関与により発症することが示唆された。唇顎口蓋裂の発症頻度は口蓋裂単独よりも低く、口蓋裂単独とは異なった遺伝子の影響が付加されることにより発症する可能性が考えられる。

口蓋裂を有する新生マウスは、出生後哺乳障害のため性別を判定できるまで生殖器が発育せず死に至ってしまうため、コルチゾン誘導口蓋裂発症における X 連鎖性遺伝要因の関与の有無を調べる方法として、N₂ の性判定を PCR によって行った。発症頻度に雌雄差はなく、X 連鎖性遺伝要因は否定でき、常染色体性の遺伝要因が示唆された。

本研究では、genetic maternal effect の有無を調べるため、F₁ と N₂ 作製において雌雄を代えて交配を行った。

過去の報告では A 系統の口唇裂³⁵⁾と催奇物質誘導口蓋裂²⁹⁾において genetic maternal effect が示唆され、A 系統が母の場合に奇形の頻度が高くなることが報告されている。本研究では、F₁ および N₂ において A/WySn が母父の両者の交配を試みたが、口蓋裂発症頻度に有意な差はなく、genetic maternal effect は明らかにならなかった。

A/WySn と C3H/He のコルチゾンに対する感受性の差が認められたため、その遺伝的要因が存在する染色体領域を遺伝学的手法の一つである連鎖分析²⁷⁾によって検出することが可能であると考えられた。そのため口蓋裂を有した N₂ の H-2 領域における遺伝子型を PCR により判定し、H-2 領域とコルチゾン感受性遺伝子との連鎖を評価した。N₂ では全ての座位において A/WySn のホモ接合体とヘテロ接合体の頻度は 50% であるが、A/WySn のコルチゾン誘導口蓋裂の責任遺伝子と連鎖した遺伝子座では A/WySn のホモ型の頻度が有意に高くなると考えられる。口蓋裂を有した N₂ 19 匹の D17Mit33 と D17Mit49 による遺伝子型比は、ともに期待値である 1:1 から有意な差は認められなかった。しかし、複数の遺伝子の関与が示唆されていることから、責任遺伝子座においても遺伝子型比はホモ型：ヘテロ型=19:0 にはならない可能性を考慮すると、今回のホモ型優位の遺伝子型比は H-2 領域と責任遺伝子との連鎖を示唆する結果と考えられる。また D17Mit33 が D17Mit49 よりもホモ型の割合が高いため、H-2S 領域が H-2Q 領域よりもコルチゾン感受性座位との連鎖の可能性が高いと考えられる。今後 N₂ マウスの数を増やし、H-2 領域のさらなる検討に並行し、全染色体上に配置した DNA マーカーを用いて口蓋裂発症におけるコルチゾン感受性遺伝子が存在する染色体領域を特定していく予定である。

結 論

A/WySn と C3H/He の遺伝的交配実験により、コルチゾンにより誘導される口蓋裂発症に関与する遺伝的要因について検討したところ、以下の知見を得た。

1. 口蓋裂発症において A/WySn はコルチゾンに高い感受性を示し、C3H/He は抵抗性を示した。
2. コルチゾン誘導口蓋裂発症の主働遺伝的要因は常染色体劣性遺伝性であり、複数の遺伝子の関与が示唆された。
3. コルチゾン誘導口蓋裂発症における A/WySn の genetic maternal effect は明らかでなかった。
4. コルチゾン誘導口蓋裂発症の責任遺伝子と H-2S 領域との間に示唆的連鎖が認められた。

本研究の一部は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業の補助を受けた。

文 献

- 1) Diehl, S. R. and Erickson, R. P.: Genome scan for teratogen-induced clefting susceptibility loci in the mouse: evidence of both allelic and locus heterogeneity distinguishing cleft lip and cleft palate, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94: 5231-5236, 1997.
- 2) Richard, A. and Spritz, M. D.: The genetics and epigenetics of orofacial clefts, *Current Opinion in Pediatrics*, 13: 556-560, 2001.
- 3) Wyszynski, D. F. and Beaty, T. H.: Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts, *Teratology*, 53: 309-317, 1996.
- 4) Azarbayjani, F. and Danielsson, B. R.: Phenytoin-induced cleft palate: evidence for embryonic cardiac bradyarrhythmia due to inhibition of delayed rectifier K⁺ channels resulting in hypoxia-reoxygenation damage, *Teratology*, 63: 152-160, 2001.
- 5) Horie, S. and Yasuda, M.: Alterations in palatal ruga patterns in Jcl: ICR mouse fetuses from dams treated with all-trans-retinoic acid, *Hiroshima J. Med. Sci.*, 50: 17-25, 2001.
- 6) Park-Wyllie, L., Mazzotta, P., Pastuszak, A., Moretti, M. E., Beique, L., Hunnisett, L., Friesen, M. H., Jacobson, S., Kasapinovic, S., Chang, D., Diav-Citrin, O., Chitayat, D., Nulman, I., Einarson, T. R. and Koren, G.: Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies, *Teratology*, 62: 385-392, 2000.
- 7) Satokata, I. and Maas, R.: Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development, *Nat. Genet.*, 6: 348-356, 1994.
- 8) Proetzel, G., Pawlowski, S. A., Wiles, M. V., Yin, M., Boivin, G. P., Howles, P. N., Ding, J., Ferguson, M. W. and Doetschman, T.: Transforming growth factor-beta 3 is required for secondary palate fusion, *Nat. Genet.*, 11: 409-414, 1995.
- 9) Nottoli, T., Hagopian-Donaldson, S., Zhang, J., Perkins, A. and Williams, T.: AP-2-null cells disrupt morphogenesis of the eye, face, and limbs in chimeric mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95: 13714-13719, 1998.
- 10) Chisaka, O. and Capecchi, M. R.: Regionally restricted developmental defects resulting from targeted disruption of the mouse homeobox gene *hox-1.5*, *Nature*, 350: 473-479, 1991.
- 11) Culiati, C. T., Stubbs, L. J., Woychik, R. P., Russell, L. B., Johnson, D. K. and Rinchik, E. M.: Deficiency of the beta 3 subunit of the type A gamma-aminobutyric acid receptor causes cleft palate in mice, *Nat. Genet.*, 11: 344-346, 1995.
- 12) Peters, H., Neubuser, A., Kratochwil, K. and Balling, R.: Pax 9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities, *Genes. Dev.*, 12: 2735-2747, 1998.
- 13) Dinchuk, J. E., Focht, R. J., Kelley, J. A., Henderson, N. L., Zolotarjova, N. I., Wynn, R., Neff, N. T., Link, J., Huber, R. M., Burn, T. C., Rupar, M. J., Cunningham, M. R., Selling,

- B. H., Ma, J., Stern, A. A., Hollis, G. F., Stein, R. B. and Friedman, P. A.: Absence of post-translational aspartyl beta-hydroxylation of epidermal growth factor domains in mice leads to developmental defects and an increased incidence of intestinal neoplasia, *J. Biol. Chem.* 277: 12970-12977, 2002.
- 14) Juriloff, D. M.: Differences in frequency of cleft lip among the A strains of mice, *Teratology*, 25: 361-368, 1982.
 - 15) Juriloff, D. M. and Mah, D. G.: The major locus for multifactorial nonsyndromic cleft lip maps to mouse chromosome 11, *Mamm. Genome*, 6: 63-69, 1995.
 - 16) Juriloff, D. M.: Genetic analysis of the construction of the AEJ. A congenic strain indicates that nonsyndromic CL (P) in the mouse is caused by two loci with epistatic interaction, *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 15: 1-12, 1995.
 - 17) Juriloff, D. M., Harris, M. J. and Mah, D. G.: The *clf 1* gene maps to a 2- to 3-cM region of distal mouse chromosome 11, *Mamm. Genome*, 7: 789, 1996.
 - 18) Juriloff, D. M., Harris, M. J. and Brown, C. J.: Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model, *Mamm. Genome*, 12: 426-435, 2001.
 - 19) Ching, G. H. and Chung, C. S.: A genetic study of cleft lip and palate in Hawaii. I. Interracial crosses, *Am. J. Hum. Genet.*, 26: 162-176, 1974.
 - 20) Greene, R. M. and Kochhar, D. M.: Spatial relations in the oral cavity of cortisone-treated mouse fetuses during the time of secondary palate closure, *Teratology*, 8: 153-161, 1973.
 - 21) Salomon, D. S. and Pratt, R. M.: Involvement of glucocorticoids in the development of the secondary palate, *Differentiation*, 13: 141-154, 1979.
 - 22) Gasser, D. L., Yadavish, K. N., Trammell, M. A. and Goldman, A. S.: Recombinants in the H-2 S/H-2 D interval of mouse chromosome 17 define the map position of a gene for cleft palate susceptibility, *Teratology*, 38: 571-577, 1988.
 - 23) Gasser, D. L., Mele, L., Lees, D. D. and Goldman, A. S.: Genes in mice that affect susceptibility to cortisone-induced cleft palate are closely linked to *Ir* genes on chromosomes 2 and 17, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 78: 3147-3150, 1981.
 - 24) Liu, S. L. and Erickson, R. P.: Genetic differences among the *A/J X C 57 BL/6 J* recombinant inbred mouse lines and their degree of association with glucocorticoid-induced cleft palate, *Genetics*, 113: 745-754, 1986.
 - 25) Melnick, M., Jaskoll, T. and Slavkin, H. C.: Corticosteroid-induced cleft palate in mice and H-2 haplotype: maternal and embryonic effects, *Immunogenetics*, 13: 443-450, 1981.
 - 26) Jaskoll, T., Choy, H. A., Chen, H. and Melnick, M.: The CORT-GR signal transduction pathway and CORT-induced cleft palate in H-2 congenic mice, *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 15: 57-65, 1995.
 - 27) Shimizu, T.: Mapping of a gene causing mouse gutter-shaped tooth root to chromosome 5, *Arch. Oral Biol.*, 44: 917-924, 1999.
 - 28) Hackman, R. M. and Brown, K. S.: Corticosterone-induced isolated cleft palate in *A/J* mice, *Teratology*, 6: 313-316, 1972.
 - 29) Pratt, R. M., Salomon, D. S., Diewert, V. M., Erickson, R. P., Burns, R. and Brown, K. S.: Cortisone-induced cleft palate in the brachymorphic mouse, *Teratog. Carcinog. Mutagen.*, 1: 15-23, 1980.
 - 30) Fraser, F. C.: The multifactorial/threshold concept uses and misuses, *Teratology*, 14: 267-280, 1976.
 - 31) Diewert, V. M. and Pratt, R. M.: Cortisone-induced cleft palate in *A/J* mice: failure of palatal shelf contact, *Teratology*, 24: 149-162, 1981.
 - 32) Montenegro, M. A., Rojas, M., Dominguez, S. and Rosales, C. J.: Differences in extracellular matrix components and cell density during normal and dexamethasone-treated secondary palate development in two strains of mice with different susceptibility to glucocorticoid induced-clefting, *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 18: 100-106, 1998.
 - 33) Erickson, R. P., Butley, M. S. and Sing, C. F.: H-2 and non-H-2 determined strain variation in palatal shelf and tongue adenosine 3':5' cyclic monophosphate: a possible role in the etiology of steroid-induced cleft palate, *J. Immunogenet.* 6: 253-262, 1979.
 - 34) Jaskoll, T., Choy, H. A., Chen, H. and Melnick, M.: Developmental expression and CORT-regulation of TGF-beta and EGF receptor mRNA during mouse palatal morphogenesis: correlation between CORT-induced cleft palate and TGF-beta 2 mRNA expression, *Teratology*, 54: 34-44, 1996.
 - 35) Davidson, J. G., Fraser, F. C. and Schlager, G.: A maternal effect on the frequency of spontaneous cleft lip in the *A/J* mouse, *Teratology*, 2: 371-376, 1969.

The Genetic of Cleft Palate Induced Cortisone in Mice

Taekhiko Shimizu^{1,2}, Juan Han¹ and Takahide Maeda^{1,2}

¹*Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo*

²*Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
(Director : Prof. Takahide Maeda)*

The purpose of this study was to detect genetic factors affecting the appearance of cleft palate induced cortisone using genetic crosses between A/WySn and C3H/He mice. Embryos from within-strain breeding of A/WySn and C3H/He, and the F₁ intercross and N₂ backcross embryos from crosses between the two strains were used to evaluate cortisone susceptibility. On day 11 to 14 gestation, the mice were given subcutaneous injections of cortisone acetate. On day 18 the embryos were dissected for observation of cleft palate. The frequency of cleft palate in the A/WySn strain treated with cortisone was 65.4%, on the other hand 12.1% in the C3H/He mice. The frequency in F₁ mice was significantly lower compared with that in the A/WySn strain, indicating recessive transmission. To investigate the influence of an X-linked factor, we judged the sexuality of N₂ embryos using polymerase chain reaction (PCR). There was no significant difference in the incidence between the sexes among N₂ mice. These findings suggest the cortisone-induced cleft palate in mice was influenced by major gene effect with autosomal recessive transmission. Genetic maternal effect in the appearance of cleft palate was not detected in this study. The significant difference between the two strains in the incidence of cleft palate indicates that mapping of susceptibility loci for cortisone would be possible using linkage analysis. To evaluate a linkage between the gene responsible for cleft palate inducing cortisone and H-2 region on chromosome 17, which have been associated with cortisone susceptibility, we performed the genotyping of the individual N₂ with cleft palate using MIT primer located in the H-2 region. The genotyping results suggested that the H-2 S region might be associated with cortisone susceptibility in the occurrence of cleft palate.

Key words : Cleft palate, Mouse, Genetics, Cortisone

Genetic mapping of fused root of the maxillary second molar in mice to chromosome 5

Yasunori Miura*¹ and Takehiko Shimizu*^{1,2}

*¹ Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo,

*² Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
2-870-1 Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, JAPAN

Abstract Although studies have identified several genes that are involved in tooth root formation, little is known about the genetics of root fusion. The purpose of the present study was to identify the chromosomal region that includes the candidate gene causing root fusion, using SMXA recombinant inbred (RI) strains of mice. Fusion of the mesial and palatal roots of the upper second molars (M^2) was observed in 16 of 21 substrains of SMXA RI mice. The incidence of root fusion of the M^2 in substrains and parental strains showed a continuous spectrum of distribution between 0 and 85%. In a genome-wide linkage analysis, a high Lod score exceeding the suggestive threshold level was found between D5Mit97 and D5Mit31 on chromosome 5. These findings suggest that a polygenic system with incomplete penetrance is involved in the fusion of roots, and that one of the genes causing root fusion of the M^2 in mice is located in a distal region on chromosome 5.

Key words

Fused root,
Inbred mice,
Linkage analysis

Introduction

In humans, the frequency of fusion of molar roots varies among ethnic groups. In modern Europeans, fusion of roots occurs in 0.2% of maxillary first molars, 14.6% of maxillary second molars, 36.8% of maxillary third molars, 0.3% of mandibular first molars, 21.7% of mandibular second molars, and 19.2% of mandibular third molars¹. It is generally thought that the morphology of tooth roots is primarily determined by genetic rather than environmental factors¹, but the genetics of specific fusion of roots are poorly understood. X-chromosomal aneuploidy has been found to be associated with taurodontism², short root and root separation^{3,4}. Dentin dysplasia⁵ and dentinogenesis imperfecta⁶ also affect root morphology. However, there is no clear association between these syndromes and the fusion of molar roots.

Although fusion of roots is generally rare in

mice, there have been reports of fusion of roots in inbred and mutant mice. In tabby mice, reports indicate a high frequency of fusion of the roots of the first and second molars, which involves reduction of root size⁷. Mice with epilepsy-like disorder (EL) have a 60% incidence of fusion of roots of the upper first molar⁸, with an autosomal recessive pattern of inheritance. Asada⁹ reported that the C57L/J mouse strain is one of the most useful models for studying the cause of fusion of roots; their incidence of gutter-shaped root of the lower second molars is about 90 to 100%. A gene causing fusion of roots in C57L/J mice has been mapped to the distal region of chromosome 5¹⁰.

The SMXA recombinant inbred (RI) mouse strain set has been proven to be a powerful tool for analyzing multifactorial genetic traits^{11,12}. SMXA RI mouse strains were produced by systematic inbreeding from the F_2 generation of a cross between A/J and SM/J inbred strains¹³. The SMXA RI strains show phenotypic difference in a variety of traits, including body weight, blood insulin and lipids levels¹⁴. A detailed genetic profile of the

Received on March 29, 2005

Accepted on July 13, 2005

SMXA RI strains has been reported¹⁵. We have previously observed that some substrains of SMXA RI mice have a high incidence of fusion of roots (mesial and palatal roots) of the upper second molars. The purpose of the present study was to identify the chromosomal region that contains the candidate gene causing fusion of roots, using SMXA RI mouse strains.

Materials and Methods

Mice

A total of 219 mice were used. The mice belonged to the parental strains A/J and SM/J and 21 of the 26 substrains of the SMXA RI set ($n=7-13$ for each strain). Five SMXA RI strains (SMXA-3, -6, -11, -21 and -23) were excluded from the present study because of an insufficient number of samples. Mice were obtained from the Institute for Experimental Animals, Hamamatsu University School of Medicine (Hamamatsu, Japan). The mice were maintained under conventional conditions ($25 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$ humidity, and 12-h light/dark cycle), and were fed a commercial diet (MR Breeder, Nihon Nohsan Co., Kanagawa, Japan) and tap water *ad libitum*.

Observation of fusion of roots of the upper second molar

The mice used were 90 days old at sacrifice,

and each was anesthetized with ether immediately before sacrifice. The skulls were defleshed and macerated in 1% potassium hydroxide at 42°C for 48 hours. The bilateral upper second molars (M^2) were extracted from maxilla. A total of 438 M^2 ($n=11-26$ for each strain) from 219 mice were used. In normal mice, the maxillary second molars have 3 roots: mesial, palatal and distal. Fusion of roots of M^2 was observed using a stereoscopic microscope at $\times 32$ magnification. The frequency of fusion of roots of M^2 was calculated for each SMXA RI and parental strain.

Linkage analysis

Linkage analysis was performed using Map Manager QTXb15¹⁶ to detect the chromosomal region influencing fusion of roots of M^2 . For genome-wide linkage analysis, we used 789 markers distributed through the genome that have informative strain distribution patterns¹⁵, allowing the frequency of fusion of roots of M^2 in each SMXA RI strain to be analyzed as a quantitative trait¹². The significance of each locus detected by interval mapping was represented as likelihood ratio statistic (LRS), and logarithm of odds (Lod) scores were then obtained by dividing the LRS by 4.605^{14} . The significance threshold for the interval mapping was computed by permutation test¹⁷. The Lod scores calculated by 1,000 sets of permutation test were 2.3 for suggestive

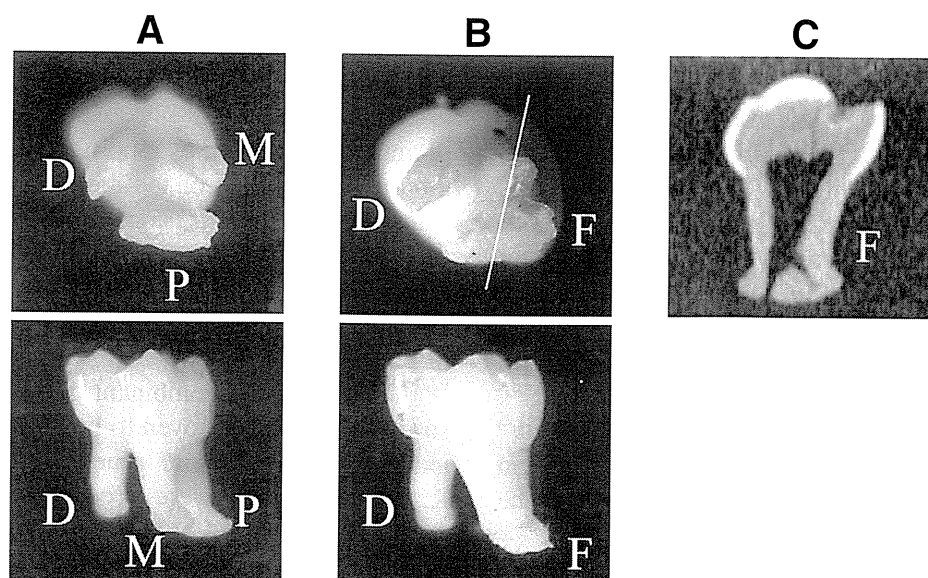


Fig. 1 Fusion of the mesial and palatal roots of the upper second molars in SMXA RI strains. **A**: normal roots; **B**: fused roots. White line indicates cross section of micro-CT image; **C**: Micro-CT image of fused roots. The mesial and palatal roots had a common pulp cavity, but root apices were separate. D: distal root; M: mesial root; P: palatal root; F: fused roots

associations with the fusion of roots of M², and 4.3 for significant associations.

Results

Frequency of fusion of roots of M²

Fusion of the mesial and palatal roots of M² (Fig. 1) was observed in the A/J strain and 17 of the 21 SMXA RI substrains. The mesial and palatal roots had a common pulp cavity, but had separate root apexes (Fig. 1-C). The frequencies of fusion of roots of M² in the SMXA RI and parental strains are shown in Fig. 2. SMXA-26 had the highest frequency of fusion of roots of M² (85%, n = 20). Fusion was

not observed in SMXA-4 (n = 20), -12 (n = 11), -16 (n = 18), -17 (n = 22) or -27 (n = 16). The histogram of the frequency of fusion of roots showed a continuous distribution pattern. Both parental strains were positioned at the lower end in the histogram: SM/J, 0% (n = 22); A/J, 4% (n = 24).

Linkage analysis

We detected strong linkage on the distal part of chromosome 5 exceeding the suggestive threshold level. The maximum Lod score, 3.6, was observed

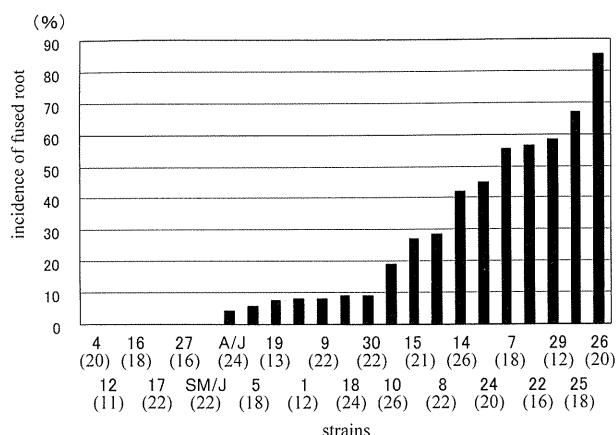


Fig. 2 Distribution of the incidence of fused root of the upper second molars in 21 SMXA RI substrains and 2 parental strains (SM/J and A/J). The histogram of the frequency of fused root showed a continuous distribution pattern suggesting that fusion of root is not controlled by simple Mendelian inheritance, and may be determined by multiple genes. Numbers in parentheses represent the numbers of teeth used.

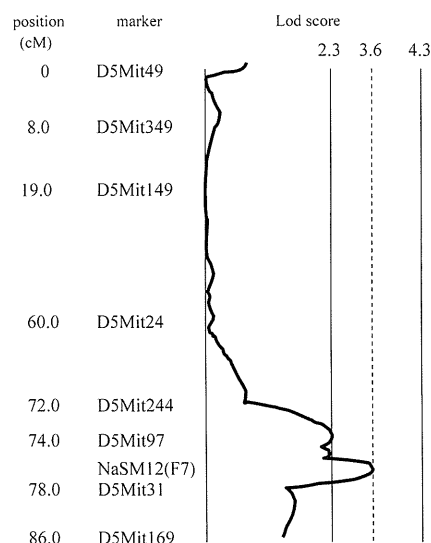


Fig. 3 Lod scores of chromosome 5. The thick solid line is the plot of the Lod scores. The vertical lines labeled with the numeric values 2.3 and 4.3 indicate the suggestive and significant level, respectively. The position 0cM represents the centromere, and the position 86cM represents the telomere. 1 suggestive locus is detected in the distal region of chromosome 5 suggesting the existence of a linkage between this locus and the locus controlling the growth of fused root. Map positions of the markers were obtained from the Mouse Genome Database.

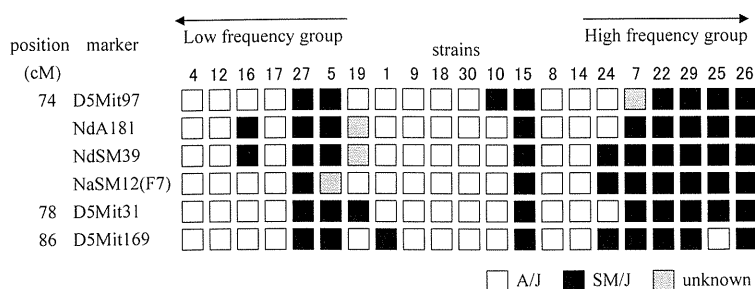


Fig. 4 Strain distribution pattern of chromosome 5 around the peak Lod scores. Genetic and microsatellite marker loci are listed at the left. Each column represents the genotype of a SMXA RI substrain reported by Mori *et al.*¹⁵⁾ The black boxes indicate the SM/J alleles; the white boxes indicate the A/J alleles; and the gray boxes indicate that the genotype was not determined.

between D5Mit97 and D5Mit31, which are located 74 and 78 cM from the centromere, respectively (Fig. 3). No other regions exceeding suggestive or significant Lod threshold scores were detected on any chromosomes. Figure 4 shows the strain distribution pattern of the loci with the peak Lod scores. SM/J alleles with the peak Lod scores were associated with high frequency of fusion of roots, whereas A/J alleles were associated with low frequency of fusion of roots.

Discussion

Aberrant morphological features of the molar roots constitute one of the most common developmental tooth anomalies in humans. Findings by Ackerman *et al.*¹⁾ suggest that occurrence of taurodont, pyramidal and fused molar roots is influenced by genetic factors. Shimizu *et al.*¹⁸⁾ performed genetic crosses using 2 strains of mice: C57L/J with fused roots of the lower second molars (M_2), and C57BL/6J with normal roots. They found that the fusion of roots of M_2 was controlled by genetic factor on chromosome 5 with an autosomal recessive pattern of inheritance¹⁰⁾. Ohta *et al.*¹⁹⁾ found that an autosomal recessive factor affected fusion of the mesial and palatal roots of the upper first molar (M^1) in EL mice, in an experiment in which EL mice were mated with DDY mice with normal roots. However, the loci for fused root of M^1 in EL mice are still unmapped.

In present study, the continuous spectrum of distribution of the incidence of fusion of roots in M^2 of parental strains and 21 SMXA RI strains suggests the involvement of a polygenic system. In the histogram of the incidence of fusion of roots, the parental strains, SM/J and A/J, are clearly located at the lower end, indicating that some SM/J- and A/J-derived alleles have strong suppressive effects on the fusion of roots. However, the histogram shows that many substrains have a higher frequency of fusion of roots than the parental strains, suggesting that other SM/J- and A/J-derived alleles promote fusion of roots.

In linkage analysis, a Lod score exceeding the suggestive threshold level was found between D5Mit97 and D5Mit31 on chromosome 5. This suggests that one of the genes causing fusion of roots of M^2 in mice is located in that region. The genotypes of mice with a high frequency of fusion of roots included SM/J-derived alleles around the

peak Lod scores on chromosome 5. This finding indicates that the SM/J alleles on chromosome 5 are associated with promotion of fusion of roots. However, the SM/J strain had the lowest frequency (0%) of fusion of roots among all substrains and parental strains. Therefore, it is possible that there remain undetected loci that are responsible for fusion of roots, and that their effects are suppressed by the SM/J alleles.

In a previous study, an allele controlling fusion of roots of M_2 in C57L/J mice was found at the distal region of chromosome 5¹⁰⁾, which is very close (approximate distance, 2 cM) to the loci detected in the present study. Thus, although fusion of roots of M_2 was not observed in SMXA RI or parental strains in the present study, the available evidence suggests that previous loci controlling fused root of M_2 in C57L/J mice and the loci detected in this study may be common. We searched the Mouse Genome Database for candidate genes that map within the interval exceeding the suggestive level. There are about 50 genes including novel genes between D5Mit97 and D5Mit31. However, we found no potential candidate genes involved in tooth development within the candidate region, suggesting that novel genes are involved in the regulation of specific processes affecting fusion of roots.

Confirmation of the candidate loci and further definition of chromosomal location requires a fine mapping study using a F_2 (SM/J \times A/J) intercross. The results of the present study and subsequent fine mapping will help clarify the underlying mechanisms of dental root growth in man, because mouse and human genes are highly syntenic, contributing to the actualization of the tooth regeneration.

Acknowledgments

We greatly appreciate the many helpful suggestions and editorial comments provided by Dr. T. Maeda (Nihon University School of Dentistry at Matsudo). We also appreciate Dr. M. Nishimura (Nagoya University) for providing the SMXA RI strain mice. This investigation was supported by A Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology to promote 2001-multidisciplinary research projects (in 2001–2005).

References

- 1) Ackerman, J.L., Ackerman, A.L. and Ackerman,

- A.B.: Taurodont, pyramidal and fused molar roots associated with other anomalies in a kindred. *Am J Phys Anthropol* **38**: 681–694, 1973.
- 2) Jaspers, M.T. and Witkop, C.J. Jr.: Taurodontism, an isolated trait associated with syndromes and X-chromosomal aneuploidy. *Am J Hum Genet* **32**: 396–413, 1980.
 - 3) Midtbo, M. and Halse, A.: Root length, crown height, and root morphology in Turner syndrome. *Acta Odontol Scand* **52**: 303–314, 1994.
 - 4) Varrel, J.: Root morphology of mandibular premolars in human 45,X females. *Arch Oral Biol* **35**: 109–112, 1990.
 - 5) Seow, W.K. and Shusterman, S.: Spectrum of dentin dysplasia in a family: case report and literature review. *Pediatr Dent* **16**: 437–442, 1994.
 - 6) Pettiette, M.T., Wright, J.T. and Trope, M.: Dentinogenesis imperfecta: endodontic implications. Case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **86**: 733–737, 1998.
 - 7) Gruneberg, H.: The molars of the tabby mouse, and a test of the 'single-active X-chromosome' hypothesis. *J Embryol Exp Morphol* **15**: 223–244, 1966.
 - 8) Asada, Y., Shimizu, T., Matsune, K., Shimizu, K., Suzuki, Y., Takamori, K. and Maeda, T.: Absence of the third molars in strain EL mice. *Ped Dent J* **10**(1): 19–22, 2000.
 - 9) Asada, Y.: Discovery and evaluation of the gutter-shaped root (GSR) in inbred mice. *Jpn J Ped Dent* **33**: 774–784, 1995. (in Japanese)
 - 10) Shimizu, T.: Mapping of a gene causing mouse gutter-shaped tooth root to chromosome 5. *Arch Oral Biol* **44**: 917–924, 1999.
 - 11) Kobayashi, M., Ohno, T., Tsuji, A., Nishimura, M. and Horio, F.: Combinations of nondiabetic parental genomes elicit impaired glucose tolerance in mouse SMXA recombinant inbred strains. *Diabetes* **52**: 180–186, 2003.
 - 12) Ishih, A., Ohno, T., Nishimura, M. and Terada, M.: Genetic analysis of mortality in murine angiostrongyliasis costaricensis using SMXA recombinant inbred mouse strains. *Parasitol Int* **49**: 335–338, 2000.
 - 13) Nishimura, M., Hirayama, N., Serikawa, T., Kanehira, K., Matsushima, Y., Katoh, H., Wakana, S., Kojima, A. and Hiai, H.: The SMXA: a new set of recombinant inbred strain of mice consisting of 26 substrains and their genetic profile. *Mamm Genome* **6**: 850–857, 1995.
 - 14) Anunciado, R.V., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., Nishimura, M. and Namikawa, T.: Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis. *Exp Anim* **49**: 217–224, 2000.
 - 15) Mori, M., Akiyoshi, S., Mizuno, Y., Okuizumi, H., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y. and Nishimura, M.: Genetic profile of the SMXA recombinant inbred mouse strains revealed with restriction landmark genomic scanning. *Mamm Genome* **9**: 695–709, 1998.
 - 16) Manly, K.F., Cudmore, R.H. Jr. and Meer, J.M.: Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mamm Genome* **12**: 930–932, 2001.
 - 17) Doerge, R.W. and Churchill, G.A.: Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character. *Genetics* **142**: 285–294, 1996.
 - 18) Shimizu, T., Maruyama, H., Matsune, K., Shimizu, K., Asada, Y. and Maeda, T.: Molecular genetic study of the gutter shaped root (GSR) in inbred mice. *Ped Dent J* **8**(1): 93–97, 1998.
 - 19) Ohta, M., Nomura, R., Matsune, K., Shimizu, T., Maeda, T. and Asada, Y.: Genetic study of the fused upper molar roots in inbred mice. *Jpn J Ped Dent* **41**(1): 189–193, 2003. (in Japanese)

鎖骨頭蓋骨異形成症における RUNX 2 遺伝子のミスセンス変異

清水 武彦 福島 知典 韓 娟
松 永利 恵 天 井 砂波里 荒 井 延 子
前 田 隆 秀

要旨：鎖骨頭蓋骨異形成症は常染色体優性遺伝性の疾患であり、鎖骨低形成、頭蓋骨縫合骨化遅延、歯の萌出遅延などを特徴とする症候群である。本症候群の遺伝子座は染色体 6p21 に位置し、この領域の転写因子の一つである RUNX 2 の遺伝子変異が本症の原因であるとされている。本研究では、鎖骨頭蓋骨異形成症の 1 男児について、RUNX 2 遺伝子の変異解析を行ったところ以下の知見を得た。

1. 患児に両側の鎖骨低形成、頭蓋骨縫合骨化遅延および泉門閉鎖遅延、乳歯脱落遅延および永久歯萌出遅延が認められた。本人および保護者に対する医療面接の結果、患児の症状は非家族性であると思われた。
2. 本症例の RUNX 2 のエキソン領域の DNA を PCR にて増幅し、シークエンシング法により塩基配列を決定した。その結果、患児のエキソン 3 の runt ドメイン内にミスセンス変異を認めた。673 塩基目のシトシンがチミンに変異することで、225 番目のアミノ酸であるアルギニンがトリプトファンに変異していると予想された。この結果として、RUNX 2 タンパクの骨芽細胞分化に関わる正常な働きが損なわれ、本症候群が発症したものと考えられた。
3. 過去に報告された本症例と同一の変異を有する症例と、本症例の臨床症状を比較したところ、その症状は異なっており、遺伝子型と表現型は必ずしも一致しないことが示唆された。

Key words：鎖骨頭蓋骨異形成症、RUNX 2 遺伝子、遺伝子変異

緒 言

鎖骨頭蓋骨異形成症 (Cleidocranial dysplasia) (MIM 119600) は常染色体優性遺伝性の疾患であり、全身的に骨化遅延を認め、鎖骨低形成、頭蓋骨縫合骨化遅延、歯の萌出遅延を特徴とする症候群である。6 番染色体の平衡転座を伴った鎖骨頭蓋骨異形成症の 2 症例が報告され^{1,2)}、また連鎖解析により本疾患の遺伝子座は染色体 6p21 に存在することが判明した³⁻⁵⁾が、1997 年に本症において RUNX 2/CBFA 1 (runt-related transcription factor 2/Core Binding Factor α 1, 以下 RUNX 2 と称す) の変異 (挿入、欠失、ナンセンス変異; アミノ酸を指定しているコドンで停止コドンへ変化させる変異, ミスセンス変異; アミノ酸を指定しているコドンを別のアミノ酸に対応するコドンへ変化させる変異, ポリアラニンをコード

するコドンの伸長) が同定され、RUNX 2 遺伝子変異が本症の原因であることが明らかになった^{6,7)}。RUNX 2 は、runt ドメイン遺伝子ファミリーに属し、骨芽細胞と軟骨細胞の分化を誘導する転写因子である。RUNX 2 のノックアウトマウスは骨芽細胞を欠如するため骨の形成不全を生じ、出生時に呼吸不全のため死亡することが報告されている⁸⁾。また、RUNX 2 欠損アレルのヘテロ接合体マウスと、放射線導入による RUNX 2 座位の欠損のマウスは、歯科的異常を除いて鎖骨頭蓋骨異形成症の症状を示している⁹⁾。

鎖骨頭蓋骨異形成症の患者における RUNX 2 遺伝子の変異解析によって、RUNX 2 遺伝子変異同定例が多く報告されており¹⁰⁻¹⁴⁾、臨床症状との関連性について検討されている。今回著者らは、日本人の鎖骨頭蓋骨異形成症の 1 男児において、RUNX 2 遺伝子の変異が存在するかどうか、変異の種類は何か、また過去の報告と比較し臨床症状との関連性があるかどうかを知る目的で、RUNX 2 遺伝子の変異解析を行った。

日本大学松戸歯学部小児歯科学教室
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(主任：前田隆秀教授)
(2005 年 6 月 20 日受付)
(2005 年 10 月 25 日受理)

試料および方法

RUNX 2 遺伝子の変異解析

鎖骨頭蓋骨異形成症と診断された日本人の 8 歳の男児から得た DNA を試料とした。患児の舌を歯ブラシにて擦過し、舌粘膜上皮細胞を採取し、Laird ら¹⁵⁾の方法に従い DNA を抽出した。また対照として、全身と頭蓋顎顔面領域の発育に異常のない健常者 (35 歳男性) から同様に DNA を抽出した。

なお、本研究実施に際しては予め、本学倫理委員会の承認 (承認番号: EC 05-017) を得るとともに、本論文の公表に際して、患児および保護者の同意を得た。

RUNX 2 のエキソン 0 からエキソン 7 までの 8 エキソンを polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅するために、Quack ら¹⁰⁾により報告された 7 組のプライマーを用い、エキソン 1 に対しては新たなプライマー (5'-CTAACTTGGTGGCTGTTGTG-3' および 5'-GGYAGCC-TCTTACCTTGAAG-3') を設定した。使用したプライマー配列を表 1 に示す。PCR の反応条件は、鋳型 DNA 100 ng, TaKaRa EX *taq* (TaKaRa) 1 unit, 10×EX *taq* buffer (TaKaRa), dNTP Mixture (TaKaRa) 200 μM, forward および reverse プライマー 0.5 μM を total volume 20 μl に混合し、PCR の温度条件は、Gene Amp®PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて、94°C 4 分に続き、94°C 20 秒, 60°C 30 秒, 72°C 30 秒を 32 サイクル行った。PCR 増幅産物は 2% アガロースゲルを用い、1×TBE (Tris

base-Boric acid-EDTA) 中にて 100 V, 40 分電気泳動後、エチジウムブロマイド染色し、紫外線光上 (302 nm) にて DNA バンドを可視化した。

アガロースゲルから RUNX 2 の DNA バンドを切り出し、QIAquick gel extraction kit (QIAGEN) によって DNA を回収した。シーケンス反応は、精製された DNA 100 ng, ABI PRISM™ DNA sequencing kit BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction with AmpliTaq®DNA Polymerase, FS (Applied Biosystems), 各エキソンの PCR に用いたものと同じのプライマー 30 ng を混合し、温度条件は 94°C 10 秒, 50°C 5 秒, 60°C 4 分を 30 サイクル行った。ジェネティックアナライザ ABI PRISM®310 (Applied Biosystems) を用いて RUNX 2 の 8 つの exon の塩基配列を決定し、患児と対照の塩基配列を比較した。

シーケンスにより患児と対照の塩基配列が異なり、遺伝子変異が疑われたエキソンに対して、変異部位を認識する制限酵素を検索した。遺伝子変異が疑われたエキソンの PCR 産物を制限酵素で処理後、アガロースゲル電気泳動および染色を行い、患児と対照の間で制限酵素断片長多型を検出することで遺伝子変異を同定した。

結 果

臨床症状

患児は両側の鎖骨低形成により、左右の肩が胸の前で接近する特徴的な姿勢がとれた (図 1)。患児 7 歳 8 か

表 1 RUNX 2 遺伝子の PCR プライマー

エキソン		プライマーシーケンス (5'-3')	プロダクトサイズ (塩基対)
エキソン 0	Forward (F)	TACCAGCCACCGAGACCAACAGAG	369
	Reverse (R)	GTTTTGCTGACATGGTGTCCAC	
エキソン 1	F	CTAACTTGGTGGCTGTTGTG	414
	R	GGYAGCCCTTACCTTGAAG	
エキソン 2	F	CAGATGCTTGATTCTGTCGG	385
	R	GTGCTGATTTGTATACAGACTAG	
エキソン 3	F	TCATTGCCTCCTTAGAGATGC	311
	R	GGACATGAAAGTGACACTAAC	
エキソン 4	F	TATAAAGCAATTTGAAATGCAAGG	428
	R	GTTTTGAAGTGAACACATCTCC	
エキソン 5	F	TAAGGCTGCAATGGTTGCTAT	306
	R	GTCCTGTGAGCATGGATGAG	
エキソン 6	F	TAGAACATTAGAGCTGGAAGG	186
	R	CGGACAGTAACAACCAGACAG	
エキソン 7	F	TGTGGCTTGCTGTTCTTTATG	629
	R	GATACCACTGGGCCACTGCT	

Quack ら¹⁰⁾による (エキソン 1 は独自に設定)

月時のパノラマエックス線写真を図2に示した。下顎中切歯および第一大臼歯の萌出が認められず、乳歯脱落遅延と永久歯萌出遅延を認めた。パノラマエックス線写真上では過剰歯は認められなかった。側面頭部エックス線像を図3に、後頭前頭方向投影像を図4に示した。頭蓋骨縫合骨化遅延および泉門閉鎖遅延が原因と思われる正中陥凹を認めた。頭部エックス線規格写真の分析の結果(図5)、軽度の上顎劣成長および扁平な下顎角を認めた。顔貌では、低い鼻稜、眼間開離がみられた。身長は8歳8か月時に121.5cmでありほぼ平均値であった。本人および保護者に対する医療面接の結果、患児の症状は非家族性であると思われた(図6)。



図3 側面頭部エックス線写真(8歳8か月時)
泉門閉鎖遅延が原因と思われる陥凹(矢印)を認めた。

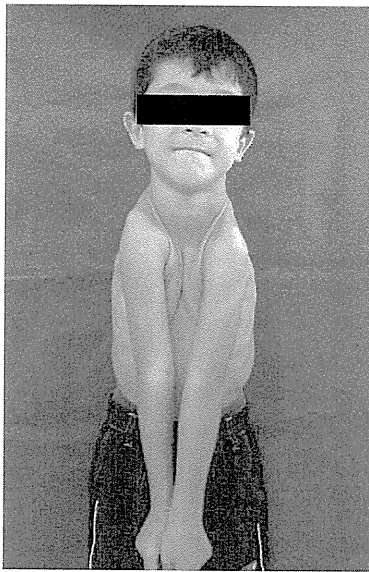


図1 正面写真(8歳8か月時)

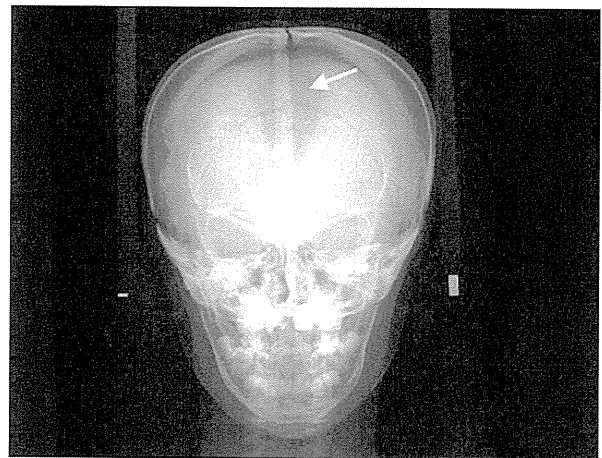


図4 後頭前頭方向投影像(8歳8か月時)
頭蓋骨縫合骨化遅延(矢印)を認めた。

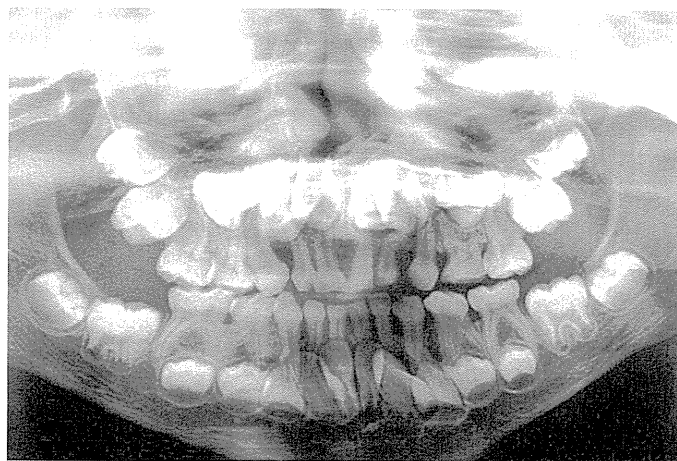


図2 パノラマエックス線写真(7歳8か月時)

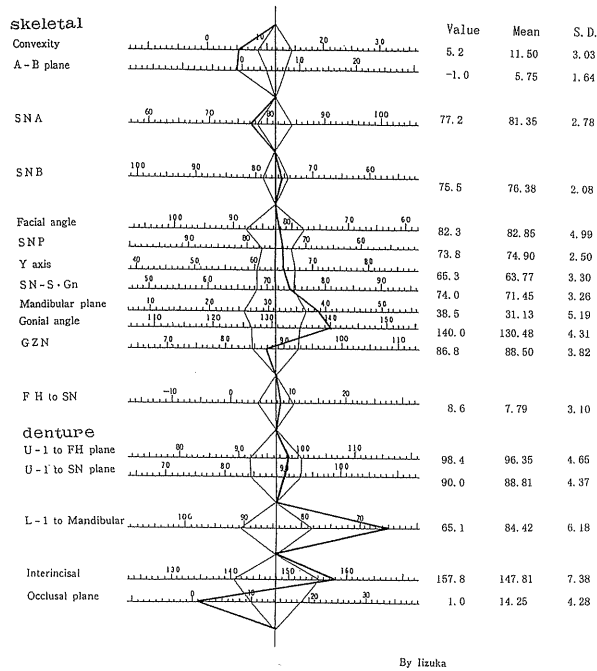
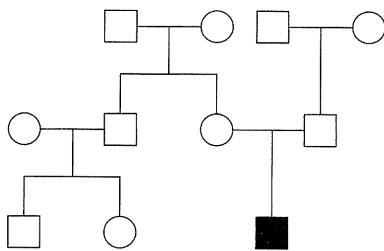


図5 側面頭部エックス線規格写真分析結果



□ : 非罹患男性
 ○ : 非罹患女性
 ■ : 罹患男性 (患児)

図6 鎖骨頭蓋骨異形成症の家系図

RUNX 2 遺伝子の変異解析

図7に患児および対照の RUNX 2 の PCR 増幅産物の電気泳動像を示す。患児の PCR 増幅産物は、8 エキソンとも対照とバンドサイズの差は認められなかった。PCR 増幅産物のシークエンスにおいて、患児の RUNX 2 エキソン3の runt ドメイン内にミスセンス変異を認めた(図8)。673 塩基目のシトシンがチミンに変異 (673 C>T) することで、225 番目のアミノ酸であるアルギニンがトリプトファンに変異 (R 225 W) していた。

患児と対照との間の制限酵素断片長多型の検出におい

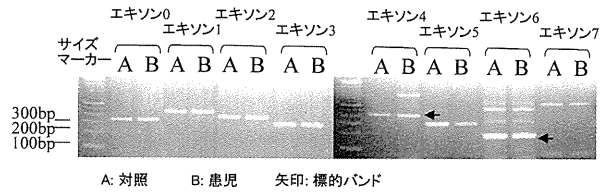


図7 患児および対照の RUNX 2 遺伝子の PCR 産物

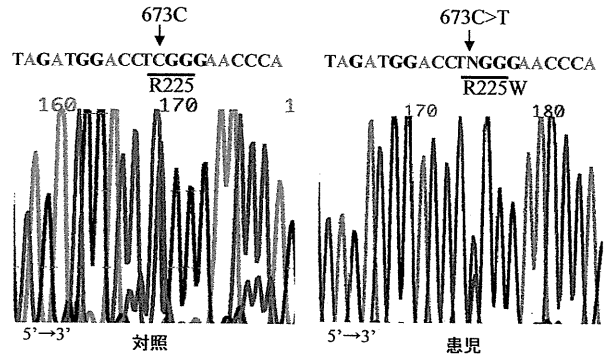


図8 RUNX 2 エキソン3の runt ドメインのミスセンス変異

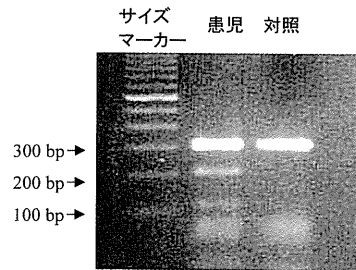


図9 制限酵素 *EcoT* 14 I にて処理した RUNX 2 エキソン3の PCR 産物

ては、患児では 673 C>T のミスセンス変異により制限酵素 *EcoT* 14 I の認識配列 (C/CTTGG) となり、患児の RUNX 2 エキソン3の 311 塩基対の PCR 産物は *EcoT* 14 I により 203 塩基対と 108 塩基対に切断されたが、対照では切断されなかった(図9)。患児と対照との間の制限酵素断片長多型を検出したことより、ミスセンス変異の存在を確認した。

患児と対照の RUNX 2 のエキソン塩基配列はエキソン3以外においては 100% 一致し、また Otto ら¹²⁾により報告された配列、また GenBank の配列 (accession number AF 001443-AF 001450) と完全に一致した。

考 察

鎖骨頭蓋骨異形成症の発症頻度は約 10 万人に 0.5 人、罹患子孫は 1000 人を超えている¹⁶⁾。本

症候群の鎖骨の異常は、通常は両側性部分欠損で、骨化不全のみのこともあり、全欠損はまれで、片側性欠損のこともある。歯科領域では、乳歯脱落遅延、永久歯萌出遅延、過剰歯、上顎劣成長、狭・高口蓋がみられる。頭部・顔面では短頭、大泉門開大、前頭・頭頂突出、前頭縫合に沿った前額正中陥凹、眼間開離、低い鼻稜、頭蓋骨縫合骨化遅延、加齢とともに間挿骨の出現がみられ、骨格的には、低身長、短く先細りの指、脊椎彎曲、恥骨結合開離などがみられる¹⁷⁾。今回著者らが経験した症例においては、両側の鎖骨低形成、頭蓋骨縫合骨化遅延および泉門閉鎖遅延、乳歯脱落遅延および永久歯萌出遅延、上顎劣成長がみられ、鎖骨頭蓋骨異形成症の典型的な症状を呈していた。

RUNX2は未分化間葉系細胞を骨芽細胞系列に分化させる機能と、骨芽細胞の成熟、成熟骨芽細胞で石灰化に関連する基質蛋白質の産生調節などの働きがあることが報告されている^{18,19)}。また、軟骨細胞分化、破骨細胞分化、歯の発生にも重要な転写因子であることが判明している¹⁸⁾。RUNX2はポリオーマウイルスのエンハンサーに結合する因子としてクローニングされた Polyoma Enhancer Binding Protein 2 α A (PEBP 2 α A) と同一の遺伝子である²⁰⁾。鎖骨頭蓋骨異形成症において、RUNX2遺伝子の染色体転座^{1,2)}、欠失、挿入、ナンセンス変異、スプライスサイト変異、ミスセンス変異^{12~14)}が報告されている(図10)。ミスセンス変異はコドン内の塩基の変

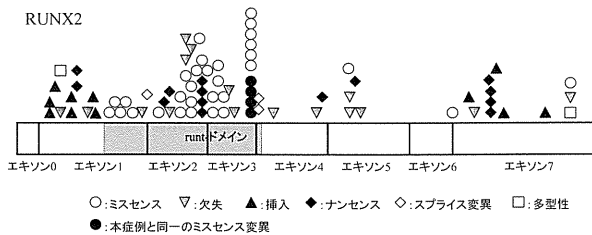


図10 過去に報告された鎖骨頭蓋骨異形成症における RUNX2 変異^{12~14)}

化または置換により、異なったアミノ酸が合成中のポリペプチド鎖内にはいり、変種タンパクがつくられる突然変異であり、RUNX2 遺伝子のミスセンス変異は多くの報告があり、その変異は runt ドメインに集中している^{10,11,21)}。runt ドメインは、ショウジョウバエの体節形成遺伝子 runt に高いホモロジーを持ち、また runt ドメインの C 末端は nuclear localization signal を含み、これは核における RUNX2 タンパクの蓄積にとって必須とされる。著者らの症例に認められたミスセンス変異も runt ドメインの C 末端部に位置する R 225 に認められ、673 C>T により、R 225 W のアミノ酸変異を生じていた。この結果として、RUNX2 タンパクの正常な働きが損なわれ、本症候群が発症したのと考えられる。R 225 におけるミスセンス変異は他の箇所よりも頻度が高く、国内外において複数例の報告^{10,11,13)}がある。R 225 W (673 C>T) と R 225 Q (674 G>A) が報告されているが、nuclear localization signal の一部である R 225 の変異は RUNX2 タンパクの核での蓄積を阻害し、正常なタンパクの機能を喪失すると考えられている¹¹⁾。また runt ドメインにミスセンス変異のある RUNX2 タンパクは DNA 結合も転写活性も示さないことが報告されている¹³⁾。RUNX2 のノックアウトマウスにおいては、間葉細胞から骨芽細胞への分化が阻害され、オステオカルシンやオステオネクチンなどの骨蛋白の発現が著しく低下し、骨形成が進行しないことが報告されている^{8,9,22)}。ヒトにおいても RUNX2 変異による異常蛋白の産生によって、前駆細胞から骨芽細胞への分化の遅延および骨芽細胞の産生量の低下が生じ、全身的な骨低形成が生じるものと考えられる¹⁰⁾。また、歯の萌出遅延については、RUNX2 のノックアウトマウスにおいて、歯の萌出前の歯槽骨での破骨細胞活性の低下がみられたことが報告されている²³⁾。しかしながら、なぜ骨低形成が鎖骨頭蓋に顕著に現れるのか、また過剰歯を生じる原因は不明である。

Quack ら¹⁰⁾の報告では、本症が疑われた42家系のう

表2 RUNX2 エキソン3のミスセンス変異 673 C>T を生じた過去の症例と本症例の臨床症状の比較

	家族性	泉門閉鎖遅延	鎖骨低形成	歯科異常	低身長
Quack ら ¹⁰⁾	N	N	N	N	N
Otto ら ¹²⁾	N	+	+	+	-
Yoshida ら ¹³⁾	-(日本人)	+	+	+(過剰歯+)	+(SD-1.48)
Yoshida ら ¹³⁾	-(日本人)	+	+	+(過剰歯+)	+(SD-3.41)
本症例	-(日本人)	+	+	+(過剰歯-)	-

+ : 有 - : 無 N : 不明

ち 18 家系にのみ RUNX 2 遺伝子変異が同定され、Zhou ら¹¹⁾や Yoshida ら¹³⁾の報告でも本症が疑われた家系すべてに RUNX 2 遺伝子変異が認められるわけではなかった。吉田ら²¹⁾は、明らかに本症の典型的な症状を呈し家族歴も認めるが、RUNX 2 遺伝子変異が認められなかった原因として、RUNX 2 の片方のアレルの欠失の可能性、転写調節領域の異常、イントロンの異常、もしくは RUNX 2 以外の遺伝子異常により本症が発症している可能性を示唆している。

RUNX 2 遺伝子変異は多岐にわたっているが、遺伝子変異と臨床症状との関連性は明らかになっていない。Quack ら¹⁰⁾の報告では、鎖骨頭蓋骨異形成症の浸透率は 100% であったが、同一家族内においても骨格型の症状の程度は様々であり、また過剰歯の存在も他の症状と無関係であったことから、遺伝子型と表現型に明らかな関連性はなかったとしている。Chitayat ら²⁴⁾の報告でも、鎖骨頭蓋骨異形成症の家族内での症状の変異は大きく、歯の萌出遅延のみのこともあったとしている。一方、Yoshida ら¹³⁾は、鎖骨頭蓋骨異形成症の一つの特徴である低身長は、runt ドメインに変異がある患者よりも変異がない患者の方が軽度であること、また低身長と過剰歯の出現の間に明らかな関係があることを報告している。著者らが検出した R 225 のミスセンス変異を有する過去の報告の臨床症状を検索してみると (表 2)、Quack ら³⁾は、R 225 W (673 C>T) と R 225 Q (674 G>A) を報告しているが、その臨床症状の詳細は不明であった。Zhou ら¹¹⁾も R 225 Q を報告し、鎖骨形成不全と泉門閉鎖遅延は認めるもののその他の症状の詳細は不明であった。Yoshida ら¹³⁾は、日本人の鎖骨頭蓋骨異形成症において、R 225 W と R 225 Q を報告しているが、両者とも頭蓋縫合閉鎖遅延、鎖骨形成不全、過剰歯、低身長を示していた。Otto ら¹²⁾の報告した R 225 W では、これらの特徴のうち低身長を呈しておらず、また著者らの症例でも、過剰歯と低身長を認めなかったことから、遺伝子型と表現型は必ずしも一致しないことが示唆された。本症候群の低身長は 4 歳から 8 歳にかけて著名になるとされている²¹⁾が、過去の R 225 W の症例では身長の変化的変化は不明であった。

結 論

鎖骨頭蓋骨異形成症の 1 男児において、本症候群の原因遺伝子とされる RUNX 2 遺伝子の変異解析を行ったところ、以下の知見を得た。

1. 患児に両側の鎖骨低形成、頭蓋骨縫合骨化遅延および永久歯萌出遅延がみられた。医療面接の結果、患児

の症状は非家族性であると思われた。

2. 本症例の RUNX 2 のエクソン領域をシークエンスした結果、患児のエクソン 3 内にミスセンス変異を認めた。このため正常な RUNX 2 タンパクが産生されず、タンパク本来の働きが損なわれ、本症候群が発症したものと考えられた。
3. 過去に報告された本症例と同一の変異を有する症例と、本症例の臨床症状を比較したところその症状は異なっており、遺伝子型と表現型は必ずしも一致しないことが示唆された。

文 献

- 1) Nienhaus, H., Mau, U., Zang, K. D. and Henn, W.: Pericentric inversion of chromosome 6 in a patient with cleidocranial dysplasia, *Am. J. Med. Genet.*, 46: 630-1, 1993.
- 2) Narahara, K., Tsuji, K., Yokoyama, Y. and Seino, Y.: Cleidocranial dysplasia associated with a t (6;18) (p12;q24) translocation, *Am. J. Med. Genet.*, 56: 119-20, 1995.
- 3) Feldman, G. J., Robin, N. H., Brueton, L. A., Robertson, E., Thompson, E. M., Siegel-Bartelt, J., Gasser, D. L., Bailey, L. C., Zackai, E. H. and Muenke, M.: A gene for cleidocranial dysplasia maps to the short arm of chromosome 6, *Am. J. Hum. Genet.*, 56: 938-43, 1995.
- 4) Gelb, B. D., Cooper, E., Shevell, M. and Desnick, R. J.: Genetic mapping of the cleidocranial dysplasia (CCD) locus on chromosome band 6 p 21 to include a microdeletion, *Am. J. Med. Genet.*, 58: 200-5, 1995.
- 5) Mundlos, S., Mulliken, J. B., Abramson, D. L., Warman, M. L., Knoll, J. H. and Olsen, B. R.: Genetic mapping of cleidocranial dysplasia and evidence of a microdeletion in one family, *Hum. Mol. Genet.*, 4: 71-5, 1995.
- 6) Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H., Owen, M. J., Mertelsmann, R., Zabel, B. U. and Olsen, B. R.: Mutations involving the transcription factor CBFA 1 cause cleidocranial dysplasia, *Cell*, 89: 773-9, 1997.
- 7) Lee, B., Thirunavukkarasu, K., Zhou, L., Pastore, L., Baldini, A., Hecht, J., Geoffroy, V., Ducy, P. and Karsenty, G.: Missense mutations abolishing DNA binding of the osteoblast-specific transcription factor OSF 2/CBFA 1 in cleidocranial dysplasia, *Nat. Genet.*, 16: 307-10, 1997.
- 8) Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S. and Kishimoto, T.: Targeted disruption of Cbfa 1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts, *Cell*, 89: 755-64, 1997.
- 9) Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B. and Owen, M. J.: Cbfa 1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development, *Cell*, 89: 765-71, 1997.
- 10) Quack, I., Vonderstrass, B., Stock, M., Aylsworth, A. S.,

- Becker, A., Brueton, L., Lee, P. J., Majewski, F., Mulliken, J. B., Suri, M., Zenker, M., Mundlos, S. and Otto, F.: Mutation analysis of core binding factor A1 in patients with cleidocranial dysplasia, *Am. J. Hum. Genet.*, 65: 1268-78, 1999.
- 11) Zhou, G., Chen, Y., Zhou, L., Thirunavukkarasu, K., Hecht, J., Chitayat, D., Gelb, B. D., Pirinen, S., Berry, S. A., Greenberg, C. R., Karsenty, G. and Lee, B.: CBFA1 mutation analysis and functional correlation with phenotypic variability in cleidocranial dysplasia, *Hum. Mol. Genet.*, 8: 2311-6, 1999.
 - 12) Otto, F., Kanegane, H. and Mundlos, S.: Mutations in the RUNX2 gene in patients with cleidocranial dysplasia, *Hum. Mutat.*, 19: 209-16, 2002.
 - 13) Yoshida, T., Kanegane, H., Osato, M., Yanagida, M., Miyawaki, T., Ito, Y. and Shigesada, K.: Functional analysis of RUNX2 mutations in cleidocranial dysplasia: novel insights into genotype-phenotype correlations, *Blood Cells Mol. Dis.*, 30: 184-93, 2003.
 - 14) Napierala, D., Garcia-Rojas, X., Sam, K., Wakui, K., Chen, C., Mendoza-Londone, R., Zhou, G., Zheng, Q. and Lee, B.: Mutations and promoter SNPs in RUNX2, a transcriptional regulator of bone formation, *Mol. Genet. Metab.*, 86: 257-68, 2005.
 - 15) Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R. and Berns, A.: Simplified mammalian DNA isolation procedure, *Nucleic Acids Res.*, 19: 4293, 1991.
 - 16) Ramesar, R. S., Greenberg, J., Martin, R., Goliath, R., Bardiën, S., Mundlos, S. and Beighton, P.: Mapping of the gene for cleidocranial dysplasia in the historical Cape Town (Arnold) kindred and evidence for locus homogeneity, *J. Med. Genet.*, 33: 511-4, 1996.
 - 17) 升野光雄, cleidocranial dysplasia, 諏訪庸夫, 先天異常症候群辞典 (上巻), 日本臨牀社, 大阪, 2001, pp. 461-462.
 - 18) 小守壽文, : 骨形成のマスターレギュレーター *Pebp 2 α* / *Cbfa 1*, 蛋白質核酸酵素, 45: 13-17, 2000.
 - 19) Schroeder, T. M., Jensen, E. D. and Westendorf, J. J.: Runx2: A master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts, *Birth Defects Res. Part C: Embryo Today*, 75: 213-225, 2005.
 - 20) Ogawa, E., Maruyama, M., Kagoshima, H., Inuzuka, M., Lu, J., Satake, M., Shigesada, K., and Ito, Y.: PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factors homologous to the products of the Drosophila runt gene and the human AML1 gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 6859-6863, 1993.
 - 21) 吉田丈俊, 金兼弘和, 蒔田芳男, 伊藤善也, 永井敏郎, 矢野公一, その他, : わが国における鎖骨頭蓋異形成症の臨床的・遺伝学的検討, *小児歯誌*, 105: 442-447, 2001.
 - 22) Tsuji, K., Komori, T. and Noda, M.: Aged mice require full transcription factor, Runx2/Cbfa1, gene dosage for cancellous bone regeneration after bone marrow ablation, *J. Bone Miner. Res.*, 19: 1481-1489, 2004.
 - 23) Yoda, S., Suda, N., Kitahara, Y., Komori, T. and Ohshima, K.: Delayed tooth eruption and suppressed osteoclast number in the eruption pathway of heterozygous Runx2/Cbfa1 knockout mice, *Arch. Oral Biol.*, 49: 435-442, 2004.
 - 24) Chitayat, D., Hodgkinson, K. A. and Azouz, E. M.: Intrafamilial variability in cleidocranial dysplasia: a three generation family, *Am. J. Med. Genet.*, 42: 298-303, 1992.

Missense Mutation in the RUNX 2 Gene in A Patient with Cleidocranial Dysplasia

Takehiko Shimizu, Tomonori Hukushima, Juan Han, Rie Matsunaga
Sahari Tenjyo, Nobuko Arai and Takahide Maeda

*Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
(Director : Prof. Takahide Maeda)*

Cleidocranial dysplasia is an autosomal dominant disorder characterized by skeletal anomalies such as patent fontanels, late erupting secondary dentition, short stature, and rudimentary clavicles. The locus for this disease was mapped to chromosome 6p21. Mutations in the RUNX2 gene has been shown to cause cleidocranial dysplasia. RUNX2 is a member of the runt family of transcription factors and its expression is found in developing osteoblasts and chondrocytes. An 8-year-old Japanese male with the clinical diagnosis of cleidocranial dysplasia was the subject of this study. His clinical description included delayed closure of sutures, late erupting secondary dentition, and hypoplastic clavicles. We did not discover any past history of cleidocranial dysplasia in his family.

We performed mutational analysis for RUNX2 to determine if there was a mutation in RUNX2 in this patient. A missense mutation was detected in the coding region of the RUNX2. Arginine 225 (R225) which was located at the C-terminal end of the runt domain was mutated and a replacement by tryptophan (R225W) was identified in the patient. This mutation, which results in premature termination in the runt domain, may produce a cleidocranial dysplasia phenotype by abolishing transactivation of the mutant protein.

We studied the clinical evaluations of phenotypes of previous cases with R225W mutation in RUNX2. We could not, however, find any significant correlation of genotype and phenotype.

Key words : Cleidocranial dysplasia, RUNX2 gene, Mutation analysis

マウス SMXA Recombinant 近交系を用いた上顎近遠心方向の 大きさを規定する遺伝子の量的形質遺伝解析

小宮 城 治 清水 邦彦

要旨: 骨格性不正咬合の遺伝子診断法開発のために SMXA Recombinant 近交系 (RI) マウスを用い、上顎の近遠心方向の大きさを規定している遺伝子の探索を、量的形質遺伝解析 (QTL 解析) 法にて行った。21 系統の SMXA RI マウスを 90 日齢まで飼育した後、上顎骨の切歯孔前縁と蝶形骨基底後縁の距離を測定した。上顎の大きさは最大で 11.5 mm (SMXA-8)、最小で 10.4 mm (SMXA-24) であり、その他の SMXA RI マウスの顎骨の大きさはこの値の間に分布したため、得られた値を量的形質値とした。

これまでに報告されている SMXA RI マウスの Strain Distribution Pattern と量的形質値とを指標として QTL 解析ソフト Map Manager QTb 28 を用いて全染色体を対象に QTL 解析を行った。その結果、第 10 番染色体と第 11 番染色体に有意な値を得た。第 10 番染色体の 57.9 cM に位置するマーカー D 10 *Mit* 70 で LOD スコアが 2.9 の suggestive の値を示し、第 11 番染色体の 9.8 cM および 13.1 cM に位置するマーカー D 11 *Mit* 152 および D 11 *Mit* 163 で LOD スコアが 5.8 の significant の値を示した。この結果から、第 10 番及び第 11 番染色体のこれら領域に上顎の近遠心方向を規定する遺伝子が存在していることが示唆された。

Key words: QTL 解析, SMXA Recombinant inbred マウス, 上顎, 遺伝解析

緒 言

小児歯科臨床において、不正咬合を有する小児の成人時の予測や、親の不正咬合がどの程度遺伝するのか、あるいは両親のどちらの顎顔面の形質が強く発現するのかなど、顎顔面領域の成長を予測することは極めて重要である。ハプスブルグ家の下顎前突優性遺伝に代表されるように、顎骨形態は環境要因だけでなく遺伝による影響が強く働くことが知られている¹⁾。顎骨形態を理解するためには、顎顔面の遺伝形式をはじめ形態形成遺伝子の解明が重要であることは疑いようもない。しかしながら、顎顔面領域の遺伝学的観点からの報告は疫学的手法によるものが多く、分子遺伝学的解析はほとんど行われていないのが現状である。また、顎骨形態の研究では下顎骨を中心に解析しているものが多い^{2,3)}。不正咬合の要因の一つとして、上下顎の大きさの不調和が挙げられ、下顎骨だけでなく相対的な上顎骨の大きさに対する解析が必要とされる。

これまでに著者らの近交系マウスを用いた一連の研究

において、大きな顎骨を有するマウス (MRL/n, RF/J, A/J) と小さな顎骨を有するマウス (C 57 BL 6/J, SM/J) の交配実験を行い、得られた下顎骨の大きさを線分計測し検討を行った結果、下顎骨の大きさが優性遺伝を示すが、単純なメンデル遺伝形式に従わず多遺伝子が関与していることを明らかにしてきた^{4,5)}。多遺伝子により調節されている形質は連続的な表現型を示し、そのような形質を量的形質という。顎骨の大きさは量的形質とみなすことができ、量的形質遺伝 (Quantitative Trait Locus; QTL) 解析法により遺伝的な解析が可能である⁶⁾。そのため、これまでに筆者らは下顎骨の大きさの異なる近交系マウス SM/J と A/J の両系統を交雑することにより得られた SMXA Recombinant Inbred (RI) マウス 21 系統を用いた QTL 解析により、マウス第 10 番染色体と第 11 番染色体に下顎骨の大きさを規定する遺伝子が存在することを明らかにしてきた⁷⁾。

今回、下顎骨だけでなく上顎の大きさを評価するために SMXA RI マウスを用い、上顎骨の近遠心方向の大きさを対象とした QTL 解析を行い、検討を行ったので報告する。

材料と方法

1. マウスおよび試料の作製

今回の研究に使用したマウスは、国立浜松医科大学医

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(指導: 前田隆秀教授)
(2002 年 5 月 27 日受付)
(2002 年 7 月 6 日受理)

学部附属動物実験施設内で系統維持されている SM/J, A/J および SMXA RI マウス 21 系統の合計 23 系統の雌雄おのおの 5 匹ずつ、合計 230 匹を用いた。現在、SMXA RI 近交系マウスは 26 系統存在するが、そのうちの 5 系統 (SMXA-3, -6, -11, -21, -23) は解析に必要な産子数が得られなかったため解析対象から除外した。全てのマウスは室温 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ の条件下で飼育を行い、飼料には日本農産の MR プリーダーを用いた。

各系統は 90 日齢まで飼育した後、エーテル麻酔下にて安楽死させ頭部を摘出した。得られた頭部は 1% KOH

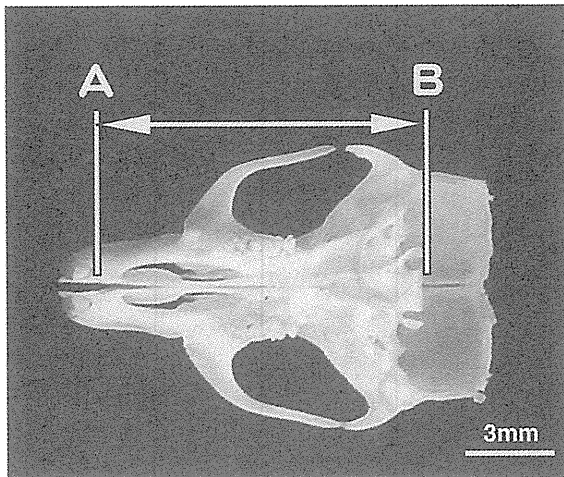


図1 上顎骨の計測点。A：切歯孔前縁 B：蝶形骨基底後縁

に浸し、 43°C で 48 時間処理し軟組織を除去した。なお、本研究の実験方法およびマウスの使用は日本大学松戸歯学部動物実験倫理委員会の承認を得ている。

2. 上顎の計測

乾燥した上顎を 1 mm 目盛りの方眼紙上に置きキャノン社製複写機にて 2 倍に拡大した。図 1 に示すように切歯孔前縁と蝶形骨基底後縁を計測点として、ノギスを用い計測点間距離を測定した。得られた計測値は 2 倍に拡大したものであるために 1/2 倍にした後、各系統の平均値及び標準偏差を算出した。

3. QTL 解析

QTL 解析に必要な Strain Distribution Pattern はすでに報告されている 789 の多型マーカーの情報を利用した⁸⁾。これらのマーカーは約 5 cM の間隔で染色体上に位置している。QTL 解析法の 1 つである Interval mapping は QTL 解析ソフト Map Manager QTb 28 を用いて行った⁹⁾。QTL を検出するための統計上の有意水準は permutation test により算定される Likelihood Ratio Statistic (LRS) 値と Logarithm of Odds (LOD) スコアーにより決定した^{10,11)}。LOD スコアーは LRS 値を 4.605 で割った値である¹²⁾。

結 果

1. 各系統別の上顎測定値

各系統の上顎測定結果を図 2 に示す。SMXA-8 系統で顎骨の大きさが最大を示し 11.5 mm であった。また

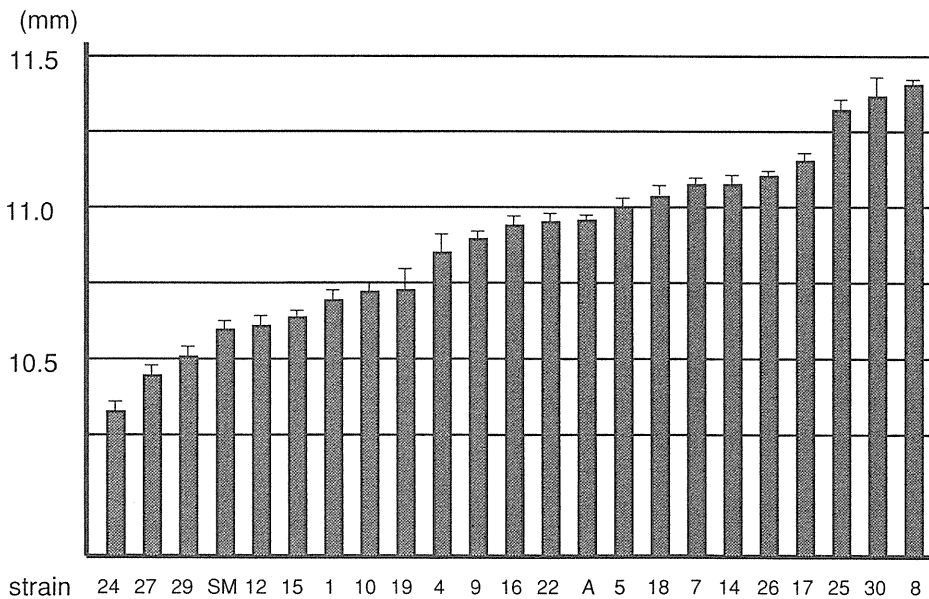


図2 上顎測定結果

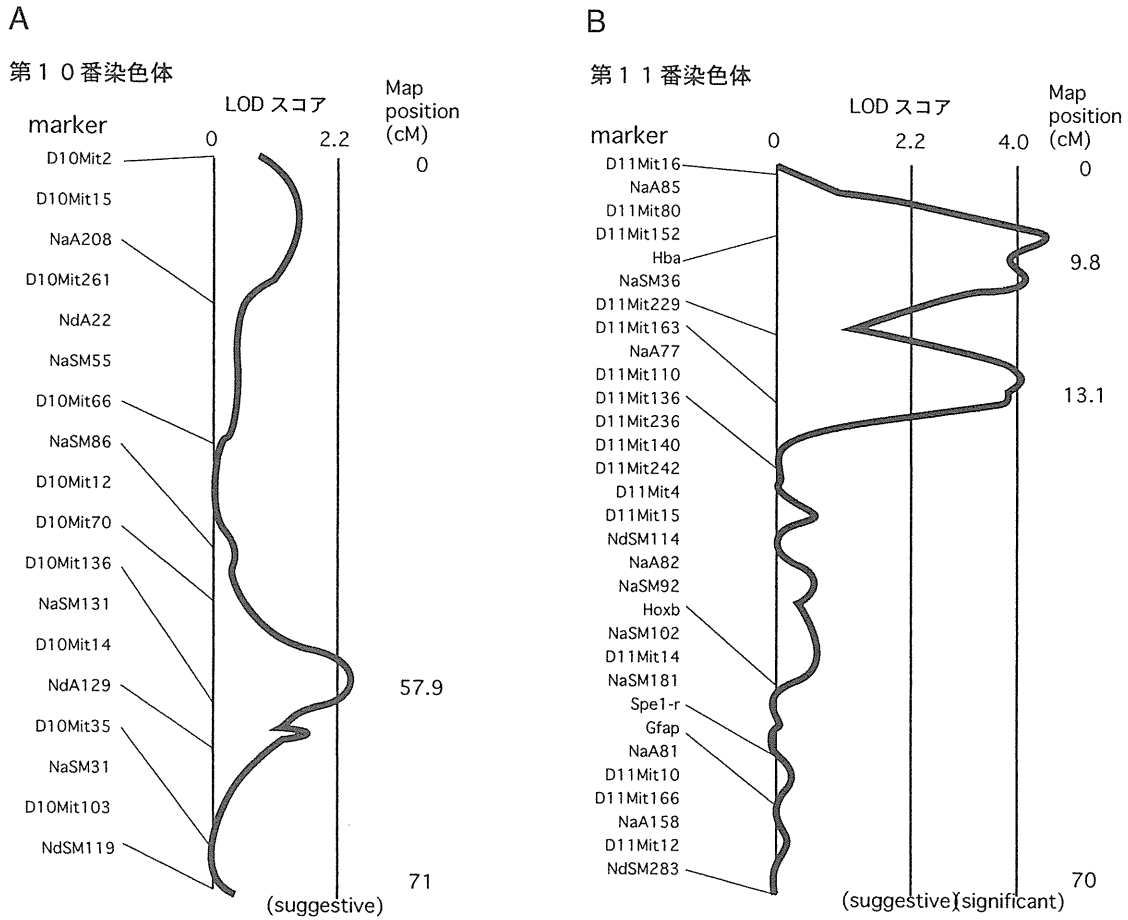


図3 QTL解析結果。A: 第10番染色体 B: 第11番染色体

SMXA-24系統で最小値を示し、その大きさは10.4 mmであった。その他のSMXA RIマウスの顎骨の大きさはこれらの値の間に分布した。なお、親系統であるSM/JとA/Jではそれぞれ10.7 mmと11.0 mmであった。

2. QTL解析

上顎骨近遠心方向の大きさを対象としたQTL解析結果を図3に示す。permutation testの結果、QTLの検出基準はLODスコアが2.2~4.0の時にsuggestive (5%有意水準)であり、4.0以上の時にsignificant (1%有意水準)であることが算定できた。全染色体を対象としたQTL解析の結果、第10番染色体の57.9 cMに位置するマーカーD10Mit70でLODスコアが2.9のsuggestiveの値を示し、第11番染色体の9.8 cMおよび13.1 cMに位置するマーカーD11Mit152およびD11Mit163でLODスコアが5.8のsignificantの値を示した。95%信頼区間は10番染色体上のマーカーD10Mit12と

表1 検出したQTL近傍の候補遺伝子

染色体	Map position (cM)	候補遺伝子
10	58	<i>Syt</i> : synaptotagmin
	59	<i>Myf 5</i> : myogenic factor 5
		<i>Myf 6</i> : myogenic factor 6
	61	<i>Kera</i> : keratocan
		<i>Lum</i> : lumican
	62	<i>Kcnc 2</i> : potassium voltage gated channel, Shaw-related subfamily, member 2
	<i>Kifc 4 b</i> : kinesin family member C 4 B	
11	12	<i>Mor 2</i> : malate dehydrogenase
	13	<i>Otx 1</i> : orthodenticle homolog 1
		<i>Cct 4</i> : chaperonine subunit 4
		<i>Spnb 2</i> : beta-spectrin 2
	13.5	<i>Peli 1</i> : pellino 1
	15	<i>Gek 1</i> : germ cell kinase 1
	16	<i>Asb 3</i> : ankyrin repeat and SOLS box containing protein 3
	<i>Hba</i> : hemoglobin alpha chain complex	
	<i>Mpg</i> : N-methylpurine DNA glycosylase	
	<i>Stk 10</i> : serin/threonine kinase 10	

D 10 *Mit* 14 の間と、11 番染色体のマーカー D 11 *Mit* 152 と *Hba* の間、D 11 *Mit* 229 と D 11 *Mit* 163 の間である。なお、第 10 番および 11 番染色体以外の染色体では有意な値が得られなかった。

考 察

本研究では複雑に関与している遺伝子の作用を単純に解析するために SMXA RI 近交系マウスを用いた。SMXA RI 近交系は RI マウスの 1 種類であり SM/J と A/J と親系統として交配させ、その交雑系 F2 マウスを基礎集団として 20 世代以上近交を続けた系統である¹³⁾。RI マウスは複合的な形質の解析のために開発されたマウスであり、これまでに SMXA RI マウスを用いて体重、血中インシュリン値、脂質代謝活性などの量的形質の遺伝解析が行われている¹²⁾。SMXA RI 近交系の親系統である SM/J は小さな顎骨を持ち、A/J は大きな顎骨を持つ。解析対象となる形質が両親系統間で異なるために SMXA RI マウスは顎骨の大きさを規定する遺伝子の解析に非常に有効である。

顎骨の大きさのように連続量として測定できるが明確に区別ができない形質を量的形質と言い、一般にこれらの形質は複数の遺伝子により調節されている¹⁴⁾。このような量的形質を調節している遺伝子の遺伝子座を同定するのに QTL 解析が適している。上顎骨の大きさは SMXA-8 系統で最大を示し SMXA-24 系統で最小値を示した。また、その他の SMXA RI マウスの顎骨の大きさはこれらの値の間に分布した。なお、各 SMXA RI 系統の顎骨の大きさと体重に相関はみられない¹⁴⁾。上顎骨の大きさを対象として QTL 解析を行った結果、第 10 番染色体の 57.9 cM に位置するマーカー D 10 *Mit* 70 で LOD スコアが 2.9 の suggestive の値を示し、第 11 番染色体の 9.8 cM および 13.1 cM に位置するマーカー D 11 *Mit* 152 および D 11 *Mit* 163 で LOD スコアが 5.8 の significant の値を示し、これらのマーカーの近傍に上顎骨の大きさを規定する遺伝子の存在する可能性が示唆された。

第 10 番および 11 番染色体の QTL が検出された領域近傍のマーカーを指標として Mouse Genome Database (MGD, <http://www.informatics.jax.org/>) より候補遺伝子を調べた結果を表 1 に示す。これまでに第 10 番染色体に *Syt*, *Myf5*, *Myf6*, *Kera*, *Lum*, *Kcnc2*, *Kifc4*, 第 11 番染色体に *Mor2*, *Otx1*, *Cct4*, *Sfnb2*, *Gek1*, *Asb3*, *Hba*, *Mpg*, *Stk10* の遺伝子がこの領域に位置することが知られているが、これらの遺伝子の機能は十分に解析されているとは言えず、現在の情報から、明らかに顎骨の大き

さを規定しているものは特定できない。しかしながら、いずれの遺伝子も候補遺伝子となりうる可能性を秘めている。特に第 11 番染色体 12 cM に存在している *Otx1* 遺伝子は、発生初期段階において第一鰓弓および前頭部で発現しており、この領域を中心とした形態形成に関与していることが知られている¹⁵⁾。さらに興味深いことに、*Otx1* 遺伝子は胎生期だけでなく生後の脳下垂体でも発現しており、培養細胞による実験より *Otx1* は成長ホルモンの分泌に関与する可能性も示されている¹⁶⁾。これらの研究と今回の実験結果により、*Otx1* 遺伝子が上顎骨の大きさを規定している可能性が示唆された。

マウス第 10 番染色体の 57.9 cM と第 11 番染色体の 9.8 cM および 13.1 cM の領域はヒトとマウス染色体の相同性から、それぞれヒト染色体 12q21 と 2p12 に相当する。今回の研究では実験系を単純化するために SMXA RI マウスを用い、ホモ接合体の染色体の効果を対象として調べた。今後、ヒト遺伝子診断への応用にはヘテロ接合体での解析が必要となるが、今回の結果よりヒト染色体 12q21 と 2p12 に焦点を当てることで、骨格性不正咬合の遺伝子診断への可能性が示された。

結 論

SMXA RI マウスを用い、上顎の近遠心方向の大きさを規定している遺伝子の探索を、QTL 解析にて行った結果、以下の結論を得た。

1. マウス第 10 番染色体の 57.9 cM に位置するマーカー D 10 *Mit* 70 で LOD スコアが 2.9 の suggestive の値を示し、第 11 番染色体の 9.8 cM および 13.1 cM に位置するマーカー D 11 *Mit* 152 および D 11 *Mit* 163 で LOD スコアが 5.8 の significant の値を示し、これらのマーカーの近傍に上顎の大きさを規定する遺伝子の存在する可能性が示唆された。
2. マウス第 10 番染色体の 57.9 cM と第 11 番染色体の 9.8 cM および 13.1 cM の領域は、それぞれヒト染色体 12q21 と 2p12 に相当し、この領域に焦点を当てることで骨格性不正咬合の遺伝子診断開発の可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、実験動物を分与いただきました国立浜松医科大学医学部付属動物実験施設に感謝致しますとともに、御指導と御校閲を賜りました本学小児歯科学講座の前田隆秀教授に感謝いたします。本研究の一部は学術フロンティア推進事業の補助を受けた。

本論文の要旨の一部は第 40 回日本小児歯科学会大会 (2002 年 6 月 6 日, 千葉) において発表した。

文 献

- 1) 清水敏郎, 和田溝聴: 反対咬合の遺伝, 須佐美隆三, 中後忠男編, 反対咬合, 医師薬出版, 東京, 1976, pp. 36-40.
- 2) Goto, N., Yamaoka, A., Sudo, T., Mannen, H., Fukuta, K. and Nishimura, M.: Morphometric profiles of the mandible of SMXA recombinant inbred strains of mice and strain identification on the basis of mandible measurements, *Exp. Anim.*, 42: 41-50, 1993.
- 3) Klingenberg, C. P., Leamy, L. J., Routman, E. J. and Cheverud, J. M.: Genetic architecture of mandible shape in mice: effects of quantitative trait loci analyzed by geometric morphometrics, *Genetics*, 157: 785-802, 2001.
- 4) Maeda, T., Okamoto, K., Yoshida, A. and Kurihara, Y.: Study of hereditary trends in the shape of murine mandible, *J. Nihon Univ. Sch. Dent.*, 36: 269-275, 1994.
- 5) 岡本和久, 道本 篤, 武井謙司, 太田宅哉, 小宮城治, 松原清他: 近交系マウス複数モデルを用いた下顎骨形態の遺伝に関する研究, *小児歯誌*, 35: 410-414, 1997.
- 6) Nadeau, J. H. and Frankel, W. N.: The roads from phenotypic variation to gene discovery: mutagenesis versus QTLs, *Nature Genet.*, 25: 381-384, 2000.
- 7) Dhomoto, A., Shimizu, K. and Maeda, T.: Quantitative trait locus on chromosomes 10 and 11 influencing mandible size of SMXA RI mouse strain, *J. Dent. Res.*, 81: 501-504, 2002.
- 8) Mori, M., Akiyoshi, S., Mizuno, Y., Okuizumi, H., Okazaki, Y., Hayashizaki, Y., et al.: Genetic profile of the SMXA recombinant inbred mouse strains revealed with restriction landmark genomic scanning, *Mamm. Genome*, 9: 695-709, 1998.
- 9) Manly, K.: A Macintosh program for storage and analysis of experimental genetic mapping data, *Mamm. Genome*, 4: 303-313, 1993.
- 10) Doerge, R. and Churchill, G.: Permutation tests for multiple loci affecting a quantitative character, *Genetics*, 142: 285-294, 1996.
- 11) Lander, E. and Kruglyak, L.: Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results, *Nature Genet.*, 11: 241-247, 1995.
- 12) Anunciado, V. P., Ohno, T., Mori, M., Ishikawa, A., Tanaka, S., Horio, F., et al.: Distribution of body weight, blood insulin and lipid levels in the SMXA recombinant inbred strains and the QTL analysis, *Exp. Anim.*, 29: 217-224, 2000.
- 13) Nishimura, M., Hirayama, T., Serikawa, T., Kanehira, K., Matsushima, Y., Katoh, H., et al.: The SMXA: a new set of recombinant inbred strain of mice consisting of 26 substrains and their genetic profile, *Mamm. Genome*, 6: 850-857, 1995.
- 14) 石川 明, 鈴木 享, 海老原史樹文: QTL解析: 基礎理論と行動遺伝学への応用, *比較生理生化学*, 15: 49-58, 1998.
- 15) Acampora, D., Avantaggiato, V., Tuorto, F. and Simeone, A.: Genetic control of brain morphogenesis through *Otx* gene dosage requirement, *Development*, 124: 3639-3650, 1997.
- 16) Acampora, D., Mazan, S., Tuorto, F., Avantaggiato, V., Tremblay, J. J., Lazzaro, D., et al.: Transient dwarfism and hypogonadism in mice lacking *Otx 1* reveal prepubescent stage-specific control of pituitary levels of GH, FSH and LH, *Development*, 125: 1061-1072, 1998.

Quantitative Trait Locus Analysis of the Genes Regulating
the Anteroposterior Length of the Maxilla using
SMXA Recombinant Inbred Strain Mice

Joji Komiya and Kunihiko Shimizu

*Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentist at Matsudo
(Director : Prof. Takahide Maeda)*

To develop a genetical diagnosis for skeletal malocclusion, we explored gene(s) regulating the anteroposterior length of the maxilla by the method of Quantitative Trait Locus (QTL) analysis using SMXA Recombinant Inbred (RI) strain mice. Anteroposterior lengths between the anterior border of the incisor pore and posterior border of the basisphenoid in the maxilla of 21 SMXA RI Strains mice at 90 days of age were measured. The maxilla of the SMXA-8 strain was the largest (11.5 mm) and that of SMXA-24 was the smallest (10.4 mm) in 21 strains. As the maxilla sizes of SMXA RI strain mice formed a continuous distribution between 11.5 mm and 10.4 mm, the data was regarded as the value of the quantitative trait. The strain distribution pattern reported in the previous study and the value of the quantitative trait were used in the QTL analysis for the whole genome using the Map-Manager QTb 28 software. Based on the result of QTL analysis, we obtained significant values on chromosome 10 and 11. Around the marker D 10 Mit 70 mapped at 57.9 cM from the centromere on chromosome 10, the LOD score showed 2.9 with a suggestive level and around the marker D 11 Mit 152 and D 11 Mit 163 mapped at 9.8 and 13.1 cM, respectively on chromosome 11, the LOD scores showed 5.8 with a significant level.

These results suggest that the major gene(s) regulating the anteroposterior length of the mouse maxilla are located on chromosomes 10 and 11.

