

研究成果物

2) 総説その他

Calcium Phosphate Deposition on Dentin Bonding Agent in Electrolyte Solution

T. Hayakawa,* K. Nemoto*, T. Sakae** (Nihon University, School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan)

* Department of Dental Materials

**Department of Anatomy

M. Yoshinari (Department of Dental Materials Science and Oral Health Science Center, Tokyo Dental College, Chiba, Japan)

Abstract

The aim of this study was to investigate mineral induction on a dentin bonding agent *in vitro*. The composition and properties of calcium phosphate deposited on a dentin bonding agent after immersion in electrolyte solution were investigated. Through X-ray diffraction, infrared spectrometry, electron probe microanalysis, and scanning electron microscopy, the main component of the calcium phosphate was determined to be carbonate-containing hydroxyapatite. Dentin bonding agents containing phosphate ester methacrylate have a possibility to induce calcium phosphate formation *in vivo*.

Introduction

Nowadays, dentin bonding agents are widely used for dental clinics. Most dentin bonding agents contain carboxylic acid or phosphoric acid ester monomers for improving their adhesiveness to tooth substrate. The polymers with phosphate groups will be expected to bind calcium ions under physiologic conditions. It has been reported that polymeric materials modified by surface graft polymerization of a phosphate-containing monomer produce a calcium phosphate layer that is firmly bonded with the material upon immersion in simulated physiologic solution.^{1,2} The polymer surface grafted with methacrylate phosphate monomer could first induce calcium ions and then form calcium phosphate layers onto the substrate under a physiologic condition.

The phosphate groups of phosphoric ester monomers in dentin bonding agents will be exposed on the surface after the curing of dentin bonding agents. On the basis of the above reports, it is expected that dentin bonding agents containing phosphoric acid ester will induce a calcium phosphate layer on the cured bonding agents by immersion in a simulated physiologic solution. If polymers with phosphate groups will form a calcium phosphate layer on the materials *in vivo*, they will be applicable as remineralization induction materials in dental clinics, for example, as a new type of direct pulp-capping material.

The aim of this study was to investigate mineral induction using a mineralization inductive solution on a dentin bonding agent *in vitro*. The composition and properties of

the calcium phosphate deposited on the dentin bonding agent after immersion in electrolyte solution were investigated.

Materials and Methods

As a dentin bonding agent, Clearfil Photobond (Kuraray, Osaka, Japan) was used. Clearfil Photobond contains methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP).³ Tape with a hole measuring 8 mm in diameter and 1 mm in thickness was placed on a Teflon mold. After mixing the universal and catalyst liquids of Clearfil Photobond, the mixture was applied inside the hole of the tape. The bonding agent was cured by 60-second photo irradiation using α -Light II (J. Morita, Tokyo) and heat cured at 50°C for 2 hours, then at 100°C for 30 minutes. The surface of the cured bonding agent was polished using No. 1,500 waterproof paper under running water in order to remove the residual monomers on the surface of the bonding agent. The cured Photobond disks were then immersed in 30 mL of electrolyte solution with pH = 7.4 at 37°C for 1, 3, 5, 7, 14, and 28 days in sealed polystyrene bottles. The electrolyte solution was Hanks balanced solution (HBSS) without organic species, which was proposed by Hanawa and Ota.⁴ The ion concentrations of HBSS (mmol/L) without organic species are as follows: Na⁺: 142, K⁺: 5.81, Mg²⁺: 0.811, Ca²⁺: 1.26, Cl⁻: 145, HPO₄²⁻: 0.778, SO₄²⁻: 0.811, and HCO₃⁻: 4.17. The solutions and bottle were exchanged every day to expose the specimens to fresh solution. Immediately after immersion, the specimens were

again washed by deionized water to remove electrolytes that they did not take up. The specimens were then immediately dried in a desiccator.

The products of the reaction experiment were analyzed by means of thin-film X-ray diffraction (XRD; thin-film attachment, Rigaku RINT 2000, Tokyo), Fourier transformed infrared spectrometer (FT-IR; Horiba FT-210, Tokyo), electron probe microanalysis (EPMA; Hitachi X-8010, Tokyo), and field-emission scanning electron microscope (SEM; Jeol JSM-6340F, Tokyo) observation.

Results

The formation of white precipitates was observed on the cured Photobond disk. The white precipitates became visible after 3 days of immersion in HBSS. After 7 days of immersion, the surface of the cured Photobond disk was almost covered with white substance layers.

XRD spectrum analysis after 7 days of immersion showed calcium phosphate formation on the cured Photobond disk. Major peaks could be assigned as 002, 210, 211, 112, 202, 310, 113, 222, and 213 of hydroxyapatite. XRD revealed that hydroxyapatite was deposited on the cured Photobond disk.

FT-IR spectrum after 7 days of immersion in HBSS showed two clusters of peaks at 569 and 602 cm^{-1} derived from P-O bending modes, and at 1,039 cm^{-1} derived from P-O (phosphate-oxygen) stretching mode. These peaks were attributed to the P-O bonds of calcium phosphate materials. The peaks derived from carbonate groups were also observed around 870 and 1,420 cm^{-1} , indicating that these carbonate groups were incorporated in the apatite structure. EPMA revealed that the components of the white precipitate were Ca, P, and O. After 1 day of immersion, a small amount of calcium-containing substances was observed on the Photobond disk. After 3 days of immersion, the amount of calcium increased to almost 10 times that of 1 day of immersion. The Ca:P ratio of the white substance was 1.41 after 3 days of immersion, 1.43 after 5 days of immersion, and 1.37 after 7 days of immersion.

SEM observation revealed that there was no precipitate formation on the Photobond surface after 1 day of immersion. After 3 days of immersion, the formation of precipitated globules was observed. The globules were scattered on the Photobond surface. After 7 days of immersion, the Photobond surface was completely covered with calcium phosphate globules. A large number of globules were fused together. Each globule was composed of a group of numerous thin, film-form flakes uniting

and/or clustering together. The size of flakes was between 100 and 200 nm. This type of crystal agglomeration was referred to as a card-house structure.

Discussion

This study revealed that calcium phosphate was formed on the cured Photobond disk after immersion in HBSS. Clearfil Photobond contains MDP, which is a phosphate methacrylate.³ Some phosphate groups exposed on the surface have a possibility to interact with calcium ions of HBSS. Afterward, phosphate ions are adsorbed on the calcium preadsorbed surface. The calcium phosphate layer is probably formed by repetition of this process.

The calcium phosphate formed on the Photobond disk was carbonate-containing hydroxyapatite according to the results of FT-IR, XRD, and EPMA. Hanawa and Ota⁴ found that calcium phosphate was deposited on titanium after immersion in HBSS and reported that the calcium phosphate was carbonate-containing hydroxyapatite. This result corresponds with our result. However, the other authors reported that carbonate-containing hydroxyapatite was obtained on a titanium surface after 60 days of immersion. In this study, we observed hydroxyapatite formation on the cured Photobond disk after 3 days of HBSS immersion macro- and microscopically. This was due to the difference of the surface chemistry of titanium and the Photobond disk, namely with or without a phosphate group.

It was concluded that calcium phosphate was formed on the cured Photobond after immersion in HBSS, and that the main component of the calcium phosphate was carbonate-containing hydroxyapatite. The results obtained in this study suggest that dentin bonding agents containing phosphate ester methacrylate have a possibility to induce calcium phosphate formation *in vivo*. The formation of calcium phosphate *in vitro* should be further investigated.

Acknowledgments

This study was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture to multidisciplinary research projects and grants-in-aid for Scientific Research (C) (2) (Nos. 11671817 and 12671904) from the Japan Society for the Promotion of Science, and by a Suzuki Memorial Grant of the Nihon University School of Dentistry at Matsudo, General Individual Research Grant (No. 01-1008). This study was also supported in part by Oral Health Science grant No. 992C01 from Tokyo Dental College.

References

1. Tretinnikov ON, Kato K, Ikada Y. *In vitro* hydroxyapatite deposition onto a film surface-grafted with organophosphate polymer. J Biomed Mater Res, 1994;28:1365-1373.
2. Kamei S, Naohide T, Tamai S, Kato K, Ikada Y. Histological and mechanical evaluation for bond bonding of polymer surfaces grafted with a phosphate-containing polymer. J Biomed Mater Res, 1997;37:384-393.
3. Fujisawa S, Kadoma Y, Komoda Y. HPLC separation of methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate from dental bonding agent. J Jpn Dent Mater, 1991;1:30-34.
4. Hanawa T, Ota M. Calcium phosphate naturally formed on titanium in electrolyte solution. Biomaterials, 1991;12:767-774.

① レーザーによる目の障害

日本大学松戸歯学部 保存修復学教室

池見宅司

高出力レーザーの認識と 歯科治療の特殊性

歯科臨床で高出力レーザーが使用されるようになり、事故防止のためにも歯科医師あるいは歯科医療従事者は、使用されているレーザー装置の特性をしっかりと把握しておく必要がある。一時期、ソフトレーザー（一般的に数mW～100mW程度）が顎関節症などの治療に好んで用いられていた。したがって、ソフトレーザーを使用した経験のある臨床家は、高出力レーザー（一般的に0.5W以上、レーザー製品のclass分け3B以上）をソフトレーザー感覚で使用するという誤った認識をもっていることもある。実際、高出力レーザーをソフトレーザーのように顎関節症などの疼痛緩和に用いることも可能であるが、その名のとおり出力がまったく異なり、高出力レーザーは破壊的な作用を有することを常に念頭に置かなければならない。

現在、歯科臨床で応用されている高出力レーザー装置はいずれもレーザー光を集束させており、チップ先端から出た光は平行光線とはならず、焦点から外側では拡散して、距離が離れるほどエネルギーは減弱する。しかし、至近距離では歯を削除したり、軟組織を切除するなどの強力なエネルギーを放出している。歯科治療の特殊性として、歯のような硬組織を削除するためには、高出力のレーザーが用いられること、施術範囲が患者の目に近い場所であること、また、治療時の術者と施術野の距離が近い場合が多いなどの理由で、とく

に注意が必要である。

次に、ある種のレーザー装置ではガイド光が組み込まれており、その光をレーザーそのものと勘違いしている場合も考えられる。各種レーザーのうち半導体、Nd:YAG、Er:YAG、CO₂レーザーは赤外領域の波長で、目に見えない光であることを知っておかねばならない。光が見えないからといって、これらの高出力レーザーを不注意に直接目に照射してしまうことも考えられるので注意を要する。強いエネルギーをもったレーザー光の衝撃波は瞬時に眼組織の一部を破壊してしまうので、レーザー光が発振されているかどうかを、感熱紙などを用いて確認するようにしなければならない。また、歯科治療ではデンタルミラーや金属製の器具を使用することから、それらによるレーザーの反射光は目に見えないがゆえに、後々目の障害となることが懸念される。

歯科医療の現場に高出力レーザーが頻繁に使用され始めたのはごく最近のことであるため、目の障害に関する長期にわたるデータはほとんどない。しかし、レーザーに関する認識不足あるいは慣れとともに無防備となった歯科医療従事者がいたとするならば、近い将来、それらの人の目に何らかの障害をもたらす可能性がないとも限らない。レーザーによる治療は軟組織の処置だけでなく窩洞形成にも応用され、その応用方法やレーザーの種類も増大していくものと思われ、正しい認識のもとにそれらの装置を使用するように心がけるべきである。

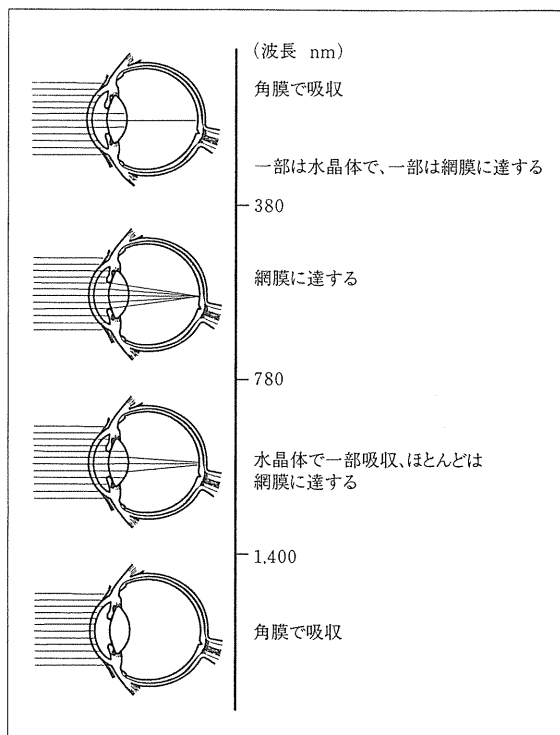
レーザーの種類と目の障害

人体において光を感知するのは目であり、目は他の組織に比べて機能の再生能力が弱く、不可逆的な変化を生じやすい。障害の程度はレーザーの波長、出力、出力モード（連続波、パルス波）によって異なるが、その障害は日常生活に及ぼす影響も大きく、歯科医師にとっては致命的な障害となることもある。そこで、眼球における光の吸収波長についての概要を図1に示し、歯科診療用に市販されているレーザーの種類が目に対してどのような障害をもたらすかについて説明する。

1. 紫外領域：310nm 以下は角膜で吸収される。310～380nm では一部水晶体で吸収され、一部は網膜に達する。若年者では網膜に達しやすい。
2. 可視光領域：380～780nm では網膜に達し、その一部が錐状体、杆状体で吸収される。
3. 赤外領域：780～1,400nm ではほとんどが網膜に達する。1,400nm 以上は角膜で吸収される。

紫外領域のレーザーは現在、歯科では使用されていないが、エキシマレーザー（190～380nm）などは研究対象となっている。この領域の過度の光が目曝されると、角膜で強い吸収が起こり、角膜に炎症を起こす。そのため、眼痛、異物感、充血、視力低下をきたすが、数日後には症状が消失する。

Ar レーザー（486nm）のような可視光や、赤外部の一部（780～1,400nm）の波長を有する半導体レーザー（810nm）およびNd：YAG レーザー

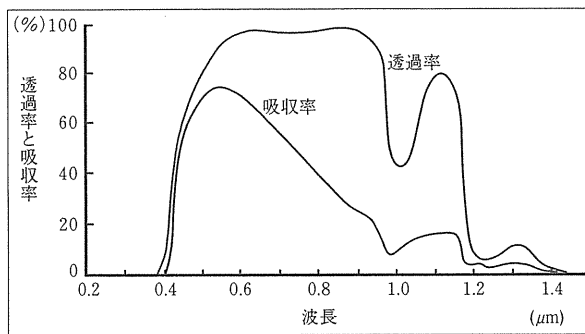


図① 光の波長と眼球での吸収

（1,064nm）は目の角膜や水晶体により網膜上に集光されて、エネルギー密度が約 10^5 大きくなるとされている。したがって、過度の光エネルギーは網膜や脈絡膜のメラニン色素に吸収されて熱エネルギーに変換され、その部分の凝固が生じる。網膜周辺部の場合、視力に関してはそれほどの影響はないと考えられるが、眼球後極部の網膜黄斑部が損傷した場合には視力低下が生じる。そして、網膜凝固が強ければ、不可逆的な変化として視機能が永久的に失われる。

Er：YAG（2,940nm）やCO₂ レーザー（10,600nm）などの赤外領域のレーザーでは、前眼部の温度が上昇して角膜火傷や水晶体混濁（赤外線白内障）、視力低下を起こす可能性がある。

前述のように、現在市販されている歯科用レーザーのレーザー光はチップ先端あるいは発振器からプローブにいたる場所で集束されており、至近距離でなければ比較的安全と考えられるが、可視光から赤外領域にかけての波長で、高輝度、高エネルギーを有するレーザーではとくに注意を要する。また、パルスモードで使用する場合には瞬間



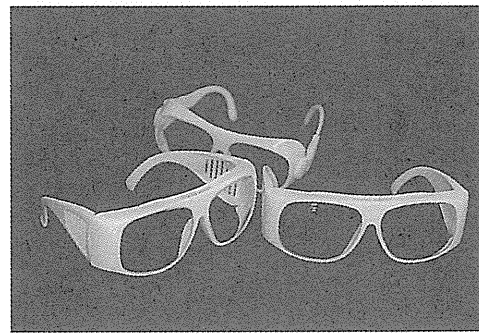
図② 光の波長と眼球透過率および眼底吸収率(レーザー安全ガイドブックより引用)

的なエネルギーが大きく、せん光時間がmsec単位と非常に短いために、瞬目反射(刺激に対する閉眼運動)が間に合わず、可視のレーザー光の侵入を防ぐことが困難であることを留意しておかなければならない。そして、赤外光では知覚されることがないので、眼球の防衛機構が働かずに、予想以上の障害をもたらす危険性がある。

網膜障害の指標の一つとして、網膜凝固閾値($T \cdot A$ 値)がある。これは、眼透光体における光の透過率 T と眼底における光の吸収率 A の積で表わしたものである。この $T \cdot A$ 値が大きい光波長ほど網膜を凝固しやすく、ルビーレーザーやArレーザーでは70%以上で凝固能率がよいとされている。しかし、個体差も大きく、白人と比べて一般に日本人は眼底色素が多いために A 値が大きくなり、白人よりも閾値が低くなる傾向を示すとされている。また、黄斑部では凝固閾値が低く、弱い光でも障害を受けやすい。図2には光波長と眼球の透過率および眼底吸収率の関係について示した。

患者においては、術者の不注意からレーザーを直接目に照射されてしまうという最悪の事故も考えられるが、レーザーを常時使用している歯科医療従事者にとっては、慢性的な目の障害が今後の問題となってくる可能性がある。

レーザー発振についてはマイクとスピーカーを使用した際のハウリングに例えられる。このとき、非常に不快な高い大音が発せられ、耳を塞ぎたくなることをほとんどの人は経験していると思う。もし、非常に大きな音であつたら鼓膜が破れてし



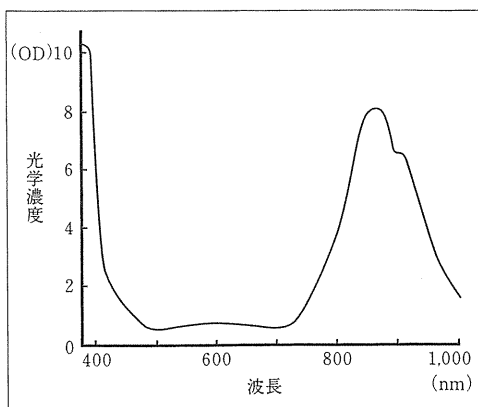
図③ レーザー用保護メガネ

まうこともある。このようなことが高出力レーザーと目の関係にも生じてくると考えればよいのであるが、障害の程度は目のほうが桁違いに大きいと考えるべきであろう。そして、高出力レーザーに関しては一瞬の不注意で重大な視力障害を起こす可能性があるので、十分な目の保護対策が必要である。

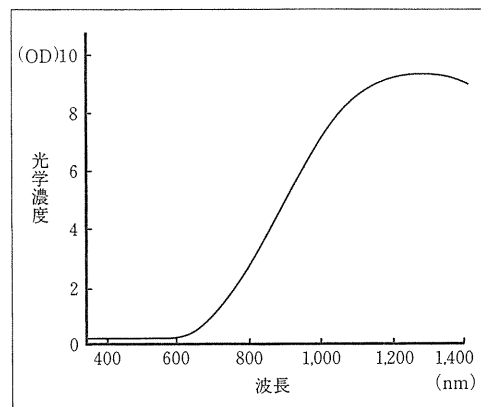
目の保護対策

高出力レーザー使用時の目の保護対策として、レーザー光用遮光メガネが一般的に用いられている(図3)。このレーザー保護メガネは各種レーザーの波長に合わせた遮光性能を有しているので、備え付けのメガネを使用しなければならない。数種類のレーザー機器を使用している診療室では、専用のメガネがすぐに特定できないような状況も考えられることから、購入時に判別できるようにしておくことと便利である(レンズに吸収波長およびOD 値が刻印されている)。

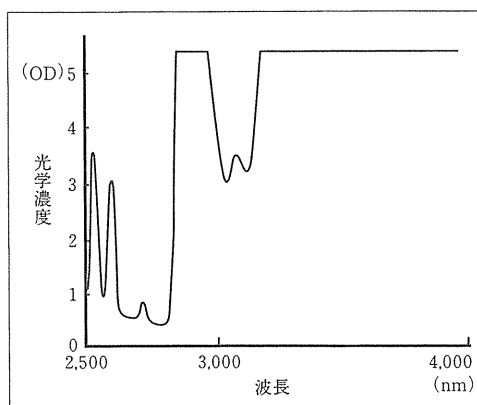
図4a~dは、半導体、Nd:YAG、Er:YAGおよびCO₂レーザー光に対する保護メガネのレンズの吸収特性を示すグラフである。この吸収特性グラフは測定値であって、規格値ではない。縦軸のODとはoptical densityの略で光学濃度を表わし、レンズが光を吸収する度合いを示している。その値は光線透過率 T から算出される $[OD = \log_{10}(1/T)]$ 。OD 値は、高くなるほどレンズにおいて選択的に波長がよく吸収されることを表わしており、遮光したい波長に合わせてレンズを使用しなければな



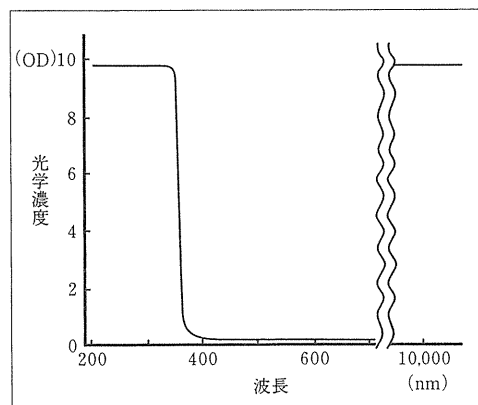
図④a 半導体レーザー用保護メガネ光学特性
(資料提供：山本光学㈱)



図④b Nd:YAGレーザー用保護メガネ光学特性
(資料提供：山本光学㈱)



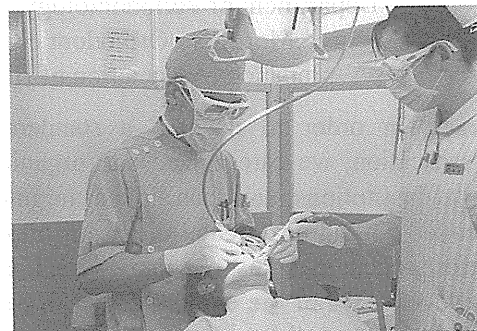
図④c Er:YAGレーザー用保護メガネ光学特性
(資料提供：山本光学㈱)



図④d CO₂レーザー用保護メガネ光学特性
(資料提供：山本光学㈱)

らない。可視光用のものとしては、レーザー光一部透過タイプのものもあり、光軸が希望どおりの局所にあたっているかどうかを確認することもできる。しかし、保護メガネをしていたとしても、いずれのレーザーに関しても直接覗き込むようなことは絶対に避けるべきである。さらに、周辺の人にも障害を与えないようにレーザー光用遮光カーテンの使用が望ましい。図5にはレーザー使用時の臨床風景を示した。保護メガネは術者と患者だけでなく、介補者にも必要である。

以上、レーザーと目の障害、その予防について述べてきたが、高出力レーザーは今後の歯科医療に欠くことのできない存在になりつつある。その使用方法や障害予防を的確に行うことで、使用しているレーザーの能力を安全かつ十分に発揮させることができる。レーザーのもつ生物学的効果はいまだ未知数のものも多く、疼痛緩和の機序や細



図⑤ 高出力レーザー装置使用時の診療

胞活性などについて研究が進められているが、それらの進展によってはますます応用範囲が拡大し、レーザー機器の種類も増えてくるものと考えられ、それぞれの特性を認識して事故のない臨床応用が望まれる。

【参考文献】

- 1) 佐藤清祐：レーザー障害と医学的応用、レーザーハンドブック(稲葉文男、他編)、753～766、朝倉書店、東京、1973.
- 2) 松下 要：レーザー安全ガイドブック(通商産業省光学技術院監修、財団法人光産業技術振興協会編)、第3版、新技術コミュニケーションズ、2000.

う蝕診断法

小林清吾

日本大学松戸歯学部
衛生学講座

前臨床う蝕と臨床う蝕

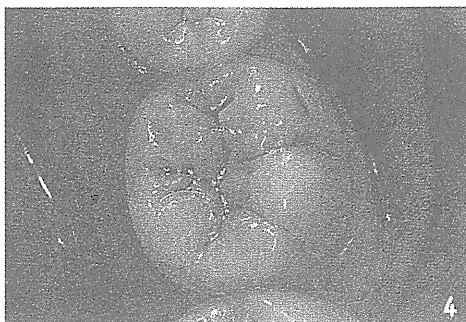
う蝕診断で検出する病巣には、基本的に、①前臨床う蝕と、②臨床う蝕の2段階がある。臨床的にはう蝕進行度のどこまでを予防処置にとどめるか、どこから充填治療を行うか、の判断が重要課題である。また、疫学調査においては比較や統計処理のため、再現性の高い診断基準が必要である。

1) 前臨床う蝕(図1a)は、脱灰による白濁または着色が生じているがエナメル質にう窩の形成を伴っていない状態にある。この段階では充填処置を控え、保健指導と特異的予防処置を徹底する。小窩裂溝部の場合、シーラントによりう蝕進行を停止させることができ、その後も健全歯と同じ扱いで予防処置(フッ化物応用や食生活の改善)と経過観察をするだけで済む。また、平滑面の場合、同様の予防処置により再石灰化が進めばう蝕は治った状態になる。このように前臨床う蝕の分類は特異的予防を強化する対象歯を定めるためのものとなる。ここで選択された前臨床う蝕に対して、早期充填治療を行ってはならない。期待されるう蝕予防効果が台無しにならないように。

2) 臨床う蝕(図1b)は、う窩の形成がありエナメル質表層における解剖学的形態の破壊が肉眼で確認できる。なお、う窩の形成とう蝕病巣の拡大は同程度ではない。エナメル質に限局しているう窩は、多くの場合、病理組織像としての象牙質う蝕である。小窩裂溝部において、臨床診断でエナメル質に小う窩が認められる歯のうち、研磨組織診断で89%に象牙質う蝕病巣が認められていた¹⁾。このようなう窩を伴った臨床う蝕は一般に充填処置が適応となる。

新しいう蝕診断基準

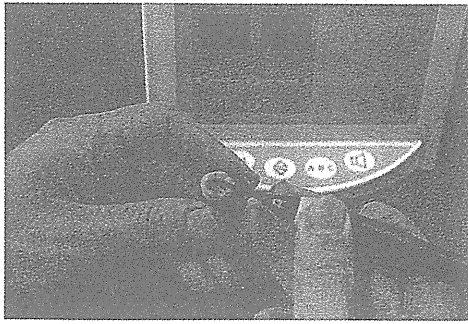
最近のう蝕診断基準として、学校歯科医会²⁾、歯科疾患実態調査³⁾、口腔衛生学会⁴⁾、WHO⁵⁾の基準がある。前臨床う蝕は、歯科疾患実態調査の[C₀]、学校歯科医会の[CO]: Caries for Observation、口腔衛生学会の[C₀]や[C₁]、また[CP]: Caries for Preventionに相当している。臨床う蝕として、歯科疾患実態調査の[C₁]以上、口腔衛生学会の[C₂]以上、学校歯科医会の[C]、WHOの[Decayed]が対応している。一般に、DMFの算定においては臨床う蝕をDとして加算し、前臨床



図①a 前臨床う蝕(右側下顎第1大臼歯)



図①b 臨床う蝕(右側下顎第1大臼歯)



図② レーザーう蝕診断機。DIAGNOdent®

う蝕は加算せず健全歯として扱っている。

ここで、どこからを臨床う蝕とするか（カットオフポイント）の基準が不統一である。エナメル質にう窩が確認できることを所見として、学校歯科医会は [C]、歯科疾患実態調査は [C₁] 以上を臨床う蝕としてきた。一方、新しく口腔衛生学会より [C₁] は臨床う蝕とせず、[C₂]（象牙質う蝕）以上を DMF に算定するとの提案がなされた。しかし、エナメル質にう窩が認められるケースはすでに象牙質う蝕である¹⁾。WHO 基準でも肉眼で確認できるう窩（unmistakable cavity）を臨床う蝕（Decayed）としている。公平なデータ比較のためにも、口腔衛生学会の基準は再考されるべきものと考ええる。

歯科用探針使用の是非

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となってきた^{4,5)}。視診法を主体に、確認のためには CPI プローベを用いることとしている。しかし、学校歯科健診など日本型の集団健診ではスリーウェイシリシジを用意することが困難で、照明も不十分であり、見落としの多くなることが危惧される。う窩の存在を基準とするう蝕検出においては、視診 + CPI プローベの使用に比べ、視診 + 歯科用探針使用のほうがう蝕の検出率が高い結果が得られている（杉原ら：1999、小林ら：1999）。よって、加圧操作やステッキ感の触診を控えう窩の確認操作を行うだけに

すれば、歯科用探針使用は有用であると考ええる。また、臨床の場合における精密健診において、フィッシャーシーラントや保存修復処置に先行する行為として探針の限定使用は認められる⁴⁾。

レーザーう蝕診断器の利用

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、透過光、電気伝導度、レーザー等を利用した診断器が開発されてきた。ここでは、近年その有用性が注目されている DIAGNOdent® について述べる。

DIAGNOdent®（図 2）はう窩を伴わない小窩裂溝部のエナメル質う蝕（前臨床う蝕）の検出に優れており、実際の口腔内で調査した報告によると敏感度（真の陽性検出比）は 0.96、特異度は 0.86、再現性を示す κ 値 = 0.90 であった⁶⁾。小型、電池式で携帯性に優れ、濡れていても診断精度に影響が少ない。う蝕病巣の量と対応すると考えられる蛍光強度がデジタルディスプレイに表示され、14～20 はエナメルう蝕、20 未満は象牙質う蝕と判定される。しかし、一度う蝕が生じた部位では再石灰化された後でもう蝕陽性を示すようであり、20 未満の症例でも充填処置が不可欠とはいえない。視診再精査でう窩やう蝕象牙質の透過像が確認できなければ、特異的予防処置を継続すべきである。DIAGNOdent® はシーラント処置適応歯の選択に際し、今までの歯質破壊を伴う歯科用探針の触診法に代わって役立つものと期待される。

文献

- 1) Tveit, A.B. et al.: Clinical diagnosis of occlusal dentin caries, *Caries Res*, 28: 368～372, 1994.
- 2) 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.
- 3) 厚生省健康政策局歯科保健課：平成 11 年度歯科疾患実態調査必携、1999.
- 4) 「初期う蝕診断」における探針の意義に関する作業検討部会（平石 総、他）：望ましい初期う蝕の診断法、*口衛誌*、50: 137～152、2000.
- 5) WHO: Oral Health Surveys, Basic Methods, World Health Organization, Geneva, 4th ed., 1997.
- 6) Lussi, A. et al.: Clinical performance of a laser fluorescence device for detection of occlusal caries lesions, *Eur J Oral Sci*, 109: 14～19, 2001.

歯周病原性細菌とアポトーシス

落合 邦康* 栗田 智子**

近年、米国における広範な調査から歯周病罹患患者には動脈硬化、心筋梗塞そして肺炎などが高率に発症することが報告された。さらに、早産や低体重児の出産のリスクが高いことや糖尿病の病態にも関係していることが判明した。これは、局所の慢性疾患である歯周病が全身感染を起こす病巣感染源としてのみならず、炎症物質の持続的な供給源となる可能性を強く示唆している。歯周病のメカニズムは極めて複雑で、発症と進展には宿主の免疫応答の失調が重要な要因となる。歯周病原性嫌気性菌が産生する揮発性脂肪酸は、免疫担当細胞に顕著にアポトーシスを誘導するため、サイトカイン産生異常などが歯周病の発症に深く関係していると思われる。

Key Words : 歯周病／歯周病原菌／揮発性脂肪酸／酪酸／アポトーシス

I 歯周病

歯周病(Periodontal disease)とは、歯肉、歯槽骨、セメント質および歯根膜という歯周組織におこる種々の病変に与えられた総括的な疾患の名称である。歯肉炎(Gingivitis)と歯周炎(Periodontitis)に大別されるが、一般に歯肉炎は炎症が歯肉組織に限局しているもので、歯周炎は歯肉のみならず他の歯周組織に波及する。いずれも歯肉局所の細菌によって発症し進行する感染症であり、近年若年者では慢性の歯肉炎、高齢者では歯周炎が激増している。前者は歯垢中の大部分の細菌が関与し、口腔清掃が不十分なため増加する非特異的な細菌が原因となっておこる。一方歯周炎は、歯垢蓄積に伴って増加する特定の細菌が原因となって発症する感染症であると考えられている。従来歯肉炎は歯周炎の初期の病型で、未治療のまま放

置すると歯周炎になると考えられて来た。しかし、ほとんどの歯肉炎は、一過性または持続性であり進行性ではないことや、歯肉炎から歯周炎に進行するのはごく一部であることがわかって来た¹⁾。従って歯周炎は、特定の細菌によっておこる感染症という考えが一層強くなって来た。

歯周炎は、局所の状態と口腔全体の疾病活動性により表1のように分類され、それぞれに原因と考えられる特異的細菌名が挙げられている。しかし、歯周病の発症や進行のメカニズムは大変複雑で、サル以外良い実験動物がないことや複数の細菌が関与しているなどから不明な点が多い。歯周組織には、歯周炎関連細菌の可溶性抗原や線毛に対する特異抗体産生細胞が存在し、IgGを中心とした抗体産生が行われる。しかし、末梢血中の抗体量は、必ずしも歯周組織の抗体産生量を反映していない。ヒトの歯周炎にみられる浸潤細胞の多

* Kuniyasu Ochiai 明海大学歯学部口腔微生物学講座 教授

** Tomoko Kurita-Ochiai 日本大学松戸歯学部細菌学教室 講師

表1 歯周病の病型と主な病原性細菌

病 型	主な病原菌
妊娠性歯肉炎	<i>Prevotella intermedia</i>
思春期性歯肉炎	<i>Prevotella intermedia</i>
急性壊死性潰瘍性歯肉炎 (ANUG)	<i>Prevotella intermedia</i> <i>Treponema denticola</i>
成人性歯周炎	<i>Porphyromonas gingivalis</i> <i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Eikenella corrodens</i> <i>Campylobacter rectus</i> <i>Prevotella intermedia</i> <i>Bacteroides forsythus</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Treponema denticola</i>
若年性歯周炎	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> <i>Capnocytophaga</i> 菌種

くは、B細胞系でとりわけ形質細胞が多い。その密度は、歯周炎の重症度に比例しており、治療の効果に伴って減少することが知られている。また、治療後に形質細胞の浸潤が収まらない場合病態は改善しない。これらの点から、形質細胞が歯周炎の増悪に深く関与していると判断されている。

組織浸潤の形質細胞が産生する免疫グロブリンは、IgG が圧倒的に多く、次いで IgA や IgM であることが報告されている。その部位には必ずT細胞が局在し、B細胞の増殖分化にT細胞が関与していることを示唆している²⁾。IgG 産生形質細胞主体の歯周病態も、T細胞系の免疫調節によりもたらされた結果と考えられる。口腔粘膜は、腸管の粘膜などで見出されているように $\alpha\beta$ T細胞に比べ $\gamma\delta$ T細胞が多数を占めている。またヒト歯周組織に存在するT細胞は、使用するレセプターの種類が少ないことも報告されており、多様性は少なく少数のT細胞が定着して増えた可能性がある。更に歯周炎活性部位のCD4⁺/CD8⁺ T細胞比率は、健康歯肉組織のそれと異なり著しく低下しているという報告もある³⁾。これは免疫応答の恒常性が歯周病変部で失調し、正常な抗体産生

が行われていない可能性を強く示唆している。また、成人性歯周炎病変部においては、T細胞由来サイトカイン産生にも大きな変化がみられるという報告が多数ある。これらの事実からも歯周炎の発症と進展には、原因微生物のみならず宿主の免疫応答、特にT細胞が深くかかわりあっていることは間違いない。

II 歯周病原性細菌の産生する揮発性脂肪酸

筆者らは歯周病の発症と病態の進展には、局所での免疫応答の異常、特にサイトカイン産生のアンバランスが重要な問題であるとの考えから、歯周病原性細菌の免疫応答に及ぼす影響について検討を行ってきた^{4~6)}。また、*Actinobacillus actinomycetemcomitans* や *Capnocytophaga ochracea* など一部の菌が全身に転移し、感染性心内膜炎などをおこすことが報告されている。その原因の1つとして、免疫抑制物質が深く関わっていると推測した。これらの菌体からタンパクを主成分とする免疫抑制物質の精製を行い、その性状を明らかにした^{7, 8)}。

しかし、最も罹患率の高い成人性歯周炎の主な

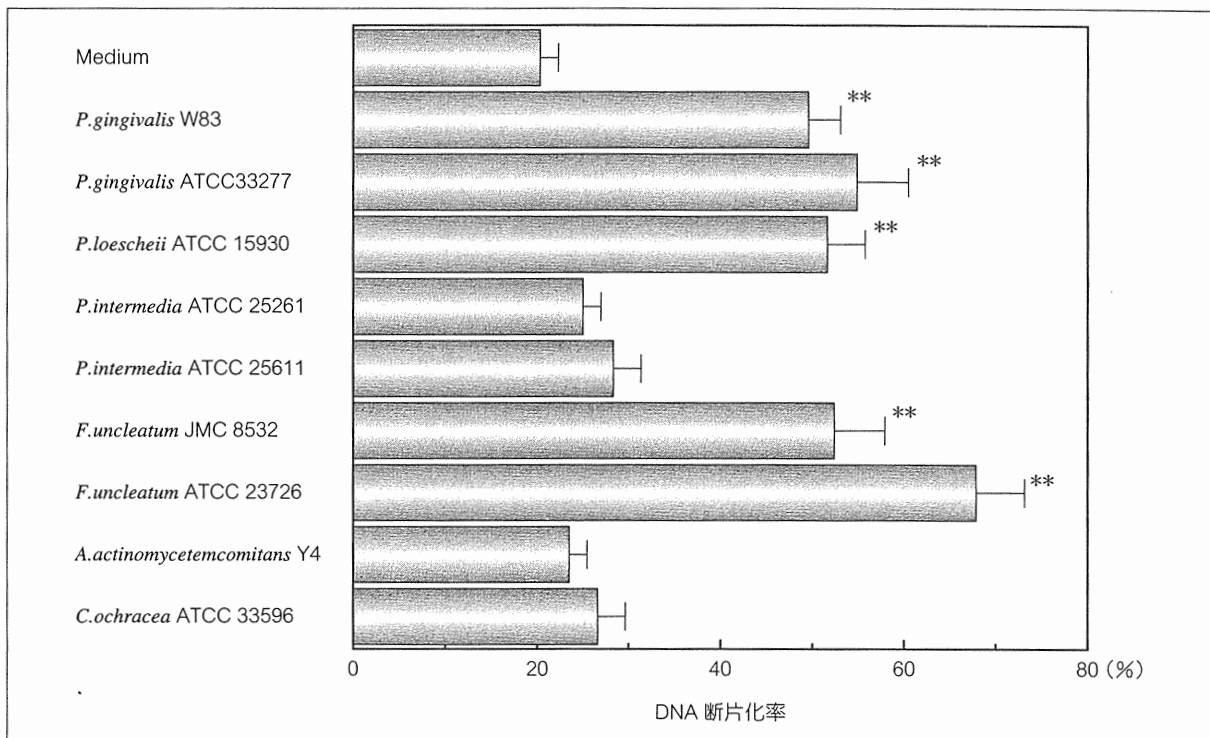


図1 歯周病原性細菌によって誘導されるB細胞アポトーシス

歯周病原性細菌培養後の培養上清を用いて調べたB細胞アポトーシス誘導。供試菌株の培養上清を濾過滅菌後、100mL添加し、21時間培養。収集細胞のDNA断片化をDPA (dual photon absorptionmetry) assayで測定。使用細胞：マウスB lymphoma 細胞株 WEHI 231

t検定：** P < 0.01

表2 歯周病原性菌の産生する主な揮発性脂肪酸

培養上清	産生脂肪酸量 ^{a)} (mM)					
	酢酸	プロピオン酸	イソ酪酸	酪酸	イソ吉草酸	吉草酸
培地	0.8 ±	ND ^{b)}	ND	ND	ND	ND
<i>P. gingivalis</i> (I) ^{c)}	0.1	5.5 ± 0.4	4.2 ±	23.6 ±	10.3 ± 1.0	ND
(II)	14.4 ±	4.1 ± 0.2	0.3	2.1	7.7 ± 0.3	0.4 ±
<i>P. loescheii</i>	1.2	19.1 ± 2.0	2.5 ±	21.0 ±	10.0 ± 0.5	0.1
<i>P. intermedia</i>	13.2 ±	ND	0.2	1.8	3.4 ± 0.3	0.3 ±
<i>F. nucleatum</i> (I)	1.3	4.6 ± 0.3	4.7 ±	13.3 ±	ND	0.1
(II)	10.8 ±	3.3 ± 0.2	0.4	1.1	ND	ND
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	1.0	ND	0.4 ±	0.1 ±	ND	0.1 ±
<i>C. ochracea</i>	12.8 ±	0.6 ± 0.1	0.1	0.1	0.21 ± 0.1	0.1

脚注：a) 供試菌株培養21時間後の培地中に産生された脂肪酸量をガスクロマトグラフィー法により測定。

b) ND：検出されず。c) 使用菌株名：*P. gingivalis* (I) FD381, (II) W83, *F. nucleatum* (I) ATCC33568, (II) ATCC23726

原因菌とされる偏性嫌気性菌 *Porphyromonas gingivalis* などの菌体からは、何ら抑制物質は検出されなかった。そこで、T細胞に影響を及ぼす物

質について培養上清を含め再検討を行ったところ、嫌気性菌(表1)の培養上清中に極めて強力にT細胞の増殖を抑制し、サイトカイン産生に影響

表3 歯周病原性菌の産生する揮発性脂肪酸による mitogen 活性抑制作用

培養上清	ConA (0.5 μ g) (%)	LPS (1.0 μ g) (%)
培地	0	0
酢酸	20.8	14.7
酪酸	99.7 **	99.7 **
イソ酪酸	42.0 *	44.5 *
プロピオン酸	86.9 **	83.0 **
吉草酸	75.3 **	68.7 **
イソ吉草酸	89.5 **	72.9 **

抑制率は、C3H/HeN 脾臓よりT細胞及びB細胞を分離し、10mMの揮発性脂肪酸存在下で48時間培養後に細胞の増殖率を³H-チミジンの取り込み量を測定し、算定した。

対照に対するt検定：** P < 0.01, * P < 0.05

を及ぼす物質が存在することが判明した。これは耐熱性の低分子で、T細胞のみならずB細胞のLPS (lipopolysaccharide) の mitogen 活性も顕著に抑制した⁹⁾ (図1)。これらの物質について詳細に検討を行ったところ、歯周病原性菌の主要最終代謝産物で、口臭の原因となる揮発性脂肪酸 (Volatile fatty acids: VFA) であった。特に酪酸にその作用が強く、以下プロピオン酸、イソ吉草酸であった(表2)。歯周炎患者の歯肉構内における脂肪酸の含有量は高く、4～12mM程度検出されている。興味あることに病態の悪化に伴い、上昇することが知られている。これらの脂肪酸は、5～10mM濃度でConA(concanavalin A)やLPSによるT細胞・B細胞の mitogen 活性を抑制した(表3)。特に酪酸は1mM添加で、それぞれ40%、70%、また2mM添加でいずれの増殖も85%近く抑制した。また、マウスの脾臓T細胞のサイトカイン産生に及ぼす影響を検討した結果、IL (interleukin)-4, IL-5, IL-6の産生はほぼ完全に抑制された。IL-2も2mM添加で20%程度に減少し、5mM添加でほぼ完全に抑制された。これらの結果から、極めて低濃度のVFAが直接免疫担当細胞に作用した場合、局所の免疫応答は著しく変化することが推測された。VFA添加により細胞にどのような変化がもたらされるか検討を加えた結果、いずれの細胞においても典型的なアポトーシス像が見い出された(図2)。

Ⅲ VFAによるアポトーシス誘導

マウス脾細胞を用いた実験から、酪酸添加によ

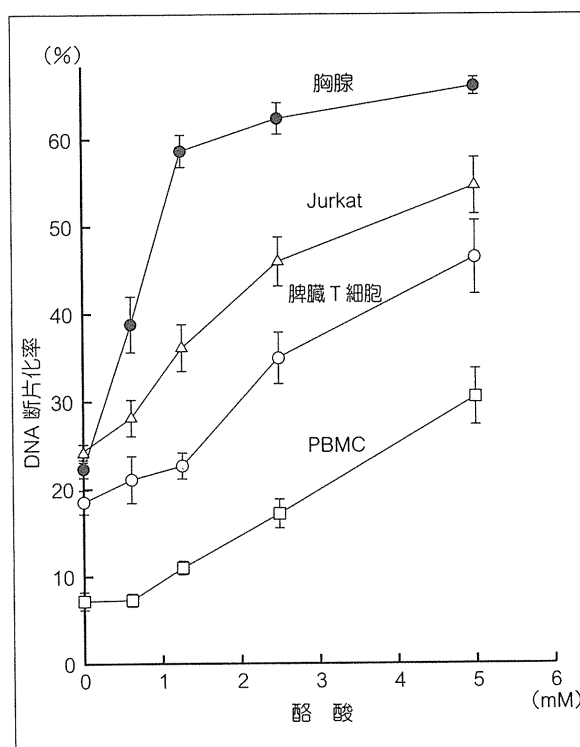
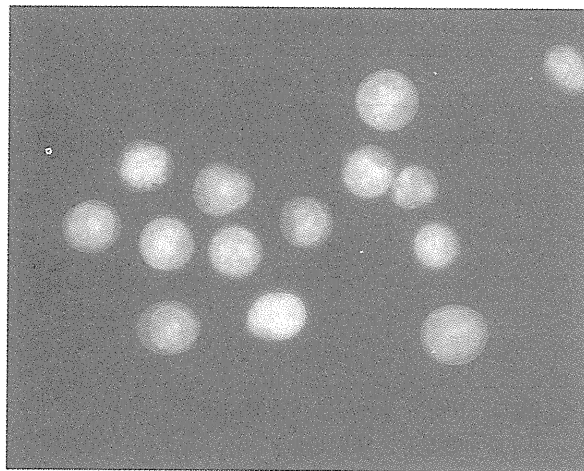


図2 酪酸によって誘導されるT細胞アポトーシス
供試細胞株を各種の酪酸存在下で21時間培養後、DNAの断片化をDPA assay法により測定。

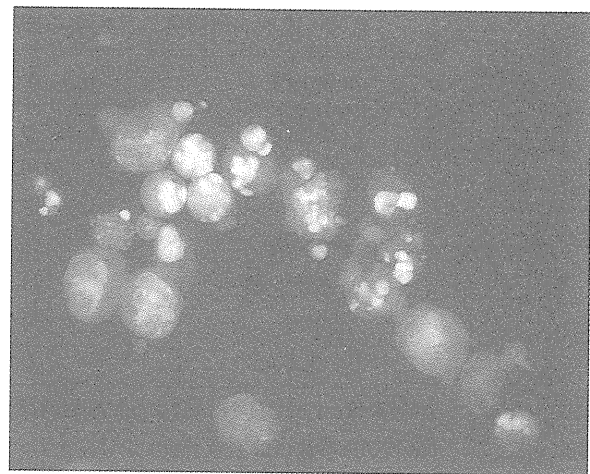
t検定：* P < 0.01, ** P < 0.05。

使用細胞：マウス胸腺細胞 (●), 精製脾臓 T 細胞 (○), Jurkat ヒト lymphoma 細胞株 (△), PBMC (□)

りサイトカイン産生に変化が生じるため、T細胞が影響を受けやすいことが推測された。そこでマウス胸腺や脾臓からT細胞を分離精製し、更にヒト T lymphoma 細胞 Jurkat と酪酸を用い、ジメチルチアゾール・ジフェニル・テトラゾリウム臭



(a) 対照群



(b) 酢酸添加群

図3 酪酸誘導アポトーシス

Jurkat の酪酸 5 mM, 21 時間処理におけるアポトーシス。

供試細胞のアポトーシス感受性は、胸腺T細胞> Jurkat 細胞>脾臓T細胞> PBMC の順で、PBMC は VFA のアポトーシス誘導能に対しやや抵抗性を示した。

酸塩(MTT)法により生細胞数の変化を調べた。また、DPA 反応およびアガロース電気泳動法により核酸の断片化の検討を行った。供試したいずれの細胞においても、酪酸添加により生存率の著しい低下はないものの、DNA 断片化率の測定から、酪酸は濃度および作用時間依存的にいずれのT細胞にもアポトーシスを誘導する結果が得られた(図2)。その作用は強力で、酪酸は胸腺細胞に対し1.25mM, 6時間で急激にアポトーシスを誘導した。末梢リンパ球(PBMC), 脾臓T細胞およびJurkatでは、2.5mMで約16時間作用時にアポトーシスが誘導された。感受性の低いJurkatの場合においても、酪酸5mM, 21時間処理することにより極めて顕著なクロマチン顆粒の凝集と、DNA ラダーなどアポトーシス像が認められた(図3)。供試細胞のアポトーシス感受性は、胸腺T細胞> Jurkat 細胞>脾臓T細胞> PBMC の順で、PBMC は VFA のアポトーシス誘導能に対しやや抵抗性を示した。しかし、上皮細胞および線維芽細胞は酪酸によりアポトーシスが誘導されることはなかった(図4)。これは、生体において微生物の存在する外界との接触面に位置する細胞の性質として興味深い結果と思われる。最も感受性の高かった胸腺T細胞より、パニング法および磁気ビーズ法を用いてCD4⁺T細胞, CD8⁺T細胞を

分離し酪酸の影響を検討した。その結果, CD4⁺T細胞に強くアポトーシスが誘導されたが, CD8⁺T細胞はほとんど影響をうけなかった^{10, 11)} (図5)。これはサイトカイン産生実験の結果と一致し、主にTh2タイプのT細胞にアポトーシスが誘導されるものと考えられた。以上の結果から、歯周炎活動部でのCD4⁺T /CD8⁺T比の著しい低下などに、VFAによる特定細胞のアポトーシス誘導が関与している可能性が示唆される。また、抗炎症性作用のあるサイトカインIL-4の産生抑制、また歯垢構成菌の菌体成分、特にLPSによる抗原非特異的な抗体産生の促進などが相乗的に作用し、正常な抗原特異抗体産生応答が営めなくなるものと考えられる。

IV アポトーシス関連遺伝子の解析

Fasは、TNF/NGF(tumor necrosis factor/neural growth factor)ファミリーに属する約45kDの細胞膜タンパク質で、細胞内にアポトーシスのシグナルを伝達することが知られている。ヒトのFasリガンドは、281アミノ酸からなる約37kDの膜タンパク質でTNFファミリーに属している。自己免疫疾患モデルマウスであるgldマウスでは、Fasリガンド遺伝子に異常が認められることから、Fas-FasリガンドによるアポトーシスがT細胞の

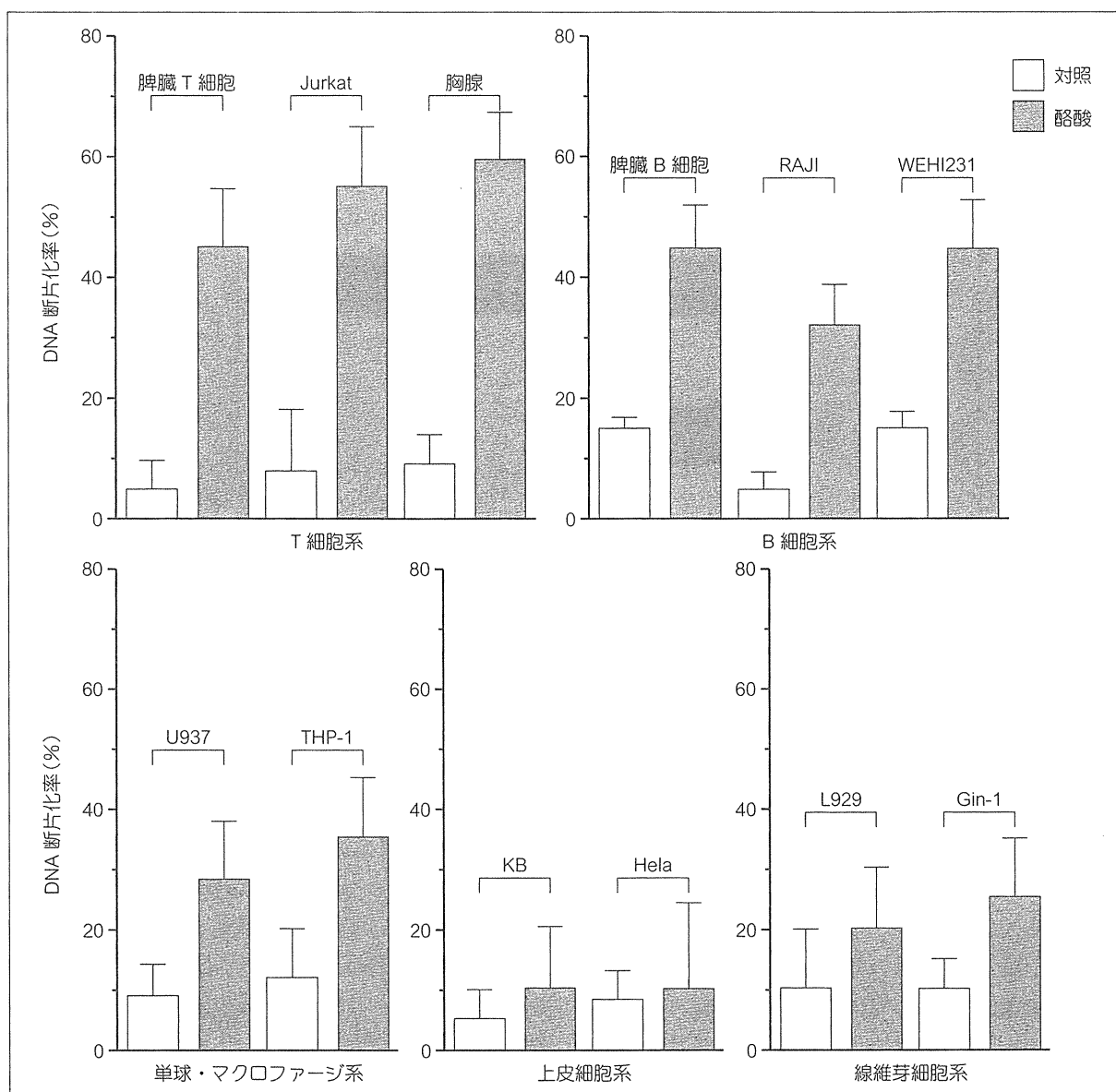


図4 細胞種によるアポトーシス感受性

上皮細胞および線維芽細胞は酪酸によりアポトーシスが誘導されることはなかった。

制御に関与していると考えられている。一方 *bcl-2* 遺伝子は、ヒト濾胞性リンパ腫に關与する癌遺伝子として発見された膜タンパク質で、主にミトコンドリア、外膜、核膜や小胞体に局在している。この *bcl-2* と相同性を示すタンパク質が多数同定され、*bcl-2* ファミリーとしてグループ化されている。そこで筆者らは、これらのアポトーシス関連タンパク質が酪酸誘導 T 細胞アポトーシスにどのようにかわりあっているかを各種モノクローナル抗体を用いて検討した。PBMC および Jurkat を 5 mM 酪酸と供に培養後、経時的に細胞を採取

し、FITC(fluorescein isothiocyanate)標識抗 Fas および抗 *bcl-2* 抗体を作用させその局在をフローサイトメーターで計測した。また、抗 Fas リガンドの添加の影響を MTT 法で計測した。その結果、Fas 陽性細胞は対照および酪酸添加群で差は認められなかった。抗 Fas リガンドの添加は、5 mM の酪酸誘導アポトーシスにはほとんど影響が認められなかった。

bcl-2 の発現率は、Jurkat において培養初期(6 時間)の酪酸添加群では 9.0%と僅かに低下した。また、培養後期(16 時間)においても、発現率が

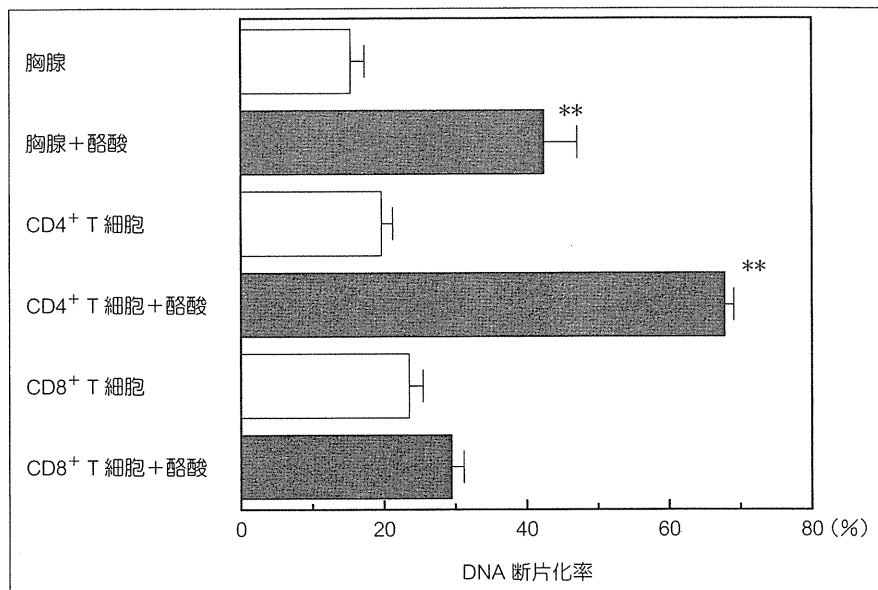


図5 T細胞サブセットアポトーシスに及ぼす酪酸の影響

マウス脾臓T細胞より磁気ビーズ法によりT細胞サブセットを精製。各サブセットを5 mMの酪酸存在下で21時間培養後DNAの断片化をDPA assay法により測定。CD4⁺T細胞に強くアポトーシスが誘導されたが、CD8⁺T細胞はほとんど影響をうけなかった。*t*検定：***P* < 0.01

低下した。PBMCの21時間培養においても、被験群のbcl-2の発現は対照群の1/5以下に低下していた。

これらの点をより詳細に検討するため、Western blot法を用い種々の条件で培養したJurkat細胞を溶解し電気泳動後、膜転写し、抗bcl-2, Bax, FasおよびFasリガンド抗体を作用させ化学発光によりそのシグナルを検出した。その結果、bcl-2は5 mM酪酸添加16時間後にその発現が低下した。さらにbcl-2リン酸化体も消失していた。それ以外の物質では変化が認められなかった。以上の結果から、酪酸はアポトーシス抑制遺伝子bcl-2の発現をブロックすることによりアポトーシスを遂行するものと思われるが、アポトーシス促進遺伝子Baxの発現に対しては何らの増強作用も示さなかった。また、酪酸誘導アポトーシスにおいては、Fas-Fasリガンド系の関与も少ないものと思われる。

V p53 ノックアウトを用いた解析

p53はヒト発癌に最も広範に関わっている癌抑制遺伝子の1つである。他の癌抑制遺伝子と異なり、変異型のp53は野生型に比べて優勢であり、

細胞を癌化する能力を有している。正常細胞を放射線や化学薬剤で処理するとp53タンパク質量が一過性に増加し、細胞分裂周期のG₁からS期への進行が抑制される。p53遺伝子欠損細胞ではこのような現象がおきないので、細胞周期進行の抑制とアポトーシスはいずれもp53を介した正常細胞の防御機構と考えられる。しかし、グルコルチコイド等によるアポトーシスのようにp53を介さないp53非依存性アポトーシスも存在するので、P53遺伝子欠損マウスを用い酪酸誘導アポトーシスの発現機序の解析を行った。すなわち、P53遺伝子欠損マウスより胸腺および脾臓T細胞を精製し同様の実験を行った。その結果、酪酸はp53遺伝子欠損マウスから調製したいずれの細胞に対しても濃度依存적および経時的にアポトーシスを誘導した。その程度は野生型マウスに比較しやや劣るものの、両者の間には有意な差は認められなかった。

VI シグナル伝達に関する解析

アポトーシスには、その誘導、決定および実行の3つの過程が考えられている。その決定過程には2つの経路が主な役割を果たしている。その1

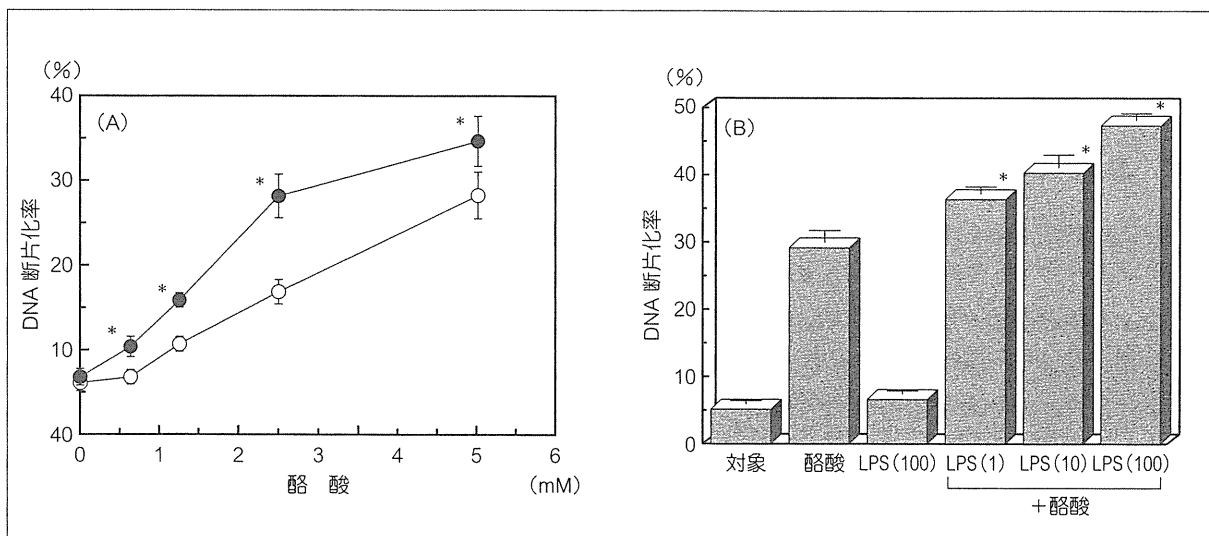


図6 酪酸誘導性アポトーシスに関するLPSの促進効果

(A) ヒト末梢血よりリンパ球を分離し、各濃度の酪酸と大腸菌リポ多糖 (LPS) 添加におけるアポトーシス誘導の変化をDPA assayにより測定。LPS添加 (●)

(B) 各種濃度のLPS添加のアポトーシス誘導におよぼす影響

LPSが、酪酸に比較的抵抗性を示すヒト末梢血PBMCのアポトーシスを増強することが判明した。

検定：*P < 0.05

つは、Caspaseによる自己および下位Caspaseの限定分解経路である。その働きは、細胞内のタンパク質を分解することでアポトーシスを実行する過程においても重要な役割を担っている。Caspaseは、基質特異性により大きく3種類に分類されており、本研究においては3分類群の代表であるCaspase 1, 3, 6について、*p53*遺伝子欠損および野生型マウスの脾臓T細胞を用いて解析を行った。その結果、*p53*遺伝子欠損および野生型マウスの脾臓T細胞ではCaspase-1活性は認められなかった。Caspase-3および6の活性は、*p53*遺伝子欠損および野生型マウスにおいて酪酸添加後経時的に増加が認められ、特にCaspase-3は酪酸添加後16時間以降急速でかつ顕著な増加が認められた。また、Caspase 6も両マウスとも培養16時間以降で増加が認められた。

しかし、阻害剤を用いた実験では、PBMCのアポトーシスは、Caspase 1および3いずれの阻害剤の影響も受けなかったが、Jurkat細胞はCaspase 3阻害剤により部分的に回復した。PBMCの酪酸誘導アポトーシスがCaspase 3の活性化を伴うにも関わらず、何故Caspase阻害剤の影響を受けないのか不明であるが、Caspase 3

阻害剤が膜透過性が弱いことや正常細胞PBMCとlymphoma Jurkat細胞では感受性に差があるのかも知れない。

VII LPSによるT細胞の酪酸誘導アポトーシス増強作用

最近筆者らの研究によりLPSが、酪酸に比較的抵抗性を示すヒト末梢血PBMCのアポトーシスを増強することが判明した¹²⁾(図6)。LPSはグラム陰性菌の細胞壁に局在し多くの生物学的活性を有するため、グラム陰性菌感染症において最も重要な因子である。同時に、免疫担当細胞を刺激し種々の免疫応答を促進し、特にB細胞の増殖と分化やマクロファージの活性化に主導的な役割を果している。しかし、LPSのT細胞に及ぼす影響はあまり知られていない。一連の研究から、酪酸誘導PBMCのアポトーシスは、LPSの添加により濃度依存的に促進される結果が得られた。そして、LPS単独ではアポトーシスは誘導されず酪酸の存在を必要とすること、CD3⁺PBMC-T細胞に優位に誘導され、CD4⁺およびCD8⁺T細胞の感受性が高いことが判明した。これらの結果は、歯周局所において歯周病原性細菌の増殖に伴い増加する

酪酸と LPS が特異的に T 細胞を破壊し、歯周局所の免疫応答に変調をきたすことを強く示唆している。

VIII おわりに

口腔には歯面や歯肉構内に莫大な数の微生物が集約して存在する。「硬組織上の歯垢」に生息する口腔レンサ球菌が感染性心内膜炎の原因菌であることは旧来の事実である。「軟組織の感染症・歯周病」からは、当然大量の菌や炎症物質が生体内に移入し、感作リンパ球や抗体が全身に波及することは明白である。近年、次のような事実が米国の広汎な疫学調査で明らかとなった。

① 歯周病患者には循環器疾患が高率に見られ、歯周疾患がアテローム動脈硬化症の進展に重要な役割を果たしている^{13, 14)}。

② 歯周病の患者には呼吸器系疾患が多発する^{15, 16)}。

③ 中等度から重度の歯周病に罹患している女性には、低体重児を出産するリスクが高い¹⁷⁾。

④ 歯周病が治療されている糖尿病患者では糖尿病のコントロールが容易であるが、未治療の場合は困難である¹⁸⁾。これらはまたスペキュレーションの域を出ないものも有るが、歯周病原性細菌が歯肉病巣より直接全身に転移したり、歯周局所の炎症関連物質が全身に影響を及ぼしていることをより一層明確にしている。歯周病は炎症物質の持続的な供給源とも考えられ、新たな意味での病巣感染および炎症物質の病巣源と見ることができる。更に、一部の歯周病原菌の産生するストレス蛋白質に対する特異抗体がヒトのそれ (HSP60 ファミリー) に交叉反応することから、歯周病が自己免疫疾患を引き起こす可能性がある^{19, 20)}。これらのメカニズムが解析されることにより、生活習慣、遺伝的特質、全身疾患やストレスなどが重要な因子であると考えられて来た心臓病や循環器障害において、歯周病が主因となる可能性もある。歯周病を予防・治療することは、明らかにいくつかの重大な全身的疾患を予防することであり、将来のより進んだ健康管理につながっていくものと考えられる。

文 献

- 1) Miyazaki H. : A global overview of periodontal epidemiology. "Periodontal needs of developing nations". (Park A.R.C. and Newman H.N., ed.), Science Reveiws Ltd, Middlesex : 1-7 (1996)
- 2) Okada H., Shimabukuro Y., Kassai Y., et al. : The function of gingival lymphocytes on the establishment of human periodontitis. Adv Dent Res 2 : 364-367 (1988)
- 3) Taubman M., Stoufi E., Ebersole V., et al. : Phenotypic studies of cells from periodontal disease tissues. J Periodont Res 19 : 587-590 (1998)
- 4) Ochiai K., Kurita-Ochiai T., et al. : Immunoadjuvant effects of periodontitis-associated bacteria. J Periodont Res 24 : 322-328 (1989)
- 5) Kurita-Ochiai T., Ochiai K., et al. : Immunosuppressive effect induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* : effect on immunoglobulin production and lymphokine synthesis. Oral Micro Immunol 7 : 338-343 (1992)
- 6) Kurita-Ochiai T., Ochiai K., et al. : Adoptive transfer of suppressor T cells induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* regulates immune response. J Periodont Res 29 : 1-8 (1993)
- 7) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. : Immunosuppressive factor from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* down regulates cytokine production. Infect Immun 64 : 50-854 (1996)
- 8) Ochiai K., Senpuku H., kurita-Ochiai T. : Purification of immunosuppressive factor from *Capnocytophaga ochracea*. J Med Microbiol 47 : 1087-1095 (1998)
- 9) Kurita-Ochiai T., Fukushima K., Ochiai K. : Volatile fatty acid, metabolic by-products of periodontopathic bacteria, inhibit lymphocyte proliferation and cytokine production. J Dent Res 74 : 1367-1373 (1995)
- 10) Kurita-Ochiai T., Fukushima K., Ochiai K. : Butyric acid-induced apoptosis of murin thymocytes, splenic T cells, and human Jurkat T cells. Infect Immun 65 : 35-41 (1997)
- 11) Kurita-Ochiai T., Ochiai K. : Volatile acid, metabolic by-product of periodontopathic bacteria, induces apoptosis in WEHI 231 and Raji B lymphoma cells and splenic cells. Infect Immun

- 66 : 2587-2594 (1998)
- 12) Kurita-Ochiai T., Fukushima K., Ochiai K. : Lipopolysaccharide stimulates butyric acid-induced apoptosis in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun* **67**:22-29 (1999)
 - 13) Beck JD., Garcia R., Heiss C., et al. : Periodontal disease and cardiovascular disease. *J Periodontol* **67** : 1123-1137 (1996)
 - 14) Meyer DH., Fives-Taylor PM. : Oral pathogens : from plaque to cardiac disease : *Curr Opin Microbiol* **1** : 88-95 (1998)
 - 15) Scannapienco F. A., Mylotte J. M. : Relationships between periodontal disease and bacterial pneumonia. *J Periodontol* **67** : 1114-1122 (1996)
 - 16) Scannapienco F. A. : Role of oral bacteria in respiratory infection. *J Periodontol* **70** : 793-802 (1999)
 - 17) Gibbs R. S., Romero R., Hillier S. L., et al. : A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* **166** : 1515-1528 (1992)
 - 18) Mealey B. L. : Influence of periodontal infections on systemic health. *Periodontol* **2000** **21** : 197-209 (1999)
 - 19) Koga T., Kusuzaki T., et al. : The 64-kilodalton GroEL-like protein of *Actinobacillus actinomycetem-comitans*. *J Periodont Res* **28** : 475-477 (1993)
 - 20) Hotokezaka Z.H., Hayashida H., et al. : Cloning and sequencing of the *groESL* homologue from *Polyphyromonas gingivalis*. *Biochim Biophys Acta* **1219** : 175-178 (1994)

切開と縫合のための解剖

こざわ ゆき しげ
小澤 幸重

日本大学松戸歯学部 解剖学教室第二講座
〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1

はじめに

本稿を書くにあたり、現場の臨床医の先生方にいま何が知りたいか、何を望んでいるかについてアンケートを取らせていただいた。

それを読むと、学生時代に学んだ解剖学、口腔解剖学と、臨床の現場では違うことが多く、臨床医がとまどいを持っているということが理解できる。その原因の1つは、学校教育の中での講義は、あくまで人体の解剖の典型である、ということだ。これは正常例でも、口唇裂・口蓋裂、上顎二番の欠損、八番の形態異常等々でも同じである。これらはいわば典型の1つで、異常の程度は実にさまざまであることは、現場に出てみれば一目瞭然たる事実なのだ。

ここに書かせていただくことは、解剖学的基本事項や注意などであり、読まれる方はさぞかし「なんだ？」と感じられることかも知れない。あらかじめお許しを頂きたい。しかし、ここに記した基本の第一は、人の顔をみれば百人百様、だから人体の構造も千差万別なのだ、ということである。

1 切開と縫合に関する解剖学的な予備知識

外科的に処置する場合には、患者さんの受ける侵襲や痛みをできるだけ少なくし、再生が速やかに行われるようにしなければならない。そのための基本とは、まず動脈、神経を避けることである。動脈、神経は口腔内では特定の領域の骨の近くを通ることが多い。また万一、傷つけたとしても、血管も神経もある程度は再生修復する。口腔粘膜は口腔の複雑さもあり、部位によってそれぞれ特徴的な構造を持っている。

口腔粘膜のごく基本的な解剖は、ある程度可動性があるような部位においては粘膜下組織が存在するため、唾液腺、脂肪、そして太い神経や動脈が通っている(図1)。一方、可動性のない、たとえば付着歯肉などは粘膜下組織が骨膜(膠原線維などが多く詰まっている)になっていて、知覚性神経が豊富に分布している。そのため、傷つけると痛いし、年をとってくると膠原線維が硬くなってくるため修復が遅い(図2)。

上皮の修復のポイントは、固有層との境界にある基底層細胞であるが、これも年齢と共に活性が落ち

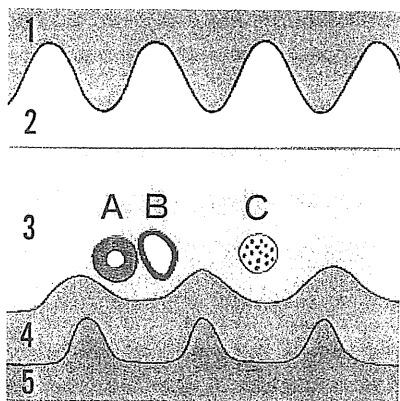


図1 口蓋や舌、口唇などでは比較的大い動脈、神経は粘膜下組織を通り、かつ骨の溝を通る。
A：動脈、B：静脈、C：神経線維束。

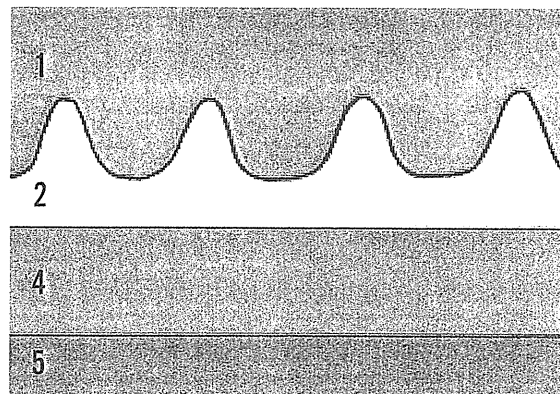


図2 歯肉などでは、膠原線維が多い粘膜下組織と骨膜が直接骨に接している。ここは老化によって硬くなるとともに知覚神経が多く、痛みが激しい。しかし大い動脈や神経はあまり分布していない。

1：上皮，2：粘膜固有層，3：粘膜下組織，4：骨膜，5：骨。
骨や筋肉上皮の一番下の粘膜固有層との境界の細胞（基底細胞層）が若いほど再生能力がある。粘膜固有層は膠原線維が多く、老化するほど硬くなり再生しにくい。

てくる。粘膜下では肉芽組織が修復再生のポイントであるが、これは線維芽細胞、平滑筋など再生能の高い間葉系の細胞に富むところが有利である。したがって、粘膜下組織があるところのほうが修復が早いということになる。

II 解剖学，口腔解剖学に対する誤解

神経について受ける質問は、舌の知覚と味覚の神経についてのことが多い。舌の味覚は舌神経、鼓索神経、中間神経のいずれが正しいのか、というものだ。しかしこれは、原則を理解していればなんのことはない問題なのだ。つまり、三叉神経の第3枝（下顎神経）の神経線維と顔面神経の神経線維が一緒になって舌神経を作っている（または三叉神経の第3枝の舌神経に鼓索神経が合流している），と理解されていないということにすぎない。

それと反対に、よくいえば「きちんと覚えすぎる」面もある。前記したように、教科書の記述は1つの

典型であり、そこから人間の体を多様に理解する「鍵」である。教科書に書いてある現象のみではなく、類似したことが実に多種多様、さまざまに起きているということを理解すべきである。

もう一例、下顎孔は下歯槽神経、下歯槽動脈・静脈などと下顎管の入口ないし出口なのだが、現実には三叉神経第3枝が、まず頬神経、舌神経などと分かれたのち、下顎孔近くで顎舌骨筋神経と分かれて下歯槽神経になるということが結びつかない。下歯槽神経が下顎孔に入る手前で分岐し、顎舌骨筋神経は下歯槽神経の内側を通る。だからメスの刃はこれらの神経、血管を傷つけないような方向に向けなければならないのである。

III 人体は再生する、しかも千差万別だ

以上のような“誤解”の遠因の1つには、このところ急激に学問が発達し、教える方にもかなりのとまどいがあるように思われる。たとえば一昔前まで

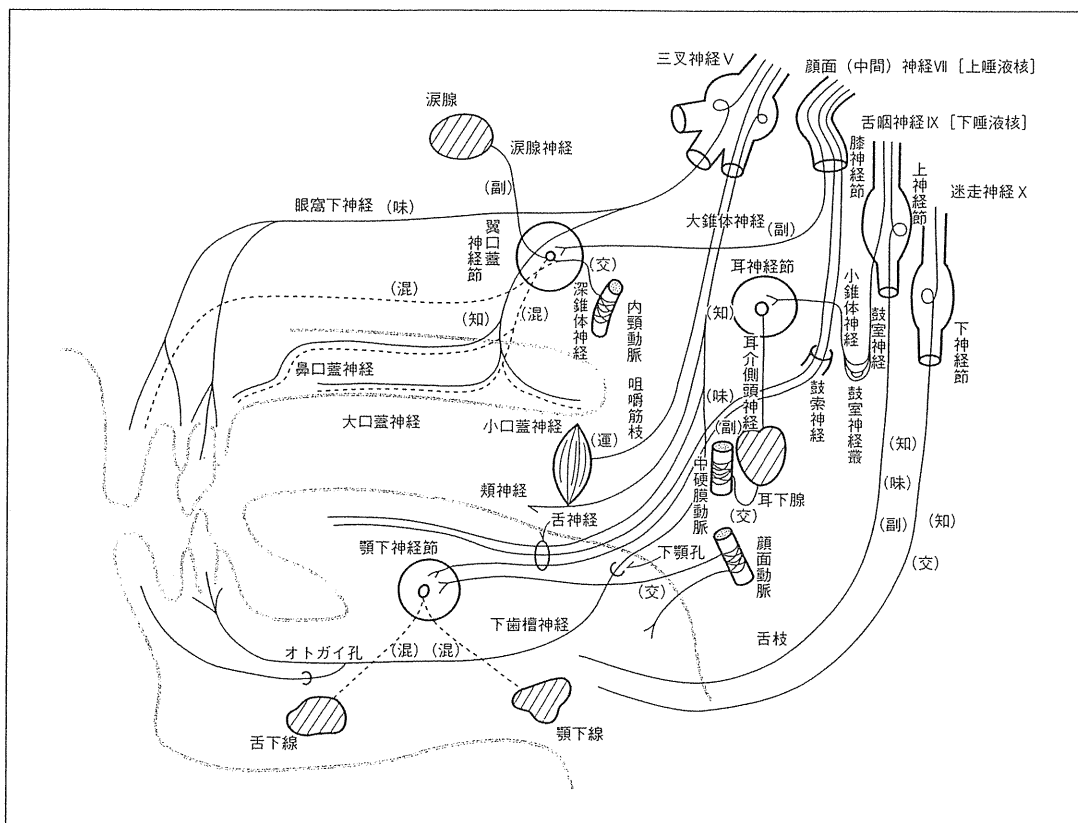


図3 口腔領域のおもな神経の分布と種類。

副：副交感性，交：交感性，知：知覚性，味：味覚性，混：混合性。

は、神経の再生はないと教科書に書かれ、堂々と教えられていたが、現在では下歯槽神経はもとより脳の移植まで考えられる時代となった。しかし振り返って考えてみれば、神経を傷つけても、ある程度すると知覚が回復することは、実地では理解していたはずである。単純に言えば、それに科学的な裏付けがついたという話だけなのだが……。

ここで憶えておいていただきたいことは、人間の体は実に強く、神経であれ血管であれ、再生しないものはないという事実だ。脱臼した歯でも再植すれば、歯根膜の中で切断した神経が再び歯髄まで進入し(?)再生するのだ。問題は再生するための条件である。

さて、口腔の中はほかの臓器と同じ、神経、血管、筋、骨、軟骨、腺のほかに、歯と歯周組織という複雑な構造を抱えている。この複雑な諸構造が年齢、性別、生活習慣、個体差等々を抱えているのだから、やっかいといえば、やっかいな器官である。だから歯科医学・医療が成り立つのだともいえるが。もちろん、これらも千差万別である。

Ⅳ 神経、脈管

解剖の基本的形態、それもあまり教科書に載っていない口腔を支配する神経の模式図を示す(図3)。口腔の神経の種類は、中枢すなわち脳からみれば、

出てゆくもの、入ってくるもの、脳以外から出てくるものの3種類に分かれる。機能的にみれば、脳に入ってくる知覚性などの求心性神経、脳から指令を出すための遠心性神経、自分の意思とは関係なく働く自律性神経に大別される。むしろ知覚性神経は脳へ刺激を送るので、自分の意思とは関係なく働くが、自律性神経には分類されていない。

自律神経は主に自律性器官を支配し、動脈の周囲にその幹（神経叢）がある交感神経、そして頭頸部では脳神経に混じっている副交感神経とに分類される。頭部には幹神経節がないから、頸部に存在する交感神経節である上頸神経節からこれら動脈壁の神経叢へ交感神経線維を送っている。頭頸部で複雑なのは、これらの神経が混在して走行配列していることである。

口腔を部位的にみると、口蓋、下顎、舌、口唇と頬、口腔底、咽頭部とに分けられる。ここで注意しなければならないのは口蓋である。口蓋は鼻腔、副鼻腔と連動した関係にあり、知覚、味覚、そして時には運動性神経が一緒の束となって一本（一束）の神経を構成している。だから、このような神経を傷つけると全部麻痺して、働かなくなってしまう。しかし、幸いなことに、後述するように太い神経は骨のそばを通っていて（骨を直に観察すると溝となっている）、よほどのことがない限り傷をつけることはない。

また、歯根膜や歯肉、歯髄はこれらの神経が複雑に走行しているが、ちょっと傷つけたくらいでは再生するか、傷ついても他に大きな影響はない。十分に注意しても傷つけてしまった時には、「再生する」と確信を持つことである。

次に、脈管系、口腔に分布する動脈は、まず心臓から近いということを認識する必要がある。心臓を出て大動脈（上行大動脈、次いで大動脈弓を通り、

右側ではさらに腕頭動脈）を経由して総頸動脈に入り、さらに外頸動脈、次いで顎動脈に入って口腔の各部位へと分岐する。この間は20cmにも満たない。だから口腔領域で細い動脈ほど圧が高く、もし動脈管を傷つけると血が遠くへ飛翔することになる。しかし、あわてる必要はない。上下顎の歯の近くの動脈は、特別の部位以外は非常に細く、病気など特別の条件がない限り、出血は必ず止まる。血管は修復するのである。

さて、危険な太い血管はどこにあるかというと、神経と同様に骨の近くを走行していて傷をつけにくい。まず、下歯槽動脈の入る下顎孔、大口蓋動脈の出る大口蓋孔、小口蓋動脈の出る小口蓋孔、眼窩下動脈の出る眼窩下孔、鼻から動脈が来る切歯乳頭の切歯管である。いずれの孔も神経、静脈と一緒に出入りする。舌に分布する舌動脈は太いが、外頸動脈から頸部で直接出て、舌の中央下を走行するので、歯槽の周囲の治療ではあまり傷をつけることはない。

太い血管は粘膜下組織を走行する。拍動するため骨が成長する時に血管の部分だけ骨化が阻害され、血管の通るところは溝となる。

同様に神経の分布は骨化より早いので、神経の通るところも溝となって骨に「〇〇溝」として残る。これは骨に近い位置を比較的太い神経や血管が通ることを意味する。ちなみに、このような領域は粘膜下組織があるために、唾液腺、脂肪組織などがある。だから、正中口蓋縫合の両脇奥のほうを触ると弾力があるのである。

❧ 口腔の粘膜

ここでは、主に歯周組織について述べる。前述のような理由により、粘膜下組織が欠如する付着歯肉、正中口蓋縫合などは粘膜上皮が直接に骨膜に接して

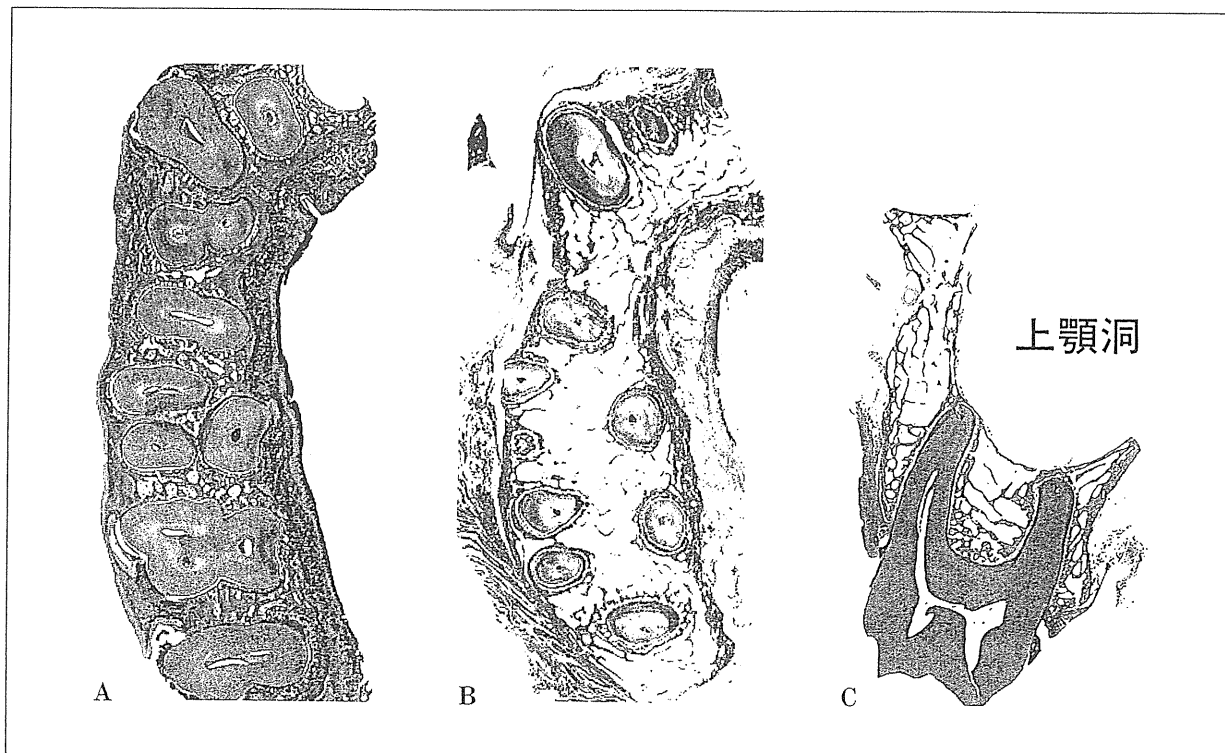


図4 A：上顎歯頸部の横断像，
B：上顎根尖部の横断像，
C：上顎第一大臼歯の縦断像（上顎洞との境界は非常に薄い骨層と上顎洞粘膜である）。
（鶴見大学・川崎堅三教授提供）

いる。したがって上皮の可動性もなく、知覚神経がたくさん分布している骨膜は、炎症で腫れたり注射針が直接接触すると痛みが激しい。逆にいうと、組織が密な所は、ちょっと太めの神経や動脈が通る余裕がないのであまり走行していない。しかし、遊離歯肉では粘膜下組織があるため、表面からみてもやや厚いし可動性があるが、太い神経や血管は走っていない。

しかしこれも、人により個体差がある。神経や血管の修復は若ければ若いほど早いし、柔らかいので傷もつけにくい。年をとって老化してくると膠原線維が硬くなって、血管も神経も硬くなる。ちょっとしたことで傷がつくし修復も長くなる。表皮も年

をとると薄くなり、傷をつけると治りにくい。血管は中膜と呼ばれる血管壁の真ん中の層が、拍動には一番大切だ。しかし、糖尿病などではこれがやられる。故に血管が傷つきやすく、修復が一層遅いのだ。

VII 歯の形態

歯、歯髄、歯と顎骨の形態的な関係についても質問が多かった。歯の形態や歯質もまた個人差が激しい。歯の形態に関するならば、歯冠の出来方はエナメル器（上皮）によって左右され、より発生の早い時期に形成される。しかし歯根は発生の後半、しかも顎の骨の形成されるころに、その影響下に形成さ

れる。

一般的に言えば、歯冠の方が周囲組織の影響を受けにくい（それでも実に多様である）。ということは、歯冠より歯根の方が一層色々な形になる可能性がある。たとえば8番の歯根が長くなって、O脚のように融合した根の穴に下歯槽神経が通ることもある。それに気づかずには抜歯すると、歯根に白い紐（実は下歯槽神経）がくっついて抜けてくる、ということになる。さて、歯根が形も多様なら、いきおい根管の形もさまざまになる。歯根の途中から根管が開く根外側枝もあり、開口部がどこにできるか一定の法則はない。歯根形成の末期にあたる根尖部位には根外側枝が特に多い。

また、根管が開くのは根尖部のみではなく、多様な開口部から、どこからでも神経などは入ってくる。年齢を重ねると歯根が完成し、次いでセメント質が厚くなってゆき、根尖孔はわかりにくくなっていく（根が完成していないと根尖孔は大きく開いているが、完成歯では非常にわかりにくい）。このような場合、頼りとなるのは経験と勘以外にはない。数多く、注意深く観察することである。

歯と顎の骨の関係だが、インプラントなどの際、特にご注意ください。一般的に、下顎や上顎の歯頸部は密に骨に取り巻かれている。しかし、上顎歯根の中腹や、上顎臼歯の根尖の上顎洞の近くは、歯が一層の薄い歯槽骨によって囲まれるのみで、骨は空洞状態にある。空洞のなかに歯根があると考えしてほしい(図4)。さらに上顎洞の粘膜は薄く、この

薄い骨を介して歯根が位置している。根管から無意識にリーマーを入れると簡単に突き抜け、根管と上顎洞は貫通する。

歯が抜ければ歯槽骨は吸収され消失する。だから無歯顎の下顎骨では、下顎管が表面のすぐ下に位置するようになる。歯肉の粘膜も薄くなり硬くなるため、傷をつけると治りにくい。

おわりに

本稿を書くにあたり、日本大学松戸歯学部第二解剖学教室同門会（平山勝憲会長）の方々にはアンケートなどにより、多大な御援助をいただいた。ここに深謝するとともに、日々の臨床における努力に敬意を表したい。

アンケートには実に多種多様の意見質問を寄せていただいた。1つ1つを解説することが本来の使命であるが、紙幅に余裕がない。いずれ1冊の本にするよう挑戦させていただくことにする。

本稿で述べたことを要約し、まとめとしたい。

「人の体はすべて違う」「常に変化する」。だから教科書に書かれていることは一例にすぎず「考える鍵」であると認識する。生体のバリエーションに対しては、「経験と勘」がそれをおぎなう。その際「人間の体は必ず修復する」と確信することである。

そして当教室では、診療室に頭蓋骨を置いて、いつも観察することを薦めている。

*

*

*

MINERAL TRIOXIDE AGGREGATEの これまでの研究結果と臨床応用

日本大学松戸歯学部口腔科学研究所

辻 本 恭 久

Research Results and Clinical Application of MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE

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

YASUHISA TSUJIMOTO, DDS, PhD.

