第23巻／第１号

平成16年６月
ISSN 0910-9722

東日本歯学雑誌

HIGASHI NIPPON DENTAL JOURNAL

東日本歯誌
第23巻／第1号
pp. 1-152
平成16年 6 月

東日本歯学会
Higashi Nippon Dental Society

東日本歯学会役員

会長	新家　昇	
専務理事	矢嶋俊彦	
常任理事	斎藤隆史・千葉逸朗	（庶務担当）
	越智守生・国永史朗	（会計担当）
	和泉博之・田隈泰信	（編集担当）
	溝口到・越野寿	（企画担当）
監事	武田正子・小野正利	

Editorial Board

Editor-in-Chief : Hiroshi IZUMI
Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Takanori SHIBATA,
Taishin TAKUMA, Yosuke TOJYO, Itaru MIZOGUCHI

Higashi Nippon Dental Society

President : Noboru SHINYA
Vice President : Toshihiko YAJIMA
Auditors : Masako TAKEDA, Masatoshi ONO
Directors : Hiroshi IZUMI, Morio OCHI, Shiro KUNINAGA,
Hisashi KOSHINO, Takashi SAITOU, Taishin TAKUMA,
Itsuo CHIBA, Itaru MIZOGUCHI

Address of Office

c／o Health Sciences University of Hokkaido, Tobetsu-cho Ishikari-gun, Hokkaido,
061-0293, Japan

東 日 本 歯 学 雑 誌
第23巻　第１号　平成16年６月
目　　次

〔原　著〕

1　Ultrasonographic features and vascular patterns
of the submandibular gland
Takashi OHNISHI, Likinobu TANAKA, Tomoaki SANO,
Youichiro HOSOKAWA and Masayuki KANEKO ……（１）

7　All local anesthetics bind to the biomembrane by its nitrogen atom in the molecule
Masahiro KOKUBU*,Kazuaki ODA**, Hanako OHKE*, Takurou KAWAI*,
Masaru KUDO*, Noboru SHINYA*. ……（７）

15　ウサギ頭頂骨に設置したキャップ内の骨形成に対する
Platelet-rich Plasma影響
川田　丈司，廣瀬由紀人，越智　守生，賀来　　亨*，矢嶋　俊彦** ……(15)

31　実験的歯の移動に伴うラットセメント細胞の形態変化
西山　博雅[1)]，浜谷　明里[1)]，矢嶋　俊彦[2)]，坂倉　康則[2)]，溝口　到[1)] ……(31)

43　*Prevotella intermedia*および*Prevotella nigrescens*由来
溶血毒素に関する研究
鎌口　有秀*，中村　麗子*，岡本　公彰**，馬場　久衞* ……(43)

53　ヒトラクフェリンがヒト単球系細胞の
ケモタキシスに与える影響
湯本　泰弘，中島　啓介，藤原　　純，池田　雅美，小鷲　悠典……(53)

61　HSY−EA1 細胞におけるprotease−activated
receptor（PAR）−１とPAR−２の相互脱感作機構
設楽　彰子，谷村　明彦，根津　顕弘，森田　貴雄，東城　庸介……(61)

69　株化骨細胞MLO-Y4-A2におけるPTH受容体遺伝子の
メカニカルストレスによる発現

岡山　三紀*,**，荒川　俊哉**，谷村　明彦***，溝口　到*，田隈　泰信** ……(69)

83　NEVA METER®を用いた唾液粘稠度と喫煙状態の関連
小林　孝雄，中島　啓介，衣笠　裕紀，増田　貴大，山下　浩朗，小鷲　悠典……(83)

〔臨　床〕

91　間接法インレーを用いた前歯部の
審美部分修復について
國安　宏哉[1)]，曽我部元尚[2)]，新井田　淳[1)]，柿崎　　税[2)]，
八島　明弘[1)]，廣瀬由紀人[1)]，斉藤　隆史[3)]，越智　守生[1)]……(91)

97　インプラント歯科外来患者の受診実態
國安　宏哉[1,2)]，廣瀬由紀人[1,2)]，越智　守生[1,2)]，八島　明弘[1,2)]，
新井田　淳[2)]，平　博彦[1,3)]，村田　勝[1,3)]，北所　弘行[1,3)]，
工藤　勝[1,4)]，大桶　華子[1,4)]，細川洋一郎[1,5)]，田中　力延[1,5)]……(97)

107　北海道医療大学歯学部附属病院・インプラント歯科外来の
局所麻酔手術症例に対する精神鎮静法の有効性の検討
大桶華子[1,2)]，工藤　勝[1,2)]，北所弘行[1,3)]，平　博彦[1,3)]，村田　勝[1,3)]，細川洋一郎[1,4)]，
新井田淳[1,5)]，國安宏哉[1,5)]，八島明弘[1,5)]，廣瀬由紀人[1,5)]，越智守生[1,5)] ……(107)

115　クローン病患者に見られた顎関節滑膜炎の一例
金澤　　香，柴田　考典，櫻井　博理*，吉澤　信夫* ……(115)

学会記録

121　第22回東日本歯学会学術大会　定例講演会 ……(121)
123　東日本歯学会第22回学術大会　一般講演抄録 ……(123)
143　会務報告 ……(143)
147　東日本歯学会会則 ……(147)
148　「東日本歯学雑誌」投稿規程 ……(148)
149　「東日本歯学雑誌」投稿の手引き ……(149)

HIGASHI NIPPON DENTAL JOURNAL
VOL. 23, NO. 1, JUNE, 2004

CONTENTS

ORIGINAL REPORTS

1 **Ultrasonographic features and vascular patterns of the submandibular gland**
Takashi OHNISHI, Likinobu TANAKA, Tomoaki SANO,
Youichiro HOSOKAWA and Masayuki KANEKO ……(1)

7 **All local anesthetics bind to the biomembrane by its nitrogen atom in the molecule**
Masahiro KOKUBU*,Kazuaki ODA**, Hanako OHKE*, Takurou KAWAI*,
Masaru KUDO*, Noboru SHINYA*. ……(7)

15 **Effects of Platelet-rich Plasma on Bone Formation in a Cap placed on Rabbit Parietal Bone**
Joji KAWADA, Yukiko HIROSE, Morio OCHI
Tohru KAKU*, Toshihiko YAJIMA** ……(15)

31 **Morphological changes of cementocytes in cellular cementum during experimental tooth movement**
Hiromasa NISHIYAMA[1)], Meiri HAMAYA[1)], Toshihiko YAJIMA[2)],
Yasunori SAKAKURA[2)], Itaru MIZOGUCHI[1)] ……(31)

43 **Study on the hemolysin from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens***
Arihide KAMAGUCHI*, Reiko NAKAMURA*,
Masaaki OKAMOTO** and Hisae BABA* ……(43)

53 **Effects of human lactoferrin on the chemotactic response of human monocytic cells**
Yasuhiro YUMOTO, Keisuke NAKASHIMA,
Jun FUJIWARA, Masami IKEDA, Yusuke KOWASHI ……(53)

61 **Cross-desensitization between PAR-1 and PAR-2 in HSY-EA1 cells.**
Akiko SHITARA, Akihiko TANIMURA,
Akihiro NEZU, Takao MORITA and Yosuke TOJYO ……(61)

69 **Mechanism of PTH receptor induction by fluid shear stress in the osteocyte-like cell line MLO-Y4-A2**

Miki OKAYAMA*, **, Toshiya ARAKAWA**, Akihiko TANIMURA***, Itaru MIZOGUCHI* and Taishin TAKUMA** ……(69)

83 **Effect of smoking on the viscosity of whole saliva measured with the NEVA METER®**

Takao KOBAYASHI, Keisuke NAKASHIMA, Hironori KINUGASA Takahiro MASUDA, Hiroaki YAMASHITA, Yusuke KOWASHI ……(83)

CLINICAL REPORTS

91 **Application of Indirect Method Inlay for Anterior Tooth Restoration : A Clinical Report**

KUNIYASU Hiroya[1)], SOGABE Motohisa[2)], NIIDA Atsushi[1)], KAKIZAKI Mitsugi[2)], YAJIMA Akihiro[1)], HIROSE Yukito[1)], SAITO Takashi[3)], OCHI Morio[1)] ……(91)

97 **Reported Conditions of Patients in the Clinical Department of Implant Dentistry**

KUNIYASU Hiroya[1,2)], HIROSE Yukito[1,2)], OCHI Morio[1,2)], YAJIMA Akihiro[1,2)], NIIDA Atsushi[2)], TAIRA Hirohiko[1,3)], MURATA Masaru[1,3)], KITAJYO Hiroyuki[1,3)], KUDOU Masaru[1,4)], OHKE Hanako[1,4)], HOSOKAWA Youichiro[1,5)] and TANAKA Rikinobu[1,5)] ……(97)

107 **Studies on the efficacy of conscious sedation in cases of surgery under local anesthesia for the clinical department of implant dentistry in the dental hospital of the Health Sciences University of Hokkaido**

OHKE Hanako[1,2)], KUDO Masaru[1,2)], KITAJO Hiroyuki[1,3)], TAIRA Hirohiko[1,3)], MURATA Masaru[1,3)], HOSOKAWA Yoichiro[1,4)], NIIDA Atsushi[1,5)], KUNIYASU Hiroya[1,5)], YAJIMA Akihiro[1,5)], HIROSE Yukito[1,5)] and OCHI Morio[1,5)]……(107)

115 **Temporomandibular joint synovitis in patients with Crohn's disease : a case report**

Kaoru KANAZAWA, Takanori SHIBATA, Hiromasa SAKURAI and Nobuo YOSHIZAWA ……(115)

〔ORIGINAL〕

Ultrasonographic features and vascular patterns of the submandibular gland

Takashi OHNISHI, Likinobu TANAKA, Tomoaki SANO,
Youichiro HOSOKAWA and Masayuki KANEKO

Department of Dental Radiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The ultrasonographic features and intranodal vascular patterns of the submandibular glands were evaluated to establish criteria for the diagnosis of salivary glands. There were significant differences between the internal echo of the submandibular glands and the parotid glands and the tongue. The internal echo of the submandibular gland indicated the lowest intensity. The internal echo intensity in the under 30% weight/height ratio group was hypoechoic, and the echo intensity in the over 50% weight/height ratio group was hyperechoic. The ratio of the obvious posterior echo of the submandibular glands were 11.0-15.0%. The ratio of the obvious boundary echo of the submandibular glands were 2.5-3.6%. No lateral shadow was observed. Continuity of the bifurcation part with the trunk was observed in 17 facial arteries (68%), 14 submental arteries (56%), and these arteries were easily examnined. Continuity was observed in 1 branch of the external carotid artery (4%), and the suprahyoid branch of the lingual artery was not observed.

Introduction

Ultrasonography is frequently used in the diagnosis of soft tissue lesions in the head and neck region because of its noninvasiveness and ease of application[1-5]. To conduct a correct sonographic diagnosis of submandibular usual gland lesion complaints, such as tumors, cysts, and inflammations, it is necessary to compare the usual ultrasonographic features and the intranodal vascular patterns of the submandibular gland with abnormal features. The features of submandibular glands on ultrasonograms are expressed subjectively, according to the clinical experience of the observer and this method always involves uncertainties caused by differences in experience.

In this study, the ultrasonographical features and the intranodal vascular patterns of the submandibular glands were evaluated to develop criteria for the diagnosis of salivary glands.

Key words：Submandibular gland, Internal echo, posterior echo, Power Doppler imaging

受付：平成16年４月２日

Materials and Methods

Examination of the ultrasonographic features was performed using a Echo Camera 210DX Ⅱ with a 5.0 MHz linear array transducer (Aloka, Tokyo, Japan). The B-mode transverse planes were obtained, and all ultrasonographic images were analyzed by one of the authors (T.O.). To standardize the settings on the image analyzing equipment, the receiving gain was kept constant at the following condition：near gain 5, far gain 3 , and gain 6. The transducer surface with echo-gel was placed on the back skin to prevent air artifacts.

The ultrasonographic image analyzing, XL500, was by Olympus-avio, Tokyo, Japan with an image processor (TVIP4100) and soft ware by Image Command4198. After the command for measuring density was selected, the brightness on the CRT representing the internal echoes were measured. The ROI (region of interest) for measuring the internal echoes were set on the subumandibular glands, the parotid glands and the tongue, respectively. The average of the brightness on the three different sites was calculated.

The ultrasonographic examination was performed bilaterally on the submandibular glands of 100 healthy volunteers：60 males (mean age, 25.5 years ; range, 23-36 years) and 40 females (mean age, 23.9 years ; range, 23-27 years).

The ultrasonographic features of the submandibular glands are shown in figure1. The internal echo, posterior echo, boundary echo, and lateral shadow were evaluated. The internal echo represents the average of the echo intensity of the submandibular glands, measured by image processer XL500. To investigate the relation between individual differences and the internal echo intensities, the under 30% weight/height ratio group was compare with the over 50% weight/height ratio group. The posterior echo was represented by the increased echo intensity of the posterior region of the submandibular gland. The difference in echo intensity between the anterior and posterior regions of the gland, and then the ratio of the submandibular glands with obvious posterior echos were calculated. The boundary echo was represented by the increase in echo intensity of the region surrounding the submandibular gland, the existence of submandibular glands with obvious boundary echos were evaluated. The lateral shadow was defined as a low echo intensity area that appeared from the lateral side in the submandibular gland to the posterior region. The blood flow of the submandibular glands were evaluated using Power Doppler US (SSD-1700 ; Aloka, Tokyo, Japan). A transverse scan was performed using a 7.5MHz transducer. All images were obtained by a Power

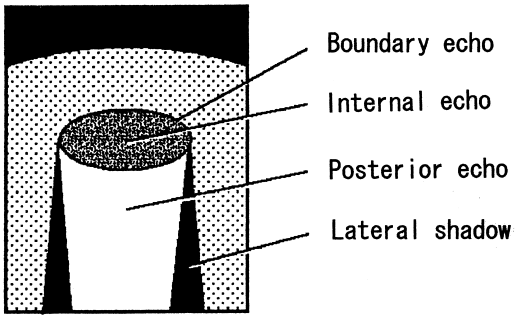


Fig.1 Ultrasonographic features of the submandibular glands

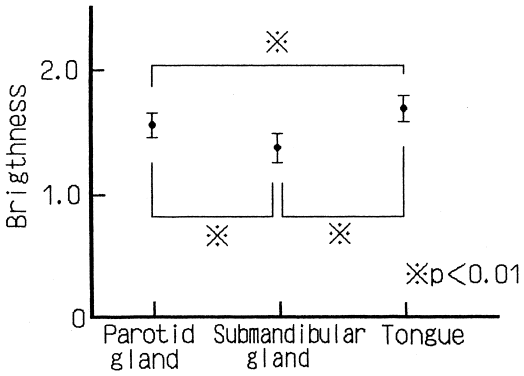


Fig.2 Internal echo intensity of the submandibular and parotid glands and the tongue

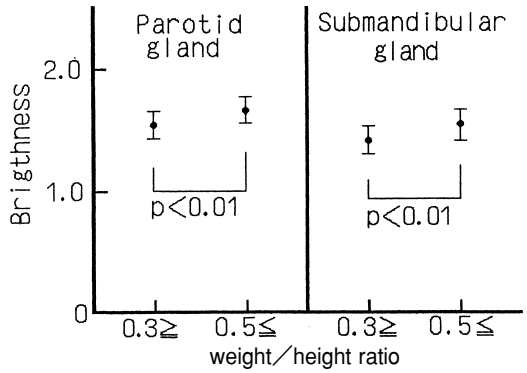


Fig.3 Relation between the individual difference and the internal echo intensity

Doppler unit under the following conditions : gain, 80dB ; depth, 42mm ; and velocity scale of Power Doppler, ±10cm/sec. The color-write priority of the Power Doppler was maximized for the display of flow color information.

The power Doppler examination was performed in the submandibular glands of 25 healthy volunteers : nineteen males (mean age, 24.2 years ; range, 22-28 years) and six females (mean age, 24.2 years ; range, 22-27 years).

All images were in principle obtained of the right side of the submandibular gland. In the branch of the facial artery, the submental artery, the lingual artery, the palatine ascending artery, the suprahyoid branch of the lingual artery, and the branch of the external carotid artery around the submandibular gland, ultrasonographic images were obtained using the Power Doppler. The continuity of the bifurcation of the trunk and each artery was examined for delineation of blood flow in the artery. The number of intraparenchymal arteries was calculated on the images obtained with an oblique sagittal orientation parallel to the mandibular plane.

Results

There were no statistically significant differences between male and female images : The right and the left internal echo, all of the internal echoes were compared for the submandibular glands, the parotid glands, and the tongue. There were statistically significant differences between the internal echo of the submandibular glands and the parotid glands and the tongue by using the Student t test ($p<0.01$). The internal echo of the submandibular gland indicated the lowest intensity (Fig.2).

To investigate the relation between individual differences and internal echo intensities, the under 30% weight/height ratio group was compared with the over 50% weight/height ratio group. The internal echo intensity of the under 30% weight/height ratio group was hypoechoic, and the echo intensity in the over 50% weight/height ratio group was hyperechoic (Fig.3). The posterior echo was represented by an increased echo intensity of the posterior region of the submandibular gland. The averages of the posterior echo intensity were 0.55-0.58 (brightness). The ratio of submandibular glands with obvious posterior echos was 11.0-15.0% (Table1). The ratio of submandibular glands with obvious boundary echos was 2.5-3.6%,

Table.1 Posterior echo of the submandibular gland

		echo intensity (brightness)	appearance rate (%)
Male	right	0.57 ± 0.21	11.7
	left	0.58 ± 0.20	11.7
Female	right	0.57 ± 0.19	11.0
	left	0.55 ± 0.23	15.0

Table.2 Boundary echo lateral shadow appearance rate (%) of the submandibular gland

		boundary echo	lateral shadow
Male	right	3.3	0
	left	3.3	0
Female	right	3.6	0
	left	2.5	0

Table.3 Visualization of bifurcation part with outside branch of the submandibular gland

n=25

	number of visualization
branch of facial artery	17 (68%)
branch of submental artery	14 (56%)
branch of lingual artery	9 (36%)
branch of palatine ascending artery	5 (20%)
branch of suprahyoid branch of lingual artery	0 (0%)
branch of external carotid artery	1 (4%)

no the lateral shadow was observed (Table2).

Table 3 shows the continuity of the bifurcation part with the trunk of each artery examined for delineation of the blood flow in the artery. Continuity of the bifurcation part with the trunk were observed in 17 facial arteries (68%), in 14submental arteries (56%), in 9 lingual arteries (36%), in 5 palatine ascending arteries (20%), in 1 branch of the external carotid artery (4%), and no suprahyoid branch of the lingual artery was observed around the submandibular gland. The average number of the intraparenchymal arteries of the submandibular gland was 1.96. A representative image obtained with an oblique sagittal orientation parallel to the mandibular plane is shown in Fig.4.

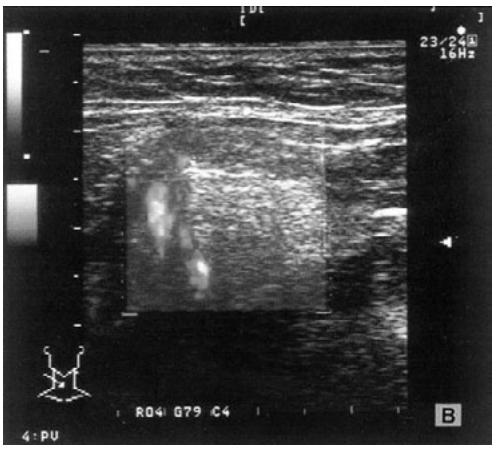


Fig.4 Power mode Doppler image obtained with an oblique sagittal orientation parallel to mandibular plane show intraparenchymal arteries.

Discussion

Ultrasonography is frequently used for the soft tissue of the head and neck regions because of its noninvasiveness and ease of use[6-9]. In addition to this diagnostic modality that is uniquely adapted for use with superficially located anatomic soft tissue structures such as the salivary glands[10], B-mode scanning, gray

scale imaging, and transducer development has enabled real-time examination. Ultrasonography may also provide morphological features of internal organs, vascular patterns[11-13]. Among the major salivary glands, the submandibular gland and the parotid gland mainly has been examined using ultrasonography. The structural changes of the gland parenchyma and the details of surrounding structures have been identified. This method resultion differences caused by the kind of salivary gland and individual differences that have been shown by radiologists, clinically[5].

It is considered that the usual ultrasonographic features and intranodal vascular patterns of submandibular gland, can be compared with and distingnished from the abnormal features. A few other studies of salivary glands by ultrasonographic scanning under specified conditions have been reported[14,15]. In the study, the ultrasonographic features and the intranodal vascular patterns of the submandibular glands were evaluated to develop criteria for a diagnosis of submandibular gland lesions.

The internal echo intensity of the parotid gland was more hyperechoic than that of the submandibular gland. The tongue intensities were the most hyperechoic of all echoes observed here. These results suggest that the internal echo intensity is related to the quantity of fatty tissue. The echo intensity is increased when there are considerable differences in acoustic impedance between gland parenchyma and fatty drops[16]. Because the salivary gland echo intensity increased with age of subject, the unchanging echo intensity of the tongue could be an in important index when internal echos are examined. The internal echo intensity in the under 30% weight/height ratio group was hypoechoic, and the echo intensity in the over 50% weight/height ratio group was hyperechoic (Fig.3). These results suggest that the echo intensity increased by a specific quantity of fatty tissue of both the submandibular gland and the subcutaneous tissue. Thus, individual differences must be considered in interpreting ultrasonographic images. Submandibular glands with boundary echoes were very few (2.5-3.6%). The boundary echo is greatly influenced by the boundary form, and the surface of the submandibular gland may be assumed to be relatively smooth. No lateral shadow caused by slight differences in the density of the submandibular gland and the surrounding structure was observed.

The continuity of the bifurcation part with the trunk of each artery was examined for a delineation of blood flow in the artery, the continuity of the bifurcation part with the trunk were observed in 17 facial arteries (68%) and, 14 submental arteries (56%), these arteries could be examined easily. Continuity was observed in one branch of the external carotid artery (4%), and no suprahyoid branch of the lingual artery was observed. These results suggest that the trunk of the artery is small, that it shows low flow signals, and congenital defects of blood vessel.

The results showed that the ultrasonographic features and the intranodal vascular patterns of the submandibular glands could be evaluated to establish criteria for diagnosis.

References

1. Bartlett LJ, Pon M : High-resolution real-time ultrasonography of the submandibular sarivary gland. *J Ultrasound Med* **3 :** 433-437, 1984.

2. Kobayashi A : The Ultrasound features of oromaxillofacial deiseases1.Diseases of buccal soft tissues. *Jpn J Oral Maxillofac Surg* **26 :** 972-981, 1980.

3. Iizuka M, Nagashima M, Kawamitsu T, Okamura K, Aoyagi K, Kimura N, Mishima Y : Ultrasonic evaluation of neck masses. *Jpn J Med Ultrasonics* **10 :** 14-18, 1983.

4. Bartlett LJ, Pon M : High-resolution real-time ultrasonography of the submandibular sarivary gland. *J Ultrasound Med* **3 :** 433-437, 1984.

5. Seibert RW, Seibert JJ : High resolution ultrasonography of the parotid gland in children. *Pediatr Padiol* **16 :** 374-379, 1986.

6. Vassallo P, Wernecke, Roos N, Peters PE : Differentiation of benign from malignant superficial lymphadenopathy : The role of high-resolution US. *Radiology* **183 :** 215-220, 1992.

7. Isaza M, Ikezoe J, Morimoto S, Takashima S, Kadowaki K, Takeuchi N, Sano M, Nakao K, Kozuka T : Computed tomography and ultrasonography in parotid tumors. *Acta Radiologica* **30 :** 11-15, 1989.

8. Nozaki H, Harasawa A, Kohno A, Shigeta A : Ultrasonographic features of recurrent parotitis in childhood. *Pediatr Padiol* **24 :** 98-100, 1994.

9. Ishii J, Nagasawa H, Wadamori T, Yamashiro M, Ishikawa H, Yamada T, Miyakura T, Amagasa : Ultrasonography in the diagnosis of palatal tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **87 :** 39-43,1999.

10. Mandel L : Ultrasound findings in HIV-positive patients with parotid swellings. *J Oral Maxillofac Surg* **59 :** 283-286, 2001.

11. Sato N, Kawabe R, Fujita K, Omura S : Differential diagnosis of cervical lymphadenopathy with intrenodal color Doppler flow signals in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **86 :** 482-488, 1998.

12. Shimizu M, Ussmuller J, Doz P, Hartwein J, Donath K : A comparative study of sonographic and histopathologic findings of tumorous lesions in the parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **88 :** 723-737, 1999.

13. Ariji Y, Yuasa H, and Ariji E : High-frequency color Doppler sonography of the submandibular gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **86 :** 476-481, 1998.

14. Toshida M : Study on demonstration of sublingual glands by ultrasonography. J Jpn Stomatol Soc **46 :** 28-35, 1997.

15. Utsumi 0 : Reserch concerning form characteristic of salivary gland by ultrasonographic analysis. *Higashi Nippon Dent J* **17 :** 219-234, 1998.

16. Nakamura M, Taniguchi N, Hayashi Y, Kawai F, Irie T, Itoh K : Age-dependent change in submandibular echo level in children. *Jpn J Med Ultrasonics* **22 :** 775-780, 1995.

〔ORIGINAL〕

All local anesthetics bind to the biomembrane by its nitrogen atom in the molecule

Masahiro KOKUBU*,Kazuaki ODA**, Hanako OHKE*, Takurou KAWAI*,
Masaru KUDO*, Noboru SHINYA*.

*Department of Dental Anesthesiology, Faculty of Dentistry.
**Department of Pharmaceutical Sciences.
Health Sciences University of Hokkaido.

*(chief : Pro. Noboru SHINYA)
**(chief : Pro. Minoru MACHIDA)

Abstract

The interaction between various local anesthetics and the phospholipid membrane was examined by ^{1}H-NMR(Nuclear Magnetic Resonance) spectroscopy. In order to measure the extent of proximity of various local anesthetics to the membrane, We examinined the chemical shift value and broadening of half-width of choline methyl signal of the membrane. Electrostatic interaction was seen between positively charged nitrogen atom of local anesthetics and negatively charged oxygen atom of phospholipid membrane. It was also determined that binding ability to the membrane of tetracaine and dibucaine, both of which possess two positively charged nitrogen atoms, was stronger than that of anesthetics such as lidocaine, procaine and bupivacaine, possessing only one positively charged nitrogen atom. On the other hand, when the positively charged nitrogen atom is surrounded by bulky carbon chains, such as cocaine, the chemical shift and broadening of half-width of choline methyl signal in the membrane were virtually unaffected. The binding ability of local anesthetics to the phospholipid membrane was found to be directly proportional to the anesthetic potency, suggesting that positively charged nitrogen atom of local anesthetics plays an important role in the action mechanism of local anesthetics.

Key words : Local anesthetics, Binding site, NMR-spectroscopy, Phospholipid membrane

INTRODUCTION

According to Hille's hypothesis[1], external applied local anesthetics must cross the nerve membrane, and

受付：平成16年２月12日

enter sodium channels to reach their specific binding site to bring local anesthetic effect by promotion of sodium ion channel inactivation. However, there is no scientific evidence demonstrating that local anesthetics cross the nerve membrane. Previous our study using ^{1}H-NMR spectroscopy only indicated the electrostatic interaction of local anesthetics at the membrane surface[2], and further our study showed that local anesthetics were left for 1month at 37℃ or 2months at 22℃ in an environment in which the pH was raised from 6.5 to 10, increasing the amount of basic local anesthetics 1,000 times, they did not cross the phospholipid membrane but instead remained on the membrane surface[3].

Furthermore, we synthesized two new uncharged(neutral) lidocaine analogues in which the nitrogen atom possess almost no positive charge, and showed that their local anesthetic effect were very poor[4]. In the contrary, local anesthetics in which possess multiple positively charged nitrogen atoms showed increased local anesthetic effect[5].

We also showed that when the negative charge of oxygen atom at the membrane surface was reduced by the administration of Eu^{3+} and Na^+ ion, local anesthetic effects were reduced[6].

Therefore, local anesthetics might express their pharmacological effect by binding to the membrane surface at the positively charged nitrogen atom. The present study using ^{1}H-NMR spectroscopy was design to examine whether all local anesthetics bind to the biomembrane by its nitrogen atom in the molecule.

MATERIALS AND METHODS

The interaction between 110mM of local anesthetics(lidocaine, procaine, propitocaine, bupivacaine, dibucaine, tetracaine, and cocaine, pH6.2-6.8) and phospholipid model membrane (66mM of egg yolk lecithin) were examined by ^{1}H-NMR spectroscopy. Lecithin dispersion were obtained by evaporating lecithin (L-α-phosphatidyl-choline type Ⅲ-E from egg yolk, 100mg/ml in hexane) to dryness, dissolving the residue in D_2O, and subjecting the resulting coarse dispersion to an ultrasonic disintegrator (W-220, Heat System-Ultrasonic, Inc., New York, USA) for 1 hour in an ice-cold vessel under a nitrogen atmosphere. ^{1}H -NMR spectra were measured in a 5-mm tube at 27℃ using a JNM-EX-400 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan). Sodium 2,2-dimethyl-2-silapentane-5-sulfpnate (DDS) was used as the internal standard (0.0ppm).

Based on the results of previous studies [2.3.4] it was thought that the binding between local anesthetics and the phospholipid membrane occurs in the oxygen atom on the phosphate adjacent to the choline methyl, which is the hydrophilic region on the external surface of the membrane. Therefore, a hydrogen atom, the choline methyl signal, was used for ^{1}H-NMR spectroscopy to measure the chemical shift and broadening of half-width (peak width at half maximum height) of hydrogen atoms signal.

RESULTS

In the ^{1}H-NMR spectrum of the phospholipid membrane, the most prominent signals, identified as choline methyl protons, methylene protons, and methyl protons, showed a chemical shift at 3.26 ppm (1302.4 Hz), 1.31 ppm (523.8 Hz), and 0.85 ppm (340.3 Hz) from internal reference (DSS), respectively. When lidocaine hydrochloride (110 mM) was added to the solution, the chemical shift of the choline methyl signal shifted 3.5 Hz to upfield (1302.4 Hz → 1298.9 Hz), but the chemical shift of the methylene

and methyl signals showed no change. This provides evidence of the interaction between anesthetics and lecithin vesicles occured on the membrane surface. A similar upfield shift was observed after addition of propitocaine (4.4 Hz), bupivacaine (4.4 H), dibcaine (8.8 Hz), and tetracaine (10.7 Hz), whereas no change of chemical shift was observed after addition of procaine and cocaine(Fig.1). In addition, the change of chemical shift of the choline methyl signal was accompanied by broadening of half-width of the choline methyl signal. Upon addition of lidocaine to the phospholipid membrane solution, the half-width of the choline methyl signal broadened from 8.0 Hz to 8.8 Hz(0.8Hz), whereas other signals of the membrane were not affected. Similar broadenings were observed in the case of propitocaine (8.0 Hz → 9.0 Hz, 1.0 Hz), bupivacaine (8.0 Hz → 9.6 Hz, 1.6Hz), dubucaine (8.0 Hz → 11.0 Hz, 3.0Hz), and tetracaine (8.0 Hz → 12.2 Hz, 4.2Hz). On the other hand, the addition of procaine and cocaine did not affect the half-width of the choline methyl signal(Fig.2). These results suggest that broadening of the half-width increases with increasing proximity between the oxygen atom of phospholipid membrane and nitrogen atom of anesthetics (Fig.3). In order to see the relation of these two values (chemical shift and half-width), values of chemical shift of choline methyl signal were plotted against half-width values of choline methyl signal in Fig. 4. As a result, the change of two values showed a good correlation (R^2=0.9622). It was also determined that binding ability to the membrane of tetracaine and dibucaine, both of which possess two nitrogen atoms, was stronger than that of anesthetics, possessing only one nitrogen atom.

DISCUSSION

According to Hille's specific receptor theory[1], external applied local anesthetics must penetrate the nerve membrane, and bind to the specific receptor from inside of nerve cell to bring local anesthetic effect, however, there is no scientific evidence demonstrating that local anesthetics cross the nerve membrane. Previous our study using ^{1}H-NMR spectroscopy and model membrane indicated that the electrostatic interaction occurred between local anesthetics and model membrane at the membrane surface[2,7], and further our study showed that local anesthetics were left for 1month at 37℃ or 2months at 22℃, they did not penetrate the phospholipid membrane but instead remained on the membrane surface[3].

We previously synthesized lidocaine ester derivatives with prolonged duration and examined their binding mode with phospholipid model membrane. The results showed that lidocaine ester derivatives indicated two interaction sites with the membrane surface not only positive charged nitrogen atom but also by electrostatic effect of ester carbonyl group[7]. Furthermore, we synthesized uncharged (neutral) lidocaine analogues in which nitrogen atom posseses almost no positive charge, and showed that their local anesthetic effect were very poor[4]. In the contrary, local anesthetics in which possess multiple positively charged nitrogen atoms showed increased local anesthetic effect[5]. We also showed that when the negative charge of oxygen atom at the membrane surface was reduced by the administration of Eu^{3+} and Na^+ ion, local anesthetic effects were reduced[6].

Present our study indicated that all local anesthetics bind to the biomembrane by its nitrogen atom in the molecule. The possibility exist that local anesthetics might express its pharmacological effect by binding to the nerve membrane.

Local anesthetics might express the anesthetic effect even if the local anesthetics molecule could not penetrate the membrane. It is generally accepted that, when the hydrophilic membrane surface is negatively charged, clusters of bound water form, the density becomes 15% heavier than that of bulk water and the volume is reduced(electrostriction). It could be assumed that local anesthetics might bring sodium channel protein conformation change by binding to the nerve membrane.

Ueda[8] hypothesized electrostriction theory that account for the mechanism of general anesthetics, when the diethylether bound to albumin, negative charge of membrane surface was reduced, and brought the volume expansion of the nerve membrane by melting of electrostricted water molecule released from the protein surface. This volume expansion suppress sodium ion channel and inhibit sodium ion passage.

The same theory is applied also to local anesthetics. When the positively charged nitrogen atoms of local anesthetics bind to the membrane and neutralize the negative charge of the membrane surface, electrostricted water is released into the bulk water, and the volume of the membrane surface expands. This expansion may cause a conformation change in the sodium channel protein, then inhibit sodium ion passage. This could be the action mechanism of local anesthetics.

In this present study, electrostatic interaction between positively charged nitrogen atom of local anesthetics and negatively charged oxygen atom of the membrane surface was seen except cocaine, however, cocaine has strong local anesthetic effect. When the positively charged nitrogen atom is surrounded by bulky carbon chains, such as is observed in cocaine, might not bind with the membrane in vitro. In order for cocaine to express its anesthetic effect, its C-C bond is assumed to cleave and form a pyrrolidine ring in vivo, and the positively charged nitrogen atom must be located on the surface of the molecule.

There are many discussions whether anesthetic effect is specific or not. Some one postulated receptor theory, and another ones supported non-specific membrane lipid theory. Nevertheless, researcher do not dispute that minimum effective concentration of anesthetics is on order of mM whatever local anesthetics or general anesthetics. It is difficult to accept that specific receptor exist, because anesthetics are only effective in such a high concentration.

As mention above, all local anesthetics have the electrostatic interaction with the membrane by its positively charged nitrogen atom. It could be also appreciate that local anesthetics are effective only in such a high concentration provided the conformation change of sodium ion channel protein which was brought by many local anesthetics molecules binding to membrane surrounding the sodium ion channel, thereby inhibit the passage of sodium ions.

These results suggest that interaction with positively charged nitrogen atom of local anesthetics and negatively charged oxygen atom of the membrane play the very important role in the mechanism of local anesthetics.

CONCULUSION

In this present study, using ^{1}H-NMR spectroscopy , electrostatic interaction between positively charged nitrogen atom of local anesthetics and negatively charged oxygen atom of the membrane surface was seen. These interaction might be an action mechanism of local anesthetics.

References

1) Hille B : Local anesthetics : Hydrophilic and hydrophobic pathway for the drug receptor reaction. J Gen Physiol **69** : 475-496, 1977.

2) Kokubu M, Oda K, Kudo M, Machida M, Shinya N : Correlation between the anesthetic potency of local anesthetics and binding ability to a model membrane. J Anesthesia **11** : 121-128, 1997.

3) Kokubu M, Oda K, Ohke H, Kato M, Kawai T, Kudo M, Shinya N : Local anesthetics do not penetrate lecithin vesicles. J Jpn Dent Soc Anesthesiol : **25(3)** : 324-329, 1997.

4) Kokubu M, Oda K, Ohke H, Abiko I, Kawai T, Kudo M, Shinya N : Local anesthetic effect of two newly synthesized uncharged lidocaine analogues. J Jpn Dent Soc Anesthesiol : **25(2)** : 169-173, 1997.

5) Kokubu M, Oda K, Kawai T, Ohke H, Kato M, Kudo M, Shinya N, Yajima T : Local anesthetic effects of three newly synthesized multiply charged lidocaine analogues. J Jpn Dent Soc Anesthesiol : **26(1)** : 65-70, 1998.

6) Endo Y, Oda K, Kokubu M : Effects of liposome and cation on the local anesthetic potency of lidocaine. J Jpn Dent Soc Anesthesiol **22(2)** : 260-271, 1994

7) Oda K, Kokubu M, Shinta N, Machida M : Proton magnetic resonance study on the interaction of lidocaine derivatives with lecithin vesicles. Masui **40(1)** : 72-79, 1991

8) Ueda I, Kamaya H : Molecular mechanism of anesthesia. Anesth Analg **63** : 929-945, 1984.