Key words : QTL analysis, SMXA recombinant inbred strain, Maxilla, Genetic analysis

コルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂発症 に關与する母体環境の検討

韓 娟 前田 実智子 松 永利 恵
清水 武彦 清水 邦彦 前田 隆秀

要旨：口唇裂，唇顎口蓋裂の発症は遺伝要因ならびに環境要因が影響するが，それらの機序はまだ解明されていない。本研究の目的はマウス唇顎口蓋裂発症に關与する環境要因の一つである母体効果を検討することである。著者らは A/WySn 系統（以下 A とする）と C3H/He 系統（以下 C3H とする）マウスを用い，雌雄をそれぞれ逆にして交配し，交雑 F₁ マウスを得た。そして F₁ マウスを A マウスに戻し，雌雄をそれぞれ逆にして交配し，[A×F₁(A×C3H)]，[A×F₁(C3H×A)]，[F₁(A×C3H)×A] と [F₁(C3H×A)×A] N₂ バッククロスマウス胎仔を作成した。妊娠マウスに妊娠 11 日目から 14 日目までの 4 日間，コルチゾン 2.5 mg/匹/日を投与した。胎生 18 日に帝王切開を行い，各群において着床数，吸収胎仔数，同腹胎仔数を調べた。生存胎仔において唇顎口蓋裂の有無について観察した。

6 群マウスにおいて胎仔の吸収率が 36.4%~45.0% であり，群間に有意差は認められなかった。唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率では，A マウス (35.5%) が A×F₁ (15.5%) および F₁×A (22.2%) と比較し，有意に高かった。唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣は正常な口唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣と比較し，平均同腹胎仔数の差はみられなかったが，平均着床数と平均吸収胎仔数が多かった。また，A マウスおよび N₂ マウスは共に同腹胎仔数が 8 匹であった時の唇顎口蓋裂発症率は最も高い値を示した。

本研究の結果から，コルチゾン投与によりマウス胎仔の高い吸収率を起すことが示唆された。また，唇顎口蓋裂の発症率は着床数および同腹胎仔数と關連することが示された。

Key words：マウス，唇顎口蓋裂，母体環境，コルチゾン

緒 言

口唇裂，唇顎口蓋裂はヒトの先天顔面奇形の中で最も高い発生頻度を示すものであり，一般集団と比べ，近親間における再現率は高い^{1,2)}。また一卵性双生児における発現の一致率は，二卵性双生児より高い^{3,4)}ことから，遺伝的要因の關与が示唆されている。一方，多くの疫学的な調査から妊娠早期母親の高熱⁵⁾，てんかんおよび抗てんかん剤の服用⁶⁻⁸⁾，コルチコステロイドの全身または局所への使用^{9,10)}，放射線や農薬などの被曝^{11,12)}，喫煙¹³⁾，過度飲酒¹¹⁾により口唇裂，唇顎口蓋裂を發症することが報告されている。また母親の人種^{14,15)}，年齢¹⁶⁾，栄養状態¹⁷⁾などの母体の生理的な環境と口唇裂，唇顎口蓋裂發症の關連も注目されている。

今日，妊娠中に催奇形薬物を投与される危険性は低くなったと思われるが，日常生活において催奇形因子に暴露されている可能性は高まっていると考えられる。一方，妊娠中に葉酸を投与することにより，新生児の先天的口腔顔面裂奇形の發生は減少するとの報告¹⁷⁾がある。しかし，葉酸の投与によって母親の妊娠中のビタミン不足を改善したにもかかわらず，口唇裂，唇顎口蓋裂の發症率に大きな変化はなく¹⁸⁾，口唇裂，唇顎口蓋裂發症に關与する環境要因の作用機序または環境要因の多寡さえも未だ解明されていない。

ヒトの口唇裂，唇顎口蓋裂の環境要因を解明するためにモデルマウスが多く用いられている。マウス系統によって胎仔の自然的な吸収率，生存率，口唇裂および唇顎口蓋裂の發症率は異なることが報告されている¹⁹⁾。また，マウス受精卵胚移植実験から，胎仔の吸収率，生存率，口唇裂および唇顎口蓋裂の發症率は母獣系統あるいは母体環境に影響されることが報告されている²⁰⁾。一方，コルチゾン投与によるマウスに口蓋裂を誘発することが報告されている²¹⁾。著者ら²²⁻²⁴⁾は過去の研究におい

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座
(主任：前田隆秀教授)
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(2005 年 9 月 16 日受付)
(2005 年 10 月 19 日受理)

て、コルチゾン投与により近交系 A/WySn マウス（以下 A マウスとする）および近交系 C3H/He マウス（以下 C3H マウスとする）において共に口蓋裂が誘発された。また、コルチゾン投与により A マウスにおいて唇顎口蓋裂がみられたが、C3H マウスにおいて唇顎口蓋裂はみられなかった²²⁾。A と C3H の 2 系統マウス間で遺伝学的な交配より得た N₂ バッククロスマウス（以下 N₂ マウスとする）において、唇顎口蓋裂を有したマウス胎仔に性差は認められなかった²³⁾。さらに、コルチゾン投与による A マウス唇顎口蓋裂を発症する候補染色体（11 番と 14 番）は²⁴⁾、自然発症の A マウス口蓋裂、唇顎口蓋裂の候補染色体（11 番と 13 番）²⁵⁾と異なることを報告している。本研究の目的は、コルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂発症に関与する母体環境要因を解明することである。そのために唇顎口蓋裂に高感受性である A マウスと唇顎口蓋裂に抵抗性である C3H マウスを用いた。交雑 F₁ マウス（以下 F₁ マウスとする）において唇顎口蓋裂は全く認められなかった為、N₂ マウスを用いた。N₂ マウスは A×F₁ と F₁×A から得た為、遺伝子型は同一であるが、母体環境は異なる。以上の A マウス、C3H マウスおよび N₂ マウスにおいて、着床数、吸収胎仔数、生存胎仔数、同腹仔数、ならびに唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率、さらに各同腹仔数における唇顎口蓋裂の発症率について観察を行い、検討を試みた。

試料および方法

1. 実験動物と飼育環境

国立遺伝学研究所より供与された A マウスと、三協ラボサービス株式会社より供与された C3H マウスを用い、本学動物実験研究センターでマウスを繁殖した。また、A マウスと C3H マウスとを交配し、F₁(A♀×C3H♂) と F₁(C3H♀×A♂) マウスを得た。以上の A マウス、C3H マウスおよび F₁ マウスを本研究で用いた。

実験動物の飼育は、本学動物実験研究センター内のマウス室にて室温 24±1℃、湿度 65±5%、明暗 12 時間サイクルの一定環境下にて行った。飼料は MF（オリエンタル社製）固形飼料を、飲料水は水道水を給水ビンにて自由摂取させた。

2. 実験方法

A マウス、C3H マウスにおいて、同系統の雌雄マウスを交配させた。F₁ マウスを A マウスに戻し、雌雄をそれぞれ逆にして交配させた。翌朝に膈栓の形成を確認し、その日を妊娠 0 日とした。妊娠マウスにおいて、妊

娠 11 日目から 14 日目までの 4 日間に、リン酸緩衝生理食塩水に溶解した 25 mg/ml の酢酸コルチゾン懸濁液を腹部皮下に投与した。投与量の決定は、コルチゾンが 2.5 mg/匹/日の投与によって A マウスに最も高い発症率の口蓋裂を誘発する²¹⁾に従った。妊娠 18 日目に妊娠マウスを頸椎脱臼により安楽死させ、マウス胎仔を子宮から摘出し、着床数、吸収胎仔数、生存胎仔数を調べ、さらに生存胎仔において実体顕微鏡下で唇顎口蓋裂の有無について観察を行った。

以上の交配より、A×A、C3H×C3H、および N₂ マウスとして A×F₁(A×C3H)、A×F₁(C3H×A)、F₁(A×C3H)×A と F₁(C3H×A)×A の 6 群のマウス胎仔において観察を行った。

なお、本実験は日本大学松戸歯学部動物実験倫理規定（承認番号 第 ECA-02-0001 号）に従った。

3. 統計分析

各群マウス間の平均着床数、平均吸収胎仔数、平均生存胎仔数、平均同腹仔数および唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の平均唇顎口蓋裂仔数において差の検定には t 検定と一元配置分散分析を、吸収率、生存率、唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率において差の検定には χ^2 検定を用い、危険率 5% を有意水準とした。

結 果

本研究において観察した母獣数は、A×A マウスが 31 匹、C3H×C3H マウスが 9 匹であった。A×F₁ マウスが 71 匹であり、そのうち A×F₁(A×C3H) が 31 匹、A×F₁(C3H×A) が 40 匹であった。F₁×A マウスが 81 匹であり、そのうち F₁(A×C3H)×A が 41 匹、F₁(C3H×A)×A が 40 匹であった（表 1）。

1. 各群における着床数、吸収胎仔数、生存胎仔数について

A×A マウスにおいて、着床数が 285 匹であり、1 母獣平均着床数が 8.9±2.3 匹であった。C3H×C3H マウスにおいて、着床数が 82 匹であり、1 母獣平均着床数が 9.1±2.1 匹であった。A×F₁ マウスにおいて、着床数が 691 匹であり、1 母獣平均着床数が 9.7±3.4 匹であった。F₁×A マウスにおいて、着床数が 1014 匹であり、1 母獣平均着床数が 12.5±4.7 匹であった。F₁×A マウスは A×A マウスと比較し、有意に多かった ($p < 0.005$)。

各群における胎仔の吸収率は、36.4%~45.0% であり、群間の有意差は認められなかった。

各群における胎仔の生存率は、55.0%~63.6% であり、群間の有意差は認められなかった。1 母獣平均同腹

仔数において、A×A マウスは5.2±2.3 匹、C3H×C3H マウスは5.3±1.3 匹、A×F₁ マウスは5.8±2.6 匹、F₁×A マウスは7.6±3.2 匹であった。F₁×A マウスはA×A マウスと比較し、有意に多かった ($p < 0.005$) (表1)。

2. 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率について

A×A マウスにおいて、31 匹の母獣にコルチゾン投与したところ、11 匹の母獣が唇顎口蓋裂仔を妊娠し、唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率は35.5%であった。A×A マウス (35.5%) はA×F₁ (15.5%) お

よびF₁×A (22.2%) と比較し、有意に高かった ($p < 0.0001, p < 0.01$)。C3H×C3H マウスにおける唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣は認められなかった。

また、A×A マウスにおいて、唇顎口蓋裂仔を妊娠した11 匹の母獣から18 匹の唇顎口蓋裂仔を得た。1 母獣において唇顎口蓋裂仔数は1~3 匹であり、平均唇顎口蓋裂仔数は1.6±0.8 匹であった。A×F₁ およびF₁×A において、1 母獣において唇顎口蓋裂仔数は共に1~2 匹であり、平均唇顎口蓋裂仔数は共に1.3±0.5 匹であった。群間の1 母獣平均唇顎口蓋裂仔数に有意差は認めら

表1 各群マウスにおいて着床数、吸収胎仔および生存胎仔の状況

単位：匹

系 統		母獣数	着 床 数 (1 母獣平均着床数±SD)	吸収胎仔数 (吸収率%) (1母獣平均吸収胎仔数±SD)	生存胎仔数 (生存率%) (1 母獣平均同腹仔数±SD)
母獣	父獣				
A	A	31	285 (8.9±2.3)	125 (43.9) (3.9±2.0)	160 (56.1) (5.2±2.3)
C3H	C3H	9	82 (9.1±2.1)	34 (41.5) (3.8±2.6)	48 (58.5) (5.3±1.3)
A	F ₁ (A×C3H)	31	320 (10.3±3.1) ***	144 (45.0) (4.6±3.1)	176 (55.0) (5.7±2.2) ***
A	F ₁ (C3H×A)	40	371 (9.3±3.2) ***	135 (36.4) (3.4±1.7)	236 (63.6) (5.9±2.8) ***
A×F ₁ 計		71	691 (9.7±3.4) ***	279 (40.4) (3.9±2.5)	412 (59.6) (5.8±2.6) ***
F ₁ (A×C3H)	A	41	483 (11.8±4.9) ***	176 (36.4) (4.3±3.8)	307 (63.6) (7.5±3.5) ***
F ₁ (C3H×A)	A	40	531 (13.3±4.3) ***	219 (41.2) (5.5±3.9)	312 (58.8) (7.8±2.9) ***
F ₁ ×A 計		81	1014 (12.5±4.7) ***	395 (38.9) (4.9±3.9)	619 (61.1) (7.6±3.2) ***
N ₂ 計		152	1705 (11.2±4.3)	674 (39.5) (4.4±3.3)	1031 (60.5) (6.8±3.0)

*** $p < 0.005$

表2 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の状況

単位：匹

系 統		母獣数	唇顎口蓋裂仔を妊娠した 母獣数 (比率%)	唇顎口蓋裂仔数 (1 母獣平均唇顎口蓋裂仔数±SD)
母獣	父獣			
A	A	31	11 (35.5)	18 (1.6±0.8)
C3H	C3H	9	0 (0.0)	0 (0.0±0.0)
A	F ₁ (A×C3H)	31	3 (9.7)	3 (1.0±0.0)
A	F ₁ (C3H×A)	40	8 (20.0) ****	11 (1.4±0.5)
A×F ₁ 計		71	11 (15.5)	14 (1.3±0.5)
F ₁ (A×C3H)	A	41	9 (22.0) **	10 (1.1±0.3)
F ₁ (C3H×A)	A	40	9 (22.5)	13 (1.4±0.5)
F ₁ ×A 計		81	18 (22.2) ***	23 (1.3±0.5)
N ₂ 計		152	29 (19.1)	37 (1.3±0.5)

** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$, **** $p < 0.0001$

表3 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣および正常な口唇口蓋仔を妊娠した母獣において着床数, 吸収胎仔と同腹仔の状況
単位: 匹

系 統		唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣				正常な口唇口蓋仔を妊娠した母獣			
母獣	父獣	母獣数	着床数 (平均着床数 ±SD)	吸収胎仔数 (平均吸収 胎仔数±SD)	生存仔数 (平均同腹 仔数±SD)	母獣数	着床数 (平均着床数 ±SD)	吸収胎仔数 (平均吸収 胎仔数±SD)	生存仔数 (平均同腹 仔数±SD)
A	A	11	106(9.6±3.2)	39(3.5±2.0)	67(6.1±2.2)	7	59(8.4±2.1)	26(3.7±1.0)	33(4.7±2.1)
A	F ₁ (A×C3H)	3	41(13.7±0.9)	21(7.0±4.4)	20(6.7±0.6)	12	96(8.0±2.8)	37(3.1±1.4)	59(4.9±2.6)
A	F ₁ (C3H×A)	8	71(8.9±2.9)	27(3.4±1.6)	44(5.5±2.5)	18	164(9.1±3.2)	57(3.2±1.6)	107(5.9±2.8)
A×F ₁ 計		11	112(10.2±4.0)	48(4.4±2.9)	64(5.8±2.2)	30	260(8.7±3.1)	94(3.1±1.5)	166(5.5±2.7)
F ₁ (A×C3H)	A	9	106(11.8±4.7)	31(3.4±3.4)	75(8.3±4.3)	11	84(7.6±3.9)	23(2.1±2.1)	61(5.5±3.1)
F ₁ (C3H×A)	A	9	155(17.2±3.4)	79(8.8±4.2)	76(8.4±3.4)	11	116(10.5±4.0)	32(2.9±3.2)	84(7.6±2.8)
F ₁ ×A 計		18	261(14.5±4.9)	110(6.1±4.6)	151(8.4±3.8)	22	200(9.1±4.2)	55(2.5±2.7)	145(6.6±3.1)
N ₂ 計		29	373(12.9±5.0)	158(5.4±4.1)	215(7.4±3.5)	52	460(8.8±3.5)	149(2.9±2.1)	311(6.0±2.9)

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005

れなかった (表2)。

3. 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣および正常な口唇口蓋仔を妊娠した母獣の着床数, 吸収胎仔数と同腹仔数について

唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣および正常な口唇口蓋仔を妊娠した母獣 (すべての生存胎仔に口唇裂, 唇顎口蓋裂と口蓋裂を認めないもの) の着床数, 吸収胎仔数と同腹仔数において結果を表3に示した。

A×F₁(A×C3H) および F₁(C3H×A)×A において, 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の平均着床数は, 正常な口唇口蓋仔を妊娠した母獣の平均着床数と比較し, 有意に多かった (p<0.05, p<0.01) (表3)。

4. 各同腹仔数における唇顎口蓋裂の発症率について

A マウスにおいて同腹仔数は1~9匹であり, 唇顎口蓋裂の発症率は11.3%であった。同腹仔数が8匹であった時の唇顎口蓋裂の発症率は5.0%であり, 最も高い値を示した (図1)。

N₂ マウスにおける同腹仔数は1~14匹であった。そのうち A×F₁(A×C3H) は2~10匹, A×F₁(C3H×A) は1~11匹, F₁(A×C3H)×A は1~14匹, F₁(C3H×A)×A は1~13匹であった。N₂ マウスにおいて唇顎口蓋裂の発症率は3.6%であり, 同腹仔数が7匹と8匹であった時の唇顎口蓋裂の発症率は共に0.6%であ

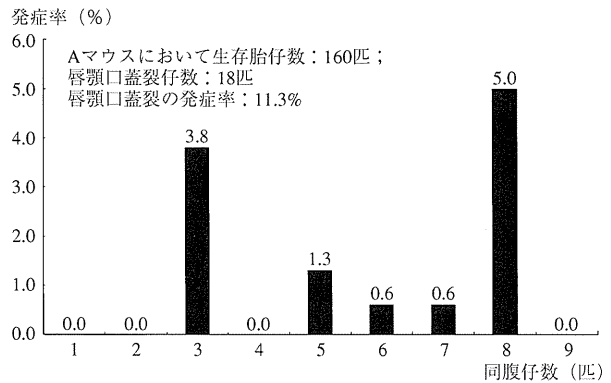


図1 A マウスにおいて各同腹仔数の唇顎口蓋裂発症率

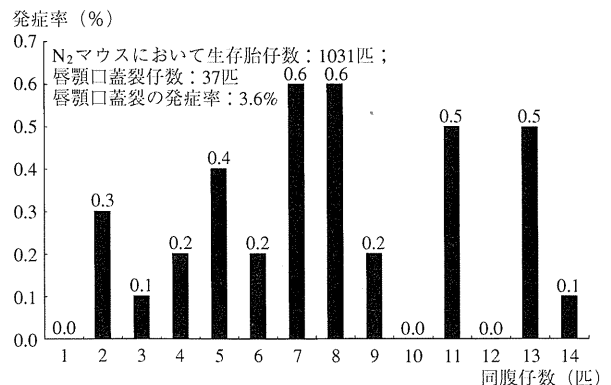


図2 N₂ マウスにおいて各同腹仔数の唇顎口蓋裂発症率

り、最も高い値を示した（図2）。

一方、C3Hマウスにおける同腹仔数は3~7匹であり、唇顎口蓋裂の発症は認められなかった。

考 察

マウスにおいて、性周期が安定になる時期は生後約50日、母獣マウスが出産・哺育などの負担に十分に耐えるようになる時期は生後約60日である²⁶⁾。また、母獣マウスの週齢と経産経験の増加に伴い、同腹仔数が少なく、胎仔の吸収率が高く、生存率が低くなり、自然発症の口唇裂と唇顎口蓋裂の発症率が減少することが報告²⁷⁾されている。その週齢と経産経験の影響を除き、母体環境として胚胎の着床数、吸収率、生存率、同腹仔数および唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率を検討するために、本研究ではすべての母獣マウスを8週齢~10週齢の未経産マウスとした。

Nonakaら²⁸⁾は、母体環境を提供する養育マウスとして、口唇裂、唇顎口蓋裂に高感受性であるCL/Frマウスと口唇裂、唇顎口蓋裂に抵抗性であるC57BLマウスを用い、CL/Frマウスの受精胞胚の移植実験を行ったところ、胎仔の吸収率について母体がCL/Frマウスであった場合（13.0%）は、母体がC57BLマウスであった場合（4.5%）より胎仔の吸収率が高いことを報告している。また、Juriloffら²⁵⁾は、A/WySnマウスとC57BL/6マウスを用いて遺伝学的な交配を行い、自然発症の口唇裂、唇顎口蓋裂を観察したところ、胎仔の吸収率についてAマウスが22.3%であり、A×F₁マウスが21.6%であり、F₁×Aマウスが5.1%であることを報告している。本研究では得られた胎仔の吸収率において、Aマウス、C3Hマウス、A×F₁マウスおよびF₁×Aマウスの間で比較し、有意差は認められず、36.4%~45.0%であり、いずれもNonakaら²⁸⁾とJuriloffら²⁵⁾の報告より高い値を示した。マウス胎仔の吸収は胎生10日目から13日目の間に最も発生することが報告されている²⁸⁾。本研究では妊娠11日目から14日目までの4日間に母獣マウスにコルチゾン投与したことにより、胎仔の吸収は母獣系統との関係がなく、すべて高率に起されることが示唆された。また、著者ら²²⁾はAマウスにおけるコルチゾン投与により、唇顎口蓋裂の発症率（11.3%）は口唇裂および唇顎口蓋裂の自然発症率（14.5%）より低いことを報告している。これはKalter²⁹⁾によって報告された胎仔の吸収率と口唇裂、唇顎口蓋裂発症率の関連性と同様の結果であり、胎仔の吸収率の増加に伴い唇顎口蓋裂発症率が減少した。

一方、本研究において各群マウス胎仔の生存率は55.0

%~63.6%であり、群間の差は認められなかった。しかしながら、1母獣平均同腹仔数を観察したところ、F₁×AマウスはA×Aマウスより有意に多かった。このことについて江崎ら²⁶⁾は、系統によって同腹仔数に差があることを報告していることから系統の異なる遺伝子が導入されたことが、平均同腹仔数の差の原因と考えられた。

また、本研究において、唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率を観察したところ、A×AはA×F₁およびF₁×Aと比べ有意に高かった。N₂マウスとしてA×F₁とF₁×Aと比較したところ、有意差はなく、共にA×Aの約半分の値を示した。従って、唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率は胎仔の遺伝子型との関連があると思われる。N₂マウスにおいて母獣がAマウスでもF₁マウスでも唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率に有意な差は認められなかった。

Kalter²⁷⁾は、同腹仔数の増加に伴い胎仔の成長が制限され、口唇裂、唇顎口蓋裂発症率が増加することを報告している。本研究では、すべての群において、唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣は正常な口唇口蓋裂を妊娠した母獣と比較したところ、平均同腹仔数の有意差は認められなかったが、平均着床数は多かった。多数の胚胎により各胚胎の成長環境が悪くなり、唇顎口蓋裂を起こしやすいことが考えられた。

さらに、各同腹仔数において唇顎口蓋裂発症率の分布を観察したところ、Aマウスにおいて同腹仔数が8匹であった時、N₂マウスにおいて同腹仔数が7匹と8匹であった時の唇顎口蓋裂発症率は最も高い値を示した。その原因は究明しえないが、Kalter³⁰⁾は、コルチゾン投与によるマウス口蓋裂の発症は同腹仔数が8匹であった時の発症率は最も高いことを報告し、本研究の結果と一致していた。このことからコルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂の発症において同腹仔数と発症率には関係があることが示唆された。

結 論

コルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂の発症に関与する母体環境要因を検討するため、唇顎口蓋裂に高感受性であるA系統マウスと唇顎口蓋裂に抵抗性であるC3H系統マウスを用い、遺伝学的な交配を行った。Aマウス、C3Hマウス、N₂マウスとしてA×F₁(A×C3H)、A×F₁(C3H×A)、F₁(A×C3H)×AおよびF₁(C3H×A)×Aにおける、胎仔の吸収率、生存率、同腹仔数、ならびに唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の状況、さらに各同腹仔数において唇顎口蓋裂の発症率について検討

を行ったところ、以下の結論を得た。

1. コルチゾン投与による各群マウスにおいて有意差はないが、高頻度の胎仔吸収率がみられた。
2. 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣の比率において、AマウスはN₂マウスより有意に高かった。C3Hマウスには唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣が認められなかった。
3. 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣において、1母獣平均唇顎口蓋裂仔数は1.0±0.0匹~1.6±0.8匹であり、群間に有意差は認められなかった。
4. 唇顎口蓋裂仔を妊娠した母獣は、正常な口唇口蓋仔を妊娠した母獣より平均着床数が多い傾向を示した。

文 献

- 1) Woolf, C. M., Woolf, R. M. and Broadbent, T. R.: A genetic study of cleft lip and palate in Utah, *Am. J. Hum. Genet.*, 15: 209-215, 1963.
- 2) Woolf, C. M.: Congenital cleft lip. A genetic study of 496 propositi, *J. Med. Genet.*, 8: 65-83, 1971.
- 3) Fraser, F. C.: The genetics of cleft lip and cleft palate, *Am. J. Hum. Genet.*, 22: 336-352, 1970.
- 4) Bixler, D.: Genetics and clefting, *Cleft Palate J.*, 18: 10-18, 1981.
- 5) Peterka, M., Tvrdek, M., Likovsky, Z., Peterkova, R. and Fara, M.: Maternal hyperthermia and infection as one of possible causes of orofacial clefts, *Acta. Chir. Plast.*, 36: 114-118, 1994.
- 6) Bertollini, R., Mastroiacovo, P. and Segni, G.: Maternal epilepsy and birth defects: a case-control study in the Italian Multicentric Registry of Birth Defects (IPIMC), *Eur. J. Epidemiol.*, 1: 67-72, 1985.
- 7) Abrishamchian, A. R., Khoury, M. J. and Calle, E. E.: The contribution of maternal epilepsy and its treatment to the etiology of oral clefts: a population based case-control study, *Genet. Epidemiol.*, 11: 343-351, 1994.
- 8) Matalon, S., Schechtman, S., Goldzweig, G. and Ornoy, A.: The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures, *Reprod. Toxicol.*, 16: 9-17, 2002.
- 9) Park-Wyllie, L., Mazzotta, P., Pastuszak, A., Moretti, M. E., Beique, L., Hummisett, L., Friesen, H. M., Jacobson, S., Kasapinovic, S., Chang, D., Diav-Citrin, O., Chitayat, D., Nulman, I., Einarson, T. R. and Koren, G.: Birth defects after maternal exposure to corticosteroids: prospective cohort study and meta-analysis of epidemiological studies, *Teratology*, 62: 385-392, 2000.
- 10) Edwards, M. J., Agho, K., Attia, J., Diaz, P., Hayes, T., Illingworth, A. and Roddick, L. G.: Case-control study of cleft lip or palate after maternal use of topical corticosteroids during pregnancy, *Am. J. Med. Genet.*, 120 (A): 459-463, 2003.
- 11) Wyszynski, D. F. and Beaty, T. H.: Review of the role of potential teratogens in the origin of human nonsyndromic oral clefts, *Teratology*, 53: 309-317, 1996.
- 12) Leite, I. C., Paumgarten, F. J. and Koifman, S.: Chemical exposure during pregnancy and oral clefts in newborns, *Cad. Saude. Publica.*, 18: 17-31, 2002.
- 13) Zeiger, J. S., Beaty, T. H. and Liang, K. Y.: Oral clefts, maternal smoking, and TGFA: a meta-analysis of gene-environment interaction, *Cleft Palate Craniofac. J.*, 42: 58-63, 2005.
- 14) Chapman, C. J.: Ethnic differences in the incidence of cleft lip and/or cleft palate in Auckland, 1960-1976, *N. Z. Med. J.*, 96: 327-329, 1983.
- 15) Khoury, M. J., Erickson, J. D. and James, L. M.: Maternal factors in cleft lip with or without palate: evidence from interracial crosses in the United States, *Teratology*, 27: 351-357, 1983.
- 16) Bille, C., Skytthe, A., Vach, W., Knudsen, L. B., Andersen, A. M., Murray, J.C. and Christensen, K.: Parent's age and the risk of oral clefts, *Epidemiology*, 16: 311-316, 2005.
- 17) Prescott, N. J. and Malcolm, S.: Folate and the face: evaluating the evidence for the influence of folate genes on craniofacial development, *Cleft Palate Craniofac. J.*, 39: 327-331, 2002.
- 18) Bille, C., Knudsen, L. B. and Christensen, K.: Changing lifestyles and oral clefts occurrence in Denmark, *Cleft Palate Craniofac. J.*, 42: 255-259, 2005.
- 19) Juriloff, D. M.: Differences in frequency of cleft lip among the A strains of mice, *Teratology*, 25: 361-368, 1982.
- 20) Nonaka, K., Sasaki, Y., Martin, D. A. and Nakata, M.: Effect of the dam strain on the spontaneous incidence of cleft lip and palate and intrauterine growth of CL/Fr mouse fetuses, *J. Assist. Reprod. Genet.*, 12: 447-452, 1995.
- 21) Fraser, F. C. and Fainstat, T. D.: Production of congenital defects in the offspring of pregnant mice treated with cortisone, *Pediatrics*, 8: 527-533, 1951.
- 22) 韓 娟, 清水武彦, 前田隆秀: A/WySn マウスと C3H/He マウスにおける口唇裂, 唇顎口蓋裂および口蓋裂の発症率の検討, *小児歯誌*, 41: 887-892, 2003.
- 23) 韓 娟, 清水武彦, 清水邦彦, 前田隆秀: コルチゾン投与によるマウス唇顎口蓋裂の遺伝形式の検討, *小児歯誌*, 42: 512-517, 2004.
- 24) 韓 娟, 清水武彦, 清水邦彦, 松永利恵, 前田隆秀: A/WySn 系統マウスにおけるコルチゾン投与による唇顎口蓋裂発症の候補染色体の検出, *小児歯誌*, 43: 72-78, 2005.
- 25) Juriloff, D. M., Harris, M. J. and Brown, C. J.: Unravelling the complex genetics of cleft lip in the mouse model, *Mamm. Genome*, 12: 426-435, 2001.
- 26) 江崎孝三郎: 各種動物の生物学, 田嶋嘉雄編, 実験動物学各論, 朝倉書店, 東京, 1972, pp. 3-24.
- 27) Kalter, H.: Prenatal epidemiology of spontaneous cleft lip and palate, open eyelid, and embryonic death in A/J mice, *Teratology*, 12: 245-258, 1975.
- 28) Juriloff, D. M. and Fraser, F. C.: Genetic maternal effects on cleft lip frequency in A/J and CL/Fr mice, *Teratology*, 21: 167-175, 1980.
- 29) Kalter, H.: The natural elimination of sporadically malformed mouse embryos, *Teratology*, 22: 201-205, 1980.
- 30) Kalter, H.: Modification of teratogenic action of cortisone in mice by maternal age, maternal weight and litter size, *Am. J. Physiol.*, 185: 65-68, 1956.

Effect of Maternal Environment on Occurrence of Cleft Lip with Palate in Mice

Juan Han, Michiko Maeda, Rie Matsunaga, Takehiko Shimizu
Kunihiko Shimizu and Takahide Maeda

*Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
(Director : Prof. Takahide Maeda)*

The incidence of cleft lip and cleft palate is influenced by environmental factors, although the mechanism still remains incompletely understood. The aim of this study was to investigate the maternal environmental effect on occurrence of cleft lip with palate (CLP) in mice. A/WySn and C 3 H/He strains were used. The F₁ hybrids from a reciprocal cross between A/WySn and C 3 H/He were raised, and the reciprocal F₁ and A/WySn were used to produce as [A×F₁ (A×C 3 H)](A ; A/WySn, C 3 H ; C 3 H/He), [A×F₁ (C 3 H×A)], [F₁ (A×C 3 H)×A] and [F₁ (C 3 H×A)×A] N₂ backcross fetuses. Pregnant mice were injected on days 11 through 14 of gestation with 2.5 mg/mouse/day of cortisone. A laparotomy was performed on the 18th gestational day at which time the implant, resorption and litter size were recorded. Each fetus that attained at least Day 18 of development was checked for the presence of CLP. The frequencies of fetal resorptions that ranged from 36.4% to 45.0% did not differ significantly among the 6 groups. The rate of dams that had CLP fetuses was significantly higher in the A/WySn strain itself (35.5%) than in the A×F₁ (15.5%) and in the F₁×A (22.2%). The mean number of implantations and the mean number of resorptions was higher in the dams that had CLP fetuses than the dams that had normal lip and palate fetuses, although the mean number of litter size did not show a significant difference. The highest incidence of CLP in the progeny was observed in the dams that had litter sizes of 8 not only A/WySn strain itself but also N₂ strains of mice. These results suggested that a high frequency of fetal resorption was affected by cortisone treatment, and the incidence of CLP might be influenced by litter size.

Key words : Mouse, Cleft lip with palate, Maternal environmental effect, Cortisone

【原著】

*Porphyromonas gingivalis*のストレス関連タンパク質遺伝子発現に及ぼす
ヘミンの影響

木山-岸川 道子、平塚 浩一、安孫子 宜光

日本大学松戸歯学部生化学講座、口腔科学研究所

(受付：平成16年12月3日)

(受理：平成16年12月9日)

要 旨

*Porphyromonas gingivalis*病原性遺伝子発現解析用カスタムメイドアレイを作成し、*groEL*、*groES*、*dnaK*および*htpG*等ストレス関連タンパク質の遺伝子発現に及ぼすヘミンの影響を *in vitro* growth の各増殖期で比較検討した。ヘミン非制限下、制限下共にすべてのストレス関連タンパク質遺伝子は増殖を通じて同様の発現プロファイリングを示した。またいずれの増殖期においても、ヘミン制限下では非制限下よりもストレス関連タンパク質遺伝子 mRNA 発現レベルに増加が認められた。アレイの結果はリアルタイム PCR 法にて確認された。これらの結果から、ヘミン制限下では本菌の環境変化に対する防御機能が高まっており、ストレス関連タンパク質が正常な菌体増殖において重要な役割を担っている可能性が示唆された。

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*、増殖、ヘミン、マイクロアレイ、ストレス関連タンパク質

緒 論

成人性歯周炎の主要病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*) は、その normal growth にヘミンが必須なグラム陰性桿菌である。臨床的に、本菌体はシステインプロテアーゼ (Arg-gingipain、RGP および Lys-gingipain、KGP) を放出して歯肉を破壊し、出血してきた赤血球にプロテアーゼ C 末端側に位置するヘマグルチニンドメインが結合し、かつプロテアーゼ活性で赤血球を破壊することによりヘムを獲得することが分かっている¹⁾。また、口腔内は酸化ストレス、冷温刺激、pH 変化が大きい特異な環境である。そこに生息する口腔内細菌もまたそのような環境変化に対応しながら生きており、この変化に菌体が柔軟に対応していく過程で、いわゆる”病原性”が現れる。我々は最近、通常の *in vitro* growth における定常期において、ストレス関連タンパク質関連遺伝子の発現が著明である事を見いだした (未発表)。ストレス関連タンパク質は酸化ストレス、冷温ストレス、pH 変化等様々な刺激によってその発現が確認され

ている²⁾。しかしながら、そのような遺伝子の mRNA 発現レベルがヘミン制限下でどのような動向を示すのかに関しては今だ報告されていない。またこのようなストレス関連タンパク質の遺伝子発現変化を解析することは、本菌体の病原性に対するヘミンの影響を解析する上でも重要である。そこで本研究では *P. gingivalis* 病原性因子の発現解析用カスタムメイドアレイを作成し、多くの病原性関連遺伝子の中で特にストレス関連タンパク質の遺伝子発現に及ぼすヘミンの影響を検討した。

材料と方法

P. gingivalis 病原性関連遺伝子を Genebank データベースおよび The Institute for Genomic Research (TIGR、<http://www.tigr.org/>) データベースより引用し (93 遺伝子)、各遺伝子に対する特異的領域を増幅した PCR 産物を、マイクロアレイスポットター (GEN III Microarray Spotter; Molecular Dynamics 社製) でスライドガラス上にスポットすることにより、カスタムメイド *P.*

gingivalis マイクロアレイを作成した。*P. gingivalis* W83 株を hemin 非制限 (コントロール群) および制限下で Early-log (以下 EL)、Mid-log (以下 ML)、Late-log (以下 LL) および Stationary (以下 ST) phase の各菌体増殖期まで培養した後、それぞれの試料から全 RNA を分離した。全 RNA のクオリティは Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent 社製) を用いて確認した。CyScribe First-Strand cDNA Labeling Kit (Amersham Bioscience 社) を用いて各増殖期の全 RNA 試料 25 μg から Cy5 蛍光標識の cDNA を作成し、マイクロアレイ上で 16 時間ハイブリダイズさせた。洗浄後、蛍光スキャナー (GenePix 4000 ; Amersham Bioscience) にて各スポットを測定したのち、解析ソフト (GenePix™Pro 3.0 ; Axon Instruments 社製 および GeneSpring ; Agilent 社製) を用いて各増殖期におけるストレスタンパク質の遺伝子発現の変化を検討した。

マイクロアレイの結果の検証にはリアルタイム PCR 法 (Quantitative real-time PCR、以下 QRT-PCR) を用いた。10 ng の各増殖期の全 RNA 試料と QuantiTect SYBR Green PCR Kit (キアゲン社) を用いて DNA Engine Opticon™ Continuous Fluorescence Detection System Version 1.0 (MJ Research 社製) にて 95 °C 15 分間の変性後、94 °C (15 秒)、60 °C (30 秒)、72 °C (30 秒) のサイクルを 40 回行い、検量線からコピー数を算定し割合を計算した。選択したストレスタンパク質遺伝子の種類および QRT-PCR に使用したプライマー配列を表 1 に示した。

結 果

マイクロアレイデータを基に不良データの除去

を行った全遺伝子 (89 遺伝子) に対して、スクアタープロット解析を行った結果を図 1 に示した。その結果、EL および ML ではヘミン制限下の方がコントロールに比較して、多くの遺伝子発現が高く認められる傾向にあった。LL では逆に全体的に多くの遺伝子発現レベルがコントロール群に高く現れた。また ST においては、全ての増殖期を通じて、個々の遺伝子の発現レベルに最も大きなばらつきが認められた。ストレス関連タンパク質をコードする遺伝子として *groEL*、*groES*、*dnaK* および *htpG* を検証したところ、EL、ML、LL および ST のいずれの増殖期においても、ヘミン制限下の方がコントロールに比較して発現が高い傾向が認められた。また、全ての増殖期で最も発現比が高く認められたのは、いずれの時期も *groES* であった (図 1)。QRT-PCR でマイクロアレイ解析の検証を行い、その PCR 産物をゲル電気泳動した結果の一部を図 2 に示す。各ストレス関連タンパク質の ST での発現は、*dnaK* 以外は全て、ヘミン制限下の方で発現が高かった (図 2 A)。また、*dnaK* の細菌増殖を通じての発現変化においても、ST 以外の増殖期では全て、ヘミン制限下の方で発現が高く (図 2 B)、アレイ解析の結果と一致していた。

コントロールおよびヘミン制限下での個々の菌体増殖を通じたストレス関連タンパク質のプロファイリングを図 3 に示す。全てのストレス関連タンパク質は、コントロール (図 3 A) およびヘミン制限下 (図 3 B) において、全ての増殖期を通じてはほぼ同様の動向を示した。また、共に ST におけるストレス関連タンパク質遺伝子の発現は LL に比較して増加傾向が認められ、特に *dnaK* の遺伝子発現レベルの上昇は他の遺伝子と比較して顕著であった。

Table 1 A list of genes coded stress protein

Gene name	TIGR ID	Anotation	Fowerd/Reverse primer	size (bp)
<i>groEL</i>	PG0520	chaperonin, 60kDa	5'- TCGCGTAGAAGATGCCTTGA -3' 5'- CGTCCTTGCCTTCTTTACC -3'	242
<i>groES</i>	PG0521	chaperonin, 10kDa	5'- TGAACATCAAACCATTGGCAGACCG -3' 5'- TCTATTTTCAGTGCCGGCATATTTGC -3'	212
<i>dnaK</i>	PG1208	dnak protein	5'- ATCGTCTGATTGAGGCATGTGTGGC -3' 5'- TTCTTGCCGGTAGCTTTGTCATGAG -3'	559
<i>htpG</i>	PG0045	heat shock protein HtpG	5'- GCAGCCAAATTCTTCTTTTACCAG -3' 5'- CTTTTTCTCATCGAGCAGCTTGGC -3'	670

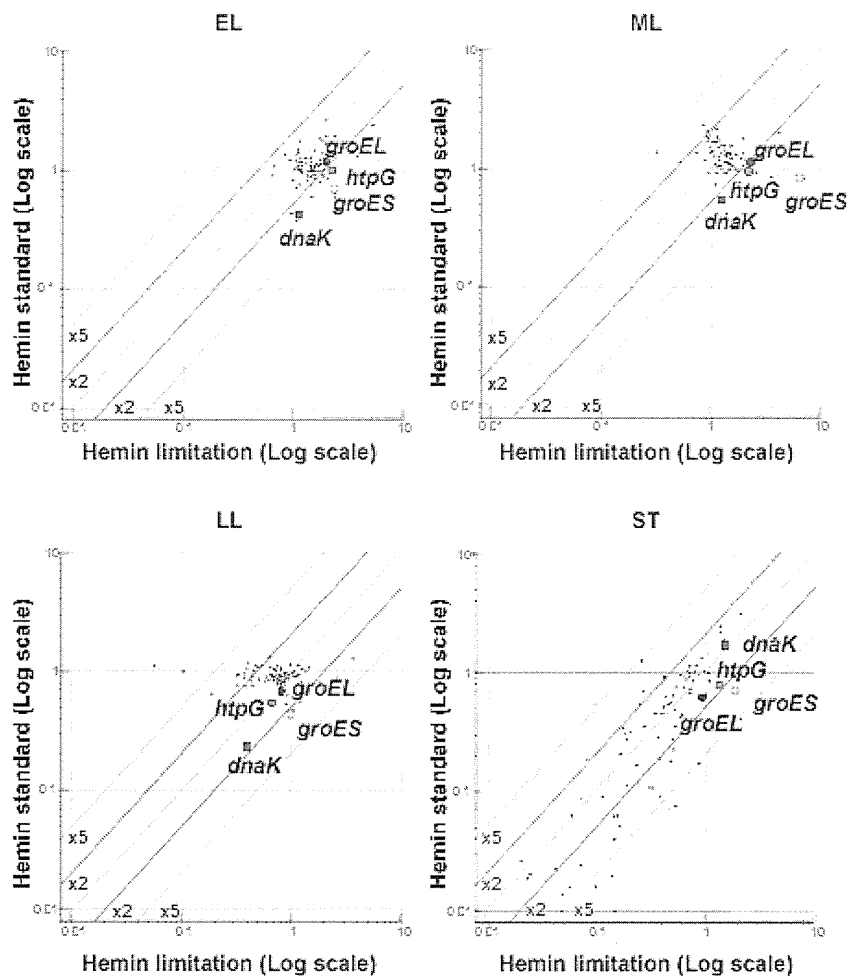


Fig. 1. Transcriptome analysis of stress proteins at different growth phase.
P. gingivalis was grown to early-log (EL), mid-log (ML), late-log (LL), and stationary (ST) phases under hemin standard concentration (5 $\mu\text{g/ml}$) or hemin limitation (0.001 $\mu\text{g/ml}$). The labeled cDNA samples reverse-transcribed from total RNAs at different growth stage were hybridized with gene probes on a microarray. Scatter plot analysis was done to express the relative transcripts levels at each growth stage.

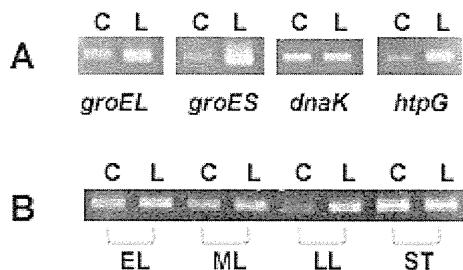


Fig. 2. Gel electrophoresis of PCR products after QRT-PCR analysis.
A: The stress responsible protein genes, *groEL*, *groES*, *dnaK*, and *htpG*, was amplified with total RNA samples in stationary phases under hemin standard concentration (C) or hemin limitation (L). **B:** RT-PCR analysis of *dnaK* gene expression in early-log (EL), mid-log (ML), late-log (LL), and stationary (ST) phases under hemin standard concentration (C) or hemin limitation (L).

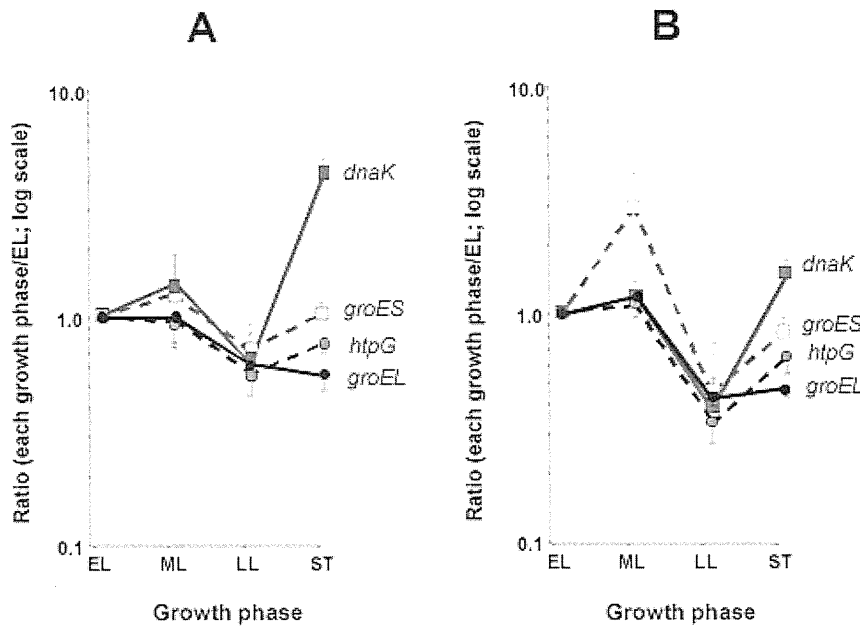


Fig. 3. Gene expression profiling of stress proteins during *P. gingivalis* growth under varying hemin concentration. *P. gingivalis* was grown to early-log (EL), mid-log (ML), late-log (LL), and stationary (ST) phases under hemin standard concentration (A) or hemin limitation (B). Induction ratios of stress relative protein at each growth stage were obtained by dividing background-corrected signal intensities of experimental samples in each growth phase by background-corrected intensities of samples in EL. Data are presented as means \pm SD.

考 察

興味深いことにヘミン濃度に関係なく、多くの病原性遺伝子発現が ST 期で低下する中で、ストレス関連タンパク質は LL に比較して ST では増加傾向が認められた。菌体増殖の定常期においては、昔から、栄養源の不足、pH の低下、浸透圧ストレスおよび代謝産物の蓄積等が認められることが知られており、このようなマルチプルストレスに反応してストレス関連タンパク質の遺伝子発現が上昇したのと考えられる。ヘミン制限下における遺伝子発現解析では、コントロール群（ヘミン非制限下）に比較して *groEL*, *groES*, *dnaK* および *htpG* 等のストレス関連タンパク質をコードする遺伝子は、増殖期に依存することなく比較的高い遺伝子発現が認められた。このことから菌体がヘミンを蓄積している時よりも、常に環境変化に対して本菌体の防御機能が高まっている可能性が示唆された。*dnaK* 変異株では DnaK は環境ストレス応答のみでなく、通常の菌体増殖に必要不可欠であることが示唆されている³⁾。また *dnaK* 変異株を用いることにより野生株に比較して様々な病原性が低下したことから DnaK は病原性

遺伝子の制御を行う可能性が報告されている⁴⁾。近年、*P. gingivalis* の病原性株 (W50, W83 および ATCC49417 株) と非病原性株 (ATCC33277, LB13D および HW24D-1 株) との比較実験で、病原性株はヘミン制限下で十分に増殖能をもつ一方で、非病原性株はヘミン制限下では増殖しにくいことが報告されており、これらの *in vitro* でのヘミン制限下での増殖能力は、*in vivo* 実験動物モデル内の感染を引き起こす能力と関連するかもしれないと推測されている⁵⁾。従って今回我々の見いだした *P. gingivalis* W83 株でのヘミン制限下でのストレス関連タンパク質の発現レベルの亢進はこれらの *in vitro* 増殖能力に関与し、さらには本菌体の病原性そのものに関わっている可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (C) (2) (課題番号 13671981) の補助を受けた。

参考文献

- 1) 門脇知子、瀧井良祐、他：歯周病とジンジパイン. 日薬理誌 **122**:37-44 2003
- 2) Mager WH, De Kruijff AJ: Stress-induced transcriptional activation. *Microbiol Rev* **59**: 506-531 1995
- 3) Bukau B, Walker GC: Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli dnaK* gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. *J Bacteriol* **171**: 2337-2346 1989
- 4) Hanawa T, Tamanishi S, et al.: Participation of DnaK in expression of genes involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Let* **214**: 69-75 2002
- 5) Kesavalu L, Holt SC, et al.: *In vitro* environmental regulation of *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence. *Oral Microbiol Immunol* **18**: 226-233 2003

連絡先：安孫子直光、日本大学松戸歯学部生化学教室
〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 TEL 047-360-9328.

Influence of Hemin on Gene Expression of Stress Proteins During *in vitro* Growth of *Porphyromonas gingivalis*.

Michiko KIYAMA-KISHIKAWA, Koichi HIRATSUKA and Yoshimitsu ABIKO

Department of Biochemistry and Research Institute of Oral Science,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba.

Summary

We developed a custom-made microarray for detecting pathogenic genes in *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and investigated the influence of hemin on gene expression related to stress-associated proteins, such as *dnaK*, *groEL*, *groES*, and *htpG*, during its growth. Independent on hemin concentrations, the genes related to the stress-associated proteins showed same profiles in transcription during its growth. In addition, these transcripts showed a high level of expression at individual growth stages under hemin limitation compared with unlimited conditions. These results were validated by real-time PCR analysis. It is suggested that *P. gingivalis* might increase its defensive capacity for adaptation of environmental changes and play an important role for normal growth.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, growth, hemin, microarray, stress protein

Address: Yoshimitsu ABIKO Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo Sakae-cho Nishi 2-870-1, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan.

Gene expression profiling and characterization under hemin limitation in *Porphyromonas gingivalis*

Michiko Kiyama-Kishikawa, Koichi Hiratsuka and Yoshimitsu Abiko

Department of Biochemistry, and Research Institute of Oral Science,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan

(Received 10 December 2004 and accepted 25 October 2005)

Abstract: Hemin is an important nutrient for *Porphyromonas gingivalis* growth and pathogenicity. We examined the gene expression profile of *P. gingivalis*, including genes involved in its pathogenicity, at various growth stages under hemin-standard and limited conditions by using a custom-made microarray. The transcription of many genes decreased after late-log and mid-log phases under hemin-standard and limited conditions, respectively. We focused on two groups of genes while comparing gene expression profiles under hemin-standard and limited conditions by gene tree analysis. Genes belonging to group A maintained high transcriptional levels, whereas genes in group B were expressed at low levels under standard hemin conditions. However, group B genes increased remarkably under hemin-limited conditions. Groups A and B contained genes involved in regulatory functions and protein fate, respectively. Genes related to energy metabolism, transport, and protein binding were present in both groups. Our results suggest that *P. gingivalis* experienced severe stress under hemin-limited conditions, and growth phase-dependent changes in transcription levels were observed for many genes. Moreover, increased expression of genes involved in energy metabolism suggests that hemin is related not only to pathogenicity, but also energy metabolism. (J. Oral Sci. 47, 191-197, 2005)

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*; microarray; growth; gene expression; hemin.

Introduction

Microorganisms are often able to adapt to changes in their environment. Adaptation to these changes involves a directed change in the synthesis of virulence factors (1). This is particularly true for organisms living in the mouth, where they are exposed to dramatic changes in oxygen tension, redox potential, osmolarity, temperature, pH, and the bacterial cell density (2). *Porphyromonas gingivalis*, a Gram-negative anaerobic bacterium, is implicated as one of the major pathogens of adult periodontal disease (3). This species possesses many virulence factors, including fimbriae, proteases, hemagglutinins, and capsular polysaccharides, which allow this organism to cause disease (2). In general, microorganisms must scavenge essential nutrients, including iron, which play a crucial role in the establishment and progression of infections (4). Iron is a constituent of several important metabolic enzymes and is essential for the growth of almost all microorganisms. *P. gingivalis* has several mechanisms to utilize iron from some iron-containing molecules such as hemoglobin, myoglobin, hemopexin, methemoglobin, oxyhemoglobin, and cytochrome C (5-7).

Numerous investigations have examined the effects of iron depletion on bacteria, identifying an accompanying decrease in virulence expression (8-11). Significant decreases in gingipain enzyme activity were found in the wild-type strains grown under iron-depleted conditions (8). Promoter activity of *fimA* gene, which encodes fimbrillin, decreased by approximately 50% in response to hemin limitation (9). Transcription of hemagglutinin-associated genes such as *hagB* and *hagC* decreased under hemin-

Correspondence to Dr. Yoshimitsu Abiko, Department of Biochemistry, Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan
Tel: +81- 47-360 9328
Fax: +81- 47- 360 9329
E-mail: yabiko@mascat.nihon-u.ac.jp

limited or non-hemin conditions (10). Trypsin-like enzyme activity in culture supernatant was also lower at each growth phase under hemin-limited than standard hemin conditions (11). Kesavalu et al. (8) demonstrated that *P. gingivalis* cells grown under iron-depleted conditions for multiple passages showed significantly decreased lesion size in mice, in contrast to cells grown under iron-normal and iron-elevated conditions. Conversely, other reports have shown increases in virulence under hemin limitation (11-14). The binding (12) and transferring (13) of hemoglobin increased considerably when the organisms were grown under hemin-limited conditions, and collagenolytic activity was generally higher in hemin-limited cultures (11). Moreover, cells and vesicles from hemin-limited cultures for hemagglutination of sheep erythrocytes exhibited higher titers than their hemin-excess counterparts (14). These reports showed a discrepancy in the virulence of *P. gingivalis* under hemin limitation. There were few reports that showed the obvious growth phase on sample collection. In addition, little is known about changes in global gene expression of virulence-related proteins during each growth phase under hemin limitation. Therefore, the variability in pathogenicity between reports in response to hemin is likely a result of differences in gene expression during bacterial growth phases at the time of sample collection.

Recent technology advances have made it possible to study global gene expression in both prokaryotes and eukaryotes by using DNA microarrays (15-18). The complete genome sequence of *P. gingivalis* strain W83 has been previously determined (19) and is available for designing *P. gingivalis* microarrays. In the present study, we prepared a custom-made DNA array of pathogenicity-associated genes and investigated the possible role of hemin in the virulence of *P. gingivalis* by comparing the transcriptional profile under hemin-limited and standard hemin conditions *in vitro*.

Materials and Methods

Microarray procedure

Ninety-three pathogenicity-related genes that had been previously described in detail were selected and amplified from *P. gingivalis* genomic DNA. The average size of these amplicons was 615 bp. Human genes encoding β -actin, GAPDH, and lactoferrin receptor were also amplified for printing on the array. All DNA probes were printed as a block of three on both the right and left sides of a glass slide, yielding six replicates of each PCR product and 570 spots per array. Purified PCR products were diluted to a final concentration of 50 ng/ μ l in Microarray Crosslinking Reagent D (Amersham Bioscience,

Piscataway, NJ, USA) and then transferred to a 384 - well microtiter plate for printing. The purified products were printed onto silane- and metal-coated glass slides (Microarray Slide Type 7; Amersham Bioscience) by using a GEN III Microarray Spotter (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) under 55% relative humidity. After drying under 55 - 60% relative humidity for 1 h, the arrays were fixed by UV cross-linking at 100 mJ/cm² in a UV Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, CA, USA), and then stored dry in a desiccator at room temperature.

Media and growth conditions

P. gingivalis strain W83 was subcultured by serial passage in hemin-free brain heart infusion (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) containing 0.25% yeast extract supplemented with menadion (1 μ g/ml). The bacteria were then transferred and cultured in fresh medium with hemin (5 μ g/ml or 0.001 μ g/ml) to early-log phase (EL), mid-log phase (ML), late-log phase (LL), or stationary phase (ST) (Fig. 1). Before inoculating the bacteria, fresh growth medium was incubated in an anaerobic chamber for several days to remove residual oxygen.

Preparation of total RNA and fluorescent-labeled cDNA

After harvesting the cells by centrifugation, cells were re-suspended in 300 μ l of DNase, RNase free water (DW; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). For isolation of total

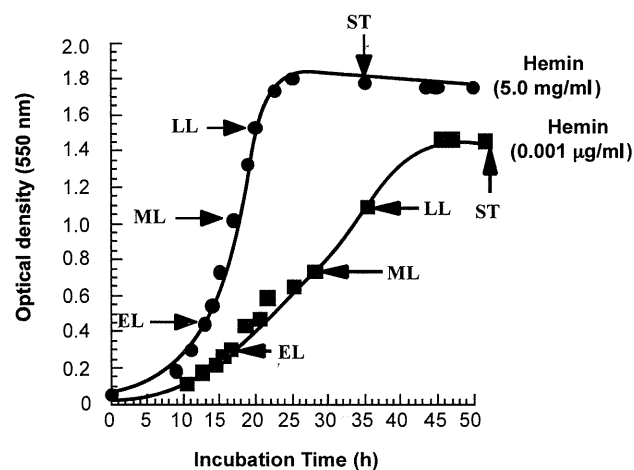


Fig. 1 Growth under different hemin concentrations in *P. gingivalis*. *P. gingivalis* strain W83 was subcultured by serial passage in hemin-free broth. The bacteria was transferred and cultured in fresh medium with hemin (5 μ g/ml or 0.001 μ g/ml) to early-log phase (EL), mid-log phase (ML), late-log phase (LL), or stationary phase (ST).

RNA, the cell suspensions were transferred into FastPrep tubes containing Lysing Matrix B (Qbiogene, Carlsbad, CA, USA) and 900 μ l of Trizol Reagent (Invitrogen), and disrupted by using a FastPrep FP120 Instrument (Qbiogene) at a speed rating of 6.5 for 40 s. After centrifugation in 200 μ l of chloroform, the supernatants were treated with chloroform, precipitated with isopropanol, resuspended in DW, and stored at -70°C . The concentration of total RNA was calculated based on absorbance measured at 260 nm. In addition, the degradation of total RNA was examined by using an Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). All samples used in this study exhibited A_{260}/A_{280} and 23S rRNA/16S rRNA ratios of at least 1.8 and 1.6, respectively.

The CyScribe First-Strand cDNA Labeling Kit (Amersham Bioscience) was used for labeling. Briefly, 25 μ g of total RNA was used for synthesis of fluorescently labeled cDNA by reverse transcription with Cy5 - dUTP (Amersham Bioscience), SuperscriptII (Invitrogen), and random nonamer primers for 1.5 h at 42°C . The cDNA was treated with NaOH, neutralized with HEPES, and then purified to remove unincorporated dye. The Cy5-labeled samples and identical amounts of Cy5-prelabeled human genes were mixed together, precipitated with ethanol, and then resuspended in 55 μ l of DW.

Hybridization and scanning

Hybridization and washing steps were carried out using an Automated Slide Processor (ASP; Amersham Bioscience) by following the manufacturer's instructions. The resuspended samples were denatured at 95°C for 3 min, cooled on ice, and mixed with an equal volume of Hybridization Buffer (Amersham Bioscience) and 110 μ l of formamide (total volume; 220 μ l). The arrays were incubated at 55°C for 2h in pretreatment solution ($2 \times$ SSPE, 0.2% SDS), washed with MilliQ water twice at room temperature, dried, and placed in the ASP. The hybridization cocktail (200 μ l) was injected into the slide chamber and hybridization was carried out at 42°C for 12h. The arrays were washed at 45°C with washing buffer I ($1 \times$ SSC, 0.2% SDS) twice for 5 min, with washing buffer II ($0.1 \times$ SSC, 0.2% SDS) twice for 5 min, and with $0.1 \times$ SSC for 30 sec prior to being air-dried in the dark. Three microarray replicates were analyzed for each growth stage.

Microarrays were scanned at 10 μm with a confocal fluorescence laser scanner (GenePix 4000; Amersham Bioscience). The emitted fluorescent signal was detected by a photomultiplier tube (PMT) at 532 nm (Cy3) or 635 nm (Cy5). For array experiments, the laser power was 100% and the PMT voltage was 500. The scanned images were processed as TIFF images and the pixel intensities of each

hybridization spot were analyzed quantitatively by using GenePixTM Pro 3.0 software (Axon Instruments, Redwood City, CA, USA). A grid of individual circles defining the location of each DNA spot on the array was superimposed on the image to designate each fluorescent spot to be quantified. Median signal intensity was determined for each spot. The local background signal was subtracted automatically from the hybridization signal of each separate spot.

Microarray data mining and analysis

The average of the signal intensities from blank portions on the array was taken as background. At each growth stage, genes with median signal intensities lower than the median background intensity + 3SDs were treated as an absence of expression. Intensities of the pre-labeled human controls were equalized and used for normalization among different arrays. Global gene expression was compared among growth phases using the Kruskal-Wallis test (P -value cutoff, 0.05; multiple testing correction; Benjamini and Hochberg False Discovery Rate), and then subjected to gene tree analysis based on standard correlation.

Results and Discussion

P. gingivalis W83 cells were grown under two different hemin concentrations -5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the standard concentration observed *in vitro*, and 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$, the lowest hemin concentration to sustain growth of *P. gingivalis*. As shown in Fig. 1, a delay in growth and a decrease in population were observed under hemin restrictions. On the basis of the growth curve, we designated the EL, ML, and LL phases of growth, and defined the ST, in which the number of viable cells remained approximately constant.

In the present study, we compared global gene expression under different hemin conditions during growth phase by using custom-made DNA microarrays based on PCR products from *P. gingivalis*. RNA samples were isolated at time points covering the entire growth phase. Although investigators often use an averaged transcriptional level of all mRNAs at each point to normalized control (i.e. global normalization), we used pre-labeled human external controls mixed in hybridization solution for the normalization. The global normalization is, in general, used effectively when large numbers of probes are spotted on an array and the probes do not belong to a restricted category. In a previous study, quantitative real-time PCR analysis demonstrated that the levels of 16S ribosomal RNA were not stable during growth phase and the amount of rRNA was significantly higher than that of other mRNAs from inducible genes (data not shown).

In the present study, 90 of the 93 initially monitored genes

were analyzed further. The gene expression profiles and average expression levels during growth phase are shown in Fig. 2. The mRNA expression of each gene did not change significantly from EL to LL under standard hemin conditions (Fig. 2A, 2C). As a whole, mRNA expression of each gene varied under hemin limited conditions (Fig. 2B) more than under standard hemin conditions (Fig. 2A). Under standard hemin conditions (Fig. 2C), the average and standard deviation of the transcripts did not vary over time from EL to LL, suggesting that many genes might be constitutively expressed. However, a significant reduction in many transcripts was observed during ST. Likewise, a significant reduction was observed in many genes after exposing the ML cells to hemin-limited conditions (Fig. 2D). Many bacteria have evolved the ability to condition culture medium by secreting extracellular signaling molecules, termed autoinducers, in association with growth phase to control expression of specific genes, a process termed quorum sensing (20-22). *luxS*-dependent quorum sensing in *P. gingivalis* has recently been described, and expression of *luxS* was found to be higher in LL than in EL, suggesting that the quorum sensing may play an important role for the virulence of *P. gingivalis*. Our data showed that a reduction in gene expression under hemin-limited conditions was not observed during the shift from LL to ST, but it was observed during the transition from ML to LL. This suggests that the quorum sensing system

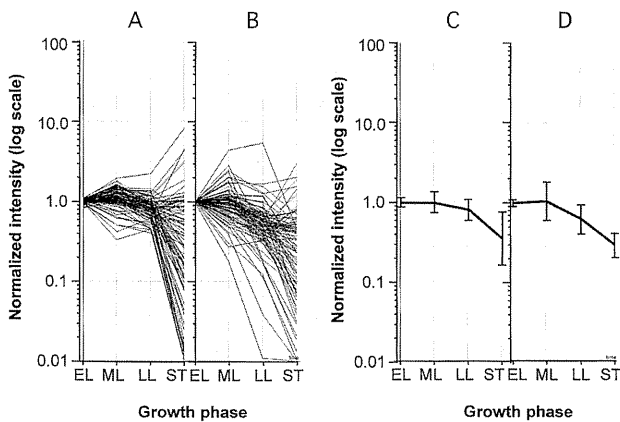


Fig. 2 Expression profiles of 90 *P. gingivalis* W83 genes. A and B represent profiles of individual genes, whereas C and D depict average profiles under standard hemin concentration (5 µg/ml; A, C) or hemin-limited conditions (0.001 µg/ml; B, D). Levels of mRNA expression during growth were expressed as the fold-change relative to the level seen during EL. Data are presented as means ± SD.

might not work well under hemin limitation.

Figure 3 exhibits the results of gene tree analysis identifying related gene expression patterns during growth. Under hemin limitation, the expression of most genes increased at EL and ML, and then decreased significantly after LL. These data suggest that *P. gingivalis* may have a regulatory switch that initiates pathogenesis during the middle of the exponential-phase growth under hemin limitation.

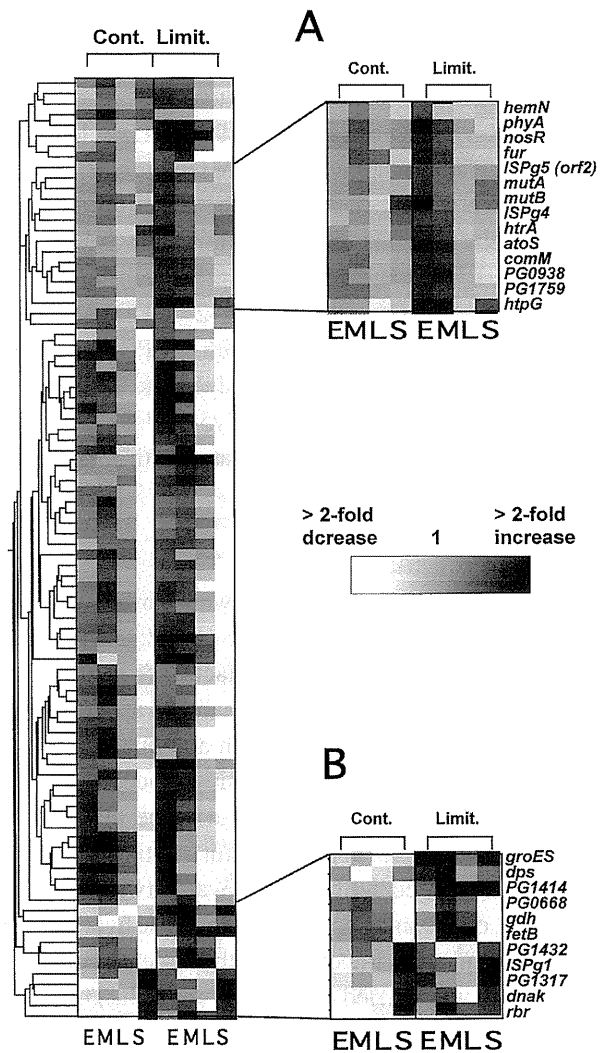


Fig. 3 Gene tree analysis based on standard correlation of the changes in gene expression under various hemin concentrations during growth of *P. gingivalis*. Distributions of individual gene expression levels are shown. Individual growth phases (E, early-log phase; M, mid-log phase; L, late-log phase; or S, stationary phase), hemin concentrations (Cont.; standard hemin conditions; or Limit.; Hemin-limited conditions) (columns), and levels of the 90 genes (rows) are shown. The scale bar indicates the color coding of the RNA levels.

Two gene groups showed significant differences in transcription profiles under hemin-standard and hemin-limited conditions (Fig. 3A, 3B). Group A contained 14 genes that showed comparatively small transcriptional fluctuations under standard hemin conditions, but which exhibited increases in transcription from EL to ML under hemin limitation (Fig. 3A). Group A contained many genes related to energy metabolism (*mutA* and *mutB*), regulatory functions (*nosR* and *fur*), and transport and binding proteins (*htrA*, *comM*, and *PG0938*, *PG1759*) (Table 1). Group B contained 11 genes that were down-regulated under standard hemin conditions, but were upregulated throughout bacterial growth under hemin limitation (Fig. 3B, Table 2). Group B contained genes involved in protein fate (*groES* and *dnaK*), transport and binding proteins (*PG0668* and *fetB*), and energy metabolism (*gdh* and *rbr*).

The *mutA* and *mutB* genes in group A encode subunits of methylmalonyl-CoA mutase, which catalyzes the interconversion of methylmalonyl-CoA and succinyl-CoA. This enzyme is known to play a role in the process that provides the amino acid metabolism intermediate to the TCA cycle (23). The *mut* genes exhibited a typical expression pattern in group A (Fig. 3A). *P. gingivalis* is asaccharolytic and cannot utilize carbohydrates as carbon/energy sources (24). Our data suggest that *mut* genes expression stability may play an important role in basic energy metabolism in *P. gingivalis* and that expression is up-regulated under hemin limitation. On the other hand, *gdh* gene expression increases at ML and LL, and these increases are particularly enhanced under hemin-limited conditions (Fig. 3B). The *gdh* gene encodes NAD-dependent glutamate dehydrogenase, which catalyzes the interconversion of glutamic acid and 2-oxoglutaric acids. This enzyme is known to participate in energy metabolism, amino acid metabolism, and nucleic acid metabolism (23).

P. gingivalis binds hemin on its surface and transports the entire molecule into the cell by an energy-dependent mechanism (25). Our data suggest that *P. gingivalis* that

reside in low-hemin environments may compensate by upregulating *mut* gene and *gdh* gene products to sustain energy production. Interestingly, genes encoding competence protein (*comM*) and transcriptase (*ISPG4* and *ISPG5*) in group A, and transcriptase (*ISPG1*) in group B were up-regulated under hemin limitation. Our data suggest that these genes might play a role in adaptation to environmental change through increased expression.

Iron acquisition is essential for *P. gingivalis* survival in a healthy periodontal environment. As shown in Fig. 3B, expression of *fetB*, *PG0668*, and *PG1414* genes, which encode transport and binding proteins, increased under hemin-limited conditions. FetB exhibits sequence similarity to the periplasmic binding proteins necessary for transporting siderophores through the periplasmic space of gram-negative bacteria (26). PG0668 and PG1414 are tonB-linked outer membrane receptors that transport hemin into the periplasmic space, from where it is further transported into the cell by a multicomponent periplasmic binding protein-dependent, ATP binding cassette transport system (27). The *rbr* gene (group B) encodes rubrerythrin, which contains a mixed Zn, Fe binuclear site (28). Rbr protein has multiple roles, not only in protein quality control, but also as an indirect regulator of transcription (29). Our data suggest that *P. gingivalis* might adapt to environmental change by increasing the expression of these genes and that these genes products might participate in the hemin uptake pathway under hemin limitation.

The *groES*, *dnaK* and *dps* genes in group B encode known stress response proteins. Most studies of Dps have focused on its role in oxidative damage protection, particularly against peroxides (30,31). Dps protects the cell not only from oxidative stress but also from multiple stresses such as UV and gamma irradiation, iron and copper toxicity, thermal stress, and acid and base shock (32). In addition, the Dps protein is induced by nutritional stress in *Bacteroides fragilis* (33). Our data show that the bacterial population continued to increase after ML until ST under hemin limitation, although the expression many

Table 1

Gene ID	TIGR ID	Description	Main role*
<i>hemN</i>	oxygen-independent coproporphyrinogen III oxidase	PG1505	Hypothetical proteins
<i>phyA</i>	hemolysin A	PG1875	Cellular processes
<i>nosR</i>	membrane-bound regulatory protein	PG1623	Regulatory functions
<i>fur</i>	ferric uptake transcriptional regulator	PG0465	Regulatory functions
<i>ISPG5 (orf2)</i>	transposase orf2	PG0008	Other categories
<i>mutA</i>	methylmalonyl-CoA mutase alpha-subunit	PG1656	Energy metabolism
<i>mutB</i>	methylmalonyl-CoA mutase beta-subunit	PG1657	Energy metabolism
<i>ISPG4</i>	transposase	PG0050	Mobile and extrachromosomal element functions
<i>htrA</i>	htrA protein (ABC solute binding protein)	PG0648	Transport and binding proteins
<i>atoS</i>	sensor histidine kinase	PG0017	Signal transduction
<i>comM</i>	competence protein ComM	PG1768	Transport and binding proteins
<i>PG0938</i>	calcium ion-transporting ATPase	PG0938	Transport and binding proteins
<i>PG1759</i>	adhesin protein	PG1759	Cell envelope
<i>hipG</i>	high temperature protein ; (Hsp90 homologue)	PG0045	Protein fate

*The classifications are described according to that in TIGR database.

Table 2

Gene ID	TIGR ID	Description	Main role*
<i>groES</i>	heat shock protein 10 (GroES)	PG0521	Protein fate
<i>dps</i>	DNA-binding stress protein	PG0090	Cellular processes
<i>PG1414</i>	hypothetical tonB-linked outer membrane receptor	PG1414	
<i>PG0668</i>	hypothetical tonB-linked outer membrane receptor	PG0668	Transport and binding proteins
<i>gdh</i>	NAD-dependent glutamate dehydrogenase	PG1232	Energy metabolism
<i>fetB</i>	heme-binding protein	PG0669	Transport and binding proteins
<i>PG1432</i>	sensor histidine kinase	PG1432	Signal transduction
<i>ISPG1</i>	transposase	PG0184	Mobile and extrachromosomal element functions
<i>PG1317</i>	hypothetical outer membrane protein	PG1317	
<i>dnaK</i>	DNA replication	PG1208	Protein fate
<i>rbr</i>	rubrerythrin	PG0195	Energy metabolism

*The classifications are described according to that in TIGR database.

arrayed genes exhibited remarkable decreases after ML. The stress-related proteins, which exhibited increased mRNA expression throughout bacterial growth, might play a role in protecting the proteins associated with growth and cell division by refolding misfolded proteins. The biological activities of proteins related to bacterial growth or cell division might be maintained until the late phase of growth.

In conclusion, we studied transcription profiles of *P. gingivalis* virulence genes during growth under hemin-limited conditions. Our analysis suggested that *P. gingivalis* may control the expression of many genes required for metabolism, stress response, and hemin acquisition in order to adapt to environmental changes. Our analysis also revealed that the expression of many genes changes drastically during bacterial growth. Microarray technology is very useful for analysis of gene expression changes under various conditions throughout *P. gingivalis* growth, and is an extremely powerful tool for characterizing global gene expression changes.

Acknowledgments

This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (13671981) from the Japan Society for Promotion of Science, and by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote Multidisciplinary Research Projects (in 2001 - 2005).

References

1. Mekalanos JJ (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174, 1-7
2. Holt SC, Kesavalu L, Walker S, Genco CA (1999) Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000 20, 168-238
3. Haffajee AD, Socransky SS (1994) Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5, 78-111
4. Wooldridge KG, Williams PH (1993) Iron uptake mechanisms of pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 12, 325-348
5. Barua PK, Dyer DW, Neiders ME (1990) Effect of iron limitation on *Bacteroides gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 5, 263-268
6. Bramanti TE, Holt SC (1991) Roles of porphyrins and host iron transport proteins in regulation of growth of *Porphyromonas gingivalis* W50. *J Bacteriol* 173, 7330-7339
7. Schifferle RE, Shostad SA, Bayers-Thering MT, Dyer DW, Neiders ME (1996) Effect of protoporphyrin IX limitation on *Porphyromonas gingivalis*. *J Endod* 22, 352-355
8. Kesavalu L, Holt SC, Ebersole JL (2003) In vitro environmental regulation of *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence. *Oral Microbiol Immunol* 18, 226-233
9. Xie H, Cai S, Lamont RJ (1997) Environmental regulation of fimbrial gene expression in *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 65, 2265-2271
10. Lepine G, Progulske-Fox A (1996) Duplication and differential expression of hemagglutinin genes in *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 11, 65-78
11. Marsh PD, McDermid AS, McKee AS, Baskerville A (1994) The effect of growth rate and haemin on the virulence and proteolytic activity of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Microbiology* 140, 861-865
12. Amano A, Kuboniwa M, Kataoka K, Tazaki K, Inoshita E, Nagata H, Tamagawa H, Shizukuishi S (1995) Binding of hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* 134, 63-67
13. Tazaki K, Inoshita E, Amano A, Hanioka T, Tamagawa H, Shizukuishi S (1995) Interaction of *Porphyromonas gingivalis* with transferrin. *FEMS Microbiol Lett* 131, 161-166
14. Smalley JW, Birss AJ, McKee AS, Marsh PD (1991) Haemin-restriction influences haemin-binding, haemagglutination and protease activity of cells and extracellular membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* W50. *FEMS Microbiol Lett* 90, 63-68
15. Lim CR, Fukakusa A, Matsubara K (2004) Gene expression profiling of mouse postnatal cerebellar development using cDNA microarrays. *Gene* 333, 3-13
16. Kuninger D, Kuzmickas R, Peng B, Pintar JE, Rotwein P (2004) Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation. *Genomics* 84, 876-889
17. Pysz MA, Conners SB, Montero CI, Shockley KR, Johnson MR, Ward DE, Kelly RM (2004) Transcriptional analysis of biofilm formation processes in the anaerobic, hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*. *Appl Environ Microbiol* 70, 6098-6112
18. Phadtare S, Inouye M (2004) Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-

- deletion strains of *Escherichia coli*. J Bacteriol 186, 7007-7014
19. Nelson KE, Fleischmann RD, DeBoy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE, Fraser CM (2003) Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. J Bacteriol 185, 5591-5601
 20. Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL, Aduse-Opoku J, Curtis MA, Camara M (2002) LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. Microbiology 148, 763-772
 21. Chung WO, Park Y, Lamont RJ, McNab R, Barbieri B, Demuth DR (2001) Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. J Bacteriol 183, 3903-3909
 22. Frias J, Olle E, Alsina M (2001) Periodontal pathogens produce quorum sensing signal molecules. Infect Immun 69, 3431-3434
 23. Takahashi N, Sato T, Yamada T (2000) Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 182, 4704-4710
 24. Mayrand D, Holt SC (1988) Biology of asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species. Microbiol Rev 52, 134-152
 25. Genco CA (1995) Regulation of hemin and iron transport in *Porphyromonas gingivalis*. Adv Dent Res 9, 41-47
 26. Carson SD, Klebba PE, Newton SM, Sparling PF (1999) Ferric enterobactin binding and utilization by *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 181, 2895-2901
 27. Nikaido H, Hall JA (1998) Overview of bacterial ABC transporters. Methods Enzymol 292, 3-20
 28. Jin S, Kurtz DM Jr, Liu ZJ, Rose J, Wang BC (2004) Displacement of iron by zinc at the diiron site of *Desulfovibrio vulgaris* rubrerythrin: X-ray crystal structure and anomalous scattering analysis. J Inorg Biochem 98, 786-796
 29. Marin I, Lucas JI, Gradilla AC, Ferrus A (2004) Parkin and relatives: the RBR family of ubiquitin ligases. Physiol Genomics 17, 253-263
 30. Almiron M, Link AJ, Furlong D, Kolter R (1992) A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. Genes Dev 6, 2646-2654
 31. Martinez A, Kolter R (1997) Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. J Bacteriol 179, 5188-5194
 32. Nair S, Finkel SE (2004) Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. J Bacteriol 186, 4192-4198
 33. Curtis MA, Kuramitsu HK, Lantz M, Macrina FL, Nakayama K, Potempa J, Reynolds EC, Aduse-Opoku J (1999) Molecular genetics and nomenclature of proteases of *Porphyromonas gingivalis*. J Periodontal Res 34, 464-472

外傷により引き起こされた形態異常を呈した下顎左側中切歯の 診断・治療に歯科用 CT (3DX™) を用いた 1 例

松根 健介 梶山 紫 白井 朗
荒井 清司 前田 隆秀

要旨：著者らは、10歳8か月の女兒の下顎左側中切歯における形態異常歯の治療を経験した。形態異常歯は、2歳時の外傷が原因と考えられ、診断・治療計画に3DX™を用い、歯の内部構造を検討した。形態異常歯歯冠は、歯根に対し90度唇側方向に彎曲しており、唇側エナメル質の一部は歯冠の象牙質内部に陥入し、歯髓腔の近接まで及んでいた。治療にあたり、歯髓処置を避ける目的で歯髓腔に近接する部位に対し、4回の間接覆髓を行った。咬合と審美性の回復はコンポジットレジンにて行った。3DX™を用いたことにより、複雑な歯の内部構造を把握しながら治療を行うことができ、歯髓処置を行うことなく良好な状態で形態の回復ができた。3DX™が、形態の複雑な歯に対しての診断・治療に大変有用なことが、本症例を通じて明らかにすることができた。

Key words：外傷, 形態異常歯, 3DX™

緒 言

日々の小児歯科臨床において、歯の外傷は高頻度に認められる疾患である¹⁾。乳歯が外傷を受けた場合、後継永久歯の発育に障害を引き起こす可能性が報告されており、歯に現れる障害の種類は、開始期、増殖期、組織分化期、形態分化期という歯の発育段階のどの時期に障害を受けたかによって変わることが報告されている²⁾。また、乳歯外傷が重篤であればあるほど、受傷年齢が低ければ低いほど、永久歯胚へのダメージが大きいこと³⁾、受傷年齢、乳歯に引き起こされた外傷のタイプ、歯槽骨骨折の有無によって後継永久歯の障害が決まることが報告されている⁴⁾。

外傷により引き起こされた障害を持つ歯や形態異常歯の治療における報告は多く認められる⁵⁻⁷⁾。近年、形態異常歯などの治療を行うにあたり、歯内部の状態を確認するために歯科用 CT (3DX multi image micro CT, 以下 3DX™, ㈱モリタ製作所) を用いた報告を認め、その有用性が報告されている⁸⁾。今回、著者らは、外傷により引き起こされた形態異常を呈した下顎左側中切歯を持つ患児の治療を行う機会を得た。形態異常歯の内部を 3DX™にて観察し、得られた画像をもとに治療を行ったので報告する。なお、本症例の報告にあたり、患児および保護者の承諾を得ている。

症 例

患児：10歳8か月 (初診時：8歳5か月)

日本大学松戸歯学部小児歯科学教室
〒271-0061 千葉県松戸市栄町西2丁目870番1
(受付：2005年10月27日)
(受理：2005年11月27日)

主訴：下顎左側中・側切歯の異常を指摘され来院
既往歴：6歳時に肺炎の既往あり、現在完治しており、その他、特記事項は認めない。

現病歴：2歳7か月時に、転倒により下顎両側中乳切歯相当部を強打した。下顎両側乳中切歯は動揺著しく抜歯され経過観察が行われていた。7歳時より下顎左側中切歯は萌出し始め、エナメル質の形成不全を認めた。さらに、経過観察していたところ、舌側に硬組織様の突起を認めたため紹介来院した。

現症：初診時の下顎左側中切歯は歯冠切端部を90度唇側に傾斜した状態であった (図 1A, B)。また、下顎左側側切歯にエナメル質減形成を認めた (図 2A, B)。エックス線検査において下顎左側中切歯の根尖は未完成であり、歯冠部は形態の異常を呈していた (図 3A, B)。

3DX™断層像：歯冠部エナメル質の厚みは正常であったが、唇側エナメル質の一部は象牙質内に埋入し、歯髓腔に近接していた。歯冠は歯頸部より約2mmの位置で90度に傾斜した状態で歯根部と一体化していた (図 4A, B)。

治療経過：咬合ならびに審美的なことを考慮し、可及的に歯髓を保護しながら治療を行うこととした。3DX™所見にて、咬合面より切削を行うと露髓の可能性が考えられた。また、唇側に認められる形態異常を改善するにあたり、歯の削除を多く行うと歯髓腔に近接、もしくは、歯髓腔に交通する可能性が考えられた。そこで、歯の削除は唇側のみを行い歯髓近接部位に対し第二象牙質の形成を促すことを目的とし、水酸化カルシウム製剤にて2か月に一度の間隔で歯の削除を行い、計4回の間接覆髓を行った。咬合の改善および審美性の回復はコンポジットレジンにて行い、現在、冷水痛や咬合痛などの異常所見は認めず経過良好である (図 5A, B)。

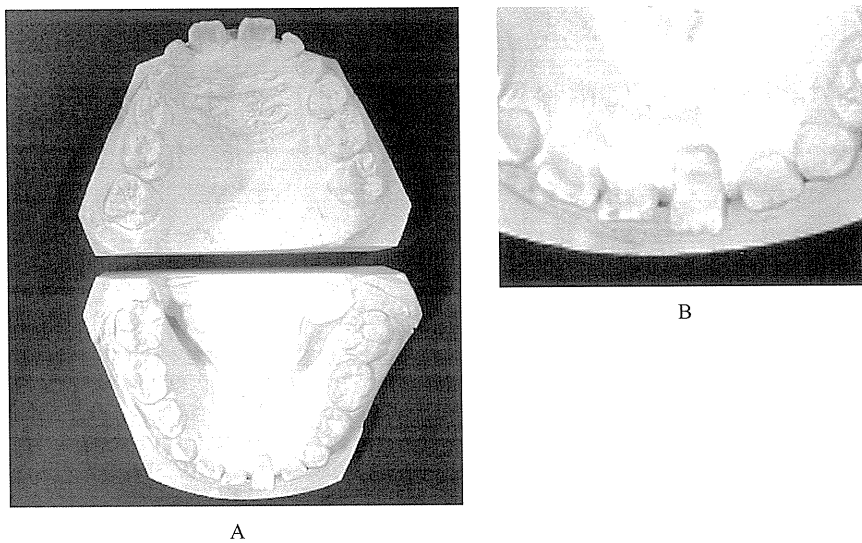


図1 口腔内模型
A：初診時（8歳5か月）
B：拡大図

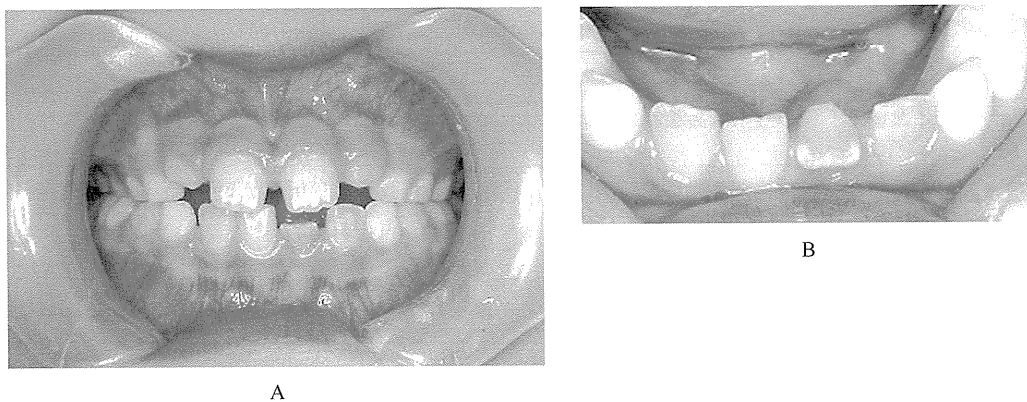


図2 口腔内写真
A：初診時（8歳5か月）
B：拡大図（咬合面観）

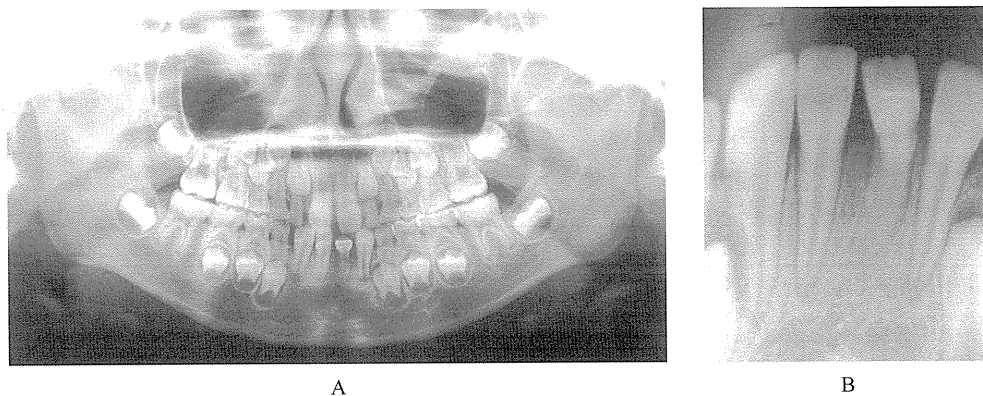


図3 初診時エックス線写真
A：パノラマエックス線写真
B：デンタルエックス線写真

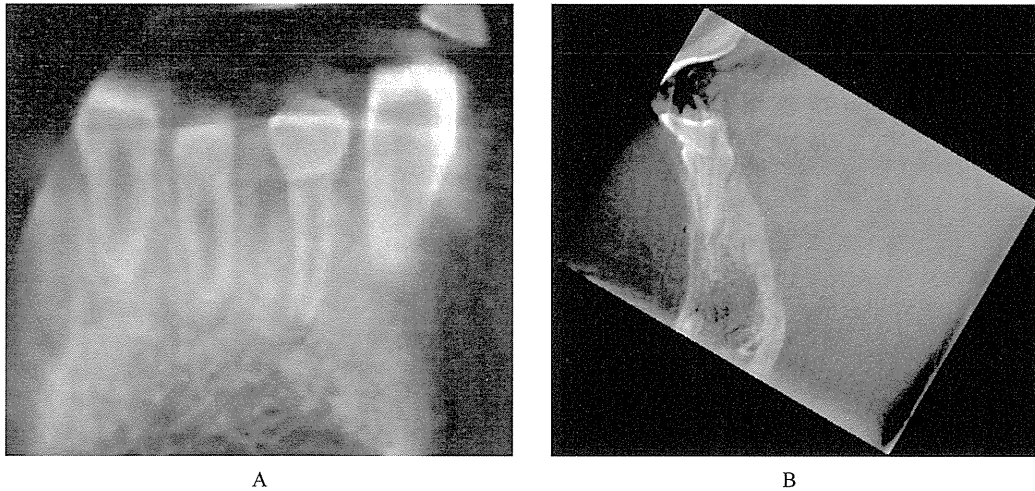


図4 3DX™ 断層像
A：前頭断
B：矢状断

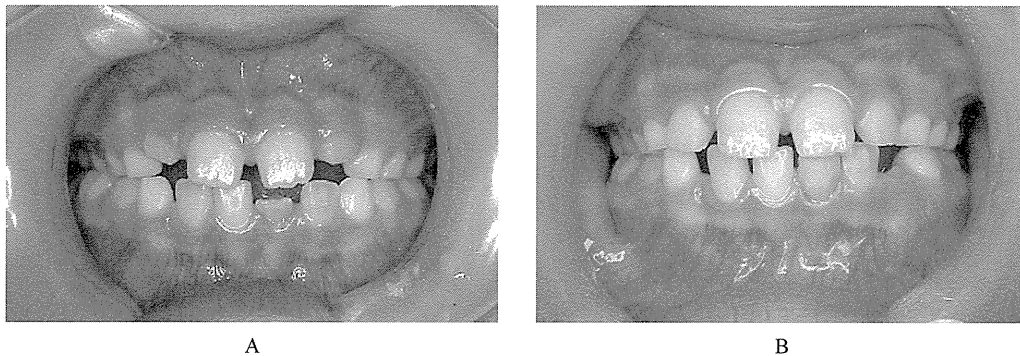


図5 口腔内治療経過
A：初診時（8歳5か月）
B：治療終了時（10歳8か月）

考 察

歯の形態異常や形成不全は、全身的原因と局所的原因に分けられる。全身的原因は、栄養障害、遺伝性疾患、先天性梅毒、代謝異常などが考えられ、左右対称または全顎的に障害が出現することが報告されている。一方、局所的要因は、炎症、外傷や放射線障害が挙げられ、その障害は局部に限られて発現することが普通である⁹⁾。また、乳歯の外傷の好発年齢は2歳前後であり、永久歯と比較し脱臼が多く、好発部位は、上顎切歯部であることが報告されている¹⁰⁾。さらに、乳歯外傷による後継永久歯に現れる障害は、多くの研究者が報告しており¹¹⁻¹⁴⁾ Andreasenらは、1) 白色または黄褐色のエナメル質の変色、2) 白色か黄褐色のエナメル質の変色と水平的なエナメル質形成不全、3) 歯冠の彎曲、4) オドントーマ様の異形成、5) 複根、6) 口腔前庭部への歯根彎曲、7) 側方への歯根彎曲、8) 歯根発育の部分的あるいは完全停止、9) 歯胚全体の脱離、10) 萌出障害の10項目に分類^{4,15)}し、エナメル質の障害が最も多いことをあわせて報告してい

る。本症例においても、下顎左側中・側切歯のエナメル質に異常を認めた。また、本症例に認められた歯冠の彎曲はエナメル質の障害に比較し、その発現頻度は、はるかに低いことが報告されている^{15,16)}。Levy¹⁷⁾はオドントーマ様の異形成の発現について述べているが、本症例においては象牙質、エナメル質、セメント質の増殖は認められないためオドントーマ様の異形成ではなく歯冠の彎曲の分類に当てはまると考えられた。

外傷により引き起こされた形態異常を伴う永久歯は審美的な回復を行う必要があることが報告されている⁵⁾。また、治療に際しては、歯の削除において可及的に露髄を避ける必要が考えられる。本症例における形態異常歯における歯髓腔の位置関係は、歯冠が唇側方向に90度に彎曲しているために咬合法ならびにパノラマエックス線写真では判断することが出来なかった。そこで、診断ならびに治療を行うにあたり3DX™を用いた。3DX™は、日本初の歯科医療に最適化した三次元画像診断装置であり、非破壊的に歯の内部構造を把握でき、口内法エックス線写真と同等の解像力を持ち、被曝

線量は従来法のパノラマとほぼ同等ときわめて低被爆という特徴を持っている¹⁸⁾。現在までに、根尖病巣の状態、埋伏歯の位置、歯髄腔の形態の把握やインプラントの診断などにおいて使用され、その有効性が報告されている¹⁹⁾。今回、著者らは、歯髄処置を可及的に避け歯冠修復を行うために、歯の内部構造を3DX™にて確認した。その結果、歯髄の正確な位置を確認することができ、90度に彎曲した歯冠に対して歯髄処置を行うことなく良好な状態で歯冠形態の回復を得ることができた。

著者らが経験した下顎左側中切歯に認められた形態異常歯は、2歳時に経験した外傷により引き起こされた歯冠の彎曲であることが示唆された。さらに、当該歯の診断・治療に3DX™を用いたが、3DX™を用いたことで、より良好な状態で歯髄処置を行うことなく咬合ならびに審美性を回復することができ、形態異常を伴う歯の内部構造を把握するのに3DX™が大変有用であることが考えられた。

参考文献

- 1) 小児歯科学会：小児の歯の外傷の実態調査，小児歯誌，34：1-20，1996。
- 2) Hall, S.R. and Iranpour, B.：The effect of trauma on normal tooth development, Report of two cases, J. Dent. Child., 35：291-295, 1968.
- 3) MacGregor, S.A.：Management of injuries to deciduous incisors, J Canad. Dent. Ass., 35：26-34, 1969.
- 4) Andreasen, J.O. and Ravn, J.J.：The effect of traumatic injuries to primary teeth on their permanent successors, II. A clinical and radiographic follow-up study of 213 teeth, Scand. J. Dent. Res., 79：284-294, 1971.
- 5) 山本益枝，中島正人，三宅雄次郎ほか：外傷が影響したと思われる永久歯歯冠形態異常の1例，小児歯誌，25：477-487, 1987.
- 6) 福島知典，清水武彦，菅野亜里早ほか：歯冠の形態修正により自然萌出が認められた埋伏上顎中切歯と過剰歯との双生歯の1例，小児歯誌，42：119-123, 2004.
- 7) Oginni, A., Adekoya-Sofora, C., Oginni F. et al.：Talon cusp：Report of a case involving all the maxillary permanent incisors in a Nigerian child, Pediatr Dent J, 11：85-88, 2001.
- 8) 菅野亜里早，清水邦彦，新井嘉則ほか：根尖性歯周炎を惹起した陥入歯に3DX®を利用し，歯内療法を行った1例，小児歯誌，40：171-176, 2002.
- 9) 前田隆秀：歯の発育と異常，前田隆秀，スタンダード小児歯科学；第1版，学建書院，東京，pp.37-50, 2001.
- 10) Bennett, D.T.：Traumatized anterior teeth, Brit. Dent. J., 116：52-55, 1964.
- 11) Selliseth, N-F.：The significance of traumatized primary incisors on the development and eruption of permanent teeth, Trans Eur. Orthod. Soc., 46：443-459, 1970.
- 12) Ravin, J. J.：Sequelae of acute mechanical trauma in the primary dentition, J. Dent. Child., 35：281-289, 1968.
- 13) 橋本実樹，久保周平，銅治芳江ほか：乳歯外傷が後継永久歯に及ぼす影響に関する実態調査，歯科学報，87：1439-1450, 1987.
- 14) 石川雅章，佐藤公子，宮新美智世：乳歯の外傷に関する臨床的研究 第3報 後継永久歯に与える影響，小児歯誌，28：397-406, 1990.
- 15) Andreasen, J.O., Sundstrom, B. and Ravn, J. J.：The effect of traumatic injuries to primary teeth their permanent successors, I .A clinical and histologic study of 117 injured permanent teeth, Acand. J. Dent. Res., 79：219-283, 1971.
- 16) Rodda, J. O.：Gross maldevelopment of permanent tooth caused by trauma to its deciduous predecessor, N. Z. Dent. J., 56：24-25, 1960.
- 17) Levy, B. A.：Effects of experimental trauma on developing first molar teeth in rats, J. Dent. Res., 47：323-327, 1968.
- 18) 篠田宏司，新井嘉則，本田和也，ほか：新世紀の歯科診断と歯科治療－歯科用小照射野 X 線 CT による画像診断－，日歯医学会誌，20：6-16, 2001.
- 19) 新井嘉則，橋本光二，江島堅一郎，ほか：歯科小型 X 線 CT (Ortho CT) の臨床例 1,000 例の統計的分析，日歯医学会誌，19：54-63, 2000.

Treatment of a crown malformation in a lower left permanent central incisor tooth derived from earlier traumatic injuries to a primary tooth based on diagnosis using 3DX™

Kensuke Matsune, Yukari Kajiyama, Akira Usui, Kiyoshi Arai, Takahide Maeda
Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

We treated a crown malformation of the lower left permanent central incisor teeth in a girl aged 10 years 8 months. The malformation derived from traumatic injuries to a primary tooth at 2 years old. We determined the treatment plan using 3DX™. The crown of the lower left permanent central incisor tooth had bent at 90 degrees against the root. The labial enamel entered to the dentin of the crown, and part of the enamel reached to near the pulp. We treated the tooth using indirect capping with calcium hydroxide paste for four times at intervals of two months to induce reparative dentin formation. The occlusion and esthetic appearance were adjusted by composite resin restoration. 3DX™ was useful for diagnosis and treatment of a tooth with crown malformation derived from traumatic injuries.

Key words : Traumatic injuries, Crown malformation, 3DX™

《原 著》

背筋力発揮時における顎頭位について

すず き ひろ し あさ の たかし かわ ら み さ お こ み やま おきむ*
鈴 木 浩 司 浅 野 隆 川 良 美佐雄 小見山 道*
はやし ゆき お あら い ま き かわ て しゅう ま** こ ばやし き へい
林 幸 男 荒 井 真 喜 川 手 秋 馬** 小 林 喜 平

日本大学松戸歯学部 第1歯科補綴学教室
*日本大学松戸歯学部 総合歯科診療学教室
**日本大学大学院松戸歯学研究科 総義歯学専攻

キーワード：顎頭位，背筋力，スポーツ

要旨：健康の維持増進に対する要求は，高齢社会にあつてますます高まり，生活習慣病への予防の見地からもスポーツが推奨されている。スポーツを安全かつ快適に行うにあたり，歯科医学的にもこれをサポートすべく種々検討がなされてきた。顎口腔領域においては，特にコンタクトスポーツを中心に顎顔面領域での外傷予防のため，マウスガードを装着することが推奨され，その必要性や効果が報告されている。一方，身体運動機能と顎口腔機能との関係についても，咬合位の改善あるいは挙上によって身体運動機能が向上するという研究報告がみられる。しかしながら，全身運動と顎口腔系の動態，および咬合機能との間には密接な関係があるとされながらも，いまだにそのメカニズムは明らかではなく，噛みしめ，くいしばりという状況変化や，下顎位がスポーツパフォーマンスに及ぼす影響についてはさらなる検討が必要と思われる。

一般に，ヒトが強い筋力を発揮する場合には噛みしめが生じると考えられているが，これについては下顎位を含めて定説はない。したがって，種々なるスポーツ選手，愛好家の顎口腔系の保全に際し，筋力発揮時に自然に生じる顎位の一端を明示しその動態を認識することは，スポーツアスリート，愛好家に対する診断，治療，そして予防において大きな示唆を与えるものと思われる。そこで，背筋力発揮時の顎頭点変位について，被験者10名を対象に6自由度顎運動測定器を用いて検討し，以下の結果を得た。

1. 背筋力発揮時における顎頭点変位は，右側顎頭では10名中9名が後下方へ変位した。左側では，10名全員が後下方へ変位した。
2. 接触滑走自発後運動時における顎頭変位は，右側顎頭では10名中9名が，左側顎頭では10名中7名が後上方へ変位した。
3. 筋力発揮時と自発後運動時の比較において，背筋力発揮時では顎頭は有意に下方へ変位した。

これまで，咬頭嵌合位からの後方運動に関しては，顎口腔系の機能異常との関連から重要視され，顎口腔系の機能診査の1項目にもなっていた。しかしながら，本研究より，背筋力を発揮する場面において，ヒトは自然な顎位として，咬頭嵌合位よりもやや後方位をとることが示唆された。さらに，下顎の後方への変位は，日常普遍的に生じていることが考えられる。

Condyle Position During Exertion of Back Strength

Hiroshi Suzuki, Takashi Asano, Misao Kawara, Osamu Komiyama*,
Yukio Hayashi, Maki Arai, Shuma Kawate**, Kihei Kobayashi

Department of Complete Denture Prosthodontics,
*Comprehensive Dentistry

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo,
Complete Denture Prosthodontics

Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Key words : condyle position, back strength, sports

Abstract : The purpose of this study was to clarify the condyle position during exertion of back strength. The changes of condylar position were measured by a six-degree of freedom jaw movement tracking device in the 10 subjects. The hypothesis of this study was that the mandibular position when the trunk muscle strength had been performed was not in the intercuspal position and was in another some position as the natural position to stable the mandible. The results were as follows ;

1 When the back strength was exerted, the retro-detrusive displacement was observed in 9 out of the 10 subjects at the right condyles while that was observed in all the subjects at the left condyles.

2 When the voluntary retrusive movement was performed, the retro-surtrusive displacement was observed in 9 out of 10 subjects at the right condyles while that was observed in 7 out of the 10 subjects at the left condyles.

The significant difference in displacement of the condyles between the back strength exertion and the voluntary retrusive movement was observed in the superior and inferior directions ($p < 0.05$).

Nihon Univ. J. Oral Sci. 27 : 312~319, 2001

緒 言

健康の維持増進に対する要求は、高齢社会にあつてますます高まり、生活習慣病への予防の見地からもスポーツが推奨されている。スポーツを安全かつ快適に行うにあたり、歯科医学的にもこれをサポートすべく種々検討がなされてきた。顎口腔領域においては、特にコンタクトスポーツを中心に顎顔面領域での外傷予防のため、マウスガードを装着することが推奨され、その必要性や効果について多くの報告をみる^{1,2,3)}。一方、身体運動機能と顎口腔機能との関係についても、MORA (Mandibular Orthopedic Repositioning Appliance)、テンプレートな

ど様々なスプリント装着による咬合位の改善あるいは挙上によって身体運動機能が向上するという研究報告がみられる^{4,5,6)}。また、石島らは、背筋力発揮時におけるクレンジング発現頻度を検討した結果、6割の者が噛みしめをおこない、下顎位については、咬頭嵌合位、偏心位、および咬合接触しない軽度の開口位をとる場合があることを報告している⁷⁾。これまで、全身運動と顎口腔系の動態、および咬合機能との間には密接な関係があるとされながらも、いまだにそのメカニズムは明らかではなく、噛みしめ、くいしばりという状況変化や、下顎位がスポーツパフォーマンスに及ぼす影響についてはさらなる検討が必要と思われる。

一般に、ヒトが強い筋力を発揮する場合には噛みしめが生じると考えられているが、これについては下顎位を含めて定説はない。したがって、種々なるスポーツ選手、愛好家の顎口腔系の保全に際し、筋力発揮時に自然に生じる顎位的一端を明示し、その動態を認識することは、スポーツアスリート、愛好家に対する診断、治療、そして予防において大きな唆を与えるものと思われる。今回は、背筋力を最大発揮させた場合の顎頭位について検討したので、その結果を報告する。

実験方法

1. 被験者

被験者は健康で、顎口腔系および体幹四肢の運動系に自覚的、他覚的に異常を認めず、TMDに既往および現病歴の無い個性正常咬合を有する健常男性10名(年齢21~26歳、平均23.7歳)とした。

なお、本実験の開始前に、各被験者に対して研究目的に関する説明を行い、同意を得たうえで実験を行った。

2. 背筋力発揮

背筋力発揮は汎用背筋力計(TAKEI, Japan)を使用し、スポーツテストの指針⁹⁾に従って行った。体幹前傾角度を30度とし、背筋力計が作動しない状態で鎖を緊張させ、それから一気に最大発揮を3秒間行わせた。実験は疲労回復を十分考慮に入れたうえで3回行い、得られた背筋力を記録した。

3. 顎頭点変位の測定および分析

顎頭点変位の測定には3次元6自由度下顎運動測定装置(CONDYLOCOMP LR3, DENTRON, Germany)を用いた。本装置は従来の測定装置と比較して下顎ボウ重量が50gと軽量で、光反射方式により微小蝶番開口運動よりトランスバース・水平アキスを演算し、顎頭点変位方向の図示、および変位距離を数値化する機能を有する⁹⁾。さらに、下顎運動を測定するにあたり頭部を固定する必要がなく、また上下歯列間にクラッチなどを介在させずに記録することができる。測定顎頭点はトランスバース・水平アキス上で、正中から55mm(顎頭間距離110mm)の点となる。アキス・オルビタールプレーンを基準平面とした直交座標系を設定し、実験開始時の顎位である最小の咬合力をもって咬頭嵌合位を保持したときの顎頭点を計測原点とした。また、筋

力発揮時の顎位は、咬頭嵌合位に限らず、被験者の最も筋力発揮に適した任意の自然な顎位でかまわないことをあらかじめ指示した。

計測はサンプリングスピード0.01secにて3秒間行い、顎運動記録はパーソナルコンピュータ(VAIO XR-7S SONY社製)に導出、データ解析ソフト(JAWS 2.0, DENTRON, Germany)にて演算処理され、変位量がリアルタイムに画面表示される。左右の顎頭点変位量は、矢状面上の前後方向および上下方向への原点からの変位量を直線移動距離として算出し、平均値を求めた。

4. 自発後方運動

本実験のパイロット試験から、背筋力発揮時においては顎頭の後方変位を多く認めたため、自発後方運動についても、背筋力発揮時と同様の顎頭運動の測定を行い、比較検討した。

5. 統計分析

背筋力発揮時と自発後方運動時における、前後および上下方向での両者間の有意差の検定には一元配置分散分析(one-way ANOVA)、および多重比較(Tukey-Kramer's method)を用いた。

結果

被験者10人の背筋力を最大発揮させた場合、および自発後方運動時の顎頭位置の結果をTable 1およびFig. 1~5に示す。

1. 背筋力発揮時の顎頭点変位量

背筋力発揮時の顎頭点変位量は、右側において前(+), 後(-)方向で $-0.12 \sim -1.82$ mm, 上(+), 下(-)方向で $+0.06 \sim -0.94$ mmの範囲に分布し、10名中9名が後下方へと変位した。一方、左側においては、前後方向で $-0.17 \sim -1.94$ mm, 上下方向で $-0.01 \sim -0.59$ mmの範囲に分布し、10名全員が後下方へと変位した。(Table 1, Fig. 1, 2)

2. 自発後方運動時の顎頭点変位量

右側においては前後方向で $-0.13 \sim -1.20$ mm, 上下方向で $+1.65 \sim -0.28$ mmの範囲に分布し、10名中9名までが後上方へと変位した。一方、左側では、前後方向で $-0.13 \sim -2.58$ mm, 上下方向で $+1.22 \sim -0.39$ mmの範囲に分布し、7名が後上方へと変位した。(Table 1, Fig. 3, 4)

Table 1 The displacements of condyles during exertion of the back strengs and the volunatary retrusive mandibular movement

Subjects	Condyle	Exertion of the back strengsh		Voluntary retrusive movement		Back Strngs(Kg)
		Anterior-Posterior	Superior-Inferior	Anterior-Posterior	Superior-Inferior	
1	R	-0.82 (0.50)	-0.94 (0.40)	-1.20 (0.26)	-0.28 (0.25)	200.5 (21.2)
	L	-1.19 (0.51)	-0.53 (0.02)	-2.58 (0.08)	1.22 (0.33)	
2	R	-0.15 (0.08)	-0.23 (0.15)	-0.13 (0.08)	0.30 (0.10)	110.5 (14.1)
	L	-0.35 (0.35)	-0.26 (0.14)	-0.13 (0.30)	0.20 (0.06)	
3	R	-1.57 (0.13)	-0.26 (0.09)	-1.13 (0.33)	1.65 (0.45)	112.5 (3.5)
	L	-1.76 (0.18)	-0.29 (0.16)	-0.94 (0.12)	0.64 (0.06)	
4	R	-1.82 (0.27)	0.06 (0.33)	-0.21 (0.06)	0.30 (0.07)	142.5 (3.5)
	L	-1.94 (0.21)	-0.59 (0.18)	-0.34 (0.05)	0.24 (0.21)	
5	R	-0.56 (0.33)	-0.52 (0.08)	-0.73 (0.80)	0.39 (0.16)	121.0 (7.1)
	L	-0.49 (0.24)	-0.01 (0.23)	-0.63 (0.20)	0.18 (0.21)	

mm(S.D.)

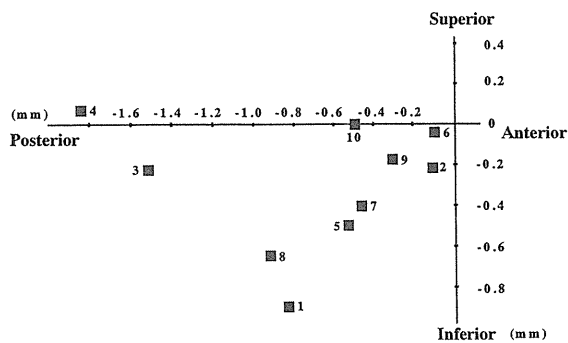


Fig.1 Displacements of the right condyles with exertion of the back strengs. The condylar displacement were observed -0.12 mm to -1.82mm in anterior-posterior direction, and +0.06mm to -0.94mm in superior-inferior direction.

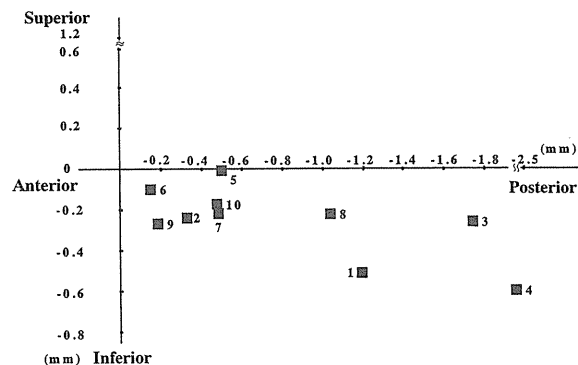


Fig.2 Displacements of the left condyles with exertion of the back strength. The condylar displacement were observed -0.17 mm to -1.94mm in anterior-posterior direction, and -0.01mm to -0.59mm in superior-inferior direction.

3. 背筋力発揮時と自発後方運動時の比較

背筋力発揮時と自発後方運動時の顎頭点変位量を検定した結果、背筋力発揮時には、左側顎頭前後方向において差が見られなかった以外は、右側顎頭の前後、上下方向、左側顎頭の上下方向に有意な差をもって変位した ($p < 0.05$)。 (Fig. 5)

考 察

咬合と全身運動機能との関係については、咬合挙上と

運動能力の向上に関する報告がある^{10,11,12})。これらは、MORA、オクルーザル・スプリント、バイト・スプリント、テンプレートなどと呼ばれる咬合挙上装置の効果について検討したものであるが、アプライアンスによる咬合挙上筋力や運動能力を高めるのに有効か否かはさらに検討されるべきであり、その機序を明らかにする必要がある。宮原らはクレンジング時のヒトのヒラメ筋H反射を観察した結果から、クレンジングが運動機能に及ぼす影響を客観的に示し、咬合状態の変化が全身の運動機

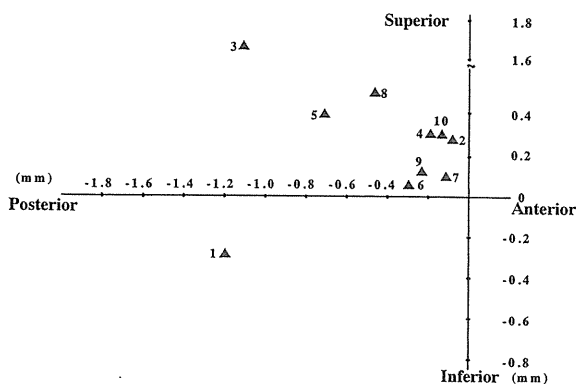


Fig. 3 Displacements of the right condyles with exertion of the voluntary retrusive movement. The condylar displacement were observed -0.13mm to -0.12mm in anterior-posterior direction, and +1.65mm to -0.28mm in superior-inferior direction.

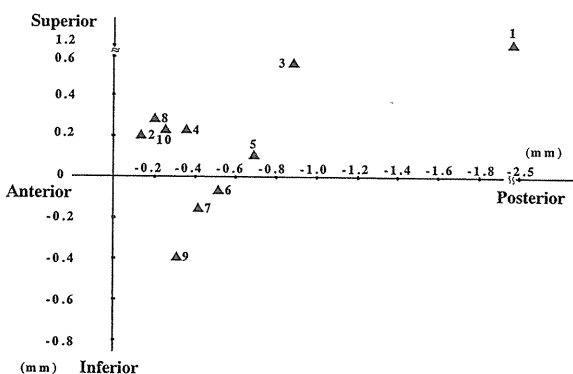


Fig. 4 Displacements of the left condyles with exertion of the voluntary retrusive movement. The condylar displacement were observed -0.13mm to -2.58mm in anterior-posterior direction, and +1.22mm to -0.39mm in superior-inferior direction.