緒言

日頃、歯科臨床を行っているなかで、さまざまな症例に出会うが、処置に窮する難症例の場合、現存する技術、薬剤では治癒が期待できないときがある。また、抜髄、感染根管治療時の髄床底や根管での穿孔は、その後の処置を難しいものとしてしまうばかりか、医源性疾患を引き起こし、最悪の場合は抜歯となるケースもある。最近では、実体顕微鏡（マイクロスコープ）を用いた治療を行う歯科医師が多くなってきたため、穿孔部や、根管内の偶発症については、かなり解決されるようになってきた。実際、私どもの診療科（歯内療法科）に送られてきた難治症例の多くは、根管内の垂直破折や穿孔が原因であることが、マイクロスコープを使用することで即座に判断（診断）することができるようになった。これまで、穿孔を起こした場合には、穿孔部の消毒止血を行った後に、アマルガムや接着性材料を使用してきた。しかし、患歯の根管系を完全に封鎖し、治癒を促進させる薬剤はなかった。

1993年、米国ローマリンダ大学Torabinejad教授によって開発されたMINERAL TRIOXIDE AGGREGATE (MTA) は根尖切除時の逆充填や、穿孔部の閉鎖等に有効であることから¹⁻⁹⁾、多くの臨床家に注目されている。図1に商品化されたMTAを示したが、DENTSPLY Tulsa DentalからPROROOT™ MTA (MINERAL TRIOXIDE AGGREGATE) ROOT CANAL REPAIR MATERIALとして発売されている。MTAは1998年にU.S. Food and Drug Administrationから認

可され、1999年から発売されたが、日本では現在のところ、厚生労働省の認可が下りていないため、販売はされていない。

本論文においては、MTAのこれまでに報告されていることを研究分野別にまとめ、解説をする。さらに臨床例を示し説明を行う。

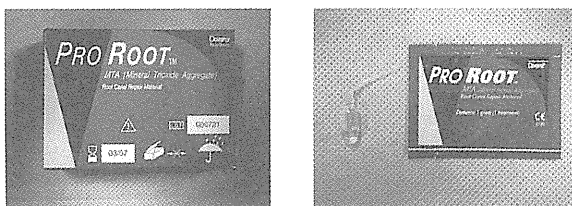


図1. MTAのパッケージ（左）と中に含まれている精製水とMTA 1包（右）

MTAの成分

MTAの主成分はportland cementであり、重量約75%を占めている。また、約20%の酸化ビスマス（Bismuth Oxide）、約5%の石膏（Gypsum）で構成されている。成分を列記すると、 $3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ (Tricalcium silicate)、 Bi_2O_3 (Bismuth oxide)、 $2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ (Dicalcium silicate)、 $3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$ (Tricalcium aluminate)、 $4\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ (Tetracalcium alminoferrite)、 $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Calcium sulfate dihydrate or Gypsum) である。

MTAの使用法

図2に示したように、粉3に対し水1の割合で混和する。粉成分は一袋に1g含有されている。水酸化カルシウムを混和するときと同様の感で行うとよい。

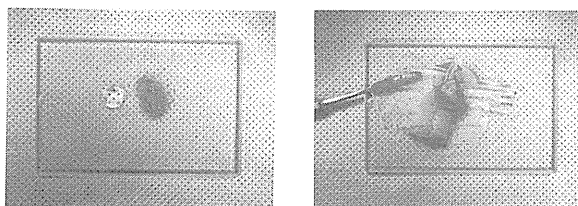


図2. 粉3に対し液1の割合で混ぜる

MTAの適応症

現在までに、MTAの使用適応症と考えられているのは、

1. 直接歯髄覆髄法
2. 根管あるいは分岐部の穿孔部の回復
3. 歯根吸収
4. Apexification
5. 逆充填
6. 垂直歯根破折
7. 漂白（walking bleach法）における歯根内バリアー等である。

MTAの物理化学的特性

Torabinejadら¹⁰⁾は、MTAとアマルガム、Super-EBA、Intermediate Restorative Material (IRM) の物性を比較検討し、報告している。それによれば、MTAは混和後pH 10.2であるが、上昇し3時間後ではpH 12.5となり、それを維持する。硬化時間は、アマルガムが4分±30秒、Super-EBAは9分±30秒、IRMは6分±30秒、そしてMTAは2時間45分±5分であり、MTAが硬化するまでに長時間を有することがわかった。また、圧縮強さは、24時間後ではアマルガムが312.5±20.1Mpa、Super-EBAは60.0±5.5Mpa、IRMは52.2±3.4Mpa、そしてMTAは40.0±4.4Mpaであり、MTAが一番数値的に劣る。しかし、21日後になると、アマルガム311.1±23.8Mpa、Super-EBA 78.1±9.3Mpa、IRM 57.4±5.9Mpa、そしてMTAは67.3±6.6Mpaであり、Super-EBAと有意差のない値となる。しかし、アマルガムと比較すると有意に低い値であった。このことから、MTAは硬化までに時間がかかるが、21日後にはSuper-EBAと同様の

圧縮強さを持つようになり、しかも、強アルカリで安定していることがわかる。

MTAの封鎖性

MTAの封鎖性について、Torabinejad ら¹⁾は根尖切除した歯の逆充填材料として使用されている、アマルガム、Super-EBAとMTAを比較した実験を行った。根尖切除部に深さ3mmの窩洞形成を行い、これらを充填し、Rhodamine Bという、蛍光色素を用いて漏洩の比較をした結果、MTAはアマルガム、Super-EBAと比較して有意に色素の漏洩を防いだと報告している。また、彼ら²⁾は、根尖切除後にMTAが血液にさらされることを考慮し、血液にさらした条件下で、アマルガム、Super-EBA、IRMとMTAを比較したが、MTAは有意にこれらと比較して、色素の漏洩を防いだと報告している。さらに彼らは³⁾、アマルガム、Super-EBA、IRMとMTAを根尖切除後に逆充填し、根管内に*Staphylococcus epidermidis*をbrothで填塞し、根尖部2～3mmまでをphenol red brothで浸した。*Staphylococcus epidermidis*が根尖部に到達すると色が変色するが、変色するまでの時間経過を90日まで計測した。その結果、アマルガム充填を行った場合は28.5日で*Staphylococcus epidermidis*が根尖部に到達し、Super-EBAでは34.5日、IRMでは15.0日、MTAは90日まで変色がなかった。すなわち、MTAは*Staphylococcus epidermidis*の微少漏洩を防いだわけである。これらの報告から、MTAは非常に優れた封鎖性を持つことがわかる。

穿孔部をMTAで処置した後の 病理組織学的検討

Pitt Fordら⁴⁾は、ビーグル犬の下顎小臼歯髓床底部に、trephine burを用いて人工的に穿孔させた。そして、穿孔直後にアマルガムまたはMTAで填塞を行ったグループと、穿孔後6週間唾液に汚染させた後、NaClOで洗浄を行い、アマルガムまたはMTAで填塞を行った。そして、その結果を病理組織学的に検討した。穿孔直後に填塞した場合、アマルガムでは7症例中7症例とも穿孔部に炎症が見られたが、MTAでは6症例中1症例であった。また、MTA 5症例のすべてにセメント質の形成が見られたが、アマルガムでは見られなかった。穿孔後6週間唾液に汚染させた後、NaClOで洗浄を行い、アマルガムまたはMTAで填塞を行った症例では、アマルガムでは8症例中すべての症例におい

て炎症が見られた。MTAでは7症例中4症例が炎症を起こしていた。また2症例においてセメント質の形成がみられた。さらに細菌感染を調べた結果、アマルガム症例において3例観察されたが、MTAでは観察されなかった。この報告からMTAがアマルガムと比較して、炎症を引き起こしにくいこと、セメント質形成促進作用があることが考えられる。

さらに、Torabinejadら⁵⁾は、カンクイザルの上顎切歯に、アマルガムあるいはMTAで逆充填を行い、病理組織学的検討を行った。その報告によると、アマルガムを逆充填した場合、6症例中6症例に炎症がみられた。セメント質がアマルガムを覆っているのが観察されたのは、6症例中0であった。MTAの場合は、6症例中1症例に炎症がみられた。また、セメント質がMTAを覆っていたのは6症例中5症例であった。両者ともに新生骨の形成は認められた。この報告からも、MTAはアマルガムよりも炎症を引き起こしにくいこと、セメント質形成促進作用を持っている可能性がある。

MTAの根尖閉塞性

Apexificationを行う場合、これまで水酸化カルシウムが使用されてきた。Shabahangら⁶⁾は、ビーグル犬の下顎小白歯の髓腔を14日間開放し、根尖病巣を人為的に作り、根管洗浄、水酸化カルシウム貼薬の後、次の材料を充填した。①Osteogenic Protein-1+collagen carrier ②水酸化カルシウム ③MTA ④collagen carrier その結果、根尖閉塞の割合は①Osteogenic Protein-1+collagen carrierにおいては、13症例中5症例(38%)、②水酸化カルシウムにおいても13症例中5症例(38%)であり、③MTAでは14症例中13症例であった。なお、④collagen carrierにおいては11症例中0(0%)であったと報告している。すなわち、この結果から、apexificationを行う場合には、これまで使用してきた水酸化カルシウムよりも、MTAのほうが優れていると指摘している。

MTAによる根管充填

MTAが根管充填剤として、使用できるかどうかについて実験し、検討した結果が報告されている。Hollandoら⁷⁾は、雑種犬の歯30本中15本に、MTAを使用して根管充填を行い、対象として、Ketac-Endoを15本に根管充填した。そして、病理組織学的観察から、次の結果を得ている。

MTAを使用した場合、主根管、側枝は新生セメント質で閉鎖され、しかも、歯根膜には炎症がみられなかった。しかし、Ketac-Endoを使用した症例においては、2症例にのみ根尖孔の部分的閉鎖がみられたが、アクシデントで歯根膜を押してしまった場合には炎症がみられた。すなわち、MTAで根管充填をした場合には、炎症を引き起こすことなく、新生セメント質で主根管、側枝を閉鎖できるということである。

MTAによる歯髄覆罩

Pitt Fordら⁸⁾は、MTAを用いて歯髄覆罩法を行いその結果を報告している。すなわち、サルの下顎切歯12本に、#1ラウンドバーで、直径1mmの露髄面を形成し、MTAあるいは水酸化カルシウム製剤を用いて直接覆罩を施した。そして病理組織学的検討した結果、MTAで覆罩したdentin bridgeが形成され、炎症はみられなかったが、水酸化カルシウム製剤で覆罩した症例では、すべての症例において炎症がみられ、6症例中2例にのみdentin bridgeが形成されていた。したがって、これまで使用されてきた水酸化カルシウム製剤よりも、MTAを使用したほうが、炎症を引き起こすことなく、dentin bridgeを形成し、直接歯髄覆罩が成功する可能性が高いことを示唆している。

MTAによる歯髄切断

Kohら⁹⁾は、抜歯予定のヒト下顎小白歯の歯髄切断法をMTAで行った結果、6ヶ月後の診査において、臨床的に予後良好であり、X線写真像でも硬組織の形成がみられた。抜歯した後の、病理組織切片から、dentin bridgeの形成と、正常歯髄の状態が確認されている。すなわち、ヒト歯髄に対しての臨床成績が良いことが示唆された。

MTAの生体適合性

Mitchelら¹⁰⁾は、MTAの生体適合性をヒト骨肉腫細胞(MG63細胞)を用いて調べ、さらに他の骨補填材、および歯科材料との比較を、細胞増殖と、種々のサイトカインの発現を調べることで比較検討した。その結果、MG63細胞の増殖を、成分の異なる3種のMTAは骨補填材と同様に促進した。しかし、水酸化カルシウム製剤は促進しなかった。また、IL-6およびIL-8が増加することから、MTAは生体適合性があるだけでなく、骨のターンオーバーを介

して治癒を促進している可能性が高いことを示唆した。

MTAの細胞毒性

MTAの細胞毒性を検討するために、Keiserら¹²⁾はヒト歯根膜線維培養細胞にMTA、アマルガム、Super-EBAを作用させ、細胞の生死を判定し、細胞毒性を検討した。その結果、練和、混和直後、あるいは混和24時間後を経過したものを作用した場合の毒性は、アマルガム、Super-EBAと比較して有意にMTAの毒性は低かった。このことから、根尖孔外、歯根外にMTAを作用させても、これまでの材料よりも安全性の高いことが考えられる。

以上の報告からMTAが歯内療法分野において有益な材料であることがわかる。Torabinejadらは学会や講演会において、臨床例を数多く提示しており、これまでに難症例と思われていた症例においても、MTAを使用することで治癒させている。日本では認可が下りていないため、患者にインフォームドコンセントを行い、承諾を得た場合にのみMTAを使用した。そのうちの2症例について報告する。

臨床症例

症例1 穿孔

患者は29歳女性で、上顎左側第二小臼歯の違和感を主訴として来院した。全身的既往歴は喘息がある。歯の現病歴では、数年前に根管治療を施され金属クラウンを装着されたが、咬合時の違和感が消えず、現在に至った。金属クラウンと金属コアを除去した後、マイクロスコープを使用して、根管内（近心、遠心、口蓋部）に穿孔部位があることを確認した。そのときのX線写真を図3に示した。



図3. MTA処置前のX線写真

患者にインフォームドコンセントを行い、MTAを使用することを承諾してもらった。根管系のcleaning、shapingをおこない、穿孔部のケミカルサージェリーを2.5% NaClOを用いて行った後、穿孔部にMTAを填塞した（図4）。

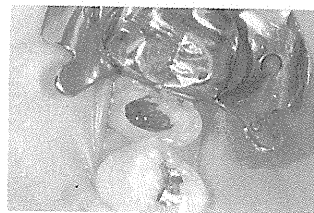


図4. MTA填塞

MTAを填塞した後の予後を観察し、臨床症状もないため、主根管の根管充填を行った（図5）。さらに、金属コアと金属クラウンを装着した（図6）が予後は良好であり、1.3年経過した現在も異常なく、患者も満足している。

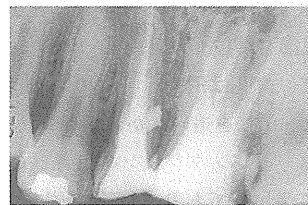


図5. 主根管の根管充填後のX線写真



図6. MTA処置後1.3年のX線写真

症例2 歯根垂直破折

患者は45歳の女性。前医から右側第一小臼歯根尖相当部に瘻孔があり、根尖病巣もあるために、歯内療法をしてほしいと依頼された。全身的既往歴は特になかった。右側第一小臼歯は数年前に根管治療をして歯冠補綴物を装着したが、瘻孔が気になった。多少の違和感があるが強い痛みはなかった。口腔内写真を図7に示した。またX線写真を図8に示した。

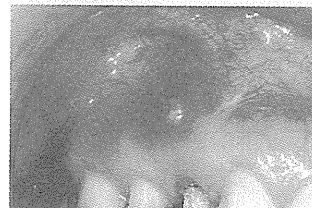


図7. 瘻孔が存在する

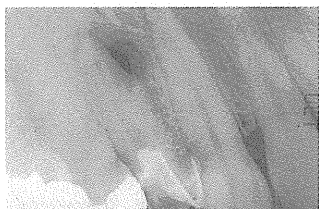


図8. 根尖周囲に不透過像が認められる

補綴物を除去した後、マイクロスコープ下で患歯を観察したところ、髄床底から根管ならびに根尖孔に至る破折線が認められた。患者にインフォームドコンセントを行い、MTAで破折線を覆い、かつ根管充填を行うことの承諾を得た。根管系ならびに髄床底部のcleaning、shapingをおこない、2.5% NaClOでケミカルサージェリーをおこなった。根管系と髄床底部をMTAで填塞した（図9）。MTA填塞後18日目において、瘻孔は消失し（図10）、他の臨床症状も異常はなかった。予後を追いつながら、レジンコアを築造し、最終的にポーセレンクラウンを装着した（図11）。患者はこの処置に満足しており、1.5年経過しているが異常はない。



図9. MTAによる填塞



図10. MTA填塞後18日目、瘻孔消失



図11. ポーセレンクラウンを装着後1.5年

結語

歯科臨床において、歯内療法を行うことは時間の浪費、見えにくい、治るかどうか分からない等の不安がつきまとい、穿孔や破折がある歯は、抜歯されてしまうことが多いように感じられる。抜歯しても、ブリッジ、義歯、インプラント等で咀嚼、口腔機能の回復をはかれると考えるからであろう。しかし、ブリッジを施すためには、隣在歯を破壊しなくてはならないし、義歯にしても、鉤歯に負担をかけてしまう。インプラントは、現在のところ保険診療ができないため、患者の経済的理由からできない場合もある。そのため、やはり自分の歯でいることが一番の解決になるが、現在のところMTAに勝る材料が見当たらない。日本での発売が遅れている理由についてはわからないが、われわれの研究室でも、MTAの生体に対する影響等を検討し、多くの情報を提供したいと考えており、現在、研究を進行中である。また、患者の健康回復の助けとなり、安全な材料があれば良いのであり、MTA以上の材料の開発を試みている。

謝辞

この論文の作成にあたり、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業の一部を費やした。また、歯内療法学講座の先生方に多大の協力を頂いたことに感謝の意を表する。

文献

- 1) Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate when used as a root and filling material. J Endodon 1993; 19: 591-5.
- 2) Torabinejad M, Higa RK, McKendry DJ, Pitt Ford TR. Dye leakage of four root end filling materials: effects of blood contamination. J Endodon 1993; 20: 159-63.
- 3) Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. J Endodon 1995; 21: 109-12.
- 4) Pitt Ford TR, Torabinejad M, McKendry DJ, Hong CU, Kariyawasam SP. Use of mineral trioxide aggregate for repairs of furcal perforations. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1995; 79: 756-62.
- 5) Torabinejad M, Pitt Ford TR, McKendry DJ, Abedi HR, Miller DA, Kariyawasam SP. Histologic assessment of

-
- mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J Endodon* 1997; 23: 225-8.
- 6) Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endodon* 1999; 25: 1-5.
- 7) Holland R, de Souza V, Nery MJ, Filho JAO, Bernabé PFE, Dezan EJr. Reaction of dog's teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endodon* 1999; 25: 728-30.
- 8) Pitt Ford TR, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *JADA* 1996; 127: 1491-4.
- 9) Koh ET, Pitt Ford TR, Kariyawasam SP, Chen NN, Torabinejad M. *J Endodon* 2001; 27: 540-2.
- 10) Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endodon* 1995; 21: 349-53.
- 11) Mitchel PJC, Pitt Ford TR, Torabinejad M, McDonald F. Osteoblast biocompatibility of mineral trioxide aggregate. *Biomaterials* 1999; 20: 167-73.
- 12) Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of mineral trioxide aggregate using human periodontal ligament fibroblasts. *J Endodon* 2000; 26: 288-9.
-

ケースレポート

根管穿孔部に Mineral Trioxide Aggregate を使用した症例

辻本 恭久 山崎 宗与
日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

Case report of using Mineral Trioxide Aggregate on root canal perforation

TSUJIMOTO Yasuhisa and YAMAZAKI Muneyoshi
Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Abstract : Mineral Trioxide Aggregate (MTA) was developed in 1993. Many clinicians have been used MTA to perforation part, root-end filling, root canal filling, etc. Previously, amalgam, glassionomer cement, or super EBA cement were used to perforation part for healing of patient part. In this case report, the patient feels the pain after infected root canal treatment, because the patient tooth has perforation. Then, patient tooth was treated by laser irradiation or $\text{Ca}(\text{OH})_2$ agent ; however, spontaneous pain did not disappear. The patient visited us for the treatment of the patient tooth. We checked the patient tooth, and MTA was applied to the perforation part, after obtaining the patient's consent. The patient tooth healed, and the prognosis is good. It is suggested that MTA is good material for repair of a perforation of the pulp floor.

Key words : perforation, MTA

(日歯内療誌 23(2) : 142~145, 2002)

緒 言

歯内療法中あるいは支台形成時に根管内から歯根外へ穿孔を引き起こすことがある。これまでに穿孔部を封鎖するために使用されてきた材料は、アマルガム、グラスアイオノマーセメント、スーパーボンド等であった。しかし、近年開発された Mineral Trioxide Aggregate (MTA) はさまざまな研究から、穿孔部の封鎖材料として前記の材料よりも優れていることが報告¹⁻³⁾されており、欧米諸国では臨床で使用されている。

今回、患者の同意が得られたことで穿孔部に MTA を使用した症例について報告する。

症 例

患 者：25 歳 女性

主 訴：上顎左側第一大臼歯の違和感

既往歴：特になし

現病歴：平成 12 年 12 月拍動性の自発痛があり、前医を受診。メタルコアを除去し、感染根管治療を行ったが穿孔部のあることを確認。その後、レーザーで穿孔部を蒸散したり、水酸化カルシウム製剤で処置をしたが、違和感あるため前医より治療依頼を受けた。

現 症：多少の違和感があるが打診痛、咬合痛等は無かった。

X 線写真所見：平成 12 年 12 月 18 日に根管治療を行う前と術後の X 線写真を図 1, 2 に示した。これらの写真からは明らかな穿孔部を特定することはできないが、頬側近心根周囲の歯槽白線が消失していると根

根管内穿孔部に Mineral Trioxide Aggregate を使用した症例



図 1 感染根管処置前



図 4 MTA 填塞後



図 2 感染根管処置後



図 5 Calcipect[®] で仮根管充填後



図 3 実体顕微鏡下での穿孔部の確認



図 6 MTA 処置後の X 線写真像

尖周囲に透過像が観察された。

診断名：穿孔，慢性根尖性歯周炎

上顎左側第一大臼歯に対する治療経過：

初診(平成 13 年 1 月 22 日)：病的歯質等を除去した後，実体顕微鏡下で患歯の観察を行った。図 3 に示したように，頬側髄床底から根管内部に穿孔が確認された。

2.5%NaClO を用いてケミカルサージェリーを行った。次に，図 4 に示したように MTA を穿孔部に填塞した。その後水酸化カルシウム製剤の Calcipect[®] で仮根管充填を行った(図 5)。その後，ストップと

酸化亜鉛ユージノールセメントを用いて二重仮封を行った。X 線写真を図 6 に示した。

2 回目(平成 13 年 2 月 5 日)：患歯に症状はなく，穿孔部にも異常がみられなかったので，Obtura II[®] を用いて垂直加圧充填法によって根管充填を行った(図 7)。なお，根管充填用シーラーはキャナルス[®] を用いた。

予後観察：MTA 処置後 2 カ月(平成 13 年 3 月 29 日)：特に異常はなく，X 線写真像においても特別な変化はみられなかった(図 8)。前医によって 3 月 8 日までに補綴物が装着された。



図 7 根管充填後の X 線写真像



図 10 MTA 処置後 1 年 9 カ月の X 線写真



図 8 MTA 処置後 2 カ月の X 線写真

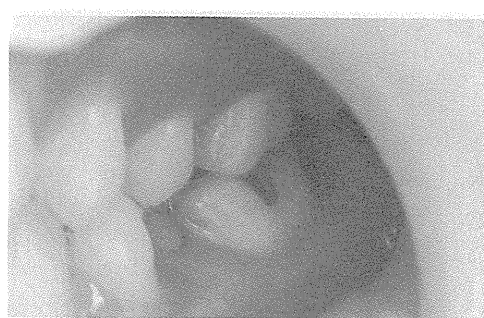


図 11 MTA 処置後 1 年 9 カ月の口腔内写真

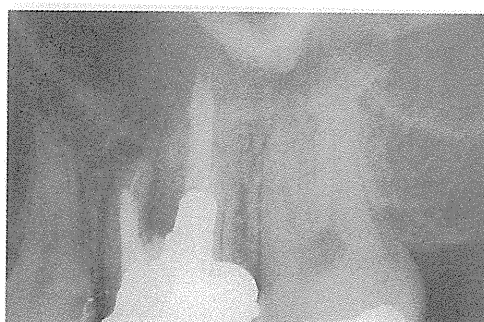


図 9 MTA 処置後 4 カ月の X 線写真

MTA 処置後 4 カ月 (平成 13 年 5 月 22 日) : 垂直打診において弱い反応を示したが、ほかの症状はなかった (図 9)。

MTA 処置後 1 年 9 カ月 (平成 14 年 10 月 12 日) : 特に症状はない。X 線写真を図 10 に、口腔内写真を図 11 に示した。

考 察

これまで、穿孔部における填塞材料として使用され

ていたのは、アマルガム、グラスアイオノマーセメント、水酸化カルシウム製剤等であった。しかし、最近では米国を中心に MTA が使用されるようになってきた。これまでにさまざまな研究者たちが MTA の効果について報告しており、穿孔部における MTA 処理後の周囲組織の回復には目を見張るものがある。特に、セメント質の添加、石灰化はこれまで使用されてきた水酸化カルシウム製剤やアマルガム等とは比較にならないぐらいに炎症を起こさずに促進されている。これらの報告^{4~8)}は、サル、ヒト等で行われており、その安全性病理学的評価は優れている。日本では、まだ厚生労働省から認可が下りておらず一般的な診療には用いられない。今回の症例では、患者が歯科医師であり、MTA に対する説明を十分行った後、患者の希望で使うことができた。MTA を穿孔部に填塞し根管充填を行い、その後補綴処置を行ったわけであるが、予後は良好であり障害なく使用されている。使用実感としてはあるが、これまで使用されていた材料よりも効果的で、しかも炎症を抑えて治癒を促進しているように思われる。前記した論文でも報告されているように、炎症を起こすことがほとんどない材料だけに、今後ますます期待される薬剤である。この先長期間経過観察を行わなければならないが、このような薬剤が早

く日本でも認可が下りて使用されるべきであると考え
るが、生体に有効であるそのメカニズムの詳細な解明
をするべく、現在基礎的研究も行っている。

文 献

- 1) Nakata, T. T., Bae, K. S. and Baumgartner, J. C. : Perforation repair comparing mineral trioxide aggregate and amalgam using an anaerobic bacterial leakage model. *J. Endod.*, 24 : 184~186, 1998.
- 2) Torabinejad, M., Higa, R. K., Mckendry D. J. and Pitt Ford, T. R. : Dye leakage of four root end filling materials : Effects of blood contamination. *J. Endod.*, 20 : 159~163, 1994.
- 3) Torabinejad, M., Falah Restegar, A., Ketter, J. D. and Pitt Ford, T. R. : Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J. Endod.*, 21 : 109~112, 1995.
- 4) Pitt Ford, T. R., Torabinejad, M., Mackendry, D. J., Hong, C. U. and Kariyawasan, S. P. : Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 79 : 756~762, 1995.
- 5) Torabinejad, M., Pitt Ford, T. R., Mackendry, D. J., Abedi, H. R., Miller, D. A. and Kariyawasam, S. P. : Histologic assessment of mineral trioxide aggregate as a root-end filling in monkeys. *J. Endod.*, 23 : 225~228, 1997.
- 6) Shabahang, S., Torabinejad, M., Boyne, P. P., Abedi, H. and McMillan, P. : A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J. Endod.*, 25 : 1~5, 1999.
- 7) Arens, D. E. and Torabinejad, M. : Repair of furcal perforations with mineral trioxide aggregate Two case report. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 82 : 84~88, 1996.
- 8) Torabinejad, M. and Chivian, N. : Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J. Endod.*, 25 : 197~205, 1999.

著者連絡先：辻本恭久

日本大学松戸歯学部歯内療法学講座

〒 271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1

歯科医療情報の標準化作業—ICD-DA対応歯科標準病名マスターについて—

齊藤 孝親¹⁾ 中山 均²⁾ 佐々木 好幸³⁾ 鈴木 一郎⁴⁾ 玉川 裕夫⁵⁾ 成澤 英明⁶⁾
萩原 芳幸⁷⁾ 日高 理智⁸⁾ 森本 徳明⁹⁾ 山田 卓也¹⁰⁾ 西田 悟¹¹⁾

日本大学松戸歯学部口腔診断学教室・口腔科学研究所¹⁾

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座(歯科放射線分野)²⁾

東京医科歯科大学歯学部附属病院 歯科医療情報部³⁾ 新潟大学歯学部附属病院口腔外科⁴⁾

大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部・医療情報室⁵⁾ 昭和大学歯学部保存修復学教室⁶⁾

日本大学歯学部補綴学教室クラウンブリッジ学講座⁷⁾ 九州歯科大学歯科保存学第二講座⁸⁾

矯正歯科森本⁹⁾ 日本歯科医師会レセプト電算処理検討委員会¹⁰⁾

保健医療福祉情報システム工業会(JAHIS)医事コンピュータ部会歯科システム委員会¹¹⁾

Standardization of ICD-DA Based Diagnostic Terminology for Dentistry in Japan

Takachika Saito¹⁾ Hitoshi Nakayama²⁾ Yoshiyuki Sasaki³⁾ Ichiro Suzuki⁴⁾
Hiroo Tamagawa⁵⁾ Hideaki Narusawa⁶⁾ Yoshiyuki Hagiwara⁷⁾ Masatoshi Hitaka⁸⁾
Noriaki Morimoto⁹⁾ Takuya Yamada¹⁰⁾ Satoru Nishida¹¹⁾

Department of Oral Diagnostics, Research Institute of Oral Science,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo¹⁾

Department of Oral Pathobiological Science (Oral Radiology),
Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine²⁾

Section of Dental Informatics, Tokyo Medical and Dental University Dental Hospital³⁾

Division of Oral Surgery, Niigata University Dental Hospital⁴⁾

Division of Medical Information, Osaka University Dental Hospital⁵⁾

Department of Operative Dentistry, Showa University School of Dentistry⁶⁾

Department of Crown and Bridge Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry⁷⁾

Department of Periodontology and Endodontology, Kyushu Dental College⁸⁾

Morimoto Orthodontic Office⁹⁾ Japan Dental Association¹⁰⁾

Japanese Association of Healthcare Information System Industry¹¹⁾

Abstract: In order to develop a standard disease master for dentistry based on the ICD-DA classification, we categorized and organized master lists of dental-disease names used at various dental institutions, and then linked the information according to the ICD-DA. We experimentally encoded 530 clinical dental-disease names, and found that 70% of the clinical dental-disease names corresponded to a disease name specified in ICD-DA as well as a synonymous disease name. However, 23% of the clinical dental disease names could not be associated with an ICD-DA code, because several disease names were considered for the same condition. Further, 7% of the clinical dental-disease names did not correspond to any code, because the disease state expression was not specified in the ICD-DA.

Keywords: ICD-DA, Dentistry, Terminology, Standardization, MEDIS

1. はじめに

医療の情報化の中で、病名など用語・コードの標準化は電子カルテや遠隔医療などの医療情報システムを支える基礎としての重要性をさらに増しており、医科領域では、ICD10 対応電子カルテ用標準病名マスター(財団法人医療情報システム開

発センター、以下、MEDIS 病名マスター)などの提供が始まっている。しかし、歯科領域においては標準的な病名マスターなどは未整備の状態である。

歯科病名については、ICD10を歯科・口腔領域へ適用するためにICD-DA²⁾が設けられているが、歯科臨床場面での活用は少なく、一部病院歯科で使

用されているのみである。歯科医療の情報化を考えると、疾病統計の充実や医科病名との整合性は重要であり、そのため、ICDにも対応した標準的な歯科病名マスターの作成が急がれている。

演者ら財団法人医療情報システム開発センター・歯科分野の標準化検討委員会では、病院歯科や歯科医院で用いられている歯科病名などを収集、整理し、玉川ら³⁾、中山ら⁴⁾の検討を基礎に、ICD-DAに対応した歯科標準病名マスターの編纂作業を行っているので、その概要を報告する。

2. ICD-DAによるコード化の試行

コード化にあたっての課題等を知るため、ある機関で使用された530の歯科臨床病名についてICD-DAによるコード化を試行した。なお、ICD-DAは5桁目が歯科的に重要な意味を持つが、試行ではMEDIS病名マスターに準じ3桁及び4桁でコード化し、また、補綴物等についてはICD10およびICD-DAに明確な分類がみられないので、暫定的にMEDIS病名マスターに準じてT888でコード化した。

その結果、歯科臨床病名のうち、70%の歯科臨床病名についてはICD-DAに明示された病名、または同義の病名としてコード化することができた。しかし、23%の歯科臨床病名では複数候補が考えられ、コードを確定できず、7%の歯科臨床病名ではICD-DAに明示のない状態表現などのためコード化できなかった。

コード化の試行によって、記載された病名表記の情報不足の問題や後述する補綴物等に関する問題だけでなく、ICD10とICD-DA、そして歯科臨床病名などとの差異の問題もみられた。

例えば、歯性上顎洞炎は学術用語集歯学編にも記載されている病名であるが、ICD-DAには明示されておらず、MEDISマスターでは慢性上顎洞炎J32.0が割り当てられている。学術用語集歯学編においては歯性上顎洞炎とともに急性歯性上顎洞炎の記載もあるため、コード化にあたっては急性歯性上顎洞炎も考慮する必要などが考えられた。

3. 修復物及び補綴物に関する状態のコード化について

歯科領域では義歯破折、冠脱離、修復物不適合などの修復物や補綴物の状態は重要な診療情報であり、日常の歯科臨床では病名とほぼ同等に扱われている。しかし、死亡疾病分類から始まったICD10及びICD-DAには補綴物等に関する明確な分類はみられない。

補綴物等に関するコード化の現状を調べたところ、社会医療診療行為別調査では「歯の補綴」としてICD10の健康状態に影響を及ぼす要因および保健サービスの利用(Z;義歯の装着及び調整Z463、歯列矯正具の装着及び調整Z464など)が用いられているが、ICD-DAでは、その分類は割愛されている。また、MEDISマスターでは補綴物等に関する状態は、外科的及び内科的ケアのその他の明示された合併症・他に分類されないもの(T888)にコード化されているが、ICD-DAではT88の3桁分類までしかないなどの差異がみられた。H12年社会医療診療

行為別調査による疾患別の件数では、「歯周炎等」、「むし歯」に次いで「歯の補綴」は第3位の多い件数を示していたが、コード割り当てが粗であるため、歯科臨床で重要な「歯の補綴」の内容を知ることとはできない状態であった。したがって、ICD-DAによるコード化とともに補綴物等に関する状態を適切にコード化することが歯科臨床的には重要と考えられ、義歯、冠、修復物などの補綴物名コードおよび破損、脱落、不適合などの状態コードをICD-DAコードの下位に付与する方法⁵⁾などを考えている。

現在、これらの課題を検討しつつ、ICD-DAに対応したMEDIS歯科標準病名マスターの編纂作業を行っている。

謝辞:ご協力頂いた日本歯科医師会、日本歯科医学会、財団法人口腔保険協会に感謝申し上げます。一部、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業に拠った。

参考文献

- [1] 財団法人医療情報システム開発センター(MEDIS-DC), ICD10対応電子カルテ用標準病名マスター(Ver. 2.00), 財団法人医療情報システム開発センター, 2002.
- [2] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 国際疾病分類歯科学および口腔科学への適用 第3版 ICD-DA, 財団法人厚生統計協会, 2001.
- [3] 玉川裕夫, 常光 旭: 歯科医療情報の標準化について(ICDに準拠した病名コードの提案): 歯科医療情報システム研究会論文集1988, 2: 61-4, 1988.
- [4] 中山 均, 伊藤 豊, 中村太保, 武埴 晃, 内藤智浩, 櫻井恒太郎, 歯牙口腔関連標準病名集作成のための技術的検討—MEDIS対応歯科病名テーブルの試作—, 医療情報学, 21(6), 425-434, 2001.
- [5] 小川光一: 歯科臨床診断におけるICD-DA適用の妥当性の検討, 第15回医療情報学連合大会, 961-962, 1995.

ICD-DA対応歯科標準病名マスターについて

齊藤 孝親¹⁾ 中山 均²⁾ 佐々木 好幸³⁾ 鈴木 一郎⁴⁾ 玉川 裕夫⁵⁾ 成澤 英明⁶⁾
萩原 芳幸⁷⁾ 日高 理智⁸⁾ 森本 徳明⁹⁾ 山田 卓也¹⁰⁾ 西田 悟¹¹⁾

日本大学松戸歯学部口腔診断学教室・口腔科学研究所¹⁾

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座(歯科放射線分野)²⁾

東京医科歯科大学歯学部附属病院 歯科医療情報部³⁾ 新潟大学歯学部附属病院口腔外科⁴⁾

大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部・医療情報室⁵⁾ 昭和大学歯学部保存修復学教室⁶⁾

日本大学歯学部補綴学教室クラウンブリッジ学講座⁷⁾ 九州歯科大学歯科保存学第二講座⁸⁾

日本医療情報学会課題研究会「歯科分野における保健医療福祉情報の標準化に関する研究会」

代表幹事・矯正歯科森本⁹⁾ 日本歯科医師会レセプト電算処理検討委員会¹⁰⁾

保健医療福祉情報システム工業会(JAHIS)医事コンピュータ部会歯科システム委員会¹¹⁾

ICD-DA Based Diagnostic Terminology for Dentistry

Takachika Saito¹⁾ Hitoshi Nakayama²⁾ Yoshiyuki Sasaki³⁾ Ichiro Suzuki⁴⁾

Hiroo Tamagawa⁵⁾ Hideaki Narusawa⁶⁾ Yoshiyuki Hagiwara⁷⁾ Masatoshi Hitaka⁸⁾

Noriaki Morimoto⁹⁾ Takuya Yamada¹⁰⁾ Satoru Nishida¹¹⁾

Department of Oral Diagnostics, Research Institute of Oral Science,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo¹⁾

Department of Oral Pathobiological Science (Oral Radiology),

Hokkaido University Graduate School of Dental Medicine²⁾

Section of Dental Informatics, Tokyo Medical and Dental University Dental Hospital³⁾

Division of Oral Surgery, Niigata University Dental Hospital⁴⁾

Division of Medical Information, Osaka University Dental Hospital⁵⁾

Department of Operative Dentistry, Showa University School of Dentistry⁶⁾

Department of Crown and Bridge Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry⁷⁾

Department of Periodontology and Endodontology, Kyushu Dental College⁸⁾

Morimoto Orthodontic Office⁹⁾ Japan Dental Association¹⁰⁾

Japanese Association of Healthcare Information System Industry¹¹⁾

Abstract: In the field of medicine, a standard disease master with an electronic medical record system based on the ICD-10 is available for use, however, in the field of dentistry, no such master is available. In order to develop a standard disease master for dentistry based on the ICD-DA, we categorized and organized master lists of dental-disease names used at various dental institutions, and then linked the information according to the ICD-DA. The present report summarizes this developmental process and discusses the standardization of terminology and codes in the field of dentistry.

Keywords: ICD-DA, Dentistry, Terminology, Standardization, MEDIS

1. はじめに

用語・コードなどの標準化は電子カルテなどの医療情報システムや遠隔医療を支える基礎としての重要性をさらに増してきており、医科領域では用語・コードの標準化として、標準病名マスター、標準手術処置マスター、標準医薬品マスター、標準臨床検査マスターおよび標準医療材料マスターの開発、普及が図られている。しかし、歯科領域ではまだ未整備なため、歯科標準病名マスターなど歯科領域の用語・コードの標準化が急がれている。そのような状況から、保健医療分野の情報化にむけて

のグランドデザインが示したアクションプランに則り、平成13年度末、財団法人医療情報システム開発センター(MEDIS)に歯科分野の標準化検討委員会が設けられ、歯科領域における情報化にむけての用語・コードの標準化作業が開始された。

演者ら歯科分野の標準化検討委員会では、まず歯科病名の標準化に着手し、現在、既存の病名集や病名マスターの収集、整理を行い、ICD10対応電子カルテ用標準病名マスター(以下、MEDIS病名マスター)¹⁾との関係²⁾も考慮して、ICD-DA⁴⁾対応歯科標準病名マスターの作成を行っているの、その概要を報告する。

2. 歯科病名資料

歯科病名の検討資料として、大学付属歯科病院における病名マスター、JAHIS医事コンピュータ部会・歯科システム委員会編纂の歯科レセコン用病名マスター、文部省学術用語集歯学編および歯学学術用語補遺集、ICD-10、ICD-DA、MEDIS病名マスターなどを用いている。

3. 概要

ICD10を歯科・口腔領域へ適用するための補助分類であるICD-DAによるコード化にあたっての課題等を知るため、ある機関で使用された歯科臨床病名についてICD-DAによるコード化を試行した。

コード化を試行した歯科臨床病名の中に「根尖周囲膿瘍」の記載がみられたが、「根尖周囲膿瘍」に関するICD-DAの分類は、4桁コードで「K046瘻孔を伴う根尖周囲膿瘍」と「K047瘻孔を伴わない根尖周囲膿瘍」の2つがあり、病名として「根尖周囲膿瘍」とだけ記され、瘻孔の記載がない場合はK047にコード化される。瘻孔の有無だけでなく、瘻孔の部位まで病名に記載されていれば、「K046瘻孔を伴う根尖周囲膿瘍」は、5桁コードによって、さらにK0460 上顎洞への瘻孔を伴うもの、K0461 鼻腔への瘻孔を伴うもの、K0462 口腔への瘻孔を伴うもの、K0463 皮膚への瘻孔を伴うものなどに細分化することが可能で、日常臨床で用いられる内歯瘻、外歯瘻という情報を知ることができる。このように、歯科的情報がよく含まれる5桁分類項目をどこまで生かせるかが大きな課題と考えられている。

このような病名表記の問題も含め、下記のような点が課題となっている。

(1) ICD-DAとICD10、MEDIS病名マスターとの関係について

どのような場合にICD-DAではなく、ICD10を参照するか(ICD-DA記載の分類項目は全てICD-DAでコード化し、それ以外をICD10で参照するか)など。

(2) 歯科臨床病名とICD-DAとの関係について
C1～C4を、エナメル質に限局したう蝕、象牙質う蝕、セメント質う蝕、停止性う蝕に誘導(リードターム)できるか、2次う蝕、COをどうするかなど。

(3) 修飾語の範囲について

MEDIS病名マスターでは病名と修飾語が分けられているが、頻出する病名、例えば、急性化膿性歯髄炎、慢性潰瘍性歯髄炎などでは修飾語(急性、慢性、化膿性、潰瘍性)を予め付した病名として登録するかなど。

(4) 修復・補綴関係のコード化について

歯科領域では破折、脱離、不適合などの修復物や補綴物の状態は重要な診療情報であり、病名とほぼ同等に扱う必要があることから、ICD-DAで欠落している修復物及び補綴物に関する状態をどのようにコード化するかなど。

現在、これらの課題を検討しつつ、ICD-DA対応歯科標準病名マスターへ向けての作業を行っている。

参考文献

[1] 財団法人医療情報システム開発センター(MEDIS-DC)

，ICD10対応電子カルテ用標準病名マスター(Ver. 2.00)，財団法人医療情報システム開発センター，2002。

- [2] 玉川裕夫，常光 旭：歯科医療情報の標準化について(ICDに準拠した病名コードの提案)：歯科医療情報システム研究会論文集1988，2：61-4，1988。
- [3] 中山 均，伊藤 豊，中村太保，武埴 晃，内藤智浩，櫻井恒太郎，歯牙口腔関連標準病名集作成のための技術的検討—MEDIS対応歯科病名テーブルの試作—，医療情報学，21(6)，425-434，2001。
- [4] 厚生労働省大臣官房統計情報部，国際疾病分類 歯科学および口腔科学への適用 第3版 ICD-DA，財団法人厚生統計協会，2001。

ヒト顎口腔系感覚運動機能のシステム評価

Systematic Assessment for Human Stomatognathic Sensorimotor Functions

成田紀之*, 遠藤博史**, 松本敏彦*, 山村健介***

Noriyuki Narita*, Hiroshi Endo**, Toshihiko Matsumoto*, Kensuke Yamamura***

*日本大学 松戸歯学部 歯科補綴学第三講座, 顎関節咬合診療科, 口腔科学研究所

*Department of Removable Partial Prosthodontics, TMD/OFP Clinic and Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

**産業技術総合研究所 脳神経科学研究部門 感覚認知科学研究グループ

**Human Perception and Cognition Research Group, Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

***新潟大学大学院 医歯学総合研究科 顎顔面機能学分野

***Division of Oral Physiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

I. はじめに

顎口腔機能系の感覚運動機能に関するシステム評価とは、顎口腔機能をシステムとして捉え、下顎運動や筋放電出力、顎口腔の感覚入力のみならず感覚と運動の統合にかかわる中枢神経活動をも対象とした包括的機能評価法であり、その確立は高齢者ならびに中枢神経障害者における顎口腔機能の評価に有用である。

顎口腔系の感覚運動機能にかかわる大脳皮質からの下行性制御に関する基礎的研究としては、覚醒サルを用いた電気生理学的研究¹⁾が挙げられる。Huangら²⁾は、サルの皮質内微小刺激によって一次感覚運動野、咀嚼野、深部咀嚼野（前頭弁蓋部）の4領域からリズム性下顎運動が誘発されることを報告している。また、近年 Martinら³⁾は一次感覚運動野、咀嚼野、深部咀嚼野の皮質内微小刺激によりリズム性顎運動に加え、嚥下が誘発されることを報告している。

さらに、覚醒サルにおける咀嚼、嚥下、随意性の顎・舌運動に関連する神経活動様式についても詳細な報告がなされている。とくに、Martinら³⁾は咀嚼／嚥下野の神経活動の記録を行い、咀嚼に関連するニューロンの多くが嚥下にも関連することを報告し、またYaoら⁴⁾は顔面野の神経活動の記録を行い、咀嚼に関連する多くのニューロンが舌の随意運動にも関連することを報告している。

加えて、覚醒サルを用いた顎口腔系の感覚運動機能にかかわる皮質領域への可逆的障害実験において、Linら⁵⁾は体性感覚野の冷却による咀嚼に伴うリズム性顎・舌運動ならびに顎・舌筋の活動様式に変調を報告し、また、Yamamuraら⁶⁾は皮質運動野の冷却による咀嚼準備期の延長とその期間の顎・舌筋の筋活動に著しい変調を報告している。さらに、Naritaら^{7, 8)}は咀嚼／嚥下野の冷却が、体性感覚野ならびに顔面運動野への冷却とは明らかに異なり、咀嚼ならびに嚥下の開始、リズムカルな咀嚼運動の遂行とその際の顎・舌筋活動、嚥下筋活動などを障害することを報告している。

ヒトの下顎運動中枢性制御に関する磁気共鳴機能描図(f-MRI)研究⁹⁾により、下顎のtapping時、clenching時のいずれにも一次感覚運動野、小脳、補足運動野の活動性が有意に増加し、tapping時にはさらに前頭弁蓋部の活動性にも有意な増加が示された。このf-MRI研究によって示されたtapping時の脳活動所見はHuangらがサルの皮質内微小刺激において示したリズム性下顎運動を誘発する脳領域とよく一致している。また、Hamdyら¹⁰⁾はヒトの嚥下に関する研究において、これらの脳領域に有意な活動性を報告している。

前頭／頭頂弁蓋部の機能に関する臨床報告では、同領域の障害によって顔面筋、咀嚼、嚥下に関する運動失調(anterior operculum syndrome or Marie-Foix-Chavany syndrome)¹¹⁻¹³⁾が報告されている。

脳活動の非侵襲的計測法

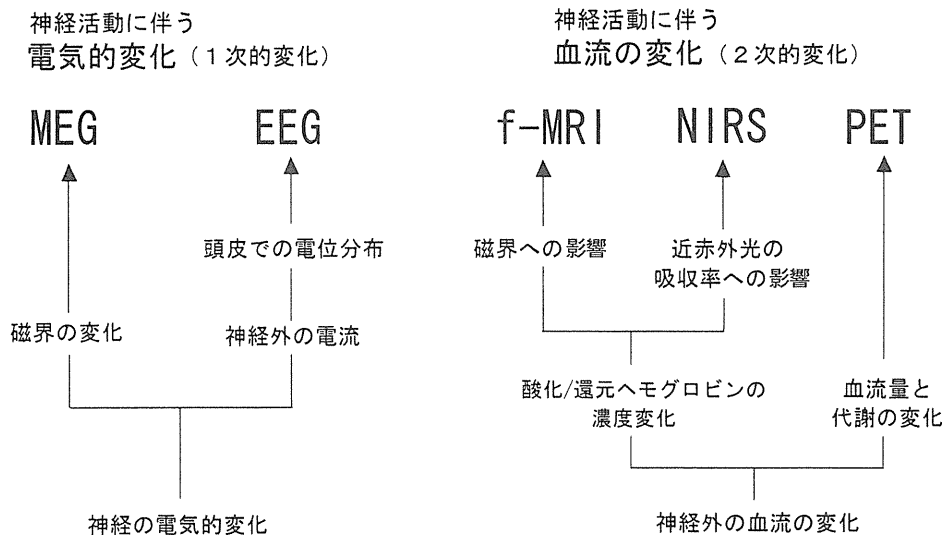


図1 各非侵襲的計測法が検出対象とする脳活動様相

以上のように、顎口腔系の感覚運動機能に関する基礎的なならびに臨床的報告からも、顎口腔機能運動時の皮質活動性を評価対象とすることの意義は大きいものと考えられる。

Ⅱ. 脳活動を非侵襲的に計測するには

脳活動の非侵襲的計測法には、脳波計測 (EEG: electroencephalography)、脳磁場計測 (MEG: magnetoencephalography)、磁気共鳴機能描図 (f-MRI: functional magnetic resonance imaging)、PET 測定法 (PET: positron emission tomography) ならびに光トポグラフィー (NIRS: near infrared spectroscopy) が挙げられる。

図1にヒトの脳活動を非侵襲的に計測する方法を示す。脳波計測法は神経活動に伴う電気的変化をその神経外電流として計測し、頭皮上での電位分布を評価する。また、脳磁場計測は神経活動の伴う電気的変化を磁界の変化として捉える。一方、神経活動に伴う局所脳血流の変化を、とくに酸化/還元ヘモグロビンの濃度変化として捉えるのが f-MRI、NIRSである。f-MRI は還元ヘモグロビンの濃度低下による NMR (nuclear magnetic resonance) の信号増大を賦活信号として計測し、また、

NIRS は酸化/還元ヘモグロビンの濃度変化を近赤外光の吸収率への影響から血流量を経時的に計測する。また、PETは神経外の血流変化を血流量と代謝の変化として捉え、とくにポジトロンを放出して崩壊していく核種 (^{11}C , ^{18}F , ^{15}O など) で標式されたトレーサの生体内挙動を定量的に解析する。

とくに本稿では、光トポグラフィーならびに脳磁場計測について概説し、さらにこれまでの研究結果をもとに顎口腔機能系のシステム評価についての解説を加える。

Ⅲ. 光トポグラフィーによる顎口腔機能にかかわる脳活動の計測

波長の長い近赤外光は皮膚や頭蓋骨を透過しやすく、頭蓋内の大脳皮質まで到達できる。また、近赤外光は脳組織を通過する間にヘモグロビンにより吸収されることから、その反射光を計測することで脳組織内のヘモグロビンの濃度変化を調べることができる。また、酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンはそれぞれ吸収係数が異なることから、酸化ヘモグロビンと還元ヘモグロビンの濃度が計測可能となる。

光トポグラフィー装置 (日立メディコ, ETG-100, 図

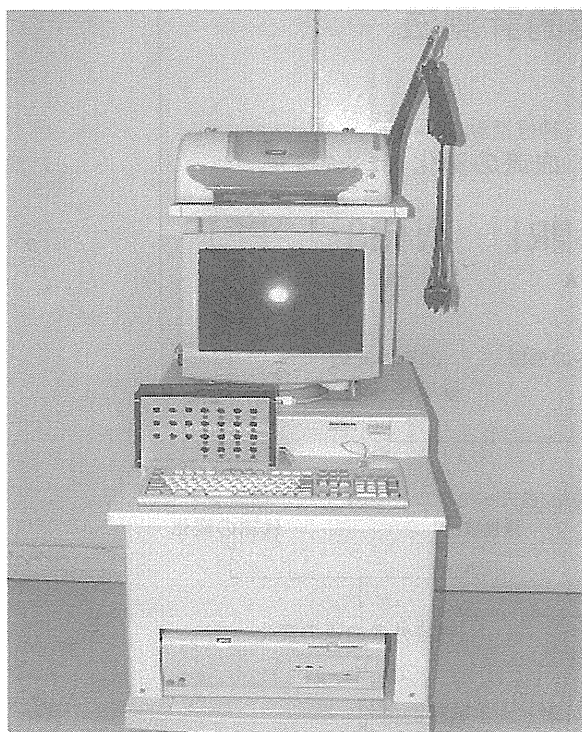


図2 光トポグラフィー装置 (ETG-100) の外観

2) は780 nmと830 nmの2波長光を1 Hz-10 Hzの範囲で正弦変調させたのち、8本の照射用光ファイバを用いて被験者の頭蓋に照射する。また、大脳皮質の計測では、頭皮上の照射・検出間距離が30 mm程度はなれる必要があり、そのため照射用光ファイバと検出用光ファイバは30 mm間隔で正方格子状に交互に配置させ、最大24 CHの計測を可能としている。

光トポグラフィー装置による顎口腔機能にかかわる脳血流の計測¹⁴⁾に先立ち、一次感覚運動野の領域を包含する頭頂から側頭におよぶ片側頭蓋部にプローブ（照射-検出間30mm, 24CH）を装着した。被験運動には、咀嚼、嚥下ならびにそれらの想起を用い、手指運動を対照とした。いずれの運動も安静40秒間の後に10秒間行わせ、それを5回繰り返した（図3）。データの加算処理は運動前、後における安静20秒間と運動10秒間を対象として行った。さらに、3次元トポグラフィー画像表示システムにより計測データを被験者個々の脳磁気共鳴描画（MR画像）上に転写し、大脳皮質における活動領域の同定を行った。

咀嚼ならびに嚥下に伴ってヘモグロビンの有意な変化（図3）がトポグラム上に示された。咀嚼および嚥下に

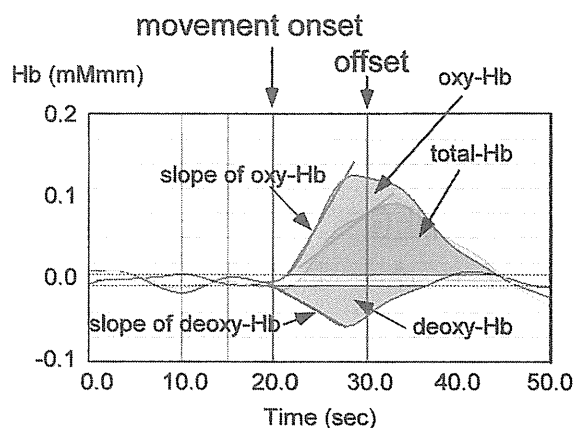


図3 嚥下時の経時的脳血流変化
嚥下開始後における酸化ヘモグロビンおよび全ヘモグロビンの有意な上昇ならびに還元ヘモグロビンの有意な低下を示す

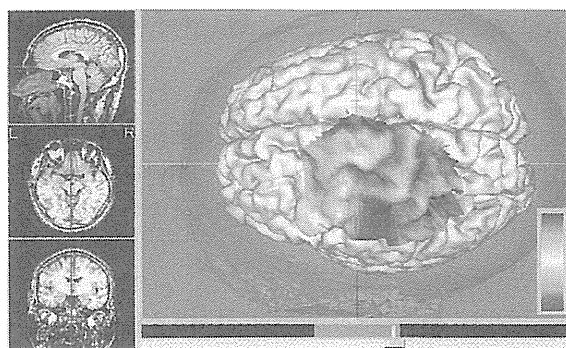


図4 MR画像上の嚥下による脳血流変化
口腔顔面領域の感覚運動皮質領域における酸化ヘモグロビンの有意な上昇を示す

伴う脳血流変化を示す領域は、手指運動によって生じる変化領域とは明らかに異なり、より外側に位置した。さらに、これらのトポグラムをMR画像上へ転写したところ、いずれの血流所見も中心溝に沿った一次感覚運動野の領域に同定された（図4）。また、それらの運動想起によっても同領域に有意な脳血流変化が示された。

以上のことから、咀嚼ならびに嚥下にかかわる大脳皮質の活動性は光トポグラフィーによって定量的に評価でき、さらに本装置が筋電図、顎運動の検査機器との併用を容易とすることから、今後脳血流を指標とした顎口腔

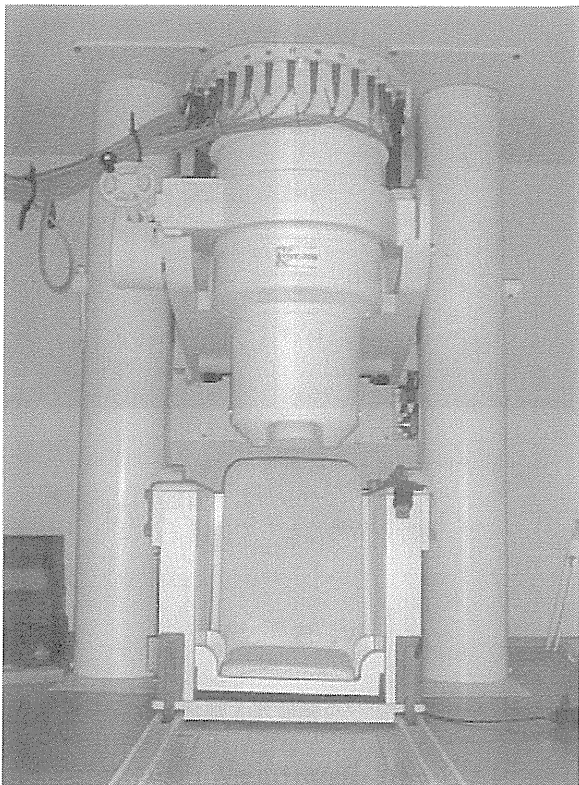


図5 MEG System (CTF Systems Inc., Canada)の外観

系の感覚運動機能に関するシステム評価が可能と考えられた。

IV. 下顎運動の皮質活動性に関する脳磁場解析

脳磁場は超伝導状態における Josephson 効果を利用した SQUID (Superconducting Quantum Interference Device, 超伝導量子干渉素子) によって計測される。図5に産業総合研究所に設置の脳磁場計測装置 (CTF Systems Inc., Canada) の外観を示す。

運動に関連する脳磁場計測 (MEG) においては、随意運動の開始約1秒前から緩やかな磁界の発現を認め、運動発現前の準備磁界 (readiness fields), 運動発現前後における運動磁界 (motor fields), さらに運動発現後における固有感覚系の feedback を反映すると考えられている運動誘発磁界 (movement evoked fields) が報告されている。

MEG は頭皮に対して平行な活動成分を計測し、補足運動野のような対向し、かつ近接するような活動成分あ

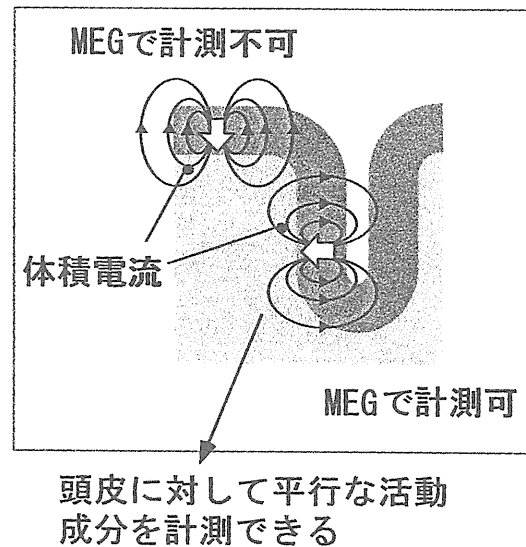


図6 MEGで計測可能な脳活動成分の模式図
MEG計測においては頭皮に対して平行な活動成分が計測される

るいは運動前野における頭皮に対して垂直な活動成分などは計測困難とされる (図6)。

下顎運動の皮質活動性に関する脳磁場解析においては¹⁵⁾, 被験者はシールド室内の磁界計測専用の椅子に座り、約5秒に一回のペースで開口、閉口、下顎側方運動、ならびに片側示指外転運動のそれぞれを100回試行した。脳磁界計測は64チャンネル全頭型計測システムを用い、サンプリング250 Hzにて行った。

一次運動野の活動性はいずれの下顎運動においても両側性に示された (図7, 8)。また、側方運動においては対側運動野の活動性に優位傾向を示した。一方、片側手指運動、とくに利き指 (右) 運動においては、対側優位な皮質活動性に有意性を示した。さらに、下顎運動ならびに手指運動の準備磁界の電流双極子は一次運動野に推定された (図9)。

以上のことから、一次運動野に示された準備磁界の両側性発現は下顎運動時における顎筋活動の両側性協調に対応する皮質活動性と理解される。

これまでの下顎運動に関連する脳電位の研究では、運動様相に応じた脳電位の有意な差異が報告されている。Yoshidaら¹⁶⁾ は、下顎側方運動にともなう運動準備電位が開口運動、閉口運動の電位に比べて有意に大きいことを報告している。

運動に関連する脳電位の発現には、感覚運動皮質、運

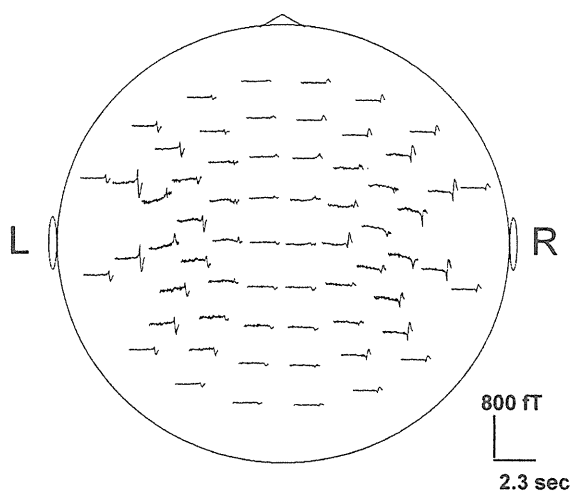


図7 各センサー部位における開口運動にかかわる準備磁界の発現様相

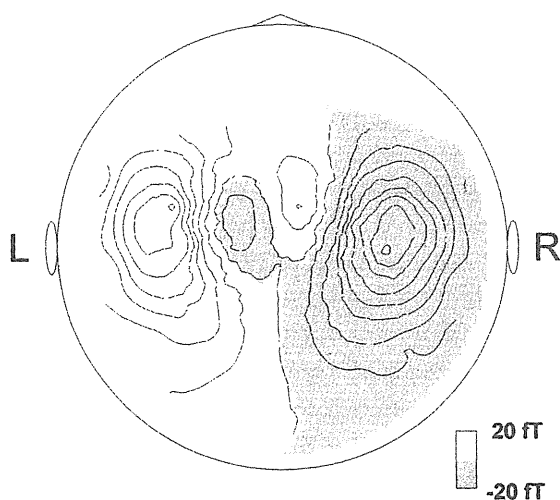


図8 開口運動にかかわる準備磁界の等磁界線図

動前野、補足運動野などの活動性がかかわり、とくに補足運動野の活動性は運動の複雑さ、難しさが増すにつれて増加することが報告されている。さらに、前述の下顎運動にかかわる脳磁場解析では、運動方向性による皮質活動性の差異を一次運動野に認めていない。

以上のことから、下顎側方運動において示された準備脳電位の有意な発現¹⁶⁾には補足運動野の活動性がとくにかかわるものと推察される。

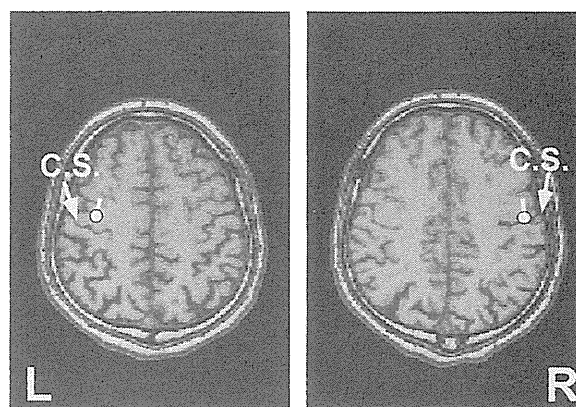


図9 下顎運動準備磁界の活動推定
下顎運動にかかわる準備磁界は一次運動野の活動性として推定された

V. 展 望

顎口腔機能にかかわる脳研究を推進することにより、顎口腔機能と脳活動のとかかわりが詳細に解明され、将来顎口腔系の感覚運動機能に関する包括的な評価が臨床的に可能となることを期待する。

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において行われた。

VI. 文 献

- 1) Sessle, B.J., Martin, R. E., Murray, G. M., et al: Cortical mechanisms controlling mastication and swallowing in the awake monkey, edited by Morimoto T., Matsuya T., Takada K., Brain and Oral Functions, 181-189, Elsevier, Tokyo, 1995.
- 2) Huang, C.-S., Sirisko, M.A, Hiraba, H., et al: Organization of the primate face motor cortex as revealed by intracortical microstimulation and electrophysiological identification of afferent inputs and corticobulbar projections, J. Neurophysiol, 59 : 796-818, 1988.
- 3) Martin, R. E., Kempainen, P., Masuda, Y., et al: Features of cortically evoked swallowing in the awake primate (*Macaca fascicularis*), J Neurophysiol, 82 : 1529-1541, 1999.
- 4) Yao, D., Yamamura, K., Narita, N., et al: Neural activity patterns in primate primary motor cortex related to

- trained or semiautomatic jaw and tongue movements, *J Neurophysiol*, 7 : 2531-2541, 2002.
- 5) Lin, L.-D., Murray, G.M. Sessle, B.J., Effects on non-human primate mastication of reversible inactivation by cooling of the face primary somatosensory cortex, *Archs Oral Biol*, 43 : 133-141, 1998.
 - 6) Yamamura, K., Narita, N., Yao, D., et al: Effects of reversible bilateral inactivation of face primary motor cortex on mastication and swallowing, *Brain Res*, 944 : 40-55, 2002.
 - 7) Narita, N., Yamamura, K., Yao, D., et al: Effects of functional disruption of lateral pericentral cerebral cortex on primate swallowing, *Brain Res*, 824 : 140-145, 1999.
 - 8) Narita, N., Yamamura, K., Yao, D., et al: Effects of reversible bilateral inactivation of primate lateral pericentral cortex on mastication, *Archs Oral Biol*, 47 : 673-688, 2002.
 - 9) 成田紀之, 井上健太郎, 泰羅雅登ほか: Tapping 及び clenching 脳活動の fMRI 研究, 歯科基礎医学会誌, 42 : 138, 2000.
 - 10) Hamdy, S, Rothwell, J.C., Brooks, D.J., et al: Identification of the cerebral loci processing human swallowing with $H_2^{15}O$ PET activation, *J Neurophysiol* 81 : 1917-1926, 1999.
 - 11) Mao, C.C., Coull, B.M., Golper, L.A.C., et al: Anterior operculum syndrome, *Neurology*, 39 : 1169-1172, 1989.
 - 12) Billeth, R., Jorgler, E., Baumhackl, U.: Bilateral anterior operculum syndrome, *Nervenarzt*, 71 : 651-654, 2000.
 - 13) Cappa, S.F., Giodotti, M., Papagno, G., et al: Speechlessness with occasional vocalizations after bilateral opercular lesions: a case study, *Aphasiology*, 1 : 5-39, 1987.
 - 14) Narita, N., Fujiwara, N., Iijima, M., et al: Spatial and temporal analysis of human orofacial motor function using multi-channel near-infrared spectroscopy, *Neurosci Abstr*, 26 : 2204, 2000.
 - 15) Narita, N. and Endo, H.: Neuromagnetic analysis of cortical activities associated with voluntary movements, edited by Nakamura Y. and Sessle B.J., *Neurobiology of mastication- from molecular to system approach*, 518-520, Elsevier, Tokyo, 1999.
 - 16) Yoshida, K., Kaji, R., Hamano, T., et al: Cortical potentials associated with voluntary mandibular movements, *J Dent Res*, 79 : 1514-1518, 2000.

顎口腔領域における MRIの応用

金田 隆



かねだ たかし

●日本大学松戸歯学部教授
(放射線学講座) ●歯学博
士, 日本歯科放射線学会指導
医 ●1986年日本大学松戸歯
学部卒業, 96年アメリカ合衆
国ハーバード大学医学部
Massachusetts Eye and
Ear Infirmary 放射線科研
究員, 99年日本大学教授 ●
1959年9月生まれ, 埼玉県出
身 ●主研究テーマ: エック
ス線 CT や MRI による顎
顔面領域の画像診断, 頭頸部
悪性腫瘍のリンパ節転移の画
像診断

要 約

MRI (Magnetic resonance imaging) は磁気共鳴画像と訳され, 磁場を利用して生体内の水素の磁気共鳴現象を画像化したものである。X線被曝がないことが特徴であり, コンピュータの進歩に伴い, 急速に普及してきた画像診断装置である。近年, 一般病院や大学病院のMRIを利用して顎関節疾患や歯科治療に応用している歯科開業医が年々増加している。MRIの原理や画像の特徴および対象症例を供覧し, 顎口腔領域への効果的な応用を述べる。

キーワード

MRI/顎口腔領域/画像診断

1. はじめに

従来から顎口腔領域疾患の画像診断は口内法を中心とした単純X線像やパノラマX線像が基本となっており, 種々の画像検査法がコンピュータの進歩に伴い開発, 利用されている現在においても, その有用性に変わりはない。しかしながら顎口腔領域は病理組織学的に多彩な成分で構成されており, 骨成分の分布を描出するにすぎない単純X線像で得られる情報は限られており, 診断や鑑別に苦慮する症例も多く存在した。

近年, コンピュータや医療機器の進歩に伴いデジタル画像による顎顔面領域への診断は急速に発展してきた¹⁾。特に一般医科病院にX線CTやMRIが普及し, 顎関節疾患やインプラント治療に, 一般病院や大学病院の画像機器を利用して日常歯科臨床に応用している歯科開業医が年々増加している²⁾。特に, 水素(プロトン)を画像化するMRIは顎関節疾患を中心

に顎口腔領域疾患へも利用されるようになってきた。今回、MRI による顎口腔領域における MRI の応用について述べる。

2. MRI の原理, 特徴

MRI は Magnetic resonance imaging の略で磁気共鳴画像と訳され、生体内組織の水素（プロトン）の磁気共鳴現象を画像化したものである。磁気共鳴現象とは1946年 Bloch と Purcell らによって発見された物理化学現象であり、磁場にさらされた原子核が特定の周波数の電波（ラジオ波）に共鳴して、自ら電波（MRI 信号）を発信する現象である（図1）。彼等はこれによってノーベル賞の栄誉に輝いている。

MRI の画像を得るまでは、①人体を静磁場（時間的に強度や方向が変化しない磁場）中に置き、静磁場強度にみあった周波数のラジオ波を人体にパルス状に放出する、②人体の水素原子が共鳴現象を起こしてエネルギーを吸収、励起状態となる、③ラジオ波を切る、④水素が MRI 信号を放出して元の状態にもどる、⑤MRI 信号をコンピュータで画像化するという順序である（図2、3）。

X線診断は顎口腔の場合、歯や顎骨のカルシウムの増減を観察しているのに対し、ヒトの水分含量は新生児で80％、成人で60％程度が水分であるため、MRI による画像診断は人体の構造を画像化するのに非常に好都合な画像検査機器である。特に水素原子は人体の水、脂肪、蛋白質、核酸などの分子を構成し、また、同じ水でもさらさらした水や粘性の高いどろどろした状態によって水素より発信する MRI の信号は異なる。MRI はこれら水素の信号強度をコンピュータを用いて再構成し、黒白の濃淡として画像化したものである²⁾。

通常、MRI の画像では信号強度により高信号（白）、低信号（灰色）、無信号（黒）と表現する。MRI はラジオ波の与え方や回数により多数の撮像法があるが、通常はスピンエコー法という撮像により得られる T1 強調像、T2 強調像および血管から造影剤を静脈注射した後の造影 T1 強調像等の2つまたは3つの画像の断層像から病巣の範囲や信号強度より画像診断を施行する。ほとんどの疾患は正常組織より水分量が増加または減少するため、T1 強調像および T2 強調像で信号が変化し、組織分解能の高い画像が描出される。これらの信号を周囲正常組織と比較し、病変

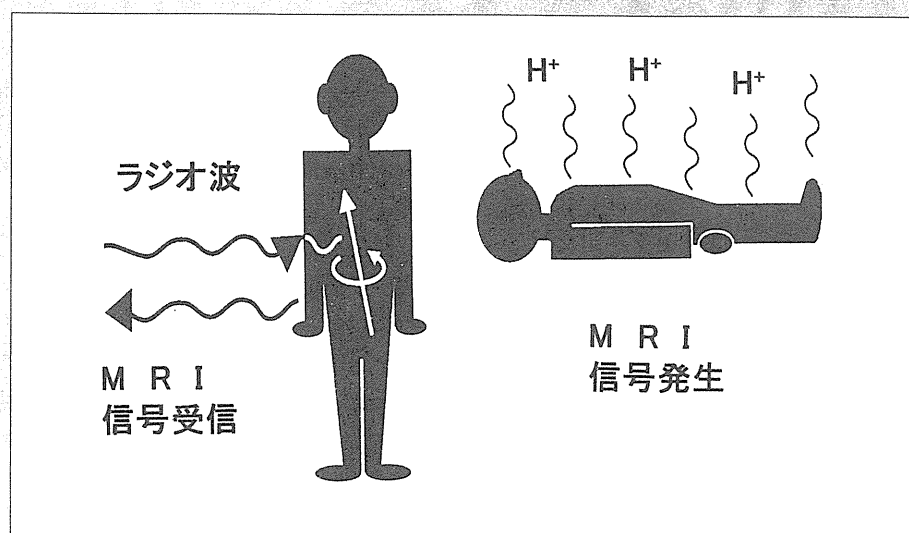


図1 MRI の信号発生のプロセス

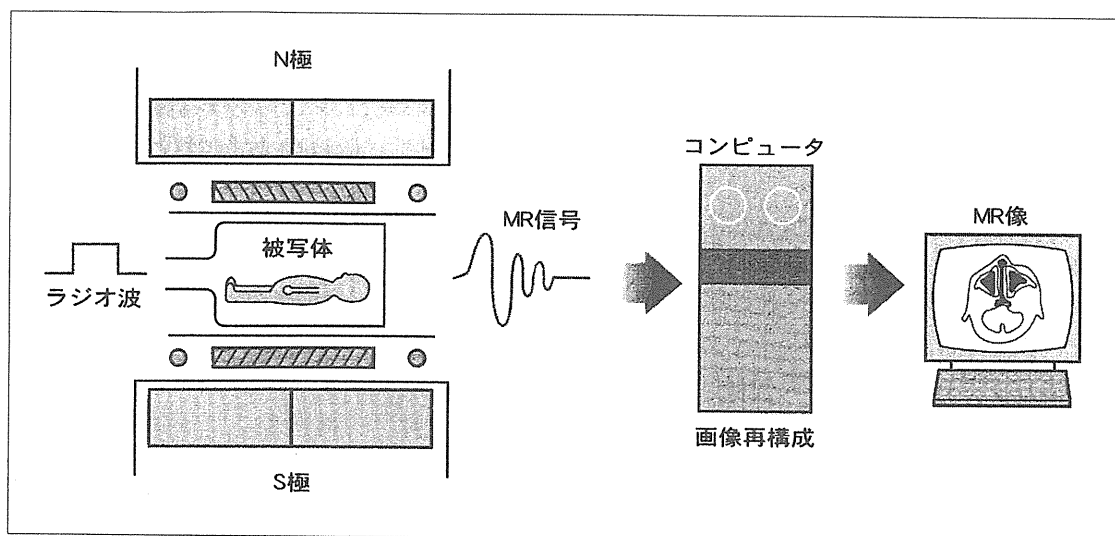


図2 MRIの信号発生から画像まで

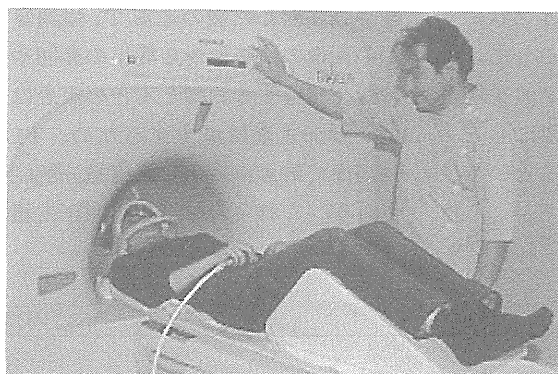


図3 MRIの撮像の実際
(日本大学松戸歯学部
放射線科)

の進展範囲や鑑別診断を行う。よって最低限の正常各組織の信号強度を理解することがMRIの画像診断の近道であり、代表的な各組織の信号強度を表に示す(表1)。

3. MRI 撮像依頼時の注意点

またMRIは磁場を利用するためX線検査機器とは異なる長所、短所をもっている。デジタル画像の代表的X線CTとの比較も含めて表に示す(表2)。歯科開業医が近隣の病院に患者さんのMRIを依頼する時は、撮影内容にもよるが、MRIの撮影は約30～40

分かかり、撮影時には太鼓のようなトントンという音が発生し、人体が入る程度の狭いスペースで動かないようにしなければならない。よって撮像に協力できない患者の撮像は困難である。

特にペースメーカー保持者や脳手術後のクリップやワイヤー等磁性体を持つ患者さんは禁忌であり、被曝を伴わない検査であるが、胎児に対するMRIの安全性もまだ確立されていないため、原則として妊婦のMRI撮像は避けるべきである。事前にこれらの十分な問診を行い、MRI検査事故の起きないように注意をしなければならない。

表1 各組織のMRIの信号強度 (SE: スピンエコー法)

	T1 強調像	T2 強調像
多くの腫瘍, 嚢胞	低～中信号(灰)	中信号(灰)～高信号(白)
脂肪, 骨髓, 耳下腺	高信号(白)	高信号(白)
粘膜, リンパ節	中～高信号(灰)～(白)	高信号(白)
筋肉, 神経	低～中信号(灰)	低～中信号(灰)
関節円板, 筋膜	低信号(灰)	低信号(灰)
副鼻腔, 骨皮質, 石灰化物	無信号(黒)	無信号(黒)

表2 CT, MRI の長所と短所の比較

	CT	MRI
長所	<ul style="list-style-type: none"> ○空間分解能に優れる ○短時間の撮影ですみ, 緊急患者にも有用 ○再現性が高い ○石灰化の描出に有用 	<ul style="list-style-type: none"> ○非侵襲的 ○エックス線被曝がない ○任意の断面の撮像が可能 ○組織分解能が高い ○骨, 空気からのアーチファクトが少ない ○血流情報が得られる ○脳の機能情報が得られる
短所	<ul style="list-style-type: none"> ○エックス線被曝がある ○骨, 空気からのアーチファクトがある ○組織分解能はMRIにくらべ低い ○造影時にヨード造影剤の副作用がある 	<ul style="list-style-type: none"> ○撮影時間がCTにくらべ長い ○検査対象に制限(ペースメーカー装着者, 動脈瘤のクリップ等)がある ○皮質骨や石灰化の描出は不良である ○現時点で空間分解能力がCTより劣る

4. 口腔内の金属による障害陰影

MRIは口腔領域疾患に有効な反面, 磁場を利用するため, 磁性体の金属を口腔内に修復物や補綴物として装着すると, その周囲の磁場がみだれる障害陰影(アーチファクト)を生じる。口腔内の修復物は, 白金加金や金パラジウム等の非磁性体は障害陰影を生じないが, ニッケルやマグネット等の強磁性体は強い障害陰影が生じるため, 画像診断が困難となることがある。

これら口腔内の磁性体の金属補綴物や修復物ばかりでなく, 歯科治療時の切削バー破片による磁性体が, 歯肉に迷入することにより障害陰影を生じる³⁾。つまり歯科治療が口腔癌の患者の画像診断に影響を与える

原因を作る可能性がある。よって我々歯科医師は歯科治療時に切削バーによる歯肉の損傷を最小限にする必要がある。

5. 顎口腔領域への臨床応用

1) 顎関節疾患へのMRIの応用

顎関節症の画像診断はMRIの応用により急速に進歩した領域である⁴⁾。特に従来は, 関節円板の位置異常は顎関節造影を施行しなければ顎関節症の診断が困難であった。しかしながらMRIの出現により, 被曝がなく, より非侵襲的に顎関節の画像検査が可能となり, 顎関節造影を施行する症例が非常に減少した。近年, 日常臨床において, MRI検査は顎関節症の必修な検査となりつつある。特に顎関節症は被験者が圧倒

的に若い女性が多く、その MRI 検査の大きな特徴の一つである放射線被曝がないことは大きな利点である。

関節円板を直接描出できる MRI は、①関節円板の位置、形態、動態、②Joint effusion（関節腔内の液体）の有無、③下顎頭の骨髓信号の異常と骨変化について診断することができる（図 4）。しかしながら顎関節の MRI 診断は決して万能ではなく、関節円板の癒着や穿孔の診断が困難であるなど欠点を周知して画像診断に臨まなければならない。

2) 顎骨骨髓疾患への MRI の応用

下顎骨は比較的厚い皮質骨の内部に海綿骨を有し、成人の海綿骨は骨髓を含む intertrabecular space をもつ骨梁のネットワークである。海綿骨の表面積は皮質骨の10倍あり、血液中のカルシウムのホメオスターシスに重要な役割を果たしている。骨髓は造血を営む肉眼的に赤い色を呈する赤色骨髓と脂肪細胞に転換した黄色い色を呈する黄色骨髓に分けられる。出生時に下顎骨は造血を有する赤色骨髓であるが加齢によ

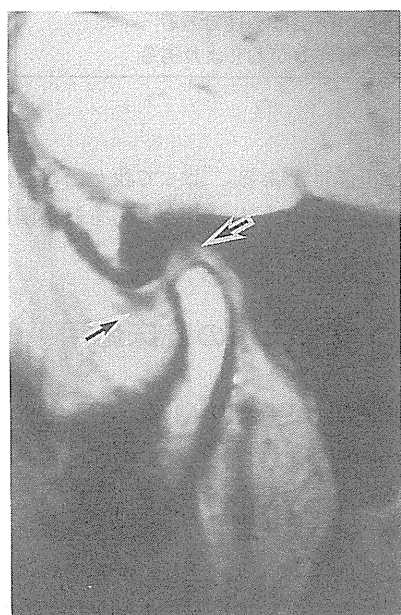


図 4 正常者の顎関節 MRI 矢状断像（閉口時）
関節円板（矢印）が低信号に観察される

り前歯から臼歯部、下顎枝方向へと黄色髄に置換していき20歳以上ではほとんど黄色髄になるため MRI では脂肪の信号となる。つまり椎体から離れた骨髄ほど脂肪化していると考えられている。

骨髓疾患の異常を検出するためには、MRI を用いた赤色や黄色骨髓の年齢による正常骨髓の分布を知ることが必修である。MRI による下顎骨骨髓の正常者の検討では25歳以上でもまれに下顎頭に赤色骨髓が存在する正常者がいる⁵⁾。骨髓疾患は従来の X 線診断では検出困難のことが多かったが、骨髓を直接イメージングできる MRI の導入により、骨髓疾患の早期判定や骨髓炎においては軟組織の異常も容易に描出可能となった⁶⁾（図 5、6）。

3) 顎骨腫瘍、嚢胞性疾患への応用

MRI にて従来の X 線診断にて鑑別が困難であった、顎骨の嚢胞と腫瘍の鑑別が可能となった。特にエナメル上皮腫は特徴的な MRI 所見を有し、他の嚢胞性疾患との鑑別が容易に行われるようになった。また歯原性嚢胞のうち歯原性角化嚢胞は内容物の角化物の量により T2 緩和時間が短縮し MRI の信号強度が異なるため、他の嚢胞との鑑別が容易となった⁷⁾。

4) 口腔領域軟組織疾患への応用

① 口唇、頬粘膜、歯肉、小唾液腺病変

口唇や頬粘膜は層状の扁平上皮に被われており、その粘膜下には小唾液腺が豊富である。臨床的にはそれらから生じた前癌病変や悪性腫瘍および小唾液腺病変、血管性病変や線維腫等が多い。MRI にて歯肉癌は T1 強調像で筋肉より低信号、T2 強調像で表層脂肪よりやや低い高信号を呈し、顎骨に浸潤すると早期に顎骨骨髓の信号が変化する。顎骨への浸潤は、顎骨の骨の抵抗力の一番弱い歯槽頂から浸潤していくのが典型である（図 7）。歯肉癌から顎骨へ進展し、顎骨をある程度破壊するとはじめて X 線像にて検出され、いわゆる浸潤像や虫食い状所見を呈する。

ちなみに頭頸部腫瘍学会編の頭頸部癌取り扱い規約⁸⁾にて、歯肉癌から顎骨へ進展した、いわゆる虫食い状所見は腫瘍の大きさにかかわらず腫瘍の

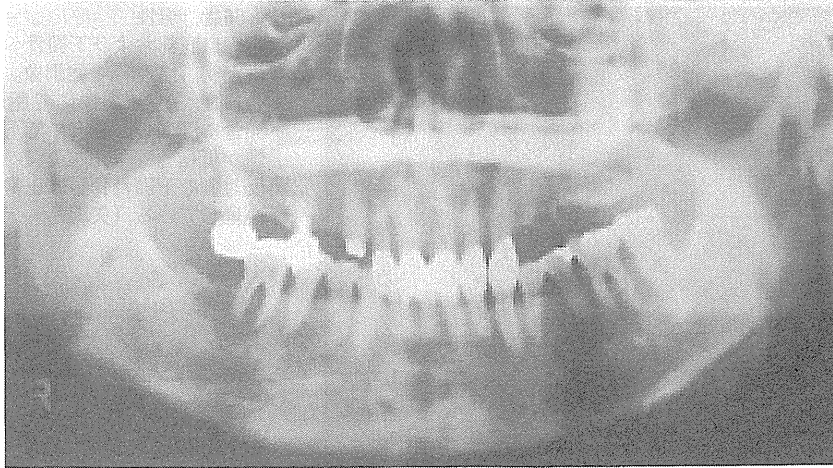


図 5

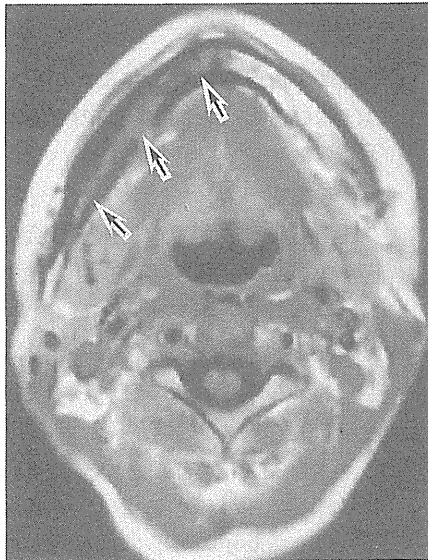


図 6

図 5, 6 48歳, 女性

下顎右側急性骨髄炎(下顎右側第一大臼歯が原因歯)パノラマX線写真(図5), MRI T1 強調像(図6)。

右側臼歯部から下顎枝にかけてパノラマX線像にて著変はみられない。

しかしながら, MRI 体軸横断像にて下顎前歯部から右側臼歯部および下顎枝にかけて, 骨髄炎により下顎骨の骨髄は低信号を呈している(矢印)。X線写真では検出できなかった下顎骨骨髄の炎症をMRIは早期に検出できることが分かる

ページがT4とされ, 軟組織と顎骨の両者を治療しなければならない。よって顎骨に進展した歯肉癌か否かは転移の問題も含め, 患者の治療方針や予後に大きな影響を与えるため, MRIは重要な画像検査となっている。

軟組織の描出に優れるMRIであるが, 口腔粘膜の表層を進展する白板症はMRIにて描出すること

が困難なことが多く, 組織系の相関も含め白板症の検出や進展範囲を正確に描出するには何らかの検討が必要であろう。

小唾液腺病変はT1強調像で筋肉よりやや低信号, T2強調像で脂肪よりやや低い高信号を呈し造影効果がみられる(図8)。筆者の検討では小唾液腺病変の検出能はMRIがCTより優れる。しかし

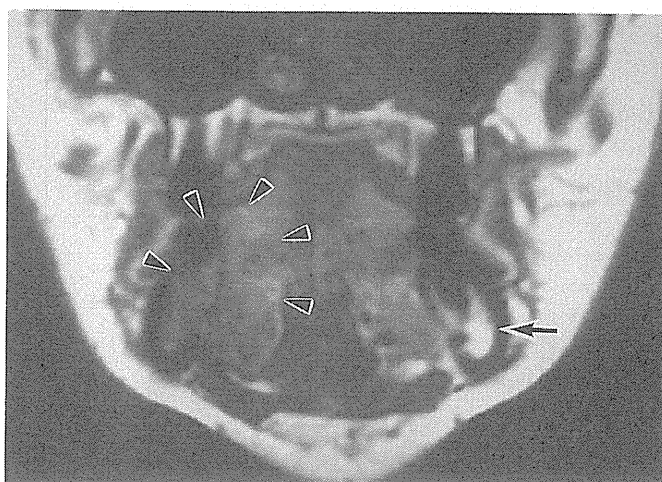


図7 56歳, 男性
右側口底部および下顎骨へ浸潤した
歯肉癌, MRI T1 強調像。
MRI T1 強調像にて歯肉癌が下
顎骨に浸潤し, 腫瘍にて下顎骨の骨
髄が低信号を呈している (矢頭)。
反対側の下顎骨骨髄は正常な高信号
を呈している (矢印)

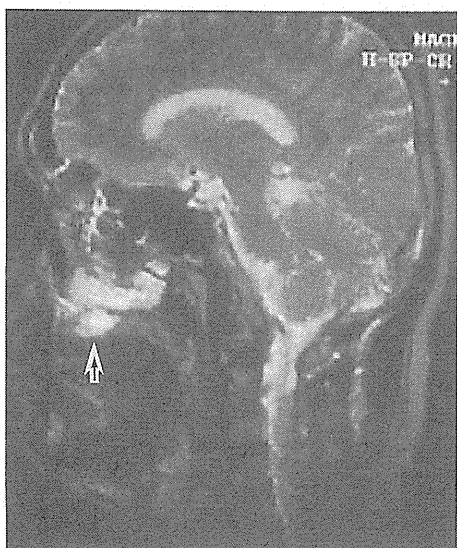


図8 38歳, 男性
口蓋に発生した腺様嚢胞癌, MRI T2
強調像。
MRI 矢状断像にて口蓋部に小唾液腺
由来の腺様嚢胞癌による高信号が認めら
れる (矢印)。同病変は口蓋骨に浸潤
し, 鼻腔に近接している

ながら, 小唾液腺腫瘍の良悪性の鑑別は信号強度や造影効果にては困難であり, 周囲軟組織と病巣の境界が良悪性の鑑別の一つになる。小唾液腺腫瘍のなかで腺様嚢胞癌はしびれや神経痛様疼痛を生じる神

経浸潤が古典的に有名なことから, 口蓋に生じるものは翼口蓋窩への神経浸潤の診査が必須となる。

② 舌病変

日常歯科治療にて遭遇する機会の多い舌疾患は, 血管腫やリンパ管腫等の良性疾患や扁平上皮癌が多い。舌に生じた扁平上皮癌は T1 強調像で低信号, T2 強調像で高信号を呈し, 造影にて比較的早期に造影効果がみられる。これらの舌癌の進展範囲の T 分類診査のみならず治療効果の判定や再発の診査に, CT, MRI は有効というより現時点での舌癌治療を行う唯一の検査と言っても過言ではないであろう。特に原発巣とリンパ節転移を同時に多方向から画像検査できる MRI 検査は, 現在多くの病院の舌癌の画像検査のプロトコールにされている。

③ 口腔筋群の病変

日常歯科治療にて関連する口腔筋群の疾患としては歯性の炎症や顎骨骨髓炎などの炎症の波及や, 血管腫などの良性疾患が比較的多い。歯性の炎症は MRI にて咀嚼筋間隙に炎症による信号の延長が見られるのが特徴であり, 重篤な患者の膿瘍の部位や大きさにより排膿路の確保や切開部位の診査に MRI や CT は有効である。

口腔領域軟組織の血管腫は歯科開業医でも遭遇する可能性の高い疾患である。通常、単純およびパノラマX線所見では血管腫の内部に点状の石灰化物が描出されることがある。しかしながら石灰化の出現は30～40％程度の頻度であり病変の鑑別は比較的容易であるが、病変の範囲の診断は困難であった。MRI 検査にて侵襲なく画像検査が可能となった疾患のひとつである。血管腫の MR 像は T1 強調像で低～高信号、T2 強調像でも中～高信号を呈し、造影効果がみられ、その血液プールの大きさ、線維化、出血や血流速度により MRI の信号や造影効果に変化する（図9）。

臨床で遭遇するのは稀ではあるが、誤診が致命的となる動静脈奇形は病巣内に T1、T2 強調像共に無信号を呈する蛇行した血管が観察されることが特徴である。口腔内の血管性病変は直視できるときは診断は比較的容易であるが、病巣の進展範囲は視診以上に広いことが多く、病巣の大きさの判定や血管腫

と動静脈奇形との鑑別等に MRI は非常に有効である。

④ 顎下腺病変

日常歯科治療で鑑別を必要とする主訴に顎下部の腫脹がある。それらの疾患のうち重要な位置を占める、顎下腺疾患の病変の画像検査は従来から唾液腺造影が主流をなしていた。しかしながら唾液腺腫瘍の画像診断はいわゆる“Ball-in hand appearance”といわれるように腫瘍を直接描出するものではなく、二次的な造影欠損像を指摘し、被曝や造影剤を注入する侵襲を伴うものであった。

しかしながら CT や MRI の出現により腫瘍の検出率ははるかに向上した。腫瘍の検出率はもちろん腫瘍の進展や転移等において、一般医科領域にて腫瘍検出のため唾液腺造影はほとんど施行されなくなった。一方、唾液腺造影は導管の描出に優れる利点を有するが、近年、導管の描出も可能な

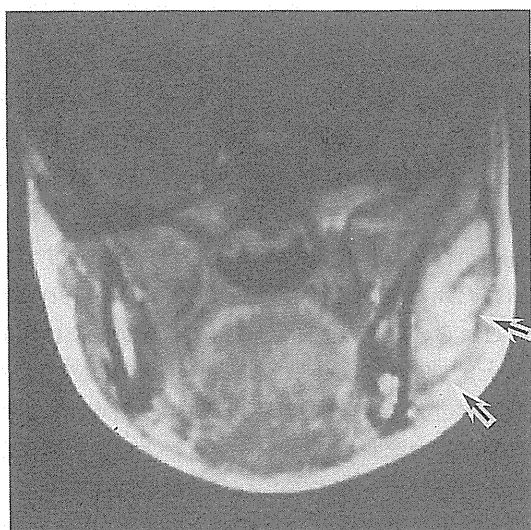


図9 13歳、女子
左側咬筋の血管腫（Intramuscle hemangioma）、造影 MRI T1 強調像。
口腔内の視診にて血管性の小さな腫瘍であったが、造影 MRI 前額断像にて左側咬筋全体が血管腫（矢印）であることが分かる



図10 48歳、女性
Sjögren 症候群。慢性唾液腺炎による口腔内乾燥を主訴に来院した。
MR-Sialography（MRI による水を強調した唾液腺造影に近似した像）にて耳下腺に点状の高信号がみられ、いわゆる apple-tree appearance を呈している（矢印）

MR-Sialography (MRI による水を強調した唾液腺造影に近似した像) (図10) の出現により、唾液腺造影に変わるものと期待されている。

大唾液腺のうち耳下腺は脂肪の含有が比較的豊富なためX線 CT にて周囲筋肉や軟組織との区別が容易であり、唾液腺腫瘍の検出は容易である。一方顎下腺は脂肪の含有がやや低いいため単純X線 CT で描出が困難な症例が多く、造影 CT にても周囲筋肉とコントラストがつきにくい症例が存在する。しかしながら組織コントラストに優れる MRI は顎下腺や顎下腺病変の描出は造影剤を用いなくても容易となった。MRI にて顎下腺病変は T1 強調像で周囲筋肉や顎下腺体より低信号、T2 強調像で周囲筋肉や顎下腺体より高信号を呈し、Gd-DTPA 造影にて造影効果がみられる⁹⁾ (図11)。

病巣が腺体内か腺体外により鑑別診断が異なるため、組織コントラストに優れる MRI は顎下腺病変の画像診断において唾石のような石灰化物を検出す

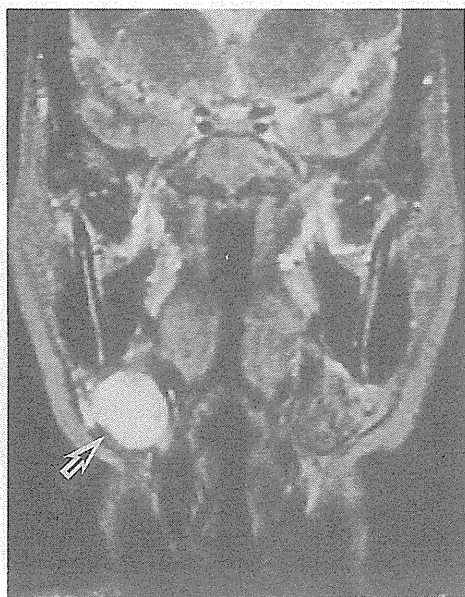


図11 52歳、女性
右側顎下腺から発生した多形性腺腫。
MRI T2 強調像。
MRI T2 強調像前額断像にて右側顎下腺部に類円形の境界明瞭な高信号がみられる (矢印)

ることを除き、CT よりも優れているであろう。

唾液腺の腫脹を起こす唾石症は臨床で遭遇する唾液腺疾患の中で圧倒的に多いが、唾石は MRI で T1, T2 強調像共に無信号として観察される。ウイルス性疾患や唾石により発現する唾液腺炎は、急性期は T1 強調像で周囲筋肉や顎下腺体より低信号、T2 強調像で高信号を呈するが、慢性化するにつれ線維化が進むと T2 強調像で逆に低信号化してくる。唾石の位置や顎下腺の炎症状態により手術方針が異なるため MRI による画像診断は重要な検査となる。

6. 歯科医師としての悪性腫瘍の頸部リンパ節転移の基礎知識と画像診断

全身のリンパ節は約800個ほどあり、そのうち約300個ほどが頭頸部に存在する (図12)。口腔領域の悪性腫瘍の進展は①直接浸潤②神経浸潤③リンパ節転移④血行転移が主であるが、それらのうち顎口腔領域疾患の悪性腫瘍は、リンパ管を通じての頸部リンパ節転移の頻度が非常に高い。CT や MRI の横断像にて直径 1.0cm のリンパ節には約10億個の腫瘍細胞が存在するといわれ、これら頸部リンパ節の転移により癌のステージングによる手術方針や患者の 5 年生存率の予後を大きく左右するため、リンパ節転移の診査は非常に重要である。

これら頸部リンパ節の診査はX線 CT が出現する前は触診にたよる状態であったが、CT や MRI の出現によりこれらの頸部リンパ節の画像検査が現在は主流となった。CT や MRI にてリンパ節の部位、大きさ、形態、造影効果、内部壊死や節外浸潤等にて転移リンパ節の鑑別診断を施す¹⁰⁾。顔面および口腔領域からのリンパ流はオトガイ下リンパ節ならびに顎下リンパ節等を経由して深頸リンパ節群の最上部 (頭頸部癌取扱規程の上内深頸リンパ節) に集まり下方に流れていく。よってリンパ節転移の診査には原発部位以外にこれら深頸リンパ節群および副神経リンパ節群までかならず診査しなければならない。

リンパ節の大きさはリンパ節の長径、短径を含め多

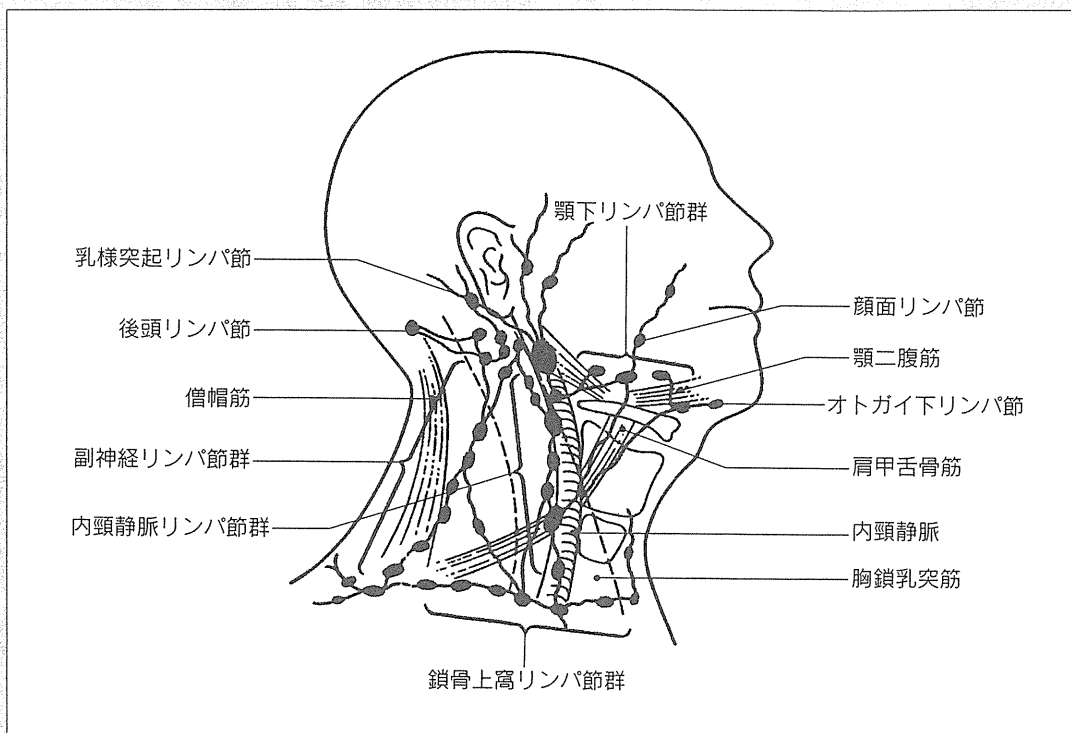


図12 頸部リンパ節模式図

くの報告があるが、横断像にて顎下、オトガイ下、深頸部リンパ節は長径1.5cm程度まで正常とされている。しかしながら転移リンパ節の大きさによる鑑別は正診率がけっして高くないため、1.0cm以上の大きさのものは必ずチェックすることが望ましい。転移リンパ節の形態は長短径の比を求め、球形を呈するものほど転移の可能性が高いとされている。これはリンパ管を通じて腫瘍細胞が流れ込むことからリンパ節が風船状に膨らむため、この理論が支持されている（図13）。転移リンパ節は新生血管の増生や壊死を起こすことが多いため、造影剤による造影効果を診査する必要があり、特にCTやMRIの内部壊死の所見はリンパ節の大きさにかかわらず転移リンパ節と診断される。



図13 61歳、男性
口腔癌の頸部リンパ節転移。MRI T1強調像。
MRI T1 強調像矢状断像にて右側頸部に球形に膨らんだ転移リンパ節が多数観察される（矢印）



7. まとめ

現時点での顎口腔領域疾患および口腔領域疾患に密接に関連する顎下腺および悪性腫瘍のリンパ節転移について MRI による応用を述べた。顎口腔領域への MRI や CT による画像診断はここ10年で急速に増加した。しかしながら我々歯科医師はこれら画像診断の恩恵を、はたして患者に有効に活用しているであろうか？

筆者が留学していたボストンの耳鼻科眼科専門病院の放射線科は奇形と悪性腫瘍の疾患が多く、それら疾患の画像評価は常にプロトコルが練られ撮影効果を検討し、最大限の効果を引き出していた。また近医の開業医は常に画像フィルムを放射線科に持ち込み、病院を効率的に利用し、患者の QOL に役立てていた。

我々歯科医師はこれらの進歩の著しい画像診断について常に貪欲に吸収し、医療機器の長所を最大限に引き出し、患者に貢献することは医療人としての責務であろう。

参考文献

1) 金田 隆, 倉林 亨編 : 歯科放射線 Teaching file. 砂書房, 東京, 2001.