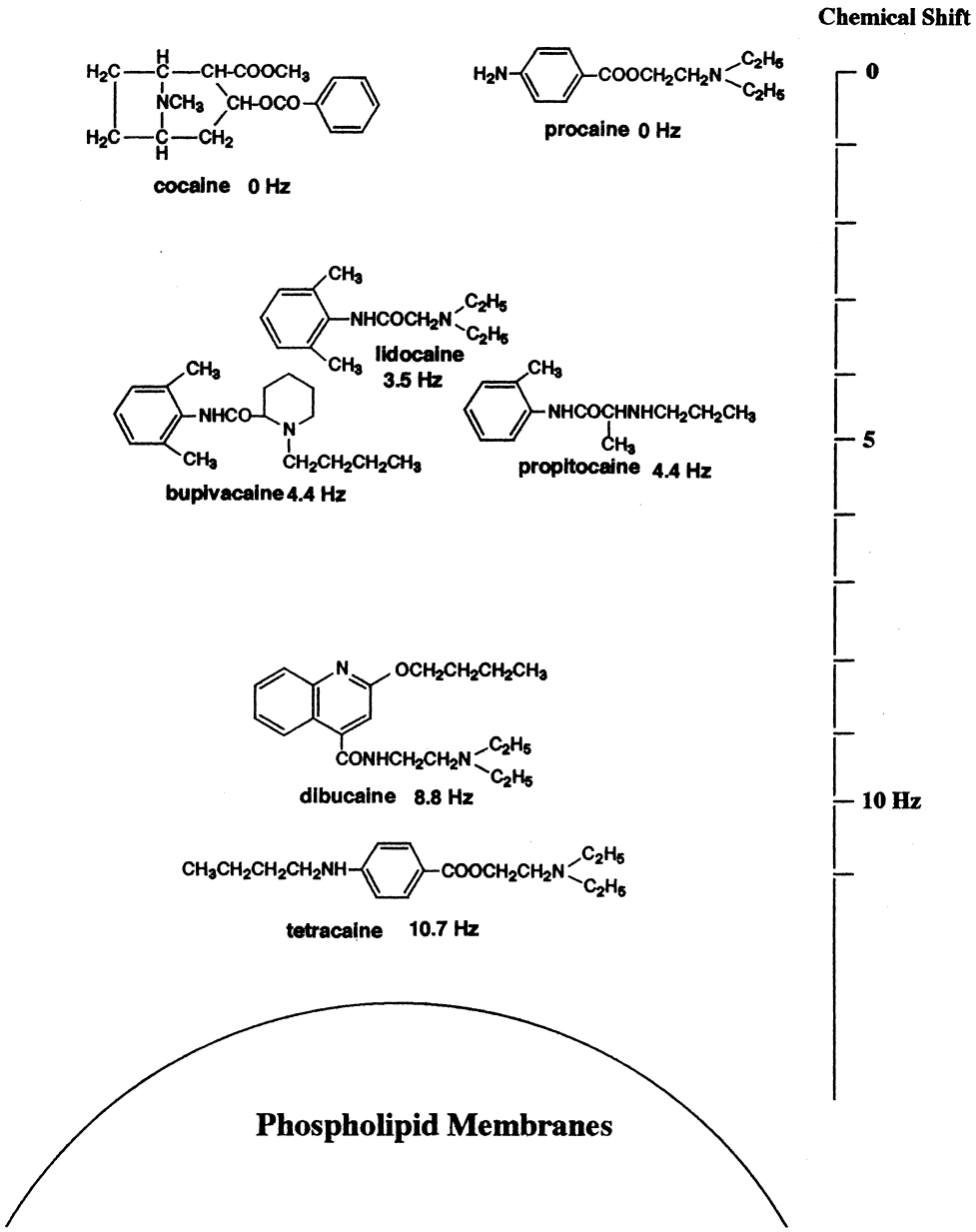


Fig.1 Proximity between phosposlipid membrane and local anesthetics estimated by chemical shifts of choline methyl signal of phospholipid membrane. Lidocaine(3.5Hz),bupivacaine(4.4Hz), propitocaine(4.4Hz), dibucaine(8.8Hz) and tetracaine(10.7Hz).

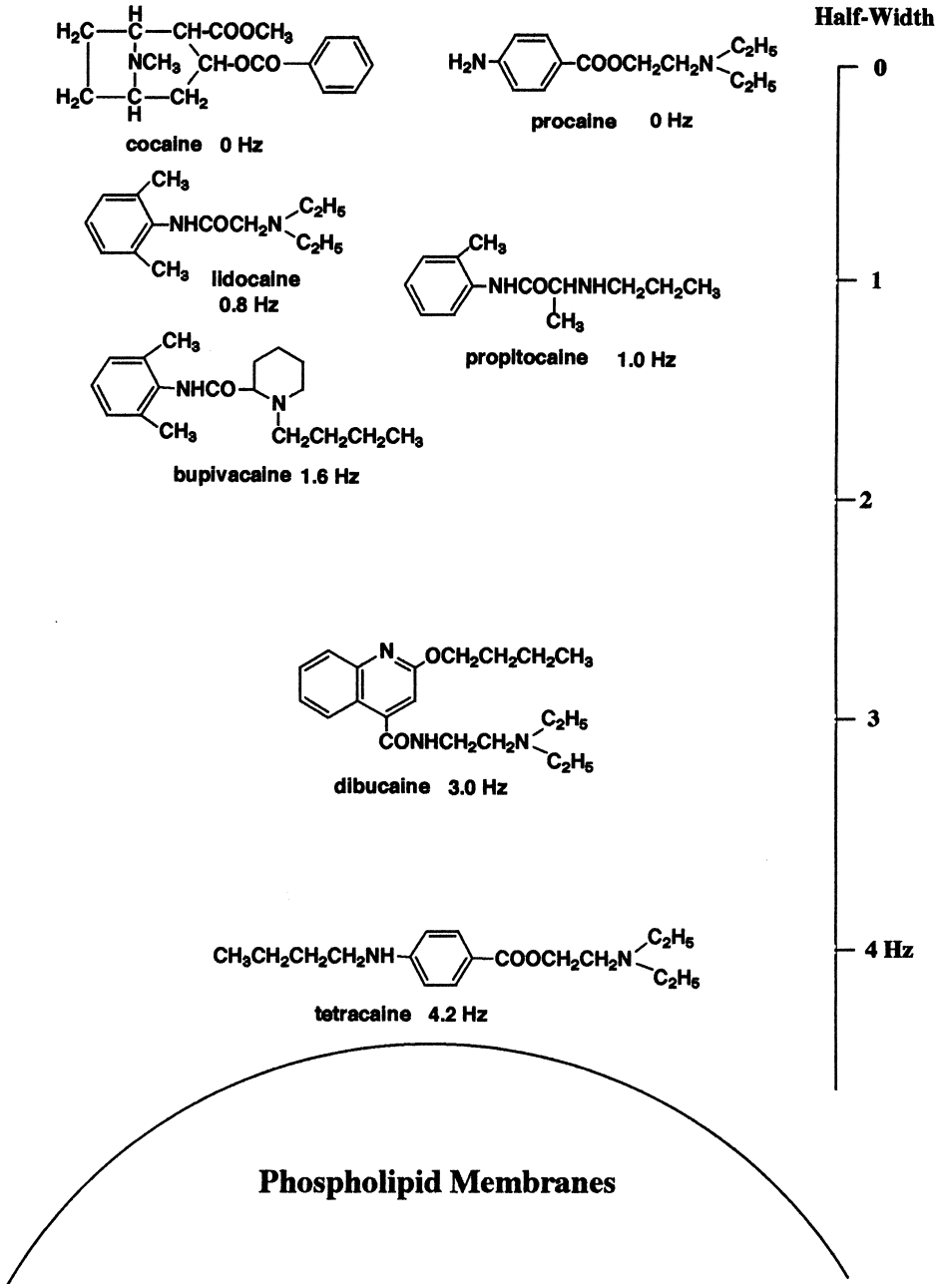


Fig.2 Proximity between phospholipid membrane and local anesthetics estimated by broadening of choline methyl signal. Lidocaine(0.8Hz), propitocaine(1.0Hz), bupivacaine(1.6Hz), dibucaine(3.0Hz) and tetracaine(4.2Hz).

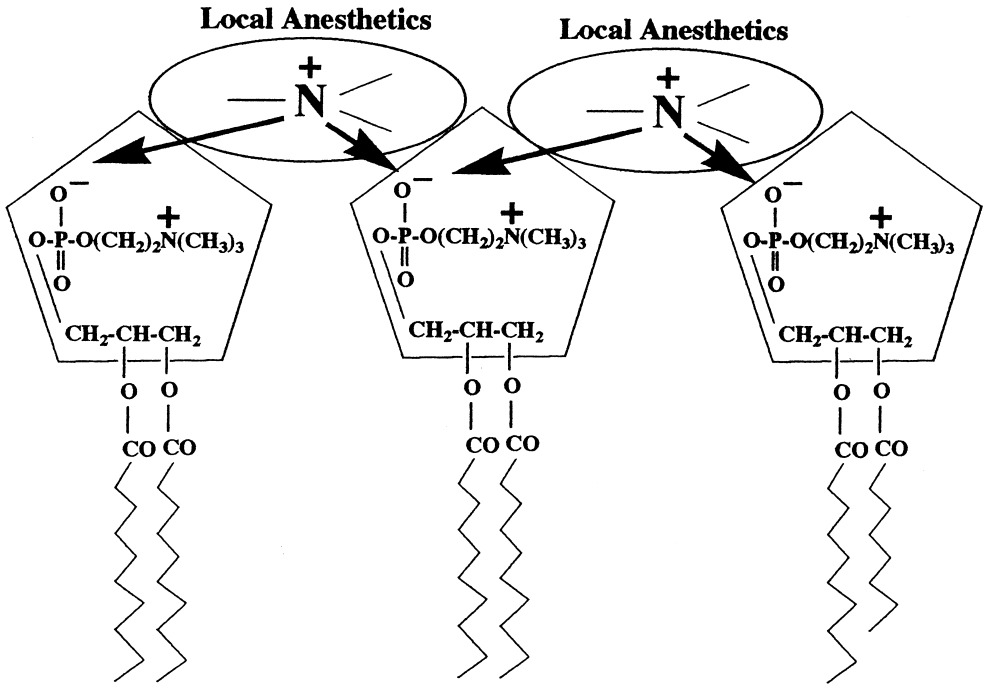


Fig. 3 Electrostatic interaction between positively charged nitrogen atom of local anesthetics and negatively charged hydrogen atom of phospholipid membrane was seen.

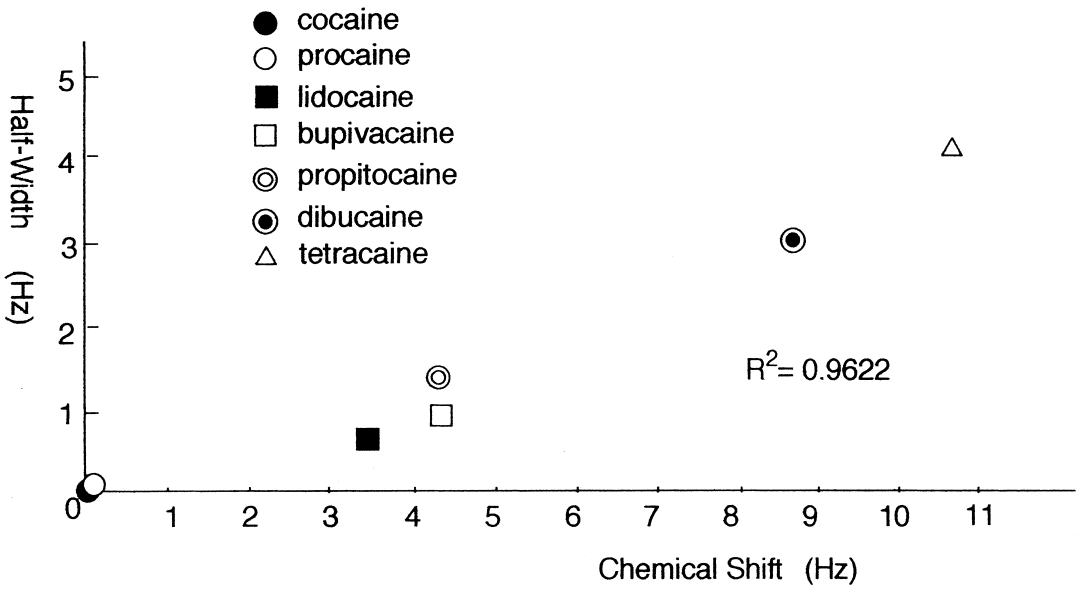


Fig.4 There was a close correlation between chemical shift and half-width (R^2=0.9622).

〔原　著〕

ウサギ頭頂骨に設置したキャップ内の骨形成に対するPlatelet-rich Plasma影響

川田　丈司，廣瀬由紀人，越智　守生，賀来　　亨*，矢嶋　俊彦**

北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座
*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座
**北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

Effects of Platelet-rich Plasma on Bone Formation in a Cap placed on Rabbit Parietal Bone

Joji KAWADA, Yukiko HIROSE, Morio OCHI
Tohru KAKU*, Toshihiko YAJIMA**

Depatment of Fixed Prosthodontics
*Depatment of Oral Pathology
**First Department of Oral Anatomy
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The aim of this study was to carry out a comparative assessment of the osteogenesis-promoting effects of platelet-rich plasma (PRP) in combination with different kinds of carrier compounds. An enclosed space was created by setting a cap on the rabbit parietal bone to study osteogenesis using the guided bone regeneration (GBR) method. The space was filled with PRP along with a bone-compensating carrier to induce osteogenesis, and the amount of osteoneogenesis in the cap was measured.

First, various methods for collecting PRP were assessed.Then a pair of polypropylene caps were attached to the surface of the parietal bone of each rabbit. One of these caps was filled with one of the following carriers : Collagen, β-TCP, thrombin･β-TCP complex, or sodium alginate (control group) ; the other cap was filled with the same carrier soaked with PRP (experimental group). After8weeks, undecalcified samples were sectioned and used for histological observations and measurements of the amount of osteoneogenesis. In addition, longitudinal observations of osteogenesis guided by the β-TCP･PRP complex were carried out.

The most suitable method for collecting PRP was found to be a double spin method (2400rpm for10min followed by 3600 rpm for 15 min), yielding a platelet concentration factor of 13.5. The amount of osteoneogenesis in the cap was higher in the experimental PRP (+) group than in the control PRP (－) group

受付：平成16年４月７日

with any of the carriers tested. The amount of osteogenesis was greater in the β-TCP・ PRP complex pair than in any of the other carrier pairs. In the longitudinal study of osteogenesis using the β-TCP･PRP complex, PRP was found to increase osteogenesis relatively early in the experiment.

This experimental study supports the osteogenesis-promoting effects of the β-TCP･PRP complex without the combined use of thrombin, this suggests that the β-TCP･PRP complex alone will promote osteogenesis when used in clinical treatment. In addition, this method which uses no animal-derived thrombin, could have additional benefits in a clinical setting, preventing infection by unknown viruses or the side effects of abnormal blood coagulation.

Key words： PRP, Rubbit, Bone formation, β-TCP, GBR

緒　言

近年，歯科領域における顎骨補綴治療やインプラント治療において，骨形成能を最大限に賦活させるためには，間葉系細胞を骨芽細胞に分化，増殖させる成長因子とその組織環境が重要であることが明らかにされてきている[1]．また，一般に臨床で求められている骨再生法は，術者の技術に影響されない（確実性，操作性と管理性が高い），安全性に優れている（非感染性で外科的侵襲や術後疼痛が少ない）手技，さらに実用性が高いシステムである．

わが国における自己血由来のPlatelet-rich plasma（PRP）の応用は，1990年代より皮膚科や整形外科領域で始まり，PRPは軟組織の創傷治癒に関する成長因子として注目されてきた[2,3]．一方，歯科領域においても，1998年にMarxら[1]による口腔・顎顔面外科領域における報告をはじめとして，PRPに関する臨床報告[4~14]は増加傾向にあり，PRPの高い実用性の確立が期待されている．しかし，PRPの骨再生作用と機能については未解明な部分も多く，研究方法や評価方法も不適切なものがあり，その有効性についても十分に明らかにされていない[15,16]．

PRPは骨再生[17~21]の４大要素の足場[22,23]，細胞[18]，刺激[24~26]，成長因子[27~29]のうち，成長因子（TGF-β, PDGF, IGFなど）を含み，同時に足場の働きも有するため（図１），骨の創傷治癒促進にその有効性が示唆されている[3]．しかし，PRPの骨形成能を定量的に評価した報告はない．

図１　骨再生の４大要素

そこで本研究では，ウサギ頭頂骨にキャップによる人工的な空間を作り，PRPが骨形成に及ぼす影響を新生骨量および組織像から比較検討した．同時にPRPの担体（コラーゲン，トロンビン・β－TCP複合体，アルギン酸ナトリウム，β－TCP）の影響も比較検討した．

材料および方法

１．PRPの採取法の検討

１）実験動物

実験には，体重約2.5kgの日本白色ウサギ（ホクドー，札幌）20羽を用いた．ウサギは北海道医療大学動物実験センターにて検疫飼育

後，異常を認めなかったものを実験に使用した．実験は「北海道医療大学動物実験の指針」に従い行った．

2）採血法および遠心法

ウサギの後耳介静脈から採血針（インサイトN®翼なし24G14mm, Becton Dickinson, Salt Lake City, UT, U.S.A.）と真空採血管（ベノジェクトⅡ®クエン酸ナトリウム3.8%含，テルモ，東京）を用いて5 ml採血をした後，遠心分離を行った．遠心分離器はLabofuge300®（Heraeus, Germany）を使用した．

遠心法はシングルスピン法にて1200，2400，3600rpmで10分間回転を行った．さらに，1200，2400rpmにおいては，ダブルスピン法にて2回目の遠心回転を1200,2400,3600 rpmとし15分間回転し，それぞれの血小板濃縮率を求めた．なお，予備実験の結果より本実験では，PRPの濃縮率を高めるために，採取方法を改良して行った（図2）．

2．血小板の活性化の検討

1）血小板の活性化

血小板をトロンビン（0.5万単位，トロンビンモチダ®，持田製薬，東京）1/10希釈にて3分間活性化させたものを血小板の形態におけるコントロールとした．血液を採取し，2% paraformaldehyde-2% glutaraldehyde で前固定後，1%OSO_4にて後固定した．固定終了後，通法に従い，アルコール系列で脱水，Epon-812樹脂にて包埋した．試料は，ガラスナイフにより，1 μmの切片を作製し，トルイジンブルー染色を行い，光学顕微鏡により観察を行った．超薄切片は，酢酸ウラン，およびクエン酸鉛にて染色を施した後，透過型電子顕微鏡[30]（TEM：JEM100CX®，日本電子）により観察と撮影を行った．

同様に，走査型電子顕微鏡[31,32]（SEM：X－650®，日立）にて観察と撮影を行った．

3．担体の差異によるPRPの骨形成の比較実験

1）実験動物

動物は体重約2.5kgの日本白色ウサギ12羽を用いた．前投薬にジアゼパム（ホリゾン®，山之内製薬，東京）2 mg/kgの筋注と硫酸アトロピン（硫酸アトロピン注射液タナベ®，田辺製薬，大阪）0.05mg/kgの皮下注を行った後に，ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル®，共立製薬，東京）25mg/kgの後耳介静脈投与による全身麻酔下で実験を行った．

2）術式

頭頂部の剃毛後，塩酸リドカイン（キシレステシンA®，3Mエスペ，東京）にて浸潤麻酔を行い，皮膚，骨膜を剥離して，頭頂骨の骨表面を露出させ，電気エンジン（インプランターⅡ®，京セラ，京都）を注水下で，低速回転にして（800rpm/min）トレフィンバーを用いて，直径5 mm，深さ1.5mmの溝を左右に2つ形成した．ラウンドバー＃2を用いて，溝の内側に9つのドリルホールを設置後，直径5 mm，高さ8 mmに加工したポリプロピレン製のキャップを被せた．その内部に血小板活性化作用があるアテロコラーゲン（テルダーミス®，テルモ，東京），骨伝導性を有する多孔質β－TCP（オリンパス，東京），局所止血剤で血小板のα顆粒分泌効果を有するトロンビン[33,34]（ティシール®，バクスター，東京）･β-TCP複合体，非動物性でトロンビンと同じ性質を持つアルギン酸ナトリウム[35]（アルト®，カイゲン，大阪）の担体を生理食塩水とともに充填した（対照群）．また，PRPは採取法の検討で濃縮率の良かった条件のものを用いた．それぞれの担体・PRP複合体の群を充填した（実験群）．充填後，外科用接着材（アロンアルファA三共®，三共，東京）にて骨面に固定し，骨膜，皮膚を

縫合した（図３）．

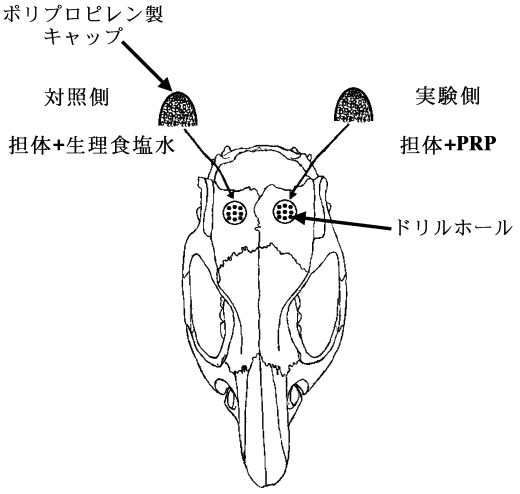


図３　ウサギ頭頂骨における担体埋入法

３）組織固定

実験期間は８週とし，屠殺後に10％ホルマリン溶液による灌流固定を行った．頭頂骨を摘出し，10％ホルマリンにて浸漬固定，脱水後，通法に従い，polyester resin（Rigolac®，応研商事，東京）にて包埋し，薄切機（BS3000®，Exakt, Germany）にてキャップ正中面で試料を薄切後，機械研磨機（MG4000®，Exakt, Germany）で非脱灰研磨標本を作製した．

４）骨形成量の評価法

塩基性フクシン・メチレンブルー重染色による組織観察と骨形成量を画像解析ソフト（NIH Image®1.62,National Institutes of Health,Bethesda, MD, U.S.A.）を用いた．統計処理には，計測により得られた値から各実験群の平均値を算出し，一元配置分散分析を行いFisherのPLSDによる多重比較検定法を用いた．有意水準は５％とした．

４．PRP･β－TCP複合体群の骨形成過程の分析

予備実験より骨形成量が最大であったPRP・β－TCP複合体群については，４，８，12，16週の長期経過観察を行った．

結　果

１．PRPの採取法の検討

１）シングルスピン法による血小板濃縮率

全血に対する血小板の濃縮率（平均値）では，シングルスピン法の平均濃縮率は，1200rpmで10分遠心回転時，1.9倍，2400rpmで10分時，1.8倍，そして3600rpmで10分時，1.4倍であった（表１）．

表１　シングルスピン法によるPRP濃縮率

回転数	時間 分	遠心効果 $\times 10^4$G.sec	濃縮率
1200	**10**	**13**	**1.9±0.29**
2400	**10**	**54**	**1.8 ±0.23**
3600	**10**	**121**	**1.4±0.29**

平均±標準偏差

1200と2400rpmの遠心分離で同程度の血小板濃縮率が得られた．しかし，1200rpmにおいて，血球成分と血漿成分を明確に分画することができないため，血球成分が多量に混じる結果となった．一方で，2400rpm以上であると，明確に分離でき，また，2400と3600rpmとを比較すると，3600rpmの濃縮率が，低い結果となった．以上より，ファストスピンの最適な回転数は，2400rpmであった．

２）ダブルスピン法による血小板濃縮率

ダブルスピン法によるテクニカルエラーとして，血液や分離した血漿を採取時に必要以上に強い力で吸引すると，血小板がその機械的刺激により活性化を起こした．吸引刺激により血小板の脱顆粒が起こり，血小板内に含まれる成長因子が細胞外に放出され，血液凝固を起こりやすくした．

ダブルスピン法では，シングルスピン法で，

良結果を得た1200，2400rpmをファストスピンに設定し，セカンドスピンを1200，2400，3600rpmにて行った．その結果，2400rpmで10分遠心回転した後，2400rpmで15分遠心回転時の条件と，2400rpmで10分遠心回転した後，3600rpmで15分遠心回転時の条件で高濃縮され，血小板濃縮率は13.5倍となった（表２）．ダブルスピン法でもファストスピンを1200rpmで行うと，血球と血漿の分離が完全でないため，血小板の濃縮において差異が生じて，不適切であった．

表２　ダブルスピン法によるPRP濃縮率

１回目　時間10分		２回目　時間15分		
回転数	遠心効果 $\times 10^4$G.sec	回転数	遠心効果 $\times 10^4$G.sec	濃縮率
1200	**13**	**1200**	**20**	**5.5±3.1**
1200	**13**	**2400**	**81**	**6.8±6.7**
1200	**13**	**3600**	**183**	**5.3±5.3**
2400	**54**	**1200**	**20**	**10.7±2.6**
2400	**54**	**2400**	**81**	**13.5±4.9**
2400	**54**	**3600**	**183**	**13.5±4.8**

平均±標準偏差

２．血小板の活性化の検討

１）TEM像

血小板の活性化の状態をTEMで観察した（図４a, b, c）．活性化の初期では，血小板中に含まれているα顆粒は血小板全体に散在しており，偽足形成を始めていた（図４a）．中期では，α顆粒は血小板の中央部に集まり，多数の偽足を出していた（図４b）．活性化の後期では，血小板の内部からα顆粒は消失していた．血小板からさらに多数の偽足が伸長し，星状を呈していた（図４c）．

２）SEM像

血小板のSEM像では，それぞれの遠心回転条件における血小板の活性化を示す偽足が観察された．回転数が高くなるに従い，血小板の形態も楕円形から，長く太い偽足を多数伸ばしている星状の形態へ変化していた（図５）．

ダブルスピン法における１回目：2400rpm×10分，２回目：3600rpm×15分のSEM像は，トロンビンに反応させたSEM像と類似した形態であった（図５a,c）．１回目：2400rpm×10

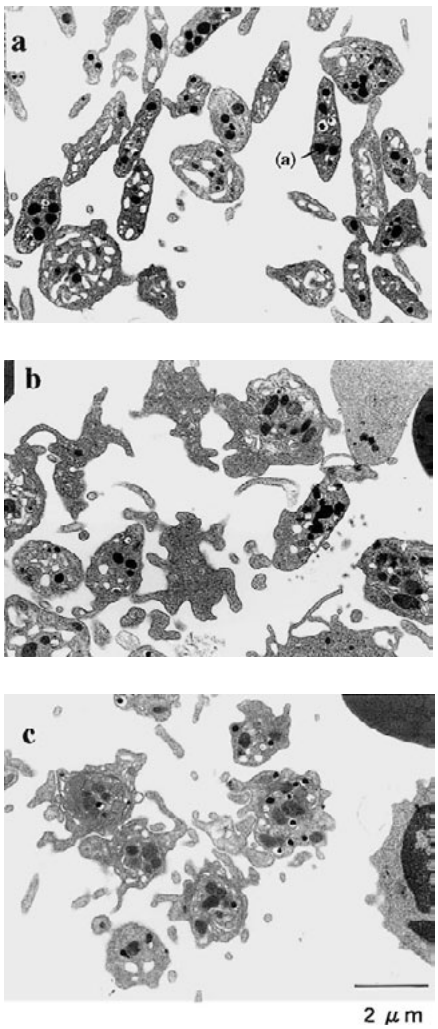


図４　血小板の活性化（TEM像）
a：初期
α顆粒（a）は血小板全体に散在し，形態的には偽足を出し始めている．
b：中期
α顆粒は血小板の中央に集まり，偽足の数も増えている．
c：後期
α顆粒は血小板から放出されかなり消失している．偽足が伸長し，星状を呈している．

分，２回目：3600rpm×15分とトロンビンを併用したものは，トロンビンを併用しないものと比べると，さらに活性化作用が進み，フィブリン網を形成していた（図５c,d）．

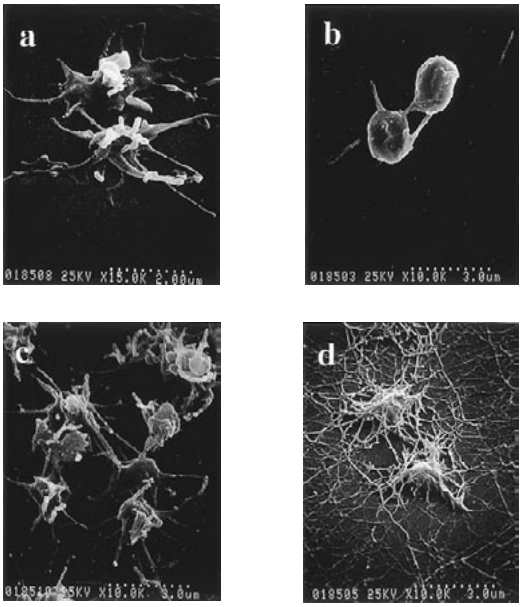


図５　血小板の活性化（SEM）
ａ：コントロール
　全血にトロンビンを添加したもの
ｂ：１回目：2400回転×10分，２回目：1200回転×15分
　楕円形の形態から偽足を出し始めている
ｃ：１回目：2400回転×10分，２回目：3600回転×15分
　太い偽足が多数伸長して星状を呈している
ｄ：１回目：2400回転×10分，２回目：3600回転×15分
　＋トロンビンフィブリン網を形成している

３．担体の差異によるPRPの骨形成の比較実験

実験部位において，キャップ埋入周囲の腫脹や，膿瘍の形成，キャップ自体の露出は認められなかった．また，キャップの摘出時において，ポリプロピレン製のキャップは頭頂骨上に固定されていた．

PRPの採取法の実験結果より，ダブルスピン法の１回目：2400rpm×10分，２回目：3600rpm×15分で採取したPRPを骨形成実験に用いた．

１）コラーゲン群

コラーゲン群では，PRP（＋）がPRP（－）に比べて，キャップ内の広い範囲にわたって骨の形成が認められ，骨の形成量も多く認められた．PRP（＋），PRP（－）ともに，既存骨と類似する染色の新生骨組織が認められ，新生骨組織は既存骨と連続していた（図６a,b）．

２）β－TCP群

β－TCP群において，PRP（＋）では，既存骨と類似する染色の新生骨組織が，β－TCPの粒子の周囲に観察された．キャップ内の基底部である頭頂骨の近位部位では，遠位部位と比べて，広範囲でのβ－TCP吸収像が観察された．PRP（＋）において，新生骨組織はキャップの先端付近まで，PRP（－）はキャップ中間付近まで観察され，PRP（＋），PRP（－）ともに新生骨組織は既存骨と連続しており，キャップの周縁に沿って，骨の形成が認められた（図６c,d）．

３）トロンビン・β－TCP複合体群およびアルギン酸ナトリウム群

トロンビン・β－TCP複合体群とアルギン酸ナトリウム群では，PRP（＋），PRP（－）ともに，骨形成はほとんど認められなかった（図７a,b,c,d）．

４）新生骨量の画像解析

既存骨と新生骨の境界はキャップ内縁の最下端を結ぶ仮想直線とし，画像処理ソフトNIH Image®に読み込んで計測し，キャップ正中断面積における新生骨量の割合を算出した（図８）．結果は，コラーゲン群のPRP（－）は10.3%，コラーゲン群のPRP（＋）は15.3%であった．β－TCP群のPRP（－）は21.4%，β－TCP群のPRP（＋）は28.5%であった．アルギン酸ナトリウム群，トロンビン・β－TCP複合体群においては，PRP（＋）（－）ともに５%未

満であった．どの担体もPRP(＋)が，PRP(－)より骨の形成量は多い結果となった．担体別では，β－TCPの骨形成量が最も多く，その他の担体と比べて，有意差が認められた（図８）．

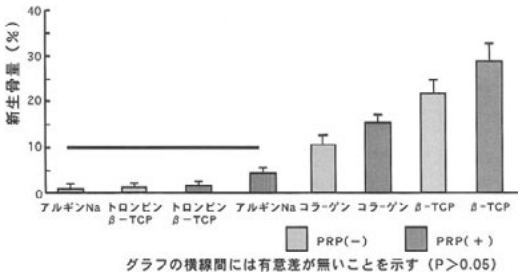


図８ 新生骨形成量（キャップ正中断面における新生骨組織の割合）
担体別ではβ－TCPの骨形成量が最も多く，その他の担体と比べて有意差が認められる．(Fisher's PLSD)

４．PRP・β－TCP複合体群の骨形成過程の分析

骨形成量が最大であった担体β－TCP群埋入後４，８，12，16週の摘出試料を，塩基性フクシン・メチレンブルー重染色後組織観察し，それぞれの骨形成量を画像解析した．

１） ４週の組織像

４週の組織像において，PRP（＋)(－）ともに，新生骨はキャップ中間部付近まで観察された．PRP（＋）は（－）と比べて，新生骨量は多く認められた．また，キャップ内縁に沿って，骨の形成が認められた（図９a,b)．

２）８週の組織像

８週の組織像において，新生骨の多くはβ－TCP顆粒の周囲に認められた．また，頭頂骨表面に近位部位が，遠位部位と比べて，多くのβ－TCPが吸収されていた．PRP（＋）の新生骨はキャップの先端付近まで，PRP（－）の新生骨はキャップの中間部付近まで観察された（図９c,d)．

３）12週の組織像

12週の組織像において，PRP（＋)(－）ともにβ－TCPの吸収が認められた．特に，頭頂骨に近いキャップ基底部位が，先端部と比べて，多くのβ－TCPが吸収されていた．しかし先端部の顆粒径が大きいβ－TCPは，ほとんど吸収されていなかった．また新生骨量では，PRP（＋)(－）の形成量の差は認められなかった（図10a,b)．

４）16週の組織像

16週の組織像において，PRP（＋)(－）の新生骨量の差はほとんど認められなかった．また骨量は12週より減少していた．β－TCPの顆粒吸収量は観察期間で最大であった（図10c,d)．

５）画像解析

正中断面積による４，８，12，16週の新生骨量の変化は，４週において，PRP(－)11.6%，PRP（＋）18.8%であった.8週において，PRP（－）21.4%，PRP（＋）28.5%であった．12週において，PRP（－）16.4%，PRP（＋）17.4%であった．16週において，PRP（－）15.4%，PRP（＋）15.6%であった（図11)．

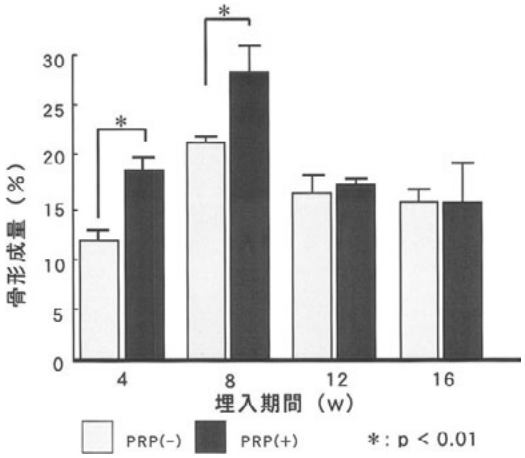


図11 骨形成量の変化(正中断面積による４，８，12，16週の骨形成量)
PRP（－)(＋）ともに８週の時，最大の骨形成量を示している．12週以降，骨量が減少し，16週ではPRP（－）（＋）の差はない.(Fisher's PLSD)

以上結果よりPRP（＋)(－）ともに新生骨の増加率は４週から８週の時が高く，８週時に最大の骨形成量を示していた．また12週以降は，

骨量の減少が認められた．16週では，PRP（＋）（－）ともに骨量がほぼ同じ数値になった．

考　察

1．PRPの分離法について

PRPの分離法には，シングルスピン法とダブルスピン法がある．シングルスピンにおいて，2400rpm以上の回転数を用いれば，血球と血漿を明確に分画することが可能となり，血小板の豊富な部位が明示され，効率的に血小板を採取することができるようになった．特に，Sonnleitnerら[36]の報告にもあるように，血清と血球との境界部分には白血球および血小板が大量に存在し，血球部分では境界から下へ数mmまでの部分に新鮮で幼若な血小板が大量に存在している．この部分を採取することで，通法[8]よりも高濃度のPRPを精製することが可能となった．また，ダブルスピン法においては，セカンドスピンが2400rpm以上で血小板の濃度はほぼ一定になることが示唆された．このことより，血小板濃度を上げるために，血小板自体にダメージを与えるほどの高回転数で，分離する必要はないと考えられた．最適遠心分離法の回転条件は，澤ら[37]によると，2400rpmで７分間遠心回転した後，3000rpmで10分間の遠心回転をするダブルスピン法では，平均濃縮率は4.9倍であった．一般に，遠心分離器の性能の違いにより，回転数と時間だけで，単純に比較することができない．しかし，本実験では，血小板の採取部位の改善と，2400rpmで10分遠心回転したのち，3600rpmにて15分の遠心回転を行う条件より，澤ら[37]の実験の遠心効率（141×10^4 G・sec）よりも大きく（237×10^4G・sec），平均濃縮率も13.5倍となった．従って本法は濃縮するのに大変有用だと思われた．

2．血小板の機能，血小板の活性化と形態の関係について

血小板自体の機能には，１）毛細血管透過性の抑制，２）血小板の粘着と凝集，３）血液凝固の促進，４）血餅の収縮，５）線維素溶解の抑制，６）血管の収縮，７）成長因子の貯蔵がある．２）の作用より，血小板は損傷を受けた血管内皮下に粘着し始める．そして，血小板が偽足を生じ，血小板同士の凝集を招く．そこに，血小板膜のリン脂質から生成されたトロンボキサンA２や動員されたCaイオンが加わると顆粒内容の放出が起こり，血小板脱顆粒の状態になり，成長因子を放出し，軟組織創傷治癒を行うといわれている[2]．また，トロンビンなどの血小板の活性化物質や機械刺激により，血小板に含まれているα顆粒が，収縮タンパク質の作用により，微小管に取り囲まれるように，血小板の中心に集合する．α顆粒が開放小管系の膜に接触後，この膜とα顆粒の膜が融合し，顆粒の内容物（成長因子など）が開放小管系に放出され，さらに，周囲の環境へ拡散する（脱顆粒状態）．その際に活性化された血小板は，偽足を形成しつつ伸展する．本実験でも，SEMおよびTEM像において，それらが観察された．トロンビンによる刺激と，遠心回転の機械刺激による血小板の形態の違いは認められなかったが，遠心回転数の刺激の差による血小板の形態の違いが認められた．したがって，遠心回転数の条件を考慮する必要があると思われた．また，高回転の機械刺激とトロンビンの併用に関しては，血小板の活性化に対して，過剰な刺激になりうるので，トロンビンとの併用には注意が必要であると思われた．

3．血小板の活性化について

SEMにて，遠心回転による血小板の形態の違いを観察した結果，高遠心回転血小板の形態は，全血にトロンビンを暴露させた血小板の形

態とほぼ同様であった．血小板は遠心分離過程の回転数による機械的刺激で活性化状態になることが推察された．血小板は，高濃縮と高遠心回転数により，血小板同士が接触する機会が増えることで，O'BrienとWoodhouseが報告[38]しているように，血小板の接触刺激により，活性化しやすくなると思われる．

β－TCP・PRP複合体は新生骨形成が優れていたのに対し，β－TCP・PRP複合体にトロンビンを混合して血小板を活性化した実験群では，骨形成は見られなかった．トロンビンを使用した場合，さらに，反応が進み，フィブリン網を形成しキャップ内への細胞侵入を妨げるのと，成長因子をごく初期に放出しその制御が働かないため，骨形成には不利に働くと思われた．