能に影響を及ぼす可能性を示唆している¹³⁾。しかしながら、これまでの顎口腔機能と全身運動との関係における報告では、咬合挙上装置¹³⁾やクレンチング¹⁴⁾など、運動時に噛みしめることを前提とした検討がほとんどで、顎位については、咬頭嵌合位をとらない場合があるとの報告⁷⁾を見るにすぎない。

プロスポーツ選手、スポーツ愛好家に関わらず、顎口腔系の保全にあたり、筋力発揮時にヒトが自然に位置しようとする顎位を認識することは重要であり、その動態の一端を明示することはスポーツアスリートに対する診断、治療、そして予防において、大きな示唆を与えるものと思われる。そこで今回は、背筋力を最大発揮させた場合の顎頭位について検討した。

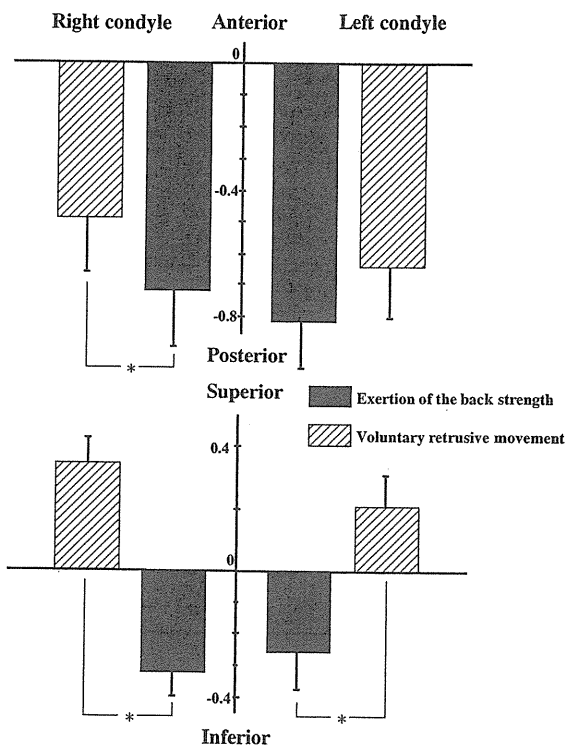


Fig. 5 Statistical analysis of the condylar displacements between the exertion of the back strength and the voluntary retrusive movement. Significant differences were observed at right condyle in anterior-posterior direction, and at both condyles in superior-inferior direction (ANOVA, *: $p < 0.05$).

被験者には日常的に運動をしている男性を、年齢差が大きくなるように選択した。本研究は、背筋力発揮時の下顎運動の動態を調べるのが目的であるため、個性正常咬合を有し、TMDに既往および現病歴のないものを対象としたが、ブラキシズムならびにクレンチングの自覚的、他覚的有無については問わなかった。

筋力が発揮されるとき、筋の収縮は等尺性収縮、等張性収縮に大別され、筋の持つ特性から静的筋力、持久力、瞬発力の3つに分けることができる¹⁵⁾。一方、等尺性収縮は、筋長が一定で、筋長力を変化させる収縮であり、等張性収縮は、筋張力が一定で、筋長のみを変化させる収縮である。背筋力は等尺性収縮で、静的筋力の1つであり、比較的ゆっくりと筋を収縮させて力を発揮するときの筋力である¹⁶⁾。また、全身の特に背部諸筋、肩、上腕諸筋および腰部諸筋の共働最大筋力を現すものであり¹⁵⁾、全身の筋力をみると考えて良いとされている¹⁷⁾。本研究においては、このような観点から、体幹筋の代表として

背筋力を選択し、発揮させた。また、今回計測に用いた背筋力測定装置は握力測定などとともに筋力測定としては一般的なものであり、広く用いられている方法である。従って、被験者が計測法の訓練およびその計測を経験していなくても、計測機器への慣れや、筋力発揮にも問題はないものと思われる。本方法は、今後の検討において被験者数、年齢層が変化しても再現性が高く、筋力発揮時の顎口腔系の動態をみる簡便な手段として適していると考えられる。なお今回は、Table 1 に示すように、被験者それぞれの背筋力を最大発揮した際の顎頭点の変位を調べることが目的としたため、3回計測した背筋力については標準偏差を求め、定常的に背筋力が発揮されているかどうかの指標とした。

顎頭点の測定については、これまで Messerman¹⁸⁾、Knap¹⁹⁾をはじめとして、保母ら²⁰⁾、板東ら²¹⁾、藤村ら²²⁾、黒川ら²³⁾、Airoldi ら²⁴⁾、栗山ら²⁵⁾、Kang ら²⁶⁾によって6自由度下顎運動測定器が開発、改良され、皮膚面下の顎頭運動が高精度に測定できるようになった。本研究で使用した CONDYLOCOMP LR3 は、光反射方式の非接触型で軽量な下顎運動測定器であり、下顎運動をリアルタイムで記録し、顎頭点の運動軌跡をコンピューター画面に三次元表示することができる⁹⁾。また、下顎運動を測定するにあたり、頭部を固定する必要がなく、さらに、上下歯列間にクラッチやスプリントなどを介させずに記録することができ、本研究のように背筋力発揮という全身運動を行う実験においても、運動を障害することなく、また自然な咬合状態のまま、顎運動を測定することができる。

さらに、本実験のパイロット試験から、背筋力発揮時において、顎頭の後方変位を多く認めたため、自発後方運動についても、背筋力発揮時と同様の顎頭運動の測定を行った。この自発後方運動測定の目的には、意識下における後方運動時の顎頭変位方向を確認することであり、背筋力発揮だけに集中している被験者の無意識のうちに変位する顎頭位と比較検討する必要があると考えられる。

本実験の結果、自発後方運動時では顎頭は後上方に変位した。自発後方運動時における顎頭点変位については、咬頭嵌合位より歯牙接触にて後方位をとらせた場合、Posselt は後方へ0.3 mm、上方へ0.2 mm の位置にあると報告しており²⁷⁾、河野は後方へ0.4 mm、上方へ0.2 mm の位置にあると報告している²⁸⁾。また、古谷野は後方へ0.4 mm、上方へ0.1 mm 移動していると報告し²⁹⁾、いずれ

も自発後方運動時には顎頭は後上方へ変位することを示し、本実験においても同様の結果を得た。また変位量についても、本実験では、後方へ0.5 mm、上方へ0.3 mm を示し、過去の報告に近似した。

一方、背筋力発揮時における顎頭点変位では、自発後方運動でないにもかかわらず被験者10名全員が後方へ変位し、しかも、自発後方運動時の上方変位と異なり下方に変位した。自発後方運動時と背筋力発揮時における前後、上下方向の変位量について比較すると、左側顎頭前後方向で差が見られなかった以外は、左側顎頭上下方向、および右側顎頭前後、上下方向に有意差を認めた。このことは、背筋力発揮時には下顎が咬頭嵌合位から、わずかに後方へ変位することを示している。したがって、下顎を後方へ牽引する側頭筋後腹、および顎二腹筋が強く作用していることが考えられる。また、下方への変位は、舌骨上筋群と舌骨を固定するために収縮する舌骨下筋群が協調して作用したものと思われる。これまで、咬頭嵌合位からの後方への変位に関しては、顎機能の上で障害を生じやすい運動と言われ³⁰⁾、顎口腔系の機能異常との関連から重要視され、顎口腔系の機能診査の1項目にもなっていた。しかしながら、大石³¹⁾、川畑³²⁾が新鮮屍体の顎関節の解剖により、関節構造として顎頭が、後方、後上方ばかりでなく後下方へも変位することを報告しており、また、河野²⁸⁾の被験者にも後下方への変位がみられることから、顎頭は後方運動に際し、顎機能異常者でなくても下方への変位は十分生じうることが考えられる。本実験において、意識下における自発後方運動時の後上方への変位と明らかに異なる動態を示したこの現象は、背筋力を強く発揮する際に、咀嚼筋群のなかにおいても、閉口筋よりも舌骨上下筋群が優勢に働き、下顎を固定しようとした結果かもしれない。

以上のことより、背筋力を発揮する場面において、咬頭嵌合位での強い噛み締めは生じておらず、ヒトは自然な顎位として、咬頭嵌合位よりもやや後方位をとることが示唆された。さらに、下顎の後方への変位は、日常普遍的に生じていることが考えられる。従って、臨床の場面において、下顎の後方運動という現象も十分に意識していくことが必要であると考えられる。今後、咀嚼筋の筋電図学的検討を含めて、体幹筋力発揮時の下顎の動態について、より詳細な検討が望まれる。

結 論

背筋力発揮時の顎頭点変位について、被験者 10 名を対象に 6 自由度顎運動測定器を用いて検討し、以下の結果を得た。

1. 背筋力発揮時における顎頭点変位は、右側顎頭では 10 名中 9 名が後下方へ変位した。左側では、10 名全員が後下方へ変位した。
2. 接触滑走自発後方運動時における顎頭変位は、右側顎頭では 10 名中 9 名が、左側顎頭では 10 名中 7 名が後上方へ変位した。
3. 筋力発揮時と自発後方運動時の比較において、背筋力発揮時では顎頭は有意に下方へ変位した。

本研究の結果の一部は、第 52 回日大歯学会および第 104 回日本補綴歯科学会にて発表した。

文 献

- 1) 石島 勉, 齊藤 実, 朝比奈義昭: 口腔領域のスポーツ外傷とマウスガードに関する調査, 愛院大歯誌, 27: 673-686, 1989.
- 2) 石島 勉, 山口俊樹, 月村雅史: マウスガードの使用とその外傷防止効果—北海道学生アメリカンフットボール選手における調査—, 東日本歯学雑誌, 10: 85-94, 1991.
- 3) 前田芳信: 各種競技におけるマウスガード装着義務, スポーツ歯学, 3: 63-66, 2000.
- 4) Verban EM Jr, Groppe JL, Pfautsch EW, Ramseyer GC: The effects of a mandibular orthopedic repositioning appliance on shoulder strength, J Craniomandib Pract, 2: 233-236, 1984.
- 5) Kaufman RS: A Experimental study on the effect of the MORA on football players, Basal Facts 6: 119-126, 1985.
- 6) Forgione AG, Metha NR, McQuade CF, Westcott WL: Strength and bite, Part II: Testing isometric strength using a MORA set to a functional criterion, J Craniomandib Pract, 10: 13-20, 1992.
- 7) 石島 勉, 平井敏博, 今村 円: 全身運動時のクレンチングの発現頻度に関する研究, 日補綴歯会誌, 35: 193-199, 1991.
- 8) 松島茂善: 改訂スポーツテスト指針, 136-137, 第一法規, 東京, 1969.
- 9) 荒井真喜, 北村 学, 林 幸男, 大山茂稔, 川良美佐雄, 小林喜平: 下顎運動測定装置 CONDYLOCOMP LR3 の測定精度, 日補綴歯会誌, 42: 431-437, 1998.
- 10) Williams MO, Chaconas SJ, Bader P: The effect of mandibular position on appendage muscle strength, J Prosthet Dent, 49: 560-567, 1983.
- 11) Yates JW, Koen TJ, Semenick DM: Effect of a mandibular orthopedic repositioning appliance on muscular strength, J Am Dent Assoc, 108: 331-333, 1984.
- 12) Schubert MM, Hall R, Guttu RL: Changes in shoulder and leg strength in athletes wearing mandibular orthopedic repositioning appliances, J Am Dent Assoc, 108: 334-337, 1984.
- 13) 宮原隆雄: ヒトのヒラメ筋の噛みしめによる変調, 口腔病会誌, 58: 670-686, 1991.
- 14) 上野俊明: 噛みしめと上肢等尺性運動の関連性に関する研究, 口腔病会誌, 62: 21-30, 1995.
- 15) 松浦義行: 体力測定法, 180-186, 浅倉書店, 東京, 1987.
- 16) 岡川 暁: 背筋力, スポーツ医学基本用語ゼミナール, 臨床スポーツ医学 vol. 5 臨時増刊号, 312-313, 文光堂, 東京, 1988.
- 17) 東京都立大学身体適正学研究室編: 日本人の体力標準値第 2 版, 121-124, 不味堂, 東京, 1975.
- 18) Messerman T: A means for studying mandibular movements, J Prosthet Dent, 17: 36-43, 1967.
- 19) Knap F, Richardson B, Bogstad J: Study of mandibular motion in six degrees of freedom, J Dent Res, 49: 289-292, 1970.
- 20) 保母須弥也, 望月貞成: 自動電子システムによるヒトの下顎運動の研究 第一報 システムの開発, 日補綴歯会誌, 26: 619-634, 1982.
- 21) 板東永一, 藤村哲也, 鈴木 温: デジタル方式による下顎運動測定, 日顎機能誌, 2: 137-143, 1984.
- 22) 藤村哲也, 板東永一: デジタル方式による下顎運動測定器の開発, 日補綴歯会誌, 35: 830-842, 1991.
- 23) 黒川昌彦, 林 豊彦, 宮川道夫: 1 次元 CCD カメラを用いた顎運動測定装置 (JKN-1) の測定精度, 電子情報通信会技研報 ME とバイオサイバネティクス, 92: 81-88, 1992.
- 24) Airoidi R, Gallo L, Palla S: Precision of the jaw tracking system JAWS-3D, J Orofacial Pain, 8: 155-164, 1994.
- 25) 栗山 寛, 真柳昭敏, 長谷川成男: セルスポット計測システムを応用した下顎運動システム, 日補綴歯会誌, 39: 321-332, 1995.
- 26) Kang D, Mongini F, Rossei F: A System for the study of jaw movements, Cranio, 11: 63-67, 1993.
- 27) Posselt U: Studies in the mobility of the human mandible, Acta Odont Scand, 10, Suppl. 10: 1-160, 1952.
- 28) 河野正司: 咬頭嵌合位から後方歯牙接触位への後方運動への解析, 日補綴歯会誌, 18: 202-209, 1974.
- 29) 古谷野潔: 後方運動時の下顎の三次元的動態, 日補綴歯

鈴木ら：背筋力発揮時における顎頭位について

- 会誌, 31: 805-818, 1987.
- 30) Mahan PE, Wilkinson TM, Gibbs CH: Superior and inferior Bellies of the Lateral Pterygoid Muscle EMG Activity at Basic Jaw Posterior, J Prosthet Dent, 50: 716-718, 1983.
- 31) 大石忠雄：下顎運動の立場からみた顎関節構造の研究, 日補綴歯会誌, 11: 197-220, 1967.
- 32) 川畑博昭：矢状面における各種顎頭位の研究特に顎頭安定位について, 日補綴歯会誌, 15: 403-429, 1971.

Mandibular condyle movement during mastication of foods

O. KOMIYAMA*, T. ASANO*, H. SUZUKI*, M. KAWARA*, M. WADA*,
K. KOBAYASHI[†] & S. OHTAKE* *Department of Comprehensive Clinical Dentistry, [†]Department of Complete Denture
Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo City, Chiba, Japan

SUMMARY This study evaluated the mandibular condyle displacement on the working side while masticating certain foods with different textures. For referencing the mandibular condyle movement, the range of voluntary border movement of the mandibular condyle was determined based on the analysis of the sagittal, left lateral and right lateral border motion using Posselt's figure. The test foods consisted of cheese, peanuts, and beef jerky. During mastication of cheese and peanuts, the amount of displacement of the mandibular condyle in all

directions was within the range of border movement. Significant posterior and superior shifts of the mandibular condyle were observed during mastication of beef jerky, compared with the findings obtained during border movement. Accordingly, it is suggested that prolonged mastication of hard fibrous foods, may stimulate the temporomandibular joint structure and mandibular dysfunction patients should limit their intake of such foods.

KEYWORDS: mandibular condyle movement, working side, food texture

Introduction

Mastication is a complex neurophysiological activity thought to be dependent on a central neural pattern generator that programs much of the activity. Peripheral feedback is important in the modification and coordination of masticating activity. Furthermore, it is obvious that mastication is one of most important mandibular movements in the stomatognathic system (Mohl *et al.*, 1988). During the human growth period, mastication of foods promotes the growth of the mandibular bone, and after growth, it stimulates the mandibular bone and activates bone metabolism (Enlow, 1990). It was reported that the stress of the mandibular bone and temporomandibular joint (TMJ) was affected by occlusal forces (Ralph & Caputo, 1975; Smith, McLachlan & McCall, 1986; Hart *et al.*, 1992), but these findings were not the result of a mastication study. It was also reported that the mastication movement of the mandible (Plesh, Bishop & McCall, 1986; Horio & Kawamura, 1989), and the electromyographic change in masticatory muscles (Steiner, Michiman & Litman, 1974; Plesh, Bishop & McCall, 1987) was

influenced by various food textures, however, little is known about the stress towards the TMJ in those cases.

Patients complaining of temporomandibular disorder (TMD) have often noted pain around the TMJ after masticating hard foods (Zarb & Thompson, 1970; Friction *et al.*, 1985; Dworkin *et al.*, 1990). As a result, they are usually given instructions to restrict mastication of hard foods in order to manage TMD in daily life (Edward & Schiffman, 1995). It is easy to suggest that these patients experience pain when masticating hard foods as a result of the mandibular condyle being deviated from the usual movement area, causing stimulation in the TMJ area. However, a review of the available scientific studies of TMD signs and symptoms has shown that sufficient studies are lacking.

Lundeen and Gibbs (1982) recorded mastication and voluntary border movement as defined by Posselt (1969), and were able to reproduce them three-dimensionally using a replicator. When masticating, the mandibular condyle was observed to move within the border movement area and never deviated from it. However, the study was conducted only with foods that were easy to masticate and not with hard foods which

require a strong effort from the masticatory muscles. There have been other studies on mandibular movement while masticating foods (Kuwahara, Miyauchi & Maruyama, 1990). However, no studies has measured the border movement and movement on the working side of the mandibular condyle while masticating foods with variable levels of hardness.

The present study evaluated the mandibular condyle displacement on the working side movement while masticating various foods and on the voluntary border movement simultaneously in healthy subjects. It will be possible to clarify the effect of different food textures on the mandibular condyle movement during mastication, and to discuss the proper stimulation of mastication in healthy subjects and the injurious stimulation of hard foods during mastication in patients with TMD.

Materials and methods

Subjects

Nineteen subjects, 15 males and four females, with complete natural dentition participated in the present study. Occasionally, one or more of the third molars were missing. The age of the subjects ranged from 23 to 32 years, with a mean age of 24.8 years. The occlusion was stable, and there were no interferences in the lateral or protrusive excursions of the mandible, according to definitions (Mohl *et al.*, 1988). No patient was conscious of abnormalities of the masticatory system. They reported no orofacial pain, no sound in the TMJ during movement, and no bruxism. The bilateral mandibular condyle was measured independently. A total of 38 joints, two from each subject, were studied. All subjects were presented with the same description of this study and gave informed consent.

The measurement device of the mandibular condyle

Mandibular condyle movement was recorded using a three-dimensional measuring device with six-degrees of mandibular movement freedom (Gnathohexagraph^{®*}). The movements of six reference diodes (LEDs), attached to the head in a head frame and attached to the lower front teeth using a face bow, were registered simultaneously using two CCD cameras (Gnathohexagraph^{®*}) and recorded with a sampling time of 90 Hz. During the

recording experiments, the subjects were comfortably seated in a straight-backed chair with the head unsupported, and positioned so that the Frankfort plane, head frame, and face bow were parallel to the floor. The points at which the mandibular condyle movement was measured were those on the surface of the skin above the lateral pole of the mandibular condyle, as determined by palpation (Siegler *et al.*, 1991; Naeije, van der Weijden & Megens, 1995). Before recording, standard planes such as the Frankfort plane were determined. All measurements were started from the maximum intercuspidation (ICP) and displacement of the mandibular condyle was measured in six directions: anterior–posterior, superior–inferior, and medial–lateral.

Measurement of the working side mandibular condyle displacement while masticating test foods

The subjects were presented with 1 g each of three different foods for masticating. These test foods consisted of cheese (soft food), peanuts (hard crushed food), and beef jerky (hard fibrous food). When ready, each subject randomly placed one type of food on their tongue, positioning the mandible at ICP. Simultaneous with the start of measurement, the subject started masticating each sample for 20 s. The five continuous masticating strokes from the third to seventh stroke, when food texture did not change much and the masticating stroke was stabilized, were studied. On the basis of findings from the five continuous strokes, the maximum displacements in the anterior–posterior, medial–lateral, and superior–inferior direction were obtained to calculate the mean, which was then used as the amount of displacement of the working side mandibular condyle of each joint during masticatory movement.

Determination of the range of the mandibular condyle displacement during mandibular border movement

The range of mandibular condyle displacement during mandibular border movement was determined by performing the movement which reproduced Posselt's figure (Posselt, 1969) of the mandibular incisal path. The following three voluntary border motions were analysed: (1) sagittal, (2) left lateral and (3) right lateral border motion. During sagittal border motion, the condyle was seen to slide from the ICP to the most anterior position (the most protrusive position), move

*Ono Sokki, Kanagawa, Japan.

past the anterior border tract to open the mouth maximally, and then move past the posterior border tract to close the mouth until the upper teeth maintained contact with lower teeth. During the left lateral border motion, the condyle slid from the ICP to the left side, moved to the most lateral position, moved past the point of inflection on the lateral border tract to open the mouth maximally, and then returned to the ICP point. Right lateral border motion was similar to the left lateral border motion. Each motion was made at a speed that each subject selected at their own discretion. Each subject practised the motions before the test, so that they could be readily performed. Recordings were repeated three times each for the three border movements. The mean value of the amount of displacement of the mandibular condyle at ICP was calculated for each movement in six directions of anterior–posterior, medial–lateral and superior–inferior. Then, the amount of displacement towards the six directions obtained during the three border movements was examined to select the maximum in each direction. The value was expressed as the range of border movement of the mandibular condyle of each joint.

Statistical analysis

The values were calculated as the mean \pm standard deviation (s.d.) for 19 subjects. Analysis of the values of the displacement of the mandibular condyle during the mandibular border movement and the working side mandibular condyle when masticating each sample food in six directions, anterior–posterior, medial–lateral, and superior–inferior were performed by one-way ANOVA (Tukey–Kramer's method).

Results

Figures 1–3 show typical examples of the range of border movement of the mandibular condyle and the amounts of displacement of the working mandibular condyle in each direction recorded 10 s after mastication of each test food was started at ICP.

Mandibular condyle displacement on the working side while masticating test foods

The average displacement of the working side condyle while masticating test foods is shown in Table 1. The mean values in the posterior and superior directions

were 0.62 ± 0.28 and 0.33 ± 0.22 mm during mastication of cheese, 0.78 ± 0.38 and 0.49 ± 0.26 mm during mastication of peanuts, and 1.22 ± 0.53 and 0.87 ± 0.35 mm during mastication of beef jerky, respectively. Significant posterior and superior shifts of the mandibular condyle were observed during mastication of beef jerky compared with the findings obtained during mastication of cheese and peanuts ($P < 0.01$, ANOVA), as shown in Figs 4 and 5.

Range of the mandibular condyle displacement during mandibular border movement

The mean values of maximum displacement of the mandibular condyle during mandibular border movement were 16.14 ± 3.21 mm in the anterior direction, 0.93 ± 0.24 mm in the posterior direction, 1.57 ± 0.61 mm in the medial direction, 1.12 ± 0.59 mm in the lateral direction, 0.69 ± 0.23 mm in the superior direction, and 10.67 ± 1.80 mm in the inferior direction (Table 1).

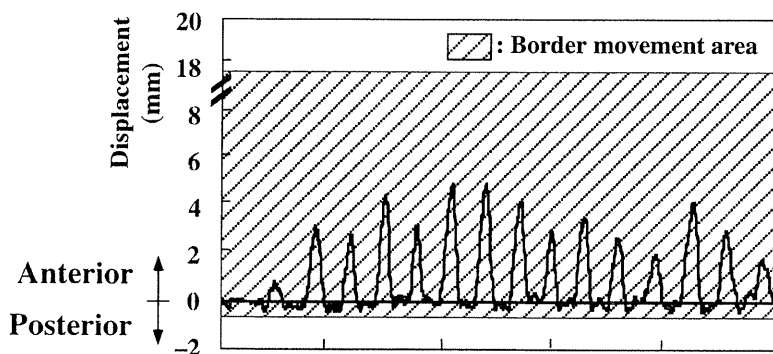
Comparison of the amounts of mandibular condyle displacement during mastication of different test foods and border movement

During mastication of cheese and peanuts, the amount of displacement of the mandibular condyle in all directions was within the range of border movement. During mastication of beef jerky, posterior and superior shifts were observed. Significant posterior and superior shifts of the mandibular condyle were observed during mastication of beef jerky, compared with the data obtained during border movement ($P < 0.01$, ANOVA), as shown in Figs 4 and 5.

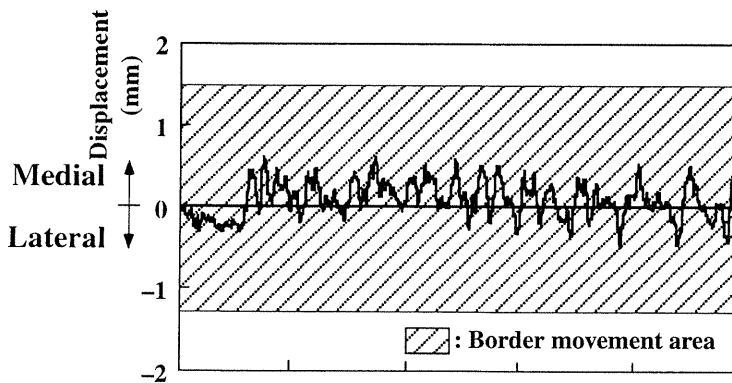
Discussion

A variety of sample foods have been used for analyzing masticatory movement (Lucas *et al.*, 1986, Olthoff *et al.*, 1986, Peyron *et al.*, 1997). It is necessary to collect foods with as many different textures as possible. However, if the number of sample foods is too great, the experiment requires too much time, causing the subjects to fatigue during recording, and it is likely that typical masticatory movement would not be reproduced. So, we selected three types of sample foods with obviously different properties. The working side condyle displacement in the anterior, medial, lateral, and inferior direction,

Anterior–posterior direction



Medical–lateral direction



Superior–inferior direction

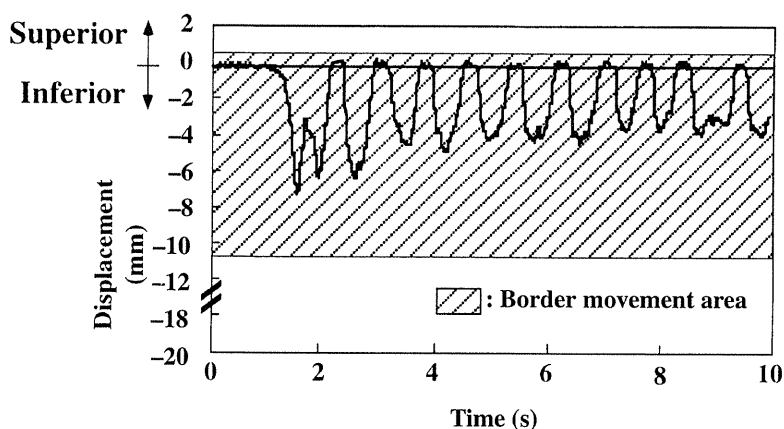


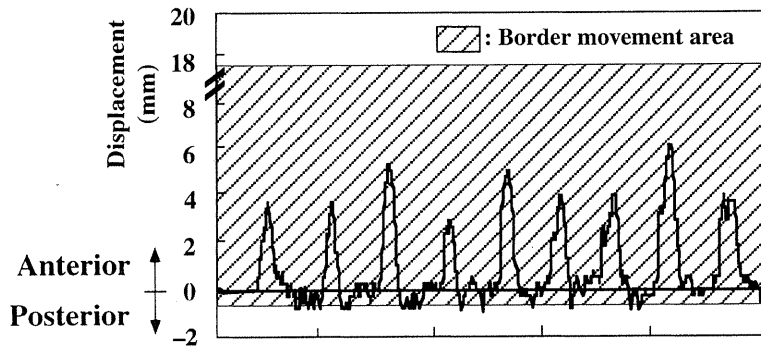
Fig. 1. Typical movements of the working side mandibular condyle in each direction recorded 10 s after mastication of cheese. During mastication of cheese, the amount of displacement of the mandibular condyle in all directions was within the range of border movement.

when masticating cheese, peanuts, or beef jerky showed no significant difference between the direction and food type. In contrast, in the posterior and superior directions, the working side condyle was displaced a significantly greater amount when masticating beef jerky compared with cheese or peanuts. While in the lateral direction, no significant difference was observed, however, the working side condyle displacement

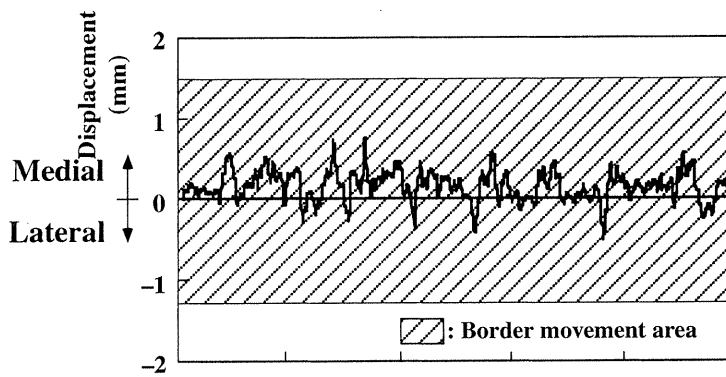
tended to increase in the order of cheese, peanuts, and beef jerky.

The superior part of Posselt's figure in dentulous subjects was determined by tooth contact, whereas the inferior part was limited by the TMJ, along with the masticatory muscles and ligaments. Zwijnenburg *et al.* (1996) set the measuring point of the mandibular condyle on the surface of the skin. They reported that

Anterior–posterior direction



Medial–lateral direction



Superior–inferior direction

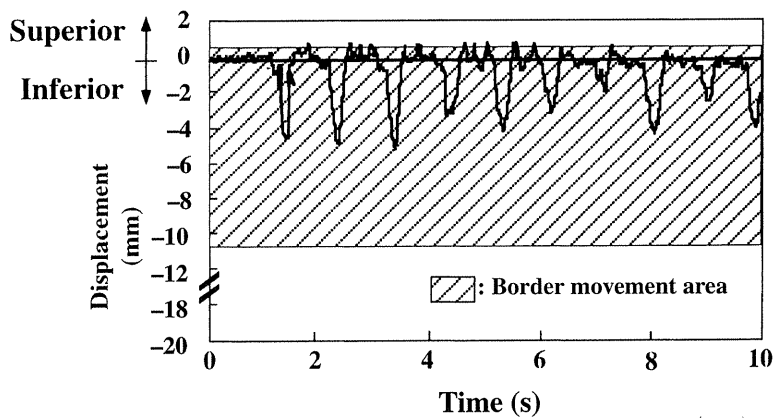
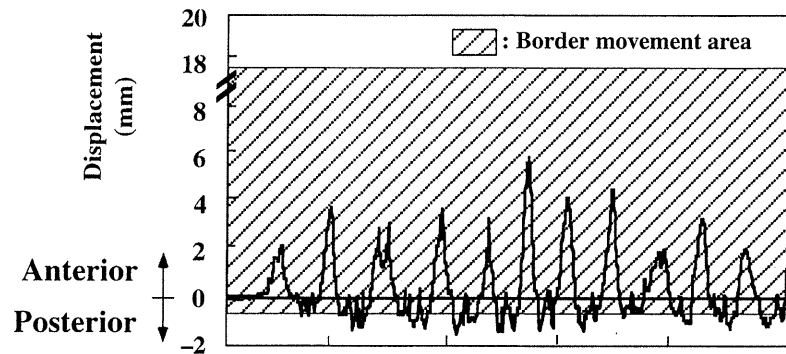


Fig. 2. Typical movements of the working side mandibular condyle in each direction recorded 10 s after mastication of peanuts. During mastication of peanuts, the amount of displacement of the mandibular condyle in all directions was almost within the range of border movement.

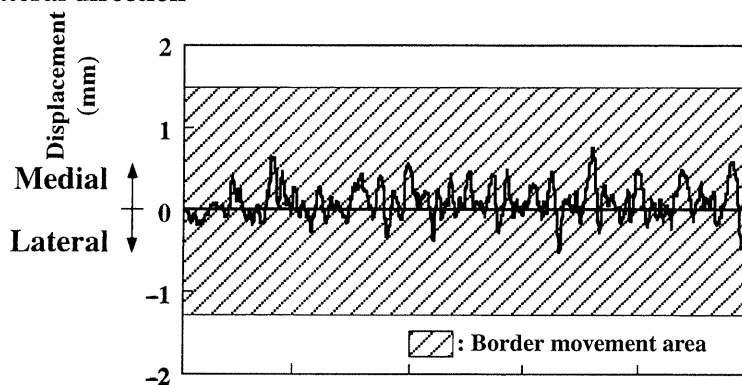
the displacement in the anterior–posterior direction was 18.20 ± 3.70 mm for the right condyle and 16.20 ± 3.60 mm for the left condyle. The displacement totals in the anterior and posterior directions obtained in the present study was very close to those findings. Lundeen, Shryock and Gibbs (1978) revealed that the mean amount of lateral displacement because of Bennett movement was 0.75 mm and that 80% of the

subjects demonstrated a displacement of 1.50 mm or less. Lundeen and Wirth (1973) noted that the medial displacement shifted within a range of 0–3 mm. In the present study, the lateral displacement of the mandibular condyle was 1.12 mm, while the medial displacement was 1.57 mm, both within the range presented in those other studies. As for the displacement in the superior–inferior direction, Zwijnenburg *et al.* (1996)

Anterior–posterior direction



Medial–lateral direction



Superior–inferior direction

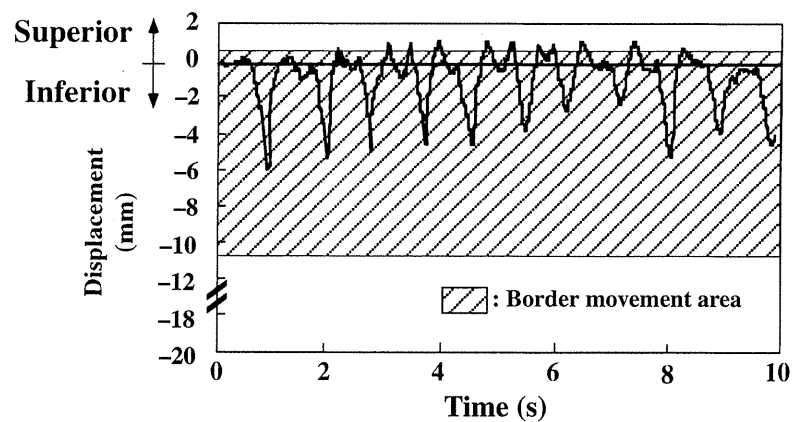


Fig. 3. Typical movements of the working side mandibular condyle in each direction recorded 10 s after mastication of beef jerky. The deviation of the working side condyle during mastication of beef jerky from the range of mandibular border movement in the posterior and superior directions were observed.

reported that it was >10 mm. As a result, it is suggested that the 11.36 mm displacement reported in the present study is reasonable.

On the frontal plane, the masticatory cycle of the path is classified into three phases and tends to follow a process. The cycle begins with ICP and goes straight in the inferior direction (first phase). At the most inferior point, it turns around and then translates laterally

either to the right or left in the superior direction (second phase). It then turns around towards the medio-superior direction and comes back to ICP (third phase). Between the second and third phases, foods are grasped by the interocclusal space between the maxillary and mandibular teeth (Murphy, 1965). During the third phase, food is crushed and sheared. According to Gibbs *et al.* (1981), even when masticating cheese, the

Direction	Mandibular condyle displacement (mm)			
	Border movement	Mastication		
		Cheese	Peanuts	Beef jerky
Anterior	16.14 ± 3.21	5.16 ± 1.51	4.65 ± 2.01	5.29 ± 2.12
Posterior	0.93 ± 0.24	0.62 ± 0.28	0.78 ± 0.38	1.22 ± 0.53
Medial	1.57 ± 0.61	0.60 ± 0.38	0.59 ± 0.35	0.70 ± 0.41
Lateral	1.12 ± 0.59	0.63 ± 0.45	0.80 ± 0.54	0.96 ± 0.47
Superior	0.69 ± 0.23	0.33 ± 0.22	0.49 ± 0.26	0.87 ± 0.35
Inferior	10.67 ± 1.80	5.60 ± 1.57	5.17 ± 1.39	5.92 ± 1.31

Values are mean ± s.d., *n* = 38.

Table 1. Mandibular condyle displacement during mandibular border movement and working side movement while masticating test foods

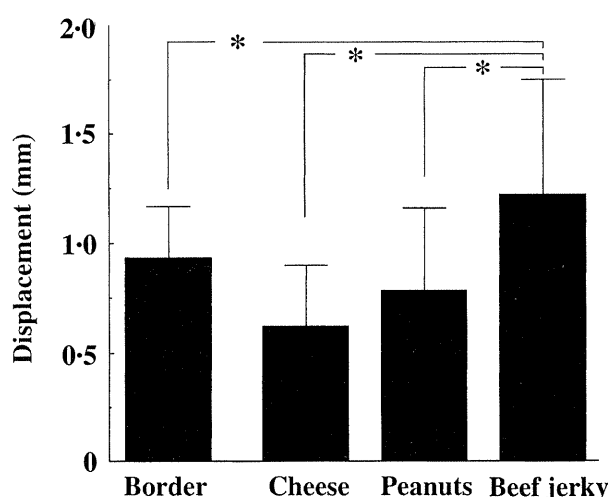


Fig. 4. Comparison of the amounts of displacement during border movement and mastication of different test foods in the posterior direction. Significant posterior shifts of the mandibular condyle were observed during mastication of beef jerky, compared with the findings obtained during mastication of cheese and peanuts and during mandibular border movement ($P < 0.01$, ANOVA Tukey–Kramer’s method).

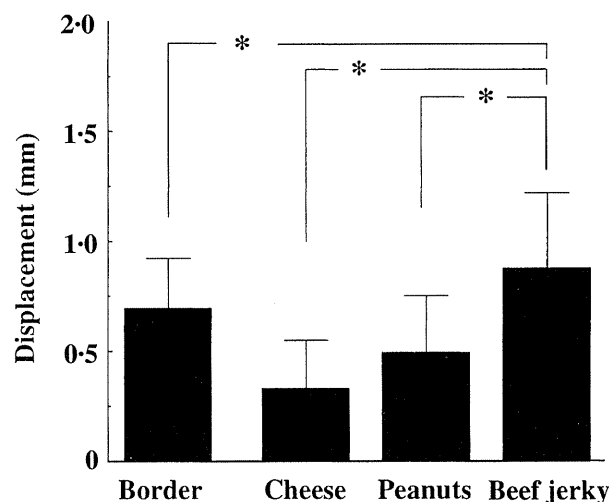


Fig. 5. Comparison of the amounts of displacement during border movement and mastication of different test foods in the superior direction. Significant superior shifts of the mandibular condyle were observed during mastication of beef jerky, compared with the findings obtained during mastication of cheese and peanuts and during mandibular border movement ($P < 0.01$, ANOVA Tukey–Kramer’s method).

mandibular condyle demonstrates a concentric movement from the posterior–inferior direction to the ICP at the end of the masticatory cycle. The mandibular condyle displays a slight displacement in the posterior–inferior direction at the time of mastication. Many studies have reported that the activity of the masticatory muscle increases in proportion to food hardness and texture (Steiner *et al.*, 1974; Plesh *et al.*, 1987). When masticating such hard crushed foods like peanuts, a stronger level of muscle activity is required in comparison with masticating cheese. Apparently, movement which deviates from the normal mandibular condyle border movement range might not occur as it is easy to crush such foods. However, when masticating

hard fibrous foods like beef jerky, the activity levels of the temporal muscle, masseter muscle, and medial pterygoid muscle increase during the third phase of the masticatory cycle. Accordingly, mandibular displacement increases as the foods cannot be easily crushed or sheared by the molar teeth. It is suggested that the mandibular condyle might displace largely in the posterior–superior direction as the mandible rotates and moves laterally, and at the same time proceeds in a posterior–superior direction.

The TMJ is the joint between the mandibular fossa on the temporal bone and the mandibular condyle. The space between is mediated by the articular disk. The posterior portion of the mandibular condyle is filled

with retro-discal tissue which has a laminated zone that includes elastic fibre and connective tissue, and is richly vascularized and inverted (Mahan & Alling, 1991). According to the findings of the present study, the working side condyle was displaced 1.22 ± 0.53 mm in the posterior direction and 0.87 ± 0.35 mm in the superior direction when masticating beef jerky. Moreover, the range of border movement in the posterior and inferior direction was 0.93 ± 0.24 and 0.69 ± 0.23 mm, respectively. Accordingly, the deviation of the working side condyle during mastication of beef jerky from the range of border movement in a posterior and superior direction was about 0.3 and 0.2 mm, respectively. Accordingly, in view of the movement observed when masticating beef jerky, the articular disk might be compressed by the mandibular condyle during each masticating stroke. It is suggested that a repeated compression over a long period of time might result in deformation and dislocation of the articular disk. Moreover, the TMJ retro-discal tissue has a structure which is totally irresistible to loading. It might be suggested that pain will be induced when the mandibular condyle compresses the connective tissue of the posterior portion of the TMJ.

The present findings were examined in comparison with the amounts of displacement during mastication of different test foods. Significant posterior and superior shifts of the mandibular condyle were observed during mastication of beef jerky, compared with the findings obtained during mastication of cheese and peanuts and border movement. It was also observed that lateral displacement tended to increase, although it was not significant. It may be suggested that in TMD patients prolonged mastication of hard fibrous foods, such as beef jerky, should be limited. However, this study could not explain whether this deviation is a proper stimulation or injurious stimulation. Further studies are needed to clarify mandibular condyle displacement during mastication.

References

- DWORKIN, S.F., HUGGINS, K.H., LERESCHE, L., *et al.* (1990) Epidemiology of signs and symptom in temporomandibular disorders: clinical signs in cases and controls. *Journal of American Dental Association*, **120**, 273.
- EDWARD, F.W. & SCHIFFMAN, E.L. (1995) Treatment alternatives for patients with masticatory myofascial pain. *Journal of American Dental Association*, **126**, 1030.
- ENLOW, D.H. (1990) *Facial Growth*, 3rd edn, p. 281. W.B. Saunders, Philadelphia.
- FRICITION, J.R., KROENING, R., HALEY, D. & SIEGERT, R. (1985) Myofascial pain syndrome of the head and neck: a review of clinical characteristics of 164 patients. *Oral Surgery Oral Medicine and Oral Pathology*, **60**, 615.
- GIBBS, C.H., LUNDEEN, H.C., MAHAN, P.E. & FUJIMOTO, J. (1981) Chewing movements in relation to border movements at the first molar. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **46**, 308.
- HART, R.T., HENNEBEL, V.V., THONGPREDA, N., VAN BUSKIRK, W.C. & ANDERSON, R.C. (1992) Modeling the biomechanics of the mandible: a three-dimensional finite element study. *Journal of Biomechanics*, **25**, 261.
- HORIO, T. & KAWAMURA, Y. (1989) Effects of texture of food on chewing patterns in human subject. *Journal of Oral Rehabilitation*, **16**, 177.
- KUWAHARA, T., MIYAUCHI, S. & MARUYAMA, T. (1990) Characteristics of condyler movement during mastication in stomatognathic dysfunction. *International Journal of Prosthodontics*, **3**, 555.
- LUCAS, P.W., OW, R.K.K., RITCHIE, G.M., CHEW, C.L. & KENG, S.B. (1986) Relationship between jaw movement and food Break-down in human mastication. *Journal of Dental Research*, **65**, 400.
- LUNDEEN, H.C. & GIBBS, C.H. (1982) *Advances in Occlusion*, p. 2. Wright PSG Inc., Boston.
- LUNDEEN, H.C., SHRYOCK, E.F. & GIBBS, C.H. (1978) An evaluation of mandibular border movements: their character and significance. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **40**, 442.
- LUNDEEN, H.C. & WIRTH, C.G. (1973) Condylar movement patterns engraved in plastic blocks. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **30**, 866.
- MAHAN, P.E. & ALLING, C.C. (1991) *Facial Pain*, 3rd edn, p. 198. Lea & Febiger, Philadelphia.
- MOHL, M.D., ZARB, G.A., CARLSSON, G.E. & RUGH, J.D. (1988) *A Textbook of Occlusion*, p. 150. Quintessence Inc, Chicago.
- MURPHY, T.R. (1965) The timing mechanism of the human masticatory stroke. *Archives of Oral Biology*, **10**, 981.
- NAEJIE, M., VANDER WEIJDEN, J.J. & MEGENS, C.C.E.J. (1995) OKAS-3D: an opto-electronic jaw movement analysis system with six degrees of freedom. *Medical Biological Engineering and Computing*, **33**, 683.
- OLTHOFF, L.W., VAN DER BILT, A., DE BOER, A. & BOAMAN, F. (1986) Comparison of force-deformation characteristics of artificial and several natural foods for chewing experiments. *Journal of Texture Studies*, **17**, 275.
- PEYRON, M.A., MASKAWI, K., WODA, A., TANGUAY, R. & LUND, J.P. (1997) Effects of food texture and sample thickness on mandibular movement and hardness assessment during biting in man. *Journal of Dental Research*, **76**, 789.
- PLESH, O., BISHOP, B. & MCCALL, W. (1986) Effect of gum hardness on chewing pattern. *Experimental Neurology*, **92**, 502.
- PLESH, O., BISHOP, B. & MCCALL, W. (1987) Mandibular movements and jaw muscles' activity while voluntary chewing at different rates. *Experimental Neurology*, **98**, 285.
- POSSELT, U. (1969) *Physiology of Occlusion and Rehabilitation*, p. 39. Blackwell, Oxford.
- RALPH, J.P. & CAPUTO, A.A. (1975) Analysis of stress patterns in the human mandible. *Journal of Dental Research*, **54**, 814.

- SIEGLER, S., HAYES, R., NICOLELLA, D. & FIELDING, A. (1991) A technique to investigate the three-dimensional kinesiology of the human temporomandibular joint. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **65**, 833.
- SMITH, D.M., McLACHLAN, K.R. & McCall, W.D. (1986) A numerical model of temporomandibular joint loading. *Journal of Dental Research*, **65**, 1046.
- STEINER, J.E., MICHIMAN, J. & LITMAN, A. (1974) Time sequence of the activity of the temporal and masseter muscles in healthy young human adults during habitual chewing of different test foods. *Archives of Oral Biology*, **19**, 29.
- ZARB, G.A. & THOMPSON, G.W. (1970) Assessment of clinical treatment of patients with temporomandibular joint dysfunction. *Journal of Prosthetic Dentistry*, **24**, 542.
- ZWIJNENBURG, A., MEGENS, C.C.E.J. & NAEJJE, M. (1996) Influence of choice of reference point on the condylar movement paths during mandibular movements. *Journal of Oral Rehabilitation*, **23**, 832.

Correspondence: Dr Osamu Komiyama, Department of Comprehensive Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan.
E-mail: komiyama@mascat.nihon-u.ac.jp

開咬による咀嚼障害を訴えた高齢者慢性関節リウマチの一例

齊藤孝親 梅田宜承 村上洋*
橋爪英城** 内田貴之 多田充裕
大関一弥 大高裕子 吉川隆雄
笹原廣重

A Case of Severe Open Bite in an Elderly Patient with Rheumatoid Arthritis

TAKACHIKA SAITO, YOSHITSUGU UMEDA, HIROSHI MURAKAMI *,
HIDEKI HASHIZUME **, TAKASHI UCHIDA, MITSUHIRO OHTA,
KAZUYA OHZEKI, YUKO OHTAKA, TAKAO YOSHIKAWA
AND HIROSHIGE SASAHARA

Abstract: We experienced a case of severe open bite manifested as a loss of occlusion in areas other than the right second molar in an elderly patient with chronic rheumatoid arthritis. The patient was a 73-year-old male whose chief complaint was masticatory disturbance due to open bite, and who had no awareness of symptoms of the temporomandibular joint such as pain, noise, or trismus. There was no large curvature of deviation in the rhythmic maximum opening movement pathway at the incisal point, and all pathways resembled one another. Variation in the movement velocity appeared smooth, other than a notch at the end of the open period.

In order to improve mastication as quickly as possible, we prepared a resin block for the upper jaw to regain occlusion, and attempted to improve masticatory disturbance. The patient was satisfied with the outcome, having regained the ability to masticate.

One week after the placement of the resin block, the muscular activity levels of the masseter muscle and the temporal muscle increased on both sides, and the muscular activity level on the left side, which previously displayed marked open bite, doubled compared with the muscular activity level prior to the placement of the resin block.

Key words: open bite (開咬), elderly patient (高齢者), rheumatoid arthritis (慢性関節リウマチ), mandibular movement (顎運動), movement velocity (運動速度)

[Received Apr. 26, 2002]

緒言

慢性関節リウマチ(以下, RA)は多発性関節炎を主徴候とする原因不明の慢性全身性炎症性疾患で, 関節滑膜の病変を主座とするが, 進行すれば軟骨, 骨などを侵して関節組織の破壊, 変形をきたす疾患¹⁾である。近位指節間関節など手に最も好発する他, 肘, 膝, 足関節などの中小関節がよく侵されるが, 顎関節での初発は少なく²⁻⁴⁾, 発症は他

関節に遅れ, 症状も軽微または緩和な傾向をとる²⁾とされる。しかし, 顎関節が障害された場合の本症特有の継発症として前歯部開咬がみられる場合があり⁵⁾, 咀嚼障害などにより患者のQOLに大きな影響を与えることが知られている。

今回, 右側上下顎第二大臼歯による咬合接触のみとなった高度な開咬を呈し, 咀嚼障害を訴えた高齢の慢性関節リウマチ患者を経験したので, 顎運動および咀嚼筋活動所

日本大学松戸歯学部口腔診断学教室

* 日本大学松戸歯学部総合歯科診療学教室

** 日本大学松戸歯学部歯内療法学教室

Department of Oral Diagnostics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo. 2-870-1 Sakae-cho Nishi, Matsudo 271-8587, Japan.

* Department of Comprehensive Clinical Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

** Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo.

見も含め、その概要を報告する。

症 例

患者：73 歳，男性。

初診：平成 12 年 3 月 27 日。

主訴：上下の歯が咬み合わず，うまく食べられない。(開咬および咀嚼障害)

現病歴：約 1 年前より前歯部が上下に空き始め，痛みや関節音，運動障害はみられなかったが，次第に上下の歯を咬み合わせることができなくなってきた。寝たきりなどのため歯科受診できずにいたところ，右奥歯以外は全く咬み合わなくなり，とても食事しにくい状態となってしまった。そこで，在住市のねたきり老人訪問歯科診療を依頼し，歯科医師会の訪問診査にて当院紹介され来院。

既往歴：1995 年より RA 発症し，四肢各部の疼痛と運動障害および腰痛を認めるようになる。某病院にて理学療法および薬物療法中であるが，ほぼ寝たきりで，Steinbrocker et al⁶⁾による RA 病期分類は Stage III，機能障害度の分類は Class III である。また，閉鎖性動脈硬化症(膝窩動脈)，骨粗鬆症および脳梗塞(1997 年，1998 年，1999 年)についても加療中である。

全身所見：体格はやや痩せ型で，四肢各部の運動障害が認められた。介助者が支持しての一時的な立位なども可能であったが，同一姿勢の維持は疼痛のため短時間しかできなかった。

血液検査データ：CRP 7.0mg/dl，RF 148IU/ml，抗核抗

体 320 倍，血清補体価 29.5 ～ 29.7U/ml。

口腔外所見：顔貌は左右対称であるがオトガイ部が後退し，オトガイ唇溝の消失が認められた。顎関節部の発赤，腫脹，圧痛は認められず，運動痛，関節音も認められなかった。最大開口量は上下顎中切歯切縁間で 45mm であった。

口腔内所見：

7	5	3	2	1		1	2	3	4	5		
8	7	5	4	3	2	1		1	2	3	4	7

残存しているが，閉口時は右側上下顎第二大臼歯の遠心が咬合接触するのみで，上下顎中切歯切縁間で over bite -7 mm，over jet 4 mm を呈する開咬を認めた。口腔清掃はやや不良で，辺縁歯肉の軽度発赤腫脹がみられたが，歯周ポケットは 5] を除き 4 mm 以下で，残存歯の動揺は認めなかった。上下顎前歯部では中等度の咬耗が認められた(図 1)。

診断模型所見：診断模型上では上下顎の咬合接触がみられた(図 1)。

X 線所見：パノラマ X 線写真およびパノラマ 4 分割顎関節 X 線写真にて，下顎頭，関節窩ならびに関節結節の破壊，吸収像が認められた(図 2)。

顎運動所見(シロナソグラフ)：リズミカルな最大開閉口運動においては，切歯点での運動径路はわずかに左方に弯曲するが大きな弯曲や偏位はなく，毎回の経路もほぼ類似していた。運動速度の変化は，開口相末期に notch⁷⁾ がみられる以外は，スムーズであった(図 3)。

筋電図所見：5 秒間の最大咬みしめ時の平均筋活動量は，咬筋，側頭筋とも咬合接触の無い左側が低く，imbalance

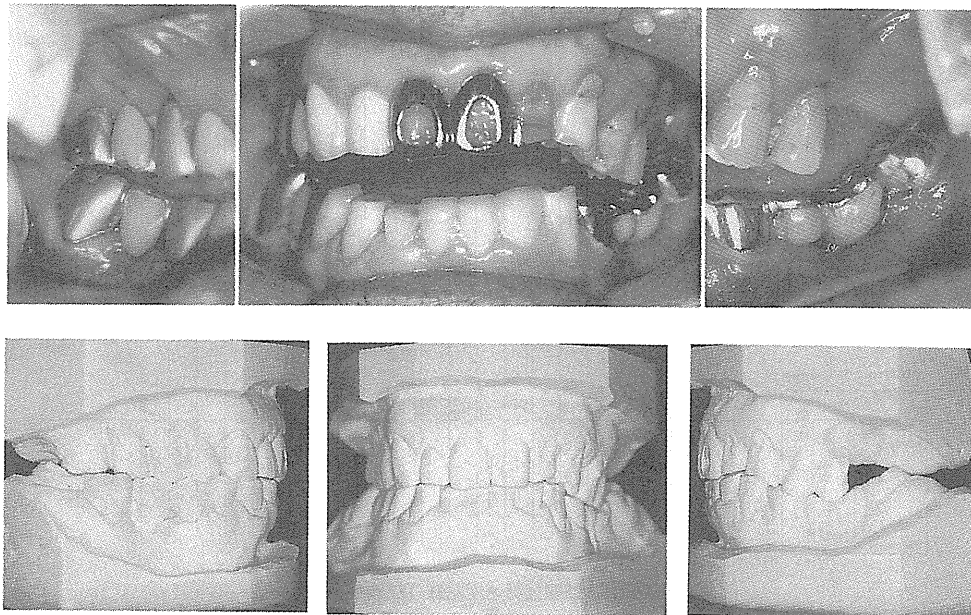


図 1 口腔内所見および診断模型所見

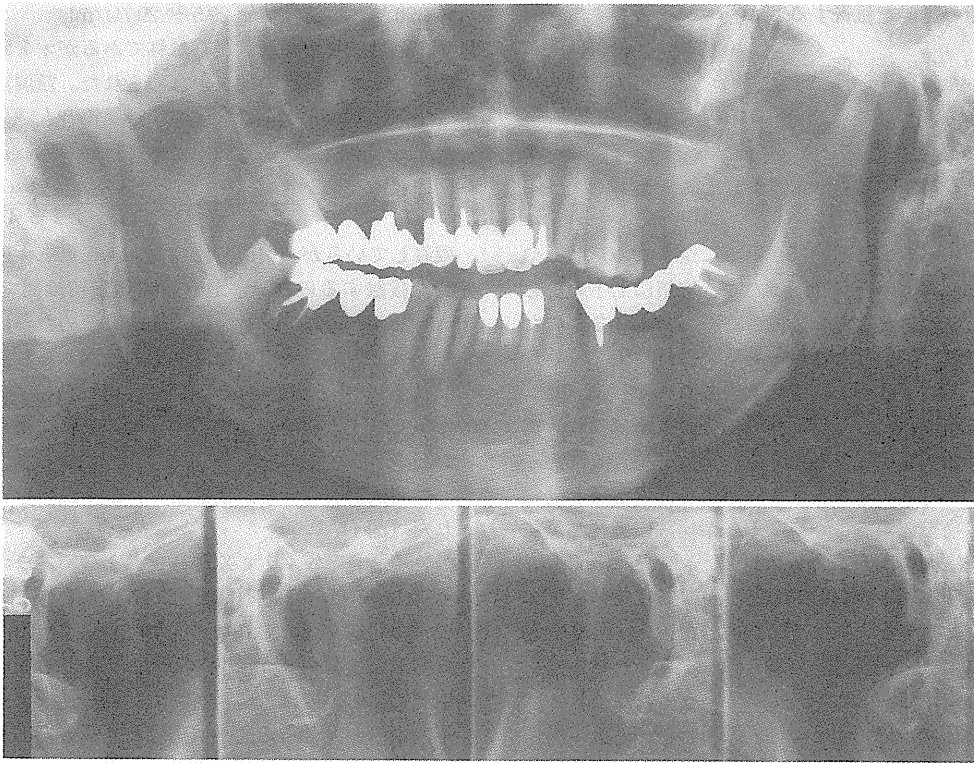


図 2 パノラマ X 線写真およびパノラマ顎関節 4 分割 X 線写真

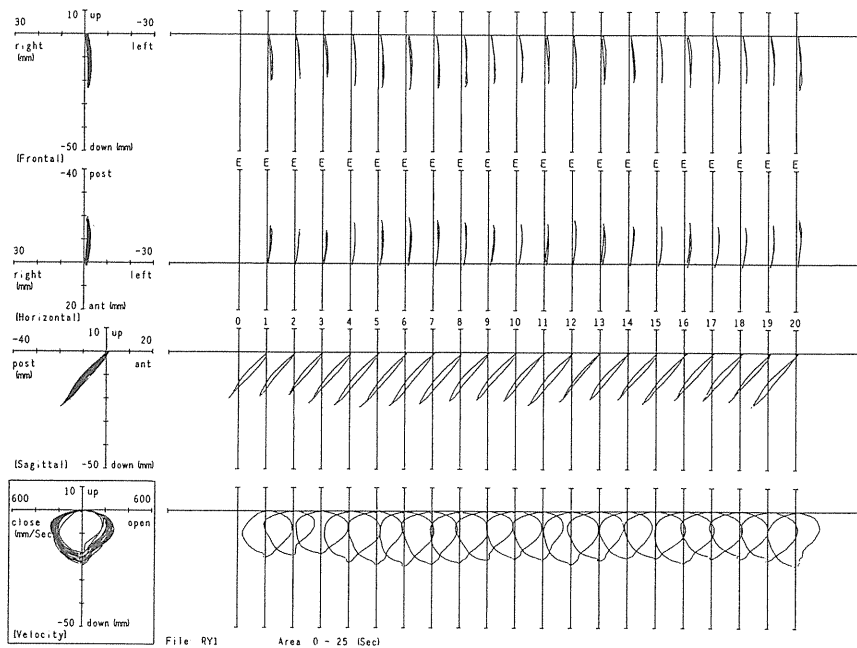


図 3 顎運動および顎運動速度記録 (Sirognathograph)

($\mu V \cdot sec$)

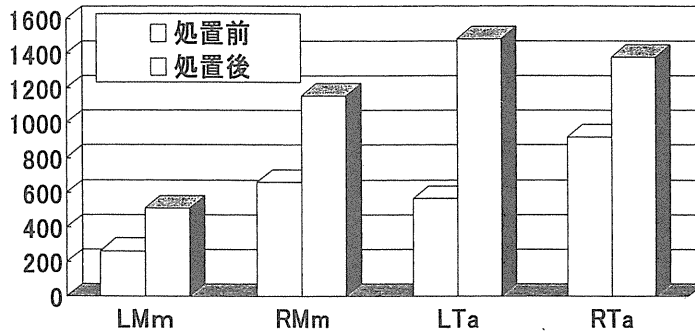


図 4 最大噛みしめ時の筋活動量 (補綴処置前後の比較)

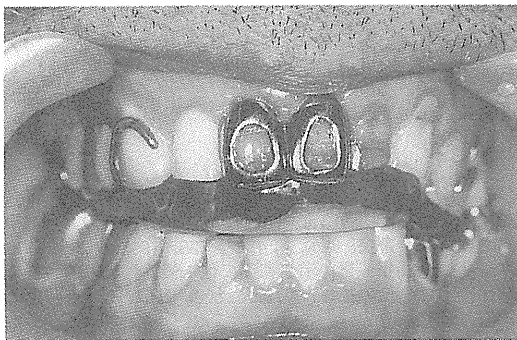


図 5 咀嚼用上顎レジンプロック

考 察

RA は多発性関節炎を主徴候とする原因不明の慢性全身性炎症性疾患で、関節滑膜の病変を主座とするが、進行すれば軟骨、骨などを侵して関節組織の破壊、変形をきたす疾患¹⁾である。本症例は、68 歳の高齢で RA を発症し、発症後約 4 年で開咬に気づき、その約 1 年後に咀嚼障害をきたす高度な開咬に至ったものである。RA の有病率は 0.3 ~ 1.5%、好発年齢は 30 ~ 50 歳代、男女比は 1 : 3 で女性に多いが、高齢者では本症例のように男性が増加する傾向があるとされている¹⁾。

RA が顎関節に初発することは少ないとされる^{2,4)}が、RA 患者の約 60%には雑音、疼痛、開口障害、腫脹、圧痛、こわばりなど何らかの顎関節症状が認められ^{2,4,8)}、大半は RA 発症後 5 年未満に自覚していた²⁾との報告がなされている。本症例では RA 発症後約 3 年で開咬は認識されたが、開咬以外の顎関節症状については発症後 5 年経過した現在まで特に病識はない。

RA 患者の顎関節症状のうち雑音は、RA 患者の半数以上で認められる^{2,4,8)}とされるが、疼痛については、慢性期には疼痛を現症として訴えるものは少なかった²⁾。運動時痛のみで安静時にみられた症例はなかった⁵⁾など、明確な発現を示さない場合が報告されている。また、開口域の減少がみられたとする報告^{8,9)}に対し、開口域に有意差はなかったとする報告^{2,10,11)}があり、開口制限についても明確な傾向は得られていない。むしろ、このように各症状がそれほど明確に発現しないことが他の関節と異なる顎関節の特徴であるとされており^{2,3)}、本症例において顎関節症状が認識されなかったことも同様のことが考えられる。なお、この点については、他の関節での治療先行の影響もあると考えられる。

下顎頭の粗造化、平坦化など RA による顎関節異常の頻

を認めた (図 4)。

臨床診断：慢性関節リウマチによる下顎頭変形に起因する開咬症。

治療経過：可及的速やかな咀嚼の改善を目標に、上顎左側大臼歯の欠損補綴を含む上顎レジンプロック (以下、レジンプロック) (図 5) を作成して咬合接触の回復を図り、咀嚼障害の改善を試みた。また、併せてウ蝕処置ならびに口腔清掃指導を行った。レジンプロック装着によって「咬み合わせができて、普通に食事できるようになった」と、患者の満足を得ることができた。

レジンプロック装着 1 週間後の筋活動 (図 4) は、装着前に比べ、咬筋、側頭筋いずれも左右前ともに筋活動量の増加がみられ、特に左側の筋活動量はレジンプロック装着による咬合接触の回復によって装着前の約 2 倍に増加した。しかし、側頭筋前腹では左右側の協調性がみられるようになったが、咬筋においては左右側の imbalance の大きな変化は認められず、左側の筋活動量は右側の約 40%であった。

1 年半後の電話による確認では、問題なく食事しているとのことであった。

度は高く, Ogus¹²⁾は68%, 水谷ら²⁾は約80%, 田中ら⁵⁾は54例中43例に異常を認めたとし, 土川ら³⁾は被験者15例全例に異常を認めたとしている。RAの進行により下顎頭が吸収して下顎の後方支持が失われると, 筋の作用により下顎骨は最後臼歯を支点として後上方に回転移植し前歯部の開咬をきたすようになる。高度な開咬をきたした本症例においても顎関節の変化は大きく, 下顎頭, 関節窩ならびに関節結節の破壊, 吸収像が認められた。RAの継発症としての開咬については, 土川ら³⁾は15例中1例, 水谷ら²⁾は109例中数例, 田中ら⁵⁾は54例中10例に開咬を認めたと報告している。開咬の出現については, 下顎頭骨吸収の程度と前歯部開咬の出現率は直接的には結びつかず, その原因として大白歯部の咬合支持の問題が指摘されている⁵⁾。すなわち, 大白歯部での咬合支持がある場合は下顎頭骨吸収が軽度でも開咬を呈し易いが, 大白歯部の咬合支持がない場合は下顎頭の骨吸収が進んでも開咬を呈しにくく, 開咬の発現には大白歯部での咬合支持の有無が大きな影響を及ぼすとされている。

本症例では左側上顎大白歯欠損のため左側大白歯部の咬合支持はないが, 右側では上下顎第二大臼歯遠心による咬合支持が存在している。そのため下顎頭の吸収に加え, 右側第二大臼歯の咬合支持が支点となり高度な開咬が生じたものと考えられる。

下顎運動については, 下顎頭の破壊吸収が生じると下顎運動の運動中心が変化し複雑な運動様相を呈する¹³⁾と考えられたが, 切歯点最大開閉口運動経路に大きな弯曲や偏位はなく, 開口相末期以外は運動速度の変化もスムーズであった。遠藤ら¹⁴⁾も顎関節部形態の吸収性変形像を認めるが下顎限界運動経路がスムーズな例を報告しており, また, 大人の顎関節RAでは他の関節のような骨性強直がほとんどみられない^{2, 15)}との報告がある。顎関節でみられるこれら運動性維持の特徴には, 開口度確保のために回転運動で代償される³⁾ことや, 会話や咀嚼という必要運動が常に行われている¹⁶⁾ことの影響が考えられる。

一般にRAの治療は, 薬物療法などで炎症の鎮静化を図るとともに, QOLを維持向上させることが重要で, 筋萎縮や関節拘縮を防止し関節可動域を保持するため積極的にリハビリを行うことが肝要であるとされている¹⁾。顎関節RAにおいても, 前歯開咬を認めない症例を対象にした検討で開口距離の増加や疼痛の消失など顎関節症状の改善に顎運動療法が効果的であると報告されている¹⁷⁾。RAに起因する開咬に対しても, 顎間牽引療法, スプリント療法, 咬合調整, 補綴的対応などの保存療法が行われることが多い¹⁸⁾。本症例では, 患者が高齢であること, 開咬による咀嚼障害以外の歯科的訴えがないこと, ほぼ寝たきりで, かつ疼痛のため同一姿勢の維持が長時間しかできないことなどを考慮して, 歯の欠損ならびに開咬の空隙を補填するレ

ジブロックにて咬合接触を回復し, 可及的速やかに咀嚼の改善を図った。その結果, 咬合接触のなかった左側の咀嚼筋筋活動量は装着前の約2倍に増加し, 咬めるようになったと患者の満足を得ることができた。

下顎頭の破壊吸収が進み, 付着筋の作用により下顎骨が最後臼歯を支点としてさらに後上方に回転移動してしまうと, 晩期には上気道の閉塞による呼吸困難を来す⁵⁾ことが報告されている。したがって, 本症例においても, 今後は, 顎関節RAの晩期継発症である閉塞性睡眠時無呼吸症候群に対する注意も必要と考えられた。

結 語

右側上下顎第二大臼歯による咬合接触のみとなった高度な開咬を呈し, 咀嚼障害を訴えた高齢の慢性関節リウマチ患者を経験したので, 顎運動および咀嚼筋筋活動所見も含め, その概要を報告した。

本研究の一部は文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業によった。

参考文献

- 1) 柏崎禎夫, 狩野庄吾 (編): 免疫・アレルギー・リウマチ病学, 第2版, 医学書院, 東京, pp.121-135, 1995.
- 2) 水谷英樹, 篠塚 襄, 米良和彦, 他: 慢性関節リウマチと顎関節—その病変の推移とX線所見—, 日口外誌, 31: 2421-2431, 1985.
- 3) 土川幸三, 飯浜 剛, 渋谷善行, 他: 慢性リウマチ15例における顎関節の臨床的検討, 日顎誌, 1: 51-65, 1989.
- 4) 土川幸三, 加藤譲治, 土持 真, 他: 顎関節リウマチの診断基準作成のための検討, 日口外誌, 37: 1024-1032, 1991.
- 5) 田中潤一, 伊藤亜希, 中根 研, 他: 慢性関節リウマチ患者における顎関節異常とその対策, 日口外誌, 45: 497-503, 1996.
- 6) Steinbrocker, O., Traeger, C. H. and Batterman, R. C.: Therapeutic Criteria in Rheumatoid Arthritis. JAMA. 140: 659-662, 1949.
- 7) 多田充裕: 咀嚼運動速度に関する診断学的研究—開口相における運動速度の様相について—, 日口診誌, 5: 299-310, 1992.
- 8) 野村城二, 山本英志, 村田 琢, 他: 慢性リウマチ患者での顎関節機能障害についての臨床的検討 (抄録), 日顎誌, 9: 286-287, 1997.
- 9) Marbach, J. J. and Spiera, H.: Rheumatoid Arthritis of the Temporomandibular Joints. Ann Rheum Dis. 26: 538-543, 1967.
- 10) Franks, A. S. T., Storhaug, K. and Tveito, L.: Temporomandibular Joint in Adults Rheumatoid Arthritis. Ann Rheum Dis. 28: 139-145, 1969.
- 11) Crum, R. J. and Loiselle, R. J.: Incidence of Temporomandibular Joint Symptoms in Male Patients with Rheumatoid Arthritis. JADA. 81: 129-133, 1970.
- 12) Ogus, H.: Rheumatoid arthritis of the Temporomandibular Joint. Br J Oral Surg. 12: 275-284, 1975.
- 13) 藤澤政紀, 塩山 司, 高嶋 勉, 他: 下顎頭の著しい変形を伴う慢性関節リウマチの一例. 日顎誌, 11: 128-131, 1999.
- 14) 遠藤美樹, 虫本栄子, 田中久敏: 補綴処置により前歯部開咬の改善を認めた慢性関節リウマチの1症例. 補綴誌, 43: 432-439, 1999.
- 15) 今村英夫, 久保田英朗, 田中絹子, 他: 顎関節強直症を併発

- した慢性関節リウマチの1例. 日顎誌, 5:119-126, 1993.
- 16) 中富憲次郎, 戸井良夫: 慢性多発性関節リウマチ患者の顎関節の臨床的観察(抄録). リウマチ, 4:180, 1963.
- 17) 朝比奈たまき, 水谷英樹, 杉村泰郎, 他: 慢性関節リウマチ患者の顎関節症状に対する顎運動療法の効果. 日口外誌, 44:750-752, 1998.
- 18) 中村芳明, 古賀千尋, 岩本 修, 他: 顎関節リウマチにおける保存療法の臨床的検討. 日口診誌, 13:46-54, 2000.

|||||
原 著
|||||

歯科医療面接における傾聴技能に関する研究
——ビデオ観察による初診患者に対する学生の評価基準——

伊藤孝訓 青木伸一郎 井出尨也
須藤玲美 北原聡子 笹原廣重

Study on Listening Skills during Medical Interviews in Dentistry
——Evaluation Using Video Observation of Student Skills in
Interviews with New Patients——

ITO Takanori, AOKI Shinichiro, IDE Kazuya,
SUTOO Lemi, KITAHARA Satoko and SASAHARA Hiroshige

Abstract : In recent years, teaching students how to interview patients has become an increasingly important area of instruction in the field of dental medicine. In this study, clinical interviews of new patients performed by students were videotaped to allow observation of the manner in which the interviews were conducted. The subjects of the study were two groups of dental students : a control group in the sixth year of dental school as of 2000, and another group—called the lecture group—in the sixth year of dental school as of 2001. Students evaluated in 2001 listened to commentary on interview videos from the previous year, as well as lectures on how to perform interviews.

Results showed that 90—100% of the lecture group scored positive for specific actions during the interviews, such as greetings given at the beginning of the interview, confirming the names of patients, performing self-introductions, conversing without a mask, and selecting appropriate positioning. More students in the lecture group than in the control group demonstrated empathetic attitudes through body language, facial expressions, and conversation. While there were also more students who asked open-ended questions in the lecture group, interview skills such as focused questions, prompting, and non-verbal communication were not well-demonstrated. Students in the lecture group also took more time to listen to patients, and the period of time from the point at which students heard the chief complaint until they shifted their attention to begin writing medical records was significantly longer in the lecture group. The time for which the students failed to make eye contact with patients was also significantly shorter in the lecture group.

The study pointed to the necessity of teaching students how to communicate with patients early in their training, beginning in the first few years of dental school, and proceeding step by step, to allow them to perform effective clinical interviews in which information may be collected, trust built, patients informed, and even reassurance given.

日本大学松戸歯学部口腔診断学教室
日本大学松戸歯学部口腔科学研究所
Department of Oral Diagnostics, Nihon University
School of Dentistry at Matsudo

Research Institute of Oral Science, Nihon University
School of Dentistry at Matsudo
平成14年4月30日受付
平成14年9月30日受理

Key words : medical interview, listening skill, communication, behavioral science, dental education

緒 言

近年、患者の病気をみつけるための診断情報の効率的な収集を目的とした医師サイドの問診から、患者の利権意識の増大、健康観の多様化、慢性疾患モデルとしての医療構造の変化、そして癒しとしての面接の治療効果が理解されてきたために、患者中心で信頼関係の構築を優先する医療面接¹⁻³⁾へと変化してきた。

当教室では以前から4年次において医療コミュニケーション⁴⁾、診断プロセス⁵⁾、医師の決断と心理⁶⁾および患者心理などの講義、そして5年次の臨床実習では医療面接のロールプレイ、6年次の臨床実習では実際の初診患者の医療面接を行っているが、面接技法の教育としてはいまだ十分なものとはいえない。本研究は歯科の臨床コミュニケーション、特に医療面接における傾聴技能の実態と教育効果の把握、さらに歯科特有の医療面接様式について検討することによって、教育内容の具体性が提示できると考えた。

そこで、初診時面接における傾聴技能について、2000年度6年生と2001年度6年生を対象にビデオによる観察から医療面接を教育するうえでの問題点について検討したので報告する。

対象および方法

対象は2000年度6年生45名と2001年度6年生45名である。方法は医療面接行動を撮影するビデオカメラによる観察システムを診療室の歯科診療ユニット2台に設置した。そして初診外来を訪れた患者に対して承諾を得た後、学生に初診面接として主訴、現病歴の聴取およびカルテ記載を行わせ、面接行動と会話をビデオテープにて録画した。なお2001年度学生(補講群)は、2000年度学生(対照群)が受けた講義、ポリクリ内容に、さらに医療面接実施前に対照群が撮影されたビデオ

を用いた解説と小講義により面接技法の補習講義を受けた。終了後に教員が手分けしてビデオ再生し傾聴技能について検討を行った。また教員間での評価を統一するため複数の症例を記録したビデオにて意見調整した。

面接時の傾聴技能の評価は、面接態度(11項目)、面接技法(6項目)、総体的評価(4項目)、および面接時間・回数(16項目)について評価表に則って評価した。なお総体的評価は井上⁷⁾の評価基準に従って評価した。面接時間と回数について評価者間の差はMann-Whitney *U* 検定により検定した。また歯科特有の医療面接様式を模索する意味で面接の様式と歯科疾患についても分類検討した。

結 果

1. 面接態度について

「面接を始める前に挨拶をした」は両群ともに高い値であったが、補講群は100%であった。「患者の名前を確認した」「自己紹介した」「マスクを外して対応した」「患者と斜め45度に相対するようなポジショニングをした」ものは対照群が約50%であったが、補講群はほとんど90%以上の高い値であった。「常識的で失礼のない言葉使いをした」ものは対照群が85.3%、補講群が84.4%ではほぼ同じく比較的高かった。「質問が事務的に一定のリズムで続いた」ものが対照群61%、補講群48.9%と約半数程度であった。「専門用語を多用してわかりにくい」ものは対照群で19.5%みられたが、補講群で6.7%と少なかった。「ボールペンをくるくる回したり、机をこつこつした」ものも数名みられた(表1)。

2. 面接態度の総体的評価について

面接態度の総体的評価として面接時の姿勢は、ジェスチャーを交えるような共感的姿勢を示すものより、落ち着いて観察的な姿勢を示す客観的な

表 1 態度評価

	対照群	補講群
挨拶をした	85.4	100
患者の名前を確認した	46.3	97.8
自己紹介をした	46.3	97.8
患者と適切な距離で、斜め 45 度に相対し座った	58.5	88.9
マスクを外して面接した	63.4	91.1
質問が事務的に一定のリズムにすすめられた	61	48.9
患者が聞き取りやすい声の大きさ	70.1	93.3
常識的で失礼がないよう言葉使いに注意した	85.3	84.4
専門用語が多くてわかりにくい部分がある	19.5	6.7
ボールペンをくるくる回したり、机をこつこつした	7.3	2.2

(%)

表 2 面接態度の総体的評価

	姿勢		表情		会話	
	対照群	補講群	対照群	補講群	対照群	補講群
威圧的	4.9	0	7.3	0	7.3	0
萎縮的	9.8	8.9	12.2	8.9	14.6	6.7
客観的	65.8	51.1	65.8	57.8	63.4	55.6
共感的	19.5	40	14.6	33.3	14.6	37.8

(%)

ものが多く、対照群で 65.8%、補講群でやや低く 51.1%であった。表情については萎縮的なものや共感的なものより、落ち着いて冷静な観察的評価をしている客観的なものが対照群で 65.8%、補講群で 57.8%であった。会話についても同様に、やりとりが冷静で客観的なものが対照群で 63.4%、補講群で 55.6%であった。共感的な態度については、対照群 15%程度に比較して補講群は姿勢が 40%、表情が 33.3%、会話が 37.8%とやや高い傾向がみられた (表 2)。

3. 面接技法について

面接の始めに「開かれた質問 open-ended question を多用した」ものは対照群が 73.1%、補講群が 84.4%であった。面接の中盤において「話を促すような掛け合いをした」ものは対照群が 61.0%、補講群が 55.6%であった。面接の後半で「話を絞り込んで疑問点を解消した」ものは対照群

が 53.7%、補講群が 46.7%であった。「会話の流れがスムーズにすすめられた」ものは対照群が 26.8%に対して補講群が 48.9%であった。「ある時は身を乗り出すような態度をした」ものは対照群 53.7%に対して補講群 26.7%に減った。また患者が「言い忘れたことがないかを確認した」ものは対照群が 12.2%に対して補講群が 31.1%とやや高い傾向がみられたが、両群とも低く適切に使われていなかった (表 3)。

4. 面接時間について

「患者から視線を外している時間」と「診察時間」は、有意な差を認め対照群が長かった。「総診察時間」と「面接時間」は、両群ともにほぼ同様な傾向がみられ差はなかった。「患者に視線を向けている時間」は、補講群がやや長い傾向がみられたが差はなかった。すなわち、総診察時間の 2/3 が面接時間で 1/3 が診察に要した時間であった。面

表 3 面接技法

	対照群	補講群
面接始め：open-ended question を多用している	73.1	84.4
面接中盤：話を促すような掛け合いをした	61	55.6
面接後半：絞り込み疑問点を解消した	53.7	46.7
会話の流れがスムーズに行われた	26.8	48.9
ある時は身を乗り出すような態度をした	53.7	26.7
話の腰を折るようなことをした	2.4	4.4
患者が言い忘れたことがないか確認した	12.2	31.1

(%)

表 4 面接時間

	対照群	補講群	U-Test
患者に初めて視線を向けた時刻	0分7秒±0分8秒	0分8秒±0分12秒	n. s
初めて口腔内を視た時刻	10分42秒±7分50秒	9分26秒±5分29秒	n. s
患者に視線を向けている時間	4分50秒±2分67秒	6分27秒±4分36秒	n. s
患者から視線を外している時間	11分98秒±5分38秒	9分28秒±5分53秒	p<0.05
面接時間	16分46秒±6分47秒	17分26秒±9分35秒	n. s
診査時間	10分26秒±6分12秒	8分00秒±5分23秒	p<0.05
総診察時間	26分58秒±8分17秒	25分21秒±11分41秒	n. s
学生が話している時間	2分42秒±1分42秒	2分22秒±1分26秒	n. s
患者が話している時間	2分44秒±3分19秒	2分27秒±3分20秒	n. s
カルテを書き始めた時刻	0分56秒±0分49秒	1分39秒±1分38秒	p<0.05

接時間の約 1/3 は患者に視線を向けていたが、残りの 2/3 は患者から視線を外しており、その大半はカルテを記入するために費やしており、対照群においては視線を向けている時間の約 2 倍程度であった。

「学生が話している時間」と「患者が話している時間」は両群ともに同じ傾向がみられ差はなかった。「カルテを書き始めた時刻」は主訴を確認し患者に背を向けてカルテに記載を始めた時間のこと、対照群の 56 秒に対して補講群が 1 分 39 秒と有意に長く、面接当初に患者の話聞くことに時間を割く傾向がみられた (表 4)。

5. 面接の質問回数について

「学生が質問した回数」と「患者が回答・質問した回数」はほぼ同じような傾向がみられ差はなく、学生は close-ended question を多用し、患者は質問された回数以上に自ら多く語るものものは少な

かった。共感を現す態度である「相づちを打った回数」は対照群が 31.4 回に対して補講群は 57.2 回と有意に多かった。「患者の言葉を反復・繰り返した回数」も、「話を促進させた回数」も両群とも同じような傾向がみられ差はなかった (表 5)。

6. 面接様式について

歯科特有の基本的な医療面接様式を考えるにあたり 2000 年度および 2001 年度学生をまとめ集計した。そして患部を一瞥するような簡単な視診をませて面接した学生 (患部確認群) と面接終了後に診査に移行した学生 (患部未確認群) の 2 タイプについて集計した。

「初めて口腔内を視た時刻」において患部確認群は 7 分 16 秒で、患部未確認群は 12 分 41 秒と有意に遅かった。「患者が話している時間」は患部未確認群の 1 分 28 秒に対して患部確認群は 3 分 42 秒と有意に長かった。「総診察時間」は両群とも約 26

表 5 面接の回答・質問回数

	対照群	補講群	U-Test
学生が質問した回数	28.0±10.4	27.7±11.4	n. s
患者が回答・質問した回数	30.3±11.6	28.66±12.7	n. s
何回ユニットを倒して診査したか(回数)	1.5±1.0	1.2±0.5	n. s
相づちを打った回数	31.4±25.0	57.2±53.6	p<0.05
患者の言葉を反復する, 繰り返した回数	6.0±6.9	7.5±5.8	n. s
話を促進させた回数	2.6±2.5	2.9±4.8	n. s

(回)

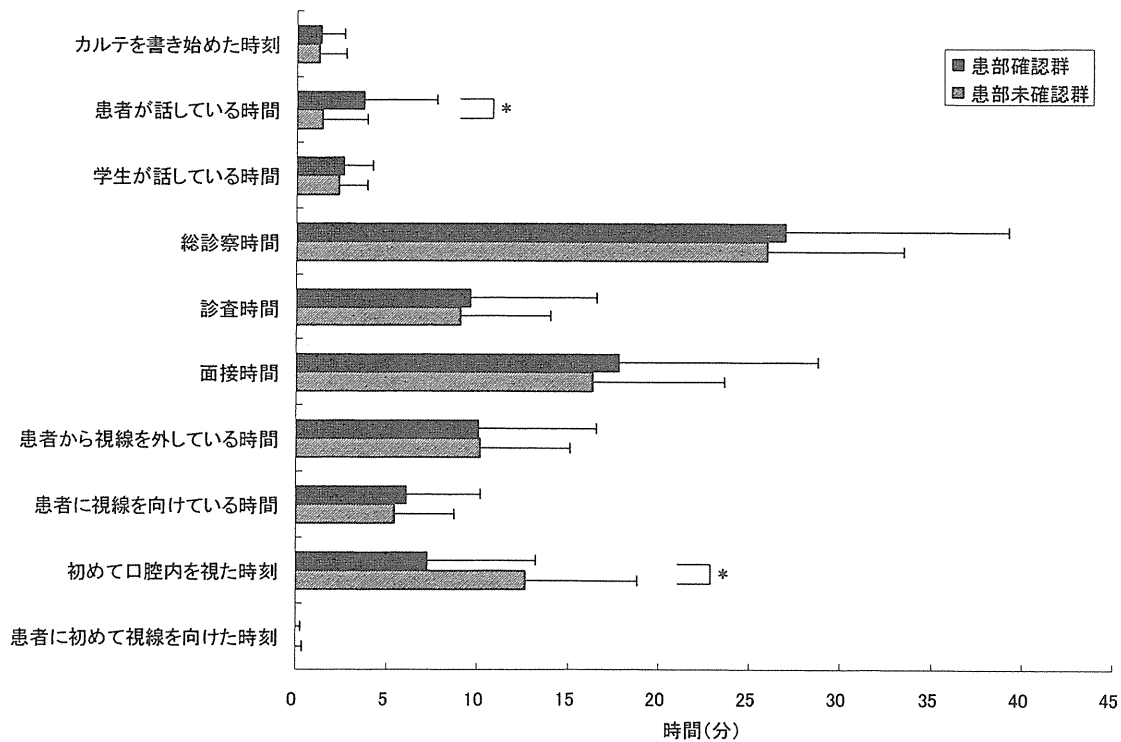


図 1 面接様式の違いによる面接時間

* : p<0.05, (Mann-Whitney の U 検定)

分, 「面接時間」も約 17 分, 「診査時間」も約 9 分とほぼ同じ傾向がみられ差はなかった。また「患者に視線を向けている時間」も差がなかった(図 1)。

学生が質問した回数, 患者が答えた回数は 26~31 回程度で, ほぼ同じ傾向がみられ差はなかった。「患者の言葉を反復・繰り返した回数」と「話を促進させた回数」もほぼ同じ傾向がみられ差はなかった(図 2)。

7. 疾患別の面接傾向について

異なった歯科疾患によって医療面接がどのように違うかを考えるにあたり 2000 年度および 2001 年度学生をまとめ疾患ごとに集計した。

「学生が話している時間」にのみ辺縁性歯周炎群とその他群, 顎関節症群とその他群に差がみられた。「面接時間」「総診察時間」および「患者に視線を向けている時間」は辺縁性歯周炎, 根尖性歯周炎, 顎関節症においてほぼ同じ傾向がみられ差はなかった。「患者が話している時間」は辺縁性歯

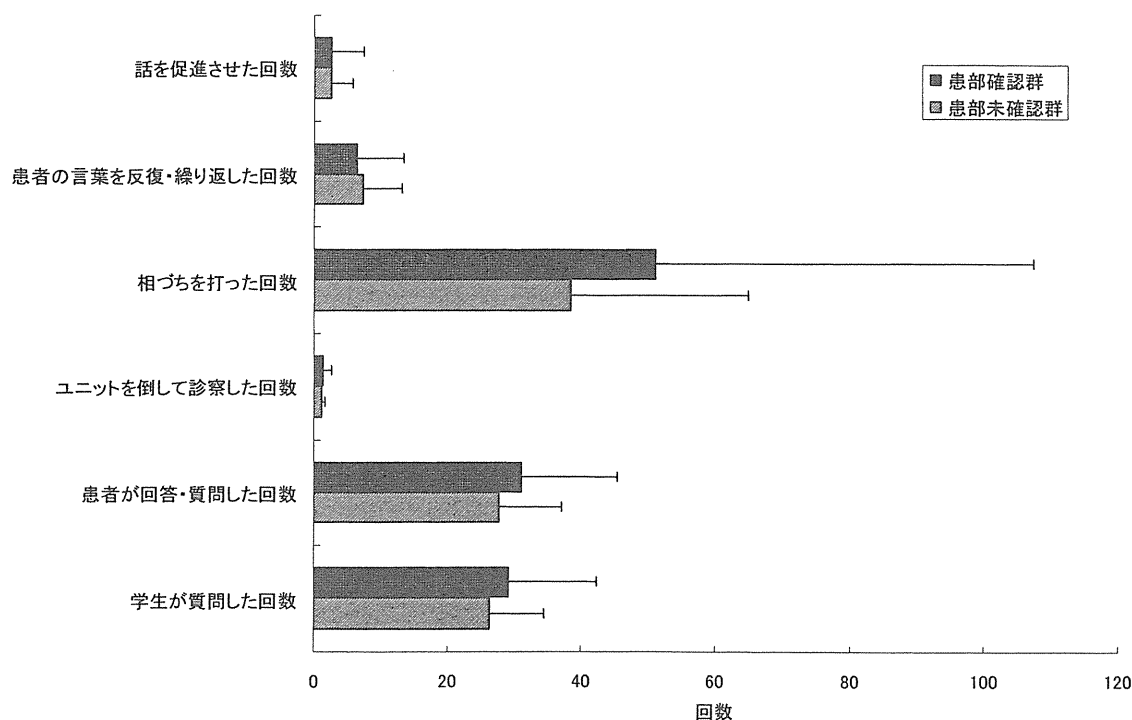


図 2 面接様式の違いによる診査回数
n. s. (Mann-Whitney の U 検定)

周炎と根尖性歯周炎に比較して顎関節症は短い傾向がみられ差はなかった。一方、「患者が話している時間」は顎関節症に比較して辺縁性歯周炎と根尖性歯周炎は短い傾向がみられ差はなかった(図 3)。

学生が質問した回数、患者が答えた回数は 27~30 回程度で、ほぼ同じ傾向がみられ差はなかった(図 4)。

考 察

1. 補習講義の効果について

「面接を始める前に挨拶をした」「患者の名前を確認した」「自己紹介した」「マスクを外して面接した」「患者と適切な距離で、斜め 45 度に相対し座った」「常識的で失礼のない言葉使いをした」および「専門用語を多用してわかりにくい」などの面接態度について、学生は直前補習の内容を理解し具体的に行動することができた。

面接態度の総体的評価を要約すると、対照群で 7%程度みられた威圧的態度の学生は補習群では

みられなかった。萎縮した態度は対照群で 10~14%みられたが補習群では 10%以下であった。客観的態度は対照群で 60%以上、補習群で 50%以上にみられた。共感的態度は対照群で 20%以下にみられたが、補習群で 30%以上にみられた。特に対照群の傾向は井上ら⁷⁾の医学部 5 年生を対象とした報告とほぼ一致した結果であった。

面接技法において、患者が自由に答えられる質問法で、患者の考えや最も重要と思っていることを明らかにすることができる開かれた質問である「open-ended question」については多用されていたが、面接の中盤以降に用いる「話を促すような掛け合いをした」「話を絞り込んで疑問点を解消した」「言い忘れたことがないかを確認した」などについては、直前の説明やビデオによる解説と 5 年次のロールプレイの教育だけでは、臨床の場で実施できるレベルには至らなかった。Open-ended question で面接はスタートしているが、傾聴を重視し口を挟まずに患者中心に医療面接を展開する学生は少なかった。また患者の話をコントロールすることができずに困惑する学生もみられた。

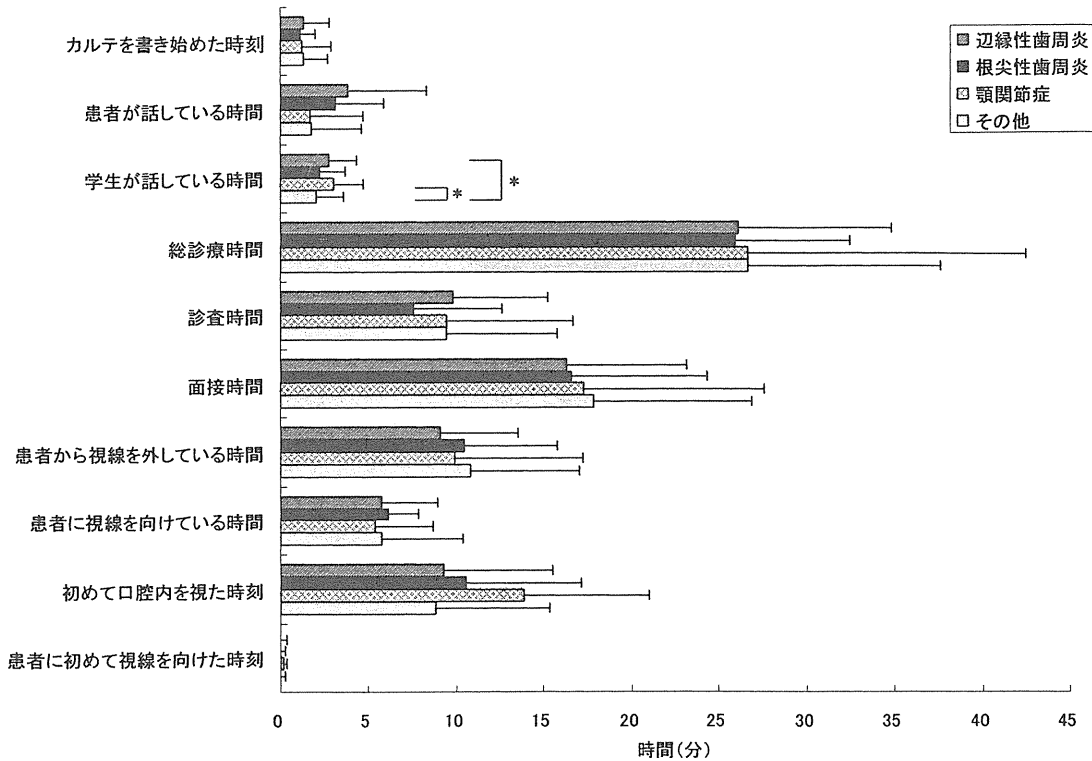


図 3 疾患の違いによる面接時間
* : $p < 0.05$, (Mann-Whitney の U 検定)

Sondell ら⁸⁾は、RIAS 法 (The Roter Method of Interaction Process Analysis) を歯科用に改訂し、歯科領域特有のコミュニケーションを解析評価し、歯科医師患者関係について定量的な表現を試みた。社会心理学的会話(社会的会話, 世辞, 共感, 励まし, 批判など)と医学専門学的会話(指導, 狭い意味での問診, カウンセリング, 医療サービスなど)について、会話の回数を集計した結果、37%が社会心理学的会話で、63%が医学専門的な会話であった。また 59%は歯科医師側の質問であり、41%は患者からの会話であり、歯科医師-患者関係を理解するための 1つの指針になりうると報告している。本成績では、面接時間が約 17分であり、学生が質問などの話をしてきた時間は約 2.5分、患者が回答・質問した時間は約 2.5分、そして両者の会話がなく学生が視線を外しカルテの記載を行っている時間が約 10分であった。会話時間だけの割合は学生、患者とも同じ約 50%で、会話した回数も学生、患者ともに約 28 回程度であった。両者とも会話内容は疾患に関する質問・回

答がほとんどで、社会心理的な内容はあまりみられなかった。

補習講義の効果については、面接態度、いわゆる患者に接する態度・マナーは講義、演習などの授業方法によりほとんどの学生が習得できるという結果が得られた。しかし医療面接スキルの習得は低い結果であった。OSCE の導入に対して学生自身による OSCE 対策としてのマニュアル化が進み、本来の目的である態度や技能が身につかないと危惧する声もあるが、これまで歯科領域において医療行動科学という学問分野^{9,10)}の教育が十分でなかったことから医療面接、診察技法についての教育が取り上げられ体系化されることは意味ある教育改革の 1つである。今後医療面接技法については、コミュニケーションスキル、患者心理、医師の診断プロセス・決断心理、医療倫理、医療社会行政などの多くの分野が関与するためもっと強化をはかるべきであろう。そして知識の習得のみでなく医療面接の演習については、早い時期から段階的なコミュニケーション学習の流れを作る

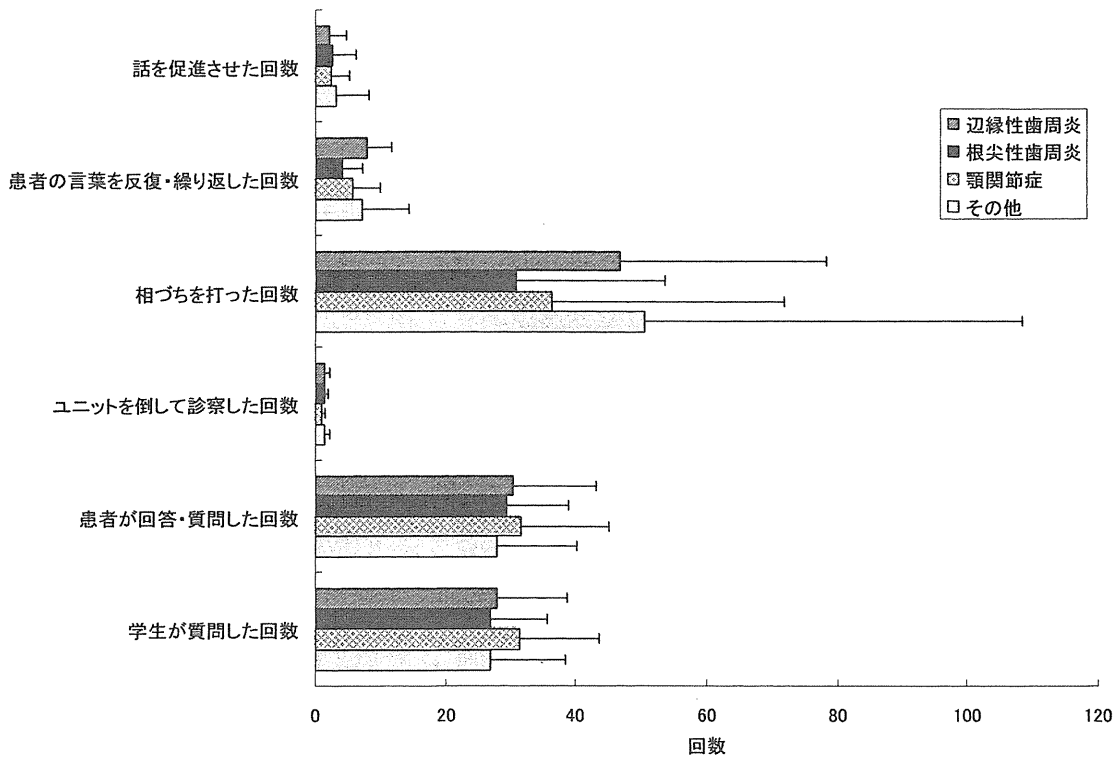


図 4 疾患の違いによる診査回数
n. s. (Mann-Whitney の U 検定)

ことにより、面接スキルも患者対応に具現化されたものになると思われる。

2. 評価項目の判断基準について

面接を始めるにあたり最初の3分間を患者に与えることにより、患者の人格、個性、診断学・治療学、患者のニーズ、医師に対する要求がわかる¹¹⁾といわれており、心身の不調についての話を「健康問題物語」¹²⁾と呼んでいる。特に患者自身が自分の見方でみて、自分の言葉で表現し、自分の価値観で意味づけた自分の病気に対する考え方を解釈モデル¹³⁾といい患者対応として活用することは有用である。早い時期から筆記用具を持ち、主訴を聞いた後にすぐ患者に背を向ける行動は、会話を止め印象としても良くはなく、また聞きながら記載しては観察の機会をなくすことにもなる。そのためにも「カルテの記載を始めた時刻」を計測し明らかにすることは、面接が適切にスタートされているかをみる良い指標となる。今回平均1分40秒という結果が得られたが、内科での3分に対し

ては少ない。鑑別診断する対象疾患が少なく、視診により比較的診断が容易という歯科の特性から臨床推論にあまり時間を要さないため、妥当性のある結果と思われる。

「患者に視線を向けている時間」が面接時間の1/3という結果が得られたが、一般会話、医療現場、さらに文化の違いなど、その配分は明らかではないが、カルテ記載に慣れが生じればさらに視線を患者に向けられるようになる。今回カルテの記載内容とコミュニケーション評価との関連性について検討は行っていないが、背を向けている時間の長い学生ほどカルテの記載内容は充実しているような感がある。コミュニケーションの55%は非言語的なメッセージで得られることから、患者から視線を外す時間は最小限にすべきであろう。そのためには現病歴の記載についてはトレーニングを積むことで効率的なまとめができるようになる必要がある。各大学でOSCEの導入が試みられ、医療面接で「面接時間の1/2以上を患者に視線を向けていること」という評価項目を組み

入れたものもみられるが、日本人の心理的背景を踏まえた根拠について今後検討する必要があると思われる。

本実習のような急性症状をもつ初診患者の場合、できるだけ迅速に面接を終了し処置を行いたいために問診の早い時期から close-ended question を重ねることが情報入手としては効果的で用いられやすいが、適切なコミュニケーションの確立を配慮すると用いるタイミングは難しい。十分に会話の流れを把握し柔軟に傾聴すべきである。おおまかには open-ended question で患者の話す健康問題物語を通して解釈モデルをとらせ、適当な促しと患者の非言語的コミュニケーションに注意を払い、最初の3分間を傾聴中心で進め、主訴を的確にとらえることと患者の病気に対する考えや治療に対する希望をとらえればよいと思われる。また促しを効果的に用いると患者の訴えと病気のパターンとを対応させる想定診断でおぼろげなりにもいくつかの診断名をリストアップすることができる。次いで設定した想定診断を仮説として仮説-検証する鑑別診断に移った時点から close-ended question による質問を進め、より確定的なものとするための思考を繰り返すべきである。なおその際に主訴の絞り込みや想定・鑑別診断時には必ず投錨効果、代表性の直観といった判断にまつわる心理的バイアス⁹⁾があることを忘れてはならない。

初診の面接様式を考えるにあたり、効率よく鑑別診断するために最初の主訴を聞いた時点で口腔内を診て、仮説演繹する思考としての視診行動がコミュニケーションするうえでどのような影響を与えるかについても検討する必要がある。本実験方法では面接様式による明確な差は得られなかったが、一度視診した後に面接を続けたほうが「患者が話している時間」で有意に長かった。このことは視ることで臨床推論がうまく進み、その結果として患者の話をじっくり聞くことができるようになったかなどについて、今後は対象を患者アンケートに求め、患者満足度を指標にした検討も加えて考慮する必要があると考える。歯科医師によるこれまでの歯科診断のスタンダードは、治療効率を優先した医療と口腔を診れば即診断できると

いう特性を最優先に考えた問診であったが、慢性疾患としての医療構造モデルや患者が抱く解釈モデルの利用から医療過誤の防止や患者ケアの質を高めるためにも、患者の「健康問題物語」を傾聴する時間を十分にとるべきであろう。う蝕、歯髄炎、歯周炎などの歯科の common disease の場合は、主訴を聞いた後に簡単な視診を行って得られた情報を最大限に利用して、想定診断をより確定的なものへと思考を進めたほうがよいように思われるが、一方、慢性疾患、不定愁訴、治療上の問題などの場合は傾聴に重点を置くべきであろう。

また、今回は初診時面接であったので、疾患による「面接時間」「総診察時間」および「患者に視線を向けている時間」は辺縁性歯周炎、根尖性歯周炎、顎関節症において有意な差はみられなかった。

しかし、これらのことから、医療面接の評価基準の根拠を明らかにするためにも、傾聴技能を評価する客観的な評価基準の確立を目的に多角的な視野に立った検討を試み、一般医学における医療面接様式とは異なった歯科の特異性を鑑みた歯科医療面接様式を明らかにしなければならないことが示唆された。

OSCE の実践が CBT と同じ平成 17 年度実施になったことから、諸大学において 4 年次終了時、臨床実習（ポリクリ、終了時）、臨床研修医（開始時、修了時）などの多様な時期で OSCE が試行されている。特に以前に行われていた国家試験実技試験とは異なり、OSCE では医療面接が中心的な役割を担う立場にあると思われる。伴¹⁴⁾は臨床能力について、通常の医学教育のタキソノミーで使われる知識、技能、態度という分野に加えて、情報収集能力と総合的判断能力を取り出して 5 つに分けると理解しやすいと説明している。医療面接は情報収集能力と総合的判断能力を限られた時間で発揮する場面であり、ある意味大変な知的作業と思われることから、OSCE の 4 年次終了時期での適応は面接態度・マナー程度に限定するなどの具体的目標を明らかにする必要がある。さらに医療面接のステーションについては、面接態度・マナー、話の進め方、診断名の絞り込み、カルテ記載、処置方針の説明、患者指導・教育などを数個

に分け、総合的な臨床能力を問う形式を組み、現段階では臨床研修医の修了テストとして起用するほうが内容の難易性からも適当と思われる。またこれまでの OSCE の実施例において、抜歯紹介を目的とした患者や抜歯後の説明を課題とした医療面接がみられるが、初診場面としては患者のもつ歯科疾患の解釈モデルをいかに引き出すかを学ぶことによって、患者-医師信頼関係の構築の仕方が習得できると思われる。問診票や健康調査質問票を手に取り医療面接を行っても、抜歯施行前の医科的既往歴の確認が主体となるにすぎないと思われる。このようなことから歯科医療面接は学生教育の取り組み、OSCE においては対象となる受験学年に対応した評価基準やモデルコアカリキュラムとの課題の整合性の確立が急がれる。

結 論

1. 医療面接で用いられるコミュニケーションスキルの中でも面接態度・マナーについて、ほとんどの学生は講義・演習などで習得できるが、非言語的な促し、傾聴や話の進め方などの面接スキルは習得が難しいことがわかった。

2. 総診察時間は約 25 分程度で、2/3 が面接時間、1/3 が診査時間に使われ、面接時間の 1/3 は患者に視線が向けられていた。

3. 愁訴を確認した後に患部を簡単に視診する面接と面接終了後に診査を行う面接様式による違いは、前者のほうが有意に患者と話している時間が長かった。

以上のことから、医療面接における傾聴技能の評価の根拠と教育効果の妥当性が示唆されるとともに、歯科特有の医療面接様式の確立のための動機付けになったと思われる。

本研究の一部は、平成 11 年度日本学術振興会科学研究費 (11672062)、平成 12 年度日本大学松戸歯学部鈴木研究費 (00-1015)、および文部省平成 13 年度学術フロンティア推進事業による。

文 献

1) 植村研一：アメリカにおける医学生の臨床実

習，医学教育，23：151-154，1992.