2) 鹿島 勇監修, 金田 隆編 : これならわかるデジタルエックス線装置. 砂書房, 東京, 2001.

3) Kaneda, T., Minami, M., Curtin, H. D. et al. : Dental Bur Fragments Causing Metal Artifacts on MR Images. *Am J Neuroradiol*, 19 : 317~319, 1998.

4) Westesson, P. L., Katzberg, R.W. : Temporomandibular Joints. In: Som PM, Curtin HD. ed. *Head and neck imaging*. 3rd ed, St. Louis : Mosby-Year book, Inc ; 1996, 375~433.

5) Kaneda, T., Minami, M., Ozawa, K. et al. : MR appearance of bone marrow in the mandible at different ages. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 82 : 229~233, 1996.

6) Kaneda, T., Minami, M., Ozawa, K. et al. : Magnetic resonance imaging of osteomyelitis in the mandible : Comparative study with other radiological modalities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 79 : 634~640, 1995.

7) Minami, M., Kaneda, T., Ozawa, K. et al. : Cystic lesions of the maxillomandibular region : MR imaging distinction of odontogenic keratocysts and ameloblastomas from other cysts. *Am J Roentgenol*, 166 : 943~949, 1996.

8) 日本頭頸部腫瘍学会 (編) : 頭頸部癌取扱い規約. 第二改訂版, 55~61, 金原出版, 東京, 1991.

9) Kaneda, T., Minami, M., Ozawa, K. et al. : MR imaging of the submandibular gland : normal and pathological states. *Am J Neuroradiol*, 17 : 1575~1581, 1996.

10) Curtin, H. D., Ishwaran, H., Mancuso, A. A. et al. : Comparison of CT and MR imaging in staging of neck metastases. *Radiology*, 207 : 123~130, 1998.

*

*

*

2. 粘膜免疫における TNF と lymphotoxin の役割

日本大学松戸歯学部総合口腔医学講座助教授 山本正文

key words TNF, lymphotoxin, Peyer's patch, GALT, NALT

動 向

粘膜免疫は感染防御機構の第一線を担っている。ヒトの身体が突き詰めればチューブ状の構造物あるいはその集合体であることを考えれば、「内なる外」として外界に接している消化器、呼吸器、生殖器などの内腔表面が常に感染の危険にさらされていることは容易に想像できる。粘膜免疫はそれらの侵入してきた病原性細菌やウイルスあるいは食物由来の抗原による侵襲に対応し、生態にとって有害なものを選択的に排除している。さまざまな免疫機構が粘膜免疫の成立に関与しているが、その中心的な役割を果たしているのが分泌型 IgA 抗体とその誘導のための粘膜関連リンパ組織である¹⁾。

近年の分子生物学の飛躍的な進歩によりターゲット分子の遺伝子を欠損させた遺伝子欠損マウスの作製が可能となり、これまで間接的に示されていたターゲット分子のもつ機能を直接的に証明できるようになった。一方で、これまで知られていなかったターゲット分子の新たな機能が発見されることがしばしばある。これまで炎症性サイトカインとして知られていた tumor necrosis factor (TNF) や lymphotoxin (LT) の遺伝子欠損マウスの解析により、これらのサイトカインが粘膜関連リンパ組織を含めた末梢リンパ組織の形成に大

きく関与していることが示された。本稿では TNF や LT が粘膜関連リンパ組織の形成、粘膜免疫応答の誘導と制御にどのような役割を果たしているかについて解説を加えてみたい。

A. 粘膜免疫応答のメカニズム

粘膜面に侵入もしくは投与された抗原に対する分泌型 IgA 抗体応答を誘導成立させるにあたって、common mucosal immune system (CMIS) とよばれる循環帰巢経路が存在する。CMIS はその役割により、誘導組織と実効組織に分けられる。誘導組織は抗原を認識・処理し、各種免疫担当細胞が活性化される部位である。その組織は抗原の侵入・投与経路から大きく3つに分類される。呼吸器系では鼻咽頭関連リンパ組織 nasal-associated lymphoreticular tissue (NALT) や呼吸器関連リンパ組織 bronchus-associated lymphoreticular tissue (BALT)、消化管では腸管関連リンパ組織 gut-associated lymphoreticular tissue (GALT) とよばれる粘膜関連リンパ組織である¹⁾。GALT を例にとると、侵入した抗原は Peyer 板に取り込まれる。Peyer 板のドーム領域には M 細胞とよばれる抗原取り込み専門の細胞や dendritic cell (DC)、マクロファージなどの抗原提示細胞が存

在する。ドームの下方には濾胞が形成され、B細胞領域とその周辺にCD4⁺T細胞やCD8⁺T細胞からなるT細胞領域が存在しIgA抗体産生に必要な免疫担当細胞が含まれている。したがって、消化管粘膜を介して侵入してきた抗原はそこに存在するCD4⁺T細胞やIgA前駆B細胞などの免疫担当細胞を活性化する。活性化された免疫担当細胞はPeyer板を離れ、腸管膜リンパ節、胸管を介して血流に入り、実効組織である腸管の粘膜固有層に到達して多量体のIgAを産生すると考えられている¹⁾。腸管の分泌型IgA抗体応答におけるPeyer板の重要性は、1970年代初頭に腸管粘膜固有層のIgA産生細胞がPeyer板の前駆細胞由来であり、Peyer板の抗原特異的IgA前駆B細胞が腸管粘膜固有層IgA産生細胞に分化することによって示唆された^{2,3)}。また、経口免疫したマウスのPeyer板よりCD4⁺T細胞を分離し、同一抗原で再感作すると顕著な細胞増殖活性およびサイトカイン産生が認められた^{4,5)}。したがって、腸管における抗原特異的IgA抗体応答の誘導組織はGALTであることを示唆している。

B. TNFとLT

TNF, LT α , LT β はTNFスーパーファミリー

ーに属するサイトカインである。TNFスーパーファミリーにはその他、CD30リガンド(L), CD40L, FasL, TRAILなどが含まれる^{6,7)}。TNFとLT α はhomotrimerで構成される。TNFは細胞膜結合型 cell-bound formと分泌型 secreted formの2種類で存在するが、LT α_3 は分泌型で存在する。TNFとLT- α_3 は55kDのTNFレセプター(TNFR55)および75kDのTNFレセプター(TNFR75)に結合する。一方、LT β はLT- α と複合体を形成し(LT- $\alpha_1\beta_2$)、細胞膜結合型として存在する^{7,8)}(図1)。また、LT- $\alpha_1\beta_2$ はLT- β レセプター(LT β R)に結合する。LT β Rの細胞内ドメインはTNFR55またはTNFR75の細胞内ドメインとのhomologyが低く^{7,8)}、LT β Rを介するシグナルがTNFR55, TNFR75を介するシグナルと異なった機能を誘導するであろうことは容易に想像できる。また、近年、Herpes simplex virus (HSV)が活性化T細胞に感染する際に結合するherpesvirus entry mediator (HVEM)に、LT- α_3 と新しいTNFファミリーである homologous to lymphotoxins, exhibits inducible expression, and competes with HSV glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes (LIGHT)が結合することが報告された⁹⁾。LIGHTは29kDのtype II transmem-

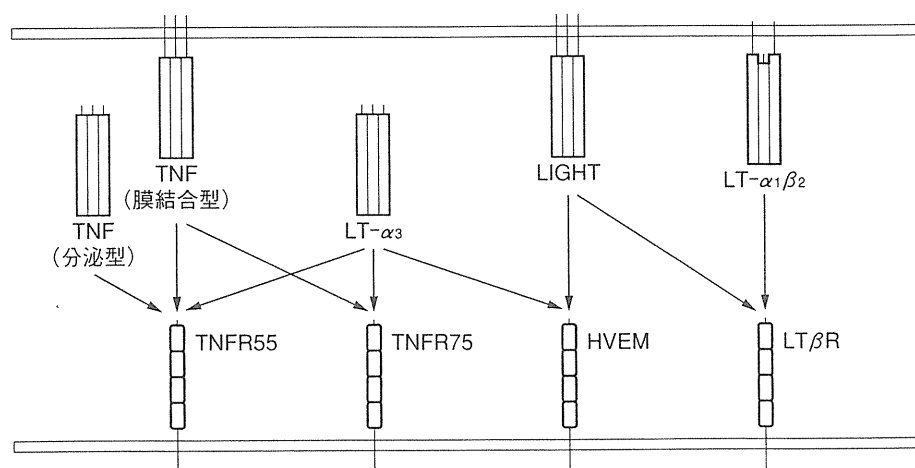


図1 TNF, LTのリガンドとレセプターの関係

brane proteinで、活性化T細胞より産生され、HVEMとLT β Rに結合することが報告されている⁹⁾ (図1)。

C. TNF, LTと末梢リンパ組織

TNF, LTあるいはそれらのレセプター欠損マウスの解析を行った結果、これらのサイトカインが末梢リンパ組織の形成において重大な役割を果たしていることが示された (表1)。LT- α 欠損マウス, LT- β 欠損マウスあるいはLT β R欠損マウスは末梢のリンパ節が形成されなかった¹⁰⁻¹³⁾。一方, TNFR55欠損マウス, TNFR75欠損マウスは末梢リンパ節の形成は正常であった^{14,15)}。さらに, ヒトIgG1がマウスのFcレセプターと結合しyolk sacを通過する性質を利用して, 妊娠中の母親マウスにLT β RとヒトIgG1とのfusion protein (LT β R-Ig) を投与することにより, 胎生期のLT β Rを介するシグナルをブロックした。その結果, これらの*in utero* LT β R-Ig投与マウスは末梢リンパ節が形成されなかった¹⁶⁾。一方, 胎生期のLT α 欠損マウスに抗LT β R抗体を投与してLT β R伝達経路を活性化すると, 末梢リンパ節が形成された¹⁷⁾。したがって, 末梢リンパ節の形成には胎生期におけるLT α 1 β 2とLT β R

を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていることを示唆された (図2)。

末梢リンパ節欠損マウスにおいても脾臓の形成は認められた。しかしながら, LT- α 欠損マウス, LT- β 欠損マウス, LT β R欠損マウスあるいはTNFR55欠損マウスにおける脾臓の構造は著しく乱れており, T細胞領域, B細胞領域が明確に分離されていなかった。さらに, 胚中心germinal center, 濾胞樹状細胞 follicular dendritic cellsのクラスターの形成も認められなかった^{10-15,18)}。一方, *in utero* LT β R-Ig投与マウスの脾臓の構造は正常であり, 胎生期のLT α / β 伝達経路のブロックは脾臓の構築に影響しないことが示された¹⁶⁾ (表1)。興味深いことに6週齢のマウスにTNFR55-Igを投与しても変化はなかったが, LT β R-Igを投与すると胚中心の消失など脾臓の構造に乱れが生じた¹⁹⁾。以上の結果より, LT α / β シグナル伝達経路は脾臓形成後, その構造を維持するために重要な役割を果たしていることが示され, 胎生期のTNF/LT伝達経路は脾臓の構築に影響を与えることが示唆された。脾臓やリンパ節における胚中心の形成はヘルパーT細胞の活性に依存しており, ヘルパーT細胞によって活性化された抗原特異的B細胞は一次濾胞へと移動し, 2次濾胞を形成する。2次濾胞はさら

表1 各種マウスにおけるリンパ組織の形成

マウス	脾臓の組織構造	末梢リンパ節	腸間膜リンパ節	Peyer 板	ILF	NALT
LT α 欠損	-	-	-	-	-	+
LT β 欠損	-	-	+	-	ND	+
LT β R 欠損	-	-	-	-	ND	+
TNF 欠損	-	+	+	+	ND	+
TNFR55 欠損	-	+	+	+	ND	+
LT β /TNF 欠損	-	-	+	-	ND	ND
LT β /TNFR55 欠損	-	-	-	-	ND	ND
<i>in utero</i> LT β R-Ig 処理	-	-	+	-	+	+
IL-7R 欠損	+	+	+	-	+	+
Id2 欠損	+	-	-	-	ND	-

ND: not determined

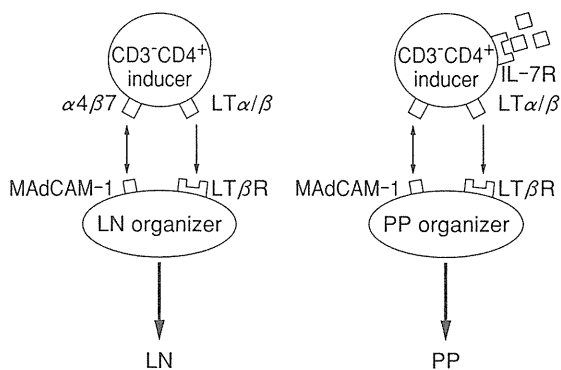


図2 末梢リンパ組織とPeyer板の形成におけるLTの関与

に組織学的に発達し胚中心が形成される。胚中心では抗原特異的B細胞の体細胞高頻度突然変異 somatic hypermutationや親和性成熟 affinity maturationが起こる。濾胞樹状細胞は胚中心にネットワークを形成し、高親和性B細胞の選択やメモリーB細胞の形成において重要な役割を果たしていることが示唆されている。したがって、上述の遺伝子欠損マウスやLTβR-Ig処理マウスの脾臓にみられる構造の乱れは体液性免疫応答にも影響を及ぼし、T細胞依存性蛋白抗原に対する抗体応答の著しい抑制がみられた^{11,18,19)}。

D. GALTにおけるTNFとLTの役割

上述のように粘膜面における抗原特異的分泌型IgA抗体応答の誘導に際しては、腸管や鼻咽頭などの粘膜関連リンパ組織が重要な役割を果たしている。腸管関連リンパ組織として代表的なものはPeyer板である。LT-α遺伝子欠損マウス、LT-β欠損マウス、LTβR欠損マウスあるいはLTβR伝達経路の下流で働くNIK (NF-κB-inducing kinase) 欠損マウスは他の末梢リンパ節と同様、Peyer板の形成がみられなかった^{10-13,20)}。また、*in utero* LTβR-Ig投与あるいは抗IL-7R抗体投与マウスもPeyer板が欠損していた^{16,21)}。これらの結果はPeyer板の形成において胎生期にLTβR

およびIL-7Rを介するシグナルが重要な役割を果たしていることを示唆している。また、最近の報告で、IL-7R⁺CD3⁻細胞がPeyer板のインデューサーと考えられ、IL-7を介したシグナルによりLT-α_{1β2}を産生してLTβR⁺VCAM-1⁺ICAM-1⁺間葉系細胞を活性化し、活性化された間葉系細胞はBCL、ECLなどのケモカインを産生することによってCXCR5、CCR7を発現するIL-7R⁺CD3⁻細胞の走化性を誘導する²²⁾、というPeyer板の形成におけるリンパ系細胞と間葉系細胞との細胞間相互作用が示唆された(図2)。

LT-β欠損マウス、*in utero* LTβR-Ig投与マウスでは他の末梢リンパ節は欠損していたが腸間膜リンパ節と頸部リンパ節が認められ、粘膜免疫に関与するリンパ節の形成はLTβR伝達経路に依存しないことが示された^{12,16)}。興味深いことに胎生期のマウスにTNFR55-IgとLTβR-Igの両方を投与することにより、腸間膜リンパ節は形成されなかった¹⁷⁾。以上の結果から、粘膜免疫に関与するリンパ節の形成には胎生期におけるTNFR55とLTβRの両方のシグナル伝達経路が関与していることが示唆された。さらに、LTβとTNFR55の両方を欠損したマウスにおいては腸間膜リンパ節を含む全ての末梢リンパ節の形成が認められないが、TNFとLTβのマウスでは腸間膜リンパ節が存在しており²³⁾、腸管膜リンパ節の形成におけるTNFR55伝達経路にはTNF以外のリガンドの存在することが示唆された。

マウス腸管にはPeyer板の他に複数のリンパ組織が報告されている。腸管粘膜固有層にクリプトパッチ cryptopatch とよばれるリンパ小節が存在する²⁴⁾。クリプトパッチはc-kit⁺IL-7R⁺のリンパ球が局在し、胸腺非依存性腸管上皮細胞間リンパ球 intraepithelial lymphocytes (IEL) が分化することが示唆されている²⁴⁾。クリプトパッチおよびIELはLTα欠損マウス、IL-7R欠損マウスにおいても正常であり、クリプトパッチの形成に

LT 依存性の経路は関与していないことが示された²⁵⁾。腸管にはクリプトパッチの他に孤立リンパ小節 isolated lymphoid follicles (ILF) が存在する²⁵⁻²⁷⁾。ILF は Peyer 板と類似した構造を有し、胚中心も存在する。また、ILF は生後構築され、出生後 1 週間以内に肉眼で確認されるようになる。ILF は非常に小さく、その存在も腸管粘膜固有層内に限られており、Peyer 板のように腸管壁に突き出すような形態をとることはないが、その数は非常に多く、小腸と大腸の両方に認められる²⁵⁻²⁷⁾。LT- α 欠損マウスでは Peyer 板と同様に ILF は欠損していた²⁵⁾。しかしながら、ILF は他の Peyer 板が欠損している IL-7R 欠損マウス、*in utero* LT β R-Ig 投与マウスにおいて認められており、形成のメカニズムが Peyer 板とは異なることが示されている²⁵⁾ (表 1)。マウスの大腸にはさらに、コロニックパッチ colonic patch が存在する²⁸⁾。*in utero* LT β R-Ig 投与マウスではコロニックパッチが形成されていないことから、その構築には LT β R 伝達経路が必要であることが示された²⁸⁾。

E. 腸管の IgA 産生における LT α / β 伝達経路の役割

上述のように胎生期の TNF/LT あるいは LT α / β 伝達経路は Peyer 板や腸間膜リンパ節の形成に深く関与していた。しかしながら、*in utero* LT β R-Ig 処理マウスにおける腸管粘膜固有層の IgA 陽性細胞数は正常であった²⁹⁾。一方、LT α 欠損マウスあるいは LT β R 欠損マウスは脾臓の B 細胞数が正常であるにもかかわらず、腸管粘膜固有層の B 細胞数は著しく減少していた。この減少は生後 3 日より LT β R-Ig を投与したマウスにおいても認められた³⁰⁾。さらに、LT α 欠損マウスに正常マウスの骨髄細胞を移入したところ、Peyer 板や腸間膜リンパ節の形成はみられなかったが、

腸管粘膜固有層における B 細胞の局在は回復した³⁰⁾。したがって、腸管粘膜固有層における B 細胞の局在には Peyer 板や腸間膜リンパ節などの関連リンパ組織が必要ではなく、生後の LT β R 伝達経路が重要であることが示された。また、LT α 欠損マウスの骨髄細胞を LT β R 欠損マウスに移入しても IgA 産生に変化はみられないが、RAG-1 欠損マウスに移入すると腸管の IgA 陽性細胞数は増加した。さらに RAG-1 欠損マウスの小腸組織片を LT α 欠損マウスに移植すると、腸管における IgA の産生が回復したことから、腸管の IgA 産生は腸管粘膜固有層の間質系細胞における LT β R 伝達経路に依存していることが示唆された³¹⁾。そこで、腸管の抗原特異的 IgA 抗体応答における Peyer 板の役割を解析するために、*in utero* LT β R-Ig 投与による Peyer 板欠損マウスを用いて、経口免疫による腸管粘膜の抗原特異的 IgA 抗体応答を解析した。その結果、*in utero* LT β R-Ig 投与マウスでは腸管粘膜面に顕著な特異的 IgA 抗体産生が認められた²⁹⁾。さらに腸管膜リンパ節より CD4⁺ T 細胞を分離し抗原で再感作した結果、顕著な細胞増殖およびサイトカイン産生が認められた²⁹⁾。したがって、Peyer 板が欠損している状態でも抗原特異的 CD4⁺ T 細胞が誘導され、腸管粘膜面における分泌型 IgA 抗体産生をサポートすることが示された。

F. NALT 形成における TNF と LT の関与

鼻腔には NALT が存在する。Peyer 板と類似の構造を有し、経鼻免疫により抗原特異的 IgA 抗体応答を鼻腔や他の粘膜組織に誘導することにより、呼吸器系における IgA 誘導組織であることが示唆されている^{32,33)}。しかしながら、NALT 構築のメカニズムは Peyer 板のそれとは全く異なり、LT- α 欠損マウス、TNF 欠損マウス、*in utero* LT β R-Ig 投与マウスなど Peyer 板を欠損

しているマウスにおいても NALT は認められた^{34,35)}。したがって、NALT の形成に TNF, LT は関与していないことが示された。また, TRANCE/RANK 経路, IL-7R 経路にも依存していなかった^{34,35)}。さらに CD3⁻CD4⁺細胞を欠く ROR γ 欠損においても NALT の存在が報告されているが³⁴⁾、我々の最近の知見では同様に CD3⁻CD4⁺細胞を欠く Id2 欠損マウスでは NALT の形成が認められなかった³⁵⁾。興味ある点は Id2 欠損マウスに CD3⁻CD4⁺細胞を移入することにより、NALT の形成が認められた³⁵⁾ (表1)。この結果は CD3⁻CD4⁺細胞が LT α / β 経路非依存性に NALT の構築に重要な役割を果たすことが示唆している。

むすび

粘膜関連リンパ組織の構築において、TNF/LT 経路, LT α / β 経路は非常に重要な役割を果たすことが示された。また、最近の報告で新たに同定された ILF や NALT は Peyer 板とは異なった発達の過程をもつこともわかってきた。粘膜関連リンパ組織構築のメカニズム、また、粘膜免疫応答誘導のメカニズムを解明することは、粘膜面に効果的な IgA 抗体応答を誘導する粘膜ワクチンの開発や食物アレルギー、喘息、炎症性腸疾患などの粘膜組織に発生する疾病の治療法を確立するためにも大変重要であり、今後の研究に期待する。

文献

- 1) Kiyono H, McGhee JR. The mucosal immune system. In: Paul WE, editor. Fundamental immunology. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1998. p.909-46.
- 2) Craig SW, Cebra JJ. Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. J Exp Med 1971; 134: 188-200.
- 3) Husband AJ, Gowans JL. The origin and antigen-dependent distribution of IgA-containing cells in the intestine. J Exp Med 1978; 148: 1146-60.
- 4) VanCott JL, Staats HF, Pascual DW, et al. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. J Immunol 1996; 156: 1504-14.
- 5) Okahashi N, Yamamoto M, VanCott JL, et al. Oral immunization of interleukin-4 (IL-4) knockout mice with a recombinant *Salmonella* strain or cholera toxin reveals that CD4⁺ Th2 cell producing IL-6 and IL-10 are associated with mucosal immunoglobulin A responses. Infect Immun 1996; 64: 1516-25.
- 6) Smith CA, Farrah T, Goodwin RG. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. Cell 1994; 76: 959-62.
- 7) Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, et al. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. Curr Top Microbiol Immunol 1995; 198: 175-218.
- 8) Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. Immunol Today 1992; 13: 151-3.
- 9) Mauri DN, Ebner R, Montgomery RI, et al. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin α are ligands for herpesvirus entry mediator. Immunity 1998; 8: 21-30.
- 10) De Togni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. Science 1994; 264: 703-7.
- 11) Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, et al. Lymphotoxin- α -deficient mice: effects on secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. J Immunol 1995; 155: 1685-93.
- 12) Koni PA, Sacca R, Lawton P, et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β -deficient mice. Immunity 1997; 6: 491-500.
- 13) Futterer A, Mink K, Luz A, et al. The lymphotoxin β receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. Immunity 1998; 9: 59-70.
- 14) Pasparakis M, Alexopoulou L, Grell M, et al. Peyer's patch organogenesis is intact yet formation of B lymphocyte follicles is defective in peripheral lymphoid organs of mice deficient for tumor necrosis factor and its 55-kDa receptor. Proc Natl

- Acad Sci USA 1997; 94: 6319-23.
- 15) Neumann B, Luz A, Pfeffer K, et al. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1996; 184: 259-64.
 - 16) Rennert PD, Browning JL, Mebius R, et al. Surface lymphotoxin α/β complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J Exp Med* 1996; 184: 1999-2006.
 - 17) Rennert PD, James D, Mackay F, et al. Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin β receptor. *Immunity* 1998; 9: 71-9.
 - 18) Fu YX, Molina H, Matsumoto M, et al. Lymphotoxin- α (LT α) supports development of splenic follicular structure that is required for IgG responses. *J Exp Med* 1997; 185: 2111-20.
 - 19) Mackay F, Majeau GR, Lawton P, et al. Lymphotoxin but not tumor necrosis factor functions to maintain splenic architecture and humoral responsiveness in adult mice. *Eur J Immunol* 1997; 27: 2033-42.
 - 20) Yin L, Wu L, Wesche H, et al. Defective lymphotoxin- β receptor-induced NK-kappa B transcriptional activity in NIK-deficient mice. *Science* 2001; 291: 2162-5.
 - 21) Adachi S, Yoshida H, Honda K, et al. Essential role of IL-7 receptor α in the formation of Peyer's patch anlage. *Int Immunol* 1998; 10: 1-6.
 - 22) Honda K, Nakano H, Yoshida H, et al. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 2001; 193: 621-30.
 - 23) Kuprash DV, Alimzhanov MB, Tumanov AV, et al. TNF and lymphotoxin β cooperate in the maintenance of secondary lymphoid tissue microarchitecture but not in the development of lymph nodes. *J Immunol* 1999; 163: 6575-80.
 - 24) Kanamori Y, Ishimaru K, Nanno M, et al. Identification of novel lymphoid tissues in murine intestinal mucosa where clusters of c-kit⁺ IL-7R⁺ Thy1⁺ lympho-hemopoietic progenitors develop. *J Exp Med* 1996; 184: 1203-6.
 - 25) Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 2002; 168: 57-64.
 - 26) Moghaddami M, Cummins A, Mayrhofer G. Lymphocytes-filled villi: comparison with other lymphoid aggregations in the mucosa of the human small intestine. *Gastroenterology* 1998; 115: 1414-25.
 - 27) Leithauser F, Trobonjaca Z, Moller P, et al. Clustering of colonic lamina propria CD4(+) T cells to subepithelial dendritic cell aggregates precedes the development of colitis in a murine adoptive transfer model. *Lab Invest* 2001; 81: 1339-449.
 - 28) Dohi T, Fujihashi K, Rennert PD, et al. Hapten-induced colitis is associated with colonic patch hypertrophy and T helper cell 2-type responses. *J Exp Med* 1999; 189: 1169-80.
 - 29) Yamamoto M, Rennert P, McGhee JR, et al. Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 2000; 164: 5184-91.
 - 30) Newberry RD, McDonough JS, McDonald KG, et al. Postgestational lymphotoxin/lymphotoxin β receptor interactions are essential for the presence of intestinal B lymphocytes. *J Immunol* 2002; 168: 4988-97.
 - 31) Kang HS, Chin RK, Wang Y, et al. Signaling via LT β R on the lamina propria stromal cells of the gut is required for IgA production. *Nat Immunol* 2002; 3: 576-82.
 - 32) Yamamoto M, Briles DE, Yamamoto S, et al. A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to pneumococcal surface protein A. *J Immunol* 1998; 161: 4115-21.
 - 33) Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, et al. Nasal immunization induces *Haemophilus influenza*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J Infect Dis* 1999; 180: 122-32.
 - 34) Harmsen A, Kusser K, Hartson L, et al. Organogenesis of nasal-associated lymphoid tissues (NALT) occurs independently of lymphotoxin- α (LT α) and retinoic acid receptor-related orphan receptor-g, but the organization of NALT is LT α dependent. *J Immunol* 2002; 168: 986-90.
 - 35) Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, et al. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT β R, and NIK signaling pathways but requires the Id2 gene and CD3⁻ CD4⁺ CD45⁺ cells. *Immunity* 2002; 17: 31-40.

炎症性サイトカインによる 粘膜関連リンパ組織構築の メカニズム

* 日本大学松戸歯学部総合口腔医学

山本正文

はじめに

遺伝子欠損マウスの誕生によりターゲット分子の持つ機能を直接的に証明できるようになったが、一方では予想もしなかった機能が新たに発見されることがしばしばある。Tumor necrosis factor (TNF) や lymphotoxin (LT) は免疫制御において種々の機能を有するサイトカインとして知られているが、TNFやLT、また、それらのレセプターの遺伝子欠損マウスの解析により、これらのサイトカインが末梢リンパ組織の構築に大きく関与していることが示された。本稿ではこれらのサイトカインが粘膜関連リンパ組織の構築にどのような役割を果たしているのか、われわれの知見を交えて解析を加えてみたい。

1. リンパ組織構築における TNF, LTの関与

TNFとLTは、ともにTNFスーパーファミリーに属する3量体で形成されるサイトカインである。TNFはhomotrimerで構成され、細胞膜結合型 (cell-bound form) と分泌型 (secreted form) の2種類を有する。一方、LTは α 鎖と β 鎖の組み合わせによって、細胞膜結合型 (LT- $\alpha_1\beta_2$) と分泌型 (LT- α_3) に分類される^{1, 2)}。TNFとLT- α_3 は、55kDのTNFレセプター (TNFR55) および75kDのTNF

レセプター (TNFR75) に結合するが、LT- $\alpha_1\beta_2$ はLT- β レセプター (LT β R) に結合する (図1)。

これらのサイトカインおよびレセプター欠損マウスのリンパ組織を解析した結果、LT- α 遺伝子欠損、LT- β 欠損、LT β R欠損マウスは末梢のリンパ節が形成されなかった^{3, 4)}。また、脾臓ではT細胞領域、B細胞領域も明確に分離されておらず、胚中心 (germinal center; GC)、濾胞樹状細胞 (follicular dendritic cells; FDC) のクラスターも形成されなかった。これらのリンパ組織構築における障害は体液性免疫応答にも著しい影響を示し、T細胞依存性タンパク抗原の感作による抗体の、アイソタイプクラススイッチは誘導されなかった⁴⁾。一方、TNF欠損マウス、TNFR55欠損マウスではリンパ節は正常であるが、脾臓のGC、FDCが形成されておらず、抗原特異的抗体反応におけるクラススイッチが正常に行われなかった^{5, 6)}。それに対してTNFR75欠損マウスは全てのリンパ組織が正常に発達していた⁷⁾。以上の結果より、LT β Rを介するシグナルは末梢リンパ節の構築に重要な役割を果たしており、TNFR55を介するシグナルは脾臓の構造維持に関与していることが示された (表1)。

2. TNF, LTによる腸管関連 リンパ組織構築の制御

粘膜組織は全身系免疫とは独立した免疫機構を有する。粘膜面に抗原特異的なIgA抗体応答を誘導成立させるのが、common mucosal immune system (CMIS) と呼ばれる循環帰巢経路であり、腸管関連リンパ組織 (GALT)、鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、気管支関連リンパ組織 (BALT) などの粘膜関連リンパ組織 (MALT) により制御されている⁸⁾。GALTの構築におけるTNF, LTの影響を解析した結果、LT- α 遺伝子欠損、LT- β 欠損、LT β R欠損マウスはパイエル板が欠損していた^{3, 4, 9, 10)}。また、妊娠期の母親マウスに、LT β R-Igあるいは抗IL-7R抗体を投与することによりパイエル板欠損マウスが得られた^{11, 12)}。これらの結果は、パイエル板の構築には胎生期にLT β RおよびIL-7Rを介するシグナルが重要な役割を果たしていることを示唆している (表1)。

最近の報告で、パイエル板の構築における詳細なメカニズムの解析がなされた。胎生期のマウスの腸管にB lymphocyte chemoattractant (BCL) のレセプターであるCXCケモカインレセプター5 (CXCR5) を発現しているIL-7R⁺CD3⁻リンパ球が認められた。さらに、IL-7R⁺CD3⁻細胞は、IL-7Rを介する刺激によりLT $\alpha\beta$ を産生

した¹³⁾。一方パイエル板の原基にはBCLを産生するLT β R⁺VCAM-1⁺ICAM-1⁺間葉系 (mesenchimal) 細胞が存在した。また、これらの細胞はLT β R-Ig, あるいは抗IL-7R抗体を*in utero*で投与することにより消失した¹³⁾。以上の結果より、①IL-7を介したシグナルにより、IL-7R⁺CD3⁻細胞はLT $\alpha\beta$ を産生し、LT β R⁺VCAM-1⁺ICAM-1⁺間葉系細胞を活性化する、②活性化された間葉系細胞はBCLなどのケモカインを産生することによってIL-7R⁺CD3⁻細胞の走化性を誘導する、というパイエル板構築におけるリンパ系細胞と間葉系細胞間相互作用が示唆された。一方、興味深いことに*in utero* LT β R-Ig投与パイエル板欠損マウスは、タンパク抗原をアジュバントのコレラ毒素とともに経口免疫することにより、抗原特異的粘膜IgA抗体応答が誘導された¹⁴⁾。これらの結果は、パイエル板が腸管の抗原特異的免疫応答において、必須のIgA誘導組織ではないことを示唆している。

マウス腸管にはパイエル板の他に孤立リンパ小節 (isolated lymphoid follicles ; ILF) が存在する。ILFはパイエル板と似た構造を有し、GCも存在する。また、LT- α 欠損マウスではパイエル板と同様にILFは欠損していた¹⁵⁾。しかしながら、ILFは他のパイエル板が欠損しているIL-7R欠損マウス、*in utero* LT β R-Ig投与マウスにお

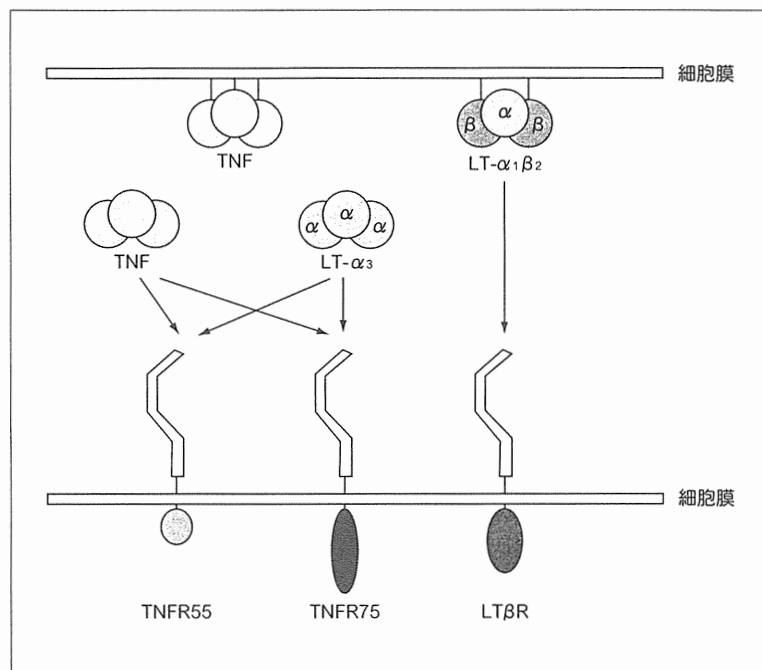


図1 TNF, LTとレセプターの相互作用

表1 マウスの末梢リンパ組織の構築

マウス	リンパ節	パイエル板	ILF	NALT	文献
LT- α 欠損	-	-	-	+/-	3, 4, 15, 18, 19)
LT- β 欠損	+/-	-	ND	+/-	9, 19)
LT β R欠損	-	-	ND	ND	10)
TNF欠損	+	+/-	ND	+	5, 18)
TNFR55欠損	+	+/-	ND	+	6, 18)
TNFR75欠損	+	+	ND	ND	7)
LT β R-Ig処理	+/-	-	+	+	11, 19)
IL-7R欠損	+	-	+	+	7, 15, 18, 19)

ND : not determined

いて認められており、構築のメカニズムがパイエル板とは異なることが示された(表1)¹⁵⁾。ILFが腸管における免疫応答誘導においてどのような役割を果たしているかを明らかにすることは今後の課題である。

3. NALT構築のメカニズム

マウスのNALTは鼻粘膜下に位置し、ヒトのワルダイエル扁桃輪に相当すると考えられている。パイエル板と似た構造を有し、経鼻免疫により抗原特異的IgA抗体応答を鼻腔や他の粘膜組織に誘導する^{16, 17)}。興味深いことにその構築のメカニズムはパイエル板のそれとは全く異なり、LT- α 欠損マウス、TNF欠損マウス、IL-7R欠損マウス、*in utero* LT β R-Ig投与マウスなど、パイエル板を欠損しているマウスにおいても検出された(表1)。しかしながら、LT- α 欠損マウスでは、NALTは認められるものの、その構造は壊れていた^{18, 19)}。以上の結果は、TNFR, LT β Rを介するシグナルがNALTのorganogenesisに関与していないが、構造の維持には関与していることを示唆している。さらに、われわれの最近の知見では、Id2欠損マウスでNALTの欠損が認められており¹⁷⁾、CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞が、NALTのorganogenesisに重要な役割を果たすことが示唆された。

おわりに

TNF, LTを足掛かりにして、MALT構築のメカニズムが徐々に明らかになってきた。MALTのメカニズムを把握することは、粘膜ワクチンの開発や炎症性腸疾患の治療法を確立する上で、おおいに役立つであろう。抗原特異的免疫応答におけるILFの役割や、MALT構築のメカニズムの解明など、今後の研究に期待したい。

参 考 文 献

- 1) Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, *et al.* The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Current Topics in Microbiol Immunol* 1995; 198: 175-218.
- 2) Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992; 13: 151-3.
- 3) DeTogni P, Goellner J, Ruddle NH, *et al.* Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994; 264: 703-7.
- 4) Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, *et al.* Lymphotoxin- α -deficient mice: effects of secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* 1995; 155: 1685-93.
- 5) Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, *et al.* Immune and inflammatory responses in TNF α -deficient mice: a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996; 184: 1397-411.
- 6) Neumann B, Luz A, Pfeffer K, *et al.* Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1996; 184: 259-64.
- 7) Erickson SL, de Sauvage FJ, Kikly K, *et al.* Decreased sensitivity to tumor-necrosis factor but normal T-cell development in TNF receptor-2-deficient mice. *Nature* 1994; 372: 560-3.
- 8) Kiyono H, John Bienenstock J,

- McGhee JR, *et al.* The mucosal immune system: features of inductive and effector sites to consider in mucosal immunization and vaccine development. *Reg Immunol* 1992; 4: 54-62.
- 9) Koni PA, Sacca R, Lawton P, *et al.* Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β -deficient mice. *Immunity* 1997; 6: 491-500.
 - 10) Futterer A, Mink K, Luz A, *et al.* The lymphotoxin β receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 1998; 9: 59-70.
 - 11) Rennert PD, Browning JL, Mebius R, *et al.* Surface lymphotoxin α/β complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J Exp Med* 1996; 184: 1999-2006.
 - 12) Adachi S, Yoshida H, Honda K, *et al.* Essential role of IL-7 receptor α in the formation of Peyer's patch anlage. *Int Immunol* 1998; 10: 1-6.
 - 13) Honda K, Nakano H, Yoshida H, *et al.* Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 2001; 193: 621-30.
 - 14) Yamamoto M, Rennert PD, McGhee JR, *et al.* Alternate mucosal immune system: organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 2000; 164: 5184-91.
 - 15) Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, *et al.* Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J Immunol* 2002; 168: 57-64.
 - 16) Yamamoto M, Briles DE, Yamamoto S, *et al.* A nontoxic adjuvant for mucosal immunity to Pneumococcal surface antigen A. *J Immunol* 1998; 161: 4115-21.
 - 17) Kuroono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, *et al.* Nasal immunization induces Haemophilus influenzae-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. *J Infect Dis* 1999; 180: 122-32.
 - 18) Harmsen A, Kusser K, Hartson L, *et al.* Organogenesis of nasal-associated lymphoid tissues (NALT) occurs independently of lymphotoxin- α (LT α) and retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ , but the organization of NALT is LT α dependent. *J Immunol* 2002; 168: 986-90.
 - 19) Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, *et al.* Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT α 1 β 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3-CD4⁺CD45⁺ cells. (submitted for publication)



粘膜関連リンパ組織の構築と TNFファミリー*

山本正文**

Key Words : TNF, lymphotoxin, Peyer's patch, lymphoid organogenesis, mucosal immunity

はじめに

ヒトは粘膜を介して、外界からの病原性細菌やウイルスなどの異種抗原と接しており、粘膜の免疫機構が感染防御の第一線を担っている。その広さは皮膚の200倍におよび、 10^{11} 個もの免疫担当細胞が存在する¹⁾。粘膜面ではさまざまな細胞性、体液性免疫機構が免疫応答の成立に関与しているが、その中心的な役割を果たしているのが粘膜関連リンパ組織である。粘膜関連リンパ組織は種々の抗原の体内への侵入経路から大きく2つに分類される。消化器系を介して侵入してくる抗原に対する腸管関連リンパ組織(gut-associated lymphoreticular tissue : GALT)と、呼吸器系での鼻咽頭関連リンパ組織(nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue : NALT)もしくは気管支関連リンパ組織(bronchus-associated lymphoreticular tissue : BALT)である¹⁾。粘膜面を介して侵入した抗原は粘膜関連リンパ組織に取り込まれ、そこに存在する $CD4^+$ T細胞、IgA産生前駆B細胞などの免疫担当細胞を活性化する。抗原刺激を受けたそれらの免疫担当細胞はこの組織を離れ、所属リンパ節、胸管を介して、血流に入り、粘膜固有層に到達して多量体のIgAを分泌する。この抗原特異的IgA抗体産生に関連する免疫担当細胞の循環帰巢経路をcommon mucosal Immune system (CMIS)とよんでいる(図1)¹⁾。

近年の遺伝子欠損マウスを用いた解析により

TNFファミリーのリガンド、レセプターを介したシグナル伝達が粘膜関連リンパ組織の構築に深く関与していることが示された。本稿ではTNF, LTが粘膜関連リンパ組織の構築にどのような影響を及ぼしているのか、また、粘膜免疫応答の誘導におけるTNF, LTの役割についてわれわれの知見を交えて解析を加えてみたい。

TNF, LTとレセプターとの結合様式

TNFとLTはともにTNFファミリーに属する三量体で形成されるサイトカインである。TNFはhomotrimerで構成され、細胞膜結合型(cell-bound form)と分泌型(secreted form)の2種類を有する。一方、LTは α 鎖のhomotrimer (LT- α_3)で構成され、分泌型で存在するものと、 α 鎖と β 鎖の組み合わせ(LT- $\alpha_1\beta_2$)で構成され、細胞膜結合型で存在するものがある²⁾³⁾。TNFとLT- α_3 は55kDaのTNFレセプター(TNFR55)および75kDaのTNFレセプター(TNFR75)に結合するが、LT- $\alpha_1\beta_2$ はLT β レセプター(LT β R)に結合する(図2)。LT β Rの細胞内ドメインはTNFR55またはTNFR75の細胞内ドメインとのhomologyは低く、LT β Rを介するシグナルがTNFR55, TNFR75を介するシグナルと異なった機能を発現するであろうことは容易に想像できる。また、近年、Herpes simplex virus (HSV)が活性化T細胞に感染する際に結合するherpesvirus entry mediator (HVEM)に、LT- α_3 と新しいTNFファミリーであるhomologous to Lymphotoxins, exhibits Inducible expression, and

* Role of TNF family in the mucosa-associated lymphoreticular tissue organogenesis.

** Masafumi YAMAMOTO, D.D.S., Ph.D.: 日本大学松戸歯学部総合口腔医学講座(☎271-8587 松戸市栄町西2-870-1); Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo 271-8587, JAPAN

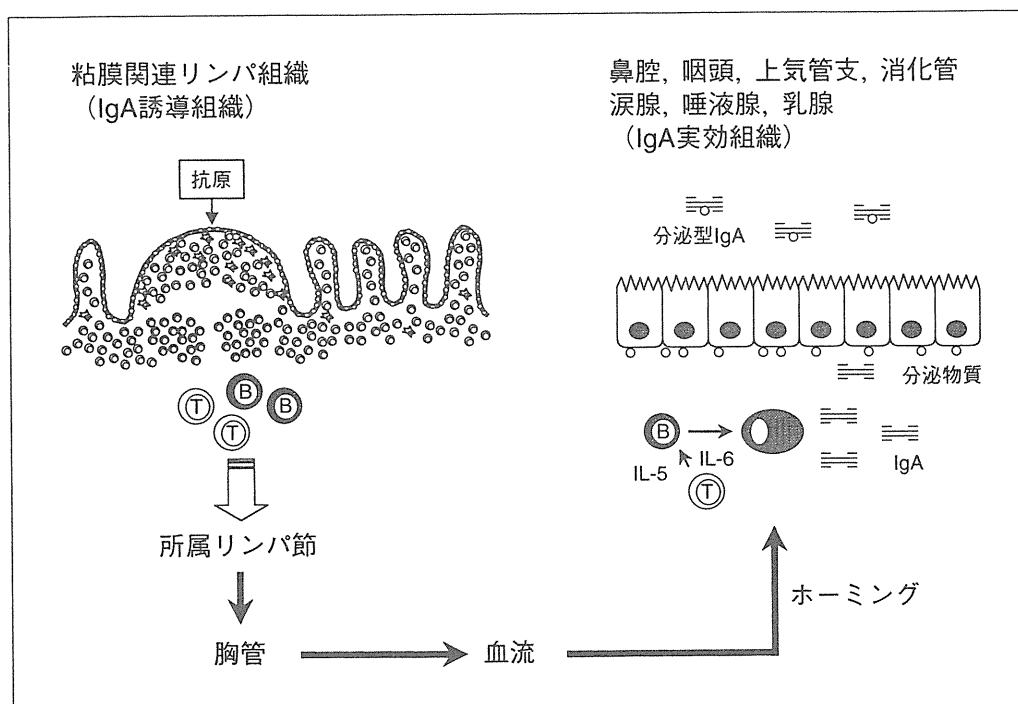


図1 粘膜免疫機構による免疫応答の成立

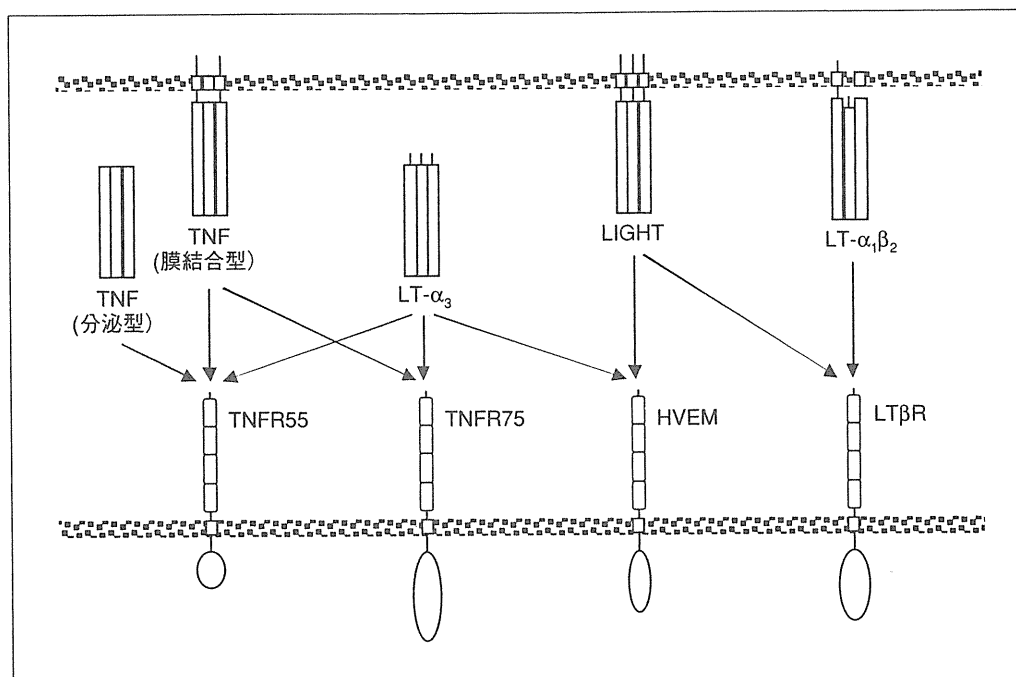


図2 TNF, LTのリガンド, レセプター相互作用

competes with HSV Glycoprotein D for HVEM, a receptor expressed by T lymphocytes (LIGHT)が結合することが報告された⁴⁾. LIGHTは29kDaの type II transmembrane proteinで, 活性化 T 細胞より産生され, HVEMとLTβRに結合することが示されている (図2).

末梢リンパ組織構築における TNF, LTの役割

TNFやLT, また, レセプターの遺伝子欠損マウスの解析によりTNFファミリーが末梢リンパ組織の構築に大きく関与していることが示され

表1 各種マウスにおけるリンパ組織の構築

マウス	脾臓		リンパ節	パイエル板	ILF	NALT	文 献
	GC	FDC					
LT α 欠損	—	—	—	—	—	+/- ^c	5), 6), 18), 21), 22)
LT β 欠損	—	—	+/- ^a	—	ND	+/- ^c	9), 22)
LT β R欠損	—	—	—	—	ND	ND	14)
TNF欠損	—	—	+	+/- ^b	ND	+	7), 21)
TNFR55欠損	—	—	+	+/- ^b	ND	+	8), 21)
<i>in utero</i> LT β R-Ig処理	—	—	+/- ^a	—	+	+	11), 22)
IL-7R欠損	ND	ND	+	—	+	+	17), 21), 22)

a: 腸間膜リンパ節が存在, b: サイズの縮小, c: 組織構造の破壊, ND: not determined

た. LT- α 遺伝子欠損マウスおよびLT β R欠損マウスは末梢リンパ節が形成されなかった⁵⁾⁶⁾. 一方, TNF欠損マウス, TNFR55欠損マウスのリンパ節の形成は正常であった⁷⁾⁸⁾. 以上の結果より, リンパ節の形成におけるLT- $\alpha_1\beta_2$ の重要性が示された. しかしながら, LT- β 欠損マウス, *in utero* LT β R-Ig投与マウスでは他の末梢リンパ節は欠如していたが腸間膜リンパ節が認められた^{9)~11)}. この結果は腸間膜リンパ節の形成が他の末梢リンパ節と異なり, LIGHTのようなLT- $\alpha_1\beta_2$ 以外のリガンドが関与する可能性を示唆している(表1).

脾臓の構築においても, TNFおよびLTは重要な役割を果たしている. TNF欠損マウス, TNFR55欠損マウス, LT- α 欠損マウス, LT- β 欠損マウス, LT β R欠損マウスはT細胞領域, B細胞領域が明確に分離されておらず, 胚中心(germinal center: GC), 濾胞樹状細胞(follicular dendritic cells: FDC)ネットワークも形成されなかった^{5)~8)}(表1). Tヘルパー細胞により活性化された抗原特異的B細胞は一次濾胞を形成し, 次いで二次濾胞に移行してGCを形成する. GCは活発な抗原特異的B細胞分裂の場所であり, そこで機能的な抗体V領域遺伝子の体細胞高頻度突然変異(somatic hypermutation)や親和性成熟(affinity maturation)が起こる¹²⁾. また, 一次濾胞, 二次濾胞ともにFDCが存在し, 抗体反応過程でみられるB細胞の選択機構において中心的な役割を果たすことが示唆されている¹²⁾. 実際, 上述の遺伝子欠損マウスの脾臓構築におけるGC, FDCの消失は体液性免疫応答にも著しい影響を示し, T細胞依存性蛋白抗原の感作による抗原特異的抗体のアイソタイプクラススイッチは誘導されなかった^{6)~8)}.

以上の報告より, TNFおよびLTはリンパ節の形成, 脾臓の構築に深く関与し, ひいては体液性免疫応答の誘導に重要な役割を果たしていることが示された.

TNF, LTによる粘膜関連 リンパ組織の制御

上述のように, 粘膜組織は全身系免疫とは独立した免疫機構を有し, 粘膜面における抗原特異的分泌型IgA抗体応答の誘導に際しては, GALTやNALTなどの粘膜関連リンパ組織が重要な役割を果たしている(図1). したがって, 粘膜関連リンパ組織の構築におけるTNF, LTの役割, また, 粘膜関連リンパ組織欠損下での抗原特異的IgA抗体応答の解析は粘膜免疫機構を解明する上で重要な手がかりとなる. GALTの構築におけるTNF, LTの影響を解析した結果, LT- α 遺伝子欠損マウス, LT- β 欠損マウス, LT β R欠損マウスはパイエル板が欠損していた⁶⁾⁷⁾⁹⁾¹³⁾. また, *in utero* LT β R-Ig投与あるいは抗IL-7R抗体投与マウスもパイエル板が欠損していた¹¹⁾¹³⁾(表1). これらの結果はパイエル板の形成は胎生期にLT β RおよびIL-7Rを介するシグナルが重要な役割を果たしていることを示唆している. また, 最近の報告で, 胎生期のマウスの腸管にB lymphocyte chemoattractant(BCL)のレセプターであるCXC chemokine receptor 5(CXCR5)を発現しているIL-7R⁺CD3⁻リンパ球が認められた. さらに, IL-7R⁺CD3⁻細胞はIL-7Rを介する刺激によりLT- $\alpha_1\beta_2$ を産生した¹³⁾. 一方, パイエル板の原基にはBCLを産生するLT β R⁺VCAM-1⁺ICAM-1⁺間葉系(mesenchymal)細胞が存在した. また, これらの細胞は

表2 TNFR55, LT β Rを介するシグナルのブロックによる
腸管関連リンパ組織の構築と粘膜免疫応答

マウス	腸間膜リンパ節			パイエル板			粘膜免疫 応答
	T/B 細胞 領域	GC	FDC	T/B 細胞 領域	GC	FDC	
<i>in utero</i> TNFR55-Ig投与 ^a	明瞭	+	+	明瞭	+	+	+++
<i>in utero</i> LT β R-Ig投与 ^a	明瞭	+	+	欠損	欠損	欠損	++
TNFR55-Ig投与 ^b	明瞭	+	+	明瞭	+	+	+
LT β R-Ig投与 ^b	やや不明瞭	+	+/-	明瞭	+	+/-	+

^a: 母親マウスの妊娠14日目と17日目に投与.

^b: 免疫期間中に投与.

LT β R-Igあるいは抗IL-7R抗体を*in utero*で投与することにより消失した¹⁵⁾. 以上の結果より, ①IL-7R⁺CD3⁻細胞はIL-7を介したシグナルによりLT- α β 2を産生してLT β R⁺VCAM-1⁺ICAM-1⁺間葉系細胞を活性化し, ②活性化された間葉系細胞はBCLなどのケモカインを産生することによってCXCR5を発現するIL-7R⁺CD3⁻細胞の走化性を誘導する, というパイエル板の形成におけるリンパ系細胞と間葉系細胞との細胞間相互作用が示唆された. そこで, われわれは腸管の抗原特異的IgA抗体応答におけるパイエル板の役割を解析するために, *in utero* LT β R-Ig投与によるパイエル板欠損マウスを用いて, 経口免疫による腸管粘膜の抗原特異的IgA抗体応答を解析した. その結果, *in utero* LT β R-Ig投与マウスでは腸管粘膜面に顕著な特異的IgA抗体産生が認められた. さらに腸管膜リンパ節よりCD4⁺T細胞を分離し抗原で再感作した結果, 顕著な細胞増殖およびサイトカイン産生が認められた¹⁶⁾. したがって, パイエル板が欠損している状態でも腸管膜リンパ節に抗原特異的CD4⁺T細胞が誘導され, 分泌型IgA抗体産生をサポートすることが示された. 次に, 正常なGALT存在化でのIgA抗体応答誘導時におけるTNFとLTの影響を解析するために, 正常マウスの経口免疫期間中にLT β R-IgあるいはTNFR55-Igを投与し, LT β RあるいはTNFR-55を介するシグナルをブロックした. その結果, LT β R-Igを投与することにより腸管膜リンパ節の構造の一部が壊れ, 抗原特異的IgA抗体応答の顕著な抑制が認められた(表2)¹⁷⁾. 以上の結果より, 腸管の抗原特異的IgA抗体応答に際して, ①パイエル

板は必須の誘導組織ではないこと, ②腸間膜リンパ節の構造が重要であることが示唆された.

最近の報告で, マウス腸管にはパイエル板の他に孤立リンパ小節(isolated lymphoid follicles: ILF)が存在することが示された. ILFはパイエル板と似た構造を有し, GCも存在する. また, LT- α 欠損マウスではパイエル板と同様にILFは欠損していた¹⁸⁾. しかしながら, ILFは他のパイエル板が欠損しているIL-7R欠損マウス, *in utero* LT β R-Ig投与マウスにおいて認められており, 形成のメカニズムがパイエル板とは異なることが示されている(表1)¹⁸⁾.

呼吸器系粘膜組織にはNALTが存在する. パイエル板と似た構造を有し, 経鼻免疫により抗原特異的IgA抗体応答を鼻腔や他の粘膜組織に誘導することより, 呼吸器系におけるIgA誘導組織であることが示唆されている¹⁹⁾²⁰⁾. しかしながら, NALT構築のメカニズムはパイエル板のそれとはまったく異なり, LT- α 欠損マウス, TNF欠損マウス, IL-7R欠損マウス, *in utero* LT β R-Ig投与マウスなどパイエル板を欠損しているマウスにおいてもNALTは認められた. したがって, NALTの形成にTNF, LTは関与していないことが示された. しかしながら, LT- α 欠損マウスではNALTは認められるもののそのサイズは小さく, 組織構造は壊れていた²¹⁾²²⁾ことから, LTは構造の維持に関与していることが示唆された(表2). また, われわれの最近の知見ではId2欠損マウスでNALTの欠損が認められた²²⁾. さらにCD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞をId2欠損マウスに移入することにより, NALT様の構造物が再構築された²²⁾. 以上の

結果より, CD3⁻CD4⁺CD45⁺細胞がNALTの構築に重要な役割を果たすことが示された。

おわりに

粘膜関連リンパ組織構築においてTNF, LTがどのような役割を果たしているかについて解説を加えた。感染症のほとんどは粘膜面を介して侵入してくる病原性微生物によって引き起こされ, 生体防御における粘膜免疫機構の役割の重要性が認識されてきている。粘膜関連リンパ組織構築のメカニズム, また, 粘膜免疫応答誘導のメカニズムを解明することは, 粘膜面に効果的なIgA抗体応答を誘導する粘膜ワクチンの開発や食物アレルギー, 喘息, 炎症性腸疾患などの粘膜組織に発生する疾病の治療法を確立するためにも大変重要であり, 今後ますます研究の発展を期待したい。

文 献

- 1) Kiyono H, McGhee JR. The mucosal immune system. In : Paul WE, editors. *Fundamental Immunology* 4th ed. Philadelphia : Lippincott-Raven PA ; 1999. p.909.
- 2) Ware CF, VanArsdale TL, Crowe PD, et al. The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995 ; 198 : 175.
- 3) Tartaglia LA, Goeddel DV. Two TNF receptors. *Immunol Today* 1992 ; 13 : 151.
- 4) Mauri DN, Edner R, Montgonery RI, et al. LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin a are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 1998 ; 8 : 21.
- 5) DeTogni P, Goellner J, Ruddle NH, et al. Abnormal development of peripheral lymphoid organs in mice deficient in lymphotoxin. *Science* 1994 ; 264 : 703.
- 6) Banks TA, Rouse BT, Kerley MK, et al. Lymphotoxin- α -deficient mice : effects of secondary lymphoid organ development and humoral immune responsiveness. *J Immunol* 1995 ; 155 : 1685.
- 7) Pasparakis M, Alexopoulou L, Episkopou V, et al. Immune and inflammatory responses in TNF α -deficient mice : a critical requirement for TNF α in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *J Exp Med* 1996 ; 184 : 1397.
- 8) Neumann B, Luz A, Pfeffer K, et al. Defective Peyer's patch organogenesis in mice lacking the 55-kD receptor for tumor necrosis factor. *J Exp Med* 1996 ; 184 : 259.
- 9) Koni PA, Sacca R, Lawton P, et al. Distinct roles in lymphoid organogenesis for lymphotoxins α and β revealed in lymphotoxin β -deficient mice. *Immunity* 1997 ; 6 : 491.
- 10) Alimzhanov MB, Kuprash DM, Kosco-Vilbois MH, et al. Abnormal development of secondary lymphoid tissues in lymphotoxin b-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 9302.
- 11) Rennert PD, Browning JL, Mebius R, et al. Surface lymphotoxin α/β complex is required for the development of peripheral lymphoid organs. *J Exp Med* 1996 ; 184 : 1999.
- 12) Kosco-Vilbois MH, Zentgraf H, Gerdes J, et al. To 'B' a germinal center ? *Immunol Today* 1997 ; 18 : 225.
- 13) Adachi S, Yoshida H, Honda K, et al. Essential role of IL-7 receptor α in the formation of Peyer's patch anlage. *Int Immunol* 1998 ; 10 : 1.
- 14) Futterer A, Mink K, Luz A, et al. The lymphotoxin β receptor controls organogenesis and affinity maturation in peripheral lymphoid tissues. *Immunity* 1998 ; 9 : 59.
- 15) Honda K, Nakano H, Yoshida H, et al. Molecular basis for hematopoietic/mesenchymal interaction during initiation of Peyer's patch organogenesis. *J Exp Med* 2001 ; 193 : 621.
- 16) Yamamoto M, Rennert PD, McGhee JR, et al. Alternate mucosal immune system : organized Peyer's patches are not required for IgA responses in the gastrointestinal tract. *J Immunol* 2000 ; 164 : 5184.
- 17) Yamamoto M. Role of TNF/LT α and LT α/β for the mucosal immunity [abstract]. *Proc Jpn Immunol* 2001 ; 31 (4), p.2-5.
- 18) Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, et al. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine. *J*

- Immunol 2002 ; 168 : 57.
- 19) Yamamoto M, Briles DE, Yamamoto S, et al. A non-toxic adjuvant for mucosal immunity to Pneumococcal surface antigen A. J Immunol 1998 ; 161 : 4115.
 - 20) Kurono Y, Yamamoto M, Fujihashi K, et al. Nasal immunization induces *Haemophilus influenzae*-specific Th1 and Th2 responses with mucosal IgA and systemic IgG antibodies for protective immunity. J Infect Dis 1999 ; 180 : 122.
 - 21) Harmsen A, Kusser K, Hartson L, et al. Organogenesis of nasal-associated lymphoid tissues (NALT) occurs independently of lymphotoxin- α (LT α) and retinoic acid receptor-related orphan receptor- γ , but the organization of NALT is LT α dependent. J Immunol 2002 ; 168 : 986.
 - 22) Fukuyama S, Hiroi T, Yokota Y, et al. Initiation of NALT organogenesis is independent of the IL-7R, LT α 1 β 2/LT β R and NIK signaling pathways but does require the Id2 gene and CD3⁻CD4⁺CD45⁺ cells. Immunity 2002 ; 17 : 31.

* * *

原 著

差分化遺伝子クローニングによる骨芽細胞への低出力 レーザー照射の生物学的効果の機序解明

安 孫 子 宜 光

日本大学松戸歯学部生化学講座

(主任 : 安孫子宜光教授)

(受理 : 平成 14 年 7 月 15 日)

Elucidation of Mechanisms for the Biostimulatory Effect of Low Level Laser Irradiation on Osteoblasts by Subtractive Gene Cloning

Yoshimitsu ABIKO

Department of Biochemistry and Oral Science Research Institute,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Chief : Prof. Yoshimitsu ABIKO)

(Accepted for Publication : July 15, 2002)

Abstract : Various biostimulatory effects of low-energy laser irradiation (LLLI) have been reported that involve the acceleration of bone regeneration. We reported that LLLI stimulated cellular proliferation, bone nodule formation, alkaline phosphatase activity, and osteocalcin expression. However, the molecular basis of the mechanisms leading to these findings has not been elucidated. To accomplish this, we constructed the cDNA library of MC3T3-E1, a clonal osteoblastic cell line, which enhanced gene expressions by LLLI using a subtracted gene cloning procedure. In the present study, we further characterized gene library by DNA nucleotide sequence and homology-search with a DNA database. Among 88 subtractive genes, several clones exhibited high homology with mitochondrial protein genes, signal transduction-related genes, and EST genes. These findings may help to elucidate the molecular-based mechanisms for the biostimulatory effect of LLLI on osteoblasts.

(J. Jpn. Soc. Laser Dent. 13 : 79~88, 2002 Reprint requests to Dr. ABIKO)

Key words=Low-energy laser irradiation, Osteoblast, Gene expression

キーワード=低出力レーザー, 骨芽細胞, 遺伝子発現

緒 言

低出力レーザー照射が創傷や難治性潰瘍に治療効果があると言及されて以来, 炎症抑制, 疼痛減少, 骨折治癒促進など広範な臨床効果が報告されている^{1,2)}。しかしながら,

低出力レーザー照射による生物学的効果の作用機序は不明な点が多い。とくに分子レベルでの実証科学的な解明は遅れている。

歯科医学領域にも積極的な応用が期待されているなかで, レーザー医療をさらに推進, 発展させるためには, 有用性

〒271-8587 千葉県松戸市栄町西 2-870-1 TEL 047-360-9332, FAX 047-360-9329
2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo City, Chiba 271-8587, Japan TEL +81-47-360-9332, FAX +81-47-360-9329

の高いレーザー照射の機種、照射法を開発するとともに、生物学的効果を実証科学的に解明していく必要があると思われる。

従来の分子レベルでの研究アプローチは、生理活性物質の発見→精製→遺伝子クローニング→機能解析→タンパク質一次構造の解析が行われてきた。しかし、これらの研究方法では、すでによく知られている生理活性物質あるいは同定、精製に成功した分子しか捉えることはできない。当然ながら、目的とする生命現象に関わる未知の遺伝子については研究することは不可能である。

近年、ゲノムサイエンス研究の飛躍的な進展に伴い、ヒトを含む種々の生物のゲノム計画が進められている³⁾。ゲノムデータベースの充実に伴って、細胞内で変動する遺伝子のトランスクリプトーム解析は、生命現象を理解することに多くの情報を与え得ると期待されている。

遺伝子発現の変動を捉える方法として、遺伝子バンクを作成し、対照の mRNA で差し引きするサブトラクション遺伝子クローニング法が開発されている⁴⁾。レーザー照射した細胞から mRNA を分離して cDNA 遺伝子バンクを調製し、非レーザー照射細胞の mRNA を用いて同一の遺伝子を差し引いた（差分化）残りの遺伝子群は、レーザー照射によって遺伝子発現が増大した遺伝子ということになる。この差分化遺伝子ライブラリーを作成し、得られた遺伝子クローンの塩基配列を解読してゲノムデータベースの遺伝子配列とホモロジー検索することによって関与する遺伝子を同定し、その遺伝子の遺伝子産物の機能を明らかにすることが可能となる。

本研究では、骨芽細胞に低出力レーザー照射して差分化遺伝子ライブラリーを構築して新たに得た 88 遺伝子クローンについて塩基配列を解読し、低出力レーザー照射の生物学的効果の作用機序の解明を試みた。

実験方法

1. 細胞培養

骨芽細胞として、マウス新生仔の頭蓋骨から樹立され、骨結節形成能を有する MC3T3-E1⁵⁾を用いた。細胞は、10% 牛胎児血清、100 μ g/ml ペニシリン G、50 μ g/ml ゲンタマイシン硫酸を添加した α -MEM 培地で、95% air-5% CO₂、37℃ の条件化、CO₂ インキュベーターで培養した。培養ディッシュ（75cm²）に培養液 10ml の培養液を加えて培養を行った。

2. レーザー装置

低出力レーザー照射装置は、Ga-Al-As 半導体レーザー装置（モデル Panalas-1000、波長 830nm、最大出力 500 mW；松下電器）を用いた。細胞表面から 5 cm の距離に

照射部を設定し、500mW で培養ディッシュ 75cm² に対して 20 分間照射した。この照射条件で、エネルギー密度は 7.6 J/cm² になる。培養液の存在下および非存在化でレーザー照射を行って調べたところ、両条件でのエネルギー量に差は認められなかった。このことから培養液中の赤色物質による吸収は軽微と考えられ、照射時に培養液を取り除かず実験を行った。また、この照射条件で培養液の温度の変化に有意差は認められない。

3. cDNA ライブラリーの作成

本実験では、細胞増殖への影響も調べるために、MC3T3-E1 細胞をセミコンフルエントまで培養し、レーザー照射後、1, 6, 12, 24 時間後に細胞から総 RNA を回収した。総 RNA を混合して、mRNA を精製し、cDNA ライブラリーを作成した。5 μ g のポリ A-RNA をテンプレートにして、1.6 μ g Not I サイトをもつ oligo dT をプライマーに、メチル化デオキシヌクレオチドを用いて逆転写酵素（Superscript II）反応によって cDNA を合成した。合成試料から RNA を RNase H を用いて取り除いた後、BglII-SmaI アダプターを付加してベクタープラスミドに一方方向で挿入できるようにした。300bp 以下の短い DNA フラグメントをスピニングカラムで除き、ベクタープラスミド pAPneo に挿入し、T4 リガーゼでキメラプラスミドを作成した⁶⁾（図 1）。

4. 差分化遺伝子クローニング

キメラプラスミドを宿主細胞 *Escherichia coli* DH5 α F 7IQ にエレクトロポレーション法で形質転換し、R408 ファージを感染させて一本鎖化して回収した。次いで、レーザー非照射 MC3T3-E1 から回収、精製した mRNA をビオチン標識し、一本鎖化キメラプラスミド ライブラリーとハイブリダイズさせ、さらにストレプトアビジンを結合させた。共通する mRNA 結合キメラプラスミドをフェノール法で除去し、残ったキメラプラスミド、すなわちレーザー照射で mRNA レベルが上昇した遺伝子を含むキメラプラスミドを回収した。この操作を二度繰り返した。差分化キメラプラスミドに BcaBEST DNA ポリメラーゼを用いて二本鎖 DNA プラスミドにした後、*E. coli* MC1061A に形質転換して差分化遺伝子クローン ライブラリーを作成した⁶⁾（図 2）。

5. 塩基配列の解読

単一コロニーの *E. coli* 遺伝子クローンをランダムに回収後、自動プラスミド精製装置（Kurabo, PI-100）でプラスミドを回収、精製した。各キメラプラスミドの挿入 DNA 断片の塩基配列の解読は、dideoxy chain termination 法⁷⁾で行った。塩基配列の解読は蛍光自動 DNA シーケンサー（LiCor, Epicenter Technology 社）、蛍光標識

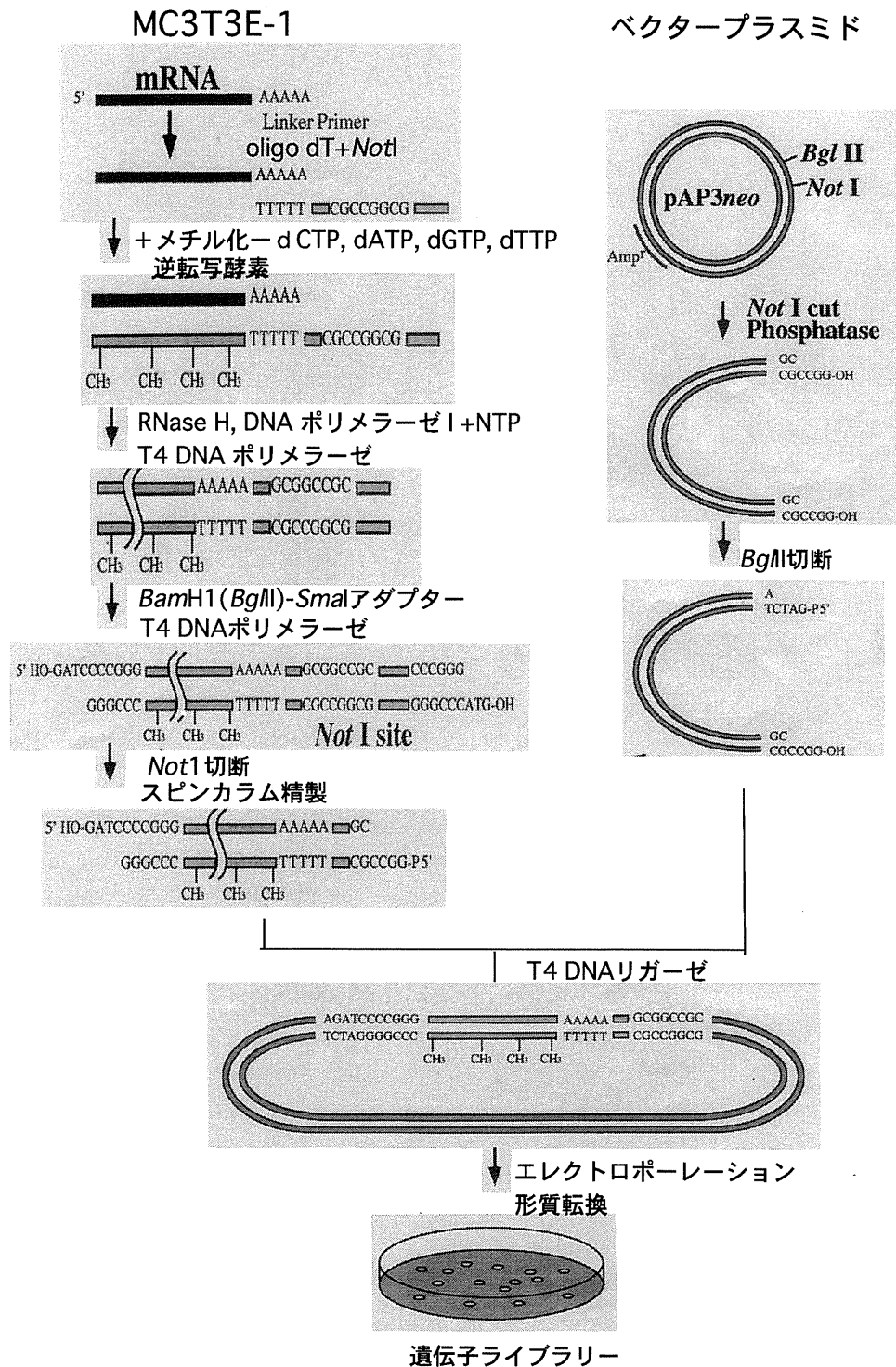


図 1 非レーザー照射細胞遺伝子バンク作成の概略
制限酵素リンカー付加の工夫によって cDNA 断片の挿入方向は一定となり、差分化する際
の非レーザー照射細胞 mRNA に対するアンチセンス鎖がプラスミド DNA の一本鎖として残る。

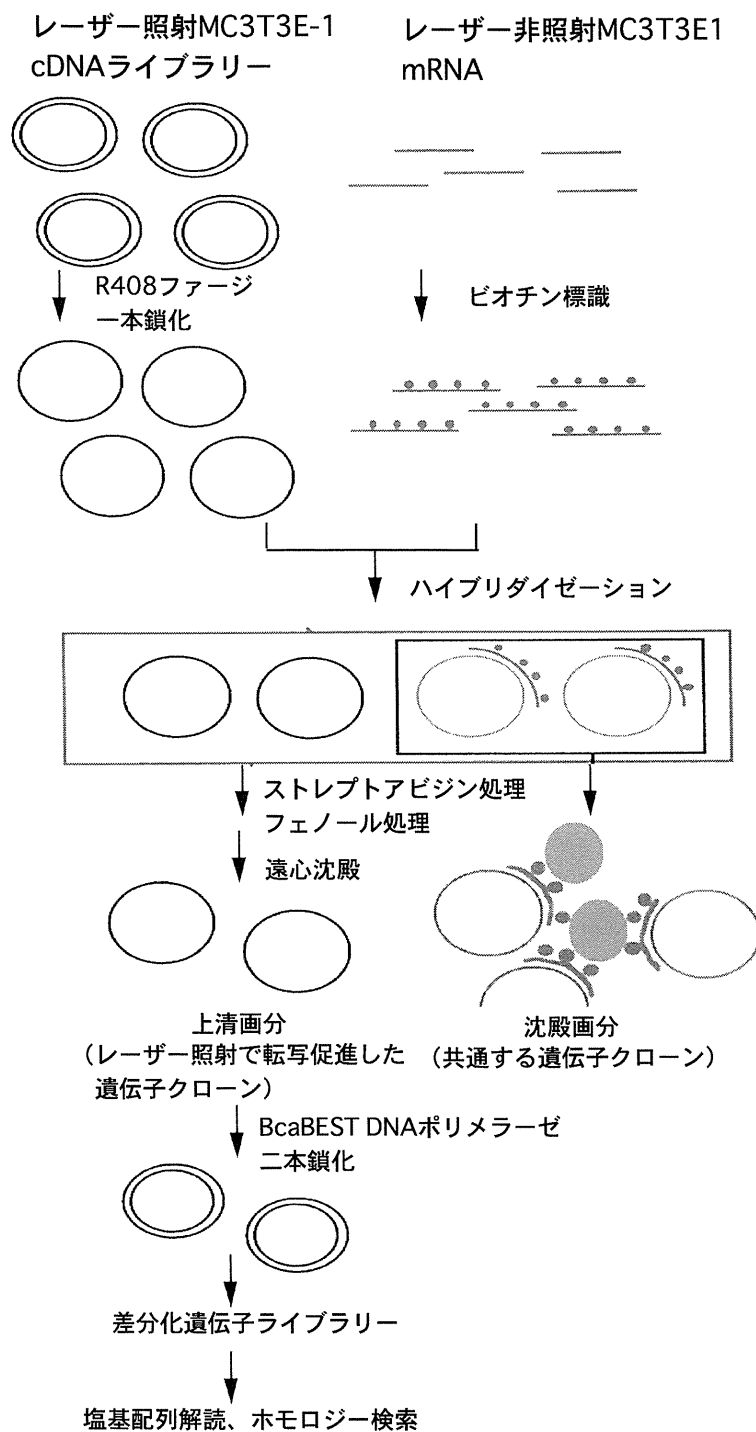


図 2 差別化遺伝子ライブラリー作成の概略
プラスミド遺伝子バンクの一本鎖化された DNA にビオチン標識した非レーザー照射細胞 mRNA が結合する。ビオチンにストレプトアビジンが結合したプラスミドはフェノール処理で取り除かれる。上清画分に残ったプラスミド DNA を二本鎖に戻して大腸菌宿主に形質転換して差別化遺伝子ライブラリーを得る。

DNA プライマー, Sequi therm Long-Read cycle sequencing kit (LiCor, Epicenter Technology 社) を用いて行った。

6. データベース検索

National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を利用して, 塩基配列のホモロジー検索 (Nucleotide BLAST; blastn) を行った。約 520bp の塩基配列のホモロジー検索の結果で既知遺伝子と一部の相同性が見られたものを Known gene クローン, アノテーションがない EST (Expression Sequence Tag) gene とのホモロジーが見られたものを EST クローン, 30bp 以上相同性が見られないのを Unknown gene クローンとした。