トロンビンの単位は，臨床で使用する際に10数秒でゲル状になるトロンビン単位（500単位／ml）を用いた．またトロンビンと同様の性質を持つ植物由来のアルギン酸ナトリウムにおいても，骨形成は認められなかった．アルギン酸ナトリウムは，生体内での分解性が低く，組織内で被包化されやすいため，血液や体液の流れが抑制され，骨形成を遅延させるとの報告[39]がある．担体としてアルギン酸ナトリウムは完全に吸収され，既存骨によって置換されることがないため，臨床応用するには問題があるように思われた．

４．骨形成量の評価方法について

骨形成能を検討するため，ウサギ頭頂骨の平坦な骨面を用い，GBRの原理に基づき，細胞毒性の無い，血小板に対して非活性化材質[40]であり，オートクレーブ滅菌が可能であるポリプロピレン製のキャップを利用した．また確実なスペースメーキングによる遮断効果および封鎖性を図り，内部に新生する骨量の客観的評価が行えるように，容積を0.1ccに規格化した．一定範囲内での新生骨形成状態を正中断面積に求めることで定量的，客観的に評価することが可能となった．

５．PRP・β－TCP複合体について

１）β－TCPについて

現在，骨補填材として自家骨以上に優れた生体材料は，まだ開発されていない．しかし，自家骨は採取にあたり，患者の外科的侵襲や術後の疼痛など問題点がある．一方，代用骨であるβ－TCPは骨形成能に劣るが，分子式$Ca_3(PO_4)_2$のリン酸カルシウム化合物で，水に対する溶解度は，ハイドロキシアパタイトに次いで小さいが[41]，生体内において吸収・置換することができる材料である．またβ－TCPは，骨伝導能を有しており[23]，生体材料として優れている．CaとPを成分とした人工物のβ－TCPは安全性の問題からも優れていると思われる．

今回，コラーゲンと比較して，β－TCPの骨形成量が多かった理由として，血清中のタンパク質を吸着する働きがあるため[41]，担体としてPRPの保持効果が高かった点と，骨形成の際に必要なCaとPが，β－TCPの溶解により，周囲に豊富にあった点が挙げられる[42]．本来，骨が存在しない部位に骨を形成させる過程では，目的とする部位に骨芽細胞前駆細胞および，骨芽細胞を分化，誘導し，同部位での骨芽細胞の活性化が不可欠だと考えられている．高濃度のカルシウムイオンが，骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性や，オステオカルシン産生量を増加させることから，カルシウムイオンが骨芽細胞の分化を促進する[43,44]．織井の報告[45]によると，局所的にカルシウム濃度が上昇するに従い，細胞が活性化され，さらに，石灰化物の形成が促進される．これらのことより，局所の骨形成には，高濃度のカルシウムイオンの存在が重要であると思われる．

粒径については，125μm以下の大きさになる

と異物巨細胞により埋入早期に吸収され，骨形成のための場の確保ができなくなる[46]．また，粒子間隔が小さすぎると新生血管が侵入しにくいだけでなく，骨形成に関与する細胞の侵入も妨げる．逆に，間隔が大きすぎると血餅の保持が難しくなる．これらの理由から，500μm前後が推奨されており[46]，今回，このサイズの粒径を用いた．

2）PRPについて

自己血から作られるPRPには，PDGF，TGF－β1，TGF－β2，IGF，EGF，ECGFなどの様々な成長因子が含まれている．その中のPDGFは，血管形成，細胞増殖などにより，創傷治癒に多くの有用性がみられ，血管新生やコラーゲン合成により骨再生が促進される．TGF－β1，TGF－β2は，骨芽細胞前駆細胞の走化性，有糸分裂を高め，骨形成を促進させ，また，破骨細胞の形成や骨の吸収を抑えることで骨形成を助長している[3]．また，IGFは骨芽細胞の分裂，増殖を促進させ，骨形成時に骨添加を促進させる[4]．これらの成長因子は他の成長因子とともに作用し，その結果として様々な経路で異なったシグナル伝達を行い，最終的には遺伝子発現を活性化してタンパク産生を行うようになる．そして，血漿中に含まれるフィブロネクチン，ビトロネクチンおよびフィブリンもまた，細胞の分化，走化性に作用している．PRPの特徴は，１つの再生系路しかない合成された増殖因子の作用と異なっていることである[16]．

今回，β－TCP・PRP複合体の骨形成量が一番多いという結果が得られたのは，これらβ－TCPとPRPの利点によるものと考えられる．

3）新生骨形成量について

β－TCP・PRP複合体は，４週において18.8％の骨形成がみられ，β－TCP単体のものが，11.6％であったのと比べると，（62％増）骨量が多かった．16週では，β－TCP・PRP複合体とβ－TCP単体の骨形成量の差がなくなったことから，PRPの骨形成効果は初期にあらわれることが分かった．このことは，PRPに含まれる成長因子の働く時期とも一致する[1]．また，16週においてキャップ内の骨が吸収しているのは，新生骨が頭頂骨の外側に過剰に形成されたものであるため機能しておらず，それが原因で吸収されたと思われる．

結　論

PRPの骨形成を目的として，体重約2.5kgのウサギから採血をして，血小板の高濃縮について検討した．SEMにて血小板の活性化の様子を観察後，ウサギ頭頂骨にGBRの原理によるキャップの骨形成実験モデルを作製した．キャップ内に担体であるアテロコラーゲン，β－TCP，アルギン酸ナトリウム，トロンビン・β－TCP複合体を埋入した対照群と，これらの担体とPRPとの複合体を埋入した実験群間において，キャップ内の骨形成量を比較検討した．その後，骨形成が良好であったPRP・β－TCP群の骨形成過程を観察し，次の結果を得た．

１．動物由来のトロンビンを使用しない本方法は，未知のウィルスの感染や，血液凝固異常を予防することができるため有用であると思われた．

２．ダブルスピン法にトロンビンを併用すると，血小板の活性化がさらに進み，フィブリン網を形成して凝固し，細胞などの侵入を妨げ，骨形成には不利に働くと推測された．

３．コラーゲン，β－TCP，トロンビン・β－TCP複合体，アルギン酸ナトリウムを担体として用いた場合，PRP（＋）群は，PRP（－）群と比べて，キャップ内部の骨形成量は多かった．

4．PRP・β－TCP複合体が，新生骨量が一番多かったのは，β－TCPが他の担体よりCaやPの供給が多いため，速やかに骨形成が行われていたためと推測された．

5．PRP・β－TCP複合体による骨形成は実験初期に顕著に認められたので，PRPの骨形成効果は初期にあらわれると推測された．

以上より，PRPの骨形成促進効果が動物実験で確認されたことより，臨床においても，生体材料とPRPのみで骨形成が促進されることが示唆された．また，歯科領域のインプラント治療などの小手術においてGBRの応用とPRP・β－TCP複合体を使用した場合，PRPは骨成長因子を含んでおり，骨形成に有効であると考えられた．PRPは骨形成の場を確保する生体材料として優れていることが示唆され，治療期間の短縮化と従来の移植材料の問題点を解決する可能性があると考えられる．

謝　辞

稿を終えるに臨み，終始ご懇篤なる御指導と御高閲を賜りました，北海道医療大学名誉教授坂口邦彦先生に深謝致します．さらに，終始暖かい御支援と御協力を頂きました本学歯学部歯科補綴学第二講座，口腔病理学講座，口腔解剖学第一講座の諸先生，歯学部ハイテクリサーチセンター電子顕微鏡機器室　伊藤亜男氏および動物実験センターの皆様に心から御礼申し上げます．

本論文の一部は，東日本歯学会第20回学術大会（2002年２月，札幌），日本補綴歯科学会東北・北海道支部学会（2002年８月，札幌），東日本歯学会第21回学術大会（2003年２月，札幌），第109回日本補綴歯科学会（2003年５月，東京），および第33回日本口腔インプラント学会（2003年７月，名古屋）において発表した．

また，本研究の一部は平成14,15年度日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究C（２），課題番号14571855）により行った．

文　献

1．Marx ER, Carlson RE, Eichstaedt MR, Schimmele RS, Strauss EJ, Georgeff RK : Platelet-rich plasma : growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **85** : 638－646, 1998.

2．Pierce GF, Tarplen JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A : Platelet-derived growth factor(BB homodimer), transforming growth factor－β1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing.Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* **140** : 1375－1388, 1992.

3．Philippart P,Brasseur M,Hoyaux D,Pochet R : Human recombinant tissue factor,platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft : a5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Impl* **18** : 411－416, 2003.

4．Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox C H, Williams RC : Effects of the platelet-derived growth factor/insulin like growth factor-Ⅰ combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* **62** : 710－716, 1991.

5．Whitman DH, Berry RL, Green DM : Platelet gel : an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* **55** : 1294－1299,1997.

6．Anitua E FPlasma rich in growth factors : preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Impl* **14** : 529－535,1999.

7．澤　裕一郎，川野　大，福井克仁，他：自己血からの多血小板血漿（PRP：Platelet rich plasma）を用いた上顎前歯部自家骨移植の１例－インプラント治療における骨移植への有用性－．日口外誌　46：372－374，2000.

8．澤　裕一郎，望月　誠：PRPによる自家骨移植についての臨床的検討－インプラント治療における骨移植への有用性－．日口腔インプラント誌　14：279－286，2001.

9．Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB : Comparison of platelet-rich plasma, bovine

porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects : a reentry study. *J Periodontol* **73** : 198－205, 2002.

10. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA : Mandibular reconstruction : a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **31** : 281－286, 2002.
11. Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S,Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P : Sinus floor augmentation with β-tricalcium phosphate (β－TCP) : does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation ? *Clin Oral Impl Res* **14** : 213－218, 2003.
12. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G : Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implant : a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Impl* **18** : 15－22, 2003.
13. 竹腰利英：インプラント周囲骨欠損に対する多血小板血漿の骨再生促進効果に関する実験的研究，広大歯誌　35：33－48，2003.
14. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH : Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33** : 56－59, 2004.
15. Landesberg R, Moses M, Karpatkin M : Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* **56** : 1116－1117, 1998.
16. Sánchez RA, Sheridan JP, Kupp IL : Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Impl* **18** : 93－103, 2003.
17. 田畑泰彦：ティッシュエンジニアリング－組織再生誘導のための基盤技術開発－．最新医学　58：49－56，2003.
18. Yamada Y,Boo JS,Ozawa R,Nagasaka T,Okazaki Y, Hata K, Ueda M：Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cell and fibrin glue with a biodegradable scaffold. JCraniomaxillofac Surg 31 : 27－33,2003.
19. 筏　義人：再生医工学の過去・現状・未来．遺伝（別冊）13：122－129，2001.
20. Langer R,Vacanti JP：Tissue engineering.Science 260：920－926，1993.
21. 井上一知：Ⅱ．Tissue engineering　2．再生医療への展望．日外誌102：282－287,2001.
22. 西山令生，杉山利子，平井義人：組織再生誘導法におけるα－TCP顆粒添加コーゲンスポンジの有用性．日歯保存誌　45：565－575，2002.
23. 夫才成，日比野祥敬，山田陽一，新美　敦，本田雅規，岡崎恭宏，畠　健一郎，吉川隆章，上田実：生体吸収性セラミックスβ－TCPを足場に用いた培養人工骨に関する実験的研究．日口外誌　47：1－7，2001.
24. 井上四郎：CCEF法による電気刺激法．MB Orthop 6：89－98，1993.
25. 松本弘幸，坂口邦彦，越智守生：パルス電場刺激の家兎大腿骨インプラント埋入モデルへの応用．第1報　磁場強度，1日あたりの刺激時間の影響．補綴誌　40：1171－1182，1996.
26. 加々見寛行，越智守生，広瀬由紀人，坂口邦彦，賀来　亨：容量結合型電場刺激（CCEF）法の口腔インプラントへの応用－家兎インプラント埋入モデルにおける骨形成促進効果の研究－．日口インプラント誌　13：38－46，2000.
27. 川上敏行：骨形成因子（BMP）と骨形成．松本歯学　25：101－112，1999.
28. 久保木芳徳，滝田裕子，小野一郎：骨形成蛋白質（BMP）を応用した骨の組織工学の原理．臨外　56：61－74，2001.
29. 國安宏哉，広瀬由紀人，賀来　亨，金子昌幸，田隈泰信：Growth differentiation factor－5／β－TCP複合体によるビーグル犬前頭洞内骨形成に関する実験的研究．東日本歯誌　21：11－23，2002.
30. 寺尾　清：初学者のための透過電顕像の読み方．南江堂，東京，1985．116－117.
31. 板倉　宰：血液凝固・線溶の基礎と走査電顕アトラス．メジカルビュー社，東京，1982．144－153.
32. 松本英彬，小原明子，林正好，岡田徳弘：ADP凝集による血小板粒度分布と走査電子顕微鏡を用いた血小板形態の検討．Sysmex J　5：12－17，1982.
33. 菊池白，沖野由美，児野喜穂：止血性接着剤・FKS－Zの臨床－出血性疾患における顎・口腔領域への応用－．口科誌　34：166－181，1985.
34. 久保四郎，山本悦秀，橘　直哉，小田島哲世，小浜源郁，黒川一郎：フィブリン接着剤（Tisseel®）の口腔外科領域への応用に関する基礎的ならびに臨床的検討，第1報：フィブリン接着剤のラット背部皮膚切創に対する創傷治癒効果．日口外誌　28：1577－1583，1982.
35. 澤　裕一郎，徳永有紀：アルギン酸ナトリウムで処理したPRPを用いた自家骨移植について　－トロンビンの代用としてのアルギン酸ナトリウムの可能性－．QE　21：1285－1290，2002.

36．Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan YD：A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques : a technical note. *Int J Oral Maxillofac Impl* **15** : 879－882, 2000.

37．澤　裕一郎，渡邊悟朗，原禎幸，丸山誠二，桜田聡彦，溝越俊二：少量の自己血からのPRP作製法に関する検討－８mlの自己血からの１mlのPRP作製法－．日口インプラント誌　15：59－65，2002.

38．O'Brien JR, Woodhouse MA : Platelets：their size, shape and stickiness in vitro : degranulation and propinquity. *Exp Biol Med* **3** : 90－102, 1968.

39．昆隆一，荒木吉馬：α型リン酸三カルシウム－キトサン系骨補填材の骨伝導性－アルギン酸塩被膜による窩洞封鎖効果－．歯材器　19：478－483，2000.

40．山根　進，小田　亮，樋口勝規，下御領良二，田中　悟，松江正芳，上野　　徹，中根高信：多血小板血漿（PRP）の精製法についての検討，日口インプラント誌　16：77－83，2003.

41．青木秀希：驚異の生体物質アパタイト．医歯薬出版，東京，1999．１－17，87－122，

42．Khalid AAR：Bone graft substitutes：a comparative histologic review of osteoconductive grafting materials. *Int Oral Maxillofac Impl* **16** : 105－114, 2001.

43．Ozawa S, Kasugai S：Evaluation of implant materials (hydroxyapatite,glass-ceramics, titanium)in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials* **17** : 23－29, 1996

44．Matsuoka H, Akiyama H, Okada Y, : In vitro analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatite-and wollastonite-containing glass-ceramic : Released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ROS17/2.8 cells., *J Biomed Mater Res* **47** : 176－188, 1999.

45．織井弘道：骨芽細胞様細胞の細胞増殖，石灰化物形成および細胞外マトリックス成分の発現におよぼすカルシウムイオンの影響．日大歯学　73：558－566，1999.

46．山本浩正：骨移植材のお話．－骨のバイオロジー－PARTⅣ－．QE19：161－171，2000.

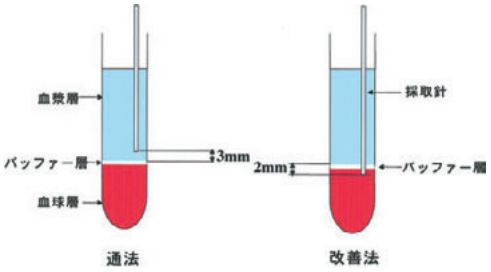


図2　ダブルスピン法におけるファストスピン後の血小板採取部位

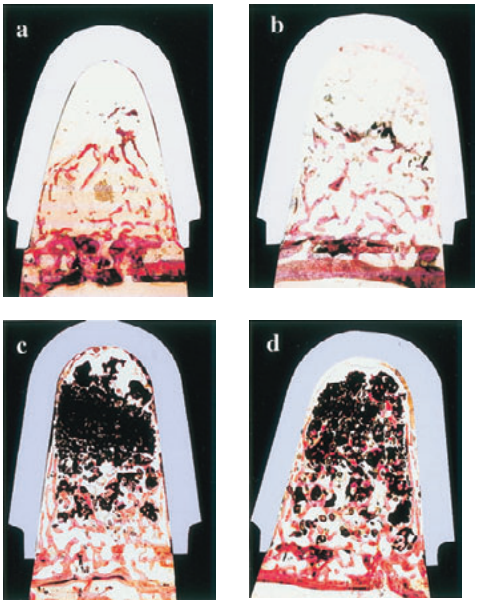


図6　コラーゲン群およびβ－TCP群の骨形成像．８週の組織像
a：コラーゲン・PRP（－）(×20)
b：コラーゲン・PRP（＋）(×20)
c：β－TCP・PRP（－）(×20)
d：β－TCP・PRP（＋）(×20)
a，bともにキャップ内に，新生骨の形成が認められる．
bはaと比べて，キャップ内の広範囲に骨の形成が認められる．
cはキャップの中間付近まで，新生骨が観察される．
dはキャップ先端付近まで，新生骨が観察される．

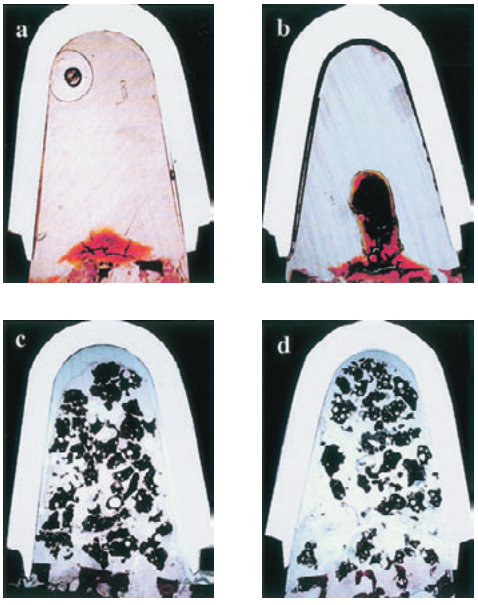


図7　アルギン酸ナトリウム群およびトロンビン・β－TCP複合体群の骨形成像．８週の組織像
a：アルギン酸ナトリウム・PRP（－）(×20)
b：アルギン酸ナトリウム・PRP（＋）(×20)
c：トロンビン・PRP（－）(×20)
d：トロンビン・PRP（＋）(×20)
a，b，c，dともに骨形成はほとんど見られない．

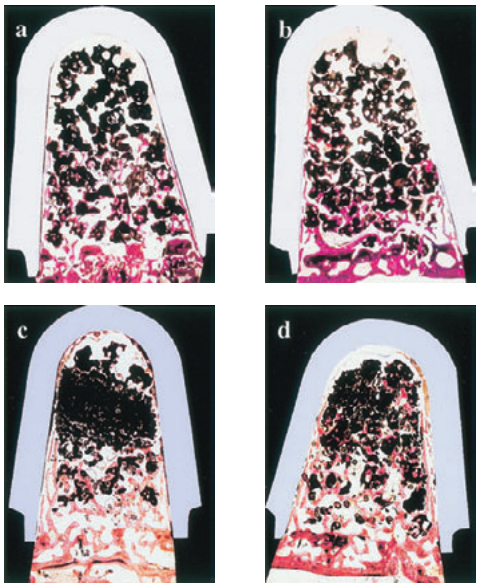


図 9　β－TCP群の骨形成像．４，８週の組織像
ａ：β－TCP・PRP（－）４週（×20）
ｂ：β－TCP・PRP（＋）４週（×20）
ｃ：β－TCP・PRP（－）８週（×20）
ｄ：β－TCP・PRP（＋）８週（×20）
a,bともに新生骨はキャップ中間部付近までに観察される．またキャップ内縁に沿って,骨の形成が認められる．ｃ，ｄともβ－TCPの顆粒の周囲に骨形成が認められる．頭頂骨表面に近位部位が，遠位部位と比べて多くのβ－TCPが吸収されている．

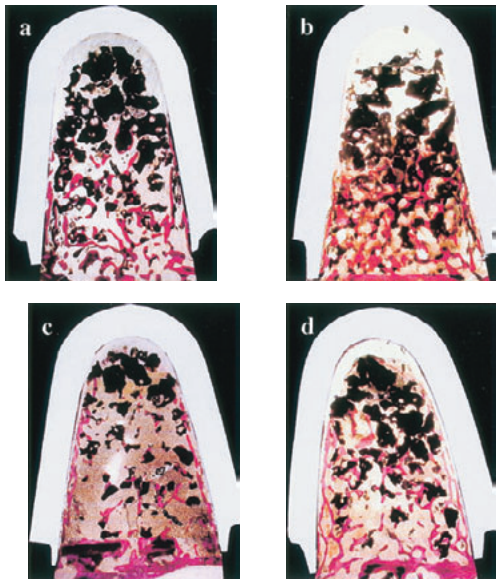


図10　β－TCP群の骨形成像.12,16週の組織像
ａ：β－TCP・PRP（－）12週（×20）
ｂ：β－TCP・PRP（＋）12週（×20）
ｃ：β－TCP・PRP（－）16週（×20）
ｄ：β－TCP・PRP（＋）16週（×20）
ａ，ｂ，ｃ，ｄともにキャップ基底部に近位部位のβ－TCPの吸収像が認められる．
新生骨量は，８週と比べると12,16週とも減少している．

〔原　著〕

実験的歯の移動に伴うラットセメント細胞の形態変化

西山　博雅[1)]，浜谷　明里[1)]，矢嶋　俊彦[2)]，坂倉　康則[2)]，溝口　到[1)]

[1)]北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座
[2)]北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

Morphological changes of cementocytes in cellular cementum during experimental tooth movement

Hiromasa NISHIYAMA[1)], Meiri HAMAYA[1)], Toshihiko YAJIMA[2)], Yasunori SAKAKURA[2)], Itaru MIZOGUCHI[1)]

[1)]Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
[2)]Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

This study examined morphological changes in cementocytes of the cellular cementum on the pressure side during experimental tooth movement, using hematoxylin and eosin-stained sections, an immunohistochemical method with antibody for single stranded-DNA, and confocal laser scanning microscopy (CLSM). The upper first molars of 8-week-old Wistar rats were forced to move buccally by nickel-titanium wire.

The following results were obtained:

1. Nuclear condensation and fragmentation appeared in several cementocytes adjacent to the hyalinized PDL. These cells showed a positive reaction to the antibody for single stranded DNA.
2. The number of cementocytes with apoptosis progressively increased up to 2 days.
3. At 4 days, the number of cementocytes, which were positive for the single stranded-DNA antibody had decreased, and the number of empty lacunae increased.

These results demonstrate that cementocytes in the cellular cementum adjacent to the hyalinized PDL underwent cell death via apoptosis.

Key words：cementocyte, cellular cementum, apoptosis, tooth movement.

受付：平成16年４月１日

Ⅰ　緒　言

歯に矯正力を加えると，歯根膜には圧迫力，および牽引力負荷部位が生じる．圧迫側においては，歯根膜の圧迫による血流の阻害，および硝子様変性部位の出現，マクロファージ系の細胞による変性組織の吸収，そして破骨細胞による歯槽骨の吸収（穿下性吸収）がおこる．一方，牽引側では，歯根膜が牽引されることにより血流が活性化され，骨芽細胞，線維芽細胞が増殖し骨形成が行われる．このように，矯正学的歯の移動は，外力に対する歯周組織の一連の反応と位置づけることができる．

矯正力による歯の移動に伴う歯周組織の変化については，従来より数多くの報告がある．1904年Sandstedt[1]は，イヌを用いた実験的観察から，圧迫側歯根膜に均質無構造の硝子様変性組織が出現し，それに隣接する歯槽骨に穿下性骨吸収が行われることを初めて報告した．その後，Schwarz[2]，Oppenheim[3]，WaldoとRothblatt[4]，Macapanpanら[5]，Reitan[6-8]，ReitanとKvam[9]，Rygh[10]により硝子様変性組織付近では，骨の吸収および添加と同時に歯根表面の吸収がみられると報告された．しかし，従来の歯の移動に伴う歯周組織の反応に関する研究では，破骨細胞，骨芽細胞，あるいは線維芽細胞などの歯根膜組織を対象にしたものがほとんどであった．

歯は，生理的条件下で常に改造現象が起こっている骨と比較し吸収されにくい．矯正治療はこの両者の吸収に対する抵抗性の差を利用し歯の移動を行っている．しかし，臨床的には歯の矯正移動により歯根の短小化などの歯根吸収[11-15]がしばしば観察される．矯正臨床で認められる歯根吸収の多くは，歯根表層あるいは歯根尖に限局した小さなものであり，最終的にはセメント芽細胞による吸収窩の修復機転が起き[10,16,17]，臨床上大きな問題とはならない．しかし，歯根尖が広範に吸収され歯の著しい動揺をきたし，歯の機能と安定性に大きな影響を及ぼすことが稀にある．このような重度の歯根吸収の原因に関しては，過大な矯正力[10]，治療期間の長期化[13,14,16,18]，歯根形態の異常[15]，歯の外傷の既往，舌や口唇の習癖，全身的な代謝障害，ホルモンバランスの異常などの様々な要因が指摘されているが，その正確な原因に関しては明らかではない．

セメント質は歯根象牙質の表面を覆う石灰化組織であり，歯根膜および歯槽骨とともに歯を支持している．一般にセメント質は無細胞セメント質と有細胞セメント質とに分類され，ヒト，ラットおよびマウス等において，無細胞セメント質は歯頚側歯根に，有細胞セメント質は根尖側歯根に分布している．形態的には有細胞セメント質は，骨小腔および骨細管と同様のセメント小腔およびセメント細管のなかに，セメント細胞およびその突起を入れていることなど多くの点で骨組織に類似する[19-21]が，血管を含まないこと，吸収されにくいことなど，骨組織とは異なる特性を有することが報告されている．しかし，いまだにその本態や矯正力に対する反応性に関しては不明な点が多く，歯を構成する硬組織のなかで最も知見に乏しい組織である．

そこで本研究では，矯正力に対するセメント質の反応を明らかにすることを目的として，圧迫側有細胞セメント質中のセメント細胞の経時的な形態変化について検討を行った．

Ⅱ　材料および方法

1．実験動物

実験動物には，生後８週齢のWistar系雄性ラット74匹を用いた．すべての実験動物は，北海道医療大学動物実験センターにて飼育し，通常のラット用固形飼料（オリエンタル酵母工業，東京）と水を十分に与え，自由摂食させた．な

お，すべての実験動物の取り扱いは，北海道医療大学動物実験の指針に基づいて行った．

２．実験的歯の移動方法

実験的歯の移動は，Igarashiらの方法[22]に準じ，矯正用ニッケルチタンワイヤー（直径0.012 inch，長さ18.5 mm, Rocky Mountain Morita）を用いて初期荷重約60gfで上顎第一臼歯の頬側移動を行った（図１）．

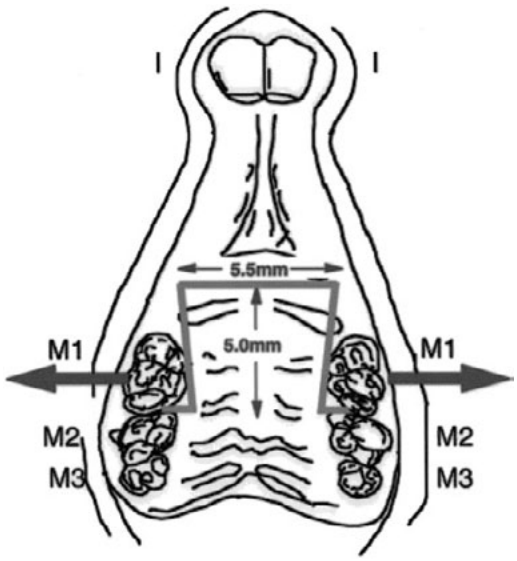


図１ 本研究で用いた歯の移動装置の模式図
⇨：歯の移動方向、I：前歯，
M１：第一臼歯，M２：第二臼歯，M３第三臼歯

３．実験期間

実験群には，装置装着後，3，6，12時間，1，2，4，7日を各８匹，対照群として装置未装着の８週齢および実験群と同様に観察期間を設けた4，7日後のラットを各６匹用いた．

４．試料の作製

各実験期間終了後，実験動物はペントバルビタール（40mg/kg）による麻酔下にて，4％paraformaldehyde（0.1M PB，pH7.4）固定液を用い，上行大動脈より灌流固定を30分行った．その後，上顎骨を摘出し，同固定液を用いて４℃で12時間の浸漬固定を施した．固定終了後４℃で10％EDTA溶液（0.01M PBS,pH7.4）による６週間の脱灰後，通法に従いアルコール系列で脱水し，透徹後，パラフィンに包埋した．臼歯部咬合面に平行に，厚さ５μmの連続横断切片を根分岐部より根尖部まで作製した．切片には，Hematoxylin－Eosin重染色（H－E）を施した．

５．アポトーシスの観察

上記パラフィン切片を用いて，アポトーシスに特有な一本鎖DNA（断片化部位）に対する抗体[23,24]を用いた免疫染色を施し，光学顕微鏡を用いて観察した．

免疫染色は内因性ペルオキシダーゼの除去をIsobe法[25]により５mM過ヨウ素酸水溶液と３mM水素化ホウ素ナトリウムを用いて行い，5％正常ヤギ血清によるブロッキングを行った後，一次抗体は抗ss－DNAウサギポリクローナル抗体（DAKO JAPAN）を反応させ，二次抗体にはHRP抱合ヤギ抗ウサギIg G（BIO SOURCE International）を用いアポトーシスに特有なss－DNAの標識を行った．その後，DAB（武藤化学）により発色し，対比染色はメチルグリーンにて行った．

６．共焦点レーザー顕微鏡によるセメント細胞の観察

各実験期間終了後，実験動物はペントバルビタール（40mg/kg）による麻酔下にて，4％paraformaldehyde（0.1M PB，pH7.4）固定液を用い，上行大動脈より灌流固定を30分行った．その後，上顎骨を摘出し，同固定液を用いて４℃下で12時間の浸漬固定を施した．固定終了後４℃下で10％EDTA溶液（0.01M PBS,pH7.4）による６週間の脱灰後，ショ糖溶液に浸漬後，ドライアイスとアセトンを使用し，OCT compoundに包埋した．試料は，凍結切片作製まで－80℃に保存した．通法に従い，臼歯咬合面に平行な20μmの横断連続凍結切片をクライオスタット（CM1850, LEICA, Germany）にて根分岐部より根尖部まで作製した．薄切後，Alexa

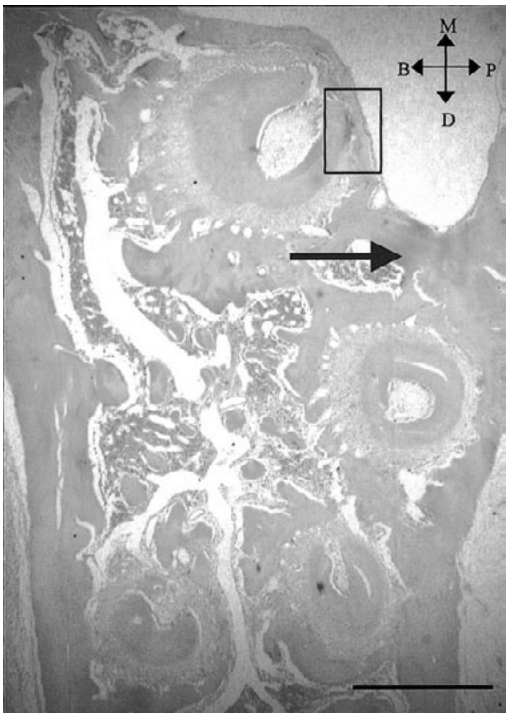


図２　ラット上顎右側第一臼歯部の脱灰横断切片（H－E染色像）
近心根，近心舌側根，近心頬側根，遠心舌側根，遠心頬側根の５根が認められる．
黒枠は，本研究の観察部位である近心根の圧迫側を示す．歯根の移動方向を矢印にて示す．
M：近心，D：遠心，B：頬側，P：口蓋側（bar＝500μm）

488標識phalloidinによるF－actin染色，ならびに４’,６－diamino－２－phenylindole,dihydrochloride（DAPI）による核染色を施し，Perma Fluor（Thermo Shandon,USA）にて封入を行った[19,26]．その後，共焦点レーザー顕微鏡（CLSM）（TCS NT, LEICA）を用い励起波長488 nmおよびUV（347nm）にて観察を行った．

８．観察部位

観察部位は，歯の移動群において根尖側の硝子様変性組織が出現する第一臼歯近心根の口蓋側セメント質とした（図２）．

Ⅲ　結　果

１．H－E染色所見

対照群の歯根膜は，全周にわたってほぼ均一

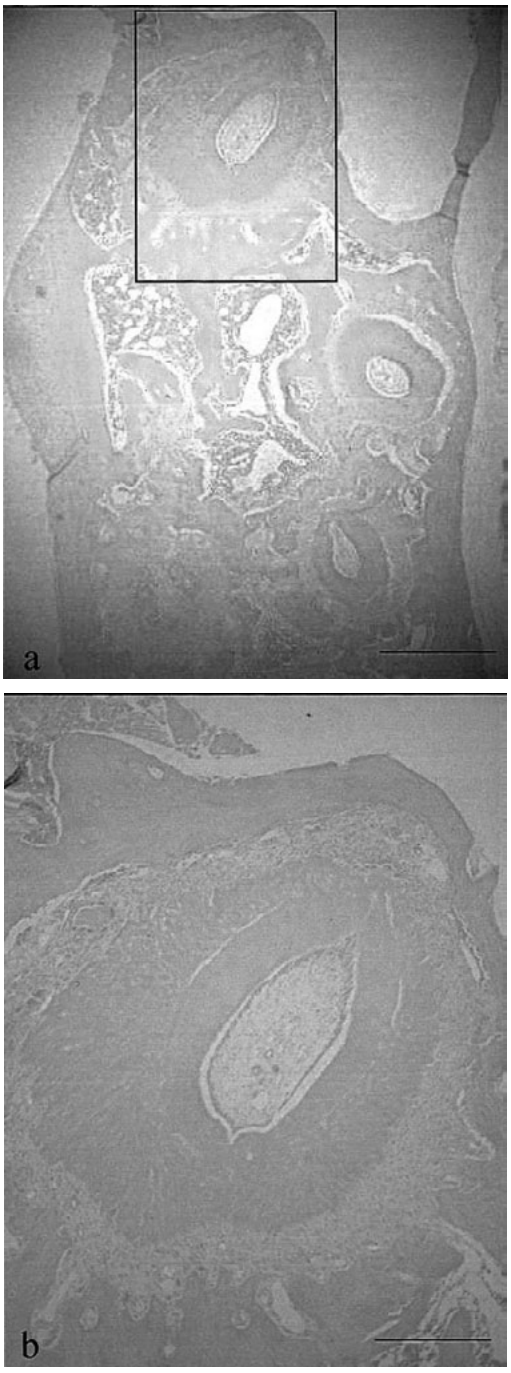


図３：上顎左側第一臼歯部の脱灰横断切片（H－E染色像）
対照群の根尖部切片を示す．bはaの黒枠部分の拡大像．
bar（a）＝500μm. bar（b）＝100μm.

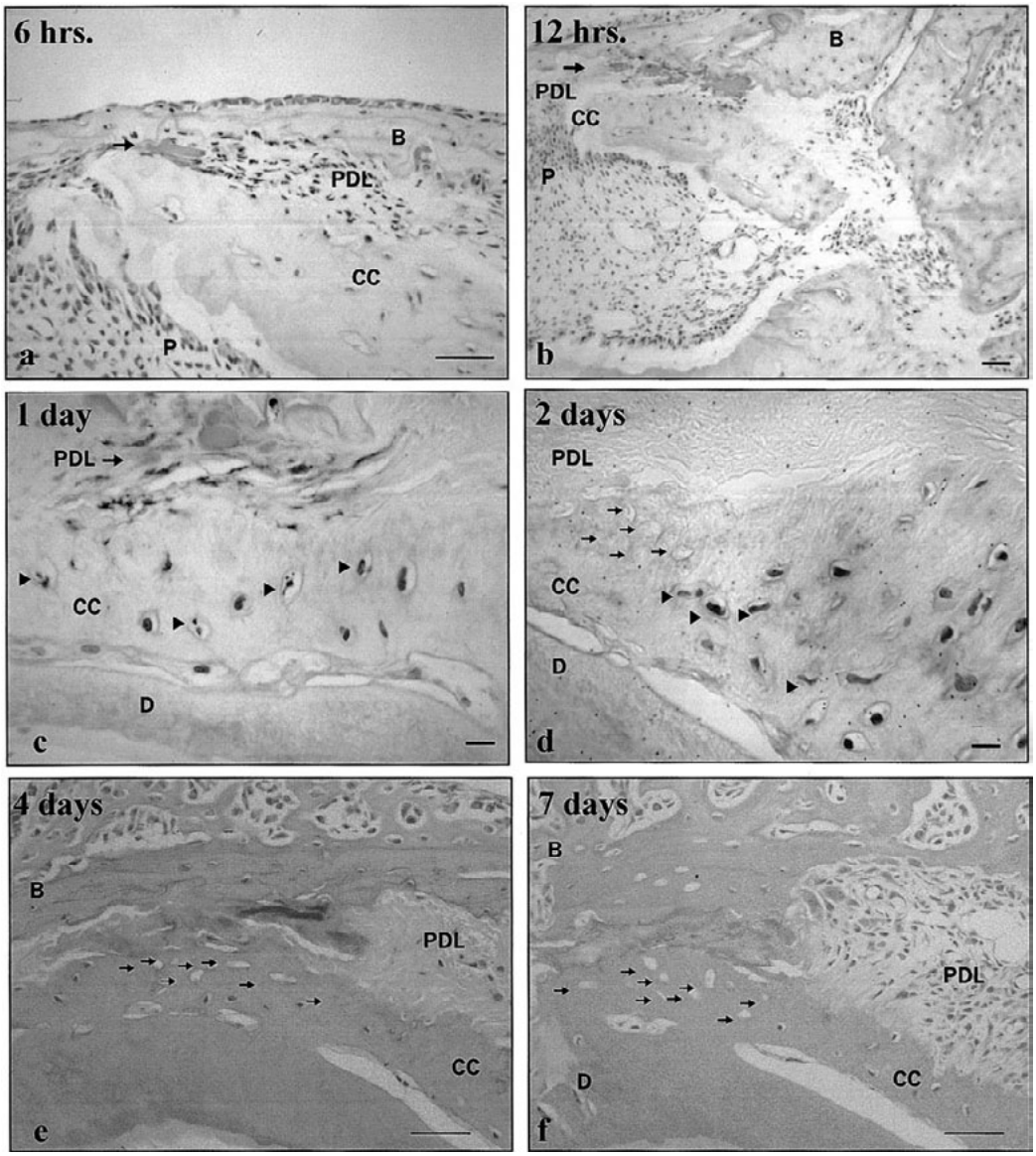


図４：　歯の移動に伴う第一臼歯近心根根尖圧迫部位の経時的変化（H－E染色）
a：荷重負荷後６時間．圧迫された歯根膜に硝子様変性組織の出現がみられる．(矢印)
b：12時間．歯根膜の硝子様変性組織の範囲の増加がみられる．(矢印)
c：１日．硝子様変性組織(矢印)に隣接した有細胞セメント質に核の濃縮および断片化(矢頭)が認められる．
d：２日．セメント細胞の核の断片化（矢頭）と空胞化したセメント小腔（矢印）が認められる．
e：４日．セメント細胞の消失したセメント小腔（矢印）が認められる．
f：７日．セメント細胞の消失したセメント小腔(矢印)の範囲はセメント質表面から深層に拡大している．
bar（a, b）＝50μm. bar（c, d）＝10μm.