- 2) 津田 栄，平野 寛，渡辺洋一郎：面接技法の教育に関する検討，医学教育，16：465-468，1985.
- 3) 佐々木宏起，津田 栄，伴 信太郎，葛西龍樹，越智則晶，松下 明，森 崇文，小笠原裕幸：医療面接の開始時における傾聴技能の評価，医学教育，27：167-170，1996.
- 4) 宮本尚彦：コミュニケーションをとるための技法はなぜ必要か，臨床教育マニュアル（日本医学教育学会教育技法委員会編），篠原出版，東京，1994，189-229.
- 5) 伊藤孝訓，井出壺也，関 真之，笹原廣重：学生の歯科疾患診断時における情報収集過程について—第 1 報 仮説病名と主観確率について—，日歯教誌，9：196-203，1994.
- 6) 伊藤孝訓，青木伸一郎，笹原廣重：臨床的意思決定（Clinical Decision Making）教育の試み—第 2 報 臨床教育における医療認知心理学の必要性—，日歯教誌，16：43-51，2000.
- 7) 井上新平，田中修一，元木洋介，高橋美枝：ビデオを用いた精神科面接演習の試み，医学教育，26：45-50，1995.
- 8) Sondell, K., Soderfeldt, B. and Palmqvist, S.: A method for communication analysis in prosthodontics, Acta Odontol Scand, 56: 48-56, 1998.
- 9) 小椋秀亮：21 世紀の歯科医学教育におけるコア・カリキュラムの構想，日歯教誌，15：68-74，1999.
- 10) 俣木志朗：歯科医療行動科学入門，日歯医師会誌，53，4-11，2000.
- 11) Beckman, H. B. and Frankel, R. M.: The effect of physician behavior on the collection of data, Annal of Internal Medicine, 101: 692-696, 1984.
- 12) 飯嶋克巳：外来でのコミュニケーション技法，日本医事新報社，東京，1999，23-42.
- 13) Kleinman, A., Eisenberg, L. and Good, B.: Culture, illness and cross-cultural research, Annal of Internal Medicine, 88: 251-258, 1978.
- 14) 伴 信太郎：臨床研修医の臨床能力評価—臨床能力の評価技法—，日歯教誌，15：44-48，1999.

ネットワークによる在宅歯科医療の診断的支援に関する研究

第3報: ブロードバンドの伝送速度の様相例

大 沢 聖 子^{1,3)} 大 関 一 弥¹⁾ 酒 井 淳¹⁾
内 田 貴 之^{1,3)} 多 田 充 裕^{1,3)} 吉 野 祥 一^{1,3)}
伊 藤 孝 訓^{1,3)} 齊 藤 孝 親^{2,3)} 齊 藤 哲 也⁴⁾
小 倉 京 子⁵⁾

A Study of Network Diagnostic Support for Home Dental Care

Report 3: Aspects of Broadband Transmission Speed

SEIKO OSAWA^{1,3)}, KAZUYA OZEKI¹⁾, JUN SAKAI¹⁾,
TAKASHI UCHIDA^{1,3)}, MITSUHIRO OHTA^{1,3)}, SHOICHI YOSHINO^{1,3)},
TAKANORI ITO^{1,3)}, TAKACHIKA SAITO^{2,3)}, TETSUYA SAITO⁴⁾
AND KYOKO OGURA⁵⁾

Abstract : The aspects of speed obtained with a best-effort broadband internet connection that forms the network base for remote dental care were compared between ADSL, CATV, and FTTH. Further, the introduction of encrypted communication by VPN (PPTP), a mandatory technology used for ensuring information security, is discussed in regards to ADSL, which is the most widespread technology used in Japan for computer based communications. In our experiment, transmission times for sending and receiving a graphics file by an FTP command between each clinic and the hospital were measured using commercially available equipment, such as a PC and broadband router. We found that the actual speed was lower than the theoretical maximum speed when used with all 3 technologies and that speeds fluctuated greatly. Although VPN security could be introduced without difficulty, the effective speed was reduced more than that in ordinary communications.

On the basis of our findings, it is considered important to measure and confirm the actual line speed in advance when using a best-effort broadband internet connection.

Key words : network (ネットワーク), internet (インターネット), home dental care (在宅歯科医療), broadband (ブロードバンド), Virtual Private Network (VPN)

[Received Jul. 11, 2005]

¹⁾ 日本大学松戸歯学部歯科総合診療学講座 (主任: 伊藤孝訓助教授)

²⁾ 日本大学松戸歯学部総合口腔医学講座 (主任: 大竹繁雄教授)

³⁾ 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

⁴⁾ 齊藤歯科クリニック

⁵⁾ 日本大学松戸歯学部顎口腔義歯リハビリテーション学講座 (主任: 小林喜平教授)

¹⁾ *Department of Oral Diagnostics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo* (Chief: Ass. Prof. TAKANORI ITO) 2-870-1 Sakae-cho Nishi, Matsudo 271-8587, Japan.

²⁾ *Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo* (Chief: Prof. SHIGEO OTAKE)

³⁾ *Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo*

⁴⁾ *Saito Dental Clinic*

⁵⁾ *Department of Gnatho-Oral Prosthetic Rehabilitation, Nihon University School of Dentistry at Matsudo* (Chief: Prof. KIHEI KOBAYASHI)

はじめに

平成 16 年版情報通信白書¹⁾によれば, インターネットの利用人口は平成 15 年末で約 7,730 万人に達し, 人口普及率は 60% を突破するなど, 国民生活にインターネットは浸透し, インターネットが生活の必需品となりつつあることが報告されている。医療におけるネットワークの利用²⁻⁴⁾も急拡大し, 様々な医療情報がインターネットを通じて交換されている^{5,6)}。

このようなインターネット普及の背景にはブロードバンドといわれる高速通信環境の整備があり, 電話回線を利用する Asymmetric Digital Subscriber Line (以下, ADSL), ケーブルテレビ回線を利用する Community Antenna Television Internet (以下, CATV), 光ファイバーを利用する Fiber-to-the-Home (以下, FTTH) などの高速通信環境が利用されている⁷⁾。これらブロードバンドとして利用されている一般回線の多くは, 通信速度など通信サービスの品質保証のないベストエフォート型で, 最大通信速度および接続性に関して保証せず, 可能な場合にのみ最大限の速度・品質で提供することを前提に, 安価に高速なサービスを提供する⁸⁾ため, 問題点も指摘されている^{9,10)}。事業規模の小さな歯科領域では, 専用回線ではなく, これらのブロードバンドを用いることが多いと考えられる。

そこで, 1 例として, ベストエフォート型ブロードバンドを利用した歯科診療所と支援病院間の通信速度の様相を ADSL, CATV および FTTH について検討した。また, 公衆回線をあたかも専用回線化する手法である仮想プライベートネットワーク (Virtual Private Network, 以下, VPN) による通信速度の検討も Point-to-Point Tunneling Protocol (以下, PPTP)¹¹⁾ について行った。

材料及び方法

1. 使用機器

機器, OS 等は個人向けの普及機を中心とし, 診療所側では Tablet PC TX1100 (HP Compaq) (Celeron 800MHz, RAM 256MB) と Microsoft Windows XP Tablet PC Edition 2005 (Microsoft) を使い, 支援病院側では PowerEdge 400SC (Dell) (Celeron 2GHz, RAM 512MB) と Windows 2000 Server (Microsoft) を用いた。画像ファイル送受信用のファイルサーバとしては, Windows 2000 Server 付属の Internet Information Server (IIS) の FTP Service を用いた。診療所側でのインターネット接続機器は, 各プロバイダ指定機器を用いた。

暗号化通信のための VPN ルータには, ブロードバンドルータ・リモートアクセスモデル AirStationG54 WHR2-G54V/P (Buffalo) を用いた。

動画送受信には, PC カメラ USB CD30S (I-O DATA)

とインターネットテレビ電話ソフト V-Talk REBIRTH (Media Business Network) を用いた。

2. ネットワーク

ADSL, CATV および FTTH を利用している 3 か所の歯科診療所の協力を得て, 診療所側ネットワークとして ADSL, CATV および FTTH のベストエフォート型ブロードバンドを用いた。CATV のみ集合住宅タイプである。プロバイダから提供される通信速度の最大速度 (以下, 理論的 maximum 速度) は, ADSL は送信時 (以下, 上りと記す) 1 Mbps, 受信時 (以下, 下りと記す) 12 Mbps, CATV は上り 768 Kbps, 下り 20 Mbps, そして, FTTH は上り 100 Mbps, 下り 100 Mbps である。支援病院側へは学術情報ネットワーク SINET 経由で接続される。

なお, 機器構成をできるだけ同一とするため, VPN 使用の有無に関わらず, 診療所側ではプロバイダ指定のルータ, モデムあるいは回線終端装置と診療所側 PC との間に VPN ルータを介し, 支援病院側でも VPN ルータを介してサーバを接続した。実験にあたってインターネット高速化ソフトの導入や機器等のチューンナップは行わず, 全て標準設定のままとした。

3. 実験方法

1) 通信速度計測方法

通信速度の計測は, 各歯科診療所に配置した実験用 PC から 1.2MB の口腔内写真 jpg 画像ファイルを支援病院側 PC サーバに対し Windows 標準 FTP コマンドの put および get にて送受信したときの実測値を計測した。計測は, 順次 3 か所の歯科診療所で送受信を 5 回繰り返し, 自動実行で 1 時間毎, 7 日間連続して行った。

なお, ADSL については診療所での伝送損失は 41dB (3480m) であった。

2) VPN

VPN の検討は, ADSL を対象に, Windows に標準搭載されている PPTP を使い, 支援病院側の VPN ルータのみを使用するリモートアクセス VPN と, 支援病院側, 診療所側ともに VPN ルータを使用する LAN 間接続 VPN について, それぞれ計測した (図 1)。また, 患者療養指導への応用も視野に, ビデオチャットによる情報交換も試行した。

結果および考察

1. 通信速度について

ADSL, CATV, FTTH を対象に画像伝送時の通信速度を計測した結果を図 2 に示す。

1 週間での平均通信速度は, ADSL では上り 0.54 Mbps \pm 0.01, 下り 2.44 Mbps \pm 0.02, CATV では上り 0.72 Mbps \pm 0.10, 下り 7.34 Mbps \pm 1.01, そして FTTH では, 上り 7.85 Mbps \pm 0.25, 下り 8.39 Mbps \pm 0.09 であった。

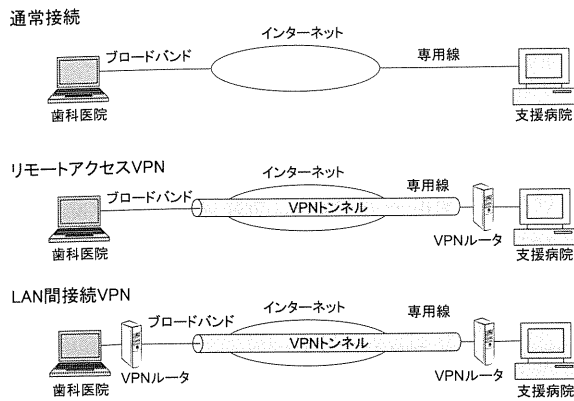


図 1 実験に用いたネットワークのイメージ
 (注: 実験では, VPN の使用に関わらず診療所側, 支援病院側ともに VPN ルータを介在させ計測した。)

ADSL は, 通信速度は低いものの上り下りともに安定した様相を示し, CATV も上りでは安定した様相を示した。しかし, CATV の下りは FTTH に近い平均通信速度を示したが変動は大きく, 特に夜間, 21 時から翌 2 時にかけて通信速度が低下する場合がみられた。FTTH は, ADSL と CATV に比べ速い通信速度を示し, 上りの昼間, 8 時から 17 時にやや変動がみられるものの比較的安定した様相を示した。

ベストエフォートとされる通信環境では一つの端末回線を複数のユーザーで使用するため, 使用者が多いと通信速度は遅く, 使用者が少ないと通信速度は速いなどの変化が生じることが知られている。CATV や FTTH でみられた変動もこのことが一つの要因と思われる。特に CATV の変動は, 集合住宅内に多くのネットワーク利用者があることの影響も考えられる。ADSL に比べて速度が速かった CATV ではあるが, 滝沢ら¹⁰⁾も安定性が悪く中断が認められたと報告しており, 変動が大きい点については留意が

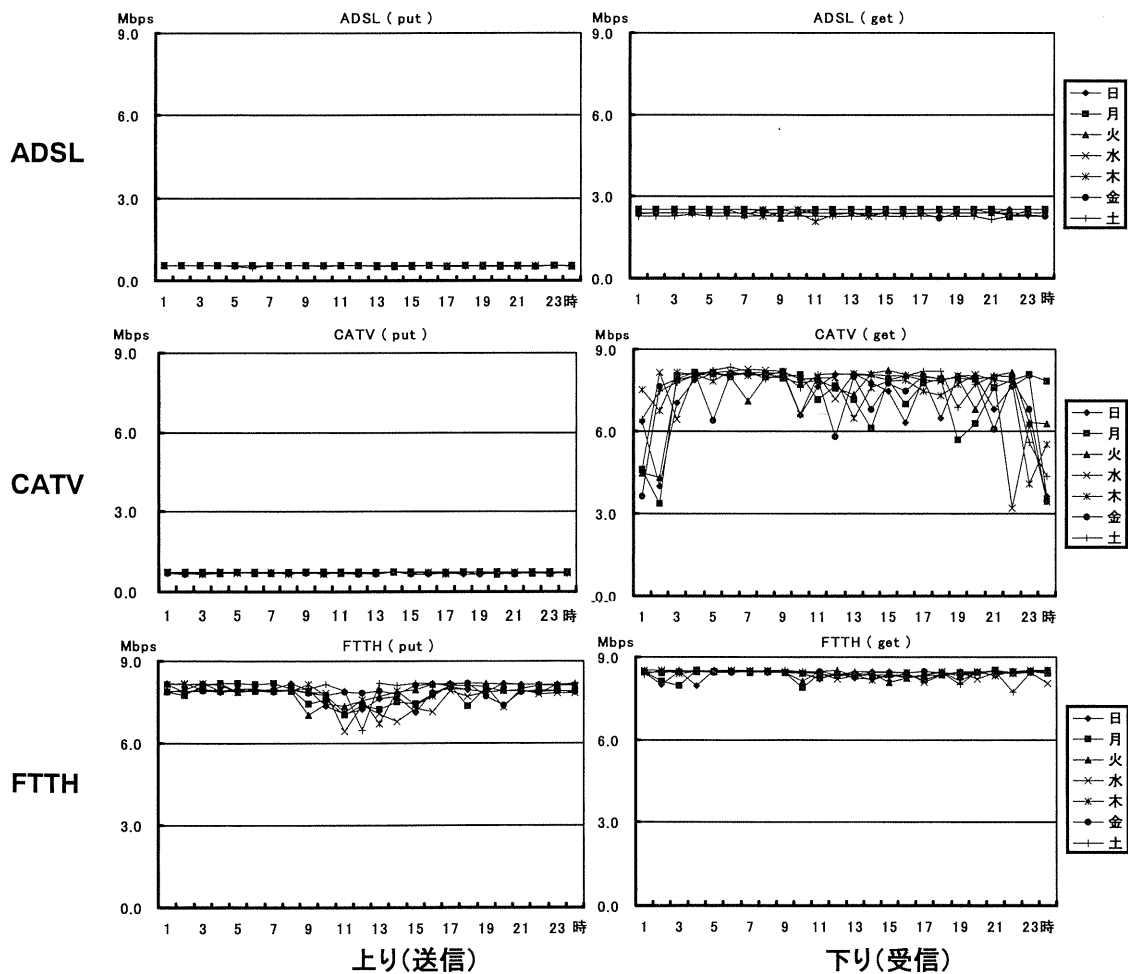


図 2 伝送速度の様相

必要であろう。

理論的最大速度は、ADSLでは上り1Mbps、下り12Mbps、CATVでは上り768Kbps、下り20Mbps、そしてFTTHでは上り下りともに100Mbpsであるが、実測速度の理論的最大速度に対する割合をみると、ADSLでは上りで理論的最大速度の53.8%、下りで20.4%、CATVは上りで93.5%、下りで36.7%、そしてFTTHは上りで7.8%、下りで8.4%であった(表1)。

橋ら¹²⁾は、遠隔読影システムの検討の中で、「ADSL回線でダウンロード時間の実測値が大きく増加したのは、ADSL回線がアナログ回線であるため、理論的最高速度が常に実現されないことが大きな原因であると考えられる」としているが、著者らの検討では、いずれのブロードバンドであっても実効速度は理論的最大速度に比べ低く、使用機器の性能以外にも、インターネット環境の影響が大きいことが考えられた。

ADSLでは収容局から利用者宅までの距離に応じて伝送損失が大きくなり速度が低下するため、このことがADSLの実効速度が遅かった大きな要因と考えられる。

表2は、当講座関係者の歯科診療所でADSLを利用する場合の電話回線線路距離長と伝送損失を電話回線線路情報開示システム¹³⁾で調査してもらった結果であるが、収容局までの線路距離長は860mから5530m、伝送損失は14dBから59dBまでの幅がみられ、通信速度の差が大きく生じることが考えられた。

ブロードバンドとして最も普及しているADSLであるが、商品説明にも明記されているように収容局までの線路距離長が2kmを超えると十分な速度が出なくなっていくことから、ADSL中心に病診連携等のネットワークを構築する場合は、電話回線線路距離長と伝送損失の調査を行い、事前に実効速度を把握しておくことが重要と考えられる。

一般家庭でのインターネット利用ではホームページを閲覧するネットサーフィンなどの利用が多いため下りの速度が重要視される。そのため、ADSLやCATVのようにダウンロードに用いる下り回線速度が速く、アップロードに用いる上り回線速度が遅い非対称となっている場合が多い。しかし、相互通信を行う医療においては上り回線の遅さがボトルネックになることが指摘されており⁹⁾、医療での利用を考えた場合は、FTTHのように上り下りとも高速で安定していることが望まれる。

ベストエフォート型ブロードバンドは、このように通信速度に変動がみられる場合や理論的最大速度と実効速度が異なる場合があることから、医療での利用にあたっては事前に通信速度の実測、確認が必要であろう。

2. VPNについて

ADSL回線におけるVPN使用時の伝送速度を表3に示

表1 伝送速度の理論的最大速度と実測速度との比較

回線種別	理論的 最大速度	実測速度		速度比率**	
		平均	SD		
ADSL	上り	1	0.54	0.01	54.0%
	下り	12	2.44	0.02	20.3%
CATV	上り	0.8*	0.72	0.10	90.0%
	下り	20	7.34	1.01	36.7%
FTTH	上り	100	7.85	0.25	7.8%
	下り	100	8.39	0.09	8.4%

* : 768Kbps

** : 実測速度 / 理論的最大速度

表2 ADSLを利用する場合の電話回線線路距離長と伝送損失¹³⁾の例

	n = 21			
	平均	SD	最大	最小
線路距離長 (m)	2128.8	1029.6	5530	860
伝送損失 (dB)	30.3	12.5	59	14

表3 ADSLにおけるVPN使用時の伝送速度

	Mbps					
	リモートアクセス VPN			LAN 間接続 VPN		
	平均	SD	速度比率*	平均	SD	速度比率*
上り	0.45	0.01	84%	0.47	0.02	88%
下り	0.98	0.03	40%	1.50	0.07	61%

* : VPN使用時の実測速度 / 未使用時の実測速度

す。

リモートアクセスVPNによる仮想プライベートネットワークでの平均通信速度は上り0.45Mbps、下り0.98Mbpsであり、下り回線速度は非使用時の40%に低下した。また、LAN間接続VPNによる仮想プライベートネットワークでは、上り0.47Mbps、下り1.50Mbpsであり、下り通信速度はVPN非使用時の61%に低下した。リモートアクセスVPNはクライアント側にVPNルータを要しない利点があるが、LAN間接続VPNに比べやや速度が低下した。川口ら¹⁴⁾も、VPNトンネルにより伝送の帯域は大幅に減少することを踏まえた上でVPNを利用しなくてはならないとし、津坂ら¹⁵⁾も、VPN装置を用いた場合、接続性、安定性、スループットの確認が最も大切であると述べている。したがって、VPN使用時には回線通信速度の低下を十分考慮する必要があるといえる。

今回、VPN使用下でのビデオチャットによる動画送受

信で経皮的電気刺激療法を例に試行したところ、動画の円滑さを欠くという問題がみられた。救急医療では実用的な動画の送受信を行うには実効速度 5.5Mbps 以上が必要とされる¹⁰⁾ことも考えると、VPN 使用時には通信速度の低下をあらかじめ考慮し、高性能な PC 等の機器選択とともにネットワーク環境としては FTTH を選択すべきであろう。

現在の Windows 製品には PTP クライアントソフトが標準搭載されているので、今回用いた個人向け VPN ルータの導入、あるいは PPTP サーバ機能を持つ Windows 製品の導入で容易に VPN 環境を作ることができる。通信速度の低下はあっても、VPN によって仮想専用線が確保されることの意義は大きく、療養指導などへの活用も期待される。

結 語

1 例として、ベストエフォート型ブロードバンドの通信速度の様相を ADSL, CATV および FTTH の回線について検討したところ、変動がみられる場合や理論的最大速度と実効速度が異なる場合がみられ、医療での利用にあたっては事前に通信速度の実測、確認が必要と考えられた。

謝辞 ご協力いただいた関係者各位にお礼申し上げます。

本研究の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業および平成 16 年度日本大学学術研究助成金（個 04-130）によった。

参考文献

- 1) 総務省：平成 16 年版情報通信白書。http://www.soumu.go.jp/
- 2) 齊藤孝親, 齊藤哲也, 大川将彦, 他：ネットワークによる在宅歯科医療の診断的支援に関する研究 第 2 報：35mm フィルムスキャナを用いたデンタル X 線情報の伝達について。日口診誌, 12：1-8, 1999.
- 3) 齊藤孝親, 齊藤哲也, 石井広志, 他：ネットワークによる在宅歯科医療の診断的支援に関する研究—第 1 報：デジタルカメラを用いた視覚情報の伝達について—。日口診誌, 10：330-337, 1997.
- 4) 石川 准, 井上通敏, 大山永昭, 他：保健医療分野の情報化にむけてのグランドデザイン。厚生労働省, 2001.
- 5) 森川富昭, 能瀬高明, 折田憲始, 他：病診・病病連携を行うためのリアルタイムコラボレーションシステムの構築—歯科領域における運用—。医療情報学, 23 (supple)：660-662, 2003.
- 6) 高誠治郎：遠隔地画像診断のための医用画像の個人情報への遮蔽と暗号化の試み。近畿医大誌, 26：259-267, 2001.
- 7) 日経パソコン編集：日経パソコン用語辞典 2005 年版。日経 BP 社, 東京, 2004.
- 8) @nifty：ADSL について。http://www.nifty.com/setsuzoku/adsl/what.htm
- 9) 山本庸平, 北原博人, 滝沢正臣, 他：遠隔医療におけるブロードバンドネットワークの比較。医療情報学, 23 (supple)：650-651, 2003.
- 10) 滝沢正臣, 村瀬澄夫, 坂田信裕, 他：小児救急支援医療ネットワークの構築に関する考察。医療情報学, 24 (supple)：960-961, 2004.
- 11) 土屋信明：NETWORK MAGAZIN MOOK 失敗しない VPN 構築。アスキー, 東京, 2004.
- 12) 橘 英伸, 梅田徳男, 岩田 靖：VPN 技術と構造化報告書による遠隔画像診断システムの構築。MEDICAL IMAGING TECHNOLOGY, 22：26-34, 2004.
- 13) NTT 東日本：電話回線線路情報開示システム。http://www.ntt-east.co.jp/line-info/
- 14) 川口雄一, 服部妙子：VPN トンネルを利用した LAN 間接続の実験。平成 15 年度情報処理教育研究会論文集, 331-334, 2003.
- 15) 津坂昌利, 長嶋宏和, 原 武史, 他：VPN 技術を用いた 3D 作成サーバの遠隔医療への応用。日本医放会誌, 63：318, 2003.

咬合音による歯周組織の評価 —歯周初期治療前後の比較—

大 川 将 彦

Assessment of Periodontal Tissue by Occlusal Sound —Before and after Initial Periodontal Treatment—

MASAHIKO OKAWA

Abstract: Tooth mobility is one of the clinical indicators for assessing the degree of advancement and improvement in periodontitis. As tooth mobility also affects occlusal contacts, it is also important to assess occlusal contacts in the functional assessment of teeth and periodontal tissue. In order to objectively assess functional changes in teeth and periodontal tissue attributable to improvements in periodontitis, occlusal sound was measured, with which slight changes in occlusal contacts could be ascertained. The subjects were 12 patients with adult periodontitis who underwent conventional initial periodontal treatment. Occlusal sound was measured, and periodontal tissue of each of these patients were clinically assessed before and after initial periodontal treatment. Tapping-generated occlusal sound was recorded at the cheekbone area using headgear designed for monitoring occlusal sound, and changes in the resonance frequency of teeth and periodontal tissue, duration of high-frequency components, and the number of waveforms were analyzed using waveform analysis software.

1. For clinical symptoms of periodontal tissue, significant improvements in PD, GI, PII were seen after initial periodontal treatment.
2. For the resonance frequency of periodontal tissue, a significant decrease was seen in the frequency components in the 300-600Hz band, whereas a significant increase was seen in the frequency components in 600-900Hz and 900-1200Hz bands after initial periodontal treatment.
3. Duration of the high-frequency components of occlusal sound decreased significantly after initial periodontal treatment.
4. Frequency of multiple peak on waveforms decreased significantly after initial periodontal treatment.

As discussed above, changes in periodontal tissue before and after initial periodontal treatment were assessed by measuring occlusal sound generated by tapping movements. Improvements in periodontitis were observed through changes in the resonance frequency of periodontal tissue, the duration of high-frequency components, and the number of waveforms. These findings suggest that functional changes in teeth and periodontal tissue attributable to improvements in periodontitis can be objectively assessed by measuring occlusal sound.

Key words: occlusal sound (咬合音), high-frequency component (高周波成分), periodontitis (歯周炎), diagnosis (診断)
〔Received Nov. 15, 2001〕

緒 言

歯周組織は、歯肉、歯槽骨、歯根膜およびセメント質から構成されており、これら歯周組織は歯を顎骨に結合している組織であるとともに、歯に加わる外力が直接顎骨に伝わるのを防ぐ緩衝作用の役割をしている。そのため、歯周

組織が病的状態に陥った場合、歯と顎骨との結合力や緩衝作用にも影響を及ぼし臨床的には歯の動揺がみられるようになる。

歯の動揺を客観的に評価する方法としては、静的な変位量の検討としてダイヤルゲージを用いた Mühlemann¹⁾、木村と石橋²⁾、ストレインゲージを用いた Picton³⁾、梶井⁴⁾な

日本大学大学院松戸歯学研究所歯学専攻 (指導：笹原廣重教授)

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo Oral Diagnostics, (Director: Prof. HOROSHIGE SASAHARA) 2-870-1 Sakae-cho Nishi, Matsudo 271-8587, Japan.

どの報告があり、動的な変位量の検討として、歯に振動を加えその応答から動揺度を評価した芹澤⁵⁾、Schulte et al.⁶⁾ d'Hoedt et al.⁷⁾などの報告がある。また、歯の動揺に影響を及ぼす歯周組織の力学的性状について倉島⁸⁾は、歯周組織が単なる弾性体ではなく粘性抵抗力が存在すると報告し、Noyes and Solt⁹⁾は歯周組織の粘性定数、弾性定数の定量化について報告している。

歯周疾患に罹患し炎症が進展すると、炎症性細胞が歯根膜に浸潤、波及し歯根膜主線維の破壊が起これ歯根と歯槽骨の線維性結合力を弱めることになり、歯周組織の粘弾性が変化する。さらにこれらの変化は歯と歯周組織の共振周波数にも変化を与える。小林と奥村¹⁰⁾は、歯を槌打した時の振動スペクトルは歯周疾患が進行すると低周波領域にシフトしていく傾向がみられ、歯周組織の粘弾性特性の低下と明らかに関連すると報告している。

このように、歯周炎の進展に伴う歯周組織の変化については動揺や共振周波数などの機能的な検討が行われているが、炎症の改善に伴う歯と歯周組織の共振周波数の変化に関する報告¹¹⁾は少ない。また歯周炎が進展して、臨床症状として歯の動揺が生じると咬合接触状態も変化するが、炎症の改善に伴う咬合接触状態の変化に関する報告^{12,13)}も少ない。したがって、歯と歯周組織の変化について機能的側面からの検討は不十分であると考えられる。

咬合状態の診査には、咬合紙を用いる方法、触診法、聴診法、咬合音診査法および咬合器を用いる方法などがあるが、口腔内に器具を入れずに自然な状態で機能的な咬合状態を診査できる咬合音診査法^{14,15)}が咬合接触状態の評価に有用であることが明らかにされている¹⁶⁻¹⁹⁾。

そこで著者は、歯周炎の改善に伴う歯と歯周組織の変化を、機能的側面より客観的に評価することを目的として、歯周疾患患者の初期治療前後において、タッピング運動時の咬合音によって歯と歯周組織の共振周波数、高周波成分の持続時間および波形数について検討を行い、歯と歯周組織の変化を咬合音で評価できる可能性が示唆されたので報告する。

研究方法

1. 被験者

被験者は、日本大学松戸歯学部付属歯科病院口腔診断科を受診し、歯周組織検査と X 線画像診断によって成人性歯周炎と診断された患者で、顎口腔系に歯周病以外、自覚的、他覚的に異常が認められない個性正常咬合者 12 名(年齢 27 歳から 69 歳、平均年齢 44.8 歳、男性 4 名、女性 8 名)である。

被験者に対しては本研究の目的および方法について十分な説明を行いインフォームド・コンセントが得られた上で測定を行った。また、本研究に際し日本大学松戸歯学部倫

理委員会において承認 (EC01-004) を得た。

2. 歯周組織の臨床症状の評価

歯周組織の臨床症状の評価は、以下の 4 項目を用いた。

1) Probing Depth (PD)

歯周プローブを用い、各歯 6 点法(頰側近心、頰側中央、頰側遠心、舌側近心、舌側中央、舌側遠心)により 1 mm 単位で測定した。

2) Clinical Attachment Level (CAL)

歯周プローブを用い、セメント・エナメル境を基準として、歯周ポケット底部までの距離を各歯 6 点法によって 1 mm 単位で測定した。

3) Gingival Index (GI)

Löe & Silness²⁰⁾の方法を用いて、歯肉の炎症程度を 0～3 までのスコアで評価し、それらの平均を被験者の GI とした。

4) Plaque Index (PII)

Silness & Löe²¹⁾の方法を用いて、プラークの付着状態を 0～3 までのスコアで評価し、それらの平均を被験者の PII とした。

3. 咬合音測定

咬合音は、船越²²⁾の方法に準じ左右頬骨部から採取した。咬合音を採取するセンサは、共振周波数 65KHz で 2 Hz から 40KHz 間がフラットな周波数特性をもつマイクロ加速度ピックアップ CE501M601 (Vibro-meter Corp.) を用い、アンプはセンサプリアンプ PS-602 (ONO SOKKI) を用いた。採取した咬合音は、センサアンプユニットから得られた咬合音の左右 2 ch の原波形と、フィルターユニット PS-701 (ONO SOKKI) にて 10KHz 以下の周波数成分を除去した高周波成分の左右 2 ch の波形を、インテリジェント FFT アナライザ CF-6400 (ONO SOKKI) に入力、チャンネル数 4 ch、分解能 19.53 μ sec、サンプリング点数 2048 ポイントで記録した。なお、センサの加圧量は、ひずみゲージ式変換器 LM-2KA (KYOWA) および動ひずみ測定器 DPM-612B (KYOWA) を用いて 100g/cm² とした (Fig. 1)。

4. 測定および解析方法

本研究は、初期治療前に歯周組織の臨床症状の評価、咬合音の測定を行い、初期治療としてプラークコントロール、スケーリング、ルートプレーニングを行った。そして、初期治療終了 2 週間後¹²⁾に歯周組織の臨床症状の評価、咬合音の測定を行った。なお、初期治療の期間は約 3 ヶ月であり、その間の来院回数は平均 9.1 回であった。

咬合音の測定は、デジタルメトロノームに合わせて被験者に平均的咀嚼サイクルとされている 0.8 秒間に 1 回²³⁾のリズミカルなタッピング運動を行わせ記録した。そして、運動の不安定な初期の 5 回を除く連続した 10 回のタッピング運動時の咬合音についてパーソナルコンピュータ

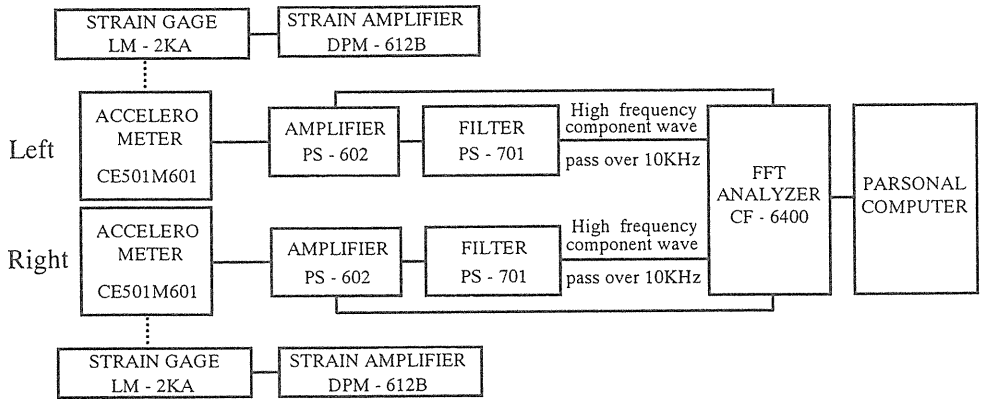


Fig. 1 Analyzing system

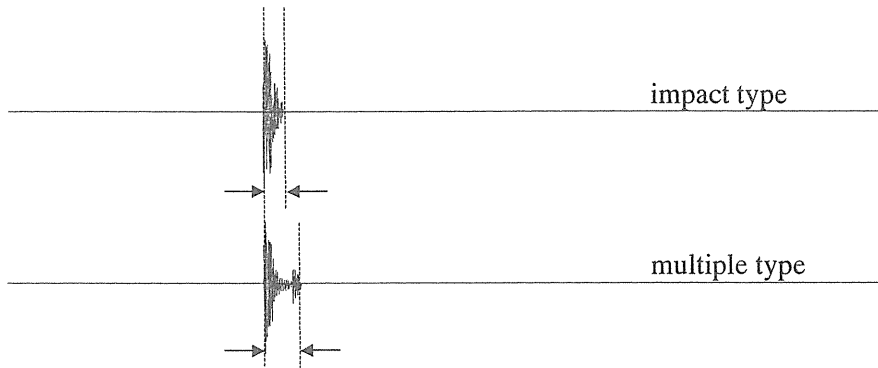


Fig. 2 Waveforms on occlusal sound

The duration of the occlusal sound was designated as the duration from the start of the occlusal sound waveform until it attenuated to 1/20 the maximum amplitude.

Dimension V350 (DELL) および波形解析ソフト DADiSP (DSP Development) を用いて波形解析を行った。

5. 解析項目

解析は以下の項目について行った。なお、咬合音については 10 回のタッピング運動時の値を平均し、各被験者の代表値として行った。各項目の検定は、対応のある t 検定を用いた。

1) 歯周組織の臨床症状の評価

初期治療前と初期治療後の PD, CAL, GI および PII を比較検討した。

2) 咬合音による歯と歯周組織の共振周波数

歯周組織の変化によって影響される低周波成分を対象に、300-2400Hz の帯域について 300Hz 帯域ごとに検討した。

3) 咬合音の高周波成分

(1) 咬合音の高周波成分の持続時間

歯の固有振動である咬合音の高周波成分²²⁾を用い咬合音波形の立ち上がりから最大振幅の 20 分の 1 に減衰するま

でを持続時間とした (Fig. 2)。

なお、咬合音の持続時間は各被験者において左右側で長い方を用い検討した。

(2) 咬合音の高周波成分の波形数

咬合音の波形数は石井¹⁸⁾の方法に準じ、2 波形以上を多峰性として出現頻度を検討した (Fig. 2)。

成績および考察

1. 歯周組織の臨床症状の評価

歯周組織の臨床症状の評価を Table 1 に示した。

PD は初期治療前 $3.51 \pm 0.41\text{mm}$ が初期治療後 $2.79 \pm 0.36\text{mm}$, CAL は初期治療前 $3.48 \pm 0.71\text{mm}$ が初期治療後 $3.41 \pm 0.67\text{mm}$, GI は初期治療前 1.49 ± 0.15 が初期治療後 0.37 ± 0.13 , PII は初期治療前 1.33 ± 0.18 が初期治療後 0.34 ± 0.10 であり、いずれの臨床症状の評価項目も減少傾向を示し、PD, GI, PII では有意差が認められた。

初期治療によって PD の減少をはじめとして歯周組織の

Table 1 Clinical evaluation of periodontal tissue before and after initial periodontal treatments

	PD (mm)	CAL (mm)	GI	PII
before (n=12)	3.51 (0.41)	3.48 (0.71)	1.49 (0.15)	1.33 (0.18)
after (n=12)	2.79 (0.36)	3.41 (0.67)	0.37 (0.13)	0.34 (0.10)

Results were expressed as mean (S.D.).
Significance of difference by paired t-test (**: P<0.01).

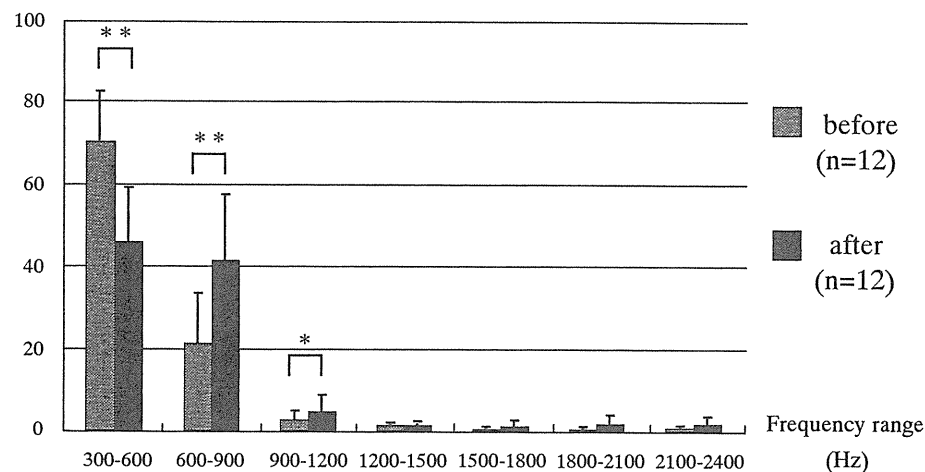
Distribution ratio
(%)

Fig. 3 Frequency distribution on occlusal sound before and after initial periodontal treatments
Significance of difference by paired t-test (**: P<0.01 *: P<0.05).

臨床症状の改善がみられたという報告²⁴⁻³⁰⁾を多く認める。苗代ら¹³⁾は、著者と同様に約3ヶ月間の初期治療によってPDは初期治療前 $3.91 \pm 1.28\text{mm}$ が初期治療後 $2.94 \pm 0.84\text{mm}$, CALは初期治療前 $5.26 \pm 2.33\text{mm}$ が初期治療後 $4.06 \pm 1.55\text{mm}$, GIは初期治療前 1.14 ± 0.34 が初期治療後 0.68 ± 0.55 , PIIは初期治療前 0.97 ± 0.38 が初期治療後 0.38 ± 0.25 に有意に改善が認められたと報告している。また、瀬戸口³¹⁾も、平均117日間の初期治療によってPDは初期治療前 $3.21 \pm 0.60\text{mm}$ が初期治療後 $2.36 \pm 0.50\text{mm}$, CALは初期治療前を0とすると初期治療後 $-0.33 \pm 0.33\text{mm}$, GIは初期治療前 1.39 ± 0.33 が初期治療後 0.44 ± 0.18 , PIIは初期治療前 1.05 ± 0.36 が初期治療後 0.19 ± 0.12 に有意に改善が認められたと報告している。

著者の成績も、苗代ら¹³⁾や瀬戸口³¹⁾の報告と類似し、ブラークコントロール、スクレーピング、ルートプレーニングという初期治療によって歯周組織の臨床症状が改善されたことを示した。

しかし、歯周組織の臨床症状の評価項目であるPD, CAL, GIおよびPIIは静的な歯周組織の状態の評価であり、歯根膜の力学的性状を客観的に表示し機能的に評価することも重要である。

そこで著者は、歯周組織の改善に伴う歯と歯周組織の変化を、機能的側面より客観的に評価することを目的として、タッピング運動時の咬合音によって歯と歯周組織の共振周波数、高周波成分の持続時間および波形数について検討を行った。

2. 咬合音による歯と歯周組織の共振周波数の検討

初期治療前後の咬合音による歯と歯周組織の周波数の分布をFig. 3に示した。

咬合音による歯と歯周組織の周波数の分布をみると、300-600Hz帯域は初期治療前72.6%が初期治療後47.2%, 600-900Hz帯域は初期治療前22.0%が初期治療後42.7%, 900-1200Hz帯域は初期治療前2.6%が初期治療後4.6%であり、初期治療後に300-600Hz帯域の周波数成分の有意な減

少と、600-900Hz 帯域および 900-1200Hz 帯域の周波数成分の有意な増加を認めた。

歯周疾患に罹患すると、歯根膜中の結合繊維の破壊、歯槽骨の破壊、血管の拡張や血管周囲の結合繊維の破壊によって歯周組織中の組織液が流れ易くなるため、歯根膜の粘性、弾性共に低下し、打振時の歯のスペクトル幅やピーク波形に変化がみられ³²⁾、歯と歯周組織を系とした共振周波数が低下する³³⁾と報告されている。また、矯正治療において、保定前と保定期間内での周波数の変動は、保定期間が経過し臨床的動揺度が軽度になるにつれピーク周波数は高域にシフトしたと報告されている¹¹⁾。

これらの報告から、粘弾性の低下による動揺の増加に伴い歯と歯周組織の共振周波数は低下し、動揺の改善に伴い歯と歯周組織の共振周波数は高域にシフトすることが考えられる。

著者の共振周波数における検討では、初期治療前と比較し初期治療後では 300 - 600Hz 帯域の周波数成分の有意な減少と、600-900Hz 帯域および 900-1200Hz 帯域の周波数成分の有意な増加を認めたことは、歯周炎の改善によって歯と歯周組織の結合が改善され、共振周波数が高域にシフトしたことを意味していると考えられる。

本研究における 300Hz ごとの周波数帯域の検討によって、歯周炎の改善に伴う歯と歯周組織の変化を共振周波数の変化として捉えることができた。このことから、これら周波数成分の変化を検討することによって、歯と歯周組織の変化について口腔を単位として機能的な一側面より評価できるといえる。

3. 咬合音の高周波成分の検討

1) 咬合音の高周波成分の持続時間

咬合音の高周波成分の持続時間を Table 2 に示した。

初期治療前の持続時間は 2.42 msec、初期治療後は 2.11 msec であり、有意に短い値を認めた。

高周波成分の持続時間を検討した吉野³⁴⁾は、健全歯列者群で約 1 msec から約 2 msec、佐藤³⁵⁾は 1.96 msec であると報告している。著者の初期治療後の成績はこれら健全歯列者群に近づく傾向が認められたことから、歯周炎の改善によって咬合接触状態が改善されたことを示したものと見える。検討対象とした周波数帯域は異なるが、50Hz から 2.5KHz を対象とした村本³⁶⁾、貴船³⁷⁾、350Hz から 10 KHz を対象とした本間³⁸⁾も著者と同様に歯周炎の改善に伴う咬合音の持続時間の減少を報告しており、著者の成績を裏付けるものと考えられる。

歯周疾患に罹患し炎症が進展すると、炎症性細胞が歯根膜に浸潤、波及し歯根膜主線維の破壊が起これば歯根と歯槽骨の線維性結合力を弱めることになり、歯周組織の粘弾性が変化し、動揺を伴い咬合接触状態に変化を及ぼすようになると考えられる。また、歯根膜内に拡大した炎症が軽

Table 2 Duration time on occlusal sound before and after initial periodontal treatments

Duration time (msec)	
before (n=12)	2.42 (0.26)
after (n=12)	2.11 (0.34)

Duration time on occlusal sound were measured on High-frequency components.

Results were expressed as mean (S.D.).

Significance of difference by paired t-test (**: P<0.01).

Table 3 Frequency of multiple peaks on waveform of the occlusal sound before and after initial periodontal treatments

Frequency	
before (n=12)	0.86 (0.17)
after (n=12)	0.53 (0.23)

Results were expressed as mean (S.D.) in Frequency.

Significance of difference by paired t-test (**: P<0.01).

減されると、血管周囲の形質細胞やリンパ球の浸潤は次第に減少し、その部位に線維芽細胞が出現し、血管周囲に輪状の線維増殖を生じる³⁹⁾。これによって歯根膜の主線維である膠原線維が産生され、歯根膜の再生が行われ歯根膜の粘弾性が向上すると考えられる。

したがって、高周波成分の持続時間が初期治療後に有意に短い値を認めたことは、初期治療によって歯周組織の炎症が改善され、歯根膜線維の再生によって歯根膜の粘弾性が向上した結果、歯の動揺が改善され咬合接触時における不安定な咬頭滑走が減少したものと考えられる。

2) 咬合音の高周波成分の波形数

咬合音の高周波成分の波形数を Table 3 に示した。

多峰性の出現頻度は、初期治療前は 0.86、初期治療後は 0.53 であり、有意に低い値を認めた。

咬合音の高周波成分の波形は咬合接触による衝撃に対応していることから、不安定な咬合接触からより安定した咬合位に滑走し、その咬合干渉の大きさによって 1 波形または 2 波形以上の咬合音波形が出現することが報告¹⁸⁾されている。覚道⁴⁰⁾は歯の咬合接触状態が安定であれば、初めに位置した咬合接触位からさらに顎を閉じることは不可能であり、対合歯の咬頭の滑走は起こらないと報告している。干渉装置を用いた検討⁴¹⁾や欠損群および補綴群の検討¹⁸⁾においても咬合音波形の多峰性の出現頻度は、咬合状態が

不安定なときに高いと報告され、2波形以上の出現頻度について石井¹⁸⁾は、補綴群 71.0%、欠損群 94.5% であると報告している。

著者の初期治療前の成績は、石井¹⁸⁾の補綴群、欠損群と類似した値を認め、歯周炎による咬合接触の不安定さが考えられる。言い換えれば、歯周疾患に罹患し、歯周組織の粘弾性が低下し歯の動揺が生じている場合などは、対合歯との咬合接触が不安定になり、最初の咬合接触から顎をさらに閉じることができ、より安定な咬合接触位に滑走運動すると考えられる。そして、初期治療前の多峰性の出現頻度が高いことは、咬合接触の規則性や再現性が低いことを意味しており、歯周組織の炎症によって咬合接触状態が不安定になっていたと考えられる。

それに対し、初期治療後で多峰性の出現頻度が有意に低くなったことは、歯周組織の炎症が改善されて歯根膜の粘弾性が向上したことによって、歯の動揺が改善され、咬合の安定性が増したことを示しているといえる。

このように咬合音の高周波成分の持続時間および波形数によって、歯周炎の改善による咬合接触の安定性を捉えることができた。このことから、咬合音の高周波成分の持続時間および波形数を検討することによって、歯と歯周組織の変化について口腔を単位として機能的な一側面より評価できるといえる。

動揺歯と非動揺歯とは歯肉縁下細菌叢が異なる⁴²⁾こと、動揺が大きい歯と小さい歯とは骨縁上結合組織のコラーゲン量や血管分布が異なる⁴³⁾こと、歯の動揺が大きい場合には、たとえ浅いポケットといえどもポケット内の炎症が強い可能性が推察される⁴⁴⁾ことなど、動揺度を診査することの重要性が指摘されている。特に、歯の動揺が歯周組織の付着の喪失を引き起こすリスクファクターの一つである^{45,46)}と指摘されていることから考えると、動揺の変化を的確に診断することが重要で、そのためには僅かな咬合接触の変化も知ることができる咬合音の診断的意義は大きいといえる。

以上のように、初期治療前後の歯周組織の改善状態をタッピング運動時の咬合音によって検討したところ、歯と歯周組織の共振周波数、高周波成分の持続時間および波形数によって歯周炎の改善状態を明らかにすることができた。このことは、咬合者によって歯周組織の改善について口腔を単位として機能的側面より客観的に評価できることを示唆したものといえる。

結 論

歯周炎の改善に伴う歯と歯周組織の変化を機能的側面より客観的に評価することを目的として、歯周疾患患者の初期治療前後の咬合音について、歯と歯周組織の共振周波数、高周波成分の持続時間および波形数の検討を行い、以下の

結論を得た。

1. 歯周組織の臨床症状の評価

初期治療前と比較し初期治療後では、PD、GI、PIIの有意な改善を認めた。

2. 咬合音による歯と歯周組織の共振周波数

共振周波数は、初期治療前と比較し初期治療後では、300-600Hz帯域の周波数成分の有意な減少と、600-900Hz帯域および900-1200Hz帯域の周波数成分の有意な増加を認めた。

3. 咬合音の高周波成分

1) 咬合音の高周波成分の持続時間

高周波成分の持続時間は、初期治療前と比較し初期治療後では有意に短い値を認めた。

2) 咬合音の高周波成分の波形数

咬合音の波形の多峰性の出現頻度は、初期治療前と比較し初期治療後では、有意に低い値を認めた。

以上のように、初期治療前後における歯周組織の改善状態をタッピング運動時の咬合音によって検討したところ、歯と歯周組織の共振周波数、高周波成分の持続時間および波形数によって歯周炎の改善状態を明らかにすることができた。このことは、咬合音によって歯周組織の改善について口腔を単位として機能的側面より客観的に評価できることを示唆したものといえる。

なお、本研究の一部は、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業の補助を受けて行われたことを付記する。

謝辞 稿を終わるに臨み、終始御指導を賜った本学口腔診断学講座笹原廣重教授に深い感謝の意を捧げるとともに、御校閲を頂きました生理学講座古山俊介教授、歯内療法講座山崎宗与教授ならびに歯周病学講座小方頼昌教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に種々の御協力を頂きました本学口腔診断学講座齊藤孝親助教授、伊藤孝訓専任講師および吉野祥一専任講師ならびに口腔診断学講座員各位に御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Mühlemann, H. R.: Periodontometry. A method for measuring tooth mobility. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 4: 1220-1233, 1951.
- 2) 木村一雄, 石橋真澄: ダイアルゲージを応用した歯牙動揺測定器について. 口腔病学会誌, 19: 115-117, 1952.
- 3) Picton, D. C. A: A study of normal tooth mobility and the changes with periodontal disease. Dent practit. 12: 167-173, 1962.
- 4) 梶井 徹: 新しい装置による歯の生理的動揺の大きさとその性質について. 日補綴歯会誌, 11: 129-151, 1967.
- 5) 芹澤千洋: 歯の打診音の測定についての基礎的研究. 日歯周病会誌, 18: 42-49, 1976.
- 6) Schulte, W., d'Hoedt, B., Lukas, D., et al.: Periotest-neues Me β -verfahren der Funktion des Parodontiums. Zahnarzt Mitt. 73: 1229-1240, 1983.
- 7) d'Hoedt, B., Lukas, D., Mühlbradt, L., et al.: Das Periotestver-

- fahren-Entwicklung und klinische Prüfung. Dtsch Zahnartzl Z, 40 : 113-125, 1985.
- 8) 倉島晃一：歯周組織の力学的性状に関する研究—とくに歯根膜および歯槽骨について—。口腔病会誌, 30 : 361-385, 1963.
 - 9) Noyes, D. H. and Solt, C. W.: Relationship Between "Tooth Mobility" and "Mechanical Mobility of Teeth". J Periodotol, 43 : 301-303, 1972.
 - 10) 小林健二, 奥村康彦：歯の槌打による歯周組織の衝撃応答に関する研究。日歯保存誌, 36 : 206-224, 1993.
 - 11) 更谷啓治：歯周組織支持構造の動特性解析。日補綴歯会誌, 29 : 683-698, 1985.
 - 12) 苗代 明, 沼部幸博, 鴨井久一：イニシャルプレパレーション前後における咬合力の変化に関する研究—第1報スケーリング・ルートプレーニング処置前後の変化について—。日歯周病会誌, 36 : 902-911, 1994.
 - 13) 苗代 明, 沼部幸博, 鴨井久一：歯周病患者の歯周治療前後における咬合力および咬筋の筋活動量に関する研究。日歯周病会誌, 40 : 279-291, 1998.
 - 14) 雨宮幸三：咬合音に関する研究。歯科医学, 35 : 625 - 656, 1972.
 - 15) Brenman, H. S.: Gnathosonics and Occlusion. Front Oral Physiol, 1 : 238-256, 1974.
 - 16) 伊藤 裕：咬合音の振動伝達に関する研究。日補綴歯会誌, 23 : 634-653, 1979.
 - 17) 中山一郎：咬合音と歯牙接触時期に関する研究。日補綴歯会誌, 29 : 1374-1387, 1985.
 - 18) 石井広志：咬合接触の様相と咬合音の高周波成分に関する研究。日口腔診断会誌, 5 : 277-286, 1992.
 - 19) 野崎勝也：咬合音の解析に関する基礎的研究。日大口腔科学, 8 : 16-26, 1982.
 - 20) Loe, H. and Sillness, J.: Periodontal disease in pregnancy. I.: Prevalence and severity. Acta Odontol Scand, 21 : 533 - 551, 1963.
 - 21) Sillness, J. and Loe, H.: Periodontal disease in pregnancy. II.: Correlation between oral hygiene and periodontal condition. Acta Odontol Scand, 22 : 121-135, 1964.
 - 22) 船越光豊：咬合音の高周波成分に関する基礎的研究。日大口腔科学, 13 : 145-155, 1987.
 - 23) Woelfel, J. B., Hickey, J. C. and Allison, M. L.: Effect of posterior tooth form on jaw and denture movement. J Prosthet Dent, 12 : 922-939, 1962.
 - 24) Badersten, A., Nilvéus, R. and Egerberg, J.: Effect of nonsurgical periodontal therapy. I. Moderately advanced periodontitis. J Clin Periodontol, 8 : 57-72, 1981.
 - 25) Badersten, A., Nilvéus, R. and Egerberg, J.: Effect of nonsurgical periodontal therapy II . Severely advanced periodontitis. J Clin Periodontol, 11 : 63-76, 1984.
 - 26) Badersten, A., Nilvéus, R. and Egerberg, J.: Effect of non-surgical periodontal therapy IV . Operator variability. J Clin Periodontol, 12 : 190-200, 1985.
 - 27) Lindhe, J. and Nyman, S.: Scaling and granulation tissue removal in periodontal therapy. J Clin Periodontol, 12 : 374 - 388, 1985.
 - 28) Morrison, E. C., Ramfjord, S. P. and Hill, R. W.: Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). J Clin Periodontol, 7 : 199-211, 1980.
 - 29) 横田 誠, 鬼ヶ原真人, 深野木健, 他：初期治療後の歯周ポケットの改善について。日歯周病会誌, 25 : 216-224, 1983.
 - 30) 本田 亘：初期治療におけるブラーク, 歯肉および歯周ポケットの推移について。日歯周病会誌, 25 : 160-177, 1983.
 - 31) 瀬戸口尚志：初期治療に伴う歯周病患者の末梢血及び歯肉溝多形核白血球機能の変化について。日歯周病会誌, 30 : 466 - 480, 1988.
 - 32) 大倉博顕：歯及び歯周組織の周波数測定について—ユニットパルス加振と高速フーリエ変換機による解析—。日歯周病会誌, 24 : 54-83, 1982.
 - 33) 永田一夫：歯周組織の周波数応答に関する研究。日補綴歯会誌, 20 : 375-392, 1976.
 - 34) 吉野祥一：咬合音の高周波成分における動的診断に関する基礎的研究。日大口腔科学, 14 : 272-282, 1988.
 - 35) 佐藤 繁：クリック有雑音者の動的な咬合状態と咀嚼筋活動に関する検討。日口腔診断会誌, 13 : 263-274, 2000.
 - 36) 村本達也, 田口 智, 朝妻八男, 他：歯周炎罹患者に対する初期治療の咬合音への影響。日歯周病会誌, 30 : 248-254, 1988.
 - 37) 貴船亮英, 本間修平, 原 耕三：咬合音診断機器の改良試作。日歯周病会誌, 27 : 482-491, 1985.
 - 38) 本間修平：咬合治療の効果と咬合音診断。日歯周病会誌, 26 : 667-683, 1984.
 - 39) 秋吉正豊：歯周組織の構造と病理—歯周病学—。歯薬出版, 東京, 215-251, 1962.
 - 40) 覚道幸男：床義歯の生理学。学研書院, 東京, 5-108, 1980.
 - 41) 永井邦彦：咬頭滑走における咬合音の高周波成分について。日大口腔科学, 16 : 64-73, 1990.
 - 42) Grant, D. A., Grant, A. D., Flynn, M. J., et al.: Periodontal Microbiota of Mobile and Non-Mobile Tooth. J Periodotol, 66 : 386-390, 1995.
 - 43) Neiderud, A.-M., Ericsson, I. and Lindhe, J.: Probing pocket depth at mobile/nonmobile teeth. J Clin Periodontol, 19 : 754-759, 1992.
 - 44) 川崎 潤, 田代芳之：非外科的歯周治療による歯周ポケットの反応に対する歯の動揺の影響。九州歯会誌, 53 : 215-224, 1999.
 - 45) Wang, H.-L., Burgett, F. G., Shyr, Y., et al.: The Influence of Molar Furcation Involvement and Mobility on Future Clinical Periodontal Attachment Loss. J Periodotol, 65 : 25 - 29, 1994.
 - 46) Flesazar, T., Knowles, J., Morrison, E., et al.: Tooth mobility and periodontal therapy. J Clin Periodontol, 7 : 495-505, 1980.

直感的思考様式に関連した事象関連電位の成分分析

井 田 聡 子

Components Analysis of Event-related Potentials Associated with Intuitive Diagnostic Strategies

SATOKO IDA

Abstract : The purpose of the present study was to clarify the reasoning used in diagnosing dental diseases. Cognitive-scientific examination was performed with chronic periodontitis, one of the most frequently encountered diseases in the clinical setting, as the task, using the event-related potential method to obtain objective data.

The subjects were 6th grade students and resident dentists in our university including 34 males and 9 females. The task was to discriminate mandibular anterior gingiva which had chronic periodontitis from normal gingiva using their color photographs. Rare stimulation (periodontitis) and frequent stimulation (normal gingiva) were presented to the subjects as 30% and 70%, respectively.

In experiments, 2 experimental series were prepared with different difficulty levels. In task 1, ERP was recorded using chronic periodontitis with moderate advanced inflammation as rare stimulation and normal gingiva as frequent stimulation (hereinafter referred to as simple cognition). In task 2, chronic periodontitis with slightly advanced inflammation was observed as rare stimulation and normal gingiva as frequent stimulation; thus, the task in the latter case featured less difference between stimuli (hereinafter referred to as difficult cognition).

The experimental method was as follows: The subjects, with an electric pole mounted on the head, were made to sit quietly on a chair in a shielded room. Their head was fixed on a jaw holder, and the task was presented, 100 times every 3,000 msec, with the monitor located 50 centimeters in front. The brain waves induced at every presentation were recorded by digital electroencephalography. The baseline potential at 100 msec, immediately before the start of stimulation was set at $0\mu V$. The waveform at the time of correct response within the interval of 944 msec, from the start of stimulation was added for the subject in order to obtain the mean added waveform. ERP derived from Fz was examined by the peak identification method, hitting ratio of discrimination, RT (response time), and principal component analysis. The following conclusions were obtained.

1. N2b latent time was shorter for simple than difficult cognition ($p<0.01$).
N2b amplitude was higher for simple than difficult cognition ($p<0.01$).
 2. The hitting ratio of correct responses was higher for simple than difficult cognition ($p<0.01$).
RT was shorter for simple than difficult cognition ($p<0.01$).
 3. P300 amplitude was higher for simple than difficult cognition ($p<0.05$).
 4. Principal component analysis revealed 7 and 6 principal components for simple and difficult cognitions, respectively. The N2b component was extracted for both simple cognition and difficult cognition. The MMN component was extracted for simple cognition while the SW latter-stage component was extracted as the 1st principal component for difficult cognition.
 5. There was no significant difference between simple and difficult cognition in N100 and N200 latent time and amplitude.
- These findings suggested that in the case of simple discrimination, pattern recognition, which is a more intuitive form of diagnostic strategies, is used, whereas in the case of difficult discrimination, differentiation is performed by functional information processing rather than intuitive diagnostic strategies.

Key words : event-related potential (ERP) (事象関連電位), pattern cognition (パターン認知), diagnostic strategies (診断プロセス), information processing (情報処理過程)

[Received Feb. 8, 2005]

日本大学松戸歯学部口腔診断学講座 (主任: 伊藤孝訓助教授)

Department of Oral Diagnostics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Ass. Prof. TAKANORI ITO) 2-870-1 Sakae-cho Nishi, Matsudo 271-8587, Japan.

緒 言

医師が診断するときの思考過程は、Sackett¹⁾によるとパターン認識、多分岐法、仮説-演繹法、徹底的除外法が代表的な4つの思考様式であるといわれている。特に仮説-演繹法は医師が用いることの最も多い思考様式といわれ、最初に仮説が頭の中に思い浮かぶ心理認知過程については、パターン認識が関与するといわれるが明らかでない。

医師の診断思考過程の研究は、古くから計量診断学や臨床判断学の分野²⁻⁵⁾で行われている。これまで用いられてきた実験方法は、ビデオテープを用いた想起法⁶⁾や質問紙による聴取方法^{7,8)}による研究が主体をなしているが、客観的な実験による試みは未だ少なく明らかでない。そこで本研究は客観的なデータを得る方法として、脳活動の非侵襲的測定法である脳波、特に事象関連電位 (Event-related potential: ERP)⁹⁾を用いて、診断思考過程を明らかにすることを試みた。ERPは刺激入力と反応出力との間に介在する脳内の心的活動を msec 単位で分析できるという特徴を持っている。潜時約 100msec を境にして、それより長潜時のものは様々な実験パラダイムに際して、選択的注意や認知機能を反映し変動することが知られている。そこで実験課題に対する被験者の行動指標に加えて ERP を記録すれば、刺激入力と反応出力との間に介在する情報処理プロセスの解明に役立つと考えられる。ERP の諸成分のうち、とくに注目されているものが P300 と呼ばれる成分で、1965 年に Sutton ら¹⁰⁾によって発見され刺激呈示後約 300msec に出現する陽性波であり、情報呈示による被験者の心理的不確実さの解決に関連して出現し、刺激の情報内容により変動する内因性の電位である。臨床応用としては、痴呆疾患の認知機能評価¹¹⁾、抗痴呆薬の効果判定¹²⁾、精神疾患への応用¹³⁾、高次脳機能障害の評価¹⁴⁾、うそ発見機への活用¹⁵⁾などが報告されている。このように、人間の脳活動について ERP を用いて測定することは診断思考過程を研究するツールとして有用な検討法の一つと考えられる。

今回、臨床の場において多く遭遇する疾患である慢性歯周炎を課題として、鑑別診断の際の思考過程、特に初期の直感的思考様式を明らかにすることを目的に、ERP を指標とした認知科学的¹⁶⁾な検討を試みた。

被験者および実験方法

1. 被験者

被験者は実験に支障のない程度の視力を有する本学在学中の 6 年次学生および臨床研修歯科医で男性 34 名、女性 9 名、平均年齢 24.7 歳を対象とした。なお被験者はすべて右利きで、過去に精神神経疾患の既往のない健常者を対象とした。

本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認と、各被験者に対して実験の趣旨を説明し同意を得て行われている (承認番号: EC03-004 号)。

2. 課題

課題は下顎前歯部が慢性歯周炎に罹患した歯肉と、正常歯肉のカラー写真を用いた慢性歯周炎の弁別で、oddball 課題に準じて標的刺激 (Rare 刺激) を 30%、非標的刺激 (Frequent 刺激) を 70% とした。課題は弁別の難易度により 2 つの実験系を組んだ。第 1 課題は Rare 刺激として炎症の進行が重度な慢性歯周炎、Frequent 刺激として正常歯肉 (以下、簡単な認知とする) を用い、第 2 課題は Rare 刺激として炎症の進行が軽度な慢性歯周炎、Frequent 刺激として正常歯肉で、歯肉形態の差があまりない課題 (以下、困難な認知とする) を用いて ERP を記録した。課題に用いた写真を Fig. 1 に示す。

3. 課題の呈示方法

実験方法はシールドルーム内にて電極を装着した被験者を椅子に安静な状態で座位をとらせ、頭部を頸乗せ台にて固定し 50cm 前方にある画像呈示用モニターに 3,000msec ごとに課題を 100 回呈示し、その際誘発される脳波を記録した。実験を行う前にモニターにて正常歯肉および慢性歯周炎の課題を見せて、Rare 刺激が呈示されたときボタンを押すよう指示した。

4. 測定方法

脳波は国際 10-20 法¹⁷⁾に基づき、正中前頭部 (Fz)、正中中心部 (Cz)、および正中頭頂部 (Pz) の 3ヶ所より両側耳朶連結を基準とし、ボディアースを前頭極 (Fpz) として脳波皿電極を用いて導出した。ERP 記録解析システム¹⁸⁾を Fig. 2 に示す。視覚刺激である課題を画像呈示用モニターに画像サイズ 140 × 260mm にて呈示し、その際誘発される脳波をデジタル脳波計 SYNAFIT EE 5800 (NEC メディカルシステムズ社) で記録した。帯域周波数は低域遮断フィルタ 0.05Hz、高域遮断フィルタ 100Hz にて記録した。反応時間 (RT) は課題呈示開始から判断しボタン押しをするまでとして、Multi Trigger System 2001 (メディカルトライシステム社) にて計測した。

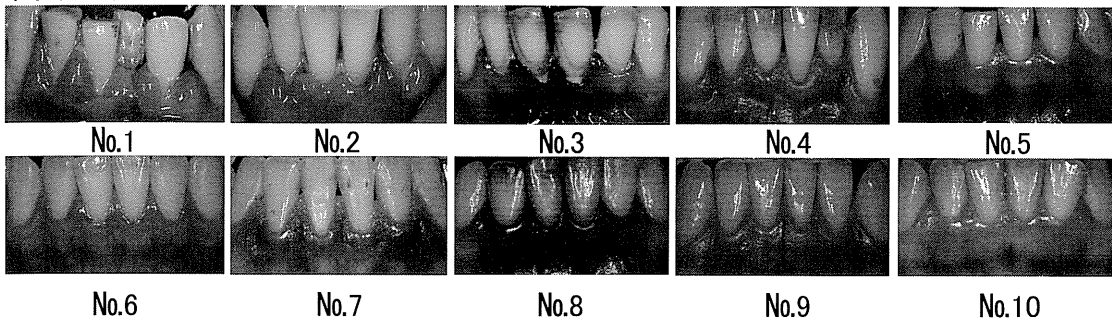
5. 解析項目

ERP の解析は眼球運動による眼球電図 (EOG) を同時測定し、EOG の振幅が ± 100 μV を越える時にはアーチファクトの混入ととらえ除外した¹⁷⁾。刺激開始直前 100msec の平均電位を基準電位 0 μV とした。サンプリングポイント 1 msec にて行い、刺激開始より 944msec の区間について被験者ごとに正反応時の波形を加算し、加算平均波形を求めた。また、Fz から導出した ERP^{18,19)}について以下の項目を検討した。

1) 総加算平均波形

各被験者の加算平均波形をさらに 43 名分加算平均して

簡単な認知



困難な認知

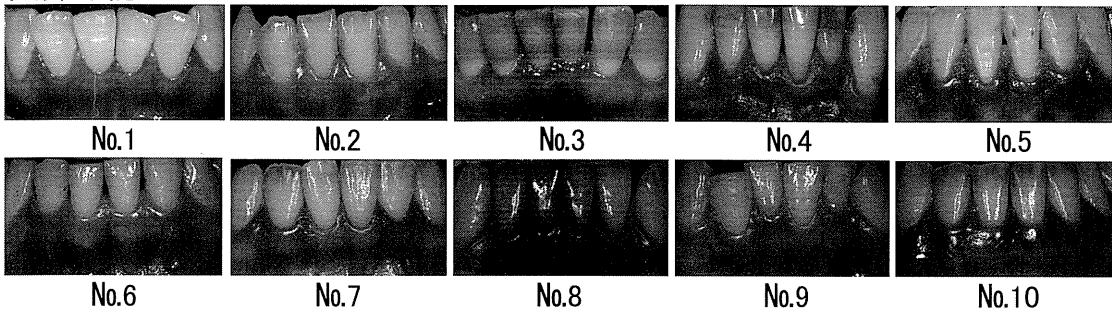


Fig. 1 課題の写真

簡単な認知と困難な認知ともに Rare 刺激で No 1 ~ 3, Frequent 刺激で No 4 ~ 10 を用いた。

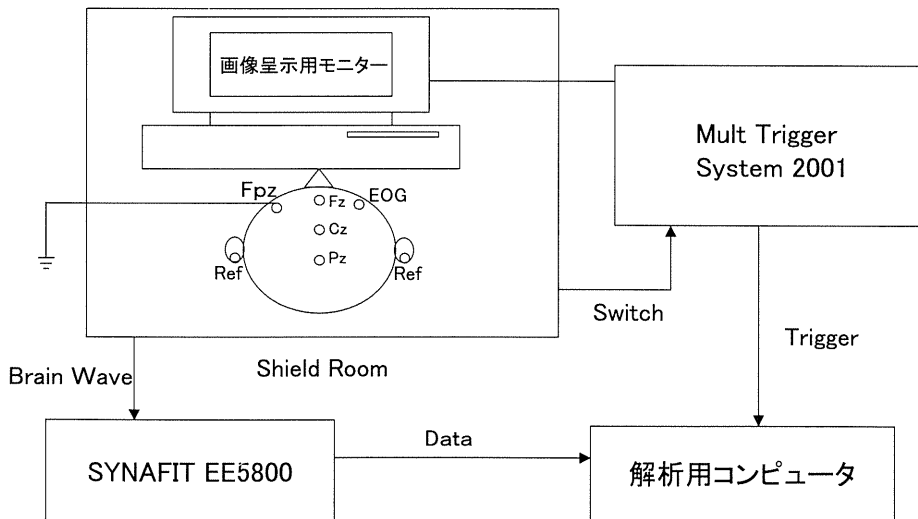


Fig. 2 ERP 記録解析システム

求めた。

2) 頂点同定法

波形の潜時と振幅は、被験者ごとの加算平均波形を以下の time-window に準じ設定した。模式図を Fig. 3 に示す。

N100：刺激開始より 75 ~ 125msec 間にある最大振幅を持つ陰性成分

N200：刺激開始より 170 ~ 230msec 間にある最大振幅

を持つ陰性成分

MMN：Rare 刺激の波形から Frequent 刺激の波形を引き算した波形において、刺激開始より 170 ~ 200msec 間にある最大振幅を持つ N200^{19, 20)} の下位成分

N2b：Rare 刺激の波形から Frequent 刺激の波形を引き算した波形において、刺激開始より 200 ~ 230msec 間にある最大振幅を持つ N200 の下位成分

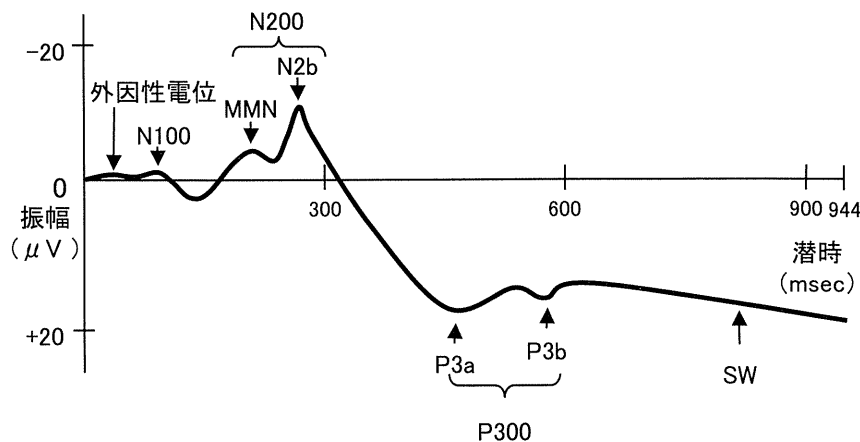


Fig. 3 ERP の模式図
横軸は潜時，縦軸は振幅を示す。

- N100 : 刺激開始より 75-125msec 間にある最大振幅を持つ陰性成分
 N200 : 刺激開始より 170-230msec 間にある最大振幅を持つ陰性成分
 MMN : Rare 刺激の波形から Frequent 刺激の波形を引き算した波形において，刺激開始より 170-200msec 間にある最大振幅を持つ N200 の下位成分
 N2b : Rare 刺激の波形から Frequent 刺激の波形を引き算した波形において，刺激開始より 200-230msec 間にある最大振幅を持つ N200 の下位成分
 P300 : 刺激開始より 250-600msec 間にある最大振幅を持つ陽性成分
 P300 波形のほぼ前半部に出現する成分を P3a，それよりも後半部に出現する成分を P3b とする。
 SW 前期：刺激開始より 600-750msec 間にある最大振幅を持つ波形成分
 SW 後期：刺激開始より 750-944msec 間にある最大振幅を持つ波形成分

P300：刺激開始より 250～600msec 間にある最大振幅を持つ陽性成分

P300 波形のほぼ前半部に出現する成分を P3a，それよりも後半部に出現する成分を P3b とする。

SW 前期：刺激開始より 600～750msec 間にある最大振幅を持つ波形成分

SW 後期：刺激開始より 750～944msec 間にある最大振幅を持つ波形成分

なお，time-window 内の電圧の peak 値を各波形成分の振幅とし，その時の時間を各波形成分の潜時として求めた。

3) 主成分分析

主成分分析に用いたデータは，まず始めに被験者ごとの加算平均波形を 15msec ごとに平均して 63 ポイントの電位を求めた。そして各データポイントの電位を変数として，バリマックス法を用いて主成分分析を行った。主成分は固有値 3.1 以上，因子負荷量は 0.7 以上の部分を抽出した。抽出された主成分については，上記の time-window を用いて ERP 成分を同定し，認知の違いについては ERP 成分の出現傾向より検討した。

4) 弁別の適中数および RT

課題の判断について適中数と RT を集計した。Rare 刺激と判断した際の正解数を示す正反応数，Frequent 刺激と判断した際の正解数を示す非選択反応数を求めた。

5) 検定方法

検定は Mann-Whitney の U 検定にて行った。検定ソフトは SPSS 10.0J を用いて行った。

結 果

1. 総加算平均波形

総加算平均波形を視察すると簡単な認知および困難な認知において Rare 刺激，Frequent 刺激ともに潜時約 100 msec と 250msec 付近に頂点をおく陰性波と，その後にくるかな陽性波が波形の構成成分であった。このような波形の形状から陰性頂点を N100 成分と N200 成分と断定した (Fig. 4)。

2. 頂点同定法

N100 潜時は簡単な認知で 90msec，困難な認知で 90msec であり，N100 振幅は簡単な認知で $3.1 \mu V$ ，困難な認知で $3.7 \mu V$ であった。簡単な認知と困難な認知に潜時，振幅とも差は認められなかった (Table 1)。

N200 潜時は簡単な認知で 202msec，困難な認知で 207msec であり，N200 振幅は簡単な認知で $6.5 \mu V$ ，困難な認知で $6.6 \mu V$ であった。簡単な認知と困難な認知に潜時，振幅とも差は認められなかった (Table 1)。

P300 潜時は簡単な認知で 539msec，困難な認知で 514msec であり，潜時において簡単な認知と困難な認知に差は認められなかった。P300 振幅は簡単な認知で

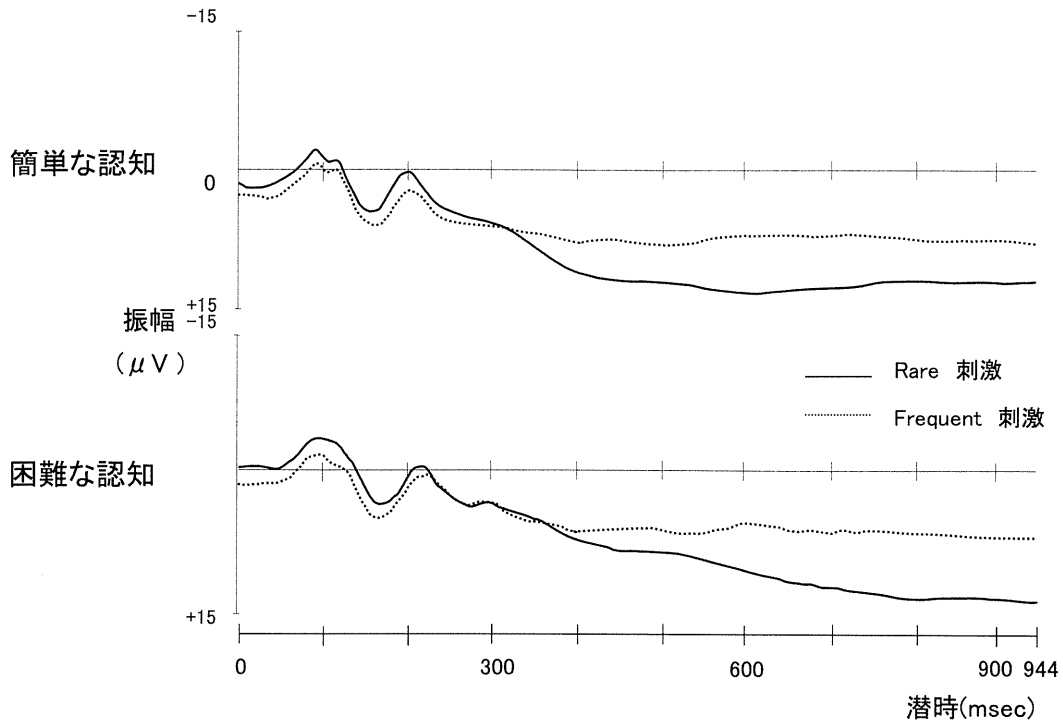


Fig. 4 総加算平均波形
 縦軸:振幅 横軸:潜時 各被験者の加算平均波形を更に加算平均した総加算平均波形について、Rare 刺激と Frequent 刺激を重ね書きしたものを示す。

Table 1 N100, N200, P300 の潜時および振幅

	潜時 <msec>			振幅 <μV>		
	N100	N200	P300	N100	N200	P300
簡単な認知	90 (16)	202 (14)	539 (71)	3.1 (3.2)	6.5 (3.8)	15.1 (7.0)**
困難な認知	90 (17)	207 (14)	514 (99)	3.7 (3.7)	6.6 (4.3)	12.0 (5.4)

n = 43

() : SD

** : Mann-Whitney's U-test (P<0.05)

Table 2 MMN, N2b の潜時および振幅

	潜時 <msec>		振幅 <μV>	
	MMN	N2b	MMN	N2b
簡単な認知	228 (32)	310 (37)*	3.9 (3.3)	3.8 (3.2)*
困難な認知	235 (34)	335 (37)	4.0 (3.5)	2.4 (3.7)

n = 43

() : SD

* : Mann-Whitney's U-test (P<0.01)

15.1 μV, 困難な認知で 12.0 μV であり、振幅において簡単な認知と困難な認知に有意な差が認められ、簡単な認知で高かった (P < 0.05) (Table 1)。

MMN 潜時は簡単な認知で 228msec, 困難な認知で 235msec であり、MMN 振幅は簡単な認知で 3.9 μV, 困難な認知で 4.0 μV であった。簡単な認知と困難な認知に潜時、振幅とも差は認められなかった (Table 2)。

N2b 潜時は簡単な認知で 310msec, 困難な認知で 335msec であり、潜時において簡単な認知と困難な認知に有意な差が認められ、簡単な認知で短かった (p<0.01)。N2b 振幅は簡単な認知で 3.8 μV, 困難な認知で 2.4 μV であり、振幅において簡単な認知と困難な認知に有意な差が

認められ、簡単な認知で高かった (p<0.01) (Table 2)。

3. 主成分分析

簡単な認知は7つの主成分(累積寄与率 92%)に要約され、第1主成分は P3a 成分、第2主成分は P3b と SW 前期の重畳成分、第3主成分は SW 後期成分、第4主成分は外因性電位の重畳成分、第5主成分は N2b 成分、第6主成分は N100 成分、第7主成分は MMN 成分と解釈できた (Fig. 5)。

困難な認知は6つの主成分(累積寄与率 90%)に要約され、第1主成分は SW 後期成分、第2主成分は P3a 成分、第3主成分は P3b と SW 前期の重畳成分、第4主成分は外因性電位の重畳成分、第5主成分は N2b 成分、第6主

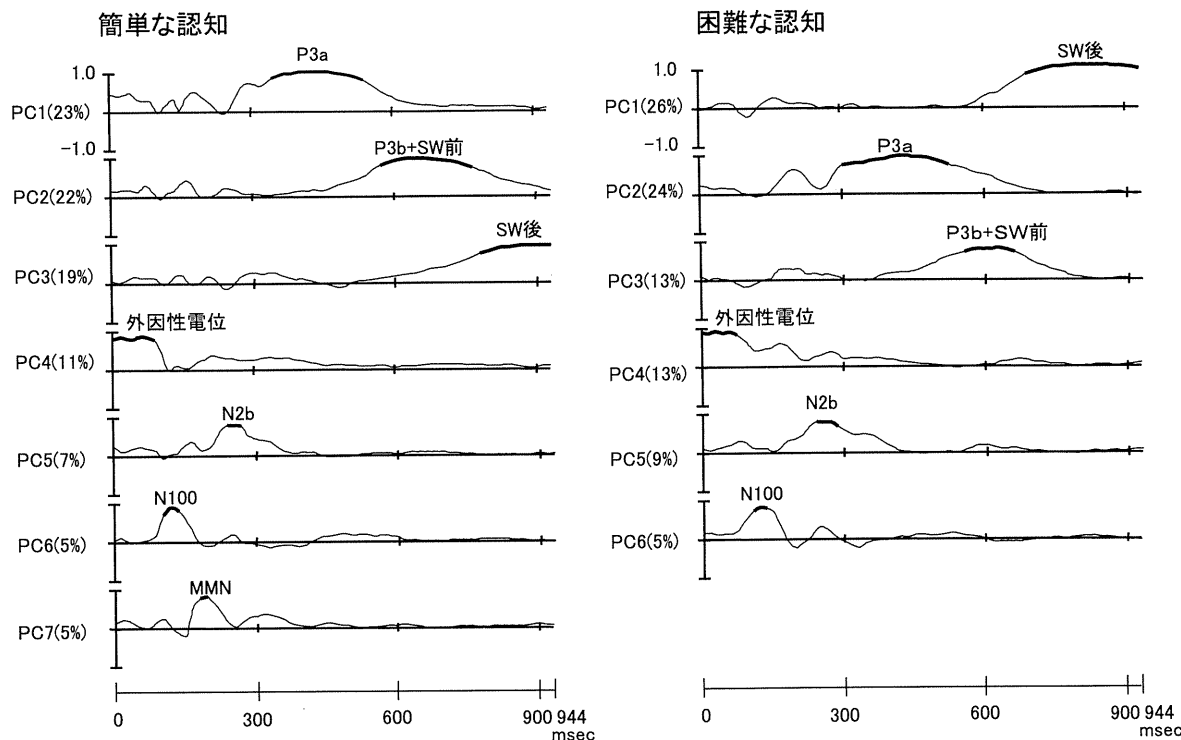


Fig. 5 主成分分析による因子負荷量と寄与率

Rare 刺激によって得られた結果を示す。縦軸：因子負荷量 横軸：潜時 太線部：因子負荷量が 0.7 以上
 PC1 ~ PC7: 第 1 主成分 ~ 第 7 主成分
 %: 寄与率 外因性電位: N100 成分より以前の重量した ERP 成分を示す。

Table 3 弁別の適中数および RT

	正反応	非選択反応	RT<msec>
簡単な認知	30 (1) *	63 (7)	557 (70) *
困難な認知	27 (5)	62 (8)	621 (63)

n = 43

(): SD

*: Mann-Whitney's U-test (P<0.01)

正反応: Rare 刺激と判断した際の真の正解数

非選択反応: Frequent 刺激と判断した際の真の正解数

RT: Rare 刺激である目的の画像を認めた際の刺激開始からボタン押しまでの平均時間

成分は N100 成分と解釈できた (Fig. 5)。

4. 弁別の適中数および RT

正反応数は簡単な認知で 30 回中 30 回、困難な認知は 30 回中 27 回であり、簡単な認知と困難な認知に有意な差が認められ、簡単な認知で正反応数が多かった ($p<0.01$) (Table 3)。非選択反応数は簡単な認知で 70 回中 63 回、困難な認知で 70 回中 62 回であり簡単な認知と困難な認知に差は認められなかった (Table 3)。

RT は簡単な認知で 557msec、困難な認知で 621msec

であり、簡単な認知と困難な認知に有意な差が認められ、簡単な認知で短かった ($p<0.01$) (Table 3)。

考 察

1. ERP の認知科学的解釈について

歯科医師は歯科疾患の診断をする際、口腔内外より多くの視覚情報を抽出し存在・進行度の判断を行っている。従来から情報処理過程を調べる方法としては、心理学が中心となり様々な情報処理モデルが構築されてきた。しかしその根拠となるデータは、質問紙などの内観法に代表される口述法やアンケート調査がほとんどであったため、客観性や信頼性において問題も少なくはなかった。その後、認知心理実験を行った際に客観的なデータとして扱うことができる RT が多く用いられるようになった^{21, 22)}。RT は実験後の行動結果も含めた情報処理過程を推測することが可能であるが、人間の情報処理過程は多様であり、RT のような行動結果のみを指標に考察していくには限界があった。

そこで近年では ERP に代表される電気生理学的な手法を用いた検討がなされている。その大きな特徴としては脳活動における電位的な変化をみることにより脳機能を推定することが可能であり、情報処理過程と反応処理過程とを分けて検討できる²³⁾ことや 1msec 程度の分析が可能であ

ることがあげられる。ERPはある事象により誘発された電位を指すものであり、およそ潜時100msecを境にしてそれより早い潜時のものを外因性電位²⁴⁾とし、遅い潜時のものを内因性電位として分類されている。外因性電位は中枢神経系外の刺激によって生じるもので、内因性電位は通常100msec以降のERP成分が認知や判断などの情報処理過程に関与しているといわれ、N100、N200、P300などが代表的な成分である。

N100は感覚刺激を呈示すると刺激の標的・非標的に関わらず必ず誘発される電位で、Hillyardら²⁵⁾は注意を向けている方の振幅が、向けていない方に比べて高くなることから、N100がチャンネル選択過程に対応する電位であると報告した。本実験のN100潜時、振幅は簡単な認知および困難な認知に差は認められなかった。この結果よりN100が反映するとされる外的事象に対する選択的注意反応は正常に働き、ほぼ同一な注意を持ちながら実験課題を遂行しているものと考えられる。

N200について、Ritterら²⁶⁾は標的弁別処理の実行中に表出する電位であると報告した。またN200は下位成分も情報処理過程の指標として用いられ、Näätänenら¹⁹⁾はRare刺激からFrequent刺激を引いた引き算波形で、持続時間の長い丘状の前頭部優勢の成分であるMMNとその後半部に重畳して出現する前頭部から頭頂部にかけて広く分布する山型成分であるN2bからなっていると説明した。MMNは刺激に注意を向けていない時にも出現する電位で自動的なミスマッチの検出過程に関連しているとされ、N2bは被験者が刺激に対して注意を向けている課題のみ出現する電位で意識的な検出過程²⁷⁾に関連していると考えられている。本実験のN200潜時、振幅は簡単な認知および困難な認知に差は認められなかった。

そこで引き算波形によって求めたN200の下位成分であるMMNとN2bについて検討を行った。MMN潜時、振幅は簡単な認知および困難な認知に差は認められなかったが、N2b潜時、振幅は簡単な認知および困難な認知に差が認められ、簡単な認知で潜時が短く振幅は高かった。潜時は情報の処理時間、振幅は脳の処理資源に関連すると考えられている。Wickensら²⁸⁾は、難易度を変化させた2種類の課題を被験者に行わせることによって、脳における処理資源の容量には限りがあり、振幅の変化は課題に配分されている処理資源の容量を反映していると報告した。すなわち情報を処理する際、比較的処理が簡単な課題であれば脳の処理資源に余裕ができるため振幅は高く、困難な課題であれば逆に振幅は低くなる。

この結果より弁別する際の自動的弁別であるミスマッチ検出過程は簡単な認知および困難な認知ともに差は認めないが、意識的な検出過程では困難な認知は弁別がしづらいいため意識的に注意をしながら処理を行った結果、簡単な認

知の方が潜時が短く振幅は高かったと考えられる。

P300は認知文脈の更新に関連する電位であり、Donchin²⁹⁾は外界の刺激に対して被験者は状況、環境および記憶をもとに常に予期しながら課題を遂行しており、予期の更新が起こるときに変動する電位であると報告している。P300潜時はRare刺激とFrequent刺激の区別が簡単などときには短く、困難などときには長くなる。一般的に約300msecから長いときには900msecあたりまで長くなり刺激評価の指標^{23,30-32)}であるといわれている。本実験のP300潜時は簡単な認知が539msec、困難な認知が514msecであり簡単な認知および困難な認知に差は認められなかった。この結果より弁別後の認知文脈の更新までの処理時間には差がないと考えられる。また本実験のP300振幅は簡単な認知が15.1 μ V、困難な認知が12.0 μ Vで、簡単な認知および困難な認知に差が認められ簡単な認知で振幅が高かった。この結果より簡単な認知が困難な認知に比べ処理資源が少なく済んでいることが考えられる。

またP300の下位成分も情報処理過程の指標として用いられており、Squiresら³³⁾はP300波形の前半部をP3a、P3aより潜時が遅い成分をP3bと名付け、P300にはP3aとP3bが含まれていると報告した。P3aは被験者がその刺激を無視していても生じる電位で受動的注意によって引き出された評価過程に関連していると考えられており、P3bは被験者に何らかの課題を課していない場合には出現しないので、その成分はP3aよりも高度な認知機能に対応していると考えられるが、頂点同定法ではP3aおよびP3bを同定することができなかった。

以上をまとめると、ERP成分のN2b潜時、振幅およびP300振幅の出現傾向に違いが認められた結果、簡単な認知と困難な認知では情報処理過程に違いがあることが示唆された。

2. 思考様式とERPについて

歯周疾患の病態とその推移は複雑であるが、臨床的診断としては歯肉炎にせよ歯周炎にせよ歯周組織に病的変化が起きて、症状が最初に認められるのが歯肉であることが多い。歯肉の病的変化を診断し治療計画を立案することが歯周治療の基礎となるのは周知の事実である。歯肉形態の異常については通常、直接視診で判断され、その形態は歯肉歯槽粘膜境から遊離歯肉溝までの付着歯肉、遊離歯肉溝より歯冠側にあるナイフエッジ状の辺縁歯肉、歯間部を埋めるピラミッド状の乳頭歯肉よりなり、ひきしまったピンク色を呈しているのが健康歯肉の特徴である。これらを知識として歯科医師が慢性歯周炎を鑑別する際、日常臨床において医療面接および診査情報と合わせて診断をしているが、視診により得られる情報量は多く、一連の診断プロセスにおいて視診は大きなウェイトをしめる。

本実験における視診とは、脳内にある歯肉の形態特徴と

標的試料である歯肉カラー写真との標本照合³⁴⁾である。この現象を大脳生理学的に説明すると、課題とした歯肉の写真である視覚刺激が大脳皮質の一次感覚野に到達し、ニューロンの電気信号としてそこで各構成要素として分解され刺激が探知される。次に各構成要素は高次感覚野以降でその特徴が抽出され刺激が何であるか、そして標的か非標的かを記憶と照合し弁別されるといわれている³⁵⁾。また認知科学的にはこの時点パターン認識といい、画像認識のプロセスは画像データの前処理(雑音除去、濃度値変換など)に続き、特徴抽出(線、領域、角の抽出など)である物理レベルでの処理、そして認識対象の理想型を特徴要素で記述した標準パターンとの照合をして認識を行う。この照合をマッチングといい、多くの標準パターンとのマッチングを重ね、最もよく似たパターンの属する対象概念を認識の結果とする。その際のマッチングは完全な一致は少なく、適当な近さの尺度の度合いをはかっているといわれている³⁶⁾。笹原ら⁸⁾は歯科疾患における診断思考過程において、歯科医師が根尖病変の X 線診断を行う際にパターン認識をどのように行っているかについて検討した結果、数量化理論第 I 類を用いて類似性による基準から 4 つの X 線像の標準パターンを抽出し、根尖病変イメージを明らかにしたと報告し、診断思考過程におけるパターン認識の重要性を示唆した。

本実験では個々の ERP 成分を比較検討するだけでなく、簡単な認知および困難な認知の一連の情報処理過程における思考様式の違いを明らかにすることを目的に主成分分析、弁別の適中数および RT による検討を行った。主成分分析は加算平均誘発電位の構成成分を統計学的に把握する有効な手法として、Rachkin ら³⁷⁾により導入され多く適用されてきた。弁別の適中数および RT は情報を処理し行動を起こした結果の指標であり、従来から認知心理実験に用いられている。

本実験では簡単な認知および困難な認知において多くの主成分を抽出することができ、簡単な認知では 7 つの主成分(累積寄与率 92%)、困難な認知では 6 つの主成分(累積寄与率 90%)が抽出できた。主成分における特徴としては N2b 成分が簡単な認知および困難な認知に抽出され、MMN 成分は、簡単な認知のみに抽出できた。また簡単な認知では第 2, 3 主成分である P3b + SW 前期成分, SW 後期成分の寄与率がそれぞれ 22%, 19%であったのに対し、困難な認知では寄与率が 13%, 26%と逆の結果となった。一方、弁別における適中数で正反応は、簡単な認知および困難な認知に差が認められ、簡単な認知で正反応数が多く、非選択反応は簡単な認知および困難な認知に差は認められなかった。RT は簡単な認知で 557msec, 困難な認知で 621msec であり、簡単な認知および困難な認知に差が認められ簡単な認知で短かった。

N2b は被験者が刺激に対して注意を向けている課題にのみ出現する電位で意識的な検出過程に関連していると考えられており、簡単な認知および困難な認知ともに意識的に注意をもって情報を処理していたことが考えられる。MMN は刺激に注意を向けていない時にも出現する電位で自動的なミスマッチ刺激の検出過程に関連していると考えられており、簡単な認知は困難な認知よりもマッチングに近い情報処理を行っていたことが考えられる。P3b + SW 前期成分, SW 後期成分の寄与率が簡単な認知と困難な認知とで逆になったことは、P3b はより高度な認知機能, SW は判断後の認知的ストラテジーの再調整やフィードバックを表している¹⁸⁾といわれていることから、簡単な認知は困難な認知よりも判断後の再調整を多くは必要としない処理プロセスを経ていると考えられる。弁別の適中数および RT は情報を処理し行動を起こした結果の指標であり、簡単な認知は課題が容易であり、情報処理および行動までの一連の過程にかかる時間は短縮したと考えられる。

これらのことより本実験における情報処理過程を推察すると、簡単な認知は弁別の適中数および RT から困難な認知に比べ情報処理が容易であり、また主成分分析から情報処理過程で意識的な検出を行っているが、マッチングに近い処理をしていることが考えられた。青木¹⁸⁾が行った歯種の鑑別実験における主成分分析の結果と比較すると、学習前では SW 前期, SW 後期成分の抽出が目立ち、N200 成分は学習後の効果として抽出はされたが、下位成分である MMN や N2b までの分離抽出には至らなかった。このことは単純に比較することはできないが、今回課題とした簡単な認知においては P300 の下位成分が抽出できたことから、青木の実験課題よりは比較的容易な判断レベルであったと解釈することができる。

このように簡単な認知と困難な認知では異なった主成分が抽出され、正反応数や RT の違いによりそれぞれの情報処理過程の違いを抽出することができた。

これらのことから、慢性歯周炎を鑑別する課題における脳の認知情報処理活動としては、P300 の関与はこれまでの報告と同じであるが、弁別が容易な場合には直感的思考様式であるパターン認識が関与し、明らかに正常とかけ離れた症例を弁別する際は、MMN や N2b の抽出から今までの学習・経験により得たパターン認識を用いて瞬時にしていることが客観的に明らかになった。

結 論

慢性歯周炎を課題とした難易度の異なる認知実験により、N100, N200, P300, MMN および N2b の検討を行い、以下の結論を得た。

1. N2b 潜時は簡単な認知と困難な認知において有意な差が認められ、簡単な認知で短かった ($p < 0.01$)。

N2b 振幅は簡単な認知と困難な認知において有意な差が認められ、簡単な認知で高かった ($p < 0.01$)。

2. 正反応の適中数は簡単な認知と困難な認知において有意な差が認められ、簡単な認知が多かった ($p < 0.01$)。

RT は簡単な認知と困難な認知において有意な差が認められ、簡単な認知で短かった ($p < 0.01$)。

3. P300 振幅は簡単な認知と困難な認知において有意な差が認められ、簡単な認知で高かった ($p < 0.05$)。

4. 主成分分析において簡単な認知と困難な認知でそれぞれ 7 主成分と 6 主成分が抽出された。N2b 成分が簡単な認知および困難な認知に抽出され、MMN 成分は簡単な認知のみに抽出され、困難な認知には第 1 主成分に SW 後期成分が抽出できた。

5. N100 および N200 の潜時、振幅において簡単な認知と困難な認知に差は認められなかった。

以上のことから、課題の弁別が容易な場合には直感的思考様式であるパターン認識の存在が ERP 成分により認められ、また弁別が困難な場合には直感的思考様式よりも帰納的な処理を行っていることが示唆された。

謝辞 稿を終わるに臨み、指導途中で急逝されました恩師本学口腔診断学講座笹原廣重教授に感謝し、哀悼の意を捧げます。また、本研究の御指導と御校閲頂きました生理学講座古山俊介教授に深い感謝の意を捧げるとともに、御校閲頂きました保存学Ⅱ講座小方頼昌教授、矯正学講座葛西一貴教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究に種々のご協力を頂きました口腔診断学講座伊藤孝訓助教授、青木伸一郎講師ならびに講座員各位に御礼申し上げます。

なお、本論分の要旨の一部は、第 18 回日本口腔診断学会総会において発表した。

本研究の一部は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業の補助を受けて行われたことを付記する。

参考文献

- Sackett, D.L.: Clinical diagnosis and the clinical laboratory. *Clin Invest Med*, 1 : 37-43, 1978.
- Ledley, R.S. and Lusted, L.B.: Reasoning foundations of medical diagnosis. *Science*, 130 : 3-21, 1959.
- 高橋暁正: 計量診断学への歩み (計量診断学, 高橋暁正), 第 1 版, 東京大学出版会, 東京, pp.1-13, 1969.
- Elstein, A.S., Kagan, N., Shulman, L.S., et al.: Methods and theory in the study of medical inquiry. *J Med Educ*, 47 : 85-92, 1972.
- Cutler, P.: Problem-solving methods (Problem-solving in clinical medicine: From data to diagnosis, Cutler, P.), 1st ed, Williams & Wilkins, Co., Baltimore, pp.38-55, 1979.
- Barrows, H.S., Norman, G.R., Neufeld, V.R., et al.: The clinical reasoning of randomly selected physicians in general medical practice. *Clin Invest Med*, 5 : 49-55, 1982.
- 福井次矢: 病歴・診察・迅速検査データの有用性—胸痛患者の診断プロセスにおける定量的評価—. *日公衛誌*, 37 : 569-575, 1990.
- 笹原廣重, 伊藤孝訓, 戸田博文, 他: 歯科医師の X 線診断過程におけるパターン認識—根尖性歯周炎の標準パターンの抽出と認識—. *日口誌*, 5 : 98-105, 1992.
- 投石保広: ERP 研究の歴史 (事象関連電位 (ERP) マニュアル—P300 を中心に—, 加我君孝, 古賀良彦, 大澤美貴雄, 他), 第 1 版, 篠原出版, 東京, pp.1-9, 1995.
- Sutton, S., Braren, M., Zubin, J., et al.: Evoked-potential correlates of stimulus uncertainty. *Science*, 150 : 1187-1188, 1965.
- Neshige, R., Barrett, G. and Shibasaki, H.: Auditory long latency event-related potentials in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *J Neurol Neurosurg Psychiatr*, 51 : 1120-1125, 1988.
- 柿木隆介, 音成龍司, 柴崎 浩, 他: 老年痴呆の薬剤効果判定における事象関連電位 "P300" の意義. *脳波と筋電図*, 17 : 359-364, 1989.
- 町山幸輝, 椎原康史: 精神分裂病と事象関連電位. *精神誌*, 87 : 936-943, 1985.
- 穂積昭則: 事象関連電位を用いた高次脳機能障害評価 4 音弁別課題による情報処理資源適正配分に関する検討. *Dokkyo J Med Sci*, 27 : 421-436, 2000.
- Neshige, R., Kuroda, Y., Kakigi, R., et al.: Event-related brain potentials as indicators of visual recognition and detection of criminals by their use. *Forensic Sci Int*, 51 : 95-103, 1991.
- Norman, D.A.: 認知科学とは何か? (認知科学の展望, 佐伯胖監訳), 第 1 版, 産業図書, 東京, pp.1-15, 1984.
- 下河内稔, 一条貞雄, 沖田庸嵩, 他: 誘発電位検査法委員会報告—誘発電位測定指針 (案) について—. *脳波と筋電図*, 13 : 97-104, 1985.
- 青木伸一郎: 事象関連電位による歯科学学生の学習利得に関する認知科学的検討. *日口誌*, 11 : 205-219, 1998.
- Näätänen, R. and Gaillard, A.W.K.: The orienting reflex and the N2 deflection of the event-related potential (ERP) (Tutorials in ERP Research: Endogenous Components, Gaillard, A.W.K., Ritter, W.), 1st ed, North-Holland, Amsterdam, pp.119-141, 1983.
- 投石保広, 下河内稔: 弁別課題にみられる初期陰性成分の分析—NA, MMN, N2b との比較検討—. *生心理精生理*, 8 : 19-30, 1990.
- Ritter, W., Simon, R. and Vaughan, Jr. H.G.: Association cortex potentials and reaction time in auditory discrimination. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 33 : 547-555, 1972.
- Desmedt, J.E.: P300 in serial tasks: an essential post-decision closure mechanism. *Prog Brain Res*, 54 : 682-686, 1980.
- McCarthy, G. and Donchin, E.: A metric for thought: a comparison of P300 latency and reaction time. *Science*, 211 : 77-80, 1981.
- 山口成良, 越野好文: 脳波現象と誘発電位の意義 (誘発電位の基礎と臨床, 佐藤謙助, 平井富雄, 山岡淳), 第 1 版, 創造出版, 東京, pp.14-16, 1990.
- Hillyard, S.A., Hink, R.F., Schwent, V.L., et al.: Electrical signs of selective attention in the human brain. *Science*, 182 : 177-180, 1973.
- Ritter, W., Simon, R., Vaughan, Jr. H.G., et al.: A brain event related to the making of a sensory discrimination. *Science*, 203 : 1358-1361, 1979.
- Karlin, L.: Cognition, preparation, and sensory evoked potentials. *Psychol Bull*, 73 : 122-136, 1970.
- Wickens, C.D., Kramer, A.F. and Donchin, E.: The event-related potential as an index of the processing demands of a complex target acquisition task. *Ann NY Acad Sci*, 425 : 295-299, 1984.
- Donchin, E.: Surprise!... surprise?. *Psychophysiology*, 18 :

- 493-513, 1979.
- 30) Kutas, M., McCarthy, G. and Donchin, E.: Augmenting mental chronometry: the P300 as a measure of stimulus evaluation time. *Science*, 197 : 792-795, 1977.
 - 31) Megliero, A., Bashore, T.R., Coles, M.G.H., et al.: On the dependence of P300 latency on stimulus evaluation processes. *Psychophysiology*, 21 : 171-186, 1984.
 - 32) McCarthy, G. and Donchin, E.: Chronometric analysis of human information processing (Tutorials in ERP Research: Endogenous Components, Gaillard, A.W.K., Ritter, W.), 1st ed, North-Holland, Amsterdam, pp.251-268, 1983.
 - 33) Squires, N.K., Squires, K.C. and Hillyard, S.A.: Two varieties of long latency positive waves evoked by unpredictable auditory stimuli in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 38 : 387-401, 1975.
 - 34) 古川俊介：多次元情報を用いる診断（コンピュータ診断，古川俊介），第1版，共立出版，東京，pp.40-42，1982.
 - 35) 酒井邦嘉：認知記憶システム（心にいどむ認知脳科学，酒井邦嘉），第1版，岩波書店，東京，pp.49-65，1997.
 - 36) 長尾 真：プロローグ（コンピュータのパターン認識，長尾真），第1版，東京大学出版会，東京，pp.4-5，1985.
 - 37) Ruchkin, D.S., Villegas, J. and John, E.R.: An analysis of average evoked potentials making use of least mean square techniques. *Ann NY Acad Sci*, 115 : 799-826, 1964.