結 果

差分化遺伝子ライブラリーからプラスミド DNA を抽出, 精製し制限酵素で切断してアガロースゲル電気泳動を行い, 挿入断片を調べた。図 3 にその一部を示す。

300bp 以上の挿入断片をもち, かつ制限酵素消化パターンが異なる 88 遺伝子クローンを選び, プラスミド DNA を精製し, それぞれの挿入 DNA 断片の塩基配列について 520bp 解読した。得られた塩基配列情報を NCBI の BLAST プログラムで塩基配列のホモロジー検索を行った。図 4 は, No. 1-178 クローンを一例として示したもので, 図 4A が塩基配列, 図 4B が DNA データベースとのホモロジー検索で相同性のあった遺伝子とのアライメントスコア, 図 4C がホモロジー検索で相同性の極めて高いトップ 4 遺伝子のアノテーション情報である。そして, 図 4D は, No. 1-178 の塩基配列 (Query) と NM02553.1 遺伝子 (Sbjct) の DNA 塩基配列ホモロジー検索結果である。相同性の高かった 4 遺伝子のアノテーションは, いずれもマウスのミトコンドリアのリボゾームタンパク質 L11 であった。

88 遺伝子クローンについてのホモロジー検索の結果を表 1 にまとめた。22 クローンが Known 遺伝子, 38 クローンは EST クローン, 30 クローンは Unknown 遺伝子であった。また, 表 2 に 22 クローンの既知遺伝子についてのアノテーション情報を示した。

考 察

低出力レーザー照射の生物学的効果として, 炎症抑制, 疼痛減少, 創傷治癒促進, 骨折治癒促進などが報告されている。しかしながら, 一方ではレーザー照射の効果について心理的なプラセボー効果が大いとする懐疑的な見方や単なる温度上昇効果によるものであるとする意見もある。

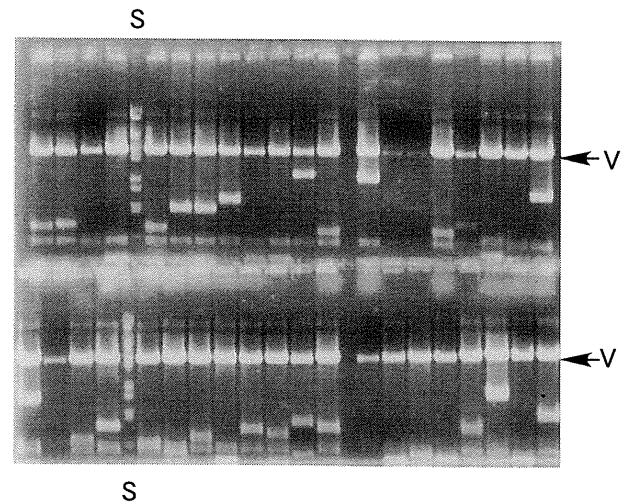


図 3 差分化遺伝子クローンのスクリーニング
差分化遺伝子ライブラリーの大腸菌クローンを培養し, 集菌後, プラスミド DNA を分離する。制限酵素 *Not* I, *Bgl* II で切断し, アガロース電気泳動を行う。300bp 以上の挿入 DNA をもつクローンを選択する。S, サイズスタンダード DNA; V, ベクタープラスミド DNA 断片

このような背景のなかで, 歯科領域への低出力レーザーの積極的な応用をさらに推進, 発展させるためには実証科学的方法で作用メカニズムを解明する基礎研究が必要であると考えられる。

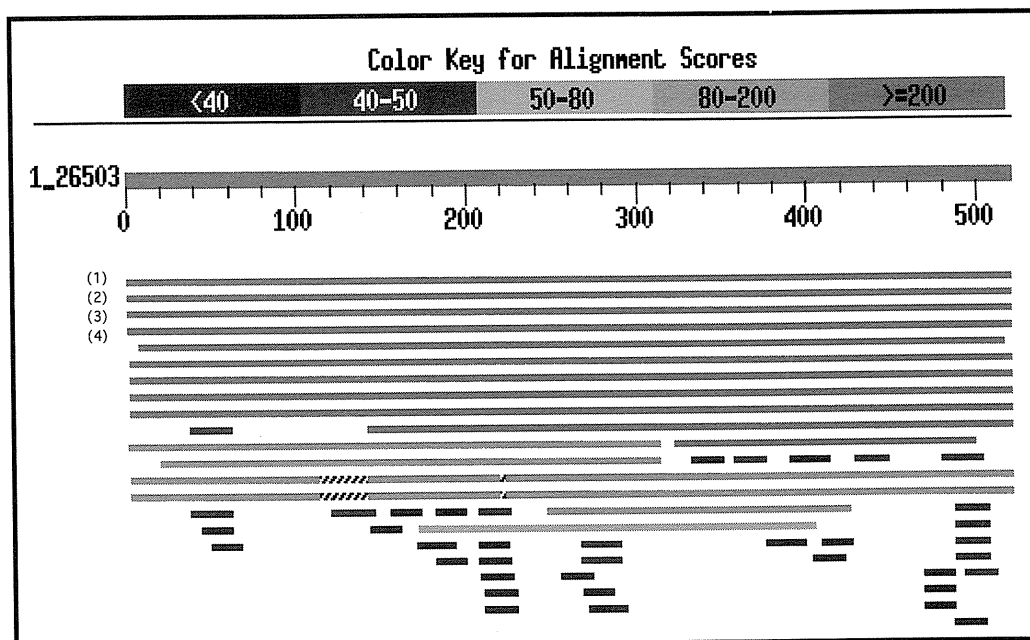
われわれは, レーザー照射の骨形成促進メカニズムを解明するために *in vitro* 実験系を設定し検討を行っている。ラット胎仔の頭蓋骨から採取した骨芽細胞に低出力レーザー照射を行い, 骨結節数が照射量に比例して増大し, アルカリホスファターゼ活性, コラーゲン産生が促進されることを見いだしている⁸⁾。さらに, 培養早期のレーザー照射がより強い骨形成促進効果を有することを報告している⁹⁾。この結果は, レーザー照射が未分化間葉系細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進することを示唆する。

近年, ゲノム科学を基盤とする研究技術が進展し, ゲノム情報をすべて解読するゲノムプロジェクトの進展とその応用によって先進的な研究が行われている。細胞・組織から mRNA を抽出して, ランダムプライマーを用いて mRNA の遺伝子増幅を行って遺伝子発現レベルの差を同定するデファレンシャル デイスプレイ法や遺伝子バンクを作成して対照の mRNA で差し引くサブトラクション遺伝子クローニング法などが開発されている。そして, 得られた遺伝子の塩基配列情報をゲノムデータベースと照合することで, その生命現象に関与する遺伝子発現を未知遺伝子も含めて同定することが可能である。

A 塩基配列

TACATCATGTCCAAGCTAAGCCGGGCCACTCGGACCCTCAAGAAGCCCGAGGCCGGCGCGTGATCCGGTCCATCG
 TGCAGCAGGCCAAGCTATTCTGGGCCTCCACTAGGTCCCATCTTGGGTCAGCGAGGTGTCTCTATCAACCAGTT
 CTGCAAAGAGTTCAACGAGAAGACAAAGGACATCAAAGAAGGCATTCCCCTGCCTACAAAAATTTTATAAAGCCC
 GACAGGACATTTGAGCTCAAGATTGGGCAGCCCACTGTTTCTTACTTTTTGAAGGCAGCTGCTGGGATCGAGAAGG
 GGGCCCGGCATACAGGGAAAGAGGTGGCAGGCCTGGTGAGTTTGAAGCACGTATATGAGATTGCCTGTGTCAAAGC
 TAAGGATGATGCTTTTACCATGCAAGATGTGCCCTGTCTTCTGTGGTCCGTTCCATCATTGGCTCTGCCCCTTCC
 CTGGGCATTGAGTGGTGAAGGACCTCAGTGCAGAAGAACTGGAGGCTTTCCAGAAGGAACGAG

B ホモロジー検索でヒットした遺伝子



C ホモロジーの高い4遺伝子のアノテーション

(1) gil13384979|ref|NM_025553.1|

Mus musculus mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

(2) gil12845690|dbj|AK010329.1|AK010329

Mus musculus ES cells, mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

(3) gil12833044|dbj|AK002797.1|AK002797

Mus musculus kidney, mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

(4) gil13559368|dbj|AB049639.1|AB049639

Mus musculus MRPL11, mitochondrial ribosomal protein L11

Identities = 519/520 (99%)

D 塩基配列のホモロジー

(1) gi|13384979|ref|NM_025553.1

```

Query:   1  tacatcatgtccaagctaagccgggccactcggaccctcaagaagcccgaggccggcggc 60
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct:  74  tacatcatgtccaagctaagccgggccactcggaccctcaagaagcccgaggccggcggc 133

Query:  61  gtgatccggtccatcgtgcgagcaggccaagctattcctgggcctccactaggtcccatc 120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 134  gtgatccggtccatcgtgcgagcaggccaagctattcctgggcctccactaggtcccatc 193

Query: 121  ttgggtcagcgaggtgtctctatcaaccagttctgcaaagagttcaacgagaagacaaag 180
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 194  ttgggtcagcgaggtgtctctatcaaccagttctgcaaagagttcaacgagaagacaaag 253

Query: 181  gacatcaaagaaggcattccctgcctacaaaaattttataaagcccgacaggacattt 240
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 254  gacatcaaagaaggcattccctgcctacaaaaattttataaagcccgacaggacattt 313

Query: 241  gagctcaagattgggcagcccactgtttcttactttttgaaggcagctgctgggatcgag 300
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 314  gagctcaagattgggcagcccactgtttcttactttttgaaggcagctgctgggatcgag 373

Query: 301  aagggggcccgccatcacagggaaagaggtggcaggcctggtgagtttgaagcacgtatat 360
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 374  aagggggcccgccatcacagggaaagaggtggcaggcctggtgagtttgaagcacgtatat 433

Query: 361  gagattgcctgtgtcaaagctaaggatgatgcttttaccatgcaagatgtgccctgtct 420
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 434  gagattgcctgtgtcaaagctaaggatgatgcttttgccatgcaagatgtgccctgtct 493

Query: 421  tctgtggtccgttccatcattggctctgcccgttccctgggcattcgagtgggaaggac 480
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 494  tctgtggtccgttccatcattggctctgcccgttccctgggcattcgagtgggaaggac 553

Query: 481  ctcagtgcagaagaactggaggctttccagaaggaacgag 520
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct: 554  ctcagtgcagaagaactggaggctttccagaaggaacgag 593
    
```

図 4 差分化遺伝子クローンのホモロジー検索の一例

1-178 と名付けた差分化遺伝子クローンの塩基配列を NCBI の BLAST サーチを行った結果、マウスのミトコンドリアのリボソームタンパク質 L11 遺伝子と高い相同性が得られた。A, No. 1-178 クローンの塩基配列解読結果 : B, BLAST 解析した結果のホモロジーをもつ遺伝子のアライメント結果 : C, 相同性の極めて高いトップ 4 遺伝子のアノテーション情報 D, 塩基配列のホモロジー情報

表 1 88 遺伝子クローンのホモロジー検索結果

Unknown	EST	Known
1-87	1-79	332/332 (100%) 1-81 /32kDa
1-93	1-83	129/130 (99%) 1-84 /Thiord reductase
1-97	1-102	35/37 (94%) 1-85 /Myosin
1-100	1-112	291/306 (95%) 1-95 /TF
1-109	1-114	30/31 (96%) 1-104 /ESNRA
1-113	1-116	71/76 (93%) 1-122 /Msx Zn finger
1-121	1-125	239/254 (94%) 1-126 /sn RNA
1-143	1-127	54/54 (100%) 1-133 /galactin
1-149	1-128	297/300 (99%) 1-155 /c-jun
1-152	1-131	509/512 (99%) 1-164 /hydrolase
1-160	1-132	431/442 (97%) 1-167 /Centromere
1-163	1-136	199/218 (91%) 1-174 /Annexin III
1-165	1-147	233/251 (92%) 1-178 /Mt rRNA protein
1-168	1-150	237/240 (98%) 1-191 /hydrolase
1-169	1-151	494/516 (95%) 1-198 /EST/MHC
1-171	1-157	181/192 (94%) 1-199 /G protein
1-172	1-161	507/521 (97%) 2p-12 /phosphatase
1-173	1-162	156/171 (91%) 2p-16 /GDP/disof.
1-180	1-176	518/518 (100%) 2b-59 /Tyr-phosphatase
1-182	1-177	487/494 (98%) 2b-46 /silence Med-EST
1-183	1-194	519/520 (99%)
1-187	1-195	473/473 (100%)
1-192	1-197	413/420 (98%)
2b-45	2b-51	82/82 (100%)
2b-47	2b-52	418/466 (89%)
2b-50	2b-54	520/520 (100%)
2b-55	2b-56	83/85 (97%)
2b-57	2b-58	410/453 (90%)
2b-58	2p-1	516/518 (99%)
2p-20	2p-2	517/517 (100%)
	2p-6	517/518 (99%)
	2p-7	182/191 (95%)
	2p-8	516/517 (99%)
	2p-10	127/134 (94%)
	2p-11	509/516 (98%)
	2p-13	418/425 (98%)
	2p-18	301/304 (99%)
	2p-19	515/515 (100%)
30 clones	38 clones	20 clones

表 2 22-Known クローンの既知遺伝子のアノテーション情報

Gene ID No.	Description	Identities
AB049639	Mus musculus MRPL 11 mRNA for mitochondrial ribosomal protein L11	515/516 (99%)
AA285552	Mus musculus GDP-dissociation inhibitor	513/518 (99%)
AJ001633	Mus musculus mRNA for annexin III	513/517 (99%)
AI006497	Human protein phosphatase PP2A, 65kD regulatory subunit	511/518 (98%)
AF039567	Mus musculus Msx-interacting-zinc finger protein 1 (Miz 1)	492/494 (99%)
AF112439	Mus musculus Fanconi anemia group G protein	465/472 (98%)
AA856395	Mus musculus Hypotical 32.8kD prtein in PDE1-CSE1 intergenic region	363/375 (96%)
BF714528	Mus musculus SnRNA activating protein 50kD subunit	352/408 (86%)
AF116187	Mus musculus inner centromere protein	278/296 (93%)
AF218069	Mus musculus galectin-8	267/270 (98%)
BE334277	Mus musculus c-jun protein oncogene	259/263 (98%)
AF230356	Mus musculus U2 small nuclear ribonucleoprotein A	240/258 (93%)
U28807	Mus musculus lymphoid-specific transcription factor NFATc3	239/244 (97%)
AF110520	Mus musculus major histocompatibility complex NG27, 28, RPS28	190/194 (97%)
BF730197	Human Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 16	158/170 (92%)
AF013490	Mus musculus protein-tyrosine phosphatase	128/133 (96%)
BC006075	Mus musculus Myosin, heavy polypeptide 9	121/134 (90%)
AA166294	Mus musculus Silencing mediator of retinoid & thyroid action	71/ 72 (98%)
AA611370	Mus musculus Bleomycin hydrolase	60/ 61 (98%)
AW743450	Mus musculus Thioredoxin-dependent peroxide reductase	46/ 49 (93%)

われわれはすでに、低出力レーザー照射したマウス骨芽細胞様細胞から遺伝子バンクを作成し、レーザー非照射細胞から回収した mRNA を結合させて取り除き、レーザー照射によって発現促進した約 50 遺伝子クローンを単離している。DNA ホモロジー検索の結果から、細胞周期のライセンス因子¹⁰⁾や ATP 合成酵素の F0F1-ATPase¹¹⁾などの遺伝子を同定することに成功している。

本研究では、新たにレーザー照射 MC3T3E-1 の差分化 88 遺伝子クローンについて塩基配列を解読した。その結果、特にホモロジーが高かった既知遺伝子として、mitochondria ribosomal protein L11, GDP-dissociation inhibitor, annexin III, protein phosphatase, MSX-interacting-zinc finger protein, Fraconi anemia group G protein などが同定された。また、ホモロジーが極めて高い EST クローンが数個同定された。

ribosomal protein L11 は、EF-G の機能に関与することが報告されており、タンパク質合成過程で重要な働きをされると考えられている¹²⁾。GDP-dissociation inhibitor, protein phosphatase, G protein はいずれも情報伝達系において重要な役割を果たしている。Annxin III は、エナメル芽細胞や象牙芽細胞に見いだされており¹³⁾、細胞カルシウムの調節に関与するといわれている¹⁴⁾。MSX-2 は、顎顔面の発育に関与することが知られているが¹⁵⁾、MSX-

interacting-zinc finger protein は、MSX-2 の応答性エレメント DNA への結合に関与すると示唆されている¹⁶⁾。今後、RT-PCR 法やノーザンブロット法によって mRNA レベルが上昇しているかを確認し、これら遺伝子の転写の促進が、どのように骨芽細胞の増殖、分化に関与するかの研究を進める必要がある。

また、EST クローンのなかには、ホモロジーが極めて高い EST 遺伝子が多く同定されている。マウスのゲノムプロジェクトが進展しており、新規に同定され機能が判明する遺伝子の情報がデータベースに蓄積されていくことから、ホモロジー検索を続けることによって新規遺伝子の発見が期待できる。

結 論

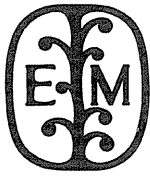
骨芽細胞 MC3T3E-1 に Ga-Al-As 半導体レーザー（モデル Panalas-1000, 波長 830nm）照射し、非照射細胞の mRNA を用いて差分化遺伝子ライブラリーを作成した。新たに 88 遺伝子クローンの塩基配列を解読し、DNA データベースとホモロジー検索を行った。その結果、情報伝達系、タンパク合成系などに関与する遺伝子が同定された。これらの結果から、低出力レーザー照射は、これら遺伝子の転写促進により、骨芽細胞の増殖、分化に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省の科学研究費補助金基盤研究(A-1, 13307059) および学術フロンティア研究推進事業の補助を受けた。レーザー装置の使用について松下産業機器社の御協力に感謝致します。

文 献

- 1) Mester, E., Mester, A.F. and Mester, A.: The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg. Med.*, **5**, 31-39, 1985.
- 2) Ohshiro, T. and Calderhead, R.G.: Development of low reactive-level laser therapy and its present status. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, **9**: 267-275, 1991.
- 3) Vukmirovic, O.G. and Tilghman, S.M.: Exploring genome space. *Nature*, **405**: 820-822, 2000.
- 4) Tanaka, H., Yoshimura, Y., Nishina, Y., Nozaki, M., Nojima, H. and Nishimune, Y.: Isolation and characterization of cDNA clones specifically expressed in testicular germ cells. *FEBS Lett.*, **355**: 4-10, 1994.
- 5) Kodama, H., Amagi, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S.: Establishment of clonal osteogenic osteoblastic cell line from newborn mouse calvaria. *Jpn. J. Oral Biol.*, **23**: 899-901, 1981.
- 6) Hosoya, S., Tamura, K., Nomura, K., Abiko, Y.: Construction of subtracted osteoblast cDNA library with laser-irradiation-enhanced transcription. *Laser Therapy*, **9**: 107-114, 1997.
- 7) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 5463-5467, 1977.
- 8) Ozawa, Y., Shimizu, N., Mishima, H., Kariya, G., Yamaguchi, M., Takiguchi, H., Iwasawa, T. and Abiko, Y.: Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. *Advanced Laser Dentistry, International Conference*, p 281-288, 1995.
- 9) Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G. and Abiko, Y.: Low-energy laser irradiation stimulated bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*, **22**: 347-354, 1998.
- 10) Yamamoto, M., Tamura, K., Hiratsuka, K. and Abiko, Y.: Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation. *Lasers Med. Sci.*, **16**: 213-217, 2001.
- 11) Tamura, K., Hosoya, S., Takema, T., Sakurai, Y., Fujii, T. and Abiko, Y.: Low level laser irradiation enhances expression of F0F1-ATPase subunit-b gene in osteoblastic cells. *Laser Therapy*, **10**: 107-116, 1998.
- 12) Agrawal, R.K., Linde, J., Sengupta, J., Nierhaus, K.H. and Frank, J.: Localization of L11 protein on the ribosome and elucidation of its involvement in EF-G-dependent translocation. *J. Mol. Biol.*, **311**: 777-787, 2001.
- 13) Le Cabec, V. and Maridonneau-Parini, I.: Annexin 3 is associated with cytoplasmic granules in neutrophils and monocytes and translocates to the plasma membrane in activated cells. *Biochem. J.*, **15**: 481-487, 1994.
- 14) Goldberg, M., Feinberg, J., Rainteau, D., Lecolle, S., Kaetzel, M.A., Dedman, J.R. and Weinman, S.: Annexins I - VI in secretory ameloblasts and odontoblasts of rat incisor. *J. Biol. Buccale.*, **18**: 289-298, 1990.
- 15) Foerst-Potts, L. and Sadler, T.W.: Disruption of Msx-1 and Msx-2 reveals roles for these genes in craniofacial, eye, and axial development. *Dev. Dyn.*, **209**: 70-84, 1997.
- 16) Wu, L., Wu, H., Ma, L., Sangiorgi, F., Wu, N., Bell, J.R., Lyons, G.E. and Maxson, R.: Miz1, a novel zinc finger transcription factor that interacts with Msx2 and enhances its affinity for DNA. *Mech. Dev.*, **65**: 3-17, 1997.



Genome science-based gene expression monitoring in osteoblasts altered by low-level laser irradiation

Y. Abiko^{a,b,*}, K. Hiratsuka^{a,b}, S. Hamajima^a, M. Ohta^{b,c},
K. Ide^{b,c}, H. Sasahara^{b,c}

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

^b*Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan*

^c*Department of Oral Diagnostics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan*

Abstract

Although the biostimulatory effects of low-level laser irradiation (LLLI) have been reported, the molecular basis of the mechanisms are not fully elucidated. To elucidate the mechanism of bone regeneration by low-level laser irradiation (LLLI), gene expressions altered in osteoblast by LLLI were identified using the subtractive gene cloning and cDNA microarray technologies. Many gene expressions in osteoblast were altered by LLLI. Many genes whose expression levels were altered by LLLI were shown, including ATP synthesis, DNA replication, signal transduction, enzymes, structural proteins, ESTs and other unknown function genes. These findings suggest that LLLI may demonstrate biostimulatory effects through the expression of many genes, and genome science-based gene expression monitoring will provide unprecedented access to elucidate the mechanism of bone regeneration stimulated by LLLI.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: LLLI; Osteoblast; Gene expression

1. Introduction

The biostimulatory effects of low-level laser irradiation (LLLI), such as wound healing, cell proliferation, antiinflammation [1,2] and bone formation [3,4], have been reported. However, the molecular basis of the mechanisms are not fully elucidated.

* Corresponding author. Tel.: +81-47-360-9332; fax: +81-47-360-9329.

E-mail address: yabiko@mascad.nihon-u.ac.jp (Y. Abiko).

Advances in the technology for assaying transcription levels, in a highly parallel fashion coupled with the completion of genome projects, make possible a complete description of gene regulatory systems. In this study, we focused on the characterization of genes altered in osteoblasts by LLLI, and attempted to elucidate the mechanism of biostimulatory effects using the subtractive gene cloning and cDNA microarray-based expression monitoring system.

2. Materials and methods

MC3T3-E1 cell, a clonal osteoblast-like cell [5], was cultured and irradiated with a Ga-Al-As diode laser device (Model Panalas® 1000; wave length: 830 nm; output power: 100–700 mW variable, Matsushita Industrial Equipment). Laser irradiation was performed at continuous wave at 500 mW output powers for 20 min (7.64 J/cm^2). Subtractive cDNA library, subtracting LLLI cells cDNA from non-LLLI cells mRNA, was constructed using a stepwise procedure [6]. Nucleotide sequencing of

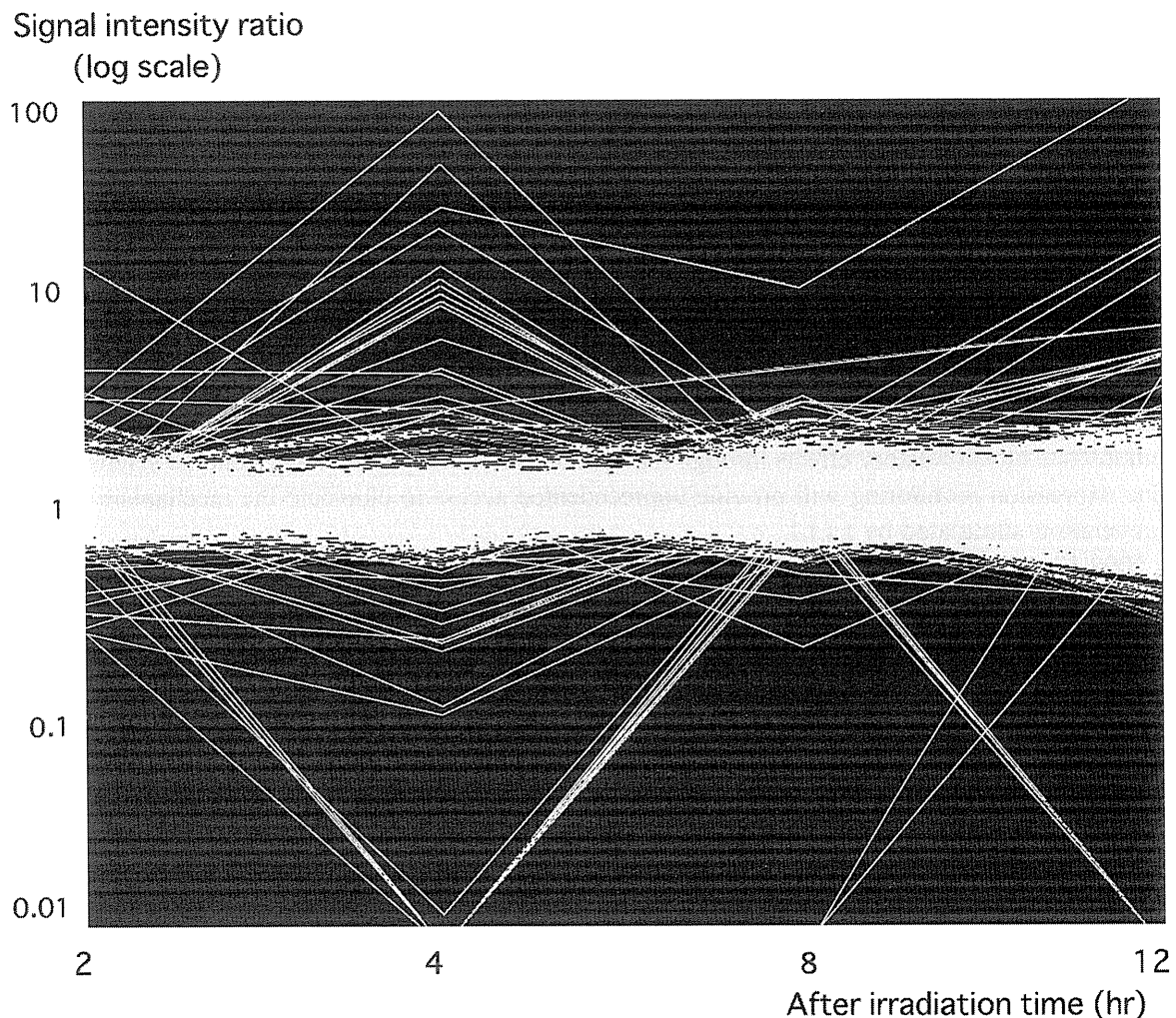


Fig. 1. Gene expression profiles of 3800 genes in osteoblast by LLLI.

Table 1
Gene list

Genebank ID	Description	Ratio
<i>Increased</i>		
NM_008319	adhesion molecule 5, telencephalin	21
NM_016882	Squamous cell carcinoma antigen	17
NM_013619	Olfactory receptor 67	2.6
NM_012040	CaM kinase	2.4
NM_010216	C-fos-induced growth factor	2.1
NM_008850	Phosphatidylinositol transfer protein	2
<i>Decreased</i>		
NM_007435	ATP-binding cassette, subfamily D	4.5
NM_009139	Small inducible cytokine A6	2.8
NM_009175	Sialyltransferase 1	2.1
NM_007824	Cytochrome P450, 7a1	2

each gene clone was carried out and assessed by BLASTN homology search in NCBI databases.

To monitor transcriptional profiling, the gene expression cDNA microarray (Atlas™ Glass Mouse 3.8. Clontech) was used. Total mRNAs were isolated with and without LLLI cells and synthesized to cDNAs, and then labeled with fluorescence dyes cy3 and cy5, respectively. Signals of fluorescence were followed by computer analysis to derive relative changes in expression level of the genes.

3. Results

The homology searches of the subtractive gene library total 126 clones were carried out, and 31 known, 45 EST and 50 unknown genes were found. Among known genes, annexin III, ribosomal protein, membrane protein, G protein, and GDP dissociation inhibitor coding genes were identified (data not shown). Fig. 1 shows the expression profiles of 3800 genes from cDNA microarray analysis. After normalization and data mining, genes altered those transcription levels after 8 h of LLLI; these are listed in Table 1.

4. Conclusion

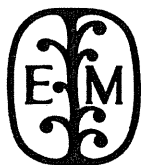
Many gene expression levels in osteoblast by LLLI were capable of being identified by subtractive gene cloning and cDNA microarray technologies. The genes that were altered by LLLI include ATP synthesis, DNA replication, signal transduction, enzymes, structural proteins and other unknown function genes including ESTs. These findings suggest that LLLI may demonstrate biostimulatory effects through a variety of gene expressions, and genome science-based gene expression monitoring will provide unprecedented access to elucidate the mechanism of bone regeneration stimulated by LLLI.

Acknowledgements

The authors are grateful to Matsushita Industrial Equipment for providing the laser apparatus. This study was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research (B-2, 13470395; A-1, 11307051), and was conducted to promote Multidisciplinary Research Projects from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

References

- [1] N. Shimizu, M. Yamaguchi, T. Goseki, Y. Shibata, H. Takiguchi, T. Iwasawa, Y. Abiko, Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1 β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cell, *J. Dent. Res.* 74 (1995) 1382–1388.
- [2] Y. Ozawa, N. Shimizu, Y. Abiko, Low-energy diode laser irradiation reduced plasminogen activity in human periodontal ligament cells, *Lasers Surg. Med.* 21 (1997) 456–463.
- [3] Y. Ozawa, N. Shimizu, G. Kariya, Y. Abiko, Low-energy laser irradiation stimulated bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells, *Bone* 22 (1998) 347–354.
- [4] E. Ohbayashi, K. Matsushima, S. Hosoya, Y. Abiko, M. Yamazaki, Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts, *J. Endodontol.* 25 (1999) 30–33.
- [5] H. Kodama, Y. Amagi, H. Sudo, S. Kasai, S. Yamamoto, Establishment of clonal osteogenic osteoblastic cell line from newborn mouse calvaria, *Jpn. J. Oral Biol.* 23 (1981) 899–901.
- [6] M. Kobori, Y. Ikeda, H. Nara, M. Kato, M. Kumegawa, H. Nojima, H. Kawashima, Large scale isolation of osteoclast-specific genes by an improved method involving the preparation of a subtracted cDNA library, *Genes Cells* 3 (1998) 459–475.



Effect of linear polarized light near-infrared irradiation on chemokines production in synovial cells from human temporomandibular joint

Mitsuhiro Ohta^a, Naomi Ogura^b, Makiko Tobe^b,
Hiroyuki Sakamaki^b, Kazuya Ide^a, Hiroshige Sasahara^a,
Yoshimitsu Abiko^{c,*}

^aDepartment of Oral Diagnostics and Research Institute of Oral Science,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1, Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

^bDepartment of Oral Surgery and Research Institute of Oral Science,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1, Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

^cDepartment of Biochemistry, and Research Institute of Oral Science,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo, 2-870-1, Sakaecho-Nishi 2 chome,
Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

Abstract

Immediate effects of linear polarized light near-infrared irradiation (LPLI), such as anti-inflammation and pain relief from temporomandibular joint (TMJ) disorders, have been reported. However, the molecular-based mechanisms are not yet elucidated. Synovial cells are believed to play pathological roles in the development and continuation of inflammation. Chemokines, such as interleukin (IL)-8 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, have been found in synovial fluid from patients with TMJ synovitis as well as IL-1 β . The purpose of this study was to examine the effect of LPLI on chemokines production stimulated in human synovial (HTS) cells treated with IL-1 β . The cells were isolated from TMJ synovial tissues and cultured using an outgrowth method. The confluent-stage cells were treated with IL-1 β and LPLI was applied. The amounts of chemokines in conditioned medium were measured by ELISA kit. LPLI significantly reduced the production of IL-8 and MCP-1. These findings suggest that LPLI may have an anti-inflammatory effect on TMJ disorders through the reduction of chemokine production.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: LPLI; TMJ; Synovial cells; Chemokine

* Corresponding author. Tel.: +81-47-360-9328; fax: +81-47-360-9329.

E-mail address: yabiko@mascad.nihon-u.ac.jp (Y. Abiko).

1. Introduction

Treatment with linear polarized light near-infrared irradiation (LPLI) has been known to relieve pain and improve local blood flow, and it is used during physical therapy for relieving pain in cases of temporomandibular arthritis [1]. However, the mechanism of action remains largely unknown.

It has been known that the level of interleukin (IL)-1 β is elevated in the synovial fluid of patients with temporomandibular osteoarthritis. We have reported that the production of IL-8 and monocyte chemoattractant protein (MCP)-1 is elevated when IL-1 β was interacted with human synovial (HTS) cells [2]. These chemokines are considered to induce inflammation and tissue breakdown when produced in excess.

For the purpose of examining the effectiveness of LPLI on the improvement of temporomandibular arthritis symptoms, IL-8 and MCP-1 production levels from HTS cells were determined after exposure to IL-1 β and LPLI.

2. Material and methods

Human synovial tissues were obtained from the patient with a condylar process fracture of the temporomandibular joint (TMJ). The tissue was cultured under coverslip in Ham's F12 with supplements. When the growth from the explants had reached the confluent stage, the cells were detached and subcultured.

HTS cells were placed in a 24-well multiple plate. After confirming confluence, they were treated with 1.0 U/ml of IL-1 β . The device for LPLI was Super Lizer HA2200 LE2 (Tokyo-Iken, Tokyo) with a wavelength of 645–1050 nm. Pulsed irradiation at 1 Hz was performed at an energy density of 3.84 J/cm². The culture supernatants were collected at 2, 4, and 6 h after LPLI. IL-8 and MCP-1 levels in conditioned media were measured using ELISA kits.

3. Results

After HTS cells were exposed to IL-1 β , the production of IL-8 and MCP-1 was elevated, although the amounts of increase were reduced at 2 h after irradiation as compared to without irradiation (Figs. 1 and 2).

4. Conclusion

IL-8 and MCP-1 are chemokines that migrate and are activated by the action of neutrophilic leukocytes and macrophages. These immunocompetent cells are important for the maintenance of homeostasis, however, they cause tissue breakdown by producing various kinds of enzymes and active oxygen. Moreover, it has been suggested that they cause a sequencing of elevated chemokine output, as they stimulate HTS cells by producing large amounts of IL-1 β . Therefore, it is suggested that an anti-inflammatory

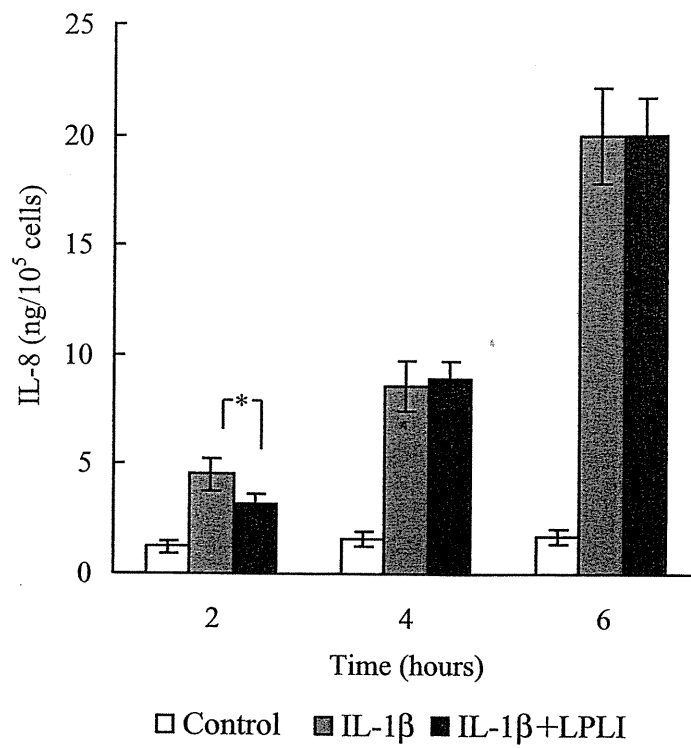


Fig. 1. Effects of LPLI on IL-8 production in HTS cells. Results are expressed as mean \pm S.D. Asterisk indicates significance of $p < 0.05$.

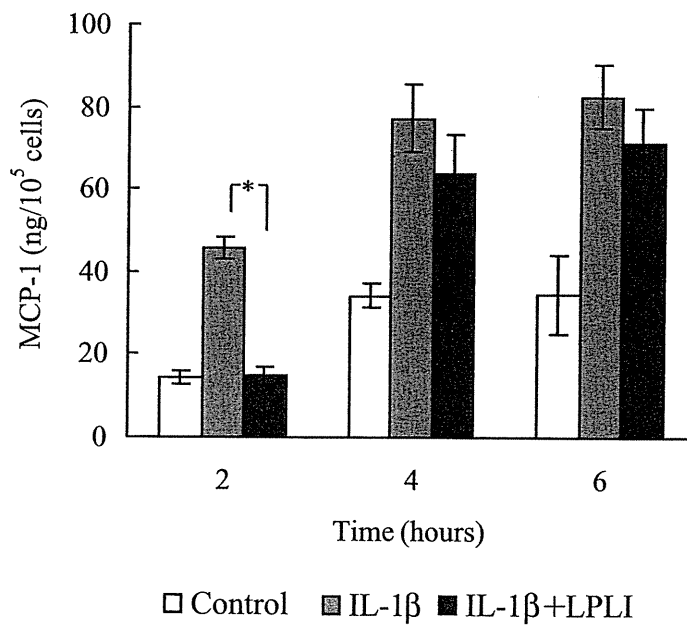


Fig. 2. Effects of LPLI on MCP-1 production in HTS cells. Results are expressed as mean \pm S.D. Asterisk indicates significance of $p < 0.05$.

effect and inhibition of substrate destruction may be attained by inhibiting such sequencing by reducing the production of IL-8 and MCP-1.

In cultured HTS cells, the production of IL-8 and MCP-1 was enhanced by IL-1 β stimulation, which was inhibited by LPLI in the early stage. Therefore, it is suggested that such irradiation might be useful as treatment for inhibiting inflammatory reactions.

Acknowledgements

This study was supported in part by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan to promote Multidisciplinary Research Projects, and by the Nihon University General Individual Research Grant for 2002 (02-115).

References

- [1] S. Iwakata, S. Nomura, M. Suzuki, N. Sakurai, A. Saitoh, S. Kohno, The immediate effect of polarized light irradiation therapy to TMD patients, *Niigata Dent J.* 25 (1) (1995) 43–49.
- [2] M. Tobe, N. Ogura, Y. Abiko, H. Nagura, Interleukin-1 β stimulates interleukin-8 production and gene expression in synovial cells from human temporomandibular joint, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60 (2002) 741–747.

総 説

咀嚼と嚥下運動の脳皮質性制御機構に関する最近の知見

成 田 紀 之¹⁾, 山 村 健 介²⁾

キーワード：咀嚼，嚥下，一次体性感覚野顔面領域，一次顔面運動野，咀嚼/嚥下野

はじめに

咀嚼・嚥下運動は、摂食行動の主要な構成要素であるとともに、顎・舌・顔面・咽喉頭領域の筋など、歯科領域とも関係の深い顔面・口腔領域の数多くの筋の協調した活動によってなされる非常に複雑な運動である。これらの運動は、脳のさまざまな部位にある莫大な数のニューロン（神経細胞）からなる神経回路によって制御されている。この神経性運動制御システムの解明は、実際の臨床で直面する咀嚼あるいは嚥下障害患者の病態を理解するうえで重要である。

運動の制御機構に基づいた分類では、咀嚼・嚥下運動ともに、いわゆる半自動性運動（半自動調節性運動）に分類される。半自動性運動は、運動の開始や運動制御の一部に随意的な要素が含まれるものの、通常はその運動の大部分が自動的に遂行される運動をいい、ほかには呼吸や歩行もこの運動に分類される。これら半自動性運動の制御機構の特徴は、その運動の基本的なパターンが下位脳幹にあるパターン・ジェネレーターという神経回路によって制御される点にある。このパターン・ジェネレーターは、ほぼ生得的に備わっており、そのことが運動の習得に要する時間と努力、あるいは運動再現の精度という点において、半自動性運動と同程度に複雑な随意運動（例えば楽器の演奏）との決定的な差を生んでいる。それゆえ

に、これまでの咀嚼と嚥下に関する神経制御機構に関する研究の焦点は、特に脳幹のパターン・ジェネレーターの役割におかれていた（Dubner ら，1978；Jean，2001；Lund，1991；Lund ら，1988，1999；Luschei と Goldberg，1981；Miller，1986；Nakamura と Katakura，1995；Sessle と Henry，1989）。

脳皮質をはじめとするいわゆる高位中枢の役割は、パターン・ジェネレーターの起動やパターン・ジェネレーターのもつ複数のレパートリーの選択であろうと想像され、その詳細には不明な点が多かった。しかし、近年、トロント大学の研究グループによる、サルの大脳皮質で行った詳細な電気生理学的な実験（Huang ら，1989 a, b；Martin ら，1997，1999；Sessle ら，1999），f-MRI をはじめとする非侵襲的脳活動計測法をヒトに用いた実験の結果より（Hamdy ら，1998；Martin ら，2001；Momose ら，1997；Narita ら，2000；Onozuka ら，2002），咀嚼・嚥下運動制御における高位脳の役割が徐々に明らかになり始めている。

そこで、本稿では咀嚼・嚥下運動制御にかかわる大脳皮質領域、特に一次体性感覚野顔面領域、一次顔面運動野、咀嚼/嚥下野（図1）について、それぞれがいかに咀嚼と嚥下を制御するか、それらの特性をもとに解説する。

1. 咀嚼と嚥下にかかわる皮質領域とは

顔面・口腔領域の運動と大脳皮質のかかわりは、古くから種々の動物で特定の皮質領域の刺激により、顔面・口腔領域の一過性の筋収縮、あるいは咀嚼に類似したリズムミカルな下顎運動が誘発されることから知られていた。その領域とは、霊

1) 日本大学松戸歯学部歯科補綴学第三講座、口腔科学研究所
〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1

TEL：047-360-9387 FAX：047-360-9389

2) 新潟大学大学院医歯学総合研究科口腔生命科学専攻摂食環境制御学講座顎顔面機能学分野

〒951-8514 新潟県新潟市学校町通2-5274

TEL：025-227-2824 FAX：025-225-0281

2003年8月4日受付

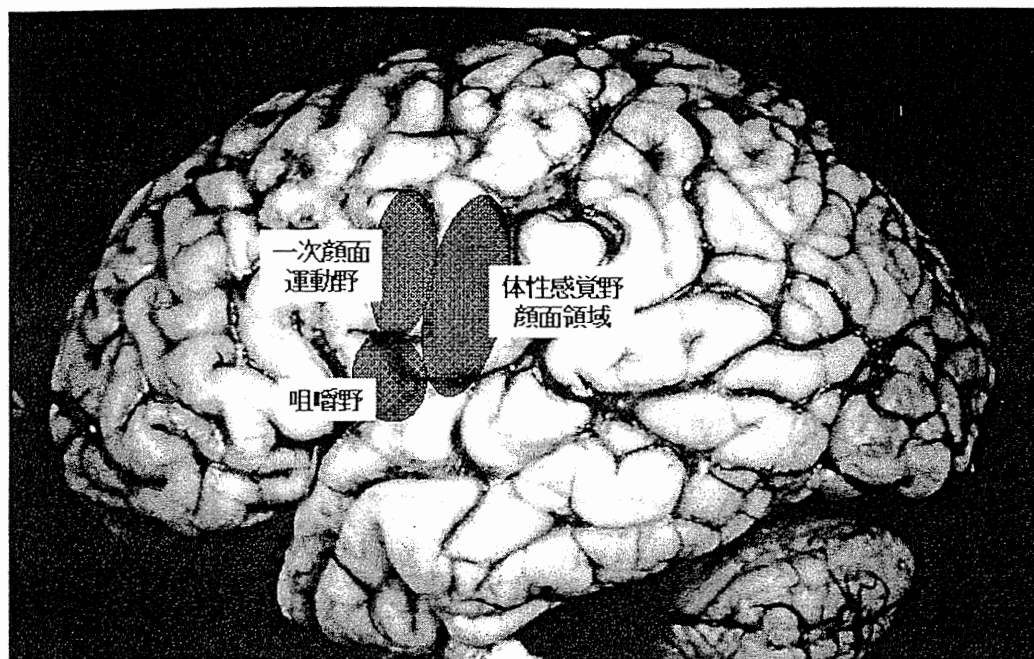


図1 咀嚼にかかわる大脳皮質領域

咀嚼関連皮質領域のうち、一次顔面運動野、一次体性感覚野顔面領域、主咀嚼野（図中の咀嚼野）について、大脳皮質表面からみた大まかな位置関係を示す。

長類においては外側中心前回，すなわち Brodmann の area 4, area 6 の外側部に相当する皮質領域である。これらの皮質領域が咀嚼・嚥下運動の制御に重要であるという仮説は，これらの領域に損傷が認められる患者の病態観察や，実験的にこれらの領域を破壊した動物に発現する摂食行動の障害を観察した実験によっても支持されてきた。例えば，Larson ら（1980）はサルを用いた実験でこの領域を両側摘除すると舌筋と咀嚼筋の協調性が障害されることを報告している。同様の知見が，ウサギやネコなど，ほかの動物種を用いた実験によっても得られている。これらの結果は，中心前回最外側部と下前頭回後部の損傷患者に認められる食物移送や咽頭部における嚥下の不全（Meadows, 1973；Robbins ら，1988）といった臨床所見とよく一致している。

しかし，これらの知見は，大脳皮質表面に与えた電気刺激や皮質破壊の及んだ領域の境界の同定が困難な不可逆的破壊実験，あるいは脳損傷を受けた患者の観察によって得られたものであり，機能的，あるいは組織学的に作成された詳細な脳地図との正確な対応という点において課題を残していた。そこで，トロント大学の研究グループは，限局された皮質部位を刺激する有効な手法として

確立されていた皮質内微小刺激（ICMS），単一ニューロン活動記録，そして皮質冷却による可逆的破壊実験を覚醒サルの大脳皮質に適用することで，大脳皮質傍中心溝領域が顔面・口腔領域の運動制御にいかなる役割を果たすかについての再検討を行った。

その結果，Huang ら（1989 a）は，表面電気刺激によってリズムカルな下顎運動が誘発されることから，以前より咀嚼野と考えられていた皮質部位（Brodmann の area 6 外側部でトロント大学の研究グループはこれを主咀嚼野と名付けた）に加え，それと隣接した一次顔面運動野，一次体性感覚野顔面領域，さらに咀嚼野の深部にあたる皮質領域である前頭弁蓋部（トロント大学の研究グループはこれを深部咀嚼野と名付けた）の皮質内微小刺激によってもリズムカルな下顎運動が誘発されることを明らかにした。最近 Martin ら（1999）は，主咀嚼野ならびに深部咀嚼野への皮質内微小刺激によってリズムカルな下顎運動に加え嚥下が誘発されることを報告し，先の Huang ら（1989 a）が報告したリズムカルな下顎運動の発現領域の見解をさらに嚥下にまで拡大し，サルにおけるこの領域を皮質咀嚼/嚥下野と定義した（図2）。

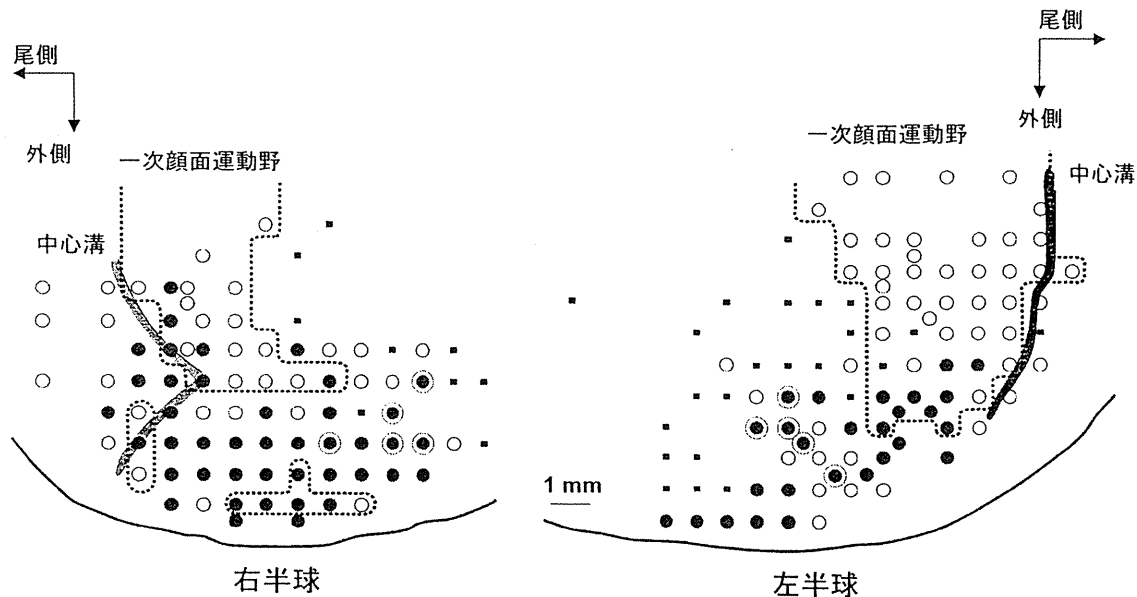


図2 皮質内微小刺激によって嚥下が誘発されたサル大脳皮質傍中心溝領域

刺激により嚥下が誘発された部位を黒丸および二重丸（深部）で示す。左右半球とも、中心溝より前方の一次顔面運動野（破線で囲んだ部分）およびそれより外側の咀嚼野の刺激により嚥下が誘発された。白丸は嚥下を誘発せずに、リズムカルな下顎運動などのほかの口腔顔面の運動応答を示した部位であり、黒点はいずれの誘発も示されなかった部位を示す（Martin ら（1999）より改変）。

さらに彼らは、一次顔面運動野、一次体性感覚野顔面領域、皮質咀嚼/嚥下野（主咀嚼野ならびに深部咀嚼野）からの単一ニューロン活動を記録することで、これら皮質領域のニューロンは摂食行動に関連した発火パターンを示すことや、これら皮質領域のニューロンの感覚受容野と皮質内微小刺激により誘発される顔面・口腔領域の運動を比較することで、一次顔面運動野、一次体性感覚野顔面領域、咀嚼/嚥下野それぞれの領域は固有の感覚入力と運動出力のパターンを有することを明らかにした（Huang ら, 1989 b）。

2. 咀嚼と嚥下にかかわる皮質咀嚼/嚥下野の機能特性

先に述べたように、霊長類では、この領域は皮質表面に近く、古くから皮質表面電気刺激により咀嚼様のリズムカルな下顎運動が誘発される領域として知られていた主咀嚼野と、それよりも外側、皮質表面からみると咀嚼野から白質を隔てた深部に位置する前頭弁蓋部の深部咀嚼野に分類される。皮質咀嚼/嚥下野のニューロンが咀嚼運動に関連した活動を示すことは、サル、ネコ、ウサギなど多くの動物種で確認されている（Kubota と Niki, 1971；Lund と Lamarre, 1974；Luschei と Gordberg, 1981；Martin ら, 1997；

Sessle ら, 1999；Yao ら, 2002）。その発火パターンは、大きく1）下顎運動、あるいは咀嚼筋活動に同期したリズムカルな発火と2）下顎運動や咀嚼筋活動のリズムとは明確に対応しない持続的な発火に分類される。

Narita ら（2002）は覚醒サルを用いて、皮質内微小刺激によって同定した咀嚼/嚥下野を可逆的に冷却することで、皮質咀嚼/嚥下野が摂食行動の遂行に果たす機能を検討した。その結果、咀嚼/嚥下野の冷却によって随意的な咀嚼運動の開始が障害されることが明らかになった。すなわち、動物に食物を提示しても、開口しそれを受け入れる行動が認められなくなり、食物を口腔内に挿入し強制的に咀嚼させようとした場合にも、食物を吐出するような拒絶応答、咀嚼運動が開始された場合にもすぐに中断してしまうなど、冷却前には示されることのなかった行動が頻繁に観察された（図3）。咀嚼が開始され嚥下まで遂行できた例について、下顎運動軌跡および咀嚼筋、舌筋など咀嚼関連筋活動の定量的解析を行ったところ、食物の取り込みや移送にかかる時間が延長し、臼歯部で咀嚼を行っている期間の咀嚼周期が不安定になることが明らかになった。さらに、一咀嚼周期における閉口筋活動量の低下と活動時間

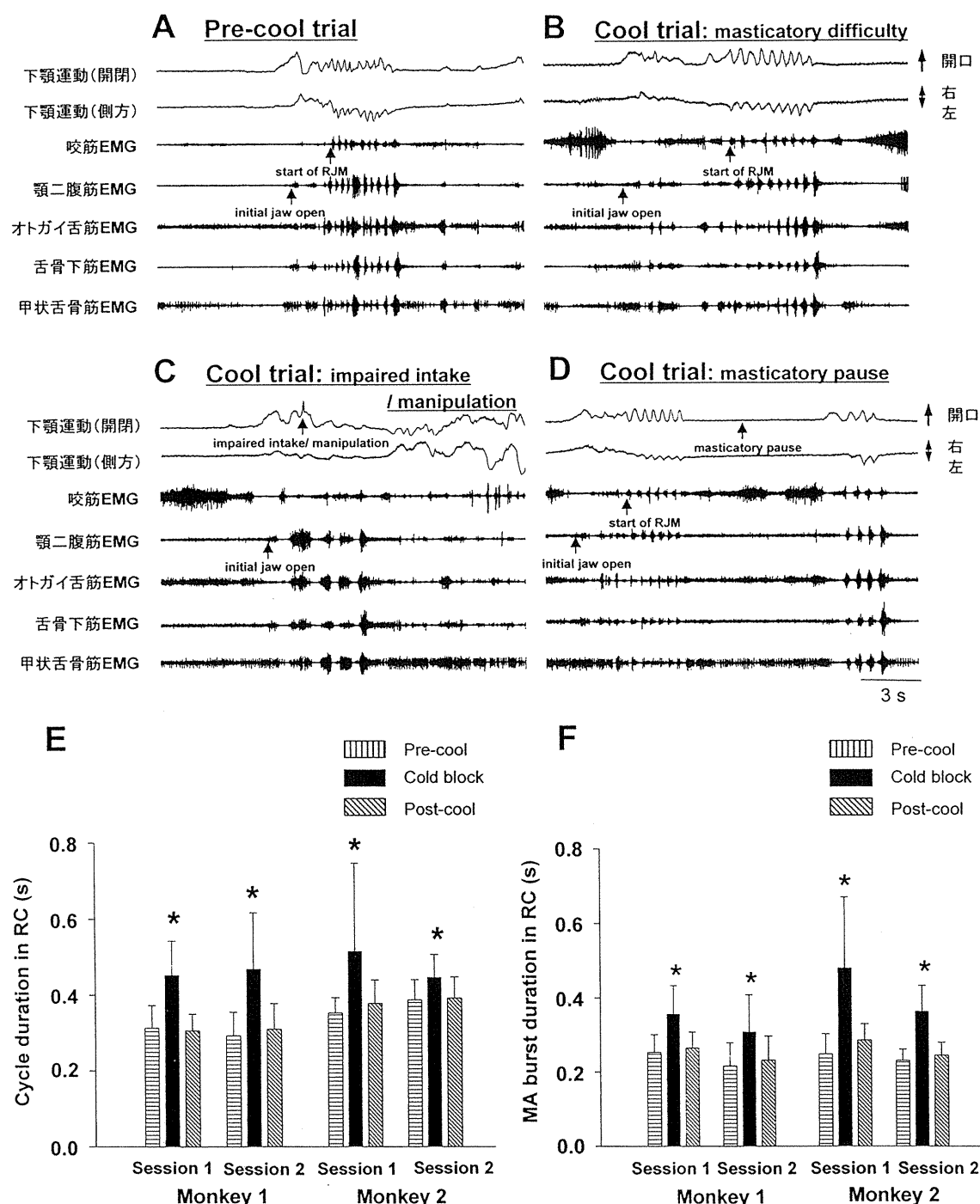


図3 サル咀嚼/嚥下野の可逆的冷却による咀嚼行動への影響

A～Dは記録例。Aに冷却前、B～Dに咀嚼/嚥下野の可逆的冷却によって生じた咀嚼行動の変調パターンを示す。Bは食塊の取り込みおよび食塊の口腔内移送に障害(masticatory difficulty)が認められ、冷却前のパターンに比べて、リズムカルな咀嚼運動(RJM)の開始までの時間が延長した例。Cは食塊の取り込みおよび食塊の口腔内移送にさらに強い障害(impaired intake and manipulation)が認められ、結果としてリズムカルな咀嚼運動を開始できなかった例。Dはリズムカルな咀嚼運動は開始するものの、咀嚼は中断し(masticatory pause)、嚥下の移行に障害を認めた例。

E, Fは2頭のサルで行った、両側咀嚼/嚥下野の可逆的冷却実験(各動物2回)に関する定量解析の結果を示す。リズムカルな咀嚼運動が行われている咀嚼期(rhythmic chewing phase: RC)の咀嚼周期(cycle duration)ならびに咬筋筋放電持続時間(MA burst duration)はいずれも可逆的冷却により冷却前と比べ有意に延長し、冷却を止めると元のレベルまで回復した。Pre-cool:冷却前, Cold block:冷却中, Post-cool:冷却後(Naritaら(2002)より改変)。

の延長、各咀嚼関連筋活動の時間的關係の変調も観察された (図 3)。

皮質咀嚼野の摘除に伴い、食物の取り込みから臼磨・粉碎、食塊の移送と嚥下といった一連の運動の移行、すなわち咀嚼運動の円滑な遂行が障害されることは、Enomoto ら (1987) が行ったウサギを用いた実験でも示されている。これらの結果は、咀嚼/嚥下野は咀嚼運動制御に関し、運動の発現や食物の取り込みから嚥下までの円滑な移行に加え、一咀嚼周期における個々の筋活動制御にも重要な役割を果たしていることを示唆している。この皮質領域の破壊効果と咀嚼時のニューロン活動様式を考え合わせると、咀嚼中に持続的に活動するタイプのニューロンが前者の役割を、下顎運動に同期してリズムカルに活動するタイプのニューロンが後者の役割を担っているのかもしれない。

また Narita ら (1999) は、皮質咀嚼/嚥下野の活動が嚥下に果たす役割を調べるために、サルの皮質咀嚼/嚥下野の可逆的冷却が嚥下運動に及ぼす効果を調べ、この部位の冷却により、咀嚼あるいは飲水行動に伴う嚥下の発現頻度が減少し、動物がジュースを口からこぼすといった障害が起こることを観察した。さらに、嚥下時に活動する筋の活動時間や、個々の筋活動の時間的關係が皮質冷却により変調されることを明らかにした。これらは、ヒトの中心前回と下前頭回の脳卒中患者において、食物の口腔内への移送ならびに咽頭期嚥下の失調が頻繁に観察される事実と関連があると思われる (Meadows, 1973; Robbins ら, 1988)。

以上のことから、皮質咀嚼/嚥下野は咀嚼の開始、リズムカルな咀嚼運動の形成と維持、さらには咀嚼から嚥下の移行と嚥下関連筋活動の調節に重要と考えられる。

3. 咀嚼と嚥下にかかわる一次顔面運動野の機能特性

脳皮質一次運動野は、霊長類では中心溝前方に位置し、組織学的には Brodmann の 4 野に分類される。この部位は、脳皮質から発せられる随意運動指令の最終的な出力部位と考えられており、この部位の電気刺激により、身体の限局した部位に一過性の筋収縮 (単縮) が誘発される。刺

激部位と単縮が誘発される身体部位との間には、いわゆる体部位局在といわれる関係があることは Penfield と Rasmussen (1950) が示した脳機能地図 (有名な運動性のコピト) でよく知られている。一次顔面運動野は一次運動野の外側部に相当し、この部位の刺激により顔面・口腔領域に単縮が誘発される。覚醒サルの一次運動野に系統的に微小刺激を行った Huang ら (1989 a) の研究によると、単縮が多く誘発されたのは口唇など顔面の筋や舌筋で、顎筋に単縮が誘発される割合は少なかった。サルの場合、舌や顎筋に単縮を誘発する領域が顔面運動野の外側部を占め、皮質咀嚼野 (主皮質咀嚼野) との境界を形成する。Huang ら (1989 a) は、これら顔面運動野外側部の刺激により、筋の単縮のみならず、リズムカルな下顎運動が誘発されることも明らかにした。

Yao ら (2002) は一次顔面運動野、特に舌支配領域から単一ニューロン活動記録を行い、咀嚼運動に関連して活動するニューロンの多くが、下顎運動リズムに同期して発火するとともに、食物の取り込みや移送が行われる期間にも発火することや、これらニューロンの多くが随意的な舌運動に関連して活動することを明らかにした。また、彼らの実験に先立ち、Martin ら (1997) は咀嚼に関連した活動性を示す顔面運動野ニューロンの多くが嚥下の開始前や嚥下に同期した発火パターンを示すことを報告している。

一次顔面運動野が咀嚼、嚥下運動に果たす役割を調べるために、サルの一次顔面運動野の可逆的冷却が咀嚼・嚥下運動に及ぼす効果を調べた Yamamura ら (2002) は、顔面運動野の冷却は一連の咀嚼運動のなかでも、特に動物が食物を口腔内に取り込んで口腔内に移送する際の下顎と舌の運動協調を障害することを報告した (図 4)。この結果は、前述の咀嚼に関連した活動を示す顔面運動野ニューロンの多くが食物の取り込みと移送時に活動するという報告 (Yao ら, 2002) と一致する。一方、顔面運動野の冷却により、口腔内の食塊を咽頭部に移送する期間が延長したものの、嚥下の発現や嚥下関連筋の活動は変調を受けなかった。以上のことから、一次顔面運動野ニューロンは咀嚼運動のなかでも、比較的随意性を有すると考えられる食物取り込みと移送時の下顎と

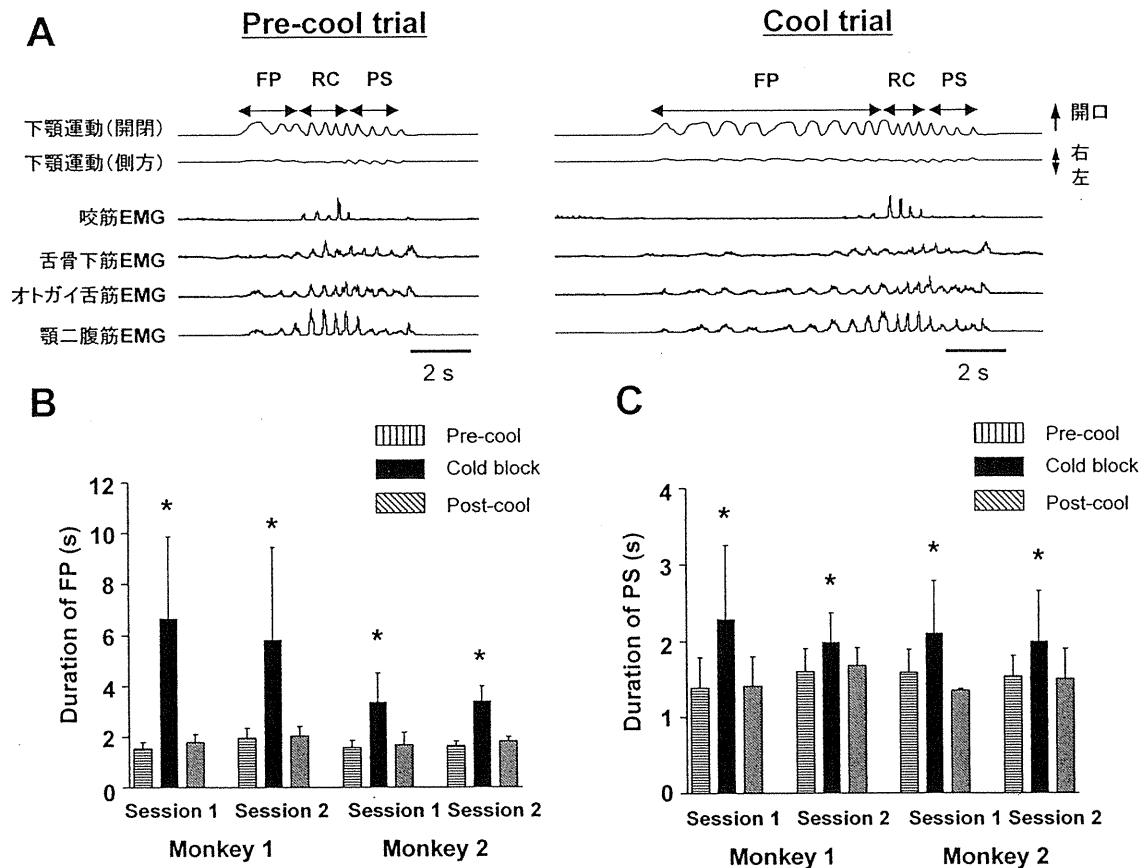


図4 サル一次顔面運動野の可逆的冷却による咀嚼行動への影響

Aは記録例。一次顔面運動野の冷却により、食物の取り込みと臼歯部への移送が行われる期間（咀嚼準備期：FP）が著明に延長した。いったん臼歯部での咀嚼が始まると、その後嚥下にいたるまで比較的スムーズに咀嚼運動が遂行された。B、Cは2頭のサルで行った、両側顔面運動野の冷却実験（各動物2回）に関する定量解析の結果を示す。咀嚼準備期（food preparatory phase：FP）の時間（B）、食塊を嚥下のために口腔後方に移送している嚥下前期（preswallow phase：PS）の時間（C）ともに顔面運動野の冷却によって有意に延長した。一方、臼歯部でのリズムカルな咀嚼が行われている咀嚼期（rhythmic chewing phase：RC）の時間は有意な影響を受けなかった。Pre-cool：冷却前，Cold block：冷却中，Post-cool：冷却後（Yamamuraら（2002）より改変）。

舌の運動協調に関与するものと考えられ、嚥下の発現や嚥下筋活動の調節には直接かわらないことが示された。

Yamamuraら（2002）の知見で注目すべきは、一次顔面運動野の冷却は、咀嚼/嚥下野の冷却時と異なり、咀嚼運動の開始そのものは障害しないということである。一般に、大脳皮質からの随意運動指令の出力部位は、一次運動野であるとされているが、半自動性運動である咀嚼運動に関する皮質からの開始指令は一次運動野ではなく、咀嚼/嚥下野から発せられるのは興味深い。

4. 咀嚼と嚥下にかかわる一次体性感覚野顔面領域の機能特性

大脳皮質一次体性感覚野は霊長類では中心溝の後方に位置し、組織学的にはBrodmannの1、

2、3野に分類される。この部位は末梢から上位脳へと伝えられてきた感覚情報の大脳皮質への入り口である。この部位も、運動野と同様に体部位局在をもち、顔面領域は一次体性感覚野の外側部に位置する。一次体性感覚野顔面領域を微小刺激しても、顔面・口腔領域の単縮は誘発されないが、主咀嚼野との境界に近い部位への微小刺激は咀嚼様のリズムカルな下顎運動を誘発する。

Linら（1998）は、一次体性感覚野顔面領域の可逆的冷却が咀嚼運動へ及ぼす影響を調べ、この領域の冷却によって咀嚼から嚥下への移行にかかる時間が延長されることを報告した。また、感覚野の冷却による咀嚼筋活動、舌と下顎の協調性に対する影響は、咀嚼/嚥下野ならびに顔面運動野の冷却によるものと比較して、軽度なものであ

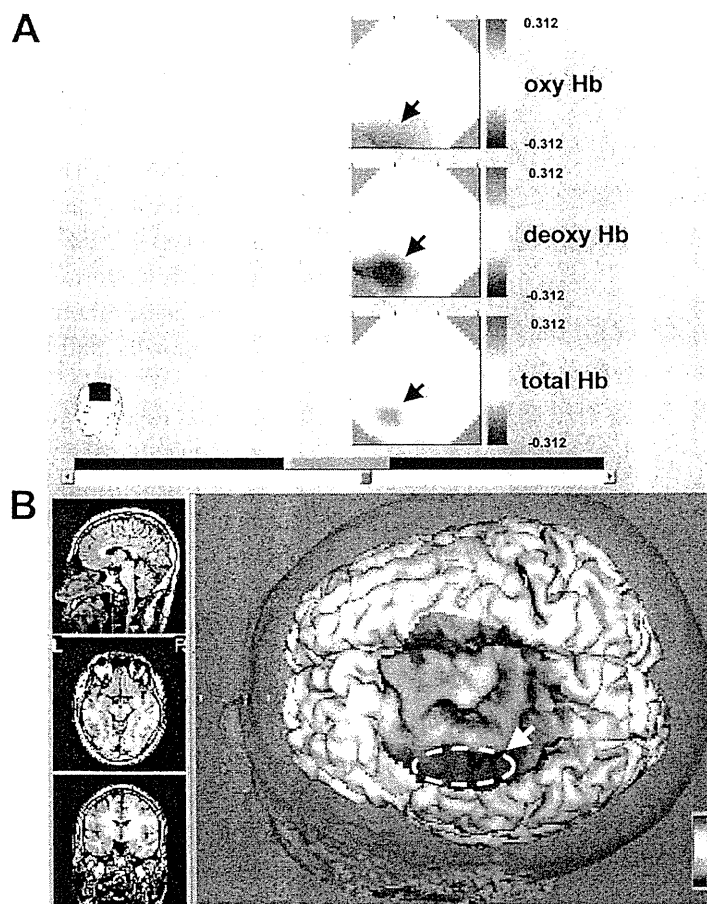


図 5 光トポグラフィーによるヒト咀嚼運動にかかわる脳活動計測

一次感覚運動野の領域に相当する頭頂から側頭に及ぶ片側頭蓋部にプローブ（照射一検出間 30 mm, 24 CH）を装着して、咀嚼にかかわる脳活動の計測を光トポグラフィー装置（ETG-100）を用いて行った。被験者は安静 40 秒をはさんで 10 秒間のガム咀嚼を 5 回繰り返した。A に右側ガム咀嚼時における左半球大脳皮質活動の結果を示す。上段に酸化ヘモグロビン（oxy Hb；矢印）、中段に還元ヘモグロビン（deoxy Hb；矢印）、下段に全ヘモグロビン（total Hb；矢印）のトポグラムを示している。さらに、三次元トポグラフィー画像表示システムにより計測データ（oxy Hb のトポグラム）を被験者の脳磁気共鳴描画上に転写して大脳皮質での活動領域を推定したところ、咀嚼時の皮質活動は中心溝に沿った一次顔面運動野、一次体性感覚野顔面領域ならびに咀嚼野（矢印で示した破線部）に示された（B）。

た。

以上、咀嚼、嚥下運動にかかわる、咀嚼/嚥下野、一次顔面運動野および一次体性感覚野顔面領域の機能特性について、主に覚醒サルにおける微小刺激、単一ニューロン記録、そして冷却による可逆的破壊実験の結果を中心に述べてきたが、これらの結果からも、それぞれの咀嚼ならびに嚥下にかかわる役割の特異性が伺われる。

5. ヒトにおける咀嚼と嚥下の皮質活動について

近年、非侵襲的にヒトの脳活動が計測可能となり、咀嚼あるいは嚥下時の脳活動様式について報告がなされている。

咀嚼運動については Momose ら（1997）ならびに Onozuka ら（2002）が報告している。

Momose（1997）は H_2O^{15} を用いた PET（positron-emission tomography）解析により一次感覚運動野、補足運動野そして島皮質および小脳、線条体の活動性を報告している。一方、Onozuka ら（2002）は f-MRI（functional magnetic resonance imaging）による解析を行い、同様の領域に活動性を確認している。

また、Hamdy ら（1998）ならびに Martin ら（2001）は、PET あるいは f-MRI による嚥下時脳活動の解析を行い、上側頭回、中・下前頭回、前頭弁蓋部、尾側前帯状回に活動性を確認している。

さらに、Narita ら（2000）は一次感覚運動野の活動性を NIRS（Near infrared spectro-

copy) により計測し, 咀嚼と嚥下に関する包括的顎機能評価を検討している (図5).

これらヒトの咀嚼あるいは嚥下に伴い活動する脳領域は, これまでサルで詳細に検討された領域とよく一致しており, 一次感覚運動野ならびに前頭弁蓋部領域の病巣 (anterior operculum syndrome, Mao ら, 1989) による咀嚼ならびに嚥下, さらに顎口腔・咽頭の随意性運動の失調を考え合わせると, 円滑な摂食行動を遂行するうえで, 一次感覚運動野ならびに皮質咀嚼/嚥下野の活動性を包括的に維持することの重要性が伺われる.

おわりに

咀嚼運動は, 「食物を移送する」「噛む」という運動が, 連続的かつ同時進行的に起こる複雑な運動で, そのどちらかが欠けても円滑な咀嚼運動は成し遂げられない. 中枢神経系をも包含する, 包括的な顎口腔機能治療を行ううえで, 「食物を移送する」機能の重要性にもいま一度注目する必要があるのではないだろうか.

顎口腔機能障害と中枢性疾患との関連ならびに中枢性疾患を対象とした顎口腔機能治療の可能性を見出すには, いまだ多くの時間を費やす必要がある. しかし, 非侵襲的に高次脳活動の計測が容易になった現在, 咬合の変化が脳活動に及ぼす影響などについても, 実際にヒトを用いた研究で行われ始めている. 得られた知見が, 実際に臨床の場において診断あるいは治療の評価に応用できるよう, 今後も研究を積み重ねていけば, 例えば, 日常的に行われている義歯の治療が適切であったときとそうでなかったときとの違いを高次脳活動に見だし, それが診断に応用できる日も遠くないと信じている.

このような個人的な思いがいつか実質的な検討へと繋がることを願い, 本稿を終えることとする.

謝 辞

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文部科学省科学研究費補助金 (奨励研究B: 14771019) において行われた.

文 献

- Dubner R, Sessle BJ, Storey AT (1978) The Neural Basis of Oral and Facial Function. Plenum Press, New York
- Enomoto S, Schwartz G, Lund JP (1987) The effects of cortical ablation on mastication in the rabbit. *Neurosci Lett* 82: 162-166
- Hamdy S, Aziz Q, Rothwell JC, Hobson A, Thompson DG (1998) Sensorimotor modulation of human cortical swallowing pathways. *J Physiol (Lond)* 506: 857-866
- Huang CS, Hiraba H, Murray GM, Sessle BJ (1989a) Topographical distribution and functional properties of cortically induced rhythmical jaw movements in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Neurophysiol* 61: 635-650
- Huang CS, Hiraba H, Sessle BJ (1989b) Input-output relationships of the primary face motor cortex in the monkey (*Macaca fascicularis*). *J Neurophysiol* 61: 350-362
- Jean A (2001) Brain stem control of swallowing: neuronal network and cellular mechanisms. *Physiol Rev* 81: 929-969
- Kubota K, Niki H (1971) Precentral cortical unit activity and jaw movement in chronic monkeys. In: *Oral-Facial Sensory and Motor Mechanisms* (Dubner R, Kawamura Y eds), p 365-379, Appleton-Century-Crofts, New York
- Larson CR, Byrd KE, Garthwaite CR, Luschei ES (1980) Alterations in the pattern of mastication after ablation of the lateral precentral cortex in rhesus macaques. *Exp Neurol* 70: 638-651
- Lin LD, Murray GM, Sessle BJ (1998) Effects on non-human primate mastication of reversible inactivation by cooling of the face primary somatosensory cortex. *Arch Oral Biol* 43: 133-141
- Lund JP, Lamarre Y (1974) Activity of neurons in the lower precentral cortex during voluntary and rhythmical jaw movements in the monkey. *Exp Brain Res* 19: 282-299
- Lund JP, Enomoto S (1988) The generation of mastication by mammalian central nervous system. In: *Neural Control of Rhythmic Movements in Vertebrates* (Choen AH, Rossignol S, Grillner, S eds), p 87-113, Wiley, New York
- Lund JP (1991) Mastication and its control by the brain stem. *Crit Rev Oral Biol Med* 2: 33-64
- Lund JP, Scott G, Kolta A, Westberg K-G (1999) Role of cortical inputs and brainstem interneuron populations in patterning mastication. In: *Neurobiology of Mastication: From Molecular to Systems Approach* (Nakamura Y, Sessle BJ eds), p 504-514, Elsevier, Tokyo

- Luschei ES, Goldberg LJ (1981) Neural mechanisms of mandibular control: mastication and voluntary biting. In: Handbook of Physiology, The Nervous System, Motor Control, Vol. II (Brooks VB ed), p 1237-1274, American Physiological Society, Bethesda
- Mao CC, Coull BM, Golper LAC, Rau MT (1989) Anterior operculum syndrome. *Neurology* 39: 1169-1172
- Martin RE, Murray GM, Kempainen P, Masuda Y, Sessle BJ (1997) Functional properties of neurons in the primate tongue primary motor cortex during swallowing. *J Neurophysiol* 78: 1516-1530
- Martin RE, Kempainen P, Masuda Y, Yao DY, Murray GM, Sessle BJ (1999) Features of cortically evoked swallowing in the awake primate (*Macaca fascicularis*). *J Neurophysiol* 82: 1529-1541
- Martin RE, Goodyear BG, Gati JS, Menon RS (2001) Cerebral cortical representation of automatic and volitional swallowing in humans. *J Neurophysiol* 85: 938-50
- Meadows JC (1973) Dysphagia in unilateral cerebral lesions *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 36: 853-860
- Miller AJ (1986) Neurophysiological basis of swallowing. *Dysphasia* 1: 91-100
- Momose T, Nishikawa J, Watanabe T, Sasaki Y, Senda M (1997) Effects of mastication on regional cerebral blood flow in humans examined by positron-emission tomography with ^{15}O -labelled water and magnetic resonance imaging. *Arch Oral Biol* 42: 57-61
- Nakamura Y, Katakura N (1995) Generation of masticatory rhythm in the brainstem. *Neurosci Res* 23: 1-19
- Narita N, Yamamura K, Yao D, Martin RE, Sessle BJ (1999) Effects of functional disruption of lateral pericentral cerebral cortex on primate swallowing. *Brain Res* 824: 140-145
- Narita N, Fujiwara N, Iijima M, Matsumoto T, Kawasaki S (2000) Spatial and temporal analysis of human orofacial motor function using multi-channel near-infrared spectroscopy. *Neurosci Abstr* 26: 2204
- Narita N, Yamamura K, Yao D, Martin RE, Masuda Y, Sessle BJ (2002) Effects on mastication of reversible bilateral inactivation of the lateral pericentral cerebral cortex in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Arch Oral Biol* 47: 673-688
- Onozuka M, Fujita M, Watanabe K, Hirano Y (2002) Mapping brain region activity during chewing: A functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res* 81: 743-746
- Penfield W, Rasmussen T (1950) The cerebral cortex of man. MacMillan, New York
- Robbins JA, Levine RL (1988) Swallowing after unilateral stroke of the cerebral cortex: preliminary experience. *Dysphagia* 3: 11-17
- Sessle BJ, Henry JL (1989) Neural mechanisms of swallowing: neurophysiological and neurochemical studies on brainstem neurons in the solitary tract region. *Dysphagia* 4: 61-75
- Sessle BJ, Yao D, Yamamura K (1999) Face primary motor cortex and somatosensory cortex: input and output properties and functional interrelationships in the awake monkey. In: *Neurobiology of Mastication: From Molecular to Systems Approach* (Nakamura Y, Sessle BJ eds), p 482-493, Elsevier, Tokyo
- Yamamura K, Narita N, Yao D, Martin RE, Masuda Y, Sessle BJ (2002) Effects of reversible bilateral inactivation of face primary motor cortex on mastication and swallowing. *Brain Res* 944: 40-55
- Yao D, Yamamura K, Narita N, Martin RE, Murray GM, Sessle BJ (2002) Neuronal activity in face primary motor cortex of awake monkeys in relation to semiautomatic and trained orofacial movements. *J Neurophysiol* 87: 2531-2541

Recent Insights in the Mechanisms of Cerebral Cortex Controlling Mastication and Swallowing

Noriyuki NARITA¹⁾ and Kensuke YAMAMURA²⁾

1) *Department of Removable Partial Prosthodontics,*

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

2) *Division of Oral Physiology,*

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

Abstract: The recent literature on the neural basis of semi-automatic movements such as mastication and swallowing has emphasized the crucial role of brainstem pattern generators in their genesis and regulation. While much less emphasis has been given to the role of higher brain centers, it has been shown that rhythmic jaw movements and swallowing can be evoked in primates by intracortical microstimulation (ICMS) as well as by electrical surface stimulation or transcranial magnetic stimulation of the lateral part of the pericentral cortex of both hemispheres, including the primary face motor cortex (face MI), the primary face somatosensory cortex (face SI), the principal part of the cortical masticatory area (CMA)/swallow cortex, and the deep part of CMA/swallow cortex. Furthermore, recordings of single neuronal activities and ICMS-evoked movements and EMG activities indicate that each of these cortical regions appears to have distinct sensory input and motor output patterns related to rhythmical jaw movements and swallowing, and many neurons in these areas show ingestion-related firing patterns, including activity associated with mastication and swallowing. Recent studies on the behavioral alterations using cold block technique on CMA/swallow cortex, face MI, and face SI indicated the peculiar effects on mastication and swallowing. Bilateral cold block of CMA/swallow cortex was associated with masticatory deficits, reflected as impaired food intake or manipulation and difficulty in carrying out a sequence of masticatory cycles, and alterations of the food-preparatory phase and masticatory and swallowing-related EMG patterns of jaw, tongue, and swallow muscles. Cold block of face MI markedly affected the ability of the monkey to carry out mastication and swallowing. The masticatory deficit was characterized by a significant elongation of the total masticatory time, including in particular elongation of the food preparatory phase. The coordination of the jaw- and tongue-muscle activities was severely disrupted during the food preparatory phase. Although cold block of face MI elongated the duration of the preswallow phase, but it had no significant effect on swallow duration or the EMG parameters during swallowing. Cold block of face SI affected to the total masticatory time, which was due principally to an increase in the preswallow phase time. Taking into consideration the above further evidences of effects by cold block of the CMA/swallow cortex, face MI and face SI, these three cortical regions may be differentially involved in the initiation and control of mastication and swallowing.

Key words: Mastication, Swallowing, Primary face somatosensory cortex, Primary face motor cortex, Cortical masticatory area (CMA)/swallow cortex

MR imaging of maxillomandibular lesions

Takashi KANEDA, DDS, PhD

Department of Radiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan.

Key Words : MR imaging, Diagnostic imaging, Maxillomandibular lesions

This paper addresses maxillomandibular lesions including cyst, tumor and osteomyelitis in terms of their general features and discusses the use of MR imaging techniques, interpretation of images and their characteristic findings. MR imaging of odontogenic keratocyst improved the visualization of a cystic pattern, regularly thin walls, weak enhancement of cyst walls and inhomogeneous intensity of fluid contents. However, some of them could be misdiagnosed as mixed or solid patterns by non-contrast study alone. Ameloblastoma showed mixed solid and cystic components, irregularly thick walls, papillary projections, and marked enhancement of the walls. In mandibular osteomyelitis, MR imaging could give us more detailed information regarding residual activity of infection and the extent of involvement. MR findings were suggestive to differentiate between tumors and cysts and characterize many cystic entities in the maxillomandibular region.

Oral Radiol. 2003 ; 19 : 64-69

Introduction

Diagnostic imaging of maxillomandibular lesions has been performed by conventional radiography including dental and occlusal films, pantomography, conventional tomography, and occasionally X-ray computed tomography(CT)¹⁻³. Diagnostic accuracy with these modalities mainly depends on change of density such as radiolucent, radiopaque, or mixed appearance, predilection in location, relationship with teeth (including root resorption), and other radiological signs. Maxillomandibular lesions most frequently show a uni- or multilocular radiolucent pattern⁴⁻⁶. However, for example, this pattern

with discrete margins is not pathognomonic for specific lesions and may indicate many different diseases of odontogenic and nonodontogenic entities. Especially, radiological differentiation between odontogenic keratocyst and ameloblastoma is difficult although important¹. It is also critical for differential diagnosis to note the precise anatomic location of the lesion within the jaw, its relationship to the dentition in general, and any specific relationship to a tooth or portion of a tooth. However, these findings do not represent specific lesions, either.

Magnetic resonance (MR) imaging is a new modality with excellent soft tissue contrast reso-

lution, and its increasing application has had a dramatic impact on the diagnosis of dento-maxillofacial lesion⁷⁻⁹.

The purposes of this article were to evaluate the usefulness of MR imaging of the maxillo-mandibular lesions and the findings of MR imaging were compared with other radiological modalities.

MR Imaging techniques and image interpretation

Maxillomandibular lesions are frequently small, and an effective surface coil should be used. It is desirable that slice thickness and interval be as thin as possible, preferably about 3 to 6 mm in thickness. High Tesla machines can provide high-quality images of good spatial resolution but are sometimes susceptible to metallic artifacts and image distortion caused by dental filling materials. Ferromagnetic dental filling materials produce major image degradation on MR imaging of the jawbone. Dental bur fragments remaining in the gingiva from previous dental treatment can also produce metallic artifacts¹⁰. Because the extent of metallic artifacts in the oral cavity during MR examinations is unpredictable, it is necessary to consider the direction of slice selection and to avoid the gradient echo technique, which is associated with increased metallic artifacts. Metallic artifacts are observed most severely along the direction of the static magnetic field, and this point should be considered to avoid the overlapping of metallic artifacts with the lesion when scan direction is chosen.

Benign odontogenic tumors are difficult to differentiate from odontogenic cysts in clinical practice. However, differentiation between cysts and tumors can be achieved by contrast-enhanced MRI⁶. The relationship between these lesions and the teeth can be evaluated by plain radiography when the lesions are small.

When they are large, many of the benign odontogenic tumors become difficult to differentiate from non-odontogenic tumors of both the benign and malignant types.

Normal imaging anatomy of the mandible

The mandible, the only cranial bone that is freely mobile, develops as a paired set of membrane bones lateral to the Meckel cartilage. It is a tubular structure of dense cortical bone filled with trabecular bone and bone marrow.

At the time of birth, the newborn has only red bone marrow in the mandible, resulting in overall low signal intensity on MR imaging. With increasing age, red marrow conversion to yellow marrow begins first in the anterior region and proceeds to the premolar/molar region, angle, ramus, and condyle, in that order. No red marrow is recognized in the body of the normal mandible of individuals over 30 years of age¹¹.

Cyst

A cyst is pathologically characterized as an epithelial lined cavity that usually contains fluid or semisolid material. On the basis of development, cysts have been subdivided into odontogenic and non-odontogenic types. Odontogenic cysts arise from tooth derivatives. Histologic analysis of the epithelial layers, the presence of cyst calcification, and the clinical findings allow further subdivision³.

The WHO classifies the primordial cyst as a synonym for odontogenic keratocyst¹². Odontogenic keratocysts are thought to arise from proliferation of residue of the dental lamina and account for 3 – 11 % of all cysts of the jaw. Differentiating odontogenic keratocyst from other cystic lesions in the maxillomandibular region is important because of its high recurrence rate and malignant change in the epithelium⁴.

Odontogenic keratocyst

Typically, plain radiography and CT showed well-defined unilocular and multilocular cystic radiolucency with bony sclerotic margin and bulging of the bony cortex with no perforations.

MR imaging of odontogenic keratocysts show a cystic pattern, regularly thin wall, weak enhancement of cyst wall and heterogeneous intensity of fluid contents other types of cysts showed a cystic pattern, regularly thin wall, weak enhancement of cyst wall after gadolinium-injection⁹. Some cysts could be misdiagnosed as mixed or solid pattern by non-contrast study alone. T2 relaxation times of cystic components were significantly shorter in odontogenic keratocysts than in ameloblastoma, with no overlap⁹.

Tumor

Benign odontogenic tumors are characterized by imaging findings of expansile growth and well-defined margins with smooth borders, and their appearances are very similar to those of odontogenic and non-odontogenic cysts. MR imaging is effective in differentiating between tumors and cysts, evaluating the infiltration of malignant tumors in the jawbone and surrounding soft tissue. Combining plain radiography with advanced imaging techniques including CT and MR imaging can improve the accuracy of diagnosing odontogenic tumors⁶.

Ameloblastomas

Ameloblastoma is the most common and clinically most significant odontogenic tumor, constituting 1% of all tumors and cysts and approximately 11% of all tumors in the maxillo-mandibular region³. It occurs most often during the 3rd and 4th decades of life but may appear at any age and shows no sexual predilection. Ameloblastoma is classically described as a multilocular, expansile radiolucency that

occurs most frequently in the mandibular molar/ramus area³. The radiologic findings of expansile cortical plates with scalloped margins, soap bubble appearance, resorption of tooth roots, and predilection in location are key to correct diagnosis³. However, these findings are not pathognomonic for ameloblastoma and may indicate odontogenic keratocyst, odontogenic myxoma, ameloblastic fibroma, giant cell granuloma, or immature ossifying fibroma, making differential diagnosis difficult. However, MR findings in ameloblastoma were different from those in odontogenic keratocyst: mixed solid and cystic components, irregularly thick walls, papillary projections, and marked enhancement of the walls and septa⁷. Especially, demonstration of papillary projections and solid components on gadolinium-enhanced T1-weighted images were helpful in differentiation from other kinds of cysts (Figure 1)⁷.

Osteomyelitis

Osteomyelitis is one of the common inflammatory diseases of the jaw bones⁸. Most cases of this disease in the jaws result from odontogenic infections. Radiologic findings show a variety of bone reactions including completely radiolucent areas, mixed radiolucent and radiopaque areas, and completely radiopaque areas⁴. However, its radiological diagnosis is still difficult, especially regarding early detection and prognosis⁸. The findings are often inadequate for determining inflammatory activity.

In mandibular osteomyelitis, the use of MR imaging is useful for detecting osteomyelitis, identifying the extent of inflammation, and investigating the spread of inflammation to soft tissue, while at the same time depicting postoperative recurrence. The augmentation of conventional T1- and T2-weighted SE imaging with fat suppressed imaging is also effective in diagnosing mandibular osteomyelitis.

