

Imaging of Osteomyelitis in the Mandible: CT and MR Imaging Features

Lee, K¹; Mori, S¹; Motohashi, J¹; Kaneda, T¹; Minami, M¹; Curtin, HD¹; Yamamoto, H²

¹Dept. of Radiology, Japan; ²Dept. of Pathology, Japan; ³Dept. of Radiology, Japan

Aim: To describe CT and MR findings of osteomyelitis in the mandible and to compare with those of other radiological modalities.

Method: Twenty-five patients with osteomyelitis in the mandible have been studied with CT and MR imaging. Results of the CT and MR imaging were compared with those of plain radiography, panoramic radiography and bone scintigraphy.

Results: All the mandibular bony lesions showed abnormal low (76%) or low-to-intermediate (24%) signal intensities on T1-weighted images and abnormal heterogeneously intermediate-to-high (75%) or low-to-high (25%) signal intensities on T2-weighted images. Surrounding soft tissue showed abnormal low signal intensities on T1-weighted images and high signal intensities on T2-weighted images. After intravenous injection of contrast material, bone marrow lesions and the surrounding soft tissue revealed diffuse enhancement in all cases. MR imaging showed larger areas of abnormality than plain, panoramic radiography and CT. However, CT was superior to the MR imaging about the information of cortical bone in the mandible. Although bone scintigraphy showed heterogeneously increased uptake, it did not accurately reveal the extent of lesions.

Conclusion: CT and MR imaging could evaluate both bony lesions and soft tissue abnormality of osteomyelitis in the mandible.

口腔白板症の悪性転化潜在能に関する病理組織学的研究：

殊に血管新生について

日本大学松戸歯学部口腔外科学教室¹

日本大学松戸歯学部病理学教室²

○野上 俊雄¹, 久山 佳代², 山本 浩嗣²
名倉 英明¹

口腔白板症（以下、白板症）は、その5%前後に扁平上皮癌への悪性転化がみられ、口腔領域における重要な前癌病変のひとつである。近年、種々の固形腫瘍の増殖過程において、血管新生の亢進は、病態の進展と密接に関わっていることが明らかにされつつある。

これまで、白板症の悪性転化に関して、多くの病理組織学的、臨床病理学的検討がなされてきたが、血管新生の観点からみた報告は少なく、これらについて十分に検討されているとはいえない。

そこで、白板症の悪性転化と微小血管新生との関係を明らかにする目的で、白板症悪性転化例の初診時組織切片を用いて、病理組織学的、免疫組織化学的に比較検討した。

血管新生刺激因子のひとつである Vascular Endothelial Growth Factor と、そのレセプターの発現率、粘膜上皮結合組織における微小血管密度、および粘膜上皮の Ki-67 index は、非悪性転化群と比較し、悪性転化群において、より高い値が示された。

これらの結果から、悪性転化群では、白板症と診断された初期段階において、血管新生を中心とした間質反応の亢進が起きているものと推察された。

A CYTOLOGICAL STUDY OF MUCOSAL DYSPLASIA AFFECTING THE ORAL, BRONCHIAL AND UTERINE CERVICAL REGIONS

*Fifita SF¹⁾, Kuyama K¹⁾, Matusmoto T²⁾, Yamamoto H¹⁾, Nakahira T³⁾, Ohmura M³⁾
Departments Of Pathology¹⁾ And Clinical Laboratory²⁾ Nihon University School Of Dentistry
At Matsudo, Department Of Pathology³⁾, Chiba West General Hospital, Japan*

Objective: The study was aimed to determine the morphological features of oral, bronchial and uterine cervical mucosal dysplasia through cytology and morphometry, in an attempt to establish a better morphological definition of dysplasia and more valid morphological criteria of dysplasia in oral mucosa.

Method: Cytomorphometry was applied to cytological smears collected from oral, bronchial and uterine cervical mucosae, which were histologically diagnosed with dysplasia. The frequency and severity of atypias were discriminantly assessed and were based on N/C ratio and shape. Our reporting system included a cytological category ranging from mild to severe dysplasia for oral and uterine cervical cases, while bronchial dysplasia ranged from mild to severe atypical metaplasia.

Result: Different conditions may determine atypical changes within these regions, however, we would expect to see some valid cytological and morphometrical criterion which can provide assistance in grading dysplasia of oral, bronchial and uterine cervical lesions. With cytology and morphometry, valuable criterion could be seen by discriminating oral dysplasia from bronchial and uterine cervical dysplasia in regard to nuclear size and shape.

Conclusion: The dysplastic lesions of the epithelium offer a particularly interesting area of research for understanding the biological nature of the evolution of dysplasia, and the process of cancer formation. Attempting to evaluate specific morphological nuclear criteria of different lesions from different tissues was difficult. However, the combination of cytological and morphometrical analysis was useful in the characterization.

A HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY OF MALIGNANT TRANSFORMATION OF ORAL LEUKOPLAKIA

Nogami T¹, Kuyama K², Nagura H¹, Yamamoto H², Departments of ¹Oral Surgery and ²Pathology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

Objectives: The objective of this study was to investigate the role of apoptosis, angiogenesis and proliferation in the progression from oral leukoplakia to squamous cell carcinoma, which included the relationship of clinicopathological findings.

Materials and Methods: The materials consisted of 5 normal epithelial tissues, 6 oral leukoplakias with no carcinogenicity, 8 oral leukoplakias with carcinogenicity. To investigate these roles, clinical, histopathological, immunohistochemical studies and TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase (TDT) mediated biotin-dUTP nick end labeling) methods were carried out. Sections were reacted with antibodies against Ki-67, p53, apoptosis-suppression marker; Bcl-2, apoptosis-promotion marker; Bax and CD31. Microvessel density (MVD) was measured using computer morphological program.

Results: The peak of mitosis index, number of basal cells, cell proliferative activity index, Bcl-2 and p53 expressions were increased with malignant potential. In contrast, the peak of apoptosis index and Bax expression were decreased with malignant potential. MVD in the submucosal connective tissues tended to increase in leukoplakias with carcinogenicity.

Conclusions: The frequent expression of Bcl-2 in oral leukoplakia with carcinogenicity indicated that malignancy was derived from escaping apoptosis. In addition, high levels of Bax expression in oral leukoplakia with no carcinogenicity indicated that Bcl-family might play a role in progression. Furthermore, angiogenesis was concerned with malignant transformation of oral leukoplakia.

A STUDY OF LYMPHATIC DENSITY AND LYMPHANGIOGENESIS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Makino T¹, Kuyama K², Yamamoto H², Nagura H¹, Departments of Oral Surgery¹ and Pathology², Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

Objectives: The study was to investigate the lymphatic density and the expression of lymphangiogenesis factors in the oral squamous cell carcinoma (SCC) of nude mouse using immunohistochemistry.

Materials and Methods: The oral SCC model was made to implant neoplastic cells into the tongue of nude mouse and then investigated the tongue and lymph nodes. Immunohistochemically, all microvessels and lymphatics were detected by PECAM-1 and desmoplakin, and lymphangiogenesis factors were observed by the expression of VEGF-C and Flt-4. The microvessel density was evaluated to detect capillary and lymphatic by morphometric analysis among the tumor stroma, the front of tumor invasion (tumor surroundings) and the connective tissue of normal tongue.

Results: Neoplastic cells were seen to invade into the vessels and lymph nodes. In the microvessel density, the number and area of lymphatics in the tumor surroundings increased compared with normal tongue. The area of lymphatics was greater than that of capillaries. VEGF-C was not only seen in keratinizing neoplastic cells but also in parts of lymphatics endothelial cells. The expression of Flt-4 was seen in a part of lymphatics endothelial cells.

Conclusions: The evaluation of lymphatic density in the oral SCC model indicates that metastasis via the lymphatics was more frequent than via hematogenic. Lymphangiogenesis factors might play an important role by increasing lymphatic density.

FOREIGN BODY GRANULOMA OF THE CHIN

Akimoto Y¹, Tanaka S¹, Shibutani J¹, Kaneda T², Fujii A³, Fukumoto M⁴, Koizumi Y⁵, Kuyama K⁵, Okada H⁵, Yamamoto H⁵, Departments of Oral Surgery¹, Radiology², Pharmacology³, Clinical Pathology⁴, Pathology⁵, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

Objective: To report a case of 60-year presence of metals leading to the formation of a cystic granuloma.

Case: A 76-year-old man was referred with a painless swelling of chin that he had first noticed 10 months earlier. The chin was diffusely swollen and slightly erythematous. On oral examination, the mucosa of gingivo-labial junction was expanded and fluctuant. The CT scan showed a 1 cm length high density object surrounded by a 2.5 x 2.5 x 2.5cm spherical low density area, which indicated a cystic lesion containing a foreign body. The multiple scattered small foreign bodies were also found in the lumen of the cyst. The domed bone absorption corresponding to the lesion was found at labial surface of the mandibular bone. There was a scar on the skin of chin, which had suffered a knife wound 60 years before. Since then, there had been no subjective symptoms except for the recent swelling. A tentative diagnosis of cyst containing fragments of knife was made. An enucleation of the cyst was performed. The cyst consisted of thick wall was completely encapsulated and contained mucinous, greenish brown fluid intermingled with cholesterol. The cyst contained foreign bodies, which were metal and were floating in the cyst fluid. Histological diagnosis was cystic foreign body granuloma with no epithelial lining.

Conclusion: A large cystic granuloma caused by metals in the soft tissue of the chin was identified 60 years after the occasion. Since the granuloma fully expanded, the treatment might be done just before the rupture.

A COMPARATIVE STUDY OF IMMUNOHISTOCHEMISTRY BETWEEN ODONTOGENIC KERATOCYST AND EPIDERMOID CYST

Koizumi Y¹, Kuyama K¹, Utsunomiya T¹, Okada H¹, Fukumoto M², Yamaguti Y³, Yamamoto H¹ Departments of Pathology¹ and Comprehensive Dentistry², Nihon University of Dentistry at Matsudo, and Department of Clinical Pathology³, Kashiwa Hospital, Jikei University, Chiba, Japan

Objective: The purpose of this study was to compare the immunohistochemistry between odontogenic keratocyst (OKC) and epidermal cyst (EDC), in order to understand their natures.

Materials and Methods: Fifteen cases of OKC were collected at the Department of Pathology, Nihon University at Matsudo, and twenty cases of EDC in the skin at the Department of Clinical Pathology, Kashiwa Hospital, Jikei University. Immunohistochemically, primary antibodies against the following antigens were used: Cytokeratin (CK) 7, 10/13, 17, 18, 19, 20, MNF116, HMW, MIB1, p53, bcl-2 and Bax. Dextran polymer method (Envision+ kit, DAKO A/S, CA) was used for antigen detection.

Results: Histopathological features: The epithelium of OKC was thin and parakeratotic. Daughter cyst and epithelial budding were sometimes present in the cyst wall. The epithelium of EDC was thickly hyperkeratinization associated with flatterings of the rete pegs and including much keratotic materials in it. Immunohistochemical findings: Positive staining for CK-19 was detected only in OKC. MIB1 and Bax were more often expressed in EDC than that in OKC. However, bcl-2 was positive in OKC than reactivity that of EDC. The p53 was almost equally expressed in both.

Conclusions: These results suggest that the epithelium of EDC was more undifferentiated than that of OKC, since CK-19 reaction. The cell proliferation and apoptosis were so frequent in EDC that a lot of keratotic materials were filled up in the cyst.

トンガ王国における学童のう蝕罹患状況と食生活の関連性について

Fifita Sisilia¹、久山 佳代¹、田口 千恵子²、河村 康二³、河村 サユリ³、清水 潤⁴、Tomiki Sililo⁵、
小林 清吾²、山本 浩嗣¹

¹日本大学 松戸歯学部 病理学講座、²日本大学 松戸歯学部 衛生学講座、³河村歯科医院、⁴東北大学
大学院 歯学研究科、⁵トンガ国立Vaiola病院

要約: トンガは、2000年我々が行った調査でもDMFT=3.4と高く、近年のう蝕有病率増加の要因として食文化の変遷や予防教育の遅れが考えられた。今回、トンガ王国の小学生のう蝕調査および生活習慣・食事調査を実施し、結果を本島と離島に分けて分析を行い、予防歯科保健プログラムを検討した。その結果、いずれにしても学校を中心とする地域社会を基盤とした予防歯科教育プログラムの立案と実践が必要であるが、本島と離島に分け、それぞれに対応した食生活をも含めた古き良き文化の継承と都市化への対応の必要性が示唆された。(索引用語: う蝕, トンガ, 食事調査)

目的:

南太平洋上に浮かぶトンガは、本島トンガタプ島と大小約170の島々からなる離島から構成され、かつてDMFT=1(WHO, 1986年)という非常に低い齲蝕有病率で知られる王国であり、齲蝕の伝播を妨げる要因として島国の伝統的食生活が指摘されてきた¹⁾。しかし、その後我々が行った調査によると、2000年の12歳児平均DMFTは3.4、WHOの分類によるとmoderate categoryに属していた。近年のトンガにおける齲蝕増加の要因として中野ら²⁾は、1960年代以降、本島で急速に進行した食生活の都市化を挙げ、さらにトンガにおいて予防歯科教育を行うには本島と離島とに分けて考える必要性を示唆した。また足ら³⁾は1976年からトンガで数回にわたる食事調査を実施し、本島と離島では食物群摂取状況に明らかな違いが存在することを述べ、同時に顎骨発育および歯科疾患への影響を指摘した。そこで我々はトンガ予防歯科保健プログラムを立案することを目的に、本島と離島それぞれでう蝕調査と食事および生活習慣調査を実施し、予防歯科プログラム立案の一助となるべき方向性と具体性を模索することとした。

方法:

本調査はトンガ王国内の異なった地域から文化レベルの近似した7つの国立小学校(本島:Tongatapu島6校、離島:Ha'apai島1校)に対し、本島は歯科医師5人、歯科衛生士6人で、Ha'apai島は歯科医師2人、歯科衛生士2人で行った。齲蝕検出は前回と同様の視診型で行った。探針は歯垢除去およびう窩の確認のみに用い、スティッキーフィッシャーの検出は行わなかった。基本的にはWHOの基準に従い、未処置歯にはC1~C4の分類を加えた。さらに食事および生活習慣調査は各学級担任が説明しながら学童に配布し、その場で記載させ、当日回収した。う蝕および食事調査がともに回収できたのは本島882名、Ha'apai島210名、いずれも回収率100%であった。集計はう蝕が12歳児について、食事調査は全対象者に対して行った。

結果および考察:

12歳の平均DMFTが本島4.85(男子4.40、女子5.81)、Ha'apai島2.60(男子1.83、女子3.75)、う蝕有病率が本島89.4%(男子88.9%、女子90.5%)、Ha'apai島70.0%(男子66.7%、女子75.0%)であった(表1)。本結果は本島とHa'apai島に差が今もなお存在することを示し、それぞれに対応した予防歯科保健プログラム実践の必要性を明らかにした。さらにう蝕の処置状況は未処置の者が多く、男子74.5%、女子84.0%であり、う蝕処置率は男子4.4%、女子1.5%であり、日本の数値と比較して非常に悪い状況であった。トンガ王国におけるマンパワーはコデンタルスタッフも含めればこれら未処置歯に対する歯科治療の遂行が可能な人数であるため、我々は今回、歯科検診後の治療勧告用紙の配布を試みた。しかしこの成果の程は現時点では次回の検診結果を待つほかない。

生活習慣調査の結果は、間食(就寝前含む)、小学校での菓子類の買い物、甘味飲料の常飲の質問項目では本島が、一方就寝前の歯磨き、歯磨剤の使用、フッ化物配合歯磨きの質問項目ではHa'apai島で「はい」の回答率が高かった。ここでみられた差異の要因の一つとして、調査校はHa'apai島唯一の国立小学校であり、週に1回歯科医師が訪問しブラッシング指導をしており、この予防歯科教育を通じて口腔衛生に対する意識の向上につながったものと考えた。食事調査の結果は、本島では主食がイモから穀類(パン)と菓子類を組み合わせた食習慣への移行を示していた。さらにこれら水分が少ない主食には砂糖入りの嗜好飲料が必要と思われた。副食としては緑黄色野菜、魚、果実などの摂取量が少なく、砂糖および甘味料が多かった。この食習慣は小学校での間食でも同様の傾向がみられた。一方Ha'apai島では足ら³⁾が指摘したカルシウム含有量の多い食物、すなわちイモ(タロイモ、キャッサバ、ヤム)、ココナッツ液汁、魚類などを用いた伝統的な食文化が現代でも継承されていた。さらに彼らが小遣いを使って買い求める小学校での間食の買い物でも、イモ・果実類により空腹を補っている傾向がみられ、家庭の味および習慣は本島と比較して少ないう蝕罹患状態を説明する一つの要因と推察された。またHa'apai島の子供たちは、嗜好飲料よりも水を食事と共に摂取することを好んでいた。Ha'apai島の主要な地域の水水道

フッ化物イオンは0.54ppmであり、本島の0.11~0.26ppmと比較して若干高く、さらに前述のフッ化物配合歯磨剤の高い使用率(85.8%)と合わせて齲蝕抑制に影響を与えているものと考えられた。

さらに全調査者から平均DMFTが0 (n=10)と10以上 (n=10)を有する学童の食生活を比較した結果、本島の7名のDMFT=0の子供たちは夕食には伝統的な食物を好み、さらに就寝前にも緑黄色野菜、牛乳あるいは果実のみを食していた。要するにう蝕のない学童は近代化の進んだ本島に在住していても、伝統的な食品を選択している傾向がみられた。う蝕がない要因の一つとして食生活が考えられるが、フッ化物配合歯磨剤の使用など他の要因との関連性も含めて、さらなる検討の余地を残した。

結論として、トンガ王国の小学生は齲蝕有病率が総じて高いが、本島と離島とでは明らかな違いがみられる。いずれにしても学校を中心とする地域社会を基盤とした予防歯科教育プログラムの立案と実践が必要であるが、本島と離島に分け、それぞれに対応した食生活をも含めた古き良き文化の継承と都市化への対応を考えていかなければならない。

文献：

- 1) Cutress TW et al. : Newzealand Dental Jpurnal., 75 : 94-106, 1988.
- 2) 中野廣一, 亀谷哲也 : 口腔衛生会誌 40 : 372-373, 1990.
- 3) 足立己幸, 山本妙子 : 日本歯科医師会誌 35 : 31-38, 1982.

表1 12歳児永久歯う蝕有病状況

	性別	人数	健全歯	DMFT	処置歯	未処置歯	喪失歯
日本	男	31	22.94	2.10	1.65	0.45	-
	女	33	23.30	2.76	1.88	0.88	-
トンガ 総計	男	51	22.27	4.10	0.18	3.88	0.12
	女	25	21.96	5.48	0.08	5.24	0.16
本島	男	45	21.91	4.40	0.18	4.20	0.11
	女	21	21.52	5.81	0.10	5.57	0.14
Ha'apai島	男	6	25.00	1.83	0.17	1.50	0.17
	女	4	24.25	3.75	0.00	3.50	0.25

表2 食物群^{*}別摂取状況(食品数,重複回答)

	本島(882人)				離島(210人)				
	朝・昼・夕食	間食(家庭)	間食(学校)	平均摂取食数 ^{**}	朝・昼・夕食	間食(家庭)	間食(学校)	平均摂取食数 ^{**}	
伝統的な食物	いも類	763	29	0	0.90	401	58	32	2.34
	ココナッツクリーム	763	14	0	0.88	401	58	32	2.34
	ココナッツ液汁	59	0	0	0.07	167	66	0	1.11
	緑黄色野菜	877	6	0	1.00	202	46	0	1.18
	果実類	59	50	2	0.13	282	96	73	2.15
	魚介類	50	4	0	0.06	187	0	0	0.89
	肉類	557	3	0	0.63	199	0	0	0.95
	水	159	54	0	0.24	175	40	20	1.12
	平均摂取食数 ^{**}	3.73	0.18	0.00	3.91	9.59	1.73	0.75	12.07
	近代的な食物	穀類	1769	369	23	2.46	153	49	20
砂糖及び甘味料		1912	1997	515	5.02	63	60	29	0.72
油脂類		2476	266	36	3.15	527	38	26	2.81
緑黄色野菜		877	6	0	1.00	202	46	0	1.18
豆類		30	0	0	0.03	0	0	0	0.00
魚介類		50	4	0	0.06	187	0	0	0.89
肉類		557	3	0	0.63	199	0	0	0.95
卵類		53	5	0	0.07	23	0	0	0.11
乳および乳製品		57	20	0	0.09	12	5	0	0.08
嗜好飲料		2149	355	73	2.92	241	12	20	1.30
スナック菓子	200	246	36	0.55	0	17	16	0.16	
平均摂取食数 ^{**}	11.49	3.71	0.77	15.97	7.65	1.08	0.53	9.26	

^{*}食物群は足立²⁾の分類に従った。

^{**}一人当たり一日平均摂取食品数

A CYTOLOGICAL STUDY OF MUCO-
SAL DYSPLASIA OF THE ORAL,
BRONCHUS AND CERVIX

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部
中央検査室²⁾, 千葉西総合病院³⁾, 船橋市立医療センター⁴⁾

○ Sisilia F. Fifta (DDS)¹⁾, 久山佳代 (DDS)¹⁾,
松本 敬 (CT)²⁾, 山本浩嗣 (DDS)¹⁾, 中平隆志 (CT)³⁾,
阿部 寛 (CT)³⁾, 大村光浩 (MD)³⁾, 高橋久雄 (CT)⁴⁾,
加藤 拓 (CT)⁴⁾, 上原敏敬 (MD)⁴⁾

[Objective] The study was aimed to determine the morphological features of dysplasia among oral, bronchus and cervix by cytomorphometry, in an attempt to establish a better morphological definition, and more valid morphological criteria of dysplasia in oral mucosa.

[Method] Computer cytomorphometry was applied to Papanicolaou stained smears collected from oral and cervix, which were histologically diagnosed categorizing from mild (6 cases), moderate (6) to severe dysplasia (4). Bronchial sputum smears without histological explanations, ranged from mild (5 cases), moderate (5) to severe dysplasia (2), were categorized depending on the Japanese classification. In each category, an average of over 50 accurate selected atypical cells traced and analyzed.

[Result] The mean nuclear and cytoplasmic area (NA) (CA) and diameter (ND) (CD) values showed a marked variability among regions, with a clear variability between categories. The reduction in mean NA and ND values among regions as it progressed from mild to moderate category, prior to an increase to severe category, strongly correlated with a decrease in CA and CD values as it progressed to severe category. The mean N/C ratio values showed a similar significant increase as it progressed to severe category among regions with greatest differences observed in oral and cervix: oral (0.10–0.34 μm), cervix (0.14–0.41 μm), and bronchus (0.19–0.24 μm). Oral and cervical CA and CD values were higher than the bronchial values. No significant differences were found between mean nuclear and cytoplasm irregularity values among regions.

[Conclusion] Good correlations among regions and between categories were observed in this study. Further work will be carried out on chromatin pattern, cytoplasmic colour, and the smear background to affirm morphological criterias in the oral mucosa.

Pseudosarcoma associated with SCC : a case report

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部中央検査室²⁾, 株式会社サンリツ³⁾

○Sisilia F. Fifita (DDS)¹⁾, 久山佳代 (DDS)¹⁾, 松本 敬 (CT)²⁾, 森川美雪 (MT)¹⁾, 中平隆志 (CT)³⁾, 山本浩嗣 (DDS)¹⁾

【はじめに】 Pseudosarcoma associated with S.C.C. is a rare oral neoplasm characterized by a combination of malignant epithelial and mesenchymal cells. We report a case of pseudosarcoma associated with SCC of the oral cavity.

【症例】 On July 2002, a 59-yr-old man presented with a 2 cm diameter grayish brown polypoid mass, arising from the base of the tongue and surrounded by whitish mucosa. Exfoliative cytology was done and diagnosed Class 3. The patient underwent tumor resection and diagnosed pseudosarcoma associated with SCC.

【細胞所見】 Cytologically, the Papanicolaou stained smears contained atypical squamous cells : increased N/C ratio and chromatin with bright orange cytoplasm. Less frequent were spindle shaped cells with sarcomatous features. Multinucleated giant and inflammatory cells were scattered in the necrotic background.

【組織所見】 Histologically, the tumor showed carcinomatous and sarcomatous element. The polypoid mass revealed bizarre giant and interlacing spindle cells. The epithelium showed SCC with invasion of pseudo-duct like epithelial nests and keratin pearl in the two components. Atypical mitotic figures were noted. Immunohistochemically, the epithelial cells were positive for keratin and EMA, and the sarcomatous region was reactive for vimentin. The positive rates of carcinomatous portion and sarcomatous portion were 40%, and 60%, respectively.

【まとめ】 Based on these findings, two separate populations of tumor cells were corresponded to the histological growth pattern. The cytological characteristics did not reveal prominent malignant features.

A comparison between cytomorphological and ultrastructural findings of granular cell tumors

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 日本大学松戸歯科部中央検査室²⁾, 船橋市立医療センター³⁾

○Fifita Sisilia(DDS)¹⁾, 久山佳代(DDS)¹⁾,
森川美雪(MT)¹⁾, 松本 敬(CT)²⁾, 加藤 拓(CT)³⁾,
上原敏敬(MD)³⁾, 山本浩嗣(DDS)¹⁾

OBJECTIVE : The purpose of this study is to compare the cytological features among three cases of granular cell cytoplasms. Granular cells can be detected in both odontogenic and non-odontogenic tumors, such as ameloblastoma and granular cell tumor and usually result from degenerative changes.

STUDY DESIGN : Three cases had common granular cytoplasms are described. The diagnosis was made on a fine needle aspiration and the cytological (Papanicolaou staining) and ultrastructural features (electron microscopy) among them were compared.

RESULTS : Case one was a granular cell type ameloblastoma occurred in the posterior mandible of a 22-year-old male. He revisited our hospital for further evaluation of his painful progressive swelling. The cytological findings revealed clusters of cuboidal, columnar and rounded cells with eccentric nuclei and granular cytoplasms. The tumor was resected under general anesthesia. Case two was a left breast granular cell tumor occurred in a 35-year-old female. The cytological findings revealed round to oval uniform non-atypical stromal like cells with eccentric nuclei and fine dense granular cytoplasms with unclear borders. Case three was a left parotid gland granular cell tumor occurred in a 65-year-old female. The cytological findings were similar to case two.

CONCLUSION : Detection of these tumors initiates a search for the similarities and differences of their ultrastructural features. Using the electron microscopy, we will find out the cytoplasmic granular patterns, density and contents.

A flow cytometric analysis of oral mucosal lesions: with special reference to pathological findings

日本大学松戸歯学部病理学講座

Sisilia Fifita, 久山 佳代, 山本 浩嗣

【Objective】 Histology remains the best to assess oral mucosal lesions. Though several techniques are used to study the dysplasia of oral mucosal lesions, only a few method using smears to assess the risk for cancer have been performed. Therefore, an assessment by flow cytometry (FCM) to determine the DNA aneuploidy. **【Method】** Non-specific inflammation (n=10), leukoplakia (n=10) and OSCC (n=10) cases were analyzed by FCM. Cell cycle and DNA aneuoloidy analyses were performed using DNA Reagent Kit. DNA was analyzed by CellQuest software. The DNA aneuploidy, % of cells in G2-M and DNA (D.I.) and proliferative indices (P.I.) were measured. **【Results and Discussion】** The aneuploidies of inflammation, leukoplakia and OSCC were 0.15, 0.37 and 0.58, respectively. As for proportion of G2-M of aneuploidy cells, the same tendency was shown. D.I. and P.I. of malignancy were different among these lesions. In this study, leukoplakia was close to P.I. and D.I. of OSCC, should be considered. FCM analysis is an useful screening method.

A Study of Lipid Staining on Oral Mucosal Lesions : 2nd Reports

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 同 検査室²⁾, サンリツ株式会社³⁾

○FiftaSisilia (DDS)¹⁾, 久山佳代 (DDS)¹⁾, 松本 敬 (CT)²⁾, 中平隆志 (CT)³⁾, 山本浩嗣 (DDS)¹⁾

【Introduction】 Lipid staining has been shown to be effective in sputum cytology and has been reported to use as a submethod in detecting lung cancer. We report the evidence of lipid droplets stained with Oil-Red-O on oral mucosal lesions using exfoliative cytology and determine the origin of these droplets.

【Method】 The study consisted of 200 cases which included SCC (n=40), leukoplakia (n=32), lichen planus (n=30), inflammatory (n=40), ulcer (n=30) and normal (n=28), collected from Nihon University School of Dentistry hospital at Matsudo. Two smears were taken for each case, one for Oil-Red-O and one for Papinicolaou staining. Frozen sections were obtained from SCC (n=10) and dysplastic lesions (n=10). We followed the 'Nakahara's criteria' for lipid assessment of the lungs : no staining—no positive cells, scattered positive cells : +, many scattered positive cells : ++.

【Results & Conclusion】 The oral mucosal lesions showed distinctive features of lipid droplets between SCC and other mucosal lesions in terms of the density, largeness, granularity and fineness of the lipid droplets found in the cytoplasm. Lipid droplets have been shown to accumulate more in SCC smears and keratin pearl of frozen sections. Lipid droplets were also scattered in the background of SCC and inflammatory lesions. The presence of lipid droplets has been frequently described in a variety of pathological conditions. This staining may also be effective as a submethod for detecting lipid droplets on oral mucosal lesions. Their presence and origin are discussed. This study was partly supported by "A Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology to promote multi-disciplinary research projects (2000)".

食事の介護負担に関する調査

○仁平 暢子¹⁾・野本 たかと¹⁾・有川 量崇²⁾
林 佐智代¹⁾・三橋 聡¹⁾・竹蓋 道子³⁾
小林 清吾²⁾・妻鹿 純一¹⁾

¹⁾ 日本大学松戸歯学部障害者歯科学講座

²⁾ 日本大学松戸歯学部衛生学講座

³⁾ 日本大学松戸歯学部附属歯科病院歯科衛生士

緒言

摂食・嚥下指導を行っていくうえで、保護者・介護者が日常行う食事介助や機能訓練を果たす割合は大きい。長期的な指導を行ううえで、食事介助する者の負担の軽減を図っていくことは摂食・嚥下指導の一つの課題である。現在、介護負担に関する研究は欧米を中心に高齢者を対象としているものが多い、しかし、発達障害児・者を対象とした介護負担に関する調査は少ない。今回、発達障害児・者を持つ保護者・介護者に対して、食事時の介護負担をどの程度感じているのかを知るために調査を行った。

対象と方法

平成13年10月～平成14年6月に日本大学松戸歯学部附属歯科病院特殊診療科、摂食・嚥下リハビリテーション外来を受診した発達障害児・者の保護者・介護者を対象として調査を行った。

調査方法には、要介護高齢者の介護負担評価法である「Zarit 介護負担尺度日本語版」を参考に、身体的・心理的・時間的負担を考慮して、独自に作成した食事に関する10項目5段階評価の調査表、および対象者のQOL調査のためにWHO-QOL26を使用した。

結果

食事に関する調査では、「食事の介助を負担と感じる」、「食事時にイライラする(憂鬱になる)」、「食事の仕方が本当に上手になるか不安に思う」という質問項目に高い値が認められ、これらの点について負担を感じる保護者・介護者が多く認められた。

一方「食事の介護量が増えたか」、「食事介助にこれ以上時間をさけないか」という項目では、値が低く、あまり負担と感じていない傾向がみられた。

なお、本調査対象者のQOLの平均値は3.27(例数追加し検討中)であった。

考察

今回の調査結果から、調査対象者のQOLは、田崎らが一般住民を対象に調査したQOL平均値(3.29)と近似しており、予想よりも高い値を示している。しかしながら、食事の介助を負担に感じたり、イライラする(憂鬱になる)などの介護負担を感じている者が多くみられた。

保護者・介護者にかかる負担は食事の調理や介助量などの身体的なものからではなく、心理的側面からの負担を感じているのではないかと推察された。摂食・嚥下指導において保護者・介護者が感じる介護負担に配慮しながら訓練・指導を行っていく事の重要性が示唆された。

結論

食事の介助を負担と感じている割合が高い結果が得られた。その負担は心理的なものからの由来であることがうかがえた。

文献

- 1) 荒井由美子, 杉浦ミドリ, 工藤啓: 要介護高齢者の介護負担評価法の紹介, 公衆衛生, 65: 134-135, 2001
- 2) 田崎美弥子, 中根充文: 介護休業制度を利用して働く女性のQOL, 日社精医誌, 6, 171-184, 1998
- 3) R.J.V.Montgomery, J.G.Gonyea: Caregiving and the Experience of Subjective and Objective Burden, Family Relations, 1985, 34, 19-26

歯垢中の *S. sobrinus* の存否, *S. mutans* のレベル及びイオン希釈法による唾液の緩衝能とう蝕リスクとの関連性

後藤田 宏也¹、水野 恭子¹、田口 千恵子¹、鈴木 瑠美¹、有川 量崇¹、竹内 武男²、篠崎 紀子²、井田 博久³、福島 和雄²、小林 清吾¹

¹日本大学 松戸歯学部 衛生学教室、²日本大学 松戸歯学部 細菌学教室、³ビー・エム・エル

要約： 口腔内でのイオン希釈法を応用した新しい緩衝能測定法を検討するための予備研究として、口腔外の *in vitro* で安静時唾液の緩衝能の測定を行い、唾液緩衝能および歯垢中の *S. sobrinus* の存否, *S. mutans* のレベルとう蝕リスクとの関係について検討した。唾液が低緩衝能で、歯垢中に *S. sobrinus* が存在し、*S. mutans* が高レベルで検出されるという条件が、う蝕リスクの大きな要因となることが認められた。これらの結果から高う蝕リスク者には、歯の攻撃因子(酸産生菌)の除去および防御因子(唾液緩衝能・唾液流量)の把握と改善、フッ化物の応用による歯質の強化の必要性が示唆された。(索引用語：唾液緩衝能、イオン希釈法、ミュータンスレンサ球菌)

目的：

う蝕の発生には、歯の攻撃因子(酸産生菌、ショ糖)と防御因子(唾液流出量、唾液緩衝能、フッ化物)のバランスが深く関与しており、それぞれの因子を調べる検査を組み合わせることで、よりの確にう蝕活動を把握できると考えられる¹⁾。イオン希釈法を利用した新しい緩衝能測定法を試みた。その方法は洗口による吐き出し液を酸で滴定し、滴定曲線を作成後、洗口液中のフッ化物イオンが希釈される割合から算出した唾液量^{2) 3)}により補正した pH を緩衝能値とするものである。また現在う蝕活動性試験は、唾液をサンプルとするものが多く、歯垢を対象とした *S. sobrinus* と *S. mutans* の区別が可能な簡易キットは実現されていない。本研究は、イオン希釈法をう蝕活動性試験(唾液流量、唾液緩衝能テスト)としての臨床への応用性を検討し、分析対象を歯垢とした *S. sobrinus* の存否および *S. mutans* レベルを簡便、迅速に判定可能なう蝕診断キットの開発と実用化を目的として行った。

今回、口腔内でのイオン希釈法を応用した新しい緩衝能測定法を検討するための予備的研究として、口腔外の *in vitro* におけるイオン希釈法による安静時唾液の緩衝能の測定を行い、防御因子である唾液緩衝能および歯垢中の攻撃因子である *S. sobrinus* の存否, *S. mutans* レベルとう蝕リスクとの関係について報告する。

対象と方法：

1. 対象者およびう蝕有病状況の把握

日本大学松戸歯学部学生の128名(男性72名、女性56名)を対象に、十分な照明下でミラーと探針を用いて口腔内診査を行い、個人単位のDMFTを求めた。

2. 唾液の採取方法および緩衝能の測定法

被験者(n=112)から安静唾液を採取後、安静唾液1mlと脱イオン蒸留水をpH7、フッ化物イオンとして10ppmの濃度に調整したNaF溶液5mlを混和後、0.01N塩酸をマイクロピペットで0.1mlずつ添加、pH電極を用いてpHを測定し、1mlまでの滴定曲線を作成した。塩酸1ml滴定時のpH値をもって緩衝能値とし、高緩衝能(pH5.0以上)、中緩衝能(pH5.0～pH4.0)、低緩衝能(pH4.0未満)と分類した。

3. 歯垢試料の採取方法および細菌種の同定・細菌数の算定方法

被験者(n=128)から1分間のブラッシング処理後にPBS 5mlにて含漱することにより回収した歯垢懸濁液を採取し、供試歯垢サンプルとした。歯垢サンプル希釈液をスパイラル装置を用いてMS培地(総レンサ球菌数算定用)、ビー・エム・エル社製のMSB改良培地(*S. mutans*と*S. sobrinus*の検出・菌数算定用)に塗抹し、37℃下で2～3日間嫌気培養後、総レンサ球菌数の算定と*S. mutans*と*S. sobrinus*の検出・菌数算定を行った。ミュータンスレンサ球菌種の判別は主として実体顕微鏡下の集落形態を指標に行い、判別困難な集落に関してはガラス壁固着性、デキストラン凝集性、ELISA等の各種同定試験を通して算定処理を行った。

差の検定はt-testで行った。

結果および考察：

全被験者のDMFTの平均は7.29±5.59(以下mean±SD)であった。

高緩衝能群(n=36)、中緩衝能群(n=32)および低緩衝能群(n=44)の平均DMFTはそれぞれ、4.89±4.86、7.44±5.21、9.16±5.85であった。高緩衝能群と低緩衝能群間に有意差を認めた(p<0.001)(図1)。

総レンサ球菌数9.40±11.38(10⁶CFU/ml)、総*S. mutans*菌数2.65±7.94(10⁶CFU/ml)で検出率は95%(121名/128名)、総*S. sobrinus*菌数1.89±11.02(10⁶CFU/ml)で検出率は20%(26名/128名)であった。*S. sobrinus*の検出群(n=26)と*S. sobrinus*の非検出群((n=102)間での平均DMFTはそれぞれ、10.12±5.29、6.57±5.45で有意差を認めた(p<0.01)(図2)。

総レンサ球菌に占める*S. mutans*の割合が1%未満の群、1%以上の群、*S. sobrinus*の検出群(+)、非検出群(-)に分類した。*S. mutans*(1%以上)かつ*S. sobrinus*(+)の群(n=12)、*S. mutans*(1%未満)かつ*S. sobrinus*(+)の群(n=14)、*S. mutans*(1%以上)かつ*S. sobrinus*(-)の群(n=45)、*S. mutans*(1%未満)かつ*S. sobrinus*(-)の群(n=57)の平均DMFTはそれぞれ13.17±3.19、7.50±5.42、8.56±6.15、5.00±4.27であった。

総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合が1%以上かつ *S. sobrinus* が検出され低緩衝能に分類される群 (n=7)、総レンサ球菌に占める *S. mutans* の割合が1%未満かつ *S. sobrinus* が検出されない高緩衝能に分類される群 (n=17) のDMFTの平均はそれぞれ 12.43 ± 3.15 , 3.65 ± 3.89 で、2群間に有意差を認めた ($p < 0.001$) (図3)。

これらの結果から唾液が低緩衝能で、歯垢中の *S. sobrinus* が存在し、*S. mutans* が高レベルで検出されるという条件が、高う蝕リスクの大きな要因となることが認められた。高う蝕リスク者には、歯の攻撃因子(酸産生菌)の除去および防御因子(唾液緩衝能・唾液流量)の把握と改善、フッ化物の応用による歯質の強化の必要性が示唆された。

口腔内での洗口時のイオン希釈メカニズムを再現し、比較・対照するために、in vitroにおいてイオン希釈法による安静時唾液の緩衝能の測定を実施した。緩衝能の低い群は、DMFTが高値を示し、う蝕罹患状態との関連性が認められた。現在、その結果をもとに口腔内での洗口によるイオン希釈による緩衝能測定法との一致性を、成人および高齢者を対象に実施し、口腔内との臨床所見との相関性を分析している。この方法は吐出法や咀嚼法では困難な口腔内残留唾液、安静時唾液および唾液分泌が少ない高齢者の唾液の緩衝能測定、洗口時間5秒程度で唾液の採取可能なため被験者には負担が軽い等の有用性が高いと予想される。さらにイオン希釈法を緩衝能テスト(スクリーニングテスト)への応用、歯垢を対象とした高う蝕リスク者の迅速検出システム(歯垢中の *S. sobrinus* の存否および *S. mutans*, レベルを簡便、迅速に判定可能なチェアサイドのう蝕診断キットの開発と実用化)を検討中である。

本研究の一部はベンチャー研究開発拠点整備事業および平成13年度学術フロンティア推進事業により行った。

文献:

- 1) 下野 勉, 他: Quintessence Journal of Dental Auxiliary, 9(3):57-70, 1985
- 2) Weatherell, J. A., et al.: Caries Res., 26, 94-97, 1992.
- 3) 後藤田宏也, 他: 口腔衛生学会誌, 50, 676-677, 2000

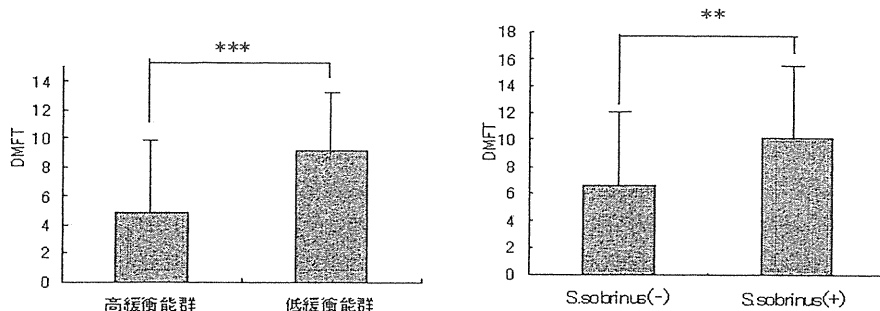


図1 唾液緩衝能とDMFTの関係

図2 歯垢中の*S. sobrinus*の存否とDMFTの関係

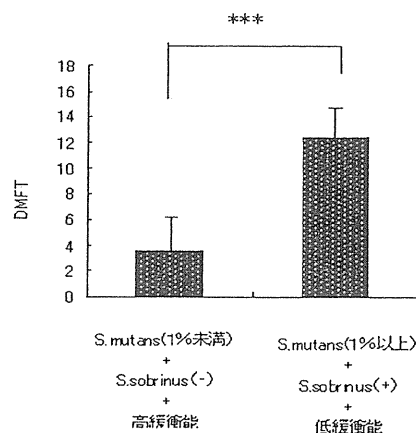


図3 唾液緩衝能と歯垢における*S. sobrinus*の存否・*S. mutans*のレベルとDMFTの関係

; $p < 0.01$, *; $p < 0.001$

唾液中のミュータンスレンサ球菌レベルとう蝕有病との相関—改良型MSB培地の応用—

○水野 恭子^{1,2}、後藤田 宏也¹、竹内 武夫²、
吉尾 雅子²、斉藤 美芽子²、井田 博久³、
福島 和雄²、小林 清吾¹ (¹ 日本大学松戸歯
学部 衛生学教室、² 日本大学 松戸歯学部
細菌学教室、³ ビー・エム・エル)

【目的】ミュータンスレンサ球菌 (MS) の算定・検出用に多用されているMSB培地の欠点 (選択性不良) を改善した改良型MSB培地がビーエムエル社により開発され、その有用性が報告されている。本研究では、改良培地と従来培地を用いて、唾液中 *S.mutans* (*Sm*) と *S.sobrinus* (*Ss*) レベルとう蝕有病との相関性を評価することを目的とした。