な幅を示していた（図３）．対照群では術後4,7日のいずれにおいても移動前の試料とほぼ同様な結果が得られた．歯根全周にわたり有細胞セメント質の厚い層が観察された．

歯に荷重負荷後6，12時間，1，2，4，7日のH－E染色像を図４に示す．荷重負荷後３時間で第一臼歯近心根歯根膜に一部圧迫像がみられ，6時間よりエオジン好染色性の硝子様変性組

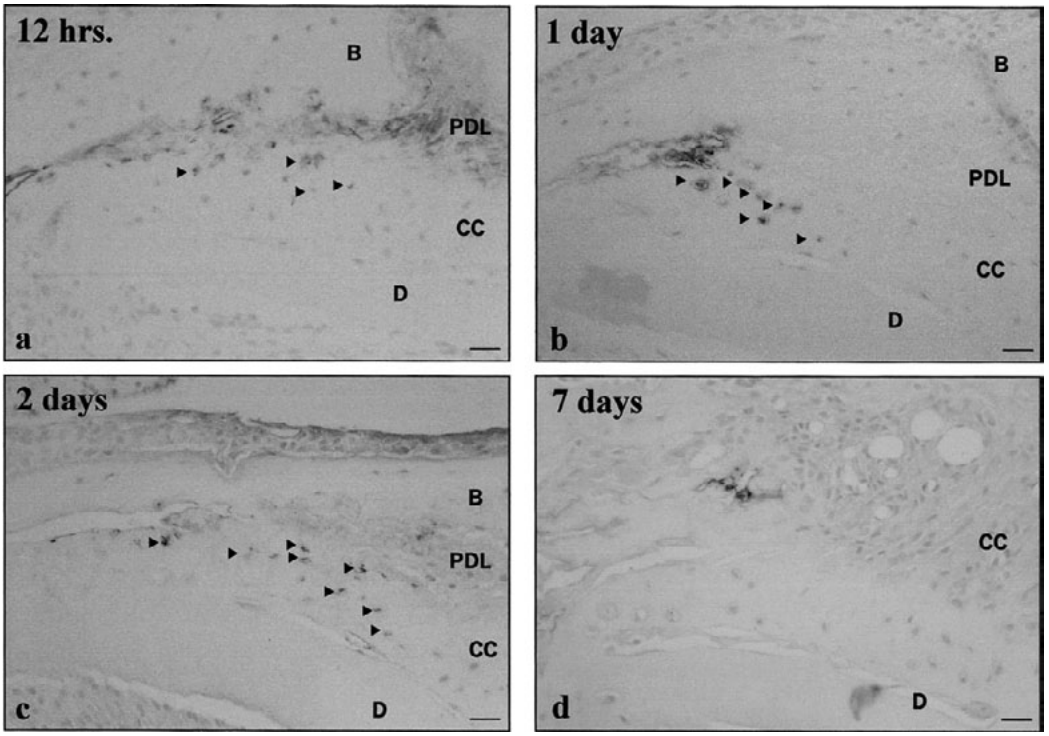


図５：歯の移動に伴う第一臼歯近心根根尖圧迫部位の経時的変化（免疫染色）
a：硝子様変性組織に隣接する表層の細胞に抗ss－DNA抗体に対する陽性反応が認められる（矢頭）
b，c：抗ss－DNA抗体陽性反応を示すセメント細胞（矢頭）の増加がみられる．
d：抗ss－DNA抗体陽性反応を示すセメント細胞は消失した．　　bar＝10μm

織が出現した（図４a）．その後，硝子様変性組織の範囲の増加が認められた.1日で変性組織に隣接する有細胞セメント質内のセメント細胞の一部に核の濃縮および断片化が観察された（図４c）.2日より，核の濃縮および断片化は減少し空のセメント小腔が多く観察されるようになった.4日以降ではセメント小腔の空胞化が顕著となった．

２．免疫染色所見

荷重負荷後12時間より硝子様変性組織に隣接するセメント質において，抗ss－DNA抗体に対する陽性反応が認められた（図５a）.1日でセメント細胞にはっきりとした陽性反応が観察されるようになり（図５b）,2日ではさらに多数のセメント細胞において抗ss－DNA抗体陽性反応がみられた（図５c）.4日では硝子様変性組織に隣接するセメント質中に陽性反応を示す細胞は減少し,7日ではほとんど反応は認められなかった．

３．共焦点レーザー顕微鏡所見

荷重負荷後12時間で変性組織に対応する有細胞セメント質のセメント細胞の一部に核の濃縮，断片化がみられたが，セメント質表面の細胞との突起のコンタクトは残存していた（図６a, b）.1日では，セメント細胞の核の濃縮および断片化が観察されるのに加え，セメント細胞の突起の消失，および細胞質におけるF－actinの染色性の低下がみられた（図６c, d）.2日ではさらにセメント細胞におけるF－actinの染色性の消失も認められた（図６e, f）.4日ではセメント細胞の細胞質や核の染色性はほとんど消失し（図６g）,7日では細胞の変化はさらに進行し，萎縮した細胞質がわずかに残存しているのが認められた（図６h）．

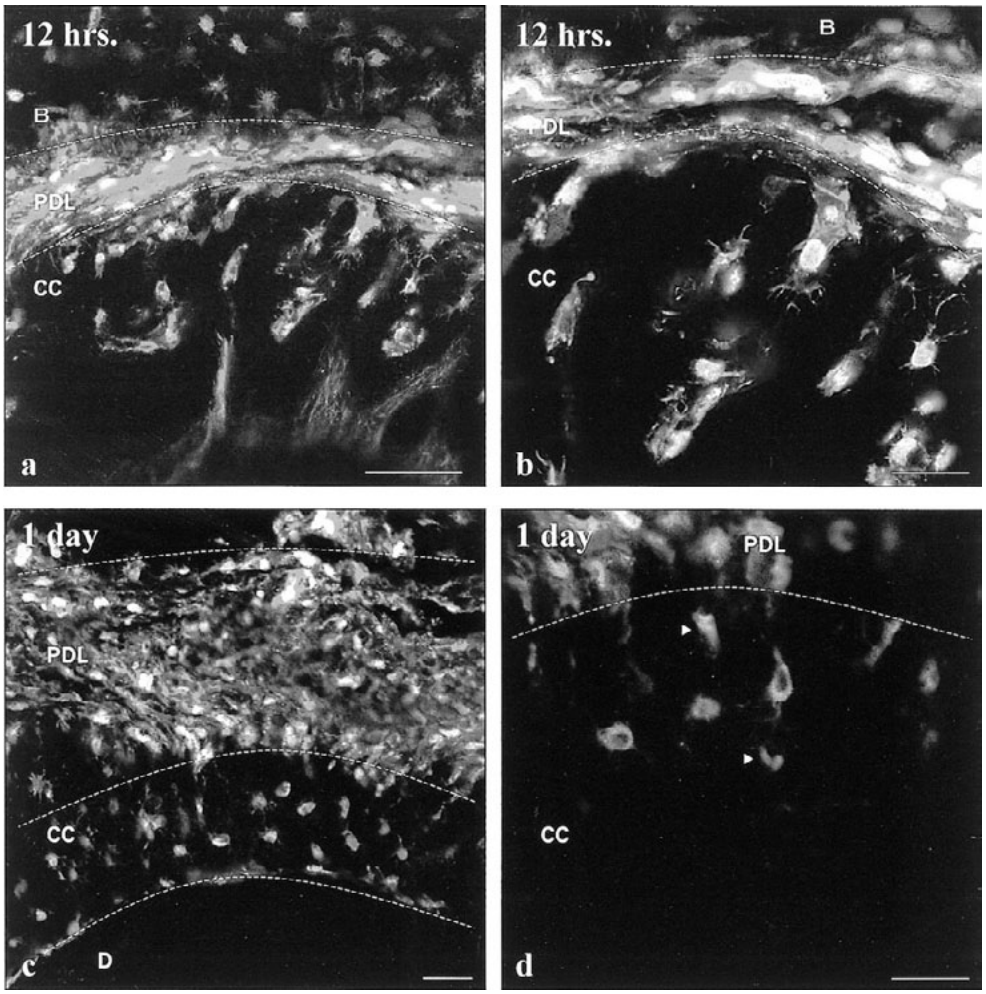


図6：共焦点レーザー顕微鏡所見
a，b：荷重負荷後12時間．歯根膜の硝子様変性組織に隣接するセメント細胞の一部に核の濃縮がみとめられるものの，セメント細管の突起は残存している．
c，d：荷重負荷後１日．濃縮した核と断片化（矢頭）が認められ，セメント細胞の突起の消失，および細胞質のF−actinに対する染色性が著しく低下した．
B：歯槽骨CC：有細胞セメント質　D：象牙質　P：歯髄　PDL：歯根膜
bar（a，c）＝50μm. bar（b，d）＝20μm.

Ⅳ 考 察

１．歯の移動方法について

本実験に用いた歯の移動方法は，Igarashiらの方法[22]に準じて行った．この方法では，ニッケルチタン合金ワイヤーの超弾性の特性を利用しているため，任意の矯正力を歯に持続的に負荷することを可能にしている．また，この方法では，根尖側に近い部位を回転中心とした傾斜移動を示すため，硝子様変性組織は根尖部口蓋側に出現する．

本研究の目的は，変性組織が出現する圧迫側におけるセメント細胞の組織変化をみることを目的としている．したがって，本研究では，予備実験として，有細胞セメント質が分布する根尖部に硝子様変性組織が広範に出現する力の大

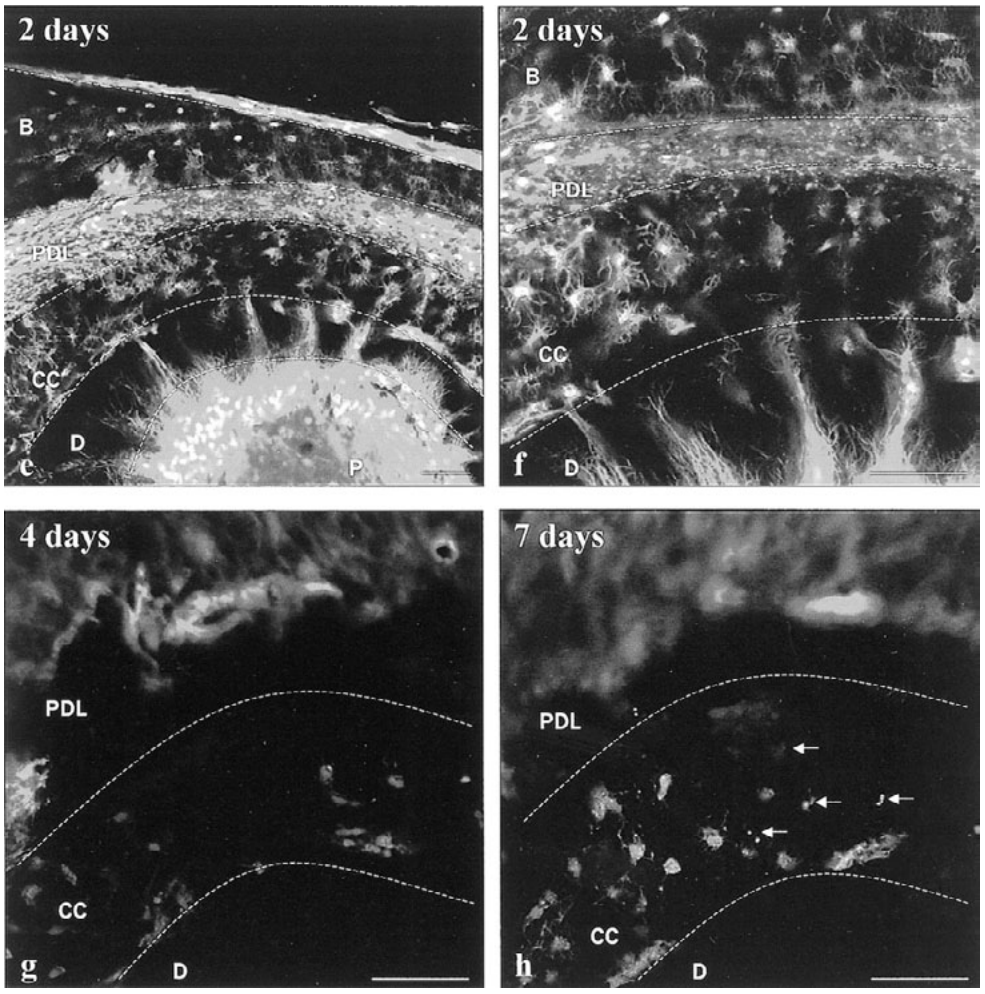


図6：共焦点レーザー顕微鏡所見
e，f：荷重負荷後2日．歯根膜圧迫部位に隣接するセメント細胞のF－actinの染色性はさらに低下し，小腔内の核の染色性も消失した．
g：荷重負荷後4日．セメント細胞の細胞質や核の染色性はほとんど消失している．
h：荷重負荷後7日．萎縮した細胞質がわずかに残存するのみとなっている（矢印）．
B：歯槽骨CC：有細胞セメント質　D：象牙質　P：歯髄　PDL：歯根膜　　bar＝50μm.

きさを確認するため，初期荷重20gf, 40gf, 60gfの移動実験を行い，変性組織の出現様相を比較検討した．その結果，いずれの力の条件においても変性組織の出現が見られたが，特に60gfの初期荷重によって，広範な変性組織が根尖部に形成されていることが明らかとなったため，本研究では，60gfの初期荷重を歯の移動に適用することとした．

2．セメント細胞の観察方法について

本研究では，骨細胞の細胞質と核の形態を同時に把握するため，蛍光標識されたphalloidinによる細胞質染色[19,26,27]とDAPIによる核染色[28,29]の二重染色を行った．有細胞セメント質に存在するセメント細胞は，骨細胞に比較して，その細胞突起が少ないことが指摘されている[19]．しかし，蛍光強度が強く，また退色しづらいという特徴を有しているAlexa488標識phalloidinを用いることによって，十分セメント細

胞の細胞突起を含めた形態を把握することができた．Phalloidinは毒キノコの一種であるAmanita phalloidesから抽出されたbicyclic peptidesであり，F－actinに特異的に結合することが知られている[27]．本研究では，予備実験として，F－actinに対する抗体を用いた免疫組織化学染色と蛍光標識されたphalloidinによる蛍光染色との比較検討を行った．その結果，phalloidinによる染色法では，その適用が凍結切片に限られるものの，抗体法に比べてその染色性が強く，セメント細胞や骨細胞の細胞突起の細部にわたって反応性を示すことが明らかになった．また，併せてAlexa488標識とFITC標識のphalloidinについても染色性の比較を行った結果，前者は蛍光強度が強く，また退色しづらいという特徴を有しており，共焦点レーザー顕微鏡よる観察により適しているものと考えられた．しかし，荷重負荷１日以降では，細胞死を示すセメント細胞の染色性が低下しており，セメント細胞の形態を観察することは困難であった．これは，細胞死に伴うF－actinの分解によるものと考えられる．

一方，核染色にはDAPI[28,29]，PI[19]，YOYO－１iodine[30]などの様々な染色方法が適用されているが，本研究で用いたDAPI法は，mRNAとの交差反応による細胞質の染色が無いこと，他の方法で行う塩酸とprotease K処理の操作[30]が必要でないという利点を有していた．以上の予備実験の結果により本実験では，Alexa488標識phallodinによる細胞質染色とDAPIによる核染色の二重蛍光染色を用い行った．

３．セメント細胞の形態変化について

アポトーシス細胞の形態学的特徴には，細胞の縮小，クロマチンの凝縮，核の断片化，細胞表面の平滑化，細胞の断片化があげられる．また，生化学的には，ヌクレオソーム単位のDNAの断片化が観察され，遺伝子に支配された細胞死と定義されている．一方，ネクローシスは不可逆性の損傷により生じる病理的な死と定義される．その形態学的特徴としては，ミトコンドリアや小胞体の膨化，細胞の膨化と溶解，イオン輸送系の崩壊，細胞内容物の流出などがあげられ，アポトーシスとは明確に区分されている．

本研究においては，歯に荷重負荷後12時間から２日にかけて硝子様変性組織に隣接したセメント細胞にクロマチンの凝縮，核および細胞の断片化，ss－DNA抗体陽性反応などの典型的なアポトーシスの特徴を示す細胞が多数観察されたことから，歯の移動初期に認められた細胞形態の変化は，アポトーシスであると考えられた．今回の実験系で認められた変化は，歯根膜の虚血・低酸素状態がストレスとして作用し，隣接しているセメント細胞にアポトーシスを引き起こしたと考えられる．

骨細胞や軟骨細胞におけるアポトーシス細胞の処理に関して，アポトーシス小体が周囲細胞の食作用により早期に処理されない状況下においては，アポトーシス細胞がネクローシスに移行するとの報告がある[31,32]．本研究と同じ実験系で行われたラット歯槽骨骨細胞の細胞死に関する研究[33]でも，同様の細胞形態変化が観察されている．

４．歯根吸収について

一般的に歯根表層に存在するセメント質は，骨組織に比べて組織活性や組織改造能が低く，吸収されにくい組織とされている．しかし，Ketcham[11]は，臨床的な観点から，歯根吸収が矯正学的歯の移動と密接な関連性を有することを報告した．その後，多くの研究者によって矯正学的歯の移動時に圧迫側歯根膜に形成される硝子様変性組織に対応した歯根表層に高い頻度で吸収が認められること，および硝子様変性組織の吸収過程で出現するマクロファージ，異物巨細胞，あるいは破歯細胞によってセメント質の吸収が起きることが明らかにされた[5,8－10,17,34－37]．

しかし，豊城[37]によると，歯根吸収は硝子様変性組織の出現部位だけでなく，牽引側歯根膜領域あるいは生理的な歯の移動時においても認められることが報告されており，その正確な発現機序に関しては不明のままである．

本研究では，硝子様変性組織に隣接するセメント細胞が細胞死を起こすことを明らかにした．最近の骨細胞の組織学的研究から，骨細胞の細胞死と骨吸収の関連性が指摘されている．Nobleら[38]は，骨細胞のアポトーシスが，胎生期の骨組織，成人の異所性骨形成，および骨関節炎周囲のosteophyteに認められることから，アポトーシスと骨改造の関連性を指摘した．また，Hamayaら[33]は，歯の移動に伴い出現する変性組織に隣接する骨細胞においてアポトーシスを認めたことから，骨細胞のアポトーシスが歯槽骨の吸収機転と関係していることを示唆している．もちろん，骨組織とセメント質ではその生物学的特性が異なっているが，前述した骨組織において示唆されている骨吸収の機序が，矯正学的歯の移動におけるセメント細胞の細胞死と歯根吸収との関係にも適用できる可能性が考えられる．今後，セメント細胞の細胞死と歯根吸収の変化をより長期的にみていき，両者の関連性，ならびに歯根吸収の機序を証明していきたいと考えている．

V　結　論

ラットを用いた実験的歯の移動によって，以下のことが明らかになった．

1．H－E染色所見より，圧迫側歯根膜に生じた硝子様変性組織に隣接するセメント細胞の形態変化が観察された．荷重負荷後1日よりセメント細胞の一部に核の濃縮と断片化が認められた.2日では変化を示すセメント細胞は深部に及んだ．

2．抗ss－DNA抗体を用いた免疫染色より，変性組織に隣接するセメント細胞に陽性反応が認められた.12時間より陽性反応はみられ,2日で最も多くのセメント細胞に陽性反応が認められた．その後反応は減少した．

3．共焦点レーザー顕微鏡所見より,12時間で変性組織に隣接するセメント細胞の一部に核の濃縮，断片化がみられたが，セメント細管の細胞突起は残存していた.1日では核の濃縮および断片化が観察されるのに加え，細胞突起の消失および細胞質のF－actinに対する染色性の低下がみられた.2日ではさらにセメント細胞の染色性の低下がみられ,4日後ではセメント細胞および核の染色性はほとんど消失し，萎縮した細胞質がわずかに残存しているのが認められた．

以上の結果より，実験的歯の移動によって，圧迫側歯根膜に生じた硝子様変性組織に隣接する有細胞セメント質のセメント細胞にアポトーシスが示された．

文　　献

1．Sandstedt C：Einige Beitrage zur Theorie der Zahnregulierung. Nord Tandilakere Tidssker，**4**：236−245，1904.

2．Schwarz AM：Tissue changes incidental to orthodntic tooth movement. Int J Orthodont Oral Surg，**18**：331−352, 1932.

3．Oppenheim A：A Possibility for physiologic orthodontic movement. Am J Orthod Oral Surg，**30**：277−328, 1944.

4．Waldo CM and Rothblatt JM：Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. J Dent Res，**33**：481−486, 1954.

5．Macapanpan LC，Weinmann JP and Brodie AG：Early tissue changes following tooth movement in rats. Angle Orthod，**24**：79−95, 1954.

6．Reitan K：Some factors determining the evaluation of forces in orthodontics. Am J Orthod，**43**：32−45，1957.

7．Reitan K：Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. Angle Orthod，**34**：244−255, 1964.

8．Reitan K：Clinical and histologic observations on tooth movement during and after orthodontic treatment.

Am J Orthod, **53**：721−745, 1967.

9. Reitan K and Kvam E：Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. Angle Orthod, **41**：1−14, 1971.

10. Rygh P：Orthodontic Root Resorption Studied by Electron Microscopy. Angle Orthod, **47**：1−16, 1977.

11. Ketcham AH：A progress report of an investigation of apical root resorption of vital permanent teeth. Int J Orthod1, **5**：310−328, 1929.

12. Newman WG：Possible etiologic factors in external root resorption. Am. J. Orthod, **67**：522−539, 1975.

13. Kennedy DB, Joondeph DR, Osterberg SK and Little RM：The effect of extraction and orthodontic treatment on dentoalveolar support. Am J Orthod, **84**：183−190, 1983.

14. McFadden WM, Engstrom C, Engstrom H and Anholm M：A study of the relationship between incisor intrusion and shortning. Am J Orthod Dentofac Orthop, **96**：390−396, 1989.

15. 達谷窟佳子，清水義之，古田樹己，三谷英夫：矯正治療に伴う歯根吸収のリスクの診断法に関する研究（第1法）. Orthod Waves, **57**：359−368, 1998.

16. Harry MR and Sims MR：Root resorption in bicuspid intrusion：A scaning electron microscope study. Angle Orthod, **52**：235−258, 1982.

17. Brudvik P and Rygh P：Root resorption beneath the main hyalinized zone. Eur J Orthod, **16**：249−263, 1994.

18. Langford SR and Sims MR：Root surface resorption, repair, and periodontal attachment following rapid maxillary expansion in man. Am J Orthod, **81**：108−115.

19. Kagayama M, Sasano Y, Mizoguchi I and Takahashi I：Confocal microscopy of cementocytes and their lacunae and canaliculi in rat molars. Anat Embryol, **95**：491−496, 1997.

20. 加賀山　学，笹野泰之：セメント質の発生. 解剖誌, **75**：365−369, 2000.

21. Freeman E：Periodontium in：Oral histology（edited by Ten Cate AR）4 th ed. 276−312, Mosby−Year Book Inc., St. Louis, 1994.

22. Igarashi K, Mitani H, Adachi H and Shinoda H：Anchorage and retentive effects of a bisphosphonate（AHBuBP）on tooth movements in rats. Am J Orthod Dentofac Orthop, **106**：279−289, 1994.

23. Naruse I, Keino H and Kawabata Y：Antibody against single−stranded DNA detects both programmed cell death and drug−induced apoptosis. Histchemistry, **101**：73−78, 1994.

24. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, Kawasaki H, Sugiyama T, Kawarada Y and Tanigawa N：Detection of apoptotic cells in human colorectal cancer by two different in situ methods. Jpn J Cancer Res, **90** 188−193, 1999.

25. Isobe Y, Chen ST, Nakane PK：Studys on translocation of immunoglobulins across intestinal epithelium 1 Improvements in the peroxidase−labeled antibody method for application to study of human intestinal mucosa. Acta Histochem Cytochem, **10**：161−171, 1977.

26. Kagayama M, Sasano Y, Hirata M, Mizoguchi I and Takahashi I：An improved mounting method for observation of thick specimens using confocal microscopy. Biotech Histochem, **71**：231−233, 1996.

27. Cooper JA：Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J Cell Biol, **105**：1473−1478, 1987.

28. Williamson DH and Fennell DJ：The use of fluorescent DNA−binding agent for detecting and separating yeast mitochondrial DNA. Methods Cell Biol, **12**：335, 1974.

29. Akimoto Y, Obinata A, Endo H and Hirano H：Distribution of β1 integrin during development of chick tarsometatarsal skin in vivo and in vitro. J Histchem Cytochem, **44**：411−422, 1996.

30. Liu S, Weaver DL and Taatjes DJ：Three−dimensional reconstruction by confocal laser scanning microscopy in routine pathologic specimens of benign and malignant lesions. Histochem Cell Biol, **107**：267−278, 1997.

31. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M and Kroemer G：The apoptosis−necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. Oncogene, **15**：1573−1581, 1997.

32. Roach HI and Clarke NM：“Cell paralysis”as an intermediate stage in the program−med cell death of epiphyseal chondrocytes during development. J Bone Miner Res, **14**：1367−1378, 1999.

33. Hamaya M, Mizoguchi I, Sakakura Y, Yajima T and Abiko Y：Cell death of osteocytes occurs in rat alveolar bone during experimental tooth movement. Calcif Tissue Int, **70**：117−126, 2002.

34. Azuma M：Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. Bull Tokyo Med Dent Univ，**17**：149−178, 1970.
35. 小沢　操：ラット上顎臼歯歯根吸収に及ぼす実験的歯の移動の影響．日矯歯誌，**41**：616−630，1982.
36. 佐藤嘉晃，石川博之，中村進治，脇田　稔：矯正力を加えた際の圧迫側歯周組織の経時的な変化．日矯歯誌，**54**：177−192, 1995.
37. 豊城あずさ：実験的歯の移動に伴う歯根吸収の開始機序に関する組織学的研究．Orthod Waves，**57**：213−229, 1998.
38. Noble BS, Stevens N and Reeve J：Identification of apoptonic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. Bone，**20**：273−282, 1997.

〔原　著〕

*Prevotella intermedia*および*Prevotella nigrescens*由来溶血毒素に関する研究

鎌口　有秀*，中村　麗子*，岡本　公彰**，馬場　久衛*

*北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室
**鶴見大学歯学部口腔細菌学教室

Study on the hemolysin from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*

Arihide KAMAGUCHI*, Reiko NAKAMURA*,
Masaaki OKAMOTO** and Hisae BABA*

*Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.
**Department of Oral Bacteriology, School of Dental Medicine, Turumi University.

Abstract

Hemolysin genes of *Prevotella intermedia* that have been reported were not detected by PCR in many strains of *P. intermedia* and *Prevotella nigrescens*. In both organisms, hemolytic activity was observed in many strains which had not retained the hemolysin genes. Hemolysin was partially purified from the outer membranes of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. This hemolysin was activated with SH reagents and inhibited with SH blockers. After heating at 100℃ for 10 minutes, the hemolytic activity was almost inhibited, but heat stable hemolysin was also observed. Therefore, it is suggested that *P. intermedia* and *P. nigrescens* have two different hemolysins on the outer membrane which are related to growth in the oral cavity.

Key word：hemolysin, *Prevotella intermedia, Prevotella nigrescens*

緒　　言

口腔内における黒色色素産生菌の１種として*Prevotella intermedia*と*Prevotella nigrescens*が存在する[1]．*P. intermedia*は正常歯肉溝のみならず，成人性歯周炎，急性壊死性潰瘍性歯肉炎，妊娠性歯肉炎から検出される[2~5]．一方*P. nigrescens*も正常歯肉溝から検出されるのに加え，成人性歯周炎，感染根管から検出される[6~10]．両菌は発育するために*Porphyromonas*

受付：平成16年３月23日

*gingivalis*と同様にヘモグロビンやヘミンを必要とする．*P. intermedia*と*P. nigrescens*は溶血毒素を産生し，赤血球よりヘモグロビンやヘミンを獲得しているものと考えられる．また，一般的に細菌の産生する溶血毒素は病原性と何らかの関連性が指摘されている．*P. intermedia*と*P. nigrescens*の産生する溶血毒素が口腔内でどの様な作用をするかは不明である．*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素の精製法は確立されていないことより，既にBeemら[11]の報告した*P. intermedia*の溶血毒素遺伝子の塩基配列を基にして，組み換え型溶血毒素を作製し，溶血毒素の性状を検討することを試みた．しかし，溶血毒素遺伝子のPCR産物と溶血活性の間に不一致が見られた．そこで，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素遺伝子の存在の有無と溶血の関係を検討し，報告されたものとは異なる新たな溶血毒素とその遺伝子の存在の可能性を示唆した．また，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素をそれぞれ部分精製し，それらの性状について検討を行った．

実 験 方 法

供試菌株および培地

P. intermedia ATCC 25611（基準株），JCM 6322，32（臨床分離株），43（臨床分離株），87（臨床分離株），*P. nigrescens* ATCC 25261，ATCC 33563（基準株），5（臨床分離株），6（臨床分離株），8（臨床分離株），9（臨床分離株），19（臨床分離株），IN 19（臨床分離株），58（臨床分離株），65（臨床分離株），67（臨床分離株）を酵母エキス、ヘミン、メナジオン添加トリプテック・ソイ・ブロース（TYHM培地）にて嫌気的に培養した．

溶血毒素遺伝子の検出

Beemら[11]の報告した*P. intermedia*の溶血毒素遺伝子を検出する為に以下のプライマーを用いてPCRを行った．ORF 1 を増幅するプライマーは（P1プライマー（PCR産物：1,070 bp）：P1 F；5’ AATATGGTCATAATTTCCG3’，P1R；5’ TATTCCAGGATAAATAGGATC3’，P1-2プライマー（PCR産物；797bp）：P1-2F；5’ ACAAACTTGTTGTAATATAGAG3’，P1-2R；5’ GGGATAAGTTGTAATATAGAG3’，P2プライマー（PCR産物：781bp）：P2F；5’ ACTCAAGAAATGCTTAAGACG 3’，P2-R；5’ GCTGCTAATATAATTGCTTGC3’，P2-2プライマー（PCR産物：451bp）：P2-2F；5’ TAGGTGCTGAAGAGAACACG3’，P2-2R；5’ ACCATATGTGGCAATAGTGCC3’，P3プライマー（PCR産物：1,927 bp）：P3F 5’

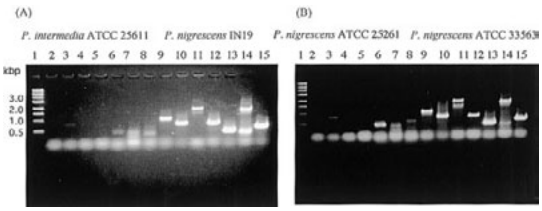


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products from *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC33563, ATCC25261, and IN19.(A) : Lanes 2 to 8 indicate PCR products from *P. intermedia* ATCC25611. Lanes 9to15 indicate PCR products from *P. nigrescens* IN19.(B) : Lanes 2 to 8 indicate PCR products from *P. nigrescens* ATCC25261.Lanes 9to15indicate PCR products from *P. nigrescens* ATCC33563.Samples of both gel lanes indicate as bellows : lane1 : 1kb laddeer. Lane2 and 9 : PCR products by P1parimer pair(1,070bp), lanes3and10 : PCR products by P2primer pair(781bp), lanes4and11 : PCR product by P3primer pair(1,927 bp), lanes5and12 : PCR product by P1-2primer pair(796bp), lanes6and13 : PCR product by P2-2pimer pair(451bp), lanes7and14 : PCR product by P3-2primer pair (1,771bp), lane8and15 : PCR product by P3-3 primer pair(618bp).

CTTTAAGCAAAAAGCATACGC3', P3R5' CAAACACATTCTTAATCTCTC3', P3-2プライマー（PCR産物：1,771 bp）：P3-2F；5' TGGAATGGGCAGACGGTTAGG3', P3-2R；5' CAGCCACAAAGACGAATTGTTCTCG3', P3-3プライマー（PCR産物：610 bp）：P3-3F；5' CCTAATCTTGCATTGGTGGC3', P3-3R；5' TTGATGAGTTCAGCAGCTCC3'）である．PCRの条件は前加熱94℃，5分（1 cycle），変成92℃，1分，アニーリング55℃，1分，増幅72℃，1分（35サイクル），増幅72℃，5分（1サイクル）で行った．各菌株からのDNAの抽出はSmithら[12]の方法に準じて行った．

外膜画分の分画方法

2 LのTYHM培地に*P. intermedia* ATCC 25611または*P. nigrescens* ATCC 25261を接種し，5日間培養後，10,000 gにて30分遠心し，菌体を得た．この菌体を100 mlのPBSに懸濁し，氷冷下でブレンダーにより2分処理した．これを10,000 gにて30分遠心し，その上清をさらに100,000 gにて60分遠心し沈殿を得た．この沈殿を外膜画分とした．

外膜画分の可溶化と溶血毒素の部分精製方法

外膜画分に100 mM n-Heptyl-β-D-thioglucoside（HTG）を加え，室温で30分振とうして可溶化した．これを100,000 gで60分遠心し，上清をDEAE-Sephadex A-50にかけ，30 mM HTG含有50mM Tris-HCl（pH8.5）にて溶出した．吸着物を0.1M NaCl，0.2 M NaClを含む30 mM HTG含有50 mM Tri-HCl（pH8.5）にて溶出した．各フラクションの溶血活性を測定し，活性画分を透析後，凍結乾燥した．これを部分精製溶血毒素とした．

溶血活性の測定方法

1．菌体の溶血活性の測定方法：菌液の600 nmにおけるODを1.5にPBSにて調製した．この菌液2 mlを15,000 gにて10分遠心し，沈殿にPBSを1,000 μl添加し，再懸濁した．これに2％家兎赤血球を1,000 μl加え，37℃にて60分振とうした．ついで，2,000 gで5分遠心し，さらに菌体を除くために上清を15,000 gにて5分遠心した．この上清の540 nmにおける吸光度を測定した．家兎赤血球を蒸留水にて溶血させたものの540 nmの吸光度測定値を100％溶血活性とし，各試料の溶血活性を％で表わした．

2．溶液の溶血活性の測定方法：溶液（100 μl）にPBSまたは阻害剤含有PBSを900 μl添加し，さらに2％家兎赤血球を1,000 μl加えた．これを37℃にて60分振とう後，2,000 gで5分遠心し，上清の540 nmのODを測定した．溶血活性は1と同様に％で表わした．

3．血液寒天培地上での溶血活性の測定方法：TYHM家兎血液寒天培地に各菌を塗抹し，嫌気培養後，コロニーの周囲にベーター溶血環が観察された時は＋，溶血環が観察されないときは－とした。

N末端アミノ酸配列の解析

SDS-PAGE後のゲルをPVDF膜に転写後，クマーシーブリリアントブルーにて染色した．ついで，目的のタンパク質バンドを切り出しプロテインシークエンサー（Procise 492，Applied Biosystems）を用いてアミノ酸配列を決定した．また，この配列をBLAST searchにてホモロジーのあるタンパク質とその遺伝子を検索した．

結　　果

1．*P. intermedia*と*P. nigrescens*からの溶血毒素遺伝子の検出

*P. intermedia*と*P. nigrescens*の基準株および臨床分離株の計16株よりBeemら[11]の報告した溶血毒素遺伝子のORF1，ORF2，ORF3領域の検出をPCRで行った．しかし，全てが検出され

たのは*P. nigrescens* ATCC 33563とIN19の２株のみであった．その他の株はORF２のみが検出されたものが６株，これらの領域が全く検出されないものが８株あった（Table１）．これらの菌株のうち基準株の*P. intermedia* ATCC 25611，*P. nigrescens* ATCC 25261およびORF１，ORF２，ORF３が検出された*P. nigrescens* ATCC 33563とIN19株についてさらに検討を加えた．これらの４株についてORF１は２種のプライマー（P1 and P1-2プライマー），ORF２は２種のプライマー（P2 and P2-2プライマー），ORF３は３種のプライマー（P3，P3-2，P3-3プライマー）の異なるプライマーを用いて各領域の検出についてさらに検討した．この結果，*P. intermedia* ATCC25611および*P. nigrescens* ATCC 25261においてORF２以外は検出されなかった．*P. nigrescens* ATCC 33563および*P. nigrescens* IN19はORF1，ORF2，ORF3がいずれのプライマーでも検出された（Fig．1とTable２）．

Table. 1. Detection of hemolysin gene (ORF1, 2, 3 regions) from various *P. intermedia* and *P. nigrescens* strains with PCR

Bacteria	ORF1	ORF2	ORF3
P. intermedia ATCC 25611	-	+	-
P. intermedia JCM 6322	-	-	-
P. intermedia 32	-	+	-
P. intermedia 43	-	-	-
P. intermedia 87	-	-	-
P. nigrescens ATCC 25261	-	+	-
P. nigrescens ATCC 33563	+	+	+
P. nigrescens 5	-	-	-
P. nigrescens 6	-	+	-
P. nigrescens 8	-	+	-
P. nigrescens 9	-	-	-
P. nigrescens 19	-	+	-
P. nigrescens IN19	+	+	+
P. nigrescens 58	-	-	-
P. nigrescens 65	-	-	-
P. nigrescens 67	-	-	-

+ : PCR product positive, - : PCR product negative

２．血液寒天培地と試験管での溶血性について

P. intermedia ATCC 25611，*P. nigrescens* ATCC 25261，*P. nigrescens* ATCC 33563，*P. nigrescens* IN19の血液寒天培地と試験管内での溶血反応を測定した．その結果４株とも血液寒天培地での溶血性は示したが，ORF1，ORF2，ORF3をもつ*P. nigrescens* ATCC 33563と*P. nigrescens* IN19は試験管内での溶血性は示さなかった．これに対してORF２のみしかもたない*P. intermedia* ATCC 25611と*P. nigrescens* ATCC 25261は試験管内溶血性を示した（Table２）．このことよりORF1，ORF2，ORF3の存在と試験管内での溶血性は一致しなかった．

３．培養経過と試験管内溶血性

P. intermedia ATCC 25611，*P. nigrescens* ATCC 25261，*P. nigrescens* ATCC 33563，*P. nigrescens* IN19の培養日数と各菌体の試験管内溶血性について検討した．その結果，*P. intermedia* ATCC 25611および*P. nigrescens* ATCC 25261は培養１日目より溶血活性がみられ，培

Table. 2. Relationship between hemolysin gene and hemolysis of *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 25261, ATCC 33563, and IN 19

Bacteria	hemolysin gene			hemolysis	
	ORF1	ORF2	ORF3	plate	tube
P. intermedia ATCC 25611	-	+	-	+	+
P. nigrescens ATCC 25261	-	+	-	+	+
P. nigrescens ATCC 33563	+	+	+	+	-
P. nigrescens IN 19	+	+	+	+	-

hemolysin gene : + : PCR product positive, - : PCR product negative
hemolysis : plate : + : β - hemolysis zone positive, tube : + : hemolysis positive, - : hemolysis negative

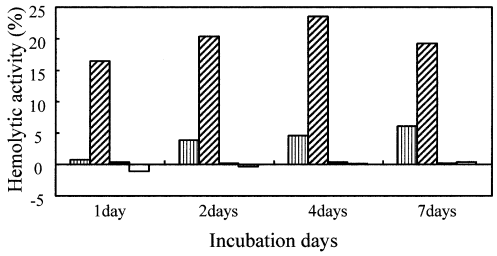


Fig. 2. Effect of incubation on hemolytic activity of cells of *P. intermedia* and *P. nigrescens*.
▨: *P. intermedia* ATCC 25611, ▨: *P. nigrescens* ATCC 25261, ■: *P. nigrescens* ATCC 33563, □: *P. nigrescens* IN19

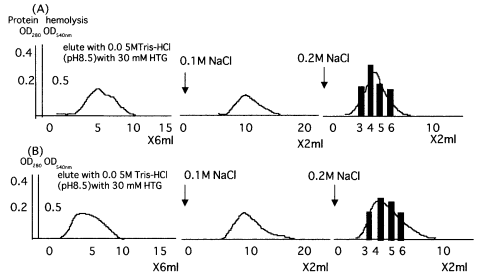


Fig. 3. Anion-exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50) pattern of hemolysin from the outer membrane of *P. intermedia* ATCC25611(A) and *P. nigrescens* ATCC25261(B). Abbreviation : HTG ; n-heptyl-β-D-thioglucoside. Line indicates protein at 280 nm of OD. Column indicates the hemolytic activity at 540 nm of OD.