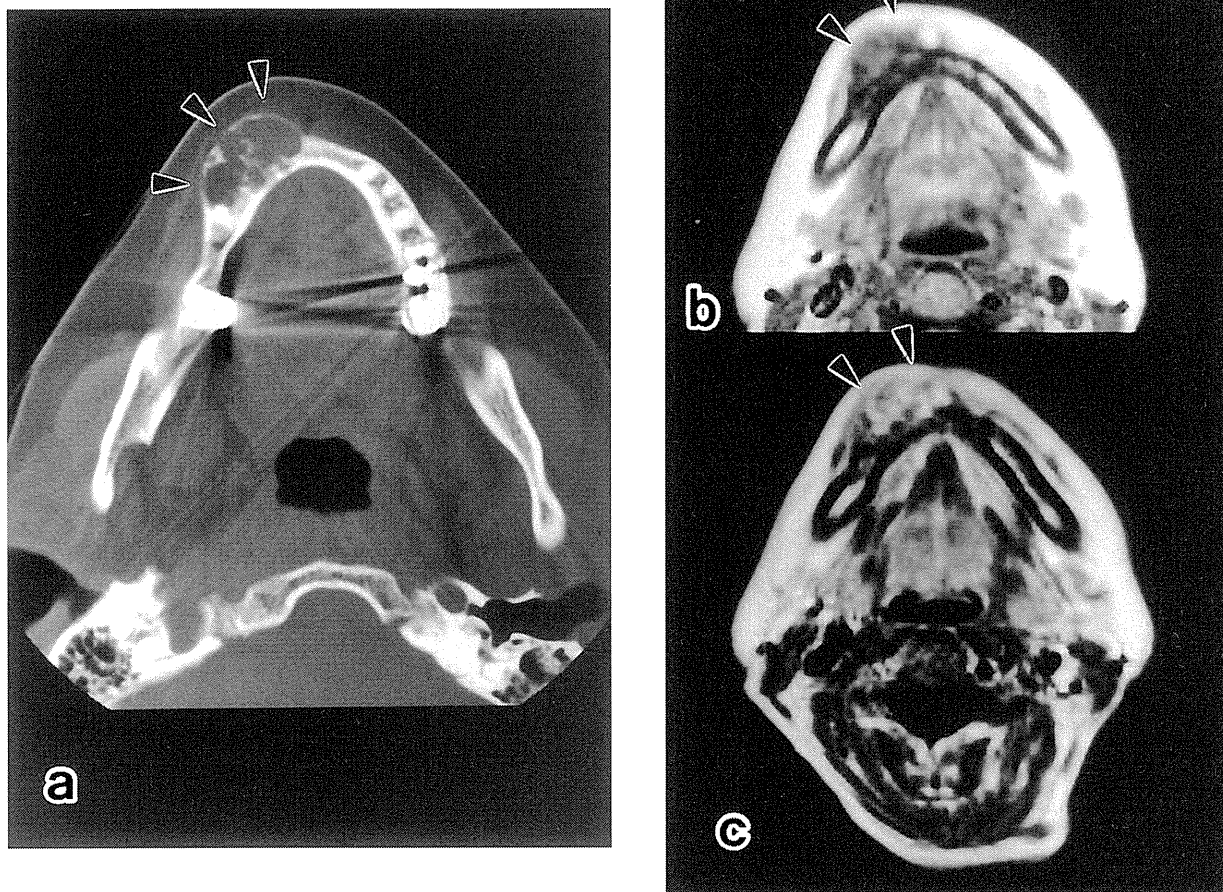


Figure 1 Multilocular ameloblastoma in 34-year-old man
 (a) Axial CT shows an expansile multilocular lesion with bulging of the bony cortex without perforation (arrowheads). (b) Axial T1-weighted MR image reveals a lesion of homogeneously low signal intensity in the mandible (arrowheads). (c) Postcontrast axial MR image shows a markedly enhanced solid lesion in the mandible (arrowheads). Solid ameloblastoma was mostly suspected preoperatively.

MR imaging of the mandibular osteomyelitis

MR findings of cortical bony lesions showed thickening of cortical signal void on both T1- and T2-weighted MR images. All the lesions in the bone marrow were shown as low or low and intermediate signal intensity areas on T1-weighted MR images, and high, mixed (high and low, high and intermediate) signal intensity areas on T2-weighted MR images. After intravenous injection, high T2-weighted signal intensity area showed enhancement on contrast T1-weighted MR images (Figure 2)⁸. Histopa-

thologically, these areas corresponded to the sites of active infection, which were not collections of pus but predominantly granulation tissue. Sequestra showed low signal intensity on both T1- and T2-weighted signal intensities. These lesions were surrounded by a high signal intensity rim on both T1 and T2-weighted MR images. These rims were identified as hemorrhage on histopathological examinations⁸.

Conclusion

Regarding cystic lesions in the maxillomandibular region, MR imaging was superior to



Figure 2 Suppurative osteomyelitis in the mandible in 43-year-old man

(a) Sagittal T1-weighted image shows low intensity areas from the molar to the ramus region (arrowheads).

(b) Postcontrast sagittal T1-weighted image shows mixed low and high intensities from the anterior to the ramus region. Residue of the infected bone marrow reveals enhancement (arrows).

(c) Sagittal T2-weighted image shows heterogeneous low-to-high signal intensities. Positive residual inflammatory bone marrow shows high intensity foci (arrows).

other radiological modalities because of its capability of the inner character of the lesions such as cystic patterns, solid components, cyst walls and intensity homogeneity of fluid content. In osteomyelitis, MR imaging could give us more detailed information regarding residual activity of infection and the extent of involvement than did conventional radiography, CT, and bone scintigraphy. MR imaging a useful technique for assessing maxillomandibular lesions.

References

1. Pindborg JJ, Hansen J. Study on odontogenic cyst epithelium: 2. clinical and roentogenologic aspects of odontogenic keratocysts. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963 ; 58 : 283-94.
2. Eversole LR, Rovin S. Differential radiographic diagnosis of lesions of the jaw bones. *Radiology* 1972 ; 105 : 277-84.
3. Weber AL, Kaneda T, Scrivani SJ, Aziz S. Cyst, Tumors, and Nontumorous Lesions of the Jaw. Section one: Pathologic states. In: Som PM, Curtin HD editors. *Head and Neck Imaging*. 4th ed. St. Louis: CV Mosby; 2003. P. 930-81.
4. Wood NK, Goaz PW. Differential diagnosis of oral lesions. 4th ed. St. Louis: Mosby-Year Book; 1991. P. 301-620.
5. Langlaris RP. Radiology of the jaws. In: Delbalso AM, editor. *Maxillofacial imaging*. Philadelphia: W.B. Saunders; 1990. P. 313-73.
6. Kaneda T, Minami M, Curtin HD, et al. Cyst, Tumors, and Nontumorous Lesions of the Jaw. Section two: Systematic approach to imaging diagnosis of jaw lesions. In: Som PM, Curtin HD editors. *Head and Neck Imaging* 4th ed. St. Louis: CV Mosby; 2003. P. 982-6.
7. Minami M, Kaneda T, Yamamoto H, et al. Ameloblastoma in the maxillomandibular region: MR imaging. *Radiology*. 1992 ; 184 : 389-393.
8. Kaneda T, Minami M, Ozawa K, et al. Magnetic resonance imaging of osteomyelitis in the mandible: Comparative study with other radiological modalities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995 ; 79 : 634-40.
9. Minami M, Kaneda T, Ozawa K, et al. Cystic lesions of the maxillomandibular region: MR imaging distinction of odontogenic keratocysts and ameloblastomas from other cysts. *AJR* 1996; 166 : 943-9.
10. Kaneda T, Minami M, Curtin HD, et al. Dental Bur Fragments Causing Metal Artifacts on MR Images. *AJNR Am J Neuroradiol* 1998; 19 : 317-9.
11. Kaneda T, Minami M, Ozawa K, et al. MR appearance of bone marrow in the mandible at different ages. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1996 ; 80 : 229-33.
12. Kramer IRH, Pindborg JJ, Shar M. Histological typing of odontogenic tumours: World Health Organization: International Histological Classification of Tumours. 2nd ed. Spring-Verlag, Berlin; 1992. p.1-42.

Reprint request to:

Takashi KANEDA

2-870-1, Sakaecho-Nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

E-mail: tkaneda@mascot.nihon-u.ac.jp

P-C-7 ICD-DA 対応歯科標準病名マスターとその課題

○齊藤孝親¹, 中山 均², 佐々木好幸³, 鈴木一郎⁴, 玉川裕夫⁵, 成澤英明⁶, 萩原芳幸⁷,
日高理智⁸, 森本徳明⁹, 山田卓也¹⁰, 西田 悟¹¹

¹ 日本大学松戸歯学部口腔診断学教室・口腔科学研究所, ² 元北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座 (歯科放射線分野), ³ 東京医科歯科大学歯学部附属病院歯科医療情報部, ⁴ 新潟大学歯学部附属病院口腔外科, ⁵ 大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部・医療情報室, ⁶ 昭和大学歯学部保存修復学教室, ⁷ 日本大学歯学部補綴学教室クラウンブリッジ学講座, ⁸ 九州歯科大学歯科保存学第二講座, ⁹ 矯正歯科 森本, ¹⁰ 日本歯科医師会レセプト電算処理検討委員会, ¹¹ 保健医療福祉情報システム工業会 (JAHIS) 医事コンピュータ部会歯科システム委員会

歯科医療情報標準化の基盤となる ICD-DA 対応歯科標準病名マスターの編纂を行っているので、その概要を報告する。

歯科標準病名マスター検討のため、日常頻用されている歯科臨床病名の ICD-DA によるコード化や既存歯科病名マスターの比較検討などを行ってきた。歯科臨床病名に対して ICD-DA によるコード化を試行したところ、約 30% の歯科臨床病名では複数候補が考えられたり、ICD-DA に明示のない状態表現などのため、記載された表記のままでのコード化は困難であった。また、歯科医院で使用されている歯科レセコンの病名マスターと病院歯科で使用されている病名マスターの比較では、歯科レセコンでの病名数は病院歯科での病名数の約 1/3 にとどまっていた。ICD 分類としての病名の分布は、いずれの病名マスターにおいても歯科領域の病名が含まれる 11 章：消化器系の疾患 (K)

が最も多く、次いで、19 章：損傷、中毒およびその他の外因の影響 (S,T), 2 章：新生物 (C, D) の順であった。しかし、19 章：損傷、中毒およびその他の外因の影響 (S, T) に分類される病名が占める割合は、病院歯科の 15% に対し歯科レセコンでは 46% と大きく異なっており、違いの多くは義歯破損など補綴物の状態表現に関するものであった。

歯科標準病名マスターにおいては、このように、臨床場面で ICD の利用がなかったことに起因する課題、義歯の破損、冠の脱落など状態表現が病名と同様に扱われていることに起因する課題などに加え、患者単位だけでなく、個々の歯を単位とし、しかも複数の病名が併記される場合が多いという歯科特有の課題の検討が重要となっている。

(一部、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業)

ICD-DA 対応歯科標準病名の概要

齊藤孝親¹⁾ 中山 均²⁾ 佐々木好幸³⁾ 鈴木一郎⁴⁾ 玉川裕夫⁵⁾ 成澤英明⁶⁾ 萩原芳幸⁷⁾ 日高理智⁸⁾
森本徳明⁹⁾ 山田卓也¹⁰⁾ 西田 悟¹¹⁾

日本大学松戸歯学部口腔診断学教室・口腔科学研究所¹⁾

日本医療情報学会課題研究会「歯科分野における保健医療福祉情報の標準化に関する研究会」²⁾

東京医科歯科大学歯学部附属病院 歯科医療情報部³⁾ 新潟大学歯学部附属病院口腔外科⁴⁾

大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部・医療情報室⁵⁾ 昭和大学歯学部保存修復学教室⁶⁾

日本大学歯学部補綴学教室クラウンブリッジ学講座⁷⁾ 九州歯科大学歯科保存学第二講座⁸⁾

矯正歯科 森本⁹⁾ 日本歯科医師会レセプト電算処理検討委員会¹⁰⁾

保健医療福祉情報システム工業会(JAHIS)医事コンピュータ部会¹¹⁾

Outline of ICD-DA Based Standard Diagnostic Terminology for Dentistry in Japan

TAKACHIKA SAITO¹⁾ HITOSHI NAKAYAMA²⁾ YOSHIYUKI SASAKI³⁾ ICHIRO SUZUKI⁴⁾
HIROO TAMAGAWA⁵⁾ HIDEAKI NARUSAWA⁶⁾ YOSHIYUKI HAGIWARA⁷⁾
MASATOSHI HITAKA⁸⁾ NORIAKI MORIMOTO⁹⁾ TAKUYA YAMADA¹⁰⁾ SATORU NISHIDA¹¹⁾

Research Institute of Oral Science, Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo¹⁾

Society for the study of dental health information system in Japan Association for Medical Informatics²⁾

Section of Dental Informatics, Tokyo Medical and Dental University Dental Hospital³⁾

Division of Oral Surgery, Niigata University Dental Hospital⁴⁾

Division of Medical Information, Osaka University Dental Hospital⁵⁾

Department of Operative Dentistry, Showa University School of Dentistry⁶⁾

Department of Crown and Bridge Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry⁷⁾

Department of Periodontology and Endodontology, Kyushu Dental College⁸⁾

Morimoto Orthodontic Office⁹⁾ Japan Dental Association¹⁰⁾

Japanese Association of Healthcare Information System Industry¹¹⁾

Abstract: Consolidation of various master lists that provide the basis for standardized medical information in the field of dentistry. Standard dental disease names corresponding to the ICD-DA were compiled based on the standard disease name master (MEDIS-DC), to which approximately 600 dental disease names were added.

In dental clinical practice, terms that express breakage and poor fitting prosthetic appliances, such as artificial dentures and crowns, are frequently treated the same as disease names in medical records and receipts, however, they are not entered as disease names in the ICD10/ICD-DA.

Therefore, terms that express breakage and poor fitting prosthetic appliances were registered as disease names to give priority to daily clinical practice. For example, "3/4 crown breakage, hard resin facing cast crown breakage" is listed as an entry under the heading of "crown breakage". A general outline of ICD-DA standard dental disease names is presented in the present report, focusing on conditions encountered in dental clinical practice.

Keywords: ICD-DA, Dentistry, Terminology, Standardization, MEDIS-DC

1. はじめに

保健医療情報のグランドデザインに示されたアクションプランに則り用語・コードの標準化が進められている。医科領域では、標準マスターの一つとして財団法人医療情報システム開発センターからICD10対応電子カルテ用標準病名マスター(以下、MEDIS標準病名マスター)が提供され、レセプト電算処理システム傷病名マスターとも連携した改訂を経て、その実装が進んでおり、歯科領域においても歯科医療情報標準化の基盤となる各種マスター

の整備が進められつつある。

我々は病名について、MEDIS標準病名マスターに準じ、国際疾病分類ICD10のファミリーとして口腔及び歯科的な疾患のために設けられている「国際疾病分類 歯科学及び口腔科学への適応(ICD-DA)」¹⁾に対応した歯科標準病名の編纂を行った。

2. 資料

歯科標準病名編纂のための資料として、ICD-10、ICD-DA、MEDIS標準病名マスター、大学付属歯

科病院の病名マスター, JAHIS医事コンピュータ部会・歯科システム委員会編集の歯科レセコン用病名マスター, 文部省学術用語集歯学編および歯学学術用語補遺集、日本補綴歯科学会・歯科補綴学専門用語集などを用いた。

3. 概要

歯科標準病名の編纂^{2,3)}にあたって、まず歯科で用いられている各病名マスターに収載されている病名およびICD-DAで明記されている病名、さらに義歯破折など補綴・修復物の状態表現などから、常用と思われる2549病名を選出した。

これらの病名がMEDIS標準病名マスターにどの程度収載されているかについて検討を行ったところ、MEDIS標準病名マスターにはすでに1924病名が収載されていた。しかし、歯科で重要な補綴・修復物関係の病名は30病名が収載されるにとどまっているなど現在のMEDIS標準病名マスターには、歯科臨床に必要な病名の不足等がみられた。

疾病分類であるICD10/ICD-DAには明記されていないが、補綴物等の状態表現は歯科の特徴の一つであり、歯科臨床では義歯や冠など補綴物の破損、不適合などの状態表現が病名と同等に扱われ、カルテ、レセプトともに頻用されている。そのため、その収載は歯科病名マスターで最も重要な要件といえる⁴⁾。また、歯科臨床ではカルテ、レセプトで略号が多用されるという特徴もあり、その収載も重要である。

それら歯科臨床の特徴を踏まえ、補綴・修復物の状態表現も含めた約600の歯科病名を新たにMEDIS標準病名マスターに追加することとした。追加した病名の約40%はT分類に該当する補綴修復物関係、矯正装置関係、インプラント関係のものである。また、約24%はK分類に該当する消化器

系疾患で歯科、口腔領域疾患の病名である。

例えば、補綴・修復物の破損、不適合などの状態表現の収載にあたっては、リードターム「冠破損」に対し「3/4冠破損、4/5冠破損、全部鑄造冠破損、硬質レジン前装冠破損」などを索引語とし、また、カルテ、レセプト記載で略号表記が認められている病名の収載にあたっては、リードターム「急性化膿性歯髄炎」に対し「急化pul」を索引語とするなど、日常の歯科臨床と齟齬が生じないように配慮した。

これら実装にあたって重要な部分を中心に、ICD-DA対応歯科標準病名の概要を報告する。

謝辞:ご協力頂いた日本歯科医師会、日本歯科医学会および日本歯科医学会歯科学術用語委員会、財団法人口腔保険協会、保健医療福祉情報システム工業会医事コンピュータ部会歯科システム委員会に感謝申し上げます。一部、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業に拠った。

参考文献

- [1] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 国際疾病分類 歯科学および口腔科学への適用 第3版 ICD-DA, 財団法人厚生統計協会, 2001.
- [2] 玉川裕夫, 常光 旭: 歯科医療情報の標準化について (ICDに準拠した病名コードの提案): 歯科医療情報システム研究会論文集1988, 2: 61-4, 1988.
- [3] 中山 均, 伊藤 豊, 中村太保, 武埴 晃, 内藤智浩, 櫻井恒太郎, 歯牙口腔関連標準病名集作成のための技術的検討—MEDIS対応歯科病名テーブルの試作—, 医療情報学, 21 (6), 425-434, 2001.
- [4] 歯科医療情報の標準化作業—ICD-DA対応歯科標準病名マスターについて—, 齊藤孝親, 中山 均, 佐々木好幸, 鈴木一郎, 玉川裕夫, 成澤英明, 萩原芳幸, 日高理智, 森本徳明, 山田卓也, 西田 悟, 医療情報学, 22 (suppl.): 537-538, 2002.

CO₂ レーザーの有用性について

松根 健介 前田 隆秀* 日本大学松戸歯学部小児歯科学教室講師 *同教授

(〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1)

はじめに

近年、レーザー治療における発展には目を見張るものがあります。レーザーはその優れた特性から歯科医学領域でも多岐にわたり応用されており、硬組織への応用、すなわち歯の切削（窩洞形成）への応用も実用可能となってきています。一方、レーザーを使用した軟組織の切開・止血の有用性に対する報告も多く認められます¹⁾。レーザーによる治療は、エアータービンや電気エンジンによる歯の切削と比較し、生体自体への振動や音の軽減が認められます。このことは、患者の精神的苦痛の排除につながると考えられます。さらに、レーザーを使用することにより無麻酔下での治療も可能となってきています。これらのことは、一般成人はもちろんのこと振動や音等に敏感な小児に対しての歯科治療に大変有効であると考えられます。しかしながら、一般歯科治療の中におけるレーザー治療の位置付けは、タービンやメスを使用した歯科治療と比較し特別なものの考えが未だに強いのが現実です。現在、大学における診療では、歯の切削や軟組織の処置に対しレーザーを用い

ていますが、その中でも、CO₂ レーザーを用いた軟組織の処置について紹介したいと思います。

CO₂ レーザーについて

CO₂ レーザーは、1964年Patelによって開発され、医科領域でしばらく使用された後に歯科領域に応用されるようになりました。レーザーには、組織の表層でエネルギーの大部分が吸収され内部に透過しない組織表面吸収型レーザーと、組織を透過し途中で吸収されながらも深部までエネルギーが到達する組織透過型レーザーの2つがあります。CO₂ レーザーの波長は、10.6 μ mで水分によく吸収される組織表面吸収型レーザーです。

CO₂ レーザーの応用範囲を以下に示します。

1. 硬組織に対する処置（予防および象牙質知覚過敏症を含む）
2. 歯髄組織に対する処置
3. 歯周疾患に対する処置
4. 口腔外科領域の処置
5. その他（顎関節症、インプラント、歯科麻酔等）

以上大まかに示しましたが、歯科治療におけるほとんどの治療行為に応用可能と考えられます。その中でも小児歯科領域では、歯肉弁切除、小帯切除、粘液嚢胞の摘出等の軟組織の処置に対してその威力を発揮すると考えています。

松戸歯学部小児歯科診療室にて使用しているCO₂レーザーは、PanalasC10 (Panasonic社製)です。PanalasC10は、発信波長10.6μm、スーパーパルスや短時間リピートパルスが採用された、可変領域1～10WのCO₂レーザーです。軟組織の切開、止血、凝固および蒸散はもちろんのこと、象牙質の削除および象牙細管の閉鎖による象牙質知覚過敏に対しても応用が可能なレーザーです。

日本大学松戸歯学部小児歯科診療室
外来手術における過去3年間の推移

表1、2に日本大学松戸歯学部小児歯科診療室外来における手術件数（予約をして処置を行った件数）と軟組織処置に対してのCO₂レーザーの使用頻度を示します。外来手術件数における軟組織処置は約30件です。その内訳を見ると例年粘液嚢胞の摘出が多く、軟組織の処置においてはメスではなくレーザー

を使用した処置がほとんどを占めていることがわかりました。また、CO₂レーザーの項でお話しましたように日々の外来処置においては、歯肉弁の切除や歯瘻に対してレーザーを使用していることを考えると、軟組織の処置においてはレーザーの使用頻度が高くなってきていることがわかりました。

また、日本大学松戸歯学部小児歯科診療室では術前に保護者および患児に以下の説明を行っています。

1. レーザー治療について（安全性の説明含む）
2. レーザー治療と既存（メス使用）の治療との違い
3. 術中の痛みについて
4. 処置時間
5. 術後の治療経過（必要に応じ写真を提示）
6. 術後の痛みについて
7. 術後の消毒および日常生活における注意点等

実際の診療では

1. 粘液嚢胞摘出（図1）

6歳、女児

主訴：唇が腫れている。

表1 日大松戸歯学部小児歯科外来における手術件数

	平成13年	平成14年	平成15年
手術数	92	107	124
軟組織処置数	25	28	30

表2 軟組織処置内容

	平成13年	平成14年	平成15年
粘液嚢胞摘出	15 (15)	14 (14)	12 (11)
上唇小帯切除	5 (4)	3 (3)	8 (6)
舌小帯切除	3 (1)	10 (8)	5 (3)
その他	2 (2)	1 (1)	5 (4)

() レーザー使用

症状：下口唇に直径約5mmの腫瘍を認める。

治療方針：レーザーを使用し摘出を行う。

術式：局所麻酔下で、出力3～5W連続波の条件で摘出を行った。

嚢胞周辺にそって、全周にわたり深さ1mm程度の切開を加え、嚢胞上部をピンセットで引き上げ頸部にレーザーを照射し、嚢胞を一塊で摘出した。

注意点：再発を防ぐ意味でも嚢胞を一塊で傷つけずに除去することが大切である。創面に粟粒状の小嚢疱が残っている場合は、それらの摘出も行う。また、創面は縫合せずに開放創のまま様子を見る。必要に応じ創面にアクロマイシン軟膏を貼付する。

2. 小帯切除 (図2)

1) 舌小帯切除

6歳、男児

主訴：舌の動きが悪い。

症状：舌小帯が短縮しており、前方突出したときハート状を呈している。

治療方針：舌小帯切除後、舌機能訓練を行う。

術式：局所麻酔下で、出力2W連続波の条

件で切除を行った。

舌を挙上させ(バキューム等でも可)、舌小帯を伸展させた状態で切開を加える。

注意点：舌小帯切除においては、唾液腺の開口部である舌下小丘にレーザーの影響がおよばないように照射方向に気を付ける。また、再付着を防ぐために舌機能訓練を行うことを説明する。

2) 上唇小帯切除

7歳、女兒

主訴：前歯の間が開いている。

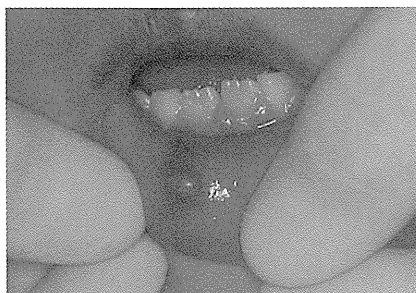
症状：上唇小帯の高位付着を認める。

治療方針：小帯切除後、経過観察を行う。

術式：局所麻酔下で、出力2W連続波の条件で切除を行った。

上唇を上方に引っ張りながら、小帯を伸展させ、小帯起始部に対しレーザーを照射し、切開を加える。

注意点：肥厚部分が口蓋側まで及んでいる場合は、レーザー照射を口蓋側まで行う必要がある。再発を防ぐために切開した後、菱形の正中部および中切歯歯間部をやや深めに照射する。また、再付着を防ぐために上口唇を牽引する運動を2～3日することを説明する。



術前



術中

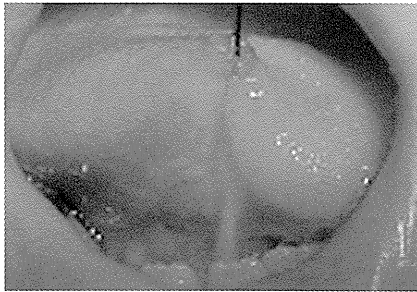


術後

局所麻酔下で、出力3～5W連続波の条件で摘出を行った。

嚢胞周辺にそって、全周にわたり深さ1mm程度の切開を加え、嚢胞上部をピンセットで引き上げ頸部にレーザーを照射し、嚢胞を一塊で摘出した。

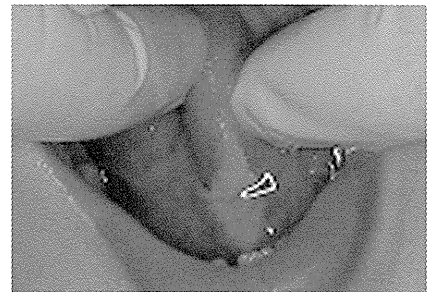
図1 粘液嚢胞摘出



術前



術後



術後3日目

舌を挙上させ (バキューム等でも可)、舌小帯を伸展させた状態で切開を加える。再付着しないように舌機能訓練を行っている。



術前



術中



術後

上唇を上方に引っ張りながら、小帯を伸展させ、小帯起始部にレーザーを照射し、切開を加える。再発を防ぐために切開した後、菱形の正中部および中切歯歯間部を深めに照射する。

図2 小帯切除

3. 歯瘻に対する処置 (図3)

5歳、男児

主訴：歯ぐきが腫れた。

症状：上顎右側乳中切歯根尖部に歯瘻を認める。

治療方針：感染根管治療およびレーザーを使用した歯周膿瘍切開。

術式：無麻酔下で2W連続波の条件で切開を行った。

無麻酔下のため、1Wの出力でデフォーカス (非焦点照射) にて周囲組織を暖め活性化させた後に、ジャストフォーカス (焦点照射) にて歯瘻中心部より排膿をさせた。

注意点：照射は少し温かく感じる程度で痛みを強く訴えない範囲で行う。また、後継永久歯への影響を考えレーザー照射を歯瘻部位にとどめ過剰な照射は行わない。

4. 開窓術 (図4)

9歳、男児

主訴：歯が出てこない。

診査：X線診査により上顎左側犬歯の萌出障害が認められた。

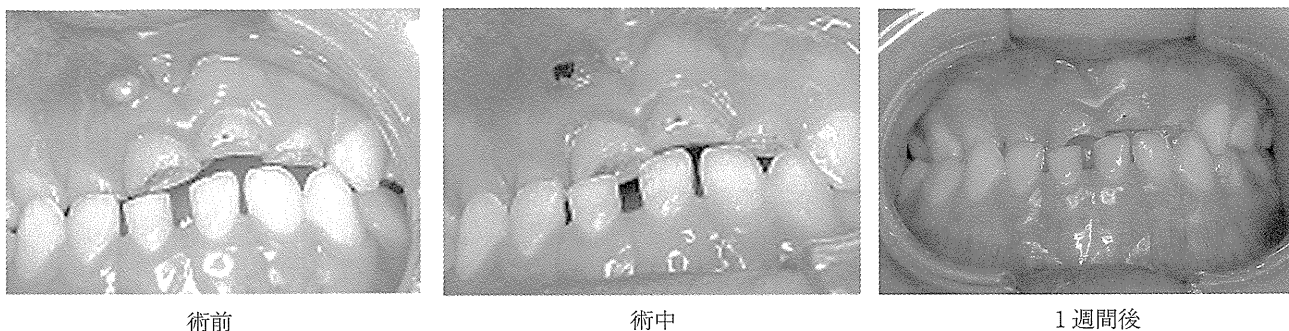
治療方針：開窓した後、牽引を行う。

術式：局所麻酔下で、出力3～4W連続波の条件で蒸散を行った。

歯冠部を確認し円運動を行いながら軟組織の蒸散を行った。

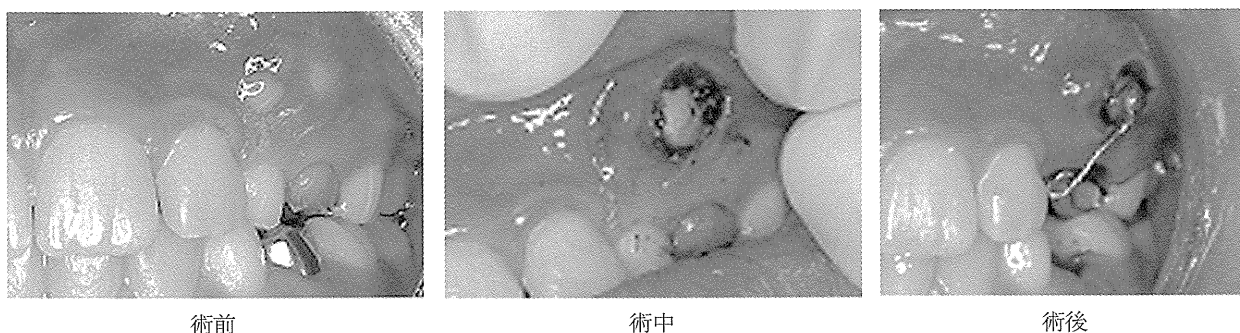
注意点：同一部位への過剰照射を防ぐために、切開速度を可及的に早くし、蒸散した創が浅く炭化層が少ない状態にするよう心がける。

その他、エプーリス切除、歯肉弁切除や抜歯後の疼痛緩和等の軟組織の処置にレーザーを使用しています。出力については、無麻酔



術前 術中 1週間後
無麻酔下のため、1 Wの出力でデフォーカス（非焦点照射）にて周囲組織を暖め活性化させた後に、ジャストフォーカス（焦点照射）にて歯瘻中心部より排膿をさせた。1週間後には歯瘻は消失していた。

図3 歯瘻に対しての切開



術前

術中

術後



翌日

歯冠部を確認し円運動を行いながら軟組織の蒸散を行った。
翌日、痛みもなく良好な状態であった。

図4 開窓術

下での使用においては患者の痛みに対する感受性や処置部位の状態によって決定しています。また、低出力より軟組織の蒸散もしくは切開を行い必要に応じ上げていっています。さらに、照射終了後に、照射部位に1Wの低出力のレーザー照射を行い組織の活性を促しています。また、基本的に軟組織の処置においては、連続波で処置を行い、フットスイッチにて調整すると同時に、円運動やチップの

動き（手を早く動かす等）を変化させることにより侵襲を少なくするように処置を行っています。

治癒過程について

CO₂レーザーを使用した軟組織に対しての処置の一番の利点は術中、術後ともに出血を認めないことです。また、出血が少なく開放

創にして終了すること、つまり、縫合を必要としないことも利点のひとつと考えられます。実際の臨床の場合においても、出血なく、縫合せずに良好な状態で術後の経過が進んでいく様子を観察すると、レーザー治療の威力を感じます。術中は出血なく、開放創でその処置を終了するわけですが、創面の炭化および凝固層が認められ、特に炭化層により創面が黒く焼け焦がれてしまっている感じが残ってしまいます。また、粘液嚢胞摘出後の創面等においては開放創になっているがために創面の大きな陥没が認められます。これらの事柄は、術前の説明時に保護者および本人によく説明しておく必要があると考えられます。しかし、炭化層においては洗浄を行うことにより、炭化した組織は剥離し薄い創面の多くがきつね色の凝固変性層のみになります。

術後、4、5日を過ぎると創面は偽膜が被覆し、創面の陥没も改善されてきます。そして、約1週間後には上皮の新生が認められるようになりますが、一部まだ偽膜が認められます。約2週間が経つと創面はほぼ上皮で覆われ、3週間を過ぎるころにはほとんどの症例において、瘢痕の縮小が起こり治療していることが観察されます²⁾。レーザー照射後の治療においては、疼痛を伴うことがなく非常に良好な治療が望めることがわかります。

CO₂レーザーと外科用メスを用いた治療過程の比較においては、炭化層・凝固壊死層の存在により、レーザー創の方が外科用メスを用いたときより治療過程が長期化するが、本質的な差はないことが報告されています。また先に述べたように創面の大きな陥没を認めるため心配になる場合もあると思いますが、筋層におよぶ切除を行っても比較的小範囲であるならば、開放創と閉鎖創の治療過程に差

は認められないことが報告³⁾されていること、ならびに症例を観察している限り非常に良好な治療が認められることをあわせて報告させていただきます。

今後のレーザー治療の躍進について

臨床の場合においてレーザー治療は広く用いられてきており、各種レーザーが販売され、その特色を生かした臨床応用がなされています。レーザーの使用目的は、大きく分けると、硬組織と軟組織に対しての2つに大別できると思います。予防を含めた硬組織における処置では、Er-YAGレーザーやNd-YAGレーザーが大変有効であると考えられます⁴⁾。歯質削除においてNd-YAGレーザー(S.L.T社製)を使用してみたところ、歯質強化や健全歯質と感染歯質の選択的削除の可能性も認められ、今後のより一層の発展が考えられました。

一方、軟組織の処置においてはCO₂レーザーが、痛みが少なく、少ない出血もしくは優れた止血効果を発揮することより、大変有効であると考えられます。しかしながら、歯科診療においてレーザー治療が大変有効なことが判ったとしても、今後レーザーが広く臨床の場合においてその威力を発揮するには多くの問題点を改善しなければいけないと思います。例えば、レーザー本体の大きさや価格、接着に対する問題、レーザー治療に対しての手技の統一性等です。これらの問題点が解決されていくことにより、よりレーザー治療というものが日々の臨床の中で広く使用されるようになると思います。

ま と め

2000年3月の小児歯科臨床の対談の中に「レーザーですね。使ってよかった、という報告はあまり聞かないけど(笑)、こういうのが出てきましたよ、という期待感があります。…」という文章があります。3年前、私もレーザーに対しての認識は同じだったと思います。しかしながら、この3年間でレーザーは飛躍的に進歩し、レーザー治療というものが歯の切削も可能であり、より扱いやすくなったと認識しております。今回、レーザー治療について少しばかりお話しさせていただきましたが、私もレーザー治療を始めてから少しの時間しか経っていませんが、その便利さに驚いている1人です。今後は、レーザーについての基礎研究が進むとともに、臨床の場にレーザーというものが違和感なく使

用されていくことが、レーザーがより発展していくことにつながると考えています。今回、ご紹介させていただいたCO₂レーザーはレーザーの中でも比較的扱いやすく導入しやすい機種と思います。是非、日々の臨床の中でレーザー治療というものが特別でないものとなる日を楽しみにしております。

参考文献

- 1) 加藤純二、栗津邦男、篠木 毅、守矢佳世子：一からわかるレーザー歯科治療、医歯薬出版株式会社、2003.
- 2) 松本光吉編：歯科用炭酸ガスレーザーの臨床—技術編—、財団法人口腔保健協会、2002.
- 3) 古森考英、高戸 毅、岡田憲和、赤川徹弥：炭酸ガスレーザーによる舌創部の治癒過程に関する基礎的研究—開放創と閉鎖創の比較—、日本レーザー歯誌、5：1-11、1994.
- 4) 森岡俊夫：う蝕予防への応用、歯科ジャーナル39：251-257、1994.

一般開業歯科医師による探針を用いない 初期う蝕診断の検査者間誤差

Inter-examiner Error for Early Caries without Using Dental
Explorer by Japanese Dental Practitioners

後藤田宏也 田口千恵子 水野恭子
有川量崇 小林清吾 佐久間汐子¹⁾

GOTOUDA Hiroya, TAGUCHI Chieko, MIZUNO Kyouko, ARIKAWA Kazumune,
KOBAYASHI Seigo and SAKUMA Sihoko¹⁾

索引用語：う蝕診断法，集団歯科健診

緒 言

従来，学校歯科健診をはじめとする集団歯科健診において，歯科用探針と歯鏡による視診型が推奨されてきた¹⁾。一方，探針加圧操作により歯質破壊が生ずる場合がある，との指摘から，今日では尖端の鋭利な歯科用探針を使用しない方針が主流になってきた^{2,3)}。今日の第一線歯科医師が行っているう蝕診断において，歯科用探針を用いなかった場合の診断誤差に関する定量的評価が望まれていると考える。特に，平成7年度より学校歯科健

診に導入された要観察歯：COは，主観的判断要因が大きいことから，判定にはどの程度の誤差が生ずるか興味のもたれるところである。このたび，某地区歯科医師会が主催するう蝕診断法をテーマとした研修会に参加し，参加歯科医師の診査者間におけるう蝕診断の差異を評価する機会を得た。興味ある結果が得られ，若干の考察を加えたので報告する。

対象および方法

歯科医師33名が診査者となった。診査者に対して，学校歯科医の経験の有無，および集団健診と一般臨床の診査時での探針使用に関する質問調査が行われた。次に，1歯ずつ小瓶に入れワックス上に植立した抜去歯の小窩裂溝部を対象として，う蝕診断が実施された。水に濡れた状態で，探針を用いない視診型で，診査者が通常行っている診査基準に従い，健全，CO，Cの分類を行う診査とした。

う蝕の合意診断は，研究者2名が日本学校歯科医師会の基準⁴⁾に基づき，対象歯面を乾燥し，探針を用いての視診と触診を行い，両診査者が合意でき

日本大学松戸歯学部衛生学教室（主任：小林清吾教授）

¹⁾ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔健康科学講座
（主任：宮崎秀夫教授）

Department of Dental Public Health, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. KOBAYASHI Seigo)

¹⁾ Division of Preventive Dentistry, Department of Oral Health Science, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University (Chief: Prof. MIYAZAKI Hideo)

受付：平成16年4月26日

受理：平成16年5月12日

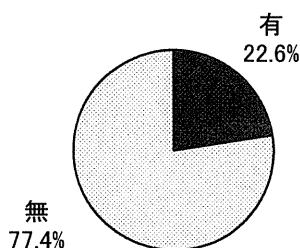


図1 学校歯科医経験の有無

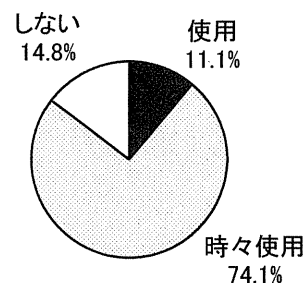


図2 探針使用の有無 (集団健診)

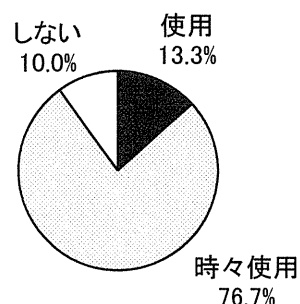


図3 探針使用の有無 (臨床)

表1 健全歯の診断結果

診断	No. 1		No. 2	
	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)
健全	5	15.6	22	71.0
CO	19	59.4	9	29.0
C	8	25.0	0	0
無記入	1	—	2	—

たものを採用した。この合意診断の分類ごとに、診査者による診断結果の分布を検討した。合意診断との一致率を的中率とした。合意診断による対象歯の内訳は、健全歯：2本、CO：4本、C：4本、計10本であった。

結 果

1. 学校歯科医の経験

学校歯科医経験者は22.6%、未経験者は77.4%であり、未経験者が多く、全体の約3/4を占めていた(図1)。本質問項目に関する有効回答数は31名であった。

2. う蝕診断における歯科用探針の使用

集団健診でのう蝕診断において、歯科用探針使用の者11.1%、ときどき使用の者74.1%、使用しない者14.8%であった(図2)。有効回答数は27名であった。一般臨床でのう蝕診断において、歯科用探針使用の者13.3%、ときどき使用の者76.7%、使用しない者10.0%という結果であった(図3)。有効回答数は30名であった。集団健診時と一般臨床時における探針使用率は同程度で、ときどき使用するという者が双方で大部分を占めた。

3. 抜去歯を対象としたう蝕診断

結果を表1～3に示す。パーセントの値は未記入の者を除いたものである。

合意診断が健全である場合の結果を表1に示す。対象歯No.1における合意診断に対する的中率は15.6%と、きわめて低かった。このケースでは、COと判定した者が最も多く59.4%、Cと判定した者も25.0%であった。No.2では的中率は71.0%と高く、Cとした者は皆無であった。

CO歯の場合(表2)、いずれの対象歯においても的中率が35.5～46.8%と半数より低い結果であった。No.3とNo.4ではCと診断した者が、またNo.6では健全と診断した者が最も多かった。

C歯の場合(表3)、対象歯のいずれにおいても的中率が53.1～75.8%と半数より高く、診断分布のばらつきは比較的小さかった。しかしケースによりばらつきの大きさに差異のあることが示された。

考 察

今回は、歯科用探針を用いないう蝕診断法で行われた。また歯面は水で濡れた状態とし、口腔内の条件に近づけた。しかし、抜去された歯であり、

表 2 CO 歯の診断結果

	No. 3		No. 4		No. 5		No. 6	
診断	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)
健全	3	9.1	1	3.2	10	31.3	14	43.7
CO	14	42.4	11	35.5	15	46.8	12	37.5
C	16	48.5	19	61.3	7	21.9	6	18.8
無記入	0	—	2	—	1	—	1	—

表 3 う蝕歯の診断結果

	No. 7		No. 8		No. 9		No. 10	
診断	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)	人数 (名)	割合 (%)
健全	3	9.5	7	21.9	6	19.4	4	12.1
CO	12	37.4	5	15.6	7	22.6	4	12.1
C	17	53.1	20	62.5	18	58.0	25	75.8
無記入	1	—	1	—	2	—	0	—

手にとって近くで任意の角度から凝視でき、照明は十分であった。その結果、う蝕診断に大きな検査者間誤差のあることが示された。診断誤差の背景には、単なる着色をう蝕病変と誤診したり、う窩形成の定義があいまいであることが考えられた。CO のケースでは、いずれの場合も合意診断との一致率が 50%以下であり、重大な問題を含んでいると思われた。診査者によって健全歯や CO が C と診断されて切削と充填処置が行われたり、C の歯が健全歯や CO と診断されることによってう蝕が進行してしまうなどの弊害が考えられる。また疫学調査において、CPI 探針使用と視診によるう蝕診断は、視診+歯科用探針による方法に比べ、DT の検出に無視できない見落としがあると報告されており⁹⁾、一方的に歯科用探針の使用を禁ずることに問題が残されている。

今回の調査により診査者間において視診によるう蝕検出には大きなバラツキがあることが確認された。歯科用探針を用いない方法を前提にした場合、今後、精度の高い、しかも学校健診など実際の口腔内で簡便に用いられるう蝕診断法の開発が急務である。

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および富徳会研究助成により行った。

文 献

- 1) 島田義弘：集団歯科検診の実際，p. 1～9，医歯薬出版，東京，1990.
- 2) 「初期う蝕診断」における探針の意義に関する作業部会(雫石 聡，他)：望ましい初期う蝕の診断法，口腔衛生会誌，50：137～152，2000.
- 3) WHO：Oral Health Surveys, Basic Methods, 4th ed., World Health Organization, Geneva, 1997.
- 4) 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)，日本学校歯科医会，東京，1995.
- 5) 小林清吾，田浦勝彦，磯崎篤則，山下文夫：咬合面小窩裂溝の初期う蝕診断法に関する検討—視診/CPI 探針・歯科用探針の比較—，口腔衛生会誌，49：650～651，1999.

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教室
電話 047-360-9356, FAX 047-360-9356

短 報

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

Estimation of *Streptococcus mutans* in the Brushing Plaque
by a Simple and Rapid Immunoassay Kit

後藤田宏也^{1,3)} 水野 恭子¹⁾ 田口千恵子¹⁾
福島和雄^{2,3)} 小林清吾^{1,3)}

GOTOUDA Hiroya^{1,3)}, MIZUNO Kyouko¹⁾, TAGUCHI Chieko¹⁾,
FUKUSHIMA Kazuo^{2,3)} and KOBAYASHI Seigo^{1,3)}

索引用語：ブラッシング歯垢，イムノクロマト法，簡便迅速測定キット

緒 言

う蝕リスク診断においてう蝕原因菌レベルの測定は必要不可欠である。この目的のためにデントカルト SMTM (オリオン社) などの培養法に基づく簡易測定キットが多用されているが、迅速性と特異性に欠点があることが指摘されている。最近、ジーシー社およびトクヤマデンタル社がイムノクロマト法を用いた *S. mutans* 用の迅速検出キットのスコアと唾液中の *S. mutans* 菌数との相関

性を報告し^{1~3)}、チェアサイドにおけるう蝕リスク診断法として有望視されている。その試料には唾液が用いられてきたが、う蝕原因菌の主な棲息部位は歯面上の歯垢であり、う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と考えられる。最近、Neta⁴⁾は、定量性のある簡便な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歯垢混濁液（ブラッシング歯垢）がその目的に適うことが示された。そこで今回、ブラッシング歯垢試料を用いて本学部細菌学教室とトクヤマデンタル社が共同開発したイムノクロマトキット（以下トクヤマキット）の性能を培養法と比較して調べた。併せて、デントカルト SMTMの性能と比較した。

対象および方法

1. 対象者

日本大学松戸歯学部4年次生20名（男性12名、女性8名、平均年齢21.9±0.8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ECO 2-015号）。

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口腔科学研究所

¹⁾ Department of Dental Public Health, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. KOBAYASHI Seigo)

²⁾ Department of Dental Microbiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. FUKUSHIMA Kazuo)

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

受付：平成16年7月26日

受理：平成16年8月4日

被験者に対して事前に十分な説明を行ったうえで、被験者から自由意志に基づく同意を得た。

2. 歯垢試料の調整および菌数算定

1 分間のブラッシング処理後、PBS 5 ml にて含嗽する Neta⁴⁾の方法により、回収したブラッシング歯垢を、福島の方法⁵⁾に準じて改良 MSB 培地を用いた分離培養法および菌数算定法にて *S. mutans* の菌数を算定した。

3. 簡易迅速キット（トクヤマキット）

トクヤマ社から提供されたイムノクロマトキットを以下の方法により使用し評価した。歯垢試料の 5 倍希釈を用い、平田ら²⁾の方法に準じて、*S. mutans* 菌数レベルを測定した。採取したブラッシング歯垢 0.5 ml を、シリンジで加圧しながら、濾紙を担持したカートリッジにて濾過し、*S. mutans* 菌体を含む沈殿画分を濾紙に捕捉した。処理液 1 を 0.5 ml 濾過し、沈殿画分を洗浄した。処理液 2 を 0.25 ml 濾過し、濾紙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。0.15 ml の処理液 3 を濾過することで、濾紙上の抗原を処理液 3 とともに回収した。この溶液の全量（約 0.15 ml）をクロマトデバイスのサンプル窓に添加し、10 分後のテストラインの発色を判定し、*S. mutans* 菌数レベルを測定した。

4. 簡易培養キット

オリオン社製のデントカルト SMTM（製造番号 CE 009）を購入し、使用した。PBS を用いて 10 倍希釈した歯垢試料をテストストリップに流し、説明書に記載された方法に従って、モデルチャートにより 48 時間培養後に判定した。

5. 統計処理

測定キットの判定結果と *S. mutans* 菌数レベルの相関は、スピアマンの順位相関係数を用い、*S. mutans* 菌数レベルの一致性は、Cohen の Kappa 係数によって評価した。またデントカルト SMTM：Low 群=0, 1, High 群=2, 3, トクヤマデンタル社の迅速キット：Low 群=0, High 群=1, 2 の 2 群に分け、*S. mutans* 菌数は、Low 群=

表 1 簡易検査キットの評価

被験者	<i>S. mutans</i> 菌数 (10 ⁵ CFU/ml)	スコア	
		トクヤマ 迅速キット	デントカルト SM TM キット
A	25.61	2	3
B	18.29	1	2
C	9.96	1	2
D	8.94	2	3
E	2.64	0	1
F	2.07	1	1
G	2.03	1	3
H	1.30	0	2
I	1.26	0	2
J	1.02	0	2
K	0.59	0	1
L	0.43	0	2
M	0.18	0	2
N	0.12	0	0
O	0.04	0	1
P	0.02	0	0
Q	0.02	0	2
R	0.00	0	1
S	0.00	0	0
T	0.00	0	0

1×10⁵CFU/ml 未満、High 群=1×10⁵CFU/ml 以上の 2 群に分別し、各簡易キットの *S. mutans* 菌数レベルに対する一致性を Cohen の Kappa 係数によって評価した。

結 果

各被験者について分離培養法による *S. mutans* 菌数測定値と検査キットの判定結果を表 1 に示した。改良分離培養法による *S. mutans* 菌数とトクヤマ迅速キットの *S. mutans* 菌数レベルとの相関 ($r=0.76$, $p=0.0009$) は、デントカルト SMTM の菌数レベルの相関 ($r=0.67$, $p=0.004$) より高かった。

また、トクヤマ迅速キットおよびデントカルト SMTM のキットの判定と菌数レベルの一致度をそれぞれ表 2, 3 に示した。トクヤマデンタル社の迅速キットの Kappa 係数 0.6 は、デントカルト SMTM の Kappa 係数 0.5 より高かった。

表2 トクヤマ迅速キットの判定基準と菌数との一致度

Risk	MSB-CFU <10 ⁵ <		Total
Low	10	4	14
High	0	6	6
Total	10	10	20

Kappa 係数=0.6

考 察

ブラッシング歯垢を用いた改良分離培養法による *S. mutans* 菌数とトクヤマデンタル社の迅速キットの *S. mutans* 菌数レベルとの相関 ($r=0.76$) は、デントカルト SMTM の菌数レベルの相関 ($r=0.67$) より高かった。平田ら²⁾も唾液を対象に、本キットが迅速、簡便であり、培養法とよく相関し ($r=0.52$)、デントカルト SMTM と同等以上の感度で *S. mutans* を測定できると報告している。また岡田ら³⁾は唾液を検体としたジーシー社のイムノクロマトキットであるサリバチェック SMTM においてはスコアレベルと *S. mutans* 菌数には相関関係がある ($r=0.48$) と報告している。

S. mutans 菌数レベルとキット判定によるリスクレベルとの一致度は、トクヤマデンタル社での迅速キットはデントカルト SMTM より若干高く、有用性が示唆された。デントカルト SMTM は *S. mutans* 菌を区別することなくミュータンスレンサ連鎖球菌を検出してしまふ欠点があるが、ジーシー社およびトクヤマデンタル社での迅速キットは *S. mutans* 菌のみを測定できる特徴がある。またトクヤマデンタル社の迅速キットの判定時間は15分であり、デントカルト SMTM の48時間と比較して非常に迅速である。このことは、アフィニティー精製抗体が高い反応性を示し、10⁵CFU/ml レベルの *S. mutans* を高感度に検出できると *S. mutans* の抗原抽出液をクロマトデバイスの分析に使用するため、クロマトデバイスでの展開性や反応性が向上することによるものである²⁾。

よってトクヤマデンタル社製の迅速測定キットは、歯科医院のチェアサイドでのう蝕リスク診断

表3 デントカルト SMTMキットの判定基準と菌数との一致度

Risk	MSB-CFU <10 ⁵ <		Total
Low	7	2	9
High	3	8	11
Total	10	10	20

Kappa 係数=0.5

に有効に利用できると考えられた。なお、今後 *S. mutans* と同様にう蝕原性細菌として重要な *S. sobrinus* の診断キット開発が望まれる。

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推進事業および日本大学松戸歯学部鈴木研究費(平成15年度一般研究03-1008)により実施された。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 岡田淳一, 松久保 隆, 杉原直樹, 小林義昌, 山内幸司, 花田信弘: モノクロー抗体を応用した *S. mutans* の迅速測定キットの評価, 口腔衛生会誌, 53: 445, 2003.
- 4) Neta, T.: Investigation of microbiological method to estimating individual caries risk. Evaluation of sampling methods and materials, Int. J. Oral Med. Sci., 1: 33~36, 2002.
- 5) 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, p. 62~81, クインテッセンス出版, 東京, 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

電話, FAX 047-360-9356

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

報 告

歯科大学附属病院等における院内感染対策の 整備状況について

The Current Status of Standard Precaution Implementation for Nosocomial Infection at University Affiliated Dental Hospitals

笹井啓史 住友雅人¹⁾ 河相安彦²⁾
下坂典立³⁾ 有川量崇⁴⁾ 田口千恵子⁴⁾

SASAI Hirofumi, SUMITOMO Masahito¹⁾, KAWAI Yasuhiko²⁾, SHIMOSAKA Michiharu³⁾,
ARIKAWA Kazumune⁴⁾ and TAGUCHI Chieko⁴⁾

索引用語：歯科大学附属病院，院内感染対策，院内感染サーベイランス

緒 言

今日わが国の医療の特徴として，人口構造や疾病構造の変化に伴う医療の高度化および患者ニー

ズの多様化があげられる．なかでも，安全かつ効率的な医療サービスの提供は，治療プロセスのみならず，医療システム全体において取組みが進められてきている．とりわけ，医療機関におけるさまざまな感染経路・系図により発生する院内感染への対策は，きわめて重要である．具体的には，感染対策マニュアルの作成・普及，医療従事者への講習会の実施，院内サーベイランスによる発生状況の把握等があげられる¹⁻¹³⁾．

こうした対策が進む中で，依然としてセラチア菌，MRSA，VRE等による院内感染事例は後を絶たず，医療機関や行政機関における感染対策強化・体制整備はきわめて重要かつ緊急な課題である．

ことに歯科領域は，医科領域に比べ，治療内容や使用機材が多岐にわたること，大半が外来患者であること，その処置内容は観血処置が多く，歯科医師は感染に関しきわめてハイリスクであることなどの特徴を有している．つまり，歯科医療においては，これらを考慮したうえで，院内感染対策における問題点の把握と新たな院内感染対策の推進が必要であるといえる．

しかしながら，現行の歯科医療における院内感

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）

¹⁾ 日本歯科大学歯学部附属病院

²⁾ 日本大学松戸歯学部補綴学第1講座（主任：小林喜平教授）

³⁾ 日本大学松戸歯学部麻酔学講座（主任：渋谷 鑑教授）

⁴⁾ 日本大学松戸歯学部衛生学講座（主任：小林清吾教授）
Department of Oral Medicine, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. OTAKE Shigeo)

¹⁾ The Nippon Dental University Hospital at Tokyo

²⁾ Department of Complete Denture Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. KOBAYASHI Kihei)

³⁾ Department of Anesthesiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. SHIBUTANI Koh)

⁴⁾ Department of Dental Public Health, Nihon University School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. KOBAYASHI Seigo)

受付：平成16年7月30日

受理：平成16年8月4日

歯科標準病名について

齊藤 孝親¹⁾ 佐々木 好幸²⁾ 鈴木 一郎³⁾ 玉川 裕夫⁴⁾ 中山 均⁵⁾ 成澤 英明⁶⁾ 日高 理智⁵⁾
森本 徳明⁷⁾ 山田 卓也⁷⁾ 多貝 浩行⁸⁾

日本大学松戸歯学部総合口腔医学講座・口腔科学研究所¹⁾

東京医科歯科大学歯学部附属口腔保健教育研究センター²⁾

新潟大学医歯学総合病院地域保健医療推進部³⁾

大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部・医療情報室⁴⁾

日本医療情報学会課題研究会「歯科分野における保健医療福祉情報の標準化に関する研究会」⁵⁾

昭和大学歯学部保存修復学教室⁶⁾ 日本歯科医師会⁷⁾

保健医療福祉情報システム工業会(JAHIS)医事コンピュータ部会歯科システム委員会⁸⁾

Standard Dental Disease Name Master

Yakachika Saito¹⁾ Yoshiyuki Sasaki²⁾ Ichiro Suzuki³⁾ Hiroo Tamagawa⁴⁾ Hitoshi Nakayama⁵⁾

Hideaki Narusawa⁶⁾ Masatoshi Hitaka⁵⁾ Noriaki Morimoto⁵⁾ Takuya Yamada⁷⁾ Hiroyuki Tagai⁸⁾

Dept. of Oral Medicine, Research Inst. of Oral Science, Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo¹⁾

Section of Dental Informatics, Tokyo Medical and Dental University Dental Hospital²⁾

Division of Community Health Promotion, Niigata University Medical and Dental Hospital³⁾

Division of Medical Information, Osaka University Dental Hospital⁴⁾

The study group of standardization for Dental Health Information System⁵⁾

Department of Operative Dentistry, Showa University School of Dentistry⁶⁾ Japan Dental Association⁷⁾

Japanese Association of Healthcare Information System Industry⁸⁾

Abstract: The standard dental disease name master and dental treatment name master lists have been provisionally publicized on the web page of MEDIS-DC. Approximately 2500 disease names are covered by the standard dental disease name master, which is open to the public under its provisional status. Of those, about 1800 disease names were taken from the standard disease name master (MEDIS-DC) and about 700 dental disease names were newly added. Further, approximately one third of the added dental disease names describe the condition of prosthetics frequently used in daily dental clinical practice, for treatment of such conditions as denture breakage.

Keywords: ICD-DA, Dentistry, Terminology, Standardization

1. はじめに

保健医療情報のグランドデザインに示されたアクションプランに則り様々な情報化が進められている。医科領域では財団法人医療情報システム開発センター(MEDIS-DC)からICD10対応電子カルテ用標準病名マスター(以下、標準病名マスター)が提供され、レセプト電算処理システム用傷病名マスター/修飾語との連携も確立し、また標準病名マスター収載病名によるレセプト傷病名への記載要求が厚生労働省通知としてなされたことから、急速にその実装、普及が進んでいる。歯科領域においても歯科医療情報標準化の基盤となる各種マスターの整備が進められつつあり、現在、歯科標準病名マスター^{1,2)}、歯科標準手術処置マスターの仮公開をMEDIS-DCおよび日本歯科医師会のホームページ上で行っている。そこで、歯科標準病名マスターについて報告する。

2. 資料

歯科標準病名マスターの編纂にあたっては、ICD-10, ICD-DA, 標準病名マスター, 大学付属

歯科病院の病名マスター, JAHIS医事コンピュータ部会・歯科システム委員会編集の歯科レセコン病名マスター, 文部省学術用語集歯学編および歯学学術用語補遺集、日本補綴歯科学会・歯科補綴学専門用語集などを資料として用いた。

3. 歯科標準病名マスター

仮公開中の歯科標準病名マスターは、歯科で用いられている各病名マスターに収載されている病名およびICD-DAで明記されている病名、さらに義歯破折など補綴・修復物の状態表現などから常用と思われる病名を選出し、約2500の病名を網羅している。その内訳は、標準病名マスターからの引用が約1800病名、新たに追加した歯科病名が約700病名である。新たに追加した歯科病名の約1/3は、義歯破折など日常の歯科臨床で多用する補綴修復物の状態表現に関するものである。

歯科標準病名マスターも標準病名マスターと同様に基本分類コードとして国際疾病分類ICD10を用い、ICD10ファミリーとして口腔及び歯科的な疾患のために設けられている「国際疾病分類歯科学及び口腔科学への適応(ICD-DA)」を基本分類コー

ドとしている。ICD分類は疾病分類であるため、日常臨床で用いられている病名とではやや差違がみられる場合がある。例えば、日常臨床では、う蝕症第2度、う蝕症第3度が用いられるが、ICD-DAには象牙質う蝕の分類しかない。ICD-DAでは埋伏歯を他の歯の妨害による萌出障害とは別の原因により萌出してこない歯(embedded)と他の歯の妨害による萌出障害の結果萌出してこない歯(impacted)を明確に区別するが、日常臨床では明確な区別はしていないなどである。最も大きな差違は、冠脱離など補綴修復物関係の状態表現がICD-DAにはほとんどないことである。現在、このような日常臨床とICD分類との差違についての調整を行っている。また、歯科標準病名マスターにはレセプト表記用のフィールドを持たせ、病名表記「急性化膿性歯髄炎」に対するレセプト表記「Pul」が選べるようにする予定である。

歯科標準病名マスターでは病院歯科、一般開業歯科含め、全ての歯科領域で使用可能なように約2500の病名表記を提示しているが、その中には一般開業歯科では常時必要としない病名も多く含ま

れている。そのため、一般開業歯科で常用すると思われる病名からなる補助テーブルの提供を検討している。

謝辞:ご協力頂いた日本歯科医師会、日本歯科医学会、財団法人口腔保険協会、保健医療福祉情報システム工業会医事コンピュータ部会歯科システム委員会はじめ関係各位に感謝申し上げます。一部、文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業に拠った。

参考文献

- [1] 歯科医療情報の標準化作業—ICD-DA対応歯科標準病名マスターについて—, 齊藤孝親, 中山均, 佐々木好幸, 鈴木一郎, 玉川裕夫, 成澤英明, 萩原芳幸, 日高理智, 森本徳明, 山田卓也, 西田悟, 医療情報学, 22 (suppl.): 537-538, 2002.
- [2] ICD-DA対応歯科標準病名マスターとその課題, 齊藤孝親, 中山均, 佐々木好幸, 鈴木一郎, 玉川裕夫, 成澤英明, 萩原芳幸, 日高理智, 森本徳明, 山田卓也, 西田悟, 医療情報学, 23(1):114, 2003.

生活歯漂白とエナメル質の耐酸性獲得

池見 宅司

日本大学松戸歯学部保存Ⅰ（保存修復学）

Department of Operative Dentistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Prof. Takuji IKEMI)

870-1, Sakaecho, Nishi-2, Matsudo, Chiba 271-8587 Japan

Vital tooth whitening and acquiring acid resistance of enamel

In order to prevent dental caries, research has been conducted to increase the acid resistance of enamel by the effective treatment with fluoride. Koulourides and colleagues treated experimental early-stage enamel caries with fluoride and their results from an acid-resistance test showed that appeared to be a remineralized layer. In addition, contact microradiograms revealed that these fluoride-treated teeth were more acid resistant than untreated teeth. Several recent studies have reported that a combination of fluoride treatment and laser irradiation increases the acid resistance of enamel. These findings suggest that demineralized or purified enamel reacts favorably with fluoride. The level of interest shown in dental esthetics has increased in recent years, and vital teeth are whitened to improve tooth discoloration. Tooth whitening has been received favorably because it is a nonabrasive technique. However, with regard to office bleaching, some reports state that this type of whitening does not cause structural changes in enamel, while other studies found that, due to its potent oxidative action, a 35% hydrogen peroxide solution not only decomposes organic compounds responsible for discoloration but also demineralizes inorganic compounds that lead to an unevenness of the enamel surface. In any case, it was considered that the organic compounds on enamel surface, such as pellicle, were eliminated immediately after whitening, and whitened teeth were therefore more susceptible to acid damage and demineralization. We believe that as a consequence of this process, the ideal time to perform an acid-resistant treatment is after tooth whitening, and this combination of esthetic improvement and caries prevention has important implications in clinical dentistry. To date, we have published reports on the effects of fluoride on the acid resistance of enamel following vital tooth whitening and structural changes on the enamel surface following vital tooth whitening combined with carbon dioxide laser irradiation. Here we present a summary of our past studies.

Key words

- ・ Vital tooth whitening
- ・ Fluoride
- ・ Acid resistance
- ・ Carbon dioxide laser

和文抄録

齲蝕予防のために歯質の耐酸性獲得を目的として、従来から、フッ化物をより効果的に歯質に取り込ませる研究が行われている。Koulouridesらは人工的に作製したエナメル質初期齲蝕にフッ化物を作用した後、耐酸性試験を行うと、脱灰部に再石灰化と考えられる層が観察され、健全歯質よりも耐酸性が獲得されているコンタクトマイクロラジオグラムを示している。そして、今日では、フッ化物とレーザーを併用することでエナメル質の耐酸性が獲得されたとの研究報告がみられる。これらのことは、一度脱灰あるいは浄化された歯質はフッ化物と良好に反応することを示唆している。

一方、最近の審美歯科に対する関心の高まりとともに、変色歯の色調改善のために生活歯の漂白が行われるようになり、歯を削除する必要のないことから好評を得ている。オフィスブリーチングによる漂白に関して、エナメル質の構造的変化は認められないとする報告と、35%過酸化水素水はその強い酸化作用により着色成分の有機質の分解だけでなく無機質が脱灰されエナメル質表面が凹凸を示すとの報告もみられる。いずれにしても、漂白直後のエナメル質表面はペリクルなどの有機質が除去されて、酸に対する抵抗性が低下し、脱灰されやすいものと想像される。

そこで、著者らは、漂白直後の歯質は耐酸性獲得の好機であり、審美性の回復と齲蝕予防が同時に行われることは、歯科臨床にとって非常に有意義であると考えて、生活歯漂白後のエナメル質耐酸性とフッ化物の効果、および炭酸ガスレーザーを併用した際のエナメル質表層の変化について論文発表しており、それらの内容をまとめてここに報告する。

キーワード

- ・ 生活歯漂白
- ・ フッ化物
- ・ 耐酸性
- ・ 炭酸ガスレーザー

緒 言

齲蝕予防のために歯質の耐酸性獲得を目的として、従来から、フッ化物をより効果的に歯質に取り込ませる研究が行われている。Koulouridesらは人工的に作製したエナメル質初期齲蝕にフッ化物を作用した後、耐酸性試験を行うと、脱灰部に再石灰化と考えられる層が観察され、健全歯質よりも耐酸性が獲得されると報告している^{1, 2)}。このことは、一度脱灰された歯質はフッ化物と良好に反応することを示唆している。さらに、今日では、フッ化物とレーザーを併用することでエナメル質の耐酸性が獲得されたとの研究報告がみられる^{3, 4)}。

一方、最近の審美歯科に対する関心の高まりとともに、変色歯の色調改善のために生活歯の漂白が行われるようになり、歯を削除する必要のないことから好評を得ている⁵⁾。オフィスブリーチングによる漂白に関して、漂白後のエナメル質の構造的変化は、リン酸等の酸処理に比べ、非常に軽微で、エナメル質表層の有機質が除去されたと考えられるSEM像が観察されている。^{6, 7)} したがって漂白直後のエナメル質表面はペリクルなどの有機質が除去されて、酸に対する抵抗性が低下し、脱灰されやすいものと想像される。しかし、エナメル質表面が浄化されており、フッ化物が取り込まれやすい一面もあるのではないかと考えられた。そこで、著者らは、漂白直後の歯質は耐酸性獲得の好機であり、審美性の回復と齲蝕予防が同時に行われることは、歯科臨床にとって非常に有意義であると考えて、生活歯漂白後のエナメル質耐酸性とフッ化物の効果、および炭酸ガスレーザーを併用した際のエナメル質表層の変化について論文発表しており^{8, 9)}、それらの内容をまとめてここに報告する。

材料および方法

実験1. フッ化物塗布効果

(1) 試料作成

ウシ下顎前歯唇側面のエナメル質表面を削除し、平坦となったエナメル質をさらに、No.2000インペリアルラッピングフィルム(3M)にて最終研磨を行った。そのエナメル質表面に直径5mmの穴を開けたプラスチックフィルム製のウインドウを貼付して試料とした。

漂白剤はハイライト(松風)を使用した。混和したペーストをウインドウ内の歯面に塗布し、6分間放置後、キュアリングライト(XL-3000, 3M)照射器にて60秒間光照射した。照射後、さらに2分間放置して水洗を行った。この操作を3回繰り返して漂白処理試料とした。

フッ化物は9400ppmFのフッ化ナトリウムとフッ化アンモニウムそして酸性フッ素リン酸溶液(フローデンA、サンスター)を使用した。各フッ化物をウインドウ内の歯面に120秒間作用し、水洗後、再度120秒間作用してフッ化物作用試料とした。

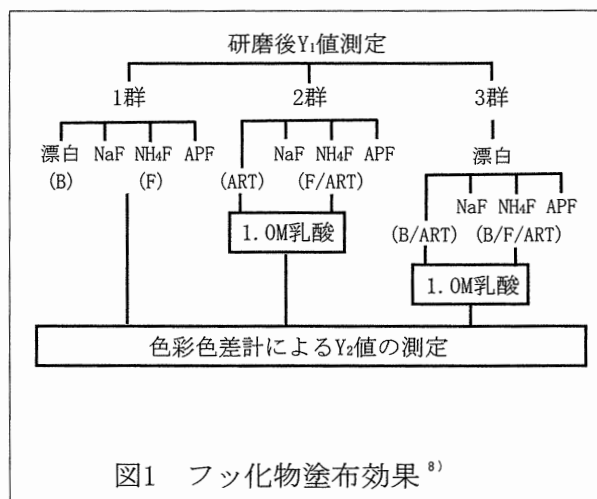


図1 フッ化物塗布効果⁸⁾

(2) 耐酸性試験

耐酸性試験(以下、ART)は、杉山の方法に準じて行った¹⁰⁾。まず、色彩色差計(CR-321、ミノルタ)にて研磨直後のY値(Y1)を測定する。次に各々の処理を施した後、1.0M乳酸をウインドウ内に60秒間作用させ、15秒間水洗し、10秒間乾燥後、同様に色彩色差計でY値(Y2)を測定する。そして、 $Y2 - Y1 = \Delta Y$ からエナメル質表面の反射量の差を求めた。

試験試料は以下の3群に分けた(図1)。

1群: 漂白処理したもの(B)。

各種フッ化物を作用したもの(F)。

2群: 耐酸性試験を行ったもの(ART)。

各種フッ化物を作用後、耐酸性試験を行ったもの(F/ART)。

3群: 漂白処理後、耐酸性試験を行ったもの(B/ART)。

漂白処理後、各種フッ化物を作用させて耐酸性試験を行ったもの(B/F/ART)。

実験はそれぞれの条件で7試料ずつ行い、各群について危険率5%(Scheffe)で多重比較検定を行った。

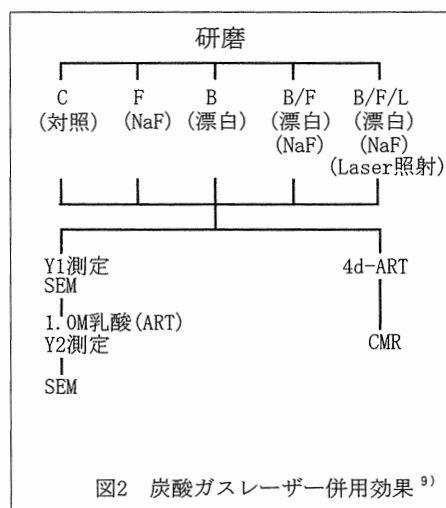


図2 炭酸ガスレーザー併用効果⁹⁾

実験2. レーザー併用効果

(1) 試料作成

実験1(1)と同様の方法で試料を作製した。試料は以下の処理を施し、図2に示す手順で実験を行った。

C：無処理

F：フッ化物塗布

B：漂白

B/F：漂白/フッ化物塗布

B/F/L：漂白/フッ化物塗布/レーザー照射

最終研磨後、15分間超音波洗浄した試料を無処理のCとした。フッ化物は、2%NaF溶液（ネオ）を使用し、これをウインドウ内の歯面に4分間作用後、十分に水洗してFの試料とした。漂白試料をBとし、1回の漂白剤放置時間は3分間、光照射は4分間で行った。漂白後、ウインドウ内にフッ化物を塗布して4分間作用したものをB/Fの試料とした。さらに、B/Fの手順に従って作製した試料にレーザー照射を1スポット3秒で、合計12秒間行ったものをB/F/Lの試料とした。

レーザーは、炭酸ガスレーザー（Panalas C10、松下）を使用し、スーパーパルスモードでレーザー照射を行った。レーザーの出力は7W、1スポットの照射時間は3秒の条件で行った。照射野径を3.0mmとし、その際の照射エネルギー密度は、パワーメーター（Nova、Ophir）にてチップ先端からの照射出力を測定し、スーパーパルスモードの照射エネルギー密度に換算すると20.6 J/cm²であった。

(2) 耐酸性試験

耐酸性試験は実験1 (2) と同様に行い、 ΔY を算出した。

(3) 耐酸性試験後のエナメル質表面のSEM観察

各々の乳酸処理後のエナメル質表面についてSEM観察を行った。走査型電子顕微鏡はFE-SEM（S-4500、日立）を用いた。

(4) 4日間耐酸性試験後のコンタクトマイクロラジオグラム

研磨面以外の歯面は、スティッキーワックスで被覆し、エナメル質表面の両端0.5mmにはネイルバーニッシュを塗布した。試料は3.0mM Caを含んだ0.01M乳酸緩衝溶液pH=4.0、50ml中に浸漬し、4日間37℃恒温槽中に静置して耐酸性試験（以下4d-ART）を行った。

4d-ART後、リゴラック（応研）に包埋し、アイソメット（Buehler）で切断して厚さ約90 μ mまで研磨した。試料の下面にフィルム（ソフロン）を置き、軟X線装置（SOFRONSRO-M40、MFG）にてコンタクトマイクロラジオグラム（以下CMR）を作製し、光学顕微鏡にて観察を行った。

結 果

実験1. フッ化物塗布効果

色彩色差計によるエナメル質の耐酸性試験で、1群において（図3-1）、フッ化ナトリウムは漂白試料や他のフッ化物に比べて有意に低い ΔY 値を示した。漂白およびフッ化アンモニウム、酸性フッ素リン酸溶液の間には有意差が認められなかった。

2群において（図3-2）、ARTはF/ARTと比較して有意に高い ΔY 値を示し、F/ART間では有意差が認められなかつ

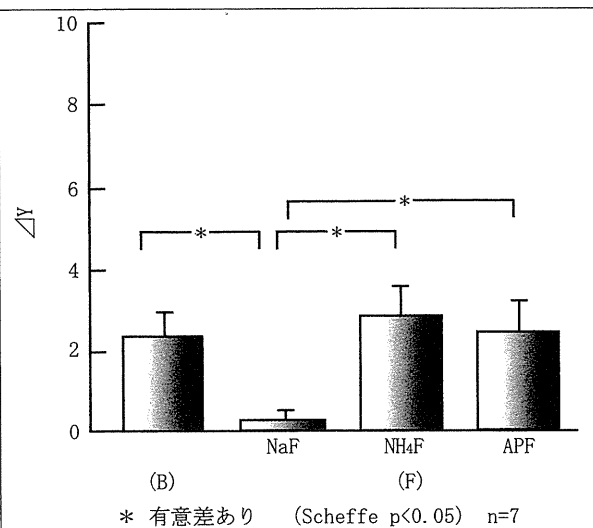


図3-1 1群：漂白処理（B）および各種フッ化物を作用した（F）試料の ΔY ⁸⁾

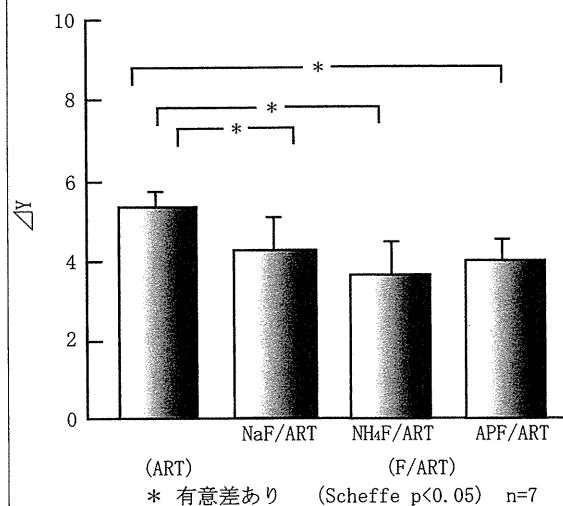


図3-2 2群：耐酸性試験（ART）および各種フッ化物を作用後、耐酸性試験を行った（F/ART）試料の ΔY ⁸⁾

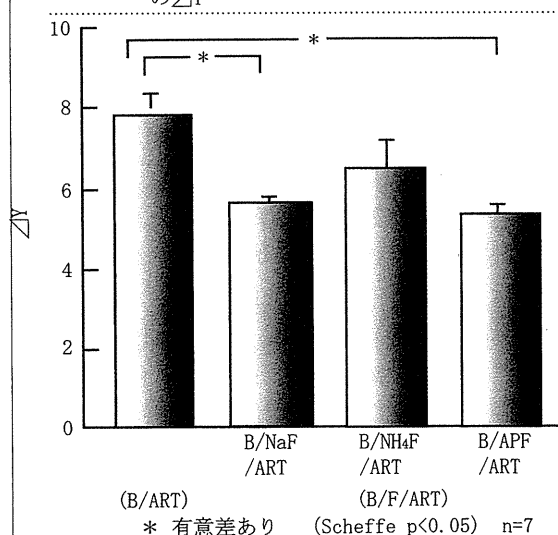


図3-3 3群：漂白処理後、耐酸性試験（B/ART）および漂白処理後、各種フッ化物を作用させて耐酸性試験を行った（B/F/ART）試料の ΔY ⁸⁾

た。

3群において (図3-3)、B/ARTはB/F/ARTのフッ化ナトリウムおよび酸性フッ素燐酸溶液と比較して有意に高い ΔY 値を示し、B/F/ART間では有意差が認められなかった。

本実験において耐酸性試験を行った試料ではB/ARTが最も高い ΔY 値を示した。そして、フッ化物を作用したものではフッ化アンモニウムが低い ΔY 値を示し、漂白処理後にフッ化物を作用したものでは酸性フッ素燐酸溶液が低い ΔY 値を示した。

実験2. レーザー併用効果

1. 色彩色差計によるエナメル質の耐酸性試験では、CとB、CとB/F、FとB/F以外の各試料間に有意差が認められた (図4)。そして、B/F/Lは他の全ての試料よりも有意に低い ΔY 値を示した。

2. エナメル質表面のSEM観察

耐酸試験後のSEM像を図5に示した。Cでは、エナメル小柱の形態が認識され、結晶間に空隙の生じた像が観察された。Fではエナメル小柱の形態が確認でき、小さなアパタイト様の結晶が認められ、それらの結晶と結晶の間には小さな空隙がみられた。Bでは、結晶間の空隙が拡大し、エナメル小柱の形態が不明瞭であった。B/Fではエナメル小柱の形態が不明瞭で、結晶はCに比べ密に存在しているが、結晶と結晶の空隙の少ない像が観察された。B/F/Lでは、エナメル小柱の形態は不明瞭であるが、Fよりも粒径の大きい結晶が認められ、結晶と結晶の空隙は小さく、密に結晶で覆われた表面形態が観察された。

3. 4d-ART後のCMR観察

4d-ART後のCMRを図6に示した。フッ化物を作用した試料ではいずれも表層に一層のX線不透過像が観察され、B/F/Lでは厚く明瞭なX線不透過像が観察された。また、FとB/F/Lではエナメル質表層の溶解が認められなかった。4d-ARTによるエナメル質表層の溶解を含む脱灰深度はB/F/Lが最も浅く、F、B/F、C、Bの順に深くなった。

考 察

歯の色調は、患者の対人関係や精神面に影響を与えることが考えられ、最近の歯科医療では、歯科疾患を処置することだけにとどまらず、患者の審美的要求に対応できることが求められている。生活歯漂白直後のエナメル質の構造的変化については、漂白剤の作用回数にもよるが、きわめて軽微な変化で、有機質が除去されたSEM像が観察されている⁷⁾。したがって漂白直後のエナメル質表面は新鮮なエナメル質が露出し、化学的な反応性が亢進しているものと推測される。

このように新鮮なエナメル質が露出した状態にある漂白直後の歯はフッ化物を取り込みやすいものと推測され、歯の審美的回復と耐酸性獲得が同時に達成されれば今後の歯科医療に貢献できるものと考えて研究を行ってきた。

第一段階として、エナメル質最表層の耐酸性を数値化するために、色彩色差計の ΔY 値に着目した。当教室の杉山

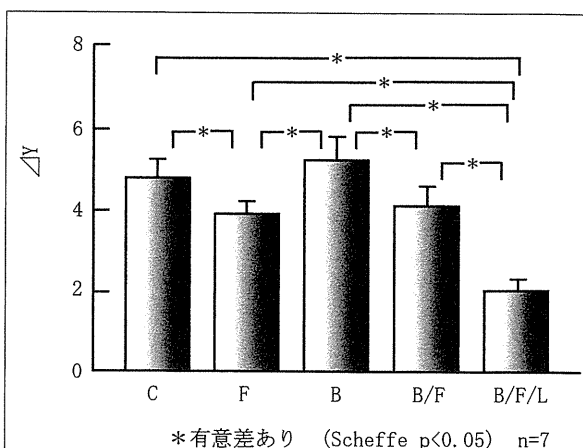


図4 色差計を用いた耐酸性試験後 (ART) の ΔY 値
C:無処理、F:フッ化物塗布、B:漂白、
B/F:漂白/フッ化物塗布
B/F/L:漂白/フッ化物塗布/レーザー照射

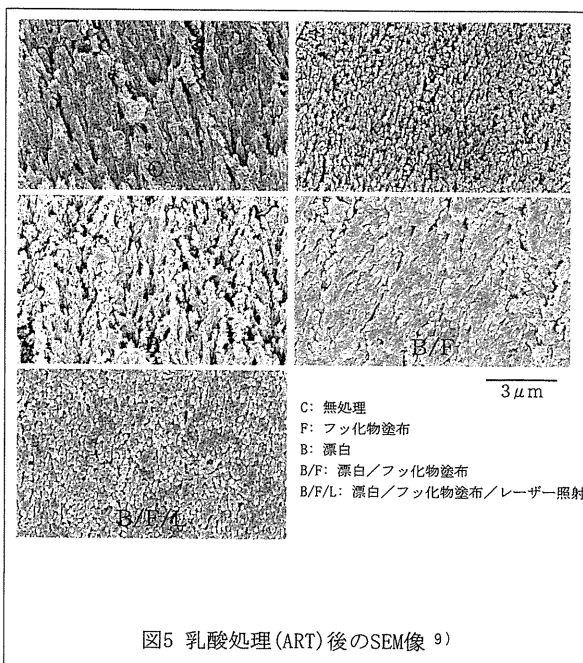


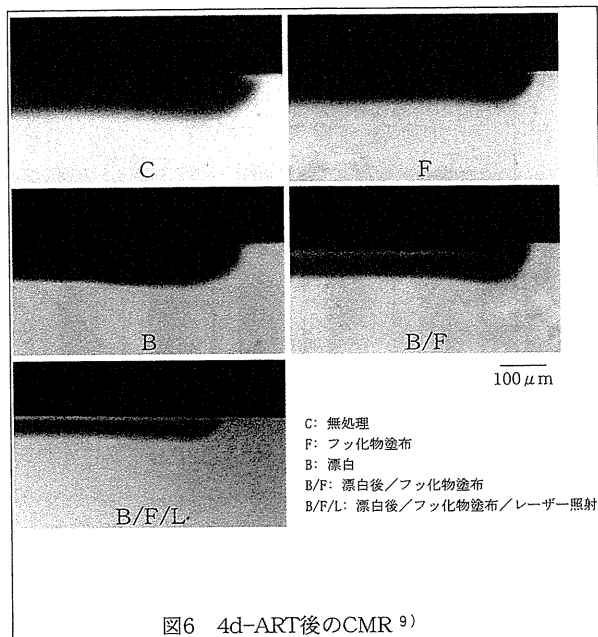
図5 乳酸処理 (ART) 後のSEM像 9)

は、乳酸によるエナメル質表面の脱灰程度と ΔY 値の変化が良好な相関を示すことを見出し、その際の適切な乳酸の濃度と作用時間を報告した¹⁰⁾。

第二段階として、この ΔY 値を指標として、フッ素含有ペーストと炭酸ガスレーザーを併用することで、歯質の耐酸性獲得を向上させ得ることが深沢正幹らによって明らかにされた。この研究ではレーザー照射後にフッ化物を塗布し、さらにレーザー照射することが効果的であると唆している⁹⁾。

これらの研究成果を踏まえ、生活歯漂白後の歯質に対するフッ化物の効果とフッ化物をより効率的に取り込ませる方法について調べることにした。

実験1において、漂白後のエナメル質の耐酸性は低く、飲食物による酸の影響を受けやすいものと考えられるが、フッ化物を作用することで耐酸性を獲得することが示された。しかし、NaFあるいは酸性フッ素リン酸溶液を漂白直後の

図6 4d-ART後のCMR⁹⁾

エナメル質表面に作用しても、漂白前のエナメル質表面の耐酸性と同程度で、それ以上の耐酸性は得られなかった(図3-2、3-3)。

前述のように、実験的に乳酸などにより一度脱灰されたエナメル質表面は、フッ化物を作用させることで耐酸性を獲得することが報告されている^{2, 11)}。また、炭酸ガスレーザー併用の際、レーザー照射、フッ化物塗布そしてレーザー照射の順で行うのが効果的であるとしている。その理由の一つとして、まずレーザー照射を受けたエナメル質表面は浄化されてフッ化物との反応性が高くなっており、さらに炭酸ガスレーザーの熱作用により歯質との反応が亢進するのではないかと考えられた⁴⁾。これらの知見から、実験2では、漂白によって既にエナメル質表面の汚物が除去されているものと考え、フッ化物とレーザー併用の効果を検討する実験を行った。

その結果、CとFでは有意差が認められ、フッ化物塗布による耐酸性の効果は従来の報告と同様であった。しかし、CとBでは有意差は認められないが、Bの方が乳酸による影響を受けやすい傾向が示された。BとB/Fでは有意差が認められ、フッ化物塗布の効果が実験1と同様に示された。特筆すべきことは、B/F/Lは他の全ての試料よりも有意に高い耐酸性が得られており、健全歯にフッ化物を作用したものよりも高い耐酸性が得られていたことである(図4)。

そこで、色彩色差計のY値に影響を与える、エナメル質表面の形態をSEM観察すると、Bではエナメル質表面の凹凸が顕著で、F、B/FおよびB/F/Lでは粗造感がCやBに比べて小さく、B/F/Lにおいてエナメル質表面の形態変化の最も少ない像が観察された。これらの粗造感に順位をつけると、色彩色差計におけるΔY値の順位と同様であった(図5)。

さらに、4d-ARTを行ってエナメル質が獲得した耐酸性をCMRにてエナメル質の縦断面から調べた。その結果、図6に示すようにC、B、B/Fではエナメル質表面が溶解して

いる像が認められ、Bでは約50 μmの深さまで溶解していた。フッ化物を作用した試料ではいずれも表層に一層の不透過像が観察され、B/F/Lでは厚く明瞭な不透過像が観察された。そして、4d-ARTによるエナメル質表面の溶解を含む脱灰深度はB/F/Lが最も浅く、F、B/F、C、Bの順に深くなった。これらのCMRは視覚的にも、漂白後にフッ化物塗布を塗布してレーザー照射することで健全エナメル質にフッ化物を塗布したものよりも耐酸性が向上しているものと考えられた。

以上により、生活歯の漂白はエナメル質の耐酸性を低下させるが、漂白直後にフッ化物塗布とレーザー照射を併用すると、健全エナメル質にフッ化物を作用したものよりもエナメル質の耐酸性が向上することが示唆された。そして、フッ化物塗布とレーザー照射の併用は、短時間でエナメル質の耐酸性を向上させる効果があり、臨床的にも有意義な方法であろうと考えられた。さらに今後は、ホームブリーチングの需要が高まるものと予想され、特に、臼歯部に関してはブリーチングという観点よりも、歯質強化を主目的とした応用方法の一つとして期待される。

レーザー照射に関しては、同じ炭酸ガスレーザーであってもメーカーの違いにより照射モードと照射エネルギーが異なることや、照射器による実質照射エネルギーの違い等を考慮しなければならず、固定した状態で照射すると褐色に着色することもあるので、軽々に使用することは避けなければならない。

結 論

1. 漂白処理後に耐酸性試験を行ったものは(B/ART)、色彩色差計によるエナメル質の表面形状変化測定において、本実験中で最も高いΔY値を示し、漂白後のエナメル質は酸による脱灰を受けやすいことが示唆された。そして、漂白処理後にフッ化ナトリウムあるいは酸性フッ素リン酸溶液を作用したもの(B/NaF/ART, B/APF/ART)では、漂白処理前のエナメル質耐酸性と同程度まで回復していた。

3. 耐酸性試験(ART)後の表面形状変化測定において、漂白/フッ化物塗布/レーザー照射(B/F/L)が最も低いΔY値を示し、健全エナメル質にフッ化物塗布した(F)よりも耐酸性は向上していた。

4. 耐酸性試験(ART)後のSEM像において、漂白試料(B)では乳酸によって最も脱灰が進行し、エナメル小柱の形態が不明瞭となった像が観察され、漂白/フッ化物塗布/レーザー照射(B/F/L)では密な結晶がエナメル質表面に観察された。

5. 4日間耐酸性試験(4d-ART)後のCMR観察において、漂白試料(B)ではエナメル質表面から約50 μmが溶解しており、エナメル質表面の溶解を含む脱灰深度は漂白/フッ化物塗布/レーザー照射(B/F/L)が最も浅く、フッ化物塗布(F)、漂白/フッ化物塗布(B/F)、無処理(C)、漂白試料(B)の順に深くなった。

※使用した図は日本歯科保存学会誌43巻5号深沢正幹他と45巻2号内山敏一の論文から引用した。

参考文献

1. Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T: An Intraoral Model for Studies of Fluoride Incorporation in Enamel; J Oral Pathol 3, 185-196, 1974.
2. Koulourides T; Increasing Tooth Resistance to Caries through Remineralization. In: Third Annual Conference on Foods, Nutrition, and Dental Health, Vol.2, J. J. Hefferren and H.. M. Koehler, Eds., Chicago: American Dental Association, pp. 193-207, 1983.
3. 田籠祥子, 森岡俊夫: エナメル質耐酸性付与に及ぼすYAGレーザー照射とフッ化物塗布の併用効果; 口腔衛生会誌 34, 344-345, 1984.
4. 深澤正幹: 炭酸ガスレーザーと試作フッ素含有ペースト併用による歯質耐酸性効果; 日歯保存誌 43, 583-591, 2000.
5. 東光照夫, 久光 久: 無髄変色歯の漂白とオフィスブリーチング (有髄変色歯の漂白), 久光 久, 松尾 通, 山岸一枝: 漂白; 第1版, デンタルダイヤモンド社, 東京, 74-81, 2000.
6. 山岸一枝: カウンセリングからメンテナンスまで, 久光 久, 松尾 通, 山岸一枝: 漂白; 第1版, デンタルダイヤモンド社, 東京, 60-64, 2000.
7. 小林 平, 妻鹿純一, 三島弘幸, 小澤幸重, 後藤治彦, 小池國光, 水川一廣: 生活歯の漂白-Hi Lite™を用いた漂白処理による歯質表層の変化-; 補綴誌39,303~307,1995
8. 深澤正幹, 内山敏一, 杉山道紀, 大村基守, 田川剛士, 荻野 朗, 河野善治, 池見宅司: 生活歯漂白後のエナメル質の耐酸性; 日歯保存誌43, 1107-1112, 2000.
9. 内山敏一: 生活歯漂白フッ化物塗布と炭酸ガスレーザー併用によるエナメル質耐酸性; 日誌保存歯45, 205-215, 2002.
10. 杉山道紀: エナメル質表面の耐酸性の評価に関する研究-色彩色差計を用いた測定法-; 日大口腔科学25, 326-338, 1999.
11. Ikemi T, Koulourides T: Abrasion biopsy in studies of mineral density of experimental enamel lesions; J Dent Res 67, 508-514, 1988.