【方法】学部学生256名を対象とし、DMFTは数を査定後、パラフィン刺激唾液を採取し、凍結保存した。37℃融解唾液試料の冷BHI希釈液を改良培地 (ビーエムエル社より供与) と従来培地にスパイラル装置にて塗抹し、48時間嫌気培養後、実体顕微鏡下で *Sm*、*Ss* 及び非MS菌の生菌数を集落形態の違いを指標に算定した。

【結果及び考察】改良型培地における *Sm* と *Ss* の検出者率と平均検出菌数 (logCFU/ml) は従来型培地より若干ながら勝った。一方非MS菌の検出菌数は改良培地で半減した。改良培地において、*Ss* 保有者群と非保有者群の平均DMFT±SDは10.15±5.21, 7.13±5.46で群間に有意な差が認められた (t検定: $p < 0.001$)。また、*Sm* 保有者において、MS比 (*Sm*/総レンサ球菌) 1%以上群と0.1%未満群の平均DMFT±SDは9.83±5.61, 6.56±5.21で両群間に有意な差を示した ($p < 0.01$)。以上、改良培地の選択性の向上、及び特定菌とう蝕有病との相関性を把握できた。

某大学附属歯科病院特殊診療科の臨床統計学的検討

○遠藤真美¹⁾・有川量崇²⁾・妻鹿純一³⁾・
伊藤政之³⁾・野本たかと³⁾・梅澤幸司³⁾・
林佐智代³⁾・田中陽子³⁾・仁平暢子³⁾・
林龍介³⁾・御田寺優子³⁾・三橋聡²⁾・
竹蓋道子⁴⁾・石崎秀子⁴⁾・小林清吾²⁾

¹⁾ 日本大学大学院松戸歯学研究科(障害者歯科学専攻)

²⁾ 日本大学松戸歯学部障害者歯科学講座

³⁾ 日本大学松戸歯学部衛生学講座

⁴⁾ 日本大学松戸歯学部附属歯科病院

緒言

日本大学松戸歯学部附属歯科病院特殊診療科は1976年に開設以来、地域における障害者歯科診療を担ってきた。高齢化などに伴い、今後、当科が果たすべき役割を明らかにする一環として、本調査を行い、以前の報告と比較検討を行ったので報告する。

対象と方法

平成13年4月1日から翌年3月31日までに当科受診患者932名のうち、往診患者を除いた826名を対象とし、年齢、性別、当科への照会先、受診年数、障害の分類、移動における介助の必要性、服用薬の有無、治療内容、歯科衛生士による予防管理の有無、行動調整の方法の各項目を調査した。障害の分類は、WHOのICD10に準じた。

結果

対象者は男性61%、21歳以上が65%を占め、車通院62%、移動介助無しが50%であった。照会有りが81%(歯科医院33%、医院・病院18%、施設・作業所12%、学校13%、行政4%、患者からの照会が14%)を占めていた。障害の分類に従って延べ患者数を比較すると、精神疾患(うち精神遅滞が74%)、神経・筋の疾患(うち挿間性および発作性障害が50%、末梢神経疾患が40%)、新生児疾患・先天奇形の順であった。投薬有りは45%であ

った。受診年数は5年以内が46%であった。定期検診受診患者の通院年数は、5年以内が31%、6-10年19%、11-20年26%、21年以上24%と長期にわたる定期的リコール患者が多かった。歯科衛生士による予防管理は13%であった。摂食指導の受診者は7%であった。薬物による行動調整の割合については、全身麻酔下3%、鎮静法下1%であった。

考察

伊藤ら¹⁾の調査において10歳以下が60.7%に対し、15年後の今回は13%で、21歳以上の割合が高かった。これは、社会の高齢化に加えて障害者歯科の対象者が発達障害児のみではなく中途障害者、高齢による機能減退者および精神障害者などと受診者の範囲が拡大したためと考えられる。

当科では照会率が81%であり、患者は全身の疾患を有しているため、他の専門機関との連携をふまえ、病院内での医療体制を整備する必要性が高いと考えられた。

また、全身管理下での治療が他の報告²⁾より極めて少なかった。全身管理下での治療方法の決定は、患者側と診療者側の要因が影響し、変化しうるものであるが、これらの要因との関連性については今後の課題としたい。

結論

以前の報告と比較して、幾つかの相違が認められ、今後、障害者歯科医療において当科が果たすべき役割や整備すべき機能の一端を推察することが出来た。

文献

- 1) 伊藤政之, 上原進, 他: 障害者歯科に関わる受療圏に関する調査-松戸を中心とした通院環境からみて-. 障歯誌 12:187-191,1991
- 2) 伊藤政之, 野本たかと, 他: 障害者歯科における受領圏に関わる調査(2)-とくに、通院距離を中心として-. 障歯誌 19: 360-372, 1993
- 3) 米津卓郎, 田中丸宣, 他: 東京歯科小児歯科における障害児歯科治療の実態. 歯科学報 96(5): 389-387,1996

顎骨骨髓炎に有効な MRI の T2 強調像の検討

○山城 光明, 李 光純, 森 進太郎
本橋 淳子, 大迫 美穂, 金田 隆
南 学*, 岡田 裕之**, 山本 浩嗣**
(日大・松戸歯・放, *東大・医・放,
**日大・松戸歯・病理)

MRI の T2 強調像は病変の範囲や性状の把握に有効であり, T1 強調像とともに顎骨骨髓炎の MRI 検査には欠かせないシーケンスであるが, 従来から用いられている SE 法の T2 強調像には撮像時間が長いという短所がある。そこで最近では撮像時間を短縮させた高速 SE 法 (以下 FSE 法とする) が開発され施行されることが多くなってきたが, FSE 法にも脂肪が強調されるという短所があり病変の診査が困難なことがある。そこで今回我々は T2 強調像について, FSE 法に STIR 法による脂肪抑制を加えたシーケンス (以下 STIR 法とする) により顎骨骨髓炎の診査を施行し, SE 法または FSE 法との比較検討を行ったので報告する。

対象および方法: 対象は本学付属歯科病院を受診し, 顎骨骨髓炎と診断され, MRI 検査が施行された 6 症例 (男性 2 人, 女性 4 人) であり, 年齢は 24~63 歳の平均 40.0 歳であった。使用した MRI 装置は 0.5 T の超伝導型磁石装置 (FLEXART, 東芝メディカル社) であり, 撮像法は T2 強調像として STIR 法 (TR/TE=6000/120, TI=100 msec) を施行し, また比較として SE 法 (TR/TE=3000/120 msec) または FSE 法 (TR/TE=4000/120 msec) を施行した。画像評価は二名の歯科放射線科医 (日本歯科放射線学会認定医) の合議の上で判定し, STIR 法と SE 法または FSE 法の病変部の描出について比較検討した。

結果: STIR 法は SE 法や FSE 法と比べて顎骨骨髓の病変部の描出が明瞭であった。また周囲軟組織への炎症の波及の描出も明瞭であった。しかしながら, FSE 法は顎骨骨髓の病変部の描出が困難であった。

結論: 顎骨骨髓炎に有効な T2 強調像は STIR 法のような脂肪抑制を加えたシーケンスが必修であると考えられた。また脂肪抑制をしない通常の FSE 法による T2 強調像は顎骨骨髓炎の診査には不適であると考えられた。

開口障害を主訴として来院した上咽頭腫瘍の一例

○神野 和子, 山城 光明, 大迫 美穂

李 光 純, 森進 太郎, 金 田 隆

(日大・松戸歯・放)

上咽頭癌は発生頻度の低い疾患ではあるが、その解剖学的位置関係から、固有の症状に乏しく早期発見が困難で、予後不良の疾患と言われている。今回我々は、開口障害を主訴として耳鼻咽喉科より紹介来院した、上咽頭腫瘍の一例について報告する。

症例：患者、31歳、男性。平成12年9月より左側耳前部の疼痛を認め、11月に某大学病院耳鼻咽喉科を受診、滲出性中耳炎の診断の基に治療を受けていたが、症状は軽減せず開口障害も発現したため、平成13年1月、顎関節症の疑いで本学付属歯科病院口腔外科に紹介来院した。主訴は開口障害で、開口時に下顎の右側への偏位がみられた。単純エックス線写真において骨の異常はみられず、症状の変化もないために、エックス線CT撮影およびMRI撮影を行った。

画像所見上、顎関節部に異常は認められなかったが、エックス線CT画像において、上咽頭部の左右非対称および左側蝶形骨翼状突起内側板の消失など上咽頭部に腫瘍を疑う所見を認めたため、MRI体軸横断像の追加撮影(STIR法)を行った。MRI画像所見として、上咽頭左側壁よりParapharyngeal space, Carotid spaceに直径4.0×3.0cmの境界不明瞭なmass lesionがみられ、左側耳管開口部付近より中耳にかかる信号の上昇と、左側頭長筋への浸潤がみられた。左側ルビエールリンパに直径1.5×1.0cmの腫脹がみられた。

以上所見より、上咽頭悪性腫瘍を疑い、国立がんセンター東病院へ紹介した。

上咽頭癌の初発症状として、多種の症状があるが、ガンセンター受診時も開口障害以外の臨床症状はみられなかった。

MRI撮影および病理組織検査の結果、最終的に上咽頭未分化型扁平上皮癌 Stage IIIと診断された。

今回の症例は、滲出性中耳炎を治療中の耳鼻咽喉科から、顎関節症を疑って紹介されたものであった。

滲出性中耳炎は、上咽頭腫瘍患者の25%に合併するといわれているが、顎関節症との鑑別となりうる三叉神経領域の知覚異常などもなく、また、開口障害以外の症状がなかったことから、確定診断まで長い経過を辿ってしまったと考えられる。患者の主訴である開口障害は、MRI画像所見より、上咽頭腫瘍によるmasticator spac特に外側翼突筋へ進展により引き起こされたものと思われる。

この症例において、顎関節症と咽頭部腫瘍との鑑別診断には、MRIが非常に有効であった。また、顎関節症の診断でのMRI撮影時に、骨髄および関節円板に異常が見られない場合には、咽頭部周囲の腫瘍を疑い体軸横断像を追加撮影する必要性があることが示唆された。

MR Imaging of Palatal Lesions

Mori, S¹; Lee, K¹; Motohashi, J¹; Kaneda, T¹; Minami, M¹; Curtin, HD¹; Yamamoto, H²

¹Dept. of Radiology, Japan; ²Dept. of Pathology, Japan

Aim: To evaluate MR imaging of palatal lesions compared with other radiological modalities.

Methods: We evaluated the MR studies of 23 patients with histopathologically validated palatal lesions. Palatal lesions included 17 tumors, 2 cysts, 1 hematoma and 3 inflammations. All lesions were examined with T1- and T2-weighted MR imaging. Radiological examinations included plain radiography, panoramic radiography and CT.

Results: All tumors had low-to-intermediate T1-weighted signal intensities and intermediate-to-high T2-weighted signal intensities. Malignant tumors had an irregular margin in all but one case. Benign tumors invariably had well-defined margins. CT showed masses of soft tissue density in all cases. All cysts had well-defined low-to-intermediate T1-weighted signal intensities and high T2-weighted signal intensities. Inflammation had ill-defined margins. In terms of tumor margination, the MR imaging findings correlated well with the histopathologic findings.

Conclusions: MR imaging is useful in delineating the extent of lesion and differentiating tumors and other lesions in the palate.

マルチ周波数処理 Computed radiography によるパノラマ X 線写真の評価

本橋淳子, 森進太郎, 李 光純, 大迫美穂, 山城光明, 金田 隆
(日大・松戸歯・放)

Assessment of pantomography using computed radiography with multi-objective frequency processing

Motohashi J, Mori S, Lee G, Ohsako M, Yamashiro M, Kaneda T

(Department of Radiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

目的：従来からのパノラマ X 線撮影法は増感紙を用いた銀塩フィルムを撮影・評価するものであり、管電圧、管電流等の撮影条件や現像処理に大きく画像が影響されることが臨床にて多々見られた。近年、コンピュータの発達によりフィルムを用いないイメージングプレートによるデジタル X 線写真が臨床にて用いられるようになってきたが、マルチ周波数処理を施した Computed Radiography (CR) によるパノラマ X 線写真の検討はいまだ見られない。

本研究の目的はマルチ周波数処理を施した CR のパノラマ X 線写真を用いて病変の評価を行い、その有効性を検討した。

対象および方法：対象は日本大学松戸歯学部附属歯科病院を受診し、病変を有する 5 名の患者のパノラマ X 線写真および 5 名の正常パノラマ X 線写真を用いた。同患者の病変をマルチ周波数の高周波、低周波およびその中間周波数で処理した画像にて病変の検出能および性状を評価した。

評価方法は 3 人の歯科放射線医にて病変の検出および性状について clear (+), moderate (±), unclear (-) の 3 段階評価した。

使用装置：使用した装置は日本大学松戸歯学部附属歯科病院の Fuji computed radiography の Fuji FCR3500 を使用した。

結果：顎骨内の病変の検出能や性状は高周波のほうが優れていた。一方、上顎洞内や軟組織の抽出には低周波が優れていた。周波数処理による CR により病変の抽出はアナログ表示にくらべてより鮮明な画像を抽出することが可能と示唆された。

マルチ周波数処理 Computed Radiography による頭部エックス線規格写真の評価

大迫美穂, 本橋淳子, 森進太郎, 李 光純, 山城光明, 金田 隆
(日大・松戸歯・放)

Assessment of cephalogram using computed radiography with multi-objective frequency processing

Ohsako M, Motohashi J, Mori S, Lee G, Yamashiro M, Kaneda T

(Department of Radiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

<目的> 頭部エックス線規格撮影法は、従来から増感紙を用いた銀塩フィルムを撮影、評価するものであり、管電圧、管電流などの撮影条件、増感紙や現像処理等に大きく像が影響されることが臨床にて多く見られた。とくに歯科矯正の臨床においては、各計測点の評価を通常の単純エックス線写真で行う際に、これら撮影条件に画像が大きく左右されることが多く、臨床にて使用が困難なのが現状である。近年、コンピュータの発達により、イメージングプレートによる CR (Computed Radiography) が臨床にて用いられるようになってきたが、マルチ周波数処理を施した CR による頭部エックス線規格写真の検討はいまだ見られない。本研究の目的はマルチ周波数処理を施した CR を用いて、頭部エックス線規格写真の各計測点の評価を施行し、マルチ周波数処理の有効性を検討することである。

<対象および方法> 1. 対象は日本大学松戸歯学部附属歯科病院の矯正科を受診した 30 人のマルチ周波数処理を施した頭部エックス線規格写真を用いた。マルチ周波数処理を高周波、低周波、およびその中間周波数の 3 段階表示し、N (ナジオン), ANS (前鼻棘), A 点, Pr (プロスチオン), B 点の 5 点の各計測点について複数の歯科放射線科医および矯正専門医にて評価した。2. CR にて撮影された頭部エックス線規格写真を上記の 5 点 (N, ANS, A 点, Pr, B 点) について各々周波数処理を施行した画像を評価した。なお、評価方法は複数の観察者にて計測点を clear (+), moderate (±), unclear (-) の 3 段階にて評価し、有効なマルチ周波数処理を検討した。

<使用装置> 使用した装置は日本大学松戸歯学部附属歯科病院の Fuji Computed Radiography (FCR 3500) の CR 装置を使用した。

<結果及び考察> マルチ周波数は低周波にくらべ、高周波の方が 5 点の評価で高い評価を得た。一方、鼻骨や顔面軟組織の側面の描出には低周波の方が優位であった。各計測点において、高周波処理の CR 画像が低周波に比べ評価が高かった。CR のマルチ周波数処理は頭部規格エックス線写真は臨床に有効な方法と示唆された。

口蓋部小唾液腺腫瘍の CT, MRI 所見の検討

森進太郎, 李 光純, 本橋淳子, 大迫美穂, 金田 隆, 南 学*, 岡田裕之**, 山本浩嗣**
(日大・松戸歯・放, **同・病理, *東大・医・放)

Assessment of the minor salivary gland tumors in the palate: CT and MRI appearance.

Mori S, Lee G, Motohashi J, Osako M, Kaneda T, Minami M*, Okada H**, Yamamoto H**
(Department of Radiology and **Pathology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo
*Department of Radiology University of Tokyo Hospital)

目的：

小唾液腺腫瘍は口蓋部に 50%以上発生すると報告されており，悪性の比率も高いことが知られている。しかしながら，口蓋部の画像検査は単純およびパノラマエックス線写真検査にて描出が困難であり，画像による鑑別も不可能な症例も多々存在した。近年，頭頸部領域に CT, MRI 検査が普及したが，口蓋部小唾液腺病変への報告は乏しい。今回我々は口蓋部に発生した小唾液腺腫瘍 14 症例の CT, MRI の特徴的所見を描出し，あわせて病理診断との比較も試みたので報告する。

対象および方法：

対象症例は，本学歯科放射線科に受診し，CT および MRI 検査を行い，病理診断にて口蓋部の小唾液腺腫瘍と診断された 14 症例とした。内訳は多形性腺腫 7 症例，腺様嚢胞癌 3 症例，粘表皮癌 3 症例，悪性多形性腺腫 1 症例であった。MRI の評価は信号強度，病変の境界および内部信号の均一性を，CT 検査は病変の濃度，病巣の境界および口蓋骨への浸潤を検討した。

結果：

MRI は病巣を容易に描出し，MRI の信号強度は T1 強調像にて低および低～中信号，T2 強調像にて高信号を呈していた。単純 CT では周囲組織との濃度変化がなく病巣の検出が困難であった。しかしながら，MRI や CT の画像による口蓋部小唾液腺腫瘍の良悪性の鑑別は困難であった。

まとめ：

MRI は口蓋部小唾液腺腫瘍の検出に有効な撮影法であることが示唆された。しかしながら画像による腫瘍の良悪性の鑑別は困難であった。

CBT (Computer Based Testing) による放射線学試験の評価

金田 隆, 森進太郎, 関谷恵子, 本橋淳子, 李 光純, 大迫美穂, 内藤康雄, 岡田裕之*, 山本浩嗣*, 南 学**

(日大・松戸歯・放, 同・*病理, **東大・医・放)

Assessment of the examination in Radiology using Computer Based Tasting

Kaneda T, Mori S, Sekiya K, Motohashi J, Lee G, Ohsako M, Naito Y, Okada H, Yamamoto H, Minami M

(Departments of Radiology and *Pathology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo,

**Department of Radiology, University of Tokyo Hospital)

目的 :

平成 14 年 3 月から CBT (Computer Based Testing : 以下 CBT と略す) による共用試験の第一回試験運用が予定されており, 平成 17 年から全国医科歯科大学に本格運用がなされようとしている。本試験様式は従来型の試験, いわゆるペーパーテストではなく, コンピュータを用いた多肢選択方式の問題であり, 教員, 学生ともにコンピュータの取り扱いはもちろん CRT 画面にも慣れていず, 施行方法も含め多々問題点が存在している。本研究の目的は本学の放射線学で実施されている画像を用いた CBT の評価および問題点の抽出である。

対象および方法 :

本学で実施している 1) CBT による 5 年次生の歯科放射線学の間試験の実施内容および 2) CBT による 6 年次生の臨床実習配属時のテストの実施内容と 3) それらの成績の分析を行った。また成績の分析は各々の学生の 4 年次の放射線学の成績とも比較検討した。5 年次生の歯科放射線学の間試験はコンピュータ画面から出題される問題を, 実習室にて 6 箇所設置されている大型の液晶画面を用いて, 各班ごとに観察しながら解答する方法である。6 年次生の臨床実習配属時のテストは配属時に, 各自コンピュータ画面を観察し解答する方法である。

結果およびまとめ :

CBT による 5 年次生の歯科放射線学の間試験および 6 年次生の臨床実習配属時のテストの成績は各々の学生の 4 年次の放射線学の成績分布とほぼ同様の傾向がみられた。しかしながら 6 年次の臨床実習における CBT ではコンピュータに慣れている学生と慣れていない学生では試験終了時間に若干の差がみられた。教材として用いる各疾患の典型像の検討を含めると教育, 研究, 臨床の融合をしなければ最適な CBT の施行には困難と考えられた。CBT のスタンダードを構築することは全国歯科大学の教員や学生への研究と教育効果も含め, 意義は大きいと示唆された。

CBTにおけるモニター画像読像とフィルム読像との比較検討

関谷恵子, 神野和子, 大迫美穂, 内藤康雄, 金田 隆, 小澤 薫*

(日大・松戸歯・放, *小澤歯科医院)

Comparative study with monitor and film images of the reading interpretation on computer based testing

Sekiya k, Kamino K, Ohsako M, Naito Y, Kaneda T, Ozawa K*

(Department of Radiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, *Ozawa Dental Clinic)

目的:

平成 13 年より共用テストが導入され, CBT (computer based testing) による試験が実施される。CBT による試験は画像を用いた試験問題が導入予定とされているが, モニター画像とフィルムとの読像がどのように受験生に影響を及ぼすか検討されていない。

本研究の目的は CBT におけるモニター画像での正答率と, フィルムを用いた問題形式による正答率について比較検討し, CBT についての評価をすることである。

方法:

CBT は顎骨および顎顔面の疾患 20 症例を選び, 多肢選択方式の問題を作成した。被験者は本学 5 年生 60 名で, すでに放射線学実習で施行している CBT による成績を基にして, 成績のほぼ同程度の学生 30 名ずつを被験者群 A, B とした。作成した CBT を, 被験者群 A に実行してもらい, その正答率を調べた。同様に, フィルムを直接観察して問題を解答する被験者群 B の正答率を調べた。

結果:

CBT の正答率は症例によってややばらつきがあったが, ほぼ同様の正答率を示した。モニターによる CBT の問題形式でもフィルム読像との差がみられなかった。フィルムを直接読像する方法は正答率が高いとは一概にいえなかった。しかしながら CBT の際, コンピュータの取り扱いに慣れた学生の方が短時間で試験を終了するという傾向がみられた。

マルチ周波数処理 Computed Radiography を用いたパノラマエックス線写真による

下顎第3大臼歯と下顎管の描出能の検討

日本大学松戸歯学部 放射線学講座

○内藤 康雄, 山城 光明, 森 進太郎, 大迫 美穂
本橋 淳子, 金田 隆

【目的】下顎第3大臼歯は解剖学的に下顎管と近接しているため、抜歯時の偶発症に注意しなければならない。その術前検査としてパノラマエックス線検査はよく行われているが、従来からのフィルム増感紙系を用いたパノラマエックス線写真は撮影条件や現像処理による画質への影響が大きく、これらが画像診断に支障をきたすこともあった。

近年コンピュータの発達により、イメージングプレート(IP)を用いた Computed Radiography (CR)が行われるようになってきた。

本研究の目的はCRの特徴である画像処理機能のうち、特にマルチ周波数処理に着目し、パノラマエックス線写真を用いて下顎第3大臼歯と下顎管の描出能について検討した。

【方法】智歯周囲炎の精査を目的に本学付属歯科病院に紹介来院した患者のうち、下顎第3大臼歯と下顎管との近接を認めた21人の30歯について撮影されたパノラマエックス線写真を用いた。各写真をFCR3500(富士フィルムメディカル株)を用いてマルチ周波数の高・中・低の各周波数で処理し、下顎第3大臼歯と下顎管の描出能を評価した。評価方法は複数の歯科放射線学会認定医によって写真の読影を行い、観察点を非常に鮮明、鮮明、どちらとも言えない、不鮮明、非常に不鮮明の5段階にて評価した。

【結果】マルチ周波数処理にて中周波処理を行ったパノラマエックス線写真は、下顎第3大臼歯や下顎管壁の描出能で高い評価点を得た。

【結論】マルチ周波数処理 Computed Radiography を用いたパノラマエックス線写真は、下顎第3大臼歯と下顎管の描出に有効な検査法であることが示唆された。

A Study of MR Diagnosis of TMJ on Patients with Orthodontic Appliances

Yoshie OKANO, Mitsuaki YAMASHIRO, Takashi KANEDA and Kazutaka KASAI

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

Background : Abnormalities of dental occlusion were previously considered to be the main etiology of temporomandibular joint (TMJ) disorders. Therefore, some orthodontic patients have TMJ disorders in recent years. These patients require frequent evaluation of imaging, and should be examine under orthodontic treatment. Magnetic resonance (MR) imaging is the primary imaging modality for patients with symptoms of TMJ disorders. However, various orthodontic appliances may limit the usefulness of MR imaging because they cause imaging degeneration.

Purpose: To examine disk position and condyle configuration with or without various orthodontic appliances on the MR imaging.

Methods and Materials: Subjects consisted of 6 types of orthodontic appliances on clinical experiments. MR images were performed with a 0.5 Tesla superconducting MR machine.

Results : 3 types out of 6 were able to examine disk position, 1 type out of 6 were able to examine both disk position and condyle configuration on MR imaging.

Conclusion : These results indicated that MR imaging for patients with orthodontic appliances was useful examination of TMJ pathologic states. However, authors recommend that patients with orthodontic appliances should be furnished "Direct bonding tubes" with molars, and should be removing wire for accurate MR examination.

Changes of Maxillary Alveolar Profile Angle and Inclination of Incisor in Japan

Miho OHSAKO, Shintaro MORI, Gansun LEE, Junko MOTOHASHI, Keiko SEKIYA, Takashi KANEDA, Eisaku KANAZAWA

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

Purpose: To clarify temporal changes of alveolar profile angle on skulls of historic populations using lateral cephalograms.

Methods: Alveolar profile angle and several other standard cephalometric measurements were taken from the lateral cephalograms. Both angular and linear measurements were used in the skeletal and cephalometric analysis.

Results: The angle was largest in Jomon people, but gradually reduced in Medieval to Edo era, then increased again to present time. Although the inclination of the incisor showed parallel relationship with the alveolar profile angle up to Edo era, it did not show clear increase in modern times. This angle had high correlations with facial height, bi-zygomatic breadth and inclination of the incisor to the Frankfort horizontal.

Conclusion: Alveolar profile angle has been changing from Jomon to Modern Japanese. And this angle had high correlations with inclination of the incisor, particularly. These two angles (alveolar profile angle and inclination of the incisor) have close association in an individual level of a single population and also in temporal changes of the Japanese with a few exception of the era. The cause of the changes of craniofacial morphology in Medieval and Edo era might not be simple, but it should be considered with the catch up of the angle in modern times.

MRIによる Rouviere リンパ節の年齢別リンパ節径について

○小椋 一郎, 内藤 康雄, 山城 光明
李 光純, 森 進太郎, 金田 隆

(日大・松戸歯・放)

目的：Rouviere リンパ節は上中咽頭の高さの咽頭後間隙内に位置し，臨床医が触診では確認できない，すなわち画像上でのみ確認しうるリンパ節として，顎顔面領域疾患の画像診断上重要である。また，同リンパ節は若年者ではしばしば正常所見として認められるが，40歳以上での描出は異常である可能性が高いと報告されている。しかしながら，正常者の年齢による本リンパ節の定量的な検討はほとんどなされていない。今回我々は，MRIによるRouviere リンパ節の年齢別リンパ節径について検討した。

方法：対象は2001年1月から2002年4月の間に本歯科病院放射線科に来院し，顎関節症の疑いでMRI撮像を施行した症例のうち，顎顔面領域に明らかな炎症所見および全身疾患を伴わなかった60名（男性9名，女性51名，年齢6～74歳，平均32.2歳）とした。使用したMR装置は0.5Tの超伝導型磁石装置（FLEXART，東芝メディカル）である。STIR法（short TI inversion recovery法，TR：1500，TE：30，TI：100）にて頭頸部を撮像し，Rouviere リンパ節の短径を計測し，年齢と短径との関連について統計学的に評価した。

結果：MRIによるRouviere リンパ節の短径は20歳未満（n=20）： 6.4 ± 1.6 mm，20歳～39歳（n=18）： 4.6 ± 1.3 mm，40歳以上（n=22）： 3.3 ± 1.2 mmであり，3群間において明らかな差が認められた（ $p < 0.01$ ）。

結論：Rouviere リンパ節は，加齢とともに小さくなるのが統計学的に明らかとなった。

Joint effusion の MRI T2 強調像の検討—SE 法と FSE 法の比較検討—

A study of T2-weighted MR image for evaluation of joint effusion—Comparative study with conventional spin echo and fast spin echo sequences—

日本大学松戸歯学部放射線学教室

○森 進太郎, 山城 光明, 本橋 淳子, 金田 隆

【目的】 Joint effusion の描出には水を強調した MRI T2 強調像が用いられるが, 従来から用いられている SE 法の T2 強調撮像には撮像時間が長いという短所がある。近年, 撮像時間を短縮させた高速 SE 法 (以下 FSE 法とする) による T2 強調撮像が施行されることが多くなってきたが, FSE 法の T2 強調像は水だけでなく脂肪も強調されるため, joint effusion の診査に適しているかどうかについて検討する必要がある。本研究の目的は, joint effusion の診査における SE 法, FSE 法それぞれの T2 強調像の比較検討を, ファントムによる基礎的検討と TMJ fluid の Category 別の臨床的検討から行うことにある。

【対象および方法】 対象は SE 法 T2 強調像にて TMJ fluid が認められた 55 例 78 関節 (男性 7 例, 女性 48 例, 年齢 8~76 歳, 平均 33.9 歳) とした。

使用した MRI は 0.5 T の超伝導型磁石装置 (FLEXART, 東芝メディカル社) であり, 撮像法は SE 法 T2 強調像 (TR/TE: 2,000/100 msec), FSE 法 T2 強調像 (TR/TE: 2,800/102 msec) を施行した。SE 法 T2 強調像による TMJ fluid の診査を基準とし, それと FSE 法との比較を行った。TMJ fluid の分類は Larheim らの grading system (2001) を用いて評価した。

【結果】 ファントムスタディより, FSE 法と比べ SE 法 T2 強調像のほうが水の描出に優れていた。臨床的検討より, SE 法 T2 強調像にて TMJ fluid と診断されたもののうち, FSE 法においても同様に TMJ fluid と診断されたものは 74.4% であった。TMJ fluid の Category による大きな差はみられなかった。

【結論】 SE 法と比べ, FSE 法による T2 強調像は joint effusion の診査には適していないことが示唆された。

口蓋部多形性腺腫の CT および MR 像

小椋一朗 1)、加藤正隆 1)、森進太郎 1)、本橋淳子 1)、李 光純 1)、岡野芳枝 1)、金田 隆 1)、岡田裕之 2)、山本浩嗣 2)

1) : 日本大学松戸歯学部放射線学教室、2) : 日本大学松戸歯学部病理学教室

CT and MR images of pleomorphic adenoma of the palate

Ichiro Ogura 1), Masataka Kato 1), Schintaro Mori 1), Junko Motohashi 1), Lee Kwangson 1), Yoshie Okano 1), Takashi Kaneda 1), Hiroyuki Okada 2), Hirotsugu Yamamoto 2)

1) : Department of Radiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo,

2) : Department of Pathology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

〔緒言〕多形性腺腫は一番頻度が高い唾液腺腫瘍で、耳下腺多形性腺腫が唾液腺腫瘍全体の 70? 80% を占める。ただし、口蓋部においてはまれで、CT および MR 像の特徴的所見についての報告はあまりなされていない。

〔対象および方法〕2000 年 7 月から 2002 年 9 月の間に本歯科病院放射線科に来院し、CT および MRI 撮像を施行した症例のうち、病理組織検査にて確定診断を得た口蓋部多形性腺腫 4 症例（そのうち 1 例は悪性多形性腺腫）を対象とした。これらにおける CT および MR 像について検討した。

〔症例 1〕67 歳女性 多形性腺腫 : CT では左側口蓋部に 2.0×1.5cm の境界明瞭な病変を認め、口蓋骨の骨吸収と菲薄化を認めた。MRI では T1 強調像で低～中信号、T2 強調像で著明な高信号を示し、内部の信号が不均一であった。

〔症例 2〕16 歳男性 多形性腺腫 : CT では右側口蓋部に 2.0×1.5cm の境界明瞭な病変を認め、口蓋骨の骨吸収と菲薄化を認めた。MRI では T1 強調像で低信号、T2 強調像で高信号を示した。

〔症例 3〕67 歳女性 多形性腺腫 : CT では左側口蓋部に 1.5×1.5cm の境界やや不明瞭な病変を認め、口蓋骨の骨吸収と菲薄化を認めた。MRI では T1 強調像で低信号、T2 強調像で一部高信号を示し、Gd-DTPA にて内部に低信号を伴う diffuse な造影効果を認めた。

〔症例 4〕65 歳男性 悪性多形性腺腫 : CT では左側口蓋部に 2.2×1.6cm の境界明瞭な病変を認め、口蓋骨の骨吸収と菲薄化を認めた。MRI では T1 強調像で低信号、T2 強調像で中～高信号を示し、Gd-DTPA にて造影効果を認めた。

〔結論〕口蓋部多形性腺腫は CT にて口蓋骨の圧迫吸収がみられ、MRI では T1 強調像で低信号、T2 強調像で一部高信号を示す点が特徴であった。

Computed radiography を用いた頭部エックス線規格写真における軟組織強調画像の試み

Preliminary Study of Soft Tissue Weighted Images on Cephalogram Using Computed Radiography

岡野芳枝, 金田 隆, 森進太郎, 本橋淳子, 今村隆一¹, 葛西一貴¹ (日大・松戸歯・放,¹日大・松戸歯・矯正)

背景：近年，矯正臨床において，不正咬合と咽頭扁桃，口蓋扁桃および舌などの軟組織との関係についてさまざまな報告がなされており，従来からの硬組織分析に加えて軟組織分析が幅広く取り入れられるようになってきた。しかしながら，分析に用いる頭部エックス線規格写真はおもに硬組織の描出に優れたものであり，軟組織の読像に熟知しない者には困難である。

一方，コンピューターの発達により，従来の銀塩フィルムを用いたアナログタイプのエックス線写真に変わり，イメージングプレートによる Computed radiography (CR) が用いられるようになってきており，アナログタイプのエックス線写真と比較し，硬組織ばかりでなく周囲軟組織の描出も可能となった。

そこで今回我々は，頭部エックス線規格 CR 画像にマルチ周波数処理を施すことにより，軟組織を強調した頭部エックス線規格 CR 画像を描出し，臨床応用す

ることを検討したので報告する。

対象および方法：資料は，日本大学松戸歯学部付属歯科病院を受診した 20 名の患者において，矯正治療の為に撮影した頭部エックス線規格 CR 画像である。

デジタルエックス線装置は FCR3500 を用い，患者の頭部エックス線規格 CR 画像をマルチ周波数処理を施し，基準画像と比較した。

評価項目は，矯正治療において軟組織分析に用いるポイントを設定し，軟組織の描出程度を 3 名の放射線科医と 2 名の矯正医がそれぞれ個別に 5 段階評価，分析した。

結果：軟組織強調頭部エックス線規格 CR 画像は，基準画像と比較し，低周波領域高強調画像で軟組織の描出は良好であった。

まとめ：従来から使用している頭部エックス線規格 CR 画像である。

Micro-CT の顎骨および歯の最適条件について

A study of Effective Sequences on Micro-CT in the Maxillo-facial Region

加藤正隆, 森進太郎, 李 光純, 片山雄三, 阪柳雅志, 岡野芳枝, 本橋淳子, 小椋一朗, 金田 隆 (日大・松戸歯・歯放)

目的：近年，歯科医療の発達に伴い，歯科領域において，歯や骨等硬組織の内部構造についてより詳細な情報を知ることが重要になってきている。それらの情報を得るためには歯科用エックス線を始めとしてCT等が広く用いられている。しかし，従来の医療用エックス線CT装置では解像度あるいはスキャンピッチが大きいため顎口腔領域における内部構造の分析に応用するのは困難であった。そのため歯や顎骨など，硬組織の形態学的研究は主に破壊的に切片を作成し観察する方法が用いて行われてきた。しかし，これらの方法では切断面からの観察しか行えず，加えて立体的な構造は再現しにくいという大きな欠点があった。ところが，近年微細構造の撮影に適したMicro-CT装置（以下Micro-CT）が開発され，研究に用いられるようになってきた。しかしそれぞれ使用する装置により撮影方法や断層画像の取得方法および3次元立体構造の採取方

法が異なっている。Micro-CTを用いて顎骨や歯の計測を行うためには，各装置の特性を考慮した上で計測値に対する最適条件やそれに伴う誤差を検証する必要がある。本研究の目的はMicro-CT装置にて，コーンビーム方式で顎骨および歯を撮影する時の3次元立体構造取得を含む最適な撮影条件とそれに伴う計測精度について比較検討を行った。

対象および方法：TOSCANER-31300 μ hd（東芝ITC製）を用いて，カルシウムファントム，歯および顎骨を用いた。方法はview数変化による像の取得時間を変化させ，画像の違いを評価した。評価の対象はカルシウムファントム，歯および顎骨を用いた実体像とMicro-CTの像の比較を施行し，最適な条件を検討した。結果：view数変化による像採取時間は20分以上であれば形体および計測値について応用可能と考えられた。

Short TI Inversion Recovery (STIR) 法による顎顔面領域軟組織の評価 Assessment of Short TI Inversion Recovery (STIR) Imaging of Soft Tissue in the Maxillofacial Region

李 光純, 森進太郎, 加藤正隆, 本橋淳子, 阪柳雅志, 片山雄三, 岡野芳枝, 小椋一朗, 金田 隆 (日大・松戸歯・放)

目的: 顎顔面領域の MRI 検査は, 通常, 主に Spin Echo 法 (以下 SE 法と略す) の T1, T2 強調像と必要に応じて造影 T1 強調像が施行されている。脂肪抑制法は脂肪の高信号が診断の妨げになる場合などに有用な撮像法であり, 全身の骨髄疾患や軟組織疾患において, その有用性が多数報告されている。

本発表の目的は脂肪抑制法の一つである STIR 法を用いて (1) 顎顔面領域軟組織の正常像の信号強度を評価, および (2) 病態像を用いて病変の描出における有用性を評価することである。

対象および方法: 1) 1999 年 4 月より 2001 年 12 月までに本歯科病院放射線科に来院し, MRI STIR 法を撮像し, 顎顔面領域に異常がみとめられなかった 80 症例の軟組織 (耳下腺, 顎下腺, 舌下腺, 咬筋, リンパ節, 口蓋扁桃, 咽頭扁桃, 下顎骨骨髄) の MRI 信号強度の検討を施行した。2) 1999 年 4 月より 2001 年 12 月までに本歯科病院放射線科に来院し, MRI 撮像を施行し, 顎顔面領域に異常がみとめられた 40 症例 (良性

腫瘍 16 例, 悪性腫瘍 2 例, 嚢胞 10 例, 炎症 12 例) を対象症例とし, SE 法の T1, T2 強調画像と STIR 像を視覚的に評価した。病変部と正常な組織との信号強度の違いを, 1 (poor), 2 (moderate), 3 (good), 4 (excellent) の 4 段階で評価し, 多重比較検定を行った。

結果: (1) STIR 像にて耳下腺 (77.5%), 咬筋 (100%) は中信号, 顎下腺 (95%), 舌下腺 (100%) は中～高信号, リンパ節は高信号 (100%) であった。口蓋扁桃 (88.75%), 咽頭扁桃 (81.25%) は中～高信号, 下顎骨骨髄は低信号 (83%) であった。

(2) 疾患全体の評価は STIR 像が最も高い評価点を得て, T1, T2 強調画像との間に有意な差がみとめられた ($p < 0.05$)。特に炎症において STIR 像が最も高い評価点であった。

まとめ: STIR 法は顎顔面領域の検査において有効なシーケンスであると示唆された。

STIR法を用いた顎関節MRIの検討

●森 進太郎¹, 本橋 淳子¹, 加藤 正隆¹, 阪柳 雅志¹,
片山 雄三¹, 金田 隆¹, 近藤 壽郎², 佐野 司³

¹ 日本大学松戸歯学部放射線学教室

² 日本大学松戸歯学部口腔外科学教室

³ 東京歯科大学歯科放射線学講座

顎関節のMRIを用いた研究は数多くなされており、関節円板の位置・形態や復位の有無、下顎頭骨髄信号の異常やjoint effusion、円板後部組織の検討など、MRIの様々な有用性が報告されている。一方、STIR法はMRIにおける脂肪抑制法のひとつであり、病変の存在診断に優れ、顎顔面領域をはじめ医科領域において広く用いられている撮像法である。しかしながら、顎関節領域のMRI診断にSTIR法が応用された報告はあまりなされていない。今回われわれはSTIR法を用いた顎関節矢状断像および冠状断像について検討したのでその有用性について報告する。

プロトン密度強調矢状断像、T2強調矢状断像、およびT1強調冠状断像と比較し、STIR像は下顎頭骨髄信号の異常や関節円板の内外側転位の診査に優れていた。STIR法にて下顎頭骨髄信号の上昇を診査することで、将来の下顎頭骨変形の前測が可能であると示唆された。また、STIR法は従来のMRI検査では描出困難であった関節包の炎症状態を診査できる可能性が示唆された。

線維性骨病変の画像診断 — CT および MRI 所見の検討 —

岡野芳枝¹, 金田 隆¹, 加藤正隆¹, 鎌田美弥¹, 横針和也¹, 森進太郎¹, 阪柳雅志¹, 岡田裕之², 山本浩嗣²
(¹ 日本大学 松戸歯学部 放射線学講座, ² 日本大学 松戸歯学部 病理学講座)

背景および目的 顎骨に生じる線維性骨病変は時間の経過と共に病態が変化し, 病変の stage により他疾患との鑑別診断は困難なことがある。従来から線維性骨病変は, 単純エックス線写真を中心とした画像診断が多く, その報告は多数みられる。一方, 近年 CT および MRI の普及により, 病変の質的な検査や三次元的な観察が可能となってきている。しかしながら, 線維性骨病変の CT および MRI による画像所見の検討はほとんどみられない。本検討の目的は, 線維性骨病変の CT および MRI による特徴的な画像所見を抽出することである。対象と方法 対象は, 2000年3月から2004年6月に, 本学付属歯科病院放射線科にて CT および MRI 検査を施行し, 病理組織検査で線維性骨病変と確定診断された 31 症例 (12 ~ 69 歳 (平均年齢 41.9 歳), 男: 11 名, 女: 20 名) である。CT は体軸横断および前額断の 2 方向で撮影し, 軟組織および骨表示画像にて, 顎骨の膨隆, 皮質骨の吸収, 隣在歯の状態および病変部の density について検討した。また, MRI は SE 法の T1 強調像 (TR/TE: 465 ~

590/15), T1 強調像造影像および T2 強調像 (TR/TE: 3000/120) にて撮像し, SE 法の信号強度および造影効果について検討した。結果および考察 31 例の線維性骨病変の内訳は, 根尖性セメント質異形成症 10 例, 線維性骨異形成症 11 例, セメント質骨形成性線維腫 10 例であった。根尖性セメント質異形成症の初期 stage にて皮質骨の吸収がみられたが, 膨隆はほとんどみられなかった。線維性骨異形成症およびセメント質骨形成性線維腫は, 著しい顎骨の膨隆を認めた。線維性骨異形成症は, CT にて, いわゆるすりガラス状の high と low の混在した特徴的な density を呈していた。また, すべての症例で根尖の吸収はみられなかった。MRI 所見では, CT と比較し, 病変部境界の把握および病変内部の質的な検査が容易であった。まとめ 線維性骨病変の CT および MR 画像から, 特徴的な画像所見が抽出され, 特に, 従来のエックス線所見より進展範囲が明瞭に描出され, CT および MRI は線維性骨病変の有効な検査法と示唆された。

耳下腺開口放出における低分子量GTP結合タンパク質Rhoの役割

¹日本大学 松戸歯学部 生理学教室、²歯科麻酔学教室

杉谷 博士¹、石橋 肇²、吉垣 純子¹、古山 俊介¹

Rhoは低分子量GTP結合タンパク質の1つで、機能の1つとして、アクチン細胞骨格の制御に関わることが知られている。耳下腺腺房細胞のアミラーゼの開口放出にもアクチン細胞骨格が関与していることが示唆されていることから、ラット耳下腺腺房細胞のアミラーゼ開口放出におけるRhoの役割を検討した。遊離ラット耳下腺腺房細胞において、抗Rho A抗体に反応する分子量約21kDaのタンパク質の存在をウェスタンブロット解析により認めた。ストレプトリジンOを用いた可透過性耳下腺腺房細胞において、Rhoを特異的にADPリボシル化し不活性化するボツリヌスC3酵素処理ではcAMPによるアミラーゼ分泌が有意に抑制された。Rhoの下流に存在するRhoキナーゼの特異的阻害薬であるY27632の存在下ではジブチリルcAMP刺激によるアミラーゼ分泌が有意に抑制された。今回の結果からRhoを介するシグナル伝達が、cAMP依存性アミラーゼ開口分泌に関与していることが示唆された。

耳下腺アミラーゼ分泌の調節機序

¹北大 歯 生理、²生理研 分子生理、³日大松戸 歯 生理

吉村 啓一¹、村上 政隆¹、吉垣 純子¹、杉谷 博士¹

耳下腺遊離細胞をバイオゲルとまぜ小さなカラムの灌流系で種々のアゴニストのアミラーゼ分泌の時間変化を解析した。アミラーゼ分泌に2つのパターンがある。カルバコール (CCh) などカルシウム (Ca) を介するアゴニストは二相性、早い大きなピークとそれに続く持続相を示す。一方イソプロテレノール (ISOP) などcAMPを介する効果はゆっくり発現し、大きな持続相を形成する。以上はアミラーゼ分泌が二段階、すなわち顆粒のプライミングと融合のモデルで良く説明できる。この場合cAMPは主に顆粒のプライミングに働き、Caは融合を促進する。プライミングの促進に少なくとも三つある。すなわちcAMPを介する顕著な効果、PKCを介するPDBuの効果、CChなどのアゴニストによるものである (ただしCChによるプライミングの機序はPKCの活性化や外液のCaには依存しない)。ISOPはCaの効果の親和性を高め顆粒の融合を顕著に促進する。またCChのプライミング作用の効率と親和性を高める。

Ca²⁺-cAMP系混合刺激による唾液分泌のUP-DOWN制御

¹生理研、²北大歯、³日大松戸歯、⁴京府医大

村上 政隆¹、吉村 啓一²、杉谷 博士³、瀬尾 芳輝⁴

唾液腺の電解質水輸送と開口分泌は細胞質のCa²⁺濃度/cAMP濃度の上昇により活性化する。前回、血管灌流ラット顎下腺を用い、低濃度calbachol (CCh) 刺激にisoproterenol (ISP) 刺激を重畳させると水分泌がさらに増加 (UP制御) したが、一方最大水分泌反応を起すCCh濃度での刺激にISP刺激を重畳させても水分泌消費は減少 (DOWN制御) 又は不変であった。UP制御にはcAMPによるチャンネル/輸送体の直接作用が確認されているが、DOWN制御の機序は不明である。これら唾液腺水分泌のUP-DOWN制御には酸素消費の増減を伴うことから、今回、DOWN制御をエネルギー代謝の視点で検討した。開口分泌それ自身はエネルギー要求は少ないが、混合刺激により水分泌が増強されない場合にも酸素消費は増加し、持続刺激中水分泌あたりの酸素消費は増大し続けた。これはprimingとその上流の分泌顆粒動員過程がエネルギーを要求し、水分泌のエネルギー要求を満たせない可能性を示唆している。さらにP-31NMR法を用い、エネルギー代謝リン化合物の動態から検討を加えた。

唾液腺における低分子量 GTP 結合タンパク質

杉谷 博士

日本大学松戸歯学部生理学教室

近年、細胞内情報伝達系の重要な因子の1つとして GTP 結合タンパク質が注目を集めている。細胞情報伝達に関わる GTP 結合タンパク質は大きく2つのグループに分類される。1つは受容体に共役した三量体 GTP 結合タンパク質である。もう1つは 18-30 kDa の分子量をもち、単量体で特異的な GTP 加水分解活性をもつ低分子量 GTP 結合タンパク質である。低分子量 GTP 結合タンパク質は Ras, Rho, Arf, Rab, Ran の5つのファミリーに分類されており、Ras は細胞の分化、Rho はマイクロフィラメントの形成、Arf は小胞体とゴルジ装置間の小胞輸送、Rab は分泌、Ran は閥内へのタンパク質輸送に関与することが報告されている。

ラット耳下腺腺房細胞は β アドレナリン受容体刺激により、細胞内 cyclic AMP の上昇を介し、アミラーゼの開口放出を引き起こす。この刺激・分泌過程における低分子量 GTP 結合タンパク質の役割が示唆されている。Rap は Ras スーパーファミリーの1つである。Rap は Rap1 および Rap2 の2つのサブグループに分類されるが、ラット耳下腺腺房細胞の分泌顆粒、細胞膜、細胞質に Rap1 が存在し、 β アドレナリン受容体刺激により細胞質への輸送の促進が報告されている 1-3)。Rab3D は4種類の Rab3 サブファミリーの1つであるが、ラット耳下腺腺房細胞の分泌顆粒に存在し、分泌顆粒のサイズの維持に関与することが報告されている 4,5)。また、他の Rab として Rab26 も分泌顆粒に存在し、 β アドレナリン受容体刺激により分泌顆粒からの消失が報告されている 6)。

われわれは、ラット耳下腺腺房細胞のアミラーゼ開口放出における Arf および Rho の役割について検討を進めている。今回、今までにえられた Arf および Rho についての知見を紹介したい。

参考文献

- 1) Kameyama Y, Nagata K, Mizuno-Kamiya M, Yokota Y, Fujita A, Nozawa Y (1994) *Life Sci* 55: 213-219.
- 2) D'Silva NJ, DiJulio DH, Belton CM, Jacobson KL, Watson EL (1997) *J Histochem Cytochem* 45: 965-973.
- 3) D'Silva NJ, Jacobson KL, Ott SM, Watson EL (1998) *Am J Physiol* 274: C1667-1673.
- 4) Raffaniello RD, Lin J, Schwimmer R, Ojakian GK (1999) *Biochim Biophys Acta* 1450: 352-363.
- 5) Riedel D, Antonin W, Fernandez-Chacon R, Alvarez de Toledo G, Jo T, Geppert M, Valentijn JA, Jammieson JD, Sudhof TC, Jahn R (2002) *Mol Cell Biol* 22: 6487-6497.
- 6) Yoshie S, Imai A, Nishida T, Shimomura H (2000) *Histochem Cell Biol* 113: 259-263.