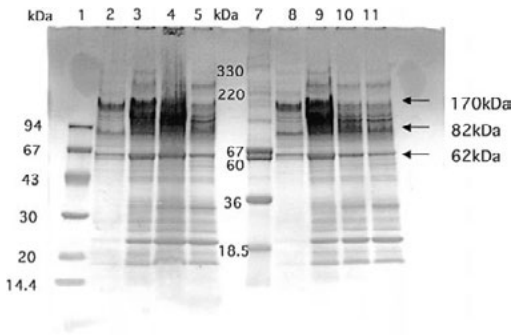


Fig. 4. SDS-PAGE of hemolytic activity positive fractions of DEAE-Sephadex chromatography.
Lane1 : low molecular weight marker ; lane2 : fraction3 ; lane3 : fraction4 ; lane4 : fraction5 ; lane5 : fraction6. Lane7 : high molecular weight marker ; lane8 : fraction3 ; lane9 : fraction4 ; lane10 : fraction5 ; lane11 : fraction6. Arrows indicate the putative hemolysin of *P. intermedia.*

養の経過と共に増加する傾向がみられたが，*P. nigrescens* ATCC 33563および*P. nigrescens* IN 19は7日培養の菌体においても溶血活性はみられなかった（Fig.2）．このことより，長期培養しても*P. nigrescens* ATCC 33563および*P. nigrescens* IN19の菌体は試験管溶血活性を示さないことがわかった．

4．*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素の部分精製とその性状

P. intermedia ATCC 25611と*P. nigrescens* ATCC 25261から得られたOM画分を透析により分離可能なHTGにより可溶化し，溶血毒素を部分精製することを試みた．Fig.3に示す様に両菌株の外膜画分からの可溶化した溶液をDEAE-Sephadex A-50にかけ，平衡化緩衝液（30 mM HTG含有0.05 M Tris-HCl（pH8.5））と同じ緩衝液にて溶出した．溶出された画分と0.1 M NaClにて溶出した画分には溶血活性は見られなかった．ついで，0.2 M NaClにて溶出した画分に溶血活性がみられた．0.3 M NaClから1 M NaClにて溶出した画分には溶血活性はみられなかった．両菌株の外膜画分の溶血毒素の溶出パターンはほぼ同様であった．*P. intermedia*の染色体DNAのシークンスの殆どが解析され公開されていることより，*P. intermedia*の部分精製溶血毒素のSDS-PAGEのメジャーなバンドのN末端アミノ酸分析を行いデーターベースよりホモロジーのあるタンパク質とその遺伝子を推定することを試みた．*P. intermedia*の溶血毒素の部分精製の各フラクションを透析後，SDS-PAGEを行った．その結果4つのフラクションにおいて共通に存在するメジャーなバンドは62 kDa，82 kDa，170 kDaの3つのバンドであった（Fig.4）．そこで，測定可能であった2バンドのN末端アミノ酸分析を行ったところ，82 kDaのバンドのN末端アミノ酸配列はRQSGEIであり，62 kDaのバンドのN末端アミノ酸配列はRAYDNQRVETVであった．170

kDaのバンドはPVDF膜に解析に必要量がブロッテングできず解析できなかった．前２者をデーターベースによりホモロジー検索を行ったが，いずれもホモロジーのあるタンパク質は見いだせなかった．ついで，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の部分精製の溶血毒素の溶血活性に対する種々の物質および加熱による影響をみた．各部分精製物のタンパク質量を１mg/mlに調製し，この外膜画分溶液の100 μlに種々の物質を添加しその影響をみた．その結果Dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, L-cysteineの還元剤を加えることにより溶血活性の増加とN-ethylmaleimide, 5, 5'-dithiobis（2-nitrobenzoic acid）のSH基の阻害剤を添加することにより溶血活性の著しい低下がみられた（Table３）．このことより，溶血毒素のSH基が溶血活性に関与していることが示唆された．また，100℃，10分の加熱により，活性の低下がみられたが，完全に失活しなかった．このことより，溶血毒素の殆どは易熱性であるが，耐熱性の部分も存在するものと思われた．これは複数の溶血毒素が存在する可能性を示唆するものと思われた．

Table. 3. Effect of various compounds and heat treatment on hemolytic activity of partially purified fraction from outer membrane fraction of *P. intermedia* ATCC 25611 and *P. nigrescens* ATCC 2561

Compouonds and heat treatment	Hemolytic activity (mean ± SD %) partially purified fraction of	
	P. intermedia ATCC 25611	*P. nigrescens* ATCC 25261
None	16.0 ± 1.5	15.1 ± 2.0
DTT (50 mM)	18.2 ± 0.8	24.0 ± 1.2
2ME (50 mM)	20.0 ± 0.5	18.8 ± 0.9
L-Cysteine (50 mM)	23.9 ± 0.4	21.7 ± 0.8
NEM (1 mM)	2.6 ± 0.1	3.2 ± 0.2
DTNB (1 mM)	7.7 ± 0.3	7.3 ± 0.1
heat (100 °C, 10min)	6.7 ± 0.3	4.3 ± 0.1

One hundred μg/100 μl each partially purified hemolysin was added 900 μl of PBS or 900 μl of each reagents in PBS, and added 1,000 μl of 2 % rabbit red blood cell. After incubation for 60min at 37 °C, these were centrifuged at 5,000 g for 5min. OD of supernatant was measured at 540 nm. Hemolytic activity was indicated as a percent of the positive control (distilled water plus erythrocytes). All samples were assayed in triplicate.
Abbreviation; DTT; Dithiothreitol, 2ME; 2-mecaptoethanol, NEM; N-ethylmaleimide, DTNB; dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

考　　察

*P. intermedia*と*P. nigrescens*は溶血毒素を産生することは知られているが[13,14]，それらの溶血毒素は精製されておらず，生物学的性状や生体における役割については明確にされていない．Beemら[11]は溶血活性の強い臨床分離株である*P. intermedia* 27よりその遺伝子を*E. coli*で発現させ，*P. intermedia*の溶血毒素の遺伝子とした．彼らによると，その溶血毒素の遺伝子は３つの領域よりなり，それぞれの領域からのオープン・リーデング・フレームをORF1，ORF2，ORF3とした．*P. intermedia*と*P. nigrescens*は1995年に*P. intermedia*より再分類されるまでほぼ同一に扱われてきた様にその性状は類似しており，溶血毒素を含めた一般的な生化学的性状による分類はできない．Shahら[15]によりDNA-DNAハイブリダイゼーションにて*P. intermedia*と*P. nigrescens*に分類することが可能になり，また，最近では16S rDNAに対するそれぞれの特異的プライマーを用いてPCR産物により同定が可能になった[14]．この様に*P. intermedia*と*P. nigrescens*は生物学的性状が類似していることより，両菌種からBeemら[11]の報告した溶血毒素の遺伝子のDNAシークエンスをもとに各ORFに対するプライマーを作製した．ついで，これらのプライマーを用いてPCR産物より組み換え型溶血毒素を作製し，その性状を検討することを計画した．しかし，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の基準株および臨床分離株の計16株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行ったがORF1，ORF2，ORF3の３つが検出されたものは２株のみであり，その他はORF2のみが検出されるか，全く検出されないかであった．また，

ORF1，ORF2，ORF3が検出された菌株は試験管内での溶血反応を示さなかった．Beemら[11]は溶血毒素遺伝子を大腸菌で発現させ、その遺伝子の短縮化と溶血活性の関係を検討した結果，ORF1が血液寒天培地上での溶血活性に関与し、ORF2，ORF3が試験管内溶血反応に関与する遺伝子であると報告した。しかし，今回行った実験ではORF1と血液寒天培地での溶血活性との関連性はみられず、ORF2とORF3と試験管内溶血反応との関連性もみられなかった。また、溶血反応を示さなかった菌株のORF1，ORF2，ORF3のDNAシークエンスは*P. intermedia* 27のシークエンスと殆ど一致していた．これとは逆にORF1，ORF3が検出されないか，またはORF1，ORF2，ORF3の全てが検出されない菌株は試験管内溶血反応を示した．この様に保有する遺伝子と溶血活性の間には矛盾が生じることになった．このことよりBeemら[11]の報告を基に組み換え型の溶血毒素を作製することは我々が保有する菌株では不可能であることがわかった．この様な現象が生じる原因として３つのことが想定された．１：細菌は菌株の相違により生物学的性状が異なる場合があり，溶血毒素の性状も菌株の違いにより異なる場合も報告されている[16~20]．２：溶血活性がない*E. coli*において遺伝子を発現させると*E. coli*の潜在的な溶血毒素遺伝子が活性化される場合があり，あたかも溶血毒素遺伝子をクローニングしたと思われることが報告されている[21~23]．３：構造遺伝子は正常であるが，プロモーター領域に変異がある場合．以上のことよりBeemら[11]の*P. intermedia* 27は特異的な性状を持つ株である可能性が示唆された．これよりBeemら[11]の報告した溶血毒素と異なる性状の溶血毒素が存在する可能性が想定された．そこで，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の基準株より溶血毒素を部分精製することを試みた．溶血活性は培養上清には存在せず，菌体の外膜画分に存在した．他の口腔細菌においても外膜画分またはvesicle画分に溶血毒素が結合している例は報告されている[18,24]．*P. intermedia*および*P. nigrescens*はシドロフォアをもたず，周囲から生体成分に結合した鉄イオンを直接利用することができない．両菌は赤血球から遊離したヘモグロビン、ヘミン等を鉄源として利用する．溶血毒素により赤血球が破壊され，ヘモグロビンやヘミンが遊離しても生体中ではハプトグロブリンやヘモペキシンに素早く結合して細菌が利用できない状態になる．溶血毒素が外膜に結合していることの意義は外膜に結合した溶血毒素が赤血球に作用した場合に溶血と同時にヘモグロビンやヘミンを菌体に結合することができる可能性が想定される．膜結合の溶血毒素として*Shigella flexneri*等のcontact溶血毒素と呼ばれる溶血毒素が報告されている[25]．これは菌体表層の溶血毒素が赤血球に結合することが必要であり，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素と類似の性状であるが，*S. flexneri*等のcontact溶血毒素と呼ばれている溶血毒素は菌が生きていることが必要であり，*S. flexeneri*の食作用の誘導等と関連があるとされる．このことより，*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素は外膜結合性であるが菌が生きていなくても作用すること，また可溶化しても溶血活性を示すことより、*S. flexeneri*等のcontact溶血毒素とは異なる性状の溶血毒素であった．*P. intermedia*と*P. nigrescens*の外膜画分を透析により脱塩可能なデタージェントにより可溶化し，溶血毒素を部分精製した．溶血活性を示したそれぞれのフラクションをSDS-PAGEにかけたところ62kDa, 82kDa, 170kDaの３つのメジャーなタンパクバンドが関与している可能性が示唆された．これら３バンドのうち２バンドのN末端アミノ酸シークエンスはデーターベース上ではホモロジーがある物質は検出されず，またBeemら[11]の報告した溶血毒素ともホモロジーは無かった．部分精製した溶血毒素は

SH基還元剤にて活性の増加とSH基阻害剤にて活性の著しい低下がみられたことよりチオール活性型の溶血毒素であると推察された．チオール活性型の溶血毒素としては*Streptococcus pyogenes*の産生するストレプトリジンO，*Streptococcus pneumoniae*の産生するニューモリシン、*Clostridium perfringens*の産生するツエター毒素など[26~28]グラム陽性菌が産生すると報告されている．これに対して*P. intermedia*や*P. nigrescens*のグラム陰性菌の産生するチオール活性型の溶血毒素はあまり報告がない．

溶血毒素は酵素型，穴形成型，界面活性型の３つに分類されている．酵素型は*Staphylococcus aureus*のβ毒素のスフィンゴミエリナーゼ，*C. perfringens*のα毒素のホスホリパーゼC等である[29,30]．これらの型の毒素は37℃で反応後，溶血を生じさせるためには０～４℃にすることが必要でホット・コールド型溶血毒素である．*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素は37℃における反応で溶血することより酵素型ではないことがわかった．穴形成型は*E. coli*のRTX溶血毒素や*Streptococcus pyogenes*のストレプトリジン等である[31~33]．これらの溶血毒素は膜に穴を形成し溶血する．*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素が膜に穴を形成するかどうかは今後の検討課題である．界面活性型は*S. aureus*のデルタ毒素や*Pseudomonas aeruginosa*の耐熱性溶血毒素は疎水性の高い界面活性作用により，溶血を引き起こす[34,35]．*P. intermedia*と*P. nigrescens*がこの性状を有するかは不明である．

口腔内において歯周病の進行に伴い溶血毒素を産生する細菌が増加することが指摘されている[36]．この報告では溶血毒素を産生する菌として*Actinomyces*属，*Streptococcus*属，*Staphylococcus*属，*Prevotella*属，*Actinobacillus*属が増加するとしている．その他に溶血毒素を産生する菌として*Porphyromonas gingivalis*や*Treponema denticola*が報告されている[18,37]．細菌における溶血毒素は病原性と関連があるとされている．これは溶血毒素の変異株は動物，培養細胞，*in vivo*において病原性が低下すると報告されていることより推測されている[38~41]．また，溶血毒素は赤血球以外の種々の細胞に対しても傷害を与えるとされている[42~46]．しかし，*P. intermedia*や*P. nigrescens*の口腔細菌の溶血毒素が歯周病においてどのような役割をしているかは明確にされていない．しかし，現在最も強く推測されていることの１つとして，発育にヘモグロビンやヘミンを必要とする細菌においては赤血球を溶血毒素により破壊し，それらを獲得することが必要不可欠であり，また，溶血毒素は歯周病の初期に関与するよりは菌の増殖に伴う歯周病の進行時に重要であると考えられている．その他の溶血毒素の病原性については*P. intermedia*と*P. nigrescens*からの溶血毒素を精製し，その遺伝子を特定し，さらにその変異株から溶血毒素の生体内での作用について検討することが必要である．

以上のことより*P. intermedia*と*P. nigrescens*において既に報告された溶血毒素およびその遺伝子と異なるものの存在が想定された．部分精製した溶血毒素は外膜結合性で，チオール活性型の性状を示した．また，溶血毒素の推定分子量は62 kDaから170 kDaの間の高分子タンパク質である可能性が示唆された．

謝　　辞

N末端アミノ酸配列を解析するにあたりご協力くださいました東京農業大学の渡部俊弘教授および大山　徹教授に心より感謝申し上げます．

文　　献

1．Shah HN and Gharbia SE : Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia*

and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. Nov., *Int J Syst Bacteriol,* **42** : 542-546, 1992.

2. Slots J and Listgarten MA : *Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases., *J Clin Periodontol,* **15** : 85-93, 1988.

3. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E et al. : The prevalence of *A. actinomycetemcomitans, P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis., *J Clin Periodontol,* **21** : 583-588, 1994.

4. Riggio MP, Lennon A and Roy KM : Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction., *J Periodontal Res,* **33** : 369-376, 1998.

5. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE et al. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis., *J Periodontol,* **53** : 223-230, 1982.

6. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR et al. : Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin., *J Endod,* **23** : 620-623, 1997.

7. Conrads G, Mutters R, Fischer J et al. : PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals., *J Periodontol,* **67** : 994-1003, 1996.

8. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN et al. : Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections., *J Periodontol,* **65** : 56-61, 1994.

9. Matto J, Saarela M, von Troil-Linden B et al. : Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens., Oral Microbiol Immunol,* **11** : 96-102, 1996.

10. Teanpaisan R, Douglas CWI and Walsh TF : Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites., *J Periodontal Res,* **30** : 245-251, 1995.

11. Beem JE, Nesbitt WE and Leung K-P : Cloning of *Prevotella intermedia* loci demonstrating multiple hemolytic domains., *Oral Microbiol Immunol*. **14** : 143-152, 1999.

12. Smith GL, Socransky SS and Smith CM : Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms., *Oral Microbiol Immunol,* **4** : 47-51, 1989.

13. Beem JE, Nesbitt WE and Leung K-P : Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia., Oral Microbiol Immunol,* **13** : 97-105, 1998.

14. Okamoto M, Maeda N, Kondo K et al. : Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens., FEMS Microbiol Lett,* **178** : 299-304, 1999.

15. Shah HN and Gharbia SE : Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. Nov., *Int J Syst Bacteriol,* **42** : 542-546, 1992.

16. Hoshi M, Kato I, Goto N et al. : Hemolytic toxin produced by *Porphyromonas gingivalis., FEMS Microbiol Lett,* **114** : 273-278, 1993.

17. Deshpande RG and Khan MB : Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436., *FEMS Microbiol Lett,* **176** : 387-394, 1999.

18. Chu L, Bramanti TE, Ebersole JL et al. : Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* : kinetics of enzyme release and localization., *Infect Immun,* **59** : 1932-1940, 1991.

19. Kay HM, Birss AJ and Smalley JW : Haemagglutinating and haemolytic activity of the extracellular vesicles of *Bacteroides gingivalis* W50., *Oral Microbiol Immunol,* **5** : 269-274, 1990.

20. Karunakaran T and Holt SC : Cloning of two distinct hemolysin genes from *Porphyromonas(Bacteroides)gingivalis* in *Escherichia coli., Microb Pathog,* **15** : 37-49, 1993.

21. Green J, Sharrocks AD, MacInnes JI et al. : Purification of HlyX, a potential regulator of haemolysin synthesis, and properties of HlyX : FNR hybrids., *Proc R Soc Lond B Biol Sci,* **248** : 79-84, 1992.

22. Lian CJ, Rosendal S and MacInnes JI : Molecular cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus(Haemophilus)pleuropneumoniae., Infect Immun,* **57** : 3377-3382, 1989.

23. Ludwig A, Tengel C, Bauer S et al. : Sly A, a regulatory protein form *Salmonella typhimurium,* induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli., Mol Gen Genet,* **249** : 474-486, 1995.

24. Sela MN : Role of *Treponema denticola* in peri-

odontal diseases., *Crit Rev Oral Biol Med,* **12** : 399-413, 2001.

25. Clerc P, Baudry B and Sansonetti PJ : Plasmid-mediated contact haemolytic activity in *Shigella* species : correlation with penetration into HeLa cells., *Ann Inst Pasteur Microbiol,* **137** : 267-278, 1986.

26. Bhakdi S, Tranum-Jensen J and Sziegoleit A : Mechanism of membrane damage by streptolysin-*O., Infect Immun,* **47** : 52-60, 1985.

27. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ et al. : Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae., Mol Microbiol,* **5** : 2611-2616, 1991.

28. Iwamoto M, Ohno-Iwashita Y and Ando S : Role of the essential thiol group in the thiol-activated cytolysin from *Clostridium perfringens., Eur J Biochem,* **167** : 425-430, 1987.

29. Ikezawa H and Murata R : Comparative kinetics of hemolysis of mammalian erythrocytes by *Clostridium perfringens* alpha-toxin（phospholipase C）., *J Biochem,* **55** : 217-224, 1964.

30. Doery HM, Magnusson BJ, Cheyne IM et al. : A phospholipase in staphylococcal toxin which hyrdolyses sphingomyelin., *Nature,* **198** : 1091-1092, 1963.

31. Welch RA : Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria., *Mol Microbiol,* **5** : 521-528, 1991.

32. Coote JG : Structural and functional relationships among the RTX toxin determinantes of gram-negative bacteria., *FEMS Microbiol Rev,* **8** : 137-161, 1992.

33. Braun V, Focareta T : Pore-forming bacterial protein hemolysins（cytolysins）., *Crit Rev Microbiol,* **18** : 115-158, 1991.

34. Caird JD and Wiseman GM : Purification of the delta toxin os *Staphylococcus aureus., Can J Microbiol,* **16** : 703-708, 1970.

35. Liu PV : Extracelluar toxins of *Pseudomonas aeruginosa., J Infect Dis,* 130 Suppl : S94-99, 1974.

36. Hillman JD, Maiden MFJ, Pfaller SP et al. : Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque., *J Periodont Res,* **28** : 173-179, 1993.

37. Chu L, Burgum A, Kolodrubetz D et al. : The 46-kilodalton-hemolysin gene from *Treponema denticola* encodes a novel hemolysin homologous to aminotransferases., *Infect Immun,* **63** : 4448-4455, 1995.

38. Gross MK, Au DC, Smith AL et al. : Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence., *Proc Natl Acad Sci USA,* **89** : 4898-4902, 1992.

39. Hyatt DR, ter Huurne AA, van der Zeijst BA et al. : Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain., *Infect Immun,* **62** : 2244-2248, 1994.

40. Alfa MJ, Degagne P and Totten PA : *Haemophilus ducreyi* hemolysin acts as a contact cytotoxin and damages human foreskin fibroblasts in cell culture., *Infect Immun,* **64** : 2349-2352, 1996.

41. Nishibuchi M, Fasano A, Russell RG et al. : Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin., *Infect Immun,* **60** : 3539-3545, 1992.

42. Cavalieri SJ, Snyder IS : Cytotoxic activity of partially purified *Escherichia coli* alpha heamolysin., *J Med Microbiol,* **15** : 11-21, 1982.

43. Haque MA, Ohki K, Kikuchi M et al. : Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea., *J Clin Microbiol,* **32** : 1109-1111, 1994.

44. Jonas D, Schultheis B, Klas C et al. : Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes., *Infect Immun,* **61** : 1715-1721, 1993.

45. Stevens DL, Mitten J and Henry C : Effects of alpha and theta toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes., *J Infect Dis,* **156** : 324-333, 1987.

46. Walev I, Weller U, Strauch S et al. : Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase（beta-toxin）of *Staphylococcus aureus., Infect Immun,* **64** : 2974-2979, 1996.

〔原　著〕

ヒトラクフェリンがヒト単球系細胞のケモタキシスに与える影響

湯本　泰弘，中島　啓介，藤原　　純，池田　雅美，小鷲　悠典

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

Effects of human lactoferrin on the chemotactic response of human monocytic cells

Yasuhiro YUMOTO, Keisuke NAKASHIMA,
Jun FUJIWARA, Masami IKEDA, Yusuke KOWASHI

Department of Periodontology and Endodontology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Human lactoferrin（hLf）has been reported to inhibit lipopolysaccharide（LPS）interaction with CD14 by suppressing TNF−α production of LPS−stimulated monocytes. However, it is unclear whether hLf affects the chemotaxis of monocytes. The present study investigated the effects of hLf on the monocyte chemotactic response to LPS. Human monocytic cells, THP−1, were cultured in RPMI1640 medium in the presence（treated）or absence（untreated）of 1α, 25−Dihydroxyvitamin D_3（100 nM）for 24 hr.The THP−1 cells were then washed and transferred to the upper chamber set in a 24−well culture plate；the medium in the lower chamber contained either formyl−methionyl−leucyl−phenylalanine（fMLP；100 nM），LPS from *Escherichia coli*（10 ng/ml）,or purified hLf（200 μg/ml）. Following a 1−hr incubation, the membrane on the floor of the upper chamber was removed and stained with Diff−Quik® to measure the absorbance at 595 nm. Quantification of the chemotactic response of cells was made by calculation of the chemotactic index（absorbance in the presence of chemoattractants/ absorbance in the absence of chemoattractants）. Cell growth was monitored with Alamar Blue®. The TNF−α and LDH levels in the culture supernatant were also measured. In the untreated cells, the mean chemotactic indices of fMLP, LPS, and hLf were 3.78, 3.19, and 1.75, respectively. The indices of fMLP + hLf and LPS + hLf were 3.30 and 2.09. Similar results were observed in the treated cells. Cell growth was not affected by the addi-

受付：平成16年３月30日

tion of fMLP, LPS, or hLf. The TNF−α and LDH levels in culture supernatant increased as a result of the introduction of LPS；however, the elevated levels were reduced by the addition of hLf. These findings suggest that hLf suppresxl by the neutrophils is bound to LPS, which leads to the inhibition of TNF−α release and the chemotactic response to LPS.

Key words：Lactoferrin, Chemotaxis, Monocyte, THP−1, CD14

緒　　言

生理学的抗菌物質として知られるヒトラクトフェリン（hLf）は，分子量約80 kDaで692アミノ酸残基からなる鉄結合糖蛋白質で，乳汁，涙，唾液などの外分泌液あるいは好中球の二次顆粒などに広く分布している．好中球由来のhLfは生体内で感染や炎症が生じると大量に放出される．最近，hLfがグラム陰性菌のリポ多糖（LPS）と結合することによりその生物学的活性を抑制することが報告され，宿主防御因子の一つとして注目されている[1−5]．

歯周炎は歯面あるいは歯根面に沈着したプラークによって発症し，細菌と感染防御機構との間の相互作用によって増悪，緩解を繰り返しながら進行する．その炎症性反応は，プラーク中に存在する歯周病原性細菌およびその構成成分の一つであるLPSが歯周ポケット上皮を通過し歯肉に入り込むことにより惹起される．炎症性反応に伴い産生された炎症性メディエーターにより毛細血管の透過性が亢進し，白血球が組織内に限らず歯周ポケット内にまで遊走することが知られている．歯周ポケット内の歯肉溝滲出液（GCF）中および歯周組織には毛細血管から浸出してきたそれら炎症性細胞の他に好中球由来のhLfが存在している．1980年代から，歯周病研究の領域でもGCF中のhLf量と歯周病の病態との関連性について研究がされてきた．Smithら[6]は成人性歯周炎患者では健常者に比較してGCF中のhLf量が多いことを報告したが，hLfは好中球中の二次顆粒に存在するため歯周ポケットにおける好中球の簡便なマーカーとして考えられてきた．また，1990年代になってからはKalfasらの研究グループが，歯周病細菌へのhLfの結合[7]，歯周病原性細菌の線維芽細胞あるいは上皮細胞への付着に対するhLfの影響[8]，歯周病原性細菌によるhLfの分解[9]などについて報告している．しかしそのhLfが白血球の走化性に与える影響や，歯周病原性細菌由来のLPSと結合し生物学的活性に与える影響については未だ不明な点が多い．

本研究では，宿主防御機構において重要な役割を果たしている単球の化学走化性（ケモタキシス）にhLfが与える影響を解明することを目的とした．

材料および方法

1．供試細胞株と培養方法

供試細胞株として，ヒト骨髄単球性白血病細胞株THP−１（ヒューマンサイエンス振興財団研究資源バンク，大阪，日本）を使用した．細胞はRPMI1640培地（Gibco Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A）に非働化ウシ胎仔血清（FCS；Gibco）を10％添加し，ペニシリンGカリウム（100 U/ml，明治製菓，東京）および硫酸ストレプトマイシン（100 μg/ml，Sigma Chemical Co., St Louis, MO, U.S.A）を含む培地（10% FCS 添加RPMI 1640 培地）を使用し37℃，5%CO_2存在下で培養した．

2．試薬

hLfとして精製ヒトラクトフェリン（ICN Pharmaceuticals, Inc., Aurora, OH, U.S.A）を使

用した．走化因子のポジティブコントロールとして Formyl－methionyl－leucyl－phenylalanine（fMLP；Sigma），LPSとして*Escherichia coli*（O 111：B 4）由来LPS（Sigma）を使用した．また，THP－1細胞表層のCD14発現促進のために1α,25−Dihydroxyvitamin D_3（活性型ビタミン D_3；Sigma）を使用した．

3．測定法

1）培養上清中TNF−α量および乳酸脱水素酵素（LDH）活性の測定

1×10^6個／mlに調整したTHP－1細胞にhLf（200 μg/ml）あるいはLPS（10 ng/ml）をそれぞれ単独あるいは同時に添加し，24時間37℃，5%CO_2存在下で培養した．1,000×gで10分間遠心操作を行った後，培地上清中TNF−α量およびLDH活性をそれぞれヒトTNF−α ELISAキット（BioSource International, Camarillo, California, U.S.A）およびCytotoxicity detection kit（Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany）を使用して測定した．

2）細胞増殖測定

1×10^6個／mlに調整したTHP－1細胞にhLf（200 μg/ml）あるいはLPS（10 ng/ml）を単独あるいは同時に添加し，24時間37℃，5%CO_2存在下で培養した．培地にアラマーブルー（和光純薬，大阪）を10 μl添加し4時間37℃，5%CO_2存在下で培養し，その後に測定波長570 nm，参照波長600 nmで吸光度を測定し細胞数を測定し細胞増殖の指標とした．

3）化学走化性（ケモタキシス）の測定

あらかじめ活性型ビタミンD_3を培地に添加することでCD14発現を増強させた活性化THP－1細胞および未添加の非活性化THP－1細胞を各々1×10^6個／mlとなるように調整した．ケモタキシスチャンバーとして24穴トランスウェル（Corning Inc, NY, U.S.A），培地としてRPMI1640にヒト血清アルブミン（Sigma）を1％添加したものを使用した．上部チャンバーに1×10^6個／mlに調整したTHP－1細胞を入れ，下部チャンバーに走化因子としてfMLP（100 nM），hLf（200 μg/ml）あるいはLPS（10 ng/ml）を単独あるいは同時に入れて1時間37℃，5%CO_2存在下で培養した．培養後，メンブレンを貫通している細胞をディフクイック（国際試薬，神戸）を用いて染色し，595 nmにおける吸光度を測定した．化学走化性は，ケモタキシスインデックス（CI；走化性因子存在下での吸光度／走化性因子非存在下での吸光度）を用いて評価した．

4．統計処理

測定値間の比較は分散分析により行い，危険率5％未満を有意と判定した．

結　　果

1．hLf添加による培養上清中TNF−α量およびLDH活性への影響

THP－1細胞培養系にhLfを単独で添加してもTNF−α産生量は変化しなかった（図1）．TNF−α産生量はLPSを添加すると有意に（約100倍）に増加したが，LPSと同時にhLfを添加するとLPSを単独で添加した場合と比較して有意に（約2／3）減少した．LDH活性はTHP－1細胞培養系にhLfを単独で添加すると有意に減少した（図2）．また，LDH活性はLPSを単独で添加すると有意に（約2倍）上昇したが，LPSと同時にhLfを添加するとLDH活性の上昇は約1.5倍にとどまった．

2．hLf添加による細胞増殖への影響

THP－1細胞培養系にhLfあるいはLPSを添加することにより細胞増殖の抑制傾向が認められたが，統計学的有意差は認められなかった（図3）．

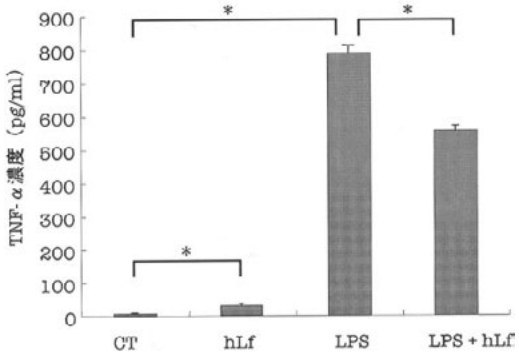


図1　hLfがTNF−α産生に与える影響
CT：対照群，hLf：ヒトラクトフェリン（200 μg/ml），LPS：*E.coli*由来リポ多糖（10 ng/ml）
*p<0.05

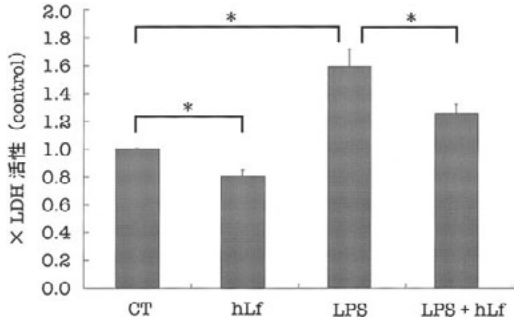


図2　hLfがLDH活性に与える影響
CT：対照群，hLf：ヒトラクトフェリン（200 μg/ml），LPS：*E.coli*由来リポ多糖（10 ng/ml）
*p<0.05

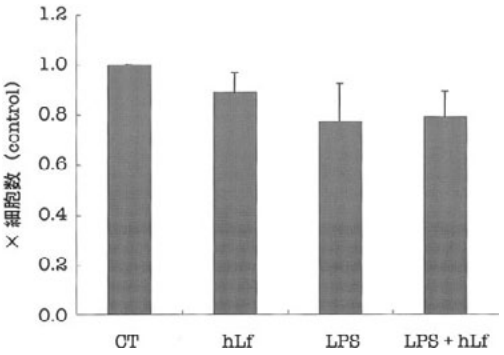


図3　hLfが細胞増殖に与える影響
CT：対照群，hLf：ヒトラクトフェリン（200 μg/ml），LPS：*E.coli*由来リポ多糖（10 ng/ml）

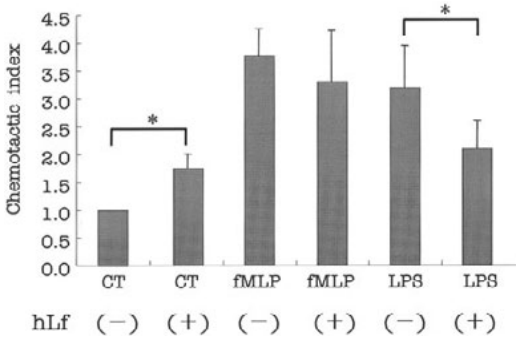


図4　hLfがケモキシスに与える影響（ビタミンD_3非添加群）
CT：対照群，hLf：ヒトラクトフェリン（200 μg/ml），fMLP：ポジティブコントロール（100 nM），LPS：*E.coli*由来リポ多糖（10 ng/ml）
*p<0.05

3．hLf添加によるケモタキシスへの影響

非活性化THP−1細胞（活性型ビタミンD_3非添加）においては，hLfを単独で添加するとCIが有意に増加した（図4）．また，fMLP, LPSを各々単独で添加するとCIが有意に増加した．fMLP, LPS各々とhLfを同時に添加するとCIはfMLPでは有意に変化しなかったが，LPSでは有意に減少した．

活性化THP−1細胞（活性型ビタミンD_3添加群）においては，コントロール群のCIが非活性化細胞の約4倍に上昇した（図5）．hLfを単独

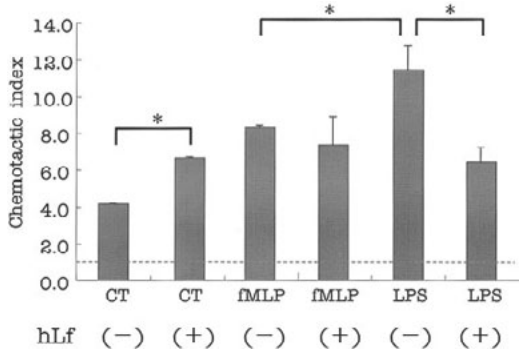


図5　hLfがケモキシスに与える影響（ビタミンD_3添加群）
CT：対照群，hLf：ヒトラクトフェリン（200 μg/ml），fMLP：ポジティブコントロール（100 nM），LPS：*E.coli*由来リポ多糖（10 ng/ml）（波線はビタミンD_3非添加群における対照群のCIを表す）*p<0.05

で添加するとCIは有意に増加した．fMLP, LPSを各々単独で添加するとCIはコントロール群に比べ有意に増加した．非活性化細胞と異なり，LPSを添加した場合はfMLPを添加した場合に比べて有意に高いCIを示した．非活性化細胞の場合と同様に，fMLP, LPS各々とhLfを同時に添加するとCIはfMLPでは有意に変化しなかったが，LPSでは有意に減少した．