原著論文

咀嚼と認知情報処理過程との関連性

—異なる最大咬合力グループにおける比較—

青木伸一郎^{*,***} 伊藤 孝訓^{*,***} 長野 裕行^{**,***} 井田 聡子^{*}
鈴木 義孝^{*} 大沢 聖子^{*,***} 會田 雅啓^{**,***} 笹原 廣重^{*,***}

Relationship between Masticatory Ability and Cognitive Information Processing : Comparative Study of Groups with Different Maximum Occlusal Pressures

Aoki Shinichiro^{*,***}, Ito Takanori^{*,***}, Nagano Hiroyuki^{**,***}, Ida Satoko^{*}, Suzuki Yoshitaka^{*}, Osawa Seiko^{*,***}, Aida Masahiro^{**,***} and Sasahara Hiroshige^{*,***}

歯科補綴学的意義

咀嚼と脳との関係について多くの研究報告が行われているが、脳機能についての報告は少ない。そこで咀嚼と脳機能との関係を明らかにするために、事象関連電位を用いて異なる最大咬合力グループを比較することにより、認知情報処理過程の客観的な評価を行った。事象関連電位の出現傾向や主成分の抽出傾向の違いからグループ間の違いを示したことから、最大咬合力の違いが認知情報処理過程に影響を与えている可能性が示唆された。

抄 録

目的：異なる最大咬合力グループを比較することによって認知情報処理過程の客観的な評価を行い、咀嚼と脳機能との関係を明らかにすることを目的とした。

方法：最大咬合力を基準に2グループに分け、オドボール課題に準じ、各図形の弁別を行わせた際のP 300の潜時、P 300の振幅、反応時間、反応時間の標準偏差を比較検討し、最大咬合力、年齢を含めた変数をグループごとに主成分分析を行い情報の総合化し、グループごとの認知情報処理過程の様相について比較検討を行った。

結果：1. 低咬合群に比べ高咬合群のCzから導出されたP 300の潜時が高い傾向を認めた。2. 両咬合圧群におけるステージごとの主成分分析による検討より、高咬合圧群は累積寄与率81.1%で第1から第4主成分に総合化することができ、低咬合圧群は累積寄与率82.7%で第1から第4主成分に総合化することができた。3. 主成分分析による検討より、高咬合圧群の第4主成分と低咬合圧群の第3, 4主成分に抽出傾向の違いが認められた。

結論：高咬合圧群と低咬合圧群において、事象関連電位の出現傾向の違いや主成分分析における主成分の抽出傾向の違いを認めたことから、咀嚼の違いが認知情報処理過程に影響を与える可能性が示唆された。

和文キーワード

認知, 脳波, P 300, 最大咬合力, 咀嚼

*日本大学松戸歯学部口腔診断学講座

**日本大学松戸歯学部第2 歯科補綴学講座

***日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

*Department of Oral Diagnostics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**Department of Crown and Bridge Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

***Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

受付：2004年3月4日/受理：2004年6月2日

Received on March 4, 2004/Accepted on June 2, 2004

I. 緒 言

国民総人口における65歳以上の老年人口割合が、15歳未満の年少人口割合を超え本格的な高齢化社会を迎えている現在、平均寿命も延長し、長い老年期を過ごすに当たり、より健全に生きがいをもって過ごすことがこれからの重要な課題となっている。近年、健康に対する価値観が非常に多様化し大きく変化しているなかで、より充実した生活を望むことは当然であり、そのため必然的に生活の質(Quality of life, 以下QOLとする)に対する関心が高まっているのが現状である。

歯科領域においては、以前よりう蝕や歯周病および顎関節症のような疾患治療そのものに関する研究が主流であったが、最近では治療後の審美的、機能的および精神的な回復に関する研究、つまりQOLを中心とした臨床的および基礎的研究が盛んに行われている。なかでも咀嚼は重要なテーマとして扱われており、咀嚼の生理学的意義¹⁾や咀嚼に影響する因子²⁾についての研究、咀嚼と健康習慣との関連³⁾などさまざまな研究が報告されている。また、近年では咀嚼そのものの研究から、咀嚼により起こりうるさまざまな効果・作用に注目が移りつつあり、咀嚼や摂食機能の身体活動への影響⁴⁾や高齢者の咀嚼と精神活動⁵⁾およびガムチューイングによる脳へのリラックス効果⁶⁾などのように、特に脳機能との関連についての研究が報告されるようになってきた。

口腔内状態の改善は、咀嚼に影響を与えるばかりではなく、身体活動や精神活動における影響、ひいてはQOLにまで影響を与える可能性が示唆されている。しかし、口腔内状態の改善による検討はアンケート調査を中心としたものが多く⁷⁻¹¹⁾、そのため主観的な要素が混入することも否めない。著者らは、以前より意欲を変化させたときの脳波、特に事象関連電位(Event-related potential, 以下ERPとする)を検討し、ヒトの認知情報処理過程を表す客観的な指標として有力なツールとなる可能性を示唆している¹²⁾。

ERPは、生体の情報処理に伴って発生する脳電位であるが、このうち潜時が100 msec以上の比較的遅い成分は、選択的注意や認知機能を反映し変動することが知られている。このことは、1965年にSutton

ら¹³⁾によりP300が外的事象に対応する内因性成分を表していることが実証され、以後P300についてはその発現部位、条件、正常値、データの信頼性および再現性などについてさまざまな課題により基本的な研究が行われている。精神医学の臨床においては、ERPが注意障害などによる疾患の指標になりうる可能性^{14,15)}、精神病患者の行動障害における異常の検出^{16,17)}、治療経過および予後を評価するモニターとして治療法や治療薬の有用性の指標¹⁸⁾として応用され、より深く行動に対する認知科学的解釈が行われている。また、一方認知科学における基礎的研究においても、ERPが情報処理モデルを構築する過程での実験データとして応用^{19,20)}され、より深く情報処理に対する解釈が行われている。

そこで今回、ERPを用いて最大咬合力の違うグループにおける認知情報処理過程の客観的な評価を目的として、高齢者を含めた対象において、最大咬合力を測定し最大咬合力の高低によるグループ分けを行い、ERPを測定することにより、認知情報処理過程の指標であるP300や反応時間(Reaction time, 以下RTとする)、反応時間の標準偏差(Reaction time standard deviation, 以下RTSDとする)においてグループ間で比較検討し、認知情報処理過程についてP300の潜時(P300潜時)、P300の振幅(P300振幅)、RT、RTSD、最大咬合力、年齢を変数としてグループごとに主成分分析を行い、情報を総合化し、グループごとの認知情報処理過程の様相について比較検討を行った。

II. 研究方法

1. 対象

被験者は本研究の趣旨を説明したうえで研究の協力に同意が得られた健常者で、脳に疾患既往のないことを問診で確認した。口腔内においては多数歯の欠損を認めず、少数歯欠損部があった場合はブリッジで修復改善されている23~69歳の35名(平均年齢45.9歳)とした。部分床義歯の使用者は含まれていない。最大咬合力の測定は、咬合力測定システム(デンタルプレスケールオクルーザーFPD-703, 富士写真フィルム)を使用して3回測定し、その平均値を代表値とした。被験者ごとに得られた最大咬合力を平均し、平均以上

の18名を高咬合圧群 (1,144.2 N \pm 264.8), 平均以下の17名を低咬合圧群 (531.4 N \pm 267.2) とし, グループ分けを行った。

2. 記録方法

ERPの測定は, シールドルーム内において椅子に安静な状態で座位をとらせ, 1 m前方にあるディスプレイの中央をみるよう説明し, 多目的刺激コントローラ (Multi Trigger System 2001, メディカルトライシステム) を用いて呈示した標的刺激 (Rare 刺激) または非標的刺激 (Frequent 刺激) の試料のうち, Rare 刺激が呈示されたときのみボタン押しするよう指示した。一連の認知情報処理過程時に出現する脳波をデジタル多用途脳波計 (SYNAFIT 5500, 日本GEマーケット) にて測定した。また, 画像呈示開始からボタンを押すまでのRTを多目的刺激コントローラを用いて測定した。

導出部位は国際10/20法に基づき, 正中前頭部 (Fz), 正中中心部 (Cz) および正中頭頂部 (Pz) の3カ所より導出し, 両側耳朶連結を基準電極とした。また, 振幅が $\pm 100 \mu\text{V}$ 以上を越えるときにはアーチファクトの混入と考え除去した。

課題は円, 三角, 四角の図形を用いた弁別とし, 本実験ではオドポール課題²¹⁾に準じ, Rare 刺激を円, Frequent 刺激を三角, 四角とし呈示頻度を20, 80%とした。呈示前にRare 刺激とFrequent 刺激および呈示回数について口答で説明し, Rare 刺激を認めたときにボタン押しを行うよう指示し, 呈示時間を1,000 msec, 呈示間隔を3,000 \pm 500 msecとしてランダムに連続して300回呈示した。300回を最初の100回 (開始期), 中間の100回 (継続期), 最後の100回 (刺激期) の各ステージに分け, 開始期および継続期は連続的に行わせたが, 刺激期は開始前に, 残りの試行回数を口答で伝え, 課題に対する意欲を高めた状態とした。

P300の同定は, それぞれの試行時において刺激開始直前100 msecの平均電位を0とし, 刺激開始より1,500 msecの区間について20回加算平均し, 被験者ごとに加算平均波形を求めた²²⁾。

得られた加算平均波形より, 頂点同定法を用いて刺激開始時より250~600 msec間にPeakがある陽性成分をP300と同定し, 最大Peak値の電位値を成分の

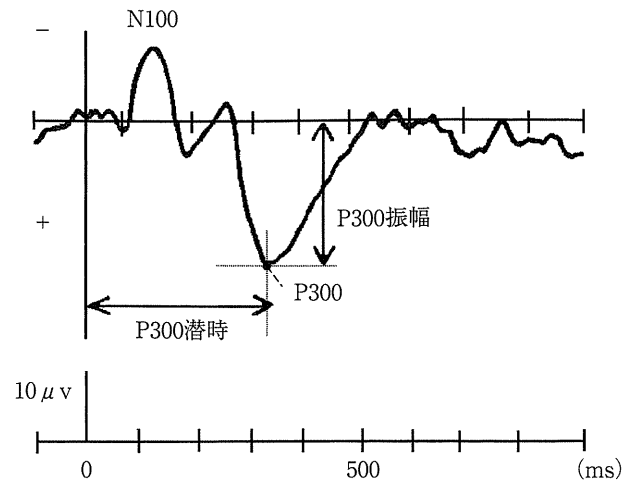


図1 Outline P300 latency and amplitude
P300 潜時と振幅の略図

振幅とし, そのときの時間を波形成分の潜時として同定を行った (図1)。

グループごとに得られたP300潜時, P300振幅, RT, RTSDを比較検討し, Fzから導出されたP300の潜時 (P300潜時 (Fz)), Czから導出されたP300の潜時 (P300潜時 (Cz)), Pzから導出されたP300の潜時 (P300潜時 (Pz)), Fzから導出されたP300の振幅 (P300振幅 (Fz)), Czから導出されたP300の振幅 (P300振幅 (Cz)), Pzから導出されたP300の振幅 (P300振幅 (Pz)), RT, RTSD, 最大咬合力, 年齢を変数とし咬合圧群ごとに主成分分析を行い, グループ間の比較を行った。今回は実験に集中している刺激期について検討を行った。

なお, 本研究は日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認と, 各被験者に対して実験の趣旨を説明し同意を得て行われている (承認番号: EC 02-060号)。

3. 統計分析

高咬合圧群と低咬合圧群のグループ間においてP300潜時 (Fz), P300潜時 (Cz), P300潜時 (Pz), P300振幅 (Fz), P300振幅 (Cz), P300振幅 (Pz), RT, RTSDにMann-Whitney U検定により, 統計学的有意差の検討を行った。またP300潜時 (Fz), P300潜時 (Cz), P300潜時 (Pz), P300振幅 (Fz), P300振幅 (Cz), P300振幅 (Pz), RT, RTSD, 最大咬合力, 年齢を説明変数として, 因子分析法における直交因子回転のオーソドックス法

の1つであるバリマックス法²³⁾を用いて主成分分析し、因子負荷量を求めた。なお、固有値が1.0以上の主成分について、グループ間で主成分の抽出傾向について検討した。

検定ソフトはSPSS for Windows 10.0.7 J (SPSS Japan) を用いて行った。

表 1 Changes in P 300 latency and amplitude of each occlusal pressure group
各咬合圧群の P 300 潜時, 振幅の変化

	Fz (ms)	Cz (ms)	Pz (ms)
P 300 latency			
High occlusal pressure group	406 (87)	401 (77)	402 (59)
Low occlusal pressure group	441 (85)	450 (77)	431 (78)
P 300 amplitude			
High occlusal pressure group	17.4 (8.0)	18.2 (7.4)	18.5 (7.6)
Low occlusal pressure group	15.2 (8.2)	16.6 (6.0)	18.0 (6.2)

Average(SD), *: p<0.05(Mann-Whitney's U-test)

III. 結 果

1. P 300 潜時, P 300 振幅, RT および RTSD の比較 (表 1, 2)

低咬合圧群に比べ高咬合圧群の P 300 潜時 (Cz) が高い傾向を認めた。

2. 高咬合圧群と低咬合圧群における主成分分析による検討 (表 3)

高咬合圧群においては、累積寄与率 81.1% で第 1 から第 4 主成分に総合化することができた。

第 1 主成分 (寄与率=31.4%) は P 300 振幅 (Fz), P 300 振幅 (Cz), P 300 振幅 (Pz) の因子負荷量がそれぞれ 0.97, 0.91, 0.82 を示し、次に RT

表 2 Changes of RT and RTSD of each group during the stimulus period
各咬合圧群の RT, RTSD の変化

	RT (ms)	RTSD
High occlusal pressure group	364 (59)	66 (34)
Low occlusal pressure group	363 (57)	60 (18)

Average(SD), *: p<0.05(Mann-Whitney's U-test)

表 3 Factor loading during the stimulus period of each occlusal pressure group
各咬合圧群における因子負荷量

Factor	High occlusal pressure group				Low occlusal pressure group			
	Principal component				Principal component			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV
P 300 latency (Fz)	0.10	<u>0.96</u>	-0.03	-0.04	0.01	<u>0.87</u>	-0.15	0.27
P 300 latency (Cz)	-0.04	<u>0.96</u>	0.01	0.13	-0.34	<u>0.84</u>	-0.07	0.01
P 300 latency (Pz)	-0.16	-0.06	<u>0.89</u>	-0.12	-0.16	<u>0.88</u>	0.20	-0.08
P 300 amplitude (Fz)	<u>0.97</u>	0.07	0.00	0.04	<u>0.82</u>	-0.22	0.12	-0.08
P 300 amplitude (Cz)	<u>0.91</u>	0.03	-0.17	-0.06	<u>0.95</u>	-0.11	-0.06	-0.08
P 300 amplitude (Pz)	<u>0.82</u>	0.05	-0.36	-0.25	<u>0.89</u>	-0.09	-0.24	0.01
RT	-0.64	0.08	0.30	0.36	-0.37	0.03	0.76	0.30
RTSD	-0.28	0.20	-0.19	0.69	0.08	-0.03	<u>0.90</u>	0.03
Occlusal pressure	-0.01	0.06	-0.16	<u>-0.81</u>	-0.05	-0.42	-0.23	-0.76
Age	-0.43	0.08	0.69	0.34	-0.14	-0.09	0.07	<u>0.88</u>
Proportion (%)	31.4	19.1	15.8	14.8	26.7	24.9	15.8	15.3

Each underline shows the maximum value of the factor loading in the 10 items, using the absolute value

アンダーラインは絶対値とした場合に 10 項目の因子負荷量の最大値を示す

の因子負荷量が-0.64を示し追随している。P 300 振幅は情報処理における処理容量を示す²⁴⁾といわれ、RT は情報処理過程および反応処理過程を含む処理時間を示すといわれている。以上より、反応処理時間の短縮による情報処理容量の増加を表していると考えられるため処理容量関連因子と命名した。

第2主成分(寄与率=19.1%)はP 300 潜時(Fz), P 300 潜時(Cz)の因子負荷量がそれぞれ0.96, 0.96を示した。Fz, Czは主として運動・反応処理系に関連し、Pzは感覚・刺激処理系に関連しているといわれており²⁵⁾、P 300 潜時は情報処理における処理時間を示すといわれている²⁶⁾。以上より、情報処理時間を表していると考えられるため運動・反応処理系処理時間関連因子と命名した。

第3主成分(寄与率=15.8%)はP 300 潜時(Pz)の因子負荷量が0.89を示し、次に年齢の因子負荷量が0.69を示し追随している。Fz, Czは主として運動・反応処理系に関連し、Pzは感覚・刺激処理系に関連しているといわれ、P 300 潜時は情報処理における処理時間を示すといわれている。年齢は加齢とともに生理的な機能の変化を示すと考えられる。以上より、加齢による情報処理時間の延長を表していると考えられるため、感覚・刺激処理系処理時間関連因子と命名した。

第4主成分(寄与率=14.8%)は咬合圧の因子負荷量が-0.81を示し、次にRTSDの因子負荷量が0.69を示し追随している。咬合圧は間接的検査法による咀嚼能力検査の結果であり、RTSDは集中力を示す²⁷⁾といわれている。以上より、集中力の散漫による最大咬合力の低下を表していると考えられるため、咬合力関連因子と命名した。

低咬合圧群においては、累積寄与率82.7%で第1主成分から第4主成分に総合化することができた。

第1主成分(寄与率=26.7%)はP 300 振幅(Fz), P 300 振幅(Cz), P 300 振幅(Pz)の因子負荷量がそれぞれ0.82, 0.95, 0.89を示した。P 300 振幅は情報処理における処理容量を示すといわれている。以上より、処理容量を表していると考えられるため処理容量関連因子と命名した。

第2主成分(寄与率=24.9%)はP 300 潜時(Fz), P 300 潜時(Cz), P 300 潜時(Pz)の因子負荷量がそれぞれ0.87, 0.84, 0.88を示した。以上よ

り、処理時間を表していると考えられるため、反応・刺激処理系処理時間関連因子と命名した。

第3主成分(寄与率=15.8%)はRTSDの因子負荷量が0.90を示し、次にRTの因子負荷量が0.76を示し追随している。RTSDは集中力を示し、RTは情報処理過程および反応処理過程を含む処理時間を示すといわれている。以上より、反応時間の短縮による集中力の低下を表していると考えられるため、集中力関連因子と命名した。

第4主成分(寄与率=15.3%)は年齢の因子負荷量が0.88を示し、次に咬合圧の因子負荷量が-0.76を示し追随している。年齢は加齢とともに生理的な機能の変化を示すと考えられ、咬合圧は間接的検査法による咀嚼能力検査の結果である。以上より、最大咬合力の低下による加齢を表していると考えられるため、生理的機能関連因子と命名した。

IV. 考 察

1. 咀嚼と認知情報処理過程との関連について

歯科治療が行われると咀嚼や審美面での改善が認められるが、それらは単に1つの器官としての改善だけでなく、全身へ与える二次的な影響や心理的な変化による生活活力への影響があることはこれまで示唆されている。寺岡ら²⁸⁾は“食べる”ことが単なる栄養摂取の手段ということだけではなく、行動意欲を起こさせる心理的効果もあると報告し、池邊ら^{29,30)}は自立した社会生活を送っている高齢者に対し、義歯の使用状況や満足度が口腔機能や全身的な健康状態に及ぼす影響について検討した結果、歯を喪失した高齢者においても満足度の高い義歯を装着することによって、口腔機能のみならず全身的な健康の向上につながる事が示唆されたと報告している。さらに船越ら³¹⁾は咬合力と知能テストとの関係について検討し、咬合力の高い者が知能テストにおいて成績が良い傾向を認めたと報告している。以上のような咀嚼と脳機能についての関連が推察された報告がみられる。

一方、ヒトの認知機構を調べる方法はこれまで心理学系を中心に検討され、さまざまな情報処理モデルにより解釈されてきた。その際、客観的なデータとしてRTが多く用いられてきた^{32,33)}。RTは認知心理実験を行った際の情報処理行動時間を比較的客観的なデー

タとして変換することができるため、実験後の行動結果も含めて情報処理過程を推測し、情報処理モデルの構築に寄与している。しかし、人間の認知情報処理行動過程は多様であり、RTのような行動結果のみを指標に考察していくには限界がある。

そこで近年では、ERPなどに代表される電気生理学的な手法を用いて検討がなされている。その大きな特徴としては、脳活動における電位変化をみることにより、脳機能を推定することが可能で認知情報処理過程と反応処理過程とを分けて検討できる^{14,16,34~36}ことや、1 msec程度の分析が可能であることがあげられる。

今回、用いたERPはある事象により誘発される電位を指すものであり、およそ潜時100 msecを境にして、それより早い潜時のものを外因性成分により誘発される電位とし、遅い潜時のものを内因性成分により誘発される電位として分類されている。潜時が100 msec以内の外因性成分による電位は刺激に対して受動的に体が反応し、恒常的に出現する電位であり、その代表的なものがN100である。一方、潜時が100 msec以上の内因性成分による電位はさまざまな実験課題を行うに際して、被験者の課題処理に対応する能動的な神経活動に対応し出現する電位であり、その代表的なものがP300である。N100は外因性の刺激に関与し刺激を与えた際にほぼ同様な反応として得られるため、刺激の確認として用いられることが多いが、P300は認知情報処理過程に関与³⁷し、潜時は情報処理を行い判断するまでの時間、振幅は課題遂行時に使われる脳の処理容量²⁴)により変化するといわれており、一般的に認知や判断を行う際の心理的な要因と関連していると考えられている。またP300潜時が情報処理過程を示しているのに対し、RTは情報処理過程および反応処理過程を示していると考えられ、P300潜時とは別の過程を表しているといわれている³⁸。RTSDにおいては、反応時間におけるSDの大小により課題遂行における集中度の指標として用いられている²⁷。

高咬合圧群と低咬合圧群におけるP300潜時、P300振幅、RTおよびRTSDの比較で、RTSDは両咬合圧群において差を認めなかったことから、実験遂行において両咬合圧群ともに同様な集中力をもって望んでいることが認められた。P300振幅は脳内にお

ける情報処理時の処理容量の残量により変化すると考えられており、比較的容易な情報処理に関しては、脳内における処理に使われる容量が少なくてすむため、残量が多くなり振幅は増加する。逆に困難な情報処理を行う場合には容量が多く使われ、残量は少なくなるため振幅も減少するといわれている。両咬合圧群において有意な差は認められなかったが、高咬合圧群が低咬合圧群に比べ振幅値が高い傾向を認めたことは、高咬合圧群が少ない処理容量で認知情報処理を行っている可能性が考えられる。P300潜時は、高咬合圧群が低咬合圧群に比べP300潜時(Cz)が短く、処理時間が短い傾向を認めたが、RTにおいては、両咬合圧群において有意な差は認められなかった。このことから、情報処理過程と反応処理過程を含めた全処理過程にかかる処理時間は両咬合圧群において差を認めないが、情報処理過程にかかる処理時間は、高咬合圧群が低咬合圧群に比べ短いことが考えられる。

これらのことより、高咬合圧群におけるP300潜時とP300振幅の結果を踏まえて考察すると、高咬合圧群は、少ない処理容量で早く情報処理をしていると考えられ、低咬合圧群に比較して情報処理時間が早いことが示唆された。以上の結果より、最大咬合力の違いが認知情報処理時間に影響を与える可能性が示唆された。

2. 高咬合圧群、低咬合圧群の特徴抽出について

各咬合圧群における特徴を検討することを目的として、咬合圧群ごとにP300潜時(Fz)、P300潜時(Cz)、P300潜時(Pz)、P300振幅(Fz)、P300振幅(Cz)、P300振幅(Pz)、RT、RTSD、最大咬合力および年齢を変数として主成分分析を行った結果、P300の頭皮上分布により若干の処理系の違いは認められるが、両咬合圧群ともに第1主成分は処理容量関連因子と解釈でき、また高咬合圧群では第2、3主成分、低咬合圧群では第2主成分が処理時間関連因子と解釈できたことは、認知情報処理過程において処理容量関連因子や処理時間関連因子が強く寄与していることが示された。

続いて高咬合圧群の第4主成分は、RTSDと最大咬合力に関連する咬合力関連因子が抽出されたことから、認知情報処理過程と咬合力関連因子との関連が示唆された。一方、低咬合圧群の第3主成分はRTと

RTSDに関連する集中力関連因子、第4主成分は最大咬合力と年齢に関連する生理的機能関連因子が抽出されたことから、認知情報処理過程と集中力関連因子および生理的機能関連因子との関連が示唆され、それぞれの咬合圧群における特徴が認められた。

以上の結果から、異なった咬合圧群間を主成分分析により比較することで各咬合圧群における違いを抽出でき、両グループの認知情報処理過程に関連する因子の違いについてERPを用いてより客観的に示すことができた。

V. 結 論

今回、ERPを用いて最大咬合力の違いによる認知情報処理機能の客観的な評価を目的として両咬合圧群による比較を行った結果、以下のような結果を得た。

1. 低咬合圧群に比べ高咬合圧群のP300潜時(Cz)が高い傾向を認めた。
2. 両咬合圧群における主成分分析による検討から高咬合圧群は累積寄与率81.1%で、第1主成分から第4主成分に総合化することができ、低咬合圧群においては累積寄与率82.7%で、第1から第4主成分に総合化することができた。
3. 主成分分析による検討より、高咬合圧群の第4主成分と低咬合圧群の第3, 4主成分において抽出された主成分に違いが認められた。

以上より、高咬合圧群と低咬合圧群においてERPの出現傾向に違いや主成分分析における主成分の違いを認めたことから、最大咬合力の違いが認知情報処理過程に影響を与える可能性が示唆された。

本研究は平成15年度科学研究費補助金(課題番号15791146)、平成15年度鈴木奨学金(03-2018)、平成13年度文部省選定学術フロンティアの補助を受けて行われたことを付記する。

文 献

- 1) 船越正也. 咀嚼情報の生理学的意義. 阪大歯学誌 35 : 1-5, 1990.
- 2) 平野浩彦, 渡辺 裕, 石山直欣ほか. 老年者咀嚼能力に影響する因子の解析. 老年歯学 9 : 184-189, 1995.
- 3) 三浦宏子, 三浦邦久, 角 保徳ほか. 地域高齢者の咀嚼機能と健康習慣との関連性. 老年歯学 15 : 248-253, 2001.
- 4) 寺岡加代, 永井晴美, 柴田 博ほか. 高齢者における摂食機能の身体活動への影響. 口腔衛生会誌 42 : 2-6, 1992.
- 5) 平井敏博, 田中 収, 池田和博ほか. 高齢者の咀嚼機能と精神活動. 日口腔科誌 37 : 562-571, 1988.
- 6) 大塚公彦, 工藤照三, 滝口俊男ほか. ガムチューイングによる大脳へのリラックス効果. 日咀嚼誌 7 : 11-16, 1997.
- 7) Seifeert A, Michmann J. Evaluation of psychologic factors in geriatric denture patients. J Prosth Dent 12 : 516-523, 1962.
- 8) Sheppard IM, Schwartz LR, Sheppard SM. Survey of the oral status of complete denture patients. J Prosthet Dent 28 : 121-126, 1972.
- 9) Reeve PE, Watson CJ, Stafford GD. The role of personality in the management of complete denture patients. Br Dent J 156 : 356-362, 1984.
- 10) Ven Waas MAJ. The influence of clinical variables on patients' satisfaction with complete dentures. J Prosthet Dent 63 : 307-310, 1990.
- 11) Ven Waas MAJ. Determinants of dissatisfaction with dentures : A multiple regression analysis. J Prosthet Dent 64 : 569-572, 1990.
- 12) 青木伸一郎, 伊藤孝訓, 笹原廣重. 加齢による咀嚼能と脳の認知機能の関連性—第1報 オドボール課題を用いた健常者の傾向分析—. 日口腔診断会誌 13 : 295-303, 2000.
- 13) Sutton S, Braren M, Zubin J. Evoked potential correlates of stimulus uncertainty. Science 150 : 1187-1188, 1965.
- 14) Duncan-Johnson CC, Donchin E. On quantifying surprise : The variation of event-related potentials with subjective probability. Psychophysiology 14 : 456-467, 1977.
- 15) Saitoh O, Niwa S, Hiramatsu K et al. Abnormalities in late positive components of event-related potentials may reflect a genetic predisposition to schizophrenia. Bio Psychiatry 19 : 293-303, 1984.
- 16) Duncan-Johnson CC, Kopell BS. The stroop effect : Brain potentials localize the source of interference. Science 214 : 938-940, 1981.
- 17) 古賀良彦. 精神分裂病における情報処理過程—事象関連電位による検討—. 精神誌 89 : 489-509, 1987.
- 18) 大澤美貴雄, 須田昭夫, 小林逸郎ほか. 塩酸ピフェメラン(セレポート®)の事象関連電位(P300)に及ぼす影響. 臨と研 66 : 1020-1028, 1989.
- 19) 斉藤 治, 丹羽真一, 平松謙一ほか. 精神分裂病の認知障害. 臨精医 14 : 891-906, 1985.
- 20) 伊澤秀而, 柳原正文. 情報比較の認知過程と視覚誘発電位. 臨脳波 27 : 370-376, 1985.

- 21) 堀 浩, 高橋光雄, 下河内 稔ほか. 脳波・筋電図用語事典 262, 大阪:永井書店, 2001.
- 22) 日本脳波・筋電図学会. 誘発電位測定指針. 脳波と筋電図 13: 97-104, 1985.
- 23) 石村貞夫, デズモンド・アレン. すぐわかる統計用語. 191 東京:東京図書, 1998.
- 24) 投石保広一. P 300 を中心としたERP 研究の小史. 加我君孝, 古賀良彦, 大澤美貴雄ほか編, 事象関連電位(ERP) マニュアル—P 300 を中心に— 1-9, 東京:篠原出版, 1995.
- 25) 斎藤 治, 豊嶋 良. 事象関連電位; 歴史と概論. 丹羽真一, 鶴 紀子編, 事象関連電位 3-21, 東京:新興医学出版, 1997.
- 26) 平松謙一. P 300 の認知心理学的基礎的研究と精神医学的臨床研究への応用の理論的根拠. 加我君孝, 古賀良彦, 大澤美貴雄ほか編, 事象関連電位(ERP) マニュアル—P 300 を中心に— 45-55, 東京:篠原出版, 1995.
- 27) 岡本一真. 加齢, 課題への集中度と事象関連電位. 北関東医学 43: 237-244, 1993.
- 28) 寺岡加代, 永井晴美, 柴田 博ほか. 高齢者における摂食機能の身体活動への影響. 口腔衛生会誌 42: 2-6, 1992.
- 29) 池邊一典, 難波秀和, 谷岡 望ほか. 自立している高齢者の口腔と全身の健康 第1報 義歯の使用が口腔機能および健康状態に及ぼす影響. 老年歯学 13: 72-77, 1998.
- 30) 池邊一典, 佐寫英則, 難波秀和ほか. 自立している高齢者の口腔と全身の健康 第2報 咀嚼と全身疾患との関係. 老年歯学 14: 131-138, 1999.
- 31) 船越正也, 川村早苗, 藤原秀樹. 咬合力と知能テストの関連について. 岐阜歯会誌 15: 392-398, 1988.
- 32) 大沼 歩, 木村 格, 成川弘治ほか. 聴覚弁別作業時の事象関連電位と反応時間との関連性について—正常者での検討—. 臨神経 28: 781-788, 1988.
- 33) 井上由紀子, 山根一人, 大河俊博. 反応時間の学習効果について—特に健常人に対する検索—. 運動生理 6: 1-4, 1991.
- 34) Kutas M, McCarthy G, Donchin E. Augmenting mental chronometry: The P 300 as a measure of stimulus evaluation time. Science 197: 792-795, 1977.
- 35) Baribeau-Braun J, Picton TW, Gosselin JY. Schizophrenia: A neurophysiological evaluation of abnormal information processing. Science 219: 874-876, 1983.
- 36) Pfefferbaum A, Wenegrat BG, Ford JM. Clinical application of the P 3 component of event-related potentials: II. Dementia, depression and schizophrenia. Electroencephalogr Clin Neurophysiol 21: 312-325, 1984.
- 37) 沖田庸嵩, 諸富 隆. 事象関連電位. 藤澤 清, 柿木昇治, 山崎勝男編, 新生理心理学 104-123, 京都:北大路書房, 1998.
- 38) 平松謙一, 秋本 優, 丹羽真一ほか. 選択反応課題における分裂病患者の反応時間とP 300 潜時. 精神医学 27: 1055-1063, 1985.

著者連絡先: 青木伸一郎

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

TEL : 047-360-9423

FAX : 047-360-9426

E-mail : aokis@mascat.nihon-u.ac.jp

Relationship between Masticatory Ability and Cognitive Information Processing : Comparative Study of Groups with Different Maximum Occlusal Pressures

Aoki Shinichiro****, Ito Takanori****, Nagano Hiroyuki****, Ida Satoko*, Suzuki Yoshitaka*, Osawa Seiko****, Aida Masahiro**** and Sasahara Hiroshige****

*Department of Oral Diagnostics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**Department of Crown and Bridge Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

***Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

J Jpn Prosthodont Soc 48 : 583-591, 2004

ABSTRACT

Purpose : Our goal was to determine the relationship between the masticatory ability and brain function by objectively evaluating the cognitive information processing from a comparison of groups with different maximum occlusal pressures.

Methods : The subjects were divided into groups by using a criterion of maximum occlusal pressure, which is one of the indices for masticatory ability. The oddball paradigm was used with a circle as a rare stimulus and a triangle and square as frequent stimuli. As the subjects performed the task of discriminating each figure, P 300 latency, P 300 amplitude, reaction time (RT), and reaction time standard deviation (RTSD) were recorded. The variables were P 300 latency, P 300 amplitude, RT, RTSD, maximum occlusal pressure, and age. For each group, we performed principal component analysis on these variables to reduce data dimensionality and examined aspects of information processing.

Results : 1. There was a significant difference between the high and low occlusal pressure groups when comparing their P 300 latency (Cz) values. 2. From the principal component analysis performed at each stage for both groups, the high occlusal pressure group yielded a cumulative contribution rate of 81.1% and the low occlusal pressure group 82.7% with data reduction into first through fourth principal components for both groups. 3. From the comparison between the high occlusal and low occlusal pressure groups, there was a difference in extraction tendency of the high occlusal pressure group's fourth principal component and the low occlusal pressure group's third and fourth principal components.

Conclusions : There were differences in the tendency of event-related potential extraction and principal component extraction based on the principal component analysis of the high and low occlusal pressure groups. These differences indicate the possibility that differences in masticatory ability affect cognitive information processing.

Key words

cognition, brain wave, P 300, maximum occlusal pressure, mastication

原著論文

背筋力発揮時における咀嚼筋活動について

浅野 隆 川良美佐雄 鈴木 浩司
小見山 道 福本 雅彦* 飯田 崇**

Masticatory Muscle Activity during Exertion of the Back

Asano Takashi, Kawara Misao, Suzuki Hiroshi,
Komiya Osamu, Fukumoto Masahiko* and Iida Takashi**

歯科補綴学的意義

背筋力を発揮する場面はスポーツのみならず日常生活においても多々みられる。今回の体幹の筋力発揮時の咀嚼筋活動様相から、身体運動時の下顎の固定に関しては、強い噛みしめによるものではなく、顎二腹筋が強く関与することが示された。大きな開口はしないことから、下顎位ならびに咬合接触様相と顎関節への負荷を考えるうえで興味深い。

抄 録

目的：身体運動時においては、下顎が固定されていると思われるが、その動態については明らかにされていない。そこで、今回は背筋力を最大発揮した場合の咀嚼筋活動様相について検討した。

方法：被験者は健常有歯顎者9名であり、汎用背筋力計を用いて背筋力を最大発揮させた。背筋力発揮時およびピーナッツ咀嚼時における側頭筋、咬筋、および顎二腹筋の筋活動様相を計測した。また、最大随意噛みしめ時の側頭筋および咬筋の筋活動量と、最大随意開口抵抗時の顎二腹筋の筋活動量を計測し、最大随意筋活動量を得た。得られた筋活動量より、各咀嚼筋の最大随意筋活動量に対する相対比率を求め、背筋力発揮時、ピーナッツ咀嚼時、および最大筋活動量の筋活動量を比較した。

結果：背筋力発揮時における側頭筋、咬筋、および顎二腹筋の筋活動はそれぞれ最大随意筋活動量に対して32.1、26.4、97.4%であった。また、ピーナッツ咀嚼時における側頭筋、咬筋、および顎二腹筋の筋活動はそれぞれ最大随意筋活動量に対して40.7、36.0、17.3%であった。

結論：背筋力を発揮する場面においては、側頭筋および咬筋で約30%、顎二腹筋で100%近い筋活動がみられた。咀嚼筋群は開閉口筋ともに活動するが、その様相から特に顎二腹筋が下顎の固定筋として密接に関与することが示唆された。

和文キーワード

咀嚼筋, 背筋力, スポーツ, 筋電図

日本大学松戸歯学部口腔機能学講座

*日本大学松戸歯学部歯科臨床検査医学講座

**日本大学大学院松戸歯学研究科

Department of Clinical Oral Physiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

*Laboratory Medicine for Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo

受付：2005年6月6日 / 受理：2005年9月1日

Received on June 6, 2005 / Accepted on September 1, 2005

I. 緒 言

身体運動時の下顎の位置を考えた場合、下顎は下顎安静位といったリラックスした位置にあるとは考え難い。そのとき下顎は、その運動に適した位置に固定が図られていると思われる。しかしながら、どのようなメカニズムで固定がなされているかについては、これまで報告をみない。上下の歯を嵌合させ、噛みしめることによって固定されるのか、下顎に付着する筋群が優位に固定に関与するのか、あるいはそれらの協調によるものなのか、いまだ明らかではない。これらを解明することは顎口腔系の健康を保持するうえでも重要であり、下顎位を含めて補綴学的にも意義深いと思われる。身体運動と下顎位、および噛みしめ様相については、種々検討がなされている。これまでの神経生理学的研究¹⁻³⁾や、頭位と咀嚼筋活動様相^{4,5)}、および、背筋力発揮時におけるクレンジング発現頻度⁶⁾を検討した報告では、咬頭嵌合位における噛みしめが行われるとする場合や、偏心位における咬合接触、また、軽度の開口位をとる場合があるなど多岐にわたっている。さらに、鈴木ら⁷⁾は背筋力発揮時の顎頭位変化について検討を加え、背筋力発揮時には顎頭が後下方へ変位する傾向があることを報告した。身体運動時における咬合接触に関する報告では、咬合圧感応シートを口腔内に挿入して測定したものが^{6,8)}、これらは通常の口腔機能環境と異なり、自然な下顎位に位置しているとは考えにくい。また、咀嚼筋については、スプリント装着時の身体運動時の筋活動様相について検討されており⁹⁾、スプリント装着によって運動能力は向上するが、咀嚼筋の活動量の変化には一定の傾向は認められないと報告されている。このように、身体運動時の下顎の動態については密接な関係がある¹⁻¹⁹⁾とされながらも、いまだに明らかではなく系統立てられた見解が望まれる。

今回は、それらを解明する一助とするため、全身の筋力の指標と考えられる背筋力²⁰⁾を最大発揮した場合の咀嚼筋の筋活動様相について検討した。

II. 研究方法

被験者は顎口腔系に自覚的、他覚的に異常を認め

ず、顎関節に既往および現病歴のない個性正常咬合を有し、体幹四肢の運動機能に異常を認めない健常男性 9 名 (年齢 21~26 歳, 平均 23.7 歳) とした。

なお、本実験の開始前に各被験者に対して研究の目的および内容に関して十分な説明をし、同意を得たうえで実験を行った (日本大学松戸歯学部倫理委員会承認番号 EC04-024 号)。

背筋力発揮は汎用背筋力計 (T.K.K. 5002, 竹井機器工業, 新潟) を使用し、スポーツテストの指針²¹⁾に従って行った。背筋力最大発揮は 3 秒間行わせ、これを疲労回復を考慮して 3 分間の休憩をはさみ 3 回行った。

被験咀嚼筋として、左右両側側頭筋前部筋束、咬筋浅部、および顎二腹筋前腹を選択した。電極の位置は側頭筋前部筋束では側頭筋前縁と平行に 10 mm 後方の部位で筋線維の走行と平行に、咬筋浅部では筋側中央部に筋側前縁と平行に、顎二腹筋前腹ではオトガイ部と下顎角を結ぶ線とオトガイ部矢状線とのなす角の二等分線上でオトガイ部より 20 mm の位置にそれぞれ貼付した。咀嚼筋筋活動量の測定には、マルチテレメータシステム (WEB-5000, 日本光電, 東京) を使用し、電極は直径 5 mm の Ag-AgCl 双極表面電極を用いた。計測時には、電極のリード線が被験者の身体運動に障害とならないよう配慮した。測定条件は、高域遮断周波数 (High cut) は 100 Hz, 時定数は 0.03 秒, 感度 (SENS) は 0.5mV/diV にて行った。導出された筋電図信号は波形分析ソフト PowerLab (AD Instruments, Australia) に取り込み、サンプリング周波数 1 kHz としてパーソナルコンピュータに記録した。また、咬頭嵌合位における最大随意噛みしめ時の側頭筋および咬筋の筋活動量と、下顎骨正中下縁に両手の拇指をあてがい、頭位が後屈しないように最大随意開口抵抗を試みた時の顎二腹筋の筋活動量を計測した。このとき、開口量としては咬頭嵌合位からごくわずかの開口量で行った。さらに、ピーナッツ約 1g (1 粒) を自由に咀嚼させ、各筋の筋活動量を計測した。筋電図分析方法は、最大随意噛みしめ時、最大随意開口抵抗時、背筋力発揮時においては、得られた筋電図波形の 3 秒間のうちの中央 1 秒間の中の 0.2 秒間の振幅値を、ピーナッツ咀嚼時については、筋電図波形を認めた中央から前後 0.1 秒間の計 0.2 秒間を選択し、各筋における、左右両側実効値 (RMS 値) の平均を算出

した。得られたRMS値より、側頭筋、咬筋、および顎二腹筋の最大随意筋活動量に対する相対比率を求めた。各被験筋の背筋力発揮時およびピーナッツ咀嚼時と最大随意筋活動量間の統計学的検定には、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) および多重比較 (Tukey-Kramer's Method) を用いた。

III. 結 果

図 1a に最大随意噛みしめ時、最大随意開口抵抗時、図 1b に背筋力発揮時、およびピーナッツ咀嚼時の筋電図波形の代表例を示す。表 1~4 に最大随意噛みしめ時、最大随意開口抵抗時、背筋力発揮時、およびピーナッツ咀嚼時における側頭筋、咬筋、および顎二腹筋の筋活動量 (RMS 値) を示す (表 1~4)。表 5 に各被験者での最大随意筋活動量を 100 とした背筋力発揮時とピーナッツ咀嚼時における相対比率を示す (表 5)。また、図 2 に全被験者の相対比率を平均した結果を表す (図 2)。

1. 背筋力発揮時の咀嚼筋活動について

背筋力発揮時における各被験者での RMS 値は、側頭筋において 76.4~189.7 (最大随意時 218.9~477.6)、咬筋で 68.4~233.6 (最大随意時 232.8~562.9)、顎二腹筋で 112.9~264.4 (最大随意時 118.6~245.8) であった (表 3)。

また、背筋力発揮時における被験者 9 人の相対比率の平均は、側頭筋、咬筋、および顎二腹筋それぞれにおいて 32.1%、26.4%、97.4% であった (表 5)。

2. ピーナッツ咀嚼時の咀嚼筋活動について

ピーナッツ咀嚼時における各被験者での RMS 値は、側頭筋において 83.6~215.2 (最大随意時 218.9~477.6)、咬筋で 99.1~206.4 (最大随意時 232.8~562.9)、顎二腹筋で 15.7~49.3 (最大随意時 118.6~245.8) であった (表 4)。

また、ピーナッツ咀嚼時における被験者 9 人の相対比率の平均は、側頭筋、咬筋、および顎二腹筋それぞれにおいて 40.7%、36.0%、17.3% であった (表 5)。

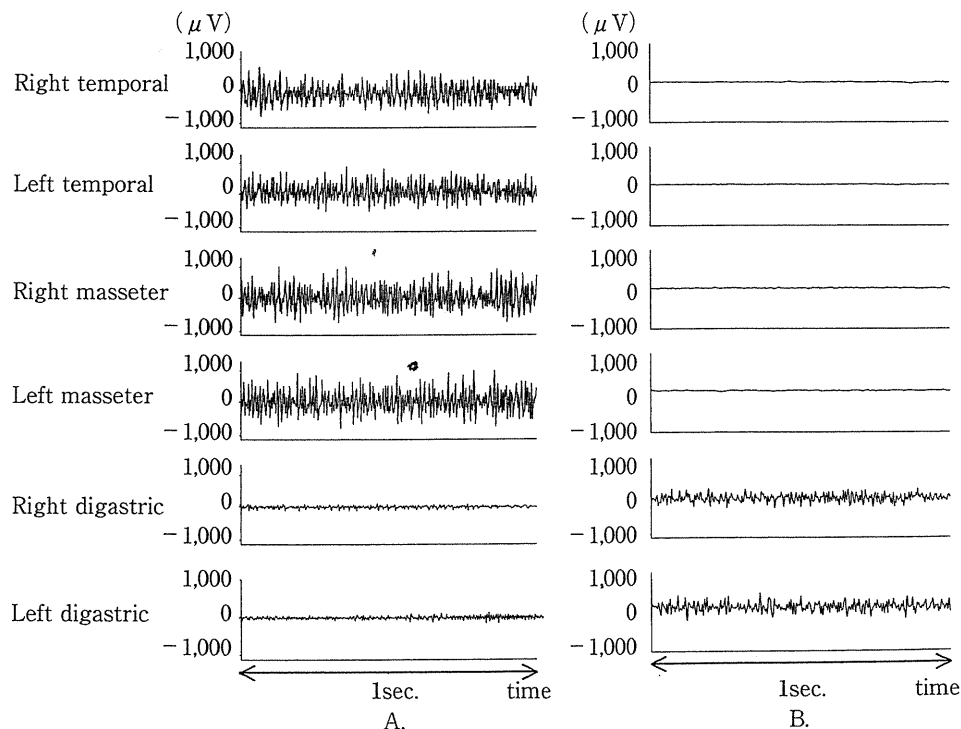


図 1a Electromyographic patterns

A : Maximal voluntary clenching, B : Resistance against forced mouth opening

筋電図波形

A : 最大噛みしめ時, B : 最大開口抵抗時の筋電図波形

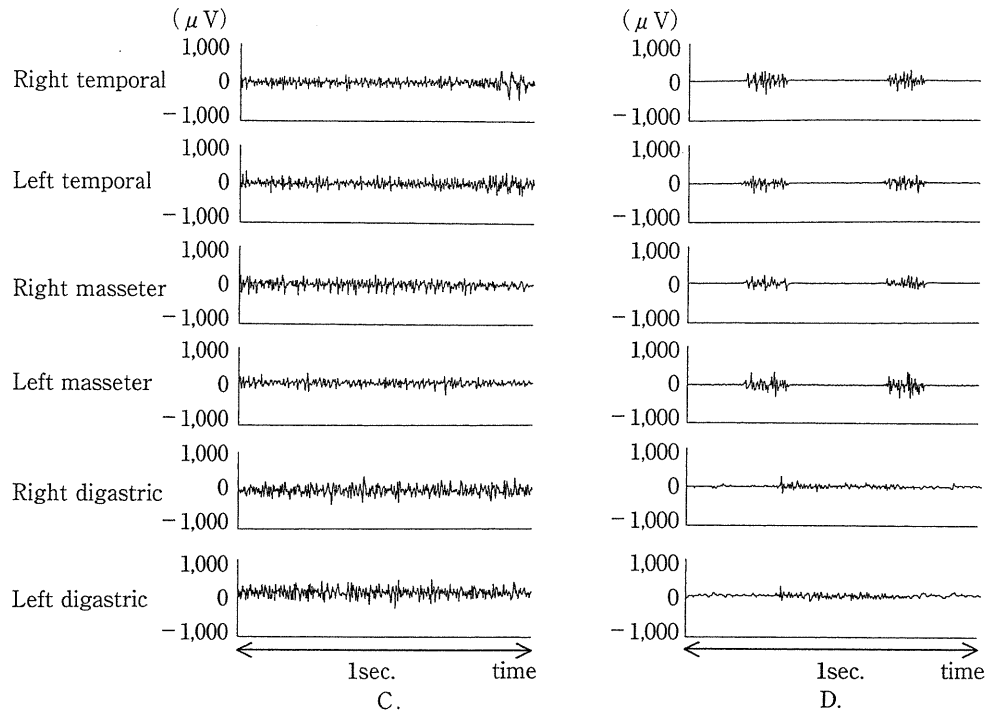


図 1b Electromyographic patterns
 C : Exertion using back strength, D : Mastication of peanuts
 筋電図波形
 C : 背筋力発揮時, D : ピーナッツ咀嚼時の筋電図波形

表 1 Masticatory muscle activity during maximal voluntary clenching (Root mean square value : RMS)
 最大随意噛みしめ時の咀嚼筋筋活動量 (RMS 値)

Subject	Temporal	Masseter	Digastric
No. 1	366.8	554.3	34.8
No. 2	221.7	419.7	14.6
No. 3	453.1	413.4	20.1
No. 4	477.6	504.4	8.7
No. 5	218.9	232.8	34.9
No. 6	253.4	332.0	51.2
No. 7	459.5	437.4	26.4
No. 8	362.7	562.9	16.7
No. 9	301.3	355.2	38.8

表 2 Masticatory muscle activity during exertion of resistance against forced mouth opening (Root mean square value : RMS)
 最大随意開口抵抗時の咀嚼筋筋活動量 (RMS 値)

Subject	Temporal	Masseter	Digastric
No. 1	97.1	153.3	225.3
No. 2	15.0	97.9	191.8
No. 3	73.6	54.4	227.5
No. 4	80.9	37.6	176.6
No. 5	24.2	53.9	203.7
No. 6	45.4	22.6	153.6
No. 7	18.8	38.1	118.6
No. 8	7.3	14.4	141.0
No. 9	26.3	103.6	245.8

3. 背筋力発揮時, ピーナッツ咀嚼時, および最大随意筋活動時の咀嚼筋筋活動の関係について

検定の結果, 側頭筋および咬筋については, 背筋力発揮時およびピーナッツ咀嚼時の筋活動量は, 最大随意筋活動時と比較して有意に小さかった ($p < 0.01$). また, 背筋力発揮時とピーナッツ咀嚼時の間には有意な差は認められなかった.

顎二腹筋については, 背筋力発揮時の筋活動量と最

大随意筋活動時の間に有意な差は認められなかった.

IV. 考 察

顎口腔系の保全にあたり, 体幹の筋力発揮時にヒトが自然に位置しようとする下顎の動態とそのメカニズ

表 3 Masticatory muscle activity during exertion using back strength (Root mean square value : RMS)
背筋力発揮時の咀嚼筋筋活動量 (RMS 値)

Subject	Temporal	Masseter	Digastric
No. 1	116.8	233.6	151.3
No. 2	83.9	116.8	228.1
No. 3	189.7	111.0	112.9
No. 4	112.8	136.2	195.6
No. 5	97.3	75.0	182.0
No. 6	76.4	68.4	155.3
No. 7	98.4	134.7	116.8
No. 8	80.3	120.3	124.1
No. 9	106.8	134.5	264.4

表 4 Masticatory muscle activity during mastication of peanuts (Root mean square value : RMS)
ピーナッツ咀嚼時の咀嚼筋筋活動量 (RMS 値)

Subject	Temporal	Masseter	Digastric
No. 1	215.2	206.4	25.5
No. 2	121.5	146.0	15.7
No. 3	83.6	142.3	20.8
No. 4	110.6	138.4	25.1
No. 5	102.4	99.1	49.3
No. 6	92.4	128.3	39.0
No. 7	174.9	190.9	24.5
No. 8	184.9	196.7	38.7
No. 9	117.6	107.7	38.7

表 5 Muscle activities of each masticatory muscle during exertion using back strength and mastication of peanuts against maximum voluntary muscle activity (relative percentage)
最大随意筋活動量に対する背筋力発揮時およびピーナッツ咀嚼時の咀嚼筋筋活動量 (相対比率)

Subject	Temporal		Masseter		Digastric	
	Back strength	Peanuts	Back strength	Peanuts	Back strength	Peanuts
No. 1	31.8	58.7	13.2	37.2	90.9	11.3
No. 2	37.8	54.8	27.8	34.8	118.9	8.2
No. 3	41.9	18.5	26.9	34.4	71.9	9.1
No. 4	23.6	23.2	27.0	27.4	110.8	14.2
No. 5	44.4	46.8	32.2	42.6	89.3	24.2
No. 6	30.1	36.5	20.6	38.6	101.1	25.4
No. 7	21.4	38.1	30.8	43.6	98.5	20.7
No. 8	22.1	51.0	21.4	34.9	88.0	27.4
No. 9	35.4	39.0	37.9	30.3	107.6	15.6
Average (S.D.)	32.1 (8.5)	40.7 (13.4)	26.4 (7.3)	36.0 (5.3)	97.4 (14.2)	17.3 (7.3)

(%)

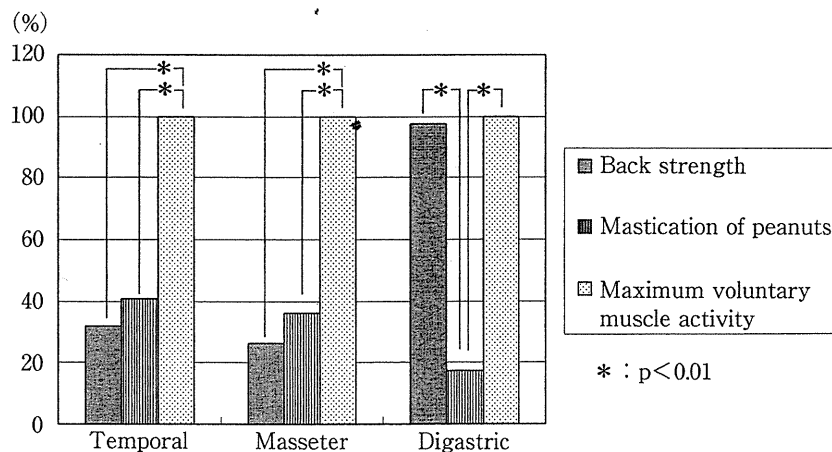


図 2 Muscle activities of each masticatory muscle during exertion using back strength and mastication of peanuts against maximum voluntary muscle activity (relative percentage)
各咀嚼筋の最大随意筋活動量に対する背筋力発揮時およびピーナッツ咀嚼時の筋活動量 (相対比率)

ム的一端を明示することは、スポーツ選手、スポーツ愛好家のみならず、ヒトの日常生活を含めて、歯科医学的見地からの診断、治療、そして予防に示唆を与えるものと思われる。今回は、術者側から口腔内環境を変化させる条件設定は行わず、体幹の筋力を発揮した場合の咀嚼筋筋活動量を評価した。

被験者には日常的に運動をしている男性を、年齢差が開かないように選択した。本研究では背筋力発揮時の咀嚼筋筋活動の様相を調べることが目的であるため、個性正常咬合を有し、顎関節に既往および現病歴のないものを対象としたが、ブラキシズムならびにクレンチングの自覚的、他覚的有無については、顎関節に問題がないことを条件としたため、問わなかった。

筋力が発揮される時、筋の収縮は等尺性収縮、等張性収縮に大別され、筋のもつ特性からは静的筋力、持久力、瞬発力の3つに分けることができる²¹⁾。等尺性収縮は、筋が平均的に一定の長さであること、あるいは、関節が一定の角度で、筋張力を変化させる収縮である。一方、等張性収縮は、平均的に一定の力を生じる筋収縮で、生体では一定のモーメント（トルク）での収縮である。背筋力は等尺性収縮で、静的筋力の1つであり、比較的ゆっくりと筋を収縮させて力を発揮するときの筋力である²⁰⁾。また、全身の特に背部諸筋、肩、上腕諸筋および腰部諸筋の共働最大筋力を現すものであり²²⁾、全身の筋力をみると考えて良いとされている²³⁾。そこで本研究においては、咀嚼筋筋活動様相を評価するにあたり背筋力を発揮させた。今回計測に用いた背筋力測定装置は、握力測定などとともに筋力測定としては一般的なものであり、広く用いられている方法である。測定操作は牽引動作のみできわめて簡便であるため問題ないものと思われる。身体運動時の噛みしめの有無や歯の接触が存在しているか否かについては、これまでも報告^{6,8)}がある。圧力感応シートなどを使用して歯の接触を検索しているが、これらの方法は運動実行中に口腔内にシートを保持しなければならず、運動に際して下顎位が自然な位置をとっているかどうか疑問である。事実、今回の予備実験において、感応シートを口腔内に保持させた場合とそうでない場合では筋電図波形に大きな相違がみられた。したがって、今回の検討では口腔内へ感応シートを置くことをしておらず、歯の接触状況については本実験とは別に自然な動態を阻害しない何らかの

方法が試みられるべきである。

筋電図に影響する要因には、活動している筋線維の数と大きさ、活動している筋線維に対する電極検出面の大きさと固定方向、そして活動している筋線維と検出電極間の距離がある。筋活動の計測にあたり、被験者間の個体差や、体組織構成の測定部位における相違から、得られた筋電位の比較を行うには、実質的にはどのような場合でも標準化をする必要がある。筋の最大随意収縮時の筋電図を記録しておいて、計測対象とした筋活動量を最大随意収縮時の筋活動量に対する%値に変換する方法^{10,24)}がよく使われており、本研究でもこの相対比率を採用した。また、これまでに咀嚼筋の測定対象は側頭筋、咬筋などの閉口筋が主であったが、本研究では開口筋である顎二腹筋に注目し、開閉口筋の筋活動様相を同時に計測することによって、下顎の動態がより詳細に推察することが可能となったと考える。

今回得られた結果では、背筋力発揮時に側頭筋、咬筋は最大随意筋活動量に対して、それぞれにおいて32.1, 26.4%であった。しかしながら、顎二腹筋の背筋力発揮時の筋活動量は97.4%であり、最大随意（開口抵抗）筋力発揮時と同等の活動様相を行っていることが示された。被験者のなかには最大随意筋活動とした開口抵抗運動時の筋活動量を上回るケースもあり、顎二腹筋においては最大ともいえる筋活動様相が示された。また、今回は、ピーナッツ咀嚼時の咀嚼筋筋活動量の計測も行った。これにより、背筋力発揮時の、特に閉口筋の筋活動量が、ピーナッツ咀嚼時のそれと比較することができ、より理解しやすくなると思われる。今回得られた結果では、ピーナッツ咀嚼時に側頭筋、咬筋は最大随意筋活動量に対してそれぞれにおいて40.7, 36.0%の筋活動量であった。また、顎二腹筋のピーナッツ咀嚼時の筋活動量は17.3%であった。これは、Gibbsら²⁵⁾の示した咀嚼力と同様の筋活動であり、背筋力発揮時には非常に強い噛みしめは行われていないことが示唆された。顎二腹筋についてみると、背筋力発揮時に大きく開口はしていないことを視認しており、かつ、最大随意開口抵抗筋活動量と同等の活動量を示したことから、筋の走向を考えると顎の後方への偏位が生じることが考えられる。予備実験において、舌骨下筋である胸骨舌骨筋も顎二腹筋と同調した筋活動を示したことから、舌骨固定下での大

きな開口のない顎二腹筋の強い収縮は、鈴木らの報告⁷⁾した後方への下顎の変位を裏づけるものと思われる。これらの現象のなかで、身体運動時の下顎の固定を考えたとき、その固定は、歯ならびに咀嚼筋群の協調により成り立つことが考えられる。すなわち、スポーツパフォーマンスを発揮するために大切なのは、咀嚼筋を使ってそのときの体勢や状況に最も適した位置に下顎を固定することと思われ、そのとき上下顎の歯が接触することがあっても、それは咀嚼筋群との協調のなかで生じるものであり、単に咬頭嵌合位で強く噛みしめているのではない、ということである。

また、強い噛みしめではないこと、および大きな開口を伴わない顎二腹筋の強い収縮から、顎関節も下顎の固定の支点として共働することが考えられる。これについては、身体運動の種類により固定様相が異なることも考えられ、顎関節における下顎の固定に対する役割と負担については今後検討されるべきであろう。側頭筋後部筋束、および外側翼突筋の筋電図学的検討を同時に行うことができれば、詳細なメカニズムも得やすいと思われるが、現時点では電極や倫理的問題から難しく、今回は行っていない。

以上のことから、背筋力を発揮する場面においては、側頭筋および咬筋の筋活動量はピーナッツ咀嚼時と同等であり、顎二腹筋においてはほぼその最大筋活動量を示し、下顎の固定に密接に関与することが示唆された。

V. 結 論

背筋力発揮時の側頭筋、咬筋、および顎二腹筋の筋電図学的検討から以下の結論を得た。

1. 背筋力発揮時の側頭筋、咬筋の筋活動量は、それぞれの最大随意噛みしめ筋活動量の約32%、および26%を示した。
2. 背筋力発揮時の顎二腹筋の筋活動量は、最大随意開口抵抗筋活動量の約97%を示した。
3. ピーナッツ咀嚼時の側頭筋、咬筋の筋活動量は、それぞれの最大随意噛みしめ筋活動量の約35~40%を示した。

本研究は、平成13年度学術フロンティア研究の一部にて行った。

文 献

- 1) Takahashi Y, Miyahara T, Tanaka T et al. Modulation of H reflex of pretibial muscles and reciprocal Ia inhibition of soleus muscle during voluntary teeth clenching in humans. *J Neurophysiol* 83 : 2063-2070, 2000.
- 2) Takahashi Y, Ueno T, Taniguchi H et al. Modulation of H reflex of pretibial and soleus muscles during mastication in humans. *Muscle Nerve* 24 : 1142-1148, 2001.
- 3) 高田敏幸, 上野俊明, 大山喬史. ヒト上肢筋 H 反射と噛みしめの関連性. *日咀嚼誌* 12 : 212-253, 2002.
- 4) 河野正司, 吉田恵一, 小林 博ほか. 咬合機能時にみられる胸鎖乳突筋の活動様相. *補綴誌* 31 : 764-769, 1987.
- 5) 佐藤康弘. 姿勢変化が咬合機能時の胸鎖乳突筋活動に及ぼす影響について. *口病誌* 62 : 29-47, 1995.
- 6) 石島 勉, 平井敏博, 今村 円. 全身運動時のクレンジングの発現頻度に関する研究. *補綴誌* 35 : 193-199, 1991.
- 7) 鈴木浩司, 浅野 隆, 川良美佐雄ほか. 背筋力発揮時における顎頭位について. *日大口腔科学* 27 : 312-319, 2001.
- 8) 藤井佳朗. 全身状態の咬合に及ぼす影響について. *デンタルマガジン* 71 : 62-63, 1991.
- 9) 石岡 克, 河野正司, 佐藤康弘. 身体の持続性運動と相動性身体運動時に観察される咀嚼筋の筋活動様相. *顎機能誌* 10 : 105-110, 1992.
- 10) Verban EM Jr, Groppe JL, Pfautsch EW et al. The effects of a mandibular orthopedic repositioning appliance on shoulder strength. *J Craniomandib Pract* 2 : 233-236, 1984.
- 11) Kaufman RS. A Experimental study on the effect of the MORA on football players. *Basal Facts* 6 : 119-126, 1985.
- 12) Forgiione AG, Metha NR, McQuade CF et al. Strength and bite, Part II : Testing isometric strength using a MORA set to a function criterion. *J Craniomandib Pract* 10 : 13-20, 1992.
- 13) 上野俊明. 噛みしめと上肢等尺性運動の関連性に関する研究. *口病誌* 62 : 21-30, 1995.
- 14) Sasaki Y, Ueno T, Taniguchi H et al. Effect of teeth clenching on isometric and isokinetic strength of ankle planter flexion. *J Med Dent Sci* 45 : 29-37, 1998.
- 15) Sumita Y, Sasaki Y, Ueno T et al. Effect of teeth clenching on the force-velocity relationships in isokinetic knee extension. *Jpn J Phys Fitness Sports Med* 48 : 365-374, 1999.
- 16) Yamanaka T, Ueno T, Sasaki Y et al. Effect of teeth clenching on muscle strength during repeated isokinetic knee extension. *Jpn J Phys Fitness Sports*

- Med 49 : 419-432, 2000.
- 17) 石岡 克, 河野正司. 咬合支持の安定性が持続的身体運動に及ぼす影響. 新潟歯学会誌 32 : 267-273, 2002.
- 18) 中禮 宏 : 噛みしめと握力発揮特性の関連性. 口病誌 70 : 82-88, 2003.
- 19) 佐藤文宏. ゴルフスイングに及ぼす噛みしめの影響. 鶴見歯学 29 : 269-279, 2003.
- 20) 岡川 暁. 背筋力, スポーツ医学基本用語ゼミナール. 臨床スポーツ医学 vol. 5 臨時増刊号 312-313, 東京 : 文光堂, 1988.
- 21) 松島茂善. 改訂スポーツテスト指針 136-137, 東京 : 第一法規, 1969.
- 22) 松浦義行. 体力測定法 180-186, 東京 : 浅倉書店, 1987.
- 23) 東京都立大学身体適正学研究室編. 日本人の体力標準値 第 2 版 121-124, 東京 : 不味堂, 1975.
- 24) 隅田陽介, 上野俊明, 大山喬史. 最大膝関節伸展運動に関連した咬筋の筋電図活動. スポーツ歯学 7 : 43-51, 2004.
- 25) Gibbs CH, Mahan PE, Lundeen HC et al. Occlusal forces during chewing and swallowing as measured by sound transmission. J Prosth Dent 46 : 443-449, 1981.

著者連絡先 : 浅野 隆

〒 271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

TEL : 047-360-9641

FAX : 047-360-9615

E-mail : asano.takashi@nihon-u.ac.jp

Masticatory Muscle Activity during Exertion of the Back

Asano Takashi, Kawara Misao, Suzuki Hiroshi,
Komiyama Osamu, Fukumoto Masahiko* and Iida Takashi**

Department of Clinical Oral Physiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

*Laboratory Medicine for Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo

J Jpn Prosthodontic Soc 50 : 45-53, 2006

ABSTRACT

Purpose : The lower jaw is considered to be fixed during body exercise. However, its mechanism remains to be elucidated. The present study investigated masticatory muscle activity during of the back.

Methods : The subjects were 9 healthy dentulous patients. The maximum back strength of the patients was measured with a back-dynamometer. Muscle activities of the temporal, masseter and digastric muscles during exertion of the back and mastication of peanuts were measured. Muscle activities of the temporal and masseter muscle during maximum voluntary clenching and that of the digastric muscles during exertion of resistance against forced mouth opening were also measured, and maximum voluntary muscle activities were obtained. The relative percentage of each masticatory muscle against maximum voluntary activity was calculated from the data obtained, and muscle activities during exertion of the back, mastication of peanuts and maximum muscle activity were compared.

Results : Muscle activities of the temporal, masseter and digastric muscles during exertion of back muscles against maximum voluntary muscle activity were 32.1%, 26.4% and 97.4% respectively. Muscle activities of these muscles during mastication of peanuts against maximum voluntary muscle activity were 40.7%, 36.0% and 17.3% respectively.

Conclusions : Muscle activities during exertion of the back were 30% in the temporal and masseter muscle, and approximately 100% in the digastric muscles. The result suggests that the digastric muscles play a key role in fixing the mandible in all masticatory muscles including jaw-opening and closing muscles. People exert back strength not only in sports but also in daily life. This study demonstrates the stronger involvement of the digastric muscles in fixation of the mandible during exercise than during strong clenching. The results are of interest in terms of mandibular position, occlusal contact and the load on the temporomandibular joint (TMJ) since there is no wide mouth opening.

Key words

masticatory muscle, back strength, sports, electromyogram

顎運動の3次元表現を応用した小児に適した 顎運動解析装置の開発

三好克実

要旨：従来の顎運動解析装置と異なり小型軽量で小児に負担が少なく、微細な顎運動異常を検出できる装置の開発を試みた。試作顎運動解析装置の精度を検証するために、前歯部相当部の運動様相は差動トランスを用い、左側下顎頭相当部の運動様相は高精度形状測定変位計を用い実測波形を求め、その波形を基準として既存の顎運動解析装置として頻用されているナソヘキサグラフ®と比較したところ以下の結果を得た。

1. 試作顎運動解析装置の波形によって得られた開閉口運動の波形は、実測波形と一致していた。
2. 軸の位置とその方向の理論を応用した試作顎運動解析装置は、ナソヘキサグラフ®によって確認できなかった、開閉口運動異常を想定した右側下顎頭相当部に付与したレジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによする開閉口運動異常部の波形を確認できた。

従来の顎運動解析装置は下顎頭、臼歯などの任意点での顎運動を表記することは不可能であった。また、計測にあたっては種々な条件が指定され、低年齢時に適用することは困難であった。今回開発した試作顎運動解析装置は口腔模型や、CTなどの画像から計測可能な任意点での顎運動表記ができ、さらに下顎の瞬間回転中心である軸を表記することにより微細な顎運動異常を検出することが可能な装置の開発に成功した。

Key words：顎運動，3次元6自由度，回転中心

緒言

小児は、無歯期、乳歯列期、混合歯列期、永久歯列期へと成長していく過程において顎顔面部の形態的な成長に伴い、顎運動などの機能も発達していく。このダイナミックな成長・発達過程を解明することは、小児歯科学の根幹ともいえる。従来、口腔の成長変化を検討したものは、経年的に採取した口腔模型による成長研究¹⁻⁴⁾、側貌頭部エックス線規格写真による成長研究⁵⁻⁷⁾などが主であり、その主眼は量的な形態変化であった。機能面から発達変化を捉えた研究は、未だ緒についたばかりと言っても過言ではない⁸⁻¹⁰⁾。

一時、「噛めない子」「噛まない子」に代表される、軟食化に伴う現代の子供の摂食機能低下が社会的現象となった⁸⁻¹¹⁾。最近では顎関節異常を訴える小児の増加が叫ばれ、その要因のひとつに摂食機能の低下あるいは軟食の摂取による咀嚼筋の未熟が挙げられている⁸⁻¹⁰⁾。このように小児期の摂食機能発達の解明は必須である。

平成7年から学校歯科健診に顎関節の診査項目が追加となり¹²⁾学校歯科医、一般歯科医のみならず小児、保護者、教員の顎関節に対する関心が高まっている。しかし、顎関節症の発現要因は明確でなく、治療方法も確立されていない。倉田¹³⁾は顎関節症状のない低年齢児において、すでにMRI所見から顎関節に異常を認める者がいるというショッキングな報告をしている。顎運動異常の早期発見、早期治療ならびに予防の面からも健常小児の顎運動の発達過程ならびに咬合異常・顎関節異常を伴う小児の顎運動について詳細な研究が、ますます重要となろう。

従来、小児の顎運動の研究にあたっては、成人を対象とした顎運動解析装置を主に用いられている²⁰⁾ことから顎運動の測定時に小児に多大なストレスを与え、低年齢児では測定不可能なことが多かった。特に既存の顎運動解析装置では、頭部の固定ならびに頭部に特殊な装置の装着を強い、特別な計測室内でのみ計測可能となる等^{15, 20-23)}の小児には多くの限界を超えている。また口腔内に特別な装置の装着が必要なものは成人においても日常の顎運動を再現することは困難であり、小児ではなおさらである。そこでこれらの問題を解消し、小児への負担が少なく、日常の顎運動に近い状態で計測が可能な装置が必要である。

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(主任：前田隆秀教授)
(2001年12月13日受付)
(2002年4月12日受理)

一方、従来の3次元6自由度の概念で報告されている顎運動解析装置はxyz座標での任意点の位置変化ならびに角度変化を検討しているが、ポインターで指示できない任意点での解析は困難であった。また顎関節症状が発現する前徴候のような微細で複雑な顎運動変化を表現することも困難であった。

そこで著者は、小児に負担が少なく簡便で、移動することが容易でかつ特別な計測室を必要としない3次元6自由度顎運動解析装置の開発を試みた。さらに顎運動を軸の位置とその方向で表すことに着目したところ、従来表現できなかったポインターで指示できない任意点の解析さらに微細な顎運動の解析ができる画期的な表現方法を見出した。その表現法を応用した顎運動解析装置を試作し、開口量と下顎頭移動量が実測できる精密機器の計測値を基準として、現在市販されており顎運動研究に頻用されている3次元6自由度顎運動解析装置と比較検討したところ開発した顎運動解析装置の有用性が確認できた。

材料および方法

1. 開閉口顎歯模型の製作

図1に示す開閉口顎歯模型を作成した。1分間に6回転するワーレンモーターを用いて一定の開閉口運動ができるようにした小児用顎模型を装着した開閉口顎歯模型を2体作製した。モーターに取り付けた真鍮製の円盤を取り付け、中心から9.68mmの部位にシャフト1の一端を、顎模型の下顎部底面にシャフト2を取り付けた。このシャフト1とシャフト2を連結させることにより、

顎模型を一定の開閉口運動を可能とした。

下顎オトガイ相当部にクラッチを取り付け、今回、著者が開発した3次元6自由度顎運動解析装置（以下、試作顎運動解析装置）ではマーカーとして青球を、ナソヘキサグラフ®による測定ではマーカーとしてLEDを、基準点として測定した。作製した開閉口顎歯模型2体のうち、1体はスムーズな開閉口運動をするものを正常開閉口顎歯模型とし、1体はスムーズでない開閉口運動をするものを異常開閉口顎歯模型とした。

異常開閉口顎歯模型の開閉口運動異常は、顎模型の右側下顎頭相当部にレジン構築を行い下顎頭表面に段差を付与し、さらにワーレンモーターに接続されえている円盤上にビスを0.1mm突出させ、最大開口位付近でシャフト1に干渉を起こさせた。しかし、正中での変位はノギスにおいて測定不可能なほど微少のものとした。

右側下顎頭相当部にレジン構築したことによって、異常開閉口顎歯模型の開閉口運動異常は正常開閉口顎歯模型に比べ正中が左側に0.75mm変位することを直接開閉口顎歯模型上でノギスにて確認できた。前後、上下方向への変位はノギスによる確認ができないものとした。一方、最大開口位付近のビスによる開閉口運動の干渉は、ビスとシャフト1との接触音によって確認可能であるが、ビスによる接触時の顎の右側への変位は確認できないほど微細なものとした。

2. 顎運動の解析

1) 差動トランスならびに高精度形状測定変位計

図2は切歯部相当部ならびに左側下顎頭相当部の開閉口運動に伴う変位測定の模式図を示し、切歯相当部の開

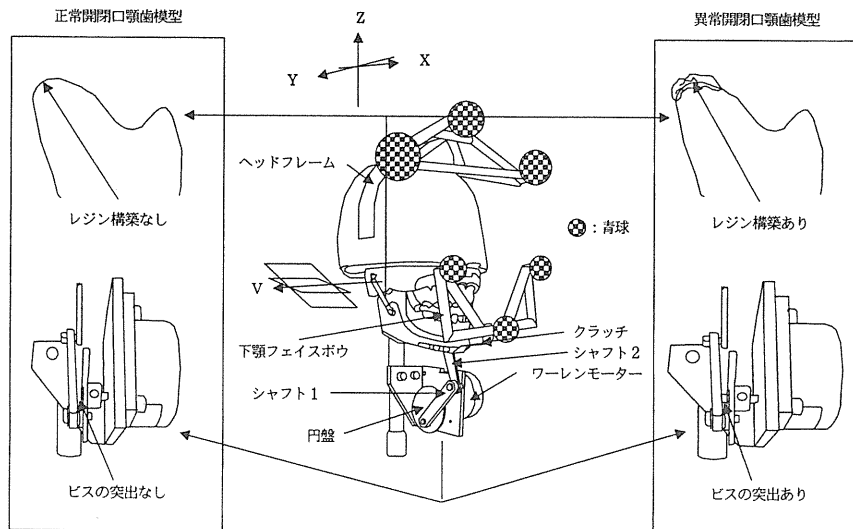


図1 開閉口顎歯模型の模式図

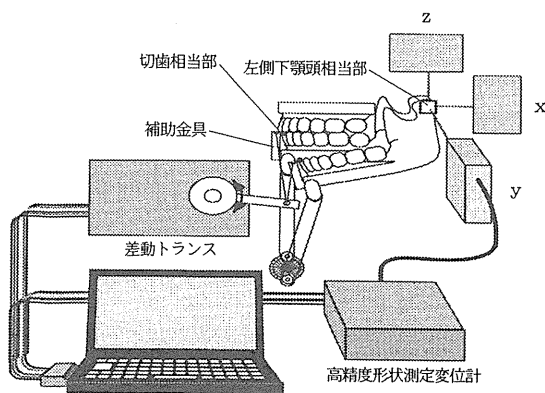


図2 差動トランスならびに高精度形状測定変位計における変位測定の様式図

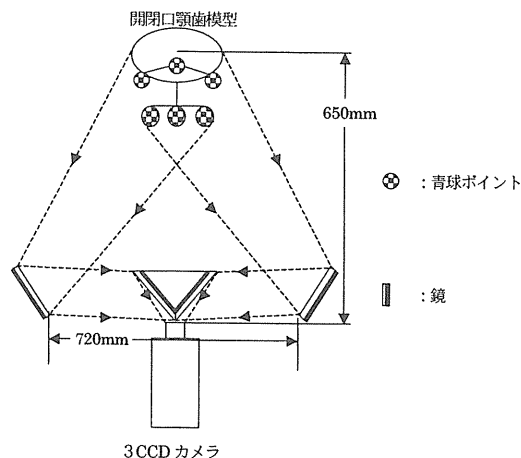


図3a 上方より見たステレオ撮影の様式図

口量の変位は差動トランス（新興通信社製：FT/200）で、左側下顎頭相当部の移動量の変位は高精度形状測定変位計（キーエンス社製：LE-4010）を用いて計測した。試作した開閉口顎歯模型の切歯相当部における開口時の変位は、下顎に設けた補助具と糸で連結した差動トランスのアナログ出力を高速レコーダー（キーエンス社製：NR-110）で10 KHzのデジタル情報としてパーソナルコンピュータに取り込んだ。また、左側下顎頭相当部のxyz方向の変位は、模型左側下顎頭中心より外側16.5 mmを中心として5 mmの立方形金属反射鏡を設け、高精度形状測定変位計を用いてアナログ出力を同様の方法でパーソナルコンピュータに取り込んだ。ここで得られたxyz方向の2乗和の平方根を左側下顎頭相当部の移動量とした。

得られた切歯相当部と左側下顎頭相当部の波形を実測波形とした。

2) 試作顎運動解析装置

開閉口運動を撮影する際の基準点（図1）は頭部に装着したヘッドフレームに3点、下顎フェイスボウに装着した3点の青球マーカの動きを図3a, 3bに示す様にステレオ撮影法で撮影した。開閉口顎歯模型を鏡に図3cの様映像が2等分され、画素数：154440、光度：400 cd/m²、視野角（上下/左右）105°/130°、映像サンプリング周波数：輝度信号13.5 MHz・R-Y信号3.375 MHz・B-Y信号：3.375 MHz・レンズ F1.6 f=4.2~50.4の機能を有する3CCDビデオカメラ（SHARP社製DIGITALVIEWCAM, VL-DH 4000）を用いデジタルビデオテープに開閉口運動を録画した。

ここで得られたビデオ映像はパーソナルコンピュータ



図3b ステレオ撮影機器

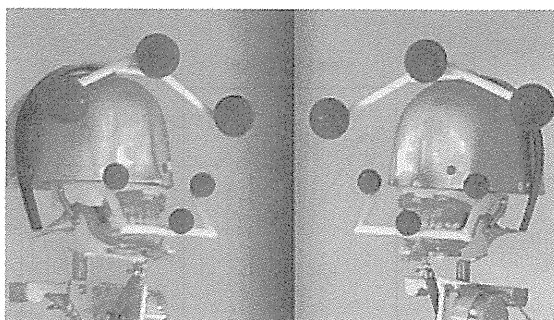


図3c 鏡により2等分された映像

（GATEWAY 2000, GP-6）とマルチメディアアクセラレータボード（CANOPUS社製マルチメディアアクセラレータ, PWR 128 P/4 VC, 画素数：76800）ならびに付属ビデオキャプチャソフト（Power Cinema EX）を用いオーディオビジュアルイメージファイルとして記録した。オーディオビジュアルイメージから Microsoft 社製

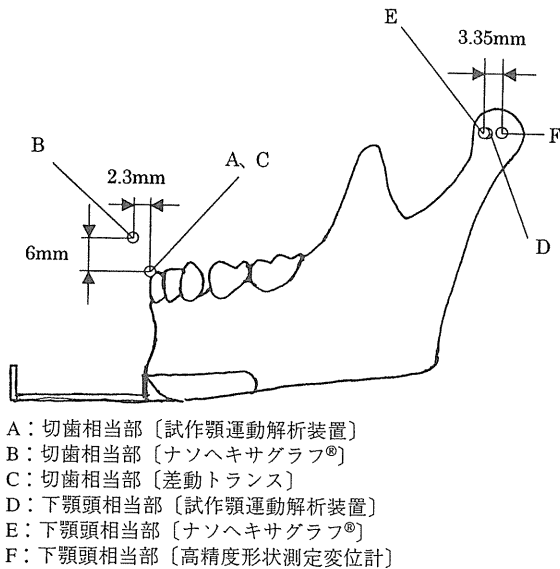


図4a 下顎任意点設定模式図

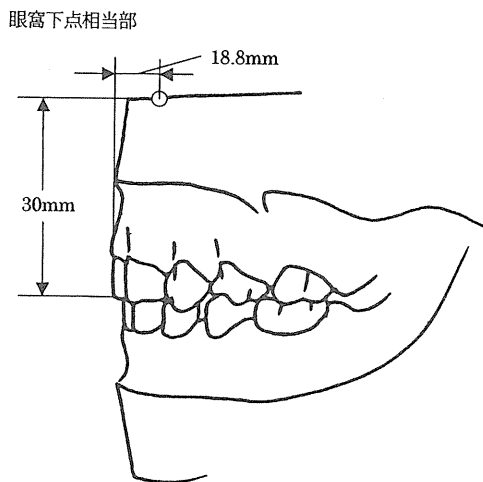


図4b 上顎任意点設定模式図

Visual Basic を用い、運動解析プログラムを作製した。3次元座標値の算出にあたっては、オーディオビジュアルイメージファイル上に映されたマーカの中心座標を算出し、2次元座標値のずれを計算することにより求めた。また上顎に対する下顎の相対運動を算出して、3次元6自由度値とした。切歯相当部の開口量と左右側下顎頭相当部の移動量は、高精度形状測定変位計の移動量と同様の方法で算出した。また軸の位置とその方向の算出にあたっては、下顎フェイスボウ上の3点のマーカで構成される平面の移動量が最小となる瞬間回転中心の軸

を求めた。

下顎における任意点の運動解析を行うにあたり、下顎切歯相当部としては模型下顎切歯切縁間中央、左右側下顎頭相当部は模型下顎頭中心より前方 3.35 mm 外側 5.1 mm として設定した (図 4 a)。任意点における開閉口運動の算出は、下顎の青色マーカ 3 点からそれぞれの任意点までの距離を直接計測し、下顎の青色マーカからの位置関係から座標を求めた。なお、正常開閉口顎歯模型と異常開閉口顎歯模型の開閉口運動計測は 30 Hz で行った。

開閉口顎歯模型の位置を一定化するために基準となる平面を必要とする。そこで眼窩下点相当部として模型上顎切歯切縁間中央より上方 30 mm、左側 18.8 mm (図 4 b) の 1 点と、左右側下顎頭相当部の 2 点を通る擬似的なフランクフルト平面を基準にした。

3) ナソヘキサグラフ®

ナソヘキサグラフ®は高速度 CCD カメラを 2 台組み込んだステレオカメラにより頭部ヘッドフレームと下顎フェイスボウに取り付けられた LED 発光ダイオードを撮影し、専用のデジタル信号処理装置により任意点のステレオ画像処理をリアルタイムで行い、上顎に対する下顎の相対運動を算出する。

ナソヘキサグラフ®の取り扱い説明書に従い頭部にヘッドフレーム、下顎部のクラッチ部に下顎フェイスボウを取り付け、任意点の計測には付属のペンポインターを用いて設定し、ナソヘキサグラフ®によって間接的に計測される。なお、正常開閉口顎歯模型と異常開閉口顎歯模型の開閉口運動計測は 90 Hz で行った。基準平面は頭部の眼窩下点相当部と左右側下顎頭相当部からなる擬似的なフランクフルト平面とした。任意の計測点の設定は、顎模型において下顎フェイスボウが切歯相当部と干渉を起こすため切歯相当部の代わりに模型切歯切縁間中央より前方 2.3 mm 上方 6 mm とし左右側下顎頭相当部を模型下顎頭中心より前方 3.35 mm 外側 12 mm (図 4 a) とした。

結 果

1) 実測波形

実測波形における切歯相当部の開口量は図 5 a に示すように 15.4 mm となり、閉口は開口と対称の平滑な曲線を描いた。一方、左側下顎頭相当部の移動量は図 5 b に示す様に 0.5 mm であった。その波形は、開口に伴って増加し、開口相と閉口相すなわち左右非対称であった。

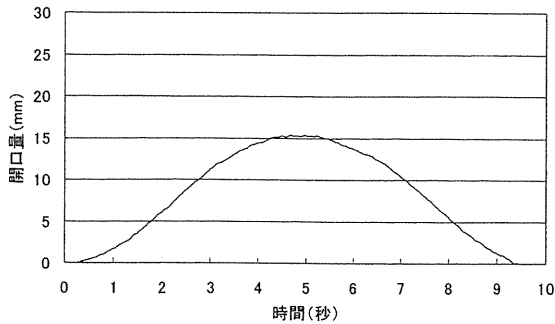


図 5 a 正常開閉口運動ファントム切歯相当部〔差動トランス〕

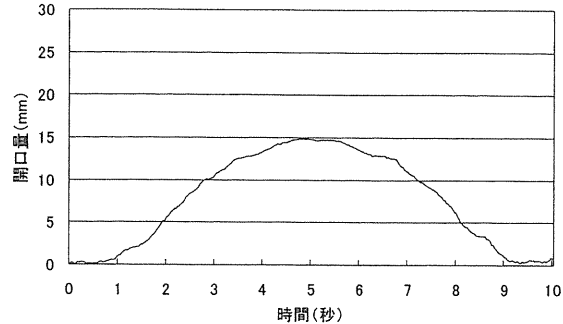


図 6 a 正常開閉口運動ファントム切歯相当部〔試作顎運動解析装置〕

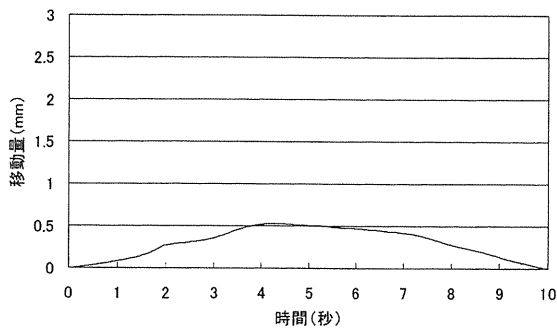


図 5 b 正常開閉口運動ファントム左側下顎頭相当部〔高精度形状測定変位計〕

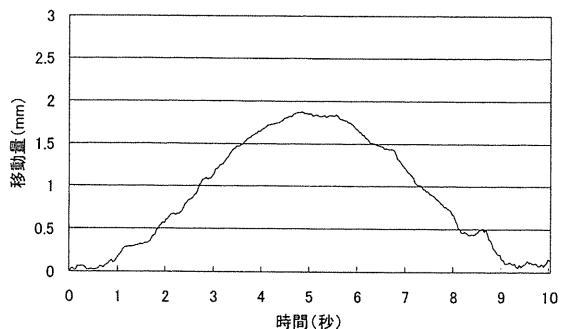


図 6 b 正常開閉口運動ファントム左側下顎頭相当部〔試作顎運動解析装置〕

2) 試作顎運動解析装置による開閉口運動波形

(1) 正常開閉口顎歯模型

正常開閉口顎歯模型の切歯相当部の開口量を試作顎運動解析装置で計測した結果は図 6 a に示すように 14.7 mm となり、閉口は開口と対称な曲線を描いた。一方、左側下顎頭相当部の移動量は図 6 b に示すように 1.8 mm、右側下顎頭相当部の移動量は図 6 c に示すように 1.6 mm であった。その波形の左右は実測波形と同様に非対称であった。

(2) 異常開閉口顎歯模型

異常開閉口顎歯模型の切歯相当部の開口量を試作顎運動解析で計測した結果は図 7 a に示すように 15.8 mm となり、閉口は開口と対称な曲線を描いた。一方、左側下顎頭相当部の移動量は図 7 b に示すように 1.8 mm、右側下顎頭相当部の移動量は図 7 c に示すように 2.3 mm であった。その波形は、開口に伴って増加し、左右は非対称であった。

これら 3 つの波形から、右側下顎頭相当部に付与したレジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによる開閉口運動異常は認められな

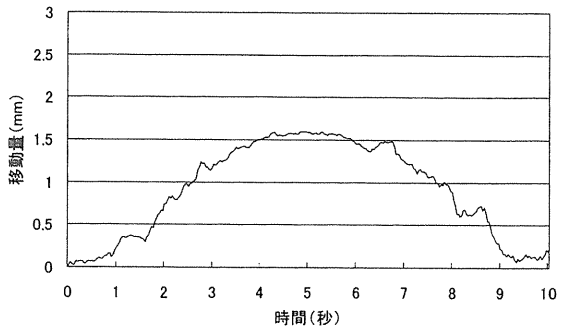


図 6 c 正常開閉口運動ファントム右側下顎頭相当部〔試作顎運動解析装置〕

かった。

3) ナソヘキサグラフ®による開閉口運動波形

(1) 正常開閉口顎歯模型

正常開閉口顎歯模型の切歯相当部の開口量をナソヘキサグラフ®で計測した結果は図 8 a に示すように 25.3 mm となり、閉口は開口と対称の平滑な曲線を描いた。一方、左側下顎頭相当部の移動量は図 8 b に示すように 2.2 mm、右側下顎頭相当部の移動量は図 8 c に示すよう

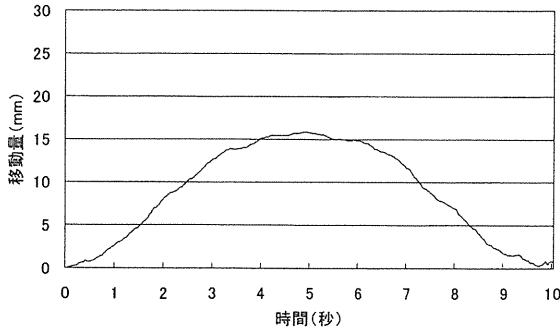


図7a 異常開閉口運動ファントム切歯相当部〔試作顎運動解析装置〕

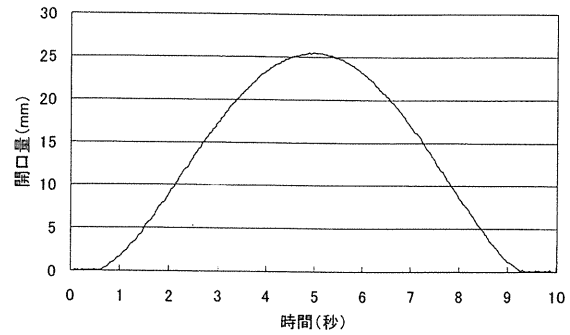


図8a 正常開閉口運動ファントム切歯相当部〔ナソヘキサグラフ®〕

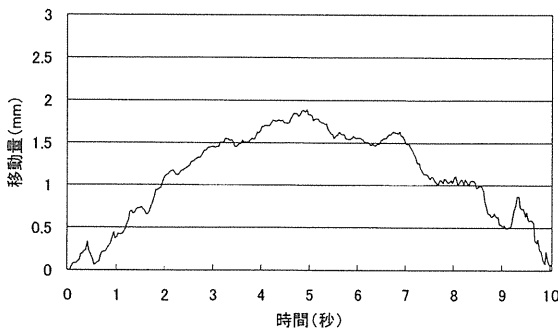


図7b 異常開閉口運動ファントム左側下顎頭相当部〔試作顎運動解析装置〕



図8b 正常開閉口運動ファントム左側下顎頭相当部〔ナソヘキサグラフ®〕

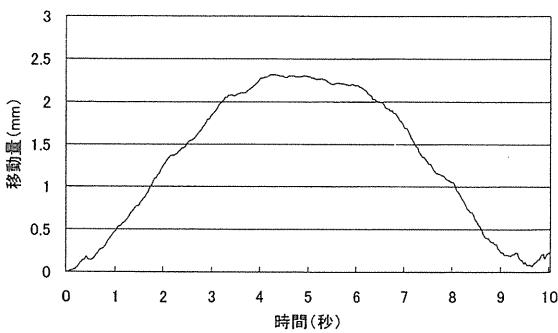


図7c 異常開閉口運動ファントム右側下顎頭相当部〔試作顎運動解析装置〕

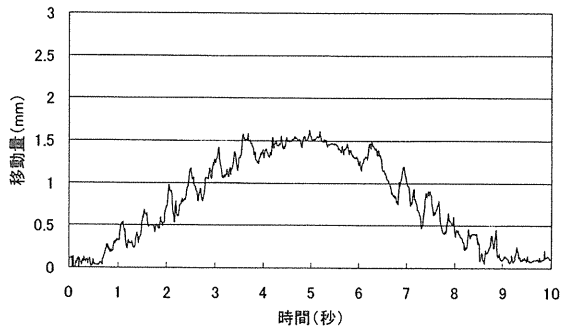


図8c 正常開閉口運動ファントム右側下顎頭相当部〔ナソヘキサグラフ®〕

に1.6 mmであった。その波形は左右対称で一定周期の凹凸が確認できた。

(2) 異常開閉口顎歯模型

異常開閉口顎歯模型の切歯相当部の開口量をナソヘキサグラフ®で計測した結果は図9aに示すように24.1 mmとなり、閉口は開口と対称の平滑な曲線を描いた。一方、左側下顎頭相当部の移動量は図9bに示すように

2.3 mm、右側下顎頭相当部の移動量は図9cに示すように2.8 mmであった。その波形は左右対称で一定周期の凹凸が確認できた。

これらの波形からは、右側下顎頭相当部に付与したレジジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによる開閉口運動異常を認められなかった。

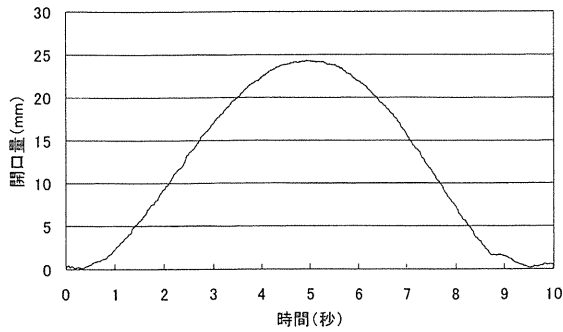


図9a 異常開閉口運動ファントム切歯相当部〔ナソヘキサグラフ®〕

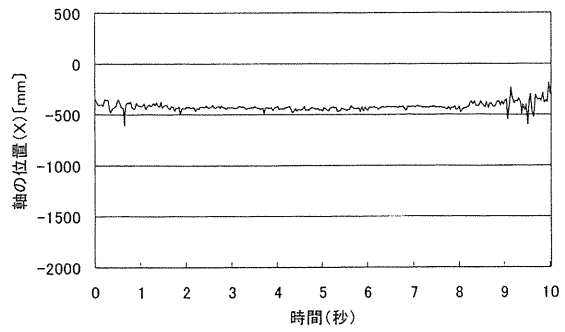


図10a 正常開閉口運動ファントム軸の位置(x)〔試作顎運動解析装置〕



図9b 異常開閉口運動ファントム左側下顎頭相当部〔ナソヘキサグラフ®〕

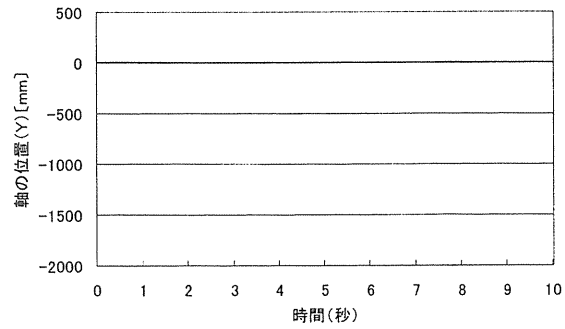


図10b 正常開閉口運動ファントム軸の位置(y)〔試作顎運動解析装置〕

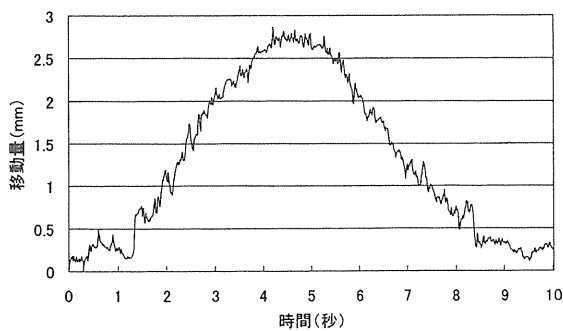


図9c 異常開閉口運動ファントム右側下顎頭相当部〔ナソヘキサグラフ®〕

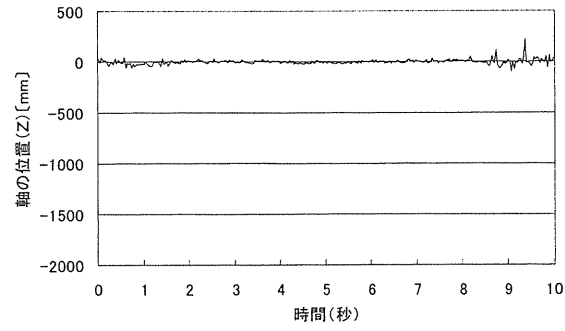


図10c 正常開閉口運動ファントム軸の位置(z)〔試作顎運動解析装置〕

4) 試作顎運動解析装置における軸を指標とした場合の顎運動解析

(1) 軸の位置

正常開閉口顎歯模型のxyz座標での軸の位置を図10a, 10b, 10cに示す。図10aはx座標すなわち前後方向の移動では、軸の位置の変動はほとんどなく、ただ咬合相と思われる領域においてわずかに変動を認めた。図10bはy座標すなわち左右方向の移動で、まったく