耳下腺分泌顆粒膜におけるアクアポリン5の機能

○松木 美和子^{1,2}、橋本 貞充¹、下野 正基¹、
吉垣 純子²、古山 俊介²、杉谷 博士²
(¹ 東歯大 病理、² 日大松戸歯 生理)

[目的] アクアポリンは、分子量27～29 kDaの水分子の透過を促進するチャネルである。腎臓、腸管、胆管などの多くの上皮性組織に存在し、唾液腺においても局在が認められている。近年、アクアポリンが腎臓の細胞内輸送小胞や、膵臓の分泌顆粒などの細胞内小器官に局在していることが報告されている。本研究では、耳下腺の分泌顆粒膜におけるアクアポリンの存在と機能について検討した。

[方法] 分泌顆粒はラット耳下腺よりパーコールを使用し精製した。分泌顆粒の溶解は、Thevenodらの方法により吸光度540 nmにて測定した。分泌顆粒膜上での局在は、イムノブロット法により確認した。

[結果と考察] 分泌顆粒の溶解は、水チャネルの阻害剤である第二塩化水銀により容量依存的に促進された。塩化第二水銀以外の二価陽イオン類では、分泌顆粒の溶解は認められなかった。塩化第二水銀の効果は、SH基の保護剤であるメルカプトエタノールで有意に阻害された。イムノブロット法により、アクアポリン5が分泌顆粒膜上に局在していることが確認された。抗アクアポリン5抗体は、分泌顆粒の溶解を促進した。以上の結果より、分泌顆粒膜にアクアポリン5の存在が示唆され、アクアポリン5が分泌顆粒膜の水の透過性を調節している可能性が考えられた。

Rho による耳下腺 cyclic AMP 依存性開口放出の制御

○杉谷 博士, 吉垣 純子, 石橋 肇, 古山 俊介
(日大・松戸歯・生理)

低分子量 GTP 結合タンパク質の 1 つである Rho は、アクチン細胞骨格系の再構成を介して、様々な細胞機能に関与することが知られている。唾液腺を含む種々の外分泌腺の開口放出においても、アクチン細胞骨格系が関わることを示唆されているが、その調節機構は明らかではない。唾液腺の 1 つである耳下腺腺房細胞は β アドレナリン受容体刺激により細胞内 cyclic AMP 濃度の上昇を引き起こし、cyclic AMP 依存性プロテインキナーゼを活性化し、糖質分解酵素アミラーゼの開口放出を引き起こす。我々は、ボツリヌス菌菌体外酵素 C3 による ADP リボシル化および抗 Rho 抗体を用いたイムノブロット解析によりラット耳下腺腺房細胞の Rho タンパク質の発現を認めた。また、可透過性腺房細胞を作成し、cyclic AMP によるアミラーゼ分泌に対する C3 の効果を検討したところ、C3 の存在下では cyclic AMP 依存性のアミラーゼ分泌は抑制された。さらに、Rho 活性化の下流に存在する Rho キナーゼの特異的阻害薬である Y27632 存在下では dibutylyl cyclic AMP 刺激によるアミラーゼ分泌は抑制された。これらの結果より、耳下腺腺房細胞において、Rho はアクチン細胞骨格系の機能調節を介して、cyclic AMP 依存性開口放出を制御すると考えられる。

LOCALIZATION AND FUNCTION OF AQUAPORIN 5 IN RAT PAROTID SECRETORY GRANULES

Sugiya, H.¹, Katsumata, O.¹, Matsuki, M.^{1,2}, Hashimoto, S.²,
Shimono, M.², Murakami, M.³, Yoshigaki, J.¹ and Furuyama,
S.¹

¹*Department of Physiology, Nihon University School of
Dentistry at Matsudo, Matsudo 271-8587, Japan,*

²*Department of Pathology, Tokyo Dental College, Chiba 261-
8502, Japan,* ³*National Institute for Physiological Sciences,
Okazaki 444-8585, Japan*

Aquaporins (AQPs) are a family of membrane proteins that function as water channels. Of the known members of the AQP family, AQP1, AQP4, AQP5, and AQP8 have so far been identified in mammalian salivary glands. We investigated the expression and function of AQPs in the secretory granules in the rat parotid gland. AQP5 was detected in the granule membranes by immunoblot analysis but not AQP1, AQP4 and AQP8. The immunoelectron microscopy experiment confirmed the expression of AQP5 on the secretory granule membranes. HgCl₂, an inhibitor of AQPs, evoked lysis of the secretory granules in a dose-dependent manner. The HgCl₂-induced lysis of the secretory granules was completely blocked in the presence of β-mercaptoethanol. Anti-AQP5 antibody evoked the lysis of the secretory granules but not anti-AQP1 antibody. In the absence of Cl⁻ or presence of an anion channel blocker, the anti-AQP5 antibody-induced granule lysis was blocked. These results suggest that AQP5 localized in the secretory granule membranes is involved in the regulation of osmotic water flow via Cl⁻ channels in secretory granule membranes in the parotid gland.

ラット耳下腺分泌顆粒における AQP6 の存在

○松木 美和子^{1,2,3}、橋本 貞充^{1,2}、下野 正基^{1,2}、
吉垣 純子^{3,4}、古山 俊介^{3,4}、杉谷 博士^{3,4}(¹東
歯大 病理、²東歯大 口腔科学研究センター、
³日大松戸歯 生理、⁴日大松戸歯 口科研)

【目的】アクアポリン(AQP)は、水の透過を促進するチャンネルで、AQP0~10 までのアイソフォームの存在が知られている。唾液腺においては、細胞膜に AQP1, 4, 5, 8 が存在することが報告されている。最近、我々は、ラット耳下腺分泌顆粒膜にも AQP5 が存在し、分泌顆粒の浸透圧調節に関与する可能性を明らかにした。本研究では、分泌顆粒膜上における AQP の機能を明らかにする目的で、ラット耳下腺分泌顆粒膜上における AQP6 の局在と機能について検討した。【方法】分泌顆粒は、ラット耳下腺よりパーコールを用いて精製した。分泌顆粒膜における AQP6 の局在は、免疫ブロット法、免疫蛍光法および金コロイドを用いた凍結免疫電顕法にて検討した。分泌顆粒の溶解は Thevenod らの方法により吸光度 540 nm にて測定した。【結果と考察】精製したラット耳下腺の細胞膜及び分泌顆粒膜における AQP6 の存在が免疫ブロット法により確認された。免疫電顕法においても、分泌顆粒上に AQP6 の局在を示す金コロイド粒子が明瞭に観察された。精製した分泌顆粒に抗 AQP6 抗体を反応させると、経時的に分泌顆粒の溶解が認められた。抗 AQP6 抗体は、抗 AQP5 抗体による分泌顆粒の溶解に相加的な効果を示した。以上の結果から、AQP6 が AQP5 と協調して、分泌顆粒膜上での水の透過性調節に関与することが考えられた。

唾液腺由来培養細胞の共焦点レーザー顕微鏡による細胞骨格系の観察

○吉垣 知能¹、通川 広美¹、吉垣 純子¹、杉谷 博士¹、古山 俊介¹(¹日大松戸 歯 生理)

ラット顎下腺由来の培養細胞である SMIE 細胞は、プレート上で単層に増殖し、tight junction を境として、腺腔側と基底側に分かれる極性を有している。そのため、唾液腺上皮細胞での、基底側から腺腔側への水移動の研究などに、in vitro モデルとして使われてきた (Hoque et al., 2002, vol. 191, p336-341)。今回、SMIE 細胞が極性を持つ機構を調べるため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、その細胞骨格系を観察した。プレート上で二三日培養すると、数十個の細胞が集まった円形コロニーを形成する。このとき、腺腔側細胞膜直下には、tight junction と思われる F-アクチンや Occludin のバンド状構造が存在していた。一方、基底側には、stress fiber が多数見られた。微小管は、細胞質全体に広がっていたが、細胞上部に、ほぼ真上を向いた突起状構造物が一つ存在し、中心体は、突起の底部に位置していた。そのため、微小管は、腺腔側の中心体から出て、基底側へ向かって広がっていると考えられる。微小管ネットワークとアクチンバンドは、M 期には消失し、分裂後、再度出現した。特に、微小管の突起は、分裂終期、midbody が存在する時期に、核の傍らに出現が観察された。これらの結果は、SMIE 細胞の極性形成において、細胞骨格系が何らかの役割を果たしていることを示唆している。

7. ラット顎下腺腺房細胞における傍細胞輸送経路の透過性と Tight Junction の超微構造変化

○橋本貞充¹⁾・村上政隆³⁾・金関 恵⁵⁾・杉谷博士⁴⁾

松木美和子²⁾・下野正基¹⁾

(¹⁾ 東京歯科大学病理学講座, (²⁾ 同口腔科学研究センター,

³⁾ 自然科学研究機構生理学研究所統合バイオサイエンスセンター・

ナノ形態生理学, (⁴⁾ 日本大学松戸歯学部生理学教室,

⁵⁾ 基礎生物学研究所)

(目的)

Tight junction (TJ) を通過し唾液に組織液成分を移送する傍細胞輸送 (paracellular pathway) による分子の選択機構について瀬川・村上は、ムスカリン受容体刺激により分泌される水は、刺激初期の経細胞成分優位から持続期に傍細胞成分優位になることを示した。βアドレナリン受容体刺激による傍細胞輸送の活性化は知られているが、その調節機構は明らかでない。本研究は、唾液分泌における傍細胞輸送経路の透過機構解析を目的とし、非刺激および刺激時の血管灌流顎下腺の蛍光色素の透過性を定量するとともに、急速凍結法によるディープエッチング・フリーズフラクチャーレプリカ (FF) 法により、TJ の超微構造変化について機能形態学的に検討した。

(材料・方法)

Wistar 系雄ラットより顎下腺を摘出、血管灌流し、1) 灌流液に Lucifer Yellow を添加し単独刺激と IPR/CCh 混合刺激下で唾液中の LY 濃度と灌流液中の LY 濃度比 (S/P)、分泌速度を比較し、傍細胞経路の透過性を検討した。2) 灌流腺に非刺激および IPR (1 μM) と CCh (1 μM) 混合刺激後、新鮮組織を金属圧着法による液体ヘリウム急速凍結固定後、切断、エッチング、白金カーボン蒸着し、TJ 領域の超微細構造を三次元的に観察した。

(結果・考察)

1) Lucifer Yellow の S/P 比は唾液分泌速度に対し反比例関係をもち、単に S/P 比の変化のみでは透過性の評価は不十分であった。S/P 比と分泌速度の関係はβアドレナリン受容体刺激により上方にシフトし、同じ分泌速度でも S/P が増加、傍細胞輸送の透過性亢進が明確になった。2) 急速凍結 FF 法では、腺房細胞 TJ 部の垂直切断面で、TJ を構成する細胞膜貫通膜内粒子が、細胞膜直下に微細線維状の介在蛋白を介し深部に集束する actin 線維束と結合する像が観察された。CCh /IPR 混合刺激群では、TJ を構成する膜内粒子の配列は不規則で、free end や terminal loop が増加する傾向が認められ、直下の actin 線維の走行がより密となった。混合刺激による分泌時では、頂端側細胞膜直下での actin 細胞骨格の構造変化にともない、TJ の網目を構成する膜貫通蛋白の局在が変化し、傍細胞輸送経路の透過性が亢進する可能性が示された。

(結論)

唾液腺腺房細胞の腺腔側では、actin 線維の構造変化と TJ 構成蛋白の再構築により傍細胞輸送経路の透過性が調節・亢進される。

Jasplakinolide induces apoptosis in rat parotid acinar cells

Sugiya, Hiroshi¹; Matsuki, Miwako^{1,2}; Hashimoto, Sadamitsu²; Shimono, Masaki²; Furuyama, Shunsuke¹

(¹*Dept. Physiol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, Chiba, Japan;*

²*Dept. Pathol., Tokyo Dent. Coll., Chiba, Japan)*

Jasplakinolide, a cell-permeable monocyclic peptide, binds to the F-actin and induces actin stabilization in vitro. In epithelial cells, actin filament network is important for the functions, because disruption of actin filament network causes morphological alteration, dissociation of mitosis and cell death. In salivary glands, actin filaments have been suggested to contribute to cell-cell adhesion, polarization and scaffold of plasma membrane. Apoptosis is a regulated process by which a cell undergoes a form of cell death characterized by DNA cleavage, nuclear condensation, cell shrinkage and membrane blebbing. We here demonstrate that jasplakinolide induces apoptosis in rat parotid acinar cells. Parotid acinar cells of male Sprague-Dawley rats were dispersed using trypsin and collagenase digestion. For morphological study, confocal and conventional transmission electron microscopies were used. DNA ladder was electrophoretically separated. When parotid acinar cells were treated with jasplakinolide, decrease of fluorescence intensity of submembrous F-actin was observed in fluorescence microscopy. In the cells, actin filament aggregation was elicited. In conventional transmission electron microscopy, chromatin aggregation, membrane blebbing and apoptotic bodies were observed exclusively in the jasplakinolide-treated cells. Jasplakinolide-induced apoptosis was confirmed by detection of DNA ladder and DNA fragmentation. Taken together, jasplakinolide induces apoptosis in rat parotid acinar cells.

Role of membrane microdomain in granule maturation in the rat parotid gland

Katsumata, Osamu¹; Yokoyama, Miki²; Yoshigaki, Junko¹; Furuyama, Shunnsuke¹; Sugiya, Hiroshi¹ (¹*Dept. Physiol., Nihon Univ. Dent. Matsudo, Chiba, Japan;* ²*Biochem., Tokyo Med. Dent. Univ., Tokyo, Japan*)

[Objective] The glycolipid- and cholesterol-rich membrane microdomains are lateral components of the plasma membranes and considered to function as platforms for both signal transduction and membrane trafficking. However, role of membrane microdomains in salivary glands has not been elucidated. In this study, we isolated membrane microdomains of rat parotid secretory granules using sucrose density ultracentrifugation, and compared the components of membrane microdomains in the process of the granule maturation. **[Methods]** Secretory granules in the rat parotid gland were purified using percoll. The components of membrane microdomains are biochemically separated as detergent-resistant membranes (DRMs) based on their insolubility in the detergent. **[Results]** When DRMs separated using detergent 1% Triton X-100, Syntaxin 6, VAMP-2 and munc-18 were recovered in GM1a-rich DRMs fraction. On the other hand, when DRMs separated using detergent 1% Brij-58, Syntaxin 6 detected in the different fraction from GM1a-rich one. In the parotid gland of rat treated with isoproterenol for 8 hours, formation of new secretory granules was observed with electron microscopy. In the granule Brij-58 insoluble DRMs, Syntaxin 6 was distributed in GM1a-rich fraction. **[Conclusion]** These results suggest that Syntaxin 6 exists on GM1a-rich microdomains in immature granule. For the granule maturation, exclusion of Syntaxin 6 from GM1a-rich microdomain appears to be important.

Relationship between salivary glucose and blood glucose: assessment using perfused salivary glands of rats/rabbits and application to human saliva

Murakami, Masataka¹; Shinozuka, Naoki²; Kishimoto, Noriyoshi²; Sakurai, Takeshi³; Sugiya, Hiroshi³; Furuyama, Shunsuke³ (*¹Nano Structure Physiology, Natl Inst Physiol Sci, Okazaki, Japan; ²Sapporo IDL, Sapporo, Japan; ³Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan*)

Salivary glucometry was assessed as a non-invasive monitor for blood glucose. Glucose concentration in the saliva and perfusate were compared in the isolated perfused submandibular glands of rats and rabbits. The ratio of saliva glucose to perfusate glucose (S/P-G) was in reciprocal relationship to the rate of fluid secretion. The saliva glucose concentration was higher as the saliva was secreted at lower rate. As the fluid secretion was higher, the value of S/P-G decreased and reached to the constant value. The present findings support that blood glucose can be estimated from the salivary glucometry when the fluid secretion rate is enough high. For practical application, the saliva was sampled from ductal openings of the sublingual/submandibular glands and the parotid gland of 42 adult human volunteers (20–28 years old) under resting and salivary stimulation with oral application of a sweet tablet. The ratio of salivary glucose to blood glucose (S/B-G) was examined among different individuals. The salivary flow rates increased by stimulation with a sweet tablet. It was shown that salivary glucose concentration showed well correlation with blood glucose under this stimulatory condition.

Analysis of cortical sensorimotor activity associated with semi-automatic orofacial motor behaviors using near-infrared spectroscopy
○成田 紀之¹、石井 智浩¹、松本 敏彦¹ ¹Dept. of Prosthodontics, Nihon Univ. Sch. of Dent. at Matsudo

AIM: The cortical sensorimotor activity associated with semi-automatic orofacial motor function was analyzed using noninvasive near-infrared (NIR) light topography. MATERIALS AND METHODS: Subjects (N=5) performed actual and imaginary masticatory, swallow and forefinger movements. The changes in oxygenation states were measured using intensity-modulated NIR spectroscopy at 24 measuring points (HITACHI Co.). RESULTS AND CONCLUSION: Actual motor performance evoked a significant increase of oxygenated hemoglobin (Hb) and a significant decrease of deoxygenated Hb. Hb change associated with an actual motor performance was shown as a peculiar region on topogram. Furthermore, it was confirmed that regional peculiarity of Hb changes consisted with functional localization in sensorimotor cortex by means of comparing a static topogram with MR-imaging. Furthermore, imaginary motor performance also caused a significant Hb change in sensorimotor cortex. These results demonstrate that NIR topography might be useful to examine cortical activities associated with orofacial motor functions, such as mastication and swallowing.

光トポグラフィーによる咀嚼・嚥下機能にかかわる大脳皮質領域の局所血流変化

○成田紀之, 石井智浩, 伊藤誠康, 飯島守雄, 松本敏彦

日本大学松戸歯学部歯科補綴学第三講座

Regional Blood Flow Changes of Cerebral Cortex Area Associated with Masticatory and Deglutitory Functions Using Optical Topography

Narita N, Ishii T, Ito M, Iijima M, Matsumoto T

Department of Removable Partial Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

I. 目的

これまでの咀嚼・嚥下にかかわる皮質制御に関する基礎的研究は、一次感覚運動皮質ならびに咀嚼・嚥下野領域への皮質内微小刺激によりリズムカルな下顎運動ならびに嚥下が誘発されることを示している¹⁾。さらに、咀嚼ならびに嚥下を誘発する皮質領域の実験的冷却は咀嚼と嚥下の発現および関連筋活動障害を^{2, 3)}。一方、ヒトのリズム性顎運動に関する機能的 MR 画像診断法による研究では、これまでの基礎的報告に一致して、一次感覚運動皮質、前頭弁蓋部における有意な活動性が報告されている。前頭弁蓋部の機能については、その領域の障害による口腔顔面領域の随意性運動失調が臨床的に報告されている(Marie-Foix-Chavany syndrome)。以上のことから、咀嚼機能ならびに嚥下機能を臨床的に検討する上において、関連する大脳皮質領域の活動性を定量的に評価することはたいへん重要なことと考える。今回は、光トポグラフィー法による咀嚼機能ならびに嚥下機能にかかわる皮質血流変化をその機能局在をもとに定量的に検討したので報告する。

II. 方法

被験者は、本研究内容をよく理解し、協力の得られた健康成人 5 名である。計測には、光トポグラフィー装置(日立メディコ, ETG-100)を用いた。計測に先立ち、プローブ(照射-検出間 30 mm, 24 CH)を頭頂から側頭におよぶ片側頭蓋部に装着した。被験運動には咀嚼(ガム)ならびに嚥下(水)を用い、手指タッピングを対照運動とした。また、各運動の持続時間は 10 秒間とし 20 秒間の休止をはさみ 5 回繰り返した。さらに、計測された脳血流データを 3 次元トポグラフィー画像表示システムにより被験者個々の脳 MR 画像上に転写し、関連皮質領域の同定と脳血流変化の定量的解析を行った。

III. 結果と考察

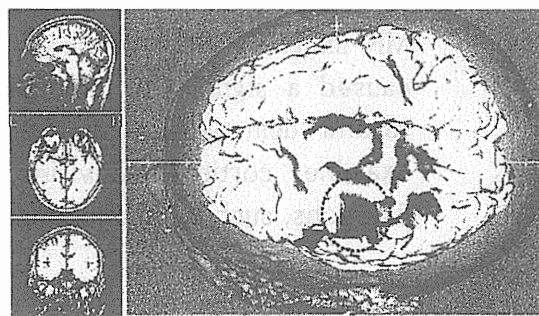
1. 咀嚼ならびに嚥下にもなう酸化ヘモクロピンの上昇, 還元ヘモクロピンの低下がトポグラ

ム上に示された。

2. 咀嚼, 嚥下あるいは手指タッピングによるトポグラムを脳 MR 画像上に転写すると, トポグラム上の局所脳血流の変化部位は, いずれも中心溝に沿った一次感覚運動皮質の領域に同定された(図)。

3. 局所脳血流の定量的解析において, 咀嚼, 嚥下, 手指タッピングのいずれもが血流変化の最大値にほぼ同等の値を示した。

以上の研究結果は, 咀嚼ならびに嚥下にかかわる大脳皮質の活動性が光トポグラフィー法により定量的に評価できることを示唆している。



嚥下にかかわる大脳皮質の活動領域(矢印)

IV. 文献

- 1) Martin RE, Kemppainen P, Masuda, Y et al. Features of cortically evoked swallowing in the awake primate (Macaca fascicularis). J Neurophysiol 82: 1529-1541, 1999.
- 2) Narita N, Sessle BJ, Raouf R et al. Effects on mastication of reversible cold block of lateral pericentral cortex of awake monkey. Soc of Neurosci Abstr 21: 1900, 1995.
- 3) 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.

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

Noriyuki Narita

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

Department of Removable Partial Prosthodontics and TMD/OFP Clinic, Nihon University School
of Dentistry at Matsudo

I. 緒言

顎口腔機能をシステムとしてとらえれば、下顎運動/筋放電出力、顎口腔からの感覚入力、ばかりか感覚と運動の統合にかかわる中枢神経の応答をも包含した機能評価法の確立は概念的にも優れ、高齢者ならびに中枢神経障害者における顎口腔機能診断に有用と考える。

これまでに、Sessle らの覚醒サルを用いた電気生理学的研究^{2,6,7,8)}においては、一次感覚運動野、咀嚼/嚥下野、深部の咀嚼/嚥下野（前頭弁蓋部）の皮質内微小刺激により、リズム性下顎運動ならびに嚥下が誘発され、さらにはそれらの皮質領域の実験的冷却は咀嚼と嚥下の発現、リズム性咀嚼筋活動ならびに嚥下筋活動などを障害する。また、ヒトの顎運動中枢性制御に関する機能的 MR 画像 (f-MRI) 研究⁴⁾は、下顎の tapping, clenching のいずれもが一次感覚運動野、小脳、補足運動野、頭頂弁蓋部の領域に有意な活動性を示し、tapping ではさらに前頭弁蓋部にも有意な活動性を示している。前頭/頭頂弁蓋部の機能については、その障害による顔面筋、咀嚼、嚥下の随意性運動失調 (anterior operculum syndrome or Marie-Foix-Chavany syndrome) が臨床的に報告されている¹⁾。

以上のことから、顎口腔系感覚運動機能の評価において、関連する皮質活動性を対象に含めることの意義はたいへん大きいものと考えられる。

II. 方法

1. 光トポグラフィーによる顎口腔機能にかかわる大脳皮質機能局在の検討。

光トポグラフィー装置（日立メディコ、ETG-100）を用い、顎口腔機能にかかわる脳血流の計測を行った。計測に先立ち、一次感覚運動野の領域に相当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 30 mm, 24 CH）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、手指運動を対照運動とした。いずれの運動も安静 40 秒後 10 秒間行わせ、それを 5 回繰り返させた。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 MR 画像上に転写し、大脳皮質活動領域の同定を行った⁵⁾。

2. 下顎運動の皮質制御に関する脳磁場解析。

下顎運動にともなう一次感覚運動野の活動性に関する脳磁場解析を行った³⁾。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、カナダ CTF 社製 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。

Ⅲ. 結果と考察

1. 光トポグラフィーによる顎口腔機能にかかわる大脳皮質機能局在について.

咀嚼ならびに嚥下にともなってヘモグロビンの有意な変化がトポグラム上に示された. さらに, これを被験者個々のMR画像上に転写したところ, 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. また, それらの運動想起においても同領域に有意な脳血流の変化が示された.

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, 脳血流を指標とした顎口腔感覚運動機能のシステム評価が可能と考えた.

2. 下顎運動の皮質制御について.

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. 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. また, 下顎運動にともなう運動誘発磁界(感覚のfeed back)は, 開口運動, 側方運動ともに両側性に示された.

以上, 口腔顔面領域からの感覚 feed back が皮質運動野の活動性に対して増幅系としてかかわることからも, 一次感覚運動野における感覚性ならびに運動性磁界の両側性発現は下顎運動, 咀嚼筋の両側性協調にとってたいへんに都合のよいことと考える.

これまでの下顎運動関連脳電位に関する研究は, 下顎運動様相に応じた脳電位発現の有意な差異を報告している⁹⁾. すなわち, 下顎側方運動にともなう運動準備電位(Cz)は開口運動, 閉口運動のそれらに比べて有意に大きい. 運動関連脳電位の発現には, 感覚運動野, 前運動野, 補足運動野などの活動性がかかわっており, とくに補足運動野は運動の方向性, 複雑さ, 難しさなどに応じてその活動性を増す. また, 脳磁場解析では, 一次運動野の活動性は下顎運動の方向性によって差異を示さないことから, 下顎側方運動における運動準備脳電位の優位性には補足運動野が深くかかわるものと推察される.

Ⅳ. 結論

今後, 顎口腔機能にかかわる脳研究を推進ことにより, 顎口腔系感覚運動機能に関する包括的なシステム評価は確立され则认为る.

Ⅴ. 文献

- 1) Billeth R., Jorgler E., Baumhackl U.: Bilateral anterior operculum syndrome, *Nervenartz*, 71: 651-654, 2000.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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(抄録集), 42: 138, 2000.
- 5) 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.
- 6) Narita N., Yamamura K., Yao D., et al: Effects of reversible bilateral inactivation of primate lateral pericentral cortex on mastication. *Archs Oral Biol*, 2002 (in press).
- 7) 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, Amsterdam, 1995.
- 8) Yamamura K., Narita N., Yao D., et al: Effects of reversible bilateral inactivation of face primary motor cortex on mastication and swallowing, *Brain Res*, 2002 (in press).
- 9) Yoshida K., Kaji R., Hamano T., et al: Cortical potentials associated with voluntary mandibular movements, *J Dent Res*, 79: 1514-1518, 2000.

BILATERAL ACTIVATION OF THE PRIMARY MOTOR CORTEX ACCOMPANYING VOLUNTARY JAW MOVEMENTS: DIPOLE ANALYSIS OF MAGNETIC READINESS FIELDS

N. Narita^{1*}, H. Endo^{2,3}, T. Matsumoto¹

1. Dept of Prosthodontics, Res Inst of Oral Sci, Nihon Univ Sch Dentistry, Matsudo, Japan

2. Neurosci Res Inst, Nat Inst of Adv Industri Sci and Tech, Tsukuba, Japan

3. CREST, Japan Sci and Tech Corp, Kawaguchi, Japan

The cortical motor activities controlling symmetrical and asymmetrical jaw movements were investigated using magnetoencephalography in contrast with unilateral finger movement. All jaw movements showed the bilateral and equal activation patterns in both hemispheres, while the unilateral finger movement resulted in an asymmetrical cortical activation with contralateral dominance, especially in dominant (right) finger movement. In the temporal patterns of dipole activities preceding jaw and finger movements, the both hemispheres accompanying jaw opening and lateral jaw movements, and the contralateral hemisphere of finger movement indicated a linearly increasing of dipole activity toward movement onsets, in contrast the both hemispheres of jaw closing movement did not exhibit positive increasing of dipole activity, which probably suggests a prediction in primary motor cortex for the termination of movement by teeth contacts. Furthermore, there was no significant difference in the dipole activities between right and left hemispheres in all types of jaw movements. From these results, it is concluded that bilateral and equal activation of the primary motor cortex during not only symmetrical but also asymmetrical voluntary jaw movements may contribute to the ingenuity in actual jaw movements on the basis of bilaterally well-coordinated masticatory muscles activities.

Supported by: A Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001–Multidisciplinary Research Projects (in 2001~2005)

下顎運動の発現に対応した大脳皮質一次運動野の活動性に関する脳磁場解析

○成田紀之, 遠藤博史*, 松本敏彦, 石井智浩

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,
*産業技術総合研究所神経科学研究部門感覚認知科学研究グループ

MEG analysis for brain activity in the primary motor cortex corresponded to the occurrence of jaw movements

Narita N, Endo H*, Matsumoto T, Ishii T

Department of Removable Partial Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo and TMD/OPF Clinic, Research Institute of Oral Science, *Human Perception and Cognition Research, Group Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)

I. 目的

これまでに、非侵襲的脳活動計測法である脳磁場計測、磁気共鳴機能描図法、光トポグラフィを用いて中枢神経活動をも対象とした包括的顎口腔機能評価法の検討を行ってきた。磁気共鳴機能描図法による研究では、下顎のtappingによる一次感覚運動皮質、小脳、補足運動野、前頭弁蓋部での有意な活動性を報告し、また光トポグラフィによる脳活動計測では一次感覚運動皮質における有意なヘモグロビンの濃度変化を報告してきた。さらに、下顎運動の脳磁場解析では両側皮質活動性に関する定性的な解析結果を報告した¹⁾。今回は、随意性下顎運動の発現にかかわる一次運動野の活動性について定量的に解析したので報告する。

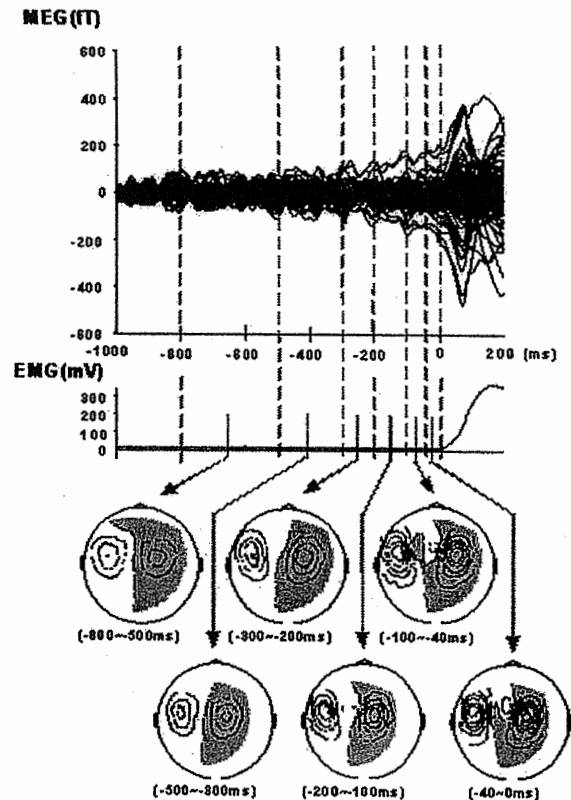
II. 方法

被験者は約5秒ごとに開口、閉口、下顎側方運動をそれぞれ100回試行した。対照運動として片側手指運動を用いた。脳磁場計測にはカナダCTF社製64 CH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。運動開始前800 msから運動開始時までの計測データを6区間で分割し、皮質活動性の偏り(laterality)ならびにその増加率について検討した(図)。

III. 結果と考察

1. いずれの下顎運動においても皮質活動性は一次運動野に推定された。また、その位置は手指運動で推定された位置より有意に外側であった。
 2. 6区間のいずれにおいても開口、閉口、側方運動にかかわる一次運動野の活動性に偏りは示されなかった。
 3. 片側手指運動にかかわる一次運動野の活動性は運動開始前200 msから対側優位であった。
 4. 一次運動野活動の増加率は、側方運動が閉口運動より有意に大きい値を示し、開口運動の値は側方運動と閉口運動との中間的値を示した。
- 以上の結果から、下顎運動の発現にともなう一次運動野の活動性は下顎運動の両側性協調への

対応と理解され、さらにその活動性には下顎の運動方向性、運動にかかわる顎筋の数、咬合による運動終止などが影響するものと考えられた。



開口運動の準備磁界と等磁界線図

IV. 文献

- 1) Narita N, Endo H. Neuromagnetic analysis of cortical activities associated with voluntary jaw movements. In: Nakamura Y, Sessle BJ, editors, Neurobiology of Mastication, From Molecular to System Approach 518-520, Amsterdam: Elsevier, 1999.

咀嚼による大脳皮質活動の賦活に関する脳波解析

—咀嚼時間による影響—

○成田紀之, 石井智浩, 船登雅彦*, 松本敏彦

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,
*昭和大学歯学部冠橋義歯学教室

Electroencephalographic analysis for cortical activation accompanying mastication
—Effects of masticatory time duration—

Narita N, Ishii T, Funato M*, Matsumoto T

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

I. 目的

咀嚼・嚥下の障害を有する患者に対する行動療法としての応用を目的に, 咀嚼・嚥下の遂行ならびにそれらの想起 (motor imagery) による大脳皮質活動の賦活様相について検討を行った。

今回は, とくに咀嚼運動の時間的要素による大脳皮質活動への影響について報告する。

II. 方法

被験者には精神神経領域に既往のない23歳から39歳までの男性5名を用いた。また, 脳波の計測には日本電気社製脳波計測装置 (SYNAFIT, NEC Co.) を用い, エレクトロキャップ (GE マルケット社製 ELECTRO-CPSYSTEM II, 19 CH) を10/20法に従って頭蓋に装着した。また, 脳波の導出は左右耳珠を基準電位として19部位から行った。咀嚼筋活動は顎二腹筋前腹および左右咬筋相当部に表面電極を貼付して双極誘導した。被験者には1, 2, 3分間それぞれガム咀嚼を行わせ, 咀嚼前, 咀嚼後における脳波周波数成分の比較検討を行った。脳波の分析はdelta, theta, alpha 1, alpha 2, beta 1, beta 2の6周波数成分について行い, 周波数解析ならびにマッピングにはATALAS (KISSEI KOMTEK) を用いた。統計解析はSigmaStat (Jandel Scientific) を用いて, 咀嚼前後の脳波を電極ごとにpaired t-testにて比較した。

III. 結果と考察

1. 1分間咀嚼前後での脳波の変化について。

前頭極においてbeta 1含有率 (%) に有意な減少が, また側頭部においてthetaの有意な上昇が示された。これまでに, ガム咀嚼においてalpha, betaの上昇, theta, deltaの低下が報告されている¹⁾。本実験の1分間咀嚼による脳波の変化にはこれまでの報告¹⁾と異なる様相が示された。

2. 2分間咀嚼前後での脳波の変化について。

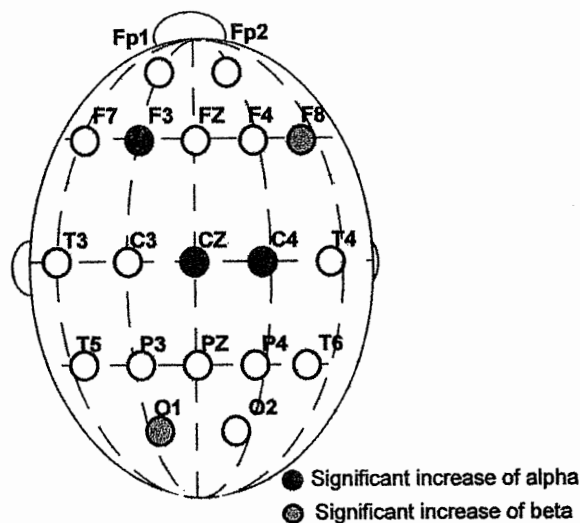
前頭部および中心領域にalpha 1の有意な上昇が示された。また, 後側頭部ではbeta 1の有意な上昇が示された。さらに, 側頭部においては

theta, deltaの有意な低下とbeta 2の有意な上昇が示された。2分間咀嚼前後による脳波の変化では, これまでの報告¹⁾と一致する傾向が示された (図)。

3. 3分間咀嚼前後での脳波の変化について。

前頭部においてtheta, alpha 1の有意な低下が, また後側頭部においてはthetaの有意な上昇が示された。これまでに, thetaの発現とdrowsiness (眠気) とのかかわりが報告されている。

以上のことから, 咀嚼の遂行によって覚醒と集中を生む可能性はあるが, それは咀嚼時間によって影響されることが確認された。



2分間咀嚼前後における脳波の変化様相

IV. 文献

- 1) Morinushi T, Masumoto Y, Kawasaki H et al, Effects on electroencephalogram of chewing flavored gum. Psychiatry and Clinical Neurosciences 54: 645-651, 2000.