いけみ・たくじ●日本大学教授・松戸歯学部保存学Ⅰ教室、1975年・岩手医科大学歯学部卒業。1975年・日本大学松戸歯学部助手。1982年・日本大学講師。1990年・日本大学助教授。1994年～日本大学教授

遺伝子研究の臨床応用と展望

前田隆秀、清水武彦、清水邦彦、中村 均

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座
(〒271-8587 千葉県松戸市栄町西2-870-1)

小児歯科は予測—gene mapping と臨床応用、病原体の検出—

小児歯科は予測の臨床といって良いほど予測が重要な要素を含んでいる。主たる小児歯科疾患である、う蝕、歯周疾患、外傷の予後、不正咬合、顎関節症において予測をしながら対応している。予測には過去のデータと現在のデータから予測する、あるいは近似の症例を参考にして予測し、加療にあたっていた。むしろこの手法は普遍であり縦断データの蓄積が予測の的確性を増大させる。一方、不慮の事故など特別な疾患は別としてほぼすべての疾患・異常は環境要因と遺伝要因によって成立する。その疾患が主に環境要因によって発症することを証明するには一卵性双生児の研究によって遺伝要因を排除して観察し、主に遺伝要因によって発症することを証明するには環境要因が可及的に同一な兄弟姉妹を用いた研究が適している。しかし、ヒトでそのような条件を満たす子どもを捜すことが難しいこととヒトに負荷を与えることは倫理面で不可能である。そこで動物実験によって証明することが行われている。遺伝要因の占める割合の多寡は別としてこの種の研究にはマウ

スが用いられることが多い。マウスが遺伝研究に頻用されるのは基本的に哺乳動物はヒトの遺伝子と相補性が高く、マウスで解明された原因遺伝子はヒトでも同一遺伝子が関与している点、妊娠期間が20日ほどであること、妊娠可能となる日齢が60日ほどと極めて短いこと、一度に出産する仔数が6～7匹ぐらいと多いこと。さらに環境要因を同一にできること、体が小さく飼育する場所を取らないこと等である。決定的なことはマウスゲノムのシークエンスが終了していることである。

そしてマウスは近交系化(ほぼすべての相同遺伝子がホモ接合体)された種(strain)が多く、連鎖解析に必要な遺伝子マーカーの多型が公開されている。なお、連鎖解析とは、複数の遺伝子が同一染色体上で極めて近い位置に座位しているとき、それらの遺伝子は減数分裂時にみられる相同組換えによっても期待されるよりも高い割合で組となって遺伝することをいい、この連鎖を利用して遺伝子マーカーから疾患・異常の原因遺伝子を探る。

この手法によって高い確率で候補となる遺伝子をマウスから探り、次に同一遺伝子をヒト染色体上からコンピュータで見出す。そしてその疾患・異常を有するヒトの家系から候

補遺伝子が原因遺伝子の一つであるか否かを確認する。

マウスあるいはヒトにおける連鎖解析によって候補・原因遺伝子の一つが解明され、その臨床応用を見据えた研究ならびに症例を報告する。

一方、原因遺伝子を明らかにする研究とは全く異なるが、ウイルスあるいは細菌感染症における確定診断、治療の効果、予後などが、血液あるいは唾液中のウイルス、細菌を定量することによって可能となっている。今回はHSV感染症に絞ってウイルスDNAの定量による臨床応用を報告する。

歯の先天欠如に関わる遺伝要因

小児歯科領域において、歯列不正や咀嚼障害の原因となる歯の先天性欠如の原因を究明することは極めて重要である。臨床のなかで歯の先天欠如には頻繁に遭遇し、第三大臼歯に続いて、上顎側切歯、第二小臼歯、下顎中切歯の欠如の頻度が高いとされている。歯の先天性欠如は家族内で遺伝性にみられることが多いことから、遺伝子の変異によって生じると考えられているが、原因遺伝子の特定まで至った例は日本では報告がなく、海外で数例があるのみである。1996年にVastardisらは第二小臼歯と第三大臼歯の先天性欠如を持つ家族において、*MSX1*という遺伝子の変異を発見し、これが歯の先天欠如の原因を明らかにした初めての報告であった。DNAはA(アデニン)、G(グアニン)、C(シトシン)、T(チミン)の4種の塩基の配列で構成されているが、欠損歯の家族の*MSX1*の塩基配列において、本来GであるところがCに変異していた。この結果、歯の形成に必要な正常なタ

ンパクが産生されず、歯が欠如したと考えられた。

そこで著者らは、この報告と類似した部位に先天性欠如を家族性に持つ患者11名に対して、同じ遺伝子変異が*MSX1*遺伝子内にもみられるか否か遺伝子解析を行った。なかでも代表的な多数歯欠損のパノラマエックス線写真を図1に示した。しかしながら、すべての患者の*MSX1*遺伝子の構造に変異は認められず正常であり、おそらく*MSX1*以外の遺伝子変異が原因と考えられる。つまり、同じ部位の歯の先天欠如の原因遺伝子は必ずしも同じではないということである。一方2000年にStocktonらは第一大臼歯から第三大臼歯までが先天的に欠如している家族において*PAX9*遺伝子の変異を発見した。症候群とは関連のない先天欠如歯の原因遺伝子で、ヒトにおいて解明されているのは*MSX1*と*PAX9*だけであり、日常臨床で最もよく目にする上顎側切歯や第二小臼歯の欠如の原因となる遺伝子変異は未だ発見されていない。

歯の発生に関わる遺伝子の解析にヒトの試料を用いることは、環境要因の影響や試料採取の困難の点から限界があるので、動物モデルを用いて研究が広く行われている。特に近交系マウスは多数の飼育が容易で、ライフサイクルが短く、またヒト遺伝子と相補性が高いことから、マウスに生じる異常の原因を解明することによって、ヒトに生じる同様な異常の原因解明に還元することが可能である。マウスは片顎片側で1本の切歯と3本の臼歯を持ち、特に臼歯の形態はヒトによく似ている。歯の先天欠如を持つマウス系統がいくつかあり、Tabbyというマウス系統は高い頻度で第三臼歯が欠如しており、その原因はX染色体上の遺伝子の変異であることがわかって

図1 遺伝性にみられた多数歯の先天性欠如(*:写真の患児)

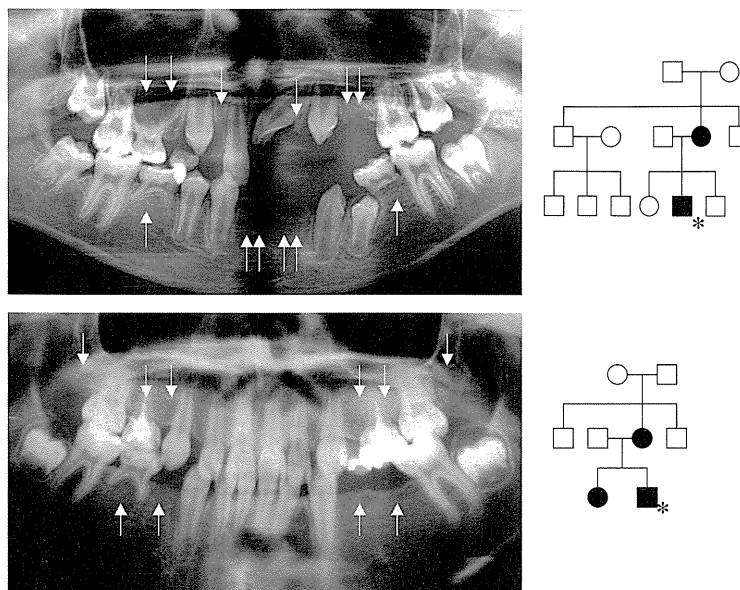
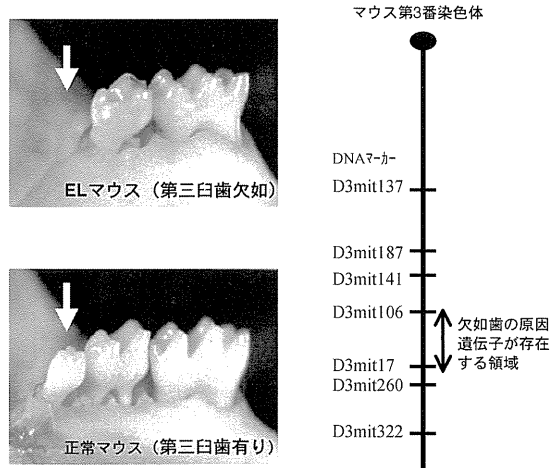


図2 ELマウスの第三臼歯欠如とマウス第3番染色体の連鎖地図



いる。

著者らはELマウスという近交系マウスの1種が第三臼歯を100%欠如していることを見出し、ELマウスを用いて先天欠如歯の原因遺伝子の解明を目指して研究を続けている。組織学的検索からELマウスの第三臼歯胚は蕾状期以降発育しないことがわかっている。その原因を探るため、連鎖解析という手法を用いてELマウスの先天欠如歯の原因遺伝子がどの染色体のどの領域に存在するのか

を調べた。その方法はELマウスと正常マウスを交配して交雑第一世代を得、続いて交雑第一世代同士を交配して交雑第二世代を得る。交雑第二世代での歯の先天欠如の有無と、すべての染色体に配置したDNAマーカーの遺伝子型との関係を統計学的に分析した。その結果、第3番染色体の中間領域に欠如歯の原因遺伝子が存在する可能性を見出した。図2にELマウスの先天欠如歯と第3番染色体の模式図を示した。

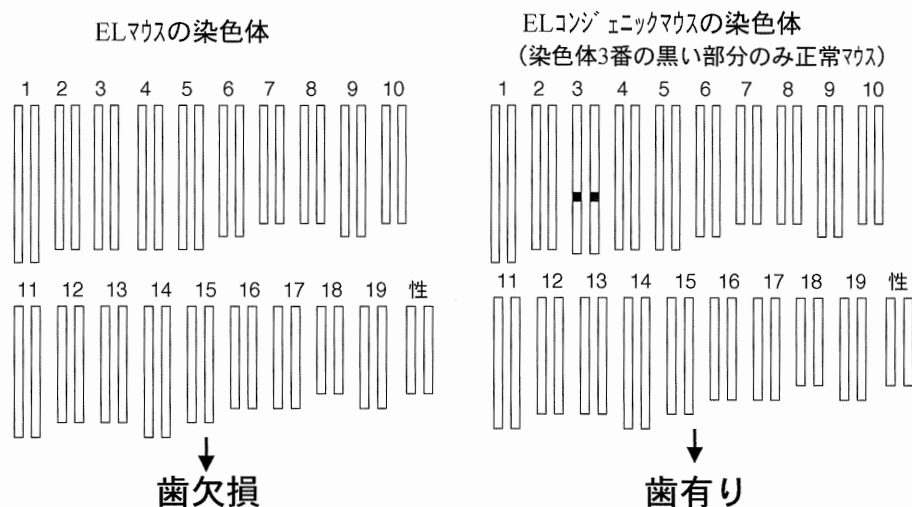


図3 ELマウスとELコンジェニックマウスの染色体の模式図と第三臼歯の有無

ELマウスの先天欠如歯の原因遺伝子が第3番染色体上にあることを生体内で証明するために、著者らはELマウスと正常マウスの系統的な交配により、ELマウスの染色体3番の中間領域だけを正常マウスの染色体と組換えたコンジェニックマウスを作成した。図3にコンジェニックマウスの染色体の模式図を示した。これにより100%第三臼歯が欠如しているELマウスに第三臼歯が出現するかどうかを調べた。その結果、ELコンジェニックマウスに95%以上第三臼歯が出現した。つまり、染色体3番の中間領域に先天欠如歯の原因遺伝子があることを生体内で証明することができた。染色体3番の中間領域には歯の発生との関連が報告されている*Lef1*と*Egf*遺伝子が存在し、この2つの遺伝子が原因遺伝子の候補と考えられる。今後は、これらの遺伝子がELマウスの第三臼歯胚においてどのような発現をしているかを解析していく予定である。

ELマウスに発症する先天欠如歯の原因を解明することができれば、ヒトの欠如歯、特

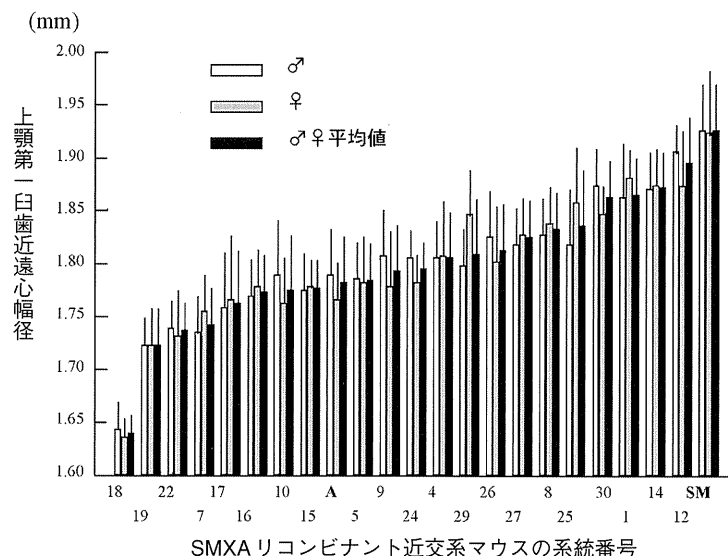
にマウスの第三臼歯はヒトの智歯に相当するため、智歯欠如の原因究明に大きく貢献できると考えられる。また、智歯は周囲炎や埋伏などの多くの問題を生じやすいため、ELマウスの第三臼歯欠損の機序をヒトに応用し、智歯の発生を止めることも可能になるかもしれない。加えて、将来的な歯の再生の実現にも貢献できると期待している。

歯と顎の大きさを決める遺伝要因

小児歯科領域において、咬合異常の原因を究明することは極めて重要であり、顎骨および歯の大きさは咬合の異常に直接的に影響する因子である。顎骨および歯の成長には遺伝要因と環境要因が相互に関与している。顎骨と歯の大きさの不調和により咬合異常が生じる症例は小児歯科臨床で頻繁にみられる。そこで著者らは顎骨と歯の大きさに関わる遺伝要因の解明に向けて研究を進めているのでその一部を紹介する。

歯科臨床の中で、歯の大きさは人それぞれ

図4 SMXA リコンビナント
近交系マウスの上顎第
一臼歯近遠心幅径



であり、また兄弟姉妹の歯の大きさや形がそっくりであることにしばしば気付く。双生児を用いた研究や異なる人種間の比較研究により、歯の大きさが環境要因だけでなく、強く遺伝要因の影響を受けることがわかっていく。しかしながら、一体どの遺伝子の影響により歯の大きさが決められているのかは未だわかっていない。ヒトにおいては、古くから男性のほうが女性より歯が大きい傾向にあることが知られており、また、性染色体異常を持つ患者の歯の大きさが小さいことなどから、性染色体上に歯の大きさに影響する遺伝子が存在することが推察されている。しかし、歯の大きい女性や歯の小さい男性もいるので、性染色体上の遺伝子だけで歯の大きさが決められているとは考えにくい。染色体21番のトリソミーであるDown症候群児において歯冠の縮小化がみられ、ここからも常染色体性の遺伝要因の関与がうかがえる。

ヒトを用いた研究では歯や顎の成長に対する環境要因の影響を排除することは困難であるため、著者らは歯と顎の大きさに関与する

遺伝要因を調べるために、近交系マウスを用いている。疾患遺伝子や形態形成に関与する遺伝子の解明の研究には、ヒト遺伝子と相補性が高く対立遺伝子がほぼ100%ホモ接合である近交系マウスが多く用いられている。マウスはライフサイクルが短く継代観察が可能であること、また同一条件下で飼育でき環境要因をほぼ一定にできることから遺伝要因を検索することが可能である。

著者らは、歯の大きさの決定に関与する遺伝子を検索するために、SM/JマウスとA/Jマウスの系統的な交配から作成されたSMXAリコンビナント近交系(RI)マウス21系統226匹の上下顎第一臼歯の歯冠幅径を計測し、連鎖解析により歯の大きさの決定に影響する染色体領域を検索した。SMXA RIマウスの歯冠幅径の計測値を図4に示した。結果として、上顎第一臼歯の大きさに関与する染色体領域を染色体7番、8番、13番、17番上に検出し、下顎第一臼歯に対しては染色体3番、7番、13番、15番上に検出した。すなわち歯の大きさの決定には複数の遺伝子が影

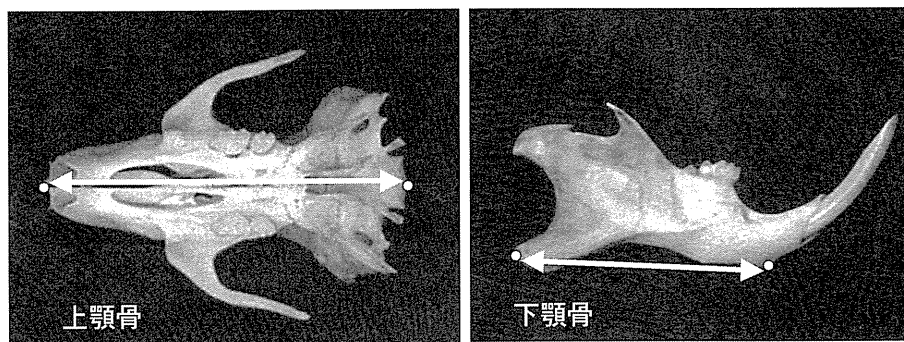


図5 マウスの上下顎骨の前後的大きさの計測点

響していることが明らかとなった。また染色体7番と13番は上顎と下顎に共通しており、このことから歯の大きさに影響する遺伝子群は、異なった歯において一部は共通しており、一部は独立していると考えられた。著者らが検出した染色体領域には、歯の発生と関連深い*Fgf2*や*Tgfb1*遺伝子があり、これらが歯の大きさに関与する候補遺伝子の一部であろうと推測している。

一方、顎骨の大きさに関しては、双生児を用いた研究から、顎骨の形態は強く遺伝要因の影響を受けるとされている。咬合異常のひとつである骨格性不正咬合は遺伝要因が強く影響するとされ、ハプスブルグ家の下顎前突優性遺伝に代表される。しかしながら、歯の大きさと同様に顎骨の大きさに関与する遺伝要因はほとんどわかっていない。

マウスの顎骨の大きさに関しては、複数の近交系マウス系統の遺伝的交配実験により下顎骨の前後的大きさは優性遺伝を示し、多遺伝子が関与していることが明らかとなっている。著者らは、上下顎骨の大きさ決定に関与する遺伝子を検索するために、SMXA RIマウスの上下顎骨の長径を計測し、連鎖解析により顎骨の大きさの決定に影響する染色体領域を検索した。上顎骨の前後的大きさの計測

点は、切歯孔前縁と蝶形骨基部後縁とし、下顎骨の前後幅径の計測点は、オトガイ部と下顎角相当部とし、左右側とも計測した(図5)。結果として、マウスにおいては上顎の長径が大きいマウス系統は下顎も同様に大きく、顎骨の前後的大きさに関与する染色体領域は上下顎で一致し、第10番染色体と第11番染色体であった。第11番染色体に検出した染色体領域には、顎顔面の発生に関わり成長ホルモンの発現にも関係がある*Otx1*遺伝子があり、顎の大きさを決定する遺伝子の1つであろうと推測している。

歯と顎骨の大きさについて同一のマウス系統を用いた実験により、歯の大きさと顎骨の大きさに関与する染色体領域は共通しておらず異なっていた。すなわち、歯の大きさを決める遺伝子と顎の大きさを決める遺伝子は異なっていると思われる。このことは、歯と顎骨の大きさには全く相関がなかったことから推測できる(図6)。

マウスとヒトの遺伝子の相補性は高いため、マウスで歯と顎骨の大きさを決定する遺伝子を特定できれば、将来的にはヒトにおける遺伝子診断に応用し、早期に歯列不正の発症リスクを判定することが可能になると考えられる。また、骨格性反対咬合における思春

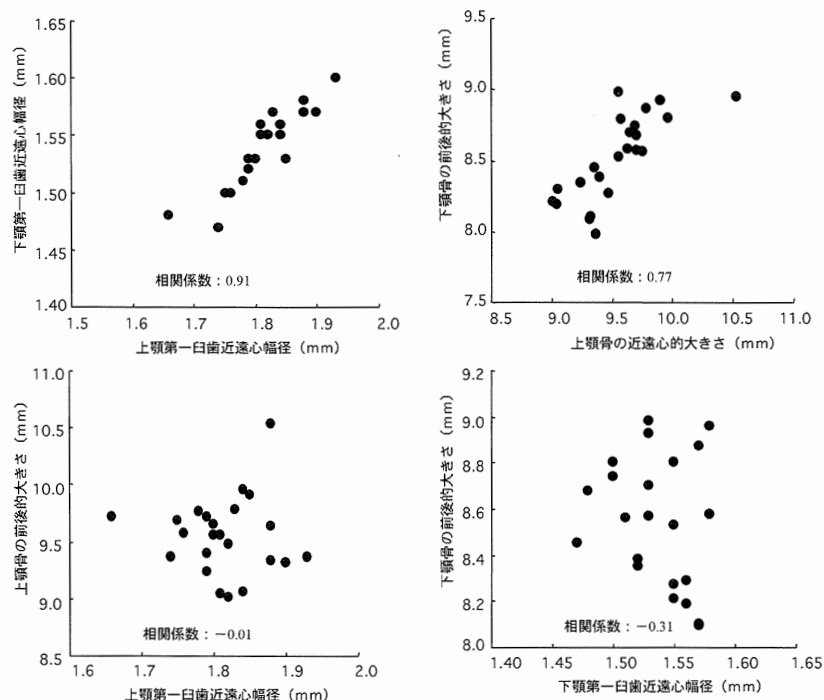


図6 SMXA リコンビナント近交系マウスにおける上下顎骨と歯の大きさの相関

期性の成長スパートなど、顎の成長の予測を遺伝子診断で行うことができるようになると期待している。

エナメル質形成不全症と遺伝子

ヒトの疾患の原因究明や診断・治療法の開発に最も有力な手法の1つにモデル動物、特にマウスを用いた解析がある。ヒトおよびマウスの染色体DNA配列の完全解読がほぼ完了した現在、精力的に遺伝子の機能解析や疾患遺伝子の原因究明が行われている。著者らはENU ミュータジュネシスプロジェクトに参加し、歯に異常を示すマウスを複数発見した。ENU ミュータジュネシスプロジェクトは、アルキル化剤のひとつであるエチルニトロソウレア(ENU)という化学物質をマウスに投与することでDNAに異常を起こし、癌や形

態異常などの疾患モデルを作成するプロジェクトである(詳細は<http://www.gsc.riken.go.jp/Mouse/>を参照)。歯に異常を持つマウスは詳細な解析の結果、遺伝性エナメル質形成不全症であることが判明した。

エナメル質形成不全症はエナメル質に先天的な異常が生じる疾患であり、様々な分類が存在するが、臨床症状により大まかに減形成型、低成熟型、低石灰化型に分類されている。また、エナメル質形成不全症は常染色体優性、常染色体劣性、伴性劣性遺伝など様々な遺伝様式を示す。これまでにエナメル質形成不全を有する家系を対象に遺伝解析を行い、エナメル質形成不全症の原因遺伝子の一つが明らかとなっている。AIHと名付けられたエナメル質形成不全症はエナメルタンパク中で最も豊富に存在するタンパク質であるアメロジェニンの異常による事が知られており、アメロ

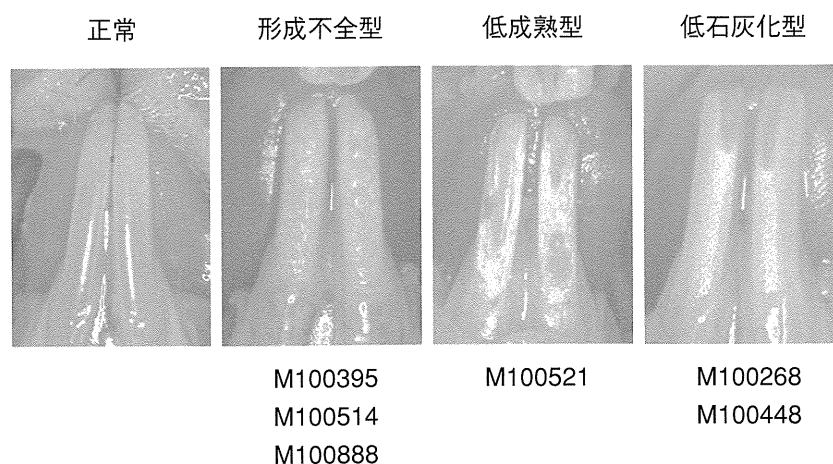


図7

ジェニン遺伝子の異常の位置により AIH は減形成型、低石灰化、低成熟型の様々な症状を示す。さらに全エナメルマトリックスタンパク中1～5%しか含まれないタンパク質であるエナメルリンの異常によるエナメル質形成不全症の報告も存在する。しかしながら、アメロジェニンと比較しエナメルリンの報告が少ないため変異と症状の解析が困難である。

ENUにて処理したマウス10,236匹を解析した結果、6匹のマウスにエナメル質表面の異常を確認した。正常のマウスの切歯は滑らかで黄色い色調を示すがNo. M100395、M100514、M100888のマウスでは切歯の表面が粗造であり、No. M100521のマウスは磨りガラス様の粗造な表面で異常な白い色調を示した。また、No. M100268、M100448のマウスは磨りガラス様の表面に加え一部エナメル質が剥離していた(図7、8)。これらのマウスは優性遺伝形式を示し、歯の異常以外の異常は認められなかった。さらに、この異常を起こす原因を調査するために連鎖解析を行い、原因遺伝子が存在する染色体を解析したところ、これまでにNo. M100395、

M100514、M100521の原因遺伝子がマウス第5番染色体に、No. M100268は第2番染色体に、No. M100888はX染色体に存在することが判明している。マウス第5番染色体にはエナメルリンとアメロブラスチンが存在することが知られているため、No. M100395、M100514、M100521のマウスについて、これら2つの遺伝子の塩基配列を調べたところ、エナメルリン遺伝子の異なった位置に塩基配列の異常が確認できた。M100359ではエナメルリン遺伝子の6489番目の塩基に、M100514では6495番目の塩基に、M100521では6341番目の塩基に異常が確認できた。

図に示した異常は正常なマウスと異常を持つマウスとの掛け合わせにより得られたマウスで、正常の遺伝子と異常な遺伝子を半分ずつ持つヘテロ個体である。異常を持つマウス同士の掛け合わせから得られるホモ個体のマウスでは、エナメル質が完全に欠如していた。

エナメルリン遺伝子の多様な異常がエナメル質の形成異常を起こすことにより、エナメルリンがエナメル質形成に必須であることを示している。エナメル質に含まれるタンパクはエ

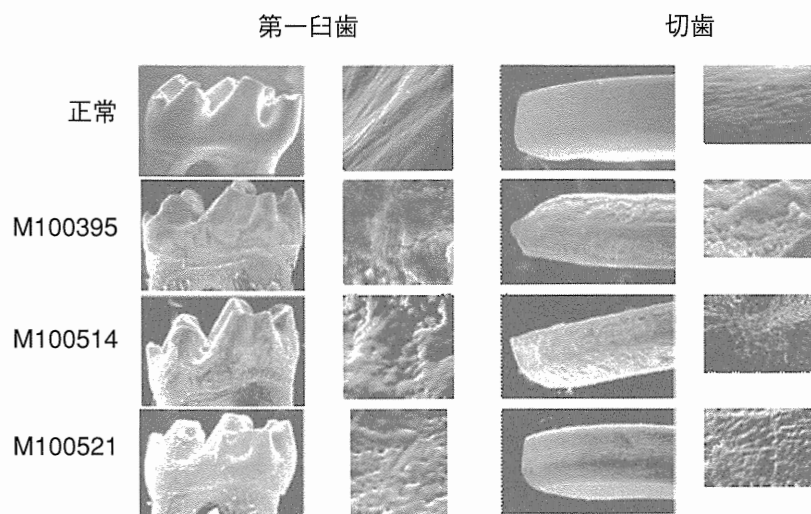


図8

ナメル質形成期を通してハイドロキシアパタイトの結晶化に様々なステップで寄与していると考えられている。これまでの報告にアメロジェニン遺伝子を破壊したマウスの解析があり、その報告ではエナメル質は正常に形成が開始されるが最終的に厚さが減少し、このことによりアメロジェニンは結晶化の開始には必要とされないが結晶の成長には必要である事が示されている。これと対照的にエナメルリンを欠損したマウスではエナメル質の形成が起らないため、結晶化の開始時期に鍵となる遺伝子であることが予想される。

従ってエナメルリンとアメロジェニンはエナメルの発生期の結晶化の過程において異なった機能を有していると考えられる。

今回著者らはENU ミュータジェネシスにより、多様なエナメルリン遺伝子の異常を作成しエナメルリンの機能に新たな見解を見いだした。さらにエナメルリン変異および他のエナメル基質に関与する遺伝子の変異を集め、それらの症状を解析する事はエナメル質形成の分子機構の研究に有用であり、さらに様々な臨

床症状を示すヒトエナメル質形成不全症の理解に役立つと考えられる。

ウイルス疾患の診断・予後に 遺伝子を応用

季節が変わり、小児の体調が変動しやすい時期には、小児歯科における日常臨床の場合において、ウイルスが原因である疱疹性歯肉口内炎や再発型の口唇ヘルペスと思われる疾病に遭遇する機会が多い。その際、多くの場合は、診察に当たった歯科医師の知識と経験から経過観察あるいは薬剤を処方し、治療を行っている。これらの疾患に限らず、細菌やウイルスが原因となって生じていると思われる疾病を歯科医師の経験にのみ頼らず、原因を特定する方法として従来から、主に血液を検体として補体結合法、中和法、免疫蛍光抗体法や酵素免疫測定法などの抗体検査やウイルス分離、抗原検索などにより原因を特定する方法が存在するが、検出感度が低かったり、判定までに時間がかかってしまうことなどから、薬剤投与の有効な時期を逃したり、検査

のコストがかかったりするために、あまり有効に利用されていない。

1983年にマリスによって考案された遺伝子増幅技術すなわちPolymerase Chain Reaction (PCR 法)をはじめとする遺伝子研究の急速な発展により、臨床の場へも遺伝子研究の手法が取り入れられるようになった。このPCR法が臨床診断へ応用されたことにより、細菌やウイルスによると思われる疾患に遭遇した際に、それまで確定診断を行うまでに数日から10日前後要していたものが、数時間で検査結果を得られ、特定できるようになったことから、歯科医師の経験に左右されず診断の正確性を向上し、適切な薬剤投与も可能となった。臨床診断にPCR法を用いる利点は単に診断までの時間の短縮だけではなく、PCR法は高感度で特異的であり、微量検体を用いての検査が可能であることから、近年、唾液や涙液などを検体として細菌やウイルスによる疾患だけでなく癌などの診断にも広く応用されている。さらに、検出感度と特異性を増したNested-PCR法などの開発により、小児期にほとんどの児童において潜伏感染しているヘルペスウイルス(HSV)のような極微量のウイルスを健康小児の混合唾液から検出することも可能となっている。

実際の臨床の場においては、原因となる細菌やウイルスの存在を特定することはもちろんであるが、薬剤量の決定などの治療法の選択において疾病活動性などの病態変化の把握が重要になる。遺伝子研究の手法は進化を遂げ、リアルタイム定量PCRの開発により増幅遺伝子の初期の鋳型量(増幅量)の差を正確に定量することができ、疾病活動性などの病態変化や治療効果の判定に応用されている。例えば、歯科診療室において度々遭遇する口唇ヘルペスの原因ウイルスのHSV-1は、ほとんどの人々が小児期に感染し、三叉神経節に潜伏感染していると言われている。発熱、紫外線照射などの刺激を受けると潜伏しているウイルスが再活性化し口唇ヘルペスなどの疾病をもたらす。健康な小児であれば、重篤化せず体調の回復とともに症状も軽快していくが、白血病、骨髄移植、腎移植などの免疫抑制状態の患児に対しては通常発症に至らないウイルス量でも発症に至ると考えられることから、これらの免疫抑制状態の患児に対してはこのリアルタイム定量PCR法(図9)を応用し、日常のウイルス量の変動を把握し、変化に対応することが重篤化を防ぐ有効な手段であると思われる。また、従来方法では検体に血液を用いられることが多く、一般の歯

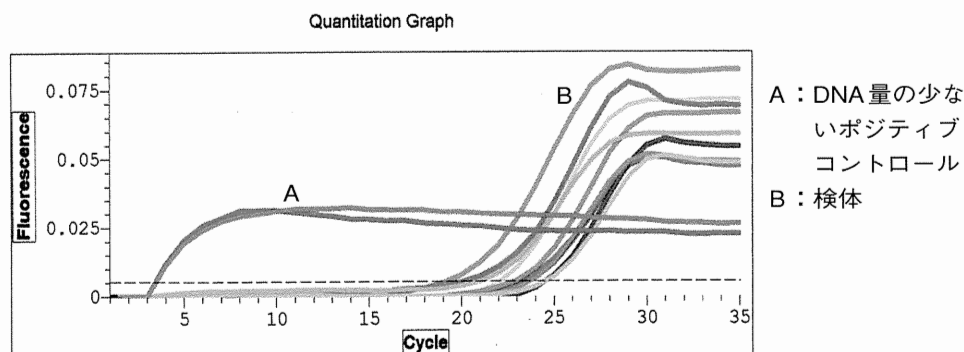


図9 リアルタイムPCR検出装置によって得られる増幅曲線

科診療室では検体の採取が煩雑であったが、遺伝子研究の発展により、患児への侵襲が少なく採取できる混合唾液中の極微量の検体を用いても高感度に検出が可能となった。これにより、一般の歯科診療室においても簡単に試料の入手が可能となった。

遺伝子研究の発展により、診断の正確性や迅速性が向上し、疾病の重篤化を免れることが可能となった。しかしながら、これらの手法を有効とするためには、正確なPCR法を行うに当たって術者の修練が必要なことや、リアルタイムPCR検出装置などの高価な検査機器が必要である。日常の臨床場において普及させるためには、これらの問題をクリアする必要がある。

数年前まで困難とされてきた手法が、遺伝子研究の発展とともに実現可能となり、日常臨床へも大きく影響し、変化を遂げている。今後も遺伝子研究の急速な進化とともに、細菌やウイルスが原因となって発症する疾患の診断や治療も発展していくと思われる。

文 献

- 1) Takehiko Shimizu, Yoshinobu Asada, Takahide Maeda : Analysis of the coding region of MSX1 gene in familial tooth agenesis, *Pediatric Dental Journal*, 13(1):71-74, 2003.
- 2) R. Nomura, T. Shimizu, Y. Asada, S. Hirukawa and T. Maeda : Genetic Mapping of Absence of the Third Molars in EL Mice to Chromosome 3. *Journal of Dental Research*, 82(10):786-790, 2003.
- 3) T. Shimizu, J. Han, Y. Asada, H. Okamoto, and T. Maeda : Localization of am3 using EL congenic mouse strains. *Journal of Dental Research*, 84(4):315-319, 2005.
- 4) Shimizu T, Oikawa H, Han J, Kurose E and Maeda T : Genetic Analysis of Crown Size in the First Molars Using SMXA Recombinant Inbred Mouse Strains, *Journal of Dental Research*, 83(1):45-49, 2004.
- 5) Dohmoto, A., Shimizu, K., Asada, Y. and Maeda, T. : Quantitative trait loci on chromosomes 10 and 11 influencing mandible size of SMXA RI mouse strains, *Journal of Dental Research*, 81:501-504, 2002.
- 6) 小宮城 治, 清水 邦彦 : 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, *小児歯科学雑誌*, 40:627-632, 2002.
- 7) 及川 栄郎, 清水 武彦 : 近交系マウスを用いた上下顎第一臼歯冠近遠心幅径と上下顎骨前後幅径に関わる遺伝要因の関連の検討, *小児歯科学雑誌*, 41(5):797-804, 2003.
- 8) Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, et al : SHIRPA, a protocol for behavioral assessment : validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett* 22:89-92, 2001.
- 9) Witkop CJ Jr : Amelogenesis imperfecta, dentinogenesis imperfecta and dentin dysplasia revisited : problems in classification. *J Oral Pathol* 17:547-553, 1989.
- 10) Masuya H, Shimizu K, Sezutsu H, Sakuraba Y, Nagano J, Shimizu A, Fujimoto N, Kawai A, Miura I, Kaneda H, Kobayashi K, Ishijima J, Maeda T, Gondo T, Noda T, Wakana S and Shiroishi T : Enamelin (Enam) is essential for amelogenesis : ENU-induced mouse mutants as models for different clinical subtypes of human amelogenesis imperfecta (AI), *Human Molecular Genetics*, 14:575-583, 2005.
- 11) 船渡 忠男 : リアルタイム定量PCRの応用, *SRL宝函*, 22(3):217-220, 1998.
- 12) 森 良一, 他 : One Point Illustrated Key Words ヘルペスウイルス, メディカルレビュー社, 大阪, 1995.
- 13) 由良 義明, 他 : 現在の口腔ヘルペスウイルス感染症の診断, *四国歯誌*, 13(2):253-258, 2001.
- 14) 生田 武, 他 : Nested PCR-リアルタイムPCR法による小児混合唾液中HSV-1の検出, *小児歯誌*, 42(5):615-622, 2004.

歯の萌出異常

日本大学松戸歯学部小児歯科学講座 教授 前田隆秀



1. はじめに

歯の萌出異常は成長発達期にある小児では、いかなる時期においても見られる現象である。誕生と同時に認められる出生歯 (natal teeth) ならびに出生後1週間以内に萌出を認める新生歯 (neonatal teeth) から成人期近くに認められる第3大臼歯の萌出異常までがあり、学校歯科医としては歯の萌出異常に注意を払わなければならない。萌出異常が認められた時には適切な対応を要する。異所萌出によっては、健康な永久歯の歯根を吸収し、保存不可能となること、歯列周長の減少を惹起して叢生となることなどが頻繁に見受けられる。

しかし、学校歯科健康診断において歯の萌出の異常にも注視した検診を行えば、歯列不正ならびに咬合異常を起こさずに、あるいは最低限に抑えることができたと思われる症例に多く遭遇する。早期の萌出異常の発見は学校歯科医のみでなく、地域のかかりつけ歯科医院における定期健康診査からも見出す目を養って欲しい。

2. 歯の萌出

乳歯の萌出はだいたい生後6か月から2年半の間に行われる。すなわち、下顎乳中切歯にはじまり、上顎第2乳臼歯の萌出で終わる。永久歯は第1大臼歯が6歳前後に乳歯列後方に萌出しはじめ、漸次歯の交換が進み11~13歳ごろに第2大臼歯が萌出してくる。

歯冠の外形が完成して、歯根の形成が開始される

と、歯胚の上をおおっている歯槽骨縁が吸収を起して消失する。さらに退化エナメル質と口腔上皮の間にある結合組織がしだいに消失する。歯冠頂が歯肉に近づくと、歯肉はその形に膨隆し、圧迫される。最初はやや発赤し、ついで、血管が圧縮され、貧血状態になる。さらに歯の萌出に従い、固有層の細胞は吸収破壊される。最終的に歯冠表面の退化エナメル上皮と口腔粘膜の上皮が融合し、歯は退化エナメル質をその部に残して、先端から萌出をはじめ、歯冠を歯肉の上に現し、咬合線に達して一応停止する。

一般に萌出は歯が口腔内に出現すること、すなわち歯肉から歯の現れることを意味する。それ以前にも歯は口腔内に向かって移動し、顎骨内で動いている (骨内萌出)。

一般に歯が萌出する場合にはまず歯冠の外形が完成し、歯根がだんだんと形成され、全長の1/3~1/2程度形成されると順次萌出を始める。

すなわち、歯の萌出はその歯が全部完成される前に見られ、歯冠部分が萌出を完了しても、なおある時期はその根尖は未完成のままである。

1) 萌出機序

歯の萌出がどうして行われるか、その機序については古くから多くの議論があり、定説はない。しかし、歯胚の発育が顎骨内で行われていることから考えて、萌出の主体は歯胚であり、歯槽骨の成長が歯の発育と密接な関係があることは明らかである。

表1に歯の萌出に関する主な学説をあげる。

永久歯の萌出は歯冠が形成され、萌出する時期になると、なんらかの原因によって血管の新生が起こ

表1 歯の萌出に関する主な学説

	萌出機序	説 明	提案者
歯の組織の成長説	1. 歯根の発育成長	歯根の延長が歯冠を口腔に押し出す	Hunter, Magitot, Nasmyth, Kölliker, Sarazin, Wedi
	2. 象牙質の発育成長と歯髄の収縮	象牙質の発育成長と、歯髄の収縮による圧力によって口腔に歯を出す	Zuckerkandl, Wallisch, Walkhoff, Eichleer, Eildmann
	3. 歯根膜組織の発育成長 a. 歯根膜の発育成長と牽引 b. 歯槽骨の発育成長	歯の周囲にある軟組織の運動により歯を口腔に引っ張る 歯槽骨の発育成長が歯を口腔に押し出す	Underwood, Landsbeger Brash, Nessel, Hermann
その他の説	4. 歯槽突起における筋の働きによる圧力	頬および舌の筋肉の働きによる圧力が歯槽突起を収縮させて、歯を萌出させる	Berten
	5. 歯槽骨の吸収	歯が口腔に露出する	Aichel, Weidenreich
組織張力説	6. 細胞の増殖による圧迫	歯髄および歯根膜にある細胞の増殖、血管、あるいはその両者の浸透圧または組織張力が歯を口腔に押し出し、歯槽骨が圧迫性萎縮によって吸収される	Constant, Leist, Fischer
	7. 歯髄歯根膜に存在する血管による圧力		Mathe, King, Baume

(正木)

り、破骨細胞が出現し、必要な範囲に歯槽縁の退縮が起こるとともに、乳歯周囲の骨組織も歯根膜の血管より新生された血管と破骨細胞の存在により、骨の吸収と乳歯根の吸収、脱落が起こり、脱落した部位へ永久歯が移動し、萌出が始まる。

以上のように、歯の萌出は単純ではなく、複雑な現象を呈するのである。

形態学的には次のような所見がみられる。

- ① 歯乳頭の発育（歯髄の成長）
- ② 歯根部象牙質の発育増大による圧力
- ③ 歯槽底部における骨の新生
- ④ 歯槽壁辺縁の消失

萌出機転は歯の形成と石灰化に続く連続した現象である。コントロールされた血管細胞の変化ならびに歯根膜が主役であるが、その他のことについては推測の域を出ない。

2) 乳歯の萌出時期と順序

乳歯は平均生後6～7ヵ月で、下顎中切歯から萌出しはじめ、2歳半ころには20本の全乳歯が萌出を完了する。

萌出順位は必ずしも一定ではないが、下記のように

である。

$$\overline{A|A} \rightarrow \underline{A|A} \rightarrow \underline{B|B} \rightarrow \overline{B|B} \rightarrow \underline{D|D} \rightarrow \overline{D|D} \rightarrow \overline{C|C} \rightarrow \underline{C|C} \rightarrow \overline{E|E} \rightarrow \underline{E|E}$$

一方、Schour, Massler らは、

$$\overline{A|A} \rightarrow \overline{B|B} \rightarrow \underline{A|A} \rightarrow \underline{B|B} \rightarrow \overline{D|D} \rightarrow \underline{D|D} \rightarrow \overline{C|C} \rightarrow \underline{C|C} \rightarrow \overline{E|E} \rightarrow \underline{E|E}$$

の順である。

萌出時期、萌出順序については人種差、個体差、性差あるいは左右差などの変異がある。また、3～4か月の差異は異常とは考えられない。

1986年の日本小児歯科学会の調査による日本人小児46,698名（男子23,610名、女子23,088名）の結果によると、乳歯の萌出順序は男女とも、上下顎とも $A \rightarrow B \rightarrow D \rightarrow C \rightarrow E$ の順である。

乳歯萌出時期に関する性差は、下顎乳中切歯において男子が早く萌出する以外、両者間には差は認められない。

3) 永久歯の萌出時期と順序

永久歯は生後6年ころに下顎第1大臼歯が萌出し、12～13歳ころまでに28歯が萌出する。

その萌出順位は混合歯列期の前期では、 $\overline{6|6} \rightarrow$

$6|6 \rightarrow \overline{1|1} \rightarrow \overline{2|2} \rightarrow \underline{1|1} \rightarrow \underline{2|2}$ である。

混合歯列期の後期では、上顎では順序が種々あり、 $4 \rightarrow 5 \rightarrow 3 \rightarrow 7$ 、 $4 \rightarrow 3 \rightarrow 5 \rightarrow 7$ 、 $3 \rightarrow 4 \rightarrow 5 \rightarrow 7$ であり、下顎は $3 \rightarrow 4 \rightarrow 5 \rightarrow 7$ である。

一方、Schour, Massler らは $\overline{6|6} \cdot \underline{6|6} \rightarrow \overline{1|1} \rightarrow \underline{1|1} \rightarrow \underline{2|2} \rightarrow \underline{2|2} \rightarrow \underline{3|3} \rightarrow \underline{4|4} \rightarrow \underline{4|4} \cdot \underline{5|5} \rightarrow \underline{3|3} \rightarrow \underline{5|5} \rightarrow \underline{7|7} \rightarrow \underline{7|7}$ である。

先行乳歯が齲蝕罹患などにより早期に喪失すると、後継永久歯の萌出が早くなったり、また乳歯の晩期残留により遅くなったりする。また、永久歯の萌出も乳歯と同様に個体の健康状態によっても左右される。

前述の日本小児歯科学会の日本人小児の報告では、永久歯萌出順序は男女とも上顎は $6 \rightarrow 1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 3 \rightarrow 5 \rightarrow 7 \rightarrow 8$ 、下顎は $1 \rightarrow 6 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \rightarrow 4 \rightarrow 5 \rightarrow 7 \rightarrow 8$ の順であり、過半数の小児において $\overline{1|1}$ が $\overline{6|6}$ より萌出が早い。

永久歯萌出の性差に関しては一般に女子のほうが早く萌出する傾向にある。

3. 乳歯の脱落

永久歯との交換期になると乳歯は脱落するが、その主な要因は成長・萌出中の永久歯による圧力によって乳歯根尖部で破骨細胞の分化が誘発され、乳歯の歯根吸収が起こり歯根膜の付着線維が消失し乳歯は脱落する。

歯根吸収様相は、乳前歯では唇側にやや屈曲した歯根尖部舌側付近から、また乳臼歯では歯根の根尖寄りの内側から吸収するが、これも一様でなく、下顎乳臼歯では遠心根の吸収が近心根より遅れる症例が比較的多くみられる。

4. 歯の萌出の異常

萌出の異常には、萌出時期からみた早期萌出と萌出遅延、ならびに萌出方向から異所萌出あるいは移行歯がある。種々の症候群において歯の数の異常、歯の構造の異常、歯の形態の異常、さらに萌出の異常がある。一方、健常児で見られ、放置すると不正

咬合を惹起すること、あるいは永久歯の保存を不可能となる症例もある。

学校歯科健康診断において、CO, GO, あるいは要観察が必要な顎関節症あるいは不正咬合に注意するだけでなく、歯の萌出の異常にも注意を払う必要がある。患児あるいは保護者が異常に気が付き歯科医院を受診した時には手遅れであり、もう少し早く来院してくれていればと思うことがある。学校歯科健康診断ではレントゲン写真撮影が不可能であるのでかかりつけ歯科医への受診を促すことが必要である。

今回の萌出異常は異所萌出、形態異常、低位乳歯、瀚法性歯嚢胞によるものの症例を挙げて検診時の注意を促したい。

1) 異所萌出

本来、歯種により萌出する位置は顎内においてはほぼ決定しているが、その部位から異なる位置に萌出することを異所萌出といい、広義には歯軸の異常を含める。

原因としては、明白なもの、あるいは不明なものがある。一般的には、顎骨の異常、周囲骨の病変などがこの原因と考えられる。歯軸の異常では主として顎骨の成長不全であると考えられ、特に著明な異常がみられるのは第3大臼歯である。この異所萌出の頻度が高い歯種は、上顎では切歯、犬歯、上顎第一大臼歯、下顎では第3大臼歯などである。

(1) 上下顎第一大臼歯の異所萌出 (症例1, 2)

学校歯科健康診断において、左右側いずれかの同名歯の萌出が認められたにも関わらず、当該第一大臼歯が萌出していない場合は異常と認識してかかりつけ歯科医への受診を薦めて欲しい。

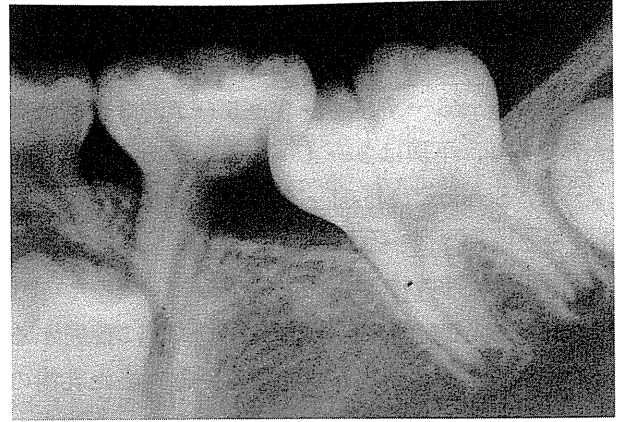
症例1は上顎第一大臼歯、症例2は下顎第一大臼歯の異所萌出を示す。

上顎第一大臼歯の異所萌出は比較的多く、早期の対応において適切な部位への萌出を誘導することができる。発見ならびに対応が遅れると将来、叢生ならびに咬合平面の異常を来とし異常な咬合運動、顎関節症をも起こすことがある。

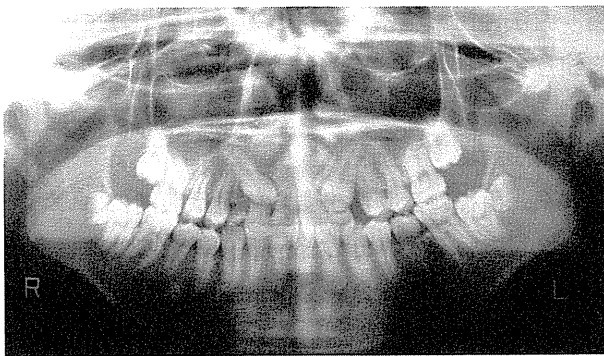
(2) 犬歯の異所萌出 (症例3)



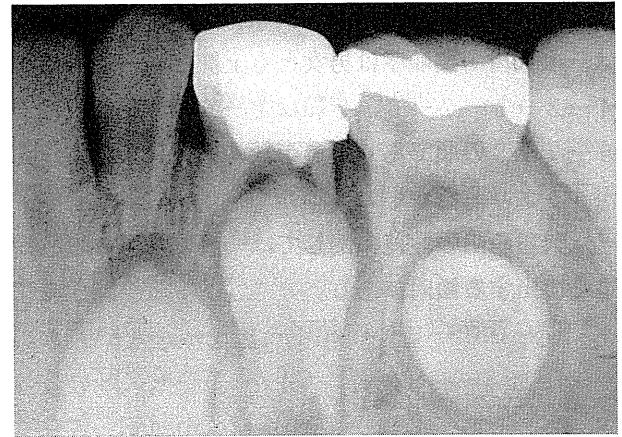
症例1 上顎第一大臼歯の異所萌出



症例2 下顎第一大臼歯の異所萌出



症例3 犬歯の異所萌出



症例4 下顎第二小臼歯の位置異常

上顎犬歯は、生後4～5か月ごろ第一乳臼歯根尖部にて石灰化が始まり、第一小臼歯の石灰化が始まる2歳ごろ上方に移動する。その後、前方に移動し、6歳ごろ乳犬歯歯根の口蓋側に位置するようになる。このように上顎犬歯の歯胚は、顎骨中でもっともこみあった部位に発生し、萌出経路が複雑であること、さらに歯胚の形成から萌出までに長い時間を必要とすることから埋伏や萌出異常をきたす頻度が高いといわれている。顎骨の中で歯同士がぶつかり圧がかかると、エナメル質より硬度が低いセメント質、象牙質が吸収してしまう。その結果、歯根吸収が生じると考えられる。

萌出方向の異常の原因は、不明であることが多いが、永久犬歯が埋伏して萌出方向の異常によって切歯群の歯根を吸収してしまうことがある。症例3では両側上顎犬歯の萌出方向が近心を向いており側切

歯ならびに中切歯の歯根を著しく吸収しており、ともに両側側切歯の保存が不可能であった。来院の主訴は「切歯の動揺が強くなってきた」であった。もし、学校歯科健康診断において、年齢から考慮して乳犬歯が動揺もしないで口腔内に存在していることに異常と認識して、かかりつけ歯科医への受診を薦めれば永久切歯群の歯根吸収を起こす前に萌出方向の異常を発見できたと思われる。その時期での処置としては乳犬歯を抜歯して、開窓し、犬歯を正常な位置に牽引することが可能であった。

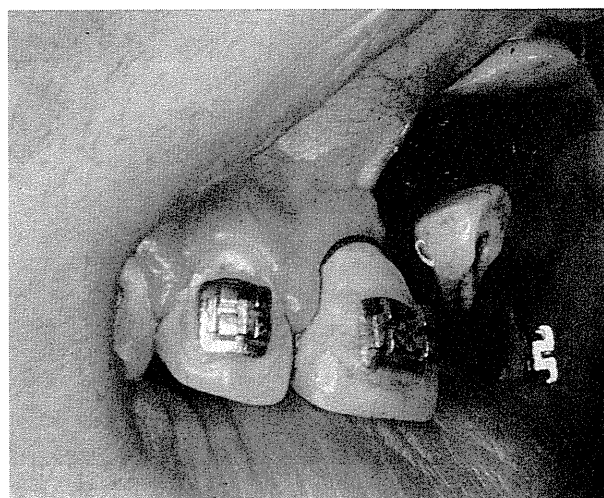
(3) 小臼歯の位置異常(症例4)

乳臼歯の萌出前期の早い時期に、小臼歯はその先行乳歯である第一乳臼歯の舌側の咬合面近くで發育し、乳臼歯の萌出時期の終わりに乳臼歯の歯根下に位置するようになる。

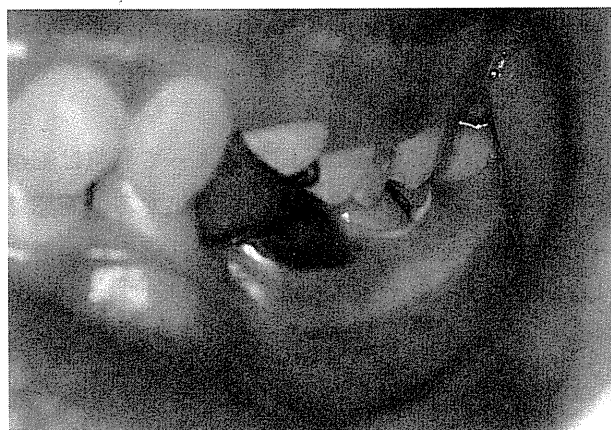
このように顎骨内で移動して、発達中の歯槽突起



症例5(1) 上顎中切歯の彎曲



症例5(2) 上顎中切歯の彎曲



症例6 第一乳臼歯の低位歯



症例7 同一個人のみられた多数の低位歯・埋伏歯

内で位置調整が行われている。しかし、なんらかの異常で小臼歯の位置異常を起こすことがある。症例4は下顎第二小臼歯が90°方向を変えて位置しているために乳臼歯の正常な歯根吸収が見られなかった。処置としては先行乳歯を抜歯して隙間を作ったところ自然に萌出方向を戻し正常に萌出した。幸い、この症例では、小臼歯の歯根形成がわずかであったので正常に萌出したが、発見が遅れて歯根が彎曲すると保存不可能となるであろう。乳歯から永久歯への交換期の年齢であるにも関わらず乳歯の動揺がない、あるいは反対側同名歯との比較から異常か否かを察知することが学校歯科健康診断では求められる。

(4) 永久前歯の彎曲 (症例5)

乳前歯の外傷において後継永久歯への影響にエナメル質形成不全 (白斑)、歯根形成不全、歯根の彎曲、萌出障害 (萌出遅延、位置異常)、永久歯胚の

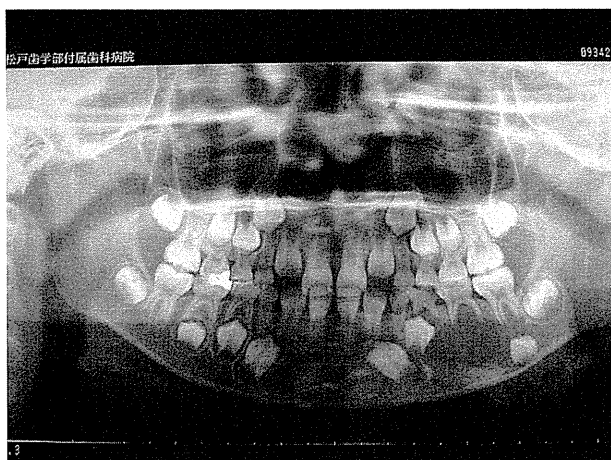
發育停止、歯小囊の嚢胞化、形態異常などが挙げられている。

症例5は乳前歯の外傷によって永久前歯の歯冠の位置が変位したもので、歯根形成前に位置の異常が発見できていれば、乳前歯の抜歯あるいは永久前歯の歯冠の位置を正常に戻すことによって歯根が強く彎曲せずにすんだと思われる。(1)は処置前、(2)処置中を示した。

(5) 低位乳歯 (症例6, 7)

咬合していた乳歯が、なんらかの転機により現在の咬合線よりも低位を占めているものをいう。低位乳歯の発現頻度は、1.3~6.9%である。好発部位は上顎より下顎に多く、ほとんどが臼歯部である。1口腔内に1歯の低位乳歯を持つ場合が多いが、複数歯に及ぶものでは同顎内の左右の組み合わせが多いという特徴がある。

低位乳歯の本態は歯根と歯槽骨の癒着 (アンキ



症例 8 濾胞性歯嚢胞

ローシス)と隣在歯の萌出とによって生じる相対的な低位との説が有力視されている。このため沈下乳歯という用語は誤解を招きやすい。乳歯がアンキローシスを起こす原因に決定的な説はないが、外傷などによる強い打撃によるショック、局所的代謝障害、後方歯の近心傾斜、後継永久歯の欠如、歯根膜の形成不全などの局所的因子、さらに、全身的または遺伝的因子などがあげられている。

低位乳歯の影響としては、永久歯列の不正や後継永久歯の歯根形成異常などが報告されている。低位乳歯では乳歯歯根と歯槽骨との癒着部位が重要な要因となる。根尖部に限局している場合は、永久歯の萌出に伴う根尖部の吸収によって乳歯は再び萌出する。しかし広汎な癒着では低位度を増し、後継永久歯の萌出を障害する。

症例 6 では乳歯の低位歯であるため第一大臼歯の萌出に伴い近心傾斜を起こし、後継永久歯の萌出余地を失い将来、埋伏あるいは舌側への萌出などの不正咬合を起こしてしまう。

症例 7 は同一個人に多数の低位乳歯と埋伏歯を有する小児の長期観察である。低位乳歯の対応であるが、経過観察と抜歯があるが、症例 7 を通じて言え

ることは、経過を見て低位度を増す場合は、抜歯すべきである。

(6) 濾胞性歯嚢胞 (症例 8)

主に小児における含歯性嚢胞としては、嚢胞性歯嚢胞が多い。

歯の石灰化が開始されてから、歯胚のエナメル器が嚢胞化したもので、嚢胞内に埋伏歯が含まれる。主な原因は、炎症にあるとされ、エナメル組織の形成が完了する10歳代から20歳代に多く発生する。

症例 8 では下顎第二乳臼歯の根尖病巣によって永久歯胚のエナメル器が嚢胞化し、嚢胞内の圧力で永久歯が移動している。この症例においても左右乳臼歯の状態に注意していればこのように大きな嚢胞化にはならなかったと思われる。

濾胞性歯嚢胞の処置は、開窓によって嚢胞は縮小して永久歯は自然と本来の部位に萌出する。開窓にあたっては、血管腫との鑑別のため乳歯の抜歯前に試験穿取をすべきである。

5. おわりに

以上のように永久歯の萌出の異常の多くが、学校における健康診断時の注意深い観察によって未然に予防できる。あるいは加療が可能となることから萌出時期、交換期年齢での乳歯の動揺度、左右同名歯の萌出状態の差異などに注意を払った学校における健康診断でありたい。

参考文献

- ・ 前田隆秀, 朝田芳信, 田中光郎, 土屋友幸, 宮沢裕夫, 渡辺 茂: 小児の口腔科学, 学研書院, 2005, 東京
- ・ Mitsuko Miyanaga, Kenji Takei, Takahide Maeda: Observation of a child with multiple submerged primary teeth (Report), Journal of Dentistry for Children, 495 November-December, 1998

解説

REVIEW ARTICLE

レーザー照射の生物学的効果の解明と機能ゲノム科学

安孫子宜光

日本大学松戸歯学部生化学講座

(平成16年11月15日受理, 平成16年12月16日掲載決定)

Elucidation of biostimulatory effect of laser irradiation and functional genomics

Yoshimitsu Abiko

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

(Received November 15, 2004, Accepted December 16, 2004)

要 約

レーザー照射が創傷や難治性潰瘍に対して治癒効果があると報告されて以来, 炎症抑制, 疼痛減少, 骨折の治癒促進など広範な臨床効果が数多く報告され, レーザー療法の応用がめざましい. レーザー療法に対する懐疑的な意見や副作用に対する十分な検討が行われていないという指摘も依然として存在する. レーザー療法が進展しているなか, レーザー照射の生物学的効果のメカニズムに対する解明は遅れていると言わざるを得ない. 医学領域へのレーザー療法の積極的な応用を推進するためにも生物学的効果を実証科学的に明確に証明する必要がある. レーザー照射の生物学的効果の分子レベル, 細胞生物学レベルでの解明にあたり, 培養細胞を利用することは有用性が高く, 得られる情報は生体の複雑な代謝系, 細胞機能に与えるレーザーの影響を解明することに貢献できると考えられる.

ヒトゲノム計画のドラフトシーケンスが終了し, ポストゲノム科学研究へと進むなか, ゲノム・トランスクリプトーム・プロテオーム, を統合したバイオイノフォーマティクス研究が飛躍的に進展している. ゲノム研究では, 膨大なゲノムデータベースを駆使した遺伝子ホモロジー検索, モチーフ検索が活用できるようになり, トランスクリプトーム研究では, 差分化遺伝子クローニングによる遺伝子探索や一度に数万の遺伝子の発現を短時間に解析できるDNA マイクロアレイ, Gene Chipが開発されている. 本稿では, レーザー療法の生物学的効果を実証科学的に解明する試みとして, 低出力レーザー照射による歯周病の炎症抑制や骨形成促進作用について歯周組織細胞, 骨芽細胞の培養系を応用して得られた研究成果を解説するとともに, 機能ゲノム科学研究技術を導入した低出力レーザー照射応答遺伝子や分子ネットワークの探索への試みを紹介する.

キーワード: 低出力レーザー, 歯根膜細胞, 骨芽細胞, 機能ゲノム科学

1. 緒言

レーザー照射の細胞増殖促進, ATP産生促進, コラーゲン合成促進, 炎症抑制, 疼痛減少, 骨折治癒促進などの広範な生物学的効果や臨床効果が多く報告されている。しかしながら, 一方ではレーザー療法に懐疑的な見解も多く, レーザー照射の効果を心理的なプラセボ効果が大きいとする考えやレーザー治療は, 臨床応用が試行錯誤的に実施されて効果のあった事象だけが誇張されているという意見もある。また, 生物学的効果は単なる温度上昇効果によるものであろうとする議論やレーザー照射の副作用について十分検討されていないという指摘もされている。このような背景からレーザー照射の生物学的効果の作用機序の解明は未だ不十分であり, 積極的な臨床応用が期待されているなかで, レーザー医療をさらに推進, 発展させるためには, 有用性の高いレーザー照射の機種, 照射法を開発するとともに, 生物学的効果を実証科学的に解明していく必要があると思われる。

レーザー照射の生物学的効果を実証科学的に証明し, そのメカニズムを解明しようとする際, 生体組織を直接的に用いる形態学的研究手段が有効であるが, 生体の複雑な代謝系の細胞機能を分子レベルで解明していくのに時として困難である。とくに生命科学研究技術を応用して研究するには研究試料の調製にも限界がある。本稿では, レーザー照射の生物学的効果を実証科学的に解明するために細胞培養系を応用した研究成果を解説する。さらにゲノムデータベース/機能ゲノム科学技術を応用したレーザー照射に応答する遺伝子や分子ネットワークの探索についての試みについても紹介したい。

2. 細胞培養系実験の設定

2.1. 歯周組織の特性と培養細胞実験系

成人の80%以上が罹患する歯周病は歯の喪失原因となる。高齢者における歯喪失の最大原因は歯周病であり, 加齢により歯周病の病態が進展すると信じられている。しかし, 高齢者の歯周病は老化という因子だけが引き金となって発症はしないと考えられている。高齢者の歯周病といえども歯肉炎・歯周炎の発症には歯垢(細菌)が, 咬合性外傷には外傷性咬合(機械刺激)が, それぞれ必須である。そこで, 我々は“外的刺激に対する歯周組織細胞の応答性(感受性)は細胞老化によって亢進する”という作業仮説を立てて歯周病に対する老化の関わり合いを調べてきた。老化に伴って歯周病の悪化が起こる要因を解明するにあたり, 歯周組織の特性に注目した機能的な研究は立ち遅れており, 歯周組織を構成している歯肉, 歯根膜, 歯槽骨の細胞老化の実態をそれぞれの生理的機能を考慮した研究が求められている。研究を進めるにあたり, どのような細胞にどのような刺激を与え, どのような刺激応答物質を研究対象に選ぶかが研究を成功させるキーポイントであると考えられる。そこで, 当研究室では, まず歯周病の病態に応じた歯周組織細胞それぞれの培養細胞実験系を考案した。

歯肉組織は常時, 口腔内細菌からの侵襲に曝されてい

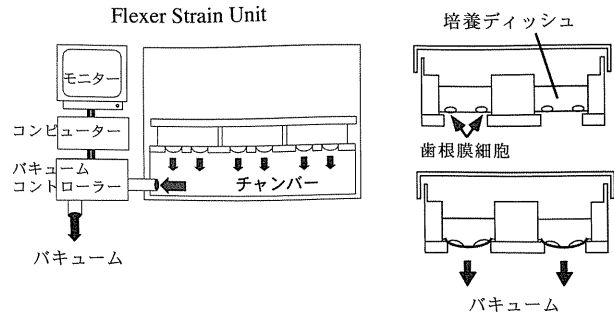


Fig.1 Flexer Strain Unit

Periodontal ligament cells were seeded onto the flexible-bottom plates and set on the chamber, then the flexible-bottom were subjected to cyclic tension force by air pump system under controlled by computer system. Computer system can controlled the elongation of flexible-bottom surface from 9 to 24 % with a good reproducibility.

る。そこで歯周病原菌から内毒素であるリポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS) を精製し, ヒト歯肉線維芽細胞の培養実験系に添加することで細菌感染の実験系を設定した。歯根膜は咀嚼時の咬合圧を緩衝する組織である。この緩衝能を越える過剰な咬合圧を受けると咬合性外傷を起こし, 歯槽骨の吸収を引き起こして歯を喪失する。また, 歯科矯正治療の圧迫側歯根膜は骨吸収因子を産生して歯槽骨の骨吸収を誘導し, 反対の牽引側では新しい骨形成を誘導することで実際に歯が移動できる。そこで弾力性底面をもつ培養プレートにヒト歯根膜(線維芽)由来細胞を培養してFlexer Strain Unitと呼ばれる装置を用いて歯根膜細胞に周期的伸展力を加えることで咀嚼時の機械的ストレス付加実験系を設定した。(Fig.1)

歯周組織細胞の老化モデルは, in vitro, in vivoの両面から培養老化細胞モデルを考案した。in vitro老化細胞は, Heyflickの細胞老化説に従って歯周組織細胞から線維芽細胞の初代培養を行い, 継代培養によって老化細胞を調製した。すなわちインフォームドコンセントを充分に行なった後, 歯科矯正治療目的で抜去した10-12歳の歯からヒト歯肉, 歯根膜組織を細切して初代培養を行い, さらに継代培養を続けた。ヒト線維芽細胞の継代可能な回数(50-60回)と採取した患者の年齢から計算して, 継代5-9代を若年, 18-25代を老化細胞として実験に供した。in vivo老化細胞は, 若齢, 老齢ラットの歯周組織から初代培養して in vivoの若年, 老化細胞として実験に供した。

次にどのような刺激応答物質を研究対象として測定するかが重要である。インターロイキン-1 β (interleukin-1 β ; IL-1 β)は, 遺伝子の転写, 翻訳後は前駆体として生合成され, 変換酵素(IL-1 β converting enzyme; ICE)によって活性型になる。IL-1 β は炎症性サイトカインとして炎症の進展に関与するとともに, 破骨細胞の分化, 活性化因子として働き, 発痛物質としても知られている。プロスタグランジンE₂ (prostaglandin E₂; PGE₂)は, ホスホリパ

ーゼA2によって細胞膜のリン脂質から遊離されるアラキドン酸を基質に律速酵素シクロオキシゲナーゼによってプロスタグランジンG₂/H₂が合成され、ついでPGE₂合成酵素によって合成される。PGE₂は血管透過性促進因子として炎症の進展に関与するとともに、破骨細胞の分化、活性化因子として働き、発痛の促進物質としても知られている。プラスミン活性化因子(plasminogen activator; PA)は、プラスミノゲンからセリン酵素であるプラスミンに変換するプラスミン/PAカスケードの律速酵素である。プラスミンは、コラゲナーゼなどの細胞外メタロプロテアーゼを活性化して組織破壊に働いたり、プレカリクレインを活性化してキニノーゲンからキニン物質を生成して炎症を促進する。歯周病が進展している炎症歯周組織ではこれらPGE₂、IL-1 β 、PAが実際に増加していること、また歯周病治療の成功によって減少することが報告されていることから、細胞老化によるこれらの産生量変化あるいは低出力レーザー照射の産生量に対する影響を調べる指標として有用であると考えられる。(Fig.2)

3. 低出力レーザー機器

低出力レーザーの消炎作用の効用に期待して、炎症歯肉へのレーザー照射を試みて効果があったとするものと無かったとするものと相反する結果の報告がされている。その違いは用いたレーザーの機種に起因するものと考えられる。同じ低出力レーザーであってもGa-Alを線源とするレーザーは皮膚に対して2-3 mmの透過力をもつが、He-Neレーザーは表層にしか達しないという。本実験では、数mmの透過力をもつGa-Al-As ダイオードレーザー機種(Panalas-1000, Matsushita社; 波長 830 nm, 最大出力700 mW)を用いた。本研究では実験対象が培養細胞であることから培養ディッシュに広く照射できるように0.6-mm口径の光ファイバーで照射範囲を広げ、直径13 cm²に照射できるように工夫をしてある。この条件で培養細胞に10分間照射したときのエネルギーは7.9 J/cm²になる。細胞培養系にこの条件でレーザー照射したときの温度を測定したが、0.5℃以下の無視できる上昇温度であったことからレーザー光の直接効果として判定できると考えている。

4. 歯周組織細胞の応答

歯肉組織から調製した老化細胞と若年細胞に歯周病原菌*Campylobacter rectus*のLPSを添加した後、培養液を採取し、炎症因子の産生について調べた。無刺激条件では、PGE₂産生量は両細胞間に大きな差は認められないが、歯周病原菌*Campylobacter rectus* LPS添加時では老化細胞は若年細胞に比べて著しくPGE₂量が増大していた。アラキドン酸カスケードのシクロオキシゲナーゼについては構成型の1型(COX1)、誘導型の2型(COX2)が存在することが知られている。LPS添加時の老化細胞と若年細胞間でCOX2遺伝子のmRNA発現量をNorthern blot法によって調べたところ、老化細胞は若年細胞に比べてcox2遺伝子のmRNA量が増大していた¹⁾。(Fig.3)

さらに、この老化細胞によるPGE₂産生量の増大は、

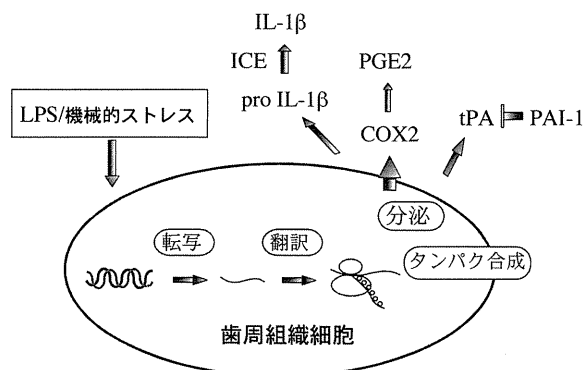


Fig.2 Outlook of experiment system for periodontal tissue cells concerning to their cellular functions.

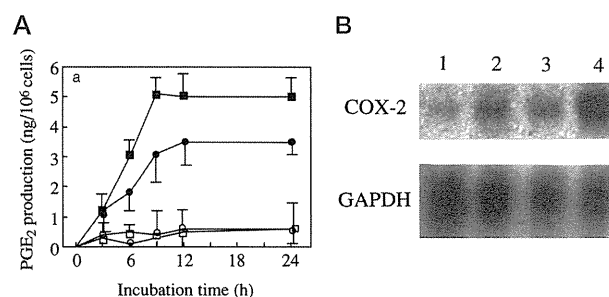


Fig.3 Effect of cellular ageing on the PGE₂ production by gingival fibroblasts.

(A) PGE₂ production of aged gingival fibroblasts was higher than that of young cells, but there was no difference between aged and young cells without challenge of LPS. □ Aged cells (LPS-), ■ Aged cells (LPS+), ○ Young cells (LPS-), ● Young cells (LPS+)

(B) Examination of mRNA levels by Northern blot analysis. RNA was recovered from each cells and run on an agarose gel electrophoresis, transferred onto nitrocellulose filter, and then hybridized with ³²P labeled *cox2*, *GAPDH* DNA probe, and observed by autoradiography. 1. Young cells (LPS-); 2. Young cells (LPS+); 3. Aged cells (LPS-); 4. Aged cells (LPS+).

LPS刺激によるIL-1 β 産生能の増大に起因することが示唆された²⁾。歯肉線維芽細胞におけるLPSのPA活性に与える影響を調べたところ、LPS濃度に依存して培養液中のPA活性は上昇し、この現象はPAの遺伝子発現の促進に起因することが明らかとなった³⁾。さらに細胞老化モデルとして酸素ラジカルを発生させる実験系においても、酸素ラジカル量に応じてPA活性が上昇した⁴⁾。継代培養によるin vitro老化歯肉線維芽細胞では、LPSに反応してcox2遺伝子発現が促進し、IL-1 β 、PGE₂を若年細胞に比べて多く産生し、歯周病の病態を進行させることが示唆された。これらの現象は、老齢ラットを用いたin vivo老化歯肉線維芽細胞の実験系でも同じ傾向がみられた⁵⁾。そして、PAも同様にin vitro, in vivo老化細胞の

実験系で老化歯肉線維芽細胞は若年細胞に比べて著明に産生量が増大していた⁶⁾。

歯根膜は歯槽骨と歯のセメント質の間に存在する線維性の結合組織である。歯根膜は、これらの両硬組織に埋め込まれて歯を歯槽窩に保持する役割を有していると共に、咬合の過重に対する機械的ストレスを吸収して歯槽骨の破壊を防いでいる。しかし、歯列不正、歯喪失顎の残存歯、咬合関係不良などの原因で特定の歯に過剰な咬合圧が加わった場合、歯根膜から骨吸収促進因子が産生され歯槽骨の吸収を来す。一方、歯科矯正治療では、この反応を応用して歯を移動させることが可能となる。矯正力が歯に加わって歯が移動するのは移動歯周囲の骨組織にリモデリングが起こることである。すなわち歯の移動方向すなわち圧迫側では骨の吸収が起こり、反対方向すなわち牽引側では骨の添加が起こり、結果、歯が移動すると考えられている。最近の研究では、圧迫側、牽引側両方で骨の改造が起こるが、圧迫側では骨吸収の活性化と骨形成の抑制が起こり、牽引側では反対に骨吸収の抑制と骨形成の促進が起こるともいわれている。矯正治療での歯の移動中に自発痛を起こすことが多く患者の大きな負担になっている。この発痛の機序は未だ十分解明されていないが、おそらく矯正力付加によってPGE₂、IL-1 β 、PA等の発痛メディエーターが歯根膜組織で産生されることが深く関与していると考えられる。事実、ネコを用いた実験的歯の移動中の歯根膜にはPGE₂、IL-1 β が強く発現していることが証明されている。

Flexer Strain Unitを用いて歯根膜由来細胞に周期的伸展力を3-5日間加えるとPGE₂が多量に産生され、周期的伸展力の強さに依存してPGE₂産生が亢進したが、伸展力を加えないものではほとんど産生されない。また、PGE₂産生に関与するイノシトール3リン酸も上昇していた⁷⁾。さらに同様の実験系で、IL-1 β も周期的伸展刺激により強く産生が亢進することが明らかとなった⁸⁾。伸展刺激を加えた歯根膜細胞の培養上清を用いてラット胎仔頭頂骨を器官培養すると、実際に⁴⁵Ca放出が上昇し、培養上清中には強い骨吸収因子の存在が示唆された。この骨吸収活性の半分はPG合成抑制剤であるインドメタシンを添加することで阻害され、残り半分はIL-1 β 抗体の添加で抑制されたため、培養上清中の骨吸収因子は主としてPGE₂とIL-1 β であると考えられた⁸⁾。(Fig.4) これらのことから過剰の周期的伸展力に応答して歯根膜由来細胞がPGE₂やIL-1 β を産生し、破骨細胞を誘導、活性化することで外傷性咬合による歯槽骨の吸収に関与することが説明できる。

歯根膜細胞への伸展刺激によるPG産生における*cox1*、*cox2*遺伝子発現についてRT-PCR法で検討した。その結果、歯根膜への伸展刺激はCOX2の遺伝子発現を顕著に亢進しており、COX1の遺伝子発現には変化がなかった。またCOX2タンパクの発現を調べるためCOX2特異抗体を用いた免疫染色では伸展刺激を加えると3日、5日目にCOX2が核膜周囲に強く発現することがわかった。すなわち伸展刺激が加わった歯根膜細胞は*cox2*遺伝子発現の

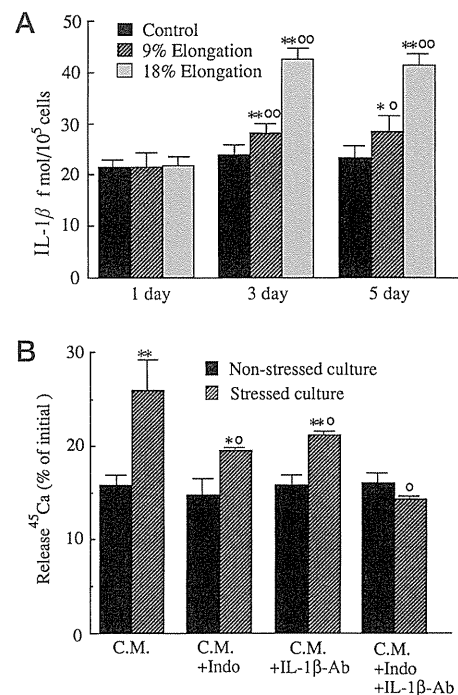


Fig.4 Effect of mechanical stress on the IL-1 β production by periodontal ligament cells.

- (A) Mechanical tension force (TMF) stimulated IL-1 β production from periodontal ligament cells in dose and time dependent manners. * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ to control in each day, ○ $p < 0.001$, ○ $p < 0.01$ to 1 day as a control, $n = 6$.
- (B) Stimulation of ⁴⁵Ca release from ⁴⁵Ca labeled rat calvaria in organ culture by conditioned media of periodontal ligament cells with TMF. The released ⁴⁵Ca was inhibited by the addition of indomethacin and antibody against IL-1 β . * $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ to control (without MTF), ○ $p < 0.01$ to control (C.M. conditioned medium), $n = 6$.

亢進を介してCOX2が産生され、PGE₂産生が亢進したと考えられた。そこで非ステロイド系抗炎症剤の誘導体で最近開発されたCOX2特異的阻害剤NS-398を添加し伸展力を加える実験を行うと、PGE₂産生亢進は完全に抑制されたため、PGE₂産生はCOX2のみを介して起こっていることが示唆された⁹⁾。一方、IL-1 β 産生では非活性型のIL-1 β 前駆体が合成され、IL-1 β 変換酵素(ICE)により活性型になることが知られている。そこで伸展刺激によるIL-1 β やICE mRNAレベルの変化についてRT-PCRとin situ hybridization法にて検討した。その結果、歯根膜細胞への伸展刺激でIL-1 β 遺伝子発現は顕著に亢進したがICE遺伝子発現には変化がなかった¹⁰⁾。

歯周組織の改造にはコラーゲンをはじめとする多くのタンパクの分解が必要PAは組織型(tPA)、ウロタイプ型(uPA)の2種類が存在しプラスミノゲンアクチベーターインヒビター(PAI)により不活性化にされることが知られている。伸展刺激を加えるとPA活性は顕著に上昇し、tPA、uPA、PAI-1の遺伝子発現について検討した結

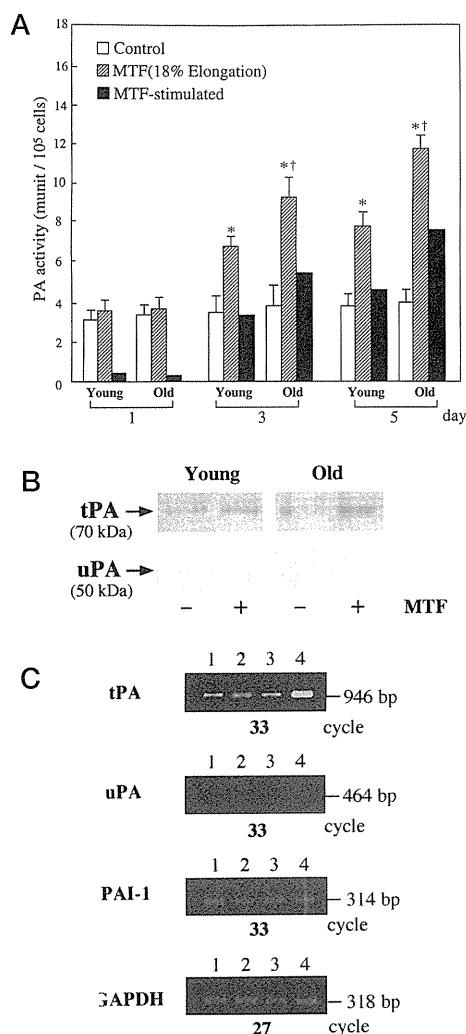


Fig.5 Effect of cellular ageing on the PA production by periodontal ligament cells.

- (A) Aged periodontal ligament cells produced more PA than young cells, but there was no difference between aged and young cells without challenge of MTF.
- (B) Western blot analysis using antibodies against tPA and uPA. The periodontal ligament cells produced tPA, did not uPA. The tPA mRNA level in periodontal ligament cells was increased by TMF.
- (C) Examination of mRNA levels by RT-PCR. The PA mRNA level was higher in aged cells 1, Young cells (TMF-); 2, Young cells (TMF +); 3, Aged cells (TMF -); 4, Aged cells (TMF +).

果、伸展刺激はtPAの遺伝子発現を亢進し、uPA、PAI-1遺伝子発現には影響を与えなかった¹¹⁾。

伸展刺激によるこれらの基礎実験系の確立ができたので、老化細胞と若年細胞間における伸展刺激によるPGE₂、IL-1 β 、PA産生量を比較検討した¹²⁾。その結果、老化細胞は若年細胞に比べてPGE₂¹³⁾、IL-1 β ¹⁰⁾、PA¹⁴⁾いずれにおいても多く産生しており、細胞老化は歯周病の病態を進行させることが示唆された。そして、いずれの

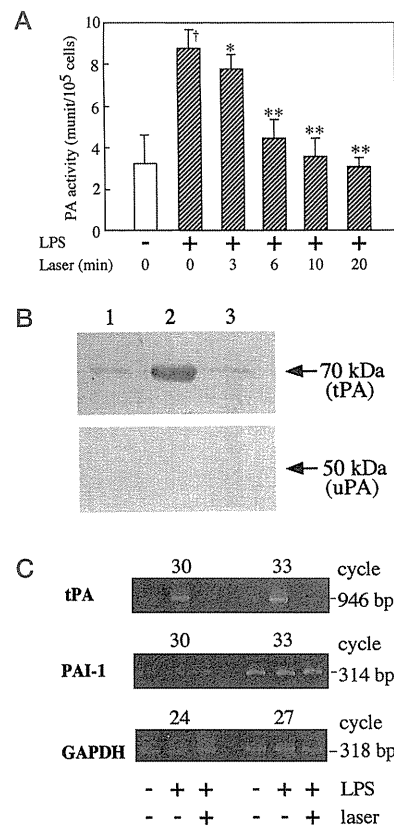


Fig.6 Inhibition of PA production from gingival fibroblasts by laser irradiation.

Condition of laser irradiation; GA-AL-As diode laser, wave length=830 nm, 7.9 J/cm².

- (A) PA production stimulated by LPS from gingival fibroblasts was reduced by laser irradiation.
- (B) Western blot analysis using antibodies against tPA and uPA. PA protein was reduced by laser irradiation. 1. LPS (-); 2, LPS (+); 3, LPS (+); 4, Laser irradiation.
- (C) Measurement of PA mRNA level by RT-PCR. PA mRNA level was reduced by laser irradiation.

場合もPGE₂、IL-1 β 、PA遺伝子の発現レベルを亢進することに起因することが明らかになった^{13, 10, 14)}。(Fig.5)

5. レーザー照射の消炎作用

細菌感染に対する防御組織としての観点から歯周病原細菌LPSで刺激する培養細胞系でPGE₂、IL-1 β 、PAの炎症メディエーター産生が誘導され老化細胞でも産生がさらに促進することが証明されたことから、細胞機能を保持した有用な実験モデル系といえよう。そこで、この細胞培養実験系を応用して、レーザー照射の影響を調べた。その結果、LPS刺激で増大したPGE₂、IL-1 β 、PA産生量はいずれもレーザー照射によって減少していた¹⁵⁻¹⁷⁾。(Fig.6)

歯根膜細胞に周期的伸展刺激を加えPGE₂、IL-1 β 、PA産生量を誘導させる実験系を用いて低出力半導体レーザーを1日10分5日間照射する実験を行った。5日間のレー

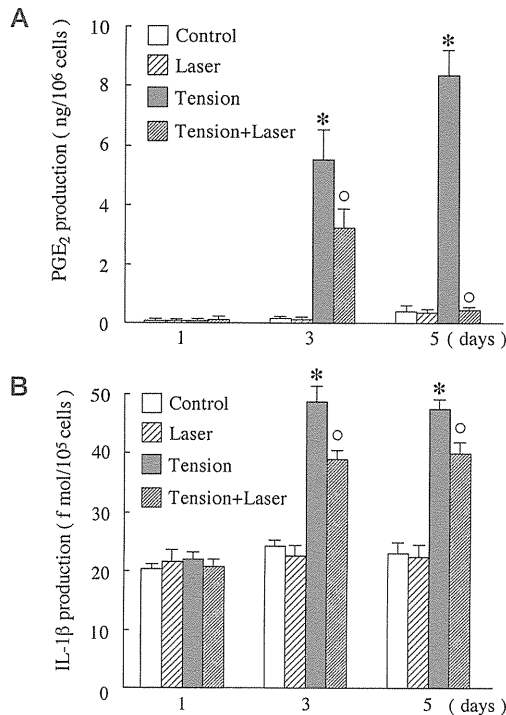


Fig.7 Inhibition of PGE₂ and IL-1β productions from periodontal ligament cells by laser irradiation. Laser irradiation reduced production of PGE₂ and IL-1β stimulated by cyclic tension force from periodontal ligament cells by laser irradiation. Condition of laser irradiation; GA-AL-As diode laser, wave length=830 nm, 7.9 J/cm².

レーザー照射によってPGE₂産生は完全に抑制され、この効果は照射量に依存していた。またIL-1βは40%のみ抑制され、この産生抑制はCOX2とIL-1βの遺伝子発現の抑制により起こっていることが示唆された¹⁸⁾。(Fig.7)

低出力レーザー照射が伸展刺激に応答して発現亢進する歯根膜細胞のCOX2やIL-1β遺伝子を顕著に抑制したことは、照射量や組織透過性を十分考慮したうえで移動歯周囲にレーザー照射を行うことにより、矯正治療に伴う疼痛軽減に有効であることを意味する。さらに前述のPA及びPAIについてもレーザー照射の影響を検討すると、伸展刺激により亢進していたtPAの遺伝子発現はレーザー照射により顕著に抑制されていた¹⁹⁾。

6. レーザー照射の骨形成促進

低出力レーザー照射による骨折や骨欠損部の骨形成促進作用が報告されているが、その作用機序を含め詳細はほとんど解明されていない。低出力レーザーを矯正臨床に応用するためには、安全でかつ効果を最大に発揮するレーザー照射条件を詳細に検討すると共に、そのメカニズムを解明することが必要である。

培養細胞実験系については、ラット骨芽細胞あるいは石灰化能をもつマウス骨芽細胞樹立株MC3T3E1を用いた。骨形成能については、リン酸カルシウム石灰化物を

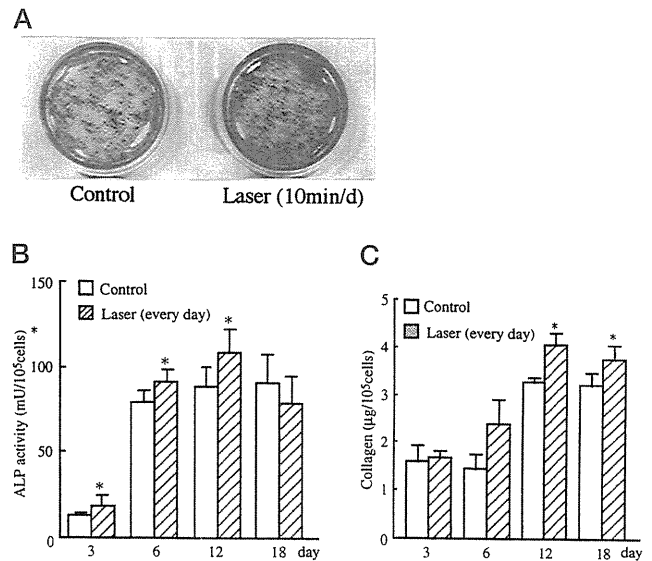


Fig.8 Effect of laser irradiation on osteoblasts. (A) Stimulation of bone nodule formation (Von Kossa staining); (B) Stimulation of alkaline phosphatase (ALP) activity. (C) Stimulation of collagen amount. Condition of laser irradiation; GA-AL-As diode laser, wave length=830 nm, 7.9 J/cm², once in a day for 21 days.