認められなかった。図10cはz座標すなわち上下方向の移動では、軸の位置の変動はほとんどなく、ただ咬合相と思われる領域においてわずかに変動を認めた。

一方、異常開閉口顎歯模型のxyz座標での軸の位置を図11a, 11b, 11cに示す。図11aはx座標を示し、咬合相と思われる領域において大きい変動を認めた。図11bはy座標を示し、変動はまったく認められなかった。図11cはz座標を示し、咬合相と思われる領域に

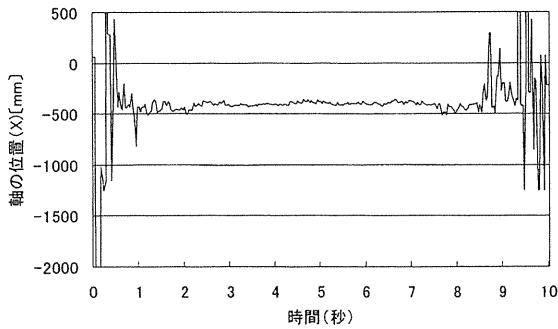


図 11 a 異常開閉口運動ファントム軸の位置 (x) [試作顎運動解析装置]

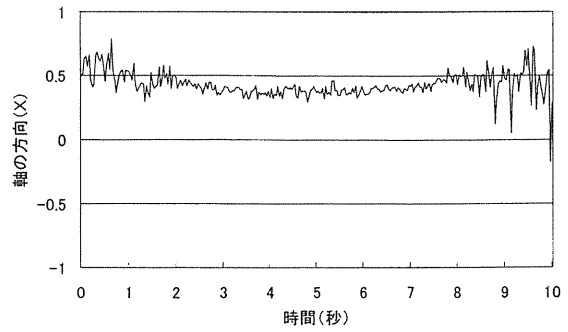


図 12 a 正常開閉口運動ファントム軸の方向 (x) [試作顎運動解析装置]

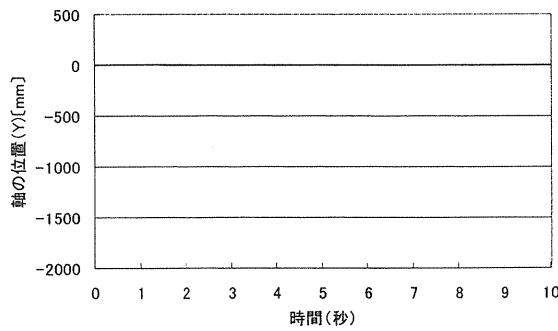


図 11 b 異常開閉口運動ファントム軸の位置 (y) [試作顎運動解析装置]

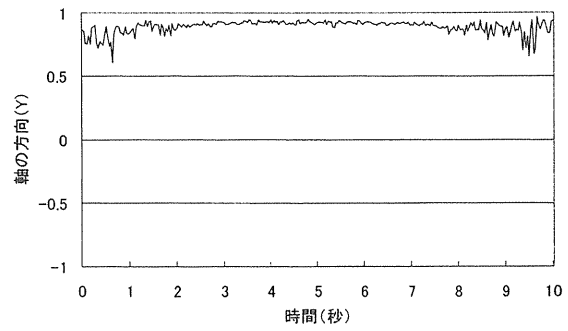


図 12 b 正常開閉口運動ファントム軸の方向 (y) [試作顎運動解析装置]

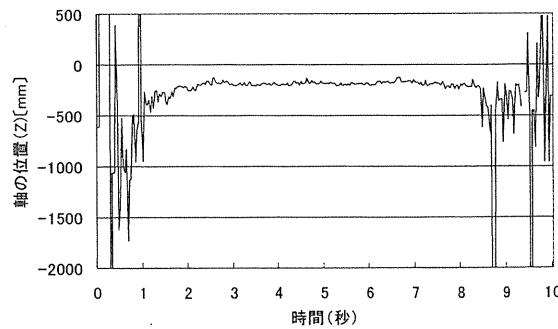


図 11 c 異常開閉口運動ファントム軸の位置 (z) [試作顎運動解析装置]

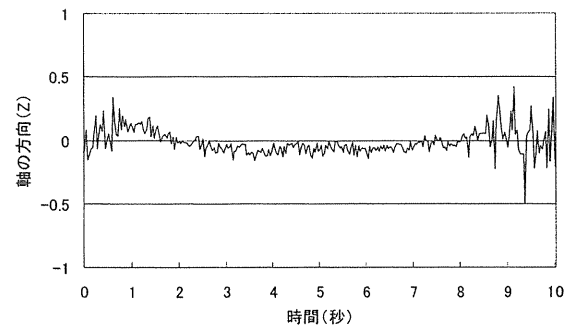


図 12 c 正常開閉口運動ファントム軸の方向 (z) [試作顎運動解析装置]

において大きい変動を認めた。

これらの波形からは、右側下顎頭相当部に付与したレジジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによる開閉口運動異常を認められなかった。

(2) 軸の方向

正常開閉口顎歯模型の軸の xyz 方向を図 12 a, 12 b, 12 c に示す。

図 12 a は x 方向を示し、咬合相と思われる領域において変動を認めた。図 12 b は y 方向を示し、咬合相と思われる領域においてわずかに変動を認めた。図 12 c は z 方向を示し、咬合相と思われる領域において変動を認めた。

一方、異常開閉口顎歯模型の軸の xyz 方向を図 13 a, 13 b, 13 c に示す。図 13 a は x 方向を示し、咬合相と思われる領域において大きい変動を認めた。図 13 b は

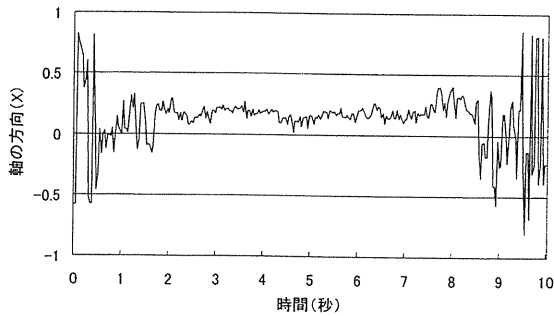


図 13a 異常開閉口運動ファントム軸の方向 (x) [試作顎運動解析装置]

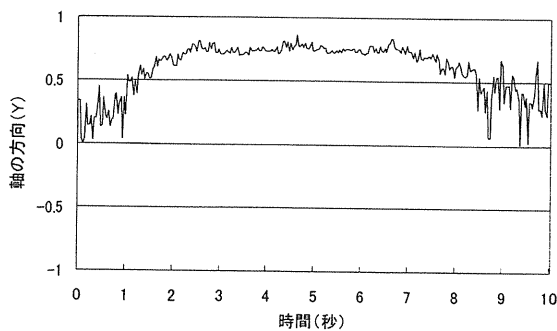


図 13b 異常開閉口運動ファントム軸の方向 (y) [試作顎運動解析装置]

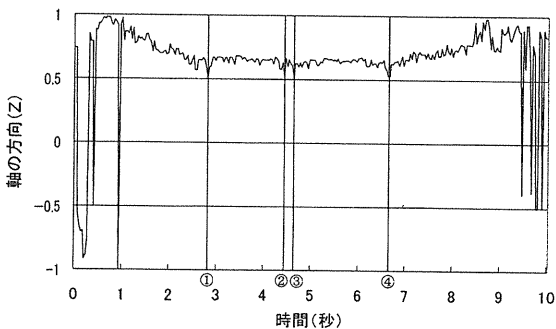


図 13c 異常開閉口運動ファントム軸の方向 (z) [試作顎運動解析装置]
①, ②, ③, ④: レジンとビスによる運動異常

y 方向を示し、咬合相と思われる領域において大きい変動を認めた。図 13c は z 方向を示し、咬合相と思われる領域において大きい変動を認めた。さらに試作顎運動解析装置とナソヘキサグラフ®の切歯相当部ならびに左右下顎頭相当部の波形と試作顎運動解析装置で求めた軸の位置からは、右下顎頭相当部に付与したレジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによる開閉口運動異常は認められなかったが、

軸の z 方向の波形から始めて①, ②, ③, ④に示すような運動異常を確認することができた。

考 察

顎運動の解明は、歯科医学における主要なテーマであり、小児歯科の分野においても、顎関節症を始めとして顎運動異常を訴える小児の増加から顎運動異常パターン認識のみならず、正常な顎運動の発達を知る上で必須である。

顎運動を計測する主な解析装置としては磁気¹⁸⁾、あるいは LED^{20,24)}などを用いた 3次元 6自由度解析装置がある。磁気を用いた装置では、計測にあたって磁場の影響を受けなくするためにシールドルームを必要とし、LEDを用いた装置では、感受性を高めるために暗室を必要とすることから、低年齢児の顎運動解析あるいは学校歯科健診などの集団健診時に顎運動を計測することは不可能である。また計測装置の分析能力であるが、機器の精度に依存し、精度が高いほど高価格となり、臨床応用が困難となる。そこで、解析装置の精度に左右されず、微細な咬合の異常、クリックや開閉口運動の異常を確認することができないか着目した。

顎運動の研究は、種々の顎運動計測装置を用いて xyz 座標での任意点から全運動軸¹⁷⁾や平均的顎頭点^{14,16)}を算出した研究がなされてきた。

河野¹⁷⁾が報告した全運動軸は断層 X 線写真およびマルチフラッシュ装置を用いているため、その性質上、下顎が矢状面内を動く 2次元運動の測定は可能であるが、3次元の立体運動測定は不可能である。

一方、顎頭点の顎運動を正確に測定し把握するためには 6自由度すなわち、xyz 座標点の位置と回転角度で表される顎運動解析が必要である。6自由度顎運動についてはこれまでもいくつか報告^{14,16)}があるが、顎運動を測定して得られた 6項目の結果が種々の組み合わせで表現されることから自由度が高く、極めて適応性があるが、運動を理解するためには複数の任意点での組み合わせにより顎運動を想像しなくてはならず規則性をもたないために解析が難しい¹⁷⁾。顎運動を正確に把握するためには、顎頭部を含む下顎全体としての運動として捉える必要がある。

特に顎頭運動の定量的な評価を行うにあたっては、顎頭運動が直接測定したいところであるが、それは不可能なことから仮定の顎頭点の運動を評価するのだが、顎頭の測定点のわずかな違いにより運動経路が異なる¹⁷⁾。さらに、側方運動時において、作業側は非作業側と比べ顎頭運動距離が小さいことから顎頭点の xyz 座標での位

置によるものなのか、あるいは顎頭の回転によるものかを判断することが困難である。真柳¹⁹⁾は、顎頭の回転運動を顎頭の平行運動として誤認する可能性のあることを述べている。以上のことから顎頭の運動を3次元的に、しかも定量的に解析することは極めて難しいと考えられる。

したがって6自由度の顎運動に対して、運動論的顎頭点を顎運動の解析する点とすることが最も望ましいと山口¹⁴⁾は、報告しているがその基準が十分に確立しているとはいえない。そこで長谷川¹⁶⁾は、全運動軸に3次元の立体運動を含めた軸の振舞を追求して行く必要があるとしているが、側方運動経路は当然のことながら湾曲をもちその移動量を実長として知るのはほとんど不可能であると報告している。

顎運動は3次元的な滑走運動^{14, 16, 18, 19)}と回転運動^{14, 18)}からなり、3次元6自由度(xyz座標, xyz座標の回転)として表現されている。しかし、従来の多くの報告にはxyz座標に関する議論はされているが、xyz座標の回転に関する経時的な変化に対する議論は少ない¹⁶⁾。そのため真の顎運動を表現しているのではなく、任意点の位置変化を示しているに過ぎず、複雑な3次元的な顎運動を捉えていない。一方、xyz座標の回転から顎運動を評価した報告^{14, 18)}はわずかであるがみられる。しかし、その回転中心がどこに存在し、どのように変化しているかについては検討されていない。その結果、微細なクリックや咬合変位による運動変化を来した場合、計測点以外の任意点での運動の変化を検知することは難しい。そこで任意点での微細な運動変化を表現できる理論を検索した。

剛体の回転軸の位置とその方向が明らかとなれば、剛体の任意点で認識できないような微細な変化を容易に認識できる。

その理論を展開すると、運動座標系における剛体の任意点Pの位置ベクトルを r 、同じ点の静止座標系における位置ベクトルを τ で表すと、点Pの無限小の変位 $d\tau$ は慣性中心とともに行う変位 dR と無限小角 $d\phi$ の回転によって生じる慣性中心に対する変位 $[d\phi \cdot r]$ とから合成される。

$$d\tau = dR + [d\phi \cdot r]$$

これに単位時間 $\left(\frac{d\tau}{dt} = v, \frac{dR}{dt} = V, \frac{d\phi}{dt} = \Omega\right)$ あたりを求め速度を導入すると次の関係が得られる。

$$v = V + [\Omega r]$$

V は滑走運動時の速度と呼ばれ Ω は回転運動時の角速度と呼ばれる。

原点が変化しても Ω は変化しないことを利用し、 $V' = V + [\Omega a]$ 、 $\Omega' = \Omega$ が成り立つことが一般的に示されている。ここで求めた V が軸の位置とその方向を示す。今回、着目した軸の概念を用いれば、軸の位置と方向の経時変化を追うことにより滑走運動と回転運動からなる微細で複雑な顎運動を克明に表現することが可能である。この軸の位置と方向を計測できるプログラムを内在した試作顎運動解析装置を考案した。

この理論を具現化するには、再現性のある開閉口運動を行う開閉口顎歯模型が必要であることから、微細な顎運動を認識できるかを正常開閉口顎歯模型と異常開閉口顎歯模型を作成した。一方、試作顎運動解析装置を検討するにあたって市販で頻用されているナソヘキサグラフ[®]と比較した。さらに、切歯相当部の開口量ならびに左側下顎頭相当部の移動量は、極めて精度の高い差動トランスと高精度形状測定変位計を用いて実測波形を求め、それを基準とした。

その結果、試作顎運動解析装置の切歯相当部の波形は実測波形に近い左右対称の曲線を描く軌跡であった。一方、ナソヘキサグラフ[®]の波形は左右対称の曲線を描いているものの非常に大きな開口量を示した。この原因として切歯相当部の設定において、今回用いた2体の開閉口顎歯模型が小児用模型を用いたために模型下顎切歯切縁間中央に設定する事が不可能でそのために模型の前方に設定されたためであるが、それを加味しても非常に大きな開口量を示した。井上²⁰⁾によるとペンポインターを上方、下方、左方、右方に傾けた場合は、それぞれに計測した座標値の中に外れ値が入っており、CCDカメラが正確に座標を読み取っていない場合があると報告している。今回、模型下顎切歯切縁間中央にもっとも近い点を認識させるためにペンポインターを傾け指示した。その結果、CCDカメラが正確に座標を読み取っていない可能性が高く、正常開閉口顎歯模型ならびに異常開閉口顎歯模型の両方で極端に大きな開口量を示したと思われる。このことからナソヘキサグラフ[®]で任意点の設定は、保持角度に注意する必要があるため口腔内の任意点の設定は難しいと言える。さらに詳しく試作顎運動解析装置とナソヘキサグラフ[®]の波形の違いを確認するために実測波形との差を図14に示した。この波形(図14)からも試作顎運動解析装置は実測波形に非常に近い結果が得られた。

試作顎運動解析装置ならびにナソヘキサグラフ[®]による左側下顎頭相当部の波形は、実測波形より移動量が大きかった。これは試作顎運動解析装置での任意点が実測波形を求めた任意点より前方に位置していたためであ

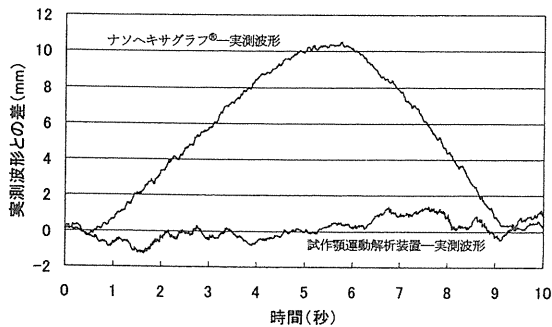


図 14 試作顎運動解析装置ならびにナソヘキサグラフ®の波形と実測波形との差

る。しかし、試作顎運動解析装置の波形は実測波形と同様に左右非対称であり、周期的な凹凸は認められないのに対し、ナソヘキサグラフ®の波形は左右対称で一定の周期で凹凸が確認できた。

波形の左右対称性ならびに一定周期の凹凸の有無が、ナソヘキサグラフ®のみに違いが現れたが、ナソヘキサグラフ®のソフトウェアの内部が公開されていないため、その原因を言及することはできなかった。

また、異常開閉口顎歯模型の切歯相当部と左右側下顎頭相当部の波形からは、右側下顎頭相当部に付与したレジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによるわずかな開閉口運動異常を確認することはできなかった。しかし、軸の方向を見ることによって右側下顎頭相当部に付与したレジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによるわずかな開閉口運動異常を検知できた。

このように試作顎運動解析装置は、精度のみならず従来の装置では任意点での顎運動解析が不可能であった既知の3つの位置からの距離を計測することにより口腔内であれば模型を作製し直接距離を計測するだけでなく、CTなどの距離計測可能な画像を用いて下顎頭を始め臼歯部等の任意点での3次元6自由度の計測が可能である。また試作顎運動解析装置は、直接装着する全重量がナソヘキサグラフ®が182g(ヘッドフレーム/下顎フェイスボウ:171g/11g)に対し53g(ヘッドフレーム/下顎フェイスボウ:48g/5g)と1/3以下であるためより負担は少なく設計されている。このことから小児に適した顎運動解析装置であると言える。

今後、試作顎運動解析装置を臨床応用する際には、今回クラッチをオトガイ相当部に固定をしたが、ヒトを対象とした場合口輪筋の影響を受けることからオトガイへの固定は現実的ではない。しかし、切歯部に今回用いたクラッチを付与することにより、臨床応用を可能とな

る。

過去に報告のない軸の位置とその方向から求めた3次元6自由度顎運動解析装置の開発に成功しさらに軽量で特別な計測室を必要としないことから、多くの健常な低年齢児の顎運動を蓄積することによって、微細な顎運動の変位の検出を経時的に捉えることができ、顎関節症を発症する小児と発症しない小児を比較し、顎関節症あるいは顎運動異常の初期の原因追求が可能になるなど研究、臨床に大きな発展が期待される。

結 論

従来の顎運動解析装置と異なり小型軽量で小児に負担が少なく、微細な顎運動異常を検出できる装置の開発を試みた。試作顎運動解析装置の精度を検証するために、前歯部相当部の運動様相は差動トランスを用い、左側下顎頭相当部の運動様相は高精度形状測定変位計を用い実測波形を求め、その波形を基準として既存の顎運動解析装置として頻用されているナソヘキサグラフ®と比較したところ以下の結果を得た。

1. 試作顎運動解析装置の波形によって得られた開閉口運動の波形は、実測波形と一致していた。
2. 軸の位置とその方向の理論を応用した試作顎運動解析装置は、ナソヘキサグラフ®によって確認できなかった、開閉口運動異常を想定した右側下顎頭相当部に付与したレジンならびにワーレンモーターに接続されている円盤上に突出させたビスによる開閉口運動異常部の波形を確認できた。

従来の顎運動解析装置は下顎頭、臼歯などの任意点での顎運動を表記することは不可能であった。また、計測にあたっては種々な条件が指定され、低年齢時に適用することは困難であった。今回開発した試作顎運動解析装置は口腔模型や、CTなどの画像から計測可能な任意点での顎運動表記ができ、さらに下顎の瞬間回転中心である軸を表記することにより微細な顎運動異常を検出することが可能な装置の開発に成功した。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師前田隆秀教授に深甚なる敬意と感謝の意をささげます。なお、本研究は学術フロンティア推進事業の補助を受けました。

文 献

- 1) 宮田太郎, 町田幸雄: 幼児期から青年期にいたる歯列弓長径の成長発育に関する累年の研究, 小児歯誌, 36: 80-92, 1998.
- 2) 宮田太郎: 青年期における切歯部の歯列および歯槽部の

三好克実：3次元顎運動解析装置の開発

- 成長発育に関する累年的研究, 歯科学報, 97: 259-295, 1997.
- 3) 青木志乃ぶ: 上顎切歯部の歯列および歯槽部の成長発育に関する累年的研究-乳歯列期から永久歯列期まで-, 歯科学報, 97: 1413-1475, 1987.
 - 4) 辻野啓一郎, 町田幸雄: 歯列弓幅径の成長発育に関する累年的研究, 小児歯誌, 35: 670-683, 1997.
 - 5) 前田隆秀, 岡本和久, 栗原洋一: 正常咬合者と不正咬合者の頭蓋顎顔面の発育研究 第1報 カナダ白人男子の縦断資料における正常咬合者と上顎前突不正咬合者の比較-側貌頭部 X 線規格写真における角度計測-, 小児歯誌, 32: 675-687, 1994.
 - 6) 前田隆秀, 岡本和久, 栗原洋一: 正常咬合者と不正咬合者の頭蓋顎顔面の発育研究 第2報 カナダ白人男子の縦断資料における正常咬合者と上顎前突不正咬合者の比較-側貌頭部 X 線規格写真における頭蓋顎顔面部の距離ならび面積計測-, 小児歯誌, 32: 688-702, 1994.
 - 7) 日本小児歯科学会: 日本人小児の頭部 X 線規格写真基準に関する研究, 小児歯誌, 33: 659-696, 1995.
 - 8) 前田隆秀, 今井 麗, 桶口直人, 斎藤健志, 赤坂守人: 小児の摂食機能と行動(食べ方)に関する研究-第1報咬合力, 咀嚼能力について-, 小児歯誌, 27: 1002-1009, 1989.
 - 9) 前田隆秀, 今井 麗, 桶口直人, 斎藤健志, 赤坂守人: 小児の摂食機能と行動(食べ方)に関する研究-第2報摂取状態と咬合力, 咀嚼能力との関係について-, 小児歯誌, 28: 133-142, 1990.
 - 10) 広瀬由治, 田村厚子, 岩田夏彦, 赤坂守人, 二木 武, 高野 陽: 小児の摂食機能に関する研究-第一報アンケートによる実態調査-, 小児保健研究, 47: 405-410, 1988.
 - 11) 前田隆秀: 小児の歯科健診の新方向, 小児保健研究, 60: 375-384, 2001.
 - 12) 都川延子, 田原有里子, 三好克実, 遠山美穂, 井下田繁子, 桶口忍生, 松野俊夫, 前田隆秀: 顎関節症・顎関節異常を訴える若年者の自我状態-エゴグラムによる検討-, 小児保健研究, 60: 69-74, 2001.
 - 13) 倉田康弘: 小児期の顎関節症症状の有無と顎関節 MR 画像の検討, 小児歯誌, 39: 937-947, 2001.
 - 14) 山口公子: 小児の6自由度顎運動測定による顎口腔機能の評価, 小児歯誌, 38: 129-137, 2000.
 - 15) 河邊弥寿恵: 顎運動解析装置の開発に関する研究-下顎頭および下顎切歯部の運動の同時解析-, 日大歯学, 72: 573-580, 1998.
 - 16) 長谷川成男, 野村孝太郎, 丸山雅昭, 田中貴信, 大杉尚之: 側方滑走運動における運動様式の検討, 補綴誌, 16: 381-386, 1972.
 - 17) 河野正司: 下顎矢状面内運動に対する顎頭運動の研究 第2報 マルチフラッシュ装置による矢状面運動の解析, 補綴誌, 12: 350-380, 1968.
 - 18) 金沢興燮: 小児期の滑走運動の特性に関する研究, 日大歯学, 72: 581-588, 1998.
 - 19) 真柳昭紘: 側方滑走運動における顎頭運動に関する研究, 補綴誌, 14: 158-182, 1970.
 - 20) 常磐 肇, 三浦不二夫, 桑原洋助, 脇本康夫, 鶴田正彦: 汎用型顎口腔機能総合解析システムの開発, 顎機能誌, 3: 11-24, 1996.
 - 21) Messerman, T., Reswick, J. B & Gibbs, C: Investigation of Functional Mandibular Movement, Dental Clinics of North America, 13: 629-642, 1969.
 - 22) Messerman, T.: A means for studying mandibular movement, J, Prosth. Dent., 17: 36-43, 1967.
 - 23) Sigaroudi, K: Analysis of jaw movements in patients with temporomandibular joint clic, J, Prosth, Dent, 2: 245-250, 1983.
 - 24) 井上吉登, 楊 静, 檜山雄彦, 熊坂純雄, 進士久明, 内村 登: LED を利用した3次元6自由度顎運動計測装置の測定精度について, 日顎誌, 13: 325-333, 2001.

Development of a Jaw Movement Analytic Device
in which Indicates the Jaw Movement Expressed Three-dimensionally
and is Suitable for Youngsters

Katsumi Miyoshi

*Department of Pediatric Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
(Director : Takahide Maeda)*

The author established a new jaw movement analytic device small in size and light weight, which does not overly burden young children and is able to record natural jaw movement in terms of a minute jaw movement. The author also tried to develop the device to express a minute abnormality in jaw movement using the axis expressed as the center of the rotation in the jaw movement. The actual measurement wave shape was searched for by using a difference movement transformer to see the movement of the incisor model and by using a high precision form measurement change meter to see the movement of the left condylar model, and to see the precision of the prototype jaw movement analytic device. It was compared with a Nasohexsagraph[®] based on that wave shape.

The results were obtained as follow.

- 1) The wave shape of the prototype jaw movement analytic device corresponded to the actual measurement wave shape.
- 2) The wave shape of the irregular movement unusual part by the resin and screw could not be confirmed with Nasohexsagraph[®] but could be confirmed with the prototype jaw movement analytic device by applying the theory of the position of the shaft and its direction.

It was unacceptable with the conventional jaw movement analytic device to express a jaw movement in the voluntary point with respect to the condylar, and the molar. Also, before measuring it, it was difficult for a condition to be specified and to apply it to a lower aged child. A prototype jaw movement analytic device which can be measured from the image such as CT and can detect a minute movement wrong point by express in a shaft was developed successfully.

Key words : Jaw movement, A degree of three dimensional six freedom, Center of axis

外傷による下顎関節突起骨折患児の顎運動測定

三好克実 松根健介

松永利恵 前田隆秀

要旨：著者らは交通事故により、左側下顎関節突起骨折を起こした患児に開口訓練を行い、良好な結果を得た症例を経験した。開口訓練を行うことにより日常生活における咀嚼が改善されたことを本教室において開発した顎運動計測装置を用いて術後6か月と1年6か月時の顎運動の解析から明らかにすることを試みた。受傷直後は著者らの視診による結果では、開口量が20.0mm（ノギス）で、中心咬合位における下顎正中中部偏位が左側へ1.0mm認められた。6か月後、1年6か月後では計測器を用いて解析した結果、開口運動に伴う側方偏位量に変化は認められないが、開口量の改善により開口量に対する側方偏位量の割合が減少していた。また、受傷後6か月時では、非患側の下顎頭においても患側同様に顎運動に伴う下顎頭の動きが強く制限されていたが、受傷後1年6か月では改善が認められ、開口量も12.5mmから36.8mmに改善されていた。以上の結果から、軽微な顎運動変化を表現できる中心軸を指標とした顎運動計測装置によって詳細な偏位を捉えることができた。

さらに今回の症例では顎運動訓練は有効であることが示唆された。

Key words：下顎関節突起骨折、外傷、顎運動

緒言

小児は、危険に対する注意不足や回避の遅れ、行動における多くの生理的未熟さを持っており、日常生活のなかで、事故により口腔領域に外傷を受けて来院することが少なくない¹⁾。小児における顎骨は、弾性に富んでいるため骨折が成人より少ないといわれているが、骨折を起こすと、成長発育に大きなダメージをおよぼす可能性がある^{2,3)}。特に小児の関節突起骨折では、下顎頭軟骨が下顎骨の成長をコントロールするとされていることから、機能面のみならず顎の発育の面からも注意を払わなければならない⁴⁾。従来の下顎関節突起骨折に関する症例報告では外科療法あるいは保存療法による治療報告や経過観察が多く記載されているが、下顎関節突起骨折を起こした患者の詳細な顎運動を長期間に亘って経過観察した報告は認められない。

今回、著者らは、交通事故により関節突起部の骨折を起こした症例を経験し、本教室で開発した顎運動計測器にて顎運動の変化をみるために術後6か月と1年6か月時での顎運動を検討したので報告する。

症例および方法

症例

患児：8歳7か月 男児

主訴：交通事故で顎を打ち、食べ物を噛むことができない。

日本大学松戸歯学部小児歯科学教室
〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(受付：2005年9月28日)
(受理：2005年11月27日)

家族歴：特記事項無し。

医科的既往歴：特記事項無し。

歯科的既往歴：う蝕治療時に麻酔経験あり。その他特記事項無し。

現病歴：平成14年3月30日、昼頃、歩行時に自動車に5mほど跳ね飛ばされ、頭部受傷のため某総合病院にて頭部骨折の確認のためCT検査を行った。その結果、頭部に異常所見は認められないことから裂創部の下口唇の縫合を行った。受傷後から咬合の異常を訴えたために当科を紹介され受診した。

現症：

口腔外所見：下顎オトガイ相当部の正中に幅10mmの裂創を認めた。左側下顎頭に自発痛を訴えていた。最大開口時の運動路は左側に偏位していた。開口量（ノギスによる計測）は20.0mmであった。

口腔内所見：初診時、下顎正中中部ならびに下口唇内側部に裂創を認め各1糸、計2糸の縫合を認めた。歯冠破折は認められなかったが、中心咬合位で左側へ1.0mmの偏位を認めた。

エックス線所見：

頭蓋前後位撮影ならびに軸位撮影法所見：左側下顎関節突起が骨折し小骨片は内下方に偏位し、左側下顎枝が上方に偏位している像を認めた。

パノラマ4分割エックス線写真所見：左側下顎関節突起が頸部より偏位している像が認められた（図1）。

パノラマエックス線写真所見：左側下顎関節突起が頸部より偏位している像が認められた。

Shüller エックス線写真所見：閉口位ならびに開口位のエックス線写真を比較すると左右下顎頭の位置の移動は少なかった。

た。

処置方法ならびに経過

処置方法および経過の模式図を示す(図2)。

1) 開口訓練

開口量の制限などの生活指導や食事指導を行い受傷部位の安静を図った後、受傷後3週から受傷後2か月の間、木製開口器を用い1日15分、3回開口訓練を行った。

2) エックス線写真撮影ならびにMR画像撮影

受傷後6か月後にパノラマ撮影法とShüller撮影法、1年6か月後にパノラマ撮影法とMR画像撮影を行った。

3) 顎運動計測

受傷後6か月と受傷後1年6か月に、本教室で開発した光学式の3次元6自由度顎運動解析装置⁵⁾(図3)を用い、顎運動計測を以下に示す条件にて行った。なお、顎運動計測にあたり患児ならびに保護者より同意を得た。

計測点：頭部に3点、下顎部に3点、計6点の反射マーカを設置し、パーソナルコンピュータで画像認識を行った。

平均的顎頭点：フランクフルト平面上耳珠前方12mmとした。

基準平面：フランクフルト平面を基準とした。

解析：切歯点(開口量；XYZ座標)、左右平均的顎頭点

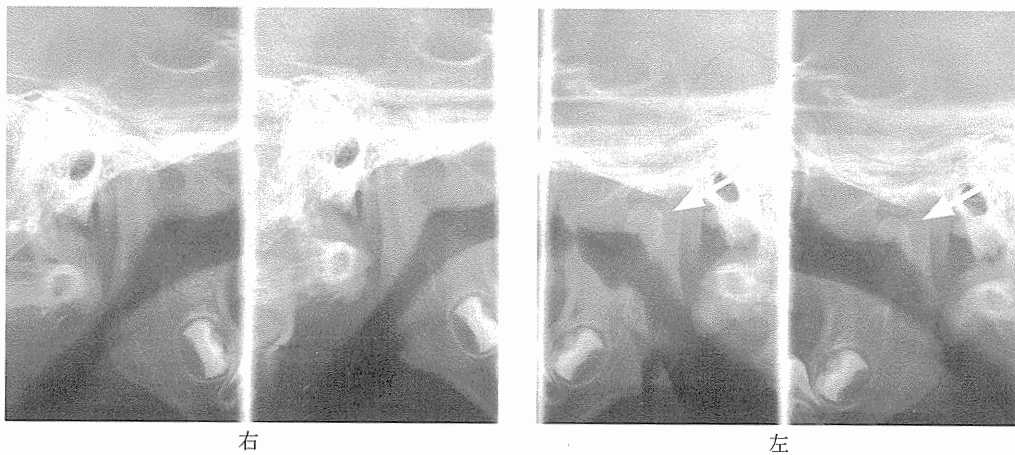


図1 パノラマ4分割撮影(初診時)
左側関節頭が頸部より離断している像が認められた。

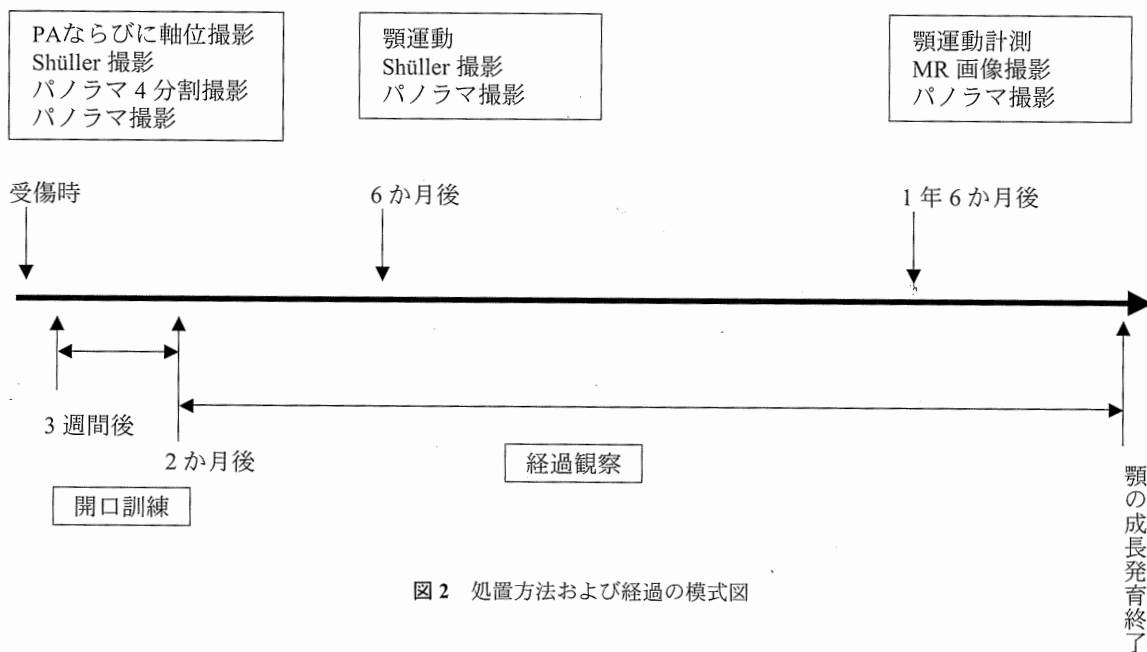


図2 処置方法および経過の模式図

(移動量；XYZ 座標) の運動の軌跡を算出し、下顎の微小な 2 平面間の運動で移動量が最小となる運動の中心、すなわち中心軸 (方向；XYZ 方向ベクトル、位置；XYZ 座標) を算出し、解析した。なお中心軸の算出にもちいた 2 平面間の計測は 100Hz でサンプリングした。

計測運動：最大開閉口運動を行うように指示した。

計測サイクル：運動が安定した連続した 6～10 サイクルを 100Hz で計測した。

結 果

1. 開口訓練ならびに経過

木製開口器を用いた開口訓練を行った結果、受傷後 2 か月に最大開口量における顎の偏位量は減少し、初診時開口量 (ノギス) も 20mm から 50mm に回復した。さらに下顎頭の圧痛も消失し、日常生活における咀嚼機能の改善が認められた。受傷後 6 か月には日常生活における咀嚼等の問題点は認められなくなった。受傷後 1 年後には正中部ならびに側方偏

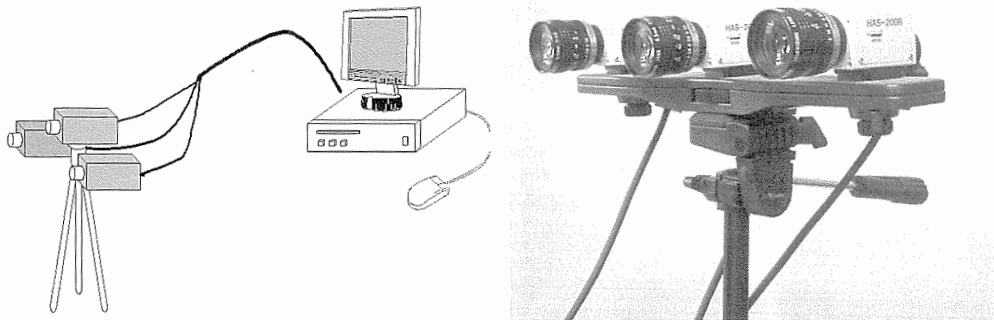


図 3 光学式 3 次元 6 自由度顎運動解析装置

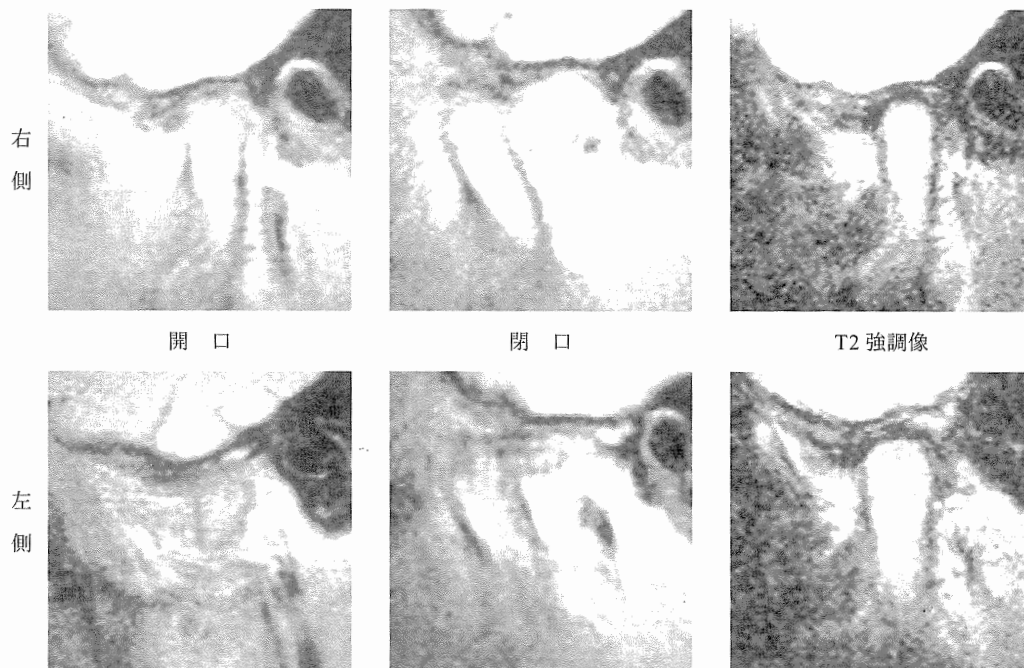


図 4 MRI 画像診査 (1 年 6 か月時)

右側の開閉口時関節円板は正常位置に位置している事が確認できた。一方左側は閉口時に関節円板はやや変形し前方転位し、開口時に復位していることが確認できた。Joint effusion は左右関節とも認め無かったが、下顎頭に若干の変形が認められた。

位置に改善が認められた。

2. エックス線ならびに MR 画像所見

パノラマエックス線写真所見 (6 か月後, 1 年 6 か月後) : 6 か月後の所見では, 左側下顎関節突起が頸部より偏位している像が認められ, 初診時と比較し偏位量の減少が認められた。1 年 6 か月後の所見では小骨片の一部が吸収されていた。

Shüller エックス線写真所見 (6 か月後) : 閉口位ならびに開口位における左右下顎頭の位置の移動は, 初診時と比較して改善されていた。特に右側下顎頭の移動は著明に改善されていた。

MRI 画像診査 (1 年 6 か月時) : 右側の開閉口時での関節円板は正常位置に位置していることが確認できた。一方, 左側は閉口時に関節円板はやや変形し前方転位し, 開口時に復位していることが確認できた。Joint effusion は左右関節とも認めなかった (図 4)。

3. 顎運動計測

1) 受傷後 6 か月

(1) 切歯点

開口量は 12.5mm であった (図 5)。左右移動量である X

座標の偏位量は左に 0.9mm, 前後移動量である Y 座標は後方に 6.6mm, 上下移動量である Z 座標は下方に 10.6mm であった (図 6)。

(2) 左右平均的顎頭点

右側平均的顎頭点の移動量は 4.6mm (図 5) で, X 座標の偏位量は左に 1.0mm, Y 座標は後方に 4.4mm, Z 座標は下方 1.3mm であった (図 7)。一方, 左側平均的顎頭点の移動量は 3.3mm (図 5) で, X 座標の偏位量は左に 1.0mm, Y 座標は後方に 2.8mm, Z 座標は下方 2.2mm であった (図 7)。

(3) 中心軸

波形の特徴として, 咬合接触部では計測マーカが細かく振動するため, 中心軸の波形に大きな乱れが確認できた。それ以外の開閉口相では波形に細かい振幅が確認できた (図 8)。

2) 受傷後 1 年 6 か月

(1) 切歯点

開口量は 36.8mm であった (図 5)。X 座標の偏位量は左に 1.0mm, Y 座標は後方に 20.2mm, Z 座標は下方に 30.7mm であった。同時に Y 座標に触診では確認できなかったクリックらしき波形を認めた (図 6)。

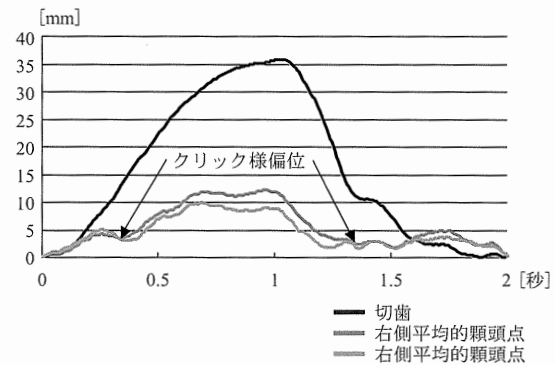
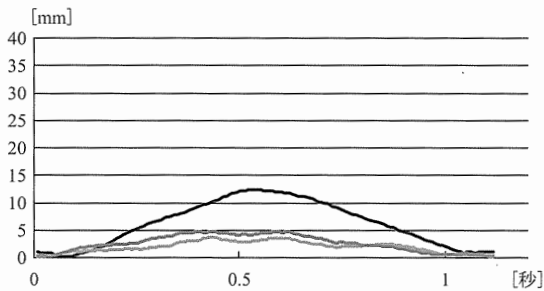


図 5 切歯開口量ならびに左右平均的顎頭点の移動量
左に受傷 6 か月後, 右に受傷 1 年 6 か月を示す。

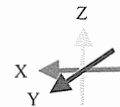
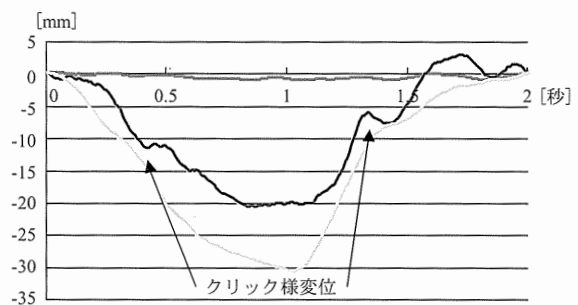
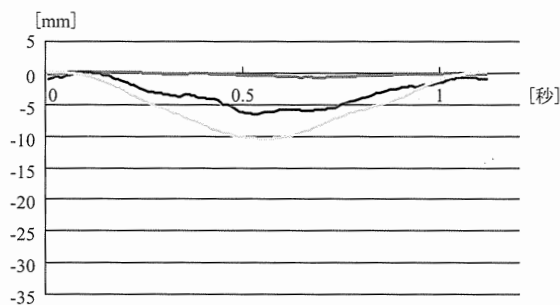


図 6 切歯の開口量 (XYZ)
左に受傷 6 か月後, 右に受傷 1 年 6 か月を示す。

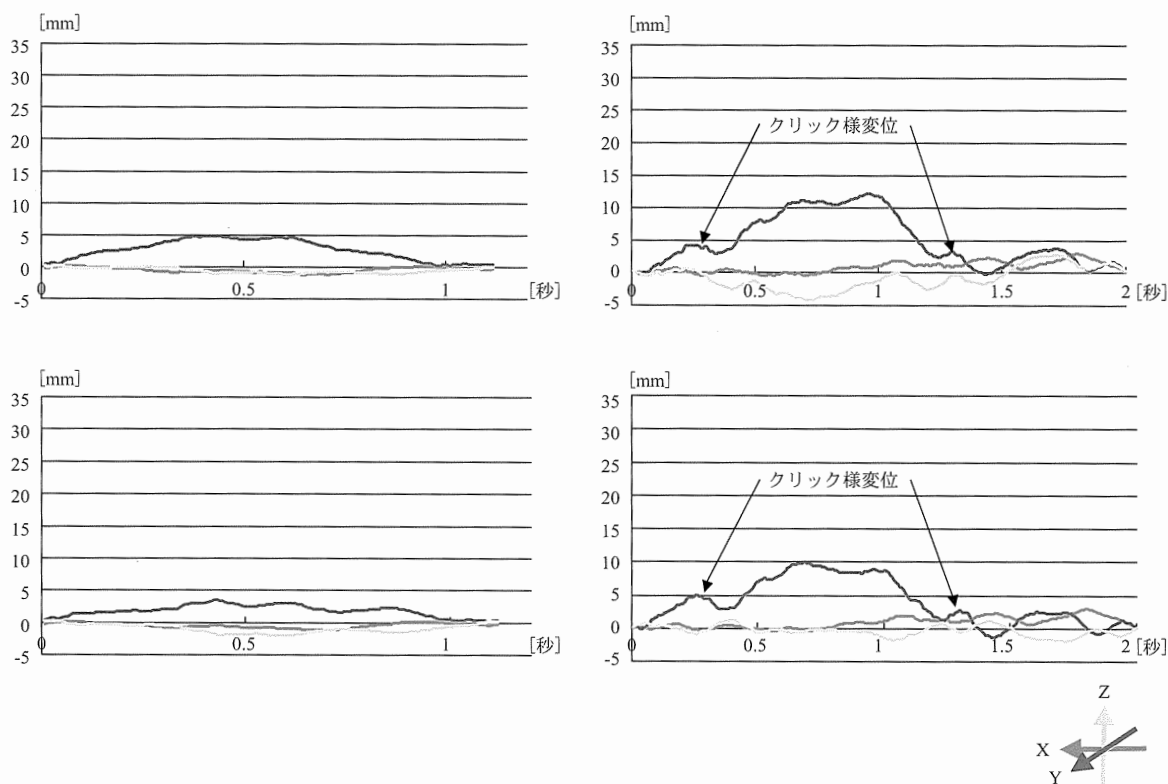


図7 平均的顎頭点の移動量
 左に受傷6か月後、右に受傷1年6か月を示し、上段は右側、下段は左側を示す。

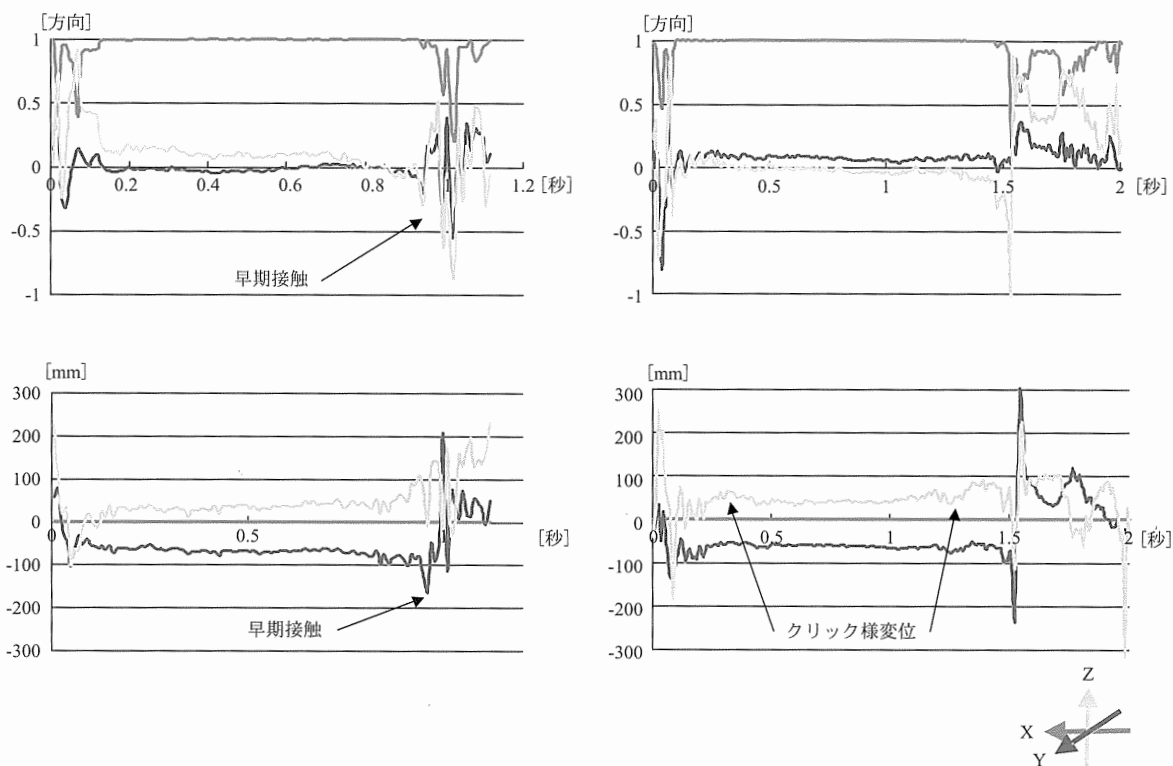


図8 中心軸の方向と位置
 左に受傷6か月後、右に受傷1年6か月を示し、上段は軸の方向、下段は軸の位置を示す。

(2) 左右平均的顎頭点

右側平均的顎頭点の移動量は 12.0mm (図 5) で、左右移動量である X 座標の偏位量は 0.5mm、前後移動量である Y 座標は 11.9mm、上下移動量である Z 座標は 1.7mm であった (図 7)。一方、左側平均的顎頭点の移動量は 8.7mm (図 5) で、X 座標の偏位量は 0.6mm、Y 座標は 8.6mm、Z 座標は 1.0mm であった (図 7)。クリック様の波形を確認できた。

(3) 中心軸

受傷後 6 か月と同様に、咬合接触部では計測マーカークが細かく振動するため、中心軸の波形に大きな乱れが確認できるが、受傷後 1 年 6 か月では閉口相の手前でも大きな波形の変化が中心軸の方向と位置に確認できた。それ以外の開閉口相では受傷後 6 か月に比べ細かい振幅が若干減少していることが確認できた (図 8)。

考 察

下顎関節突起骨折においては骨折片が下顎運動に対しどのような影響を与えるかで処置が決定する⁶⁾。治療方法については外科療法あるいは保存療法を推す報告がなされている^{2,3,6-12)}。とくに小児の下顎関節突起骨折の治療は、成長発育に影響を及ぼす観血療法よりも保存療法が主体でおこなわれてきた^{2,9-11)}。その中でも、一部の症例で顔貌変形やまれに下顎頭強直症を後遺することがあるために、小児の下顎関節突起の骨折は治療後も成長期を通じて予後経過を注意深く診る必要があることが報告されている^{2,4)}。

本症例は開口訓練により正常な開口量が回復した症例であった。受傷後 6 か月時のパノラマエックス線写真所見では下顎関節突起頸部の偏位像を呈し、1 年 6 か月時のパノラマエックス線写真所見では偏位した下顎関節突起における偏位量の改善が認められ、年齢や身長を考慮しても開口障害は消失した。受傷後 6 か月と受傷後 1 年 6 か月のノギスによる開口量計測と顎運動計測による開口量に違いが認められたのは、患児に顎運動計測を行う際、最大開閉口運動を指示するが、患児は自由な開閉口運動を行うために、開口量の結果に開きがでたと考えられる。また、受傷後 6 か月と受傷後 1 年 6 か月には開口量に大きな改善が認められたが、側方の偏位量においては受傷後 6 か月と 1 年 6 か月では大きな違いは認められなかった。これは、側方偏位量に対して開口量が大きく回復し、開口量に対する側方偏位量の割合が減少していたため、側方偏位量が改善されたように診査されたためである。左右平均的顎頭点の運動軌跡においては受傷部位である左側だけでなく、反対側の右側にもクリック様の運動抑制された波形を確認できた。また初診時の Shüller 撮影法の開閉口像を比較すると、受傷側ならびに反対側の移動量が少なく運動が制限されていたが、受傷後 6 か月では改善が認められた。MR 画像診査において左側下顎頭は復位を伴う円板転位を認めるが、右側下顎頭は円板転移を認めなかった。このことから、受傷部によって下顎自体が運動制限を受け、その影

響が反対側にも現れたものと考えられる。以上結果から、受傷部位だけではなく、反対側における下顎頭の影響を視野に入れた経過観察が大変重要であることが示唆された。

一方、受傷後 6 か月と受傷後 1 年 6 か月の中心軸の波形は細かい偏位が減少していた。中心軸は運動を下顎の位置と方向で表現するために、下顎の細かい微振動を捉えることが可能であることから、下顎の運動が安定してきていることが考えられる。受傷後 6 か月の中心軸の閉口相手前に大きな波形の変動が確認された。中心軸で大きな波形の変化が確認されたことは、咬合接触などによる、反射マーカークの大きな変動が考えられるため、開閉口運動時に早期接触が起きている可能性が考えられる。受傷後 1 年 6 か月では、早期接触は改善されていた。

今後は、受傷部における骨折片である下顎頭の位置の変化を観察し、受傷部である左側のみではなく右側の下顎頭の治癒経過も観察し、顎運動および顎顔面領域の成長の過程を観察して行く予定である。

結 論

今回の症例では開口訓練を行うことにより、側方偏位量に変化は認められないが開口量の改善により、開口量に対する側方移動量の割合が減少し、正中の改善が認められた。顎運動から早期接触ならびに患側とは反対側にも顎運動の影響が確認された。小児の下顎関節突起の骨折は治療後も成長期を通じて長期にわたる経過観察を行う必要がある。また、今回の結果より本教室にて開発された顎運動計測装置は、顎運動の長期観察における評価に有効であることが示唆された。

本研究の一部は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業の補助を受けた。

文 献

- 1) 小林考憲, 高木律男, 小野和宏ほか: 2 人乗り自転車前転事故による小児顎関節突起完全骨折の 2 例, 日口外誌, 50: 231-234, 2004
- 2) 畑毅, 細田超: 小児顎関節突起骨折患者のアンケートによる経過観察, 日顎誌, 15: 178-183, 2003
- 3) 内田啓一, 塩島勝, 音成貴道ほか: 両側顎関節突起部にみられた若木骨折の 1 例, 日口診誌, 14: 442-445, 2002
- 4) 太田舜, 茂木敏雄: 小児顎関節突起骨折の予後について, 日口外誌, 32: 1018-1029, 1986
- 5) 三好克実: 顎運動の 3 次元表現を応用した小児に適した顎運動解析装置の開発, 小児歯誌, 40: 441-453, 2002
- 6) 藤澤健司, 住友孝史, 館原誠晃ほか: 下顎骨関節突起骨折の臨床的検討, 日顎誌, 15: 18-23, 2003
- 7) 石濱幸二, 木村哲雄, 小泉英彦ほか: 片側性下顎骨関節突起骨折の予後の検討, 日口外誌, 49: 355-358, 2003
- 8) 村上賢一郎, 飯塚忠彦, 野瀬将洋ほか: 小児下顎関節突起骨折の遠隔治療成績, 日口外誌, 32: 77-87, 1988
- 9) 太田舜, 茂木敏雄: 小児顎関節突起骨折の予後について, 日口外誌, 32: 1018-1029, 1986
- 10) MacLennan WD, Simpson W.: Treatment of the mandibular condylar processes in children, Br J Plast Surg, 18: 423-427, 1965
- 11) Lindahl L, Hollender L: Condylar fractures of the mandible: II A radiographic study of remodeling processes in the temporomandibular

三好克実ほか：外傷による下顎関節突起骨折患児の顎運動測定

joint, Int J Oral Surg, 6 : 153-165, 1977

- 12) 中村雅明：小児顎骨骨折の臨床研究, 日口外誌, 31 : 2297-2316, 1985

Measurement of jaw movement in a boy with traumatic fracture of the condylar process.

Katsumi Miyoshi, Kensuke Matsune, Rie Matsunaga, Takahide Maeda
Department of Pediatric Dentistry, Nihon University

Through mouth opening training, we obtained good prognosis in a case with fracture of the condylar process as a result of a traffic accident. A jaw movement tracking device developed in our laboratory was used to improve chewing through mouth opening training. Success was clarified by analysis of jaw movement six and 18 months after injury. Immediately after injury, ocular inspection revealed that the degree of opening was 20.0mm. Displacement of the midline region of the lower jaw by 1.0mm to the left was also observed at the centric occlusal position. The patient was reanalyzed 6 and 18 months after injury, but no changes were observed in the amount of lateral deviation or mouth opening movement. However, the ratio of lateral deviation eventually began to decrease with improvement in the degree of opening. Six months after injury, movement of the condylar head with jaw movement was restricted on the uninjured side. Eighteen months after injury, however, improvement was observed and the degree of mouth opening improved from 12.5 to 36.8mm. Using the jaw movement tracking device we were able to obtain detailed measurements of slight changes in jaw movement by changes in deviation from a central axis. The findings suggest that jaw movement training was effective in this case.

Key words : Condylar process, Trauma, Jaw movement

顎関節症児の平均的顆頭点と 3次元顎運動から求めた顆頭点との位置の検討

三好 克実 上江洲 香實* 松 永利 恵
諸 星 弘 世 前 田 隆 秀

要旨: 顎関節症あるいは顎運動異常を伴う小児の顎運動の特徴を究明することは、低年齢期において顎関節症の予測、あるいは治療過程の評価などに有用である。

3次元顎運動解析装置を用いて顎運動を解析する際、両側の平均的顆頭点が使われるが、運動軌跡から求めた顆頭点との関係が明らかにされていない。

そこで、平均的顆頭点を中心に1mm間隔で80mm*80mmの範囲の任意点(合計6400点)の中から閉口時から最大開口時に至る顎運動路が最小距離となる1点を3次元顎運動から求めた顆頭点(運動中心点)とし、運動中心点の位置と平均的顆頭点との位置関係を測定したところ以下の知見を得た。

従来の顎運動解析に多く用いられてきた平均的顆頭点でなく、中心軸の基盤となる運動中心点を求めた。顎関節症児において関節円板転位側と非転位側の運動中心点の位置は異なり、非復位側の運動中心点は平均的顆頭点から大きく変位していることが明らかになると同時に運動中心点が基となる中心軸によって関節頭の微細な運動が評価できることが示唆された。

Key words: 顎運動, 顎関節症, 平均的顆頭点, 運動中心点, 中心軸

緒 言

小児における顎運動研究において、顎運動機能を表す定量的な指標は、開口量、前後のまたは側方的移動量、あるいはリズム性が多く使われ¹⁻⁴⁾、さらに最近では、運動の平均経路から求めた種々な成分の標準偏差やリズム性の変動係数で表す運動経路や運動リズムの安定性²⁾⁻⁴⁾が用いられている。これらの指標は、より精度の高い分析が可能であるが、その分析が可能となる顎運動計測装置は、複雑で測定に時間がかかり、小児の協力が得られにくく、時には恐怖心を与えることから小児の顎運動測定には限界があった。そこで著者らは、簡便で恐怖心を起こさずにチェアサイドで測定でき、精度の高い分析が可能な3次元顎運動解析装置を開発し、顎運動の解析に中心軸の有用性を報告した⁵⁾。

従来、関節頭の動きは平均的顆頭点をもって表現されているが⁶⁻⁸⁾、閉口位から最大開口位までの距離が最小

となる点すなわち3次元顎運動から求めた顆頭点の運動軌跡を知ることは個人の関節頭の運動の特徴を表現する一方法であると考えられる。

一方、疫学研究から中学生、高校生⁹⁾が顎関節症を主訴に来院することが多いこと、また小学生にすでに発症することも明らかとなっている¹⁰⁾。また、成人における顎関節症では、症型分類Ⅲ型が多いが、小児の顎関節症においても同型が多いと報告されている¹¹⁾。小児歯科医としては効果的な顎関節症の治療法のみならず、顎運動ならびに顎関節に異常がない低年齢児においてどのような顎運動が将来、顎関節症になる可能性が高いか、あるいは低いかの予測ができれば顎関節症の予防法の開発にもつながり顎関節症患者にとって光明となるであろう。

今回、著者らが開発した顎運動解析装置⁵⁾を用いて顎関節症患児の中心点を求めた。下顎を剛体と考えた場合、3次元剛体運動の中心は移動量が最小となる点の集合(中心軸)で表現できる。すなわち左右平均的顆頭点を中心に下顎が運動しているのならば顆頭間軸と中心軸は一致する。そのため中心点はX軸(左右方向)の集合となり無数に存在することとなる。そこでX軸(左右方向)を除く平均的顆頭点を含む矢状断面(Y-Z平面:前後,上下方向からなる平面)から中心点を求めた。左右の平均的顆頭点を中心にそれぞれの矢状断面上

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座

千葉県松戸市栄町西 2-870-1

(主任:前田隆秀教授)

*日本大学松戸歯学部数学講座

(主任:上江洲香實)

(2004年12月21日受付)

(2005年1月27日受理)

三好克実ほか：平均的顎頭点と運動中心点の位置的相違

において、1 mm 間隔で 80 mm*80 mm の範囲の任意点（合計 6400 点）の中から、閉口位から最大開口位に至る顎運動路の移動距離が最小となる 1 点を 3 次元顎運動から算出した顎頭点（以下運動中心点とする）を求めた。さらに顎関節症患者の顎運動を顎関節円板の転位の有無、復位の有無における顎運動の特徴を平均的顎頭点と運動中心点との位置関係から検討し、今後の研究において中心軸の基盤となる運動中心点によって顎関節症児における顎運動の特徴を検出できるかを検討した。

対象および方法

1. 対象

顎関節症状を主訴として当科を受診し、顎運動計測ならびに MR 画像検査に同意を得られた 12 歳～15 歳（平均年齢：13 歳 10 か月，男児 3 名，女児 9 名）の 12 名の 24 関節とし，MR 画像の結果，顎関節円板の状態により，非転位 3 関節，転位 21 関節で，転位で復位するもの 13 関節，転位で非復位のものが 8 関節であった。これを 3 群，すなわち非転位群，転位・復位群，転位・非復位群とした。

なお，対照として成人健常者 20 歳～30 歳（平均年齢：23 歳 4 か月，男性 1 名，女性 2 名）の 3 名を成人健常者（6 関節）とした。

2. 方法

1) MR 撮影条件

MR 撮影は，1.0 Tesla MR scanner (Signa Horizon, General Electric, USA) および直径 3.5 インチ表面コイルまたは 0.5 Tesla MR scanner (FLEXART, TOSHIBA, To-

chigi, Japan) および顎関節専用コイルを用いて行った。Signa Horizon をもちいた撮影では，fast spin echo 法で矢状断においてプロトン密度強調画像 (TR 1000 msec, TE 16 msec)，T2 強調像 (TR 2000 msec, TE 96 msec)，前頭断においてはプロトン密度強調画像 (TR 1100 msec, TE 16 msec) によっておこなった。スライス厚は 3.0 mm，スライス数は 5 枚とした。いずれの撮影法も FOV 12 cm とした。FLEXART をもちいた画像は fast spin echo 法で矢状断においてプロトン密度強調画像 (TR 1500 msec, TE 20 msec)，T2 強調像 (TR 1500 msec, TE 100 msec)，前頭断において T1 強調像 (TR 500 msec, TE 25 msec) によって行った。スライス厚は矢状断 3.5 mm，前頭断 4.0 mm とし，スライス数は 5 枚であった。FOV は矢状断 12 cm，前頭断 17 cm とした。いずれの撮影時にもマトリクス数は矢状断で 192*256，前頭断で 224*256 とした。

2) 顎運動計測器

ディテクト (株) 社製，光学計測器 Dipp-Motion XD (図 1) ならびに著者らが開発した顎運動解析装置 (特開-2002-336282) を用いて計測を行った。

3) 顎運動計測

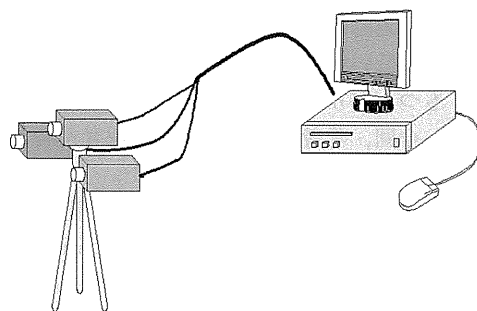
被験者に最大開閉口運動を行うよう指示し，安定した 5 サイクルの開閉口運動を 100 Hz で計測した。基準平面はフランクフルト平面とした。

4) 平均的顎頭点

左右平均的顎頭点をフランクフルト平面上の耳珠前方 12 mm に設定した。

5) 運動中心点

平均的顎頭点を中心に 1 mm 間隔で 80 mm (Y 軸：前



Dipp-Motion XD 模式図



高感度，高速 3 CCD カメラ

図 1 顎運動解析装置
ディテクト (株) 社製，光学計測器 Dipp-Motion XD

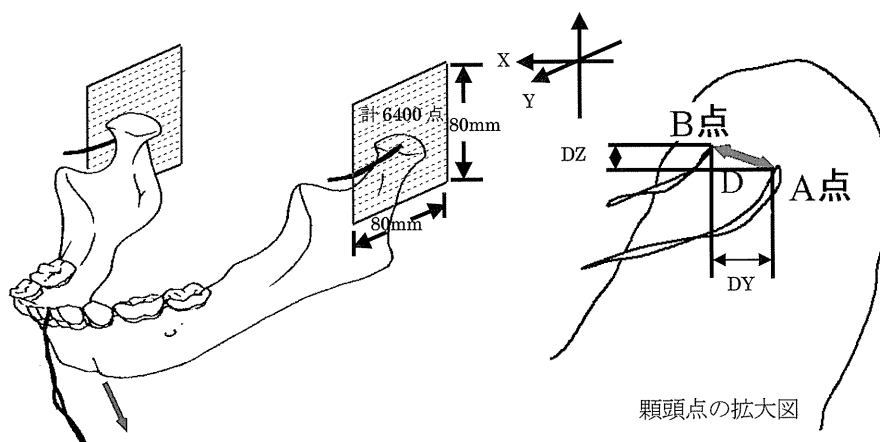


図2 計測点の模式図

平均的顆頭点 (A 点), 最大開口量の軌跡が最小となる点 (B 点: 運動中心点)
 平均的顆頭点と運動から求めた顆頭点 (運動中心点) との距離 D (Y 軸: DY, Z 軸: DZ)
 座標軸: X 座標 (左右方向), Y 座標 (前後方向), Z 座標 (上下方向)
 福山可奈子ほか: 障害児に対する口腔保健指導の効果に関する追跡調査

後方向)×80 mm(Z 方向: 上下方向)の範囲の点(計 6400 点)における開閉口運動に伴う顆頭点の 3 次元的な移動量が最小となる 1 点を算出し, 運動中心点とした (図 2)。

6) 平均顆頭点と運動中心点との位置的評価

平均的顆頭点と運動中心点の距離を算出し, 矢状面において評価した。

7) 統計処理

Mann-Whitney 検定を行い比較検討した。なお検定には SPSS Ver 10.0 J を用いた。

結 果

1. 非転位群と転位群における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較 (表 1)

1) 非転位群と転位群における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較 (Y 軸)

Y 軸方向における運動中心点と平均的顆頭点の距離 (図 2: A-B 間距離 DY) は非転位群 (3 関節) では 4.67 ± 4.04, 転位群 (21 関節) では 21.57 ± 10.58 で, 有意差 5% で有意な差が認められた。このことから Y 軸方向では非転位群と転位群では運動中心点と平均的顆頭点間の距離に違いが認められ, 非転位群の運動中心点は平均的顆頭点に近似し転位群では平均的顆頭点から離れた位置に存在することが確認された。

2) 非転位と転位における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較 (Z 軸)

Z 軸方向における運動中心点と平均的顆頭点の距離

表 1 非転位群と転位群における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較

群別関節数	Y (mm)	Z (mm)
非転位群 (3 関節)	4.67 ± 4.04	26.67 ± 13.01
転位群 (21 関節)	21.57 ± 10.58	24.38 ± 10.13

* : p < 0.05

表 2 非転位群と転位・復位群, 転位非復位群における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較

群別関節数	Y (mm)	Z (mm)
非転位群 (3 関節)	4.67 ± 4.04	26.67 ± 13.01
転位・復位群 (13 関節)	21.67 ± 12.11	24.85 ± 10.60
転位・非復位群 (8 関節)	21.50 ± 11.46	23.63 ± 10.23

* : p < 0.05

(図 2: A-B 間距離 DZ) は, 非転位群 (3 関節) では 26.67 ± 13.01, 転位群 (21 関節) では 24.38 ± 10.13 で, 有意な差は認められなかった。このことから Z 軸方向では非転位群と転位群では運動中心点と平均的顆頭点間の距離に違いは認められなかった。

2. 非転位群と転位・復位群, 転位・非復位群における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較 (表 2)

1) 非転位群と転位・復位群, 転位・非復位群における運動中心点と平均的顆頭点間距離の比較 (Y 軸)

三好克実ほか：平均的顎頭点と運動中心点の位置的相違

表3 成人健常者群における運動中心点と平均的顎頭点間距離

関節数	Y (mm)	Z (mm)
成人健常者群 (6 関節)	8.96±5.57	12.17±16.21

Y 軸方向における運動中心点と平均的顎頭点の距離 (図 2: A-B 間距離 DY) は、非転位群 (3 関節) では 4.67±4.04、転位・復位群 (13 関節) では 21.62±12.11、転位・非復位群 (8 関節) では 21.50±11.46 で、それぞれ有意差 5% で有意な差が認められたが、転位・復位群と転位非復位群では有意な差は認められなかった。このことから Y 軸方向では非転位群と転位・復位群、転位・非復位群では運動中心点と平均的顎頭点間の距離に違いが認められ非転位群の運動中心点は平均的顎頭点に近似し転位・復位群、転位・非復位群では平均的顎頭点から離れた位置に存在することが確認された。

2) 非転位群と転位・復位群、転位・非復位群における運動中心点と平均的顎頭点間距離の比較 (Z 軸)

Z 軸方向における運動中心点と平均的顎頭点の距離 (図 2: A-B 間距離 DZ) は、非転位群 (3 関節) で 26.67±13.01 と転位・復位群 (13 関節) では 24.85±10.60、転位・非復位群 (8 関節) では 23.63±10.23 で有意な差は認められなかった。このことから Z 軸方向では非転位群と転位・復位群、転位・非復位群では運動中心点と平均的顎頭点間の距離に違いは認められなかった。

3. 成人健常者における運動中心点と平均的顎頭点間距離 (表 3)

1) 非転位側と転位側における運動中心点と平均的顎頭点間距離 (Y 軸)

Y 軸方向における運動中心点と平均的顎頭点の距離 (図 2: A-B 間距離 DY) は、成人健常者 (6 関節) で 8.96±5.57 であった。

2) 非転位側と転位側における運動中心点と平均的顎頭点間距離 (Z 軸)

Z 軸方向における運動中心点と平均的顎頭点の距離 (図 2: A-B 間距離 DZ) は、成人健常者 (6 関節) で 12.17±16.21 であった。

考 察

顎運動の研究の多くは、平均的顎頭点または臨床的に触知した顎頭点 (外側極など) の運動に焦点をあて、3 次元 6 自由度顎運動計測装置にてこれらの点の解析が行われている^{1,12)}。これらの顎頭点の解析は、計測手技は

簡素であるが、下顎頭形態を考慮しておらず、回転しながら移動する性質を持つ顎頭運動は測定点のわずかな位置のずれにより運動経路が著しく異なるため^{13,14)}、顎頭点の解析では忠実な下顎頭運動を反映していないことが指摘され¹⁵⁾、さらに微小な異常運動を認知できないことが考えられる。

微小な顎運動異常を明記するには、下顎頭を含めた下顎全体の運動を捉えることが重要で、これらの運動を知るためには顎運動の制御である運動中心⁵⁾を解析する必要がある。下顎を剛体として考えた場合、3次元剛体運動の中心は点ではなく、直線すなわち軸で表現することができる。この中心軸を解析することにより微細な顎運動変化を捉えることが可能となる。つまり過去に著者⁵⁾が報告した中心軸の動態を把握することによって微細な顎運動変化を捉えることが可能となると考えられる。

しかし、この中心軸は下顎運動がどのように制御されているか総合的な判断が可能であるが、左右の関節ごとの評価は不可能であった。そこで著者らは顎関節症患者の顎運動測定・解析に中心軸の基盤となる左右下顎頭が閉口位から最大開口位への距離が最小となる点である運動中心点を算出し、この点と平均的顎頭点との位置的相違を矢状面において評価した。その結果、Y 軸方向 (前後方向) において、非転位群の顎関節では運動中心点は平均的顎頭点と近接していたが、関節円板転位を伴っている転位群においては運動中心点が平均的顎頭点から逸脱していることが確認された。さらに関節円板転位でかつ転位・復位群と転位・非復位群においても顎関節は大きく平均的顎頭点から逸脱していた。

河野ら¹⁵⁾は、描記法により矢状面内の全ての運動に対応して、顎頭部で記録される上下的な幅の最小な運動範囲を示す全運動軸を提唱し、現在も多く研究者に用いられている。河野ら¹⁵⁾の研究によると、健常な顎関節においては顎頭上の全運動軸は、蝶番軸よりもむしろフランクフルト平面上耳珠前方 13 mm に存在する平均的顎頭点に近接して存在することが提言されており、本研究において確認された運動中心点の Y 軸方向への逸脱は、前方転位した関節円板によって障害された下顎頭の前方滑走運動によるものと考えられ下顎頭の運動を評価しているものであった。

その結果、Y 軸方向 (前後方向) において、健常な顎関節では運動中心点は平均的顎頭点と近接していたが、関節円板転位を伴っている顎関節においては運動中心点が平均的顎頭点から逸脱したと考えられる。

一方、Z 軸 (上下方向) における健常な顎関節と関節円板転位を伴っている顎関節は運動中心点が平均的顎頭

点から逸脱していた。このことは下顎頭の大きさが発達途上でばらついており、運動が不安定^{6,16)}であることが言える。一概に成人と小児の比較はできないが、成人健常者と非転位群、転位群を比較してみると Y 軸方向に関して成人健常者は、転位群より非転位群に近い値を示した。このことは、Y 軸方向に関して顎関節円板転移が認められない成人健常者と顎関節円板転移が認められない非転位群は平均的顎頭点付近に運動中心点が存在し、逆に顎関節円板転移が認められる転位群は平均的顎頭点から逸脱して確認でき、顎関節円板転移を含まない群と転位を含む群を分類することが可能と考えられる。また成人は小児に比較して骨の大きいため、小児より若干高値を示したものと考えられる。また成人健常者の Z 軸に関しては、平均的顎頭点と運動中心点が近接していることが言える。

以上のことより、左右顎関節の運動中心点を顎運動に同調させて解析することは、顎運動機能障害患者のスクリーニングパラメータとして応用が可能であることが示唆された。

今後は今回求めた運動中心点と中心軸との関係を解明していきたいと考えている。

山口ら⁶⁾が 6 自由度顎運動に対して運動論的に定義される顎運動点を顎運動の解析点とすることが最も望ましいと報告したが、小児の顎口腔機能を診断、評価するための基準が十分に確立しているとはいえない。また、長谷川ら¹⁴⁾は、全運動軸に 3 次元の立体運動を含めた軸の振舞を追求して行く必要があるが、側方運動経路は当然のことながら彎曲をもちその移動量を実長として知ることとはほとんど不可能であると報告している。このことから運動中心点と中心軸との関連性の究明が顎運動(解析)を詳細に解析していくうえで重要と考えられる。

結 論

非転位群と転位・復位群、転位・非復位群で Y 軸において運動中心点と平均的顎頭点の位置に違いが認められた。非転位群と転位・復位群、転位・非復位群で Z 軸において運動中心点と平均的顎頭点の位置に違いが認められなかった。

以上の結果より顎関節症児の運動中心点が平均的顎頭

点から逸脱していることが明らかとなり、今後の顎運動の微細な異常を中心軸によって表現できる可能性が示唆された。

本研究の一部は文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業の補助を受けた。

文 献

- 1) 金沢興燮：小児期の滑走運動の特性に関する研究，日大歯学，72：581-588, 1998.
- 2) 志賀 博，小林義典，横山正起，雲野美香，難波鎌久：側頭下顎障害患者における咀嚼運動経路の安定性の定量的評価，日顎誌，15：37-42, 2003.
- 3) Jemt, T, Karlsson S, Hedegard, B.: Mandibular Movements of young adults recorded by intraorally placed light-emitting diodes, J. Prosthet. Dent., 42: 669-673, 1979.
- 4) 志賀 博，小林義典：咀嚼運動の分析による顎口腔機能診断に関する研究，補綴誌，34：1112-1126, 1990.
- 5) 三好克実：顎運動の 3 次元表現を応用した小児に適した顎運動解析装置の開発，小児歯誌，40：441-453, 2002.
- 6) 山口公子：小児の 6 自由度顎運動測定による顎口腔機能の評価，小児歯誌，38：129-137, 2000.
- 7) 長谷川成男，野村孝太郎，丸山雅昭，田中貴信，大杉尚之：側方滑走運動における運動様式の検討，補綴誌，16：381-386, 1972.
- 8) 真柳昭紘：側方滑走運動における顎頭運動に関する研究，補綴誌，14：158-182, 1970.
- 9) 都川延子，田原有里子，三好克実，遠山美穂，井下田繁子，桶口忍生，松野俊夫，前田隆秀：顎関節症・顎関節異常を訴える若年者の自我状態—エゴグラムによる検討—，小児保健研究，60：69-74, 2001.
- 10) 倉田康弘：小児期の顎関節症症状の有無と顎関節 MR 画像の検討，小児歯誌，39：937-947, 2001.
- 11) 顎関節症に関する小委員会：顎関節疾患および顎関節症の分類案，顎関節研究会誌，7：135-136, 1987.
- 12) 尾崎公一：顎関節症にみられる顎運動異常に関する研究，歯科学報，83：937-978, 1983.
- 13) 真柳昭紘：側方滑走運動における顎頭運動に関する研究，補綴誌，14：158-182, 1970.
- 14) 長谷川成男，野村孝太郎，丸山雅昭，田中貴信，大杉尚之：側方滑走運動における運動様式の検討，補綴誌，16：381-386, 1972.
- 15) 河野正司：下顎矢状面内運動に対する顎頭運動の研究 第 2 報 マルチフラッシュ装置による矢状面運動の解析，補綴誌，12：350-380, 1968.
- 16) 鶴山賢太郎，西村一美，三好克実，前田隆秀：小児の咀嚼リズムの安定性，小児歯誌，41：56-61, 2003.

Investigation of the Relationship between the Positions of Arbitrary Hinge Axis Point and Condylar Point based on Three-Dimensional Jaw Movement in Children with TMD

Katsumi Miyoshi, Kagumi Uesu*, Matsunaga Rie, Moroboshi Hiroyo and Maeda Takahide

Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo Pediatric Dentistry
(Director : Takahide Maeda)

**Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo Mathematics*
(Director : Kagumi Uesu)

It is useful for the prediction and the evaluation of the healing process of TMD in the lower age period to study the characteristic of the jaw movement of a child patient with abnormal jaw movement. When you analyze jaw movement using a three-dimensional jaw movement analysis device, the arbitrary hinge axis points of both the right and left sides are ordinarily used. The authors believe that the movement of the arbitrary hinge axis point during jaw movement is not the same as that of the condylar point obtained by tracking. However, the relationship of the position of those points is not clear. The position of the condylar point by tracking is shown as the shortest distance of the condylar point during the jaw movement path from the mouth closing position to the maximum opening position, and the point is named the center point during jaw movement. The distance of the center point and arbitrary hinge axis point during jaw movement were measured. The results were obtained as follows. It was clarified that the center point during jaw movement of hemilateral reduction and hemilateral irreducible jaw movement was away from the arbitrary hinge axis points in children with bilateral joint disk displacement of TMD. Moreover, a minute condylar movement was confirmed by the center point during jaw movement. The center of the jaw movement that is impossible to describe by arbitrary hinge axis points using conventional analysis of jaw movement seemed to be based on the condylar point during the jaw movement examined in this study.

Key words : Jaw movement, TMD, Arbitrary hinge axis points, Condylar point during jaw movement, A central axis

Carisolv™ を使用した齲蝕歯の細菌学的検索とその予後

山崎 優 植松 晃 樹 黒瀬 絵里奈
 五島 博 恵 新井 陽 子 吉田 明 弘
 前田 隆 秀

要旨：齲蝕象牙質を除去することができる Carisolv™ を用い、乳前歯 V 級窩洞 10 歯の齲蝕処置を行った。

修復処置前の窩洞内に齲蝕象牙質が除去されたかを齲蝕関連細菌の有無によって検討した。また、患児に Carisolv™ のアンケートを行い、処置した歯の経過を追ったところ以下の結果を得た。

1. Carisolv™ 処置前、対象歯すべての齲蝕象牙質表層部から齲蝕関連細菌を平均 6.1×10^6 CFU 認め、齲蝕象牙質表層下部から齲蝕関連細菌を平均 1.5×10^6 CFU 認めた。
2. Carisolv™ 処置中、10 歯中 7 歯の齲蝕象牙質表層部から齲蝕関連細菌を平均 6.4×10^4 CFU 認め、10 歯中 8 歯の齲蝕象牙質表層下部から齲蝕関連細菌を平均 7.7×10^3 CFU 認めた。
3. Carisolv™ 処置終了後、10 歯中 4 歯の齲蝕象牙質表層部から齲蝕関連細菌を平均 1.3×10^2 CFU 認め（減少率 99.989%）、10 歯中 5 歯の齲蝕象牙質表層下部から齲蝕関連細菌を平均 1.4×10^1 CFU 認めた（減少率 99.995%）。
4. 患児にアンケートをしたところ、Carisolv™ を好む患児が多かった。
5. Carisolv™ 使用後のコンポジットレジン充填の予後（平均 329 日）は良好であった。

以上の結果より、乳前歯に Carisolv™ は有用であり、患児から切削器具を用いる従来の歯科治療より好まれた。

Key words: Carisolv™, 齲蝕, 細菌検査, 予後観察

緒 言

齲蝕除去はタービン、エンジンを利用した回転切削器具が主である。最近、エアアブレイシブ、レーザーあるいは音波振動等の切削法も紹介され日常診療に使用されている¹⁾。しかし、回転切削器具は、齲蝕象牙質のみを除去するという選択性がなく、健康象牙質を不必要に除去してしまう²⁾欠点を有している。また、健康象牙質を削除することにより痛みを伴うことから無痛的に齲蝕処置を行うためには、局所麻酔が必須となる。しかしながら、局所麻酔は疼痛、痺れ感を起こし、その上タービン、エンジンは高い金属音や振動を生じさせ、患者に恐怖感、不快感を抱かせてしまう。特に小児患者においてはその恐怖心が歯科治療を遠ざける一因となっている³⁾。

近年、スウェーデンにおいて化学-機械的齲蝕除去システムとして、Carisolv™ が開発され注目されている⁴⁾。

Carisolv™ における基礎研究は少なく、その有効性についての研究は、齲蝕象牙質と健康象牙質の硬さの違いから Carisolv™ は齲蝕象牙質のみを除去するという報告⁵⁾や齲蝕探知液を指標として、齲蝕象牙質を除去しているとの報告^{6,7)}がある。しかしながら、齲窩から齲蝕象牙質が除去できたかどうかについては、Carisolv™ ゲルの透明度および歯質のステッキ感の消失で判断するように指示している⁸⁾のみで客観性に乏しく、Carisolv™ 処置終了後の窩洞内から完全に齲蝕象牙質が除去されているか疑問を抱く。

そこで著者らは、対象とした齲蝕歯に複数回 Carisolv™ を使用し、齲蝕象牙質の除去を Carisolv™ の指示書に示す条件を満たした段階で、窩洞内に齲蝕象牙質が完全に除去されたか否かを齲蝕関連細菌の存在で証明することを試みた。複雑窩洞では齲蝕象牙質の除去状態を認識するのが容易でないこともあることから、Carisolv™ による齲蝕象牙質の除去状態を視覚的に容易に把握でき、操作面からも容易な V 級齲蝕を有する乳前歯を対象とした。

窩洞内の細菌採取時期としては、Carisolv™ 処置前、処置中ならびに処置終了時とし、細菌採取部位として

日本大学松戸歯学部小児歯科学教室
 千葉県松戸市栄町西 2-870-1
 (主任：前田隆秀教授)
 (2002 年 4 月 1 日受付)
 (2002 年 4 月 12 日受理)

は、窩洞内の象牙質表層面および表層下象牙質における細菌学的な検討を行った。また齲蝕治療終了後に、Carisolv™ 使用による齲蝕治療についてのアンケートを患児に行い、小児患者への有用性の検討を行った。さらに、Carisolv™ による齲蝕治療を施した対象歯の予後観察も併せて検討した。

試料および方法

1) 被検者

日本大学松戸歯学部付属歯科病院小児歯科に齲蝕を主訴に来院し、以下の条件にあてはまる患児 10 名（男児 4 名，女児 6 名，3～7 歳，平均 5.1 歳）を被験者とした。

- (1) タービン，エンジンを使用した齲蝕の処置経験がある患児。
- (2) 歯科治療に協力的な患児。
- (3) 特記すべき全身疾患がない患児。
- (4) 形態ならびに構造の異常を認めない乳前歯で唇側面に限局した深度 C₂ の自覚症状のない齲蝕を有する患児。
- (5) 本研究の主旨を保護者に説明し同意を得られた患児

2) 被験歯

上の条件に合った被験者の乳前歯を被験歯とし、各々（右上 B 1 歯，右上 C 4 歯，左上 C 1 歯，左下 C 1 歯，右下 C 3 歯，合計 10 歯）を用いた。

3) 術者の選択

臨床経験 5 年以上の小児歯科医 1 名が齲蝕診断，齲蝕象牙質の除去状態，齲蝕治療を行った。

4) 化学-機械的齲蝕除去システム

本研究で使用した Carisolv™ (Medi Team) は，A 液（グルタミン酸，リジン，ロイシンの 3 種アミノ酸，エリスロシン，メチルセルロース，塩化ナトリウム，水酸化ナトリウム，pH 11）および B 液（0.5% 次亜塩素酸ナトリウム）から成り立っている。また，Carisolv™ 専用インスルメント 4 本，8 種類を用いて，齲蝕除去を行った。

Carisolv™ 専用インスルメントは，先端の形状に工夫されており，健康象牙質を切り込まないようにしている。そのため，無痛的治療がしやすいとされている⁹⁾。

5) 術式

すべての術式を通じて滅菌器具を使用した。はじめに，被験歯を唾液中の口腔細菌の侵入を防ぐために被験歯にラバーダム防湿を行った。Carisolv™ 処置前の齲蝕内の細菌採取を行うにあたって，被験歯の齲蝕以外の歯

表 1 被験者アンケート

●臭い：(有・無)
●味：(有・無)
●痛み：(有・無)
●いままでの歯科治療と比べて：(良・悪)

面の細菌の混入を防ぐため，齲蝕以外の歯冠部エナメル質をポピドンヨード綿球とアルコール綿球にて交互塗布し，滅菌処置を行った。

その後，Carisolv™ を Ericson らの方法⁴⁾に従い操作し，専用滅菌インスルメントにて齲蝕象牙質を掻き出した。また，エナメル-象牙境の齲蝕除去には探針にて齲蝕を掻き出した。術者が齲蝕象牙質を完全に除去したと判断するまで以上の操作を 5～10 回繰り返した。

Carisolv™ ゲルの混濁がなくなった段階で，最終的な細菌採取した後，クリアフィル ライナーボンド II Δ (クラレ社製) を指示書に従いコンディショニング，ボンディングを行い，光重合型コンポジットレジン (クリアフィル AP-X クラレ社製) にてレジン充填し，ホワイトポイントおよびスーパースナップにて研磨を行った。治療終了後，患児に表 1 に示すアンケートを行った。

6) 細菌採取

齲蝕からの細菌採取は齲蝕表層部と表層下から採取した。齲蝕表層部の細菌は齲蝕全面を滅菌綿棒にて 3 回拭き，直ちに Tris-HCL-buffer に混和した。表層下の細菌はスプーンエキスカバーターで齲蝕全体を軽く削った。

齲蝕表層部と表層下部からの細菌採取は以下のステップで行った。

1. Carisolv™ ゲルを齲蝕に満たす前の細菌採取（以下，Carisolv™ 処置前）。

2. Carisolv™ ゲルを齲蝕に満たし，専用滅菌インスルメントを作用させた後，Carisolv™ ゲルが混濁し，洗い流す。この処置を 3 回繰り返し，未だ Carisolv™ ゲルが混濁している段階での細菌採取（以下，Carisolv™ 処置中）。

3. Carisolv™ ゲルをさらに複数回処置し，Carisolv™ ゲルの混濁が生じない段階で齲蝕象牙質除去を完了と判断した段階での細菌採取（以下，Carisolv™ 処置終了後）。

7) 細菌学的検索

各ステップで採取した滅菌綿棒あるいは滅菌スプーンエキスカバーターを滅菌 Tris-HCL buffer (0.05 M, pH 7.2) 1.0 ml に混和し，ソニーケーターを用いて音波処理 (50 W, 20 sec, 20 kHz) し分散させた。この混濁液を 10 倍段階希釈し，以下の培地に塗抹し培養を行った。

総菌用培地：Brain Heart Infusion に馬脱線維血およ

び寒天を加えた血液平板培地
 選択培地: *Streptococcus* 属菌用に Mitis Salivarius
 agar
Actinomyces 属菌用に CFAT medium
Lactobacillus 属菌用に Rogosa の SL agar
 培養条件として 10% CO₂ ガスバックシステムによ
 り 37°C 48 時間培養を行った。

8) 細菌数の算定

培養後、総菌用培地および各選択培地に発育した集落
 を集落形成単位 (Colony forming unit, 以下 CFU) で算
 定を行った。

結 果

1. Carisolv™ 処置前では、被験者全員から齶蝕関連細
 菌が表層部から平均 6.1×10^5 CFU、表層下部から平均
 1.5×10^5 CFU 検出された。

Lactobacillus 属菌では、被験者 2 名 (被験者 9, 10)
 の表層部から 2.5 CFU および 7.5 CFU 検出され、被験
 者 8 名からは検出されなかった。表面下部から被験者 1
 名 (被験者 9) から 7.5×10^5 CFU 検出され、被験者 9 名
 からは検出されなかった。

Streptococcus 属菌では、被験者全員から表層部平均
 2.5×10^5 CFU 検出され、表層下部から平均 6.9×10^4 CFU
 検出された。

Actinomyces 属菌では、被験者全員から表層部平均 3.2
 $\times 10^5$ CFU 検出され、表層下部から平均 1.1×10^5 CFU 検
 出された。

2. Carisolv™ 処置中では、被験者 7 名から齶蝕関連細
 菌が表層部から平均 6.4×10^4 CFU 検出され、被験者 3
 名 (被験者 7, 8, 10) からは齶蝕関連細菌が検出されな
 かった。表層下部からは被験者 8 名 (被験者 1, 2, 3, 4,
 5, 6, 9, 10) から平均 7.7×10^5 CFU 検出され、被験者 2
 名 (被験者 7, 8) から齶蝕関連細菌が検出されなかつ
 た。

Lactobacillus 属菌は、被験者全員の表面部および表層
 下部から検出されなかった。

Streptococcus 属菌は、被験者 7 名 (被験者 1, 2, 3, 4,
 5, 6, 9) の表層部から平均 2.6×10^4 CFU 検出され、被験
 者 3 名 (被験者 7, 8, 10) からは検出されなかった。表
 層下部からは被験者 8 名 (被験者 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10)
 から平均 3.6×10^5 CFU 検出され、被験者 2 名 (被験者
 7, 8) からは検出されなかった。

Actinomyces 属菌では、被験者 7 名 (被験者 1, 2, 3, 4,
 5, 6, 9) の表層部から平均 3.0×10^4 CFU 検出され、被験
 者 3 名 (被験者 7, 8, 10) からは検出されなかった。表

層下部から被験者 8 名 (被験者 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10) に
 3.5×10^5 CFU 検出され、被験者 2 名 (被験者 7, 8) から
 は検出されなかった。

3. Carisolv™ 処置終了後では、齶蝕関連細菌が被験者
 4 名 (被験者 2, 5, 6, 9) の表層部から平均 1.3×10^5 CFU
 検出され、被験者 6 名 (被験者 1, 3, 4, 7, 8, 10) からは
 検出されなかった。表層下部からは被験者 5 名 (被験者
 2, 4, 5, 6, 9) から平均 1.4×10^5 CFU 検出され、被験者 5
 名 (被験者 1, 3, 7, 8, 10) から齶蝕関連細菌が検出され
 なかった。

Lactobacillus 属菌では、被験者全員の表層部および表
 層下部から検出されなかった。

Streptococcus 属菌では、被験者 4 名 (被験者 2, 5, 6,
 9) の表層部から平均 9.4×10^4 CFU 検出され、被験者 6
 名 (被験者 1, 3, 4, 7, 8, 10) からは検出されなかった。
 表層下部では被験者 5 名 (被験者 2, 4, 5, 6, 9) から平
 均 4.8 CFU 検出され、被験者 5 名 (被験者 1, 3, 7, 8,
 10) からは検出されなかった。

Actinomyces 属菌では、表層部から被験者 3 名 (被験
 者 5, 6, 9) から平均 2.8×10^5 CFU 検出され、被験者 7 名
 (被験者 1, 2, 3, 4, 7, 8, 10) からは検出されなかった。
 表層下部からは被験者 3 名 (被験者 5, 6, 9) から平均
 1.4×10^5 CFU 検出され、被験者 7 名 (被験者 1, 2, 3, 4,
 7, 8, 10) からは検出されなかった (表 2)。

4. Carisolv™ 処置終了後に表層部から齶蝕関連細菌が
 検出された被験者 4 名 (被験者 2, 5, 6, 9) は Carisolv™
 処置前と比べ平均 99.989% 減少 ($1 \sim 5.2 \times 10^5$ CFU) し
 ており、表層部下から齶蝕関連細菌が検出された被験者
 5 名 (被験者 2, 4, 5, 6, 9) は Carisolv™ 処置前と比べ平均
 99.995% 減少 ($2 \sim 6.2 \times 10^5$ CFU) していた。

Lactobacillus 属菌では、Carisolv™ 処置終了後に被験
 者全員から表層部および表層下部から菌が検出されなかつ
 たため、減少率は 100% であった。

Streptococcus 属菌では Carisolv™ 処置終了後に表層部
 から菌が検出された被験者 4 名 (被験者 2, 5, 6, 9) は
 Carisolv™ 処置前と比べ平均 99.981% 減少 ($2 \sim 3.5 \times 10^5$
 CFU) しており、表層部下から菌検出された被験者 5 名
 (被験者 2, 4, 5, 6, 9) は Carisolv™ 処置前と比べ平均
 99.996% 減少 ($1 \sim 1.9 \times 10^5$ CFU) していた。

Actinomyces 属菌では Carisolv™ 処置終了後に表層部
 から検出された被験者 3 名 (被験者 5, 6, 9) は Carisolv™
 処置前と比べ平均 99.996% 減少 ($1 \sim 7.2 \times 10^5$ CFU) し
 ており、表層部下から菌が検出された被験者 3 名 (被験
 者 5, 6, 9) は Carisolv™ 処置前と比べ平均 99.996% 減少
 ($1 \sim 4.1 \times 10^5$ CFU) していた。

山崎 優ほか：Carisolv による齲蝕の細菌検索

表 2-1 齲蝕象牙質表層部における各ステップごとの総菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	150000	1120	0
2	550000	4400	3
3	8425	1150	0
4	100000	150	0
5	1450000	396000	521
6	1300000	43825	4
7	800000	0	0
8	32250	0	0
9	1550000	115	15
10	160000	0	0

表 2-2 齲蝕象牙質表層部における各ステップごとの *Lactobacillus* 属菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	7.5	0	0
10	2.5	0	0

表 2-3 齲蝕象牙質表層部における各ステップごとの *Streptococcus* 属菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	64500	510	0
2	236500	2000	2
3	2875	125	0
4	1000	200	0
5	625500	135500	365
6	559000	44750	2
7	345500	0	0
8	12500	0	0
9	534500	72	7
10	102750	0	0

表 2-4 齲蝕象牙質表層部における各ステップごとの *Actinomyces* 属菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	76500	615	0
2	280500	2300	0
3	5025	100	0
4	60000	50	0
5	511000	190000	72
6	663000	14300	1
7	410000	0	0
8	23750	0	0
9	1035000	60	11
10	98000	0	0

表 2-5 齲蝕象牙質表層下部における各ステップごとの総菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	22533	180	0
2	57325	16933	2
3	71033	515	0
4	15000	3825	2
5	487500	22825	62
6	450000	12275	2
7	16900	0	0
8	7325	0	0
9	384000	4710	2
10	24900	210	0

表 2-6 齲蝕象牙質表層下部における各ステップごとの *Lactobacillus* 属菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	0	0	0
2	0	0	0
3	0	0	0
4	0	0	0
5	0	0	0
6	0	0	0
7	0	0	0
8	0	0	0
9	753	0	0
10	0	0	0

5. アンケートの結果、タービン、エンジンなどの回転切削器具による治療より Carisolv™ を使用した治療を好む患児が多かった。

6. コンポジットレジン充填後、予後を 133 日から 540

日経過しているが、10 歯すべてで脱離、二次齲蝕等特記事項は認められず、自発痛、誘発痛、圧痛、腫脹等の不快症状を経験した者は認めなかった。また、レントゲン所見においても歯槽骨ならびに歯根膜腔に病的所見を認

表 2-7 齲蝕象牙質表層下部における各ステップごとの *Streptococcus* 属菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	15550	125	0
2	44325	5417	1
3	42150	275	0
4	10000	2450	1
5	112975	8100	19
6	414500	12000	2
7	10650	0	0
8	2775	0	0
9	21975	375	1
10	15600	107.5	0

表 2-8 齲蝕象牙質表層下部における各ステップごとの *Actinomyces* 属菌数 (CFU)

被験者	Carisolv™ 処置前	Carisolv™ 処置中	Carisolv™ 処置終了後
1	8750	87	0
2	30900	4277	0
3	29800	350	0
4	10000	1700	0
5	406500	13475	41
6	337500	3000	1
7	10825	0	0
8	5175	0	0
9	296500	4940	1
10	9850	60	0

表 3 アンケート結果

被験者	年齢	性別	歯種	臭い	味	痛み	タービン と比べて	予後期間 (日)
1	7	女	左上 C	無	無	無	良	540
2	7	男	左下 C	無	有	無	良	201
3	5	男	右下 C	無	無	無	良	133
4	5	女	右上 C	無	無	無	わからない	461
5	5	女	右下 C	無	無	無	良	370
6	3	男	右上 C	無	無	無	わからない	484
7	6	男	右上 C	有	無	有	良	158
8	4	女	右上 C	無	無	無	良	230
9	4	女	右下 C	無	無	無	良	367
10	5	女	右上 B	無	無	無	良	345

(平均年齢：5.1 歳)

めた者は認められなかった。

考 察

指示書にしたがい、Carisolv™にて齲蝕象牙質を除去したと判断した後の窩洞内を細菌学的に検索したとこ

ろ、齲蝕関連細菌が全く検出されず、齲蝕象牙質が除去されたと思われる症例から、最大 5.2×10^2 CFU の齲蝕関連細菌が検出され齲蝕象牙質の残余を示した症例まであり、細矢ら⁶⁾が齲蝕象牙質の残余の危惧を報告するように、Carisolv™による齲蝕処置歯すべてから齲蝕象牙質が完全に除去されたとは言えない結果となった。

一方、Carisolv™使用によって齲蝕関連細菌のうちどの菌種が変動するかについて検討した。

齲蝕発症に関連する細菌としては、*Streptococcus* 属菌および *Actinomyces* 属菌であり、両属菌とも Carisolv™処置前および Carisolv™処置中にすべての被験歯に検出された。特に *Streptococcus* 属菌は齲蝕発生原因菌とされており、*Actinomyces* 属菌は根面齲蝕発生原因菌とされている⁹⁾が歯冠部唇面齲蝕にも検出された。*Lactobacillus* 属菌は平滑面齲蝕の中層で細菌検出率が高い¹⁰⁾とされているが、Carisolv™処置前に極少量検出されたが、Carisolv™処置中の齲窩内面から検出されなかった。

Carisolv™処置終了後に *Streptococcus* 属菌および *Actinomyces* 属菌の検出率、検出量とも比較的多かったことから Carisolv™ゲルの混濁がないと判断したとしても、齲蝕原性細菌である *Streptococcus* 属菌および *Actinomyces* 属菌の残余は予後に不安を残すことから、さらに Carisolv™ゲルの使用を必要性を示した。

井上ら¹²⁾は、Carisolv™は歯細管の細菌を死滅することはできないと述べている。Hoshino ら¹³⁾は、深部齲蝕症において切削器具により臨床的な感染齲蝕象牙質が除去され、臨床的露髄がなしとみなされた場合でも歯髄に最大 5.8×10^2 CFU の細菌が侵入していると述べている。このように齲蝕象牙質を除去したと判断したとしても窩洞から完全に齲蝕関連細菌を除去することは容易でないことが伺える。一方、吉山ら¹⁴⁾は、レジンボンディングシステムを用いて齲蝕象牙質の中に侵入した細菌を閉じ込めるシールドレストレーションを試みている。シールドレストレーションとは、象牙質齲蝕部の侵入細菌を残存させたままレジンを浸透させて硬化し、これにより侵入細菌を封じ込めてその活動を抑制するという発想である。Mertz-Fairhurst ら¹⁵⁾はシールドレストレーションの5年間の経過を追った結果、116 症例のうち 92% で齲蝕の進行がストップしたと報告している。しかし、齲蝕の進行がストップしたとしている症例のうち 50% はレジン等の一部破折や脱離が認められたとも報告している。齲蝕象牙質はレジンの接着力が低下するという報告¹⁶⁾もあり、シールドレストレーションもレジンの接着力や微小漏洩の問題点が完全に解決されているわけではない。

隅田ら¹⁷⁾は、ヒト抜去歯を用いて Carisolv™ による齲蝕除去を行った試料と、ラウンドバーによる齲蝕除去を行った試料のレジン接着強さは同等であると述べている。また、金森ら¹⁸⁾はヒト抜去歯を用いて Carisolv™ による齲蝕除去を行った試料と、スプーンエキスカバーターによる齲蝕除去を行った試料のレジン接着強さでは、Carisolv™ 使用後のレジン接着強さの方がスプーンエキスカバーター処理をしたレジン接着強さよりも強いと述べている。一方、細矢ら¹⁹⁾は乳歯健康象牙質に Carisolv™ を3分処理した後にエッチングを併用するとレジン接着強さが有意に低下したと述べている。

本研究において、Carisolv™ 処置終了後に細菌が検出された乳歯においても、平均477日経過した段階で視診にて二次カリエスの発生あるいは自発痛、誘発痛などの不快症状、さらにエックス線写真からの異常所見等が認められず予後は良好であった。今回、Carisolv™ 処置終了後に最も多い細菌数 (5.2×10^3 CFU) を示した被験歯においても、臨床的に病的症状の出現が認められなかった。また10歯すべてにおいて、レジン脱離が1歯もなく臨床的な立場からは、Carisolv™ 使用後のレジン接着強さは良好であった。

一方、橋本ら²⁰⁾は Carisolv™ にて処理した後の急性齲蝕と慢性齲蝕の窩壁象牙質面を観察した結果、急性齲蝕の方が多くの細管が開口し接着性が良好であることから、急性齲蝕の方が Carisolv™ 処置終了後の接着性修復に適していると述べている。また、瀬尾ら²¹⁾は幼若永久歯の齲蝕処置の際、ラウンドバーやスプーンエキスカバーターを用いての軟化象牙質の除去よりも、Carisolv™ と専用インスルメントを用いて、軟化象牙質の除去の方が歯髄へのダメージは少なく、幼若永久歯には有用であると述べている。急性齲蝕を好発し、歯髄腔が大きく、歯髄と齲窩と近接し易い小児期の齲蝕歯にとって Carisolv™ を使用した処置は有用であると推測される。

アンケートの結果より、Carisolv™ を使用した治療はタービン、エンジンを使用する従来の治療より好む患児が多く、Ericson ら⁴⁾の報告と一致した。その主な理由は麻酔処置をしなかったこと、処置中に痛みがほとんど無かったことによると推測される。歯科医師の立場からみると Carisolv™ を使用した治療は、タービン、エンジンを使用する従来の治療よりも操作時間が長かった。しかし、患児は Carisolv™ を使用した治療の方を好んだことから、振動や音、痛みがなかったため、操作時間の長さを感じられなかったのではないかと推測される。

今回、タービンをできる限り使用しないという方針に基づき、齲蝕を除去した後に生じた遊離エナメル質の除

去¹²⁾およびコンポジットレジン充填後、レジンの未重合部分の除去ならびに形態修正時にタービンを使用した。このように Carisolv™ はエナメル質の除去が困難であり、従来の切削器具を用いなくてはならないが、タービンの使用が無痛でかつ短時間で済むことから小児の行動にもほとんど悪影響がない。しかし、隣接面を含む臼歯の齲蝕あるいは、齲窩が閉鎖性の歯では、細矢ら⁶⁾や黒崎²²⁾は Carisolv™ 専用インスルメントの操作をやすくするために齲窩の開拓を行うために、Carisolv™ を用いた齲蝕処置でもタービンやエンジンを併用する必要があると報告しており、Carisolv™ のみで齲蝕処置を行うことは困難であった。

以上のことから小児患者の歯科治療に Carisolv™ を用いることは有効であるが、齲蝕象牙質を完全に除去することが容易でないことが判明した。シールドレストレーションの考え方を導入すると、修復処置において確実な操作による微少漏洩のない強い接着性が必須となろう。しかし、本研究は被験歯を乳歯に限っていたが、生涯にわたって機能させねばならない永久歯への Carisolv™ の応用の是非は長期観察に基づいた臨床研究を待たねば現時点では言及できない。

まとめ

乳前歯で唇側面に限局した深度 C₂ の自覚症状のない齲蝕を有する被験歯10本に Carisolv™ を応用し、以下の結果を得た。

1. Carisolv™ ゲルの混濁が消失し、Carisolv™ 処置終了と判断した被験歯において10歯中5歯に齲窩象牙質表層下に平均 1.4×10 CFU と少量であるが齲蝕関連細菌の *Streptococcus* 属菌および *Actinomyces* 属菌の存在が認められた。
2. Carisolv™ 処置終了後の窩洞内に齲蝕関連細菌が残余した被験歯であっても、微少漏洩のない確実な修復処置によって平均466日の経過観察から臨床上満足得られる結果が得られた。
3. Carisolv™ を使用した歯科治療は、局所麻酔を使用せずに齲蝕象牙質を無痛的に除去できることから、乳前歯単純窩洞で C₂ 齲蝕への応用は有効であろう。

文 献

- 1) 田上順次, 中島正俊, 稲井紀通, 堀口尚司, 富士谷盛興, 千田 彰, 他: 齲蝕除去法を比較検討する。その適応症と長所・短所, 歯界展望, 94: 993-1022, 1999.
- 2) 千田 彰: どう変わるのか, 変えるのか 齲蝕治療, Dental Diamond, 24: 66-70, 1999.
- 3) 高橋 淳: 歯科医ならびに歯科治療器具に対する小児と

- 母親の恐怖感に関する研究：愛院大歯誌，37：187-205，1999.
- 4) D. Ericson, M. Zimmerman, H. Raber, B. Gotrick, R. Bornstein, J. Thorell: Clinical evaluation of efficacy and safety of a new method for chemo-mechanical removal of caries. *Caries Res.*: 33, 171-177, 1999.
 - 5) 五十嵐公, 橋本佳奈, 礪波健一, 清水チエ, 俣木志朗, 黒崎紀正: Carisolv Gel によるう蝕象牙質の軟化について, 日歯保存誌, 41: 704-707, 1998.
 - 6) 細矢由美子, 後藤譲治: Carisolv™ が乳歯象牙質に及ぼす影響 第一報 齶蝕除去効果と齶蝕象牙質の硬さに及ぼす影響, 小児歯誌, 37: 677-684, 1999.
 - 7) 大島 任, 木下潤一郎, 鈴木信之, 木村裕一, 松本光吉: 齶蝕溶解剤 Carisolv™ に関する基礎的研究, 昭歯誌, 18: 360-365, 1998.
 - 8) Dan Ericson, 河西千州監訳: 化学-機械的齶蝕除去システム Carisolv™, 歯界展望, 93: 513-533, 1999.
 - 9) 高添一郎ら: 第5版歯学微生物学, 医歯薬出版, 東京, 1992, pp. 270-274.
 - 10) 稲井紀道, 原田直子, 島田康史: Carisolv™ による齶蝕除去, 歯界展望, 94: 1002-1006: 1999.
 - 11) 尾崎和美, 松尾敬志, 中江英明, 野村由一郎, 大木元玲子, 吉山昌宏, 他: 小窩裂溝部および平滑面部の象牙質齶蝕病巣における侵入細菌の局在性に関する免疫組織学的研究, 日歯保存誌, 36: 1059-1069, 1993.
 - 12) 井上 孝, 下野正基: 病理の三段論法 臨床歯科病理 Carisolv™, Dental Diamond, 23: 140-141, 1998.
 - 13) E. Hoshino, N. Ando, M. Sato, K. Kota: Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *International endodontic journal*: 25, 2-5, 1992.
 - 14) 吉山昌宏, 松尾敬志, 尾崎和美: 齶蝕象牙質へのシールド・レストレーションの可能性 細菌を封じ込める治療とその現実性, *The Quintessence*: 18, 77-89, 1999.
 - 15) Eva J. Mertz-Fairhurst, E. Earl Richards, J. Earl Williams, C. Douglas Smith, J. Rodway Mackert, Jr., George S. Schuster et al: Sealed restorations: 5-year results. *American J Dent.*: 5, 5-10, 1992.
 - 16) M. Yoshiyama, A. Urayama, T. Kimochi, T. Matsuo, DH, Pashley: Comparison of conventional vs self-etching adhesive bond to caries-affected dentin. *Operative dentistry*: 25, 163-169, 2000.
 - 17) 隅田素能子, 棚木寿男, 奈良陽一郎, 田中久義: 化学-機械的う蝕除去システム "Carisolv™" のう蝕罹患象牙質と接着性修復に及ぼす影響, 日歯保存誌, 43: 947-973, 2000.
 - 18) 金森吉五郎, 山田三良, 高橋亨典, 犬飼由郎, Vivian V. Ledesma, 他: Carisolv™ で処理した象牙質とのレジン接着性について, 日歯保存歯, 42: 6, 1999 (抄).
 - 19) 細矢由美子, 川下由美子, 後藤譲治: Carisolv™ が乳歯と幼若永久歯に対するレジンの接着性に及ぼす影響, 小児歯誌, 38: 344, 2000 (抄).
 - 20) 橋本佳奈, 礪波健一, 清水チエ, 黒崎紀正: Carisolv™ によって齶蝕を除去した後の窩壁象牙質面, 日歯保存誌, 42: 619-622, 1999.
 - 21) 瀬尾令士, 樋口 学, 馬場篤子, 佐藤雅美: 小児歯科におけるカリソルブの臨床的応用, *The Quintessence*: 1999, 157-169.
 - 22) 黒崎紀正: 新しいう蝕システム Carisolv™, *Dental Diamond*, 24: 36-39, 1999.