咀嚼による大脳皮質活動の賦活に関する脳電位の周波数解析 —とくに顎関節クリックを有する顎機能障害者と健常者との比較—

Cortical activation accompanying mastication using spectrum analysis of electroencephalography, especially comparing TMDs with joint clicking and healthy subjects

成田 紀之¹, 石井 智浩¹, 松本 敏彦¹

¹ 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

【目的】本研究においては、顎関節にクリックを認める顎口腔機能障害者を対象として、咀嚼前後における脳波の変化について検討を行った。【方法】被験者には精神神経的疾患に既往のない男性5名を用いた。脳波の計測には日本電気社製脳波計測装置 (SYNAFIT, NEC Co.) とエレクトロキャップを用いた。被験者にはガムを2分間咀嚼させ、咀嚼前後の脳波を比較した。脳波は delta (D), theta (T), alpha 1 (A1), alpha 2 (A2), beta 1 (B1), beta 2 (B2) の6周波数成分について分析を行った。【結果と考察】1. 健常者における脳波の変化：前頭極においては B2 の上昇, T の低下を示した。前頭部では A2, B2 の上昇と T, D の低下を示した。また、中心領域および頭頂部では A2 の上昇と T の低下を示した。後頭部では B2 の上昇を示し、側頭部では B2 の上昇と T の低下を示した。2. 顎機能障害者における脳波の変化：前頭部では A2 の低下傾向、中心領域では B2 の上昇、頭頂部では B1 の低下と T の上昇、また後頭部では A2 の低下と T の上昇傾向を示した。側頭部では B1 の低下と T の上昇、さらには D の上昇傾向を示した。健常者の咀嚼前後における皮質活動性と対比すると、顎機能障害者では、とくに前頭皮質領域の活動性に積極的な賦活は示されなかった。顎機能障害者における前頭領域の皮質活動性の変調には顎関節の障害に対する不快あるいは不安といった情動的要素のかかわりが推察される。

口腔顔面領域の触感覚受容性に対する咀嚼筋痛の影響に関する実験的研究

Experimental study on effects of masticatory muscle pain to tactile sensation of orofacial region

成田 紀之¹, 遠藤 博史², 石井 智浩¹, 松本 敏彦¹

¹ 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, ² 産業技術総合研究所

【目的】 口腔顔面痛に伴う感覚異常の発現を解明するため, 実験的に咀嚼筋痛を誘発して, 口腔顔面痛がいかに触感覚受容性を変調するものか検討した。

【方法】 被験者には本学教員を用いた。咀嚼筋痛の発現は, 左側咬筋筋腹に0.9%の生理的食塩水, 3%および5%の高張性食塩水の各0.5mlを注入して行った。口唇の触感覚刺激には air puff 刺激装置を用い, 刺激に同期した触感覚誘発電位を Cz, C3, C4で計測し, その500回を加算した。加算波形の検討は, 咬筋痛発現前後の誘発電位様相を比較して行った。また, 疼痛の評価には VAS を用いた。**【結果と考察】** 疼痛誘発前の誘発電位波形には陰性ピークとそれに引き続く陽性ピークの短潜時波形成分がいずれの被験者においても観察された。高張性食塩水の注入により誘発電位は低下傾向を示したが, そのうち疼痛の軽減にともない誘発電位は注入前の様相に回復する傾向を示した。以上, 咀嚼筋痛の誘発により口唇の触感覚誘発電位は抑制傾向を示した。その理由としては, 咀嚼筋痛の発現に伴う下降抑制系の駆動が, 二次ニューロンレベルでの疼痛情報にあわせて触覚情報をも伝達抑制し, したがって口唇部の触感覚は鈍麻化したものと推察される。

口唇の触感覚受容性に対する Cold Pressor の影響

Effects of cold pressor to tactile sensation of lip

成田 紀之¹, 遠藤 博史², 石井 智浩¹, 松本 敏彦¹

¹ 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, ² 産業技術総合研究所

【目的】本研究は口腔顔面部の触感覚受容性に対する交感神経活動の関与を明らかにする目的から、体性感覚誘発電位に対する手指冷刺激(Cold Pressor)の影響を検討した。【方法】本学教員6名を被験対象とした。口唇の触感覚刺激には air puff 刺激装置を用いて、口唇刺激に同期した体性感覚誘発電位を Cz, C3, C4 から導出した。誘発電位の加算は冷却前、冷却中、冷却後のそれぞれ200回行った。また、各誘発電位の計測時間は約1分40秒間である。手指の冷却には4℃の冷水を用い、片側の手指を浸漬して、交感神経の興奮を誘発した。【結果と考察】冷却前の誘発電位波形には陰性ピークとそれに引き続く陽性ピークの短潜時波形成分がいずれの被験者においても観察された。安静時に観察された誘発電位は手指の冷却によってその活動性を明らかに上昇した。また、手指の加温によって冷却前の様相に回復した。以上、手指の冷却によって口唇の触感覚受容性が上昇したことから、口唇触感覚受容性の亢進には交感神経活動が深く関与すると推察される。

EXPERIMENTAL STUDY FOR THE EFFECTS OF MASTICATORY MUSCLE PAIN TO THE TACTILE SENSATION FROM HOMOTOPICAL OROFACIAL REGION

N Narita^{1,2}, H Endo³, T Ishii¹, T Matsumoto^{1,2}

¹Department of Removable Partial Prosthodontics and TMD/Orofacial Pain Clinic, Nihon University School of Dentistry at Matsudo; ²Research Institute of Oral Science, Matsudo, Chiba; ³Human Perception and Cognition Research Group, Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Ibaraki

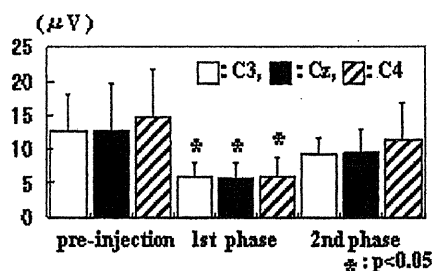
Objectives: We investigated whether the activity of somatosensory cortex, evoked by the air puff stimulation to lower lip region, could be modulated by the experimental masticatory muscle pain induced by the injection of hypertonic saline. Clinically, chronic pain patients complain hypersensitivity/ allodynia and hyposensitivity/ hypoesthesia in a remarkable individual variation (Moriyaki and Yuge, 1999). For the understanding of neuropathological backgrounds of hypersensitive/ allodynia, so many researches have been conducted and could reach to the modern concepts of neuropathic pain mechanisms on the bases of peripheral and central sensitization involved in all types of neuropathy deficits in central inhibition mechanisms. On the other hand, it is considering that hyposensitivity/ hypoesthesia, as an essential part of neuropathic pain, are a loss of afferent sensory function and the paradoxical presence of certain hyper phenomena in painful area. This study was especially conducted to clarify the effects of masticatory muscle pain to the somatosensory evoked potentials (SEPs) by means of air puff stimulation.

Methods: Nine volunteers were included in this study. Air puff stimulator, that is applicable to evoke tactile sensation from lower lip surface, was composed with the PC controller and a solenoid operated valve for air jet. Stimulus conditions were as follows: 1) Maximum stimulus intensity: 12[kPa]=0.12 [kgf/cm²], 2) Raising time of stimulus: 2 ms, 3) Stimulus duration: 5 ms (over 50% of maximum), 4) Internal stimulus interval (ISI): 300~700 ms using random function. Synchronizing with the onset of air puff stimulation, SEPs were recorded from C3, Cz and C4 electrodes and averaged up to 500 times in pre-injection period, first and second phases of post-injection periods, respectively. Each recording time was about 4 minutes. Masticatory muscle pain was evoked by the injection of isotonic (0.9 %, 0.5 ml) and hypertonic saline (5 %, 0.5 ml) into left masseter muscle. VAS for pain sensation and autonomic responses such as body temperature, pulse, and blood flow, were also measured.

Results: SEPs were composed of two components, i.e., N20, P30. Peak latencies and peak amplitudes of N20 and P30 and peak to peak amplitude of N20/P30 were analyzed. By the injection of isotonic saline (0.9 %) into masseter muscle, peak latencies and peak amplitudes of N20 and P30 and peak to peak amplitude of N20/P30 were not significantly altered. Also, body temperature, pulse and blood flow were not changed by the injection of isotonic saline. While, especially during the first phase of post-injection period of hypertonic saline (5 %), all of peak amplitudes in SEPs, i.e., peak amplitudes of N20 and P30 and peak to peak amplitude of N20/P30, significantly decreased ($p < 0.05$, One-way ANOVA and Tukey test or One-way ANOVA on Rank and Dunn's method). Also, pulse and blood flow significantly decreased ($p < 0.05$, One-way ANOVA and Tukey test) with hypertonic saline. The Figure is showing significant decreases of the peak to peak amplitudes in SEPs during first phase of post-injection period. Concerning peak latencies of N20 and P30, there was not significant alteration with hypertonic saline. Stohler et al., (2001) presented that experimental masticatory muscle pain inhibits the face cutaneous touch sensation by means of monofilaments, which is consistent with the results in this study. Furthermore, this study is presenting the further evidences for the pathofunctional interrelationships between tactile input from perioral region and masticatory muscle pain on the basis of quantitative analyses of somatosensory cortical potentials. As a control study, we previously analyzed the effect of cold pressor test, which activates sympathetic nerve system, to the tactile sensation from orofacial region. SEPs evoked by air puff stimulation to the lip surface were significantly enhanced ($p < 0.05$, One-way ANOVA on Rank and Dunn's method) by hand immersion into cold water (4 °C), accompanying with the significant ($p < 0.05$, One-way ANOVA and Tukey test) decreases of blood flow and body temperature. Therefore, it is considerable that pain sensation from muscle may cause the inhibitory effects to the tactile sensation.

Conclusions: Masticatory muscle pain may diminish the tactile sensation from homotopical orofacial region depending on its severity of pain.

This study was supported by: the Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects and the Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education 14571865, Japan.



Peak to peak amplitude of N20/P30 during pre-injection, 1st and 2nd phases of post-injection periods.

咀嚼筋痛ならびに交感神経活動は口唇の触覚誘発電位を変調するか？

○佐藤紗織, 成田紀之, 遠藤博史*, 石井智浩, 石塚あづさ, 長野裕行**, 松本敏彦

日本大学松戸歯学部歯科補綴学第三講座, *産業技術総合研究所, **日本大学松戸歯学部歯科補綴学第二講座

Do Masticatory Muscle Pain and Sympathetic Nerve Activation Modulate Lip Tactile Sensory Evoked Potentials?

Sato S, Narita N, Endo H*, Ishii T, Ishizuka A, Nagano H**, Matsumoto T

Department of Removable Partial Prosthodontics Nihon University School of Dentistry at Matsudo, *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, **Department of Crown and Bridge Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

I. 目的

咀嚼筋深部痛ならびに交感神経活動にともなう口腔顔面の表在感覚の過敏あるいは鈍麻といった感覚異常に関する臨床的実験研究として、高張性食塩水の咀嚼筋への注入ならびに手指冷却が口唇の触覚受容性に影響を及ぼすものか検討を行った。

II. 方法

被験者には本学教員9名(27~39 Y)を用いた。咀嚼筋痛の誘発は、左側咬筋に0.9%の生理的食塩水ならびに5%の高張性食塩水をそれぞれ0.5 ml注入して行った。一方、手指の冷刺激には左側手指を4℃の冷水に浸漬して行った。触覚刺激はair puff刺激装置を用いて口唇に行った。口唇の触覚刺激に同期した体性感覚誘発脳電位(SEP)を電極部位Cz, C3, C4から導出した。

SEP計測は、咀嚼筋痛の誘発において、痛み誘発前(安静)にSEPを500回加算し、さらに筋痛誘発後に500回の加算を2回繰り返した。一方、手指の冷却によるSEPの計測では、冷却前(安静)、冷却中、加温後、それぞれにSEP加算を200回行った。SEP波形の解析は潜時と振幅について、咀嚼筋痛誘発ならびに手指の冷却刺激前後における比較検討を行った。さらに、自律神経応答として指尖血流、脈、体温も同時に計測し、疼痛の評価にはVASを用いた。

III. 結果と考察

1. 安静時の口唇触覚刺激により誘発されるSEP波形にはN20とP30の波形成分が観察された。

2. 咬筋への高張性食塩水の注入によりN20, P30成分の潜時は影響されなかったが、疼痛誘発時のN20とP30の振幅はいずれも安静に比べて有意な低下を示した。また、疼痛の消失にともなって波形の振幅は疼痛誘発前の様相に回復する傾向を示した(図)。

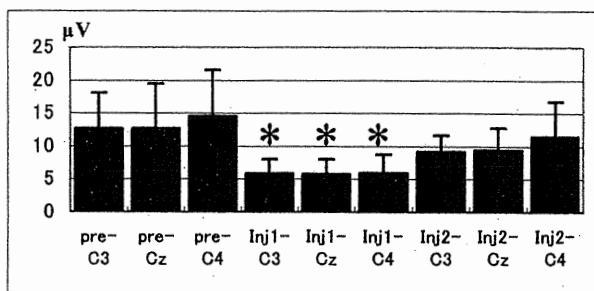
3. 咬筋への高張性食塩水の注入により指尖血流ならびに体温は、安静に比べて有意に低下した。

4. 手指の冷却による影響では、冷却時にSEP

波形のN20とP30の振幅は、安静に比べて有意に上昇した。また、手指の加温化によってN20, P30成分の振幅は冷却前の様相に回復する傾向を示した。

5. 手指の冷却によって、指尖血流ならびに体温は、注入前(安静)に比べて、有意に低下した。

以上のことから、高張性食塩液による咀嚼筋痛の誘発が口唇触覚受容性を有意に抑制したことについては、C線維ならびにAδ線維を介する疼痛情報がAβ線維を介する触覚受容性を抑制した結果であり、疼痛と触覚かかわり¹⁾、すなわちtouch gateと推察される²⁾。一方、手指の冷却による口唇の触覚の有意な上昇は、cold pressorがもたらす交感神経系の興奮³⁾を介する触覚情報伝達の亢進による影響と推察される。



5%高張性食塩水によるSEPの変化

IV. 文献

- 1) Stohler CS, Kowalski CJ, Lund JP. Muscle pain inhibits cutaneous touch perception. Pain 92: 327-333, 2001.
- 2) Tran TD, Hoshiyama M, Inui K, et al. Electrical-induced pain diminishes somatosensory evoked magnetic cortical fields. Clin Neurophysiol 114: 1704-1714, 2003.
- 3) Antony I, Aptekar E, Lerebours G, et al. Coronary artery constriction caused by the cold pressor test in human hypertension. Hypertension 24: 212-219, 1994.

咀嚼・嚥下時の大脳皮質Hbマッピングにおける咀嚼筋血液成分の除去とその臨床的意義

○石塚あづさ, 成田紀之, 川崎真護*, 遠藤博史**, 石井智浩, 佐藤紗織, 松本敏彦

日本大学松戸歯学部歯科補綴学第三講座, *日立メディコ, **産業技術総合研究所
Elimination of Muscle Blood Factor in the Mapping of Blood Volume of Hb in the Cerebral Cortex during Mastication and Swallowing, and Its Clinical Significance

Ishizuka A, Narita N, Kawasaki S*, Endo H**, Ishii T, Sato S, Matsumoto T
Department of Removable Partial Prosthodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo,
*Hitachi Medical Corporation, **National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

I. 目的

これまで咀嚼ならびに嚥下運動にかかわる脳活動計測法の日常臨床における確立を目的として、非侵襲的計測法である光トポグラフィーを用いた検討を行ってきた。とくに咀嚼時においては、咀嚼野ならびに一次感覚運動皮質領域のHb(ヘモグロビン)濃度の計測に際しては側頭筋血液の干渉を認める。今回、主成分分析法を用いることで、咀嚼・嚥下時の大脳皮質Hb計測データからの筋血液成分の除去を試み、その結果をもとに臨床的意義を考察した。

II. 方法

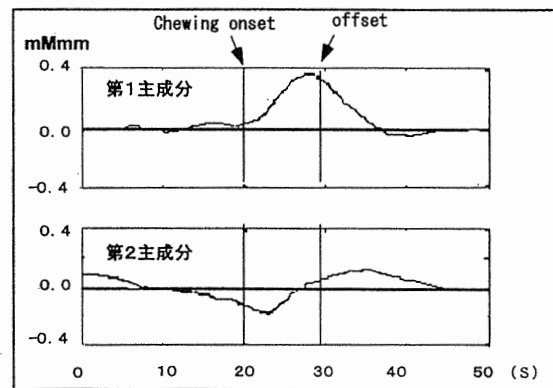
光トポグラフィー(NIRS: near infrared spectroscopy; ETG-100 HITACHI)により、咀嚼・嚥下時の大脳皮質Hb濃度の計測を行った。計測に先立ち、一次感覚運動皮質ならびに咀嚼・嚥下野を含む頭蓋領域にプローブ(照射-検出間30 mm, 24 CH)を装着した。いずれの運動も安静40秒後に10秒間行わせ、それを5回繰り返した。データの加算処理は運動前、後における安静20秒間と運動10秒間を対象とした。計測された全被験者の総Hb濃度のデータを加算平均したのち、主成分分析による解析を行った。さらに、画像表示システムを介して、この解析結果から得られたHbトポグラフを脳磁気共鳴描画(f-MRI)上に転写してその機能局在を検討した。

III. 結果と考察

1. 咀嚼時のHb濃度データにおいて、第1主成分は咀嚼運動における典型的な変化パターンを示した。一方、第2主成分は運動とともにHb濃度が低下し、さらに運動後に上昇するといった筋血液を示唆する経時的変化を示した(図)。第1主成分トポグラフのf-MRI上における局在は、咀嚼野ならびに一次感覚運動皮質領域に一致した外側領域から内側皮質領域に及ぶ広範な分布パターンを示した。一方、第2主成分の局在はトポグラフの最外側部に示され、Hb濃度の経時的変化パターンを考え合わせると側頭筋血液成分と推察された。

2. 嚥下時のHb濃度データにおける第1主成分は運動発現に先立って上昇し、また内側皮質領域に局在したことから、運動の企画にかかわる補足運動野の活動性と考えられた。一方、第2主成分は外側皮質領域に示され、さらに明らかな側頭筋のHb変化様相を示さないことから、嚥下野ならびに一次感覚運動皮質の活動性と推察された。

これまでの基礎研究は咀嚼・嚥下運動における皮質制御の意義を報告している^{1,2)}。本研究においてはヒト咀嚼・嚥下時の脳活動マップから筋血液の干渉を統計学的に排除できたことは、今後NIRSマッピングを補綴臨床に用いることで、咀嚼・嚥下時の皮質活動性を可塑的変化として評価できるものと考えられる。



咀嚼時におけるHb濃度の経時的変化

IV. 文献

- 1) 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.
- 2) Narita N, Yamamura K, Yao D, et al. Effects of functional disruption lateral pericentral cortex on primate swallowing. *Brain Res* 824: 140-145, 1999.

2431 Cognitive Modulation of the Occlusal Condition in the Sub-clinical TMDs

*N. NARITA*¹, K. KINO², T. ISHII¹, T. HAKETA², T. MATSUMOTO¹, and T. ISHIKAWA², ¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan, ² Tokyo Medical & Dental University, Japan*

Objectives: This study was conducted to clarify whether TMJ-pain could be related with cognitive modulation of the occlusal condition in the sub-clinical TMDs. Methods: Students in Nihon University (N=135, age: 20~24) were subjected in this study. Adding physical examination of stomatognathic conditions, numerical rating scales (NRS) were also used to assess the extra-oral conditions, such as jaw movement difficulty, TMJ-pain and TMJ-noise, and the intra-oral condition and awareness of bruxism. Psychological states were also assessed with Hospital Anxiety and Depression Scale. Furthermore, examinations for mechanical occlusal contact status, such as total force and total area during maximal jaw clenching, were conducted with Dental Pre-scale (Fuji Film Co., Japan). Multivariate Logistic Regression Analysis and One-way ANOVA were applied to the statistical analyses. Results: 1) Twenty one (15.6 %) subjects were aware of TMJ-pain during jaw movement. 2) The manifestations of TMJ-pain were significantly related with the awareness of jaw movement difficulty (odds ratio: OR= 386.910, p=0.00) and NRS concerning occlusal comfort (OR=0.561, p=0.02) (Multivariate Logistic Regression Analysis). 3) NRS concerning the occlusal comfort in the subjects with TMJ-pain (mean+/-SD: 3.86+/-2.67) was significantly lower than that in the subjects without TMJ-pain/noise (6.33+/-2.58) (One-way ANOVA and Dunn's Method, p<0.05). 4) With regard to total occlusal force, total occlusal area and psychological states of anxiety and depression, no significant difference was found between the subjects with and without TMJ signs. Conclusion: These associations suggest that the cognition concerning occlusal condition may be modulated with the manifestation of TMJ-pain even in the sub-clinical TMDs, in which the mechanical occlusal status and the psychological factors may not be necessary to participate. This study was supported by the Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects and Suzuki Memorial Grant of Nihon University School of Dentistry at Matsudo (03-1016).

Seq #257 - TMD and Orofacial Pain

2:00 PM-4:00 PM, Friday, 11 March 2005

Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

Back to the Neuroscience / TMJ Program

Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session (March 9-12, 2005)

噛みしめ疲労に対するスプリントの影響

○成田 紀之¹, 船登 雅彦², 石井 智浩¹, 内田 貴之³,
伊藤 誠康¹, 小林 久純¹, 松本 敏彦¹

¹日本大学松戸 歯学部 顎咬合機能治療学講座, ²昭和
大学 歯学部 歯科補綴学教室, ³日本大学 松戸歯学部
歯科総合診断学講座

【目的】 噛みしめ疲労に対するスプリントの効果ならびにその材質による差異を検討した。**【方法】** 本学学生6名を対象に1分間の最大噛みしめを30秒間の休止を挟んで5回繰り返させた。また、噛みしめ課題前ならびに噛みしめ課題後において、Dental Prescaleによる咬合測定ならびに疲労感の評価(VAS)を行った。また、同時に噛みしめ課題中に脳波測定を行い、噛みしめ疲労にかかわる脳波パターンの評価も行った。**【結果】** 1) 噛みしめ課題後の疲労感は軟性ならびに硬性スプリント装着によって有意に増加した。2) 噛みしめ課題前の咬合測定では、非装着ならびに硬性スプリント装着では咬合接触面積の有意な差異を示さなかったが、軟性スプリント装着では有意に増加した。3) 噛みしめ課題前後の咬合接触面積の比較においては、非装着ならびに硬性スプリント装着は有意な差異を示さなかったが、軟性スプリント装着は噛みしめ課題後に有意な減少を示した。4) 非装着ならびに硬性スプリント装着は噛みしめ課題後の咬合力に有意な差異を示さなかったが、軟性スプリント装着は噛みしめ課題後の咬合力に有意な低下を示した。5) 軟性スプリント装着時の脳波は非装着ならびに硬性スプリントとは異なる変動パターンを示した。**【結論】** 軟性、硬性スプリントのいずれの装着によっても噛みしめ疲労感は有意に高まるが、それらの心理的影響には差異がうかがわれた。

顎関節痛と噛み合わせ感覚

○神谷 和伸¹, 成田 紀之^{1,2}, 木野 孔司³,
羽毛田 匡³, 石川 高行³, 杉崎 正志⁴, 石井 智浩¹,
若見 昌信², 大久保 昌和^{1,2}, 松本 敏彦^{1,2}

¹日本大学松戸 歯学部 顎咬合機能治療学講座, ²日本大学 松戸歯学部 附属歯科病院 顎関節咬合科, ³東京医科歯科大学 歯学部 附属歯科病院 顎関節治療部, ⁴東京慈恵会医科大学 歯科学教室

【目的】顎関節症・口腔顔面痛患者の疼痛症状は顎口腔顔面の運動機能ばかりか感覚機能をも障害する。とくに疼痛症状とかかわる感覚機能の障害は触覚過敏あるいは鈍麻として数多くの報告がなされている。しかしながら、口腔感覚、なかでも噛み合わせ感覚については報告も少なく、顎関節痛とのかかわりから評価した報告はない。そこで、顎関節痛の有無と噛み合わせ感覚の差異について検討を行った。**【方法】**対象は本学学生135名である。噛み合わせ感覚ならびに顎関節雑音、顎関節疼痛、開口障害、歯軋りなどの自覚をNumerical Rating Scale (NRS: 0 ‘まったくない’ ~ 10 ‘非常にする’あるいは0 ‘まったくよくない’ ~ 10 ‘非常によい’)にて評価するとともにDental Prescaleによる咬合診査ならびに心理テスト (HADS) を行った。**【結果】** 1) 顎関節痛を自覚する被験者は、自覚しない者と比較して、顎関節の疼痛、歯軋りなどのNRSに有意に大きい値 (すなわち ‘より痛く、よくする’) を示した。 2) 顎関節痛を自覚する被験者は、自覚しない者と比較して、噛み合わせ感覚のNRSに有意に小さい値 (すなわち ‘わるい’) を示した。 3) 咬合検査ならびに心理テストにおいては、顎関節痛を自覚している被験者と自覚しない者との有意な差異は示されなかった。**【結論】** 顎関節痛と噛み合わせ感覚の低下とに関連が考えられた。

咬合違和感を強く訴える顎関節症の治療経験

○成田 紀之¹, 木野 孔司², 和氣 裕之³, 羽毛田 匡², 石川 高行², 杉崎 正志⁴, 松本 敏彦¹

¹日本大学松戸 歯学部 顎咬合機能治療学講座, ²東京医科歯科大学 歯学部 附属歯科病院 顎関節治療部, ³日本大学 松戸歯学部 顎咬合形成外科学講座, ⁴東京慈恵会医科大学 歯科学教室

【目的】顎頸筋痛, 開口障害ならびに咬合違和感を訴える顎関節症2例の治療経験を報告する。**【方法】**多元的評価質問票を用いて, 顎機能病態の包括的診断を行い, 薬物療法ならびに精神療法を適応した。**【結果】**いずれも日中での上下歯の接触癖, 夜間の噛みしめ・歯軋りがうかがわれ, 睡眠時の中途覚醒ならびに起床時の顎肩筋疲労を自覚していた。開口時に咬筋痛ならびに顎頸筋に圧痛を示し, 無痛開口域は症例Aで25mm, 症例Bで31mmであった。ともに噛み合わせの違和感は強くVAS 100mm (耐え難い) に対して症例Aで95と症例Bで88であった。以上の所見をもとに, 1) 噛み癖の是正指導, 開口訓練ならびに睡眠不良と夜間の噛みしめに対処するため抗不安薬を処方した。その後, 無痛開口域は健常域にまで拡大したが, 違和感は症例Aでは疼痛発現以前のレベルの70に低下したが, 症例Bでは変化を示さなかった。2) その後, 症例Aでは抗うつ薬の追加処方とともに簡易精神療法を行い, 違和感は4にまで減少した。3) 症例Bでは抗不安薬のかわりに抗うつ薬を処方し違和感は疼痛増悪前のレベル63に低下した。このとき心療内科の受診を希望したため, 心療内科に継続的処方を依頼し, 違和感は4に減少した。**【結論】**口腔感覚の異常, なかでも噛み合わせ違和感を強く訴える顎関節症患者に対する向精神薬の処方と精神療法の有用性が示唆された。

1239-P109 THE EFFECT OF SHOULDER MUSCLE PAIN ON LIP TACTILE SENSITIVITY

Noriyuki Narita¹, Tomohiro Ishii¹, Hiroshi Endo² and Toshihiko Matsumoto¹. ¹Stomatognathic Science and Occlusion, Nihon Univ School of Dentistry at Matsudo and Research Inst of Oral Science, Matsudo, Japan and ²Human Perception and Cognition Research Group, National Inst of Advanced Industrial Science and Technology, Tsukuba, Japan (Spon: Noriyuki Narita)

Aim of Investigation: We have previously described the inhibitory effects of jaw muscle pain on lip tactile sensitivity. This study was to further investigate whether shoulder muscle pain can modulate lip tactile sensation.

Methods: Nine volunteers were subjects of this study. An air puff stimulator was applied to evoke tactile sensation from the lower lip surface. Shoulder muscle pain was evoked by the injection of isotonic (0.9%, 0.5 ml) and hypertonic saline (5%, 0.5 ml) into the left trapezius muscle. Somatosensory evoked potentials (SEPs) were recorded from EEG electrodes C3, Cz, and C4 and averaged up to 500 times during the pre-injection period, and during the first and second phases of the post-injection period. Each recording time was about 4 minutes. Autonomic responses were also measured.

Results: Following injection of isotonic saline (0.9%) into the trapezius muscle, SEP amplitudes and autonomic responses such as body temperature, pulse, and blood flow did not change significantly. Following injection of hypertonic saline, however, pulse and blood flow were significantly decreased ($p < 0.05$, one-way ANOVA and Tukey test), but SEP amplitudes were not significantly changed.

Conclusions: Site characteristics indicated that heterotopic shoulder muscle pain does not modulate tactile sensation in the orofacial region.

Acknowledgements: This study was supported by: the Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects and the Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education 14571865, Japan.

THE EFFECT OF THE COLD PRESSOR TEST ON OROFACIAL TACTILE SENSATION

NORIYUKI NARITA*, TOMOHIRO ISHII, HIROSHI ENDO,
TOSHIHIKO MATSUMOTO

NIHON UNIVERSITY SCHOOL OF DENTISTRY AT MATSUDO,
MATSUDO, JAPAN

(nnarita@mascat.nihon-u.ac.jp)

Objectives: It has been reported that cold pressor effects cause ischemia in the masticatory muscles via sympathetic nerve activation. However, the effect of sympathetic nerve activation on the sensory input in the orofacial region is still unclear.

Methods: Ten healthy subjects participated in this study. An air puff stimulator, consisting of a PC controller and a solenoid-operated valve controlling an air jet, was used to evoke tactile sensation on the lower lip surface. Somatosensory evoked potentials (SEPs) were measured from EEG electrode positions C3 and C4, and recorded up to 200 times during rest, cold pressor, and re-warm periods. The cold pressor test was conducted by immersion of the left hand in cold water at 4°C for 100 seconds. SEP peak latency and amplitude were analyzed and compared among the rest, cold and re-warm periods. Spectrum analysis was conducted to estimate the modulation of SEP frequency characteristics by sympathetic nerve activation.

Results: During the cold pressor test, SEP amplitudes were significantly increased when compared with the pre-immersion rest period (one-way ANOVA and Tukey Test). SEP amplitudes returned to pre-immersion levels during the re-warm period. The spectral pattern of highly activated SEPs during the cold pressor test indicated facilitation in the broad frequency components of SEPs.

Conclusions: These results suggest that tactile sensory input in the orofacial region may be enhanced by the sympathetic nervous system.

Acknowledgments: This study was supported by: the Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects and the Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education 14571865, Japan.

酪酸によるFas/FasL系非依存性T細胞アポトーシスの誘導

○栗田智子¹、落合邦康²、櫻井亜希子¹、福島和雄¹
(日本大・松戸歯・細菌¹、明海大・歯・微生物²)

<目的>揮発性脂肪酸（VFA）は腸内細菌叢の主な構成菌や歯周病原性菌である嫌気性グラム陰性桿菌が産生する主な最終代謝産物の一つである。我々は主要構成VFAである酪酸がヒト及びマウスT・B細胞に対しアポトーシスを誘導することを報告した。今回は酪酸誘導T細胞アポトーシスにおけるFas/FasLやセラミド、活性酸素（ROS）の関与並びにCaspase（Cap）8及び9活性に及ぼす影響について検討した。

<方法>Jurkat及びPBMC-T細胞表層上のFasの発現はFITC標識抗体を用いてflow cytometryで分析した。更にFas/FasLの局在をWestern blot（WB）法により測定した。細胞抽出液中のCas8及び9活性は基質を用い蛍光光度計にて測定した。更に、阻害剤を用いて酵素活性及びアポトーシスに対する影響を検討した。セラミド及びROSの関与は合成阻害剤や抗酸化剤処理により測定した。

<結果>いずれの細胞もFasを恒常的に発現し、その発現率は酪酸添加の影響を受けなかった。更にWB上でのFas/FasL発現においても酪酸添加の影響は認められなかった。抗Fas及び抗FasL抗体の添加は酪酸誘導アポトーシスに影響を与えなかった。経時的なCas8及び9の活性化が酪酸及びFas誘導アポトーシスにおいて認められ、それらの活性は阻害剤により抑制された。酪酸誘導アポトーシスにおいてはセラミドの関与は認められないものの、抗酸化剤処理によりアポトーシスが抑制された。

<考察>酪酸誘導アポトーシスにおいてはFas/FasL系の関与は少なく、Cas8及び9の活性化並びにROSの産生が重要な役割を果たしていることが示唆された。

HUMAN GINGIVAL FIBROBLASTS RESCUE BUTYRIC ACID-INDUCED T CELL APOPTOSIS

Tomoko Kurita-Ochiai¹, Kuniyasu Ochiai², Kazuo Fukushima¹. ¹*Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo-shi, Chiba-ken, Japan,* ²*Meikai University School of Dentistry.*

Volatile fatty acids (VFA) are a major by-product of anaerobic metabolism and can be detected in gingival fluid from periodontal pockets. In this study, the contribution of gingival fibroblast to the regulation of T cell death induced by butyric acid is assessed using cell to cell interaction system. The results of DNA fragmentation assay indicated that butyric acid did not induced apoptosis in human gingival fibroblasts (Gin 1, F41G, and H. pulp). Butyric acid significantly increased IL-6, IL-8, and IL-11 production in the supernatant of these fibroblasts. Co-culturing Jurkat cells with F41G or Gin-1 using pore-filled culture insert (inter cup) attenuated butyric acid- or Fas-induced Jurkat cell apoptosis. IL-6 and IL-8 slightly stimulated butyric acid- or Fas-induced Jurkat cell apoptosis in a dose-dependent manner, although a low dose of IL-8 slightly inhibited the apoptosis. In contrast, IL-11 significantly suppressed butyric acid- or Fas-induced apoptosis dose-dependently. These results suggest that the sum of their effects of the inflammatory cytokines such as IL-6, IL-8 and IL-11, produced in fibroblast by butyric acid, are concerned in the attenuation of T cell apoptosis by gingival fibroblast. Supported by a Grant-in-aid (11671818) from the ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan.

Butyric acid-induced apoptosis in p53 deficient mice. T. Kurita-Ochiai^{*1}, K. Ochiai² and K. Fukushima¹ (¹Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo, Chiba and ²Meikai Univ. School of Dentistry, Saitama, Japan):

Butyric acids, an extracellular metabolite from periodontopathic bacteria, induces apoptosis in murine thymocytes, splenic T-cells, and human Jurkat T-cells. The present study examines the contributions of apoptosis-related proteins (Bcl-2 , Bcl-XL, Bax and p21^{WAF1/CIP1}) in the regulation of T-cell death induced by butyric acid, using p53 knock-out (p53^{-/-}) and wild-type (p53^{+/+}) mice. The results of a DNA fragmentation assay indicated that thymocytes, splenic-T cells, and B-cells from p53^{-/-} mice were susceptible to butyric acid-induced apoptosis to a degree similar to those from p53^{+/+} mice. Experiments with fractionated subpopulations of splenic T-cells revealed that DNA fragmentation was equally observed in CD4⁺ and CD8⁺ splenic T-cells from both p53^{+/+} and p53^{-/-} lymphocytes. Activation of caspase-3, caspase-6, and caspase-8, but not of caspase-1, in butyric acid-induced T-cell apoptosis occurred regardless of the presence of p53. Western blotting analysis of splenic T-cells showed that butyric acid treatment decreased Bcl-2 and Bcl-XL expressions in p53^{+/+} and p53^{-/-} cells. Splenic T-cells had barely detectable Bax and p21^{WAF1/CIP1}, regardless of whether butyric acid and/or p53 was present. These results suggest that butyric acid-mediated apoptosis of murine T-cells takes place via a pathway that is independent of p53, and is followed by the p53-regulated proteins Bax and p21^{WAF1/CIP1}, which lower the levels of the apoptosis antagonists Bcl-2 and Bcl-XL in cells.

細菌代謝産物による細胞死の誘導

栗田 智子

日大・松戸歯・細菌学

短鎖脂肪酸(SCFA)は、成人性歯周炎の代表的原因菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Prevotella* 属および *Fusobacterium* 属など偏性嫌気性菌の最終代謝産物であり、成人性歯周疾患患者の歯肉溝液中から高濃度に検出される。SCFA は多くの細胞に為害作用を示すことが報告されているため、歯周組織の歯肉溝内皮細胞に隣接して多く存在するT細胞がSCFAによってどのような影響を受けるか検討することは興味深いと考える。また近年、細胞死の新たな様式としてアポトーシス(細胞自滅)いわゆるプログラムされた細胞死が生体の恒常性のみならず多くの疾患に関与していることが判明し注目されている。

我々は歯周病原細菌が免疫応答に及ぼす影響についての研究の一環としてそれらの培養上清が著しい免疫抑制活性を有することを認め、その活性本体が揮発性脂肪酸(VFA)に起因していることを見出した。さらに、VFAの抑制メカニズムを追求する過程において我々は、主要構成VFAである酪酸がマウスおよびヒトT・B細胞に対し、Caspase 3の活性化を介するアポトーシスを誘導することを認めた。また、酪酸誘導アポトーシスはProtein kinase Cを介して、また細胞周期のG1期での停止を誘導した。更に、酪酸はヒト末梢血T細胞に対してもアポトーシスを誘導したが、細胞内でのシグナル伝達因子に関してはほとんど解明がなされていない。酪酸は、ヒストンの脱アセチル化を阻害することによりクロマチン構造及び遺伝子発現の変化を引き起こすことが報告されているが、アポトーシス誘導の詳細なメカニズムについては検討されていない。そこで歯周病原細菌代謝産物であるVFAによるヒト及びマウスT細胞に対するアポトーシス発現機構が、アポトーシス関連遺伝子によりどのように制御されているのか検討を行った。酪酸誘導アポトーシスにおいては、Fas/FasL や p53に関係なくCaspase8 およびCaspase9の活性化が認められ、またBcl-2ファミリー遺伝子の解析から酪酸は、Bcl-2 やBcl-XLの発現を抑制するもののBax発現に対しては影響を与えなかった。更にROS阻害剤に対する影響から酪酸誘導T細胞アポトーシスは活性酸素の産生を介してCaspaseファミリーを活性化し、その結果CADの活性化を伴うDNAの断片化を引き起こすものと考えられる。一方シグナル伝達の解析から、酪酸誘導アポトーシスは古典的なMAPKカスケードであるERK活性を抑制し、その一方で物理化学的ストレスのシグナル伝達系として機能するJNK及びp38を活性化した。これらの結果から酪酸誘導T細胞アポトーシスにおけるCaspaseファミリーとシグナル伝達系がどのように関与しているのか考察したい。

脂肪酸フラボノイドの抗菌作用とその応用

落合 邦康¹、栗田 智子³、○菊地 寛高²、竹内 武男³、西川 博文²、勝田 公夫⁴、福島 和雄³ ¹明海大学 歯学部 口腔微生物学講座、²明海大学 歯学部 歯内療法、³日本大学 松戸歯学部 細菌学、⁴バイオベンチャーリンク研究所

【目的】我々は脂肪酸に関する一連の研究において、植物種子、特にグレープフルーツ種子より抽出した脂肪酸フラボノイドに強い抗菌活性が有ることを見出し、その抗菌スペクトラムと利用法について検討を行った。【材料と方法】被検抗菌液として、脂肪酸フラボノイドを主成分とする「パワーアンチ」液を用いた。抗菌活性の検討を行った供試菌として以下の 33 株を用いた：一般細菌；下痢原性大腸菌、*Salmonella*、*Vibrio*、*Campylobacter*、*Staphylococcus* (含 MRSA)、口腔細菌；*Porphyromonas*、*Prevotella*、*Candida*。抗菌活性は、ペニシリンカップ法で行った。作用時間と使用濃度の影響、食品や布巾を被検液に浸漬後の殺菌効果も併せて検討した。【結果および考察】パワーアンチ液は、短時間で被検菌株全てに強い抗菌活性を示した。比較的抵抗性の *C. albicans* も 180 分浸漬後に殺菌作用が認められた。被検液処理布巾の抗菌効果は 24 時間後も認められ、食中毒予防に極めて有効であることが判明した。被検液の組成は全て食品添加物であるため、義歯の消毒や洗口液の利用も検討できるものと思われる。(会員外協力者：Dr. W.C. Yam, 香港大学)

酪酸はマクロファージ様 Raw264.7 細胞の一酸化窒素(NO)誘導性アポトーシスを抑制する

○高野 安紀子¹、竹下 玲²、鐘江 晴秀¹、栗田 智子³、落合 邦康² ¹明海大学 歯学部 歯科矯正学講座 ²明海大学 歯学部 口腔微生物学講座 ³日本大学 松戸歯学部 細菌学教室

【目的】我々は種々の歯周病原細菌の代謝産物である揮発性脂肪酸(VFA)が、ヒトおよびマウス T・B 細胞に対しアポトーシスを誘導し、歯周局所の免疫応答を失調し歯周病の病態成立に関与することを報告した。

近年、一酸化窒素(NO)によるマクロファージのアポトーシスは、炎症反応の終息に重要であることが示されている。そこで、マクロファージのアポトーシスに関する VFA の作用を明らかにする目的で、本細胞における NO 誘導性アポトーシスにおける酪酸の影響を検討した。

【材料と方法】(1) NO ドナー: SNP を用いた。(2) 細胞: マウスマクロファージ様 RAW264.7 を用いた。(3) 死細胞の検出: トレパンブル色素の取り込み能により行った。(4) アポトーシスの判定: DPA 法と DNA 断片化をアガロース電気泳動法で行った。

【結果】(1) 酪酸は RAW264.7 細胞の生存率に顕著な影響を示さなかった。しかし、酪酸処理群では、SNP 誘導性細胞死が抑制された。(2) この抑制作用は、酪酸の濃度依存的であった。(3) さらに、この抑制作用は、アポトーシスの阻害であることが前述の方法で示された。(4) また、他の VFA であるイソ酪酸も同様の活性を有していた。

【結論および考察】酪酸は、RAW264.7 細胞の NO 誘導性アポトーシスを濃度依存的に抑制した。これらの結果から、この VFA は、歯周疾患の炎症を慢性化させ、組織破壊を促進する可能性が示唆された。

嫌気性細菌代謝産物による T 細胞アポトーシス誘導機構の解析：栗田智子¹、落合邦康²、福島和雄¹ (¹日本大・松戸歯・細菌、²明海大・歯・微生物)

<目的> 揮発性脂肪酸 (VFA) は腸内細菌叢の主な構成菌や歯周病原性菌である嫌気性グラム陰性桿菌が産生する主な最終代謝産物の一つである。我々は主要構成 VFA である酪酸がヒト及びマウス T,B 細胞に対しアポトーシスを誘導することを報告した。今回は酪酸誘導 Jurkat T 細胞アポトーシスにおける活性酸素 (ROS)、セラミド、NFκB 並びに情報伝達系の影響を検討した。<方法> ROS の関与は抗酸化剤処理下における影響を DCFHDA を用いた FACS 解析にて、又セラミドの関与は合成阻害剤を用いて DPA 反応により測定した。NFκB の遺伝子発現は RT-PCR により、又細胞内シグナル伝達分子 (ERK, p38, JNK) のリン酸化レベルは Western blot 法により測定した。<結果> 抗酸化剤処理により細胞内 ROS 産生量が減少し、アポトーシスが抑制された。更に酪酸による Caspase 3 活性の増加が濃度依存的に抑制された。セラミド合成阻害剤は Fas 誘導アポトーシスには影響を与えなかったが、酪酸誘導アポトーシスを抑制した。酪酸誘導アポトーシスにおいては NFκB 発現の減少、ERK リン酸化の減少、p38 リン酸化並びに JNK リン酸化の増加が認められた。<結論> ヒト T 細胞株において酪酸は ROS やセラミドの増加を介して Caspase 3 を活性化し、アポトーシスを誘導するものと考えられる。一方シグナル伝達の解析から、酪酸は古典的な MARP カスケードである ERK 活性を抑制し、その一方で物理化学的ストレスのシグナル伝達系として機能する JNK 及び p38 を活性化した。ROS, Caspase ファミリーとシグナル伝達系がどのように関与しているのか現在検討中である。
非会員共同研究者：天野 滋 (明海大学)