考　　察

TNF−αは，細菌由来のLPS刺激により単球・マクロファージなどから産生され局所での起炎症反応，細胞障害反応，アポトーシスなどを引き起こし，炎症においてその発症と病態の進行および修復において重要な役割を果たすと考えられている．特にTNF−αの重要な作用の一つである破骨細胞の活性化とそれに伴う骨吸収は，歯周病の進行に大きく関与している[10−13]．

本研究では，まず，hLfの添加がLPS刺激によりTHP−１細胞から産生されるTNF−αに影響を与えるか検討した．その結果，1）THP−１細胞培養系にhLfを添加してもTNF−α産生量に大きな変化は認められなかった，2）LPSを添加するとTNF−α産生量は約100倍に増加した，3）LPSと同時にhLfを添加するとTNF−α産生量はLPS単独添加時と比べて有意に減少した，という所見が得られた．これらの結果はChoeらの報告と一致している[14]．Assumaらは実験的歯周炎モデルにおいてTNF−αに対するアンタゴニストを用いることによって炎症性反応や骨吸収を抑制したと報告している[15]．また，Stashenkoらは歯周病患者において健康な部位と比べて炎症のある歯周組織では有意にTNF−αの量が高かったと報告している[16]．さらに，Robertsらは慢性の成人性歯周炎において健康な歯周組織と比べて炎症のある歯周組織では有意にTNF−αのmRNA発現量が高かったと報告している[17]．これらのことから，hLfの添加により認められたTHP−１細胞からのTNF−α産生抑制は，歯周組織における炎症反応を軽減している可能性が示唆された．

本研究では，THP−１細胞培養系にhLfを添加するとLDH活性が抑制された．LPSと同時にhLfを添加するとLPS単独添加時と比べ有意にLDH活性が抑制された．これらの所見から，hLfには細胞死を抑制する作用がある可能性も考えられた．Valentiらは，感染実験においてラクトフェリンで細胞を前処理することによりアポトーシスを抑制したと報告している[18]．Lamsterらは歯周ポケットが深くなるにつれてGCF中のLDH活性が上昇することを報告している[19]．Smithらは成人性歯周炎患者では健常人と比べてGCF中のLDH活性が高いことを報告している[6]．また，Wolffらは歯周炎における細菌学的・臨床学的視標が悪化するに比例してGCF中のLDH活性が上昇することを報告している[20]．本研究の結果とこれまでの報告を考えあわせると，hLfがLPSの作用を緩和することにより過剰なTNF−α産生および細胞死を抑制し歯周病原細菌に対する宿主防御機構の一翼を担っている可能性が示唆された．

hLfが細菌や真菌，ウイルスなどの増殖・成長を抑制する報告は多く見られる．しかし細胞増殖に与える影響については様々で，成長を促進したり抑制したりと研究に用いる細胞により異なっている[21−23]．本研究ではTHP−１細胞の成長・増殖にhLfが与える影響を調べた．THP−１細胞にhLfあるいはLPSを単独で，LPSおよびhLfを同時に添加し，28時間後に細胞増殖に与える影響を調べたが，有意差は認められなかった．これらの所見から，hLfはTHP−１細胞ではその増殖に影響を与えず，細胞毒性の観点からhLfは生体に対して安全であることが示唆される．今後は，さらなる安全性を確認するために他の様々な細胞を用いてこれを検証する必要があると考えられた．

グラム陰性菌の細胞膜に由来するLPSは，生体に対し毒素活性を示すことにより様々な炎症性反応を引き起こす[24]．細菌により感染した生体内局所ではサイトカインが産生され，白血球が遊走して炎症が惹起される．走化性因子には，非常に強力なfMLPのような細菌性蛋白質やペプチド，そして宿主の走化因子であるケモカイン（特にIL−８），ロイコトリエンＢ４などの好中球産生分子，及び補体系の活性化に由来する分子（Ｃ５a）などがある．感染部位への白血球の遊走は炎症の第一段階であり，生体免疫の上で重要な役割を果たしている．近年，LPSが単球やマクロファージを活性化する機序についての研究が広くなされてきた．LPS binding protein（LBP）は炎症の急性期に血清中に多く認められるLPS結合タンパクである[25]．LPSのリピドAにLBPが結合しLPS・LBP複合体として単球・マクロファージの細胞膜表層に存在するCD14に作用することが解明された．CD14はLPS受容体として免疫学的に重要な役割を担い，活性型ビタミンD_3の刺激によりその数が増加することが報告されている[26]．Provvediniらは前駆体単球は活性型ビタミンD_3刺激によって単球やマクロファージへ分化することを報告した[27]．Rigbyらは単球を活性型ビタミンD_3で刺激すると単球の様々な生物学的活性を増幅させることを報告した[28]．これらの報告から本研究では活性型ビタミンD_3によって活性化した状態でのケモタキシスの測定も宿主免疫機構を反映する上で重要であると考えた．本研究では，活性型ビタミンD_3添加により活性化したTHP−１細胞では，非活性化細胞に比べ対照群で約４倍ケモタキシスが亢進しており，全体的なケモタキシスの亢進が認められた．この所見は，活性型ビタミンD_3で20時間前処理を行うとfMLPによる単球のケモタキシスを増加させ，また化学誘引物質がなくてもケモタキシスが亢進するというGirasoleらの報告と一致する[29]．特に，LPS添加群においてその傾向が強く認められた．活性型ビタミンD_3刺激によりCD14分子とfMLP受容体が発現することが知られている[30]．活性化THP−１細胞では，非活性化細胞と異なりLPS添加群のCIがfMLP添加群より有意に高かったことから，活性型ビタミンD_3刺激によりCD14分子がfMLP受容体より影響を受けやすい可能性が示唆された．また，活性型ビタミンD_3添加群においてもhLfを添加することによりLPS添加群のケモタキシス亢進は抑制されたが，fMLP添加群には影響を与えなかったことから，hLfはfMLP受容体には影響を与えない可能性が示唆された．

本研究の結果から，hLfは通常は単球のケモタキシスを促進している可能性が示唆された．単球にはLfの受容体が存在することが知られており[31,32]，これらの受容体が単球のケモタキシスに関与している可能性も示唆される．従って，今後はhLfが単球に作用する機序や，細胞内でのシグナル伝達について詳しく調べる必要があると考えられる．一方，LPS存在下ではhLfは単球のケモタキシスを抑制している．hLfはLPSのリピドAに結合することが報告されており[1]，LBPのアンタゴニストとして働くことによりLPS・LBP複合体の形成を阻害していることが示唆され，結果的にLPSがCD14に結合するのを阻害しケモタキシスを抑制している可能性が考えられる．この抑制的な作用機序は本研究におけるLPS刺激によるTNF−α産生および細胞死の抑制においても同様のことが考えられる．今後，CD14を介してのLPSシグナル伝達にhLfが与える影響や，最近研究が盛んに行われてるLPSの別の受容体であるToll−like receptorにあたえるhLfの作用についても詳しく検証する必要があると考えられる．

結　　論

１．THP−１細胞にLPSを単独で添加すると，

培養上清中のTNF−α濃度およびLDH活性が有意に上昇した．LPSと同時にhLfを添加すると，TNF−α濃度およびLDH活性は有意に低下した．

2．THP−1細胞にLPSあるいはhLfを単独で添加しても細胞増殖には影響が認められなかった．

3．THP−1細胞にfMLPあるいはLPSを単独で添加するとケモタキシスの亢進が認められた．活性型ビタミンD_3により活性化した細胞に，LPSを添加するとfMLPを添加した場合よりもさらにケモタキシスを亢進させた．

4．hLfはfMLP添加によるケモタキシスの亢進には影響を与えなかったが，LPS添加によるケモタキシス亢進は有意に抑制した．活性型ビタミンD_3によりTHP−1細胞が活性化し表層のCD14分子の発現が増強されると，hLf添加による抑制効果はさらに著明になった．

以上の結果より，好中球から放出されるhLf自身は単球のケモタキシスを促進するが，歯周ポケット内のような環境ではLPSによる過剰なケモタキシス亢進を抑制し宿主防御機構に関与している可能性が示唆された．

謝　　辞

本稿を終わるにあたり，終始，本研究において御指導を頂きました故小鷲悠典教授に心より感謝を申し上げます．

文　　献

1．Appelmelk BJ, An YQ, Geerts M, Thijs BG, de Boer HA, MacLaren DM, de Graaff J and Nuijens JH：Lactoferrin is a lipid A−binding protein. *Infect Immun*：2628−2632, 1994.

2．Caccavo D, Afeltra A, Pece S, Giuliani G, Freudenberg M, Galanos C and Jirillo E：Lactoferrin−lipid A−lipopolysaccharide interaction：inhibition by anti−human lactoferrin monoclonal antibody AGM10. 14. *Infect Immun*：4668−4672, 1999.

3．Elass−Rochard E, Legrand D, Salmon V, Roseanu A, Trif M, Tobias PS, Mazurier J and Spik G：Lactoferrin inhibits the endotoxin interaction with CD14 by competition with the lipopolysaccharide−binding protein. *Infect Immun*：486−491, 1998.

4．Miyazawa K, Mantel C, Lu L, Morrison DC and Broxmeyer HE：Lactoferrin−lipopolysaccharide interactions. Effect on lactoferrin binding to monocyte/macrophage−differentiated HL−60 cells. *J Immunol*：723−729, 1991.

5．Wang D, Pabst KM, Aida Y and Pabst MJ：Lipopolysaccharide−inactivating activity of neutrophils is due to lactoferrin. *J Leukoc Biol*：865−874, 1995.

6．Smith QT, Au GS, Freese PL, Osborn JB and Stoltenberg JL：Five parameters of gingival crevicular fluid from eight surfaces in periodontal health and disease. *J Periodontal Res*：466−475, 1992.

7．Kalfas S, Andersson M, Edwardsson S, Forsgren A and Naidu AS：Human lactoferrin binding to *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Prevotella melaninogenica*. *Oral Microbiol Immunol*：350−355, 1991.

8．Alugupalli KR, Kalfas S, Edwardsson S, Forsgren A, Arnold RR and Naidu AS：Effect of lactoferrin on interaction of *Prevotella intermedia* with plasma and subepithelial matrix proteins. *Oral Microbiol Immunol*：174−179, 1994.

9．Alugupalli KR and Kalfas S：Degradation of lactoferrin by periodontitis−associated bacteria. *FEMS Microbiol Lett*：209−214, 1996.

10．Thomson BM, Mundy GR and Chambers TJ：Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol*：775−779, 1987.

11．Bertolini DR, Nedwin GE, Bringman TS, Smith DD and Mundy GR：Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation *in vitro* by human tumour necrosis factors. *Nature*：516−518, 1986.

12．Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR and Roodman GD：Interleukin−1and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *J Bone Miner Res*：113−118, 1989.

13．Johnson RA, Boyce BF, Mundy GR and Roodman GD：Tumors producing human tumor necrosis factor induced hypercalcemia and osteoclastic bone resorption

in nude mice. *Endocrinology* : 1424–1427, 1989.

14. Choe YH and Lee SW : Effect of lactoferrin on the production of tumor necrosis factor–alpha and nitric oxide. *J Cell Biochem* : 30–36, 1999.

15. Assuma R, Oates T, Cochran D, Amar S and Graves DT : IL–1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* : 403–409, 1998.

16. Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J and Socransky SS : Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* : 504–509, 1991.

17. Roberts FA, McCaffery KA and Michalek SM : Profile of cytokine mRNA expression in chronic adult periodontitis. *J Dent Res* : 1833–1839, 1997.

18. Valenti P, Greco R, Pitari G, Rossi P, Ajello M, Melino G and Antonini G : Apoptosis of Caco– 2 intestinal cells invaded by *Listeria monocytogenes* : protective effect of lactoferrin. *Exp Cell Res* : 197–202, 1999.

19. Lamster IB, Harper DS, Fiorello LA, Oshrain RL, Celenti RS and Gordon JM : Lysosomal and cytoplasmic enzyme activity, crevicular fluid volume, and clinical parameters characterizing gingival sites with shallow to intermediate probing depths. *J Periodontol* : 614–621, 1987.

20. Wolff LF, Smith QT, Snyder WK, Bedrick JA, Liljemark WF, Aeppli DA and Bandt CL : Relationship between lactate dehydrogenase and myeloperoxidase levels in human gingival crevicular fluid and clinical and microbial measurements. *J Clin Periodontol* : 110–115, 1988.

21. Amouric M, Marvaldi J, Pichon J, Bellot F and Figarella C : Effect of lactoferrin on the growth of a human colon adenocarcinoma cell line–comparison with transferrin. *In Vitro* : 543–548, 1984.

22. Hagiwara T, Shinoda I, Fukuwatari Y and Shimamura S : Effects of lactoferrin and its peptides on proliferation of rat intestinal epithelial cell line, IEC–18, in the presence of epidermal growth factor. *Biosci Biotechnol Biochem* : 1875–1881, 1995.

23. Wolf JS, Li D, Taylor RJ and O'Malley BW, Jr. : Lactoferrin inhibits growth of malignant tumors of the head and neck. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* : 245–249, 2003.

24. Rietschel ET, Kirikae T, Schade FU, Ulmer AJ, Holst O, Brade H, Schmidt G, Mamat U, Grimmecke HD, Kusumoto S and et al. : The chemical structure of bacterial endotoxin in relation to bioactivity. *Immunobiology* : 169–190, 1993.

25. Tobias PS, Mathison JC and Ulevitch RJ : A family of lipopolysaccharide binding proteins involved in responses to gram–negative sepsis. *J Biol Chem* : 13479–13481, 1988.

26. Antal–Szalmas P, Strijp JA, Weersink AJ, Verhoef J and Van Kessel KP : Quantitation of surface CD14 on human monocytes and neutrophils. *J Leukoc Biol* : 721–728, 1997.

27. Provvedini DM, Deftos LJ and Manolagas SC : 1, 25–Dihydroxyvitamin D_3 promotes *in vitro* morphologic and enzymatic changes in normal human monocytes consistent with their differentiation into macrophages. *Bone* : 23–28, 1986.

28. Rigby WF : The immunobiology of vitamin D. *Immunol Today* : 54–58, 1988.

29. Girasole G, Wang JM, Pedrazzoni M, Pioli G, Balotta C, Passeri M, Lazzarin A, Ridolfo A and Mantovani A : Augmentation of monocyte chemotaxis by 1 alpha, 25–dihydroxyvitamin D_3. Stimulation of defective migration of AIDS patients. *J Immunol* : 2459–2464, 1990.

30. Polla BS, Werlen G, Clerget M, Pittet D, Rossier MF and Capponi AM : 1, 25–dihydroxyvitamin D_3 induces responsiveness to the chemotactic peptide f–Met–Leu–Phe in the human monocytic line U937 : dissociation between calcium and oxidative metabolic responses. *J Leukoc Biol* : 381–388, 1989.

31. Birgens HS : The monocytic receptor for lactoferrin and its involvement in lactoferrin–mediated iron transport. *Adv Exp Med Biol* : 99–109, 1994.

32. Birgens HS, Hansen NE, Karle H and Kristensen LO : Receptor binding of lactoferrin by human monocytes. *Br J Haematol* : 383–391, 1983.

〔原　著〕

HSY-EA1 細胞におけるprotease-activated receptor(PAR)-１とPAR-２の相互脱感作機構

設楽　彰子，谷村　明彦，根津　顕弘，森田　貴雄，東城　庸介

北海道医療大学歯学部歯科薬理学教室

Cross-desensitization between PAR-１and PAR-２in HSY-EA１cells.

Akiko SHITARA, Akihiko TANIMURA,
Akihiro NEZU, Takao MORITA and Yosuke TOJYO

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The mechanisms for cross-desensitization between protease-activated receptor（PAR）-1and PAR-2 in human parotid cell line, HSY-EA1 cells were examined. The HSY-EA1 cells strongly expressed mRNAs for PAR-1 and PAR-2, whereas the expression of PAR-3 and PAR-4 was very limited. Stimulation of HSY-EA1 cells with various concentrations of thrombin or trypsin produced a striking increase in $[Ca^{2+}]_i$ followed by a slow return to the basal level within 2-3 min. When cells were pretreated with various concentrations of trypsin, the subsequent Ca^{2+} response with thrombin diminished in a dose-dependent manner over the trypsin concentration, indicating that trypsin desensitized PAR-1. The desensitization of the thrombin-induced Ca^{2+}response was also induced by the pretreatment with PAR-2 agonist peptide, SLIGKV. These results suggest that trypsin-induced inactivation of PAR-1 is due to the heterologous desensitization of PAR-1 through the activation of PAR-2 in addition to a proteolytic degradation of PAR-1.

Key words：protease-activated receptor（PAR）, thrombin, trypsin, SLIGKV, desensitization.

緒　　言

Protease-activated receptor（PAR）は受容体分子内にリガンドとなるアミノ酸配列とリガンド結合部を持つというユニークな構造をした７回膜貫通型受容体である．現在までに，PAR-１からPAR-４まで４つのサブタイプが同定され，PAR-1,3,4はトロンビン，PAR-2,4はトリ

受付：平成16年４月１日

プシンによって活性化されることが知られている[1~3]．これらのプロテアーゼはPARの細胞外N末端の特定部位を切断し，リガンドとなる新しいN末端を露出させる．このN末端が受容体分子内の細胞外第二ループに存在するリガンド結合部に結合することによって，GTP結合タンパク質（$G_{q/11}$）を介した細胞内カルシウムイオン濃度（$[Ca^{2+}]_i$）の上昇を誘起する[3,4]．多くの場合，$G_{q/11}$を介する$[Ca^{2+}]_i$上昇反応では一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇に続く持続相が認められるが，PARを介する反応では一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇の後，速やかに刺激前の$[Ca^{2+}]_i$まで戻るという特徴的なパターンを示す．この反応は，活性化されたPARが速やかに脱感作される同種脱感作によると考えられている．PARの同種脱感作には受容体のリン酸化や内在化，あるいはリガンド結合部位の不活性化が関与することが報告されている[5~8]．このような受容体の同種脱感作の他に，異なる種類の受容体間で脱感作が起こる異種脱感作が知られているが，PARの異種脱感作についてはよくわかっていない．本研究では，ヒト耳下腺培養細胞（HSY−EA1 細胞）を用いてPAR−１とPAR−２間に起こる異種脱感作についての解析を行った．

材料および方法

１．試薬類

PAR−２アゴニストペプチドであるSLIGKVはBachem（Bubendorf, Switzerland）から，牛血漿トロンビンは伊東ハム食品から，Fura−２アセトキシメチルエステル（Fura−２／AM）は同人化学研究所より入手した．

２．細胞培養

ヒト耳下腺細胞株であるHSY−EA1 細胞はDulbecco’s Modified Eagle’s Medium Nutrient Mixture F−12Ham培地（Sigma）に２mMグルタミン酸，100μg/mlのペニシリンとストレプトマイシンを加えた培地にて培養した[9]．

３．細胞内遊離カルシウム濃度（$[Ca^{2+}]_i$）測定

HSY−EA１細胞は直径100mmのディッシュに１×10^6個，もしくは直径60mmのディッシュに４×10^5個の細胞を播種し，４～６日培養した．細胞はCa^{2+}とMg^{2+}を含まないリン酸バッファー（Gibco）でディッシュから遊離した後，20mMヘペス（pH7.4）と0.2％牛血清アルブミン（BSA）を添加したハンクス液（HBSS−H）に懸濁した．細胞懸濁液に２μMのFura−２／AMを加え，37℃で30分間振とうしたのち，新しいHBSS−Hに再懸濁し，使用まで室温で保持した．

Fura−２の蛍光強度は，蛍光光度計（日立F 2000）を用いて37℃で，340nmと380nmの励起光によって発生する510nmの蛍光強度を測定した．$[Ca^{2+}]_i$はGrynliewczらの方法[10]に従って算出した．

４．PAR−１のRT−PCR分析

トライゾール（Gibco BRL）を用い，メーカーの指示するプロトコールに則って全RNAを抽出した．抽出したRNA（１mg）から，oligo−d$(T)_{16}$プライマー（Roche Molecular Biochemicals）と逆転写酵素（東洋紡）を使ってcDNAを合成した．PAR受容体の各サブタイプのセンスおよびアンチセンスのプライマーは以下のとおりである．PAR−1：5′−CTA GGT TGG TAG AGT TTA GCC C−3′（forward），5′−TGA TCA GTT CAC AGC CAA TCC C−3′（reverse）：ヒトのPAR−１cDNA配列の1921～1942と2413～2434のヌクレオチドに対応．PAR−2：5′−AAT GCT GCG ATC TTC TGC CAT G−3′（forward），5′−CCT ACT GTG CAA TTC CCA TCT G−3′（reverse）：ヒトのPAR−２cDNA配列の948～969と1356～1377のヌクレオチドに対応．PAR−3：5′−CGT CCA TCC TTT CAC CTA CCG G−３′（forward），5′−TCT CTG TGA TGG CTG TCC TTG T−3′（reverse）：ヒトのPAR−３cDNA配列の729～750と1287～1308のヌクレオチドに対

応．PAR－４：5′－TCT ATG GTG CCT ACG TGC CCA－3′（forward），5′－TTC TGA GGA CAC CAC CCA CAC TG－3′（reverse）：ヒトのPAR－４cDNA配列の955～975と1313～1335のヌクレオチドに対応．95℃で10分のInitial denaturation stepに続いてPAR－１とPAR－３についての反応をGeme Amp PCR system2400（Perkin Elmer Biosystems）で，94℃で１分のdenaturation step，64℃で１分のannealing，72℃で１分のextension stepを30および35サイクル実行した．Final extension stepは72℃で７分行った．GAPDHのRT－PCR分析のプライマーと条件はすでに述べられているとおりである[11]．PCR産物はエチジウムブロマイドを含む２％アガロースゲル（タカラ）を使用した電気泳動で分画し，ATTO Cool Severを使ったUVイルミネーターで分析した．

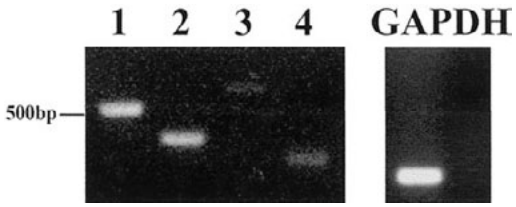


Fig. 1. RT-PCR analysis of PARs in HSY-EA1 cells. RT-PCR was preformed using the primers specific to PAR-1(lane1), PAR-2 (lane2), PAR -3(lane3), PAR-4(lane4) and GAPDH.

結　　果

HSY－EA１細胞に存在するPAR受容体のサブタイプを同定するためPAR－1, PAR－2, PAR－3, PAR－４それぞれに特異的なプライマーを用いてRT－PCR分析を行った．各サブタイプに特異的なプライマーにより35サイクルでRT－PCRを行った結果，PAR－１とPAR－２の強いバンドが検出されたが，PAR－３とPAR－４は非常に微量であった（Fig. 1）．PAR－３は30サイクルで増幅した時は検出できなかった（data not shown）．検出されたバンドのサイズはPAR－１で513bp，PAR－２で429bp，PAR－３で579bp，PAR－４で380bpであり予想通りの分子量であった．さらにPCR産物の制限酵素切断パターンから，それぞれのmRNAであることが同定された．これらのことからHSY－EA１細胞にはPAR－１とPAR－２が主に発現しており，PAR－３とPAR－４はごくわずかしか存在していないことが確認された．

PAR受容体に対するトロンビンとトリプシンの作用を明らかにするために，HSY－EA１細胞をさまざまな濃度のトロンビンあるいはトリプシンで刺激した．HSY－EA１細胞をPAR－１を活性化するトロンビン（0.2～20unit/ml）で刺激すると，急激な一過性の［Ca^{2+}］$_i$上昇がおこった．トロンビンによる［Ca^{2+}］$_i$上昇のピーク

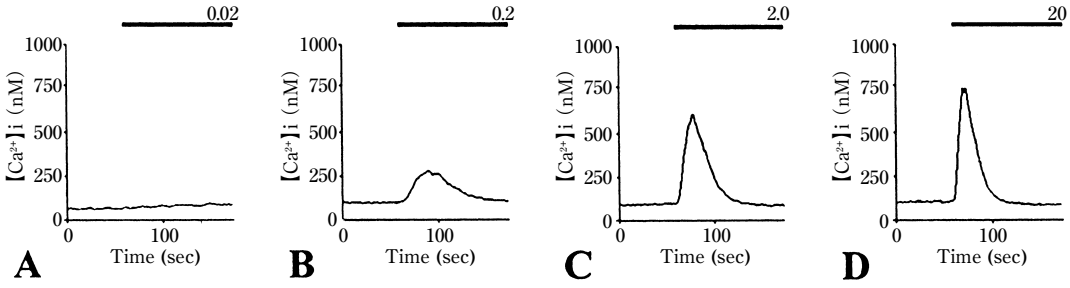


Fig. 2. Thrombin-induced Ca^{2+}mobilization in HSY EA１ cells.
The fura-2-loaded HSY-EA１ cells were exposed to 0.02U/ml(A), 0.2U/m (B), 2.0U/ml(C)and 20U/m(D)of thrombin. The presence of thrombin in the medium is indicated by a horizontal bar.

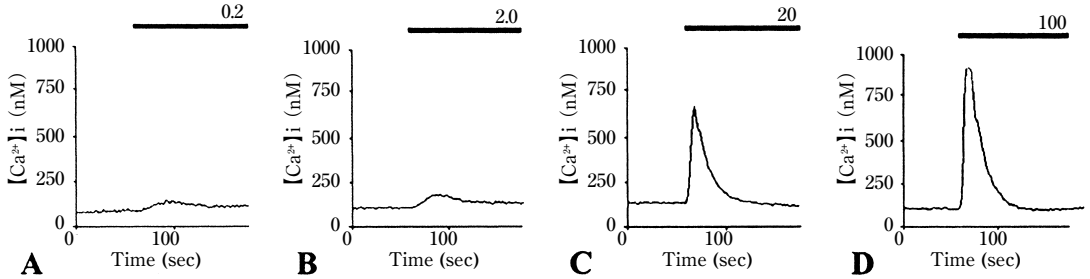


Fig.3. Trypsin-induced Ca^{2+}mobilization in HSY-EA 1 cells.
Fura-2-loaded HSY-EA 1 cells were exposed to 0.2U/ml(A), 2.0U/ml(B), 20U/ml(C)and 100 U/ml (D) of trypsin. The presence of trypsin in the medeium is indicated by a horizontal bar.

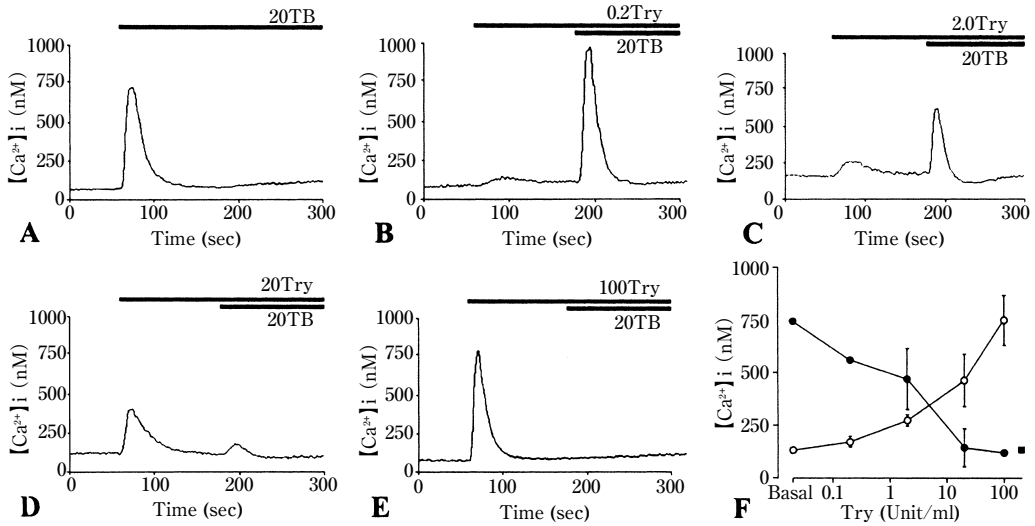


Fig. 4. Thrombin-induced Ca^{2+} responses in control (A) and trypin-pretreated cells (B-E).
(A):Cells were stimulated with 20U/ml thrombin in the absence of trypsin pretreatment. (B) - (E):Cells were initially stimulated with 0.2U/ml (B), 2.0U/ml (C), 20U/ml (D), 100U/ml (E) of trypsin for 2min and were subsequentry exposed to 20U/ml thrombin. The presence of trypsin and thrombin in the medium are indicated by a horizontal bar. (F):The increase in $[Ca^{2+}]_i$ above basal level after the first stimulation with various concentrations of trypsin (open circles) and after the second stimulation with 20U/ml thrombin (closed circles). Values shown are the mean±S.E. of six independent experiments.

の値はトロンビンの濃度に依存して増大するが，ピークから一分後ではいずれの濃度においてもbasal levelまで低下しており，他のGタンパク質共役型受容体の刺激でみられるような一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇に続く持続相は認められなかった（Fig.2A）．HSY-EA 1細胞をPAR-2を活性化するトリプシン（0.2～100unit/ml）で刺激した場合も同様に濃度依存的な一過性の$[Ca^{2+}]_i$上昇が観察された(Fig.2B)．このことから，トロンビンやトリプシンによるPAR受容体の活性化では，急激なCa^{2+}上昇に続いて受容体の脱感作が起こることが示された．

PAR-2刺激がPAR-1に与える影響を調べるため，HSY-EA 1細胞に様々な濃度のトリプシン（0.2～100unit/ml）を2分間作用させた後，最大反応を起こす20unit/mlのトロンビン刺激を行った．その結果，トロンビンによる$[Ca^{2+}]_i$上昇のピークの値は，前処置したトリプシンの濃度に依存して減少した（Figs.3＆4）．このことから，トリプシンはPAR-1を何らかの機

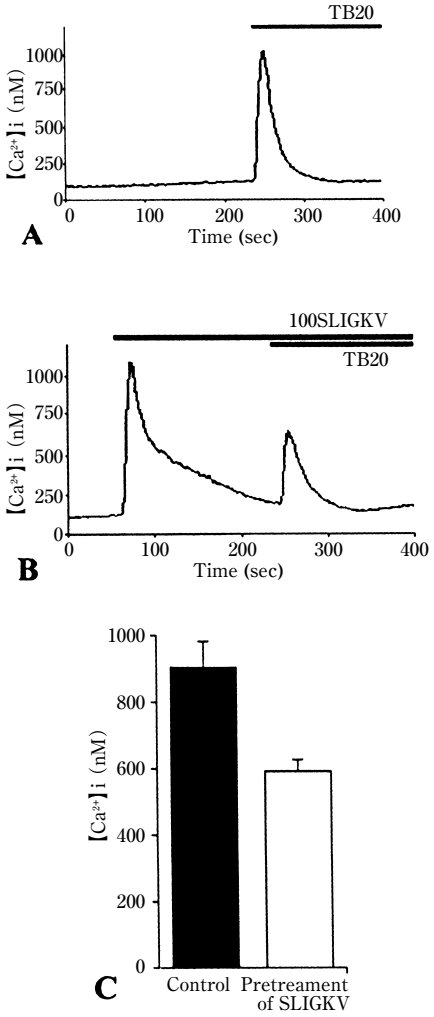


Fig.5. Effect of PAR-2 agonist peptide on the thrombin-induced Ca^{2+} responses.
Thrombin-induced Ca^{2+} responses in the presence (A) and absence (B) of the pretreatment with PAR-2 agonist peptide (SLIGKV).
The presense of SLIGKV (100U/ml) and thrombin in the medium are indicated by a horizontal bar. (C): Increases in $[Ca^{2+}]_i$ above basal level with or without pretreatment with 100 U/ml SLIGKV. Result shown are the mean±S.E. of ten independent experiments.

構で脱感作していることが示唆された．

PAR−1の脱感作がPAR−2の活性化によるものか，それともトリプシンのタンパク質分解作用によるものかを明らかにするために，PAR−2のアゴニストペプチドであるSLIGKVでHSY−EA 1細胞を前処置した3分後に最大反応を起こす20unit/mlのトロンビンを作用させた．前処置をしないコントロールと比較して，SLIGKVの前処置によりトロンビンの反応は～65%に減少した（Figs. 5& 6）．

考　　察

本研究ではトロンビンやトリプシンがHSY−EA 1細胞の$[Ca^{2+}]_i$を一過性に上昇させることを示した．トロンビンとトリプシンはPARを活性化して$[Ca^{2+}]_i$上昇を起こすことが知られている．今回観察された$[Ca^{2+}]_i$反応は，一過性の急激な上昇とこれに続く速やかな脱感作というPARに特徴的な$[Ca^{2+}]_i$反応を起こした．HSY−EA 1細胞ではPAR−1とPAR−2が強く発現していたことから，トロンビンとトリプシンはそれぞれPAR−1とPAR−2を介して$[Ca^{2+}]_i$反応を起こしたと考えられる．トロンビンはPAR−3とPAR−4に，トリプシンはPAR−4にも作用すると言われているが[1,2]，HSY−EA 1細胞におけるPAR−3とPAR−4の発現量はごく少量であったことから，その影響はほとんど無いと考えられる．

本研究ではHSY−EA 1細胞をトリプシンで前処置すると，トロンビンの反応が強く抑制されることを示した．トリプシンはPAR−2分子の細胞外ペプチド鎖を特定部位で切断することによって新しいN末端を露出させる．このN末端のアミノ酸配列（SLIGKV）が受容体分子内のリガンド結合部に結合することによって$[Ca^{2+}]_i$上昇反応を誘起する．しかし，トリプシンがPAR−2のみでなくPAR−1にも作用して不活性化する可能性が考えられる．実際，PAR−1のリガンドのC末端にトリプシンの基質になる部分があることが知られている[3,12]．一方，PAR−2の活性化を介してPAR−1の脱感作が起こる可能性も否定できない．そこで，トリプシンがPAR−2の活性化を介してPAR−1を脱感作

するのか，それともPAR−１を酵素的に切断することによって不活性化するのかを確認するために，PAR−２のアゴニストペプチドであるSLIGKVを用いた実験を行った．SLIGKVはN末端のリガンド結合部分の配列に基づいて合成したペプチドであり，ペプチド鎖を切断することなく，PAR−２のリガンド結合部に直接結合して活性化する．SLIGKVでPAR−２を刺激した後にトロンビン刺激を行うと，トロンビンによる反応は最大で60％程度に抑制された．SLIGKVのPAR−２に対する特異性は高く，PAR−１には作用しないと考えられていることから[13]，トリプシンはPAR−１の切断による不活性化のみではなく，PAR−２活性化によってPAR−１を抑制する異種脱感作を起こすことが示唆された．PARの同種脱感作機構には受容体の細胞内ドメインのリン酸化や内在化，リガンド部の不活性化が関与すると考えられている[14~18]．一方，異種脱感作には異なるメカニズムの存在が示唆されている．ラット耳下腺腺房細胞ではATP前処置によってムスカリン受容体を介するカルシウム反応が強く抑制される異種脱感作が知られている．この脱感作ではATPによるP_{2z}受容体の刺激が，ホスホリパーゼDやプロテインキナーゼC（PKC）等のタンパクリン酸化酵素を介して，ムスカリン受容体を脱感作することが報告されている[19]．PARにおいても上皮細胞でPKC−βの活性化を介して異なるサブタイプのPAR間に異種脱感作が起こるという報告がある[20]．HSY−EA１細胞におけるPAR−１とPAR−２の間の異種脱感作にも同様な機構が働いている可能性が考えられるが，その詳しいメカニズムについては今後の検討が必要である．

今回の研究から，トリプシンによるPAR−１の直接的な作用と，PAR−２を介する異種脱感作によってトロンビンによるPAR−１の反応性を低下させることが明らかになった．最近，免疫系細胞から放出されるproteinase３（PR３）やhuman leukocyte elastase（HLE），カテプシンGといったタンパク分解酵素がPAR−２を活性化することや，PAR−１を不活性化することが報告されている[21]．これらのタンパク分解酵素の作用は，今回観察されたトリプシンの作用と基本的に同じと考えられる．今後は，PARの同種および異種脱感作のメカニズムを明らかにするとともに，その生理的重要性を含めて検討を行うことが必要と考えられる．

文　　献

1．Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A,Gilbert T, Davie EW, Foster DC.：Cloning and characterization of human protease−activated receptor4. Proc Natl Acad Sci USA **95**：6642−6646, 1998.

2．Kahn ML, Zheng YW, Huang W, Bigornia V, Zeng D, Moff S, Farese RV Jr, Tam C, Coughlin SR.：A dual thrombin receptor system for platelet activation. Nature **394**：690−694, 1998.

3．Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R.：Proteinase−activated receptors. Pharmacol Rev **53**：245−282, 2001.

4．Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR.：Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation .Cell **64**：1057−1068, 1991.

5．Tanimura A, Shitara A, Nezu A, Morita T, Tojyo Y.：Differential Ca^{2+}responses induced by thrombin and thrombin−receptor agonist peptides in HSY−EA１cells. Cell Biol Int **27**：1017−1023, 2003.

6．Brass LF, Pizarro S,Ahuja M,Belmonte E, Blanchard N, Stadel JM, Hoxie JA.：Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. J Biol Chem **269**：2943−2952, 1994.

7．Hoxie JA, Ahuja M, Belmonte E, Pizarro S, Parton R, Brass LF.：Internalization and recycling of activated thrombin receptors. J Biol Chem **268**：13756−13763, 1993.

8．Woolkalis MJ, DeMelfi TM Jr, Blanchard N, Hoxie JA, Brass LF.：Regulation of thrombin receptors on human umbilical vein endothelial cells. J Biol Chem

270：9868−9875, 1995.

9. Morita T, Tanimura A, Nezu A, Tojyo Y：Visualization of inositol 1,4,5−trisphosphate receptor type III with green fluorescent protein in living cells. Cell Calcium **31**：59−64, 2002.

10. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY：A new generation of Ca 2 ＋indicators with greatly improved fluorescence properties. J Biol Chem **260**：3440−3450, 1985.

11. Mountian I, Manolopoulos VG, De Smedt H, Parys JB, Missiaen L, Wuytack F.：Expression patterns of sarco/endoplasmic reticulum $Ca^{(2+)}$−ATPase and inositol1, 4, 5−trisphosphate receptor isoforms in vascular endothelial cells. Cell Calcium **25**：371−380, 1999

12. Kuliopulos A, Covic L, Seeley SK, Sheridan PJ, Helin J, Costello CE.：Plasmin desensitization of the PAR 1 thrombin receptor：kinetics, sites of truncation, and implications for thrombolytic therapy. Biochemistry **38**：4572−4585, 1999

13. Kawabata A, Saifeddine M, Al−Ani B, Leblond L, Hollenberg MD.：Evaluation of proteinase−activated receptor−1（PAR1）agonists and antagonists using a cultured cell receptor desensitization assay：activation of PAR 2 by PAR1−targeted ligands. J Pharmacol Exp Ther **288**：358−370, 1999

14. Dery O, Corvera CU, Steinhoff M, Bunnett NW.：Proteinase−activated receptors：novel mechanisms of signaling by serine proteases. Am J Physiol **274**：C 1429−C1452, 1998.