評価するvon kossa染色によって評価した。妊娠母親ラットから出生一日前に胎児を摘出し、頭蓋骨をコラーゲナーゼ消化して骨芽細胞を培養し、骨形成誘導培地で培養すると骨結節を形成する。この実験系を利用して、骨形成に与えるレーザー照射の影響を調べた。その結果、レーザー照射により骨結節数、総面積が増大した。さらに、骨形成に重要なアルカリホスファターゼ、コラーゲンの産生量を増大させていた²⁰⁾。また、培養早期のレーザー照射がより強い骨形成促進効果を有しており、これはレーザー照射が培養早期に未分化間葉系細胞の増殖と骨芽細胞への分化を促進することにより引き起こされていることも判明した²¹⁾。(Fig.8)

7. 生物学的効果解明への機能ゲノム科学応用

遺伝子情報はDNAからmRNAへの転写そしてタンパク質合成へと流れていく。ゲノムの情報に対して、mRNAレベルの情報を総括してトランスクリプトーム、遺伝子産物すなわちタンパク質の情報を総括してプロテオームとよぶ。これらのデータベース情報を利用して統括する学問体系をバイオインフォマティクス(生物情報科学)といい、疾病関連遺伝子の探索、遺伝子産物タンパク質の立体構造解析を基盤にしたゲノム創薬へと発展している。

レーザー照射が、歯肉線維芽細胞、歯根膜細胞の炎症因子、骨吸収因子、組織破壊酵素関連遺伝子群の発現を抑制すること、骨芽細胞ではアルカリホスファターゼ、コラーゲンの産生量を増大させること、を明らかにしてきたが、これらのアプローチは、すでに役割が判明している遺伝子を取りあげて解析し、証明するもので、レー

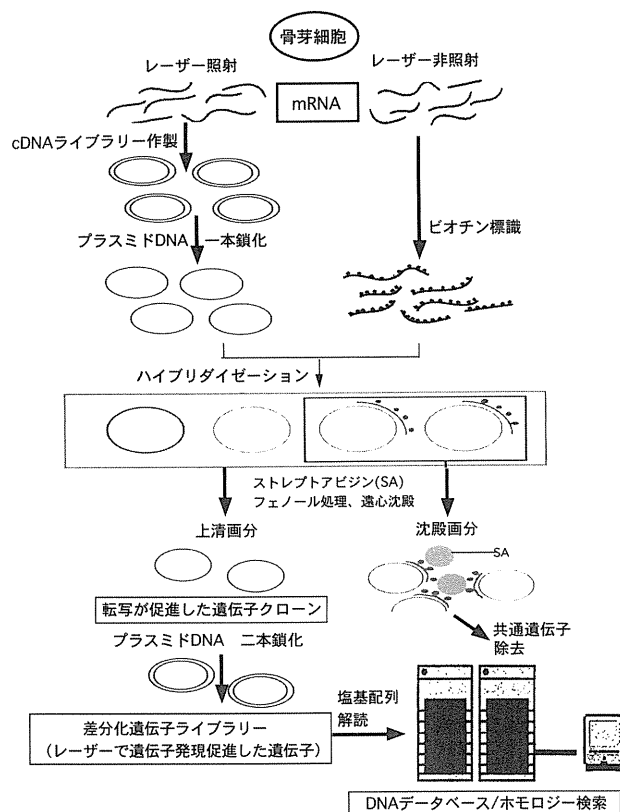


Fig.9 Search for laser irradiation responsive genes using subtractive gene cloning.

レーザー照射の全貌を明らかにできたわけでは勿論ない。レーザーの生物学的効果に関与するメカニズムはもっと多様で且つ複雑であり、未知の生命現象が関わっている。

遺伝子発現の変動を捉える方法として、遺伝子バンクを作成し、対照のmRNAで差し引きするサブトラクション遺伝子クローニング法が開発されている。レーザー照射した細胞からmRNAを分離してcDNA遺伝子バンクを作成し、非レーザー照射細胞から回収したmRNAを用いて同一遺伝子を差し引いた(差分化)残りの遺伝子群は、レーザー照射によって遺伝子発現が増大した遺伝子クローンということになる。得られた差分化遺伝子ライブラリーの各遺伝子クローンの塩基配列を解読してゲノムデータベースの遺伝子配列とホモロジー検索することによって当該遺伝子を同定し、遺伝子産物の機能を明らかにすることが可能となる。

我々は、骨芽細胞MC3T3-E1に低出力レーザー照射して差分化遺伝子ライブラリーを構築し、各遺伝子クローンについて塩基配列を解読した。そしてNational Center for Biotechnology Information (NCBI)のBLAST(Basic Local Alignment Search Tool)を利用して、塩基配列のホモロジー検索(Nucleotide BLAST;blastn)を行った。解読した520bp塩基配列のホモロジー検索の結果で既知遺伝子と一部の相同性が見られたものをKnown geneクローン、アノテーション

がないEST(Expression Sequence Tag)geneとのホモロジーが見られたものをESTクローン、30bp以上相同性が見られないのをUnknown geneクローンとした²²⁾。(Fig.9)

レーザー照射が細胞の増殖を促進することは既に知られているがその詳細な機序は不明である。MCM(mini-chromosome maintenance)遺伝子ファミリーは細胞の細胞分裂時に細胞周期S期でDNA複製が起こることを保証するライセンス因子で真核細胞のDNA複製に必須であることが明らかになっている。Northern blot 分析を行ったところ、レーザー照射後レーザー非照射細胞に比較してMCM mRNAレベルの増加が認められ、DNA合成能を放射性チミジン取り込み量により検討した結果、レーザー非照射群に比較して増加が認められた。このことからレーザー照射の細胞増殖促進作用はMCM遺伝子の転写を介してDNA複製を進行させることが関与することが示唆された²³⁾。

レーザー照射によってATP合成能や細胞内ATP量が増大することが報告されている。レーザー照射によって発現促進した遺伝子の一つがATP合成酵素(F_0F_1 -ATPase)と高い相同性を示した。Northern blot 分析の結果、やはりレーザー非照射群でmRNAレベルの増加が認められ、さらにレーザー照射細胞群にATP量の増加が認められた²⁴⁾。レーザー照射によってATP合成酵素の遺伝子発現が促進することは生物学的効果の機序の解明に興味深いものがある。(Fig.10) また、骨芽細胞の骨形成作用に関連する遺伝子としてAnnexin III²⁵⁾とMIF(macrophage migration inhibitory factor)²⁶⁾ 遺伝子クローンも差分化遺伝子ライブラリーから同定し、real time RT-PCR 法によって確認している。Annexin IIIは、エナメル芽細胞や象牙芽細胞に見いだされ、細胞カルシウムの調節に関与するといわれており、MIFは、従来、種々の組織で産生されるサイトカインで炎症プロセスに関与することが知られていたが、最近、骨芽細胞でも産生されており、骨芽細胞の増殖や骨改造を調節する機能をもつことが示唆されている。

ゲノムデータベースを応用して、短時間に遺伝子発現度を解析できるDNAマイクロアレイ法の開発が進んでいる。この方法は、膨大な数の遺伝子のcDNA、PCR産物、オリゴヌクレオチドをガラス基板に高密度にスポットしてカスタムメイドDNA マイクロアレイを作成し、比較したいRNAサンプルをそれぞれcy3, cy5の蛍光色素で標識して等量をDNA マイクロアレイとハイブリダイズさせ、スキャナーでcy3, cy5それぞれの蛍光密度をモニターすることでmRNAレベルを比較検討できる。

我々は約3900遺伝子のcDNAマイクロアレイを応用して骨芽細胞MC3T3-E1に低出力レーザー照射を行い²⁷⁾、遺伝子発現が変動する遺伝子をモニタリングした²⁷⁾。その結果、osteoglycin mRNAレベルが低出力レーザー照射によって増大することが見出し、Real time PCR法によって確認した²⁸⁾。Osteoglycinは、骨誘導因子として精製された標品の構成成分として見出されたプロテオグリカンで骨形成因子の保持、機能発現に関与することが報告されていることから、レーザー照射による骨芽細胞の

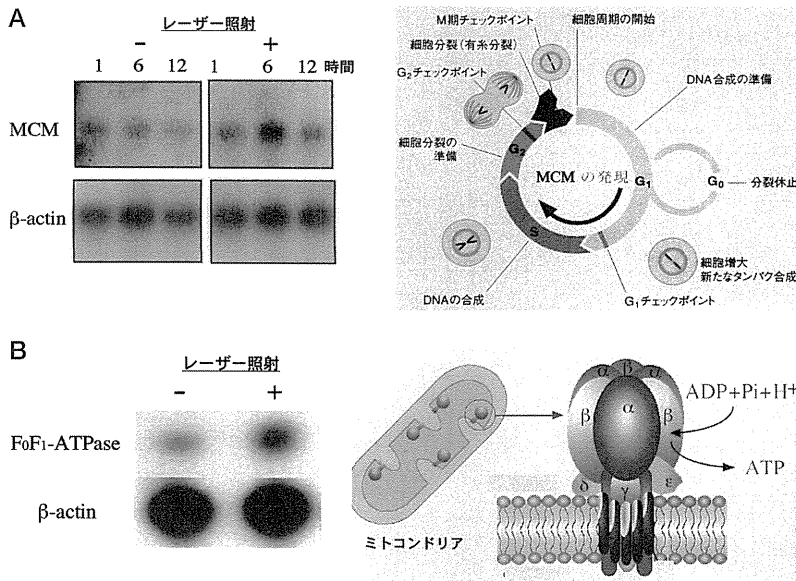


Fig.10 Enhancement of gene expressions of mini-chromosomal maintenance factor (MCM) and mitochondrial ATP synthetase (F₀F₁-ATPase). (A) Northern blot analysis of MCM mRNA and the role of MCM. (B) Northern blot analysis of F₀F₁-ATPase mRNA and the role of F₀F₁-ATPase. Condition of laser irradiation: GA-AL-As diode laser, wave length=830 nm, 7.9 J/cm². Irradiation was carried out once at preconfluent stage of osteoblasts culture.

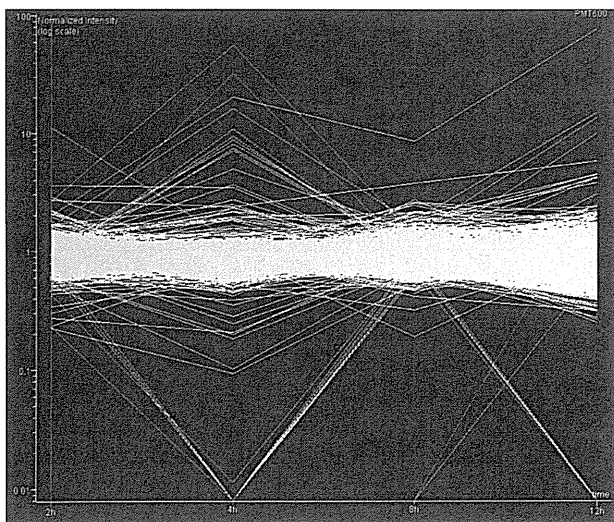


Fig.11 Gene expression monitoring in osteoblasts by laser irradiation using cDNA microarray. After laser irradiation of osteoblasts, mRNAs were recovered at 2, 4, 8, 12, hours, and analyzed mRNA levels using 3,900 genes cDNA microarray.

osteoglycin産生促進は骨形成能の促進に関与していると考えられる。(Fig.11)

DNA マイクロアレイ解析は、cy3, cy5の蛍光色素で標識された比較したいRNAサンプルそれぞれの蛍光強度の比で行われるが、我々のレーザー照射、非照射の骨芽細胞での遺伝子発現プロファイリング結果をRT-PCR で確

認してみると、必ずしも全ての遺伝子でマイクロアレイ結果とRT-PCR結果とは一致しなかった。また、両RNAサンプルの標識をそれぞれcy3, cy5を交換して解析しても両者のマイクロアレイ解析結果が必ずしも一致しないことも経験しており、マイクロアレイ解析の信頼度は高いとは言えない。その原因として、低コピー数mRNAサンプル、cy3, cy5蛍光色素標識の再現性、アレイ上のcDNAプローブ、RNAサンプルの自己アニーリング、プローブへのクロスハイブリダイゼーションなどの問題が考えられている。これらの問題点を改良した Gene ChipがAffymetrix社で開発されている。該当する遺伝子の特異配列部分16箇所を選び、それぞれに対するパーフェクトマッチと一塩基ミスマッチさせたオリゴヌクレオチドをガラス基板に直接合成し、RNAサンプルを低分子化してハイブリダイズさせることで信頼度を高めたGene Chipが市販されている。

Gene Chipで解析された膨大なトランスクリプトームデータは研究目的の新規関連遺伝子の発見に大きなインパクトを与えているが、得られた解析データ情報を日進月歩に蓄積される膨大なゲノムデータベースと照合して網羅的な検索をヒトの手で行なうことはもはや不可能といわざるを得ない。最近、解析データを遺伝子間、タンパク質間の相互関係、高次生物学的プロセス関係の膨大なデータベースと網羅的に照合させるIngenuity Pathway Analysis システム (Ingenuity System Co, トミーデジタルバイオロジー社)が開発されている。Gene Chip解析で得られた解析結果をデータマイニングし、本解析ソフトに導入することでGene Chip解析結果から情報伝達系をコアとする遺伝子間、タンパク質間の相互関係、高次生物学的プロセス関係を基盤とした各分子間ネットワークが提示される。

我々は、Gene Chip (Affymetrix 8500 genes)を用いて、ヒト骨芽細胞への低出力レーザー照射によって発現が変化する遺伝子のトランスクリプトーム解析を試みた。(Fig.12)オントロジー解析した結果、細胞分裂、シグナル伝達関連遺伝子、成長因子、成長因子受容体、イオンチャネル関連因子、Ca調節因子など多数の遺伝子の発現がレーザー照射によって変動していることを見出した。さらに、Ingenuity Pathway Analysis システムに解析データベースにデータマイニングした解析結果を送り、検索した。シグナル伝達ネットワークの第一候補では、Fig.12に示すようにWint/ β -cateninシグナル系、PI3 kinase/JAKTシグナル系の関与が示唆された。(Fig.13)

8.まとめ

培養細胞系を応用してレーザー照射の生物学的効果が

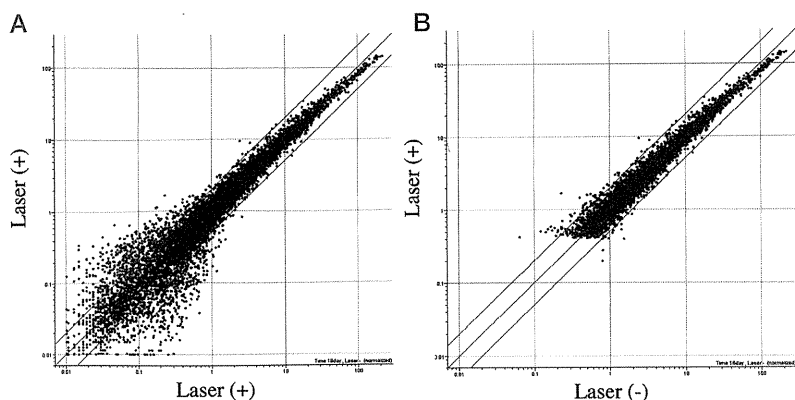


Fig.12 Gene expression monitoring in osteoblasts by laser irradiation using gene chip. After laser irradiation of osteoblasts, mRNAs were recovered at 18 hour and analyzed mRNA levels using 8,500 genes Affymetrix gene chip. (A) Scatter plot of 8,500 genes. (B) Scatter plot of reliable genes after data mining.

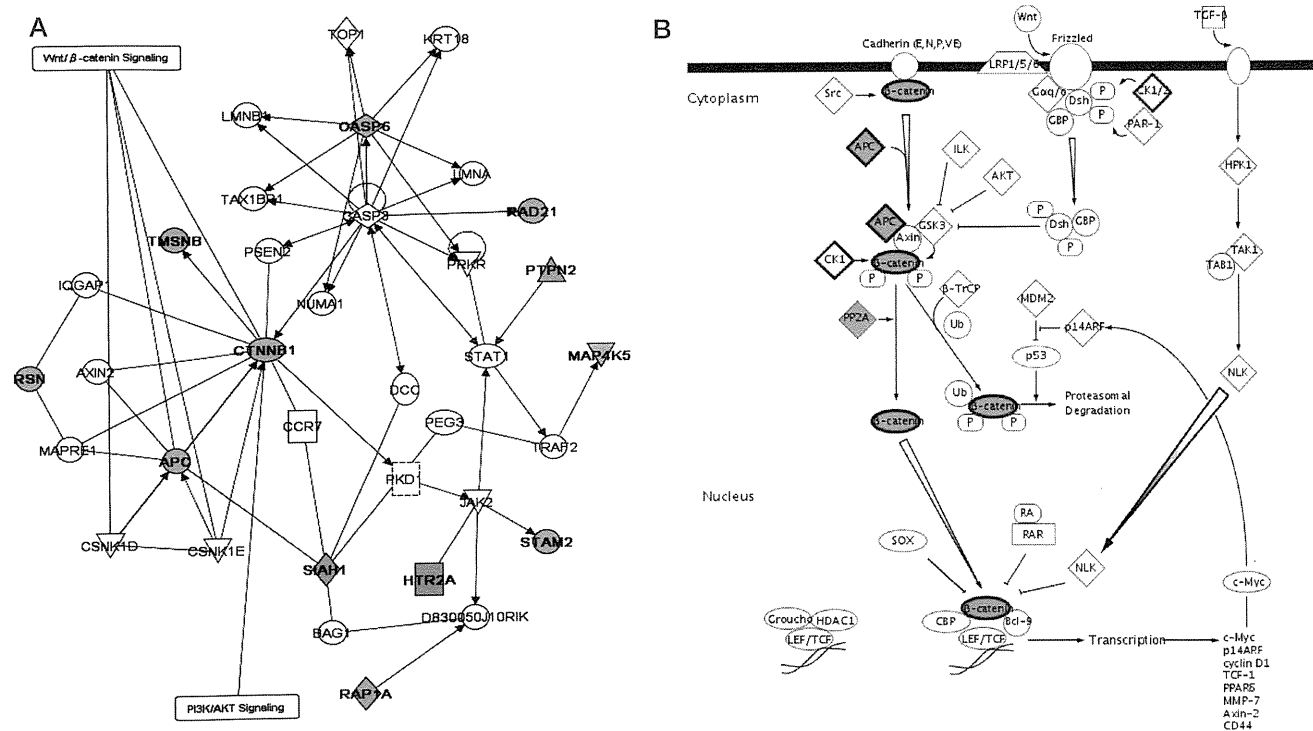


Fig.13 Analysis of Ingenuity Pathway database. (A) Net work of wnt/ β -catenin signaling and PI3 K/AKT signaling pathway. (B) Signal pathway of wnt/ β -catenin and altered gene expression genes.

証明され、その機序としてレーザー照射は種々の遺伝子発現を変動することが明らかとなった。さらに、ゲノム/トランスクリプトームデータベースを応用した差分遺伝子クローニングやcDNAマイクロアレイ、Affymetrix Gene Chipを応用してレーザー照射による発現促進する遺伝子の探索にも成功した。良くいわれていることはあるが、mRNAレベルは必ずしもタンパク質レベルとは一致しない。遺伝子発現をモニターする、これらの研究成果によってレーザー照射の生物学的効果の全貌が明らかになったわけではない。情報伝達系の構成分子のなかには、必ずしもレーザー照射の刺激によって遺伝子の転写を通じてタンパク質を発現させる必要はな

く、例えばタンパク質としてはすでに存在しているが不活性状態であり、リン酸化されて始めて作用を発揮するものがある。あるいは半減期の長いタンパク質では高い遺伝子発現レベルを必要としない。したがってトランスクリプトーム解析によって全ての生命現象が明らかになるわけではない。当研究室では、二次元電気泳動ゲルをイメージアナライザーで分析して標的タンパク質スポットを切り出して、in gel digestion、ペプチド断片の精製を自動的に行うロボットと飛行時間型質量分析機器システムを用いてゲノムデータベース解析ツールMASCOTサーチを応用してレーザー照射によって増減するタンパク質、リン酸化タンパク質の網羅的解析を行っている。

レーザー照射による生物学的効果の解明にもプロテオミクス研究を応用している。近い、将来、(ゲノム)–(トランスクリプトーム)–(プロテオーム)データベース情報を駆使したバイオインフォマティクス研究によってレーザー照射による生物学的作用の全貌が明らかになり、より効果的なレーザー医療の推進が期待できよう。

参考文献

- 1) H. Takiguchi, M. Yamaguchi, K. Mochizuki, et al.: Effect of in vitro aging on *Campylobacter rectus* lipopolysaccharide-stimulated PGE₂ release from human gingival fibroblasts, *Oral Diseases*, 2:202-209, 1996.
- 2) H. Takiguchi, M. Yamaguchi, H. Okamura H, et al.: Contribution of IL-1 β to the enhancement of *Campylobacter rectus* lipopolysaccharide-stimulated PGE₂ production in old gingival fibroblasts in vitro, *Mech. Ageing Dev.*, 98:75-90, 1997.
- 3) N. Ogura, Y. Shibata, U. Matsuda et al.: Effect of *Campylobacter rectus* LPS on plasminogen activator-plasmin system in human gingival fibroblast cells. *J. Periodontal Res.* 30:132-140, 1995.
- 4) F. Tanaka, N. Ogura, Y. Abiko: Stimulation of plasminogen activator/plasmin system in gingival fibroblast cells by oxygen radicals. *Arch Oral Biol.*, 42:263-270, 1997.
- 5) H. Okamura, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated PGE₂ and IL-1 β production in gingival fibroblast cells from old rats. *Exp. Gerontol.*, 34:379-392, 1999.
- 6) K. Mochizuki, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Enhancement of LPS-stimulated plasminogen activator production in aged gingival fibroblasts. *J. Periodont. Res.*, 34:251-260, 1999.
- 7) M. Yamaguchi, N. Shimizu, T. Goseki et al.: Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E₂ production by human periodontal ligament cells; *Arch Oral Biol.*, 39: 877-884, 1994.
- 8) N. Shimizu, M. Yamaguchi, T. Goseki et al.: Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 β production by human periodontal ligament cells, *J. Periodont. Res.* 19: 328-333, 1994.
- 9) N. Shimizu, M. Yamaguchi, T. Goseki et al.: Induction of cyclooxygenase-2 expression by excessive mechanical tension force in human periodontal ligament cells, *J. Periodontol.*, 69: 670-677, 1998.
- 10) N. Shimizu, T. Goseki, M. Yamaguchi et al.: In vitro cellular aging stimulates interleukin-1 β production in stretched human periodontal ligament derived cells, *J. Dent. Res.*, 76: 1367-1375, 1997.
- 11) M. Yamaguchi, N. Shimizu, Y. Ozawa et al.: Effect of tension-force on plasminogen activator activity by human periodontal ligament cells, *J. Periodont. Res.*, 32: 308-314, 1997.
- 12) Y. Abiko, N. Shimizu, M. Yamaguchi et al.: Effect of aging on functional changes of periodontal tissue cells, *Ann. Periodontol.*, 3:350-369, 1998
- 13) K. Ohzeki, M. Yamaguchi, N. Shimizu et al.: Effect of cellular aging on the induction of COX-2 by mechanical stress in human periodontal ligament cells, *Mech. Ageing Dev.*, 108:151-163, 1999.
- 14) S. Miura, M. Yamaguchi, Y. Abiko :Mechanical stress enhances expression and production of plasminogen activator in aging human periodontal ligament cells. *Mech. Ageing Dev.*, 112:217-231, 2000.
- 15) K. Nomura, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Inhibition of interleukin 1 β production expression in gingival fibroblasts by low-energy laser irradiation. *Lasers Med. Sci.*, 16: 218-223. 2001.
- 16) Y. Sakurai, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E₂ production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts. *Eur. J. Oral Sci.*, 108:29-34, 2000.
- 17) T. Takema, M. Yamaguchi, Y. Abiko: Reduction of plasminogen activator activity stimulated by lipopolysaccharide from periodontal pathogen in human gingival fibroblast by low-energy laser irradiation. *Laser Med. Sci.*, 15: 35-42, 1999.
- 18) N. Shimizu, M. Yamaguchi, T. Goseki et al.: Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin-1 β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.*, 74: 1382-1388, 1995.
- 19) Y. Ozawa, N. Shimizu, Y. Abiko : Low-energy diode laser irradiation reduced plasminogen activity in human periodontal ligament cells. *Lasers Surg. Med.*, 21:456-463, 1997.
- 20) Y. Ozawa, N. Shimizu, H. Mishima et al.: Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone formation in vitro. Altshuler, G.B., Blankenau, R.J., and Wigdor, H.A., Eds. *Advanced Laser Dentistry*, Proc. SPIE 1984:281-288, 1995.
- 21) Y. Ozawa, N. Shimizu, G. Kariya et al.: Low-energy laser irradiation stimulated bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Lasers Surg. Med.*, 21:456-463, 1997.
- 22) S. Hosoya, K. Tamura, K. Nomura et al.: Construction of subtracted osteoblast cDNA library with laser-irradiation-enhanced transcription, *Laser Therapy*, 9: 107-114, 1997.
- 23) M. Yamamoto, T. Tamura, K. Hiratsuka et al.:Stimulation of MCM3 gene expression in osteoblast by low level laser irradiation, *Lasers Med. Sci.*, 16: 213-217, 2001.
- 24) K. Tamura, S. Hosoya, T. Takema et al.: Low level laser irradiation enhances expression of FoF1-ATPase subunit-b gene in osteoblastic cells, *Laser Therapy*, 10:107-116, 1998.
- 25) 山本雅久, 河原三明, 安孫子宜光: Enhanced Gene Expression by Low-Level Laser Irradiation in Osteoblast - Identification of Annexin III Gene by Subtractive Gene Cloning-, *日本口腔インプラント学会誌*, 15:323-329, 2002.
- 26) 河原三明, 浜島進, 多田充裕, 笹原廣重 他: Effect of Low-Level Laser Irradiation on Macrophage Inhibitory Factor Gene Expression in Osteoblasts, *日本口腔インプラント学会誌*, 17:3-12, 2004.
- 27) Y. Abiko, K. Hiratsuka, S. Hamajima et al.: Genome science-based gene expression monitoring in osteoblasts altered by low-level laser irradiation, *Laser in Dentistry, Revolution of Dental Treatment in the new millennium; International Congress Series*, 1248: 433-436, 2003.
- 28) S. Hamajima, K. Hiratsuka, M. Kiyama-Kishikawa: Effect of low-level laser irradiation on osteoglycin gene expression in osteoblasts. *Lasers Med. Sci.*, 18:78-82, 2003.

著者紹介



安孫子宜光 (Yoshimitsu Abiko)

昭和47年, 日本大学歯学部卒業。昭和47年, 日本大学松戸歯学部助手。昭和51年, 日本大学松戸歯学部講師。昭和53-55年, 米国アラバマ大学客員講師。昭和62年, 日本大学松戸歯学部助教授。平成4年, 日本大学松戸歯学部教授, 現在に至る。

平成12年-, 中国第武漢大學客員教授, 名誉教授。平成12年-, 米国ルイジアナ州立大学歯学部, 研究教授。平成12年-, 中華民国台北医学大学客員教授。平成13年-, タイ, タマサト大学客員教授。

培養細胞レベルからみた 低出力レーザー照射の疼痛抑制効果

安孫子宜光

日本大学松戸歯学部生化学講座

要 旨

近年、レーザー療法のペインクリニックへの応用が目覚ましいが、分子レベルでの機序解明は十分ではなく、レーザー応用を推進するためにも疼痛抑制機序を実証科学的に解明する必要がある。分子レベルでの機序解明にあたり、培養細胞を利用することは有用性が高く、生体の複雑な代謝系に与えるレーザーの影響を解明することに貢献できると考えられる。本稿では、歯根膜細胞へ機械的ストレスを付加する培養細胞実験系を応用した、レーザー療法の疼痛抑制効果の実証科学的な解明について紹介する。

(ペインクリニック 26 : 230-236, 2005)

キーワード：歯根膜細胞，機械的ストレス，レーザー治療

歯根膜は歯槽骨と歯のセメント質の間に存在し、歯を歯槽窩に保持する役割を有するとともに、咬合の過重に対する機械的ストレスを吸収して歯槽骨の破壊を防いでいる。しかし、歯列不正、多数歯を喪失した顎の残存歯、咬合関係の不良などによって特定の歯に過剰な咬合圧が加わった時、歯根膜組織から炎症性メディエーターや骨吸収促進因子が産生されて疼痛、歯槽骨の吸収をきたす。一方、歯科矯正治療では、この反応を応用して歯が移動するといわれている。その機序として、歯の移動方向すなわち圧迫側では骨の吸収が起こり、反対方向すなわち牽引側では骨の添加が起こる。その結果、歯が移動すると説明されている。衆知のように歯科矯正治療で矯正装置を歯に装着した後、強烈な

疼痛が起こり、多くの患者にとって大きな負担になっている。この発痛の機序については、矯正力付加によって歯根膜組織がプロスタグランジン E_2 (prostaglandin E_2 : PGE_2)、インターロイキン- 1β (interleukin- 1β : $IL-1\beta$)、プラスミン、ブラジキニン等の発痛物質を産生するためと考えられる。実際、ネコを用いた実験的歯の移動中の歯根膜には PGE_2 、 $IL-1\beta$ が強く産生されていることが証明されている。

$IL-1\beta$ は、前駆体として生合成され、変換酵素 ($IL-1\beta$ converting enzyme : ICE) によって活性型になる。また、細胞膜リン脂質のアラキドン酸を基質にアラキドン酸カスケードの律速酵素シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase : COX) によって PGG_2/H_2 が合成され、ついで PGE_2 合成酵素によって PGE_2 が合成される。プラスミン活性化因子 (plasminogen activator : PA) は、プラスミノゲンをプラスミンに変換する酵素であり、プラスミン/PA カ

Effect of pain relief by low-level laser irradiation in cell culture level

Yoshimitsu Abiko

Department of Biochemistry, Nihon University
School of Dentistry at Matsudo

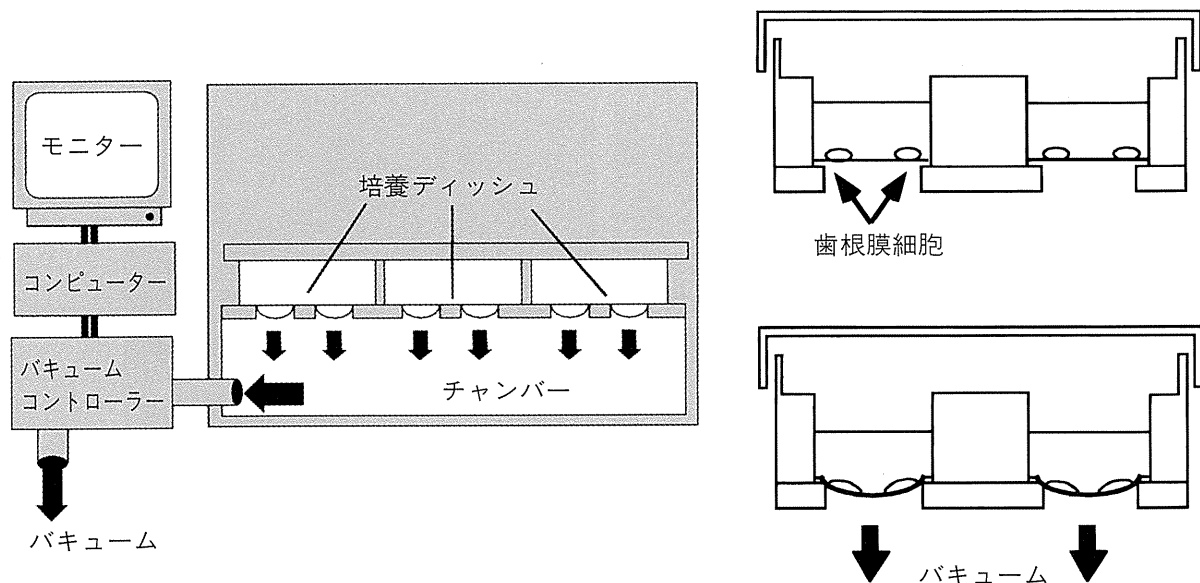


図1 Flexer Strain Unit

培養細胞を周期的な伸展させることで機械的ストレスを加える装置。コンピューター制御によって面積を9～24％に、伸展サイクルも再現性よく設定できる

スケードの律速酵素である。プラスミンは、プレカリクレインを活性化してキノーゲンから発痛物質であるブラジキニンを生成する。本稿では、レーザー照射による疼痛抑制の解明の一助として、機械的ストレスを付加した歯根膜細胞の発痛物質産生系に与えるレーザー照射の影響を紹介する。

1. 歯根膜細胞への機械的ストレス付加実験系

ヒト歯根膜線維芽細胞（初代培養）を培養して、Flexer Strain Unit と呼ばれる装置を用いて歯根膜細胞に周期的伸展力を加え、咀嚼時の機械的ストレス付加実験系を設定した。Flexer Strain Unit は、フレキシブルな底面の培養ディッシュに歯根膜細胞を培養し、チャンバー上に設置して、チャンバー内を真空ポンプで吸引することにより培養ディッシュの底面すなわち培養細胞を周期的に伸展させることで機械的ストレスを加える装置で、コンピューター制御によって再現性よく底面を伸展させ、伸展サイクルも設定できる。したがって、歯根膜細胞にとっては、一定の力と間隔で周期的に伸展されるの

で、咬合による機械的ストレスが再現されることになる（図1）。

Flexer Strain Unit を用いて歯根膜由来細胞に周期的伸展刺激を3～5日間加えると PGE_2 が多量に産生され、周期的伸展力の強さに依存して PGE_2 産生が誘導される¹⁾。さらに同様の実験系で、 $\text{IL-1}\beta$ も周期的伸展刺激により産生されることがあきらかとなった²⁾。伸展刺激を加えた歯根膜細胞の培養上清を回収して、 ^{45}Ca 標識したラット胎仔頭頂骨の器官培養系に加えると、実際に ^{45}Ca 放出が上昇し、培養上清中には強い骨吸収因子の存在が示唆された。この骨吸収活性の半分はPG合成抑制薬であるインドメタシンを添加することで阻害され、残り半分は $\text{IL-1}\beta$ 抗体の添加で抑制されたため、培養上清中の骨吸収因子は主として PGE_2 と $\text{IL-1}\beta$ であると考えられた²⁾。これらのことから過剰の周期的伸展刺激に応答して歯根膜由来細胞が PGE_2 や $\text{IL-1}\beta$ を産生し、疼痛、歯槽骨の吸収を引き起こすことが説明できる。

歯根膜細胞への伸展刺激による PGE_2 産生における *cox-1*, *cox-2* 遺伝子発現について RT-PCR 法で検討した。その結果、歯根膜への伸展刺激により COX-2 の遺伝子発現が顕著に亢進

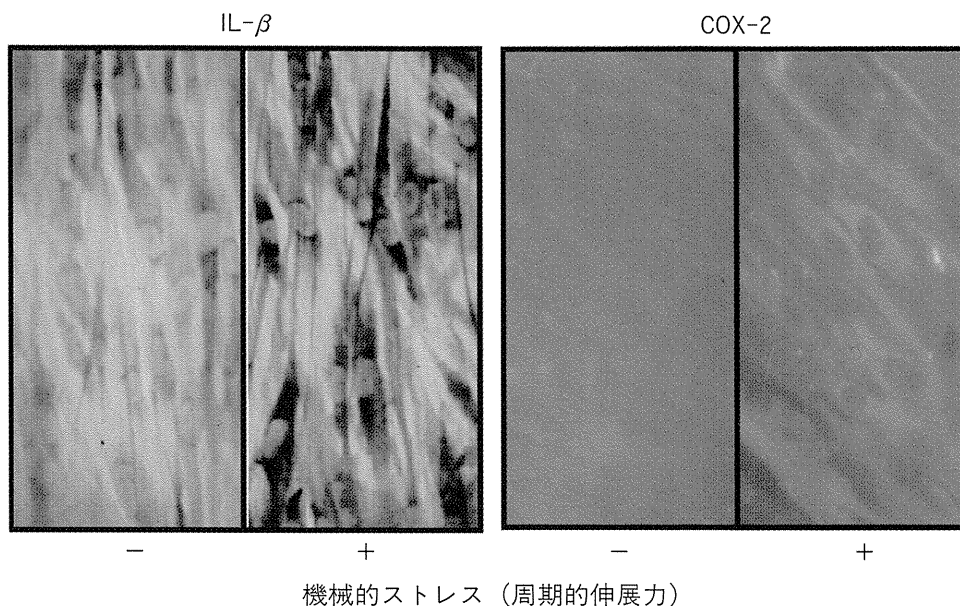


図2 歯根膜細胞への機械的ストレスによる IL- β , COX-2 産生
IL- β , COX-2 に対する特異抗体を用いて免疫組織染色を行った

しており、COX-1 の遺伝子発現には変化がなかった。また、COX-2 蛋白の発現を調べるため、COX-2 特異抗体を用いた免疫染色でも COX-2 の産生が証明された。非ステロイド性抗炎症薬の誘導体で最近開発された COX-2 特異的阻害薬 NS-398 を添加すると PGE₂ 産生亢進は完全に抑制されることから、伸展刺激による歯根膜細胞の PGE₂ 産生は COX-2 のみを介して起こっていると示唆された³⁾。一方、IL-1 β 産生については、伸展刺激による IL-1 β や ICE mRNA レベルの変化について RT-PCR と *in situ* hybridization 法にて検討した。その結果、IL-1 β mRNA レベルは増大するが、ICE 遺伝子発現には変化がなかった。伸展刺激を加えた歯根膜細胞の培養液中の PA 活性も顕著に上昇し、tPA, uPA, PAI-1 の遺伝子発現について検討した結果、伸展刺激は tPA の遺伝子発現を亢進し、uPA, PAI-1 遺伝子発現には影響を与えなかった⁴⁾。これらのことから、歯根膜細胞は過剰の機械的ストレスに応答して、発痛物質である IL-1 β , PGE₂, プラスミン, ブラジキニンの産生を亢進し、外傷性咬合や歯科矯正時の疼痛を引き起こす原因となることが示唆された(図2)。

2. レーザー照射による発痛物質産生の抑制

レーザー照射による細胞増殖促進、コラーゲン合成促進、炎症抑制、骨折治癒促進、そして疼痛減少など、広範な生物学的効果や臨床効果が多く報告されている。しかしながら、一方ではレーザー療法に未だに懐疑的な見解もあり、レーザー照射の効果を心理的なプラセボ効果が大きいとする考えや、試行錯誤的に実施されて効果のあった臨床効果だけが誇張されているという意見もある。また、生物学的効果は単なる温度上昇効果によるものであろうとする議論や、レーザー照射の副作用について十分検討されていないという指摘もされている。このような背景からレーザー照射によるペインコントロールの積極的な臨床応用が期待されている中で、レーザー医療をさらに推進、発展させるためには、有用性の高いレーザー照射の機種、照射法を開発するとともに、生物学的効果を実証科学的に解明していく必要があると思われる。

本研究では、Ga-Al-As ダイオードレーザー機種(Panalas-1000, 松下電器産業製。波長 830 nm, 最大出力 700 mW)を用いた。本研究では

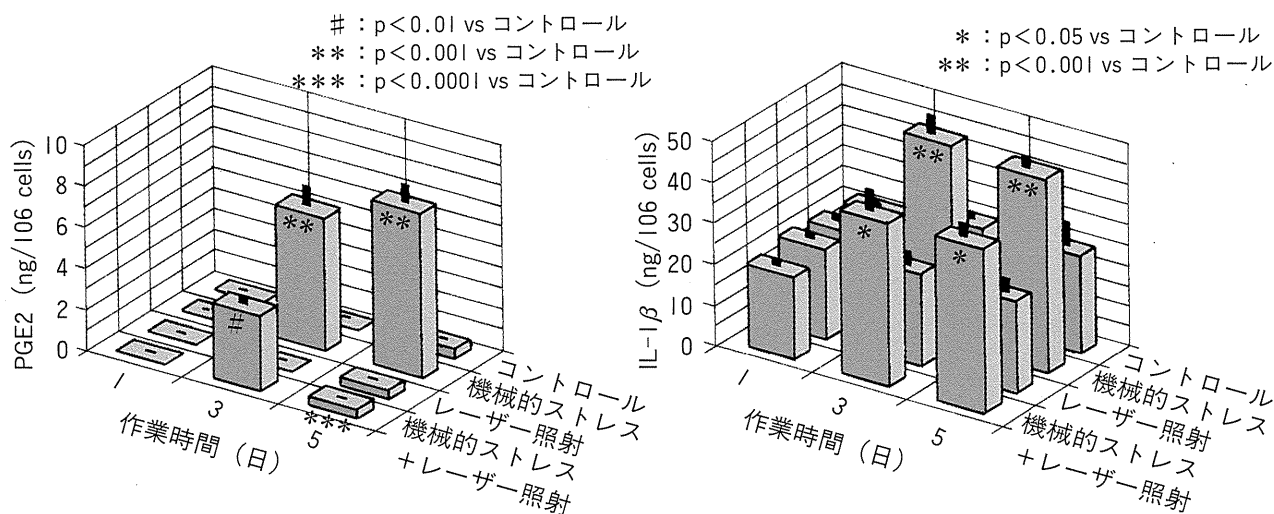


図3 歯根膜細胞 PGE₂, IL-1β 産生のレーザー照射による抑制
歯根膜細胞への機械的ストレスによって産生が増大する IL-1β, COX-2 がレーザー照射によって抑制される

実験対象が培養細胞であることから、培養ディッシュに広く照射できるように 0.6 mm 口径の光ファイバーで照射範囲を広げ、直径 13 cm²に照射できるように工夫をしてある。この条件で歯根膜培養細胞に 10 分間照射した時のエネルギーは 7.9 J/cm²になる。細胞培養系にこの条件でレーザー照射した時の温度を測定したが、0.5℃以下の無視できる上昇温度であったことからレーザー光の直接効果として判定できると考えている。

歯根膜細胞に周期的伸展刺激を加え PGE₂, IL-1β, PA 産生量を誘導させる実験系を用いてレーザー照射を行った。レーザー照射によって PGE₂産生は完全に抑制され、この効果は照射量に依存していた。また、IL-1β は 40 %抑制された⁵⁾。PGE₂, IL-1β 溶液にレーザー照射した後、ELISA 法で PGE₂, IL-1β 量を測定したが、レーザー照射群、非レーザー照射群間で変化はなく、この効果はレーザー照射による PGE₂, IL-1β の直接的な破壊ではないと考えられる。われわれは、レーザー照射による歯周炎の炎症抑制の作用機序を解明する一助に、歯周病原細菌内毒素 LPS で歯肉線維芽細胞を刺激し、増大する PGE₂, IL-1β 産生量がレーザー照射で減少するかを調べた。増大した PGE₂, IL-1β 産生量はいずれもレーザー照射によって減少し、興味深いことに COX-2, IL-1β の

mRNA レベルも減少していた。これらのことからレーザー照射は遺伝子発現の転写レベルで影響することが考えられた (図 3)。

さらに前述の PA および PAI についてもレーザー照射の影響を検討したところ、機械的ストレスで歯根膜細胞から産生が亢進していた PA 活性は減少し、tPA の mRNA レベルもレーザー照射により顕著に抑制されていた⁶⁾ (図 4, 5)。

これらの結果から、機械的ストレスに応答して発現亢進する歯根膜細胞の発痛関連物質産生の低出力レーザー照射による抑制効果は、これらメディエーターの遺伝子発現の抑制によるもので、矯正治療や外傷性咬合に伴う疼痛の軽減に有効であることが実証できたと考えられる。

3. 将来の展望

ゲノムデータベースを応用して、短時間に遺伝子発現度を解析できる DNA マイクロアレイ, gene chip の開発が進んでいる。cy 3, cy 5 蛍光色素で標識した mRNA サンプルのマイクロアレイ解析の信頼度は高いとはいえない。その原因として、cy 3, cy 5 蛍光色素標識の再現性、アレイ上の cDNA プロブ、RNA サンプルの自己アニーリング、プロブへのクロスハイブリダイゼーションなどの問題が考えられている。

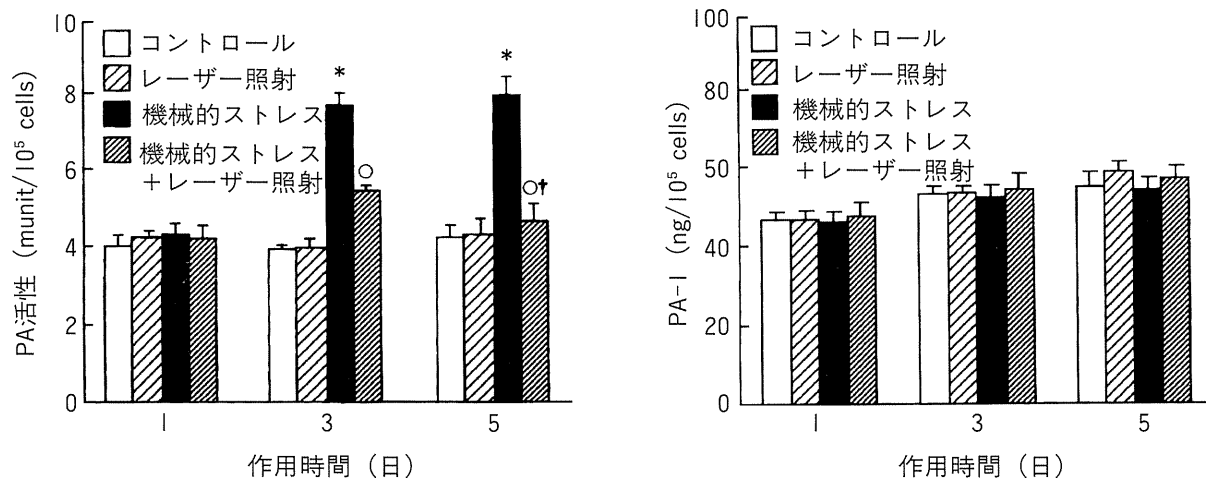


図4 歯根膜細胞のPA産生のレーザー照射による抑制
歯根膜細胞への機械的ストレスによって産生が増大するPAがレーザー照射によって抑制される

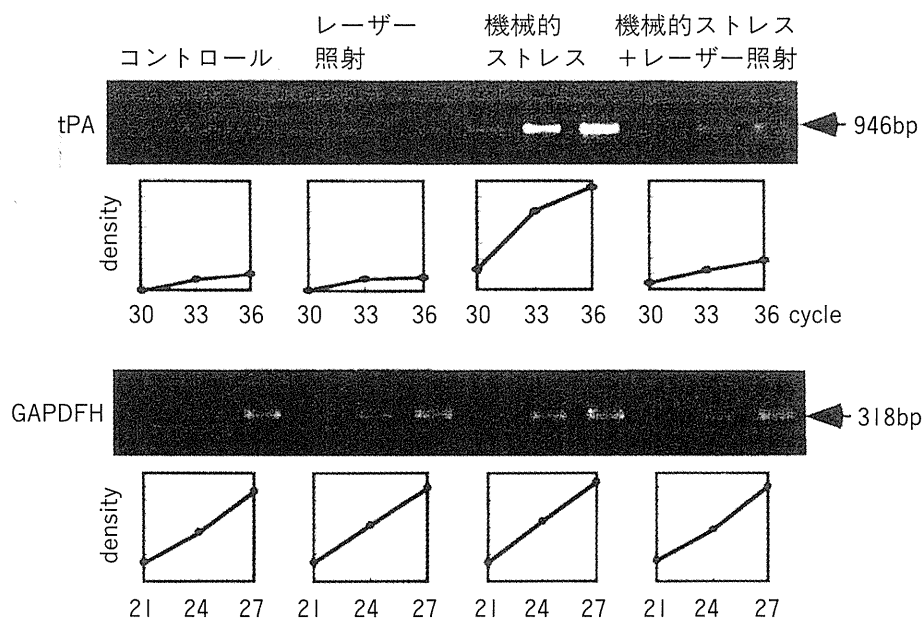


図5 歯根膜細胞のtPA遺伝子発現のレーザー照射による抑制
RT-PCRによるtPA mRNAレベルの測定結果. レーザー照射によるtPA遺伝子の転写が抑制されている. コントロールのハウスキーピング遺伝子GAPDHは変動しない

これらの問題点を改善した gene chip が Affymetrix 社で開発されている. 該当する遺伝子の特異配列部分 16 カ所を選び, それぞれに対するパーフェクトマッチと一塩基ミスマッチさせたオリゴヌクレオチドをガラス基板に直接合成し, RNA サンプルを低分子化してハイブリダイズさせることで信頼度を高めた gene chip が市販されている.

Gene chip で解析された膨大なトランスクリプトームデータは研究目的の新規関連遺伝子の発見に大きなインパクトを与えているが, 膨大

な解析データ情報を, 日進月歩に蓄積される膨大なゲノムデータベースと照合して個人が網羅的な検索を行うことはもはや不可能といわざるを得ない. 最近, gene chip 解析データを膨大な情報伝達コアデータベースと網羅的に照合させる Ingenuity Pathway Analysis システム (Ingenuity System 社, トミーデジタルバイオロジー社) が開発されている. gene chip 解析で得られた解析結果をデータマイニングして信頼性の高いデータを本解析ソフトに導入することで gene chip 解析結果から遺伝子間, 蛋白質間

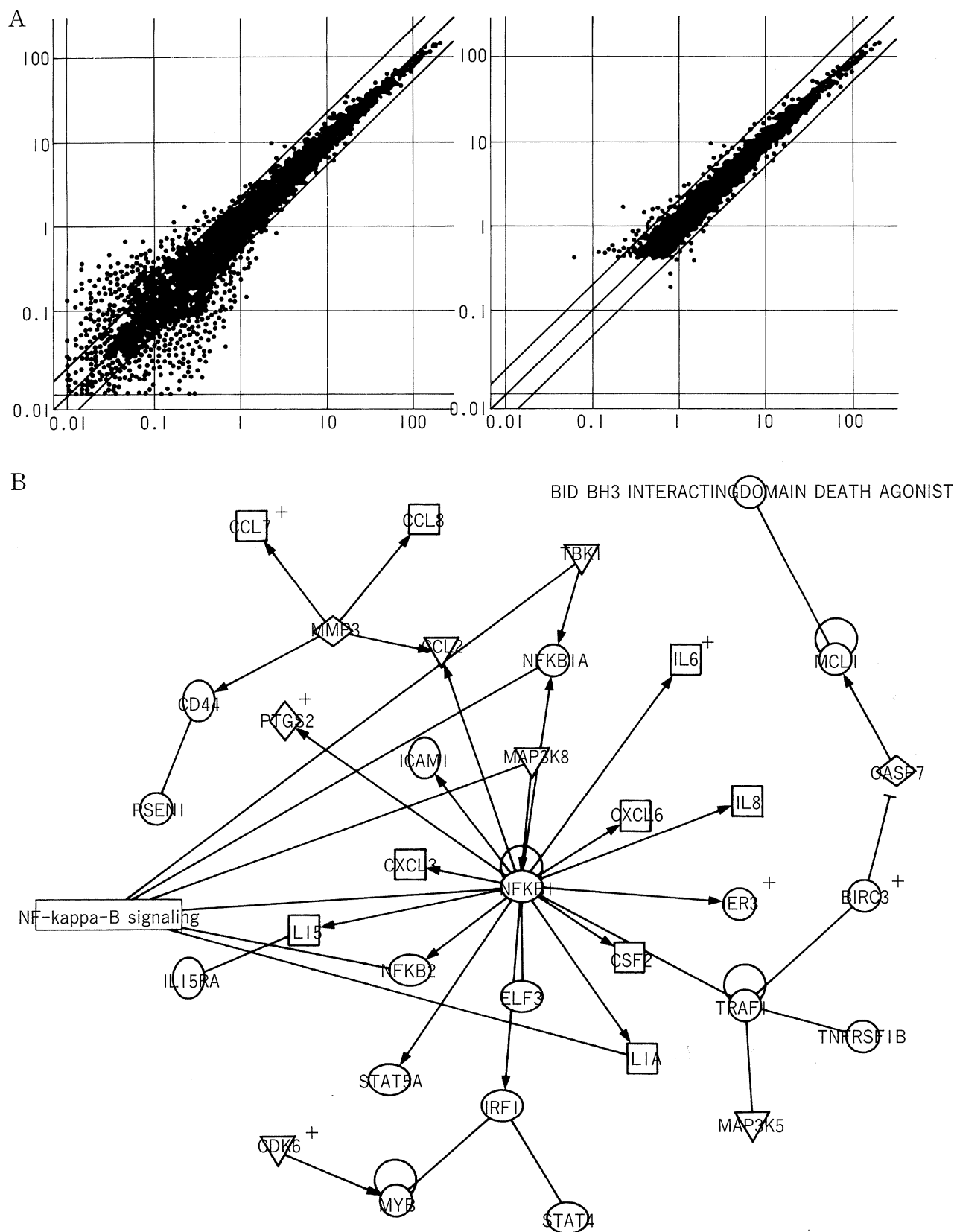


図 6 Gene Chip による遺伝子発現のモニタリングと Pathway 解析
 A: 8500 全遺伝子(左)とデータマイニングした後(右)の Scatter plot. B: データマイニング後の遺伝子群を Ingenuity Pathway 解析したネットワークの結果

の相互関係、高次生物学的プロセス関係を基盤とする各分子間ネットワーク、ヒットした情報伝達系の最新情報、関連原著論文、標的分子に対する作用薬情報、などが提示される。われわれは疼痛を伴う疾患である顎関節症の病態解明の研究で、顎関節症患者から関節滑膜細胞を初代培養し、Affymetrix ヒト Gene Chip 8500 gene™を用いて発現遺伝子を解析している。そして、Ingenuity Pathway Analysis データベースを応用して病態解明を試みている (図 6 A, B)。

まとめ

歯根膜培養細胞系を応用して、レーザー照射は機械的ストレスによる発痛物質の産生を遺伝子発現レベルに抑制させることが明らかとなった。また、Affymetrix Gene Chip を応用して発現遺伝子を網羅的に解析し、情報伝達系データベースをコアに解析することで発痛メカニズムが明らかになり、新規標的分子の発見と新規治療薬、治療法の開発が期待できるであろう。しかし、mRNA レベルは必ずしも蛋白質レベルとは一致しない。情報伝達系の構成分子の中には、必ずしもレーザー照射の刺激によって遺伝子の転写を通じて蛋白質を発現させる必要はなく、例えば蛋白質としては既に存在しているが不活性化状態であり、リン酸化されてはじめて作用を発揮するものがある。あるいは半減期の長い蛋白質では高い遺伝子発現レベルを必要としない。したがって遺伝子発現情報のみでレーザー照射の生物学的効果の全貌が明らかになるわけではない。当研究室では、二次元電気泳動ゲルをイメージアナライザーで分析して標的蛋白質スポットを切り出して、in gel digestion,

ペプチド断片の精製を自動的に行うロボットと飛行時間型質量分析機器システムを用いて、レーザー照射によって増減する蛋白質、リン酸化蛋白質の網羅的解析を行っている。レーザー照射による生物学的効果の解明にプロテオミクス研究が応用され、近い将来、(ゲノム)―(トランスクリプトーム)―(プロテオーム)の統合データベース情報を駆使したバイオインフォマティクス研究によって、レーザー照射による生物学的作用の全貌が明らかになり、より効果的なレーザー医療の推進が期待できよう。

文 献

- 1) Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, et al: Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E₂ production by human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 39: 877-884, 1994
- 2) Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, et al: Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 β production by human periodontal ligament cells. J Periodont Res 19: 328-333, 1994
- 3) Shimizu N, Ozawa Y, Yamaguchi M, et al: Induction of cyclooxygenase-2 expression by excessive mechanical tension force in human periodontal ligament cells. J Periodontol 69: 670-677, 1998
- 4) Yamaguchi M, Shimizu N, Ozawa Y, et al: Effect of tension-force on plasminogen activator activity by human periodontal ligament cells. J Period Res 32: 308-314, 1997
- 5) Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, et al: Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin-1 production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. J Dent Res 74: 1382-1388, 1995
- 6) Ozawa Y, Shimizu N, Abiko Y: Low-energy diode laser irradiation reduced plasminogen activity in human periodontal ligament cells. Lasers Surg Med 21: 456-463, 1997

※ ※ ※

エナメル質耐酸性 評価法の検討

池見宅司

日本大学松戸歯学部保存修復学教室 教授

齲蝕予防法の一つである歯質耐酸性獲得を簡便かつ正確に評価できるシステムの確立は、新規な齲蝕予防薬あるいは方法の開発に必要不可欠なものと考えられる。

いけみ たくじ

■1948年生まれ。大分県出身。

■1975年岩手医科大学歯学部卒業。

■1975年日本大学松戸歯学部助手。

■1982年同大学講師。

■1990年同大学助教授。

■1994年同大学教授(日本大学松戸歯学部保存学Ⅰ講座)。

はじめに

近年、齲蝕は感染症と考えられるようになり、齲蝕原因菌とされている *S. mutans* や *S. sobrinus* が母子感染等により感染し¹⁾、これらの菌が産生する乳酸等の有機酸によって歯質が脱灰されることから始まると考えられている^{2,3)}。そして、最近では、口腔内バイオフィルの考え方が定着し、PMTC (Professional Mechanical Tooth Cleaning) で齲蝕予防をすることが考えられている⁴⁾。

齲蝕予防には、以上のような細菌学的アプローチと歯質自体を強化するアプローチが主に考えられており、それらの両者が併用されることで、より効果的な齲蝕の予防が達成できるのではないかと考えられる。

齲蝕の撲滅は歯科医療を圧迫するのではなく、異なった歯科疾患の分野での充実した歯科医療を患者に提供できるようになるものと考えられる。さらに、齲蝕予防の目的を達成するためには定期的な来院処置が必要で、齲蝕の早期発見・治療につながり、痛いから歯医者に行きたくないという患者の発想を転換できる可能性も有していると思われる。

さて、齲蝕の初発はエナメル質に多いことから、歯質を強化する齲蝕予防では、エナメル質の耐酸性を向上させる試みが従来から行われている。その際の耐酸性獲得に関する評価法を確立することで、どのような処置あるいはホームケアによって効果的に耐酸性を獲得させることができるかという方法論を導き出すことができる。これまで、エナメル質最表層の再石灰化の

指標としてヌーブ硬さや⁵⁾、色差計を利用してエナメル質表面の性状変化を評価する方法等⁶⁻⁸⁾がある。また、エナメル質表層から深層に至る脱灰や石灰化の状況を把握するためには、一般的手法としてコンタクトマイクロラジオグラフが用いられている⁹⁾。コンタクトマイクロラジオグラム (以下、CMR) は、脱灰や再石灰化の様相が画像的に得られ、transversal micro-radiography 等で多くの貴重な情報を得ることができる¹⁰⁻²²⁾。しかし、脱灰エナメル質切片の表面の状態や表面からの脱灰深度を、エックス線から得られたフィルム上のコントラストで正確に把握することは困難と考えられ、エナメル質耐酸性獲得の評価として脱灰深度を比較検討するためには、SEM あるいは光学顕微鏡を用いる方法が必要と考えられた。

そこで、著者はエナメル質耐酸性獲得評価法としての脱灰深度測定法を確立する目的で実験を行い、脱灰層を有するエナメル質の研磨切片にアルゴンイオンエッチングを施して SEM で観察し、研磨切片の通常の SEM 像では認めにくい脱灰部の形状が明瞭に認識できる状態となることが判明した。さらに、簡便に脱灰深さを測定するために、薄切研磨切片に染色剤を応用して光学顕微鏡で観察を行った。そして、脱灰エナメル質と健全エナメル質の境界が染色により認識できるか否かについて、同一試料のアルゴンイオンエッチング後の SEM 写真と比較し、境界部の構造を調べた。その結果、耐酸性試験によるエナメル質の脱灰深さは研磨切片の染色によって測定可能であることが示唆された。

1. 試料作成

牛前歯唇側エナメル質のエナメルブロック 4 x 3 x 3 mm を作製して、1 μ m のインペリアルラッピングフィルム (3 M) にて、エナメル質表面を平坦に最終研磨を行った。エナメルブロックの両端にはネイルバーニッシュを約0.5mm の幅で塗布し、健全エナメル質の表面レベルを確保するようにした。エナメル質表面だけが露出するようにスティッキーワックスで周囲を覆った (図1)。

2. CMR の例

フッ化物をエナメル質初期齲蝕に作用することによって、エナメル質表面が耐酸性を獲得したと考えられる状態を、CMR の画像で調べようとしたものである。図2には、pH 4 に調整した0.01M の乳酸溶液中に1 で作製した試料を16時間浸漬して人工脱灰エナメル質を作成したCMR を示す。ヒト口腔内においても

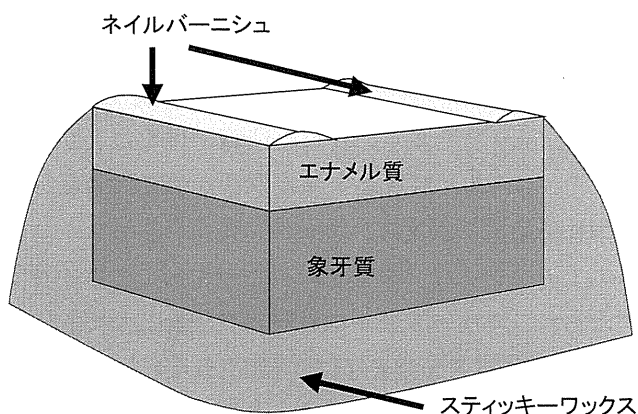


図1 エナメルブロックの作製

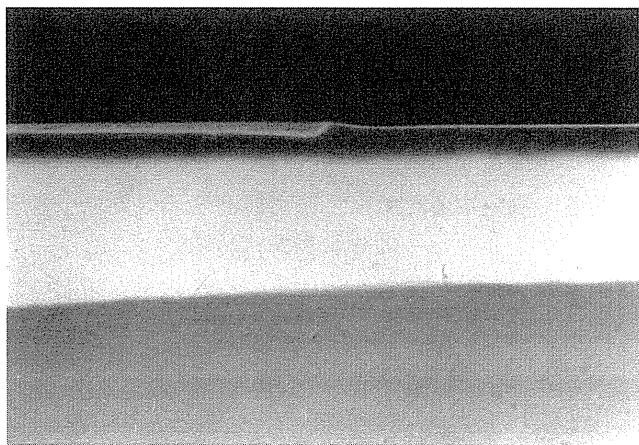


図3 前脱灰試料を義歯に装着して100ppmのフッ化物で1日2回洗口してもらい、試料を除去して耐酸性試験を行った後のCMR

pH が5.5以下の状態が長期間続くと、このような初期齲蝕が発生するものと考えられる。

図1のエナメルブロックを作製して図2に示す様な人工脱灰エナメル質を作製し、ネイルバーニッシュを除去したエナメルブロックを実験協力者の義歯に埋め込んだ。そして、100ppm のフッ化ナトリウムにて洗口を1日2回、1週間してもらい、エナメルブロックを除去後、さらに pH 4 に調整した0.01M の乳酸溶液中に48時間浸漬した耐酸性試験後の CMR を図3に示す。写真上でエナメル質表面の左側に存在するやや幅の広い白帯状の部分が再石灰化したと思われる範囲である。その下層には表層下脱灰層が認められる。また、右側に認められる幅の狭い白帯はネイルバーニッシュで保護され、前脱灰されなかった健全エナメル質部分である。耐酸性試験によりエナメル質表層まで脱灰が認められる。

図4には、図3の耐酸性を獲得したエナメル質表層

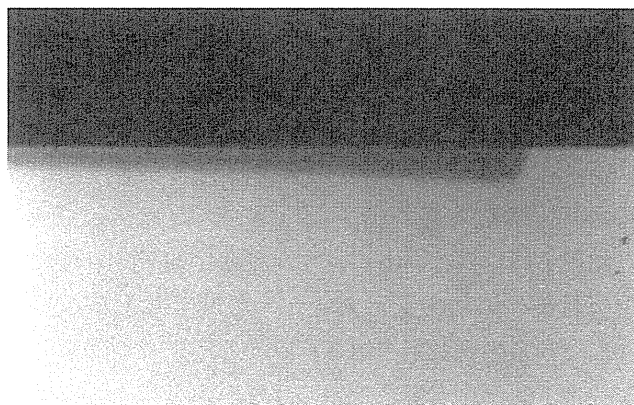


図2 前脱灰

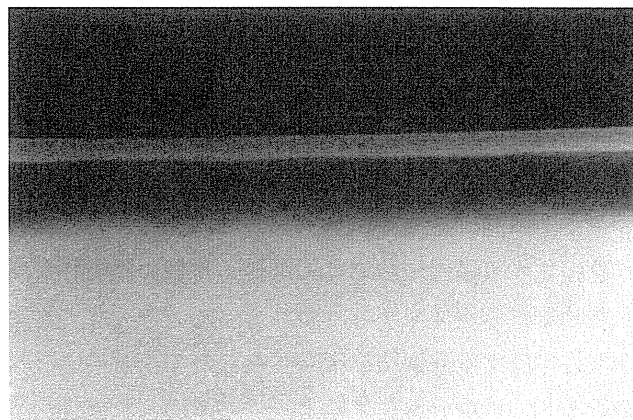


図4 図3の中央部の状態

の中央部を示した。

これらのことは、一度脱灰されたエナメル質表層はフッ化物を作用させることで、健全エナメル質よりも耐酸性を獲得できる可能性を示唆している。

以上のように、フッ化物の齲蝕予防効果について疫学的な観点からだけでなく、実証的にCMRから視覚的に得ることができる。しかし、CMRの画像から前脱灰、表層下脱灰の深さ、あるいは耐酸性を獲得した表層の厚さを調べるとなると意外に難しい。また、CMRの写真を得るまでには、試料作製、実験、薄切切片作製、軟エックス線照射、フィルムの現像、光学顕微鏡で撮影の後に写真現像・焼付けという煩雑な手順が必要で、写真確認の後に再実験となると気力が失せてしまいそうになる。そして、軟エックス線照射装置もそのためだけに必要となる。そこで、もっと簡便にそして正確に脱灰深さの測定ができる方法がないかと考え、以下のような方法を考案した。

3. アルゴンイオンエッチングと走査電子顕微鏡 (SEM)

従来の方法では、研磨歯質表面には除去しきれない研磨屑が付着しており、本来の状態をSEMで観察するためにはこれらの研磨屑が邪魔をしていた。最近で

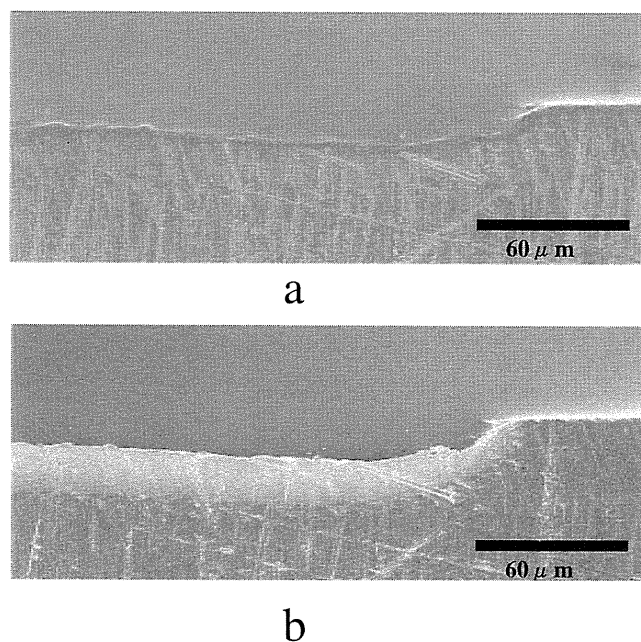


図5 アルゴンイオンエッチングの効果 (×500)
a : アルゴンイオンエッチング無し
b : アルゴンイオンエッチング処理後
(日本歯科保存学雑誌 47(1) 2004から引用)

は、コンポジットレジンと象牙質の接着界面の観察等にアルゴンイオンエッチングが施されて明瞭な画像で観察できるようになった。エナメル質においてもスマヤー層様の研磨屑の付着が認められることから、著者は、脱灰された深さを切片で横方向から観察する際にはアルゴンイオンエッチングが効果的ではないかと考えて実験を行った。試料作製は1に準じて行い、その結果を図5に示す。図5-aには研磨した切片のSEM像を示し、図5-bには同一切片のアルゴンイオンエッチング後のSEM像を示した。図5-aでは確認できなかった脱灰していると考えられる範囲が白濁して観察できるようになった。その図5-bの脱灰部分の最前線を強拡大したものを図6に示す。エナメル質が脱灰され、エナメル小柱のレベルでアパタイト結晶

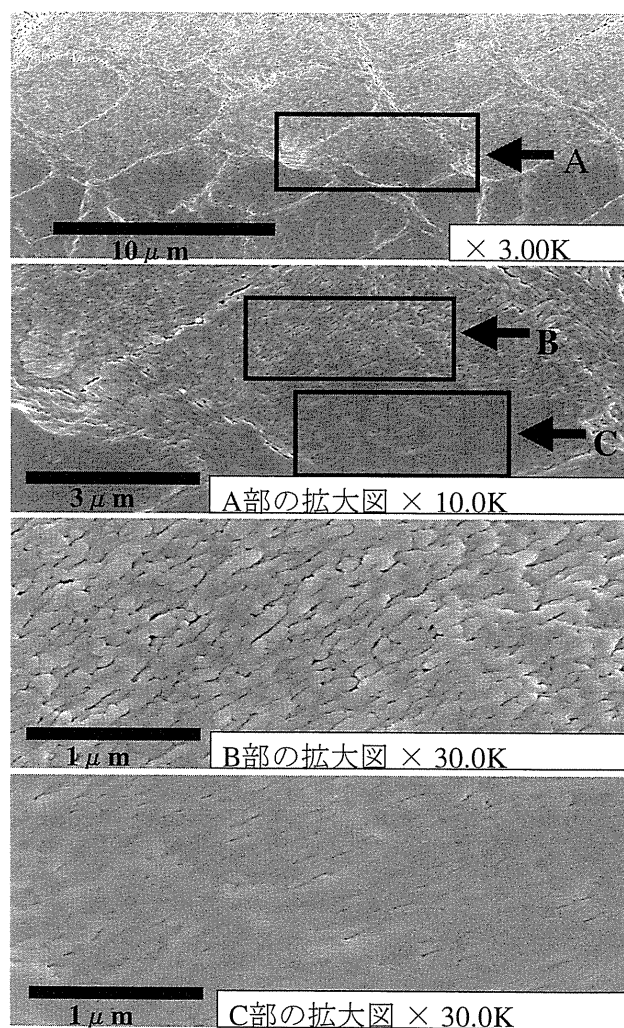


図6 アルゴンイオンエッチング後の脱灰、健全エナメル質境界部のSEM像

(日本歯科保存学雑誌 47(1) 2004から引用)

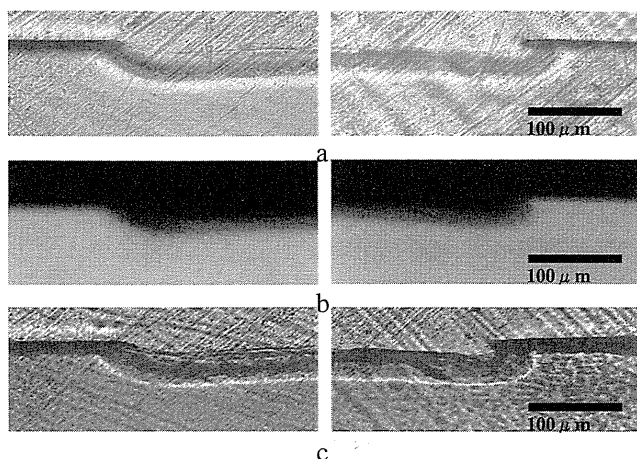


図7 24時間浸漬試料 (×400)

a : 無処理試料
b : CMR 試料
c : 染色試料

(日本歯科保存学雑誌 47(1) 2004から引用)

間に空隙のできた脱灰部分と変化の認められない健全部分が観察された。

4. 脱灰エナメル質のCMRと光学顕微鏡の比較

図7には、1に準じて作製し、乳酸脱灰溶液に24時間浸漬した厚さ約100μmの切片試料の光学顕微鏡写真とCMRを示した。図7-aは研磨した切片の光学顕微鏡写真（無処理試料）で、図7-bは同一試料のCMR写真（CMR試料）、図7-cは同一試料の齲蝕検知液を切片試料に作用した染色後の光学顕微鏡写真（染色試料）である。無処理とCMR試料では脱灰部分と健全部分を明瞭に識別することは困難であるが、染色試料では脱灰深部に現れた白色帯の境界が明瞭に観察された。

図8には、図7と同様にして、乳酸脱灰溶液に48時間浸漬した試料を示す。前述と同様に、染色試料において脱灰深部の白色帯の境界が明瞭に認められた。

5. アルゴンイオンエッチング試料のSEM像と染色試料の光顕像の比較

図9-aには、乳酸脱灰溶液中に48時間浸漬し、アルゴンイオンエッチングしたSEM像を示す。そして、図9-bには同一試料の染色試料を示す。手順としては染色試料を先に光顕で観察し、その試料にアルゴンイオンエッチングを施して蒸着後にSEM写真を撮り、コンピュータに取り込み同一の拡大を試みたも

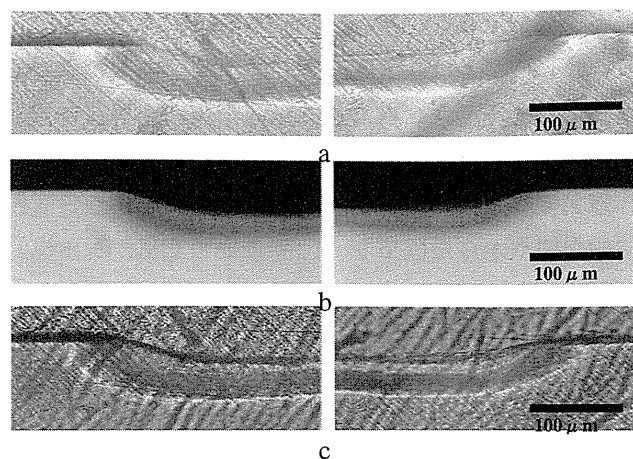


図8 48時間浸漬試料 (×400)

a : 無処理試料
b : CMR 試料
c : 染色試料

(日本歯科保存学雑誌 47(1) 2004から引用)

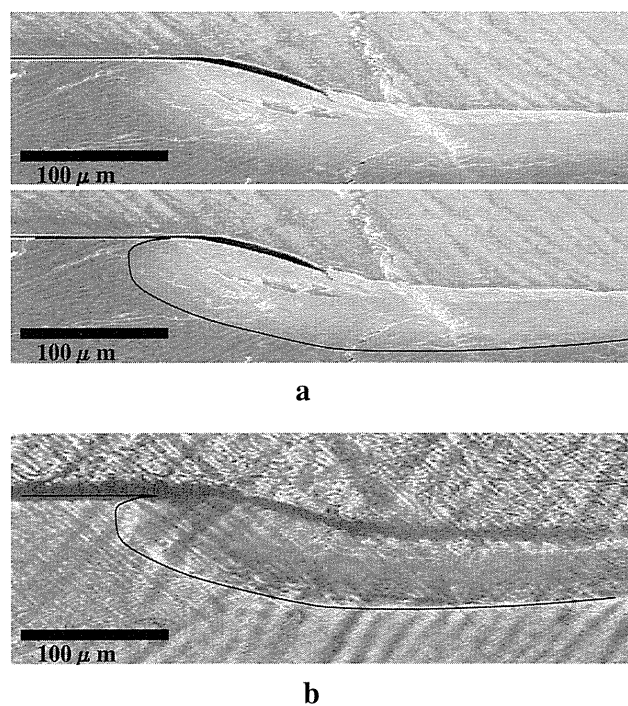


図9 48時間浸漬試料におけるSEM像と染色試料の脱灰、健全エナメル質の境界 (×400)

a : SEM写真と境界仮想線
b : 染色試料の境界仮想線

(日本歯科保存学雑誌 47(1) 2004から引用)

のである。

光学顕微鏡観察

薄切切片研磨後、無処理の試料を光学顕微鏡（島津）にて倍率400倍の画像をコンピュータ（NEC）に取り込み、無処理試料とした。同一

試料の下面にCMR用フィルム（ソフロン）を置き、軟X線装置（SOFRON SRO-M40, MFG）にて、電圧20kV、電流3.0mA、照射時間14分の条件で照射を行い、光学顕微鏡にて同様の倍率でコンピュータに取り込み、CMR試料とした。さらに、同一試料を齲蝕検知液（クラレ）に5分間浸漬後、光学顕微鏡にて等倍率で画像をコンピュータに取り込み、染色試料とした。そして、アルゴンイオンエッチングの試料の脱灰最深部と考えられる位置を実線で結び、コピーして染色試料にペーストした。その結果、脱灰の最深部は染色試料に生じる白色帯の下面に相当するものと考えられた。

まとめ

齲蝕は大昔から人類を悩ませてきた病で、腹痛や頭痛とは異なり、目でその状態を確認できることから、様々な治療法が施されてきた。そして、文明病の一種と考えられるようになり、砂糖の摂取量に比例して齲蝕が蔓延し始めた。齲蝕を予防する手段の一つとして、歯質を強化する方法がとられるようになり、多くの研究が20世紀に行われてきた²³⁻²⁹⁾。それらの多くはフッ化物による歯質耐酸性の向上を目的としたものである。フッ化物の効果を視覚的に実証できたのがコンタクトマイクロラジオグラムであると著者は考えている。

今日でもその有用性は認めるところであるが、結果を確認できるまでに多大な労力と時間が必要となる。そこで、何とか早く結果を出して、齲蝕予防に関する適切な処置法あるいはホームケアの手法の確立につながるものかと考えて、アルゴンイオンエッチングによるSEM観察あるいはもっと簡便な切片染色法にたどり着いた。歯質耐酸性の獲得の評価として、脱灰深さを比較することが最も具体的かつ客観的ではないかとの考えをもとに実験を行い、本実験条件では24時間あるいは48時間の染色試料において、明瞭な脱灰部と健全部の境界と考えられる破線状に繋がった線が認められた（図7、8）。そして、代表例の図9に示すように染色試料写真とアルゴンイオンエッチング後のSEM写真との倍率を合わせ、SEM写真から得られた境界部の線を染色試料写真に重ね合わせると、

染色試料の明るい層の下縁部に破線状に繋がった線と符合していることが判明した。この現象は齲蝕検知液やエオジン等の染色剤によっても明確に確認され、多孔性となったアパタイト結晶間に染色剤が浸透することで生じたものと考えられた。これらのことは、エナメル質脱灰の最深部の状態を調べる方法としてアルゴンイオンエッチングが有効であり、染色法という簡便な方法で光学顕微鏡によって脱灰深さ測定の可能性が示され、フッ化物やその他の処理による歯質耐酸性獲得の指標に応用可能であろうと考えられた。

【参考文献】

- 1) Caufield PW, Walker TM: Genetic diversity within *Streptococcus mutans* evident from chromosomal DNA restriction fragment polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.*, 27: 274~278, 1989.
- 2) Loesche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in Human Dental Decay; *Microbiol Rev* 50, 353~284, 1986.
- 3) Geddes DAM: Acid Produced by Human Dental Plaque Metabolism in situ; *Caries Res*, 9: 98~109, 1975.
- 4) 花田信弘 他: ミュータンスレンサ球菌の臨床生物学, クインテッセンス出版, 東京, 2003.
- 5) Feagin F, Patel PR, Koulourides T, Pigman W: Study of the Effect of Calcium, Phosphate, Fluoride and Hydrogen Ion Concentrations on the Remineralization of Partially Demineralized Human and Bovine Enamel Surfaces; *Archs oral Biol*, 16: 535~548, 1971.
- 6) 杉山道紀: エナメル質表面の耐酸性の評価に関する研究—色彩差計を用いた測定法—; *日大口腔科学*, 25: 326~338, 1999.
- 7) 深澤正幹: 炭酸ガスレーザーと試作フッ素含有ペースト併用による歯質耐酸性効果; *日歯保存誌*, 43: 583~591, 2000.
- 8) 深澤正幹, 内山敏一, 杉山道紀, 大村基守, 田川剛士, 荻野朗, 河野善治, 池見宅司: 生活歯漂白後のエナメル質の耐酸性; *日歯保存誌*, 43: 1107~1112, 2000.
- 9) 須賀昭一: 硬組織の microradiography, *歯界展望*, 27, 495~515, 1966.
- 10) 大塚倫治: 乳歯エナメル質齲蝕の microradiography による研究; *歯学*, 61: 639~667, 1973.
- 11) ten Cate JM, Duijsters PPE: Influence of Fluoride in Solution on Tooth Demineralization. II Microradiographic Data; *Caries Res*, 17: 513~519, 1983.
- 12) Reynolds EC: Remineralization of Enamel Subsurface Lesions by Casein Phosphopeptide-stabilized Calcium Phosphate Solutions; *J Dent Res*, 76: 1587~1595, 1997.
- 13) Arends J, Ruben JL, Inaba D: Major Topics in Quantitative Microradiography of Enamel and Dentin: R Parameter, Mineral Distribution Visualization, and Hyper-Re-mineralization; *Adv Dent Res*, 11: 403~414, 1997.
- 14) Damen JJM, Exterkate RAM, ten Cate JM: Reproducibility of TMR for the Determination of Longitudinal Mineral Changes in Dental Hard Tissues; *Adv Dent Res*, 11: 415~419, 1997.
- 15) Hall AF, Sadler JP, Strang R, de Josselin de Jong E, Foye RH, Creanor SL: Application of Transverse Microradiography for Measurement of Mineral Loss by Acid Erosion; *Adv Dent Res*, 11: 420~425, 1997.

- 16) Ngo H, Ruben J, Arends J, White D, Mount GJ, Paters MCRB, Faller RV, Pfarrer A: Electron Probe Microanalysis and Transverse Microradiography Studies of Artificial Lesions in Enamel and Dentin: A Comparative Study; *Adv Dent Res*, 11 : 426~432, 1997.
- 17) Clasen ABS, Ogaard O, Duschner H, Ruben J, Arends J, Sonju T: Caries Development in Fluoridated and Non-fluoridated Deciduous and Permanent Enamel in situ Examined by Microradiography and Confocal Laser Scanning Microscopy; *Adv Dent Res*, 11 : 442~447, 1997.
- 18) Ikeda H, Inaba D, Minami K, Someya Y, Yonemitsu M, Inokuchi T, Takagi O: The Effects of Q-switched Nd:YAG Laser Irradiation on Demineralization in Early Enamel Caries Lesions; *日本レーザー歯学会誌*, 10 : 70~75, 1999.
- 19) de Josselin de Jong E, ten Bosch JJ, Noordmans J: Optimised microcomputer-guided quantitative microradiography on dental mineralised tissue slices; *Phys Med Biol*, 32, 887~899, 1987.
- 20) Ikemi T, Koulourides T: Abrasion Biopsy in Studies of Mineral Density of Experimental Enamel Lesions; *J Dent Res*, 67, 508~514, 1988.
- 21) 王シンヤン, 林 秀, 榊 恭範, 岡本桂三, 宮崎光治, 本川 渉: エナメル質表層下脱灰に及ぼすフッ素イオンの影響-デジタルマイクロスコープとマイクロデンシトメーターを用いた検討-; *福岡歯科大学学会雑誌*, 29 : 147~156, 2002.
- 22) Inaba D, Minami K, Kamasaka H, Yonemitsu M: Effect of Phosphoryl-Oligosaccharides (Pos) on Remineralization of Enamel Lesions in vitro; *岩医大歯誌*, 27 : 197~202, 2002.
- 23) Brudevold F, Gardner DE, Smith FA: The Distribution of Fluoride in Human Enamel; *J Dent Res*, 35 : 420~429, 1956.
- 24) Brudevold F, McCann HG, Nilsson R, Richardson B, Coklica V: The Chemistry of Caries Inhibition, Problems and Challenges of Topical Fluorides; *J Dent Res*, 46 : 37~45, 1967.
- 25) Little MF, Posen J, Singer L: Chemical and Physical Properties of Altered and Sound Enamel. 3. Fluoride and Sodium Content; *J Dent Res*, 41 : 784~789, 1962.
- 26) Charlton G, Blainey B, Schamschula RG: Associations between Dental Plaque and Fluoride in Human Surface Enamel; *Archs Oral Biol*, 19 : 139~143, 1974.
- 27) Koulourides T, Phantumvanit P, Munksgaard EC, Housch T: An Intraoral Model for Studies of Fluoride Incorporation in Enamel; *J Oral Pathol*, 3 : 185~196, 1974.
- 28) Corpron RE, More FC, Clark JW, Korytnicki D, Kowalski CJ: In vitro Remineralization of Artificial Enamel Lesions by a Fluoride Dentifrice or Mouthrinse; *Caries Res*, 20 : 48~55, 1986.
- 29) ten Cate JM, Rempt HE: Comparison of the in vivo Effect of a 0 and 1, 500ppm F MFP Toothpaste on Fluoride Uptake, Acid Resistance and Lesion Remineralization; *Caries Res*, 20 : 193~201, 1986.