嫌気性菌代謝産物・酪酸によるT細胞アポトーシス誘導機構の解析

○落合邦康¹、天野滋¹、竹下玲¹、福島和雄²、栗田智子²
(明海大・歯・微生物¹、日大・松戸歯・細菌²)

[目的] 揮発性脂肪酸 (VFA) は、腸内細菌叢の主な構成菌や歯周病原性細菌である嫌気性グラム陰性桿菌が産生する最終代謝産物であり、多くの為害作用を持つことが知られている。我々は一連の研究により、VFA、特に酪酸が歯周組織粘膜直下に多数存在するT細胞に顕著にアポトーシスを誘導することを報告した。このT細胞アポトーシスが局所免疫応答に大きな影響を与え、病態を進展させる可能性が示唆されたため、ヒトT細胞株Jurkat細胞を用いその誘導機序の解析を行った。

[方法] アポトーシス関連遺伝子の動きを、DNAchipを用い解析を行った。個々の因子に関する解析は、p38、JNK、ERKなどストレスシグナル伝達系及び生存シグナル系因子のリン酸化をWestern blot法にて、一連のCaspase活性誘導は各種阻害剤を用い測定した。また、NF- κ B はGel shift assay、Fasおよびp53は、それぞれ特異抗体およびKOマウスなどを用いた。

[結果および考察] 酪酸誘導T細胞アポトーシスにおいては、Fas/FasLやp53の関与はなく、Caspase 8、9、3の活性化が誘導された。また、Bcl-2ファミリー遺伝子解析から、Bcl-2、Bcl-XLの発現は抑制するものの、Baxの発現には影響を与えなかった。また、極めて短時間に、ERKの活性が抑制され、JNKの活性化が起こる。このように酪酸は、細胞周期のG1期の停止を起こし、生存シグナルを抑制する一方で、CaspaseファミリーやJNKなど種々のアポトーシス促進因子の活性化を急速に誘導する。その結果、短時間でCADの活性化を伴うDNA断片化を誘導するものと思われる。これらの結果から、嫌気性菌代謝産物は生体各所において免疫担当細胞のみならず、多くの細胞、強いては宿主に大きな影響を与えていることが強く示唆される。

サンドイッチELISA法による *S. mutans* 株の
GTF-B産生性の解析

○熱田 亙^{1,2}、橋爪 智美¹、篠崎 紀子¹、
栗田 智子¹、小堀 樹一郎³、牛澤 幸司³、
池見 宅司²、福島 和雄¹ (¹日大 松戸歯
細菌、²日大 松戸歯 保存修復、³(株)第一
化学薬品)

【目的】 *S. mutans* の最重要病原因子はう蝕原性バイオフィルム形成に主役を演ずるGTF-B (*gtfB*産物) と考えられている。演者らは、昨年の本大会において、GTF-Bを精度良く微量定量できるサンドイッチELISA系を抗GTF-Bモノクローナル抗体 (MAb) を用いて構築し、その系で歯垢・唾液中のGTF-Bを直接定量できることを報告した。今回は、本定量法の測定条件に検討を加え、各種 *S. mutans* 保存・分離株につきGTF-Bの産生性の解析を試みた。

【方法】 リコンビナント酵素の精製: *S. anginosus* KSB8形質転換株培養上清より調整用SDS-PAGE等の分画操作を行って精製し、MAb P126使用のWestern-blot法により均一性を調べた。ELISA定量法: MAb P136コート96穴マイクロプレートを用いる昨年発表の方法に準じて行った。産生性試験: PS14株を用いて酵素抽出条件及び局在性を検討し、さらに *S. mutans* 分離株及び他レンサ球菌株の一夜培養物につきGTF-B産生性を調べた。【結果】 KSB8形質転換株培養上清より精製した標品はSDS-PAGE的に均一であった。純化GTF-B標品を用いて作成した標準曲線は0.25~5ngタンパクの範囲でほぼ直線性を示した。菌体結合性酵素の可溶化は8M尿素抽出が最良であった。*S. mutans* 分離株のGTF-B産生性は菌株間で大差が認められた。なお、他菌種培養物はすべて本法に陰性であった。【考察】 本研究の結果、う蝕病因論研究における本定量法の有用性が強く示唆された。

歯周病罹患者由来歯肉線維芽細胞の脂肪酸によるアポトーシス誘導性

○中道 一生¹、栗田 智子²、天野 滋¹、鈴木 直人³、大塚 吉兵衛³、福島 和雄²、落合 邦康¹ (¹明海大 歯 微生物、²日大 松戸歯 細菌、³日大 歯 生化学)

【目的】先に我々は、ヒトT・B細胞やマクロファージでは酪酸によりアポトーシスが高率に誘導されるが、ヒト歯肉線維芽細胞（HGF）では強い抵抗性を示すことを見出した。今回我々は、成人性歯周病罹患者より分離したHGF（PD-HGF）の脂肪酸によるアポトーシス誘導性について検討した。【方法】細胞はHGF細胞株Gin-1、健常人分離HGF（H-HGF）およびPD-HGFを用いた。細胞生存率はMTT法を用いて測定した。アポトーシス細胞の比率は、核一細胞質の二重蛍光染色により算定した。DNA断片化はアガロース電気泳動法により、ミトコンドリア膜電位の低下はRhodamine123蛍光標識により検出した。アポトーシスにおけるcaspaseの関与は各種阻害剤を用いて検討した。【結果】PD-HGFは酪酸処理により著しい生存率の低下を示したが、他の脂肪酸に対しては抵抗性を示した。PD-HGFでは酪酸により濃度依存的にアポトーシスが誘導され、DNA断片化とミトコンドリア膜電位の低下が観察された。このアポトーシス誘導性はinitiator caspase（caspase-8, 9）およびeffector caspase（caspase-3, 7）阻害剤によって抑制された。【考察】これらの結果より、PD-HGFは酪酸により高率にアポトーシスが誘導され、歯肉組織破壊に深く関与することが示唆された。

酪酸誘導アポトーシスにおけるミトコンドリア、セラミド、JNKの関与

○栗田 智子¹、落合 邦康²、天野 滋²、一條 秀憲³、福島 和雄¹ (¹日大 松戸歯 細菌、²明海大 歯 口腔微生物、³東医歯大院 医歯学総合研究科 分子情報伝達学)

<目的>先に我々は歯周病原細菌の主要代謝産物である酪酸が活性酸素 (ROS) の産生を介してアポトーシスを誘導することを報告した。今回は酪酸誘導T細胞アポトーシスにおけるミトコンドリア、セラミド並びに情報伝達系の影響について検討した。<方法>ミトコンドリア由来Cytochrome c, AIFおよびSmacの挙動はWestern blot法により、又セラミドの関与は合成阻害剤を用いたDPA反応又は抽出脂質のTLC解析により測定した。情報伝達系の関与はERK, p38, JNKおよびASK1のリン酸化レベルをWB法により、また合成阻害剤を用いたDPA反応により検討した。<結果>酪酸処理によりCytochrome cやAIF, Smacの放出が認められた。DGKassayにより、酪酸による細胞内セラミド産生量の増加が認められ、スフィンゴキナーゼ阻害剤であるDHSは酪酸誘導アポトーシスを抑制した。酪酸処理により、ASK1, p38, JNKの活性化及びERK活性の抑制が認められ、JNK阻害剤SP600125の添加により、酪酸誘導アポトーシスが回復した。<結論>酪酸誘導T細胞アポトーシスはミトコンドリア内でのROSの産生を介してASK1やJNKを活性化した後、その下流でCaspaseファミリーを活性化するものと考えられる。更にAIFやSmac放出によりCaspase非依存性経路の存在が認められた。

The Role of VAMP2-containing Complex in cAMP-dependent Amylase Secretion from Parotid Acinar Cells

Junko Yoshigaki¹, Shunsuke Furuyama¹, Hiroshi Sugiya¹

¹Physiology, Nihon University, 2-870-1 Sakaecho-nishi, Matsudo, 271-8587 Japan

Amylase release from parotid acinar cells is mainly regulated by accumulation of intracellular cAMP. We previously reported that VAMP2 is specifically localized at secretory granules in rat parotid acinar cells and has an essential role in cAMP-regulated amylase secretion. We also found that VAMP2 was not immunoprecipitated by anti-VAMP2 antibody from solubilized granule membrane fractions and incubation of cytosolic fraction and cAMP induced the immunoprecipitation of VAMP2. It implies that VAMP2 makes complex at secretory granules in the resting state and the complex dissociates upon activation of cAMP-dependent protein kinase (PKA). In the present study, we investigated whether the VAMP2-containing complex is pre-existing SNARE complex before priming. Although botulinum neurotoxin B (BNT-B) is a specific protease of VAMP2, VAMP2 in the SNARE complex is known to be resistant to BNT-B. Activated BNT-B efficiently cleaved VAMP2 in the solubilized granule membrane fractions. This result suggests that the VAMP2 complex is not pre-existing SNARE complex. Next, we examined the effect of ATP analogues on the immunoprecipitation. VAMP2 was precipitated by addition of ATP γ S, but not by AMPPNP. PKA can recognize ATP γ S as a substrate. In contrast, NSF, which is an ATPase that causes priming of the SNARE complex, is inhibited by ATP γ S. AMPPNP inhibits both of the reactions. Therefore, the dissociation of VAMP2 complex needs the phosphorylation by PKA, but not NSF's ATPase, meaning that the dissociation of VAMP2 complex is not priming. On the other hand, we found that pantophysin, which was reported to bind to VAMP2, is localized at secretory granules in parotid acinar cells. Pantophysin is a candidate of a component of the VAMP2 complex that suppresses the v-, t-SNARE complex formation.

ラット耳下腺分泌顆粒の密度勾配遠心による分離とタンパク質の分布

○吉垣 純子^{1,2}、勝俣 治^{1,2}、古山 俊介^{1,2}、杉谷 博士^{1,2} (¹日大 松戸歯 生理、²日大 松戸歯 口科研)

耳下腺腺房細胞において、アミラーゼは分泌顆粒に貯留され、刺激依存的に分泌される。分泌顆粒は、組織の電子顕微鏡写真の解析などから、最初未成熟な物が形成され徐々にアミラーゼが濃縮され成熟していくと考えられている。しかし、どのような機構で成熟が起こるかは不明な点が多い。我々は成熟過程の解析を行うために、成熟および未成熟分泌顆粒画分を分離することを試みた。ラット耳下腺の分泌顆粒画分からパーコールを用いた密度勾配遠心法により、密度の低い画分と高い画分に分離した。両画分でタンパク質量あたりのアミラーゼ活性には違いは見られなかったが、低密度画分のアミラーゼ活性の総量は高密度画分の約 1/4 だった。これらの画分から膜画分だけを回収して、ウエスタンブロット解析により開口放出に関わるタンパク質群の分布を調べた。その結果、syntaxin6 は低密度画分の方が高密度画分よりも多く検出された。それに対して、VAMP2 および SNAP-23 は高密度画分に濃縮されていた。したがって、成熟過程ではアミラーゼが濃縮されていくだけでなく、開口放出に必要なタンパク質が分泌顆粒膜に濃縮されていくと考えられる。我々は、可溶化した分泌顆粒膜画分では syntaxin6 と VAMP2 が結合していることを見いだしているが、この結合は成熟過程における一過的な結合であると予測される。

VAMP2-BINDING PROTEINS ON SECRETORY GRANULE MEMBRANES OF RAT PAROTID ACINAR CELLS

Yoshigaki, J., Michikawa, H., Furuyama, S., and Sugiya, H.

Department of Physiology, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

Amylase secretion from parotid acinar cells is regulated by accumulation of intracellular cAMP. We previously reported that VAMP2 is specifically localized at secretory granules in rat parotid acinar cells and is essential for cAMP-regulated amylase secretion. We also found that VAMP2 was not immunoprecipitated by anti-VAMP2 antibody from solubilized granule membrane fractions, and incubation with cytosolic fraction and cAMP induced the immunoprecipitation of VAMP2. These results suggest that VAMP2 forms complex at secretory granules in the resting state and the complex dissociates upon activation of cAMP-dependent protein kinase. It is important to identify the VAMP2-binding protein at secretory granule membrane.

In this study, We examined the presence of VAMP2-binding proteins in secretory granule membrane fractions. SNAP-23, pantophysin and syntaxin6 were detected in granule membrane fractions. We performed immunoprecipitation with antibodies against pantophysin and syntaxin6. As a result, VAMP2 is coimmunoprecipitated by anti-syntaxin6 antibody, but not by anti-pantophysin. This result shows that VAMP2 forms complex with syntaxin6 at secretory granules. Syntaxin6 was reported to be involved in secretory granule maturation in PC12 cells. There is a possibility that interaction with VAMP2 and syntaxin6 regulates the maturation and fusion of secretory granules.

Gene transfer to primary culture of parotid acinar cells

Yoshigaki, Junko; Furuyama, Shunsuke; Sugiya, Hiroshi
(*Dept. Physiol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan*)

Acinar cells of salivary parotid gland produce saliva by two types of secretion; water fluid and exocytosis of proteins like amylase. Exocytosis of amylase is mainly regulated by intracellular cAMP, and VAMP2, one of the SNARE proteins, is essential for cAMP-dependent amylase secretion. However, it is difficult to investigate the molecular mechanism of parotid acinar cells since there is no stable cell line that has the ability to release amylase upon stimulation. To examine the functions of parotid acinar cells, we tried to establish a transfection system of exogenous genes to primary culture. Acinar cells were dispersed from rat parotid glands by enzyme digestion, and cultured in Waymouth's medium that contained rat serum. Cells that cultured in dishes coated with various extracellular matrix kept amylase activity, and have the ability to release amylase in response to isoproterenol at least for 48 h. The cells spread on the dish bases and formed filopodia although they have granules that contain amylase, suggesting they are derived from acinar cells. VAMP2 gene fused with enhanced green fluorescence protein (EGFP-VAMP2) was transfected to dispersed acinar cells and cultured for 48 h. EGFP-VAMP2 protein was observed to be correctly localized at granules that contained amylase. Therefore, the cells cultured by this method can be used to examine the effects of exogenous genes on functions of parotid acinar cells like regulated exocytosis and maturation of secretory granules.

6. 耳下腺腺房細胞の分泌顆粒形成における syntaxin6 の役割

○吉垣純子・古山俊介・杉谷博士

(日本大学松戸歯学部生理学教室)

(目的)

耳下腺腺房細胞において、アミラーゼは分泌顆粒に貯留され刺激依存的に分泌される。組織の電子顕微鏡写真の解析などから、分泌顆粒は最初未成熟な物が形成され、徐々にアミラーゼが濃縮され成熟していくと考えられている。我々は分泌顆粒の形成過程の解析を試みた。

(材料・方法)

1. ラット耳下腺から調製した分泌顆粒を、さらにパーコール密度勾配遠心法により、低密度および高密度画分に分離した。それぞれの画分について、アミラーゼ活性を測定した。また、ウエスタンブロット解析により、膜タンパク質群の分布を調べた。2. ラット耳下腺の腺房細胞を単離し、遺伝子導入試薬 DMRIE-C (Invitrogen) を用いて syntaxin6 遺伝子を導入した。2日培養後、細胞を抗アミラーゼ抗体で染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(結果・考察)

低密度画分を未成熟な分泌顆粒、高密度画分を成熟分泌顆粒と予想し、解析を行った。両画分でタンパク質量あたりのアミラーゼ活性には違いは見られなかったが、低密度画分のアミラーゼ活性の総量は高密度画分の約1/4だった。膜タンパク質の分布を調べたところ、syntaxin6 および VAMP4 は低密度画分の方が高密度画分よりも多く検出された。それに対して、VAMP2 および SNAP-23 は高密度画分に濃縮されていた。したがって、成熟過程ではアミラーゼが濃縮されていくだけではなく、開口放出に必要なタンパク質が分泌顆粒膜に濃縮されていくと考えられる。抗 syntaxin6 抗体により、VAMP4 が共沈してくることから、2つのタンパク質は未成熟分泌顆粒上で結合していると考えられる。次に分泌顆粒形成における syntaxin6 の役割を調べるために、syntaxin6 遺伝子の欠失変異体を作成し、耳下腺腺房細胞の初代培養系に遺伝子導入を行った。その結果、変異遺伝子を導入した細胞では、他の細胞に比べ分泌顆粒の数が減少していた。したがって、分泌顆粒がゴルジ体から形成される際に、syntaxin6 が必要であると考えられる。

(結論)

未成熟な分泌顆粒で syntaxin6 と VAMP4 が結合していることや、syntaxin6 の変異体により分泌顆粒の形成が阻害されることから、耳下腺腺房細胞において、分泌顆粒の形成に syntaxin6 と VAMP4 の相互作用が重要な役割を果たしていることが予想される。

Formation of tight junction in a primary culture of parotid acinar cells

Yoshigaki, Junko; Furuyama, Shunsuke; Sugiya, Hiroshi (*Dept. Physiol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan*)

Exocrine glands keep the cell polarity that is due to the tight junctions that partition a cell surface into apical and basolateral membranes. In the parotid gland, the transmembrane protein occludin is observed to form tight junctions along the intercellular canaliculi. Actin filaments run along the tight junction and aquaporin5 is specifically detected at the apical membrane. The polarity is important for oriented water and electrolyte transport. We have established a method to culture dispersed parotid acinar cells that retain their ability to generate new secretory granules and secrete amylase upon the stimulation. In this study, we analysed the cell polarity of the primary culture. After the culture for 24 h, since aquaporin5 was seen to have diffused to the plasma membrane, the apical membranes could not be distinguished. No occludin was detected, suggesting that the tight junction was broken in the primary culture. These results suggest that the polarity of the cells was lost. In contrast, at 48 h after the dispersion, the cells spread as a monolayer and occludin bands appeared again between the cells. Immunoblotting with anti-occludin antibody showed that the expression of occludin increased time-dependently although it was once lost after the dispersion. These results suggest that a kind of polarity may have begun to return.

口腔剥離細胞診でみられたカンジダ症の検討

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部臨床検査室²⁾, 日本大学松戸歯学部保存学2講座³⁾

○久山佳代(DDS)¹⁾, Sisilia Fifita F(DDS)¹⁾,
遠藤弘康(DDS)³⁾, 松本 敬(CT)²⁾, 山本浩嗣(DDS)¹⁾

【目的】膾カンジダ症における細胞診の臨床的意義および形態的検討についてはこれまでに比較的多く報告され、細胞診の信頼性の高さが述べられている。しかし口腔剥離細胞診により採取されたカンジダ属の形態および検出率について検索を加えた研究は少ない。そこで本研究では口腔剥離細胞診標本にみられたカンジダ属に対して画像解析プログラムを用い、形態的な観察を行った。さらにカンジダ症が疑われる患者の唾液培養検査および細胞診を同時に行い、細胞診によるカンジダ症の検出率を求め、若干の知見を得たので報告する。

【対象】形態的な観察には、1976年9月から2001年12月までに本学付属歯科病院において、細胞診にてカンジダ症と診断された全158症例を対象とした。細胞診検体の採取方法は、サイトブラシによる擦過法で、いずれもPapanicolaou染色(以下、Pap.)、ギムザ染色、一部でPAS染色を施した。形態観察には画像解析プログラムを使用し、また培養にはニッスイスラント・カンジダ培地を用いた。

【結果】全症例の内訳は、性別が男性69人、女性89人、年齢分布は30歳以下4人、31～50歳9人、51～70歳68人、71歳～54人、不明3人であった。さらに部位別分布は舌57人、歯肉37人、歯肉33人、口蓋16人、その他15人であった。形態学的には菌体の多くはPap.染色でオレンジGに淡染し、仮性菌糸が確認された。

【まとめ】口腔剥離細胞診標本にカンジダ属はしばしば観察されるが、検出できないこともある。細胞診のカンジダ属に対する有用性を述べる。

LEIOMYOSARCOMA OF THE RIGHT UPPER GINGIVA: A CASE REPORT

Kuyama K¹⁾, Koizumi Y¹⁾, Fukumoto M²⁾ and Yamamoto H¹⁾ Departments of ¹⁾ Pathology and ²⁾ Comparative Dentistry. Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

PURPOSE: Leiomyosarcoma is relatively rare mesenchymal tumor in the oral cavity that shows smooth-muscle differentiation. We present a case of leiomyosarcoma involving the right upper gingiva.

CASE: A 47-year-old man complained of a gradually increasing mass in the right upper gingivae extending from the palate to the maxillary sinus. The patient had no remarkable past history. The tumor was sessile in character and a liver brown color with irregularity surface. Radiographs revealed horizontal resorption of the alveolar bone in the right upper molar region. Grossly, the resected tumor was 2.31.30.3cm in size and had a solid gray cut surface with a fascicular structure. Microscopically, the tumor was almost encapsulated and composed of interlacing fascicles of spindle cells that had hypercellularity, slightly hyperchromatic, 'cigar-shaped' nuclei with evident nucleoli and eosinophilic cytoplasm. Vacuoles in the cytoplasm were distinct in the transverse section. Mitotic figures were frequently encountered up to 3 per field at 400 magnification. The immunoreactivities of vimentin and alpha-smooth muscle-specific actin immunoreactivities were demonstrated in the tumor cells, whereas s-100 protein, cytokeratin, GFAP and desmin were negative. The proliferate activities using PCNA and MIB-1 showed high positive rates. Histological diagnosis was made as leiomyosarcoma.

CONCLUSION: A case of leiomyosarcoma in the right upper gingiva was reported. Emphasis was placed on the difficulties in the differential diagnosis of these uncommon tumors in the oral cavity and the examination of an extensive literature concerning leiomyosarcoma.

歯原性嚢胞の hyaline body に関する病理学的研究

日本大学松戸歯学部病理学講座

久山 佳代, 太田 泰人, 山本 浩嗣

[目的] 歯原性嚢胞に出現する hyaline body について, その由来を解明する目的で臨床的, 病理組織学および免疫組織化学的に検討した. [対象] 材料は病理組織学的に歯原性嚢胞と診断された 1,163 例を用いた. [結果と考察] hyaline body の出現頻度は, 残留嚢胞において最も高かった ($p < 0.05$). hyaline body は上皮層内あるいは上皮表層に存在し, Turnbull blue 染色において全症例の hyaline body が陽性を呈したことから血球成分の関与が示唆された. また抗アメロジェニン抗体は hyaline body 周囲の上皮細胞が, 抗 CK 抗体は周囲の絮状物質が陽性を示した所見から, その成分に上皮の関与もあることが推察された. さらに抗 ssDNA 抗体および TUNEL 法にて, 陽性細胞は hyaline body 周囲の上皮および内部に含有された形で認められた. [結論] hyaline body はその生成過程において, 上皮のアポトーシスをおこした細胞が核となり, 結合組織内の毛細血管より逸出した赤血球から由来したヘモグロビンの鉄が周囲に付着しさらに, Liesegang 現象により成長発育し hyaline body を形成したものと推察された.

う蝕誘発性高シュークロス食および加齢によるラット肺組織の病理組織学的検討

○久山 佳代¹、Fifita Sisilia¹、太田 泰人¹、山本 浩嗣¹(¹日本大学 松戸歯学部 病理学講座)

【目的】誤嚥性肺炎の病因を詳細に検討するための実験モデルの確立を目的として、う蝕および加齢がラット肺組織の病理組織学的変化に及ぼす影響を調べた。【方法】実験う蝕モデル群および非う蝕群を高齢になるまで育成し、両群の肺組織について病理組織学的に検討した。【結果】10 週間 Diet2000 で飼育したラットは通常の粉末飼料で飼育した対照ラットに比べて著しく臼歯裂溝部にう蝕が認められた。さらにう蝕に罹患の後、20 ヶ月間通常の粉末飼料で飼育を続けた高齢う蝕罹患ラットの肺組織を病理組織学的に検索を加えた結果、好中球あるいはリンパ球などによる肺胞内滲出が小葉単位に起こる気管支肺炎の像を呈していた。さらに吸引された菌塊、気道分泌物、多数の組織球の集簇や異物型巨細胞などが観察された。一方、通常の粉末飼料で 20 ヶ月 10 週間飼育された対照ラットの肺組織には、胸膜および肺胞壁の線維性肥厚や肺気腫などの加齢変化はみられたものの、炎症像が認められなかった。【考察】本結果から、高齢う蝕罹患ラットの肺組織は軽度の炎症性変化がみられ、その原因として口腔内細菌の不顕性誤嚥が行われていたと考えられる。従って本実験モデルは口腔内常在細菌の不顕性誤嚥が肺炎の原因であることを改めて実験的に証明したといえる。しかし本モデルを実験的誤嚥性肺炎モデルとして検討した際、いくつかの問題点が挙げられ、それらも併せて考察する。

う蝕実験モデルにおける実験的誤嚥の試み

¹日本大学松戸歯学部病理学講座,²日本大学松戸歯学部病理学講座,³日本大学松戸歯学部病理学講座,⁴日本大学松戸歯学部衛生学講座

久山 佳代¹, フィフィタシリア¹, 小林 清吾², 山本 浩嗣¹

【目的】慢性嚥下性細気管支炎は不顕性誤嚥により発症するといわれ、老人性肺炎として扱われている。一方、実験的メンデルソン症候群モデル作製条件としてヒト胃液と肺炎球菌を共に注入した群の死亡率は、いずれか一方のみを注入した群より有意に高かったとの報告がある。そこで高齢う蝕罹患ラットおよび高齢ラットに人工誤嚥を施し、両群の肺組織を病理組織学的に検索を加え、若干の興味ある知見を得たので報告する。【方法】実験動物は生後3週令のWister系雄性ラットを用い、飼料はDiet2000にて10週間飼育した後う蝕罹患を確認し、以後は普通粉末飼料PFに切り替え20ヶ月飼育した。さらに麻酔下にて塩酸の気管内投与を行い、2時間後肺組織標本作製した(実験群:5)。対照には高齢ラットを用いた(対照群:5)。【結果】高う蝕罹患ラットでは、Diet2000投与5週にて象牙質う蝕の成立が認められた。それらの肺組織は誤嚥性肺炎の所見を呈していた(Jpn.J.Oral.Biol,45)。さらに人工誤嚥を施した実験群の肺組織は、対照群と比較して有意に好中球浸潤や肺水腫を認めた。本研究の一部は平成13年度学術フロンティア推進事業および日本学術振興会科学研究費補助金(基盤(C)2004-2006,16591839)により行った。

歯肉に発生する反応性限局性腫瘤（妊娠性エプーリス）の病理組織学的研究
¹日本大学 松戸歯学部 病理学講座,²日本大学 松戸歯学部 口腔外科学講座

久山 佳代¹, F. Fifita Sisilia¹, 野上 俊雄², 山本 浩嗣¹

【目的】エプーリスは歯肉に生じる非腫瘍性の限局性腫瘤である。特に妊娠性エプーリス（妊娠腫）は血管腫様の構造を示す血管腫性エプーリスの像を呈し、その発生にはホルモン失調や不衛生な口腔環境などが挙げられているが、検討はいまだ不十分である。それ故、われわれは妊娠性エプーリスの発生に関与する要因を解析する目的で検索を加え、若干の知見を得たので報告する。

【方法】対象は、当講座において臨床所見および病理組織学的に妊娠性エプーリスと診断された14例（29±4歳）を用いた。対照には血管腫性エプーリス13例（男性3例（53±11歳）、若年女性5例（32±7歳）、高齢女性5例（67±11歳））、血管腫9例（59±17歳）とし、以上全27症例に対して免疫組織化学的に検索した。【結果および考察】妊娠性エプーリスは病理組織学的に肉芽腫性、血管腫性およびその移行形の3種類に分類された。免疫組織化学的には殊に肉芽腫性においてERおよびPgRに強く陽性反応を示し、血管腫性では僅かに減弱する傾向がみられた。対照症例も併せて、反応性腫瘤状病変の形成に関与する要因について検討を加える。（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日本大学松戸歯学部鈴木研究費（03-1005）による。）

診断に苦慮した乳頭状口腔粘膜病変の細胞学的検討

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部中央検査室²⁾, 日本大学松戸歯学部口腔外科学講座³⁾, 株式会社サンリツ⁴⁾

○久山佳代(DDS)¹⁾, 松本 敬(CT)²⁾, F. Fifita Sisilia(DDS)¹⁾, 森川美雪(MT)¹⁾, 野上俊雄(DDS)³⁾, 中平隆志(CT)⁴⁾, 秋元芳明(DDS)³⁾, 山本高嗣(DDS)³⁾

【はじめに】今回我々は、肉眼的に乳頭状を呈し、剥離細胞診にて診断に苦慮した粘膜病変 2 症例を経験したのでその細胞像を報告する。

【症例】1. 56 歳, 女性. 最大 2.6 cm, 乳頭状で灰白色を呈する左側口蓋歯肉腫瘍. 2. 59 歳, 女性. 最大 3.5 cm, イチゴ様(赤色乳頭状)を呈する左側下顎臼歯部ブリッジ下顎堤歯肉腫瘍. いずれも扁平上皮癌の臨床診断のもと, 剥離細胞診を施行した。

【細胞所見】1. 比較的きれいな背景に, オレンジ G 好性の角化型扁平上皮がシート状に出現していた. 核は核形不整, クロマチンの増量がみられ, 一部で N/C 比の増大や 2 核化も認められたため, クラス V と診断した. 2. 炎症性, 出血性背景に, 類円形で厚く, 層状の胞体を有するライトグリーン好性の傍基底様細胞が散在性にみられ, 核は核縁が目立つものの微細顆粒状で小型の核小体が認められた. また, オレンジ G 好性で胞体が厚く小型の角化型扁平上皮が散在性に観察された. 診断に苦慮した結果, クラス V とした。

【組織所見】1. 過角化ないし錯角化を呈する重層扁平上皮が乳頭状に増生し, その上皮脚間には組織球の集簇がみられ, 乳頭状黄色腫と診断された. 2. 異型細胞に置換された重層扁平上皮が乳頭状に増殖し, 一部で基底膜の破壊および浸潤像が観察され, 乳頭状扁平上皮癌と診断された。

【まとめ】口腔乳頭状病変では, 疣贅状乳頭腫の偽上皮腫様変化に代表されるように細胞診で苦慮することが多々ある. 偽陽性・偽陰性の報告をさけるために, 数多くの症例の経験を積み, 慎重な診断を行う必要がある. (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日本大学松戸歯学部鈴木研究費(03-1005)による.)

剥離性歯肉炎における細胞診の検討

日本大学松戸歯学部歯周病学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部病理学講座²⁾, 日本大学松戸歯学部中央検査室³⁾

○遠藤弘康(DDS)¹⁾, 岡田裕之(DDS)²⁾, 松本 敬(CT)³⁾,
松江美代子(DDS)¹⁾, 山本浩嗣(DDS)²⁾

【目的】剥離性歯肉炎は、歯肉上皮の剥離や水胞形成を特徴とする歯肉の臨床診断名である。従来より歯肉からの組織標本による検討は数多くなされているが、生体への侵襲性が少ない細胞診による検討はあまりなされていない。剥離性歯肉炎の臨床診断のもとに擦過細胞診および生検を行い、細胞診の有用性を検討することを目的とした。

【材料および方法】剥離性歯肉炎と臨床診断された男性1名、女性5名の計6症例である。

【細胞診所見】サイトブラシで検体を採取する際、4症例で歯肉上皮の剥離がみられた。その内3症例では採取時に歯肉からの出血があった。6症例中1症例で炎症性背景に胞体辺縁の濃染化、核周囲明庭、円形核でクロマチン濃染するツァンク細胞が散在性～集合性に認められた。その他の症例では炎症性背景に核腫大、大小不同、核形不整を伴う扁平上皮細胞が認められ、特徴的な所見は得られなかった。

【病理組織所見】ツァンク細胞が認められた1例は尋常性天疱瘡と診断され、他では扁平苔癬2例、瘢痕性類天疱瘡3例であった。

【まとめ】剥離性歯肉炎と臨床診断された症例に対して細胞診を行うことにより、尋常性天疱瘡を鑑別することができた。

びらん型口腔扁平苔癬に対する局所ステロイド薬の密封療法を行なった2例

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

○遠藤 弘康, 松江美代子

扁平苔癬は原因不明の慢性炎症性粘膜皮膚疾患である。その中でもびらん型の口腔扁平苔癬（ELP）は摂食時や口腔清掃時に患者が疼痛を訴え難治性となることがある。ELPの治療については現在ステロイドの外用薬が第一選択となるが、その使用に際しては口腔内の特性を考慮して行なう必要がある。唾液の流出や舌、口唇あるいは頬粘膜の動きによりステロイドの効果は減少する。歯肉におけるステロイドの効果を持続させるために、密封療法を行うことが幾つかの論文で報告されている。今回我々は歯肉に発症した2例のELP患者に対して、カスタムトレーを用いたステロイド薬の密封療法を行ない良好な結果を得たので報告した。2例とも前歯部から臼歯部にかけて、付着歯肉に広範囲にわたる発赤と接触痛が認められた。治療に先立ちまずアルジネート印象剤を用いて上下顎の印象を採取し、患者の石膏模型を作成した。真空成型装置を用いてプラスチック製のカスタムトレーを作成した。ステロイド薬は0.1% triamcinolone acetonide（ケナログ）を使用した。治療はまずステロイド薬を歯肉に塗布し、その上からカスタムトレーを装着するよう患者に指示した。ステロイドの塗布は1日3回～4回行ない、トレーの装着は各食事間および就寝中に行なう様に指示した。その結果治療開始後2週間から10週間で歯肉における症状の改善がみられた。以上より、カスタムトレーを用いたステロイド薬の密封療法は、歯肉に発生したびらん型扁平苔癬の治療に有効であったことが示された。

歯肉に発生した癬痕性類天疱瘡の治療

日本大学松戸歯学部歯周病学講座¹

日本大学松戸歯学部病理学講座²

○遠藤 弘康¹, 松江美代子¹, 山本 浩嗣²
小泉 康之², 岡田 裕之²

癬痕性類天疱瘡は粘膜を侵す自己免疫疾患である。病変は口腔粘膜, 眼, 皮膚などに認められ, 癬痕を形成して治癒するのが特徴である。口腔粘膜では歯肉が好発部位であり, 慢性剥離性歯肉炎がみられる場合が多い。口腔内の治療に関してはいくつかの方法が行われているが, 現在コンセンサスは得られていない。今回我々は2症例の癬痕性類天疱瘡患者に対して局所ステロイド治療を行ない良好な結果を得たので報告を行った。

(症例1) 2カ月前より続くブラッシング時の出血と摂食時の接触痛とを主訴に来院した72歳の女性である。口腔内では上下顎頬側付着歯肉に発赤が認められ, ニコルスキー現象は陽性であった。4カ月前に体幹部に掻痒感を認めたため皮膚科を受診したが確定診断は得られなかった。病理組織検査, 直接蛍光抗体法, 間接蛍光抗体法および臨床所見より癬痕性類天疱瘡と診断した。治療はカスタムトレーを用いたステロイド薬の密封療法を行なった。ステロイド薬は0.1% triamcinolone acetonide (ケナログ) を用いた。治療後6週間で症状は寛解した。現在までリコールを行ないプラークコントロールを続けている。

(症例2) 摂食時の接触痛を主訴に来院した71歳の男性である。口腔内では上下顎頬側付着歯肉に発赤が認められ, ニコルスキー現象は陽性であった。8カ月前より鼻出血があるが確定診断は得られていなかった。病理組織検査, 直接蛍光抗体法, 間接蛍光抗体法および臨床所見より癬痕性類天疱瘡と診断した。症例2では右眼鼻側上方に瞼球癒着が認められ, 左眼は眼瞼結膜に軽度の癬痕が認められた。口腔内の治療は症例1と同様に, ステロイド薬の密封療法を行なった。治療後1週間で接触痛は軽減し超音波スケーラーを用いたプラーク除去が行なえるようになった。6週間で症状は寛解しその後はリコールを行ないプラークコントロールを続けている。

口腔に発症した尋常性天疱瘡の 2 例

日本大学松戸歯学部歯周病学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部病理学講座²⁾, 日本大学松戸歯学部検査室³⁾, 日本大学松戸歯学部口腔外科学講座⁴⁾

○遠藤弘康(DDS)¹⁾, 岡田裕之(DDS)²⁾, 久山佳代(DDS)²⁾, 松本 敬(CT)³⁾, 松江美代子(DDS)¹⁾, 中臺麻美(DDS)⁴⁾, 山本浩嗣(DDS)²⁾

【目的】 尋常性天疱瘡は上皮内に棘融解が生じる自己免疫疾患であり, その半数以上で口腔が初発部位となることから, 口腔内での早期診断が重要である. 本報告は, 口腔内に難治性のびらんがみられた症例に対し擦過細胞診を行い, 早期に診断ができた 2 例を報告する.

【症例】 症例 1 は 31 歳の女性である. 2 ヶ月間続くブラッシング時の歯肉疼痛を主訴に来院した. 来院前には他診療科での診察を 2 回受けていたが, 確定診断はされていなかった. 症例 2 は 53 歳の女性である. 1 ヶ月前より続く歯肉のびらんを主訴に来院した. 症例 1 および症例 2 ともサイトブラシを用いて歯肉から検体の採取を行った.

【細胞所見】 症例 1 および症例 2 とも Pap 染色では扁平上皮細胞における胞体辺縁の濃染化, ツートンカラー, 円形核, クロマチン濃染するツァンク細胞および多核化を有する細胞がみられた. ギムザ染色では, Pap 染色でツートンカラーを示す部分が明庭化した. また症例 1 では, ステロイド外用薬での治療中, 症状が悪化したため再度細胞診を行った所, ヘルペスウイルス感染の合併がみられた.

【総括】 難治性の口腔病変に擦過細胞診を行うことにより, 尋常性天疱瘡の早期診断が可能であった. また症例 1 ではヘルペスウイルス感染の合併を診断することができた. ツァンク細胞はヘルペスウイルス感染細胞との鑑別が困難な場合もあるが, その際には核クロマチンのスリガラス様変化, 核辺縁のクロマチン凝集, 核の圧排像などが鑑別に重要であった.

口腔カンジタ症の特徴的な臨床所見と細胞像の研究

日本大学松戸歯学部歯周病学講座¹⁾, 日本大学松戸歯学部病理学講座²⁾, 日本大学松戸歯学部検査室³⁾

○遠藤弘康(DDS)¹⁾, 岡田裕之(DDS)²⁾, 久山佳代(DDS)²⁾, 宇都宮忠彦(DDS)²⁾, 松本 敬(CT)³⁾, 日本浩嗣(DDS)²⁾

【目的】口腔カンジタ症の診断には, 臨床症状と併せて培養検査や塗抹検査が用いられるが, 口腔病態と細胞所見との検討はあまりなされていない. 本報告では口腔擦過細胞診でカンジタが検出された症例の臨床および細胞所見を把握することを目的とした.

【材料および方法】1976年から2003年の間に当付属歯科病院で行った擦過細胞診標本のうち, 口腔病変部よりカンジタが検出された258例を対象とし, 患者の年齢, 採取部位および臨床および細胞所見を検討した.

【臨床所見】258例の平均年齢は 65.4 ± 13.7 歳であり, 60歳以上が74%を占めた. カンジタ検出部位は舌が最も多く37.2%で, ついで歯肉(33.5%), 頬粘膜(23.7%), 口角(4.5%)であった. 臨床所見は紅斑を示すものが75.2%と多数を占め, 白斑(24%)あるいは偽膜(0.8%)を示すものよりも多かった.

【細胞所見】紅斑を示す特徴的な症例では, 軽度~高度の炎症性背景に核腫大, 大小不同, 核形不整, ハローを有する扁平上皮細胞が認められた. 背景には仮性菌糸よくなるカンジタが認められた.

【考察】カンジタは30-60%の割合で健常人の口腔内からも検出される. 口腔カンジタ症の発症には局所因子の影響が大きい. 舌背は咀嚼時に刺激を受けやすく, 義歯の装着は歯肉の環境を変化させることからこれらの部位で, また義歯装着年代での発症が多かったと考えられた. 臨床症状は白斑あるいは偽膜が有名であるが, 本報告では紅斑を示すものが多くみられ, 炎症徴候を随伴することが口腔カンジタ症の特徴的な臨床所見および細胞所見であると考えられた. (本研究の一部は文部科学省平成13年度学術フロンティア推進事業による.)

C-60 NIRS 計測における脳活動信号成分抽出手法の検討—主成分分析を用いた咀嚼筋血液成分の除去—

川崎 真護¹, 田中 尚樹², 成田 紀之³

¹(株)日立メディコ応用機器開発室, ²(株)日立製作所基礎研究所, ³日本大学松戸歯学部歯科補綴学第三講座

【目的】 NIRS を用いた無侵襲脳機能計測で得られる咀嚼運動時の Hb 濃度変化波形にはしばしば咀嚼筋血液成分が重畳し, 診断の妨げになる。本研究ではこの咀嚼筋血液成分を除去する手法について検討した。【方法】 健常者 9 例の左頭頂葉領域に NIRS プローブを装着し, 右咀嚼運動時の Hb 濃度変化を計測した。【結果】 9 例の加算平均波形では運動野, 感覚野領域に相当するプローブ部位で課題中に Hb 濃度増加が確認され, 咀嚼筋領域に相当するプローブ部位で課題中に Hb 濃度減少が確認された。NIRS 先行研究でも課題中に咀嚼筋領域の Hb 濃度減少が報告されている。この波形に主成分分析を適用した結果, 第 2 主成分に咀嚼筋血液成分を示唆する Hb 濃度減少波形が抽出された。この第 2 主成分を除去して波形を再構成したところ, 運動野, 感覚野領域において明瞭な脳活動を確認できた。【結論】 主成分分析は脳活動信号成分の抽出に有効であると考えられる。

STUDIES ON CELLULAR AGING IN ORAL BIOLOGY AND MEDICINE

Yoshimitsu Abiko, D.D.S., Ph.D.

Professor, Department of Biochemistry,

Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan

Health and aging are deeply meaningful and complex realities. With the demands placed on public health resources due to the aging population in society, elucidation of the molecular basic mechanisms of aging is becoming an important subject in medical research. In general, aging has been defined as a decline in the functional activity to adapt to environmental stress. This decline has often been attributed to decrease of each cellular function or to excessive response against stimuli thought to be involved in diseases of the aged. Therefore, it is important to define how the aging of oral tissues affects the progression of oral diseases. 1. Functional changes of periodontal tissue cells by aging: Although the severity of periodontal disease is known to be affected by age, functional changes of periodontal tissue cells during the aging process are not well characterized. In vitro aging of human gingival fibroblast (hGF) and periodontal ligament fibroblast (hPLF) cells were prepared from healthy gingival tissues by sequential subcultivations. hGF were also prepared from gingiva of Down's syndrome patients and rats. Osteoblasts were prepared by sequential digestion with collagenase from fetal rat calvaria. GF and DLF were treated with LPS from periodontal pathogen and mechanical stress by cyclic tension-force, respectively. Amounts of IL-1 β , PGE2, IL-6, plasminogen activator (PA) were measured. Total RNA was extracted and mRNA expression was analyzed by RT-PCR. LPS and mechanical stress stimulated IL-1 β , PGE2, IL-6, and PA productions in old GF and PLF than in young cells, through enhancement of those mRNA levels. These findings suggest that cellular aging may be one of important factors in the progression of periodontal disease through higher production of inflammatory mediators. In addition, oxygen radical treated fibronectin (FN) as substratum diminished bone nodule formation by osteoblasts when compared to intact FN. This finding suggests that FN plays important roles in osteoblasts and FN damaged by oxygen radicals during the aging process may inhibit bone formation. 2. Effect of aging on gene expressions in submandibular gland: Saliva imparts a number of physiological roles that are intimately involved in the maintenance of oral health. Biological active proteins that have been implicated in the

maintenance of mucosal integrity and oral wound healing specificity include growth factors present in saliva . Although biological functions of salivary glands are known to be affected by age, very little is known about the effect of aging on the alteration of gene expressions in salivary glands. The changes of gene expression level in young and old mice submandibular glands were examined using Incyte cDNA microarray (Mouse GEM I; 8734, genes) and Affymetrix oligonucleotide microarray (GeneChip[®] Mu6500, 6,500 genes). Mouse GEM I and GeneChip[®] Mu6500 successfully identified 21 increased/76 decreased genes and 25 increased/177 decreased genes, respectively, that changed more than 2-fold by aging. Many features of the transcriptional changes such as salivary flow rate- and transport/secretion-associated genes appeared to be related to the functional changes by aging. These results demonstrate that the DNA microarray technology is useful to elucidate the functional changes of salivary gland by aging through the monitoring of alteration of gene expressions.