15. Hammes SR, Coughlin SR：Protease−activated receptor−1 can mediate responses to SFLLRN in thrombin−desensitized cells：evidence for a novel mechanism for preventing or terminating signaling by PAR 1's tethered ligand. Biochemistry **38**：2486−2493, 1999.

16. Mizuno O, Hirano K, Nishimura J, Kubo C, Kanaide H.：Proteolysis and phosphorylation−mediated regulation of thrombin receptor activity in in situ endothelial cells. J Pharmacol **389**：13−23, 2000.

17. Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J.：beta −Arrestins regulate protease−activated receptor−1 desensitization but not internalization or Down−regulation. J Biol Chem **277**：1292−1300, 2002.

18. Tiruppathi C, Yan W, Sandoval R, Naqvi T, Pronin AN, Benovic JL, Malik AB.：G protein−coupled receptor kinase−5 regulates thrombin−activated signaling in endothelial cells. Proc Natl Acad Sci USA **97**：7440−7445, 2000.

19. Fukushi Y.：Heterologous desensitization of muscarinic receptors by P_{2Z} purinoceptors in rat parotid acinar cells. Eur J Pharmacol **364**：55−64, 1999

20. Yan W, Tiruppathi C, Lum H, Qiao R, Malik AB.：Protein kinase C beta regulates heterologous desensitization of thrombin receptor（PAR−1）in endothelial cells. Am J Physiol **274**：C387−C395, 1998.

21. Uehara A, Muramoto K, Takada H, Sugawara S.：Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease−activated receptor2. J Immunol **170**：5690−5696, 2003.

〔原　著〕

株化骨細胞MLO-Y4-A2におけるPTH受容体遺伝子のメカニカルストレスによる発現

岡山　三紀*,**，荒川　俊哉**，谷村　明彦***，溝口　到*，田隈　泰信**

*北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座
**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座
***北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

Mechanism of PTH receptor induction by fluid shear stress in the osteocyte-like cell line MLO-Y4-A2

Miki OKAYAMA*,**, Toshiya ARAKAWA**, Akihiko TANIMURA***,
Itaru MIZOGUCHI* and Taishin TAKUMA**

*Department of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
**Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
***Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Osteocytes are generally accepted to function as sensors for mechanical stress, which are deeply involved in bone homeostasis. However, the signal transduction mechanism of mechanical stresses in osteocytes is still mostly unclear. Here the effect of fluid shear stress on gene expressions of MLO-Y4-A2 cells, a murine osteocyte-like cell line, was investigated. When shear stress was loaded on the MLO-Y4-A2 cells, PTH receptor mRNA increased to 5 to 8 times over the control level. The PTH receptor protein and cAMP levels were also increased by the shear stress. The increase in the PTH receptor mRNA was not inhibited by U-0126 (ERK kinase inhibitor) or indomethacin (COX-2 inhibitor). Luciferase reporter analysis indicated that the P1 promoter region of the PTH receptor gene includes cis-elements for transcription control by shear stress. These results suggest that in osteocytes the mechanical stress induces PTH receptor increases, which in turn amplify the effect of PTH and/or PTHrP on bone remodeling.

緒　言

歯に矯正力を加えると，歯周組織には圧迫側と牽引側という力学的環境の異なる二つの領域が形成される．力の作用方向に対応する圧迫側では，歯槽骨は吸収され，一方，牽引側では骨形成を生じ，結果として歯は力の作用方向に移動する．このように矯正学的な歯の移動は，機

受付：平成16年４月１日

械的刺激（メカニカルストレス）に対する歯周組織の生物学的な一連の過程である．歯の移動にともなう歯周組織の研究では破骨細胞，骨芽細胞，線維芽細胞などを対象としたものがほとんどであり，歯槽骨内の骨細胞の動態に関しては，いまだ不明な部分が多い．

骨細胞は骨に存在するもっとも多い細胞で，骨芽細胞の10倍以上存在する[1]．骨細胞は骨小腔内に存在するが，細く長い細胞突起をのばして隣接する骨細胞同士がお互いに接触するばかりでなく，この細胞突起は骨表面にも達し，骨芽細胞や破骨細胞とも接触している[2]．このように骨細胞は細胞間にネットワークを張りめぐらし，骨に加わるメカニカルストレスに対するセンサーの役割を担っているのではないかと考えられてきた．実際，メカニカルストレスの一つであるシェアストレスは，骨細胞において，eNOS[3]，COX-2[4-6]，Connexin43[7,8]などのmRNAを誘導することが報告されている．また，ニワトリ頭頂骨から分離された骨細胞は，骨芽細胞や破骨細胞に比べメカニカルストレスに対する反応性が高いと報告されている[9−12]．骨細胞は骨に加わるメカニカルストレス（骨にかかる重力，骨小腔内液の流れ，骨の伸縮やたわみ）を感知し，何らかのシグナルを骨芽細胞や破骨細胞に伝達し，骨のリモデリングに重要な役割を果たしている可能性が推察されている．

骨細胞を用いた過去の研究の多くは，骨組織から調製したプライマリー細胞を使用しているため，分子生物学的解析を加えることは極めて困難であった．最近，テキサス大学のBonewald博士ら[13]は，オステオカルシンのプロモーターとSimian virus 40（SV40）のlarge T-antigen遺伝子を結合したトランスジェニックマウスを作製し，その長管骨より骨細胞様の株細胞，MLO(Mouse long bone)-Y4, を樹立した．MLO-Y4細胞はオステオカルシンやCD44など骨細胞に特徴的な遺伝子の高い発現が認められ，骨細胞のin vitro 実験モデルとして期待されている．

本研究では，多様な細胞形態を含むMLO-Y4細胞から，細胞突起を数多く有し，より骨細胞に近い形態をもつ細胞としてクローニングされたMLO-Y4-A2細胞を用い，シェアストレス負荷に応答する遺伝子群の検索を試みた．その結果，シェアストレスに応答して副甲状腺ホルモン(PTH)レセプターの発現が亢進することを見いだし，その発現調節機構を分子生物学的手法を用いて解析した．

材料と方法

1.　細胞の培養

MLO-Y4-A2細胞は，2.5% fetal bovine serum (FBS), 2.5%calf serum(CS)含有のαMEM（ペニシリン１ mg/ml，ストレプトマイシン１ mg/ml，グルタミン200μM添加）を用い，タイプIコラーゲンをコートした100mmのプラスチック培養皿上で，37℃，５％CO_2環境下にて培養した．MC3T3-E1細胞は５％FBS含有のαMEMを用いて，100mmプラスチック培養皿上で培養した．

2．シェアストレスの負荷

60%コンフルエントになるまで静置培養した細胞を，CO_2インキュベーター内に入れた振盪機をもちいて，Ogataの方法[14]に従い往復運動（90サイクル／分）により培養液を動かし，シェアストレスを負荷した．

3．RNAおよびDNAの調製

培養液を除いた培養皿にISOGEN 1 ml（和光純薬）を加え，細胞をスクレイパーで剥離回収した後，テフロン・グラスホモジナイザーでホモジナイズし，マニュアルにしたがって全RNAを精製した．マウスの脳0.2gにDNAzol Reagent 1 ml (GibcoBRL)を加え，ポリトロンホ

モジナイザーにより組織をホモジナイズし，マニュアルに従ってDNAを抽出した．

4．プライマーの設計

骨関連遺伝子の塩基配列はアメリカNIH付属のNCBIより取得し，Web上のプライマー設計ソフト（Primer Selection）およびGCG Wisconsin Package（Accelrys）を用いて，PCRに使用するプライマーを設計した．設計したプライマーは表１に示した．

表１ 本実験で使用したプライマー

	Forward	Reverse
GAPDH	: 5'-ctacccccaatgtgtccgtcgtg -3'	; 5'-gatggaaattgtgagggagatgc -3'
COX-2	: 5'-gggttgctgggggaagaaatgtg -3'	; 5'-ggtggctgttttggtaggctgtg -3'
VtD-R	: 5'-cctctgtgaccctggacctg -3'	; 5'-ggctggaaggagagggaacg -3'
PTH-R	: 5'-gtgcaggcagagattaggaagtc -3'	; 5'-tgaatagacagccagccaaactc -3'
Est-Rα	: 5'-ttctgatgattggtctcgtctgg-3'	; 5'-tccgggggtatgtagtagggtttg -3'
Est-Rβ	: 5'-ctggacagggatgaggggaagtg -3'	; 5'-ccctctttgctcttactgtcctc -3'
Osteocalcin	: 5'-ccatgaggaccctctctctgctc -3'	; 5'-tttggagctgctgtgacatccat -3'
Connexin 43	: 5'-gtggcctgctgagaacctacatc -3'	; 5'-ttttttggcattttggctgtcgtc -3'
CD44	: 5'-cccacatgctacaagcacaactcc -3'	; 5'-tttcttgcatctttagcgccgctc -3'
APLase	: 5'-tcggataacgagatgccaccagag -3'	; 5'-tccttccaccagcaagaagaagcc -3'
Osteopontin	: 5'-agcagacactttcactccaatcg -3'	; 5'-tgtttttgcctcttctttagttg -3'
eNOS	: 5'-ttgatgtgctgcccctgttactcc-3'	; 5'-tttccaccgctgccttgtctttcc-3'
iNOS	: 5'-cactcagccaagccctcacctac -3'	; 5'-tctcctgcatttcttcctgatag -3'
TGF-β1	: 5'-cggggatcagccccaaacgtcg -3'	; 5'-ggcttgcgacccacgtagtag -3'
TGF-β2	: 5'-gagcgagcaggagtactacgc -3'	; 5'-gtaggcagcatccaaagcgcg -3'
TGF-β3	: 5'-ctcttccagatacttcgaccg -3'	; 5'-agtcaatataaaggggcgta -3'
IGF-1	: 5'-gtggatgctctttagttcgtg -3'	; 5'-tgttatttggtaggtgtttcg -3'
IGF-2	: 5'-agtttgtctgttcggaccgc -3'	; 5'-ggtctttgggtggtaacacg -3'

VtD-R:ビタミンDレセプター PTH-R：副甲状腺ホルモンレセプター
EstR-α:エストロゲンレセプター EstR-β:エストロゲンレセプター
APLase:アルカリフォスファターゼ

5．cDNAの合成，PCRおよびLightCyclerによるmRNAの定量

逆転写酵素Super Script II（GibcoBRL，200 units）を用い，oligo（dT)(0.5μg）をプライマーとして1μgのtotal RNAからcDNAを合成した（全量20μl，42℃，60分間インキュベーション）．合成されたcDNA１μlを鋳型として，Ampli Taq Gold Kitと各種プライマーを混合し，GeneAmp PCR System 9700（Applied Biosystem）を用いてPCR反応を行った．PCR産物は，1.5%アガロースゲル（１μg/mlエチジュウムブロマイド含有）を用い，0.5x TE泳動Buffer中で電気泳動し，ライトキャプチャー(ATTO)で検出・定量した．mRNAをより厳密に定量するため，LightCycler（Roche）を用い定量的PCRを行った．SYBR Green assay kit（Roche）を用い，上記のcDNA1μlを鋳型として，マニュアルに従い反応を行った．反応結果は付属のソフトを用いて解析した．

6．ウエスタンブロッティング

細胞のペレットにSDS-sample bufferを直接添加し溶解後，100℃で５分間変性処理をおこなった．５-20%のグラジエントゲルを用いSDS-PAGE後，タンパクをPVDF膜に転写した．転写膜をブロックエースにて４℃で一晩，または，室温で２時間ブロッキングした後，適宜希釈したそれぞれの一次抗体と４℃で一晩，また

は，室温で1時間インキュベート後，0.05% Tween 20を含むPBS（PBST）で10分づつ3回洗った．引き続き2次抗体（HRP標識抗マウスIgG抗体およびHRP標識抗ウサギIgG抗体）で処理し，抗原のタンパク・バンドをECL plusおよびライトキャプチャー（ATTO）を用いて検出した．検出されたバンドの定量はライトキャプチャーに付属のデンシトメトリーソフトを用いて行った．

7．タンパク量の定量

タンパクの定量はBradford Protein Assay Kit（Bio-Rad）を用い，牛血清アルブミン（BSA）をスタンダードとして行った．

8．cAMPおよびカルシウム濃度の測定

PTH刺激の30分前に1 mMのIBMXで前処理した細胞を，10μ200nMのPTHで2分間刺激した．cAMPは1 -Propanolにて，4℃，24時間抽出し，125I cAMP測定キット（ヤマサ）を用いて測定した．Fura-2を取り込ませた細胞を10μ200nMのPTHで刺激し，細胞内Ca^{2+}濃度の変化をCa^{2+}画像解析システム（ARGUS HiSCA，浜松フォトニクス）を用いてモニターした．

9．プロモーターLuciferase Vectorの構築

マウスの脳より調製したDNA100ngを鋳型として、FastStart Taq DNA Polymerase Kit（Roche）を用いて，マウスPTHレセプターのプロモーターエンハンサー領域（P1 ; 670 bp, P2 a ; 1080 bp, P2b ; 464 bp）をPCR法により増幅した．用いたプライマーはP1（5’-aactgctgagctgtctctcg-3’, 5’-tccacaggcctttcaaacgg-3’），P2a（5’-gaagatcttttcaggtcaccacgcttaaa-3’，5’-cccaagcttcggccgctgctccgag acgc-3’），P2b (5’-tgag tcagctcctcaacccg -3’, 5’-actaggactctcccggtatc -3’)である．増幅したそれぞれのプロモーター領域をpGL3-Basic Luciferase Vector（Promega）のマルチクローニングサイトにRapid DNA Ligation Kit（Roche）を用いて導入し，プロモーター活性測定用Luciferase Vectorを構築した．

10．プラスミドDNAの調製と細胞への導入

構築したLuciferase Vectorで形質転換した大腸菌を200mlのLB培地で一晩培養後，Qiagen tip-500plasmid kit（Qiagen）にてプラスミドを精製した．プロモーター領域を含むLuciferase Vector（1μg）と遺伝子導入効率を補正するためのpRL-TK Luciferase Vector（インターナルコントロール）（0.05μg）をEffectene Transfection Reagent Kit（Qiagen）を用いてMLO-Y4-A2細胞に導入した．

11．Luciferase活性の測定

プラスミドを導入した細胞にシェアストレスを負荷した後，PBS（－）で洗浄後，スクレイパーで細胞を剥離回収した．Dual-Luciferase Reporter Assay System Kit（Promega）を用い，MiniLumat LB9506（PerkinElmer）でluciferase活性を測定した．シェアストレスを負荷していない細胞のluciferase活性を測定し，コントロールとした．

12．共焦点レーザー顕微鏡観察

細胞を1％パラホルムアミドで30～60分固定後0.1%Triton X-100に1時間浸漬し，PBSで5分間3回洗浄した．アクチン線維を蛍光検出するため，PBSで最終濃度0.7μg/mlに希釈したAlexa-Phalloidinで4℃，2日間処理後，PBSで5分間3回洗浄した．さらに核を染色するため，PBSで最終濃度1μg/mlに希釈したDAPIで室温,1時間処理した．染色処理を行った細胞は共焦点レーザー顕微鏡（TCS-SP, Lica）を用いて観察し，蛍光画像をTCS-NT4で取り込み，コンピューター処理を行った．

結　果

１．MLO-Y4-A2細胞の特性とMC3T3-E1細胞との比較

MLO-Y4-A2細胞は図１に示すように，骨細胞の形態的特徴である多数の樹状突起を持ち，Phalloidin染色ではそれらの突起を介して隣接する細胞と互いに接触していることが確認された．次に，骨由来細胞で発現が確認されている遺伝子について，表１に示したプライマーを用い，RT-PCR法によってその発現を検討し，株化骨芽細胞MC3T3-E1と比較した．図２-(a)に示すように，MLO-Y4-A2細胞では，オステオカルシン（OCN），CD44, アルカリフォスファターゼ(ALPase)，オステオポンチン(OPN)，Connexin-43のmRNAが発現していた．一方，MC３T３-E１細胞では，OCN，ALPase，OPN，Connexin-43は発現していたが，CD44遺伝子の発現は確認されなかった．さらに，ホルモン・レセプターやサイトカインの発現について同様に比較検討した．MC3T3-E1細胞では，ビタミンDレセプター（VitD-R），PTHレセプター（PTH-R），エストロゲンレセプターα（Est-Rα），エストロゲンレセプターβ（Est-Rβ），TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3の発現が見られた．一方，MLO-Y4-A2細胞では，MC3T3-E1細胞で発現していたPTH-R, Est-Rβ, Est-Rβ, TGF-β1, TGF-β3の発現が認められなかった（図２-(b)）．こ

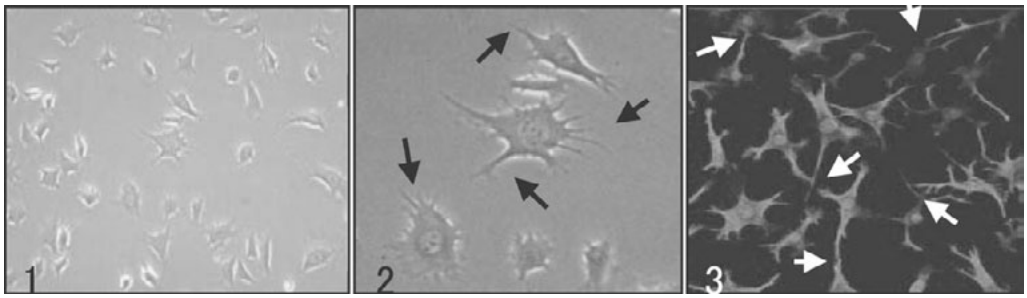


図１　株化骨細胞MLO-Y４-A２の顕微鏡像.1,2：位相差顕微鏡像；放射状に拡がった多くの突起（黒い矢印）が確認される.2は１の強拡大.3：DAPIとPhalloidinで二重染色した細胞の共焦点レーザー顕微鏡像；細胞が突起を介して接している（白い矢印）のが確認される．赤：DAPIによる核染色　緑：Phalloidin　染色.

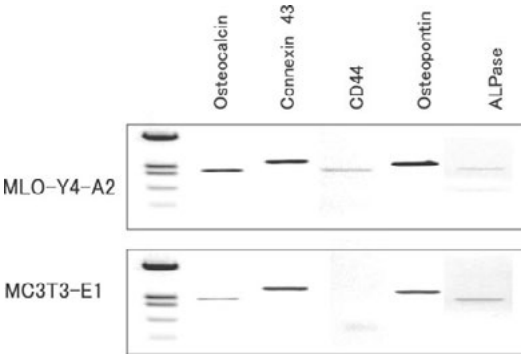


図２－(a)　RT－PCRによる株化骨細胞MLO－Y４－A２と株化骨芽細胞MC３T３－E１の遺伝子発現の比較．骨芽細胞や骨細胞での発現が報告されているOsteocalcin(423bp),Connexin43(592bp),CD44(484bp),Osteopontin(512bp)Alkase(414bp)の定常状態の発現量を比較した．

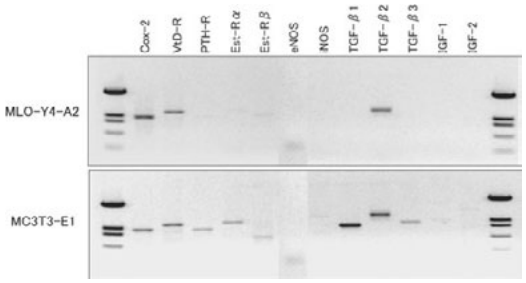


図２－(b)　RT－PCRによる骨関連遺伝子発現の比較．Cox－2(478bp),VtD－R(583bp)PTH－R(464bp)、EstR－α(604bp)、EstR－β(485bp)、eNOS(347bp)、iNOS(627bp)TGF－β1(410bp)、TGF－β2(645bp)、TGF－β3(426bp)IGF－1(382bp)、IGF－2(371bp)の遺伝子発現をMLO－Y４－A2細胞とMC3T３－E1細胞で比較した．

れらの結果は，骨芽細胞から骨細胞へ分化する過程で発現が亢進する遺伝子と，逆に，発現が低下または失われる遺伝子が存在することを示唆している．

2．シェアストレスに応答する遺伝子

MLO-Y4-A2細胞をコラーゲンコートした培養皿上で培養し，Ogataの方法[14]に従い，振盪機を用いて毎分90サイクルの往復運動によってシェアストレスを負荷した．これらの細胞より全RNAを抽出し，図２-(a)および(b)で同定された骨関連遺伝子についてそれぞれの発現量の変化をRT-PCR法によって検討した．その結果，図３に示すように，PTH-R, Est-Rα，シクロオキシゲナーゼ２（COX-2）の発現量が，シェアストレスの負荷によって増加した．

3．シェアストレス負荷によるPTHレセプターmRNA誘導

これまで，PTHを添加してメカニカルストレスを負荷すると，メカニカルストレスによるタンパクやmRNAの誘導がさらに増強されるという報告がいくつか存在する[15−18]．そこで，図３で同定したシェアストレスに応答する遺伝子の中からPTHレセプターに注目し，シェアストレス負荷によるmRNAの発現について詳細に検討した．図４に示すように，シェアストレス負荷によるPTHレセプターmRNAの発現量は１時間後から徐々に増加し，7時間後にピークを迎え，24時間後ではシェアストレス負荷前のレベルまで低下した．mRNA発現量の経時変化をコンピューターソフト（ATTO）によるデンシトメトリーで定量化した．恒常的に発現していると考えられるGAPDHのmRNA発現量を内部コントロールとしてノーマライズすると，PTHレセプターmRNAの発現量は，ピークの７時間後では対照と比べて約5.2倍に増加し，24時間後では，対照と同じレベルまで減少していた．同様の処理をおこなったサンプルをLightCyclerを用いた定量的RT-PCR法によって分析した結果，０時間と発現ピークの５～７時間ではPCRのサイクル数で約２～３サイクルの差があった．これはPCRの理論上の増幅率では，４～８倍の差に相当し，図４で示した結果を支持した．

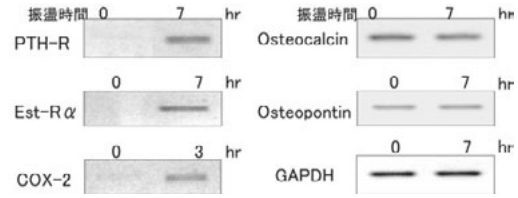


図３　シェアストレス負荷による遺伝子発現の変化．シェアストレス負荷によりPTH-R, EstR-α,COX-2のmRNAに発現増強が見られた．

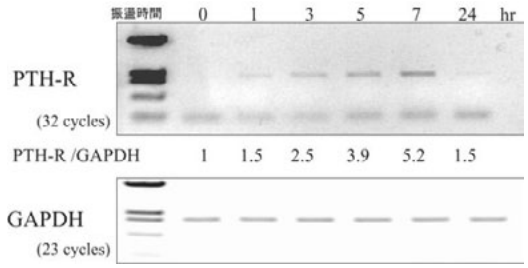


図４　シェアストレスを負荷した　MLO-Y4-A2細胞におけるPTH-R　mRNAの経時的変化．PTH-R mRNAの発現量はGAPDHで補正後，０時間の発現量を１とする相対値で示した．

4．ERKリン酸化とPTHレセプターの誘導

MC3T3-E1細胞にシェアストレスを負荷すると，MAP Kinaseの一つであるERK-1がリン酸化され，COX-2が誘導されることが報告されている[19]．MLO-Y4-A2細胞においても，COX-2がシェアストレスの負荷によって誘導されることから（図２-(a)），ERKのリン酸化がPTHレセプターの誘導と連関しているかどうか検討した．MLO-Y4-A2細胞にシェアストレスを負荷すると，ERK-1は15分をピークにリン酸化された（図５）．ERK-1のリン酸化は負荷前を１と

すると，ピーク時には約３倍に増加していた．また，ERK-2はERK-1とは逆にシェアストレス負荷前の状態ではリン酸化されていたが，シェアストレスの負荷で脱リン酸化された．ERK kinaseの阻害剤U-0126（20μM）を添加し同様の実験を行った結果，ERK-1のリン酸化は阻害され，ERK-2は完全に脱リン酸化された．ERKリン酸化のPTHレセプターmRNA発現に及ぼす影響を評価するため，U-0126添加後シェアストレスを負荷し，経時的にPTHレセプターmRNAの変化を定量した．その結果，PTHレセプター発現に対するU-0126添加の阻害効果は見られず（図６），シェアストレス負荷によるPTHレセプターの誘導はERKのリン酸化とは無関係であることが明らかとなった．

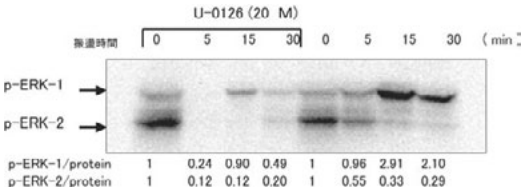


図５ シェアストレス負荷によるERKリン酸化とERKキナーゼ阻害剤（U-0126）の影響．ERK1/2のリン酸化は抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロット法で定量した．

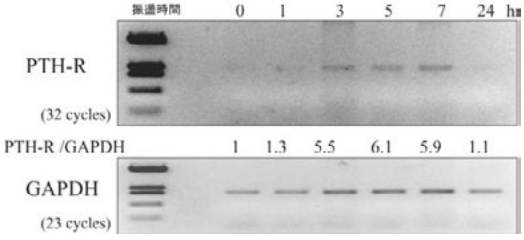


図６ ERKキナーゼ阻害剤U-0126の効果．U-0126（20 mM）添加後，シェアストレスを負荷しPTH-R mRNAの発現量をRT-PCRで定量した．

５．COX-2シグナル伝達経路の関与

Prostaglandin E2（PGE2）が骨芽細胞の増殖と分化を促進することが報告されている[12,20−22]．また，シェアストレスはCOX-2のmRNAを誘導し，その結果PGE2が合成される．そこでシェアストレスによるPTHレセプターmRNAの誘導が，COX-2／PGE2シグナル経路の下流に位置するかどうかを，COX阻害剤及びPGE２を用いて検討した．COX阻害剤であるインドメタシン（20μM）を培養液に添加し，シェアストレスによるPTHレセプターmRNAの誘導に対する影響を調べたが，インドメタシンの阻害効果は認められなかった（図７）．さらに，PGE2（1mM）添加の効果を検討したが，PTHレセプターmRNAの誘導効果は認められなかった（データーは示さない）．これらの結果は，シェアストレスによるPTHレセプターmRNAの発現誘導がCOX-2のシグナル経路とは別経路で調節されていることを示唆している．

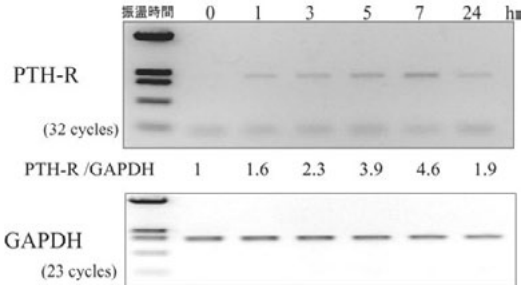


図６ ERKキナーゼ阻害剤U-0126の効果．U-0126（20 mM）添加後，シェアストレスを負荷しPTH-R mRNAの発現量をRT-PCRで定量した．

６．PTHレセプターのタンパク・レベルでの発現

シェアストレスの負荷によるPTHレセプターの発現をタンパクレベルで検討した（図８）．MLO-Y4-A2細胞にシェアストレスを負荷し，PTHレセプターのタンパク発現量を抗マウスPTHレセプター抗体を用いたウエスタンブロット法によって経時的に測定した．PTHレセプタータンパクは７時間から増加しはじめ，15時間後にピークとなり，ストレス負荷24時間後ではピーク時の半分以下に減少したえeberuを．ピーク時（15時間）でのPTHレセプタータンパク

の発現量は，コンピューターソフトによるデンシトメトリーで定量的に比較すると，シェアストレス負荷前の約7.4倍であった．

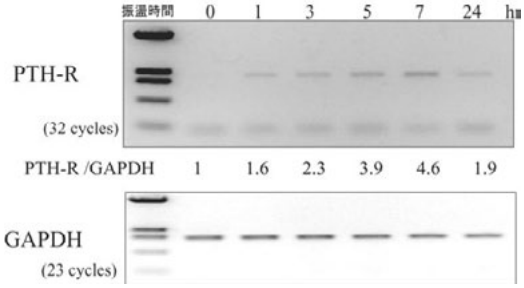


図7 COX阻害剤インドメタシンの効果．インドメタシン（20mM）添加後，シェアストレスを負荷し，PTH-R mRNAの発現量をRT-PCRで定量した．

7．PTHレセプターの細胞内情報伝達

PTHレセプターはGsとGqの２種類のGタンパク質と共役する可能性が報告されている．GsとGqのαサブユニットはそれぞれcAMP合成酵素とホスホリパーゼC（PLC）を活性化し，細胞内cAMPおよびCa2+濃度を上昇させる．そこで，シェアストレスの負荷によって誘導されたPTHレセプターがどちらのGタンパク質と共役しているかを明らかにするため，cAMPとCa2+の濃度変化を測定した．その結果，cAMP量はシェアストレスを負荷していない細胞に比べ，約２倍に増加した．しかしCa2+濃度に変化は認められかった（データは示さない）．また，骨芽細胞株MC3T3-E1細胞で同様にcAMP濃度の変化を測定した結果，シェアストレス負荷による変化は見られなかった．これらの結果から，MLO-Y4-A2細胞ではPTHレセプターは主にGsと共役していることが明らかとなった．

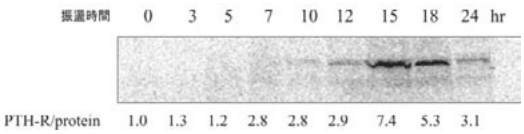


図8 シェアストレスを負荷したMLO-Y4-A2細胞におけるPTH-Rタンパクの経時的変化．ウエスタンブロット法を用いてPTH-Rタンパクの発現量を定量した．

8．シェアストレスに応答するプロモーター・エンハンサー

PTHレセプター遺伝子には２カ所（TS1, TS2）の転写開始部位が同定されている．骨の細胞ではより下流側にある転写開始部位（TS2）から転写が開始されることが報告されている．そこで，転写調節に関わる領域を同定するため，ルシフェラーゼベクターを構築し，ルシフェラーゼアッセイを行った．図９に示すように，３つのルシフェラーゼベクター（ｉ；P2a領域のみを組み込んだベクター，ii；P1-P2a領域を組み込んだベクター，iii；P2b-P2a領域を組み込んだベクター）を構築した．MLO-Y4-A2細胞に遺伝子導入し，シェアストレス負荷の前後でルシフェラーゼ活性を比較した．その結果，P1-P2a領域を含むベクターを導入した細胞では，シェアストレス負荷により４倍以上のルシフェラーゼ活性の上昇が見られた．他方，P2a領域のみ，あるいはP2b-P2a領域には同様の効果は認められなかった．これらの結果は，P1領域にシェアストレスに応答する転写調節部位が存在することを示している．

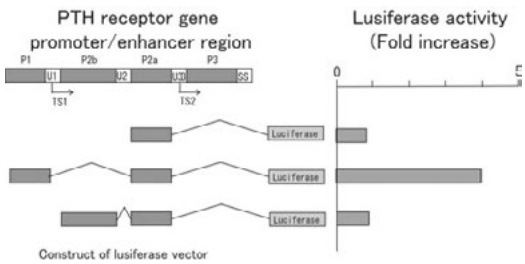


図9 シェアストレスに応答するPTH-R遺伝子のプロモーター／エンハンサー領域の決定．各領域の転写調節能をシェアストレス負荷前後のルシフェラーゼ活性の増加率で比較した．

考　察

1．メカニカルストレスに応答する遺伝子

これまで骨細胞や骨芽細胞では，メカニカルストレスに応答して誘導される遺伝子群として，eNOS/NO[5]，COX-2[5,6]，Connexn 43[7,8]，Insulin-like growth factor（IGF）[23]，などが報告されている．NOとプロスタグランジンはそれぞれ気体と脂質であり，拡散によって比較的速く骨組織を透過し，標的細胞に到達することが可能と思われる．IGFは細胞表面から組織液に分泌後，メカニカルストレスによって起こされる組織液の流れに乗って近傍の標的細胞に到達し作用すると考えられる．Connexin43は細胞突起間のギャップジャンクションを介した物質の移動を調節し，細胞間のコミュニケーションを制御すると考えられる．本研究の結果、シェアストレスはMLO-Y4-A2細胞のPTHレセプターを発現誘導することが明らかとなった．しかし，シェアストレスで誘導されたPTHレセプターがどのようなメカニズムで骨代謝に関わっているのかは現在のところ不明である．

２．PTHレセプターと共役する細胞内シグナル

PTH受容体は７回膜貫通型のレセプターであり，type-1～type-3の３つのアイソフォーム（PTH-R1～3）が存在する．PTH-R1は主に骨と腎臓に分布し，そのcDNAは1991年Juppnerらによってフクロネズミからクローニングされた[24]．PTH-R2は脳や脊髄に多く分布し，この他，膵臓，心臓，消化管にも発現が認められている25)．PTH-R3はゼブラフィッシュで同定されているが哺乳動物での報告はまだない[26]．PTH-R1にはPTHとPTHrPがいずれも結合し，Gsと共役することが知られている[27]．他方，PTHレセプターはGqとも共役し細胞内Ca^{2+}濃度を上昇させ，プロテインキナーゼC（PKC）を活性化する可能性が指摘されている[28]．しかし，これまでの研究から，PTH-R1はGqを介してPLCを活性化することは可能であるが，その活性化能は低く，Gsを介するcAMP合成酵素の活性化がPTH-R1の主要なシグナル伝達経路であると考えられている[29]．シェアストレスの負荷によって誘導されたPTHレセプターがどちらのGタンパク質と共役しているかを明らかにするため，PTH（1-34）を添加してcAMPとCa^{2+}の濃度変化を測定した．その結果，cAMP量はシェアストレスを負荷しない細胞に比べ，約２倍に増加したが，Ca^{2+}濃度に変化は認められなかった．これらの結果は，PTHレセプターがMLO-Y4-A2細胞でも主にGsと共役していることを示しており，これまでの多くの報告と一致した．

３．骨細胞のメカノセンサーとその細胞内シグナル

骨細胞は，骨芽細胞や破骨細胞に比べ，メカニカルストレスに対する感受性が高くメカノセンサーとして働いているのではないかと考えられている[4,5,10]．これまでの報告によるとメカニカルストレスを感知する受容器としてはVolume sensitive calcium channel（VSCC），インテグリン，CD44などが候補となっている．今回我々はMLO-Y4-A2細胞にCD44が発現していることを確認したが，シェアストレスに応答してCD44の発現が増加する現象は見られなかった（データは示していない）．また，VSCCの選択的インヒビターと考えられているガドリニウムはシェアストレスによるIGFの誘導を阻害することから，VSCCを介した細胞内カルシウム濃度の上昇がシェアストレスの情報伝達系に関わっているさせることが示唆されている[18]．しかしながら，今回我々はPTHレセプターmRNAの誘導に対するガドリニウムの影響を検討したが，明確な結論には到らなかった．今後はこれらを中心にメカニカルストレスのセンサーに関する解析を進めたいと考えている．

細胞膜上に存在すると想像されるメカノセンサーが感知した情報は，細胞内情報伝達系を経

て核に到達し，核で特異的な遺伝子の転写を調節すると考えられているが，その詳細は不明である．シェアストレスによるCOX-2の発現には，MAP kinaseの一種ERKのリン酸化が関与し，そのリン酸化を阻害するU-0126はCOX-2の発現を阻害することが知られている[19]．しかしながら，本研究では，U-0126はERKのリン酸化は阻害した（図５）が，シェアストレスによるPTH受容体mRNAの発現を抑制しなかった（図６）．同様に，COX阻害剤であるインドメタシンもシェアストレスによるPTHレセプターmRNAの発現を抑制せず（図7），また，プロスタグランジン（PGE2）単独ではPTHレセプターmRNAの発現を誘導しなかった．これらの結果は，シェアストレスによるPTHレセプターの発現誘導機構と，COX-2の発現に関わる情報伝達系は別経路であることを示している．

４．PTHレセプターの転写調節

マウスのPTH-R1の遺伝子は２つのグループによって1994年にそれぞれクローニングされた[30,31]．このPTHレセプター遺伝子からは２つの転写物（1.5kbおよび2.3kb）が転写されることが報告されている[32]．すなわち，図８に示すように，転写開始部位TS1および転写開始部位TS2が同定されており，それぞれにプロモーター領域が存在する．TS1のプロモーター領域P1は，G+Cに富む領域やTATA Boxを含まず，代わりにCCAAT Boxが存在した[33]．また，我々が，アクセルリ社のGCG Wisconsin Packageプログラムを使いP1領域の転写因子結合部位を検索した結果，転写因子NFκB, AP1, SP1に対するコンセンサス配列が存在した．他方，TS2のプロモーター・エンハンサー領域P2は，典型的なTATA Boxを欠くが，G+Cに富み，多くのSP1結合配列を含んでいる．ルシフェラーゼアッセイの結果，MLO-Y4-A2細胞のシェアストレスに応答するプロモーター・エンハンサー領域はP1に存在することが明らかとなった．これまでP1領域は腎臓と肝臓のみで転写される2.3kbの転写物のプロモーター・エンハンサー領域と考えられてきた．しかし，本研究の結果から，P1領域は腎臓や肝臓特異的に働く領域ではなく，骨を含む他の臓器においても転写調節領域として機能している可能性が示唆された．

５．骨粗鬆症治療薬とメカニカルストレス

骨粗鬆症の治療薬として，現在，エストロゲン誘導体やビスホスホネートが閉経後の女性に広く使用され，骨折防止効果が認められている[29]．骨粗鬆症における骨量減少では，骨吸収の亢進と骨形成の低下が同時に起きているものと考えられる．PTHは連続的に投与すると骨吸収が亢進するが，間歇的に投与すると海面骨などの骨量が増加することが知られている[34]．しかし，この骨量増加効果は坐骨神経を切除した不動化ラットにおいては減弱した[35]．このことは，PTHがその効果を発揮するにはメカニカルストレスの負荷が重要であることを示唆している．今回我々はシェアストレスによってPTHレセプターが誘導されることを見いだした．PTHの作用はPTHレセプターへの結合によってなされることから，PTHレセプターの増加はPTHの効果を増大させる可能性がある．これまで，PTHを添加してメカニカルストレスを負荷すると，メカニカルストレスによるタンパクやmRNAの誘導がさらに増強されるという報告がいくつか存在する[15−18]．本研究の結果より，PTHの投与とメカニカルストレスの負荷を平行して行うことで，骨粗鬆症の治療効果が高まる可能性が示唆された．

６．矯正歯科治療とメカニカルストレス

矯正力を歯に負荷すると，力の作用方向に対応する歯槽骨表層には圧迫力が，作用方向と逆

の歯槽骨表層には牽引力が負荷され，歯槽骨の弾性変形が初期反応として生じる．どのような種類のメカニカルストレスが歯槽骨内の骨細胞に加わっているかは不明であるが，歯槽骨内の骨細胞が歯の移動時になんらかのメカニカルストレスを受けているものと考えられる．また，矯正学的歯の移動における骨のリモデリングは，歯根に対応した歯槽骨表層部に限局してみられるものではなく，歯槽骨全体に認められ，骨の吸収と形成が同時平行的に進行することで，歯槽骨の骨量を一定に保つように働く．このような歯槽骨全体に及ぶリモデリングには，本研究で認められたPTH受容体の発現を含む分子メカニズムが関与している可能性が考えられる．今後，この可能性も含めて歯の移動時における骨のリモデリングの分子メカニズムを解明していきたいと考えている．

結　論

株化骨細胞MLO-Y4-A2を用い，メカニカルストレスの一つであるシェアストレスに対する応答を分子生物学的手法を用いて解析し，以下の結果を得た．

1．MLO-Y4-A2細胞は，シェアストレス負荷に応答し，PTHレセプターをmRNAレベルおよびタンパク・レベルで誘導した．
2．シェアストレス負荷によるPTHレセプターの誘導はERK, COX-2, PGE2を介するシグナル伝達系とは別経路であった．
3．誘導されたPTHレセプターはPTHに反応し，細胞内cAMP濃度の上昇を引き起こしたが，細胞内カルシウム濃度には影響しなかった．
4．PTHレセプター遺伝子のP1領域に，シェアストレスに応答し，転写を正に調節するプロモーター・エンハンサーが存在した．

株化骨細胞MLO-Y4-A2を用いた以上の研究結果より，骨細胞は骨に加わるメカニカルストレスに応答し，PTHレセプター遺伝子の発現を誘導することで骨代謝を調節している可能性が示唆された．

謝　辞

稿を終えるにあたり、MLO-Y4-A2細胞の分与ならびに細胞特性について種々ご指導して頂きましたテキサス大学Bonewald博士、旭化成株式会社、加藤洋一先生、また、骨代謝の研究を基礎からご指導して頂きました明海大学歯学部、羽毛田慈之教授、久米川正好名誉教授に心より感謝申し上げます。また、本研究を進める上でご協力を頂きました北海道医療大学歯学部歯科矯正学講座の大石洋平先生、泰間康平先生に深謝致します。最後に懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜りました東城庸介教授（北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座）に深甚なる謝意を表します。

文　献

1．Parfitt A M : The cellular basis of bone turnover and bone loss : a rebuttal of the osteocytic resorption--bone flow theory. Clin Orthop **127** : 236-47, 1977.
2．Favus with Sylvia Christakos : Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism. Lippincott Williams and Wilkins : 80-86, 1999.
3．Klein-Nulend J, Helfrich M H, Sterck J G H, MacPherson H, Joldersma M, Ralston S H, Semeins C M, and Burger E H : Biochem. Biophys. Res. Commun. **250** : 108-114, 1998.
4．Klein-Nulend J, Burger E H, Semeins C M, Raisz L G, and Pilbeam C C : Pulsating fluid flow stimulates prostaglandin release and inducible prostaglandin G/H synthase mRNA expression in primary mouse bone cells. J. Bone Miner. Res. **12** : 45-51, 1997.
5．Westbroek I, Ajubi N E, Alablas M J, Semeins C M, Klein-Nulend J, Burger E H, and Nijweide P J : Differential stimulation of prostaglandin G/H synthase-2 in os-

teocytes and other osteogenic cells by pulsating fluid flow. Biochem. Biophys. Res. Commun. **268**: 414-419, 2000.