皮膚疾患から口腔粘膜疾患を考える

久山佳代 日本大学松戸歯学部 病理学講座 講師
山本浩嗣 日本大学松戸歯学部 病理学講座 教授

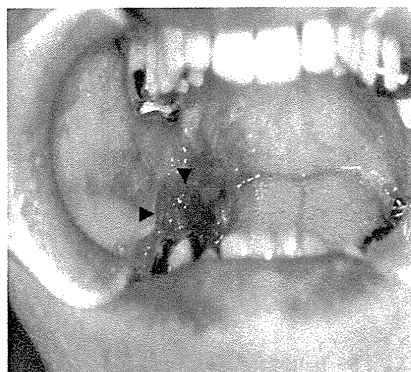


写真1 放線菌症。右側下顎歯肉に発生した潰瘍性病変（矢頭）。

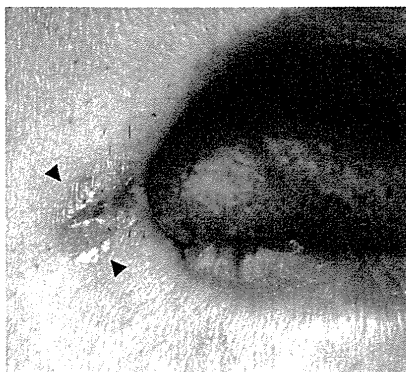


写真2 単純疱疹。口角炎に類似した病態を呈することもある（矢頭）。



写真3 カンジダ症。左側頬粘膜にみられる白色病変（矢頭）。ブラシで擦ると剥ける。



写真4 褥創性潰瘍。鋭利な歯牙に対応した有痛性潰瘍（矢頭）。

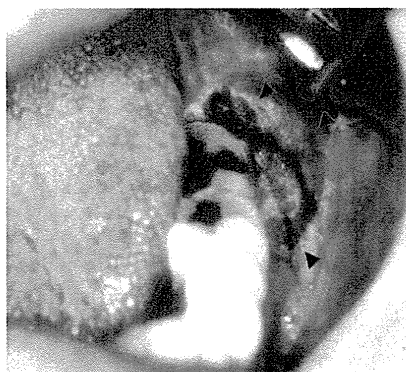


写真5-a 癌性潰瘍。壊死性、易出血性の潰瘍（矢頭）。しばしば硬結を伴う。

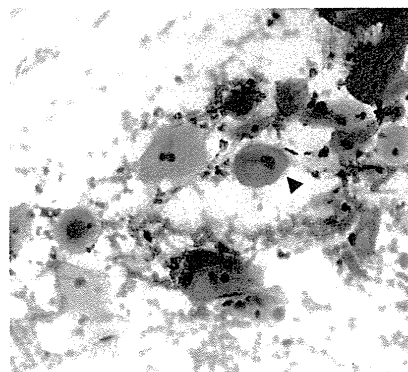


写真5-b 細胞診所見(Pap.染色)。悪性異型細胞の出現（矢頭）。

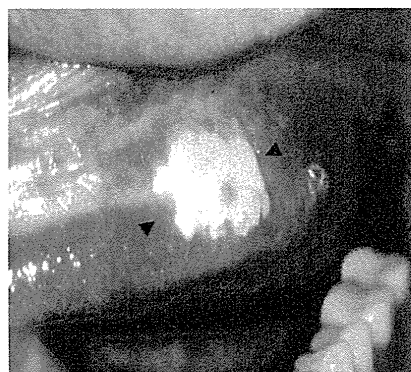


写真6 白板症。右側舌縁から舌下に存在するやや隆起した白色病変（矢頭）。

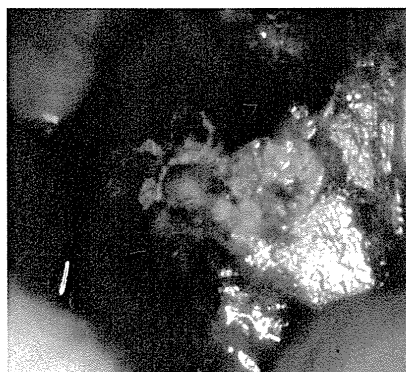


写真7 頬粘膜癌(扁平上皮癌)。白板症と肉眼的に鑑別が困難である（矢頭）。



写真8 扁平苔癬。左側頬粘膜にみられる白色レース状ないし網目状病変。



写真9 尋常性天疱瘡。細胞診で上皮が剥離する(Nikolsky現象)。

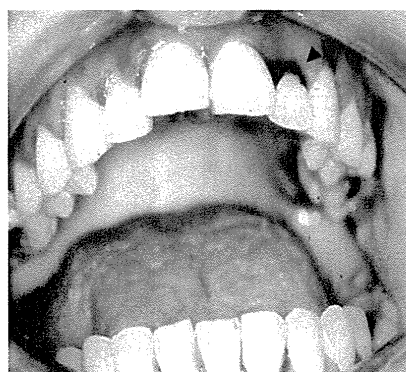


写真10-a 白血病。歯肉溝からのび慢性出血を主訴に来院（矢頭）。

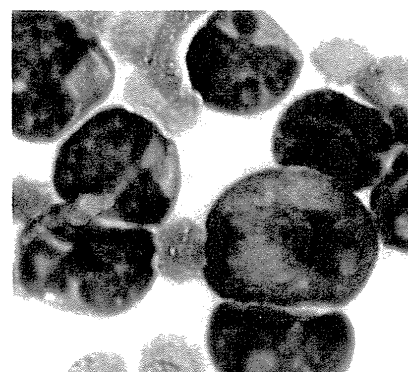


写真10-b 同症の末血像(Peroxidase染色)。未分化な白血球が出現する。

VOICE

- 1 就任挨拶 食育による愛のある社会を 田中秀夫

COLOR VIEW

- 巻頭 皮膚疾患から口腔粘膜疾患を考える 久山佳代・山本浩嗣

ARTICLES

- 3 皮膚疾患から口腔粘膜疾患を考える 久山佳代・山本浩嗣

TOPICS

■ 代議員会

- 14 第160回代議員会報告
32 予算決算特別委員会報告
48 平成17年度事業計画

■ 総務

- 54 田中執行部スタート
55 新役員紹介
58 東京都警察歯科医会総会
60 身元確認に関する歯科医師研修会

■ 保険

- 61 「歯科と高齢者医療制度」についての答申

■ 学校

- 70 歯科衛生士専門学校 第30回生
卒業式挙行

FEATURE

- 72 大学歯科病院訪問 ―東京医科歯科大学歯学部附属病院―

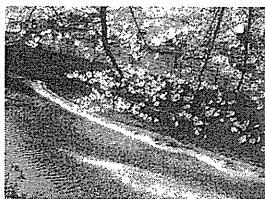
MEMBERS

- 77 思い出の写真館 80 オンエアー 中西国人（向島）

REPORT

- 84 理事会報告 89 新入会員・物故会員
88 庶務日誌
90 編集後記

●表紙写真



「水面に咲く」
山内英徳（港区芝）
撮影地：神田川端

皮膚疾患から口腔 粘膜疾患を考える

久山佳代

日本大学松戸歯学部 病理学講座 講師

山本浩嗣

日本大学松戸歯学部 病理学講座 教授

口腔は外的刺激を慢性的に受ける消化器系の入口であり、潜在する全身疾患を映し出す鏡でもある。歯科医師が口腔粘膜を診る際に知っておきたい疾患を簡潔に述べる。

くやま かよ

■1989年 日本大学松戸歯学部卒業

■2001年 日本大学松戸歯学部病理学講座講師

口腔病理専門医 第118号

細胞診指導歯科医 第1934号

やまもと ひろつぐ

■1972年 日本大学歯学部卒業

■1976年 日本大学大学院修了

■1992年 日本大学松戸歯学部病理学講座教授

口腔病理専門医 第27号

口腔は消化管の入口であり、咀嚼・嚥下という重要な役割を担い、また最も外的刺激を受ける器官である。故に口腔は、表層を耐久性が強いといわれている重層扁平上皮により被覆され、皮膚と類似した組織構造を呈している。また、唾液腺・歯という口腔特有な組織を有しており、多彩な病変が発生し、それらと臨床で遭遇する機会も多い。口腔粘膜疾患を診るうえで重要なことは、口腔粘膜に限局する病変か、全身疾患の続発症としての口腔粘膜疾患か、あるいは皮膚疾患に関係した口腔粘膜疾患かを鑑別する点である。そこで著者らは今後の臨床の現場に多少なりとも役立つことを期し、“臨床に役立つ口腔粘膜疾患の診方”という観点で歯に関連した疾患を除いた多彩な病態を呈する口腔粘膜疾患を整理したい。さらに顔面皮膚にしばしばみられる皮膚疾患も併せて記載する。

口腔粘膜疾患の診断には、問診、患部の視診・触診に加えて、全身の皮膚に関する所見を加味した総合的な観察が適宜必要であり、以下に示す臨床に即した診断の要点について、ていねいに情報を得ることから始まる。

1. 問 診

- 1) 経過（いつから発生したか、大きさ・数の変化、症状の変化、過去に同様の経験があるか、治療歴および使用した薬剤とその効果、同症状がその他粘膜ないし皮膚にみられるかなど）
- 2) 既往歴（内科疾患、アレルギー体質、膠原病、悪性腫瘍の有無など）、現病歴（抗生剤、免疫抑制

剤、輸血、歯科治療の有無など）

- 3) 家族歴（遺伝性疾患、家族内同症の有無など）

2. 視 診

大きさ、分布、発症部位、形状およびその変化、色、補綴物の有無および適合性など。

3. 触 診

熱感、圧痛、硬結、Nikolsky 現象の有無（後述）など。

4. 全身所見

貧血、黄疸、浮腫、掻痒感の有無など。

上記に挙げた所見のなかから視診を主体とした分類と、各疾患の臨床症状を簡潔に記載する。

1. 炎症性疾患

外的刺激の防御反応による潰瘍、水疱形成を主体とする病態である。

1) 感染症

(1) 細菌感染症

かつては結核、梅毒による潰瘍の診断は重要視されてきたが、現在では遭遇する機会が激減した。口腔粘膜の結核症は下掘れ潰瘍型の臨床像を呈するものが多く、また梅毒は一期で初期硬結ないし潰瘍を、二期で粘膜隆起が現れる。しかし結核症は平成13年度の新登録患者数が35,000人余り存在し、現在でも臨床の現場

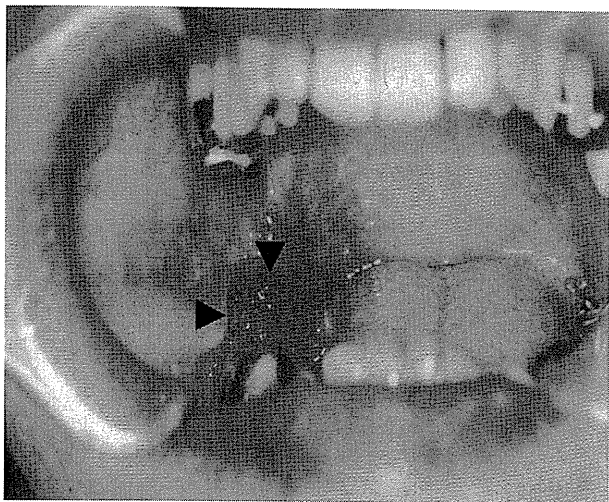


写真1 放線菌症。右側下顎歯肉に発生した潰瘍性病変（矢頭）。

において忘れてはならない疾患である。一方放線菌症は、口腔に常在する放線菌属細菌の内因性感染であり、炎症、外傷、抜歯などののち、発症しうる。青壮年期に多く、軟組織では下顎角部に腫脹で始まり、次第に板状硬結を呈し、最終的には軟化して膿瘍を形成する（写真1）。膿汁内には特徴的な菌塊が認められる。

潰瘍をみたら、炎症性か癌性かの鑑別が大切である（写真4，5-a）。剥離細胞診ないし生検を施行するという判断も重要な診断の一環である（写真5-b）。

(2) ウイルス感染症

ウイルス感染症は皮膚や粘膜に小水疱が集簇して出現し、のちに破れてびらん、痂皮を形成するという特徴的な臨床経過をたどる。患者がびらん、痂皮の状態で来院した際、口内炎や自己免疫疾患と誤らないために問診が重要である。感染ウイルスにより以下に分類される。

a. 単純疱疹（原因：herpes simplex virus）

口唇、口腔粘膜、手指、外陰部に小水疱の集簇がみられる（写真2）。子供には一次感染として全身症状を伴うこともある。二次感染は疲労、感冒や免疫低下状態に口唇ヘルペスとして出現することが多い。

b. 帯状疱疹（原因：varicella-zoster virus）

発熱、不快感など軽度の全身症状が現れ、次いで片側性（顔面・口腔内）で、一定の知覚神経領



写真2 単純疱疹。口角炎に類似した病態を呈することもある（矢頭）。

域に一致して小水疱が集簇して帯状に出現する。神経痛、刺激、接触痛などを伴い、口腔・顔面では三叉神経に沿う症状である。加齢、疲労、免疫不全状態を誘因とする。

c. 手足口病（原因：coxsackie virus A16, enterovirus 71）

幼小児に好発し、口腔粘膜の小水疱は前駆症状なしに、皮膚病変に先立って生じる。舌に出現することが多く、掻痒感や疼痛を伴う。

d. 麻疹（原因：measles virus）

感染後まもなく発熱、感冒様症状に先行して口腔粘膜（臼歯相応頬粘膜）に紅暈を伴う小白斑が生じる。のちに全身に点状の紅斑が出現する。

e. 尋常性疣贅（原因：human papilloma virus）

若年者の手足の皮膚などに好発する、いわゆるいぼである。小児に多く、口腔領域でもごくまれに口唇、頬粘膜などにみられる。

(3) 真菌感染症

a. カンジダ症（原因：Candida albicans）

真菌感染症の中で最も多くみられるカンジダ属による感染症をいう。寄生性病巣（口腔内や内臓器の病変）は、日和見感染である場合が多い。

口腔カンジダ症は白色偽膜形成（写真3）、白板、紅斑、ピリピリ感など多彩な臨床像を呈する。白色の偽膜形成を認める急性偽膜性カンジダ症（鵝口瘡）は、乳幼児、免疫不全患者、抗生剤・ステロイドの長期間投与を受けている患者、

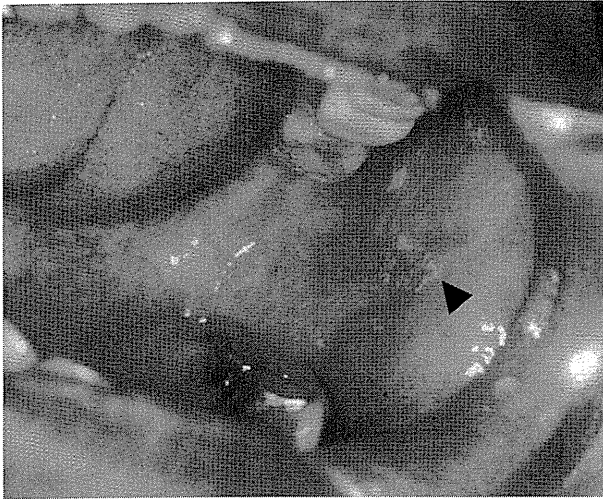


写真3 カンジダ症。左側頬粘膜にみられる白色病変（矢頭）。ブラシで擦ると剥れる。

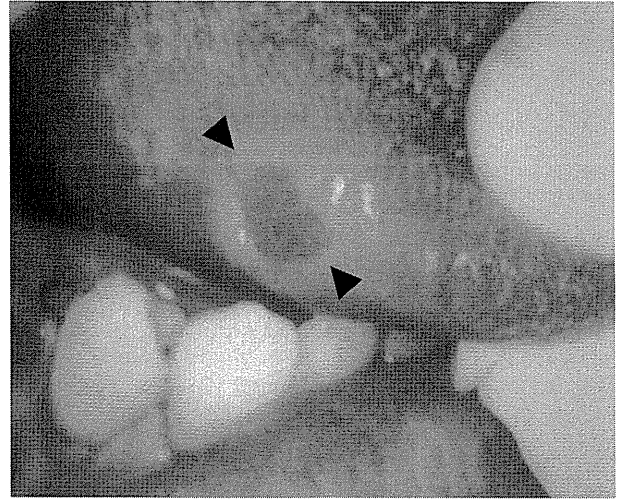


写真4 褥創性潰瘍。鋭利な歯牙に対応した有痛性潰瘍（矢頭）。



写真5-a 癌性潰瘍。壊死性、易出血性の潰瘍（矢頭）。しばしば硬結を伴う。

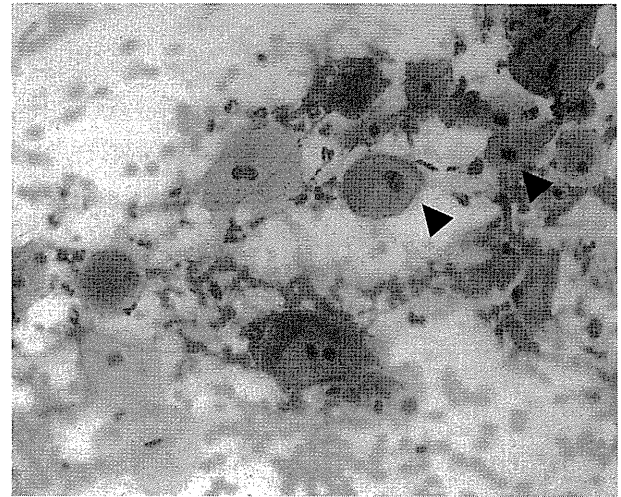


写真5-b 細胞診所見（Pap. 染色）。悪性異型細胞の出現（矢頭）。

糖尿病、悪性腫瘍患者などに多くみられる。近年では HIV 感染者の口腔粘膜の特徴的病変として知られる。慢性萎縮型カンジダ症は、義歯装着者にみられる慢性紅斑性および浮腫性病変で、口蓋粘膜に好発し、男性に多い。白板症様の病変を呈する慢性肥厚性カンジダ症は、不規則な厚さからなる白斑を特徴とし、頬粘膜に好発する。多くの患者で喫煙との相関性があるといわれている。カンジダ症は白板症や扁平苔癬などの粘膜疾患と重複して発症することが多く、除菌後の病態の変化の観察が大切である。

b. アスペルギルス症（原因：A. fumigatus）

アスペルギルス症は、*Aspergillus* 属に起因する感染症である。本症は呼吸器系への感染が多く、

副鼻腔の真菌症の多くは上顎洞のアスペルギルス症である。上顎洞に発生した本症は、一般に片側性で、鼻閉、鼻出血などを主症状とし、40～50歳代の女性に多い。

2) その他の炎症性疾患

a. 再発性アフタ性口内炎

口腔粘膜に再発性に生じる小潰瘍で、日常しばしば遭遇する。口腔のあらゆる部位に出現するが、舌や口唇に好発する。黄白色偽膜で覆われた小円形の潰瘍が紅暈で取り囲まれる。Behçet 病の初発症状（潰瘍が大型で不整形）なのかどうかを鑑別する必要がある。発症機序は不明である。

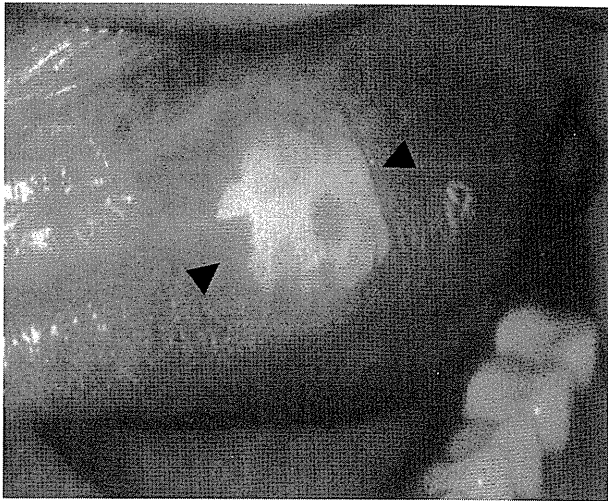


写真6 白板症。右側舌縁から舌下に存在するやや隆起した白色病変（矢頭）。

2. 腫瘍性疾患

細胞増殖による主に隆起性ないし腫瘤形成を主体とする病態である。

1) 前癌病変

形態学的にみて正常なものに比べて癌が発生しやすい状態に変化した組織をいう。

(1) 紅板症

臨床的、組織学的に他のいかなる疾患としても特徴づけられない燃えるような赤色病変で、肉眼的には平滑、顆粒状または結節様を呈する。好発年齢は白板症に類し、好発部位は軟口蓋、舌腹や口底などが挙げられる。

(2) 白板症

他のいかなる疾患としても特徴づけられない著明な白色の口腔粘膜の病変である（写真6）。病態は単発性か多発性で、肉眼的には境界明瞭な隆起性白色病変であり、均一型と非均一型に分けられている。

40歳以上の高齢者で、やや男性に多い。好発部位は口腔領域では舌、歯肉、頬粘膜に多いが、外陰部にも生じる。内因として老化や性ホルモンの影響が、また外因として不適合補綴物による慢性刺激、ガルバニー電流、カンジダ症、ウイルス感染症、梅毒や栄養障害などが報告されているが、タバコによる化学的および温熱的刺激が重要であると考えられている。

2) 前癌状態

癌となるリスクが著しく増大している一般的な状態

をいう。

(1) Bowen 病（扁平上皮内癌）

表皮内癌で、全身各所および粘膜にも生じる。慢性砒素中毒患者には本症が多発することが知られている。境界明瞭な円形の紅褐色調の局面状皮疹としてみられ、角化性鱗屑、痂皮を付す。内臓癌（消化器や子宮など）を合併することがあり、精査を要する。

(2) 扁平苔癬

皮膚や粘膜に生じる角化症を伴う慢性炎症性病変をいう（写真8）。皮膚では四肢に好発し、皮疹は5～10mm、円形、紫紅褐色の多角形状の局面ないし丘疹で、表面は角化性だがほぼ平滑である。中央部がやや陥凹したり、白色の網目が認められることがある。非刺激部に生じやすい。口腔内では頬粘膜に好発し、臨床症状は網状型が一般的だが、白斑型、萎縮型、糜爛型など多彩である。ときに病変部は、糜爛・潰瘍化し痛みを伴う。

原因は不明であるが、誘因として薬剤、歯科材料の過敏症、ビタミン欠乏症、タバコや全身疾患の続発症などが挙げられる。

(3) Plummer-Vinson 症候群

低色素性貧血があり、粘膜の萎縮性変化が咽頭や食道にまで及んで嚥下障害を呈する症候群をいう。女性に多く、本症における粘膜の萎縮性変化は前癌病変として取り扱われている。

口腔粘膜の症状は、舌乳頭が扁平になり、口角炎もみられる。爪はしばしば薄く脆くなり、スプーン状に陥凹する。

3) 上皮性良性腫瘍

(1) 石灰化上皮腫

本腫瘍は毛母、毛幹への分化を示す良性腫瘍であり、小児の頭頸部や上肢に好発する。径1～2cmのきわめて硬い境界明瞭な結節が真皮深部から皮下に触知される。

(2) 脂漏性角化症

頭頸部に好発する小型の基底細胞様細胞の増殖を主体とする外方増殖性・表在性の上皮性良性腫瘍である。径1～2cm程度の境界明瞭な黒褐色調の局面ないし結節で、表面は多少とも角化性である。

(3) 乳頭腫

粘膜上皮が乳頭状または樹枝状に増殖した良性上皮

性腫瘍である。発生頻度は比較的多く、口腔領域では舌、口唇、頬粘膜、歯肉、口蓋などが好発部位である。肉眼的には有茎性、カリフラワー状、外向増殖性の病変で、表面は細顆粒状、白色を呈し、大きさが米粒大から大豆大である。原因として慢性刺激や human papilloma virus の感染が報告されている。

4) 非上皮性良性腫瘍

(1) 粉瘤

表皮または漏斗部毛包に関連した単房性嚢胞で表皮嚢腫と同義語である。径1～2cm程度の境界明瞭な皮内嚢腫状結節で、しばしば中央部に面皰状小孔を有し、悪臭を伴う排膿および疼痛を伴う。身体各所の皮下にみられるが、口腔領域での発生は比較的まれで、20歳前後の口腔底正中中部粘膜下に好発する。

ほぼ同様の臨床所見を有する類皮嚢胞とは、組織学的に嚢胞壁が皮膚に類似した構造、すなわち角化性重層扁平上皮と皮膚付属器からなることで鑑別する。

(2) 線維腫

慢性刺激に対する膠原線維の反応性増殖物であり、真の腫瘍はまれである。口腔領域では発生頻度が高く、頬粘膜、舌、歯肉、口唇などが好発部位である。色調は灰白色を呈し、表面は平滑、広基性の硬い腫瘍である。原因は局所的な刺激や外傷である。不適合義歯が発生原因となって生じるものを義歯性線維腫という。

(3) 脂肪腫

成熟した脂肪組織よりなる良性腫瘍である。口腔領域に発生する脂肪腫は多臓器（顔面、頸部、背部）に比べ比較的少ないが、頬粘膜、舌、口腔底などに好発する。とくに成人では40歳以上に多い。表面が滑沢で、軟らかい広基性ないし有茎性の腫瘍として認められ、断面は黄色調で、分葉状を示す。

(4) 血管腫

血管が腫瘍性に増殖したものであるが、一般には組織の發育異常としての過誤腫的性格の腫瘍とみなされている。発生頻度は比較的多く、頸部および頭部の皮膚にみられることが多く、口腔粘膜では頬粘膜に好発する。口腔領域に生じるものの多くは毛細血管腫と海綿状血管腫である。隆起性で、軟らかく、その色調は赤色から青紫色まで呈し、圧迫することでその色が退色する。

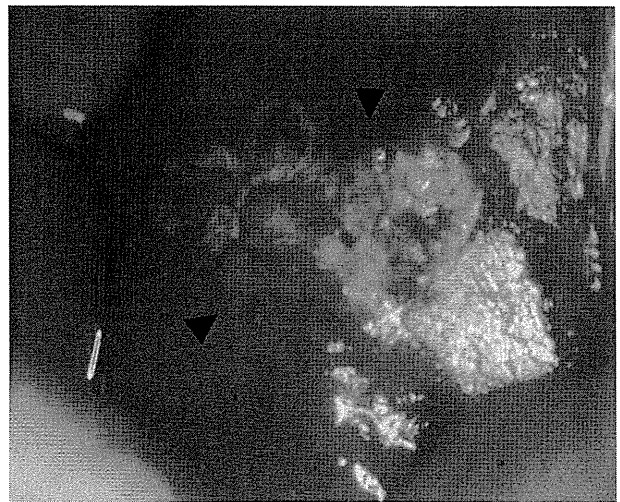


写真7 頬粘膜癌（扁平上皮癌）。白板症と肉眼的に鑑別が困難である（矢頭）。

(5) リンパ管腫

リンパ管の増殖よりなる病変であるが、その多くは先天的組織異常による。発生頻度は血管腫より低い、口腔領域では舌、口唇、頬粘膜に好発する。大きな病変では大舌症、大唇症を生じる。

(6) 神経鞘腫

神経鞘のシュワン細胞を起源とする良性腫瘍である。四肢と頭頸部の皮下に多く、口腔では舌に好発し、青年期にみられ、性差は明らかでない。粘膜下に境界明瞭で被膜を有し、硬く孤在性の腫瘍として出現するが、口腔では無症候性の粘膜腫瘍として認められる。

(7) 皮膚線維腫

線維芽細胞と組織球の増殖からなる皮内の限局性の結節状病変である。ドーム状に隆起する硬い皮内の小結節である。

(8) 黄色腫

脂質を含む泡沫細胞の粘膜固有層乳頭部での増殖による乳頭腫状、あるいは疣贅状の隆起性病変である。皮膚では、臀部などの多発性黄色小結節（発疹型）、肘・膝の伸側の黄色結節（結節型）、上眼瞼内側部の扁平な黄色局面（眼瞼型）に分けられる。口腔内では歯肉あるいは歯槽粘膜に好発する。粘膜表面は白色あるいは赤色部が混在し、顆粒状あるいは乳頭状を呈する。

4) 上皮性悪性腫瘍

(1) 扁平上皮癌

重層扁平上皮から発生し、種々の程度に角化傾向を



写真8 扁平苔癬。左側頬粘膜にみられる白色レース状ないし網目状病変。

示す癌で、口腔粘膜に発生する悪性腫瘍で最も頻度が高い。近年、高齢者における発症の増加が報告されている。舌縁、歯肉に好発し、肉眼的に潰瘍状（写真5-a）、腫瘤状ないし乳頭状などを呈し、硬結を伴うことが多い。またしばしば白板症と関連して発生するため（写真7）、肉眼的に癌が共存するか否かの鑑別が困難な際には積極的に剥離細胞診ないし生検を施行することが重要である（写真5-b）。原因として不適合義歯、鋭利な歯牙や喫煙などが挙げられる。

(2) 疣贅性癌

外向性ないし乳頭状増殖を示す扁平上皮癌の亜型である。高齢者の男性に多く、歯肉や頬粘膜に好発し、発育が緩慢で深部への浸潤や転移をきたすことは少ない。

(3) 基底細胞癌

基底細胞の増殖を主体とする扁平上皮癌の亜型であり、過誤腫的性格を有するといわれている。主に皮膚に発生する悪性腫瘍であるが、まれに口唇や歯肉にみられる。本病変は基底細胞母斑症候群の際にも随伴するため、複数の顎骨内嚢胞（歯源性角化嚢胞）が存在する場合には本症を念頭に診察することが重要である。

5) 唾液腺腫瘍

(1) 多形性腺腫

唾液腺腫瘍の中でも発生頻度が最も高い腫瘍である。好発年齢は20～50歳代で、若干女性に多く、耳下腺、口蓋腺、顎下腺、舌下腺の順に発生する。穏やかな発育を示す無痛性の腫瘍がみられ、大きさはさまざま

までである。肉眼的には不規則類球形の腫瘍で、平滑ないし分葉状の表面をなし、腫瘍は線維性被膜で被包されている。

(2) Warthin 腫瘍

大多数が耳下腺に発生し、50歳以上の男性に多く、ときに両側性に発生をみる。肉眼的に大きさは径数cm ぐらいで、発育が緩慢である。

(3) 粘表皮癌

高分化と低分化のものがあり、耳下腺に最も多く発生し、好発年齢は30～40歳代で、女性にやや頻度が高い。発育は緩慢で、無痛性である。

(4) 腺様嚢胞癌

小唾液腺や顎下腺での頻度が高い。年齢は40～70歳代、性別では女性に多い。発育は緩慢であるが痛みを伴うことが多く、神経周囲性に浸潤する性格を有している。予後は経過が長い不良で、ときに局所再発をきたし、転移を生じる。

3. 色素性病変

色素沈着による粘膜の黒褐色変化を主体とする病態である。

1) 外来性色素沈着

(1) 黒毛舌

糸状乳頭の角化伸長によって毛の生えたような状態に黒色の着色を伴うものをいう。喫煙や抗生剤長期使用による菌交代現象などの関連が考えられている。

(2) 金属の沈着

歯科材料であるアマルガムの沈着による青黒色のアマルガム刺青が代表的である。

2) 内因性色素沈着

(1) メラニン色素沈着

口腔粘膜でのメラニン沈着は歯肉、口蓋、口唇などでみられることがある。また全身疾患の継発症として現れる。副腎皮質機能不全の Addison 病、腸管ポリープを特徴とする遺伝性疾患の Peutz-Jeghers 症候群、皮膚の着色や線維性骨異形成症を伴う Albright 症候群や皮膚での多発性神経線維腫を特徴とする von Recklinghausen 病などがある。

(2) 母斑細胞母斑

神経節由来の異常分化細胞により発生し、均一な暗褐色から黒褐色の大小の色素斑で扁平あるいは隆起性

病変である。多数は後天性で思春期に好発する。口腔粘膜では頬粘膜、歯肉、口唇粘膜などに好発する。形が不整、着色が不均一、辺縁色素の染み出しや急激な増大がある場合は悪性黒色腫を疑う。

(3) 悪性黒色腫

メラニン産生細胞由来の悪性腫瘍で、臨床的に黒色腫瘍あるいは色素沈着を伴った潰瘍性病変としてみられることが多い。口腔粘膜では硬口蓋と上顎歯肉が好発部位で、50歳以上に多い。

4. 全身疾患に伴う口腔粘膜病変

全身疾患の続発症として口腔粘膜に異常所見が観察される病態である。

1) 栄養障害

ビタミン欠乏症によりしばしば口腔粘膜に変化が現れる。ビタミンB₂欠乏では口角びらん、舌炎や舌の平滑化が、ビタミンC欠乏では出血傾向を主症状（歯肉の出血、歯肉炎、辺縁性歯周炎）とする壊血病が起こる。ニコチン酸欠乏ではペラグラが生じ、口腔では口内炎、口角炎、舌の平坦化などが現れる。

2) 代謝障害

(1) 糖尿病

糖質代謝障害によって高血糖と糖尿をきたす疾患であり、その結果、動脈硬化の促進、神経障害、重篤な腎臓機能障害、網膜疾患などを続発する。また感染に対する組織の抵抗力が減弱するために、口腔粘膜に非特異的な炎症が起こりやすくなる。あるいはすでに存在する炎症性歯周疾患の憎悪を招く。

(2) アミロイドーシス

アミロイド蛋白が組織間に沈着する疾患である。口腔粘膜病変をきたすものでは原発性アミロイドーシス、多発性骨髄腫に伴うアミロイドーシスが挙げられ、舌あるいは歯肉への沈着が多い。

3) 免疫異常疾患

(1) 接触性皮膚炎

皮膚では頻繁に遭遇する湿疹症状をきたす疾患である。原因として歯科用金属、化粧品、歯磨剤、ミントやシナモンなどが挙げられる。

(2) 自己免疫疾患

a. Behçet 病

口腔粘膜の再発性アフタ、皮膚の結節性紅斑、

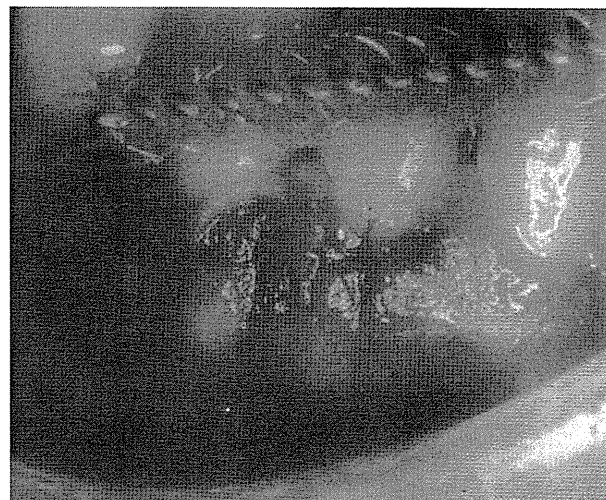


写真9 尋常性天疱瘡。細胞診で上皮が剥離する(Nikolsky 現象)。

眼の前房蓄膿性ブドウ膜炎、外陰部潰瘍などを主症状とする慢性再発性の疾患である。我が国では厚生労働省特定疾患に指定されている。原因は不明で、20歳代に初発し、男性にやや多い。口腔粘膜アフタは本症に必発する症状であり、口唇、舌、頬粘膜などに出現する境界明瞭な深い潰瘍である。

b. 尋常性天疱瘡

皮膚・粘膜疾患で、表皮細胞膜表面蛋白に対する自己抗体により表皮内水疱形成を誘導される自己免疫性水疱性疾患である。口腔粘膜では尋常性天疱瘡が最も多い。その9割以上が経過中に口腔粘膜に初発または続発する。口腔粘膜の難治性びらん形成を特徴とし、擦過すれば容易に上皮の剥離が生じる(Nikolsky 現象)(写真9)。患部の痛みと体重減少を主訴とすることが多い。

c. 類天疱瘡

口腔粘膜に現れるものの多くは良性粘膜類天疱瘡(剥離性歯肉炎)とよばれるもので、中年以降の女性に好発する。上皮基底膜抗体の陽性率が高いが、自己免疫疾患との関連性は明らかではない。口腔粘膜のびらん性病変を呈し、痛みを伴うことが多い。高齢者が多く、リスクの検討も必要だが、副腎皮質ステロイドの内服でコントロールされることが多い。

(3) 肉芽腫を形成する病変

a. サルコイドーシス

類上皮細胞からなる原因不明の系統的肉芽腫症

である。顔面や四肢に好発するが、全身いずれにも生じうる。皮膚以外では、肺、リンパ節、眼、骨など全身の各臓器を系統的に侵す。大唾液腺の病変（Heerfordt 症候群）は5%前後、口腔粘膜への罹患は2.8%で、20歳代に多く、性差はみられない。罹患部位は口唇、軟口蓋、頬、歯肉、舌の順である。口腔粘膜病変では粘膜下結合組織での無痛性の赤色結節、歯肉の紅斑あるいは肥厚を特徴とする。原因は免疫学的異常が関与し、遅延型過敏症が抑制され、細胞性免疫の障害があるものと考えられる。

b. 肉芽腫性口唇炎

口唇の無痛性の浮腫性腫脹と消退を繰り返す炎症性疾患である。溝状舌や顔面神経麻痺を伴う Melkersson-Rosenthal 症候群の部分症状とされている。口唇が片側性あるいは両側性に無痛性、浮腫性腫脹が青年期に初発し、再発、消退を繰り返す。原因は不明であるが、多原因性の感染アレルギーによるとされている。

c. 環状肉芽腫

一次的な真皮膠原線維の変性による肉芽腫性炎症である。ほぼ常色の小豆大前後の固い皮内小結節が環状に配列し、径1～2cmの局面状皮疹を形成する。拡大すると中心部がくぼみ、単発あるいは多発する。外傷を受けやすい指の関節背面、四肢伸側などの皮膚に好発する。口腔粘膜にはきわめてまれで、上下口唇、軟口蓋に有痛性、帽針

頭大、黄色の小結節病変の報告があるにすぎない。

4) 血液疾患

(1) 貧血

末梢血中の赤血球数、ヘモグロビン、ならびにヘマトクリット値のいずれか、あるいはいずれもが減少した状態で、口腔粘膜では赤色平滑舌であるハンター舌炎、口腔粘膜の蒼白・萎縮・乾燥などがみられる。

(2) 出血性素因

a. 血小板異常による出血性素因

血小板数が5万以下になると出血性素因を起こし、口腔では歯肉、舌、頬粘膜などに紫斑ないし出血がみられる。

b. 血液凝固因子の異常による出血性素因

血友病は凝固因子の第Ⅷ、Ⅸ因子の活性が遺伝的に欠乏している伴性劣性遺伝性疾患であり、男性のみに出現する。口腔では歯肉出血がみられることがある。

c. von Willebrand 病

第Ⅷ因子活性の低下と血小板粘着能の低下を特徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。出血傾向は血友病に類似する。

(3) 腫瘍性病変

a. 白血病

白血病は、白血球が自律的増殖をきたし骨髓に蓄積する疾患をいい、口腔粘膜の出血を主訴として歯科を受診する機会が多い（写真10-a, b）。急性白血病は幼若白血球が優位に増殖し急性の経

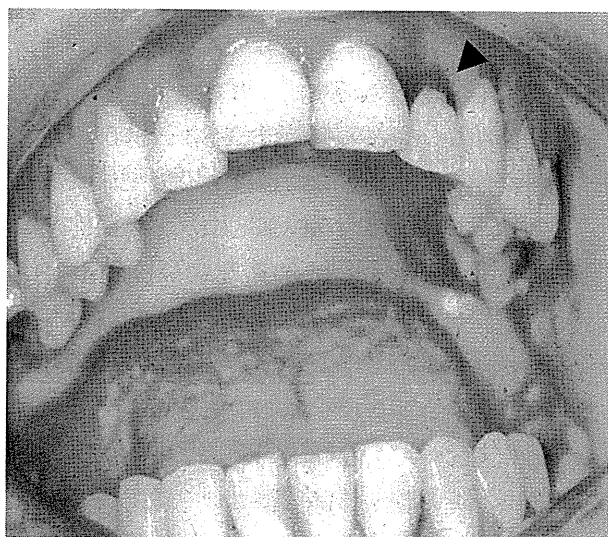


写真10-a 白血病。歯肉溝からの慢性出血を主訴に来院（矢頭）。

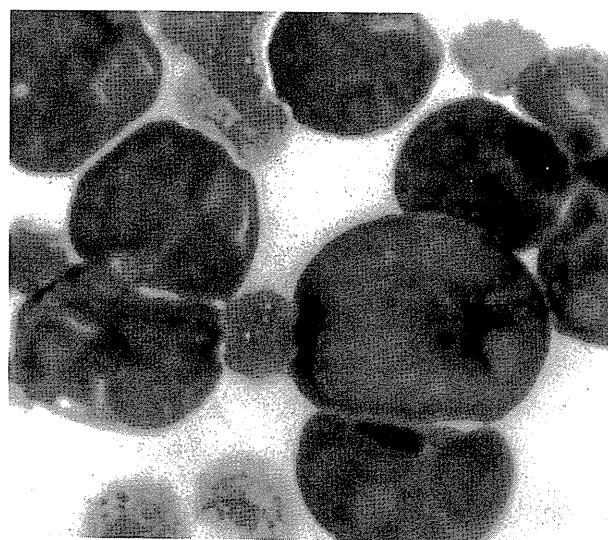


写真10-b 同症の末血像（peroxidase 染色）。未分化な白血球が出現する。

過をとり、小児や壮年に多く、予後不良。慢性白血病は分化した白血球の増殖で慢性経過をとり、高齢者に多く、長期生存可能な症例もある。原因は不明であるが、誘因として放射線、化学物質、染色体異常、ウイルス感染などが挙げられる。

b. 成人 T 細胞白血病

日本の南西部、とくに南九州、沖縄、四国西南部を中心としてみられる特異な臨床血液像を示す慢性 T リンパ球性白血病の一つである。原因は C 型レトロウイルスの human T-lymphotropic virus type I (HTLV-I) の感染による。本ウイルスは RNA 腫瘍ウイルスに属し、腫瘍の原因となることからオンコナウイルスなどとよばれる。患者のピークは50～60歳の間にあり、2：1の割合で男性に多い。病期期間は数日から年余に及び、初発症状ではリンパ節腫脹が小さく数も少ないが、約50%に多彩な特異疹を伴う。嘔気、嘔吐などの消化器症状、呼吸器症状、発熱、全身倦怠などの不定症状や肝腫、脾腫がみられる。

c. 悪性リンパ腫

リンパ組織起源の悪性腫瘍で、口腔粘膜に初発

するものは歯肉と口蓋に多く、腫瘤状病変として発現することが多い。

口腔粘膜疾患の診断には流れに沿ったいいねいな診察と幅広い知識が必要であるが、加えて臨床の現場では剥離細胞診の有用性を主張したい。同法は、患者への必要最小限の侵襲と比較的簡単な手技にも関わらず、口腔粘膜疾患のスクリーニングを可能とするものである。歯学部病理学講座との密な連携により精度の高い診断が望まれる。

本論文の一部は平成13年度学術フロンティア推進事業および平成16年度科学研究費補助金（基盤 C, 1659183）により行った。

【参考文献】

- 1) 茂呂周ほか：エッセンシャルテキスト 口腔病理学。医学情報社、東京、2000.
- 2) 山崎雙次ほか：歯科医のための皮膚科学。医歯薬出版株式会社、東京、2004.

A Study of the Relationship between Salivary Buffer Capacity and DMFT

Hiroya Gotouda,^{1,3} Hirofumi Sasai,^{2,3} Chieko Taguchi,¹ Jing Wang,¹ Kazumune Arikawa,^{1,3} Toshikazu Uchiyama,¹ Rio Yamauchi,¹ and Seigo Kobayashi^{1,3}

Departments of ¹Community Oral Health, ²Public Health and Policy, and ³Research 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 buffer capacity, DMFT, carries experience

Abstract

The existence of carbohydrates that promote rapid fermentation as an exogenous factor and the low buffer capacity of secreted saliva at rest are considered to constitute the main factors that influence the rate at which dental plaque pH declines. The present study examined the relationship between salivary buffer capacity and DMFT (carries experience) in order to analyze the buffer capacity of saliva at rest, an important related to clearance capacity in the oral cavity. The results thus obtained are reported below. The total mean \pm SD of buffer capacity value was 5.09 ± 0.87 . The 50 subjects were divided at the median value into the high-buffer capacity sub-group of 25 subjects (5.83 ± 0.37) and the low-buffer capacity sub-group of 25 subjects (4.36 ± 0.52). The average DMFT of the high-buffer capacity sub-group (4.40 ± 4.74) was lower than that of the low-buffer capacity sub-group (8.68 ± 5.39), indicating a significant difference ($p<0.01$) between the two sub-groups.

Introduction

The phenomenon whereby acid production from dietary carbohydrates generated by dental plaque bacteria is accompanied by a decline in pH, followed after a given period of time, by a recovery in pH level has been observed both in vivo and in vitro. Saliva, which is an oral cavity fluid, has been verified to have a significant effect on this type of fluctuation in dental plaque pH (1-4).

The existence of carbohydrates that promote rapid fermentation as an exogenous factor and the low buffer capacity of secreted saliva at rest are considered to constitute the main factors that influence the rate at which dental plaque pH declines (5).

The present study examined the relationship between salivary buffer capacity and DMFT (carries experience) in order to analyze the buffer capacity of saliva at rest, an important factor related to clearance capacity in the oral cavity.

Materials and Methods

Subjects and saliva sampling time

Fifty male students (average age : 21.7 years) were selected as the test subjects. Saliva sampling from these subjects was performed between 14:00 and 16:00. This study was conducted with the approval (EC 02-029) of 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.

Measurement of buffer capacity

The salivary volume was determined based on to the spitting method (6), and measured half anaerobically in a sampling cup within 30 minutes. After mixing 1.0 ml of saliva with 5.0 ml of distilled water, 1 ml of 0.01N hydrochloric acid (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) was added. The pH was measured using a pH electrode, (Hanna Instruments, Padova, Italy) and the buffer capacity was evaluated using this pH value. In addition, a total of 6.0 ml of

distilled water was used as the control and the buffer capacity was measured by adding hydrochloric acid, using the same method.

Investigation of caries experience

Using a mirror and probe under a bright light, caries experience was determined according to the standards of the Japan Association of School Dentists. The presence of decayed, missing and filled teeth (DMFT) was calculated and recorded for each subject.

Statistical analysis

For the statistical analysis, the t-test was used to compare the mean values between the two sub-groups.

Results

The mean \pm SD of salivary buffer capacity for all subjects was 5.09 ± 0.87 . The 50 subjects were then divided at the median value into a high-buffer capacity sub-group of 25 subjects (5.83 ± 0.37) and a low-buffer capacity sub-group of 25 subjects (4.36 ± 0.52). The buffer capacity value of the control solution was 2.90 (Fig. 1). The variances from the average buffer capacity of the high-buffer capacity sub-group and of the low-buffer capacity sub-group as compared to the control solution were 2.93 and 1.46, respectively. The average DMFT for the total 50 subjects was 6.54 ± 5.47 . The average DMFT of the high-buffer capacity sub-group (4.40 ± 4.74) was lower than that

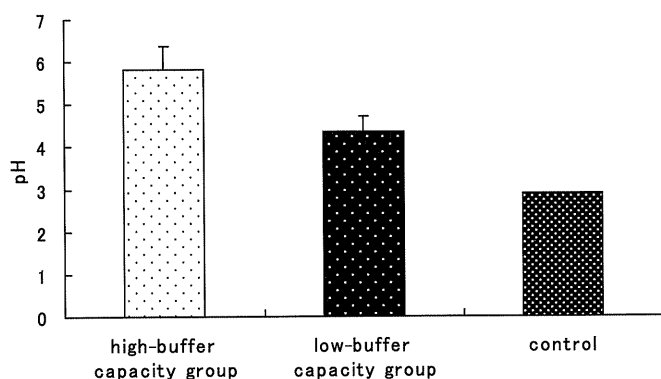


Fig. 1. Salivary buffer capacity in high-buffer capacity group and low-buffer capacity group, and the control solution.

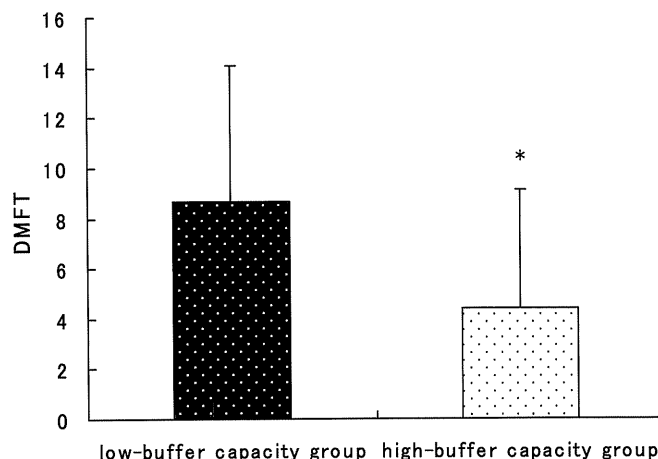


Fig. 2. Comparison of the average DMFT in high-buffer capacity group and low-buffer capacity group * $p < 0.01$.

of the low-buffer capacity sub-group (8.68 ± 5.39), indicating a significant difference ($p < 0.01$) between the two sub-groups (Fig. 2).

Discussion

There are a few methods reported for measuring salivary buffer capacity. Some examples are as follows. Based on the method of using an ejected fluid consisting of a modified fluoride ion dilution (7,8) to measure buffer capacity, 5.0 ml of distilled water was mixed with 1.0 ml of saliva in vitro and the salivary buffer capacity at rest was measured. In order to quantify the salivary buffer capacity, a method based on dripping acid into a given volume of saliva and evaluating the volume of acid required to lower the pH level of the saliva from the initial level to pH6, pH5, and pH4 was employed (6). Ericsson (9) also developed a clinical testing method whereby hydrochloric acid is mixed with saliva and the resulting pH is measured.

Ueda and Dreizen et al. similarly reported a buffer pH method whereby a given amount of acid is added to saliva and the resulting pH is measured, developed to simplify the buffer capacity measurement method (6, 7, 10). This method has the merit of lending itself to quick chair-side implementation. The present study employed the buffer pH method for saliva evaluation. This method is considered to be useful for epidemiological studies involving large numbers

of subjects. However, when performing high-accuracy measurement of buffer capacity for individual subjects, it will be necessary to study buffer capacity using the area under the curve and an integration method (7). Thus, more detailed analysis will be required.

The negative correlation between the buffer capacity and caries experience has been widely reported (6, 11). In light of the negative correlation between buffer capacity and caries experience, Ericsson (12) inferred that the most clearly demonstrated caries resistance factor is the buffer capacity. The report on the survey of dental diseases (13) based on the DMFT of male subjects 20-24 years of age showed a value of 8.60. In this study, for the low average DMFT (6.54) sub-group, it was thought that the number of subjects was small and that a large number of these subjects are children of dentists who have benefited from thorough preventive maintenance of the mouth from infancy. These factors are believed to have influenced the results. The author measured buffer capacity for a caries-susceptible sub-group (11 persons) and a caries-free sub-group (12 persons) and found that the buffer capacity of the caries-free sub-group was significantly higher than that of the caries-susceptible sub-group (7). In the present study, the total 50 subjects were divided into a high-buffer capacity sub-group and a low-buffer capacity sub-group and DMFT of these two sub-groups were compared. A significant difference in DMFT values between the high-buffer capacity sub-group and the low-buffer capacity sub-group was reported.

Until now, there has been no study on the relationship between buffer capacity and DMFT through the buffer pH method targeting resting saliva and no comparison with distilled water, which has no buffer effect, and the creation of criteria for clinical application has not been attempted. We plan to study the creation of criteria for a cleaning test through the buffer capacity of saliva as part of the assessment of the risk of dental caries based on the results of this study, increasing the number of subjects and dividing them into 3 or 4 groups, with a view to the feasibility

of clinical application to the assessment of the risk of dental caries based on the buffer capacity of saliva. Further, studies on the relationships among salivary buffer capacity, residual salivary volume, salivary clearance and dental caries are planned.

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: Relation of saliva and plaque to caries. *J Dent Res*, 53: 246-266, 1974.
2. Edgar VM: The role of saliva in the control of pH changes in human dental plaque. *Caries Res*, 10: 241-254, 1976.
3. Englander HR, Shklair LL, Fosdick LS: The effects of saliva on the pH and lactate concentration in dental plaques. *J Dent Res*, 38: 848-853, 1974.
4. Kleinberg I, Jenkins GN: The pH of dental plaques in the different areas of the mouth before and after meals and their relationship to the pH and rate of flow of resting saliva. *Arch Oral Biol*, 9: 493-516, 1964.
5. Dawes C: Factors influencing salivary flow rate and composition. In: Edgar VM and O'Mullane editors. *Saliva and Oral Health*, 2nded, British Dental Association, London, 1996. p.27-41.
6. Downen B, Ulf H: 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.
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. Gotouda H, Sasai H, Taguchi C, Wang J, Arikawa K, Kuyama K, Mega J, Yamamoto H, Kobayashi S: Study on Salivary Volume by the Modified Ion Dilution Method. *Int J Oral-Med Sci*, 3: 121-126, 2005.
9. Ericsson Y: Clinical investigations of the salivary buffering action, *Acta Odontol Scand*, 17, 131-165, 1959.
10. 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.
11. Anzai T, Tahara A, Ikeda M: Influence of colonization with mutans streptococci on caries risk in Japanese preschool children 24month survival analy-

- sis, *Pediatr Dent*, 22 : 377-380, 2000.
12. Ericsson Y.: Recent advances in dental caries research. Biochemistry, salivary and food factors in dental caries development, *Int Dent J*, 12 : 476-495, 1962.
13. Dental health division of health policy bureau ministry of health, labour and welfare Japan : Report on the survey of dental diseases (1999), oral health association of Japan, Tokyo. 2001. p.123-124.

Development of Useful Antibodies for Passive Immunotherapy against *Porphyromonas gingivalis* Infection

Yoshimitsu Abiko

Department of Biochemistry and Molecular Biology,
Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Porphyromonas gingivalis 感染に対する有用な受動免疫用抗体の開発

安孫子 宜 光

日本大学松戸歯学部 生化学・分子生物学講座

要旨：*Porphyromonas gingivalis* は歯周病の重要な原因菌と考えられており、これまでの研究成果から本菌の病原因子を標的にした免疫療法は本疾患の予防に有用であると示唆されている。歯周組織に対する病原細菌の付着は定着、感染に不可欠であり本疾患の発症に重要であることから、本菌の付着因子に対する免疫療法は極めて重要である。歯肉縁下部位への歯周病原細菌の共凝集因子、赤血球凝集因子は重要な定着因子であることが明らかにされている。一般社会からは、歯周病が生命を奪う重要な疾患であることに対する認識は未だ深くないことから、免疫療法の実用化には完全な安全性を保証せねばならない。その実現には安全性の高い受動免疫用抗体の作成が必要であろう。本稿では、歯周病の免疫療法の実現に向けてバイオテクノロジーを応用した安全性の高い受動免疫療法用抗体の作成戦略とその研究成果について紹介する。

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*, 単鎖可変部抗体, ヒト型モノクローナル抗体, 鶏 IgY

Abstract : *Porphyromonas gingivalis* has been implicated as an important etiological agent associated with periodontal disease, and emerging evidence suggests that immunotherapy against virulence factors of this pathogen may provide disease protection. Bacterial adherence to periodontal tissues is a prerequisite for colonization, and one of the important steps in the disease process, thus immunotherapy against adherence molecules is considered to be vital. Bacterial coaggregation and hemagglutination are factors that likely play major roles in colonization in the subgingival area. Since the public at large may be skeptical about the seriousness of periodontal disease, any immunotherapy employed must be carried out with absolute safety. To achieve this goal, the development of safe antibodies for use in passive immunization is significant. Herein, we discuss recent salient advances in immunotherapy against periodontal disease and introduce some biotechnological approaches for developing safe passive antibodies. Nihon Shishubyo Gakkai Kaishi (J Jpn Soc Periodontol) 47 : 239–249, 2005.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, single chain variable fragment antibody, human type monoclonal antibody, chicken IgY

Correspondence : Yoshimitsu Abiko, DDS, PhD

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, Chiba 271-8587, Japan

E-mail yabiko@masc.nihon-u.ac.jp

Introduction

Active immunization strategies for periodontal disease have been developed, and several reports have described their effectiveness and potential in experimental animals¹⁾. However, it is unlikely that active systemic immunization against periodontal disease will be utilized in humans in the near future, as its safety for practical use has yet to be shown. Further, It is known that disadvantageous immune reactions may occur with certain vaccines that very rarely result in sudden death, even though they have been previously well tested and confirmed safe.

Passively transferred immunization involves use of a specific antibody for a particular antigen, so-called serotherapy, and may provide immediate protection. As for periodontal disease, since the primary pathological site is gingival tissue, intravenous injections of antibodies may not be necessary, as effective immunization might be achieved with a simple mouth rinse or local application of the specific antibody to the periodontal pocket.

However, development of passive immunization therapy for practical use against periodontal disease has not significantly progressed, because of difficulties associated with the establishment of useful animal models and systems to deliver antibodies to the subgingival area. Further, several clinically relevant questions regarding which bacterial species are important and the etiologic agents involved in periodontal diseases remain. When considering passive immunization against periodontal diseases, the pathological focus has been primarily on gingival tissues, and application of a specific antibody that neutralizes bacterial adhesion to gingival tissues could provide a practical and satisfactory treatment approach. Recently, such an approach was used against *P. gingivalis*. In the experiment, patients with periodontitis, who harbored *P. gingivalis* in their subgingival plaque, were treated with scaling, root planing and metronidazole to suppress any detectable *P. gingivalis*, then a monoclonal antibody (MAb) against *P. gingivalis* was applied to the periodontal pocket. That treatment significantly reduced the numbers of *P. gin-*

givalis in sites showing the most severe periodontitis for up to 9 months after application of the MAb²⁾.

Although passive immunization in the oral cavity is thought to be safe, side effects can arise with use of animal antibodies, which may stimulate unwanted immune reactions that induce inflammation with further periodontal tissue destruction. Thus, it is still necessary to develop safe neutralizing antibodies for practical use.

In this review, recent salient advances in immunotherapy against periodontal disease are discussed and biotechnological approaches for developing safe passive antibodies such as recombinant single chain variable fragment, human type monoclonal antibodies, and chicken IgY, are introduced.

Molecular targets of immunotherapy

Adherence of bacteria to host tissues is a prerequisite for colonization and an important factor in bacterial pathogenesis. We have selected 2 colonization factors, coaggregation factor and hemagglutinin, as targets of passive immunotherapy³⁾,

Coaggregation factor, which plays a role in colonization through aggregation with other oral bacteria. *P. gingivalis* is able to adhere to the surface of several Gram-positive bacteria including *Actinomyces viscosus* and various streptococci⁴⁾, and inter-bacterial adherence appears to be an essential step in the process of colonization by *P. gingivalis*. It is well known that an accumulation of bacteria on tooth surfaces follows a sequence, beginning with Gram-positive facultative species and later shifting to Gram-negative facultative and anaerobic species. Another property of the coaggregation factor is its relationship to pathogenicity, since more abscesses have been shown to be formed by co-aggregates of 2 strains, for example, *A. viscosus* and *Streptococcus mitis*, than those caused by infection with a pure suspension of each microorganism and coaggregated cells were found to be more resistant to phagocytosis and killing by neutrophils *in vitro* and *in vivo*⁵⁾.

We previously cloned the gene for a 40-kDa outer membrane protein (OMP) from *P. gingivalis* 381 and produced large amounts of recombinant protein^{6,7)}. A rabbit antiserum against the purified

recombinant protein reacted with a polypeptide of a similar size in the outer membrane fraction and in vesicles of *P. gingivalis* 381. Previous studies have shown that monospecific rabbit polyclonal antibody purified using recombinant 40-kDa OMP (r40 kDa-OMP) affinity column significantly inhibited coaggregation of *A. viscosus* cells with *P. gingivalis* vesicles. These results indicated that the 40-kDa OMP functions as a coaggregation factor of *P. gingivalis*⁸⁾ and also found that the 40-kDa OMP is conserved among many strains of *P. gingivalis*⁹⁾. Using the affinity-purified antibody against r40-kDa OMP, we also confirmed that the antibody contributed to the killing of *P. gingivalis* 381 which was mediated by the complement system through both classical and alternative pathways¹⁰⁾. Further, we demonstrated that the antibody exhibited an opsonic activity on human neutrophil function leading to phagocytosis of *P. gingivalis*¹¹⁾. More recently, we found that 40-kDa OMP is one of hemin-binding protein¹²⁾. These findings suggest that 40-kDa OMP is unique and useful target of immunotherapy.

Hemagglutinin is a second potential target for immunotherapy. Hemagglutinins mediate adsorption and penetration of bacteria into host cells¹³⁾. *P. gingivalis* hemagglutinin domains are encoded in protease genes, which are able to degrade a broad range of host proteins¹⁴⁾. The multivalent hemagglutinins are also encoded by different genes, and it is thought that the hemagglutinins and protease genes may share similar hemagglutinin domain sequences in a multigene family¹⁵⁾. These findings support the notion that the hemagglutinins are the most important targets for passive immunization and that it may be of interest to develop safe antibodies capable of neutralizing the hemagglutinating activity of *P. gingivalis*.

In a previous study, we established several hybridoma clones using vesicles as the immunogen and produced a MAb, designated mAb-Pg-vc, that strongly inhibited activities of hemagglutination¹⁶⁾ and hemolysis¹⁷⁾, and also recognized the 43- and 49-kDa bands in a Western-blot analysis. This immunoblotting profile was the same as that of the monospecific antibody, anti-HA-Ag 2, which is known to be a hemagglutinating adhesin of *P.*

*gingivalis*¹³⁾. Our finding indicated that mAb-Pg-vc recognized the same epitope involved in the functional domain of hemagglutinin. Next, we constructed a *P. gingivalis* genomic library and successfully cloned a gene encoding a 130-kDa hemagglutinin protein (130 kDa-Hag) using mAb-Pg-vc. The complete nucleotide sequencing of the 4.6-kb cloned DNA fragment revealed 2 open reading frames (ORFs), with the upstream ORF shown to be the putative gene and responsible for 130 kDa-Hag, while the downstream ORF was found to specify the insertion sequence gene *IS1126*. Since an insertion sequence (IS) has the ability to move on a chromosome together with adjacent genes, it is likely that this IS may help spread the gene encoding the hemagglutinin domain on the *P. gingivalis* chromosome¹⁸⁾.

Based on the results of our Western blot analysis of nested deletion clones, we performed binding assays of the phage-displayed peptide library using mAb-Pg-vc and competition experiments of hemagglutinating activity using synthetic peptides with purified r130 k-kDa-Hag, which identified PVQNLT as a functional stretch. Further analysis of the identified short motif using NCBI databases revealed 14 genes containing hemagglutinin associated domains. It is noteworthy that additional homology searches with the short motif indicated a similarity with the hemagglutinin domain HA 1 in the influenza virus. These findings suggest that *P. gingivalis* expresses multiple sequence related hemagglutinin-associated motifs, which encode a number of hemagglutinins and/or proteases. This gene structure seems ideal for growth of the bacterium in periodontal pockets, as it facilitates the availability of heme molecules as an iron source. Since bacterial cell attachment to erythrocytes is an important initial step for expressing hemolysis activity, we also examined the effect of mAb-Pg-vc on the hemolytic activity of *P. gingivalis* cells. The MAb significantly inhibited hemolytic activity, while the inhibition was reduced by the synthetic peptide corresponding to the 130-kDa HAG functional motif PVQNLT.

Together, these findings support the notion that hemagglutinins are the most important targets for passive immunization and confirm the importance

of developing safe antibodies that are capable of neutralizing the hemagglutinating activity of *P. gingivalis*.

Recombinant ScFv antibody

The IgG molecule consists of 2 heavy (H) and 2 light (L) chains, and the N-terminal end in both the H and L chains contains variable (V) regions. These V regions are known as VH and VL, and together they form the antigen-binding site of the V fragment (Fv) in Fab. The constant region Fc plays important roles in complement activation via binding of C1 and in opsonization via binding to the Fc receptor. When considering the effectiveness and safety of antibodies for neutralizing virulence factors, Fv in Fab without Fc may avoid unwanted cellular immune responses and is a reasonable candidate for use as an antibody. The single chain variable fragments (ScFv) antibody, which consists of the H and L chain variable fragment, is also an attractive molecule, because its small size allows faster delivery to tissues when compared to an ordinary MAb¹⁹⁾. Further, an intact MAb may attach non-specifically to tissues via the constant regions. Thus, an ScFv antibody may be more advantageous due to its specific binding to pathogens.

To construct an ScFv antibody, we isolated mRNA from mAb-Pg-vc antibody-producing hybridomas, synthesized the cDNA corresponding to the VH and VL genes, amplified the genes by polymerase chain reaction (PCR) using immunoglobulin gene-specific primers or oligo dT primers, and then amplified the VH and VL genes that were interconnected by a short polypeptide linker, (Gly₄ Ser)₃. The short polypeptide linker ensured the functional expression of the VH and VL domains, and increased stability. Further, improvement of the vector with histidine hexamer tails attached to the ScFv fragment allowed for rapid purification using metal ion resin affinity chromatography. Our ScFv from hybridoma producing mAb-Pg-vc found to be secreted into the periplasmic space and then purified using an anti-E tag antibody affinity column from the periplasmic fraction. As expected, the ScFv significantly inhibited the hemagglutinating activity of *P. gingivalis* vesicles in a dose-dependent manner.

Interestingly, a DNA sequence homology search with the ScFv gene showed that CDRs in the VH gene exhibited a high degree of homology with those in the VH gene of the MAb that recognized the antigenic site of the A/PR/8/34 influenza virus hemagglutinin. Compilation of these data may help clarify the stereochemistry between antibody CDRs and antigen epitopes, which could be critical for designing novel antibodies in the establishment of a passive immunization system¹⁶⁾ (Fig. 1).

Although we succeeded in the construction of an ScFv capable of inhibiting hemagglutinating activity, the recovery rate and activity were not satisfactory. Eukaryotic proteins expressed in the *Escherichia coli* host often accumulate within the cells as insoluble protein aggregates or inclusion bodies. The recovery of structure and activity from inclusion bodies is a complex process, with efficient *in vivo* folding of functional proteins a major bottleneck of high-level production in the *Escherichia coli* host, and simple optimization protocols are not available. To accomplish the mass production of functional ScFv antibodies, we attempted to express the ScFv gene in a *Bacillus brevis* protein-producing system²⁰⁾. A chimera gene was constructed from the secretions of the leader peptide of the *B. subtilis* α -amylase gene and our ScFv gene, using a shuttle vector between *E. coli* and *B. brevis*, which was then transformed in the *B. brevis* host. As expected, the novel *B. brevis* transformant produced a large amount of ScFv protein that was secreted extracellularly, and the that protein, which was purified from conditioned culture fluid, significantly inhibited *P. gingivalis* hemagglutinating activity²¹⁾ (Fig. 2).

Our ScFv protein may be capable of inhibiting *P. gingivalis* colonization onto gingival tissues as well as Fe ion intake, and might also have a potential to prevent periodontal diseases.

Human type monoclonal antibody

One of the major obstacles to the development of therapeutic applications using MAbs derived from animals for humans is their intrinsic immuno-

genicity. The full benefits of antibody therapy can only be properly assessed with a fully human MAb that can be administered repeatedly. To develop a safe regimen for passive immunization therapy, several methods have been developed for the production of human monoclonal antibodies (hMAbs), including Epstein-Barr virus (EBV) immortalization of antibody producing cells and hybridoma production using human immunoglobulin genes from transgenic mice.

EBV infects human B-lymphocytes via the membrane antigen CD 21 and immortalizes antibody producing cells²². However, B-lymphocytes that produce efficient hMAbs are difficult to obtain, since immunization of a human population for that purpose is not practical. In order to overcome this problem, we have used severe combined immunodeficiency (SCID) mice²³. Most implanted human peripheral blood lymphocytes (hPBLs) are depleted by an immune response involving cytotoxic cells, mainly NK cells, in SCID mice. We administered anti-asialo GM 1 to SCID mice to reduce NK cell activity and then transferred hPBLs (Fig. 3).

We obtained hPBLs from a donor with a high serum level of antibodies against r40 kDa-OMP, and B cell clones were established using SCID mice and an EBV immortalization system. EBV-B cells that produced anti-r40 kDa-OMP antibodies were collected by panning using r40 kDa-OMP. IgG isotype clones, representing the IgG 1 and IgG 2 subclasses, were successfully isolated, and the clone showing the highest inhibitory activity against coaggregation was part of the IgG 2 subclass and named HAb-omp 1. The hMAb significantly inhibited the coaggregation activity of *P. gingivalis* vesicles to *A. naeslundii* cells. Next, the equilibrium binding constant of the interaction between HAb-omp 1 and r40 kDa-OMP was examined using a Fluorescence Polarization System, and the Kd value of the binding was determined from the fitted curve to be 4.4 nM, which is similar to the value for mouse MAbs²⁴.

We highly purified recombinant 130-k HMGD using an electro-osmotic medium pump system for preparative disc gel electrophoresis²⁵. Human lymphocytes were isolated from a donor who had a high antibody titer against purified recombinant 130-k HMGD and immortalized with EBV, after

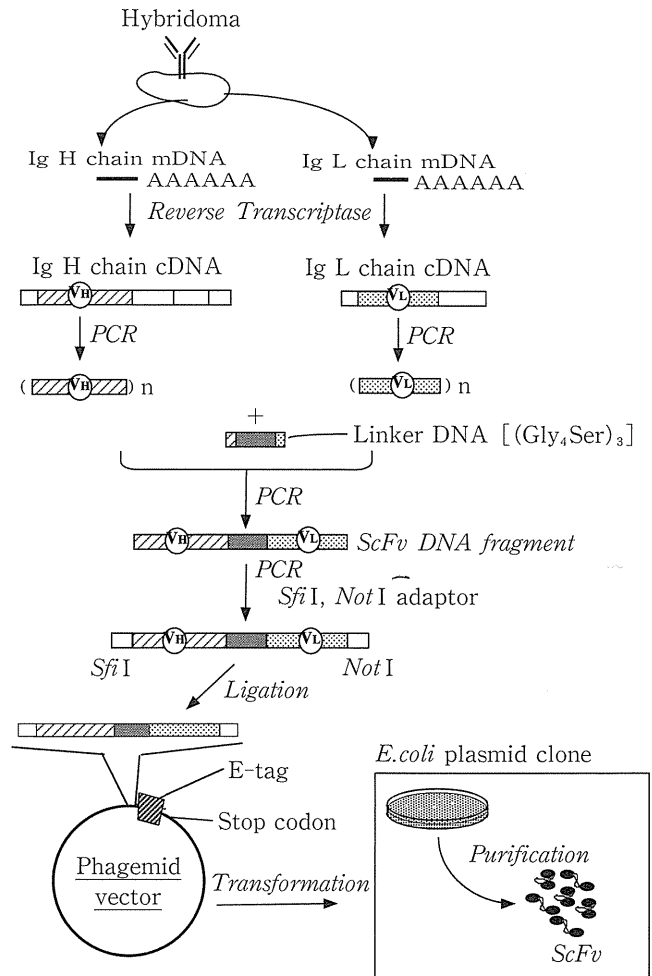


Fig. 1 Strategy for molecular cloning of VH and VL genes and construction of ScFv

which specific antibody producing B cells were established by panning using purified r130-k HMGD. The constructed hMAb-HMGD 1, which was of the IgG subclass, recognized r130 k HMDG as well as the 43- and 49-kDa major bands in *P. gingivalis* cells and vesicles, and significantly inhibited the hemagglutinating activity of *P. gingivalis* vesicles in a dose dependent manner. Further, the HuMAb-HMGD 1 recognized the synthetic peptide, EGSNEFAPVQNLTGSSVG, which contained the functional domain of 130-k HMDG²⁶.

One of the most appealing approaches for constructing hMAbs is establishment of a mouse line engineered with human immunoglobulin genes capable of producing a large repertoire of human antibodies in the absence of mouse antibodies. This

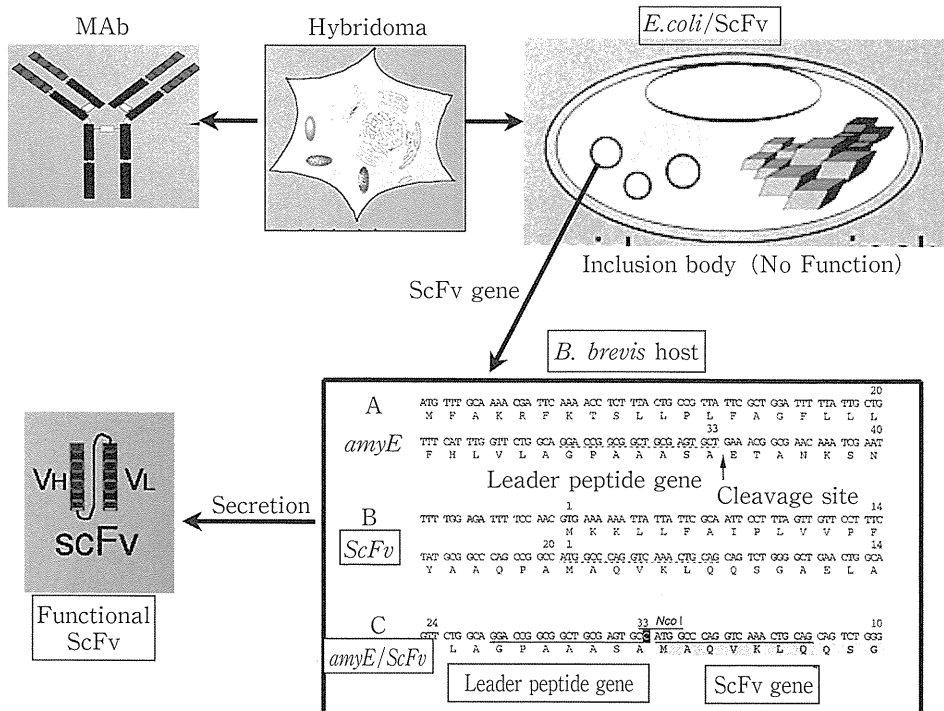


Fig. 2 ScFv gene cloning into *B. brevis* host. The leader peptide gene of *B. subtilis* α -amylase was joined with ScFv gene under adjusted triplet flame codon, and inserted into a shuttle vector between *E. coli* and *B. brevis*, which was then transformed in the *B. brevis* host

novel strategy involves inactivation of mouse immunoglobulin genes, and then introduction of human H and J chain loci into the mouse germline. Large fragments of human H and kappa L chain loci cloned on yeast artificial chromosomes have been introduced into mouse germlines via fusion of yeast spheroplasts with mouse embryonic stem (ES) cells. These fragments, which contain structural genes for the variable, joining, diversity, and constant domains as well as critical regulatory elements, proved to be sufficient for the production of a broad repertoire of human immunoglobulins and expressed significant levels of human antibodies in mice named Xenomice²⁷⁾ (Fig. 4).

We also produced hMAbs capable of neutralizing the hemagglutinin activity of *P. gingivalis* by using Xenomice. Interestingly, our successfully constructed hMAb for IgG 1 showed inhibitory activity against the hemagglutinating activity of *P. gingivalis* vesicles²⁸⁾.

Another transgenic line harboring a human Ig

gene cluster is TransChromo mice, which have 2 transmittable human chromosome fragments, one containing the Ig heavy chain locus and the other the kappa light chain locus. These 2 human chromosome fragments were introduced into a mouse strain whose endogenous IgH and Igekappa loci were inactivated. In the resultant mice, a substantial proportion of the somatic cells retained both human chromosome fragments, and recovery from the defect in Ig production was shown by high levels of expression of human Ig heavy and kappa chains in the absence of mouse heavy and kappa chains²⁹⁾ (Fig. 5).

We immunized human Ig-producing TransChromo mice with r 40 kDa-OMP and their spleen cells were fused with a mouse myeloma cell line. From that, we successfully constructed an hMAb that promoted phagocytosis of *P. gingivalis* by neutrophils³⁰⁾. Such novel hMAbs may be useful to develop a passive immunotherapy against periodontal disease through opsonic clearance of *P.*

gingivalis infection.

Chicken IgY antibody

Following immunization of hens with an antigen, specific antibodies have been induced and transported to the egg yolk, from which antibodies (IgY) can be purified in large quantities. Recently, the production of a specific antibody in chickens and extraction of IgY from egg yolks are attracting interest from the viewpoint of passive immunotherapy³¹⁾. Chicken eggs are normal dietary components, thus there are no toxic side effects, and IgY Fc has no ability to activate the complement and opsonization systems. As compared to IgG, a chicken IgY production system is advantageous, because of the higher amount of IgY produced by a single hen in 1 year, which ranges from 20 to 40 g more than animal IgG production. Previous studies have shown that antibodies are actively transported to the egg yolk of an immunized chicken, thus the use of IgY for passive immunization avoids the need to bleed animals for antibody preparation. Since the amount of IgY obtained from an egg yolk is sufficient, hyper-immunized hens may be used as a convenient and economic method for passive immunization strategies (Fig. 6).

We immunized a highly purified r130-k HMDG to chickens, and isolated IgY recognized r130 k HMDG as well as the 43- and 49-kDa major bands in *P. gingivalis*, and significantly inhibited the hemagglutinating activity. Further, the IgY recognized the synthetic peptide, EGSNEFAPVQNLTGSSVG, which contained the functional domain of 130-k HMDG³²⁾.

Conclusions

Recently, the term periodontal medicine has come to mean the study of the contribution of periodontal infections toward systemic diseases such as atherosclerosis, myocardial infarction, stroke, diabetes, low birth weight, and osteoporosis. Thus, it is considered that prevention of periodontitis is relevant for both oral and systemic health. From now, dental researchers and practitioners must take a

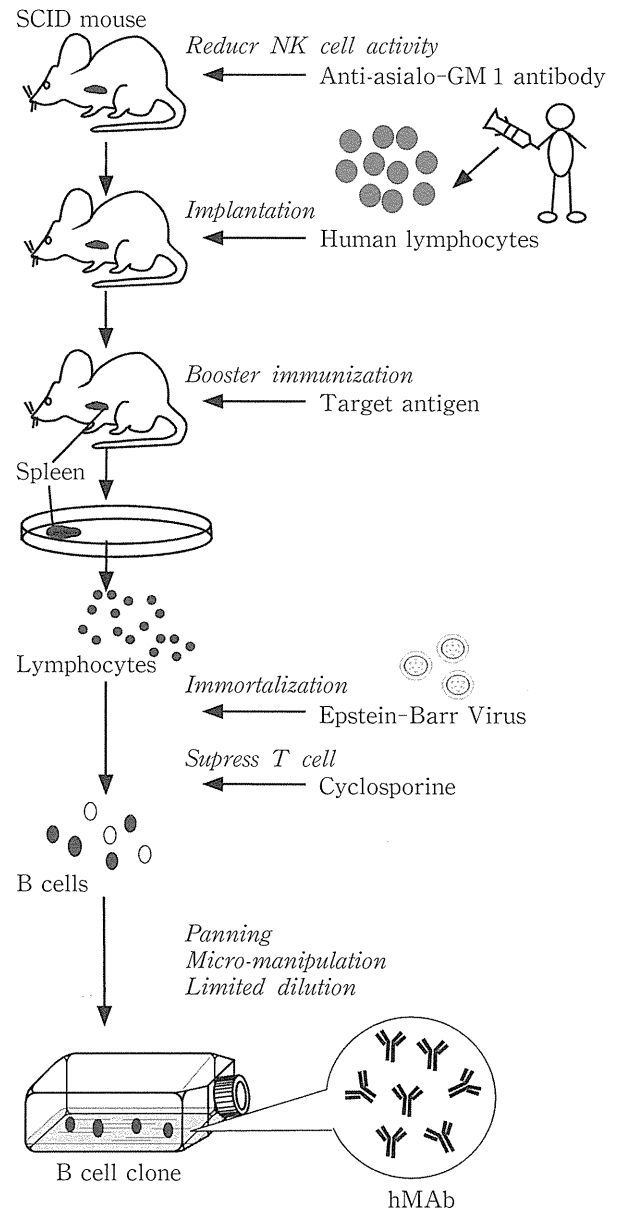


Fig. 3 An outline of the strategy to generate Hu-mAb using SCID mouse and EBV immortalization

greater responsibility to enlighten general society regarding the development of new treatment methods, as well as effective strategies to prevent periodontal disease.

Herein, we have introduced some passive immunotherapy strategies that utilize the development of useful antibodies against *P. gingivalis*. Development of a recombinant antibody, ScFv, now makes it possible to mass-produce ScFv by its expression

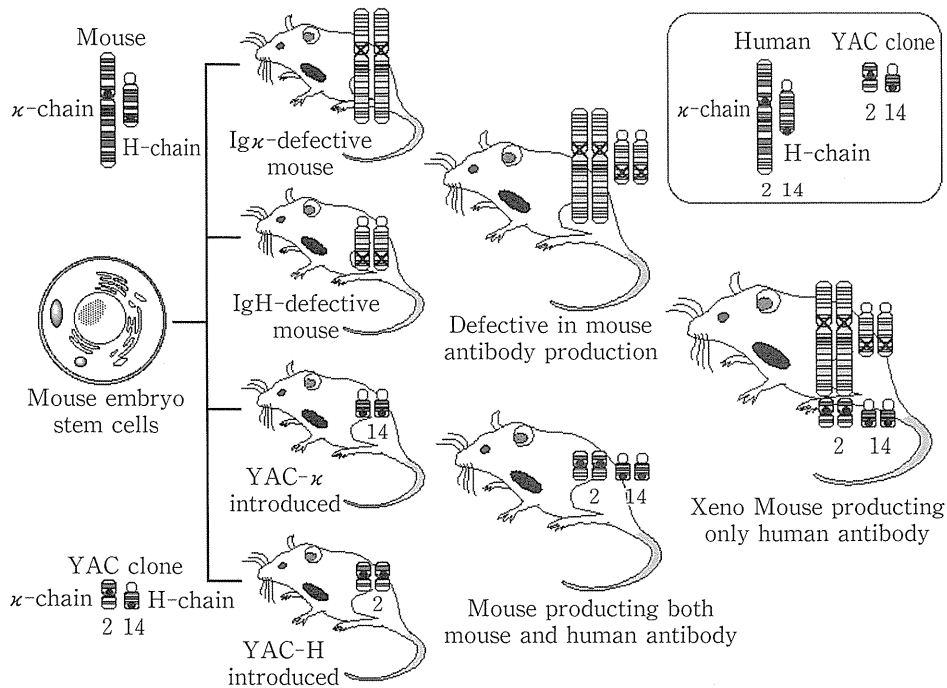


Fig. 4 The strategy for construction of human IgG gene transgenic mice, Xenomice

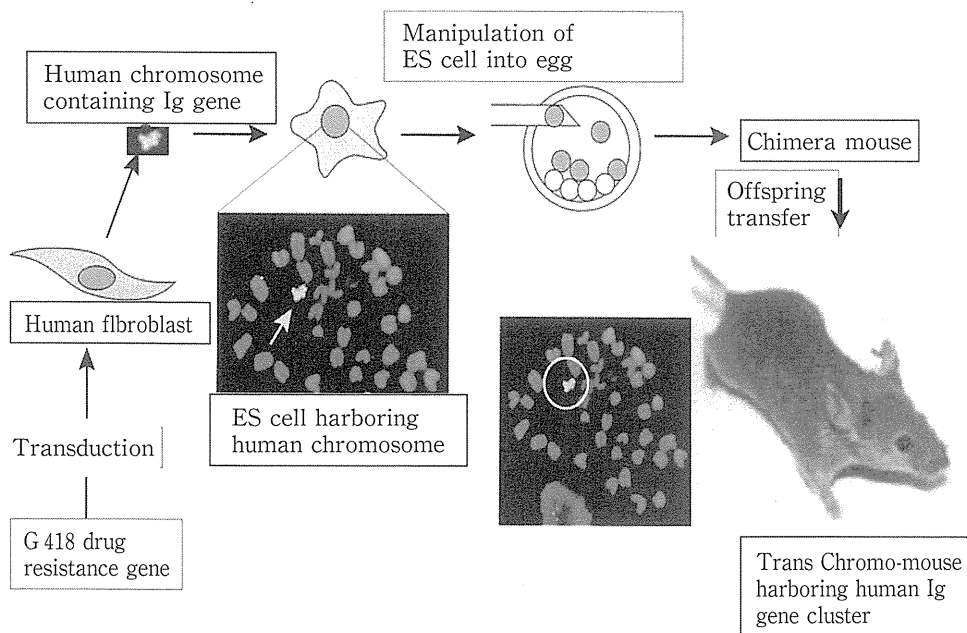


Fig. 5 The strategy for construction of human entire Ig gene transgenic mice, Trans-Chromo-mouse

and secretion in a *B. brevis* system. It is possible that human MAbs can be produced using a large quantity of ScFv with the recombinant technology introduced here. However, chicken IgY also has

the potential for mass production for human use.

All antibodies developed in the future must be useful and safe, as well as show a potential for practical use in passive immunotherapy against

periodontal disease by neutralizing *P. gingivalis* colonization. Although efforts have been made to develop effective immunotherapies against periodontal disease, it is a matter of great importance to ensure that safety is provided along with effective protection. Further, as a result of the increased commercial demand for safe therapeutic antibodies, an efficient and low cost production process is essential. It is doubtful that an active systemic immunization method against periodontal disease can be put into practical use in humans in the near future, because of safety concerns. However, investigations must continue and the goal of achieving a practical active immunization strategy against periodontal diseases maintained.

It is thought that treatment of the local immune system using mucosal immunotherapy is safer than active systemic immunization. The mucosal immune system functions to protect mucous membranes against colonization and invasion by pathogens, thus preventing the harmful immune responses to those antigens, if they reach the body interior. However, despite the many attractive features of mucosal vaccination, it is often difficult to stimulate strong secretory IgA immune responses and protection. As for specific adjuvants, the best-studied and most potent mucosal adjuvants in experimental systems are cholera toxins.

We assessed the efficacy of the 40-k OMP of *P. gingivalis* in a nasal vaccine. Mice were nasally immunized with the 40-k OMP using cholera toxin as an adjuvant and significant levels of 40-k OMP specific serum IgG 1, IgG 2 b, and IgA as well as mucosal IgA in saliva and nasal secretions were observed. Further, the 40-k OMP-specific IgG significantly inhibited the coaggregation activity of *P. gingivalis*³³. Transcutaneous immunization, a topical vaccine method, combines the advantages of needle-free delivery with targeting of the immunologically rich milieu present in skin. In animal studies, this simple technique has been shown to induce robust systemic and mucosal antibodies against vaccine antigens³⁴. The development of a transcutaneous 40-k OMP vaccine for human use may be a significant milestone in the quest for an effective vaccine. In assessing the efficacy of transcutaneously administered 40-k OMP, the 40-k

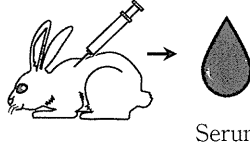
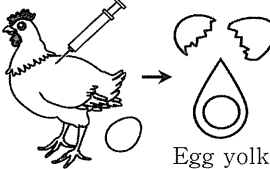
Mammalian IgG	Chicken IgY
	
Serum	Egg yolk
200 mg/40 ml blood	100–150 mg/one egg (280 eggs/1 year/4,000 mg)

Fig. 6 Comparison of mammalian IgG and chicken IgY

OMP alone induced significant 40-k OMP-specific IgG responses in both serum and saliva samples, while the OMP plus cholera toxin used as an adjuvant further increased the levels of IgG responses and induced 40-k OMP-specific serum IgA. Those 40-k OMP-specific IgG induced by the transcutaneous administered vaccine also significantly diminished coaggregation activity of *P. gingivalis*³⁵. These findings indicate that mucosal and transcutaneous vaccines using appropriate target antigens from *P. gingivalis* may be feasible for human immunization, and effective for the prevention of periodontal diseases.

In 1991, the National Institute of Dental Research sponsored a workshop titled “Genetically Engineered Vaccines: Prospect for Oral Disease Prevention,” which focused on important topics such as, oral diseases and host immune response, vaccines and the mucosal immune system, optimizing mucosal and systemic immune responses, delivery systems, targeted antigen selection, and vaccine development. Although 15 years have passed since this meeting, immunotherapy against periodontal disease remains a goal to be achieved. It is a matter of great importance to ensure safety along with effective protection. Further, as a result of increased commercial demand for safe therapeutic antibodies, there is a need for an efficient and low cost production process. The successful development of immunotherapy against periodontal disease requires a concerted effort by industry, government, and dental society.

Acknowledgments

Supported in part by "Academic Frontier" Project for Private Universities : matching fund subsidy from Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, 2001-2005, and by Grant-in-Aid for Scientific Research (A 1-16209063) from Japan Society for the Promotion of Science

References

- 1) Gibson FC 3rd, Gonzalez DA, Wong J, Genco CA : *Porphyromonas gingivalis*-specific immunoglobulin G prevents *P. gingivalis*-elicited oral bone loss in a murine model. *Infect Immun*, 72 : 2408-7411, 2004.
- 2) Booth V, Ashley FP, Lehner T : Passive immunization with monoclonal antibodies against *Porphyromonas gingivalis* in patients with periodontitis. *Infect Immun*, 64 : 422-427, 1996.
- 3) Abiko Y : Passive Immunization against dental caries and periodontal disease : Development of recombinant and human monoclonal antibodies. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11 : 140-153, 2000.
- 4) Slots J, Gibbons RJ : Attachment of *Bacteroides melaninogenicus* subsp. *asaccharolyticus* to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pockets. *Infect Immun*, 19 : 254-264, 1978.
- 5) Ochiai K, Kurita-Ochiai T, Kamino Y, Ikeda T : Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. *J Med Microbiol*, 39 : 183-190, 1993.
- 6) Abiko Y, Hayakawa M, Aoki H, Kikuchi T, Shimatake H, Takiguchi H : Cloning of a *Bacteroides gingivalis* outer membrane protein gene in *Escherichia coli*, *Archs Oral Biol*, 35 : 689-695, 1990.
- 7) Kawamoto Y, Hayakawa M, Abiko Y : Purification and immunochemical characterization of a recombinant outer membrane protein from *Bacteroides gingivalis*, *Int J Biochem*, 23 : 1053-1061, 1991.
- 8) Hiratsuka K, Abiko Y, Hayakawa M, Ito T, Sasahara H, Takiguchi H : Role of *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of *P. gingivalis* vesicles and *Actinomyces viscosus*. *Archs Oral Biol*, 37 : 717-724, 1992.
- 9) Hiratsuka K, Yoshida W, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y : Polymerase chain reaction and an outer membrane protein gene probe for the detection of *P. gingivalis*. *FEMS Microbiol Letters*, 138 : 167-172, 1996.
- 10) Saito S, Hayakawa M, Hiratsuka K, Takiguchi H, Abiko Y : Complement-mediated killing of *P. gingivalis* 381 by the IgG induced by recombinant 40-kDa outer membrane protein. *Biochem Mole Med*, 58 : 184-191, 1996.
- 11) Saito S, Hayakawa M, Takiguchi H, Abiko Y : Opsonophagocytic effect of antibody against recombinant conserved 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* on dimethyl sulfoxide-differentiated HL-60 cells. *J Periodontol*, 70 : 608-615, 1999.
- 12) Shibata Y, Hiratsuka K, Hayakawa M, T. Shiroza, Takiguchi H, Nagatsuka Y, Abiko Y : A 35-kDa co-aggregation factor as a hemin binding protein in *Porphyromonas gingivalis*, *Biochem Biophys Res Commun*, 300 : 351-356, 2003.
- 13) Mouton C, Bouchard D, Deslauriers M, Lamonde L : Immunochemical identification and preliminary characterization of a nonfimbrial hemagglutinating adhesin of *Bacteroides gingivalis*, *Infect Immun*, 57 : 566-573, 1989.
- 14) Nishikata M, Yoshimura F : Characterization of *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* hemagglutinin as a protease, *Biochem Biophys Res Commun* 178 : 336-342, 1991.
- 15) Kadowaki T, Yoneda M, Okamoto K, Maeda K, Yamamoto K : Purification and characterization of a novel arginine-specific cysteine proteinase (argingipain) involved in the pathogenesis of periodontal disease from the culture supernatant of *Porphyromonas gingivalis*, *J Biol Chem*, 269 : 21371-21378, 1994.
- 16) Shibata Y, Kurihara K, Takiguchi H, Abiko Y : Construction of a functional ScFv antibody against a hemagglutinin from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*, 66 : 2207-2312, 1998.
- 17) Hosogi Y, Hayakawa M, Abiko Y : Monoclonal antibody against *Porphyromonas gingivalis* hemagglutinin inhibits hemolytic activity. *Eur J Oral Science*, 109 : 109-113, 2001.
- 18) Shibata Y, Hayakawa M, Takiguchi H, Shiroza T, Abiko Y : Determination and characterization of the hemagglutinin-associated short motifs found in *Porphyromonas gingivalis* multiple gene products. *J Biol Chem*, 274 : 5012-5020, 1999.
- 19) Winter G, Milstein C : Man-made antibodies. *Nature*, 349 : 293-299, 1991.
- 20) Ebisu S, Takagi H, Kadowaki K, Yamagata H,

- Udaka S : The efficient production of human epidermal growth factor by *Bacillus brevis*. Ann NY Acad Sci, 782 : 115-122, 1996.
- 21) Shiroza T, Shibata Y, Hayakawa M, Shinozaki N, Fukushima K, Udaka S, Abiko Y : Construction of a chimeric shuttle plasmid via a heterodimer system : secretion of an scFv protein from *Bacillus brevis* cells capable of inhibiting hemagglutination. Biosci Biotechnol Biochem, 65 : 389-395, 2001.
- 22) Fingerroth J D, Weis JJ, Tedder TF, Strominger JL, Biro PA, Fearon DT : Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. Proc Natl Acad Sci USA, 81 : 4510-4514, 1984.
- 23) Mosier DE, Gulizia RJ, Baird SM, Wilson DB : Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. Nature, 335 : 256-259, 1988.
- 24) Abiko Y, Ogura N, Matsuda U, Yanagi K, Takiguchi H : A human monoclonal antibody which inhibits the coaggregation activity of *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun, 65 : 3966-3969, 1997.
- 25) Hayakawa M, Hosogi Y, Takiguchi H, Saito S, Shiroza T, Shibata Y, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Abiko Y : Further development of an electro-osmotic medium pump system for preparative disc gel electrophoresis : Application with a non-denaturing gram protein preparation. Anal Biochem, 288 : 168-175, 2001.
- 26) Kaizuka K, Hosogi Y, Hayakawa M, Shibata Y, Abiko Y : Human Monoclonal Antibody Inhibits *Porphyromonas gingivalis* Hemagglutinin Activity. J Periodontol, 74 : 38-43, 2003.
- 27) Mendez MJ, Green LL, Corvalan JR, Jia XC, Maynard-Currie CE, Yang XD, Gallo ML, Louie DM, Lee DV, Erickson KL, Luna J, Roy CM, Abderrahim H, Kirschenbaum F, Noguchi M, Smith DH, Fukushima A, Hales JF, Klapholz S, Finer MH, Davis CG, Zsebo KM, Jakobovits A : Functional transplant of megabase human immunoglobulin loci recapitulates human antibody response in mice. Nat Genet, 15 : 146-156, 1997.
- 28) Shibata Y, Hosogi Y, Hayakawa M, Hori N, Kamada K, Abiko Y : Construction of novel human monoclonal antibodies neutralizing *Porphyromonas gingivalis* hemagglutination activity using transgenic mice expressing human Ig loci. Vaccine, 23 : 3850-3856, 2005.
- 29) Tomizuka K, Shinohara T, Yoshida H, Uejima H, Ohguma A, Tanaka S, Sato K, Oshimura M, Ishida I. : Double trans-chromosomal mice : maintenance of two individual human chromosome fragments containing Ig heavy and kappa loci and expression of fully human antibodies. Proc Natl Acad Sci USA, 97 : 722-727, 2000.
- 30) Takauchi A, Kobayashi T, Tahara T, Nakazawa K, Hayakawa M, Shibata Y, I, Abiko Y, Yoshie H : The TransChromic mouse-derived human monoclonal antibody promotes phagocytosis of *Porphyromonas gingivalis* by neutrophils. J Periodontol, 76 : 680-685, 2005.
- 31) Hatta H, Tsuda K, Akachi S, Kim M, Yamamoto T : Productivity and some properties of egg yolk antibody (IgY) against human rotavirus compared with rabbit IgG. Biosci Biotech Biochem, 57 : 450-454, 1993.
- 32) Hamajima S, Tezuka A, Hatta H, Abiko Y : Production of egg yolk-derived immunoglobulin against *Porphyromonas gingivalis* 130-kDa hemagglutinin. Dent Jap, 41 : 115-118, 2005.
- 33) Namikoshi J, Otake S, Maeba S, Hayakawa M, Abiko Y, Yamamoto M : Specific antibodies induced by nasally administered 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* inhibits coaggregation activity of *P. gingivalis*. Vaccine, 22 : 250-256, 2003.
- 34) Glenn GM, Taylor DN, Li X, Frankel S, Montemarano A, Alving CR : Transcutaneous immunization : a human vaccine delivery strategy using a patch. Nat Med, 6 : 1403-1406, 2000.
- 35) Maeba S, Otake S, Namikoshi J, Shibata Y, Hayakawa M, Abiko Y, Yamamoto M : Transcutaneous immunization with a 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* induces specific antibodies which inhibit coaggregation by *P. gingivalis*. Vaccine, 23 : 2513-2521, 2005.