日本顎咬合学会 (特別講演) 2002.4.14

バイオサイエンス応用による未来の歯科医療

安孫子 宜光

日本大学松戸歯学部生化学教室

Future Dental Therapy Utilizing Bioscience

Yoshimitsu Abiko

Nihon University School of Dentistry at Matsudo

歯科材料と治療技術の飛躍的な発展により 20 世紀の歯科医療の高度な歯科医療が支えられてきた。さらなる開発が必要であり重要課題であることは当然であるが、21 世紀を迎え、生命科学的アプローチを応用した歯科医療体系の構築も必要であると指摘されている。近年、口腔感染症が心筋梗塞、肺炎、糖尿病、出産児の体重減少、骨粗鬆症肥満など種々の全身疾患のリスク因子であることが明らかにされつつある。先進的なバイオテクノロジー技術や細胞工学技術を応用した口腔感染症の制御への戦略について、口腔常在菌を味方にするう蝕のリプレースメント療法、安全性の高い歯周病の免疫療法の開発について紹介する。また、ヒトゲノムプロジェクトなどバイオサイエンス研究は驚異的な発展をみせ、ゲノムデータベースの蓄積が進展している。近い将来、新生児の少量の血液試料からヒトの生死に関わる遺伝子疾患を遺伝子チップを用いて解析し、生活習慣の指導、化学療法、遺伝子治療などによってカスタムメイド療法を行うことで、ほとんどのヒトが寿命をまっとうできると予想されている。一般に、老化により口腔の創傷治癒能の低下や口腔感染症が増大するといわれている。また、咬合機能の低下が記憶学習能に影響すると信じられている。歯科医学にとってこれら重要なテーマについての実証科学が求められている。これらの現象の解明に向けて動物実験系を用いて遺伝子発現チップを応用した研究アプローチについても解説したい。

Oxygen radicals induce apoptosis in human salivary gland cells. H. TAMAKI*, Y. KAMINO, Y. ABIKO, and H. NAGURA, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

Objectives: Oxygen radicals have been implicated in cellular damage, protein oxidation, membrane lipid peroxidation, enzyme inactivation, and DNA chain breakage during the processes of inflammation and/or aging. Apoptosis, or programmed cell death, is an essential mechanism for the selective elimination of cells, however, deficient or accelerated cell death is associated with a variety of disorders, encompassing most cell systems. In this study, we investigated the effects of extracellular oxygen radicals on apoptosis in a cultured human salivary gland cell line (HSG cells). Methods: The induction of apoptosis was examined in HSG cells exposed to an oxygen radical [hypoxanthine (HX) 0.1 mg ml⁻¹/xanthine oxidase (XOD) 5 munit ml⁻¹] system. Following a 10minute exposure, the cells were washed twice with PBS (-), cultured for 20minutes in fresh medium containing 2% fetal calf serum, and fixed with paraformaldehyde/PBS (-) (pH 7.4). The appearance of nuclei with DNA fragmentation was then detected by Terminal Deoxyribonucleotide Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling (TUNEL) and the expression of Caspase-3 by immunocytochemistry. Results: The number of apoptotic HSG cells induced by HX/XOD was significantly ($p < 0.05$) greater than the control. Further, the Caspase-3 staining intensity in HX/XOD treated HSG cells was more than that in the control. Conclusions: These results suggested that Caspase-3 expression might be regulated by oxygen radicals and involved in oxygen radical-induced apoptosis in HSG cells. This study was supported by a Grant from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture to promote 1998- multidisciplinary research projects (in 1998-2002).

歯周病が細菌感染による炎症性疾患であることから、抗炎症剤、抗生剤などの薬物療法が試みられてきた。しかし、特効薬はなく急性に悪化した際に補助的に用いられているのが現状であろう。薬物療法で完治できない理由として、細菌叢の除去が困難であり、感染が繰り返し起こることが考えられる。また、有効濃度を維持させるためには大量投与を必要とし、長期投与によってそれなりの効果は期待できるであろうが、耐性菌の出現、副作用など安全性に問題がある。近年、局所に作用させる local drug delivery system も工夫されているが完治させるには至っていない。

近年、歯周病の病態解明が進み、種々の炎症性サイトカインのネットワークの実態が明らかにされつつあり、近未来的にはサイトカイン療法も期待される。しかし一方では、炎症は本来、生体防御系として存在し、強引にサイトカインネットワークを狂わせることは感染の遷延化を引き起こす可能性もあろう。

ヒトゲノム計画の終了が間近い。ゲノム、トランスクリプトーム、そしてプロテオームの情報データベースがさらに充実すればバイオインフォマティクスを応用した生命科学研究が飛躍的に進展するのは疑いがない。歯周病における分子レベルでの病態解明、歯周病の遺伝子リスク因子診断などに基づいて生活習慣の指導、ゲノム創薬、化学療法、遺伝子治療などによるカスタムメイド医療も近い将来というわけにはいかないが、実現するであろうと思われる。

歯周治療の困難さが改めて思い知らされるが、生活習慣病としての認識からも発想を転換して、薬剤の長期投与による危険性や不合理性を回避して、歯周病制御のために持続性のある口腔環境へ人為的に変換させるのはどうだろうか？つまり創物主が他の組織に比べて、不完全な自然治癒、再生力に創造してしまった歯周組織を認めて、歯周病の制御の観点から口腔環境を改造できたら？というわけである。

プラークは歯肉炎症を引き起こす。口腔常在菌を味方にしてプラーク形成を抑制できれば？*S. mutans* は、蔗糖から不溶性グルカンを合成することで歯垢形成を促進する。サイクロデキストランが *S. mutans* の不溶性グルカン合成酵素を低濃度で強力に阻害することが明らかになった。さらにサイクロデキストラン合成酵素を産生する土壌細菌 *Bacillus circulans* が発見され、遺伝子が単離された。そこで口腔常在菌の *S. gordonii* に遺伝子導入し、サイクロデキストラン合成酵素を細胞外に分泌する遺伝子組換え菌株を作成した。遺伝子組換え菌株のリプレースメント療法によって持続的なプラーク抑制が期待される。また、歯周病原菌 *P. gingivalis* の赤血球凝集因子（上皮細胞定着因子）活性を抑制する ScFv 組換え抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、*Bacillus brevis* 宿主で ScFv を大量生産させることに成功しているが、ScFv 遺伝子を *S. gordonii* に導入することも興味もたれる。

唾液は、増殖因子や殺菌因子など多数の生理活性物質を分泌している。一方、唾液線は遺伝子治療の標的臓器として利点が多い。たとえば開口部から遺伝子導入が可能で外科的手術を必要としない。ウイルスベクターを用いないで遺伝子導入も可能であることから感染の耐性化がなく繰り返し治療できる。また、口腔内への有用産物の分泌だけでなく、全身への供給も期待できる。事実、抗菌作用物質、唾液分泌促進タンパクなどの分泌を増大させたと報告されている。DNA チップ解析技術を用いて老化によって発現が変動する唾液腺遺伝子を探索している。将来、有用な遺伝子導入によって歯周病予防に役立つ唾液成分に改善できると期待している。

機器さえ安価に提供できるようになると、理化学療法は医師指導のもとに自宅での実施が可能と思われる。難治性の病態という意味で歯周病と類似している、帯状疱疹、関節リュウマチ、アトピー、皮膚潰瘍などにレーザー治療が試みられ、治癒促進効果がみられるという。当教室では、歯根膜細胞への過剰な周期的進展力の付加、歯肉細胞への歯周病原菌 LPS 刺激を行い、低出力レーザー照射を行ったところ、炎症性サイトカイン、プロスタグランジン E2、プラスミノゲン活性化因子の産生が抑制され、いずれも遺伝子の転写レベルで効いていることが判明した。また、レーザー照射の生物学的効果の解明の一助として、差分遺伝子クローニング、マイクロアレイ解析を利用して、骨芽細胞への照射によって変動する遺伝子の探索を試みている。これらの研究は効果の高い副作用のないレーザー治療の開発に役立つと考えられる。

2330 Immortalization of periodontal ligament cells by transduction of hTERT gene

T. FUJITA¹, Y. TANAKA², Y. ABIKO², and J. MEGA², ¹ Nihon University Graduate School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Chiba, Japan, ² Reserch Institute of Oral science, Matsudo, Chiba, Japan

Objectives: It is important to characterize the cells being in periodontal ligament region to understand the periodontal regeneration. However, the cloning of cells isolated from periodontal ligament region is difficult, since the proliferative capacity of human periodontal ligament cells (HPL) is limited. The aim of this study is to establish immortal cell lines of HPL by the induction of telomerase activity using retroviral infection of hTERT gene and isolate single-cell derived clones by using limited dilution technique. **Methods:** The periodontal ligament tissues were collected from tooth roots extracted for orthodontic reasons. HPL were established according to the method of Somerman et al. The established HPL cells were infected with hTERT gene. After the infected cells were selected by antibiotics, telomerase activity was determined by telomeric repeat amplification protocol (TRAP assay) . These cells were isolated to single clone by using limited dilution technique. Furthermore, the gene expressions of osteogenic markers such as alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OC) were examined for each cell clone by RT-PCR. **Results:** TRAP assay showed that HPL-hTERT has specific expression as well as positive control. The original HPL grew at a similar rate with HPL-hTERT by day 80. While HPL began to be plateau and ceased to proliferate at 45 passages, the populations of HPL-hTERT actively doubled up over 160 passages at day 230. After the limited dilution, 17 single colonies were isolated. RT-PCR showed a distinctive pattern of gene expression both of ALP and OC in each clone. **Conclusion:** Transduction of hTERT gene into HPL cells helped to extend the life span. This method would be useful to characterize the cells derived from periodontal ligament tissue.

Seq #251 - Periodontal Research Pathogenesis 4

2:00 PM-4:00 PM, Friday, 11 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

[Back to the Periodontal Research - Pathogenesis Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session \(March 9-12, 2005\)](#)

[Top Level Search](#)

2239 Functional analysis of *Porphyromonas gingivalis* HBP35 by amino acid substitution

T. SHIROZA, S. OKANO, Y. SHIBATA, M. HAYAKAWA, and Y. ABIKO, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo-shi Chiba, Japan

Objectives: Periodontitis is one of the most common oral diseases resulting from the infection of *Porphyromonas gingivalis*. Our strategy to prevent this incidence is to establish passive immunization system where endogenous antibodies could directly be applied to neutralize virulent factors associated with this bacterium. We focused our attention on the *P. gingivalis* 35 kDa surface protein, or HBP35, since this protein is involved in not only the coaggregation with oral microflora but also hemin-binding. In addition, nucleotide sequencing of the gene, *hbp35* (Gene ID pg0554), coding for this protein revealed the presence of a total of four Cys residues. Of these, the first two consisted of the amino acid stretch, EVFTA~~EW~~CGYCPGGK, a catalytic center for thioredoxin. To prepare the effective antibody for passive immunization, functional analysis of this protein was carried out following amino acid substitution. **Methods:** To introduce the site-directed mutagenesis, we exploited a simple, rapid, and non-expensive approach based on the utilization of only the T4 DNA polymerase, and all four codons coding for Cys residues were successfully altered to those coding for Ser residues. The mutagenized plasmids were transformed into *Escherichia coli* disulfide bond formation-deficient strain, JCB 572, defective in alkaline phosphatase (AP) activity, and poor motility on soft agar plate due to inefficient S-S bond formation. **Results:** *E. coli dsb* mutant harboring the native *hbp35* restored the AP activity while those possessing either first or second Cys to Ser-mutation diminished this complementation. Mutation in the third or fourth Cys was no effect on AP activity. On the other hand, the *dsb* transformants harboring the mutagenized individual plasmid exhibited rather complex motile activity profile on soft agar plate. **Conclusion:** The present results clearly indicated that, in addition to previously identified function, coaggregation and hemin-binding, the HBP35 could participate in disulfide bond formation in *P. gingivalis* cells.

Seq #245 - Microbial and Molecular Studies of *Porphyromonas gingivalis*
2:00 PM-4:00 PM, Friday, 11 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

[Back to the Microbiology / Immunology and Infection Control Program](#)
[Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session \(March 9-12, 2005\)](#)

[Top Level Search](#)

Construction of Plasmid DNA for Introduction of Multiple Mutations Using a Single Drug-resistance Gene. T. SHIROZA*, Y. HOOGI, K. HIRATSUKA, S.

HAMASHIMA, and Y. ABIKO, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan

Objectives: Our research interest is to establish a passive immunization system, and molecular genetic approach as well, to prevent adult periodontitis where *P. gingivalis* is recognized to be one of the virulent bacteria. Genomic sequencing of this bacterium has almost accomplished by world-wide-project and acquisition of sequencing data allowed us to identify the presence of ORF in certain region. However, more than half of the-ORFs identified are physiologically function-unknown. One possible approach to elucidate the function of gene product is to delete the gene, and re-introduce the mutagenized gene back in to the deletant so that the variant protein could be expressed. However, the most commonly used drug-resistance gene in this bacterium is the *ermF*. This strictly restricts the construction of multiply-mutagenized *P. gingivalis*. The aim of this study was to construct the plasmid DNA to introduce multiple mutations using a single drug-resistance gene. **Methods:** We attempted to construct the plasmid utilizing the heterodimer system, recently established novel technique from this laboratory. The target gene was LANL Gene Id PG0554 (<http://www.stdgen.lanl.gov/oragen/>) and upstream and downstream genes (PG0553 and PG0555, respectively) were used. The designed structure of the plasmid was; 3'-end of PG0553, *ermF* gene cassette, 3'-end of PG0553, and 5'-end of PG0555, where both double-crossing-over and Campbell type integration could be combined. **Results:** We successfully constructed the plasmid with proper structure. **Conclusion:** The heterodimer system is a useful tool for construction of plasmid with rather complex structure. Currently, transformation of *P. gingivalis* using this plasmid is underway.

エキソヌクレアーゼを利用した、部位特異的変異の迅速導入法-*P. gingivalis* 由来 HBP35 のアミノ酸変異

○城座 映明^{1,3}、岡野 総一郎¹、柴田 恭子^{1,3}、早川 光央^{2,3}、安孫子 宜光^{1,3} (¹日大 松戸歯生化学、²日大 松戸歯 化学、³日大 松戸歯口科研)

P. gingivalis 由来 HBP35 をコードする遺伝子 (Gene ID pg0554) は当研究室によりすでにクローン化されている。本タンパク質中に存在する Cys を Ser に置換するため、エキソヌクレアーゼを利用した部位特異的変異について検討を行った。ミスマッチを含む、完全に相補な2本の PCR プライマー (24 mer) を、および、プラスミド上で標的部位とはほぼ反対側にあたる領域に、約 100 bp の間隔でオーバーラップするような2本の PCR プライマー (24 mer) を化学合成した。これらのプライマーを組み合わせて得られる2種の PCR 産物では、一方の末端はミスマッチを含む 24 mer 部位が、また、他方の末端は、約 100 bp が共通領域である。この2種の PCR 産物をエキソヌクレアーゼで処理して両末端を部分的に1本鎖とした後、大腸菌に直接導入し、変異の導入されたプラスミドを有する形質転換体を得た。これは、部分的に1本鎖となった両末端共通部位が相補な構造を取るため、この部分を介して変異プラスミドが *in vivo* で形成されたことによると考えられる。陽性クローンより得た変異 HBP35 に対し TOF-MS による分析を行い、アミノ酸の置換を示唆する結果をタンパク質レベルで得ることが出来た。

Functional analysis of the *Porphyromonas gingivalis* hemin binding protein 35 by amino acid substitution

○Teruaki Shiroza^{1,2}, Soichiro Okano¹, Yasuko Shibata^{1,2}, Mitsuo Hayakawa^{1,2}, Yoshimitsu Abiko^{1,2}

(¹Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, ²Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

[Introduction] We previously cloned the gene coding for the 35-kDa hemin binding protein (HBP35, Genbank # AB059658, Gene ID pg0554) from *P. gingivalis*. Nucleotide sequencing indicated that the gene product contained a total of four Cys residues. Of these, first two consisted of a typical functional motif, CxxC, found in many thioredoxins. [Materials and Methods] To identify the function of this protein, each Cys residue was substituted for Ser residue by site-directed mutagenesis, and mutagenized plasmid was transformed into *E. coli* dsb mutant, defective in alkaline phosphatase (AP) due to the lack of disulfide bond formation. [Results and Discussion] *E. coli* dsb mutant harboring the native hbp35 gene restored the AP activity while those possessing either first or second Cys-mutation diminished this complementation. Mutation in third or fourth Cys was no effect on AP activity. This result indicated that, in addition to previously identified function, coaggregation and hemin-binding, the HBP35 could participate in disulfide bond formation.

tshiroza@mascad.nihon-u.ac.jp

独自に開発した換気式微量拡散によるフッ化物定量法の測定精度

○田口 千恵子, 小林 清吾, 有川 量崇
鈴木 瑠美, 後藤田宏也, 水野 恭子
(日本大学松戸歯学部 衛生学講座)

【目的】食品由来のフッ化物（以下、 F^- ）摂取量の把握、また F^- の代謝研究のため、食品や生体試料中に含有される F^- について種々の定量法が用いられてきた。摂取した F^- を生体が吸収、利用できる生体利用能（Bioavailability）は食品の様々な性状により異なるとされている。

我々は、生体利用能の研究に不可欠と考えられる、低濃度レベルで、しかも、拡散速度を把握できる方法を開発し、測定精度を検討した。

【方法】拡散装置は、拡散液槽、反応槽、捕集槽で構成し、各槽には、市販のシリンジ（50ml：TERUMOR[®]、100ml：JMSシリンジ）を用いた。拡散液には、HMDS 飽和 5.0M $HClO_4$ 溶液、捕集液には0.1M NaOHを用いた。試料を入れた反応槽に拡散液を注入し、反応槽側に栓をした後、拡散液槽を除去する。反応槽と捕集槽を接続し、一定の気体を反応槽に引き込んだ状態で、恒温水槽（60度）に浸漬する。一定時間（3分、5分または10分）

後、反応槽を攪拌し、反応槽内の気体と反応ガスを捕集槽に引き込み、捕集液と気体を攪拌する。その後、捕集槽内の気体を反応槽に引き込む。この換気を2、3回繰り返す。拡散終了後、捕集液を F^- 電極にて測定した。

【結果および考察】食品に含有される F^- の定量法として、換気式微量拡散による F^- 定量法を開発した。標準液（10ppm $F^- \times 1ml$ ）回収試験において回収率 97.1%（SD=2.3%）、CV値2.4%、また、牛乳+標準液（0.02ppm $F^- \times 5ml$ ）の回収試験では回収率113.5%（SD=1.3%）、CV値1.2%であった。試料 F^- 濃度を2.5倍～10倍にして測定できた。さらに、任意の時間間隔で捕集槽を交換することで、1試料毎に F^- 拡散率を測定でき、食品由来 F^- の生体利用能を具体的に検討できる可能性が見出された。平成13年度文科省学術フロンティア推進事業による。

31. 自動換気式微量拡散装置によるフッ化物定量法について

松戸歯学部 衛生学講座

○田口千恵子, 小林清吾, 有川量崇
後藤田宏也, 水野恭子

【目的】様々な性状の食品に対応し, 低濃度のフッ化物(以下: F^-)を安定して測定でき, さらに F^- の拡散速度を把握できる F^- 分離捕集法の開発を目的とし, 換気式微量拡散法を考案した。前報告のごとく手動作業実験で良好な結果が得られたので, 今回は, 作業を自動的に行なえる装置の開発と測定精度評価を行ったので報告する。

【原理・方法】1) 自動装置の開発。装置は, 拡散液槽, 反応槽, 捕集槽, 換気シリンジで構成し, 密閉系である。動力としては, 体積可変のシリンジのプランジャー保持台が交互に動き, 連結された各部分に空気と反応ガスを一定時間を持って自動的に移動させる。弁の開閉動作のタイミングを組み合わせることにより, 反応槽内の陰圧度を任意に調節する。2) 測定精度評価。拡散液には HMDS 飽和 5.0 M $HClO_4$ 溶液 40 ml, 捕集液には 0.01 M NaOH 2 ml を用いた。試料として 0.1 ppm F^- 標準液, 牛乳(明治) 40 ml を用いた。拡散終了後, F^- 電極にて測定した。

【結果と考察】1) 時間経過を追うことができる陰圧換気微量拡散装置を開発した。2) 0.1 ppm F^- 標準液回収試験においては, 測定値 0.101 ppm (SD=0.001), CV 値 1.4% であった。最終測定液の F^- 濃度を 20 倍に濃縮して測定できることが可能であった。牛乳に F^- 標準液を添加した場合の回収試験においては, 0.1 ppm F^- 添加で, 0.092 ppm, 0.5 ppm F^- 添加で, 0.43 ppm, 1.0 ppm F^- 添加で, 0.86 ppm の濃度が回収された。 F^- に対する特異性があるものと考えられた。

【結論】今回開発の装置は, F^- 分離捕集法として, 時間間隔の F^- 捕集の測定が可能であり, 測定精度の向上が図られるものとして有望であると考えられた。今後, 生体利用能との対応を検討していく期待が持たれた。

平成 13 年度文科省学術フロンティア推進事業による。

換気式微量拡散による食品中フッ化物定量法の開発

田口 千恵子¹、小林 清吾¹、有川 量崇¹、鈴木 瑠美¹、後藤田 宏也¹、水野 恭子¹、田口 円裕²
¹日本大学 松戸歯学部 衛生学、²厚生労働省 医政局 歯科保健課

要約：食品に含有されるフッ化物（遊離されたフッ化物：以下Fとする）の定量法として、換気式微量拡散によるF分離法を開発した。標準液（10ppmF×1ml）回収試験において回収率97.1%（SD=2.3%）、CV値2.4%、また、牛乳+標準液（0.02ppmF×5ml）の回収試験では回収率113.5%（SD=1.3%）、CV値1.2%であった。なお、試料を5g～20g用いることで試料F濃度を2.5倍～10倍にして測定できることが半明した。さらに、任意の時間間隔で捕集槽を交換することにより、1試料毎にF拡散率を測定でき、食品由来Fの生体利用率（Bioavailability）を具体的に検討できる可能性が見出された。（索引用語：フッ化物定量法、換気式微量拡散法、原理）

目的：

フッ素の存在は結合型もあるが、生体に吸収される代謝の主役と考えられる遊離されたフッ化物に注目した。食品由来のF摂取量を把握し、またフッ化物代謝の研究をするため、食品や生体試料中に含有されるFの定量法について種々の方法が開発されてきた^{1,2,3}。しかし、わが国における食品中F濃度は報告者により大きな差が見られ、また、食品の性状により生体利用率に差があるとされながら、食品由来Fの意義については定量的な評価に至っていない現状にある。そこで我々は、食品の様々な性状に対応でき、また、低濃度でもFを安定して測定でき、さらに拡散速度を把握できる方法の開発に取り組んだ。

対象および方法：

装置概略を図に示す。本装置は、拡散液槽、反応槽、捕集槽から構成されており、それらには市販のシリンジ（50ml：TERUMO シリンジ、100ml：JMS シリンジ）を用いた。拡散液槽、反応槽、捕集槽はタイゴンチューブ、テフロンチューブを用いて接続し、気密性を高めた。拡散液には、HMDS 飽和の5.0MHClO₄溶液を、捕集液として0.1M NaOHを用いた。作業手順は以下である。1. 拡散液注入：試料を入れた反応槽に拡散液を注入し、反応槽側に栓をした後、拡散液槽を除去する。2. 拡散：反応槽と捕集槽を接続し、空気を反応槽に引き込んだ状態で、60℃の恒温水槽に浸漬する。3. 捕集：一定時間（3分、5分または10分）後、恒温水槽より取り出した反応槽を攪拌した後、反応槽内の空気と反応ガス（HF）捕集槽に引き込み（図中→換気）、捕集槽内のNaOHと気体を攪拌する。その後、捕集槽内の空気を反応槽に引き込む（図中←換気）。この左右方向の換気を2、3回繰り返す。捕集槽には、自作の攪拌子を入れ、気体とNaOHが混和しやすいようにした。換気は、先に送り込まれる側のシリンジを引き、後で送り込む側のシリンジを押すことによりシリンジ内の圧が1気圧以上にならないよう留意した。2. 拡散と3. 捕集の作業をあわせて1クールとする。拡散終了後、捕集槽よりNaOH1mlを採取し、TISAB III（ORION社製）を0.1ml1加え、F複合電極（ORION社製96-06）を用いて、F濃度を測定した。試料中のF濃度は、試料重量、捕集液重量をもとにブランク値（n=5、平均0.005ppm）を減じて算出した。[実験1]標準液のF濃度回収試験：10ppmFの標準液1ml、拡散液4ml、捕集液2ml。換気は3分毎に3回（3回の換気に3分程度必要であった）を行い、10クール繰り返した。10クール終了後、捕集液のF濃度を測定した。[実験2]牛乳中のF濃度測定：牛乳10ml、拡散液10ml、捕集液2ml。拡散時間2時間、換気は10分毎に2回の換気を12クール繰り返した。[実験3]F添加回収試験：牛乳5mlに0.02ppmFの標準液を5ml添加し試料とした。拡散・捕集条件は、実験2と同様である。回収率は、実験2で得られた牛乳中F濃度をもとに期待されるF含有量を求め、これを分母として算出した。[実験4]牛乳のF濃度と拡散速度：牛乳10ml、拡散液10ml、捕集液2ml。トータルの拡散時間を3時間とし、拡散速度測定のため、1時間毎に捕集槽を交換した。5分間隔2回の換気を繰り返し1時間当たり12クールの換気を行った。各実験の試料数を5とした。

結果および考察：

[実験1]10ppmFの標準液の回収率は97.1%（SD=2.3%）と高く、CV値は2.4%であった（表1）。[実験2]牛乳中のF濃度は0.0194ppm、CV値1.7%であった（表2）。一般には測定しにくいと考えられている性状の食品にもかかわらずCV値が比較的小さい（表3）。別所⁴は、20種の牛乳を「直接微量拡散法-GC法」により測定し、Fの平均を0.018ppmと報告している。今回の結果はその値とほぼ同様であった。[実験3]牛乳に標準液を添加した回収率は113.5%、CV値1.2%であった（表3）。ここでの回収率は、標準液調整に用いる蒸留水（イオン交換処理）中Fの影響が考えられ、今回は10倍濃縮法により得たデータより、蒸留水中Fを0.0015ppmとして回収率を計算した。[実験4]牛乳（10ml）を3時間拡散して捕集した平均のF濃度は0.021μgであった。この全体のF量に対して、各1時間毎で捕集されたF量の割合を算出すると、1時間で91.0%（SD=3.7%）、2時間で6.3%（SD=2.9%）、3時間で2.7%（SD=2.1%）であった。3時間目

の捕集はほぼブランク値に近似したことから、牛乳においては、2 時間でほぼ拡散が終了すると推察される。この結果から、拡散速度すなはち経時的な拡散率を把握できることが示され、生体利用能の具体的な検討につなげることができると考えられた。しかしながら、今回の1時間毎の拡散速度を考慮すると捕集槽の交換をより短時間で進行する必要性が確認された。また、全実験結果を通して、CV 値が低く、5%以下で測定することができた。これは、測定試料のF濃度を2.5倍～10倍に濃縮して測定できること(反応槽を2重に用いれば20倍にすることも可能)、密閉式ではあるが、温度と反応ガスの発生で反応槽、捕集槽内の気体膨張に対応して、管内の容積を大きくできることが有効に作用していることが考えられる。また、反応槽と捕集槽が別々であることから、反応槽は高温で、捕集槽は室温に置けるために、拡散、捕集の効率が高くなるものと思われる。一方、解決すべき問題点として、1) 反応槽と捕集槽の換気を行うための単純作業を機械化すること。2) 拡散時間内の全体を通して、反応槽の温度管理を一定にすることがあげられる。これらの改善を加えたうえで、今後は本方法を用いて生体の胃に近い条件として、反応槽の温度や拡散液の濃度を設定し、食品含有Fの生体利用能を検討していく予定である。

本研究は、平成13年度学術フロンティア推進事業の補助により実施した。

文献：

- 1) Taves, D. R : Br. J. Nutr. , 49:295-301, 1983.
- 2) 村松俊夫ら：東京衛研年報 26 ; 192-195, 1975.
- 3) 板井一好：日衛誌 45 ; 1061-1073, 1991.
- 4) 別所洋子：昭歯誌 7 ; 154-165, 1987.

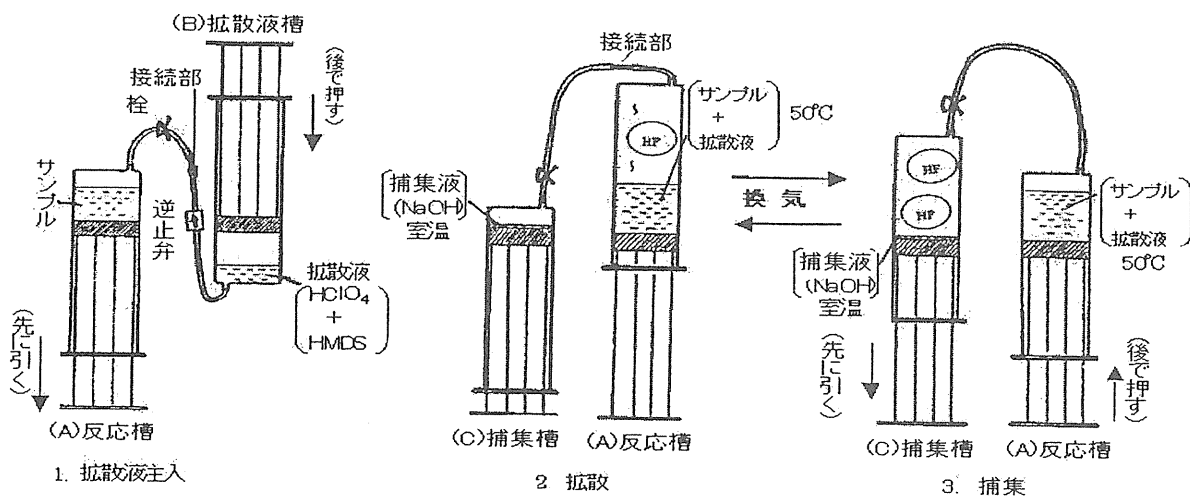


図 換気式微量拡散法の作業手順

表1 標準液F回収試験 (10μg:10ppmF×1ml)

n	F回収率(%)	SD(%)	CV(%)
5	97.1	2.3	2.4

拡散時間:1時間, 換気回数:3回×10クール

表2 牛乳中のF濃度 (牛乳:10ml)

n	F濃度(ppm)	SD(ppm)	CV(%)
5	0.0194	0.0008	1.7

拡散時間:2時間, 換気回数:2回×12クール

表3 牛乳に標準液を添加した場合のF回収試験 (牛乳5ml) + (0.1μgF:0.02ppm×5ml)

n	F回収率(%)	SD(%)	CV(%)
5	113.5	1.3	1.2

拡散時間:2時間, 換気回数:2回×12クール

牛乳F濃度=0.0194ppm(表2より)

期待F含有量=0.2045~0.2065μg

自動換気式微量拡散装置によるフッ化物単離回収法の開発

○田口 千恵子¹、小林 清吾¹、有川 量崇¹、後藤 田 宏也¹、水野 恭子¹ (¹ 日本大学 松戸歯学部 衛生学)

【目的】食品の様々な性状に対応でき、また、低濃度でもフッ化物（以下、F⁻）を安定して測定でき、さらに F⁻の回収率や回収速度を把握できる自動換気式微量拡散装置の開発に取り組んだ。

【方法】本方法は、従来の微量拡散法を進化させたものであり、体積可変のシリンジを用い、別々の反応槽と捕集槽をチューブで連結し、空気を換気することによって、反応槽で発生したフッ化物を捕集槽で捕集する方法である。拡散液には、HMDS 飽和 5M HClO₄ 溶液、捕集液には 0.01M, 0.1M NaOH を用いた。拡散終了後、捕集液を F⁻電極にて測定した。手動作業の結果から本方法の原理が合理的であると判断できたので、作業効率の向上のため、装置の自動化を計った。

【結果と考察】手動作業による結果、標準液(10ppm F⁻ × 1ml)の単離回収試験において測定値は 9.7 ± 0.2ppm, CV 値 2.4%であった。また、牛乳中の F⁻濃度は 0.019 ± 0.0003ppm, CV 値 1.7%であった。自動装置を用いると試料 F⁻濃度を 20 倍として測定できた。自動装置による標準液(0.01ppm F⁻ × 40ml)の単離回収試験において測定値は 9.4 ± 0.4ppb, CV 値 4.1%であった。本方法では、最終測定液の F⁻濃度を濃縮して測定することが可能であった。また、拡散・回収の進行中に反応槽または捕集槽をあらたに取り替えることができることから、時間経過を追ったデータより拡散率を把握できることが確認できた。

自動換気式微量拡散装置によるフッ化物分離法の有用性について

衛生学講座

○田口千恵子, 山内里央, 小林清吾
有川量崇, 後藤田宏也, 水野恭子

【目的】フッ化物（以下：F）の生体利用能（Bio-availability）を検討する方法の確立を目的に，食品や生体試料中の F の分離法として，換気式微量拡散による F 分離法を開発し，自動化した。昨年度，自動化した装置の開発と精度の一部については報告したが，さらに，有用性を検討したので報告する。

【材料と方法】試料には，F 標準液 0.01 ppm, 0.1 ppm, 1.0 ppm を各々 40 g，調製粉乳 A（明治ほほえみ）1 g，B（明治ステップ）3 g を用いた。拡散液には，HMDS 飽和 5 M HClO₄ 溶液 40 ml，捕集液には 0.1 M NaOH 3 g を用いた。試料の分離には自動換気式微量拡散装置を用いた。拡散終了後，F 複合電極（ORION 社製 96-06）を用いて，F 濃度を測定した。実験は各試料ともに 3 日間に分けて行った。

【結果と考察】1. 標準液の F 回収による濃度測定：0.01 ppmF 標準液では，0.0092 ppmF (SD=0.0004)，CV 値は 4.6 %であった。0.10 ppmF 標準液では，0.096 ppmF (SD=0.003)，CV 値は 3.2 %であった。1.00 ppmF 標準液では，0.98 ppmF (SD=0.022)，CV 値は 2.2 %であった。今まで正確な測定ができなかった 0.01 ppmF 濃度でも測定可能であった。各濃度レベルでの測定の再現性は極めて高かった。

2. 食品の F 添加回収率と F 濃度測定：調整粉乳 A の添加回収率は，104.3 % (SD=6.2 %)，B の添加回収率は，99.1 % (SD=3.5 %) であった。調製粉乳 A，B の F 濃度は，各々 1.41 ppmF (SD=0.093)，0.57 ppmF (SD=0.028)，CV 値は，6.6 %，4.9 %であった。なお，自動化装置における改善として，泡の発生抑制のために消泡抑制装置を開発し使い，消泡剤も活用した。平成 13 年度文科省学術フロンティア推進事業による。

Microbial Genomics and Periodontal Disease Y. ABIKO and H.K. KURAMITSU
(Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan and State University of New York, Buffalo, New York)

Microbial genome sequencing projects have greatly increased our understanding of the microbial world. The resulting databases will be progressively extended for examination of many organisms and new functional analysis technology will provide new information on their physiology. This symposium will focus on the present status and the future uses of the microbial genome databases for examining pathogenesis, disease progression, and potential to provide new intervention strategies for periodontal diseases. The genomes of three periodontopathogens, *Porphyromonas gingivalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and *Treponema denticola*, have essentially been completely sequenced. The development of DNA microchips based upon this information promises to greatly accelerate our understanding of gene expression relevant to virulence in these organisms. Likewise, differential display technology also could be used to provide similar information even for organisms whose genomes have not yet been sequenced. In addition, in vivo induced antigen technology may be useful for identifying genes expressed during human infection. Therefore, post-genomic technologies based upon the genome databases provides the potential for greatly increasing our understanding of the virulence mechanisms used by periodontopathogens and also the development of novel treatments for controlling periodontal diseases.

Monoclonal Antibody against *Porphyromonas gingivalis* Hemagglutinin Inhibits Hemolytic Activity Y. HOSOGI, M. HAYAKAWA, Y. ABIKO (Nihon Univ. Sch. of Dent. at Matsudo, Chiba, JAPAN)

Porphyromonas gingivalis has been implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis. This bacterium possesses hemagglutinating and hemolytic activities to attach and lyse erythrocytes. Hemolysis by this oral pathogen functions to provide heme-containing molecules for growth in the periodontal pocket. Generally, bacterial cell attachment to erythrocytes is an important initial step for expressing hemolytic activity. In the present study, we examined the effect of monoclonal antibody on the hemolytic activity of *P. gingivalis* cells. We previously constructed a monoclonal antibody using *P. gingivalis* vesicles as the immunogen, designated as MAb-Pg-vc, which inhibited vesicle-associated hemagglutinating activity. Furthermore, we cloned the gene encoding for the 130 kDa hemagglutinin (130 kDa HMG), and identified its functional motif for attachment to erythrocytes. Affinity purified MAb-Pg-vc was used to measure inhibitory activity toward hemagglutinating and hemolytic activities. In addition, the synthetic peptide corresponding to the epitope site of 130 kDa HMG was incubated with the antibody to evaluate the neutralizing activity of antibody-associated function. Our monoclonal antibody inhibited the hemolysis, and synthetic peptide hindered the antibody-mediated inhibition of hemolysis. MAb-Pg-vc will be useful tool to develop a passive immunization against *P. gingivalis* hemagglutinin and hemolysin to assess the treatment of periodontal diseases caused by *P. gingivalis* infection. yhosogi@mascat.nihon-u.ac.jp

Development of Replacement Therapy and Passive Immunotherapy Against Dental Caries*

The colonization and accumulation of cariogenic oral streptococci on the tooth surface have been associated with the ability to synthesize insoluble glucans from sucrose by the action of glucosyltransferase. A novel transformation technique, resident plasmid integration, was used to clone the gene coding for cycloisomaltooligosaccharide glucanotransferase which produces cyclodextran, a potent inhibitor of glucosyltransferase, from *Bacillus circulans* into *Streptococcus gordonii*. The gene product was successfully secreted extracellularly. The novel recombinant *S. gordonii* strain will be useful to develop replacement therapy against dental caries. Another approach to protect dental caries is to develop a safe passive immunization system. We first established hybridoma clones which produced monoclonal antibodies which capable to inhibited glucosyltransferase activity. Then single chain variable fragments of antibody genes were cloned from hybridoma and expressed into *Escherichia coli* using RT-PCR technology. The recombinant single chain variable fragments antibodies will be useful in development of passive immunization. Current concepts in the etiology focus on the relationships between suspected pathogens and host susceptibility to the systemic diseases including cardiovascular disease. Effective control of these pathogens will become more important subject in oral science to maintain quality of life.

*Yoshimitsu Abiko, DDS, PhD

Professor, Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry

Porphyromonas gingivalis と *Actinomyces viscosus* の共凝集における gingipains の役割

○馬場 貴代¹、安部 直子¹、瀧井 良祐¹、
門脇 知子¹、中山 浩次²、柴田 恭子³、安
孫子 宜光³、山本 健二¹ (¹ 九大院・歯・口
腔機能分子、² 長崎大・歯・口腔細菌学、³ 日
大・松戸歯・生化)

【目的】 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*) をはじめとする様々な口腔細菌と共凝集をすることが知られている。この機構における *P. gingivalis* の産生する2種類のシステインプロテアーゼ Arg-gingipain (Rgp) と Lys-gingipain (Kgp) の役割について検討した。【方法】 *P. gingivalis* の野生株、Rgp 欠損株、Kgp 欠損株、Rgp・Kgp 欠損株、Rgp・Kgp・HagA 欠損株、および線毛欠損株を用いて *A. viscosus* との共凝集について調べた。また、Rgp および Kgp 特異的阻害剤の影響についても調べた。さらに、血球凝集抑制活性を示す *P. gingivalis* の抗 vesicle 抗体を用いて、共凝集に関与する分子について解析を行った。【結果と考察】 *P. gingivalis* と *A. viscosus* の共凝集は Rgp 欠損株および Kgp 欠損株では有意に減少し、Rgp・Kgp 欠損株および Rgp・Kgp・HagA 欠損株では完全に消失していた。また、両菌の共凝集は Rgp および Kgp の特異的阻害剤の単独では有意に、両阻害剤の併用で完全に抑制された。*P. gingivalis* の細胞抽出画分を抗 vesicle 抗体でウェスタンブロット解析した結果、野生株や線毛欠損株でみられたタンパク質は各種遺伝子欠損株では正常にプロセッシングを受けていなかった。さらに、これらのタンパク質は Kgp の C 末端付着因子ドメイン内の HGP44 に由来する分子であることが分かった。

Identification of the functional domain in a coaggregation factor from *Porphyromonas gingivalis*. K. YAMADA, Y. SHIBATA, M. KIYAMA- KISHIKAWA and Y. ABIKO* (Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan):

Porphyromonas gingivalis has been implicated as a major pathogen in periodontal diseases. The coaggregation factor plays a role in colonization of *P. gingivalis* in the subgingival area through aggregation with other extant oral microorganisms. We previously succeeded in gene cloning of the 40-kDa outer membrane protein (OMP) and identified as a coaggregation factor. In order to develop a useful vaccine, we examined the functional domain expressing aggregation activity by a phage-displayed epitope mapping system. Peptide-displayed phage clones were isolated by biopanning using mAb, Pg-omp-A2 which inhibited the coaggregation activity, and determined the predicted amino acid sequence. The predicted amino acid sequence identified by phage-displayed epitope mapping was similar to the region of ⁸⁶IALDQTLGIP⁹⁵ in 40-kDa OMP. Next, a series of 6 peptides (designated peptide A to F) in 40-kDa OMP was designed and chemically synthesized. Pg-omp-A2 recognized the peptide C that contained the IALDQTLGIP amino acid sequence. Furthermore, the peptide C reduced the inhibitory activity of Pg-omp-A2 against aggregation activity. These findings suggest that the aggregation-associated functional domain of *P. gingivalis* 40-kDa coaggregation factor may be IALDQTLGIP, and the domain peptide will be useful to develop the component vaccine.