Microbiological Investigation and Prognosis of decayed teeth treated by Carisolv™

Masaru Yamasaki, Teruki Uematsu, Erina Kurose, Hiroe Goto

Youko Arai, Akihiro Yoshida and Takahide Maeda

Nihon University School of dentistry at Matsudo

We performed caries treatment of 10 deciduous anterior teeth with class V carious cavity using Carisolv™ that can remove dentine caries infected with bacteria related dental caries, the questionnaire investigation and their prognosis.

The removals of the infected dentine was confirmed by a culture test of the bacteria at each step before, during and after applying Carisolv™.

The results were obtained as follows.

1. Before Carisolv™ was applied, bacteria related dental caries was found in 10 teeth of all subjects with the average 6.1×10^5 CFU at the surface and the average 1.5×10^5 CFU at subsurface of the caries dentine, respectively.
2. When Carisolv™ was applied, bacteria related dental caries were found in 7 out of 10 teeth with an average 6.4×10^4 CFU at the surface and in 8 out of 10 teeth with an average 7.7×10^3 CFU at the subsurface of the caries dentine, respectively.
3. After Carisolv™ was applied, the bacteria related dental caries were found in 4 out of 10 teeth with the average 1.3×10^2 CFU at the surface showing decrease rate of 99.989% and of 5 out of 10 teeth with an average 1.4×10 CFU at subsurface of the caries dentine, showing a decreased rate of 99.989% and 99.995%, respectively.
4. We gave some questionnaire counseling caries treatment by Carisolv™ to the patients, and all of the subjects liked this method better than conventional methods such as the air turbine and engine instruments including local anesthesia.
5. Clinical prognosis at an average of 329 days was a fine based on no spontaneous and evoked pain, no gingival swelling and no pathologic findings by inspection and radiograph in all 10 treated by Carisolv™.

From above results, Carisolv™ application to caries treatment at anterior primary teeth was available.

Key words : Carisolv™, Dental caries, Bacteria prognosis

幼若永久歯の初期齲蝕診断の検討

—視診・触診と光学的ならびに細菌学的評価—

山 崎 優

要旨：日本大学松戸歯学部小児歯科外来に来院し、被検歯以外に齲蝕がないと診断した小児37名の幼若第一、第二大臼歯咬合面を、視診・触診にて健全、CO, Cと診断し、さらに総レンサ球菌数に対する mutans streptococci 数の比率、Dentocult SM[®]、Dentobuff Strip[®]、5分間咀嚼唾液量、DIAGNO dent 値を求め検討したところ、以下の結論を得た。

1. 幼若永久歯の咬合面小窩裂溝齲蝕の診査で健全歯、CO, Cの診断は、明視下での視診と軽い擦過による触診ではほぼ満足できた。
2. 齲蝕の細菌学的診断には、被検歯菌垢の総レンサ球菌数に対する mutans streptococci 数の比率を測定することが適当と思われた。
3. 被検歯菌垢の総レンサ球菌数に対する mutans streptococci 数の比率と DIAGNO dent 値との間には、正の優位な相関関係が認められた。
4. 1歯の齲蝕においても Dentobuff Strip[®]の測定結果に反映されていると思われた。
5. 齲蝕診断と事後措置を含めたその対応には、視診・触診だけではなく歯質破壊を評価できる光学的診断器である DIAGNO dentTM と齲蝕活動性を評価できる細菌学的診断の併用が有効であることがわかった。

Key words：初期齲蝕、細菌検査、DIAGNO dentTM、幼若永久歯

緒 言

幼若永久歯はエナメル質ならびに象牙質の形成が未熟であるばかりでなく、萌出後間もないために咬耗も少なく、特に、幼若第一、第二大臼歯の咬合面形態は、複雑で深い裂溝が存在しており、裂溝深部まで歯ブラシが届きにくいことから、齲蝕感受性が高く、齲蝕に罹患するとその進行が速い¹⁾。そのような理由から幼若永久歯齲蝕の早期発見・早期治療が肝要であるとされてきた。しかしながら、幼若永久歯は、再石灰化しやすい特徴を有している¹⁾ことから、白斑または裂溝部の着色歯の早期治療に疑問が投げかけられている。従って、幼若永久歯では、日常臨床あるいは学校歯科健診において齲蝕診断は、極めて重要である。Lussi²⁾は、成熟した抜去永久歯において視診のみにおける齲蝕歯判定の敏感度は62%、軽い圧による探針を併用しても敏感度は82%しか得られていないと報告している。

学校保健法施行規則が平成7年に改正され、学校歯科保健に「要観察」という新しい項目が導入された。齲蝕の病名においては要観察歯（以下COという）であるが、その診断基準は着色や粘性が触知される、もしくは、明らかな軟化底や軟化壁が確認できない歯とされているが、その診断は決して容易なものではない。日本学校歯科医会の基準では150g程度の圧による探針の使用を認めているが³⁾、探針による齲蝕の診査は再石灰化の可能性を阻害するといわれており⁴⁾、探針を用いない、あるいは用いたとしても尖端の鋭利な探針は使用しない診査方法が推奨されている^{3,5)}。しかし、視診のみの齲蝕診査は、病態像の把握が困難な場合が多く⁶⁾、特に照明が不十分な学校歯科健診のような集団検診では、齲蝕の見落としが多くなることが危惧される⁷⁾。また、最近の臨床における齲蝕の基準は、学校歯科医会、歯科疾患実態調査、口腔衛生学会、WHOなどがそれぞれ別個に設けており統一されていない⁷⁾。さらに齲蝕歯に対する切削基準も歯科医師によって差があるといわれている⁸⁾。

齲蝕感受性が高く、罹患すると進行が速いと同時に再石灰化も起こりやすいという二面性を有する幼若第一、第二大臼歯の齲蝕には、齲蝕深度と齲蝕活動性を知ることが重要である。最近、齲蝕深度を簡便に測定できる器

日本大学松戸歯学部小児歯科学教室
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
(指導：前田隆秀教授)
(2004年2月2日受付)
(2004年5月17日受理)

具として DIAGNO dent™ (KaVo 社) が開発され注目されている。DIAGNO dent™ は、発振波長 655 nm のレーザー光を齲蝕歯面に照射すると、健康歯質には認められない 670~800 nm の蛍光励起が生じるという原理を用いている⁹⁾。DIAGNO dent™ は、齲蝕検査に使用しても歯に対して無侵襲であるため、尖端の鋭利な探針による再石灰化の阻害を心配する必要がないことから、近年 DIAGNO dent™ の診断精度に関する研究がなされ、臨床への有用性の報告がみられる¹⁰⁾。

一方、従来から齲蝕罹患歯の咬合面歯垢と健全歯咬合面歯垢では、mutans streptococci の検出比率に差があることが報告されている¹¹⁾。

著者は、被検歯が健全歯か、CO あるいは齲蝕歯（以下 C という）の臨床的診断とともに被検歯の齲蝕活動性についても検討することが幼若永久歯の健全歯、CO ならびに C の対応（事後措置）には重要であろうと考えた。健全歯、CO、C の確定には本来、被検歯の病理組織学的所見を検討する必要がある。しかし、病理組織学的所見を検討するには被検歯を抜去しなければならず、倫理上許されない。そこで本研究においては、視診・触診にて健全歯、CO あるいは C と診断した幼若第一大臼歯あるいは第二大臼歯の咬合面小窩裂溝部における齲蝕原性細菌 mutans streptococci 数の総レンサ球菌数に対する比率（以下、齲蝕菌比率という）、Dentocult SM[®] による測定、5 分間咀嚼唾液量、Dentobuff Strip[®] を用いた唾液緩衝能および DIAGNO dent 値をもとに、臨床においてこれらの診断法をいかに応用すべきかを検討した。

対象および方法

被検児および被検歯

日本大学松戸歯学部小児歯科外来に来院し、以下の条件を満たす小児 37 名（男子 19 名、女子 18 名、5 歳~9 歳：第一大臼歯、11 歳~14 歳：第二大臼歯）を被検児とした。また、視診・触診において、日本学校歯科医会の齲蝕の診断基準¹²⁾より、健全歯、CO あるいは C と診断し、デンタルエックス線所見から歯根未完成な第一、第二大臼歯なものを被検歯とした。被検歯の視診・触診、咬合面裂溝部の歯垢の採取、Dentocult SM 値測定、5 分間咀嚼唾液量、Dentobuff Strip[®] による唾液緩衝能の測定、DIAGNO dent 値測定は著者が行った。

1. 無齲蝕あるいは幼若第一、第二大臼歯咬合面小窩裂溝部において、CO あるいは C を疑われる 1 歯を有する以外に齲蝕罹患歯を有していない。
2. 診査前の 3 週間以内に抗菌薬を服用していない。
3. 診査前の 1 時間以内に飲食、歯磨きを行っていない。

い。

4. 診査前の 12 時間以内に洗口液を使用していない。
5. 特記すべき全身疾患がない。

なお、本研究は、日本大学松戸歯学部倫理委員会にて承認された。（承認番号 EC 01-021 号）

1. 細菌学的検査

1) 試料採取、分散および希釈

健全歯、CO あるいは C と診断した幼若第一、第二大臼歯の咬合面小窩裂溝部の歯垢を滅菌アプリーケーターにて採取し、ただちに滅菌 Tris-HCl buffer (0.05 M, pH 7.2) 1.0 ml に混和後、氷冷下で Sonicator[®] (大岳製作所) を用い音波処理 (50 W, 30 sec, 20 kHz) にて試料を分散した。この懸濁液を 10 倍段階希釈して、以下の培地に塗抹し培養を行った。

2) 使用培地

総レンサ球菌用に Mitis Salivarius agar (以下 MS 培地, Difco), mutans streptococci 用に MS 培地に 0.2 U/ml bacitracin (Sigma) および 15% sucrose を加えた培地 (以下 MSB 培地) を使用した。

3) 培養条件

MS 培地は 10% CO₂ Gas Pack system により Gas Pack jar で 37°C, 24 時間培養後、室温で 24 時間静置した。MSB 培地は Gas Pack jar で 48 時間、嫌気培養を行った。

4) 細菌数の算定および菌の同定

MS 培地に発育した集落から集落形成単位 (colony forming unit, CFU) を算定し、MSB 培地に発育した集落については mutans streptococci の特徴ある集落形態を実体顕微鏡下で確認後、その CFU を算定し、歯垢中の齲蝕菌比率を求めた。

5) Dentocult SM[®] による唾液中 mutans streptococci の測定

使用指示書に従い、Dentocult SM[®] を用い、唾液中 mutans streptococci の測定を行った。培養には簡易培養器カルティメイト[®] を用いて 37°C, 48 時間培養後、モデルチャートにて判定し、Dentocult SM 値を求めた。

2. 唾液検査

5 分間咀嚼唾液量の測定および Dentobuff Strip[®] による唾液緩衝能の測定

使用指示書に従い、パラフィンワックス 30 秒咀嚼後、一度口腔内の唾液を嚥下させた後に 5 分間パラフィンワックスを咀嚼させ、随時コップ内に唾液を吐き出させ、咀嚼唾液量を測定した。その後、唾液を Dentobuff Strip[®] に滴下し、5 分後にカラーチャートを用い、唾液

緩衝能の判定を行った。

3. 光学的検査

DIAGNO dent™ による測定

小窩裂溝の歯垢を採取した後、同部位を歯面研磨用ブラシにて歯面を清掃し、約15秒間水洗、約10秒間エア一乾燥し、齲蝕の認められない頬側歯面にて補正を行い、細菌採取部位をDIAGNO dent™ を用いて測定した。細菌採取部位にて複数回測定し、そのうち近似値を示した3回の測定値のうち、最高値をDIAGNO dent 値とした。

4. 統計処理

健全歯、CO、Cと診断した各被検歯間の比較と、歯垢中齲蝕菌比率、5分間咀嚼唾液量、DIAGNO dent 値のそれぞれの項目においてはKruskal-Wallis検定をおこない、Dentocult SM 値、唾液緩衝能においては χ^2 検定をおこなった。

結 果

1. 健全歯、CO、Cにおける検査結果

1) 健全歯について

視診・触診において健全歯と診断した8名それぞれの被検歯垢中齲蝕菌比率、5分間咀嚼唾液量、Dentobuff Strip®による唾液緩衝能の測定値、Dentocult SM 値、DIAGNO dent 値を表1-1に示す。

- (1) 齲蝕菌比率は、 $0.15 \pm 0.09\%$ であった。
- (2) 5分間咀嚼唾液量は 5.50 ± 2.07 mlであった。
- (3) Dentobuff Strip®による唾液緩衝能はhighが7名、mediumが1名であった。
- (4) Dentocult SM 値はすべての被検者において0であった。
- (5) DIAGNO dent 値は 10.8 ± 1.4 であった。

2) CO について

視診・触診においてCOと診断した17名それぞれの被検歯垢中齲蝕菌比率、5分間咀嚼唾液量、Dentobuff Strip®による唾液緩衝能の測定値、Dentocult SM 値、DIAGNO dent 値を表1-2に示す。

- (1) 齲蝕菌比率は $8.68 \pm 9.86\%$ であった。
- (2) 5分間咀嚼唾液量は 8.26 ± 4.15 mlであった。
- (3) Dentobuff Strip®による唾液緩衝能は全ての被検者においてhighであった。
- (4) Dentocult SM 値は9名が0、7名が1、1名が2であった。
- (5) DIAGNO dent 値は 21.3 ± 10.9 であった。

3) C について

視診・触診においてCと診断した12名それぞれの被検歯垢中齲蝕菌比率、5分間咀嚼唾液量、Dentobuff Strip®による唾液緩衝能の測定値、Dentocult SM 値、DIAGNO dent 値を表1-3に示す。

- (1) 齲蝕菌比率は $54.39 \pm 18.60\%$ であった。
- (2) 5分間咀嚼唾液量は 5.21 ± 1.39 mlであった。
- (3) Dentobuff Strip®による唾液緩衝能は6名がmediumで6名がhighであった。
- (4) Dentocult SM 値は5名が1、7名が2であった。
- (5) DIAGNO dent 値は 54.6 ± 18.7 であった。

2. 各検査結果と視診・触診にて診断した被検歯との関係

1) 齲蝕菌比率

齲蝕菌比率と、視診・触診にて診断した被検歯のうち、健全歯とC間、COとC間に有意差が認められた(表2)。

2) Dentocult SM 値

Dentocult SM 値と、視診・触診にて診断した被検歯には優位な関係が認められた(表3)。

表1-1 視診、触診にて健全歯と診断した被検者

年齢	性別	採取部位	齲蝕菌比率 (%)	5分間咀嚼唾液量 (ml)	Dentobuff Strip (唾液緩衝能)	Dentocult SM 値	DIAGNO dent 値
5	男	左下6	0.0	9.0	high	0	12
12	男	左上7	0.3	6.0	high	0	11
9	女	右上6	0.0	3.0	medium	0	8
14	女	左上7	0.2	4.0	high	0	12
7	男	左下6	0.1	8.0	high	0	10
13	男	右上7	0.3	5.0	high	0	11
9	女	右上6	0.1	4.0	high	0	10
12	女	右下7	0.2	5.0	high	0	12
Mean ± SD			0.15 ± 0.09	5.50 ± 2.07			10.8 ± 1.4

DMFT=0

表 1-2 視診，触診にて CO と診断した被検者

年齢	性別	採取部位	蝕齲菌比率 (%)	5 分間咀嚼唾液量 (ml)	Dentobuff Strip (唾液緩衝能)	Dentocult SM 値	DIAGNO dent 値
11	男	左上 7	3.0	15.0	high	1	18
7	男	左上 6	2.4	16.0	high	1	17
8	女	左上 6	18.0	5.5	high	1	18
7	女	左下 6	32.3	9.0	high	2	30
7	男	右下 6	12.6	16.0	high	0	8
6	男	右下 6	1.7	4.0	high	1	17
7	女	右下 6	4.7	2.0	high	1	34
13	男	右下 7	10.9	7.0	high	1	28
12	女	左上 7	18.1	7.0	high	1	44
8	女	右下 6	4.1	6.0	high	0	19
6	男	右下 6	1.4	7.0	high	0	7
13	女	右上 7	27.8	10.0	high	0	26
6	男	右上 6	2.5	6.0	high	0	4
7	男	左下 6	3.5	8.0	high	0	19
6	男	右上 6	4.0	11.0	high	0	11
13	女	左下 7	0.3	4.0	high	0	27
11	男	右下 7	0.3	7.0	high	0	35
Mean ± SD			8.68 ± 9.86	8.26 ± 4.15			21.3 ± 10.9

DMFT=0

表 1-3 視診，触診にて C と診断した被検者

年齢	性別	採取部位	蝕齲菌比率 (%)	5 分間咀嚼唾液量 (ml)	Dentobuff Strip (唾液緩衝能)	Dentocult SM 値	DIAGNO dent 値
9	女	左下 6	47.5	3.5	medium	2	56
8	男	右下 6	75.4	4.0	medium	2	78
8	女	右上 6	84.2	5.5	high	2	37
6	男	右下 6	56.4	3.5	medium	2	86
12	女	左上 7	50.8	6.0	medium	1	67
11	女	左下 7	26.5	7.0	high	1	47
12	男	右下 7	54.8	8.0	high	1	41
13	女	左上 7	33.1	5.0	medium	2	32
13	女	右上 7	54.6	5.0	medium	2	38
13	男	左下 7	81.3	6.0	high	2	50
11	女	右下 7	55.1	4.0	high	1	43
6	男	右上 6	33.0	5.0	high	1	80
Mean ± SD			54.39 ± 18.60	5.21 ± 1.39			54.6 ± 18.7

DMFT=1

表 2 視診・触診にて診断した被検歯と蝕齲菌比率との関係

	蝕齲菌比率 (%) Mean ± SD	
健全歯	0.15 ± 0.09	**
CO	8.68 ± 9.86	
C	54.39 ± 18.60	

* : p < 0.05
** : p < 0.01

表 3 視診・触診にて診断した被検歯と Dentocult SM 値との関係

Dentocult SM 値	0	1	2
健全歯	8	0	0
CO	9	7	1
C	0	5	7

(名)
p < 0.05

3) 5分間咀嚼唾液量

5分間咀嚼唾液量と視診・触診にて診断した被検歯のうち、健全歯とCOならびにCとの間に有意差は認められなかった(表4)。

表4 視診・触診にて診断した被検歯と咀嚼唾液量との関係

	5分間咀嚼唾液量 (ml)	
	Mean±SD	
健全歯	5.50±2.07	
CO	8.26±4.15	
C	5.21±1.39	

有意差は認められなかった * : p<0.05

表5 視診・触診にて診断した被検歯と唾液緩衝能との関係

	High	Medium
健全歯	7	1
CO	17	0
C	6	6

(名)
p<0.05

表6 視診・触診にて診断した被検歯とDIAGNO dent 値との関係

	DIAGNO dent 値	
	Mean±SD	
健全歯	10.8± 1.4	
CO	21.3±10.9	
C	54.6±18.7	

* : p<0.05
** : p<0.01

4) Dentobuff Strip®による唾液緩衝能

唾液緩衝能と視診・触診にて診断した被検歯には有意な関係が認められた(表5)。

5) DIAGNO dent 値

DIAGNO dent 値と視診・触診にて診断した被検歯問のうち、健全歯とC間、COとC間に有意差が認められた(表6)。

3. DIAGNO dent 値と齲蝕菌比率との関係

被検歯37歯のDIAGNO dent 値をX軸、齲蝕菌比率をY軸としたときの近似曲線は $y=0.9x-5.1$ であり、正の優位な相関関係が認められた(図1)。

考 察

本研究では、被検歯を視診・触診にて日本学校歯科医会の基準¹²⁾に従い、健全歯、COおよびCと診断した。なお、被検歯のうち、視診・触診ならびに光学的評価と細菌学的評価からCと診断した歯は修復処置を行った。

DIAGNO dent™ について、細矢ら¹³⁾は、永久歯を視診・触診、エックス線診査からCOと診断した時のDIAGNO dent 値は 15.9 ± 12.5 、Cと診断した時のDIAGNO dent 値は 30.1 ± 23.4 であったと報告し、さらに齲蝕除去後にDIAGNO dent™ にて測定すると数値が下がり臨床応用が有効であると報告している。Sheehyら¹⁴⁾は、4歳4か月から8歳2か月児の萌出した第一大臼歯を視診のみによって診断した結果、DIAGNO dent™ の測定値が0-13は健全歯、14-20はエナメル齲蝕、21-29は象牙質齲蝕だが患者のカリエスリスクで処置するかどうか判断、30以上は処置を行うと報告している。田上¹⁵⁾は、抜去歯に齲蝕探知液を用いて検討し、DIAGNO dent™ の測定値が50以上で象牙質に達する齲蝕が存在すると報告している。

一方、Lussiら¹⁶⁾は、抜去歯を用いて病理切片から、DIAGNO dent™ の測定値が0から4は、齲蝕を認めない、もしくは齲蝕がエナメル質の1/2以下、5から10は齲蝕がエナメル質の1/2以上に及ぶがエナメル質に局限、11以上18以下は象牙質の1/2までの齲蝕、19以上は象牙質齲蝕と報告しており、Attrill¹⁷⁾は、抜去した第一、第二乳臼歯を用い、病理切片からDIAGNO dent™ の測定値が0-9を健全もしくは初期エナメル質齲蝕、10-17をエナメル質齲蝕、18以上を象牙質齲蝕と報告している。また、Ross¹⁸⁾は、抜去歯からの病理切片からDIAGNO dent™ の測定値が0-10を健全歯もしくはエナメル質初期齲蝕、11-20をエナメル質深部齲蝕もしくはエナメル象牙境に達した齲蝕、20-30を象牙質に達した齲

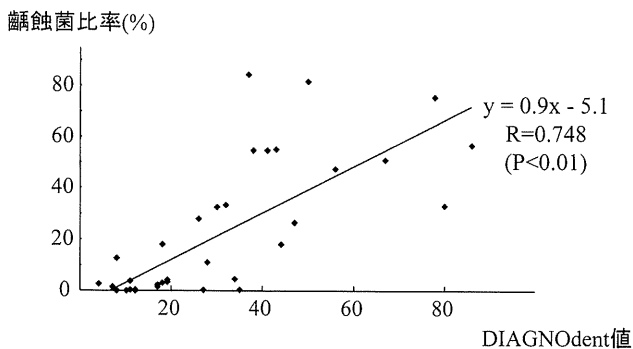


図1 DIAGNOdent 値と齲蝕菌比率との関係

蝕、30以上を歯質崩壊と報告している。

このように病理学的検討を加えた齲蝕深度の診断か否かによって DIAGNO dent 値は大きく異なることが考えられる。本研究において幼若永久歯は抜去することが不可能であったことから、臨床的な評価をしている細矢らの結果¹⁴⁾と比較したところ、ほぼ類似な値を示し、さらに本研究と同様に CO の概念を踏まえている上で CO ならびに C における DIAGNO dent 値の標準偏差が大きく、DIAGNO dent 値だけで CO, C かの診断は難しいことを示している点も類似している。

Ikedra¹¹⁾は、学童期における下顎第一大臼歯歯垢を18か月間、同一歯面を観察した結果、齲蝕に罹患した歯垢の *S. mutans* 菌数は齲蝕に罹患しない歯垢に比べ有意に多いことを報告している。また、尾崎ら¹⁹⁾は、小窩裂溝エナメル齲蝕病巣内における *S. mutans* の検出率は100%であったと報告している。Littleton²⁰⁾は、初期齲蝕咬合面齲蝕歯垢中の齲蝕菌比率が41%であると報告している。これらの報告から齲蝕面上の歯垢中の *mutans streptococci* 菌数は健全歯より明らかに多く、齲蝕活動性が高いことが推察される。

一方、唾液中の *mutans streptococci* はプラーク中の *mutans streptococci* を反映しているといわれている^{21, 22)}。五十嵐ら²¹⁾は、小児に対して Dentocult SM[®]と原理が類似している齲蝕活動性試験ミューカウント[®]を用いて齲蝕罹患状況を評価できるかを調査した。その結果、ミューカウント値が高くなるにつれ齲蝕罹患歯数の多い者が増加する傾向がみられたと報告し、藤原ら²²⁾は、唾液中の *S. mutans* 数と齲蝕罹患状態との間には有意の相関が認められたと報告している。細矢ら^{23, 24)}は、ミューカウント値が高くなるにつれ齲蝕罹患状態は高くなる傾向が認められたと報告している。本研究で Dentocult SM 値が2を示した被検児の歯垢中齲蝕菌比率は被検歯において30%以上であり、それが口腔全体に反映したか、他の歯面にも *mutans streptococci* が多数生息していたため高値を示したかは、他の健全歯面を検査していないので判断し兼ねるが、他に齲蝕を疑うような歯がないことから、この1歯のために口腔内環境の齲蝕発生の危険性が高くなり、他の健全歯への *mutans streptococci* の伝播や定着を防ぐ意味でも総合的な検査による判断が重要であると思われる。

本研究において、視診・触診で CO と診断した時の DIAGNO dent 値あるいは歯垢中齲蝕菌比率が被検歯により大きくばらついた原因の一つに、C は切削して齲蝕と確認しているのに対して CO は切削しての確定診断を行っていないことが挙げられる。そのため、視診・触

診で CO と診断した被検歯のなかで DIAGNO dent 値あるいは歯垢中齲蝕菌比率との間に矛盾が感じられる症例が散見された。例えば、視診・触診において CO と診断した被検歯で DIAGNO dent 値が35を示したが、歯垢中齲蝕菌比率が0.3%、Dentocult SM 値が0という齲蝕活動性が低いと考えられる症例、また DIAGNO dent 値が30を示し、歯垢中齲蝕菌比率が32.3%、Dentocult SM 値が2という非常に高い値の症例も認められた。前者は視診・触診により CO と診断したが切削していないため確定診断していないことから、DIAGNO dent 値から C の可能性が考えられる。しかし、齲蝕活動性が低いこと、歯垢中齲蝕菌比率が低いこと、また唾液中の *mutans streptococci* 数が少ないことから、現在の口腔内環境が維持されれば再石灰化が促進され、齲蝕進行が止まる可能性が高いものと推測される。後者は、前者よりも DIAGNO dent 値が低いため歯質の崩壊は少ないものと考えられるが、歯垢中齲蝕菌比率が非常に高いこと、唾液中の *mutans streptococci* 数が多いことから、現在の口腔内環境が改善されなければ、被検歯は C に進行することが推測される。

咀嚼唾液量と Dentobuff Strip[®]による唾液緩衝能について、岡崎ら²⁵⁾は、唾液流出量と齲蝕罹患状態との関係は認められなかったが、唾液緩衝能と齲蝕罹患状態とは関係が認められたと述べている。また、森主ら²⁶⁾は、幼児期の唾液緩衝能試験は、耳下腺からの唾液分泌を促すため高緩衝能になりやすいと述べている。本研究結果では、唾液分泌量と健全歯、CO, C との間に差は認められなかったが、唾液緩衝能は C と診断した小児において、優位な関係が認められたことから1歯の齲蝕においても Dentobuff Strip[®]の測定結果に反映されていると思われる。

本研究結果より、幼若永久歯咬合面の齲蝕診断ならびに事後措置にあたっては、歯垢中齲蝕菌比率あるいは、DIAGNO dent[™]との応用が有効と考えられた。日常臨床において、十分な光とエアブローを用いた視診に、探針を小窩裂溝内に穿刺せず、軽く擦過する程度に留めた触診で、健全歯、CO, C の診断は、ほぼ満足でき、さらに DIAGNO dent[™]のような光学的評価と細菌学的評価を併用することによって歯質の崩壊の状態と齲蝕活動性が把握でき、齲蝕診断後の予防や指導を含めた事後措置の決定がより合理的となることが提示できた。

結 論

1. 幼若永久歯の咬合面小窩裂溝齲蝕の診査で健全歯、CO, C の診断は、明視下での視診と軽い擦過による触

診でほぼ満足できた。

2. 齲蝕の細菌学的診断には、歯垢中齲蝕菌比率を測定することが適当と思われた。
3. 被検歯菌垢の齲蝕菌比率と DIAGNO dent 値との間には、正の優位な相関関係が認められた。
4. 1 歯の齲蝕においても Dentobuff Strip® の測定結果に反映されていると思われた。
5. 齲蝕診断と事後措置を含めたその対応には、視診・触診だけではなく歯質破壊を評価できる光学的診断器である DIAGNO dent™ と齲蝕活動性を評価できる細菌学的診断の併用が有効であることがわかった。

以上のことから齲蝕か否かの診断には、明視下での視診と触診でほぼ満足できるが、さらに光学的診断器である DIAGNO dent™ と細菌学的評価を併用することによって歯質の崩壊の状態と齲蝕活動性が把握でき、齲蝕診断後の予防や指導を含めた事後措置の決定が可能となることが提示された。

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました前田隆秀教授に深甚なる敬意と感謝の意を捧げます。

本研究は学術フロンティア推進事業およびベンチャー研究開発拠点整備事業の補助を受けた。

文 献

- 1) 下岡正八：乳歯・幼若永久歯の特徴，下岡正八ほか編，新小児歯科学，クインテッセンス，東京，1996，pp. 105-110.
- 2) Lussi, A.: Impact of including or excluding cavitated lesions when evaluating methods for the diagnosis of occlusal caries. *Caries Res.*, 30: 389-393, 1996.
- 3) 赤坂守人：歯と口の健康診断，安井利一編，学校歯科保健の基礎と応用，医歯薬出版，東京，2001，pp. 81-95
- 4) Barbakow, F., Imfeld, T. and Lutz, F.: Enamel Remineralization: how to explain it to patients, *Quintessence International*, 22: 341-347, 1991.
- 5) 田浦勝彦，小澤雄樹，浅沼 慎，楠本雅子，松坂朋典，坂本征三郎，熊谷 崇：初期齲蝕の検出に関する新しい考え方 - 歯科用探針は侵襲性の大きい齲蝕診査器具である - ，口腔衛生会誌，49: 145-150, 1999.
- 6) Ricketts, D. and Kidd, E.: Hidden caries: What is it? Does it exist? Does it matter? *Int. Dent. J.*, 47: 259-265, 1997.
- 7) 小林清吾：齲蝕診断法，*Dental diamond* 増刊号，予防歯科成功への道：152-153, 2001.
- 8) Lewis, D. W., Kay, E. J., Main, P. A., Pharoah, M. G. and Cisma A.: Dentists' variability in restorative decisions, microscopic and radiographic caries depth, *Community Dent. Oral Epidemiol.*, 24: 106-111, 1996.
- 9) 公開特許広報：特許出願公開番号 特開平 9-189659，特許庁，1997，pp. 1-7.
- 10) 五十嵐 公，荒木孝二，俣木志朗，黒崎紀正：DIAGNO dent® の臨床有用性，*日歯保存誌*，42: 783-785, 1999.
- 11) Ikeda, T., Sandhan, H. J. and Bradley, E. L. Jr.: Changes in *Streptococcus Mutans* and Lactobacilli in plaque in relation to the initiation of dental caries in Negro children, *Arch. Oral Biol.*, 18: 555-566, 1973.
- 12) 岡田昭五郎：児童生徒の歯及び口腔の健康診断と事後処置，*日本学校歯科医学会誌*，75: 54-60, 1996.
- 13) 細矢由美子，後藤譲治：DIAGNO dent® 応用に関する臨床的研究 第一報 齲蝕象牙質の状態が測定値におよぼす影響，*小児歯誌*，39: 974-979, 2001.
- 14) Sheehy, E. C., Brailsford, S. R., Kidd, E. A. M., Beighton, D. and Zoitopoulos, L.: Comparison between visual examination and a laser fluorescence system for in vivo diagnosis of occlusal caries, *Caries Res.*, 35: 421-426, 2001.
- 15) 田上順次：新しい齲蝕診断器“DIAGNO dent”，*Dental diamond*, 1: 34-35, 1999.
- 16) Lussi, A., Imwinkelried, S., Pitts, N. B., Longbottom, C. and Reich, E.: Performance and Reproducibility of a Laser Fluorescence System for Detection of Occlusal Caries in vitro, *Caries Res.*, 33: 261-268, 1999.
- 17) Attrill, D. C. and Ashley, P. F.: Occlusal caries detection in primary teeth: a comparison of DIAGNO dent with conventional methods, *Brit. Dent. J.*, 190: 440-443, 2001.
- 18) Ross, G.: Caries diagnosis with the DIAGNO dent laser: A user's product evaluation, *Ont. Dent.*, 76: 21-24, 1999.
- 19) 尾崎和美，松尾敬志，中江英明，野村由一郎，大木元玲子，吉山昌宏，恵比須繁之：小窩裂溝部および平滑面部の象牙質齲蝕病巣における侵入細菌の局在性に関する免疫組織学的研究，*日歯誌*，36: 1059-1069, 1993.
- 20) Littleton, N. W., Kakehashi, S. and Fitzgerald, R. J.: Recovery of specific "caries-inducing" streptococci from carious lesions in the teeth of children, *Arch. Oral Biol.*, 15: 461-463, 1970.
- 21) 五十嵐公英，千田隆一，桜井 聡，千葉桂子，神山紀久男：幼児の齲蝕罹患状況と簡易測定法による唾液中 *Streptococcus mutans* 菌数との関連性，*小児歯誌*，21: 719-727, 1983.
- 22) 藤原 卓，武井 勉，河野仁美，笹田英子，泉谷 明，大嶋 隆，祖父江鎮雄：日本人小児の唾液より分離される *Streptococcus mutans* の諸性状と齲蝕罹患状態との関係について，*小児歯誌*，26: 556-563, 1988.
- 23) 細矢由美子，安藤匡子，高風亜由美，池田靖子，加島知恵子，後藤譲治：各種齲蝕活動性試験法の臨床比較 第一報 齲蝕現症との関係，*小児歯誌*，29: 308-324, 1991.
- 24) 細矢由美子，大町耕一，東 繭，後藤譲治：齲蝕発生の予測に対する齲蝕活動性試験の有用性（第一報），*小児歯誌*，38: 985-994, 2000.
- 25) 岡崎好秀，東 知宏，田中浩二，岡本安広，村上 知，宮城 淳，他：中学生における唾液緩衝能テストと齲蝕罹患状態の関係について，*小児歯誌*，38: 615-621, 2000.
- 26) 森主宜延，金城幸子，小椋 正：幼児における齲蝕活動性試験 (Dentocult SM® Strip mutans・Dentobuff Strip®) 簡易法の信頼性について，*小児歯誌*，39: 110-115, 2001.

Study of the Diagnosis to Early Stage of Caries in Premature Permanent Teeth

—The assessment of inspection /palpation, optical examination
and microbiological finding—

Masaru Yamazaki

*Department of Pediatric dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
(Director : Prof. Takahide Maeda)*

The author was interested in the reliability of diagnosing dental caries in the occlusal pit and fissure of premature first and second molars.

The teeth, diagnosed as caries free, CO and C based on inspection and examined with an explorer were measured and assessed using the DIAGNOdent™ value, the ratio of mutans streptococci against the total amount of streptococci in the plaque, the salivary volume and salivary buffer, respectively.

The results were as follows.

1. The accuracy of caries diagnosis with inspection and examination using an explorer under a bright light was generally correct based on the DIAGNOdent™ value and the ratio of mutans streptococci against the total amount of streptococci in the plaque.
2. Positive relationships were found among the DIAGNOdent™ value, the ratio of mutans streptococci against the total amount of streptococci in the plaque.

The results suggested that the accuracy of caries diagnosis by inspection and examination using an explorer under a bright light was generally correct, and the assessments of the optical and microbiological findings indicated enamel destruction and caries activity were useful for the prevention and instruction concerning early stage of caries in youngster.

Key words : Early stage of caries, Microbiological examination, DIAGNOdent™, Premature permanent teeth

大学生および児童からのブラッシング菌垢を検体とする

S. mutans 迅速測定キットの有用性評価

水野 恭子^{1,2)} 後藤田 宏也^{1,4)} 田口 千恵子¹⁾
小林 清吾^{1,4)} 橋爪 智美²⁾ 前田 隆秀^{3,4)}
福島 和雄^{2,4)}

要旨：大学生および学童由来のブラッシング菌垢を検体としてポリクローナル抗体使用の *S. mutans* 迅速測定キット（トクヤマデンタル社製キット，以下 TD キット）の有用性試験を行った。本学部学生 84 名および小学 6 年生 20 名からの菌垢試料において，TD キットによる評価レベルとスパイラル培養法により算出した *S. mutans* 菌数との間に強い正の相関が認められた。両検体におけるスピアマンの順位相関係数はそれぞれ 0.86 ($p < 0.001$)，0.89 ($p < 0.001$) であった。また，スクリーニング基準を 5×10^3 CFU/ml 及び 0/1 間とした時の TD キットの感度は 0.98，特異度は 0.95，一致率は 92%，kappa 値は 0.90 であった。

これらより，ブラッシング菌垢を用いた TD キット測定系は，刺激唾液を用いた測定系よりも診断精度が高く，チェアサイドにおける齲蝕リスク診断に極めて有用な手法であることが示唆された。

Key words：ブラッシング菌垢，*S. mutans*，学童，迅速測定キット，齲蝕リスク診断

緒言

口腔疾患の予防に重点を置いた口腔健康管理を実施するためには，罹患の危険度（リスク）を予測した上で適切な口腔衛生指導を行っていく必要がある。齲蝕疾患におけるリスク予測は，通常，問診と視診による口腔診査後に，いくつかの齲蝕活動性試験を行って現歯の持つ齲蝕活性を調べることによるなされ，近年，その有効性が再確認されつつある¹⁾。Snyder²⁾が示す所要条件のすべてを満たすような理想的診断法はまだ開発されていない。これまでに数多くの有用な齲蝕活動性試験法が開発され，患者の齲蝕リスク診断や口腔管理に利用されている³⁻⁶⁾。現在の臨床現場においては，通常，唾液中のミュータンスレンサ球菌数や乳酸桿菌数，唾液分泌量，唾液緩衝能，飲食回数，歯垢量，フッ化物の使用等の多くのリスク要因についてそれぞれ測定・調査し，それら

の結果を総合的に評価した上で個々人の齲蝕リスク診断がなされている。これら多数のリスク要因の中で，齲蝕発症との関連で特に重要視されているのは齲蝕原因菌ミュータンスレンサ球菌の唾液中レベルである。実際，選択培地使用の培養法により求められる唾液中ミュータンスレンサ球菌レベルは，齲蝕有病と極めて強い相関があることが数多くの疫学研究⁷⁻⁹⁾により明らかにされている。

最近，培養法に代わる免疫化学的手法による迅速測定法の開発研究が大きな進展をみせている。既に，抗 *S. mutans* モノクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィ利用の迅速測定キット（以下，サリバチェック SMTM）がジーシー社により開発され商品化された¹⁰⁾。また，抗 *S. mutans* ポリクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィキットが（株）トクヤマデンタルと本学部細菌学教室により共同開発され，現在臨床試験中である¹¹⁾。これら迅速キットの測定精度は，刺激唾液を検体とした場合，いずれも市販の簡易培養キット Dento-cult SMTM（Orion, Finland）³⁾のそれとほぼ同程度と報告されている。従って，イムノクロマトグラフィ技法を用いたこれらの測定技法は，測定精度の向上と低コスト化が実現できれば，迅速性と簡便性に優れている。即ち，これからのチェアサイドにおけるリスク診断法として極めて有望である。

¹⁾ 日本大学松戸歯学部衛生学教室
（主任：小林清吾教授）

²⁾ 日本大学松戸歯学部細菌学教室
（主任：福島和雄教授）

³⁾ 日本大学松戸歯学部小児歯科学教室
（主任：前田隆秀教授）

⁴⁾ 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所
千葉県松戸市栄町西 2-870-1
（2004 年 12 月 24 日受付）
（2005 年 1 月 18 日受理）

先に著者らは、迅速測定キットであるトクヤマデンタル社製キット（以下 TD キット）とサリバチェック SM™、簡易培養キット Dentocult SM™ の 3 体につき、学生由来のブラッシング歯垢 20 検体を用いて *S. mutans* 菌数レベルとの関連性を予備的に調査した。その結果、TD キットが培養法と最良の一致性及び相関性を示す事実を認めた^{12,13)}。そこで本研究は、歯垢試料を用いた TD キット測定系の有用性を確認することを主目的とした。

大学生および小学生計 104 名から採取した多数のブラッシング歯垢試料を検体として、TD キットによる *S. mutans* 菌数レベルとスパイラル培養法で厳密に算定した *S. mutans* 菌数との間の関連性につき詳細な検討を行った。

対象および方法

1. 対象者

日本大学松戸歯学部学生 84 名(男 45 名, 女 39 名, 20 歳~27 歳) および某小学校 6 年生 20 名(男子 12 名, 女子 8 名, 11~12 歳) を対象者とした。なお本研究は、日本大学松戸歯学部の倫理委員会の承認(承認番号 ECO 2-015 号) を得ており、対象者には事前に十分な説明を行って自由意志に基づく同意を得た上で実施した。

2. 歯垢の採取および保存法

Neta ら¹⁴⁾、福島¹⁵⁾の方法に準じて下記のようにブラッシング歯垢を採取し、保存した。昼食の 2 時間後(午後 3 時過ぎ)、水道水にて軽く一回含嗽させ、すべての歯面を歯ブラシで 1 分間ブラッシングし、剥離した歯垢の懸濁液(これをブラッシング歯垢という。)を 5 ml のリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)による 30 秒間の含嗽処理により紙コップに回収した。このブラッシング歯垢試料を、バイブレーター処理で十分に分散後、そのまま(無希釈)および 5% ジメチルスルホキシド(DMSO)と 10% スキムミルクを添加し 10 倍希釈したものを調整した。それぞれ迅速キット検定用および *S. mutans* の菌数算定用の試料として、分析時まで -80℃ 下で冷凍保存した。

3. *S. mutans* の菌数算定

1) 供試培地

ミュータンスレンサ球菌の検出・菌数算定用には、Mitis-Salivarius 寒天培地(Difco, Detroit)に 15% ショ糖, 0.2 Unit/ml のバシトラシンおよび 2 mg/ml のグラミシジン G を加えた Mitis-Salivarius-Bacitracin-Gramicidin (MSBG) 寒天培地¹⁶⁾を、一方 *S. sobrinus* の検出・菌数算定用には、MSBG 培地にアズトレオナム 0.2 mg/ml を加えた Mitis-Salivarius-Bacitracin-Gramicidin-Aztre-

onom (MSBGA) 寒天培地¹⁶⁾を使用した。試料希釈用には、Brain-Heart-Infusion (BHI) 液体培地(Difco, Detroit)を用いた。

2) 培養法

冷凍保存した試料を 36℃~38℃ の温浴中で迅速融解し、超音波処理(50 W, 20 秒)後、BHI 培地で 10 倍段階希釈した。希釈液の 50 μl をスパイラル装置(ゲンゼ産業, 大阪)を用いて MSBG 培地および MSBGA 培地に塗抹し、37℃ 下で 2~3 日間嫌気培養(ローソク培養)を行った。

3) 菌数算定法

MSBG 寒天培地上に増殖したラフ型およびセミラフ型のミュータンスレンサ球菌集落数および MSBGA 寒天培地上に増殖した *S. sobrinus* 集落数を実体顕微鏡下で数えた。そして、ミュータンスレンサ球菌数から *S. sobrinus* 菌数を差し引くことにより検体 1 ml 当りの *S. mutans* 菌数を算定した。

4) 供試キット

TD キットは(株)トクヤマデンタルより提供されたものを使用した。キットによる菌数レベル測定は、平田ら¹¹⁾の方法に準じて以下のように行った。冷凍保存したブラッシング歯垢試料を融解後、その 0.5 ml をシリンジで加圧しながら、シリンジフィルターにて濾過し、*S. mutans* 菌体を含む不溶性画分をフィルターに捕捉した。約 1 ml の処理液(1)にて濾過沈殿画分を洗浄した。約 1 ml の処理液(2)を濾過、フィルターに含浸した試薬にて室温下、2 分間処理することで *S. mutans* 抗原を抽出した。約 0.15 ml の処理液(3)を濾過することで、フィルター上の *S. mutans* 抗原を処理液(3)と共に回収した。この溶液の 0.1 ml をクロマトデバイスのサンプル窓に添加し、10 分間室温放置後のテストラインの発色度合を判定し、菌数レベルを 0, 1, 2, 3 の 4 段階で評価した。

5. 統計処理

TD キットと培養法による *S. mutans* 菌数レベルの相関分析には Spearman の順位相関係数を、TD キットにより段階別されたグループ間における *S. mutans* 菌数平均値の比較には Sheffe の多重比較を用いた。なお、培養法において検出限界以下であった試料については、すべて菌数を統計上の便宜から $\log_{10} \text{CFU/ml} = 2.00$ として処理した。また、スパイラル培養法による *S. mutans* 菌数のカットオフ値を $5 \times 10^5 \text{CFU/ml}$ 、キット測定値のカットオフ値を 0/1 間は 1/2 間とした時の、TD キットの感度、特異度、一致率および Kappa 値を算出した。

結 果

採取したブラッシング歯垢試料を MSBG および MSBGA 選択培地を用いて微生物分析した結果、本学部学生 84 名中 73 名から *S. mutans* が検出され、そのうちの 7 名から *S. mutans* と *S. sobrinus* の両方が検出された。小学生では、20 名全員から *S. mutans* が検出され、そのうちの 5 名から *S. mutans* と *S. sobrinus* の両方が検出された。

図 1 は、学生由来のブラッシング歯垢 84 検体を用いて行ったスパイラル培養法による *S. mutans* 菌数と TD キット測定レベルとの相関を調べた結果である。両者間の Spearman の順位相関係数は 0.86 ($p < 0.001$) であり、強い正の相関があることが確認された。TD キットのレベル群別における人数の割合は、レベル 0, 1, 2, 3 群それぞれ 39 人, 15 人, 15 人, 15 人であった。TD キットのレベル群別におけるスパイラル培養法での *S. mutans* 菌数の平均値 (\pm SD) はレベル 0, 1, 2, 3 群それぞれ、 $3.92 (\pm 1.39)$ LogCFU/ml, $5.57 (\pm 0.53)$ LogCFU

/ml, $6.24 (\pm 0.49)$ LogCFU/ml, $6.79 (\pm 0.44)$ LogCFU/ml であった。レベル 0 群と 3 群 ($p < 0.001$)、レベル 0 群と 2 群 ($p < 0.001$)、レベル 0 群と 1 群 ($p < 0.001$)、レベル 1 群と 3 群 ($p < 0.05$) それぞれに有意な差が認められた (図 2)。

図 3 は小学生由来のブラッシング歯垢 20 検体を用い

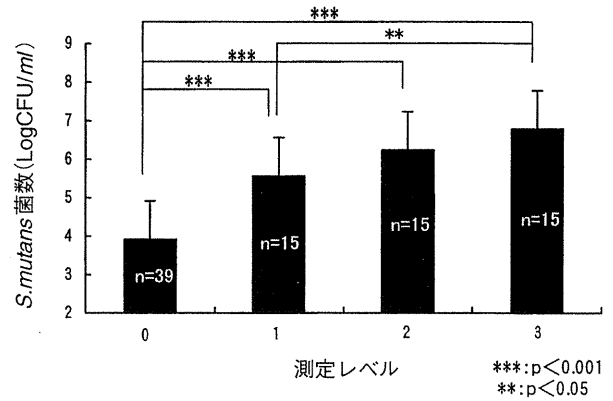


図 2 学生由来ブラッシング歯垢中の TD キット測定レベル別における *S. mutans* 菌数の比較 (n=84)

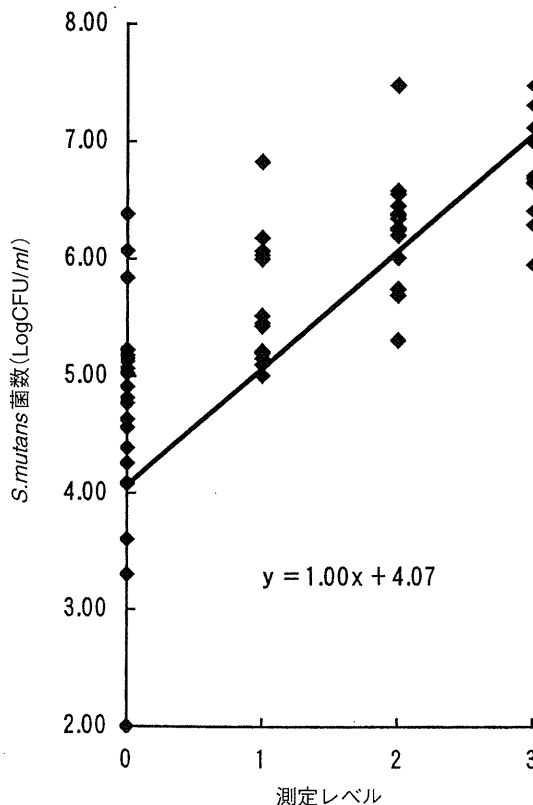


図 1 学生由来ブラッシング歯垢中の *S. mutans* 菌数と TD キット測定レベルとの相関 (n=84)

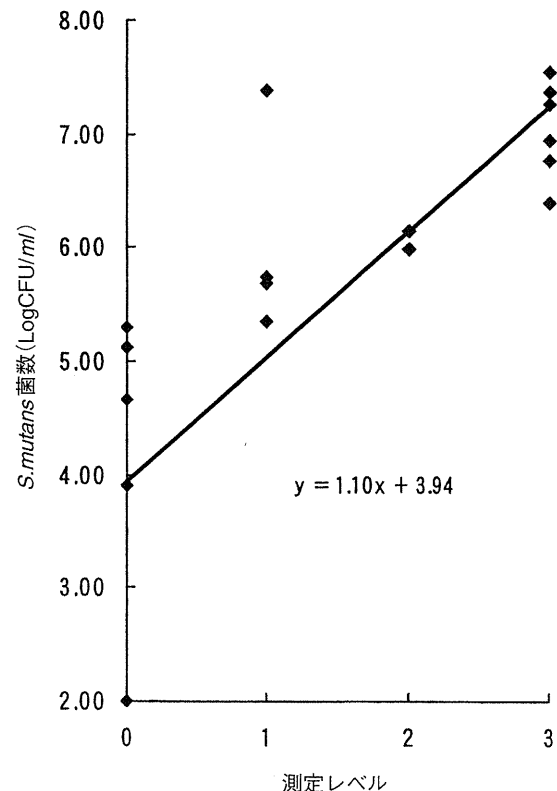


図 3 児童由来ブラッシング歯垢中の *S. mutans* 菌数と TD キット測定レベルとの相関 (n=20)

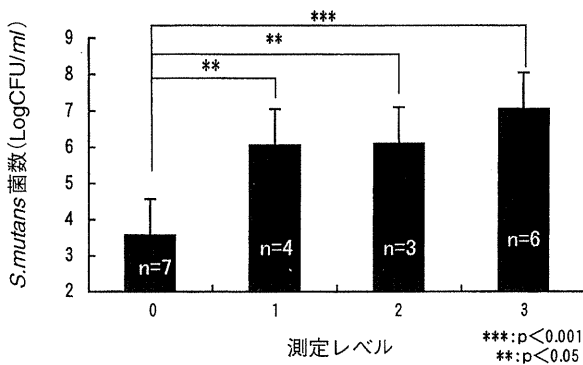


図4 児童由来ブラッシング歯垢中の TD キット測定レベル別における *S. mutans* 菌数の比較 (n=20)

て行ったスパイラル培養法による *S. mutans* 菌数と TD キット測定レベルとの相関を調べた結果である。図1の結果と同様、両者間に強い正の相関 (0.89, $p < 0.001$) が認められた。人数の割合は、レベル0, 1, 2, 3群それぞれ7人, 4人, 3人, 6人であった。*S. mutans* 菌数の平均値 (±SD) はそれぞれ 3.57 (±1.53) LogCFU/ml, 6.04 (±0.90) LogCFU/ml, 6.09 (±0.10) LogCFU/ml, 7.04 (±0.43) LogCFU/ml であった。レベル0群と3群 ($p < 0.001$), レベル0群と2群 ($p < 0.05$), レベル0群と1群 ($p < 0.05$) にそれぞれ有意な差が認められた (図4)。

本学部学生と小学生を合わせた対象者 104 名全員分の分析結果において、スパイラル培養法による *S. mutans* 菌数が 5×10^5 CFU/ml 以上のものが 55 検体の中で TD キットの判定レベルが1以上のものが 54 検体あり、2以上のものが 39 検体あった。また、 5×10^5 CFU/ml 未満の 49 検体の中で TD キットの判定レベルが0未満のものが 45 検体、1以下のものが 49 検体あった。これらより TD キットの 0/1 基準における感度は 0.98, 特異度は 0.92, 一致率は 95%, Kappa 値は 0.9 であった。また 1/2 基準における感度は 0.71, 特異度は 1.0, 一致率は 85%, Kappa 値は 0.73 と算定された。

考 察

現在、チェアサイドで使用可能なミュータンスレンサ球菌の存否および多寡を評価するための簡易培養キットがいくつか市販されている。代表的なものに Dentocult SM^{TM3}, MUCOUNT^{TM4} (昭和薬品化工, 東京), CRT^{TM5} (VIVADENT, England) さらには、バトラーカリオチェック^{TM6} (サンスター, 大阪) 等がある。なかでも Dentocult SMTM は、国の内外の臨床現場においてリスク診断の要として多用されている。しかし、いずれの簡易

キットも、バシトラシンと高濃度ショ糖を含む選択培地に口腔試料を塗抹・培養後、選択的に増殖したミュータンスレンサ球菌の集落数を調べることを基本としているため、判定までに少なくとも 48 時間を必要とする。しかも、バシトラシン耐性を獲得した他のレンサ球菌種が⁸, 近年になりとみに増加してきた。またヒト口腔に棲息する 2 種のミュータンスレンサ球菌種 (*S. mutans* と *S. sobrinus*) を識別できないこともあって、測定精度の低さが問題視されている¹⁵⁾。

このような観点から、最近、培養法のみならず、免疫化学的、分子遺伝学的なアプローチによる口腔試料中のミュータンスレンサ球菌種の検出・定量法に関する開発研究が日本を中心に大きな進展をみせている。培養法に関しては、グラミシジンを添加して選択性を高めたミュータンスレンサ球菌用の改良 MSB 培地が井田ら¹⁷⁾により、*S. mutans* の増殖を阻害するアズトレオナムを添加した *S. sobrinus* 用選択培地 MUT-SOB が⁸ Hirasawa ら¹⁸⁾により開発された。また、それらの培地を更に改良した *S. mutans* と *S. sobrinus* が選択的に増殖する MSBG 培地と *S. sobrinus* のみが増殖する MSBGA 培地が門澤ら¹⁶⁾により開発され、現在、それらの簡便キット化の検討が進められている。免疫化学的手法を駆使したものとしては、*S. mutans* の主要病原因子である Glucosyltransferase (GTF)-B に対するモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体を用いたサンドイッチ ELISA 測定システムが Shinozaki ら¹⁹⁾により、*S. mutans* 菌体に対するモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を用いたイムノクロマトグラフィー技法による *S. mutans* 迅速測定キットが岡田ら²⁰⁾, 平田ら¹¹⁾により開発された。また、PCR 法を駆使したものとしては、Oho ら²¹⁾, Yano ら²²⁾が GTF-B と GTF-I の遺伝子断片を、Igarashi ら²³⁾が Dextranase の遺伝子断片をプライマーに用いた *S. mutans* と *S. sobrinus* の検出システムを確立している。

これらの中で、簡便かつ迅速に唾液や歯垢試料中の *S. mutans* 菌数レベルを評価できるイムノクロマトグラフィーキットが、これからのチェアサイドにおける齲蝕リスク測定手段として最も期待が寄せられている。既に商品化されているジーシー社のイムノクロマトキット「サリバチェック SM」や現在臨床試験中であるトクヤマデンタル社の「TD キット」は、それぞれ 30 分間と 15 分間程度の短時間内に刺激唾液中の *S. mutans* 菌数の高低を前者は 3 段階、後者は 4 段階に評価することが出来る。培養法で求めた *S. mutans* 菌数との Spearman の順位相関係数は 0.48 ($p < 0.01$) と 0.52 であり、いずれも齲蝕のリスク診断に現在多用されている簡易培養キット

Dentocult SM™ と同等程度の測定精度を示すと報告されている^{11, 20)}。

齲蝕の疫学研究や臨床の場合において、ミュータンスレンサ球菌種の存在や多寡を評価するための口腔試料としては、通常、定量的取り扱いが可能という理由でパラフィン刺激唾液が用いられている。しかし最近、Netaら¹⁴⁾、福島¹⁵⁾は、全歯面を1分間ブラッシング後に回収した歯垢混濁液（ブラッシング歯垢）が刺激唾液と同様に定量的に取り扱い可能であり、同一個人からの刺激唾液とブラッシング歯垢における総レンサ球菌に占めるミュータンスレンサ球菌の割合（MS比）は同等ではなく、口腔ごとに大差があることを示した。これらの知見は、齲蝕原因菌である *S. mutans* や *S. sobrinus* の口腔内における存在様態は個人によって異なり、齲蝕リスク診断に使用する検体として刺激唾液は不適であることを強く示唆している¹⁵⁾。

先に著者らは、20名の学生から採取したブラッシング歯垢試料を検体として、TDキット、サリバチェック SM™、Dentocult SM™ の3者につき培養法との相関性を検討し、TDキットが最良の相関性を示すことを認めた^{12, 13)}。この実験においては、ブラッシング歯垢中 *S. mutans* 菌数を改良型 MSB 培地上の集落形態を指標に実体顕微鏡下で算定した。TDキットと Dentocult SM™ の測定レベルと比較した結果、Spearman の順位相関係数はそれぞれ 0.76 ($p < 0.001$) と 0.67 ($p < 0.01$) であった。これらの結果から、抗原抽出の違いから、サリバチェック SM™ の検体は、混合唾液、TDキットの検体は、混合唾液よりブラッシング歯垢が適していることが示唆された¹³⁾。

そこで本研究は、ブラッシング歯垢を検体とする TD キット測定系の有用性を確認することを主目的とした。大学生および小学生から採取した多数のブラッシング歯垢試料を検体としてより厳密な相関性解析を試みた。本研究では、上記の MSBG 培地と MSBGA 培地を使用し、本学部学生 84 名と小学生 20 名から採取したブラッシング歯垢中の総ミュータンスレンサ球菌数と *S. sobrinus* 菌数を算定した。前者から後者を差し引くことにより検体 1 ml 当りの *S. mutans* 菌数を算出した。菌数算定においては、定量性の良好なスパイラル装置による塗抹および実体顕微鏡下での集落数算定を行って、厳密さを期した。このようにして培養法により算出した *S. mutans* 菌数とトクヤマデンタル社製 TD キットにより 4 段階評価した *S. mutans* 菌数レベルとの間の Spearman の順位相関係数は、大学生 (84 名)、小学生 (20 名) および全対象者 (104 名) 由来の検体群においてそれぞれ

0.86 ($p < 0.001$)、0.89 ($p < 0.001$) および 0.87 ($p < 0.001$) であり、いずれも高い正の相関があることを示した (図 1, 3)。これらの結果から、現在のブラッシング歯垢の採取法が有用であることが示唆された。なお、MSBG 培地と MSBGA 培地にはスムーズ型集落を示す非ミュータンスレンサ球菌 (Non-MS 菌) はほとんど形成されず、両培地が良好な選択性を有することが確認された。また今回、供試したブラッシング歯垢 104 検体中 93 検体から *S. mutans* が、12 検体から *S. sobrinus* が検出され、両菌種の分布状況はこれまでの報告²⁴⁾ とほぼ一致していた。現在、含嗽処理が困難な乳幼児、老人のブラッシング歯垢採取法において臨床試験中である。

ブラッシング歯垢を用いる TD キット測定系は、迅速、簡便であり、簡易培養キットやサリバチェック SM より診断精度が高いことから、臨床現場での齲蝕リスク診断に有効に利用できると考えられた。なお、*S. mutans* と共に齲蝕原性細菌として重要なミュータンスレンサ球菌種である *S. sobrinus* の迅速測定キットの開発と実用化が望まれる。

本研究の一部は、ベンチャー研究開発拠点整備事業、平成 13 年度選定学術フロンティアにより実施された。

文 献

- 1) 熊谷 崇, 熊谷ふじ子, 藤木省三, 岡 賢二, Bratthall, D.: クリニカルカリオロジー, 医歯薬出版, 東京, 1996, pp. 24-39.
- 2) Snyder, L, Marshall.: Laboratory methods in the clinical evaluation of caries activity, J. Am. Dent. Assoc., 42: 400-413, 1951.
- 3) Jensen, B. and Bratthall, D.: A new method for the estimation of mutans streptococci in human saliva, J. Dent. Res., 68: 468-471, 1989.
- 4) Matsukubo, T., ohta, K., Maki, Y., Takeuchi, M. and Takazoe, I.: Asemi-quantitative determination of Streptococcus mutans using its adherent ability in a selective medium, Caries Res., 15: 40-45, 1981.
- 5) Kneist, S., Heinrich-Weltzien, R. Laurisch, L.: 新しいカリエスリスクの評価, デンタルハイジーン, 20: 189-193, 2000.
- 6) 武田健志: 齲蝕リスク判定キット「バトラーカリオチェック」の臨床評価, 口腔衛生会誌 54: 445, 2004 (抄).
- 7) Babbahmady, K, G., Challacombe, S, J. and Marsh, P, D., Newman, H, N.: Ecological Study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at Sub-sites from Approximal Dental Plaque from Children, Caries Res., 32: 51-58, 1998.
- 8) Köhler, B., Bjarnason, S.: Mutans streptococci, lactobacilli and caries prevalence in 11-and 12-year-old Icelandic chil-

- dren, Com. Dent. Oral Epinediol., 15 : 332-335, 1987.
- 9) Hirose, H., Hirose, K., Isogai, E., Miura, H., Ueda, I. : Close Association between *Streptococcus sobrinus* in the Saliva of Young Children and Smooth-Surface Caries Increment, Caries Res., 27 : 292-297, 1993.
 - 10) 松本優子, 小林諭美子, 山内幸司, 岡田淳一, 松久保隆 : モノクロナール抗体を応用した *S. mutans* の迅速簡易キットにおける検出力の評価, 口腔衛生会誌, 51 : 604-605, 2001 (抄).
 - 11) 平田広一郎, 宇梶文緒, 羽生尚広, 竹内武男, 福島和雄 : イムノクロマトグラフィー法を利用した *S. mutans* 測定キットの開発, 口腔衛生会誌, 53 : 444, 2003 (抄).
 - 12) 水野恭子, 後藤田宏也, 有川量崇, 田口千恵子, 小林清吾, 福島和雄 : イムノクロマトグラフィー法による *S. mutans* 迅速測定キットの有用性試験, 口腔衛生会誌, 53 : 353, 2003 (抄).
 - 13) 後藤田宏也, 水野恭子, 田口千恵子, 福島和雄, 小林清吾 : 簡便迅速測定キットによるブラッシング歯垢中 *Streptococcus mutans* の評価. 日歯医療管理誌, 39 : 240-242, 2004.
 - 14) Neta, T., Inokuchi, R., Shinozaki, N., Kouno, Y., Ikemi, T. and Fukushima, K. : investigation of microbiological methods to estimating individual caries risk : evaluation of sampling methods and materials. Int. J. Oral-Med. Sci., 1 : 33-36, 2002.
 - 15) 福島和雄 : ミュータンスレンサ球菌の分離同定法, 今井奨, 西沢俊樹, 福島和雄, 武笠英彦編, ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学—臨床家のためのマニュアル—クインテッセンス出版, 東京, 2003, pp. 62-81.
 - 16) 門澤久美子, 斎藤美芽子, 竹内武男, 福島和雄 : コロニー観察無しで *S. mutans* と *S. sobrinus* の菌数レベル判定が可能な培養システム. 歯基礎誌, 45 : 247, 2003 (抄).
 - 17) 井田博久 : ミュータンスレンサ球菌選択培地の改良と新検査システムの確立, 今井奨, 西沢俊樹, 福島和雄, 武笠英彦編, ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学—臨床家のためのマニュアル—クインテッセンス出版, 東京, 2003, pp. 82-97.
 - 18) Hirasawa, M. and Takada, K. : Susceptibility of *Streptococcus sobrinus* to Cell Wall Inhibitors and Development of a Novel Selective Medium for *S. sobrinus*, Caries Res., 36 : 155-160, 2002.
 - 19) Shinozaki, N., Takeuti, T., Yoshio, M., Fukushima, K., Kobori, K. and Ushizawa, K. : Development and Application of sandwich-ELISA for Direct Determination of *S. mutans* GTF-B in Human Plaque Samples, J Dent Res., 81 : A-116, 2002.
 - 20) 岡田淳一, 松久保隆, 杉原直樹, 小林義昌, 山内幸司, 花田信弘 : モノクロナール抗体を応用した *S. mutans* の迅速検出キットの評価, 口腔衛生会誌, 53 : 445, 2003 (抄).
 - 21) Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, M., Kushiyama, M. and Koba, T. : Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva polymerase chain reaction, Oral Microbiol Immunol. 15 : 258-262, 2000.
 - 22) Yano, A., Kaneko, N., Ida, H., Yamaguti, T. and Hanada, N. : Real-time PCR for quantification of *Streptococcus mutans*, FEMS Microbiol. Lett., 17 : 23-30, 2002.
 - 23) Igarashi, T., Yamamoto, A. and Goto, N. : Characterization of the dextrose purified from *Streptococcus mutans* Ingbritt. Microbiol. Immunol., 36 : 969-976, 1992.
 - 24) 福島和雄 : 第1部6章 齲蝕細菌の病原因子, 今井奨, 西沢俊樹, 花田信弘, 福島和雄編, 齲蝕細菌の分子生物学—研究の成果と展望, クインテッセンス株式会社, 東京, 1997, pp. 46-76.

Evaluation of a Rapid-Immunoassay Kit for *S. mutans* Using Brushing-Plaque Samples from University Students and School Children

Kyouko Mizuno^{1,2}, Hiroya Gotouda^{1,4}, Chieko Taguchi¹, Seigo Kobayasi^{1,4}
Tomomi Hashizume², Takahide Maeda^{3,4} and Kazuo Fukushima^{2,4}

¹*Department of Dental Public Health, Nihon University School of Dentistry at matsudo
(Director : Prof. Seigo Kobayasi)*

²*Department of microbiology, Nihon University School of Dentistry at matsudo*

³*Department of pediatric, Nihon University School of Dentistry at matsudo*

⁴*Research institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at matsudo*

The usefulness of a rapid-immunoassay kit for *S. mutans* (Tokuyama Dental company-made kit, the TD kit), which was constructed by using an anti-*S. mutans* polyclonal antibody, was examined using brushing-plaque samples from university students and school children.

The evaluation levels by the TD kit using the plaque samples from 84 university students and 20 school children correlated significantly with *S. mutans* counts determined by the spiral cultivation method. The spearman's correlation coefficient of the two plaque samples were 0.86 ($p < 0.001$) and 0.89 ($p < 0.001$), respectively. In addition, sensitivity, specificity, agreement and kappa value of the TD kit were 0.98, 0.95, 92%, and 0.90, respectively. Based on these results, it was confirmed that the brushing-plaque the TD kit system is superior to the stimulated-saliva the TD kit system, and suggested that this measuring system would be a useful tool for diagnosing the risk of caries.

Key words : Brushing-plaque, *S. mutans* school children, Rapid-immunoassay kit, Diagnosing the risk of Caries

《原 著》

齲蝕活動性試験法に関する研究

—高齲蝕群と無齲蝕群における唾液流量, 唾液緩衝能および齲蝕細菌数—

ごとうだ ひろ や
後藤田 宏 也^{*,**}

*日本大学松戸歯学部 衛生学講座

**日本大学松戸歯学部 口腔科学研究所

(指導: 小林 清吾教授)

キーワード: 改良フッ化物イオン希釈法, 唾液流量, 積分法, 唾液緩衝能, 齲蝕細菌数

要旨: 齲蝕の発生には, 酸産生菌と糖による歯の攻撃因子と, 唾液流量, 唾液緩衝能およびフッ化物利用等による防御因子とのバランスが深く関与している。それぞれの因子を調べる検査を組み合わせ, 包括的なリスク因子の情報収集によって, より確かな齲蝕リスク判定を行うことが望まれる。

本研究では, 改良したフッ化物イオン希釈法により無味刺激唾液流量と酸味刺激唾液流量および緩衝能を測定した。フッ化物イオン希釈法の改良法として, 多人数を対象にでき, 酸味刺激による唾液流量測定を簡便に行えるように, 5 ml のフッ化物溶液の洗口を試み, 採取時間を標準的時間である1分間に設定して測定を行った。一方, 唾液緩衝能の測定においても, 改良したフッ化物イオン希釈法による吐き出し液を利用することを前提に, 唾液と洗口液を混和した試料をもとに滴定曲線を求めた。この滴定曲線の分析にあたっては, 従来の方法と改良した積分法および曲線下面積法を考案しその妥当性を検討した。また最近, 定量性のある歯垢採取法について検討が行われ, 1分間のブラッシング処理を含む方法で採取した歯垢懸濁液(以下, ブラッシング歯垢)がその目的に合うことが示された。それにより細菌学的検査はブラッシング歯垢の *S. sobrinus* と *S. mutans* を定量する改良分離培養法によって分析と評価を行った。また, 改良フッ化物イオン希釈法による唾液流量と従来法, 曲線下面積法, 積分法による唾液緩衝能, および齲蝕原因菌レベルの種々の検査方法を用いて高齲蝕群と無齲蝕群とで齲蝕活動性を比較した結果, 以下のような結論を得た。

1. 改良フッ化物イオン希釈法は, 多人数の唾液採取ができ, 酸味刺激による唾液流量測定の簡便化が可能となった。また唾液流量は男女ともに無味刺激と酸味刺激のもとで相関関係が認められ, 酸味刺激において女性に比べて男性の唾液流量が有意に多かった。

2. 唾液緩衝能の評価法においては, Buffer pH 法, 曲線下面積法および積分法のいずれにおいても, 無齲蝕群の値は高齲蝕群の値よりも有意に高く, またそれぞれの方法による唾液緩衝能値の間に高い相関が認められた。疫学研究においては簡易な Buffer pH 法が有用であると考えられ, 個人の詳細な唾液緩衝能測定を行う場合には, 考案した曲線下面積法または積分法が有効であることが示唆された。

3. 高齲蝕群のブラッシング歯垢中総 *S. mutans* 菌数, 総 *S. sobrinus* 菌数, および総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合は無齲蝕群のそれらよりいずれも高く, 両群間に有意差が認められた。

本研究の結果, 集団を対象とした公衆衛生の場および疫学研究において, 唾液流量測定のための改良フッ化物イオン希釈法と唾液緩衝能測定法およびブラッシング歯垢を用いて齲蝕細菌数を評価することは, 齲蝕活動性試験として有用性があるものと考えられた。

Study on Methods to Assess Caries Activity — Volume of Saliva, Salivary Buffer Capacity, and Cariogenic Bacteria Level in Caries-susceptible Group and Caries-free Group —

Hiroya Gotouda*,**

*Department of Public Health

**Research Institute of Oral Science

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

(Director : Prof. Seigo Kobayashi)

Key words : the modified fluoride dilution method, volume of saliva, the integration method, salivary buffer capacity, cariogenic bacteria level

Abstract : The volume of saliva was determined after taste stimulation in 123 subjects using the Modified Fluoride Dilution Method. In this method, a mouth washing with 5 ml of a 100 ppmF⁻ solution for one minute was applied. To evaluate salivary buffer capacity, the Buffer pH Method and the Integration Method analyzing the titration curve were tried. The level of *S. sobrinus* and *S. mutans* were determined in the brushing plaque. The values of these caries activity tests were compared between caries-susceptible group and caries-free group.

Results suggest that the Modified Fluoride Dilution Method is useful for an epidemiological study in a large number of subjects. This method is also practical in the case of taste stimulation. The volume of saliva after sour stimulation was higher in men than in women. A significant correlation was noted between the volume of saliva after tasteless stimulation and that after sour stimulation. In clinical use for the individual, the Integration Method appeared to be more accurate than the Buffer pH Method. The percentage of the number of *S. mutans* relating to the number of total *Streptococcal* species, the total *S. sobrinus* level, the total *S. mutans* level in brushing plaque, and the salivary buffer capacity were revealed to be closely associated with caries experience.

Nihon Univ. J. Oral Sci. **29** : 194~206, 2003

緒 言

近年、健康に対する意識が高まり、歯科医療は治療中心の体系から予防管理・教育重視の方向へ大きく変化しつつある。予防的見地に立った口腔管理を実施するには、ライフステージにあわせて口腔疾患に罹患するリスクを予測した上で、適切な患者教育および口腔保健指導を行う必要がある。そのためには口腔内についての多様な個人情報収集し、リスク因子を把握し、それらリスクを

コントロールすることが重要となる。齲蝕の場合リスク因子を評価するためには、口腔内診査を行う他に、齲蝕活動性試験による検査があり、その結果に基づいた保健指導や予防管理システム構築の重要性が再認識されてきている^{1,2)}。

齲蝕の発生には、酸産生菌と糖による歯の攻撃因子と、唾液流量、唾液緩衝能およびフッ化物利用等による防御因子とのバランスが深く関与している。それぞれの因子を調べる検査を組み合わせ、包括的なリスク因子の情報

収集によって、より確かな齲蝕リスク判定を行うことが望まれる³⁾。

現在臨床応用されている齲蝕活動性試験の多くは、歯の攻撃因子を測定するもので、主として細菌学的手法^{2,4-6)}を用いた検査方法である。一方、防御因子を調べる検査法には、歯質に関するものとしてエナメル質溶解試験^{6,7)}、唾液に関するものとして唾液流量^{5,6,8)}や唾液の性状(緩衝能、粘性、pH)^{5,6,8,9)}を測定するものなどがあり、これらの中でも、唾液流量と緩衝能検査が多く行われている。

安静時と刺激時の全唾液流量を測定する方法がある⁸⁾。安静時の全唾液流量を測定する方法には、排液法、吐出法、吸引法および綿球法があり、刺激時の全唾液流量を測定する方法には、咀嚼法と味覚法がある。そのうち味覚法で断続的に酸で舌に刺激を与える方法が一般的であるが、この酸味刺激の測定は、採取方法が複雑になりやすく、被験者に負担が多いなどの欠点がある。Weatherellら¹⁰⁾は少人数を対象として1mlのフッ化物溶液をピペットで舌下に滴下して15秒間拡散させ、フッ化物イオンの希釈率から唾液流量を測定する方法を開発した。このフッ化物イオン希釈法は、吐出法や咀嚼法では測定困難な口腔内残留唾液量や少量の唾液流量の定量、採取時間の短縮、および歯の欠損の多少にかかわらず測定できる等の有用性がある。しかし、この方法では少量のフッ化物溶液をピペットにて使用するため同時に多人数の唾液採取に難がある。また無味刺激時による測定が試みられたが、酸味刺激唾液流量の測定は行われていない。一方、唾液緩衝能の測定方法には、唾液の中に酸を滴下し、唾液の初期pH値から目的とするpH値に至るまでに要する酸量を評価したり、唾液に一定量の酸を添加してその時のpHを測定するのが通法となっている^{5,6,8,11)}。しかし、この方法では酸滴定曲線の勾配の相違による唾液緩衝能の差異を分析するうえで、断片的な評価となっていることに問題点があると考えられる。また齲蝕原因菌の検出を行う市販の簡易検査キットは唾液を検体としている^{1,2,5,6)}。しかし、齲蝕原因菌の主な棲息部位は歯面上の歯垢であり、齲蝕活動性を本菌数から捉えるためには、歯垢中の菌数を計測する必要がある²⁾と考えられる。

本研究では、改良したフッ化物イオン希釈法により無味刺激唾液流量と酸味刺激唾液流量および緩衝能を測定した。フッ化物イオン希釈法の改良法として、多人数を対象にでき、酸味刺激による唾液流量測定を簡便に行え

るように、5mlのフッ化物溶液の洗口を応用し、採取時間を標準的時間である1分間に設定して測定を行った。一方、唾液緩衝能の測定においても、改良したフッ化物イオン希釈法による吐き出し液を利用することを前提に、唾液と洗口液を混和した試料をもとに滴定曲線を求めた。この滴定曲線の分析にあたっては、従来の方法と改良した曲線下面積法および積分法を考案しその妥当性を検討した。また最近、定量性のある歯垢採取法について検討が行われ、1分間のブラッシング処理を含む方法で採取した歯垢懸濁液(以下、ブラッシング歯垢)がその目的に適うことが示された²⁾。そこで細菌学的検査はブラッシング歯垢の*S. sobrinus*と*S. mutans*を定量する改良分離培養法²⁾によって分析と評価を行った。

多人数を対象とした公衆衛生の場および疫学研究での活用を目的として、改良したフッ化物イオン希釈法による唾液流量と、従来のBuffer pH法、改良した曲線下面積法と積分法による唾液緩衝能、およびブラッシング歯垢の齲蝕原因菌レベルと齲蝕活動性との関連性を検討した結果、興味ある知見が得られたので報告する。

対象および方法

I. 唾液流量および唾液緩衝能の測定方法の検討

1. フッ化物イオン希釈法による唾液流量の測定

1) 測定対象者と唾液の採取時間

洗口溶液検討のため、成人5名(平均年齢38歳、男性3名、女性2名)を対象として12:00、14:00、16:00に唾液の採取を行った。また多人数の唾液流量測定のため、本学部3年次123名(平均年齢21.7歳、男性69名、女性54名)を対象として14:00~16:00に唾液の採取を行った。

本研究は、日本大学松戸歯学部倫理委員会の審査を経て承認を得た(EC02-029号)。被験者に対して事前に十分な説明を行った上で、被験者から自由意思に基づく同意を得た。

2) 唾液流量測定用フッ化物溶液

無味刺激用溶液として、Weatherellら¹⁰⁾の方法に従い、NaF(和光純薬)により100ppmフッ化物イオン濃度に調整した溶液を用い、また酸味刺激用溶液として、その100ppmF溶液に酒石酸(和光純薬)を加え調整したものを用いた。酒石酸濃度は、成人5名を対象として2mM、10mM、20mM、本学部3年次123名を対象として10mMを用いた。

3) 唾液の回収法

蒸留水にて洗口し十分に吐き出し後、無味刺激用溶液 5.0 ml で舌下付近にて静かに 1 分間洗口し、吐き出し液を紙コップに採取した。酸味刺激に関しても同様に行った。以下、本方法による唾液流量測定法を改良フッ化物イオン希釈法とする。

4) フッ化物イオン濃度の測定法

回収した唾液試料 2.0 ml に 0.2 ml の TISAB III 溶液 (オリオン社) を加え、イオンアナライザー 290A (オリオン社) に接続させたフッ素複合電極 (オリオン社) にてフッ化物イオン濃度を測定した。フッ素複合電極のキャリブレーションには、1 ppmF⁻、10 ppmF⁻ および 100 ppmF⁻ のフッ化物イオン標準液 (オリオン社) を使用した。

5) 唾液流量の算出法

Weatherell ら¹⁰⁾の方法にて行った。以下にその要約を示す。準備液のフッ化物イオン濃度を F ppm, その量を V ml とする。吐き出し液のフッ化物イオン濃度を f ppm, 1 分間の唾液流量 (洗口直前の口腔内残量唾液量を含む) を X ml とすると、吐き出し量は (V+X) で、

$$F \times V = f \times (V + X) \text{ となる。}$$

よって求める唾液流量の X ml は、

$$X = \{(F \times V) / f\} - V \text{ と計算される。}$$

2. 曲線下面積法と積分法および従来法による唾液緩衝能の測定

1) 測定対象者と唾液の採取時間

本学部 3 年次男性 5 名 (平均年齢 21.2 歳) を対象に 14:00~16:00 に行った。

2) 曲線下面積法と積分法による唾液緩衝能の測定

吐出法⁸⁾により安静時唾液を採取し、サンプルカップにて半嫌気的狀態で 30 分以内に測定した。100 ppm フッ化物イオン濃度の NaF 溶液 5.0 ml (pH 7.0 に調整) と唾液 1.0 ml を混和後、0.01 N 塩酸 (和光純薬) をマイクロピペットで 0.1 ml ずつ加え、pH 電極 (HANNA 社) を用いて pH を測定し、1.0 ml まで添加し、滴定曲線を作成した。NaF 溶液 6.0 ml をコントロールとして、同様の方法で 0.01 N 塩酸を添加し、滴定曲線を作成した。

(1) 曲線下面積法による緩衝能

希釈した唾液の滴定曲線の曲線下面積を算出し、緩衝能を評価した。また初期緩衝能 (0.01 N 塩酸 0~0.5 ml 滴定时) と後期緩衝能 (0.01 N 塩酸 0.5~1.0 ml 滴定时) を

算出した。

(2) 積分法による緩衝能

希釈した唾液の滴定曲線とコントロール溶液の滴定曲線とを積分して得られた面積の差を算出し、緩衝能を評価した。また初期緩衝能 (0.01 N 塩酸 0~0.5 ml 滴定时) と後期緩衝能 (0.01 N 塩酸 0.5~1.0 ml 滴定时) を算出した。

3) 従来法の Buffer pH 法による緩衝能⁸⁾

吐出法により安静時唾液を採取し、サンプルカップにて半嫌気的狀態で 30 分以内に測定した。100 ppm フッ化物イオン濃度の NaF 溶液 5.0 ml (pH 7.0 に調整) と唾液 1.0 ml を混和後、0.01 N 塩酸の 0.5 ml と 1.0 ml 滴定时の pH 値をもって緩衝能を評価した。

II. 高齲蝕群と無齲蝕群における齲蝕活動性試験の比較検討

1. 口腔内診査と群の選別

本学部 3 年次の男性 71 名 (平均年齢 22.0 歳) を対象に、十分な照明下でミラーと探針を用い、日本学校歯科医会の基準¹²⁾に基づき口腔内診査を行った。未処置歯、喪失歯及び処置歯の有無を歯単位で記録し、個人単位の DMFT を求めた。DMFT の分布から DMF 歯数が 0 の 11 名を無齲蝕群、DMF 歯数が 13 以上の 12 名を高齲蝕群として被験者に選定した。

2. 改良フッ化物イオン希釈法による唾液流量の測定

高齲蝕群と無齲蝕群を対象に、無味刺激用溶液と酸味刺激用溶液を用い、改良フッ化物イオン希釈法により唾液流量を測定した。

3. 積分法及び曲線下面積法と従来法の Buffer pH 法による唾液緩衝能の測定

高齲蝕群と無齲蝕群を対象に、100 ppm フッ化物イオン濃度 NaF 溶液 5.0 ml (pH 7.0 に調整) と安静時唾液 1.0 ml を混和後、0.01 N 塩酸を 0.1 ml ずつ 1.0 ml まで添加し、得られた曲線をもとに積分法及び曲線下面積法による唾液緩衝能を測定した。また、0.01 N 塩酸 1.0 ml 滴定时の pH 値をもって Buffer pH 法の緩衝能とした。

4. 市販の簡易検査キットによる齲蝕活動性試験

1) 供試簡易検査キット

唾液中の mutans streptococci コロニー数を評価する

Dentocult-SM[®] Strip mutans (Orion Diagnostica, 以下同様に D-SM) と, パラフィンワックス咀嚼による刺激唾液の緩衝能を測定する Dentobuff[®] Strip (Orion Diagnostica, 以下同様に D-Buffer) を用いた。

2) 判定方法

それぞれの説明書に記載された方法に従って測定し, 基準により齶蝕活動性を以下のように実施して判定した。パラフィンワックスを噛みながら, 5 分間唾液を採取した。D-SM のテストストリップを通常どおり舌の上で 10 回転し検体を採取し, 同一判定者がモデルチャートにより 48 時間培養後に判定した (class 0=10⁵/ml 以下でわずかに付着, class 1=10⁵/ml 以下, class 2=10⁵/ml~10⁶/ml, class 3=10⁶/ml 以上)。また採取した唾液をピペットで採取し, D-Buffer の緩衝能測定用テストパットに滴下し, 5 分間作用させ, 結果判定表と比較して判定した (class 0=高緩衝能, class 1=中緩衝能, class 2=低緩衝能)。

5. 改良分離培養法²⁾による細菌検査

1) ブラッシング歯垢の採取と保存

1 分間のブラッシング後に生理食塩水 (PBS) 5.0 ml にて含漱した歯垢懸濁液を採取し, 供試歯垢サンプルとした。回収したブラッシング歯垢は, 5% DMSO-10% スキムミルク存在下で 1 時間放置後, -80 °C 下で分析時まで冷凍保存した。

本研究に関し, 日本大学松戸歯学部倫理委員会の審査を経て承認を得た (承認番号 EC02-015 号)。被験者に対して事前に十分な説明を行った上で, 被験者から自由意思に基づく同意を得た。

2) 供試培地及び培養法

総レンサ球菌数算定用に MS 培地²⁾, *S. mutans* と *S. sobrinus* の菌数算定用に MSB 培地²⁾を使用した。冷凍保存した歯垢サンプルを 36 °C~38 °C の温浴中で融解し, 超音波処理 (50 W, 20 秒) を行った。冷 BHI 培地で 10 倍段階希釈をし, その 50 μl をスパイラル装置 (グンゼ産業) を用いて, それぞれの菌数算定用培地に塗抹した。

3) ミュータンスレンサ球菌の同定と菌数算定法

37 °C 下で 2~3 日間嫌気培養後, 総レンサ球菌数の算定, *S. mutans* と *S. sobrinus* の菌数算定を行った。ミュータンスレンサ球菌種の判別は主として実体顕微鏡下の集落形態を指標に行い, 判別困難な集落に関してはガラス壁固着性, デキストラン凝集性, ELISA 等の各種同定試

験を通して算定処理を行った。但し, 菌が非検出の試料については統計上の便宜からすべて log CFU=2.00 とした。

統計分析にあたり, 簡易検査キットによる結果で 2 群間における平均値の差の検定は Mann Whitney's U-test を用いた。それ以外で 2 群間における平均値の差の検定は F test により分散の比の検定を行い, 等分散とみなされた場合は Student's t-test, 等分散とみなされない場合は Welch's t-test を用いた。割合の比較は χ^2 検定を用いた。相関関係の分析は Pearson's correlation coefficient test を用いた。

結 果

I. 唾液流量および唾液緩衝能の測定法の検討

1. 改良フッ化物イオン希釈法による唾液流量

無味刺激と各酒石酸濃度の酸味刺激による唾液流量の各人 3 回測定平均値を Fig. 1 に示す。被験者 5 名のうち A は, 他の被験者と比較して, 無味刺激とすべての酒石酸濃度の酸味刺激において平均唾液流量が多く, 被験者 E はそれらの平均唾液流量が少なかった。5 名の無味刺激による平均唾液流量は 1.24 ± 0.41 ml/min (以下 mean ± SD にて示す), 2 mM, 10 mM, 20 mM の酒石酸濃度の酸味刺激による平均唾液流量はそれぞれ順に 1.68 ± 0.55 ml/min, 3.41 ± 1.16 ml/min, 4.50 ± 1.66 ml/min と増加した。

本学部 3 年次を対象に行った無味刺激による唾液流量の結果を Table 1 に示す。男性, 1.21 ± 0.35 ml/min, 女性, 1.15 ± 0.28 ml/min, 対象者全体では, 1.19 ± 0.32 ml/min であった。無味刺激による唾液流量において性別差は認められなかった。また酸味刺激による唾液流量の結

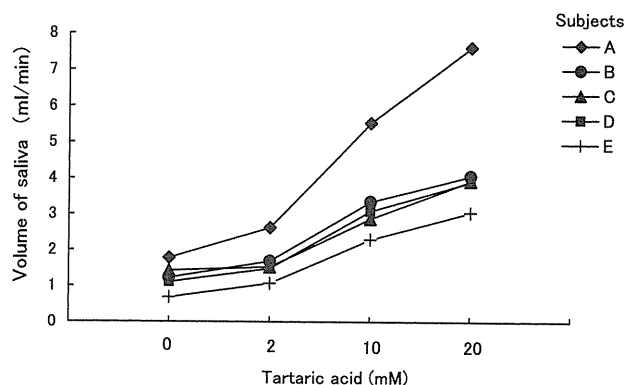


Fig. 1 Volume of saliva after taste with tartaric acid in five subjects.

Table 1 Volume of saliva after tasteless stimulation by the Modified Fluoride Dilution Method

Subjects	n	Range (ml/min)	Mean±SD (ml/min)	Significance of difference*
Men	69	0.70-2.13	1.21±0.35) NS
Women	54	0.74-1.73	1.15±0.28	
Total	123	0.70-2.13	1.19±0.32	

*: t test

NS: not statistically significant

Table 2 Volume of saliva after sour stimulation by the Modified Fluoride Dilution Method

Subjects	n	Range (ml/min)	Mean±SD (ml/min)	Significance of difference*
Men	69	1.50-4.63	3.11±0.72) p<0.05
Women	54	1.46-4.55	2.83±0.79	
Total	123	1.46-4.63	2.99±0.76	

*: t test

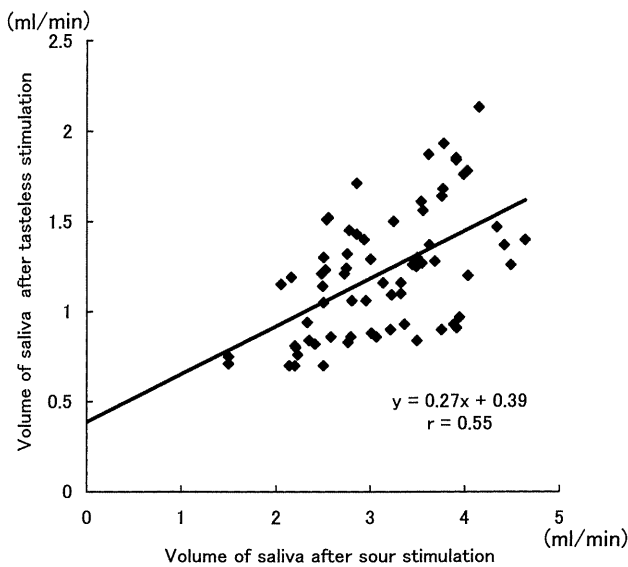


Fig. 2 Correlation between volume of saliva after sour stimulation and after tasteless stimulation by the Modified Fluoride Dilution Method in men.

果を Table 2 に示す。男性, 3.11±0.72 ml/min, 女性, 2.83±0.79 ml/min であった。対象者全体, 2.99±0.76 ml/min であった。酸味刺激による唾液流量は男性が女性より有意に高かった (p<0.05)。

性別の無味刺激による場合と酸味刺激による場合の唾液流量の相関関係を示した。Fig. 2 は男性, Fig. 3 は女性についての結果である。無味刺激と酸味刺激による唾液流量の間には, 男性, r=0.55(p<0.001), 女性, r=0.54 (p<0.001) の有意な正の相関関係が認められた。

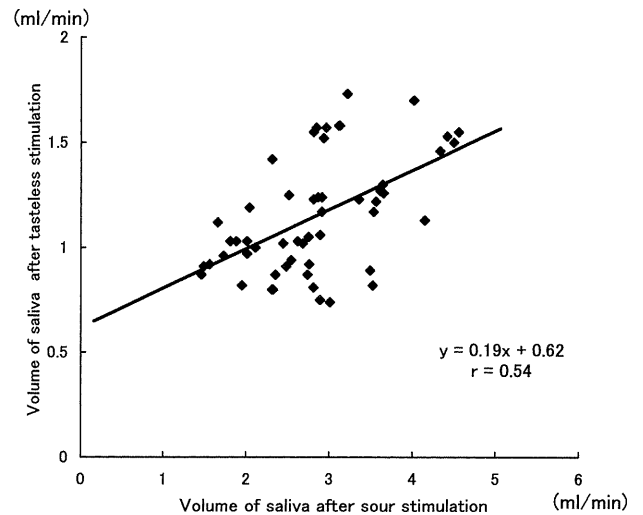


Fig. 3 Correlation between volume of saliva after sour stimulation and after tasteless stimulation by the Modified Fluoride Dilution Method in women.

2. 曲線下面積法と積分法および従来法による唾液緩衝能

本学部3年次のうち5名とコントロールの滴定曲線を Fig. 4 に示す。これら滴定曲線で描かれているごとく, 酸添加量に対応して示される pH 値の推移は各被験者に特徴的であった。例えば, 酸添加量が 0~0.7 ml において, 各被験者の示す pH 値は A が最も低く, E が最も高くほぼ一定の勾配で推移し, B, C, D が中間の値を示していた。しかし, それ以上の酸添加量において, 被験者 B, C の pH 値は大きく下降し, D の pH 値は最も緩い曲線を示し, 最終結果としての 1.0 ml 酸添加時点において, 各被験者が示す pH 値の順位は酸添加量が 0.7 ml 以下の時点とは異なっていた。

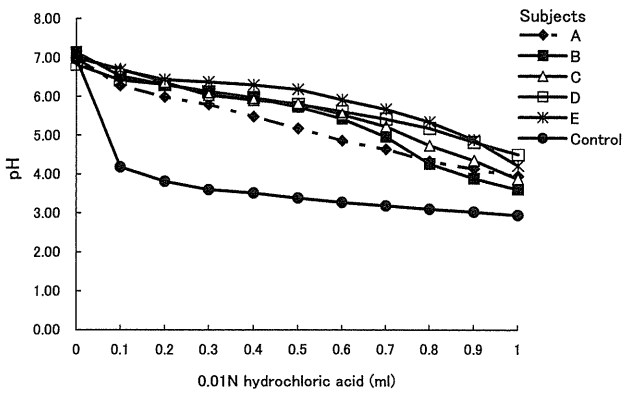


Fig. 4 Buffer titration curves in five subjects and control solution.