Analysis of Rough-Colony-Specific Proteins of
A. actinomycetemcomitans by Two-dimensional
Electrophoresis

○Haruka Fukamachi¹, Soichiro Okano², Yasuko Shibata²,
Yoshimitsu Abiko², Yoshio Nakano¹

(¹Dept. of Preventive Dentistry, Kyushu Univ. Faculty of Dental
Science, ²Dept. of Biochemistry and RIOS, Nihon Univ. School
of Dentistry at Matsudo)

【目的】*A. actinomycetemcomitans* (Aa) の臨床分離株は、寒天培地では rough 型コロニーを形成し、液体培地中ではガラス壁やハイドロキシアパタイトなどに付着して増殖するが、継代培養を行うと付着能を喪失する事が知られている。そこで、Aa の付着能を持つ株 3381 株と継代培養して付着能を喪失した 3381C 株の二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行った。【方法】Aa 3381 株を継代培養し付着能を喪失するなど形態変化を生じた Aa 3381C 株を得た。Aa 3381 株と Aa 3381C 株の菌体を二次元電気泳動し、タンパク質スポットの比較をし、発現の差があったスポットについて島津製作所ゲルエクサイズプロセッサ xcise によるタンパク抽出・トリプシン処理を行い、MALDI-TOF-MS によりタンパク質を同定した。また、両株に対するポリクローナル抗体を作成し二次元電気泳動後のゲルをウエスタンブロットし、Aa 3381 株と Aa 3381C 株のスポットの違いを比較した。【結果・考察】二次元電気泳動のスポット解析により、付着能を失った Aa 3381C 株には見られず、Aa 3381 株のみで見られるスポット 3 個、Aa 3381C 株でタンパク質量が減少しているスポット 4 個、逆に Aa 3381C 株でタンパク質量が増加しているスポット 3 個をみいだすことができた。また、ウエスタンブロットにおいては、7 個のスポットの変化を見出した。これらのタンパク質は Aa の口腔内への定着、バイオフィルムの形成に関与していると思われる。

fharuka@dent.kyushu-u.ac.jp

Functional analysis of the *Porphyromonas gingivalis* hemin binding protein 35 by amino acid substitution

○Teruaki Shiroza^{1,2}, Soichiro Okano¹, Yasuko Shibata^{1,2}, Mitsuo Hayakawa^{1,2}, Yoshimitsu Abiko^{1,2}

(¹Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, ²Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo)

[Introduction] We previously cloned the gene coding for the 35-kDa hemin binding protein (HBP35, Genbank # AB059658, Gene ID pg0554) from *P. gingivalis*. Nucleotide sequencing indicated that the gene product contained a total of four Cys residues. Of these, first two consisted of a typical functional motif, CxxC, found in many thioredoxins. [Materials and Methods] To identify the function of this protein, each Cys residue was substituted for Ser residue by site-directed mutagenesis, and mutagenized plasmid was transformed into *E. coli* dsb mutant, defective in alkaline phosphatase (AP) due to the lack of disulfide bond formation. [Results and Discussion] *E. coli* dsb mutant harboring the native hbp35 gene restored the AP activity while those possessing either first or second Cys-mutation diminished this complementation. Mutation in third or fourth Cys was no effect on AP activity. This result indicated that, in addition to previously identified function, coaggregation and hemin-binding, the HBP35 could participate in disulfide bond formation.

tshiroza@mascad.nihon-u.ac.jp

エキソヌクレアーゼを利用した、部位特異的変異の迅速導入法-*P. gingivalis* 由来 HBP35 のアミノ酸変異

○城座 映明^{1,3}、岡野 総一郎¹、柴田 恭子^{1,3}、早川 光央^{2,3}、安孫子 宜光^{1,3} (¹日大 松戸歯生化学、²日大 松戸歯 化学、³日大 松戸歯 口科研)

P. gingivalis 由来 HBP35 をコードする遺伝子 (Gene ID pg0554) は当研究室によりすでにクローン化されている。本タンパク質中に存在する Cys を Ser に置換するため、エキソヌクレアーゼを利用した部位特異的変異について検討を行った。ミスマッチを含む、完全に相補な2本の PCR プライマー (24 mer) を、および、プラスミド上で標的部位とはほぼ反対側にあたる領域に、約 100 bp の間隔でオーバーラップするような2本の PCR プライマー (24 mer) を化学合成した。これらのプライマーを組み合わせて得られる2種の PCR 産物では、一方の末端はミスマッチを含む 24 mer 部位が、また、他方の末端は、約 100 bp が共通領域である。この2種の PCR 産物をエキソヌクレアーゼで処理して両末端を部分的に1本鎖とした後、大腸菌に直接導入し、変異の導入されたプラスミドを有する形質転換体を得た。これは、部分的に1本鎖となった両末端共通部位が相補な構造を取るため、この部分を介して変異プラスミドが *in vivo* で形成されたことによると考えられる。陽性クローンより得た変異 HBP35 に対し TOF-MS による分析を行い、アミノ酸の置換を示唆する結果をタンパク質レベルで得ることが出来た。

Proteome Analysis of O₂ Stress in *Porphyromonas gingivalis*. S. OKANO, Y. SHIBATA, T. SHIROZA, and Y. ABIKO (Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, JAPAN)

Background: *P. gingivalis* is a Gram-negative anaerobic bacteria implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis. Like other anaerobic microorganisms that colonize in the gingival tissues and periodontal pockets, *P. gingivalis* must withstand the deleterious effects of molecular oxygen and its metabolites. The aim of this study was to examine the effect of oxygen stress on protein expression in *P. gingivalis* cells to obtain the clue to understand the mechanism resulting in this incidence.

Methods: *P. gingivalis* cells were anaerobically grown under hemin limitation (0.001 mg/ml). After cultivation, a half of culture was further allowed to vigorous rotation to expose air while remainder was kept anaerobic condition. The extracted proteins of them were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Protein expression profile was examined by image scanning and those found in differences were then semi-automatically excised and trypsinized using a high throughput gel-excise processor (Xcise, Shimadzu). The trypsin digest was analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry (AXIMA-CFR, Shimadzu). Many protein spots of 2-DE gels were analyzed by database search system (MASCOT) using the ORF database of *P. gingivalis* W83 from TIGR.

Results: The results indicated the plural numbers of protein expression were increased/decreased by O₂ stress. Interestingly, one of them, DnaK, which was known as a stress protein, was significantly enhanced in *P. gingivalis* after vigorous O₂ exposure.

Gene Expression Monitoring of *P. gingivalis* Virulent Genes and Passive Immunotherapy.
Y. ABIKO (Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo, Chiba Japan)

Emerging evidence suggests that passive immunization against periodontal diseases is highly significant and important. Actualization of passive immunotherapy against human, construction and mass production of safer and useful mAbs, which are capable of inhibiting specific virulent activities, are necessary. On the other hand, DNA microarray gene expression profiling provides a comprehensive portrait of the transcriptional world enabling us to view the global gene expression of microorganisms. Since each *P. gingivalis* strain may express different pathogenicity in response to environment, it is favorable to monitor the expression level of specific virulent factor in target pathogen for immunotherapy. We constructed a custom-made microarray with over a hundred of genes responsible for selected virulent factors and compared the mRNA levels from different strains and culture conditions. Furthermore, real-time RT-PCR analysis were performed to confirm the changes in gene expression. Microarray results demonstrated extensive diversity and variation of the gene expressions in strains and culture conditions. We also succeeded in construction of recombinant ScFv and human type mAbs which are capable of inhibiting colonization of *P. gingivalis*. To increase ScFv preparation, we attempted to construct a gene clone using *Bacillus brevis*, a secretion-proficient gram-positive bacterium, as a host. An ScFv can be produced a large quantity and possessing the functional neutralizing activity. This co-operative strategy, monitoring the pathogenesis by microarray analysis and the utilization of safer mAbs for passive immunization, poses special challenges and opportunities to develop the evidence-based therapy against periodontitis.

2262 Proteomics-based analysis of *Porphyromonas gingivalis* protein expression under aerobic condition

S. OKANO^{*1}, Y. SHIBATA¹, T. SHIROZA¹, Y. NAKANO², Y. YAMASHITA², and Y. ABIKO¹, ¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan, ² Kyushu University, Faculty of Dental Science, Fukuoka, Japan

Objectives: *Porphyromonas gingivalis* is a Gram-negative anaerobic bacteria implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis. Like other anaerobic microorganisms that colonize in the gingival tissues and periodontal pockets, *P. gingivalis* must withstand the deleterious effects of molecular oxygen and its metabolites. The aim of this study was to examine the effect of oxidative stress on protein expression in *P. gingivalis* cells to obtain the clue to understand the mechanism resulting in this incidence. **Methods:** *P. gingivalis* cells were grown under hemin limitation (0.001 mg/ml). After cultivation, a half of culture was further allowed to vigorous rotation to expose air while remainder was kept anaerobic condition. The extracted proteins from cultures with and without oxidative stress were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE). Protein expression profile was examined by image scanning and those found in differences were then semi-automatically excised and trypsinized using a high throughput gel-excise processor (Xcise, Shimadzu). The trypsin digest was subjected to MALDI-TOF mass spectrometry (AXIMA-CFR, Shimadzu) and analyzed by data base search system (MASCOT) using the ORF database of *P. gingivalis* W83 from TIGR. **Result:** Expression level of following four proteins was enhanced when *P. gingivalis* cells were grown under oxidative stress: AhpC (alkyl hydroperoxide reductase C subunit; PG0618), immunoreactive 42kDa antigen PG33 (PG0694), DnaK (PG1208), and HmuY (PG1551). Among these, expression of DnaK was prominent while others were absent in *P. gingivalis* cells without oxidative stress. **Conclusions:** Since AhpC and HmuY are involved in detoxification of oxidative stress and uptake of extracellular components, respectively, these findings suggest that protection mechanism against oxidative damage might be operative when *P. gingivalis* cells were exposed to oxidative stress.

Seq #235 - Genomics/Proteomics and Molecular Biology

10:15 AM-11:30 AM, Friday, 12 March 2004

Hawaii Convention Center Exhibit Hall 1-2

[Back to the Microbiology / Immunology and Infection Control Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 82nd General Session Program listing with access to abstracts](#)

2396

Oxidative effect on gingipains and fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*

M. KIYAMA-KISHIKAWA*, K. HIRATSUKA, S. HAMAJIMA, and Y. ABIKO, *Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan*

Objectives: The influence of oxidative stress on virulence of *Porphyromonas gingivalis* was not well understood. Three major proteins, Arg-gingipain, Lys-gingipain, and fimbriin itself, were found to bind to the upstream region of the *fimA* promoter, and controlled *fimA* gene expression. We studied on the mRNA levels changes of *fimA*, *rgp* and *kgp* under oxidative stress by custom-made microarray and quantitative reverse transcription PCR (QRT-PCR) analysis. Methods: Twenty-ml of cell cultures were transferred to 100-ml flasks and shaken in air, and their total RNAs were isolated. They were reverse-transcribed with fluorescent dye, hybridized with probes on a *P.g* array. QRT-PCR was carried out with reverse-transcribed cDNA and SYBR Green. Results: On the basis of the result of microarray, analysis for the *rgpA*, *rgpB*, *kgp* and *fimA* mRNA levels were carried out by QRT-PCR. Without oxidative stress, the number of *rgpA* transcripts was about 10-fold more than *kgp*, and 30-fold greater than *rgpB*. Under the oxidative stress, the mRNA level of *rgpA* was significantly reduced in a time-dependent manner and the mRNA levels of *kgp* and *rgpB* were decreased from 45 minutes after the oxidative stress. These results from microarray and QRT-PCR were well in agreement with each other. Conclusion: All of *rgpA*, *rgpB*, *kgp* and *fimA* were known to be associated with the bacterial adhesion to human tissue. Our results suggest that these genes expression might be reduced by oxidative stress. These findings suggest that the avoidance from oxidative stress is much more important than progress of adhesion to the host cells under oxidative stress. Supported in part by a Grant-in-Aid for Scientific Research (C) (13671981) from Japan Society for Promotion of Science, and by a Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to promote 2001-Multidisciplinary Research Projects.

Seq #242 - Microbial Virulence/Microbial Pathogenesis

10:15 AM-11:30 AM, Friday, 12 March 2004

Hawaii Convention Center Exhibit Hall 1-2

[Back to the Periodontal Research - Pathogenesis Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 82nd General Session Program listing with access to abstracts](#)

Development of practically usable passive antibodies for oral infectious diseases.

Prof. Abiko Yoshimitsu, Nihon University School of Dentistry at Matsudo



Objective: The aim of this study is the development of safer antibodies capable inhibiting virulent factors of oral pathogens, which can be accepted to use practically for passive immuno-therapy.

Methods: *S. mutans* glucosyltransferase-I (GTF-I), *P. gingivalis* 40-kDa outer membrane protein and 130-kDa hemagglutinin were immunized to mice and constructed hybridoma clones producing mAbs inhibiting virulent activities. Single-chain variable fragment (ScFv) antibody genes were molecular cloned and expressed in *Bacillus brevis* hosts. Human mAbs were constructed hybridoma technology using transgenic mice carrying human immunoglobulin gene loci. IgY was prepared from the egg yolk of immunized hens.

Results: The constructed safer passive antibodies were capable inhibiting the insoluble glucan synthesis of GTF-I and colonization of *S. mutans*, and the coaggregation, hemagglutination, hemin-binding, and epithelial cells adherence activities of *P. gingivalis*.

Conclusions: These findings suggest that passive immunization with the ScFv, human type mAbs, IgY, which are capable inhibiting virulent factors of oral pathogens, will be useful to prevent oral infectious diseases.

Bioinformatics of periodontal pathogen and strategy of immunotherapy
Yoshimitsu Abiko, Department of Biochemistry, Nihon University, School of
Dentistry at Matsudo

Objective: The challenge in the post-genome era to interpret bioinformatics research is significant and useful to confirm therapeutic targets and to develop medical applications. To develop evidence-based medicine, virulent factors of periodontal pathogen were identified by genome science technology, and safer and useful passive antibodies inhibiting molecular target functions were constructed. **Methods:** Gene and protein expressions of virulent factors in *P. gingivalis* were analyzed by a custom-made DNA microarray and 2D SDS-PAGE / MALDI-TOF MS. Recombinant proteins or functional domain peptides of molecular targets were immunized to mice and constructed mAbs inhibiting virulent activities. Single-chain variable fragment (ScFv) genes from the hybridoma were molecularly cloned and expressed in bacterial hosts. Human type mAbs were constructed by hybridoma technology using transgenic mice carrying human Ig gene loci. IgY was prepared from the egg yolk of immunized hens. **Results:** Homology search of genome database, microarray and proteomic analysis demonstrated new function and usefulness of molecular targets. The constructed safer passive antibodies against molecular targets were capable of neutralizing virulent activities. **Conclusions:** Genome science-based gene expression monitoring and proteomic analysis are useful to identify potential gene and protein for immunotherapy, and ScFv, human mAbs, IgY, which are capable of inhibiting virulent factors will be useful to prevent oral infectious diseases

後基因時代口腔生物資訊學之探討

Post-genome Era — Bio-informatics research in oral sciences



Yoshimitsu Abiko

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry
at Matsudo, Japan

An increased knowledge of the functional genomics supports the theory that any diseases should be understood well by considering the complex interactions between the genetic and environmental factors. Information obtained from genome projects may provide us a wide range of new ways for investigating the oral biology. The genomic, transcriptomic, and proteomic database offer the great opportunities to develop new research target and biomedical application for oral diseases.

DNA microarray/GeneChip technology has become a standard tool for gene expression analysis and enable a large volume of genome expression monitoring, and thus open a new avenue for studies of the composition, dynamics, and regulation of transcriptome researches.

Proteomics, using 2-dimensional gel electro-phoresis (2D-PAGE) / Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) coupled with genome database, also provide us an important information of biological mechanisms and the identification of disease-specific molecular targets.

The challenge in the post-genome era to interpret bio-informatics research utilizing the genome-transcriptome-proteome technologies and its database is significant and useful to open the gate of global perspective to the design of experiments and to further understanding of oral biology. In this session, our approaches utilizing

bio-informatics research technology and findings in oral sciences are introduced.

Porphyromonas gingivalis implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis. The whole genome database has already been published. We have molecular cloned 40-kDa outer membrane protein (OMP) and 130-kDa hemagglutinin (HAG). BLAST homology search of in genome database demonstrated that 40-kDa OMP is one of hemin binding proteins, and functional domain of 130- kDa HAG, PVQNLT, localized in hemagglutinin gene families. These findings suggest that these molecules are useful as therapeutic targets of immunotherapy. Practically usable safer anti- bodies, such as ScFv, human mAb, IgY, capable neutralizing the virulent factor activities, were successfully constructed. Furthermore, custom-made DNA microarray containing virulent factor associated genes were newly constructed utilizing ORF information in genome database. The constructed microarray can be effectively used for monitoring virulence gene expressions.

To elucidate the mechanism of bone formation, and anti-inflammation, gene expressions in bone-marrow stem cells, osteoblasts and periodontal tissue cells were monitored using the subtractive gene cloning and GeneChip. Many altered gene expressions were successfully identified.

Construction of IgY Neutralizing Porphyromonas Gingivalis Hemagglutinating Activity

S. HAMAJIMA¹, H. HATTA², and Y. ABIKO¹, ¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan, ² Kyoto Women's University, Japan

Objectives: Porphyromonas gingivalis has been implicated as a major pathogen for adult periodontitis. P. gingivalis has a high adherence activity to erythrocytes and epithelial cells, and hemagglutinin has been identified as an important virulent factor. Hemin is an absolute requirement for the growth of this bacterium. Thus, hemagglutinin molecule may be particularly important for adherence of this microorganism not only to gingival tissue cells, but also to attach and lyse erythrocytes in order to uptake hemin. When considering passive immunization against periodontal diseases, the pathological focus should be on gingival tissues, and application of a specific antibody that neutralizes colonization onto gingival tissue and hemin uptake is significant, and hemagglutinins are considered the most important targets for passive immunization. We previously cloned the 130-kDa hemagglutinating domain (130k-HMGD), and the functional short motif in 130k-HMGD was determined as PVQNLT. Recently, IgY has attracted considerable attention as an alternative source of antibodies for the advantage of cost-effectiveness and large-scale preparation. To develop immunotherapy against periodontitis, IgY against 130k-HMGD which capable inhibiting hemagglutination was constructed. **Methods:** Recombinant 130k-HMGD (r130k-HMGD) was largely expressed by E. coli and purified. Hens were immunized with highly purified r130k-HMGD intramuscularly and after the antibody titer reached to the highest level, the egg-yolk was pooled and the IgY was purified using a λ -carrageenan method. Hemagglutinating activity was assayed in round-bottom microtiter plates using rabbit erythrocytes. **Results:** The purified IgY from the immunized egg-yolk specifically recognized r130k-HMGD and also reacted with chemically synthesized functional hemagglutinin-associated short motif peptide. As expected, the IgY significantly inhibited P. gingivalis-associated hemagglutinating activity. **Conclusion:** Anti-r130k-HMGD IgY may be useful for passive immunization against periodontal disease caused by P. gingivalis infection.

Functional Domain of Hemagglutinating Activity in *P. gingivalis* 40kDa-OMP

H. TAGAWA¹, W.-J. CHANG¹, Y. SHIBATA¹, M. KIYAMA-KISHIKAWA¹, S.-Y. LEE², and Y. ABIKO¹, ¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan, ² Taipei Medical University, Taiwan

Objectives: 40kDa outer membrane protein (OMP) has been molecular cloned from *P. gingivalis* 381. Since the antibody against recombinant 40kDa-OMP inhibited the hemagglutinating activity and the polymeric r40-kDa-OMP expressed hemagglutinating activity, the 40kDa -OMP was thought to be one of hemagglutinins. To develop passive immunotherapy against periodontitis, MAbs were constructed by immunization with r40kDa-outer membrane protein and examined those inhibitory effect on hemagglutinating activity. Furthermore, functional domain expressing hemagglutinating activity was identified. **Methods:** Highly purified r40kDa-OMP was injected intraperitoneally into BALB/c mice, spleen derived cells were collected and combined with P3U1 myeloma cells. After selection of hybridoma cells using HAT medium, clones producing neutralizing hemagglutination activity were isolated by a single manipulation. A phage-displayed epitope mapping system was used to examine the functional domain expressing hemagglutinating activity by biopanning using the neutralizing MAb. Peptides mapped the relevant molecular within a short stretch corresponding to 40-kDa-OMP amino acid sequence was chemically synthesized and determine its inhibitory effect on hemagglutinating activity. **Results:** MAbs against r40-kDa-OMP were capable inhibiting hemagglutinating activity. Synthetic peptides, corresponding to residues WPRVGQLFIALDQTLGIPTFSVCRME in 40kDa-OMP, abolished hemagglutinating activity in a dose-dependent manner. **Conclusions:** MAbs and the functional domain driven synthetic peptide may be useful to preventing periodontal diseases caused by *P. gingivalis* infection.

A proteomics approach to identify phosphorylated proteins in *P. gingivalis*

○Soichiro Okano¹, Yasuko Shibata^{1,3}, Teruaki Shiroza^{1,3}, Yoshio Nakano², Yoshihisa Yamashita², Yoshimitsu Abiko^{1,3}

(¹Dept. Biochem., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, ²Dept. Prev., Kyushu Univ. Fac. Dent. Sci., ³Res. Inst. Oral Sci., Nihon Univ.)

Objectives: The availability of the complete genomic sequence of a number of organisms has dramatically altered the way that biological systems could be studied through the use of DNA-array technologies. However, this approach provides no direct evidence of post-translational modification, which is crucial for a precise understanding of how these events function in living cells. Especially, phosphorylation is one of most frequently occurring post-translational modifications in proteins. Phosphoproteins play a central role in a variety of fundamental cellular functions. In our laboratory, proteomics is used to study protein expression and post-translational modifications in *P. gingivalis*, an important pathogen of adult periodontitis. In the present study, we have identified the phosphoproteins in a proteomics approach to be the first step to clarify the role of phosphoproteins.

Methods: *P. gingivalis* cells were grown under hemin limitation (0.001 mg/ml). The extracted proteins from cultures were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2DE) and stained with Pro-Q diamond, a potent reagent for detection of phosphoproteins in gel. Protein expression profile was examined by image scanning and spots were semi-automatically excised and trypsinized using a high throughput gel-excise processor Xcise. The trypsin digest was subjected to MALDI-TOF MS and analyzed by MASCOT using a custom *P. gingivalis* database obtained from The Institute of Genomic Research (TIGR). In addition, the proteomics database of 2DE reference map of *P. gingivalis*, which have constructed, was used to identify phosphoproteins (Bioinformatics Project for Oral Sciences, <http://bipos.mascot.nihon-u.ac.jp>).

Results: Approximately 600 protein spots were stained with CBB, of these, over 120 protein spots including RagA (PG0185), TPR domain protein (PG1385, PG0449), Dps family protein (PG0090) were identified as phosphoproteins.

Conclusions: These data could be the starting point for further biological studies that would provide information on the functional role of the phosphoproteins.

3410 Targeted proteomics of *Porphyromonas gingivalis* protein phosphorylation under oxidative stress

S. OKANO, Y. SHIBATA, T. SHIROZA, and Y. ABIKO, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo-shi Chiba, Japan

Objectives: Post-translational modification is crucial for a precise understanding of how these events function in living cells. Especially, phosphorylation is one of the most frequently occurring post-translational modifications which plays a central role in a variety of fundamental cellular functions. *Porphyromonas gingivalis* is a Gram-negative anaerobic bacteria implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis. Like other anaerobic microorganisms that colonize in the gingival tissues and periodontal pockets, *P. gingivalis* must withstand the deleterious effects of molecular oxygen and its metabolites. The aim of this study was to examine the effect of oxidative stress on protein phosphorylation in *P. gingivalis* cells to obtain the clue to understand the mechanism resulting in this incidence. **Methods:** *P. gingivalis* cells were grown under hemin limitation. After cultivation, a half of culture was further allowed to vigorous rotation to expose air while remainder was kept anaerobic condition. The extracted proteins from cultures with and without oxidative stress were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) and stained with Pro-Q→diamond, a potent reagent for detection of phosphoproteins in gel. Protein phosphorylation profile was examined by image scanning and spots were semi-automatically excised and trypsinized using a high throughput gel-excise processor Xcise. The trypsin digests were subjected to MALDI-TOF MS and analyzed by database search system (MASCOT) using the ORF database of *P. gingivalis* W83 from TIGR. **Results:** By 2DE-gel image matching, the oxidative stress-induced alteration of phosphorylation was detected in many proteins. These phosphoproteins were successfully identified as proteins involved in transportation of cations, energy metabolism, and fatty acid metabolism. **Conclusion:** Protein phosphorylation might have important roles to survive the aerobic conditions in *P. gingivalis*. Phosphoproteins identified by MALDI-TOF MS coupled with phosphoprotein staining will be useful to evaluate the fundamental cellular functions and signal transductions by oxidative stress in *P. gingivalis*.

Seq #362 - *Porphyromonas gingivalis* :Cellular Microbiology

2:00 PM-4:00 PM, Saturday, 12 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

[Back to the Microbiology / Immunology and Infection Control Program](#)

[Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session \(March 9-12, 2005\)](#)

[Top Level Search](#)

酸化ストレスによる *Porphyromonas gingivalis* ジンジパインの局在の変動

日本大学松戸歯学部生化学教室¹⁾

日本大学松戸歯学部口腔科学研究所²⁾

○岸川道子^{1, 2)}、平塚浩一^{1, 2)}、浜島進^{1, 2)}、安孫子宜光^{1, 2)}

Oxidative stress on *Porphyromonas gingivalis* changes the localizations of gingipains.

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo¹⁾

Research Institute of Oral Science, Nihon University School of Dentistry at Matsudo²⁾

○Michiko Kiyama-Kishikawa^{1,2)}, Koichi Hiratsuka^{1,2)}, Susumu Hamajima^{1,2)}, and Yoshimitsu Abiko^{1,2)}

キーワード: *Porphyromonas gingivalis*、ジンジパイン、酸化ストレス

【目的】

歯周病原菌の多くは嫌気性菌であり、酸化ストレスはこれらの菌の生存率や病原性に大きく影響すると考えられる。我々は酸化ストレスが *P. gingivalis* におよぼす影響を網羅的に解析すると共に、本菌の主要な病原因子と考えられているトリプシン様システインプロテアーゼ (ジンジパイン) の mRNA の定量を試み、酵素活性を測定してタンパク質レベルでの酸化ストレスの影響を検討することを目的とした。

【材料および方法】

1. 酸化ストレス実験: *P. gingivalis* W83 株を late-log phase まで嫌気培養した後、100 ml フラスコに 20 ml ずつ分取し、37°C、好気条件下にて 200 rpm で激しく震盪し、15 分、45 分、90 分、180 分、360 分後に経時的にサンプリングを行った。
2. トランスクリプトーム解析: 経時的に採取した菌体から total RNA を抽出し、DNase 処理後、ランダムプライマーを用いて逆転写した。この過程で蛍光色素を取り込ませた cDNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。また、cDNA をテンプレートとして QRT-PCR を行った。増幅した PCR 産物は蛍光色素 SYBR Green I にて検出し、検量線を用いて mRNA 量を定量した。
3. 酵素活性の測定: *P. gingivalis* 菌体と培養上清中の Arg-specific cysteine proteinase (RGP) と Lys-specific cysteine proteinase (KGP) の活性を調べるために、それぞれの合成基質である Z-Phe-Arg-MCA と Boc-Val-Leu-Lys-MCA を用い、遊離した AMC の量を蛍光プレートリーダーにて検出した。

【結果】

1. マイクロアレイで解析した病原因子遺伝子の大部分は、90 分間の酸化ストレスで mRNA の発現量が減少した。QRT-PCR の結果、算出された mRNA の絶対量は *rgpA* が最も多く *rgpB* と *kgp* はそれぞれ *rgpA* の 3.3% と 9.0% であった。*RgpA* mRNA は酸化ストレスの時間経過に伴い減少したが、*rgpB* と *kgp* の mRNA は酸化ストレスの開始から約 45 分間経過後、減少した。
2. 酸化ストレスの時間経過に伴い、菌体に保持された RGP と KGP の酵素活性は減少したが、培養上清中の酵素活性は増加した。そこで培養上清中の酵素の局在を調べるために、超遠心により培養上清を可溶性画分とベジクルを主成分とする不溶性画分に分離した。酸化ストレスの有無で酵素活性を比較すると、不溶性画分では 45 分と 90 分のサンプルで酸化ストレス下のほうが高い酵素活性を示した。可溶性画分では、45 分以降のサンプルで酸化ストレス下のほうが高い酵素活性が観察された。

【考察および結論】

酸化ストレスにより、菌体のジンジパインの発現は mRNA レベルとタンパク質レベルで共に減少した。他方、培養液の不溶性画分と可溶性画分に含まれる酵素活性は蓄積した。*P. gingivalis* は酸化ストレスを受けた後、主要な病原因子であるジンジパインを細胞表層からベジクルを含む培養液中へ放出する可能性が示唆された。

(本研究は、文部科学省平成 13 年度学術フロンティア推進事業の補助を受けて行った。)

2239 *Functional analysis of Porphyromonas gingivalis* HBP35 by amino acid substitution

T. SHIROZA, S. OKANO, Y. SHIBATA, M. HAYAKAWA, and Y. ABIKO, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Matsudo-shi Chiba, Japan

Objectives: Periodontitis is one of the most common oral diseases resulting from the infection of *Porphyromonas gingivalis*. Our strategy to prevent this incidence is to establish passive immunization system where endogenous antibodies could directly be applied to neutralize virulent factors associated with this bacterium. We focused our attention on the *P. gingivalis* 35 kDa surface protein, or HBP35, since this protein is involved in not only the coaggregation with oral microflora but also hemin-binding. In addition, nucleotide sequencing of the gene, *hbp35* (Gene ID pg0554), coding for this protein revealed the presence of a total of four Cys residues. Of these, the first two consisted of the amino acid stretch, EVFTAEWCGYCPGGK, a catalytic center for thioredoxin. To prepare the effective antibody for passive immunization, functional analysis of this protein was carried out following amino acid substitution. **Methods:** To introduce the site-directed mutagenesis, we exploited a simple, rapid, and non-expensive approach based on the utilization of only the T4 DNA polymerase, and all four codons coding for Cys residues were successfully altered to those coding for Ser residues. The mutagenized plasmids were transformed into *Escherichia coli* disulfide bond formation-deficient strain, JCB 572, defective in alkaline phosphatase (AP) activity, and poor motility on soft agar plate due to inefficient S-S bond formation. **Results:** *E. coli dsb* mutant harboring the native *hbp35* restored the AP activity while those possessing either first or second Cys to Ser-mutation diminished this complementation. Mutation in the third or fourth Cys was no effect on AP activity. On the other hand, the *dsb* transformants harboring the mutagenized individual plasmid exhibited rather complex motile activity profile on soft agar plate. **Conclusion:** The present results clearly indicated that, in addition to previously identified function, coaggregation and hemin-binding, the HBP35 could participate in disulfide bond formation in *P. gingivalis* cells.

Seq #245 - Microbial and Molecular Studies of *Porphyromonas gingivalis*

2:00 PM-4:00 PM, Friday, 11 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

Back to the Microbiology / Immunology and Infection Control Program

Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session (March 9-12, 2005)

[Top Level Search](#)

P2-64/WS7-12 *P. gingivalis* 感染骨芽細胞におけるグローバルな遺伝子発現変化

○岡橋 暢夫¹, 大野 貴志¹, 中山 浩次², 安孫子 宣光³, 天野 敦雄¹
(阪大院・歯・先端情報¹, 長崎大院・医歯薬・口腔微生物², 日大松戸歯・生化³)

【目的】歯周病細菌 *P. gingivalis* は LPS, 線毛, プロテアーゼなどの病原因子を保有しており, 免疫担当細胞や上皮細胞に多彩な作用を示す。これら個々の病原因子については多くの解析がなされてきたが, 生菌感染に対する炎症応答は, 多数の病原因子が複雑に関与しているため不明の点が多い。本研究では, マイクロアレイ法を用いて *P. gingivalis* 生菌感染に対する骨芽細胞のグローバルな遺伝子発現変化を解析することを目的とした。【方法】マウス骨芽細胞 ST2 に *P. gingivalis* ATCC33277 (親株), KDP136 (gingipain 欠損株), KDP150 (線毛欠損株) を感染させた。感染細胞から RNA を調製し, CodeLink バイオチップシステムを用いて感染細胞の遺伝子発現変化を定量的に解析した。【結果と考察】ST2 細胞を *P. gingivalis* ATCC33277 株に感染させると多くの遺伝子発現の変化が認められた。感染 6 時間後に発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子は, チップ搭載の 2 万個の遺伝子のうち, 約 370 個であった。そのうち機能が明らかになっているものは 183 個であり, 炎症あるいは免疫応答に関連した遺伝子が 2 割以上を占めていた。顕著な発現上昇を示した遺伝子には IL-6 や CXCL10 などが含まれていた。線毛欠損株 KDP150 を感染させた場合の遺伝子発現変化は親株のそれとあまり変わらなかったが, gingipain 欠損株 KDP136 の感染では IL-6, CXCL10 などいくつかの炎症応答関連遺伝子の発現が明らかに低下していた。以上の結果は, 本菌感染によって炎症応答関連遺伝子の発現が上昇すること, また, gingipain が IL-6 などの遺伝子の発現に関与している可能性を示唆するものである。

Porphyromonas gingivalis の HSPs 発現動態のプロテオーム解析

日本大学松戸歯学部生化学教室

○岡野 総一郎, 柴田 恭子, 安孫子 宜光

Proteomics analysis of HSPs expression in *Porphyromonas gingivalis*

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Soichiro Okano, Yasuko Shibata, Yoshimitsu Abiko

キーワード : *Porphyromonas gingivalis*, HSPs, プロテオーム

[目的]

成人性歯周炎の重要な病原菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は偏性嫌気性グラム陰性桿菌で、口腔内環境では常に酸素分子や生体防御反応により産生される活性酸素の影響下にある。本研究では好気状態にすることで生じる *P. gingivalis* のタンパク質発現変化が、歯周組織に与えるであろう影響を解明するための一助となることを目的として、ヘミン存在下および欠乏下で培養した *P. gingivalis* を一定時間酸素刺激することにより変動するタンパク質のプロテオーム解析を、特に heat shock protein (HSP) に注目し行った。

[方法]

P. gingivalis は、ヘミン存在下およびヘミン欠乏下で培養を行った後、好気状態で 30 分～2 時間、激しく振とうした。15 抽出したタンパク質はタンパク質溶解液 (7 M Urea, 2 M Thiourea, 4% CHAPS, 40 mM Tris-base, 1 mM EDTA) で溶解後、Multiphor II (Amersham Biosciences) により等電点電気泳動を行い、SDS-PAGE にて展開した。CBB 染色後、画像比較ソフト (phoretix 2D evolution™, nonlinear dynamics) でイメージマッチングすることでタンパク質スポットの比較をし、酸素刺激により変動するタンパク質発現のプロファイリングを行った。タンパク質スポットの切り出し・脱色・トリプシンによる In-gel 消化・MS プレートへのサンプリングは、Xcise (島津製作所) により行った。消化されたタンパク質分子のペプチド断片の質量を MALDI TOF-MS (AXIMA-CFR, 島津製作所) で測定し、データベース検索エンジン (MASCOT) により TIGR の *P. gingivalis* W83 ORF データベースを用い解析を行った。

[結果]

ヘミン存在下およびヘミン欠乏下ともに、酸素刺激により発現レベルが変化した多数のタンパク質が同定された。HSP として分類される chaperonin, 60 kDa (GroEL; PG0520), DnaK (PG1208), heat shock protein HtpG (PG0045) のタンパク質量が酸素刺激後に増大した。

[考察]

酸素刺激により発現が上がった HSPs のうち、GroEL は、種を超えて相同性が高いと同時に免疫原性が高いため、交叉反応により歯周病の原因となっている可能性が報告されている。これは、生体内における酸素分子との接触や、生体防御にともないマクロファージなどが産生する活性酸素が、*P. gingivalis* の HSPs 発現に影響を与え、歯周病の病態に影響を及ぼしている可能性を示唆している。これらの分子の相互作用や関連を解明することは、*P. gingivalis* の病原性および歯周病の原因の解明に重要であると考えられる。

共同研究者 : 日本大学松戸歯学部生化学教室 城座 映明

**Systemic Diseases Caused by Periodontal Diseases
and Strategy of Passive Immunotherapy**

Yoshimitsu Abiko, DDS, PhD

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan



It has been recognized that oral infection, especially periodontitis, may affect the course and pathogenesis of a number of systemic diseases, such as cardiovascular disease, bacterial pneumonia, diabetes mellitus, and low birth weight. It has been proposed that periodontitis may affect the host's susceptibility to systemic disease in ways: by shared risk factors, by subgingival biofilms acting as reservoirs of periodontal pathogens, and through the periodontium acting as a reservoir of inflammatory mediators.

Periodontal disease may trigger pathways leading to cardiovascular disease. *P. gingivalis* can adhere and invade endothelial cells, after entering the circulation, may promote a thrombotic tendency, subsequent platelet aggregation, and intravascular clot formation. Bacterial components also stimulate high level of proinflammatory mediators such as TNF- α , IL-1 β , and PGE₂. These mediators may elicit recruitment of inflammatory cells into major blood vessels and stimulate proliferation of vascular smooth muscle, vascular fatty degeneration, and intravascular coagulation. Periodontitis may also stimulate the liver to produce C-reactive protein (CRP), which in turn will form deposits on injured blood vessels. CRP binds to cells that are damaged and fixes complement, which activates phagocytes, including neutrophils, monocytes and macrophages, then induced chemokines. These phagocytes expressed scavenger receptors allowed to uptake LDL, becoming in later stages "form-cells", a hallmark of atherosclerosis.

Pneumonia can result from infection by anaerobic bacteria. Dental plaque would seem to be a logical source of these bacteria from patients with periodontal disease, especially in elderly individuals. Oral periodontopathic bacteria can be aspirated into the lung to cause aspiration pneumonia.

Diabetes is a risk factor for severe periodontal disease. The converse possibility that periodontal disease either predisposes or exacerbates the diabetic condition has received more attention. Poor periodontal health is epidemiologically known to be associated with Type 2 diabetes mellitus. TNF- α produced due to periodontal inflammation may be an important factor influencing insulin sensitivity in both obese and type 2 diabetic patients, through suppressing insulin action via signal pathway.

Periodontitis also seem to increase the risk for low birth weight in newborns. During pregnancy, the ratio of anaerobic gram-negative bacterial species to aerobic species increases in dental plaque. If they escape into the general circulation and cross the placental barrier, they could augment the physiologic levels of IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂ and matrix metalloproteinases in the amniotic fluid and induce premature labor.

The challenge in the post-genome era to interpret bioinformatics research is significant and useful to confirm therapeutic targets and to develop medical applications. To develop evidence-based medicine, virulent factors of periodontal pathogen can be identified by genome science technology, and productions of safer and useful passive antibodies against molecular target are significant. Recombinant proteins from *P. gingivalis* were immunized to mice and constructed mAbs inhibiting virulent activities. Then, single-chain variable fragment (ScFv) genes were molecular cloned and expressed in bacterial hosts. Human type mAbs were also constructed using transgenic mice carrying human immunoglobulin gene loci. IgYs were prepared from the egg yolk of immunized hens. ScFv, human type mAbs, IgY, which are capable neutralizing virulent factors, may be useful to prevent systemic diseases caused by periodontal diseases.

電気浸透ポンプ調製用ディスクゲル電気泳動の確立に向けて

○早川光央・浜島 進・滝口 久・城座映明・柴田恭子・平塚浩一・岸川道子・安孫子宜光 (日大・松戸歯・生化学)

[はじめに]

生命科学の蛋白質を扱う研究においては、しばしば、高純度な蛋白質の精製に迫られることがある。ポリアクリルアミドゲル電気泳動は蛋白質の優れた分析法として汎用されているが、調製用としてはその潜在能力が十分には発揮されていない。ポリアクリルアミドディスクゲルにキャピラリーを通し、ゲルの下端に半透膜を張るだけで調製用電気泳動装置となる。電気泳動開始と同時に膜に発生する電気浸透流がエリユーションバッファーを送ってくれる¹⁻³⁾ためであり、この方法を電気浸透ポンプ法と呼んだ。本法における最も特徴的な点はエリユーションチャンバーの構造が非常に単純な点である。即ち、ゲルカラムの直径を任意に作製してゲル化後、その下端の断面に合わせて切り抜いたスペーサーと膜を固定すればそれがエリユーションチャンバーとなり、膜はポンプとして稼働し、ペリスタ等のポンプは不要となる。昨年度(第52回)の本学会総会において調製用電気泳動装置の大型化の試みを報告した。実験室レベルとして扱い易い電気泳動槽の大型化は、最大どこまでが適切かを把握する必要がある。ゲルの断面積を徐々に大きくしていくと上部バッファーの水圧によってゲルの中央部が下がり平らに維持し難くなる。

本報告では、直径10 cmのゲルブロックがゲルカラムに安定に保持される様改良すると共に蛋白質の分離能および泳動中にバンドの歪みが生じないかをテストした。これより小さな装置では操作上、より簡便となり性能上も劣ることはない。
[材料および方法]

電気泳動システムは、ディスクゲル電気泳動槽、パワーサプライ、フラクションコレクター、マグネティックスターラー、上下バッファー交流用ペリスタポンプの5点で構成した。ゲルカラムは直径8, 9, 10 cm (断面積50.3-78.5 cm²)を作製し、Ornstein-Davis および Laemmli の不連続系バッファーを用いた。半透膜として Spectrum 社の Spectra/Por 1 透析用フラットシート(132 675)を用い、チャンバースペーサーには20メッシュ30デニールのナイロンチュールを用いた。分取したフラクションの分析はミニスラブゲルによって泳動を行ない、クーマシーブルーで染色した。ゲル下端の面にチャンバースペーサーとしてチュールを当て、半透膜を重ねて固定し、エリユーションチャンバーとした。ガラスキャピラリーはポリエチレンチューブによって直接フラクションコレクターにつないだ。電気泳動中膜に発生する電気浸透流によって

ゲルから溶出した成分が連続的に回収された。電気泳動は4°Cの低温室下100 V 定電圧にて行ない、40分間を1フラクションとし、15-20時間の泳動時間を1サイクルとした。テスト用蛋白試料として、Bio-Rad 社のブロードレンジ・プレステイン分子量マーカー及び Sigma 社の ADA (adenosine deaminase, A-9876)を用い、応用例として口腔内細菌の蛋白質の精製を行なった。

[結果および考察]

Spectrum 社の透析用フラットシートはポンプとしての流速が適度であり、比較的安価な上、直径10 cmまで折り目のない半透膜として最適であった。

プレステイン分子量マーカーは電気泳動中のバンドの状況を随時に直接観察できるため極めて有用であり、20時間の泳動でも懸念された大口径ゲルでのバンドの歪みが生じないことが確認された。また、本マーカーは分子量が6.4~198 kDaの広いレンジで8種類の蛋白質の混合物であることから一種類のゲル濃度ですべてを分取することは不可能であり、6%、8% および 14% の SDS ゲルを用いて順次分離回収した。その結果は3.6 cm ゲル²⁾で得られた分取結果と同様であり、ゲルの断面積を大きくしてもそのための分離能の低下はみられなかった。

ADAの電気泳動では1次元目に SDS バッファーを使用し、微量成分として含まれる CD26/ジベプチジルペプチダーゼ IV (DPP IV) を分離し、2次元目に native なバッファーを用いて ADA を分離した。DPP IV はマルチファンクショナルな蛋白質で、ヒトや動物のみならずある種の口腔内細菌も DPP IV 様の高い活性を有することから口腔疾患の病原因子としての関わりを研究する上で重要視されている。

さらに、口腔内細菌由来の蛋白質を抽出し、native- および SDS-電気泳動により精製した。

[文献]

- 1) Tan, H.V. et al. *Nucleic Acid Res.* 16, 1921 (1988).
- 2) Hayakawa, M. et al. *Anal. Biochem.* 288, 168 (2001).
- 3) Hayakawa, M. et al. *Anal. Biochem.* (in press).

BONE MARROW DERIVED EOSINOPHILS
PLAY A CENTRAL ROLL FOR INDUCTION OF IGE-INDEPENDENT
ALLERGIC DIARRHEA

Mi-Na Kweon¹, Myoung Ho Jang¹, Noriko Suenobu¹, Mayumi Ueta¹,
Masafumi Yamamoto², Hiroshi Kiyono¹. ¹*Dept. of Mucosal Immunology, Res. Inst. for Microbial Dis., Osaka Univ., Osaka, Japan,*
²*Dept., of Clinical Pathology, Nihon Univ., School of Dentistry at Matsudo, Chiba.*

Our recent study has demonstrated that repeated oral OVA challenges induced severe allergic diarrhea in systemically sensitized mice (J. Clin. Invest. 106:199-206, 2000). In BALB/c mice, dramatical infiltration of eosinophils and mast cells selectively occurred in the large but not small intestine. Consistent with high levels of Th2-type cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, and IL-13), brisk levels of IgE Abs were detected in large intestine and sera of BALB/c mice with diarrhea. In contrast to BALB/c mice, total and OVA-specific IgE Ab levels were not increased in diarrhea-induced SJL/J mice. Further, significant number of eosinophils but no mast cells were recruited into small but not large intestine of SJL/J mice with diarrhea. Interestingly, a population of Gr-1^{mid}VLA-4⁺, IL-5R⁺, and CCR3⁺ cells, which represents the matured eosinophils, was significantly increased in bone marrow of the diarrhea-induced mice. Based on these results, we suggest that in addition to classical IgE-mediated hypersensitivity bone marrow-derived matured eosinophils contribute for development of mucosal allergic diarrhea by IgE-independent manner. Neutralization experiments using anti-IgE Abs or anti-IL-5 Abs are currently being undertaken in order to further prove this interesting possibility.

EFFECTS OF MUCOSAL ADJUVANT CT ON
DENDRITIC CELLS : INDUCTION OF MHC CLASS I-RESTRICTED
CD8⁺ T CELLS

Myoung-Ho Jang¹, Mi-Na Kweon¹, Masafumi Yamamoto², Hiroshi Kiyono¹. ¹*Dept. of Mucosal Immunology, Res. Inst. for Microbial Dis., Osaka Univ., Suita, Osaka, Japan,* ²*Dept. of Clinical Pathology, Nihon Univ., School of Dentistry at Matsudo, Chiba..*

Previous studies have demonstrated that cholera toxin (CT) is a potent inducer of Th2-type responses via activation of costimulatory molecules for the induction of IgA antibody responses. However, limited information is available in terms of the effects of CT on CTL responses. In order to clarify underlying mechanisms of CTL inducing function of CT, we have considered possible effects of CT on dendritic cells (DC) induced MHC class I-restricted T cells. When bone marrow-derived DC were cultured with CT *in vitro*, CD80 but not CD86 molecule was significantly enhanced when compared with those incubated with LPS or medium alone. Interestingly, CT-treated bone marrow-derived DC induced predominant allogenic CTL responses. Further, increased number of IFN- γ -secreting CD8⁺ T cells were seen when CT-treated bone marrow-derived DC were added in the mixed lymphocyte reaction. In addition, CT supported LPS-induced IL-12 synthesis by bone marrow-derived DC in the presence of IL-4. Our results suggest that CT-treated DC are an effective inducer for MHC class I-restricted CD8⁺ CTL and could be applied as an useful cancer therapy.

BLOCKADE OF BOTH TNF/LT α AND LT α / β , BUT NOT TNF/LT α OR LT α / β , PATHWAYS RESULTS IN THE INHIBITION OF MUCOSAL AND SYSTEMIC IGA RESPONSES.

Masafumi Yamamoto¹, Paul Rennert², Mi-Na Kweon³, Jerry McGhee⁴, Shigeo Otake¹, Hiroshi Kiyono³. ¹*Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo, Chiba, Japan*, ²*Biogen Institute*, ³*Res. Inst. Microbial Dis. Osaka Univ.*, ⁴*Univ. of Alabama at Birmingham*.

Both TNF and lymphotoxin (LT) influence on immunoglobulin (Ig) synthesis; however, the precise role of these cytokines for regulation of mucosal IgA antibody (Ab) responses is unknown. In this study, we assessed the role of TNF/LT α and LT α / β signaling pathways for induction of mucosal IgA responses. Oral immunization of mice which had been treated with either LT β receptor (R)-Ig or TNFR55-Ig during the immunization period with ovalbumin (OVA) plus cholera toxin (CT) as adjuvant elicited significant OVA-specific mucosal IgA as well as serum IgG and IgA Abs. Interestingly, however, when mice were treated with both LT β R-Ig and TNFR55-Ig, neither mucosal nor serum IgA Ab responses were induced, although serum IgG anti-OVA Abs were seen. On the other hand, TNF and LT α double knockout mice given OVA plus CT elicited neither mucosal IgA nor serum IgG anti-OVA Abs. These results indicate that both TNF/LT α and LT α / β , but not TNF/LT α or LT α / β alone, play an important role for induction of Ag-specific IgA Ab responses. We are currently examining the effects of TNF/LT α and LT α / β signaling pathways on IgA class switching.

粘膜免疫機構における TNF と lymphotoxin の役割

山本 正文

日本大学松戸歯学部総合歯科診療学講
座

消化管粘膜は病原性細菌やウイルスあるいは摂取された食物由来の抗原による侵襲に対応し、生体にとって有害なものを選択的に排除している。その主役を演じているのが分泌型 IgA 抗体に代表される粘膜免疫システムである。消化管粘膜における抗原特異的免疫応答の誘導・成立にあたって、中心的な役割を果たしているのがパイエル板を中心とした IgA 誘導組織であり、これらのリンパ組織内の CD4⁺ T 細胞や IgA 前駆 B 細胞が common mucosal immune system と呼ばれる循環帰巢経路を介して粘膜固有層に到達し、IgA 抗体を誘導制御すると考えられている。一方、近年の報告で末梢リンパ組織の形成、発達において tumor necrosis factor (TNF) や lymphotoxin (LT) が重要な役割を果たしていることが示されている。TNF は homotrimer で構成されるが、LT は α 鎖と β 鎖の組み合わせによって、LT- $\alpha_1\beta_2$ と LT- α_3 に分類される。TNF と LT- α_3 は 55kD の TNF レセプター (TNFR-55) および 75kD の TNF レセプター (TNFR-75) 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。これらのレセプターを介するシグナルをブロックすることにより様々な末梢リンパ組織を欠損させることが可能である。消化管免疫機構においては TNFR-55 と LT β R を介するシグナル伝達経路をブロックすることによりパイエル板とその支配リンパ組織である腸管膜リンパ節の両方が欠損する。一方、LT β R を介するシグナルをブロックすることにより、腸管膜リンパ節は存在するがパイエル板が欠損する。そこでわれわれはこれらの消化管関連リンパ組織が欠損したマウスを用いて、パイエル板および腸管粘膜リンパ節、ひいては腸管の粘膜免疫機構の形成と抗原特異的分泌型 IgA 抗体誘導における TNF と LT の役割について解析を加えた。母親マウスの妊娠期に LT β R と immunoglobulin の fusion protein (LT β R-Ig) を投与した結果、腸管膜リンパ節は存在するがパイエル板が欠損しているマウスを得た。これらのパイエル板欠損マウスに破傷風毒素を粘膜アジュバントのコレラ毒素とともに経口免疫し、腸管粘膜面における抗原特異的抗体産生の有無を検討した。その結果、コントロールマウスに比べて低いもののパイエル板欠損マウスにおいても血清中に抗原特異的な IgG と IgA、腸管粘膜面に分泌型 IgA 抗体の産生が認められた。さらに腸管膜リンパ節に抗原特異的 Th2 型サイトカインを産生する CD4⁺ T 細胞が確認された。一方、腸管膜リンパ節とパイエル板の両方が欠損している TNF/LT- α 遺伝子欠損マウスに同様の経口免疫を行ったところ、血清中、腸管粘膜面の双方において抗原特異的抗体は検出されなかった。次に IgA クラススイッチングにおける TNF/LT- α と LT- $\alpha\beta$ を介するシグナルの影響を解析するために、正常マウスの免疫期間中に LT β R-Ig あるいは TNFR55-Ig を投与し、LT β R、TNFR を介するシグナルをブロックした。その結果、LT β R-Ig 処理マウスにおいてはコントロールマウスに比較して、明らかなパイエル板の縮小がみられた。しかしながら、LT β R-Ig 処理、TNFR55-Ig 処理マウスともに腸管粘膜面に抗原特異的 IgA 抗体の産生が認められた。以上の結果から LT β R を介するシグナルはパイエル板の形成のみならず組織の維持にも関与していることが示された。しかしながら、TNF、LT ともに腸管における IgA クラススイッチングに直接的な役割は果たしていなかった。また、腸管における抗原特異的 IgA 抗体誘導に際してパイエル板は必要不可欠ではなく、腸管粘膜リンパ節の存在下で粘膜面における免疫応答を維持することが示された。

Role of TNF/LT α and LT α/β for the mucosal immunity : Masafumi YAMAMOTO^{1,2} (¹Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo, Japan, ²Osaka Univ.)

We examined the role of TNF/LT α and LT α/β for mucosal immunity. Mice treated with LT- β receptor (R)-Ig *in utero* lacked Peyer's patches (PP) but not mesenteric lymph nodes (MLN). In contrast, when mice were treated with both TNFR55-Ig and LT β R-Ig, neither PP nor MLN were developed. These results show that signaling pathways through TNFR55 and LT β R cooperate in the development of MLN. Oral immunization of LT β R-Ig-treated, PP null mice with tetanus toxoid (TT) plus cholera toxin (CT) induced TT-specific mucosal IgA responses. In contrast, TNFR55-Ig/LT β R-Ig-treated mice failed to elicit the IgA responses after immunization, indicating the importance of MLN, but not PP, for the induction of mucosal IgA response. To further assess the direct effect of signaling pathways through TNFR55 and LT β R on the mucosal IgA production, adult mice were treated with TNFR55-Ig and/or LT β R-Ig during the immunization period. Treatment of the fusion protein resulted in the alteration of MLN microarchitecture. TNFR55-Ig- and/or LT β R-Ig-treated mice elicit TT-specific mucosal IgA responses when given orally with TT plus CT; however, the responses were significantly lower than those of control mice. Further, irradiated TNF/LT α ^{-/-} mice reconstituted with wild-type bone marrow, which lack MLN and PP, failed to induce IgA responses after oral immunization. These results indicate that TNF/LT α and LT α/β signaling pathways dependent MLN play a central role for the regulation of mucosal IgA responses.

Role of TNF/LT and LT α / β for the intestinal mucosal immunity

Masafumi Yamamoto, Mi-Na Kweon, Paul D. Rennert, Shigeo Otake, Jerry R. McGhee and Hiroshi Kiyono
Comprehensive Clin. Dent., Nihon Univ., Chiba 271, Mucosal Immunol., Osaka Univ., Osaka 565, Japan, Biogen, Inc., Cambridge, MA 02142, Univ. Alabama, Birmingham, AL 35294

We examined the role of TNF/LT α and LT α / β for mucosal immunity. Mice treated with LT- β receptor (R) *in utero* lack Peyer's patches (PP) but not mesenteric lymph nodes. In contrast, when mice were treated with both TNFR55R-Ig and LT β R-Ig, neither PP nor MLN were developed. These results show that signaling pathways through TNFR55 and LT β R cooperate in the development of MLN. Oral immunization of LT β R-Ig-treated, PP null mice with tetanus toxoid (TT) plus cholera toxin (CT) induced TT-specific mucosal IgA responses. In contrast, TNFR55-Ig/LT β R-Ig-treated mice failed to elicit the IgA responses after immunization, indicating the importance of MLN, but not PP, for the induction of mucosal IgA responses. To further assess the direct effect of signaling pathways through TNFR55 and LT β R on the mucosal IgA production, adult mice were treated with TNFR55-Ig and/or LT β R-Ig during the immunization period. Treatment with the fusion protein resulted in the alteration of MLN microarchitecture. TNFR55-Ig- and/or LT β R-Ig-treated mice elicited TT-specific mucosal IgA responses when given orally with TT plus CT; however, the responses were significantly lower than those of control mice. These results indicate that TNF/LT α and LT α / β signaling pathways dependent MLN play a central role for the regulation of mucosal IgA responses.

This work is supported by Grant-in-Aid for COE Research from the Ministry of education, Sports, Science and Technology

Colonic patches interconnect between large intestinal and systemic immune compartments

Mi-Na Kweon, Masafumi Yamamoto, Ichiro Takahashi, and Hiroshi Kiyono

Dept. Mucosal Immunol, Res. Ins. for Microbial Dis., Osaka Univ., Osaka 565, Japan

Our previous study demonstrated that oral feeding of OVA resulted in the induction of allergic diarrhea in systemically primed mice. Inasmuch as abnormally high antigen-specific Th2 cell, B cell, and allergic cell (e.g., mast cells and eosinophils) responses were seen in the large intestine of these diarrhea mice, we examined the possibility that a cross-talk system might exist between systemic compartment (e.g., spleen) and large intestine. In order to clarify this possibility, mononuclear cells were isolated from Peyer's patches, colonic patches, and small and large intestine of systemically primed BALB/c mice with OVA in CFA and then assessed for antigen-specific T and B cell responses. Interestingly, mononuclear cells (MNC) isolated from colonic patches elicited significant levels of antigen-induced IFN- γ , IL-5, and eotaxin synthesis. However, MNC from Peyer's patches, small and large intestine secreted low levels of Th1- and Th2-type cytokines and eotaxin. Further, when antigen-specific Ab-forming cells (AFC) were examined after *in vitro* cultivation with OVA for 4 days, dominant antigen-specific IgM and IgA AFC were found in MNC isolated from colonic patches of systemically primed BALB/c mice. These findings imply that colonic patches are a critical inductive tissue in response to systemically administered antigen. Thus, colonic patches may play a key role for the cross-talk system between mucosal and systemic immune compartments. We are now characterizing the cellular and molecular uniqueness of colonic patches on the cross communication site in comparison to Peyer's patch.

This work is supported by Grant-in-Aid for COE Research from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture and the Ministry of Health and Welfare of Japan.

Large intestinal isolated lymphoid follicles, but not colonic patches, act as an immunological nesting site for the induction of antigen-specific Th2 and B cell responses in the diarrhea-induced mice : KWEON Mi-na¹, YAMAMOTO Masafumi^{1,2}, RENNERT Paul D.³, KIYONO Hiroshi¹ (¹Dept. of Mucosal Immunol, Res. Ins. for Microbial Dis., Osaka Univ., Osaka, Japan, ²Dept. of Oral Medicine, Nihon Univ. School of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan, ³Dept. of Immunology and Inflammation, Biogen, Inc., Cambridge, USA)

In our previous study, we demonstrated that the presence of unique cross communication pathway between systemic and mucosal (e.g., large intestine) compartments by the use of our allergic diarrhea mouse model. Oral feeding of OVA resulted in the induction of allergic diarrhea only in systemically primed mice which characterized by the presence of abnormally high antigen-specific Th2 cell, B cells, and allergic cell responses in the large intestine. In the present investigation, we have examined an essential organ that interconnects between spleen and large intestine. At first, a possible role of colonic patches was examined by the generation of colonic patch-null mice using the in utero treatment with LT β R-Ig fusion protein. Unexpectedly, systemically primed colonic patch-null mice developed severe diarrhea following oral challenge with OVA. Thus, elevated numbers of OVA-specific IgG and IgA Ab-forming cells were seen in the large intestinal MNCs isolated from the colonic patch-null mice with diarrhea. Histological analysis demonstrated the presence of isolated lymphoid follicles in the large intestine of colonic patch-null mice. In addition, MNCs isolated from the large intestine of colonic patch-null mice with diarrhea secreted high levels of IL-4, IL-5 and eotaxin following OVA stimulation. These results imply that large intestinal isolated lymphoid follicles could be a critical immunological nesting site for antigen-specific lymphocytes originated from systemic compartment. We are now addressing the cellular and molecular uniqueness of isolated lymphoid follicles in the large intestine as a cross communication site between systemic and mucosal immunity.

Nasal immunization with an outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* induces antibodies that inhibit the coaggregation activity of *P.gingivalis* : NAMIKOSHI Jun¹, YAMAMOTO Masafumi², MAEBA Satomi¹, HAYAKAWA Mitsuo³, HIRATSUKA Koichi³, SHIBATA Yasuko³, ABIKO Yoshimitsu³, OTAKE Shigeo¹ (¹Dept. Comprehensive Clin. Dent., ²Dept. Oral Med., ³Dept. Biochem., Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo., Chiba, Japan)

In this study, we demonstrated that 40-kDa outer membrane protein(40-k-OMP)of *Porphyromonas gingivalis* nasally administered with cholera toxin(CT)elicited both mucosal and systemic immune responses. Immunization of mice with 40-k-OMP and CT elicited significant 40-k-OMP-specific IgA antibodies in saliva and nasal secretions. Further, significant 40-k-OMP-specific serum IgG and IgA antibody titers were induced. Antibody-forming cell(AFC)analysis confirmed the antibody titers by revealing significant numbers of 40-k-OMP-specific IgA AFCs in the salivary glands and nasal passages. Furthermore, CD4⁺ T cells from spleen and cervical lymph nodes(CLN)exhibited significant proliferative responses when restimulated with 40-k-OMP in the presence of feeder cells in vitro. Importantly, 40-k-OMP-specific antibodies isolated from mice that were nasally immunized with 40-k-OMP and CT exhibited significantly inhibited coaggregation by *P. gingivalis* and *Streptococcus gordonii*. These results indicate that nasal administration of 40-k-OMP and CT as adjuvant is potentially an effective vaccination for the induction of 40-k-OMP-specific antibody responses and inhibits the coaggregation activity of *P. gingivalis*. Furthermore, 40-k-OMP nasal vaccination may be a useful strategy for prevention of adult periodontitis.

Nasally administered cholera toxin A subunit acts as a mucosal adjuvant : CAMPOS Emilio¹, NAMIKOSHI Jun², MAEBA Satomi², YAMAMOTO Masafumi³, YAMAMOTO Hirotsugu¹ (¹Dept. Pathol., Nihon Univ. Sch. Dent. at Matsudo, Chiba, Japan, ²Dept. Comprehensive Clin. Dent., Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo., ³Dept. Oral Medicine., Dent Nihon Univ. Sch. Dent Matsudo.)

It is well established that cholera toxin(CT), produced by *Vibrio cholerae*, acts as a potent mucosal adjuvant; however, the native form of this molecule causes severe diarrhea. Further, both native CT(nCT)and its B subunit derivative bind to GM1 gangliosides in membrane raft micro domains on neural tissues and are thus unsuitable for use in humans. In this study, we evaluated immunogenicity and the adjuvanticity of CT A subunit(CT-A)when co-administrated with ovalbumin(OVA)through nasal route. Our results show that nasal administration of OVA plus CT-A elicited both mucosal and systemic immune responses. Immunization of mice with OVA plus CT-A resulted in the induction of OVA-specific IgA antibodies in saliva and nasal secretions. Further, significant OVA-specific serum IgG, IgG1, IgG2b, IgA antibody titers were induced. Antibody-forming cell(AFC)analysis confirmed the antibody titers by revealing significant numbers of OVA-specific IgA AFCs in the submandibular glands. Furthermore, CD4⁺ T cells from the spleen exhibited significant proliferative responses when restimulated with OVA in vitro. Thus, CT-A might be a potential candidate as an effective adjuvant for the induction of Ag-specific antibody responses in humans at systemic and mucosal compartments, such as the oral cavity.

GM1 ganglioside functions as a receptor for pathogen-associated molecular patterns (PAMP): KAWAMURA Yuki¹, SHIRAI Yuko¹, KATO Rie¹, HAMABATA Takashi², YAMAMOTO Masafumi³, FURUKAWA Koichi⁴, FUJIHASHI Kohtaro⁵, MCGHEE Jerry R.⁵, DOHI Taeko¹ (¹Dept. Gastroenterology, Res. Inst., Int'l. Med. Ctr. of Japan, Tokyo, Japan, ²Dept. Infectious Dis. & Tropical Med., Res. Inst., Int'l. Med. Ctr. of Japan, Tokyo, Japan, ³Dept. of Comprehensive Clin. Dentistry, Nihon Univ., Sch. of Dentistry at Matsudo, Matsudo, Japan, ⁴Dept. Biochemistry II, Nagoya Univ. Sch. Med., Nagoya, Japan, ⁵Immunobiol. Vac. Ctr., Univ. Alabama at Birmingham, AL, USA)

Cholera toxin (CT) is one of the most potent mucosal immunogens and also has strong adjuvant effect. We investigated the effect of CT on dendritic cells (DC) in comparison with lipopolysaccharide (LPS), using DC prepared from wild type (WT) and beta1,4N-acetylgalactosamine transferase knockout (GalNAc-T KO) mice, which lack major gangliosides including GM1, receptors for CT. A subunit of CT (CT-A) has ADP-ribosyltransferase activity, while B subunit (CT-B) is responsible for binding to cell surface ganglioside receptors. The treatment of WT DC with CT but not with CT-B up-regulated co-stimulatory molecules B7-1, B7-2, and MHC class II, and down-regulated CD11c. CT-treated DC showed enhanced production of IL-12 and elicited antigen (Ag)-specific CD4+ T cell responses. Although GalNAc-T KO DC took up CT or CT-A with changes in surface CD11c expression, CT or CT-A-treated GalNAc-T KO DC failed to elicit Ag-specific T cell responses. Both WT and GalNAc-T KO DC differentiated to full function as antigen-presenting cells (APC) in response to LPS. These results suggest that CT alone was capable of inducing functional differentiation of DC and CT-induced maturation of DC requires interactions with the holotoxin binding to GM1 ganglioside. Furthermore, our data showed that CT uses a totally different pathway from LPS to induce maturation of DC. Thus, the recognition of toxin by GM1 expressed on host cells is a part of innate immunity against pathogen, and bridges following activation of adoptive immunity.

Hemagglutinin-related passive immunization against periodontal disease: for future application.
Y. Shibata*, T. Shiroza, M. Hayakawa, Y. Hosogi, K. Shimizu¹, and Y. Abiko (Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, and Nihon University School of Medicine¹, Tokyo, Japan)

Our approach to protect periodontal disease is to develop a passive immunization system whereby the colonization of *Porphyromonas gingivalis* cells onto human host tissues could be blocked. We have prepared the monoclonal antibody, mAb-Pg-vc, and its recombinant variant, scFv (I&I, 1998), and human-type monoclonal antibody, HumAb-Hag, all of which have the ability to inhibit the hemagglutinating activity.

However, for the administration to human, it is still difficult to rule out the possibility of an unexpected side-effect, and, unlike in the medical field, no social consensus as to the use of vaccines in the dental area could be gained. Therefore, we initially attempted to identify epitope molecules specifically recognized by these antibodies, and demonstrated the presence of short motif (PVQNL) within the hemagglutinin molecules (JBC, 1999). Since the human monoclonal antibody was constructed utilizing lymphocyte from human blood and there are many hemagglutinin-related molecules, such as *Influenza virus*, it is important to characterize the native antigens for the human monoclonal antibody. Indeed, our human monoclonal antibody recognized the hemagglutinin from *Influenza virus*.

To administrate these antibodies to human in future, vast amount of these molecules might be necessary. Preparation of scFv molecules in *E. coli* cells was unsatisfactory due to the formation of inclusion body. On the other hand, Gram-positive secretion-proficient strain, *Bacillus brevis*, has the ability to secrete heterologous proteins with proper disulfide bonding. Taking advantage of this, we constructed a chimeric shuttle plasmid and isolated the *B. brevis* transformant capable of secreting scFv, whose production level was several hundred times more compared to *E. coli* transformant.

This study was supported in part by Grant-in-Aid for Japan Society for the Promotion of Science (09671873) and (13671982).

Porphyromonas gingivalis ヘミン結合タンパク質 (HBP35) の結合機構

日本大学松戸歯学部 生化学教室

○柴田恭子、早川光央、平塚浩一、滝口久、安孫子宜光

Molecular mechanism of a novel hemin-binding protein (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*

Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

○Yasuko Shibata, Mitsuo Hayakawa, Koichi Hiratuka, Hisashi Takiguchi, and Yoshimitsu Abiko

キーワード

Porphyromonas gingivalis, 35 kDa hemin binding protein, redox

目的

成人性歯周炎の主要病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* は、生育に強くヘミンを要求すること、また、ヘミン欠乏により、病原性が著明に変化することが知られている。ヘミンはポルフィリン鉄錯体であることから、本菌におけるヘミンの役割は、鉄イオンの獲得のためと示唆されているが、ヘミン・鉄イオンの獲得調節機構については未だ不明な部分が多い。我々は、*P. gingivalis* 特異的な外膜タンパク質の一つをクローニングし、この外膜タンパク質が *P. gingivalis* のもつ他菌体との共凝集能に関与することを報告してきたが、新たに本分子にヘミン結合能のあることを見いだした。この 35 kDa hemin binding protein (HBP35) の一部を欠損した変異 *P. gingivalis* では、病原性が著しく減少したことから、HBP35 分子の *P. gingivalis* 口腔内定着・増殖に関わる重要性が示唆される。本研究では、HBP35 分子についてデータベース解析を行うと共に、HBP35 のヘミンの結合機構について検討した。

材料および方法

リコンビナント HBP35 を精製し、実験標品とした。ヘミン結合能の測定は、ヘミン結合タンパク質がペルオキシダーゼ活性をもつことを利用した方法 (Francis & Becker) にて行った。protoporphyrin (PPIX) 及び、鉄以外の金属イオンを配する PPIX 類の結合実験はピアコアを用いて行った。ヘミン結合部位について HBP35 分子中の Cys および His 残基の関与を推定し、Cys 残基を 5-iodoacetamidofluorescein (5-IAF) で修飾した r(C)HBP35 を、また、site-directed mutagenesis 法により、His 残基を Gly に変えた r(H → G)HBP35 を作成し、ヘミン結合を検討した。

結果

ヘミンは、rHBP35 に濃度に依存して結合した。rHBP35 には、Mg、Zn を配した PPIX の結合は認められなかった。遺伝子配列から推定される本分子のタンパク質一次構造をもとに、blast search を行った結果、HBP35 は分子内に redox に関連した分子と相同性の高いアミノ酸配列部位を持っていること、また、thioredoxin 活性中心配列 (WCGxCx) を有していることが明らかとなった。HBP35 は、酸化剤、還元剤により酸化型 rHBP35、還元型 rHBP35 に変化した。酸化型 rHBP35 にはヘミン結合は認められず、一方、還元型 rHBP35 にヘミン結合が認められた。rHBP35 を DTT で処理した後、分子中の Cys の SH 基を S-IAF に修飾した r(C)HBP35 にはヘミン結合は見られなかった。また、His 7 残基の内、²⁰⁴HQH および ²⁵²HH の His を Gly に変えた 3 種の r(H → G)HBP35 を作成し、ヘミン結合能を比較した結果、²⁰⁴HQH を GQG に変換した r(H → G)HBP35 は還元型優位となり、ヘミン結合量は増大した。

考察

ヘミンは、rHBP35 分子中の Cys 残基を介して結合しており、rHBP35 分子が還元型の時に結合が認められたこと、さらに、rHBP35 の還元型/酸化型の変化は、還元剤および酸化剤によって容易であったことなどから、*P. gingivalis* の環境の redox 認知に関わる可能性が推測される。

結論

1. HBP35 は、*P. gingivalis* のヘミン結合タンパク質の一つであり、結合には Cys 残基が関与する。
2. HBP35 は、分子内に thioredoxin の活性中心を持っている。
3. HBP35 は、酸化型および還元型に変化し、ヘミンの結合は還元型の時に認められた。

共同研究者：日本大学松戸歯学部生化学教室、城座映明

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」の補助を受けて行った。

Cross-reactivity of Human MAb against *P. gingivalis* Hemagglutinin with Influenza Virus. Y. SHIBATA*¹, Y. HOSOGI¹, K. SHIMIZU², and Y. ABIKO¹, ¹ Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Japan, ² Nihon University School of Medicine, Japan

Objective: Human MAb neutralizing *P. gingivalis* hemagglutinating activity was established using EBV immortalization and found the recognition motif as PVQNLT (JP, 2003, in press). Since the B cell clone was constructed from human lymphocytes by panning and similar short motif was found in influenza virus HA, we attempted to clarify the immuno-crossreactivity of MAb between *P. gingivalis* and influenza virus HAs. Methods: Crossreactivity was determined by antibody titration and invasion of virus was examined plaque assay using human kidney cell. Results: and Conclusion: Human MAb inhibited HA activity of *P. gingivalis* vesicles, and also suppressed the HA activity of strains of A virus (H3N2) which were epidemic in restricted year from 1968 to 1979, but not to other strains. It is noteworthy that the MAb also neutralized the invasive activity of influenza A virus using *in vitro* infection system. In spite of being the HA molecules whose *P. gingivalis* and influenza virus completely differs, both *P. gingivalis* and influenza viruses have the similar hemagglutinating activity. Interestingly, the former group of influenza A virus has a similar amino acid stretch HA as short motif of epitope in *P. gingivalis*, but this site in the later group HA is altered. The fact that the MAb against *P. gingivalis* HA of the human serum suppresses the influenza virus HA activity suggests that the crossreactivity will have to be considered in the development of serodiagnosis and immunotherapy of periodontal disease. Supported in part, by Grant-in-Aid for Scientific Research (C-13671982) from Japan Society for the Promotion of Science,, and A Grant from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology to promote 2001-multidisciplinary research projects.

Human mAbs Neutralizing *P. gingivalis* Hemagglutination from IgG2 transgenic mice. Y. Shibata*¹, Y. Hosogi¹, M. Hayakawa¹, M. Kamada², and Y. Abiko¹ (¹Nihon University School of Dentistry at Matsudo, Chiba, and ²Pharmaceutical Frontier Research Laboratories, JT Inc., Kanagawa, Japan)

Background: *P. gingivalis* has been implicated as an important pathogen in the development of adult periodontitis, and its colonization of subgingival sites is critical in the pathogenic process. One potential virulence factor, hemagglutinin, may mediate bacteria attachment onto and penetration into host cells, as well as agglutinate and lyses erythrocytes to intake heme, an absolute requirement for growth. We previously cloned the gene encoding the 130 kDa hemagglutinin domain. Toward the development of passive immunotherapy, the construction of a human monoclonal antibody which is capable of inhibiting the hemagglutinating ability is significant and important.

Methods: The human mAbs, both exhibiting a high degree of specificity and affinity against the r130k-HMGD have been prepared using XenoMouse technology. The mAbs production levels of hybridoma cells were determined using Biacore system. The characters of mAbs as a human type mAb were then supported immunologically by Western-blot analysis. Finally, the bioactivity of Xeno-mAbs was confirmed by the hemagglutinating assay using human erythrocytes and *P. gingivalis* vesicles.

Results: The constructed Xeno-mAbs, IgG2 subclass, recognized the r130k-hemagglutinin domain as well as the 43 and 49 kDa major bands in *P. gingivalis* cells. The Xeno-mAbs significantly inhibited hemagglutination of *P. gingivalis* vesicles in a dose dependent manner.

Conclusion: The newly constructed Xeno-mAbs may prove to be useful for the development of passive immunization against periodontal diseases caused by *P. gingivalis* infection, pending the results of fertility study in disease mode.

歯周病原菌に対する特異的抗体療法の開発

1. 歯周炎患者における *Porphyromonas gingivalis* 40kDa 特異抗原に対する免疫応答

新潟大学大学院 医歯学総合研究科 歯周診断・再建学分野¹、新潟大学歯学部附属病院 総合診療部²

日本大学松戸歯学部 生化学講座³、キリンビール株式会社 医薬カンパニー医薬探索研究所⁴

○小林 哲夫^{1,2}、田原 知幸⁴、金子 進¹、高内 綾乃¹、早川 光央³、安孫子 宜光³、吉江 弘正¹

Immunotherapy with specific antibodies against periodontopathic bacteria.

1. Immune response of periodontitis patients to *Porphyromonas gingivalis* 40kDa antigens

Division of Periodontology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences¹, General Dentistry and Clinical Education Unit, Niigata University Dental Hospital², Department of Biochemistry, Nihon University School of Dentistry at Matsudo³, Pharmaceutical Research Laboratory, Kirin Brewery Co., Ltd.⁴

Tetsuo Kobayashi^{1,2}, Tomoyuki Tahara⁴, Susumu Kaneko¹, Ayano Takauchi¹, Mitsuo Hayakawa³, Yoshimitsu Abiko³, Hiromasa Yoshie¹

キーワード：抗体療法、*Porphyromonas gingivalis*、血清抗体価

【目的】

歯周病原菌感染によって生じる歯周炎では、血清や歯周組織局所において免疫グロブリンG (IgG) 抗体産生の亢進が認められるが、これらは病原菌毒性成分の中和や殺菌を促進することで歯周病の制御に寄与している。したがって、歯周病原菌に対する特異抗体を投与することは、病原菌排除や歯周炎の改善につながる可能性がある。そこで、今回演者らは、代表的歯周病原菌である *Porphyromonas gingivalis* 由来の 40kDa 外膜蛋白抗原に注目し、同抗原に対する抗体産生が歯周炎の発症・進行・治療後においてどう変動するかを検討した。

【材料および方法】

1. 対象：

新潟大学歯学部附属病院歯周病診療室を受診した歯周炎患者 188 名 (初診患者 85 名、メンテナンス患者 103 名)、及び健全な歯周組織を有する 35 名を対象とした。

2. 歯周組織検査：

歯周ポケット (PD)、プロービング時の出血 (BOP) などを評価した。

3. 血清 IgG・IgG サブクラス抗体価の測定：

本学歯学部倫理委員会の承認のもとインフォームド・コンセントを得た後に、対象から採取した末梢血より血清を分離した後、*Porphyromonas gingivalis* 381 株の熱処理菌体及びリコンビナント 40kDa 外膜蛋白抗原に対する免疫グロブリンG (IgG) 及びそのサブクラス (IgG1-4) 抗体価を ELISA 法にて測定した。

【結果】

1. *P. gingivalis* に対する血清 IgG・IgG サブクラス抗体価はどちらの抗原でも、メンテナンス患者で最も高く、次いで初診患者、健常者の順であった。
2. *P. gingivalis* 菌体に対する血清抗体価と 40kDa 抗原に対する血清抗体価は、IgG3 以外では全て有意な正の相関が認められた。
3. 全被検部位に対する歯周炎 (PD \geq 4mm) 部位の割合と *P. gingivalis* 菌体に対する血清抗体価は、概ね正の相関傾向であるのに対し、歯周炎部位の割合と *P. gingivalis* 40kDa 抗原に対する血清抗体価は負の相関傾向を示した。

【結論および考察】

歯周炎の進行と共に *P. gingivalis* 40kDa 抗原に対する血清抗体価は低下する可能性が示唆された。したがって、40kDa 抗原に対する特異抗体の投与は歯周炎免疫療法に有用かもしれない。

1015 Bacitracin-resistant mechanism of *Streptococcus mutans*; relation with MbrCD and MbrAB

H. TSUDA¹, K. HIRATSUKA², Y. ABIKO¹, M. MAENO¹, and Y. YAMASHITA³,
¹ Nihon University, Tokyo, Japan, ² Nihon University, Chiba, Japan, ³ Kyushu University Faculty of Dental Science, Fukuoka, Japan

Objectives: *Streptococcus mutans* is known to be resistant to bacitracin. We previously reported that a gene locus (*mbrABCD*), which encodes a putative ABC-transporter (MbrAB) and a two-component regulatory system (MbrCD), is involved in the bacitracin resistance of *S. mutans* and that all mutants defective in each *mbr* gene on this locus were about 100 to 120 times more sensitive to bacitracin than the wild-type strain (Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2002, vol. 46, p3756-3764). In this study, we examined whether the MbrCD may be involved in gene expression of *mbrAB*.

Methods: To clarify that the MbrCD is involved in the *mbrAB* expression, we quantified the *mbrAB* transcripts of the wild-type strain Xc and of the *mbrC*-deficient mutant in the presence of 4 units (U)/ml of bacitracin using real-time RT-PCR method. Moreover, comparison of transcriptome profiles of *S. mutans* between in the presence and in the absence of bacitracin was performed using the NimbleGenTM microarray platform. **Results:** Real-time RT-PCR quantification assay indicated that *mbrAB* transcripts were highly induced by 4 U/ml of bacitracin stimulation in the wild type strain. However, the induction of *mbrAB* was not observed in the *mbrC*-null mutant, which cannot proliferate but can survive in the presence of 4 U/ml of bacitracin. Moreover, microarray-based analysis of the transcriptional profile of 1960 whole putative ORFs in *S. mutans* demonstrated that inoculation of 4 U/ml of bacitracin led to the induction of 3 genes at more than 10-fold expression levels. Two of the 3 genes with more than 10-fold induction were *mbrA* (36 times) and *mbrB* (33 times) genes, while the other was an unknown gene (21 times). In contrast, there was no gene that was down-regulated below 1/5. **Conclusions:** We concluded that *mbrAB* transcription is critical for bacitracin resistance of *S. mutans* and that MbrCD is closely related to this induction.

Seq #123 - *Streptococci*

2:00 PM-4:00 PM, Thursday, 10 March 2005 Baltimore Convention Center Exhibit Hall E-F

[Back to the Microbiology / Immunology and Infection Control Program](#)
[Back to the IADR/AADR/CADR 83rd General Session \(March 9-12, 2005\)](#)

[Top Level Search](#)

P2-26/WS16-10 *Streptococcus mutans* のプロテオームデータベースの開発と耐酸性因子の同定

○小嶋 允郎¹, 川田 美樹¹, 柴田 幸江¹, 中野 善夫¹, 岡野 総一郎², 柴田 恭子^{2,3}, 安孫子 宜光^{2,3}, 山下 喜久¹ (九大・歯・口腔保健推進学¹, 日大・松戸歯・生化², 日大・松戸歯・口科研³)

【目的】*Streptococcus mutans* のう蝕病原性として知られている耐酸性は、エナメル質の脱灰を引き起こす低 pH でも、安定して発育増殖する上で重要である。そこで、本研究では *S. mutans* UA159 株を用い、プロテオームデータベースを用いて耐酸性因子を同定した。

【方法】対数増殖期にある *S. mutans* UA159 野生株と UA159*dgk* 欠損株 (*dgk* は既に本菌の耐酸性因子として同定されている) を、一方を pH 7.5 の培地に、もう一方を pH 5.5 の培地に 2 時間暴露した。暴露後、集菌したサンプルを 2DE にかき、pH の低下で発現量が増えたゲルのタンパクスポットを特定し、TOF-MS 解析を行い、各スポットのタンパクを同定した。pH 7.5 条件下のサンプルについては全スポットの TOF-MS 解析を行い、データベースを作成した。

【結果および考察】野生株では、pH 5.5 にのみ出現したタンパクスポットが 10 個、pH 7.5 に比べて pH 5.5 で発現量が増えたタンパクスポットが 11 個認められた。一方、*dgk* 欠損株では前者 10 スポットのうち 4 スポットが消失しており、このうち 3 個はいずれも翻訳に関わるタンパク質であった。また、後者 11 スポットのうち 3 スポットは *dgk* 欠損株では pH 5.5 で発現量が増加していなかった。さらに、野生株では pH 7.5, pH 5.5 とも発現しているのに *dgk* 欠損株ではいずれの pH でも現れないタンパクスポットが 4 個確認できた。以上の結果から、上記のように野生株では pH の低下で変化するが、*dgk* 欠損株では変化が認められなくなったタンパク質およびタンパクの産生が完全に消失してしまったタンパク質は *S. mutans* の耐酸性に何らかの形で密接に関わっている可能性が示唆された。

二次元電気泳動による *Actinobacillus actinomyces-* *temcomitans* の付着因子の解析

○深町 はるか¹, 中野 善夫¹, 岡野 総一郎², 柴田 恭子²,
安孫子 宜光², 山下 喜久¹
(九大院・歯・口腔保健推進¹, 日本大・松戸歯・生化²)

【目的】 *A. actinomycetemcomitans* の臨床分離株は、寒天培地では rough 型のコロニーを形成し、液体培地中ではガラス壁やハイドロキシアパタイトなどに付着して増殖するが、継代培養を行うと付着能を喪失する事が知られている。そこで、*A. actinomycetemcomitans* の付着能を有する株 3381 株と継代培養して付着能を喪失した 3381C 株の二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行い、タンパク質レベルでの菌体の変化を観察することを試みた。

【方法】 まず、3381 株を継代培養し付着能を喪失するなど形態変化を生じた 3381C 株を得た。3381 株、3381C 株それぞれの菌体を超音波破碎後、narrow range pH4-7, 6-11, 11cm の Dry strip に等電点電気泳動後、15×15 cm SDS-PAGE を行った。PDQuest (Bio-Rad) を用いてタンパク質スポットの比較を行い、発現に差が認められたスポットをゲルエクサイスプロセッサ xcise (島津製作所) にてタンパク質の抽出・トリプシン消化を行い、MALDI-TOF-MS によりタンパク質を同定した。

【結果・考察】 二次元電気泳動後のゲルのスポット解析により、3381 株のみに見られるスポット 7 個、付着能を失った 3381C 株でタンパク質量が減少しているスポット 6 個、逆に 3381C 株でタンパク質量が増加しているスポット 3 個を見出した。これらのスポットのタンパク質のアミノ酸配列の相同性を検索した結果、付着能を失った 3381C 株では、*A. actinomycetemcomitans* の付着に関与していると報告されている TadA, RcpA などのタンパク質量が減少していた。他にも様々なタンパク質量に変化があり、これらのタンパク質も付着に関与していると考えられる。

○深町 はるか¹, 中野 善夫¹, 岡野 総一郎², 柴田 恭子², 安孫子 宜光², 山下 喜久¹(九大院・歯・口腔保健推進学¹, 日大・松戸歯・生化学²)

【目的】メチルメルカプタンは、口臭の原因物質として有力視されている揮発性硫化物の一つであり、数種の口腔内細菌がメチオニンを分解してメチルメルカプタンを産生することが知られている。特に歯周病罹患者の呼気中からは高濃度のメチルメルカプタンが産生されるという報告がある。これまでの研究により、*Treponema denticola* は歯周病罹患者の歯肉局所で増殖し、高いメチルメルカプタン産生能をもつことが分かっている。そこで *T. denticola* のメチオニン分解酵素 (METase) について、未変性二次元電気泳動を用いてタンパク質を分離・同定し、その性質を解析した。

【方法】*T. denticola* 全菌体を未変性の状態で二次元電気泳動し、ビスマスによる活性染色にて黒色スポットとして現れたタンパク質を MALDI-TOFMS にて解析した結果、1つの ORF が得られた。この配列を pGEX6P ベクターにサブクローニングして酵素を精製し、その性質を解析した。

【結果・考察】*T. denticola* の METase は、歯周病細菌である *P. gingivalis* の METase と比較して K_m が非常に低く、メチオニンとの親和性が非常に高いことが分かった。次に、*T. denticola*, *P. gingivalis* の菌体のメチルメルカプタン産生量をガスクロマトグラフィーにて測定した。結果、低濃度のメチオニンを基質として加えたときに *P. gingivalis* と比較して *T. denticola* では約 9.5 倍のメチルメルカプタン産生能を持つことが分かった。これらの結果より、*T. denticola* は口腔内のメチルメルカプタン産生に重要な役割を持つことが示唆された。また、これらの揮発性硫化物を産生する酵素は口臭予防や口臭抑制の重要な標的になると考えられる。