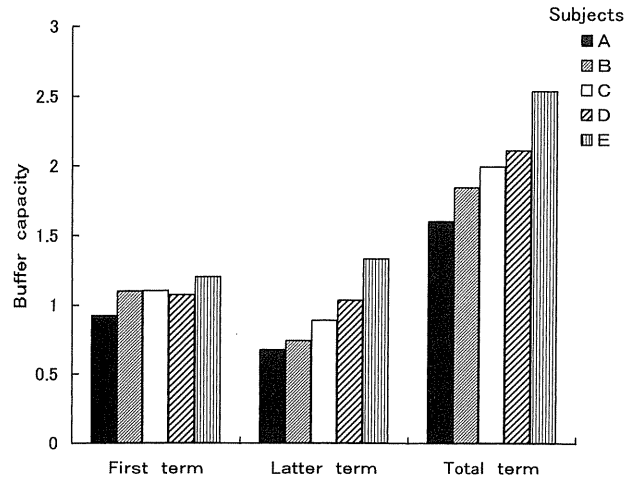


Fig. 6 Comparison of buffer capacity by the Integration Method.

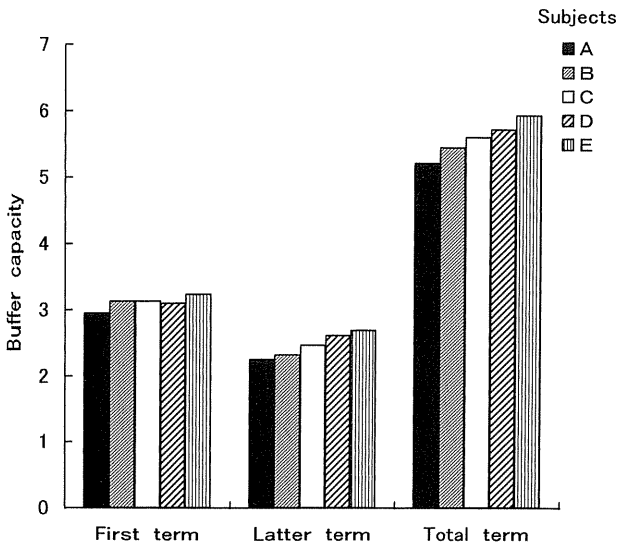


Fig. 5 Comparison of buffer capacity by the Method of Calculating Area Under Curve.

それらの滴定曲線をもとに曲線下面積法から求めた緩衝能について、初期、後期および全体の5名の個別値を Fig. 5 に、積分法による初期、後期および全体における5名の個別値を Fig. 6 に示す。また、Buffer pH法による酸添加量 0.5 ml と 1.0 ml における緩衝能の5名の個別値を Fig. 7 に示す。曲線下面積法による緩衝能でみると、初期における個体差は小さく、後期や全体で個体差が明瞭になっていた。さらに、積分法で比較すると唾液緩衝能値の個体差がいつそう明らかに区別できるように示され、後期と全体において、高い順に E, D, C, B, A であった。一方、Buffer pH法による比較では、先の2方法より個体の差が小さくなり、1.0 ml 酸添加における唾液緩衝能値の順位は D, E, A, C, B と入れ代わっていた。

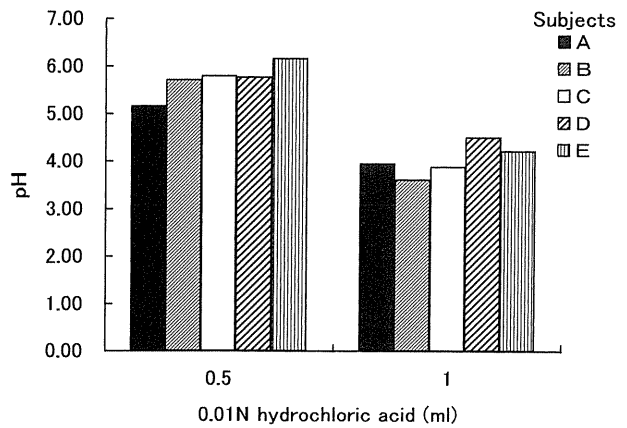


Fig. 7 Comparison of buffer capacity by the Buffer pH Method.

II. 高齶蝕群と無齶蝕群における齶蝕活動性の比較検討

1. 改良フッ化物イオン希釈法による唾液流量

改良フッ化物イオン希釈法による無味刺激唾液流量と酸味刺激唾液流量について、無齶蝕群と高齶蝕群とで比較した結果を Table 3 に示す。無齶蝕群の無味刺激唾液流量 1.31 ± 0.35 ml/min と酸味刺激唾液流量 3.29 ± 0.73 ml/min は、高齶蝕群の無味刺激唾液流量 1.23 ± 0.30 ml/min と酸味刺激唾液流量 3.19 ± 0.66 ml/min より多かったが、両群間に有意差は認められなかった。

2. 曲線下面積法と積分法および従来法による唾液緩衝能

高齶蝕群と無齶蝕群およびコントロールの滴定曲線を Fig. 8 に示す。高齶蝕群の滴定曲線は無齶蝕群と比較し

Table 3 Volume of saliva by the Modified Fluoride Dilution Method in caries-susceptible group and caries-free group (Mean±SD, ml/min)

Tastless/Sour	Caries-free group (n=11)	Caries-susceptible group (n=12)	Significance of difference*
Tasteless stimulation	1.31±0.35	1.23±0.30	NS
Sour stimulation	3.29±0.73	3.19±0.66	NS

*: t test
NS: not statistically significant

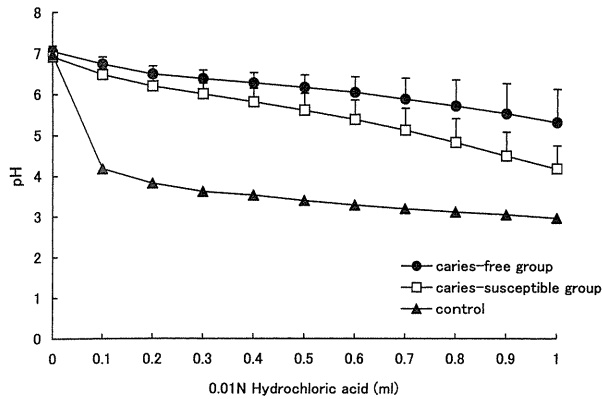


Fig. 8 Buffer titration curves for salivary samples taken from the group of caries-susceptible and caries-free, and the control solution. The vertical bars represent the standard deviations from the means.

て勾配が急で、酸添加量に対応して2群間の差が明瞭になっていた。曲線下面積法と積分法および従来法による唾液緩衝能について、無齲蝕群と高齲蝕群とで比較した結果をTable 4に示す。無齲蝕群の曲線下面積法による唾液緩衝能 6.12 ± 0.37 、積分法による唾液緩衝能 2.51 ± 0.37 、Buffer pH法による唾液緩衝能 5.29 ± 0.81 は、高齲蝕群の曲線下面積法による唾液緩衝能 5.52 ± 0.37 、積分法による唾液緩衝能 1.92 ± 0.37 、Buffer pH法による唾液緩衝能 4.16 ± 0.56 よりいずれも高く、曲線下面積法による緩衝能 ($p < 0.001$)、積分法による緩衝能 ($p < 0.001$)、Buffer pH法による緩衝能 ($p < 0.001$) は両群間に有意差が認められた。

高齲蝕群と無齲蝕群、計23名を対象とした、積分法による緩衝能とBuffer pH法による緩衝能との相関関係を

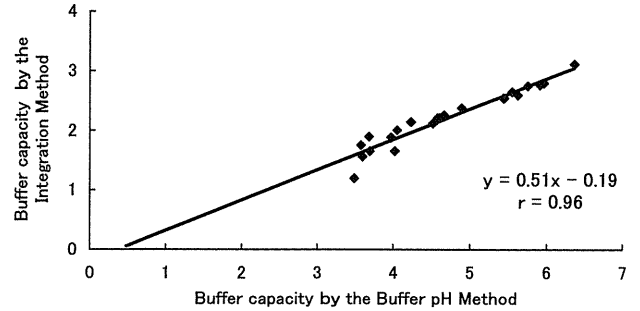


Fig. 9 Correlation of buffer capacity between by the Buffer pH Method and the Integration Method.

Fig. 9に示した。積分法および曲線下面積法による緩衝能とBuffer pH法による緩衝能の間には、 $r = 0.96$ ($p < 0.001$)の有意な正の相関関係が認められた。

3. 市販の簡易検査キットによる齲蝕活動性

高齲蝕群と無齲蝕群についてD-SM, D-Bufferのレベルを比較した結果をTable 5に示す。高齲蝕群のD-SM, D-Bufferは無齲蝕群のそれらよりいずれも高かったが、両群間に有意差が認められなかった。

4. 改良分離培養法による細菌検査

高齲蝕群の12名中12名(100%)に*S. mutans*が検出され、無齲蝕群の11名中10名(90.9%)に*S. mutans*が検出された。また、高齲蝕群の12名中5名(41.7%)に*S. sobrinus*が検出され、無齲蝕群の11名中1名(9.1%)に*S. sobrinus*が検出された。高齲蝕群の*S. sobrinus*の検出者率の有意差は認められないが($p = 0.095$)、無齲蝕群

Table 4 Salivary buffer capacity by three methods in caries-susceptible group and caries-free group (Mean±SD)

Method	Caries-free group (n=11)	Caries-susceptible group (n=12)	Significance of difference*
Area Under the Curve Method	6.12 ± 0.37	5.52 ± 0.37	$P < 0.001$
Integration Method	2.51 ± 0.37	1.92 ± 0.37	$P < 0.001$
Buffer pH Method	5.29 ± 0.81	4.16 ± 0.56	$P < 0.001$

*: t test

Table 5 Caries activity level by test kits in caries-susceptible group and caries-free group (Mean±SD)

Test kit	Caries-free group (n=11)	Caries-susceptible group (n=12)	Significance of difference*
Dentocult SM®	0.64±0.81	1.42±1.00	NS
Dentobuff® Strip	0.27±0.65	0.33±0.65	NS

* : Mann Whitney, s U test
NS : not statistically significant

Table 6 Numbers of *S. mutans* and *S. sobrinus* in brushing plaque in caries-susceptible group and caries-free group (Mean±SD)

Bacteria	Caries-free group (n=11)	Caries-susceptible group (n=12)	Significance of difference*
Total Strep (log CFU/ml)	7.86±0.62	7.86±0.32	NS
Total <i>S. mutans</i> (log CFU/ml)	4.56±1.05	6.15±0.49	P<0.001
<i>S. mutans</i> /Total Strep	(0.25±0.35)×10 ⁻²	(3.07±2.79)×10 ⁻²	P<0.01
Total <i>S. sobrinus</i> (log CFU/ml)	2.09±0.30	3.39±1.83	P<0.05

* : t test
NS : not statistically significant

より高い傾向を示した。

高齲蝕群と無齲蝕群の総レンサ球菌数, 総 *S. mutans* 菌数, 総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合, 総 *S. sobrinus* 菌数を比較した結果を Table 6 に示す。高齲蝕群の総 *S. mutans* 菌数は 6.15±0.49 log CFU/ml, 総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合は (3.07±2.79)×10⁻², 総 *S. sobrinus* 菌数は 3.39±1.83 log CFU/ml を示し, 無齲蝕群の総 *S. mutans* 菌数は 4.56±1.05 log CFU/ml, 総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合 (0.25±0.35)×10⁻², 総 *S. sobrinus* 菌数 2.09±0.30 log CFU/ml を示した。総 *S. mutans* 菌数 (p<0.001), 総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合 (p<0.01), 総 *S. sobrinus* 菌数 (p<0.05) について, 高齲蝕群は無齲蝕群より高く, 有意差が認められた。

考 察

本研究において唾液流量測定方法として Weatherell ら¹⁰⁾の方法を応用, 発展させた。Weatherell らは, ピペットを用いて 1.0 ml のフッ化物溶液を舌下に入れ 15 秒間拡散させ, 無味刺激唾液流量を測定した。本研究では, 5.0 ml のフッ化物溶液で被験者各自が 1 分間洗口をする方法である。このようにピペットを使用しない洗口法により同時に多数の唾液採取が可能となった。また, 酸味刺激には 10 mM 酒石酸で調整したフッ化物溶液を使用した。唾液の採取時間について, Dawes¹³⁾はヒトの唾液分泌の circadian rhythm について報告し, おおよそ午後 2 時~4 時頃までの変動が少なく, 最も安定していると報告している。そこで本研究ではすべてこの時間帯に実験

を行うこととした。

今まで行われている刺激の種類のための代表的な方法は咀嚼刺激と味覚刺激の大きく 2 つに分類される^{8,14)}。Watanabe ら¹⁵⁾は, 唾液の分泌量は咀嚼の機械的刺激より味覚の刺激の方がより大きな影響を与える, と報告している。本研究において味覚刺激は酒石酸にて行った。河村ら¹⁶⁾によれば, 蔗糖, 食塩, 酒石酸, 塩酸キニーネの各溶液を用い, ヒトの耳下腺唾液分泌量を調べた結果, 味覚刺激による唾液分泌量は, 酒石酸 (酸味), 食塩 (辛味), 塩酸キニーネ (苦味), 蔗糖 (甘味) の順で多く, 唾液を最も多く分泌させる味質は酒石酸 (酸味) であることが報告されている。また Yamamoto ら¹⁷⁾は, 除脳ウサギに各種味覚溶液を与えた場合に顎下腺からの唾液分泌量は酒石酸が最大で, 食塩水, 塩酸キニーネ, 蔗糖水の順になることを報告している。よって本研究では唾液分泌を最も促す酸味の酒石酸にて行った。Chauncey ら¹⁸⁾は酸をしみ込ませた綿で舌を刺激し, 耳下腺唾液分泌量と刺激回数との間の関係を調べた。しかし, この swabbing 法では, 採取方法が複雑になりやすく, 被験者に負担が多いなどの欠点がある。改良フッ化物イオン希釈法ではこれらの欠点を解消し, 洗口の簡便な手法で測定が可能である。Weatherell らの方法の 1 ml 洗口液を 5 ml にすることで舌への味覚刺激面積も大きくなり効果的となると考えられる。

多くの研究結果では, 男性の方が女性に比べて唾液流量は多く, この性差は女性の唾液腺が小さいことによるものと報告されている⁸⁾。これは安静唾液と刺激唾液の

双方に当てはまり、様々な年齢層にも該当するものである。本研究においては、無味刺激溶液による唾液流量において性別による差が認められなかったが、酸味刺激溶液による唾液流量においては男性が多く、有意差が認められた。Ericsson¹⁹⁾は顎下腺の大きさと唾液分泌量との間に相関関係があると報告している。Scott²⁰⁾は女性の顎下腺の大きさは男性よりも小さいと報告している。これらのことから唾液流量の性差の重要な一因として唾液腺の大きさがあると考えられる。

安静時と咀嚼刺激時の唾液分泌量は相関が高いとされている⁸⁾。今回の改良フッ化物イオン希釈法による無味刺激唾液流量と酸味刺激唾液流量には有意な相関関係が認められた。しかし、酸味刺激唾液流量が多いが無味刺激唾液流量は少ない者もみうけられた。よって被験者の唾液流量レベルの特徴を評価するには両方の採取方法を行うことが適切であると考えられる。

現在までに齶蝕と唾液流量の直接的な関連性を分析する研究が行われてきたが、傾向としては齶蝕が非常に少ない人では、齶蝕が多い人に比べ唾液流量が多いものの、両者の間に統計学的に有意な差があることを示した研究は少ないとされている⁸⁾。本研究の無齶蝕群と高齶蝕群の間でも次のような結果となった。無齶蝕群と高齶蝕群の比較において、無味刺激唾液流量は順に平均 1.31 ± 0.35 ml と平均 1.23 ± 0.30 ml、また酸味刺激唾液流量は順に平均 3.29 ± 0.73 ml と 3.19 ± 0.66 ml で前者は後者より高い値を示した。しかし、今回の対象者については有意な差が認められなかった。

洗口による改良フッ化物イオン希釈法を利用して次のような評価が得られた。採取時の刺激条件（味刺激等）を厳密に規格化でき、洗口できる人であればだれでもサンプリングが容易で、同時に多数の検体の採取が可能であった。この方法は吐出法や咀嚼法では測定困難な口腔内残留唾液の測定、高齢者などの少量唾液量測定^{1,21)}、短時間で唾液を採取できて被験者には負担をかけないでの測定が可能であるなど、疫学調査に適した特性が考えられる。

唾液の重要な緩衝系は炭酸-重炭酸システム、リン酸塩システム、タンパク質システムの3つの緩衝システムによって調節されている⁸⁾。唾液タンパクは低濃度で存在し、唾液緩衝作用に対する寄与はわずかであるとされている。唾液の緩衝能を定量するための測定は、一定量の唾液の中に酸を滴下し、唾液の初期の pH 値から pH

6, pH 5 または pH 4 に至るまで要する酸量を評価する方法が行われてきた^{8,11)}。Ericsson²²⁾は、滴定による方法に代えて、唾液に塩酸を加えて混合し、その時の到達 pH (resulting pH) を測定する臨床的試験法を開発した。同様に上田ら²³⁾も、Dreizen ら²⁴⁾による緩衝能測定法を簡易化するために、唾液に一定量の酸を加えてその時の pH を測定することを試み、チェアサイドで迅速に実施できる Buffer pH 法について報告した。Frostell²⁵⁾は、Ericsson の方法を改良し、一定量の酸滴定後に唾液 pH を比色法により緩衝能をスクリーニングする Dentobuff[®] を開発した。さらにこれを改良し、試験紙に唾液を滴下し簡便に判定可能にしたものが Dentobuff[®] Strip^{1,5,6)} である。現在、Dentobuff[®] Strip は市販されており、多くの臨床家によって利用されている。しかし、高価なため公衆歯科衛生活動への応用については適しているとは言い難い。また Dentobuff 法による結果は、単独で齶蝕罹患状態との間に関連性は明らかには認められないとされている^{26,27)}。本研究において無齶蝕群で 11 名中 9 名、高齶蝕群でも 12 名中 9 名が高緩衝能 (class 0) であり、齶蝕活動性試験の特異性を考慮すると妥当性に欠けると思われる。森主ら²⁶⁾も小児で 90%以上が高緩衝能になったと報告しており、評価には再検討を要すると考えられる。

改良フッ化物イオン希釈法の吐き出し液を利用することを前提に、唾液緩衝能測定への応用を目的として、*in vitro* (口腔外)において唾液 1.0 ml と NaF 溶液 5.0 ml を混和し、唾液緩衝能の分析評価法を検討した。唾液の緩衝能を定量的に表示するための測定方法には、唾液の中に酸を滴下し、唾液の初期 pH 値から目的とする pH 値に至るまでに要する酸量を評価したり、唾液に一定量の酸を添加してその時の pH を測定するのが通法となっている。しかし、この方法では酸滴定曲線の勾配の相違による唾液緩衝能の差異を分析するうえで、断面的な評価となっていることに問題点がある。曲線下面積法または積分法によれば曲線の勾配によって示される緩衝能の違いを全体的に比較できると考えられる。以上のことから、個人の詳細な唾液緩衝能を評価する場合、曲線下面積法または積分法が有力であると考えられた。また、曲線下面積法では被験者唾液試料の滴定曲線だけで求めることができ積分法より容易と評価できた。一方、積分法ではコントロール溶液の滴定曲線を考慮に入れる方法であることから、作業ステップは増えるが、曲線下面積法よりも精度の高い分析につながるものと考えられる。安静時

唾液に試みたが他の刺激唾液及び希釈をしない唾液に滴定する場合にも同様に应用可能と考えられる。また Buffer pH 法と曲線下面積法および積分法の間には $r=0.96$ と高い相関関係が認められたが、無齲蝕群では $r=0.99$ と高く、高齲蝕群では $r=0.90$ とそれより低い結果が得られた。特に高齲蝕群においては測定結果のさらなる分析が必要と思われた。今後は対象人数を増やして検討を行う予定である。

Ericsson²⁸⁾は、緩衝能と齲蝕経験の間に負の関連性があることから、最もよく確立された齲蝕抵抗性因子が唾液の緩衝能であるとしている。唾液緩衝能と齲蝕経験の間に負の関連性があることは、多くの者が報告している^{8,11,27)}。本研究においても無齲蝕群の唾液緩衝能 (Buffer pH 法, 曲線下面積法および積分法) と高齲蝕群の緩衝能間には有意な差が認められた。

ミュータンスレンサ球菌と総称される齲蝕原性細菌は、*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. rattus*, *S. cricetus*, *S. downei*, *S. macacae*, *S. ferus* の 7 菌種²⁾より成っている。人の口腔から検出されるミュータンスレンサ球菌は主に、*S. mutans* と *S. sobrinus* の 2 菌種である²⁾。両者は検出頻度も異なっており、*S. mutans* 菌が大多数のヒト口腔から検出されるのに対し、*S. sobrinus* 菌が検出されるのは 10 名中 2, 3 名程度である。この分離頻度の違いから *S. mutans* 菌の方が重要という見解が一般的で、これまでの診断・予防研究はそれを前提として進められてきた。しかし、最近の分子生物学的研究や疫学的研究の結果は *S. sobrinus* 菌が *S. mutans* 菌に優るとも劣らず重要であることを強く示唆している²⁾。しかも、両菌種の分布と齲蝕罹患との相関性を調べた幾つかの疫学研究の結果は、*S. mutans* と *S. sobrinus* の混合感染が本疾患の発症と相関していることを強く示唆している。Kohler ら²⁹⁾、Hirose ら³⁰⁾、藤原ら³¹⁾は小児を対象に疫学調査を行い、*S. mutans* と *S. sobrinus* の両菌種を保有しているグループは *S. mutans* のみを保有するグループより本菌群レベルと齲蝕有病率が有意に高いことを示した。Okada ら³²⁾、村田³³⁾もまた、高度の齲蝕経験を持つ成人の半数から *S. mutans* と *S. sobrinus* の両菌種が検出され、齲蝕経験が無いか低い成人からは *S. mutans* のみが検出されることを見出している。

本研究では高齲蝕群の総 *S. mutans* 菌数、総 *S. sobrinus* 菌数、総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合は無齲蝕群のそれらよりいずれも高く、両群間に有意差が認めら

れた。高齲蝕群の 12 名中 5 名 (41.7%) から *S. sobrinus* が検出され、無齲蝕群の 11 名中 1 名 (9.1%) から *S. sobrinus* が検出された。高齲蝕群の *S. sobrinus* 検出者率は無齲蝕群より高い傾向を示した。ここでは両群間に有意差は認められなかった ($p=0.095$) が、比較対象者が少なかったためと考えられる。齲蝕誘発における両菌種の存在は重要なものと考えられるが、現在まで *S. mutans* と *S. sobrinus* を簡易識別する検査キットは開発されていない。また齲蝕原因菌 *mutans streptococci* の主な棲息部位は歯面上の歯垢である。したがって齲蝕活動性を本菌群から捉えるためには、歯垢中の菌数を計測する必要がある²⁾。齲蝕原因菌の検出を行う市販の簡易検査キットは、唾液を検体として使用している^{1,2,5,6)}。なかでも Dentocult-SM[®]は、多くの臨床家によって利用されており、齲蝕経験との相関性が報告されている^{1,34)}。本研究では高齲蝕群の Dentocult-SM[®]の値は無齲蝕群の値より高かったが有意な差は認められなかった。最近、Neta³⁵⁾らは定量性のある歯垢採取法につき検討を行い、1 分間のブラッシング処理を含む方法で採取したブラッシング歯垢がその目的に適うことを示した。今回は、そのブラッシング歯垢を用い、*S. sobrinus* と *S. mutans* を定量する改良分離培養法²⁾によって分析と評価を行った。現在では、より高精度な *S. mutans* 菌用の迅速キット及び *S. sobrinus* の診断キット開発研究も進められている。

現在、対象人数を増やし、歯の攻撃因子及び防御因子の検査を組み合わせることで、包括的な齲蝕リスク判定の検討を行っている。今後は改良フッ化物イオン希釈法の齲蝕活動性試験への応用や齲蝕ハイリスク者の迅速検出システムが確立されれば、齲蝕予防に大きく貢献できると考えられる。

結 論

改良フッ化物イオン希釈法による唾液流量と、従来法、曲線下面積法、積分法による唾液緩衝能、および齲蝕原因菌レベルの種々の検査方法について検討した。それらの方法を用いて無齲蝕群と高齲蝕群とで齲蝕活動性を比較した結果、以下のような結論を得た。

1. 改良フッ化物イオン希釈法は、多人数の唾液採取ができ、酸味刺激による唾液流量測定が簡便化が可能となった。また唾液流量は男女ともに無味刺激と酸味刺激のもとで相関関係が認められ、酸味刺激において女性に比べて男性の唾液流量が有意に多かった。

2. 唾液緩衝能の評価法においては、Buffer pH 法、曲線下面積法及び積分法のいずれにおいても、無齲蝕群の値は高齲蝕群の値よりも有意に高く、またそれぞれの方法による唾液緩衝能値の間に高い相関が認められた。疫学研究においては簡易な Buffer pH 法が有用であると考えられ、個人の詳細な唾液緩衝能測定を行う場合には、考案した曲線下面積法または積分法が有効であることが示唆された。
3. 高齲蝕群のブラッシング歯垢中総 *S. mutans* 菌数、総 *S. sobrinus* 菌数、及び総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合は無齲蝕群のそれらよりいずれも高く、両群間に有意差が認められた。なお、市販の簡易検査キットである齲蝕活動性試験の Dentocult-SM® のレベルにおいては、両群間に有意差が認められなかった。

本研究の結果、集団を対象とした公衆衛生の場及び疫学研究において、唾液流量測定のための改良フッ化物イオン希釈法と唾液緩衝能測定法及びブラッシング歯垢を用いて齲蝕細菌数を評価することは、齲蝕活動性試験として実践的で有用性があるものと考えられた。これら測定方法の活用により、包括的なリスク因子の情報収集が可能となり、より確かな齲蝕リスク判定を行うことができると考えられる。

文 献

- 1) 熊谷 崇, 熊谷ふじ子, 藤本省三ほか：クリニカル カリオロジー, 初版, 9-25, 医歯薬出版, 東京, 1996.
- 2) 福島和雄：第3部1章 ミュータンスレンサ球菌の分離同定法, ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, 62-81, クインテッセンス出版, 東京, 2003.
- 3) 下野 勉：6歳臼歯の形成と萌出期における問題, *Quintessence Journal of Dental Auxiliary*, 9(3), 57-70, 1985.
- 4) Thylstrup A, Fejerskov O: *Textbook of Cariology*, 259-262, Munksgaard Co, Copenhagen, 1986.
- 5) 森本 基, 清水秋雄, 宮武光吉ほか：口腔保健学, 医歯薬出版, 東京, 125-129, 2002.
- 6) 飯塚喜一, 森本 基：スタンダード口腔保健, 学建書院, 東京, 137-140, 2002.
- 7) 中垣晴男, 藤垣展彦, 村上多恵子ほか：生検によるエナメル質溶解性測定の有用性—各種の齲蝕活動性試験法との比較, *口腔衛生学会誌*, 38: 27-39, 1988.
- 8) Downen B, Ulf H: Chapter 2 SALIVARY SECRETION RATE, BUFFER CAPACITY, AND pH, HUMAN SALIVA CLINICAL CHEMISTRY AND MICROBIOLOGY, Volume I, 25-73, CRC Press, Florida, 1989.
- 9) Koga-Ito CY, Unterkircher CS, Watanabe H, et al.: Caries risk tests and salivary levels of immunoglobulins to *Streptococcus mutans* and *Candida albicans* in mouthbreathing syndrome patients, *Caries Res*, 37: 38-43, 2003.
- 10) Weatherell JA, Strong M, Robinson C, et al.: Determination of volumes of fluid in the mouth by fluoride dilution, *Caries Res*, 26: 94-97, 1992.
- 11) 高橋正生：う蝕活動性試験に関する研究—とくに、唾液緩衝能について—, *歯科医学*, 45(2): 175-189, 1982.
- 12) 日本学校歯科医会：学校における歯・口腔の健康診断(平成7年度改正編), 1995.
- 13) Dawes C: Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition, *J Physiol*, 220: 529-545, 1972.
- 14) 平澤雅利：小児の唾液分泌速度に関する研究：小児歯科学雑誌, 38(1): 93-103, 2000.
- 15) Watanabe S, Dawes C: The effect of different foods and concentrations of citric acid on the flow rate of whole saliva in man, *Arch Oral Biol*, 33: 1-5, 1988.
- 16) 河村洋二郎, 船越正也, 西山 享ら：味質と反射性唾液分泌量の関係, *日本生理誌*, 26: 495-502, 1964.
- 17) Yamamoto T, Kawamura Y: Gustatory-salivary reflex in the rabbit Food intake and Chemical Senses, 211-221, University of Tokyo Press, Tokyo, 1977.
- 18) Chauncey HH, Feller R, PShannon, IL: Measurement of human Gustatory perception using the parotid gland secretion rate In taste and Olfaction II, 265-280 Oxford Pergamon Press, 1967.
- 19) Ericsson S, Hedin M, Wiberg A: Variability of the submandibular flow rate in man with special reference to the size of the gland, *Odonol Revy*, 23: 411-420, 1972.
- 20) Scott J: Age sex and contralateral differences in the volumes of human submandibular salivary glands, *Arch Oral Biol*, 20: 885-887, 1975.
- 21) 佐藤栄祐, 又賀 泉, 加藤譲治：高齢者における口腔乾燥症について—疫学と唾液腺機能—, *口腔科誌*, 38(1): 29-46, 1989.
- 22) Ericsson Y: Clinical investigations of the salivary buffering action, *Acta Odontol Scand*, 17: 131-165, 1959.
- 23) 上田五男, 安部英雄, 中尾俊一：唾液緩衝能の簡易臨床測定法ならびに測定値に及ぼす二、三因子の影響に関する研究, *口腔衛生学会誌*, 34: 45-59, 1984.
- 24) Dreizen S, Mann A, Cline JH: The Buffer Capacity of Saliva as a Measure of Dental Caries Activity, *J Dent Res*, 25: 213-221, 1946.
- 25) Frostell G.: A colourimetric screening test for evaluation of the buffer capacity of saliva, *Swed dent J*, 4: 81-86, 1980.

- 26) 森主宣延, 金城幸子, 小椋 正 : 幼児における齲蝕活動性試験 (Dentocult-SM[®] Strip mutans, Dentobuff[®] Strip) 簡易法の信頼性について, 小児歯科学雑誌, 39 (1) : 110-115, 2001.
- 27) Anzai T, Tahara A, Ikeda M, et al. : Influence of colonization with mutans streptococci on caries risk in Japanese preschool children 24 month survival analysis, *Pediatr Dent*, 22 : 377-380, 2000.
- 28) Ericsson Y. : Recent advances in dental caries research. Biochemistry, salivary and food factors in dental caries development, *Int Dent J*, 12 : 476-495, 1962.
- 29) Köhler B, Bjarnason S : Mutans Streptococci, Lactobacilli and Caries Prevalence in 11-and 12-year-old Icelandic Children, *Community Dent Oral Epidemiol*, 15 : 332-335, 1987.
- 30) Hirose H, Hirose K, Isogai E, et al. : Close Association between *Streptococci sobrinus* in the Saliva of Young Children and Smooth-Surface Caries Increment, *Caries Res*, 27 : 292-297, 1993.
- 31) 藤原 卓, 武井 勉, 河野仁美ほか : 日本人小児の唾液より分離される *Streptococci sobrinus* の諸性状と齲蝕罹患状態との相関について, 小児歯科学雑誌, 26 : 556-563, 1988.
- 32) Okada T, Tomita Y, Namiki Y, et al. : Species Constitution of Mutans Streptococci Isolated from Caries-susceptible and Caries-free Students, *J Dent Res*, 74 : S1, 501, 1995.
- 33) 村田宣弘 : 高齲蝕罹患経験者と非・低齲蝕罹患経験者から分離される Mutans Streptococci の菌数と菌種について, 日本口腔診断学会雑誌, 9 : 25-34, 1996.
- 34) 岡崎好秀, 中村由貴子, 東 知宏ら : 就学前児における齲蝕活動性試験 Cariostat Dentocult-SM[®] Strip mutans Dentocult-LB[®] と齲蝕罹患状態との関係について, 口腔衛生学会誌, 49 : 2-8, 1999.
- 35) Neta T, Ikemi T, Fukushima K, et al. : investigation of microbiological method to estimating individual caries risk. Evaluation of sampling methods and materials, *Int. J. Oral-Med. Sci.* 1 : 33-36, 2002.

謝辞 : 稿を終えるにあたり, 本研究において終始懇切なる御指導, 御鞭撻を賜りました日本大学松戸歯学部衛生学講座 小林清吾教授に深甚な感謝の意を捧げると共に, 御指導, 御高閲の労を賜りました本学細菌学講座 福島和雄教授, 生化学講座 安孫子直光教授, 障害者歯科学講座 妻鹿純一教授に深く御礼申し上げます。また, 研究を進めるにあたり御指導, 御助言を賜りました本学化学 早川光央教授, 数学 上江洲香實教授, 総合口腔医学講座 山本正文教授ならびに衛生学教室各位に感謝の意を表します。

なお本研究の一部は平成13年度選定学術フロンティア推進事業, ベンチャー研究開発拠点整備事業および日本大学松戸歯学部鈴木研究費により実施された。

原 著

ミュータンスレンサ球菌レベル算定用の改良選択培地の有効性評価

後藤田宏也^{*、††} 水野 恭子^{*} 田口千恵子^{*} 有川 量崇^{*、††} 小林 清吾^{*、††}
門澤久美子^{**} 斎藤美芽子^{**} 井田 博久^{***} 上江洲香實^{†、††} 福島 和雄^{**、††}

概要：近年、ミュータンスレンサ球菌の算定・検出用に多用されている MSB 培地の欠点（選択性不良）を改善した改良型 MSB 培地が開発された。本研究では、改良型 MSB 培地の選択性の有効性を分析し、その改良 MSB 培地を用いて、唾液中の *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) および *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) 菌数レベルとう蝕有病との関連性の検討を行い、以下の結論を得た。

1. 唾液中の *S. mutans* および *S. sobrinus* の検出者率と平均検出菌数は、従来型と改良型の両培地ではほとんど差が認められず、改良培地で若干ながらともに増加した。一方、ミュータンスレンサ球菌以外のレンサ球菌（Non-MS 菌）の検出者率および平均検出菌数は、ともに改良培地において有意に低い値を呈した。MSB 培地と改良 MSB 培地における検出菌数の比較は、*S. mutans* および *S. sobrinus* では正の相関が認められた。

2. 総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合が低い群と高い群の間の平均 DMFT に有意な差が認められた。また、*S. sobrinus* の非検出者群と検出者群の平均 DMFT においても、両群間の値に有意な差が認められた。

索引用語：改良 MSB 培地, *S. mutans*, *S. sobrinus*, う蝕有病

口腔衛生会誌 55 : 89-94, 2005

(受付：平成 16 年 5 月 10 日/受理：平成 16 年 12 月 17 日)

緒 言

う蝕の主要な原因菌はミュータンスレンサ球菌とよばれる乳酸産生能をもつ細菌である。なかでも *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) と *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) の 2 菌種がヒトのう蝕発症に深くかかわっており¹⁻⁴⁾、多くの乳幼児においては、主として近親者（特に母親）の口腔から感染し、歯面に定着する。成人においては *S. mutans* が 9 割以上のヒトの口腔から検出され、これに対して *S. sobrinus* は 2~3 割の人から検出される⁵⁻⁹⁾。Gold ら¹⁰⁾の Mitis-Salivarius Bacitracin 寒天平板培地 (MSB 培地) などのミュータンスレンサ球菌用選択培地を用いて、これまで数多くの疫学研究が行われ、唾液中ミュータンスレンサ球菌レベルとう蝕発症との間に正の相関があることが明らかにされている¹¹⁾。しかし近年、これまで多用されてきた MSB 培地などに多数の

ミュータンスレンサ球菌以外のレンサ球菌 (Non-MS 菌) が増殖するため、その選択性不良の改善が求められてきた¹²⁻¹⁵⁾。

最近、ミュータンスレンサ球菌の算定・検出用に多用されている MSB 培地の欠点（選択性不良）を改善した改良型 MSB 培地が開発された¹²⁻¹⁵⁾。本研究では、この新しい選択培地の有効性を評価するとともに、この培地を用いて、唾液中の *S. mutans* および *S. sobrinus* 菌数レベルとう蝕有病との関連性を検討したので報告する。

対象および方法

1. 対象者

日本大学松戸歯学部歯学部の学生 256 名 (男性 144 名, 女性 112 名, 平均年齢 22.6 歳, 20~28 歳) を対象とした。

本研究は、日本大学松戸歯学部の倫理委員会の審査を経て承認を得た (承認番号 EC 02-015 号)。被験者に対し

* 日本大学松戸歯学部衛生学講座

** 日本大学松戸歯学部細菌学講座

*** ビー・エム・エル

† 日本大学松戸歯学部総合口腔医学

†† 日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

て事前に十分な説明を行ったうえで、被験者から自由意思に基づく同意を得た。

2. う蝕有病状況の把握

十分な照明下でミラーと探針を用い、日本学校歯科医学会の基準¹⁶⁾に基づき口腔内診査を行った。未処置う蝕、喪失および処置う蝕の有無を歯単位で記録し、個人のDMF 歯数を求めた。

3. 分離培養法による細菌検査

1) 唾液の採取と保存

被験者にパラフィンワックスを噛んでもらい、5分間刺激唾液を採取した。回収した唾液サンプルは、福島の方法¹²⁾に準じて5% Dimethyl sulfoxide (DMSO)-10% スキムミルク存在下で1時間放置後、 -80°C 下で冷凍保存した。

2) 供試培地および培養法

総レンサ球菌数算定用に Mitis-Salivarius (MS) 培地 (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) を、*S. mutans* と *S. sobrinus* の菌数算定用に Gold ら¹⁰⁾の方法に従って作製した MSB 培地およびビー・エム・エル (東京) より供与された改良 MSB 培地を使用した。冷凍保存したサンプルを 36°C ~ 38°C の温浴中で融解し、超音波処理 (50 W, 20 秒) を行った。 4°C に冷却した Brain Heart Infusion 液体培地 (Difco, 冷 BHI 培地) で10倍段階希釈をし、それらの $50\ \mu\text{l}$ をスパイラル装置 (グンゼ産業, 大阪) を用いて、それぞれの菌数算定用培地に塗抹した。

3) ミュータンスレンサ球菌の同定と菌数算定法

37°C 下で2~3日間嫌気ジャーを用いたローソク培養後、総レンサ球菌、*S. mutans*、*S. sobrinus* および Non-MS 菌の菌数算定を行った。ミュータンスレンサ球菌種および Non-MS 菌の判別は、主として実体顕微鏡下の集落形態を指標に行い、判別困難な集落に関してはガラス壁固着性、デキストラン凝集性、ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) などの各種同定試験¹²⁾を通して算定処理を行った。ただし、菌が非検出の試料については統計上の便宜からすべて $\log\text{CFU}=2.00$ とした。

統計処理において2群間の差の検定は t-test、割合の比較には χ^2 検定、多重比較には Tukey の方法を用いた。相関関係の分析は Spearman's correlation coefficient test を用いた。

結 果

1. う蝕有病状況

対象者256名の平均 DMFT は 7.8 ± 5.5 (以下、平均値 \pm 標準偏差) で、DMF 歯数が0の者が26名、1~4の者が58名、5~8の者が71名、9~12の者が50名、13

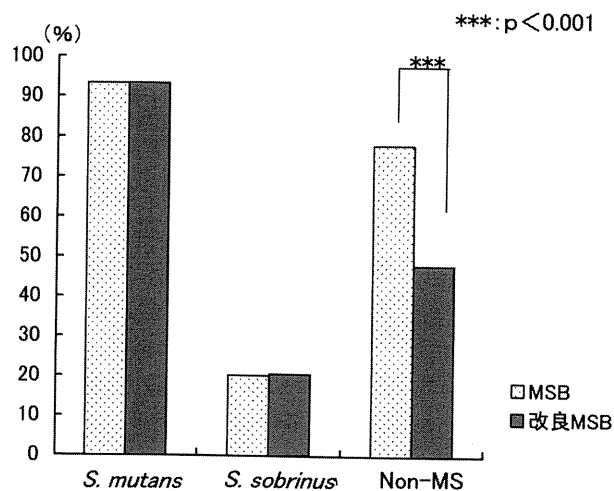


図1 改良MSB培地とMSB培地における各種菌の検出者率 (n=256)

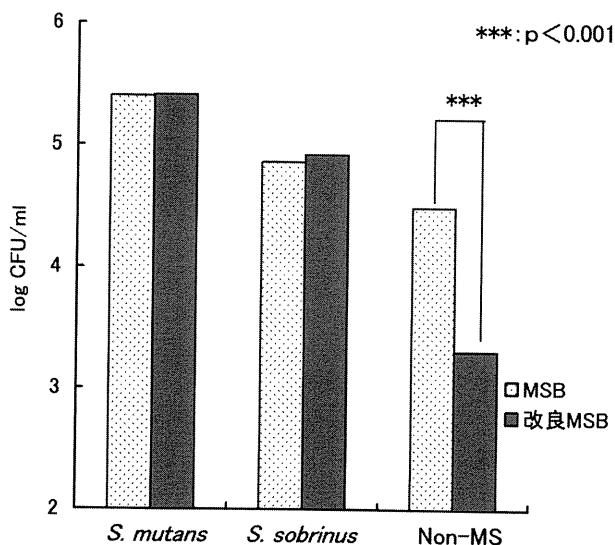


図2 改良MSB培地とMSB培地における各種菌の検出菌数

以上の者が51名であった。

2. 改良MSB培地とMSB培地における各菌種の検出者率と検出菌数および両培地間の関連性

MSB培地と改良MSB培地における*S. mutans*、*S. sobrinus* および Non-MS 菌の検出者率を図1、検出菌数を図2に示す。MSB培地と改良MSB培地を比較すると、Non-MS 菌の検出者率は78.1%、48.0%であり、平均検出菌数 ($\log\text{CFU}/\text{ml}$) は 4.49 ± 0.92 、 3.31 ± 1.27 であった。

唾液中の *S. mutans* および *S. sobrinus* の検出者率と平均検出菌数は、従来型と改良型の両培地ではほとんど差

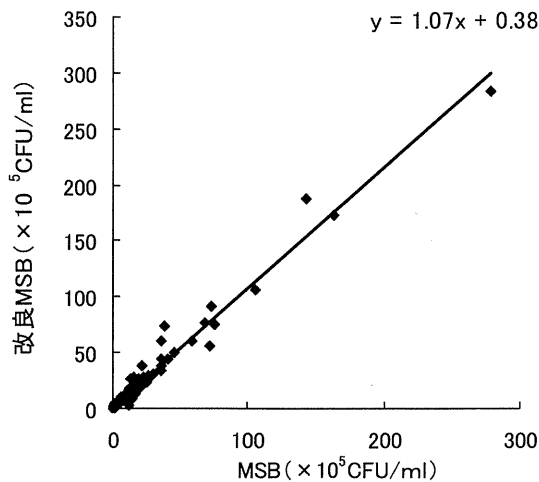


図3 改良MSB培地とMSB培地における *S. mutans* 検出菌数の比較 (n=238)

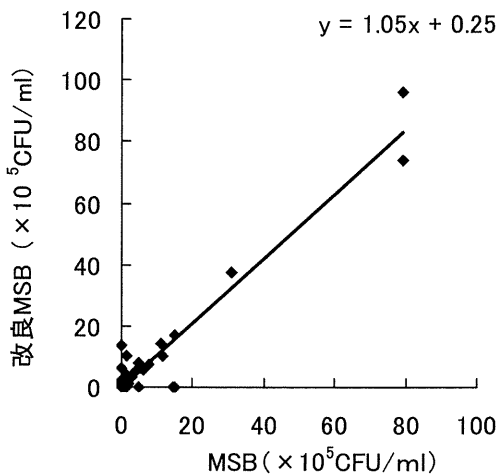


図4 改良MSB培地とMSB培地における *S. sobrinus* 検出菌数の比較 (n=52)

が認められず、改良培地で若干ながらともに増加した(有意な差は認められなかった)。一方、Non-MS菌の検出者率(χ^2 検定, $p < 0.001$)、平均検出菌数(t-test, $p < 0.001$)はともに改良培地において有意に低い値を呈した。

MSB培地と改良MSB培地における検出菌数の比較は、*S. mutans*では $r = 0.97$ ($n = 238$, $p < 0.001$) (図3)、*S. sobrinus*では $r = 0.56$ ($n = 52$, $p < 0.001$) (図4)と正の相関が両培地間に認められた (Spearman's correlation coefficient test)。

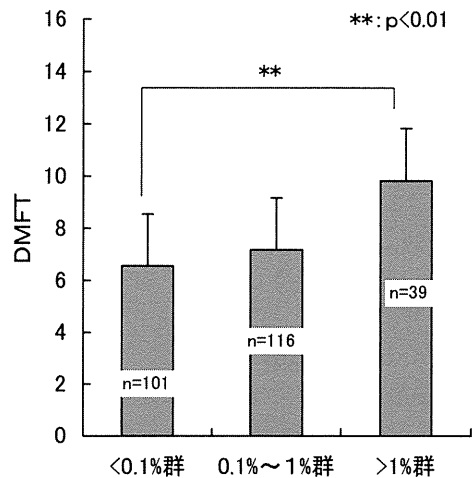


図5 総レンサ球菌中の *S. mutans* の比率による被験者群別 DMFT

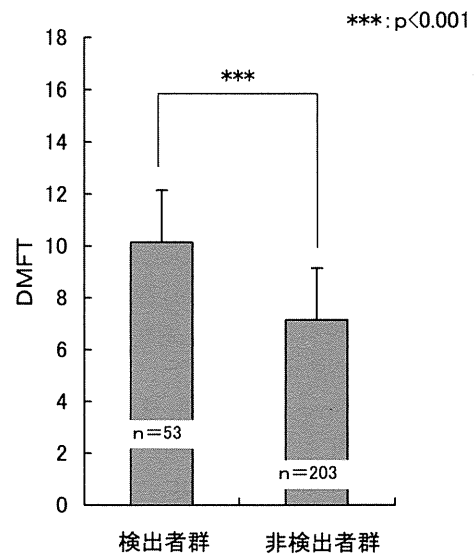


図6 *S. sobrinus* の検出者群と非検出者群における DMFT の比較

3. 改良MSB培地における各菌種数とDMFTとの関連性

MS培地による総レンサ球菌の検出菌数は 8.11 ± 0.39 logCFU/mlであった。総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合 (*S. mutans* 比率) が異なる被験者群別の平均DMFTの結果を示す(図5)。*S. mutans* 比率が0.1%未満と1%以上の両群間の値に有意な差が認められた (Tukeyの多重比較, $p < 0.01$)。また *S. sobrinus* の検出者群と非検出者群の平均DMFTは、それぞれ、 10.15 ± 5.21 , 7.13 ± 5.46 であり、両群間の値に有意な差が認めら

れた (図 6) (t-test, $p < 0.001$).

考 察

Gold ら¹⁰⁾の MSB 培地は, MS 培地に 0.2 unit/ml のバシトラシンと 15% のスクロースを添加した培地であり, ミュータンスレンサ球菌を分離するための選択培地として最も一般的に使用されている. しかし, MSB 培地にはバシトラシン耐性を獲得した Non-MS 菌が少なからず増殖する. 井田ら¹³⁾は, MSB 培地を用いた場合の Non-MS 菌の検出者率が 58.6%, 検出菌数が $6.06 \pm 6.16 \log\text{-CFU/ml}$, 福島¹²⁾は検出者率が 96.0%, 検出菌数が $4.66 \pm 0.94 \log\text{CFU/ml}$, また安藤ら¹⁵⁾は, 検出者率が 86.5% であった報告している. よって MSB 培地では Non-MS 菌の検出率が高いという欠点を有している.

バシトラシンと同じペプチド系抗生物質であるグラミジン D に対して, *S. mutans* は独特の耐性機構を有することが報告されている¹⁰⁾. 井田ら¹³⁾はグラミジン D の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定し, 分析した. その結果バシトラシンについては用いた *S. mutans* 株の MIC はすべて 2 unit/ml 以上であったが, ほかのレンサ球菌では約 40% が 0.25 unit/ml 以下であった. また, グラミジン D についてはすべての *S. mutans* 株が 2 $\mu\text{g/ml}$ 濃度で発育抑制を受けなかったが, ほかのレンサ球菌ではほぼ 90% の株が同濃度下で発育抑制を受けた. よってバシトラシンにおいては, 8 unit/ml 濃度で *S. mutans* の 70% 以上の株が発育を抑制され, 同様の効果を得ることができた. これらの結果から, ビー・エム・エルは従来の MSB 培地に, Non-MS 菌の増殖をバシトラシン (0.2 unit/ml), グラミジン D (2 $\mu\text{g/ml}$), コリスチン (10 $\mu\text{g/ml}$), ナリジクス酸 (10 $\mu\text{g/ml}$) および Yeast extract (20 mg/ml) を添加して選択性を高めた改良 MSB 培地を開発した (公開特許情報: 2002-027975).

本研究では, 唾液を検体として成人 (大学生) 256 名を対象に, 改良 MSB 培地と従来の MSB 培地における *S. mutans*, *S. sobrinus* および Non-MS 菌のコロニー数と検出者率の比較を行った. その結果, 唾液中の *S. mutans* および *S. sobrinus* の検出者率と平均検出菌数は, 従来型と改良型の両培地ではほとんど差が認められず, 改良培地で若干ながらともに増加した (有意な差は認められなかった). 一方, Non-MS 菌の検出者率および平均検出菌数は, ともに改良培地において有意に低い値を呈した. これらの事実は, 改良 MSB 培地がミュータンスレンサ球菌に対し, 高い選択性をもつことを示している.

福島¹²⁾は, 唾液の代わりにブラッシング歯垢を検体として 52 名を対象に検討を行い, Non-MS 菌の検出者率

および平均検出菌数は, ともに改良培地において低い値を示したという結果を得ている. 井田ら¹³⁾は, 唾液を用いて 17 名を対象に検討を行い, 改良 MSB 培地の Non-MS 菌の検出率と検出菌数が少なかったと報告している. 金子ら¹⁴⁾は, 唾液を用いて小学生 345 名を対象に検討し, 改良 MSB 培地において *S. sobrinus* で若干検出者率の改善がみられたと報告している. 安藤ら¹⁵⁾は, 唾液を用いて 52 名を対象に検討し, Non-MS 菌の検出菌数の算定は行っていないが, 改良 MSB 培地の Non-MS 菌の検出者率は低下したと報告している. したがって, これらの報告から, ミュータンスレンサ球菌に対して, 改良 MSB 培地が高い選択性をもつことを示している. よってミュータンスレンサ球菌を分離または算定するための選択培地としては, この改良 MSB 培地が現在のところ最良の培地と思われる.

ミュータンスレンサ球菌の分布とう蝕罹患との相関を調べた疫学的研究の結果は, *S. mutans* と *S. sobrinus* の両菌種をともに保有する人は, *S. mutans* あるいは *S. sobrinus* のみを保有する人よりも, う蝕罹患のリスクが有意に高いことを示唆している. Hirose ら¹⁾と藤原ら²⁾は日本人の幼児を, Köhler ら³⁾はアイスランド人の児童を, Babaahmady ら⁴⁾がイギリス人児童を対象に疫学調査を行い, 唾液における *S. mutans* と *S. sobrinus* の両菌種を保有しているグループは, *S. mutans* のみを保有するグループより本菌群レベルとう蝕有病率が有意に高いことを示した. また, 成人 (大学生) の高う蝕経験群と無う蝕経験群を対象として, Okada ら¹⁷⁾および村田¹⁸⁾が唾液中で, 後藤田¹⁹⁾が歯垢中において *S. mutans* レベルと *S. sobrinus* の有無とう蝕経験との相関について調べ, 同様の結論を得ている. 本研究においては菌数レベルおよび有無で分類を行い, 総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合が低い群と高い群間の平均 DMFT および *S. sobrinus* の非検出群と検出群の間の平均 DMFT に有意な差が認められた. 今回は, う蝕経験との関連性のみを分析したが, 今後う蝕活動性との因果関係を明らかにするためには, 調査時点からのう蝕発生状況を前向き調査で検討する必要があると考えられる.

本研究では, 改良 MSB 培地のミュータンスレンサ球菌に対する選択性を検討した結果, ミュータンスレンサ球菌の回収率を低下させずに, Non-MS 菌の検出率を大きく下げる点で有用性が認められた. またその改良 MSB 培地を用いて, 唾液中の *S. mutans* および *S. sobrinus* 菌数レベルと DMFT との関連性を検討し, 唾液中で *S. mutans* の高レベルの者または *S. sobrinus* の検出される者では, DMFT が高いことが確認された.

謝辞：なお、本研究の一部はベンチャー研究開発拠点整備事業補助金、平成15年度日本大学松戸歯学部鈴木研究費（一般研究、03-1008）および平成13年度選定学術フロンティア推進事業補助金により実施された。

文 献

- 1) Hirose H, Hirose K, Isogai E et al. : Close association between *Streptococci sobrinus* in the saliva of young children and smooth surface caries increment. *Caries Res* 27 : 292-297, 1993.
- 2) 藤原 卓, 武井 勉, 河野仁美ほか：日本人小児の唾液より分離される *Streptococci sobrinus* の諸性状と齲蝕罹患状態との相関について, 小児歯誌 26 : 556-563, 1988.
- 3) Köhler B, Bjarnason S : *Mutans streptococci*, lactobacilli and caries prevalence in 11- and 12-year-old Icelandic children. *Community Dent Oral Epidemiol* 15 : 332-335, 1987.
- 4) Babbahmady KG, Challacombe SJ, Marsh PD et al. : Ecological study of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* and *Lactobacillus* spp. at sub site from approximaldent-alplaque from children. *Caries Res* 32 : 51-58, 1998.
- 5) Hanada N : Current understanding of the cause of dental caries. *Jpn J Infect Dis* 53 : 1-5, 2000.
- 6) Loesche WJ : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol Rev* 50 : 353-380, 1986.
- 7) 福島和雄：口腔微生物学・免疫学, 5章 7-II う蝕の細菌学, 医歯薬出版, 東京, 2000, 265-273 頁.
- 8) 福島和雄：う蝕の原因菌研究の現状—*S. sobrinus* を中心にして—/歯界展望別冊 89(2), 医歯薬出版, 東京, 1997, 325-335 頁.
- 9) van Palenstein Helderma WH, Matee MIN, van der Hoeven JS et al. : Cariogenicity depends more on diet than the prevailing mutans streptococcal species. *J Dent Res* 75 : 535-545, 1996.
- 10) Gold OG, Jordan HV, Van HJ : A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 18 : 1357-1364, 1973.
- 11) Bratthall D : クリニカルカリオロジー 8章 リスク判定の科学的背景, 医歯薬出版, 東京, 第1版, 1996, 232-251 頁.
- 12) 福島和雄：ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, 第3部1章 ミュータンスレンサ球菌の分離同定法, クインテッセンス出版, 東京, 2003, 62-81 頁.
- 13) 井田博久, 花田信弘, 佐藤 勉ほか：ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, 第3部2章 ミュータンスレンサ球菌選択培地の改良と新検査システムの確立, クインテッセンス出版, 東京, 2003, 82-89 頁.
- 14) 金子 昇, 宮崎秀夫：ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, 第3部3章 改良MSB培地を用いたう蝕疫学調査, クインテッセンス出版, 東京, 2003, 90-97 頁.
- 15) 安藤俊史, 佐藤泰則：ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, 第3部4章 改良培地と新検査システムの臨床応用, クインテッセンス出版, 東京, 2003, 98-105 頁.
- 16) 日本学校歯科医会：学校における歯・口腔の健康診断（平成7年度改正編）, 1995.
- 17) Okada T, Tomita Y, Namiki Y et al. : Species constitution of mutans streptococci isolated from caries-susceptible and caries-free students. *J Dent Res* 74 : SI, 501, 1995.
- 18) 村田宣弘：高齲蝕罹患経験者と非・低齲蝕罹患経験者から分離される *Mutans Streptococci* の菌数と菌種について, 日口診誌 9 : 25-34, 1996.
- 19) 後藤田宏也：齲蝕活動性試験法に関する研究—高齲蝕群と無齲蝕群における唾液流量, 唾液緩衝能および齲蝕細菌数—. *日大口腔科学* 29, 194-206, 2003.

著者への連絡先：後藤田宏也 〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1 日本大学松戸歯学部衛生学講座
TEL・FAX：047-360-9356
E-mail：hiroya@mascut.nihon-u.ac.jp

Estimation of the Improved Selective Medium for *mutans Streptococci*

Hiroya GOTOUDA^{*,††}, Kyoko MIZUNO^{*}, Chieko TAGUCHI^{*}, Kazumune ARIKAWA^{*,††},
Seigo KOBAYASHI^{*,††}, Kumiko MONZAWA^{**}, Mimeko SAITO^{**}, Hirohisa IDA^{***},
Kagumi UESU^{†,††} and Kazuo FUKUSHIMA^{**,††}

^{*}Department of Hygiene, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

^{**}Department of Bacteriology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

^{***}Bio Medical Laboratories

[†]Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

^{††}Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Abstract : MSB media are frequently used for counting and detection of *mutans Streptococci*. In recent years, improved MSB media have been developed by improving the demerits of existing MSB media (poor selectivity). In this study, we examined usefulness of improved MSB media for selectivity and the correlation between the levels of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in saliva and the prevalence of caries using improved MSB media and drew the following conclusions.

1. There were almost no differences in the ratio of the number of subjects positive for *S. mutans* and *S. sobrinus* in saliva when comparing the conventional medium with the improved medium. The improved medium was slightly superior to the conventional medium in terms of the mean count of detected microorganisms. On the other hand, the ratio of the number of subjects and the mean detection count for Non-MS microorganisms were significantly lower in the improved medium. When the numbers of microorganisms detected in the MSB medium and the improved MSB medium were compared, A positive correlation was noted for *S. mutans* and *S. sobrinus*.

2. A significant difference in the mean DMFT was observed depending on whether the percentages of *S. mutans* out of the total *Streptococcus* count was low or high. Significant differences were also observed in the mean DMFT between the groups in which *S. sobrinus* was detected and was not detected.

J Dent Hlth 55 : 89 – 94, 2005

Key words : Improved MSB media, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, The prevalence of caries

Reprint requests to T. GOTOUDA, Department of Hygiene, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1, Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

TEL · FAX : 047-360-9356/E-mail : hiroya@mascat.nihon-u.ac.jp

Study of Salivary Volumes by the Modified Ion Dilution Method

Hiroya Gotouda,^{1,5} Hirofumi Sasai,^{2,5} Chieko Taguchi,¹ Jing Wang,¹ Kazumune Arikawa,^{1,5}
Kayo Kuyama,^{3,5} Junichi Mega,^{4,5} Hirotsugu Yamamoto,^{3,5} and Seigo Kobayashi^{1,5}

Departments of ¹Public Health, ²Oral Medicine, ³Pathology, ⁴Dentistry for the Disabled, and ⁵Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Correspondence to :

Hiroya Gotouda

E-mail : hiroya@mascad.nihon-u.ac.

jp

Keywords :

salivary volume, the modified fluoride dilution method, reproducibility, correlations

Abstract

There have been many studies on the relationships among various methods for determining whole salivary volume and these methods' effectiveness. The methods of determining this volume include those that determine the salivary volume of a subject at rest and during salivary stimulation. The conventional method uses both the spitting method at rest and the paraffin mastication method. In the present study, we compared the reproducibility of the salivary volumes determined by the modified ion dilution method (the modified fluoride dilution method) and conventional methods. Salivary volumes in decreasing order were sour stimulation with the modified fluoride dilution (MFD) method, during mastication, under tasteless stimulation with the MFD method, and at rest. Higher correlations were found between the salivary volumes at rest and during mastication determined by the conventional method ($r=0.57$, $p<0.001$) and between salivary volumes under tasteless stimulation and sour stimulation by the MFD method ($r=0.56$, $p<0.001$). With a collection time of 1 minute, the MFD method featured a smaller coefficient of variation and higher reproducibility than those of the spitting and paraffin mastication methods, indicating its usefulness.

Introduction

Saliva plays an important role in maintaining the health of the oral cavity and a lower salivary volume has been reported to increase the risk of oral cavity diseases such as caries and periodontosis (1-4). It would be useful to measure and evaluate salivary volume reliably, for maintenance of oral cavity health.

Many studies have examined the relationships among various methods for determining whole salivary volume and these methods' effectiveness (5). The methods of determining whole salivary volume include those that determine the salivary volume of a subject at rest and during salivary stimulation. The methods for measuring the whole salivary volume at rest include the drainage method, spitting method, suction method, and swab method, while those for determining whole salivary volume during salivary

stimulation include the mastication method and taste method. Of these, the conventional methods are the spitting method and paraffin mastication method. The author previously examined salivary volume with the modified ion dilution method (the modified fluoride dilution method) for measurement that was developed and modified based on the method of Weatherell et al. (6) and reported its usefulness in permitting simultaneous collection of saliva from many persons and its simplification of salivary volume measurement by sour stimulation (7). However, no comparative study was made between this method and conventional methods.

In the present study, the relationships among the salivary volumes determined by the modified fluoride dilution (MFD) method and the conventional methods and these methods' reproducibilities were compared.

Materials and Methods

Subjects and salivary collection times

Saliva samples were collected from 5 women (average age, 20.5 years) between 14:00 and 17:00 for evaluation of reproducibility.

Separately, saliva samples were collected from 70 students (35 men and 35 women with an average age of 21.6 years) in our school between 14:00 and 16:00 in a larger-scale study for investigation of salivary volume. The present study was conducted upon approval (EC 02-029) by the Ethics Committee of the School of Dentistry at Matsudo, Nihon University. The subjects, who were provided with an adequate explanation, freely agreed to participate in the study.

Salivary collection for the modified fluoride dilution method

A sodium fluoride solution (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) containing fluoride ion at a concentration of 100 ppm was used as a tasteless stimulation solution and a solution of the 100 ppm fluoride solution additionally containing tartaric acid (Wako Pure Chemical Industries) at a concentration of 10 mM was used as an sour stimulation solution according to the method of Weatherell et al. (6). After the subjects performed thorough mouthwashing with distilled water, they gently gargled 5.0 ml of the tasteless stimulation solution under the tongue for 1 minute and expectorated the solution into a paper cup. The samples of the saliva obtained with sour stimulation were collected in a similar manner. Separately, saliva samples were collected from the selected five women; their mouths were then immediately washed with water and after 5 minutes, saliva samples were collected again in a similar manner. The same procedure was repeated up to 10 times.

Methods of determination of fluoride ion concentration and calculation of salivary volume

The fluoride ion concentration in each sample recovered was determined by adding 0.2 ml of total ionic strength adjustment buffer III™ (Orion, Beverly, MA, USA) to 2.0 ml of the recovered saliva sam-

ple and measuring the concentration using a specific fluoride ion-sensitive electrode (Orion) connected to an Orion 290A™ ion analyzer. The fluoride ion electrode was calibrated using fluoride ion standard solutions (Orion) containing fluoride ion at 1, 10, and 100 ppm. The salivary volume was calculated according to the method of Weatherell et al. (6). The following is a summary of the method. When the fluoride ion concentration in the gargle solution is designated as "F" (ppm), the volume as "V" (ml), the fluoride ion concentration of the spit solution as "f" (ppm), and the salivary volume per minute (including the salivary volume remaining in the oral cavity immediately before mouthwashing) as "X" (ml), the amount of spit solution is [V + X]. At the time of expectoration, the following equation is satisfied:

$$F \times V = f \times [V + X]$$

Consequently, the salivary volume "X" (ml) can be calculated from the following equation:

$$X = \{ [F \times V] / f \} - V$$

Measurement of salivary volume of subjects at rest

The salivary volume was determined according to the spitting method (5). After swallowing all saliva in the oral cavity, subjects were encouraged to expectorate all saliva secreted while the mouth was shut (once or twice per minute). The saliva samples were collected in a paper cup and salivary volume was determined. The five women washed their mouth immediately after the first collection of saliva and another saliva sample was collected in a similar manner after 5 minutes. The same procedure was repeated up to 10 times.

Measurement of salivary volume with mastication

Each subject was encouraged to masticate paraffin wax and the saliva secreted during a period of 1 minute was collected in a paper cup (5); salivary volume was then determined. The five women repeated the same procedure every 5 minutes up to 10 times, washing their mouths immediately after each collection of saliva.

Statistical analysis

For statistical analysis, coefficients of variation were determined for comparisons of reproducibility and Pearson's correlation coefficient test was performed for correlation analysis.

Results

The mean±SD of the salivary volume was determined by four methods: at rest, during mastication, and with tasteless and sour stimulations with the MFD method. The results for the five subjects in 10 repeated runs are summarized in Table 1. In all subjects, the salivary volume was the highest with sour stimulation as determined by the MFD method and the resting salivary volume the lowest. The mean coefficients of variation of the 10 measured values of the subjects tested by the four methods are summarized in Table 2 and the overall means are shown in Fig. 1. The overall means of the coefficient of variation were 39.4% for subjects at rest, 19.4% during mastication, 14.6% with tasteless stimulation,

and 10.3% with sour stimulation as determined with the MFD method; the coefficient of variation decreased and reproducibility increased with the same order of the four methods.

Results of the larger-scale test involving 70 subjects concerning measurement of salivary volume by four methods are summarized in Table 3. The salivary volumes in decreasing order were with sour stimulation, during mastication, with tasteless stimulation, and at rest. Table 4 presents the correlations between the four methods on the determination of

Table 1. Mean salivary volume (Mean ±SD, ml/min) determined of 10 measurements by 4 methods for 5 subjects

Subjects	resting	mastication	tasteless stimulation	sour stimulation
	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
A	0.31±0.14	0.47±0.11	0.62±0.07	1.44±0.14
B	0.43±0.19	3.53±0.50	1.70±0.23	4.55±0.49
C	0.33±0.12	0.60±0.14	0.91±0.19	2.30±0.37
D	0.36±0.18	1.03±0.16	1.06±0.15	4.37±0.30
E	0.28±0.06	1.17±0.24	0.91±0.12	2.43±0.19

Table 2. Coefficients of variation of 10 salivary volumes measurements determined by 4 methods for 5 subjects

Subjects	resting	mastication	tasteless stimulation	sour stimulation
	CV (%)	CV (%)	CV (%)	CV (%)
A	45.2	23.4	11.3	9.7
B	44.2	14.2	13.5	10.8
C	36.4	23.3	20.9	16.1
D	50.0	15.5	14.2	6.9
E	21.4	20.5	13.2	7.8



Fig. 1. Comparison of mean coefficients of variation of salivary volumes determined by 4 methods for 10 measurements in 5 subjects

Table 3. Salivary volume determined by 4 methods in a study involving 70 subjects

Subjects	n	resting	mastication	tasteless stimulation	sour stimulation
		Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD
Men	35	0.39±0.33	1.77±0.83	1.21±0.39	3.01±0.72
Women	35	0.33±0.30	1.54±0.80	1.15±0.34	2.78±0.72
Total	70	0.36±0.32	1.66±0.82	1.18±0.36	2.89±0.72

Table 4. The correlation values between 4 methods in determination of salivary volumes in 70 subjects

	resting	mastication	tasteless stimulation	sour stimulation
resting	—			
mastication	0.57***	—		
tasteless stimulation	0.35**	0.27*	—	
sour stimulation	0.38**	0.34**	0.56***	—

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

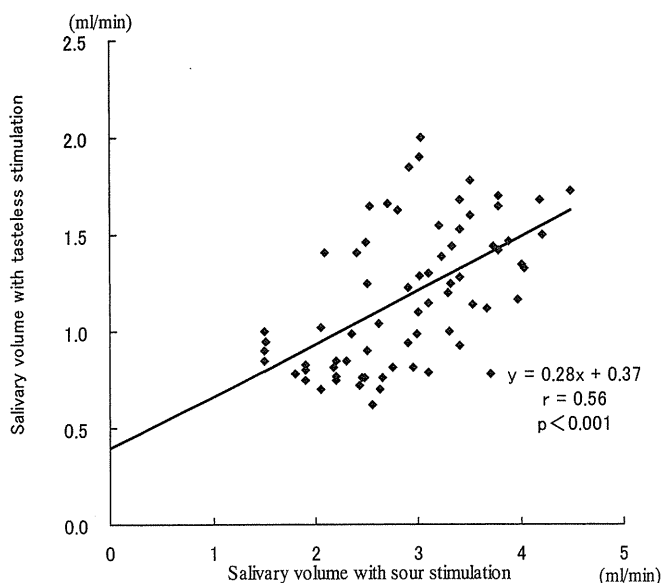


Fig. 2. Correlation between salivary volume with tasteless and sour stimulations in 70 subjects

salivary volumes and their significances in coefficient values. The correlations between values obtained with tasteless and sour stimulations by the MFD method and between those at rest and during mastication were higher (Figs. 2 and 3).

Discussion

Dawes (8) reported in his study on the circadian rhythm of human salivation that this rhythm is most stable with minimal variation between 2 and 4 p.m. For this reason, saliva samples were collected in this time period in the present study.

In the MFD method, saliva samples are collected in a standard period of 1 minute using a 5-ml mouth-

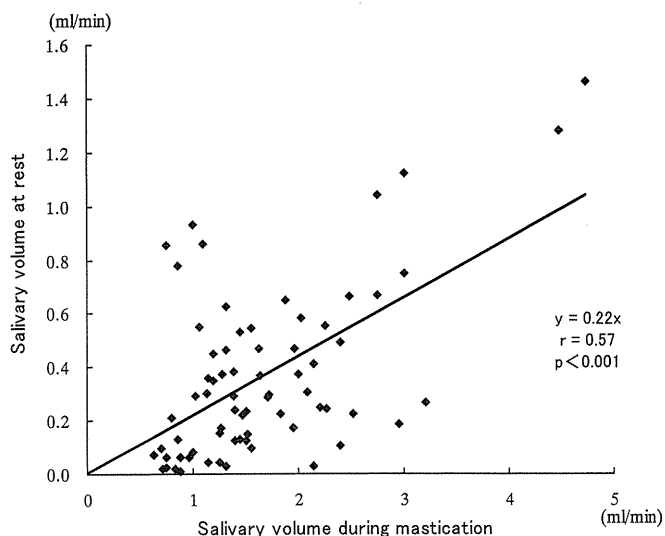


Fig. 3. Correlation between salivary volume at rest and during mastication in 70 subjects

wash fluoride solution so that samples can be collected from a larger number of subjects and salivary volume measurements can be performed in a simpler and easier way with sour stimulation (7). In this method, the conditions of stimulation (such as taste) during collection of saliva can be more rigorously standardized, and it is possible to collect a large number of samples easily from individuals able to gargle. For use in larger populations, conventional methods proposed so far have the problems of requiring a period of 3 to 5 minutes for collection of saliva (5), imposing a greater burden on subjects. As a result, the subjects swallowed their saliva during sample collection, reducing its accuracy. However, shortening of collection time generally decreases

reproducibility, and thus limits always exist as to how short the sample collection time can be. In the present study the reproducibilities of the salivary volumes of the subjects at rest and during mastication were investigated for the purpose of determining the usefulness of the MFD method. The MFD method featured a lower coefficient of variation and higher reproducibility in the test with a collection time of 1 minute. These findings indicate that the MFD method can reduce salivary collection time and improve the reproducibility of salivary volume measurement and thus is useful in practice. In particular, salivary volume with sour stimulation as measured by the MFD method was the highest in reproducibility. The stimulations commonly used can be roughly grouped into two types: mastication and taste (5, 9). Watanabe et al. (10) reported that salivary volume was influenced more by taste stimulation than by mechanical masticatory stimulation. Among taste methods, the one commonly used is stimulating the tongue with a sour material intermittently (5, 11). However, sour stimulation measurement has the drawback of requiring a complicated and tedious collection procedure and thus imposes a greater burden on subjects. The MFD method eliminates these drawbacks and makes the measurement possible with a simple mouthwashing procedure. Increase in the amount of mouthwash from 1 ml, as in the method of Weatherell et al., to 5 ml leads to a wider area of tongue receiving the taste stimulation and thus makes measurement more effective.

Many studies have examined salivary volume by various methods of measuring whole salivary volumes and their correlations (5). Ericsson et al. (12) reported that salivary volume at rest was 0.30 ml/min and that salivary volume during paraffin mastication was 1.50 ml/min on average. Heintze et al. (13) found that resting (drainage) salivary volume was 0.36 ml/min in men and 0.26 ml/min in women, and that salivary volume during mastication was 1.80 ml/min in men and 1.40 ml/min in women. They also found that salivary volumes at rest (drainage) and during stimulation (mastication) correlated well (men, $r=0.49$; women, $r=0.42$). Österberg et al. (14)

reported in their study of elderly adults that the resting (drainage) salivary volume in men was 0.25 ml/min and 0.18 ml/min in women, while the salivary volume during stimulation (mastication) in men was 1.65 ml/min and 1.04 ml/min in women. The salivary volumes at rest (drainage) and during stimulation (mastication) correlated well (men, $r=0.58$; women, $r=0.51$). White (15) concluded that salivary volumes during mastication and at rest were more strongly correlated ($r=0.72$) in his comparative study. In the present study involving 70 subjects, the mean salivary volume at resting was 0.36 ml/min and 1.69 ml/min during paraffin mastication, both of which were similar to the values reported in previous studies. In addition, the mean salivary volume with tasteless stimulation was 1.18 ml/min and 2.89 ml/min with sour stimulation as determined by the MFD method; and salivary volumes in decreasing order were sour stimulation, mastication, tasteless stimulation, and at rest. Although the four methods were found to be significantly correlated with each other, the correlations between the salivary volumes at rest and during mastication determined by the conventional method ($r=0.57$) and between salivary volumes with tasteless and sour stimulations by the MFD method ($r=0.56$) were higher; on the other hand, the correlation between the salivary volumes during mastication and with tasteless stimulation was lower.

In the present study, salivary volumes in decreasing order were sour stimulation by the MFD method, mastication, tasteless stimulation by the MFD method, and at rest. The correlations between salivary volumes at rest and during mastication determined by the conventional method and between salivary volumes with tasteless and sour stimulation by the MFD method were higher. The results obtained with a collection time of 1 minute revealed that the MFD method had a lower coefficient of variation and higher reproducibility than those of the spitting method and the paraffin mastication method. In addition, the MFD method allows measurement of the salivary volume remaining in the oral cavity, which is difficult with the spitting and mastication methods, as well as measurement of saliva in smaller

amounts (16, 17), for example in elderly adults, by collecting saliva samples for a shorter period of time without imposing a burden on subjects, and thus the MFD method would be suitable for epidemiological surveys. The authors will continue to examine the possibility of using this modified method in the field of public health and epidemiological studies, which typically include larger numbers of subjects.

Acknowledgments

A part of this study was supported by a grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote the 2001-Multidisciplinary Research Project (in 2001-2005)

References

1. Mandel ID and Wotman S : The salivary secretions in health and disease. *Oral Sci Rev*, 8 : 25-47, 1976.
2. Imfeld T : Oligosialia and xerostomia. I. Basic principles, epidemiology, etiology, pathology. *Schweiz Mschr Zahnmed*, 94 : 741-754, 1984.
3. Fox PC, van der Ven PF, Sonies BC, Weiffenbach JM, Baum BJ : Xerostomia : evaluation of a symptom with increasing significance. *J Am Dent Assoc*, 110 : 519-525, 1985.
4. Leo MS : Xerostomia : diagnosis, management, and clinical complications. In : Edgar VM and O'Mullane, editors. *Saliva and Oral Health*, 2nd edition. British Dental Association, London, 1996, p.43-66.
5. Downen B and Ulf H : Chapter 2 : Salivary secretion rate, buffer capacity, and pH. In : Tenovuo JO, editor. *Human Saliva Clinical Chemistry and Microbiology*, Volume I. CRC Press, Florida, 1989, p.25-73.
6. Weatherell JA, Strong M, Robinson C, et al. : Determination of volumes of fluid in the mouth by fluoride dilution. *Caries Res*, 26 : 94-97, 1992.
7. Gotouda H : Study on methods to assess caries activity-volume of saliva, salivary buffer capacity, and cariogenic bacteria level in caries-susceptible group and caries-free group. *Nihon Univ J Oral Sci*, 29 : 194-206, 2003.
8. Dawes C : Circadian rhythms in human salivary flow rate and composition. *J Physiol*, 220 : 529-545, 1972.
9. Hirasawa M : Studies on salivary flow rates in children-response to taste stimulation and bite force of primary teeth. *Jpn J Ped Dent*, 38 : 93-103, 2000.
10. Watanabe S and Dawes C : The effect of different foods and concentrations of citric acid on the flow rate of whole saliva in man. *Arch Oral Biol*, 33 : 1-5, 1988.
11. Chauncey HH, Feller R, Pshannon IL : Measurement of human Gustatory perception using the parotid gland secretion rate, In : *Taste and Olfaction II*, Oxford Pergamon Press ; 1967, p.265-280.
12. Ericsson Y and Hardwick L : Individual diagnosis, prognosis, and counseling for caries prevention. *Caries Res*, 12 (Suppl. 1) : 94-102, 1978.
13. Heintze U, Birkhed D, Bjorn H : Secretion rate and buffer effect of resting and stimulated whole saliva as a function of age and sex. *Swed Dent J*, 7 : 227-238, 1983.
14. Osterberg T, Landahl S, Hedegard B : Salivary flow, saliva, pH, and buffering capacity in 70-year-old men and women. Correlation to dental health, dryness in the mouth, disease, and drug treatment. *J Oral Rehabil*, 11 : 157-170, 1984.
15. White KD : Salivation : a review and experimental investigation of major techniques. *Psychophysiology*, 14 : 203-212, 1977.
16. Wolff A, Gadre A, Begleiter A, Moskona D, Cardash H : Correlation between patient satisfaction with complete dentures and denture quality, oral condition, and flow rate of submandibular/sublingual salivary glands. *Int J Prosthodont*, Jan-Feb 16 : 45-48, 2003.
17. Sato E, Mataga I, Kato J : Xerostomia in geriatrics (part 1) : Epidemiological and salivary functional study. *J Jpn Stomatol Soc*, 38 : 29-46, 1989.

原 著

歯科用探針を代用する DIAGNOdent®の有用性について

後藤田宏也^{*,***} 田口千恵子^{*} 内山 敏一^{*} 有川 量崇^{*,***}
山内 里央^{*} 小林 清吾^{*,***} 佐久間汐子^{**} 上江洲香實^{****,*****}

概要：半導体レーザーを用いたう蝕診断器：DIAGNOdent®は非破壊的に微細なう蝕病変を検出できるため、初期う蝕または前臨床う蝕の診断に使用できることが期待される。臨床診断における DIAGNOdent®の有用性はいくつか報告されているが、小窩裂溝部における Sticky 感の有無との対応を検討したものはない。Sticky 感の有無はシーラントなど積極的予防処置適応歯の条件として有用とされてきたが、この判定に歯科用探針を用いることに問題があった。そこで今回われわれは、Sticky 感の有無と DIAGNOdent®測定値の関係について、臨床評価や使用基準を評価する目的で小学校児童を対象に臨床疫学的な検討を行った。その結果、DIAGNOdent®値の Cut-off point を設定し、感度と特異度を検討した結果、Cut-off point を 15, 20, 25, 30 としたときの Sticky (+), Sticky (-) のそれぞれの感度は 0.89, 0.78, 0.63, 0.48, 特異度は 0.61, 0.74, 0.80, 0.84 となった。また DIAGNOdent®値 20 での Cut-off point における kappa 値は 0.49 と最大で、陽性反応適中率は 60%, 陰性反応適中率は 87% となった。Sticky 感のない健全歯の検出に比較的高い有効性が認められた。

索引用語：DIAGNOdent®, 歯科用探針, 初期う蝕診断, Sticky 感

口腔衛生会誌 55 : 159-164, 2005

(受付：平成 16 年 9 月 30 日 / 受理：平成 17 年 5 月 25 日)

緒 言

選択的シーラント処置 (Target sealant) 適用の判定基準として、シャープな歯科用探針による Sticky 感の有無が有用とされてきた¹⁾。一方、シャープな歯科用探針による歯質の破壊および歯質の石灰化を阻害するなどの弊害が議論されている^{2,3)}。探針を使用しない視診や CPI プローブを用いて診査する方法などが試みられているが、Sticky 感の検出はシャープな歯科用探針を用いず予測することはできない。また、視診・触診型診査は術者の感覚や経験により診断が左右され、判定精度の問題がある。電気伝導度測定 (ECM) によるう蝕診断は、診断精度に優れているが⁴⁾、装置の大きさ、測定時に要求される条件の厳密さから臨床的には限界がある。そこで KaVo 社により開発された半導体レーザーを用いたう蝕診断器：DIAGNOdent®は、非破壊的に微細なう蝕病変を検出できるため、初期う蝕の診断に使用できることが期待される。臨床診断における DIAGNOdent®の有用性は報

告されているが⁵⁻⁹⁾、Sticky 感の有無との対応を検討したものはない。そこで今回われわれは、小学校児童を対象に Sticky 感の有無と DIAGNOdent®測定値の関係について臨床疫学的な検討を行った。

対象および方法

1. 対象

対象者は沖縄県一地区の学童で、学校歯科健診において健全または要観察歯 (CO) と診断された永久歯臼歯をもつ者 39 名 (男子：18 名, 女子：21 名, 平均年齢 9.3 ± 2.0 歳) とした。また本調査においては、事前に十分な調査目的を説明し、調査に参加することに自由意志に基づく同意が得られた 39 名の保護者の児童を対象とした。対象歯は 75 歯 (上顎小・大白歯：35 歯, 下顎小・大白歯：40 歯) で、195 のう窩の形成が認められない小窩裂溝部より測定値を得た (表 1)。

2. 測定方法

学校歯科医の診療室で対象者をデンタルチェアに座ら

* 日本大学松戸歯学部社会口腔保健学講座

** 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔健康科学講座

*** 日本大学松戸歯学部口腔科学研究科

**** 日本大学松戸歯学部数学講座

せ, 十分な照明のもとで臨床経験 30 年の同一診査者が水平位にて歯面をエアにて乾燥後, 小窩裂溝部を視診にて, う窩の有無, 色調(着色, 白濁)について診査を行った. 対象部位の歯面を乾燥し, 清掃を目的として AD

ゲル®(クラレ, 倉敷)を使用後, DIAGNOdent® (Kavo, Germany) の小窩裂溝用プローブ (A プローブ) にて測定を行い, ピーク時の値 (測定回数は 1 回) にて D 値の決定値とした. 続いてエキスポローラー (#9, ワイディエム, 東京) の歯科用探針にて, 控えめな圧 (約 100-150 g) で Sticky 感の有無 [以下: Sticky (+), Sticky (-)] を判定した.

表 1 歯種別対象小窩裂溝部数

歯種	合計
5	1
5	1
6	47
6	46
6	46
6	48
7	3
7	3
	195

3. 統計解析

DIAGNOdent®値 (以下, D 値) の Cut-off point を 15, 20, 25, 30 の設定時に対する Sticky (+), Sticky (-) の kappa 値, 敏感度, 特異度, 陽性反応適中率, 陰性反応適中率を求めた.

結 果

1. Sticky (-) および Sticky (+) の対象歯における DIAGNOdent®値の度数分布

触診による Sticky (-) および Sticky (+) 歯の D

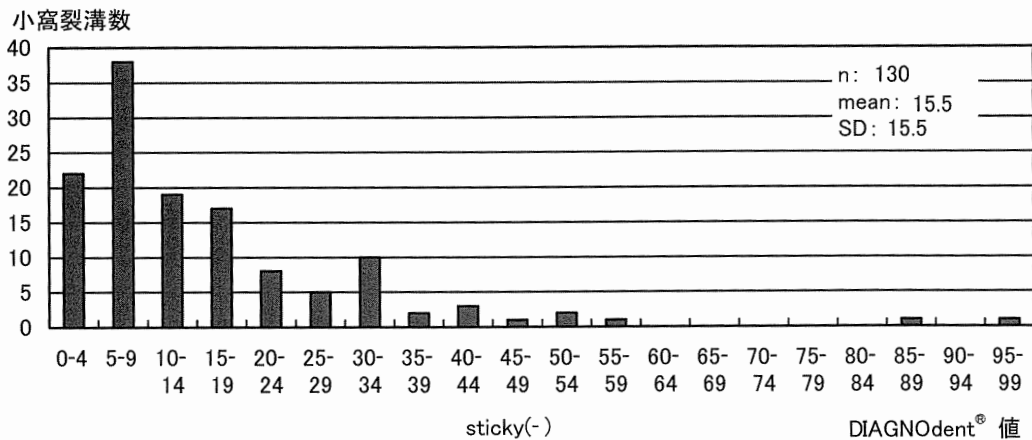


図 1 「Sticky (-)」の時の DIAGNOdent®値の度数分布

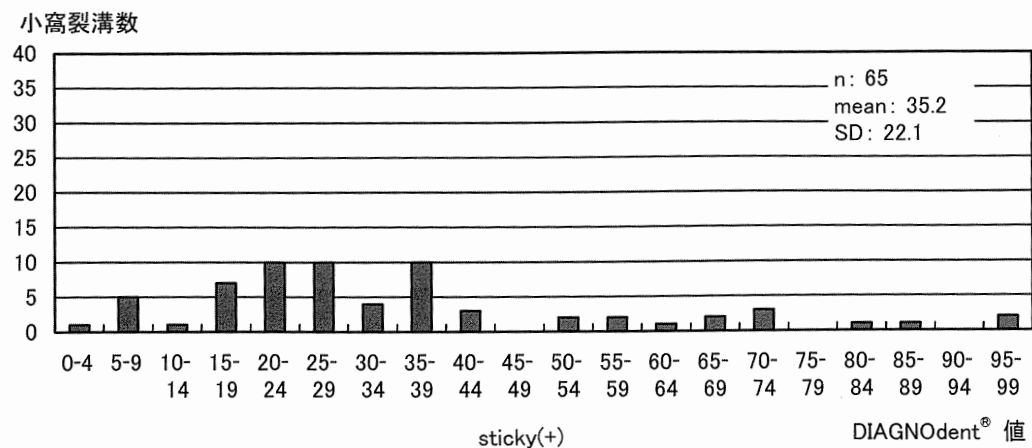


図 2 「Sticky (+)」の時の DIAGNOdent®値の度数分布

表2 DIAGNOdent[®]値と Sticky (+), (-) の関係 (cut-off point : 15)

		Sticky		計
		(+)	(-)	
DIAGNOdent [®] 値	15 以上	58	51	109
	0 ~ 14	7	79	86
計		65	130	195

kappa = 0.43 (p < 0.05)

敏感度 = 0.89, 特異度 = 0.61, 陽性反応適中率 = 53%, 陰性反応適中率 = 92%

表3 DIAGNOdent[®]値と Sticky (+), (-) の関係 (cut-off point : 20)

		Sticky		計
		(+)	(-)	
DIAGNOdent [®] 値	20 以上	51	34	85
	0 ~ 19	14	96	110
計		65	130	195

kappa = 0.49 (p < 0.05)

敏感度 = 0.78, 特異度 = 0.74, 陽性反応適中率 = 60%, 陰性反応適中率 = 87%

値の度数分布を順に図1, 2に示した。触診による Sticky(-)の小窩裂溝数は130症例で, D値は15.5±15.5(以下, 平均±標準偏差)であった。D値0~34を示す症例が全体の91.5%を占め, D値5~9の症例が最頻値を示した(図1)。

Sticky(+)の小窩裂溝数は65症例で, D値は35.2±22.1であった。D値が15~44の頻度が全体の67.7%を占めた。またD値50以上の症例も少数ではあるが存在していた(図2)。Sticky(+)のD値は, Sticky(-)のD値と比較してばらつきが大きかった。

2. DIAGNOdent[®]値による Sticky (+) または Sticky(-) のスクリーニング精度

D値のCut-off pointを15, 20, 25, 30にした場合, kappa値はそれぞれ0.43(p<0.05), 0.49(p<0.05), 0.43(p<0.05), 0.33(p<0.05)であり, 最も高いものでも中等度の一致率にとどまった。D値のCut-off pointを15, 20, 25, 30にした場合のSticky(+), Sticky(-)における敏感度, 特異度, 陽性反応適中率および陰性反応適中率をそれぞれ表2~5に示した。Cut-off pointを20としたときの敏感度は0.78, 特異度は0.74, 陽性反応適中率は60%, 陰性反応適中率は87%であった。

考 察

視診に比べシャープな歯科用探針はう蝕の検出精度を向上させると考えられてきた¹⁰⁾。また, う蝕進行度の疫学調査¹¹⁾や, 効率的にカリエス・フリーを育てるためのシーラント応用のリスク歯スクリーニング¹²⁾に, 歯科用探針によるSticky感は有用であると報告されている。

一方, 歯科用探針の加圧操作により歯質破壊が生ずることから, 原則として尖端の鋭利な歯科用探針は使用しない方針が主流になってきた²⁾。歯質を破壊しない方法で診断精度を向上させる目的で, X線¹³⁻¹⁶⁾, 電気伝導度¹⁷⁻¹⁹⁾, 透過光^{20,21)}, レーザー²²⁾などを利用した診断器が開発されてきた。

なかでもDIAGNOdent[®]はレーザー光を用いて非破壊的にう蝕を感知する装置で, 発振波長655nmのレーザー波長光を被検歯面に照射すると, う蝕部分が発する670~800nmの蛍光励起が生じる特徴を利用する。その蛍光励起強度を測定して, 検出結果を0~99の数字で表示し, その数値でう蝕の進行状況を判断する。またその特徴として, 光を利用するためにX線被曝の潜在的なリスクへの配慮が必要でなく, プローブを歯面に軽く接触させるか, 非接触で観察できるため, 不用意な探針操作で生じる, 再石灰化層の破壊の可能性²³⁻²⁵⁾もない。本装置

表4 DIAGNOdent®値と Sticky (+), (-) の関係 (cut-off point : 25)

		Sticky		計
		(+)	(-)	
DIAGNOdent®値	25 以上	41	26	67
	0 ~ 24	24	104	128
計		65	130	195

kappa = 0.43 (p < 0.05)

敏感度 = 0.63, 特異度 = 0.80, 陽性反応適中率 = 61%, 陰性反応適中率 = 81%

表5 DIAGNOdent®値と Sticky (+), (-) の関係 (cut-off point : 30)

		Sticky		計
		(+)	(-)	
DIAGNOdent®値	30 以上	31	21	52
	0 ~ 29	34	109	143
計		65	130	195

kappa = 0.33 (p < 0.05)

敏感度 = 0.48, 特異度 = 0.84, 陽性反応適中率 = 60%, 陰性反応適中率 = 76%

を用いたう蝕診断の利点として、小窩裂溝部での診断精度の改善、う蝕の進行経過の観察、初期う蝕の探知、適切な予防処置への利用、健康歯質の保存、適正な精度による診療の質および患者の信頼度の向上などがあげられる。

しかし、本装置の診断精度に関する評価の多くが抜去歯を対象としており⁵⁻⁸⁾、臨床評価や実際の使用基準が一定していない。本装置で表示される数値とう蝕との相関について、まだ明確な基準が確立しているとはいえない。そこで、今回は、初期う蝕の診断において、小学校児童を対象に Sticky 感の有無と DIAGNOdent®測定値の関係について臨床疫学的な検討を行った。

メーカーからどの程度の数値が象牙質う蝕なのか、病巣除去または修復治療を必要とするのかは示されていない。稲井は、初期う蝕の検知には、50 に設定することが有効であったと報告した²⁶⁾。千田らは、治療すべきう蝕の基準値として 18~25 の範囲を提唱している²⁷⁾。また熊谷は DIAGNOdent®の測定値と、彼の提唱する「トータルリスク・スコア」を重ね合わせて診断することで、初期う蝕に対する処置方針のガイドラインを求めようとしている²⁸⁾。

開発グループの 1 人である Lussi らは成人患者に対する DIAGNOdent®値の表示値により分類し、0~14：特に処置の必要なし、15~20：予防処置を勧める、21~30：

患者のカリエスリスクやリコール間隔などに応じて予防処置または保存修復治療を勧める、30 以上：保存修復治療(予防処置)を勧める、という治療方針を示した⁹⁾。本研究においては、永久歯の小白歯・大白歯の健全またはう蝕の形成が認められない CO と診断された小窩裂溝部を対象とした。その結果、Sticky (+) では D 値が 15~44 の分布が全体の 67.7% を占め、また D 値が 50 以上にも少数ではあるが分布しており、Sticky (-) の D 値と比較してばらつきが大きかった。Sticky (-) では D 値 5~9 の割合が最も分布が多く、0~34 の割合が全体の 91.5% を占めた。また、D 値の Cut-off point を設定し、Sticky (+), Sticky (-) に対する敏感度と特異度を検討した結果、Cut-off point を 15, 20, 25, 30 としたときのそれぞれの敏感度は 0.89, 0.78, 0.63, 0.48, 特異度は 0.61, 0.74, 0.80, 0.84 となった。また D 値 20 での Cut-off point における Sticky (+), Sticky (-) に対する kappa 値は 0.49 と最大となり、陽性反応適中率は 60%、陰性反応適中率は 87% となった。D 値が 19 以下であればほとんど Sticky (-) であり、D 値が 20 以上では 40% は Sticky (-) となった。

本研究では、Sticky (+), Sticky (-) のスクリーニングに活用するためには、DIAGNOdent®値における Cut-off point を 20 にすることが適当であると考えられた。DIAGNOdent®値が 19 以下だとシーラント対象外の

歯をスクリーニングすることが有用であると認められた(シーラント処置の対象歯から除く)。DIAGNOdent[®]値が20以上では探針を用いてシーラント処置を決定し、次回のリコール時に再診査および処置を行うことが合理的と考えられる。Lussiら⁹⁾は15~20:予防処置を勧める, 21~30:患者のカリエスリスクやリコール間隔などに応じて予防処置または保存修復治療を勧めるとしている。また千田ら²⁷⁾は20程度よりも小さい値が表示されたなら健全歯か要観察歯と考え、ほかの所見や症状あるいは患者のカリエスリスク, 社会的環境などを配慮したうえで判断するとしており, われわれの方針と対応している。本調査では, 要観察歯にはフッ化物塗布および口腔清掃指導を行い, Sticky (+)の歯にはシーラント処置を施した。今後は本研究の対象者の追跡調査を行い, その結果を検討する必要があると考えられる。

謝辞: なお本研究の一部は平成13年度学術フロンティア推進事業補助金, ベンチャー研究開発拠点整備事業補助金および新技術開発研究により実施された。

文 献

- 1) 葭原明弘, 小林清吾, 佐久間汐子ほか: フッ化洗口学童の第一大臼歯に対する合理的なシーラント応用について. 口腔衛生会誌 44: 260-266, 1994.
- 2) 「初期う蝕診断」における探針の意義に関する作業部会(零石聰ほか): 望ましい初期う蝕診断法. 口腔衛生会誌 50: 137-152, 2000.
- 3) WHO: Oral Health Surveys, Basic Methods. World Health Organization, Geneva, 4th ed., 1997.
- 4) Wang J, Sakuma S, Yoshihara A et al.: An evaluation and comparison of visual inspection, electrical caries monitor and caries detector dye methods in detecting early occlusal caries *in vitro* study. J Dent Hlth 50: 223-230, 2000.
- 5) 佐久間恵子, 高橋亨典, 須崎 明ほか: DIAGNOdent[™]応用に関する基礎的研究—エナメル質の厚さがう蝕の測定値に及ぼす影響—. 日歯保存誌 45: 1-8, 2002.
- 6) 須崎 明, 高橋亨典, 佐久間恵子ほか: DIAGNOdent[™]応用に関する基礎的研究—脱灰・コラゲナーゼ処理した象牙質に対する反応—. 日歯保存誌 43: 200-207, 2000.
- 7) 五十嵐 公, 俣木志朗, 黒崎紀正ほか: DIAGNOdent[®]の臨床的有用性. 日歯保存誌 42: 783-785, 1999.
- 8) 飯島洋一, 田中景子, 高木興氏: う蝕診断用レーザー機器によるエナメル質初期う蝕病変の診断. 口腔衛生会誌 49: 646-647, 1999.
- 9) Lussi A, Megert B, Longbottom C et al.: Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions. Eur J Oral Sci 109: 14-19, 2001.
- 10) 島田義弘: 集団歯科検診の実践, 医歯薬出版, 東京, 1990, p 1-9.
- 11) 小林清吾, 中村宗達, 川崎浩二ほか: フッ化物洗口学童における永久歯小窩裂溝部初期齲蝕の経時的推移について. 口腔衛生会誌 39: 217-231, 1989.
- 12) 田浦勝彦, 小澤雄樹, 浅沼 慎ほか: 初期齲蝕の検出に関する新しい考え方—歯科用探針は侵襲性の大きな齲蝕診査器具である—. 口腔衛生会誌 49: 145-150, 1999.
- 13) Wenzel A, Fejerskov O: Validity of diagnosis of questionable caries lesions in occlusal surface of extracted third molars. Caries Res 26: 188-194, 1992.
- 14) Gray GB, Paterson RC: Fissure caries diagnosis and resulting treatment decisions by clinical community dental officers and general dental practitioners. Eur J Prosthodont Restorative Dent 5: 23-29, 1997.
- 15) Ekstrand KR, Kuzmina I, Bjorndal L et al.: Relationship between external and histologic features of progressive stages of caries in the occlusal fossa. Caries Res 29: 243-250, 1995.
- 16) Weerheijm KL, Gruythuysen RJM, van Amerongen WE: Prevalence of hidden caries. J Dent Child 59: 408-412, 1992.
- 17) Ekstrand KR, Ricketts DNJ, Kidd EAM et al.: Detection, diagnosing, monitoring and logical treatment of occlusal caries in relation to lesion activity and severity: an *in vivo* examination with histological validation. Caries Res 32: 247-254, 1998.
- 18) Ricketts DNJ, Kidd EAM, Wilson RF: Electronic diagnosis of occlusal caries *in vitro*: adaptation of the technique for epidemiological purposes. Community Dent Oral Epidemiol 25: 238-241, 1997.
- 19) Ie YL, Verdonschot EH: Performance of diagnostic systems in occlusal caries detection compared. Community Dent Oral Epidemiol 22: 187-191, 1994.
- 20) Verdonschot EH, Bronkhorst EM, Burgersdijk RCW et al.: Performance of some diagnostic systems in examinations for small occlusal caries lesions. Caries Res 26: 59-64, 1992.
- 21) Gray GB, Paterson RC: Prediction of the extent of caries in pit and fissure lesions in a field trial in the west of Scotland. Caries Res 13: 329-335, 1997.
- 22) Lussi A, Imwinkelried S, Pitts NB et al.: Performance and reproducibility of a laser fluorescence system for detection of occlusal caries *in vitro*. Caries Res 33: 261-266, 1999.
- 23) Loesche WJ, Svanberg ML, Pape HR: Intraoral transmission of *Streptococcus mutans* by a dental explorer. J Dent Res 58: 1765-1770, 1979.
- 24) American Dental Association: Caries diagnosis and risk assessment, a review of preventive strategies and management. In personalizing caries risk assessment and diagnosis. J Am Dent Assoc 126: 4-9, 1995.
- 25) Barbakow F, Imfield T, Lutz F: Enamel remineralization: how to explain in to patients. Quintessence int 22: 341-347, 1991.
- 26) 稲井紀通: レーザーを応用したう蝕検知装置「DIAGNOdent[®]」. DE 129: 36-37, 1999.
- 27) 千田 彰, 佐久間恵子, 須崎 明: レーザーによるう蝕診断—DIAGNOdent[®]を用いて. 歯科評論 691: 80-84, 2000.
- 28) 熊谷 崇: カリオロジーの臨床実践. 歯科評論 692: 104-118, 2000.

著者への連絡先: 後藤田宏也 〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 日本大学松戸歯学部社会口腔保健学講座
TEL・FAX: 047-360-9356
E-mail: hiroya@mascat.nihon-u.ac.jp

Usefulness of DIAGNOdent® in Place of a Dental Probe

Hiroya GOTOUDA^{*,***}, Chieko TAGUCHI^{*}, Toshikazu UCHIYAMA^{*}, Kazumune ARIKAWA^{*,***},
Rio YAMAUCHI^{*}, Seigo KOBAYASHI^{*,***}, Shihoko SAKUMA^{**} and Kagumi UESU^{***,****}

^{*}Department of Community Oral Health, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

^{**}Division of Preventive Dentistry, Department of Oral Health Science,
Graduate School of Medical and Dental Sciences Niigata University

^{***}Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

^{****}Department of Mathematics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Abstract : The DIAGNOdent® , a new device for diagnosing caries using a semiconductor laser, has been shown to have the ability to detect even small carious lesions in a non-destructive manner, and is therefore expected to be useful for the diagnosis of incipient caries or preclinical caries. A few reports have indeed been published on the usefulness of DIAGNOdent® in the clinical diagnosis of caries. However, its usefulness for perceiving the presence or absence of a feeling of stickiness in pits and fissures has not been studied to date. Determination of the presence or absence of a feeling of stickiness in the teeth has been considered to be useful for determining whether or not aggressive preventive measures against caries, such as the use of sealants, are indicated. However, the use of a dental probe to assess such stickiness is associated with problems. Accordingly, we conducted a clinical epidemiological study of elementary school children to examine the usefulness of the DIAGNOdent® for assessing the stickiness of teeth and establishing criteria for the diagnosis. The kappa value, which indicates the correspondence between the presence or absence of stickiness and the DIAGNOdent® values, was the highest (0.49, indicative of a moderate correspondence ratio) when the DIAGNOdent® value of 20 was used as the cutoff point. Using the same cutoff point, the sensitivity was 0.78, the specificity was 0.74, the predictive value for positive responses was 60% and the predictive value for negative responses was 87%. Thus, a relatively high efficacy of DIAGNOdent® for detecting healthy teeth with no stickiness was demonstrated.

J Dent Hlth 55 : 159 – 164, 2005

Key words : DIAGNOdent®, A dental probe, The diagnosis of incipient caries, A feeling of stickiness

Reprint requests to H. GOTOUDA, Department of Community Oral Health, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1, Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

TEL · FAX : 047-360-9356/E-mail : hiroya@mascat.nihon-u.ac.jp