6. Joldersma M, Burger E H, Semeins C M, and Klein-Nulend J: Mechanical stress induces COX-2 mRNA expression in bone cells from elderly women. J. Biomech. **33**: 53-61, 2000.

7. Yellowley C E, Li Z, Zhou Z, Jacobs C R, and Donahue H J: Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. J. Bone Miner. Res. **15**: 209-217, 2000.

8. Cheng B, Zhao S, Luo J, Sprague E, Bonewald L F, and Jiang: Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. J. Bone Miner. Res. **16**: 249-259, 2001.

9. Klein-Nulend J, Semeins C M, Ajubi N E, Nijweide P J, and Burger E H: Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts-correlation with prostaglandin upregulation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **217**: 640-648, 1995a.

10. Klein-Nulend J, Van der Plas A, Semeins C M, Ajubi N E, Frangos J A, Nij weide P J, and Burger E H: Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. : FASEB J. **9** 441-445, 1995b.

11. Ajubi N E, Klein-Nulend J, Nijweide P J, Vrijheid-Lammers T, Alblas M J, and Burger E H: Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes-a cytoskeleton-dependent process. Biochem. Biophys. Res. Commun. **225**: 62-68, 1996.

12. Woodiel F N, Fall P M, and Raisz L G: Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: Structure-activity relations and signal transduction pathway. : J. Bone Miner. Res. **11**, 1249-1255, 1996.

13. Kato Y, Windle J J, Koop B A, Mundy G R, and Bonewald L F: Establishment of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. J. Bone Miner. Res. **12**: 2014-2023, 1997.

14. Ogata T: Fluid flow induces enhancement of the Egr-1 mRNA level in osteoblast-like cells: Involvement of tyrosine kinase and serum. J Cell Physiol **170**: 27-34, 1997.

15. Chow J W M, Fox S, Jagger C J, and Chambers T J: Role for parathyroid hormone in mechanical responsiveness of rat bone. Am J Physiol **274**: E146-154, 1998.

16. Sekiya H, Mikuni-Takaaki Y, Kondoh T, and Seto K: Synergistic effect of PTH on the mechanical responses of human alveolar osteocytes. Biochem. Biophys. Res. Commun. **264**: 719-723, 1999.

17. Ryder KD and Duncan RL: Parathyroid hormone modulates the response of osteoblast-like cells to mechanical stimulation. Calcif. Tissue Int. **67**: 241-246, 2000.

18. Miyauchi A, Notoya K, Mikuni-Takagaki Y, Takagi Y, Goto M, Miki Y, Takano-Yamamoto T, Jinnai K, Takahashi K, Kumegawa M, Chihara K, and Fujita: Parathyroid hormone-activated volume-sensitive calcium influx pathways in mechanically loaded osteocytes. J. Biol. Chem. **275**: 3335-3342, 2000.

19. Wadhwa S, Godwin S L, Peterson D R, Epsten M, Raisz L G, and Pilbeam C C: Fluid flow induction of cyclooxygenase 2 gene expression in osteoblasts is dependent on an extracellular signal-regulated kinase signaling pathway. J. Bone Miner. Res. **17**: 266-274, 2002.

20. Flanagan A M, and Chambers T J: Stimulation of bone nodule formation in vitro by prostqaglandin E1 and E2. Endocrinology **130**: 443-448, 1992.

21. Scutt A, and Bertram P: Bone marrow cells are targets for the anabolic action of prostaglandin E2 one bone: Induction of trasition from nonadherent to adherent osteoblast precursors. J. Bone. Miner. Res. **10**: 474-487, 1995.

22. Weinreb M, Suponitzky I, and Keila S: Systemic administration of an anabolic dose of PGE2 in young rats increases the osteogenic capacity of bone marrow. Bone **20**: 521-526, 1997.

23. Sakai A, Sakata T, Ikeda S, Uchida S, Okazaki R, Norimura T, Hori M, Nakamura T: Intermittent administration of human parathyroid hormone (1-34) prevents immobilization-related bone loss by regulating bone marrow cell capacity for bone cells in ddY mice. J. Bone Miner. Res. **14**: 1691-1699, 1999.

24. Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Schipani E, Richards J, Kolakowski LF Jr, Hock J, Potts JT Jr, Kronenberg HM: A G protein-linked receptor for parathyroid formone and parathyroid hormone-related peptide. Science **254**: 1024-1026, 1991.

25. Usdin T B, Gruber C, and Bonner T I: Identification and functional expression of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, PTH2 receptor. J. Biol. Chem. **270**: 15455-15458, 1995.

26. Rubin D A, Hellman P, Zon L I, Lobb C J,

Bergwitz C, and Juppner H : A G protein-coupled receptor from zebrafish is activated by human parathyroid hormone and not by human or teleost parathyroid hormone-related peptide : Implications for the evolutionary conservation of calcium-regulating peptide hormones. J. Biol. Chem. **274** : 23035-23042, 1999.

27. Iiri T, Farfel Z, Boume H R : G-protein diseases furmish a model for the turn-on switch. Nature **394** : 35-38, 1998.

28. Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E, Urena P, Richards J, Bonventre JV, Potts JT Jr : Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells : a single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** : 2732-2736, 1992.

29. 尾形悦郎, 池田恭治, 福本誠二 : PTH/PTHrPの基礎と臨床, 2002.

30. McCuaing K A, Clarke J C, and White J H : Molecular cloning of the gene encoding the mouse parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 5051-5055, 1994.

31. Kong X F, Schipani E, Lanske B, Joun H, Karperien M, Defize L H K , Juppner H, Potts J T, Segre G V, Kronenberg H M, and Abou-Samra A B : The rat, mouse and human genes edcoding the receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide are highly homologous. Biochem. Biophys. Res. Commun. **200** : 1290-1299, 1994.

32. Urena P, Kong X F, Abou-Samra A B, Juppner H, Kronenberg H M, Potts J T Jr and Segre G V : Parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP) receptor mRNA are widely distributed in rat tissues. Endocrinology **133** : 617-623, 1993.

33. McCuaing K A, Lee H, Clarke J C, Assar H, Horsford J, and White J H : Parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor gene transcripts are expressed from tissue-specific and ubiquitous promoters. Nucleic Acids Res. **23** : 1948-1955, 1995.

34. Kalu DN, Doyle FH, Pennock J, Foster GV : Parathyroid hormone and experimental osteosclerosis. Lancet. **1** : 1363-1366, 1970.

35. Sakai K, Mohtai M, and Iwamoto Y : Fluid shear stress increases transforming growth factor beta 1 expression in human osteoblast-like cells : modulation by cation channel blockades. Calcif Tissue Int. **63** : 515-20, 1998.

〔原　著〕

NEVA METER®を用いた唾液粘稠度と喫煙状態の関連

小林　孝雄，中島　啓介，衣笠　裕紀，増田　貴大，山下　浩朗，小鷲　悠典

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

Effect of smoking on the viscosity of whole saliva measured with the NEVA METER®

Takao KOBAYASHI, Keisuke NAKASHIMA, Hironori KINUGASA
Takahiro MASUDA, Hiroaki YAMASHITA, Yusuke KOWASHI

Department of Periodontology and Endodontology, School of Dentistry
Health Sciences University of Hokkaido
(Chief : Prof. Yusuke KOWASHI)

Abstract

The objective of the present study was to evaluate the effect of smoking on the viscosity of whole saliva. The viscosity of whole saliva was measured with a newly developed device, the NEVA METER. Twenty-one smokers were requested to refrain from smoking for 1 day and then to start to smoke again ; subsequently, the viscosity of the whole saliva, colony forming unit, and cortisol levels in the saliva were monitored 1 and 2 days post-cessation of smoking. The viscosity of the whole saliva was significantly lowel after 1 day without smoking, and then increased after smoking was resumed. Cortisol levels in the saliva did not change throughout the experiment. These findings suggest that smoking increases the viscosity of whole saliva but not through changes in cortisol levels.

Key words : NEVA METER, smoking, saliva, viscosity

要　旨

本研究では唾液粘稠度に対する喫煙の影響を明らかにすることを目的として，NEVA METERを用いた唾液の測定を行った．喫煙者21名からベースライン時，喫煙を停止させて１日後，喫煙を再開させ１日後に唾液を採取し，唾液の粘稠度，コチニン濃度，コルチゾール濃

受付：平成16年４月１日

度，細菌数を測定した．唾液粘稠度は喫煙１日後で有意に減少し，喫煙再開１日後には有意に増加した．しかしコルチゾール濃度に変化は認められなかった．これらの所見より，喫煙により唾液粘稠度は増加することが明らかになった．

緒　　言

唾液は口腔環境を整えるために多種類の有機成分や無機成分を含んだ複合液である．唾液には多くの生理作用があり，口腔内を移動することによって歯面や口腔内を洗浄している．また，唾液は含有する多くの抗菌成分により，歯面に付着する細菌性プラークに対しても多大な影響を与えている．歯周病の原因が細菌性プラークであること[1-3]を考えると，唾液は歯周病の発症・進行に大きな影響を与えていると考えられる．

近年，歯周病のリスクファクターとして喫煙が注目されている[4-7]．喫煙が歯周病に対して影響を与える機序については不明であるが，口腔内に対して直接的に，あるいは全身状態を介して間接的に影響を与えている可能性が考えられる．喫煙が唾液の流出量に与える影響については，これまで相反する報告がなされている．PangohnとSharon[8]は喫煙者８名では非喫煙者に比べ耳下腺からの唾液分泌が増加していたと報告したが，Winsor[9]およびKortingとKleinschmidt[10]らは相反する結果を報告している．このように，喫煙が唾液分泌に与える影響については十分なコンセンサスが得られていないのが現状である．

臨床の場において，患者の口腔内を診査する際に喫煙をしている患者では唾液が粘ついているという印象を持つことが少なくない．そこで，喫煙者は非喫煙者に比べ唾液の粘稠度が高い可能性が考えられる．しかし，これまで唾液の性状，特に粘性について検討した研究は数少ない．本研究では喫煙が唾液の粘稠度に与える影響を明らかにすることを目的とし，近年開発された唾液の牽糸度を簡易に測定できるNEVA METER（石川鉄工所　北九州市）を用いて唾液の粘稠度を測定した．また，唾液の粘稠度の変化が口腔内の細菌数に与える影響についても検討した．

材料と方法

１．唾液粘稠度と唾液中コチニン濃度の関連

１）被験者

北海道医療大学に在籍する職員，学生に研究の主旨を説明し，インフォームドコンセントの得られた22歳から29歳の152名を被験者とした．被験者には喫煙に関して、無記名のアンケートを実施した．アンケートでの調査項目は（１）食事をしてからの経過時間，（２）喫煙をするかどうか，（３）喫煙者には一日の喫煙本数，（４）喫煙年数，（５）最後に喫煙をしてからの経過時間，（６）非喫煙者には一日に受動喫煙環境に何時間いるか，であった．

２）サンプルの採取

アンケート終了後，直ちに唾液サンプルを採取した．被験者を下顎安静位で３分間開口させ，口腔底に貯留した唾液を滅菌スポイトにて静かに採取し唾液サンプルとした．

３）粘稠度の測定

採取した唾液サンプルについて，NEVA METERを使用して牽糸度を５回測定した．測定結果の最大値と最小値を除いた３回の牽糸度の平均値を粘稠度の指標とした．

４）コチニン濃度の測定

喫煙状態の指標とするために，唾液サンプルについてニコチンの代謝産物であるコチニンの濃度をサンドイッチELISA法で測定した．

２．喫煙停止による唾液粘稠度の経時的変化（６日間の喫煙停止による変化）

１）被験者

北海道医療大学に在籍する職員，学生に研究の主旨を説明し，インフォームドコンセントの得られた喫煙者10名を被験者とした．

2）喫煙停止とサンプルの採取

被験者に喫煙状態に関するアンケートを実施し，直後に唾液サンプルを採取し，この時点をベースライン時（0日）とし、直ちに喫煙を停止させ1日，2日，6日後に唾液サンプルを採取した．

3）粘稠度の測定

採取した唾液サンプル粘稠度を前述のように測定した．

4）コルチゾール濃度の測定

ストレスの指標とするために採取した唾液サンプル中のコルチゾール濃度をコルチゾールEIAキット（Oxford biomedical research）を用いて測定した．

3．喫煙停止による唾液粘稠度の経時的変化（1日間の喫煙停止，喫煙再開による変化）

1）被験者

北海道医療大学に在籍する職員，学生に研究の主旨を説明し，インフォームドコンセントの得られた喫煙者21名を被験者とした．

2）喫煙停止・再開とサンプル採取

被験者に喫煙状態に関するアンケートを実施し，唾液サンプルを採取し，この時点をベースライン時（0日）とした．ベースラインから1日間喫煙を停止させ再度，唾液サンプルを採取した（喫煙停止1日）．唾液を採取後，直ちに喫煙を再開させ1日後，つまりベースライン時から2日後に唾液サンプルを採取した（喫煙再開1日）．

3）粘稠度の測定

採取した唾液サンプル粘稠度を前述のように測定した．

4）コチニン濃度の測定

採取した唾液サンプルのコチニン濃度を前述のようにELISA法で測定した．

5）唾液中細菌数の測定

採取した唾液を滅菌蒸留水で1／5,000希釈し，シャーレ中の羊血液寒天培地（日水製薬）に播種した．播種後のシャーレは，好気的（37℃のインキュベーター内）あるいは嫌気的（37℃のインキュベーター内に入れたBBLガスパック（Becton Dickinson）システム）に24時間培養した．培養後、血液寒天培地上のコロニー数をカウントしCFUを算出した．

6）唾液中コルチゾール濃度の測定

採取した唾液サンプルのコルチゾール濃度を前述のように測定した．

4．統計解析

アンケート結果から被験者を喫煙者と非喫煙者の2群に分け，唾液中コチニン濃度と唾液粘稠度の相関を検討した．また，アンケート結果と唾液粘稠度の相関を検討した．喫煙者10名の0日，1日，2日，6日（6日間の喫煙停止による変化）と喫煙者21名の0日，喫煙停止1日後，喫煙再開1日後（1日間の喫煙停止，喫煙再開による変化）における測定結果は，対応のあるt検定を行い解析した．

全ての解析は，Macintosh用統計解析ソフトJMP 4 を用いて行った．

結　　果

1．唾液粘稠度と唾液中コチニン濃度の関連

被験者152名（男性110名，女性42名）で，喫煙者は67名（男性58名，女性9名），非喫煙者は85名（男性52名，女性33名）であった．被験者の年齢は24.10±2.30歳（平均±標準偏差）で，喫煙者は24.54±2.31歳，非喫煙者は23.76±2.24歳であった．唾液粘稠度は被験者で10.80±5.19 mm，喫煙者で11.61±5.30 mm，非喫煙者で10.15±5.26 mmであった．唾液コチニン量は被験者で12.17±21.05 ng/ml，喫煙者で27.48±24.24 ng/ml，非喫煙者で0.09±0.51 ng/mlであった．

表1 唾液粘稠度と唾液コチニン濃度のアンケート結果を示す.

	全被験者	喫煙者	非喫煙者
被験者（男性：女性）	152（110：42）	67（58：9）	85（52：33）
年齢	24.10 ± 2.30	24.54 ± 2.31	23.76 ± 2.24
食事をしてからの時間（分）	255.19 ± 107.64	264.46 ± 151.98	247.74 ± 52.81
一日の喫煙本数（本）	——	7.82 ± 10.50	——
喫煙年数（年）	——	3 .23 ± 4.28	——
最後の喫煙からの経過時間（分）	——	89.14 ± 30313	——
受動喫煙環境にいる時間（分）	——	——	35 .45 ± 79.27

平均 ± 標準偏差

またアンケートの結果，食事をしてからの経過時間は255.19±107.64分，喫煙者において一日の喫煙本数は7.82±10.50本，喫煙年数は3.23±4.28年，最終喫煙からの経過時間は89.14±303.13分，非喫煙者において受動喫煙環境にいる時間は35.45±79.27分であった（表1）.

唾液粘稠度と唾液コチニン量の相関は，全被験者で相関係数0.201（$p=0.020$）であった．全被験者をアンケートの結果より喫煙者と非喫煙者に分けた．喫煙者で相関係数0.224（$p=0.068$），非喫煙者で0.037（$p=0.738$）であった（図1）．唾液粘稠度とアンケート結果（食事をしてからの経過時間，最終喫煙からの経過時間，一日の喫煙本数，喫煙年数）において相関を調べた結果，有意な相関は認められなかった．またコチニン濃度と喫煙からの経過時間の間にも有意な相関は認められなかった.

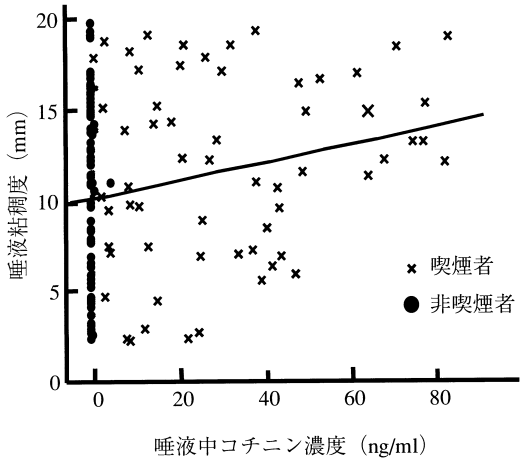


図1 全被験者152名を喫煙者と非喫煙者に分け，唾液粘稠度と唾液コチニン濃度の分布状態．直線は全被験者の相関を示す.

2．喫煙停止による唾液粘稠度の経時的変化（6日間の喫煙停止による変化）

被験者10名（男性9名，女性1名）の年齢は24.90±1.37歳であった．唾液粘稠度はベースライン時（0日），喫煙停止1日後，2日後，6日後でそれぞれ11.97±4.64 mm，8.29±4.01 mm，7.67±4.00 mm，8.03±3.04 mmで，唾液中コルチゾール濃度はそれぞれ4.55±2.86 ng/ml，4.01±1.78 ng/ml，6.84±7.04 ng/

表2 喫煙停止による経時的変化（6日間の喫煙停止による変化）のベースライン時におけるアンケート結果を示す.

被験者（男性：女性）	10（9：1）
年齢	24.90 ± 1.37
食事をしてからの時間（分）	347.00 ± 156.64
一日の喫煙本数（本）	17.80 ± 5.83
喫煙年数（年）	7 .15 ± 2.23
最後の喫煙からの経過時間（分）	105.10 ± 183.19

平均 ± 標準偏差

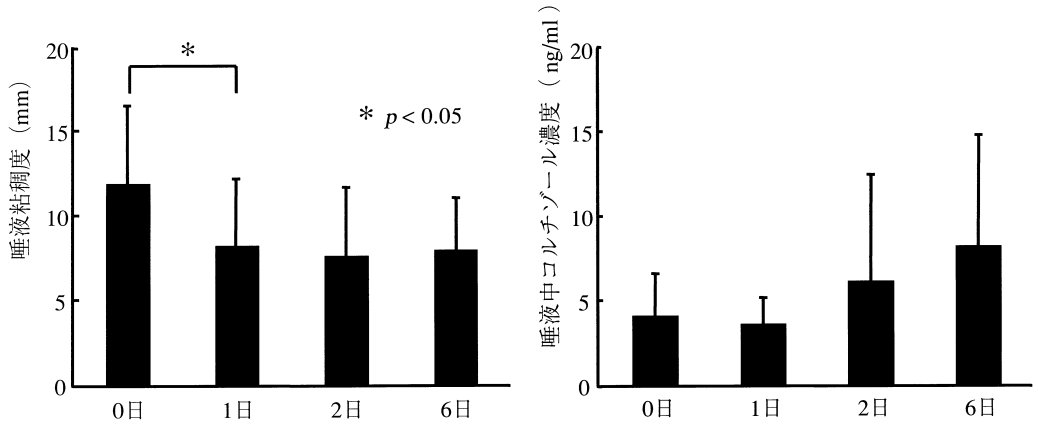


図２　喫煙停止による経時的変化（６日間の喫煙停止による変化）における唾液粘稠度（左グラフ），唾液中コルチゾール濃度（右グラフ）の変化を示す．
唾液粘稠度において０日と１日の間に有意差を認めた．

ml，9.12±7.42 ng/mlであった．

またアンケートの結果，食事をしてからの経過時間は347.00±156.64分，一日の喫煙本数は17.80±5.83本，喫煙年数は7.15±2.23年，最終喫煙からの経過時間は105.10±183.19分であった（表２）．

０日の唾液粘稠度と喫煙停止１日後の唾液粘稠度の間には有意差が認められたが（p＝0.04），喫煙停止１日後と２日後あるいは６日後の粘稠度の間には有意差は認められなかった。唾液中コルチゾール濃度に関しては，いずれの測定値間にも有意差は認められなかった（図２）．アンケート結果と唾液粘稠度の間にも有意な相関は認められなかった．

３．喫煙停止による唾液粘稠度の経時的変化（１日間の喫煙停止，喫煙再開による変化）

６日間の喫煙停止による結果から，唾液粘稠度は喫煙停止１日後にはベースライン時に比べて有意に低下してその後あまり変化しないことが明らかになった。よって，喫煙を１日停止させ，その後に再開させて粘稠度の変化を観察した．

被験者21名（男性18名，女性３名）は24.86±2.55歳であった．唾液粘稠度はベースライン時（０日），喫煙停止１日後，２日後でそれぞれ10.88±6.99 mm，8.72±5.61 mm，11.73±6.03 mmで，唾液中コチニン濃度はそれぞれ23.26±19.38 ng/ml，23.26±19.38 ng/ml，16.28±13.21 ng/mlであった．唾液中細菌数（CFU）は好気条件下ではベースライン時，喫煙停止１日後，２日後でそれぞれ133.48±119.21，332.57±397.34，490.38±684.16で，嫌気条件下ではそれぞれ216.00±231.31，215.38±180.11，463.05±733.78であった．唾液中コルチゾール濃度はベースライン時，喫煙停止１日後，２日後でそれぞれ11.14±6.88 ng/ml，9.51±9.48 ng/ml，5.57±6.17 ng/mlであった．アンケートの結果，食事をしてからの経過時間は327.27±194.84分，一日の喫煙本数は18.64±6.00本，喫煙年数は8.23±3.84年，最

表３　喫煙停止による経時的変化（１日の喫煙停止，喫煙再開による変化）のベースライン時におけるアンケート結果を示す．

被験者（男性：女性）	21（18：3）
年齢	24.86 ± 2.55
食事をしてからの時間（分）	327.27 ± 194.84
一日の喫煙本数（本）	18.64 ± 6.00
喫煙年数（年）	8 .23 ± 3.84
最後の喫煙からの経過時間（分）	47.27 ± 190.52

平均 ± 標準偏差

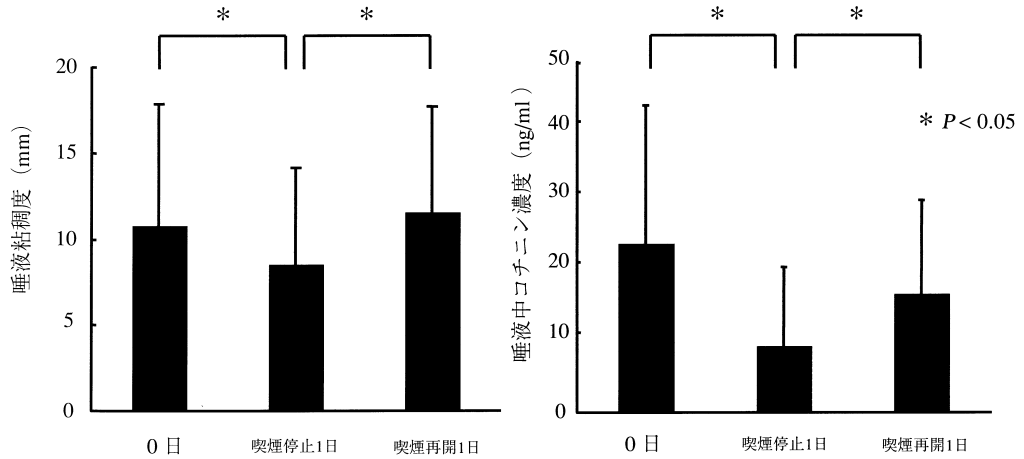


図3　喫煙停止による経時的変化（1日の喫煙停止，喫煙再開による変化）における唾液粘稠度（左グラフ），唾液中コチニン濃度（右グラフ）の変化を示す．

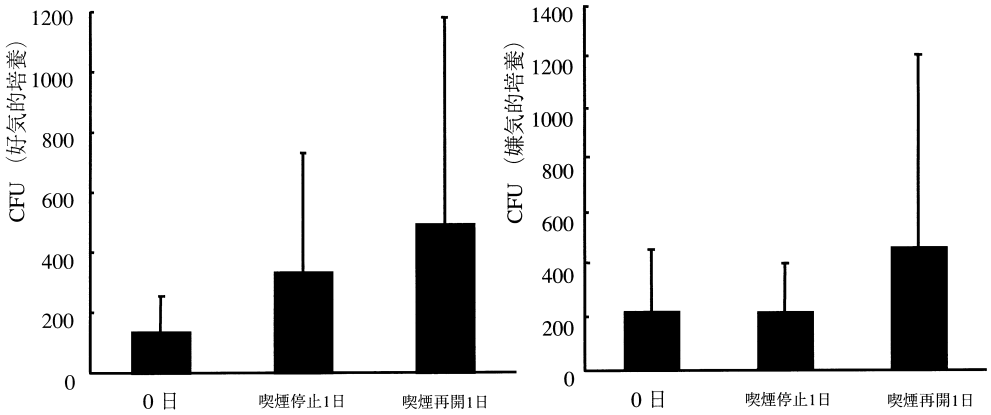


図4　喫煙停止による経時的変化（1日の喫煙停止，喫煙再開による変化）においてCFU（好気的培養）(左グラフ)，CFU（嫌気的培養）(右グラフ）の変化を示す．

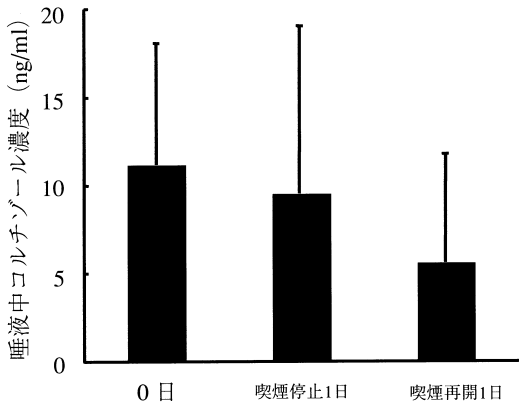


図5　喫煙停止による経時的変化（1日の喫煙停止，喫煙再開による変化）における唾液中コルチゾール濃度の変化を示す．

終喫煙からの経過時間は47.27±190.52分であった（表3）．

0日の唾液粘稠度と喫煙停止1日後の唾液粘稠度の間（$p=0.03$），および1日後の唾液粘稠度と2日後の唾液粘稠度の間（$p<0.01$）に有意差が認められた．同様に，唾液中コチニン濃度についても0日と1日後の間（$p<0.01$），1日後と2日後の間（$p<0.01$）にも有意差が認められた（図3）．好気的および嫌気的細菌数と唾液中コルチゾール濃度については，いずれの測定値間にも有意差は認められなかった（図4，5）．また，アンケート結果と

唾液粘稠度の間には有意な相関は認められなかった．

考　　察

本研究では最初に唾液粘稠度と唾液コチニン濃度に関連があるかどうかを検討した．その結果，被験者の唾液粘稠度と唾液中コチニン濃度の間に有意な相関が認められた．しかし，これは非常に弱い相関であった．また，被験者を喫煙者と非喫煙者に分け相関を調べたところ有意な相関は認められなかった．本測定は横断的な研究であり，非喫煙者の分布から認められるように唾液粘稠度は個人差が大きく影響していると考えられる．このことから，同一被験者で喫煙状態を変化させ唾液粘稠度の経時的変化を調べる必要性が考えられた．

そこで，喫煙停止による唾液粘稠度の変化では，まず10名の喫煙者に６日間喫煙を停止させた．その結果，喫煙停止１日後では０日に比べ唾液粘稠度が有意に減少し，その後６日後までは一定のレベルであった．これらの結果より，喫煙を停止することにより唾液粘稠度は１日後には有意に減少する可能性が示唆された．

次に，喫煙停止後に減少した唾液粘稠度が喫煙の再開により変化するかについて検討した。新たに21名の喫煙者を選択し，喫煙を１日停止させた後に喫煙を再開させ唾液粘稠度の変化を測定した．その結果，喫煙を停止することにより唾液粘稠度は有意に減少し，喫煙を再開することにより唾液粘稠度が有意に増加した．また，喫煙停止により唾液中コチニン濃度は０日と比べて有意に減少し，喫煙再開により有意に増加した．０日，１日後，２日後の各測定時における唾液粘稠度と唾液中コチニン濃度の相関を調べた結果，両者の間に有意な相関は認められなかった．これらの結果から，喫煙が唾液粘稠度および唾液中コチニン濃度に何らかの影響を与えていることが示唆されたが，血中ニコチンが代謝されたコチニンが唾液中に分泌され直接，唾液の粘稠度に関与している可能性は低いと考えられた．

喫煙停止による唾液粘稠度の減少という現象に，喫煙停止により喫煙者が感じるストレスが関与している可能性を考え，ストレスの一指標と考えられている唾液中コルチゾール濃度[11−13]を測定した。その結果，コルチゾール濃度は喫煙停止により有意に変化しなかった。よって，喫煙停止により喫煙者が受けるストレスが唾液粘稠度に影響を与えている可能性は低いと考えられた．

唾液の粘稠度を決定する因子については不明であるが，我々は比較的分泌量が一定の粘液性唾液に加えて漿液性唾液がどれくらい分泌されるかによって粘稠度が決定されるのではと考えている．しかし，Parvinen[14]はパラフィン刺激による唾液の分泌量は喫煙者と非喫煙者の間に有意差はなかったと報告している．さらにHeintze[15]は安静時唾液量を調べ，喫煙者と非喫煙者には有意差は認められなかったと報告している．また，PanghornとSharon[8]は喫煙者では非喫煙者に比べ漿液性唾液の分泌量が有意に増加していたと報告している．しかし，本研究での図１にように非喫煙者において唾液粘稠度が大きく変動していることから被験者毎の個人差は大きい。よって，これらの横断的研究では母集団となる被験者の数をかなり多くしないとデータの信頼性に疑問が生じる。一般に，唾液分泌量を調べるにあたっては多くの条件を統一して測定する必要があるので，外来患者のチェアサイドで簡易に測定できる可能性は低い。その点，本研究で使用した唾液粘稠度測定器を使用すれば短時間に再現性の高いデータが得られる。今後，喫煙と唾液粘稠度の関連を明らかにするために，唾液分泌量を測定し，唾液粘稠度との関連を探る必要がある．

唾液粘稠度の変化が口腔内の細菌数に影響を

与えるかを明らかにするために，唾液中サンプルを好気的，嫌気的培養を行った結果，CFUは経時的に変化せず唾液粘稠度との間にも関連は認められなかった。唾液粘稠度が口腔内細菌に与える影響については，この後，異なる手法により検討する必要が考えられた．

結　　語

本研究の結果から，喫煙により唾液粘稠度は増加することが明らかになった．しかし，喫煙がどのような機序で唾液粘稠度に影響を与えているか，喫煙による唾液粘稠度の変化が歯周病の進行に影響を与えているのか，については今後さらに検討する必要がある．

文　　献

1．Slots J : Subgingival microflora and periodontal disease. J Clin Periodontol l6 : 351－382, 1997.

2．Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M, Slots J : The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis ; a retrospective study.J Clin Periodontol 14 : 95－95, 1987.

3．Slots J, Listgarten MA : Bacteroides gingivalis, Bacteroides intermedius and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. J Clin Periodontol 15, 85－93, 1988.

4．Haber J, Wattles J, Crowley M, Mandell R, Joshipura K, Kent RL : Evidence for cigarette smoking as a major risk factor for periodontitis. J Periodontol 64 : 16－23, 1993.

5．Haber J : Cigarette smoking : a major risk factor for periodontitis.Compendium 15 : 1002－1008, 1994.

6．Haber J : Smoking is a major risk factor for periodontitis. Curr Opin Periodontol : 12－18, 1994.

7．Lie MA : Smoking as a risk factor for periodontitis. Ned Tijdschr Tandheelkd 106 : 419－423, 1999.

8．Pangborn RM, Sharon IM : Visual deprivation and parotid response to cigarette smoking.Physiol Behav 6 : 559, 1971.

9．Winsor AL : The effect of cigarette smoking on secreation.J Gen Psychol 6 : 190, 1972.

10．Korting GW, Kleinschmidt W : Veranderungen der Speichelsekretion bei Hautkrankheiten . Dermatol Wochenschr 128 : 772, 1953.

11．Tarui H, Nakamura A : Saliva cortisol : a good indicator for acceleration stress.Aviat Space Environ Med 58 : 573－575, 1987.

12．Schreinicke G, Hinz A, Kratzsch J, Huber B, Voigt G : Stress－related changes of saliva cortisol in VDU operators.Int Arch Occup Environ Health 62 : 319－321, 1990.

13．Cross N, Pines MK, Rogers LJ : Saliva sampling to assess cortisol levels in unrestrained common marmosets and the effect of behavioral stress. Am J Primatol 62 : 107－114, 2004.

14．Parvinen T : Stimulated salivaly flow rate, pH and lactobacillus and yeast concentrations in non－smokers and smokers. Scand J Dent Res 92 : 315, 1984.

15．Heintze U : Secretion rate, buffer effect and number of lactobacilli and *Streptcoccus mutans* of whole saliva of cigarette smokers and non－smokers. Scand J Dent Res 92 : 294, 1984.

〔臨　床〕

インプラント歯科外来患者の受診実態

國安　宏哉[1,2]，廣瀬由紀人[1,2]，越智　守生[1,2]，八島　明弘[1,2]，
新井田　淳[2]，平　博彦[1,3]，村田　勝[1,3]，北所　弘行[1,3]，
工藤　勝[1,4]，大桶　華子[1,4]，細川洋一郎[1,5]，田中　力延[1,5]

[1]北海道医療大学歯学部附属病院インプラント歯科外来
[2]北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座
[3]北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座
[4]北海道医療大学歯学部歯科麻酔学講座
[5]北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

Reported Conditions of Patients in the Clinical Department of Implant Dentistry

KUNIYASU Hiroya[1,2]，HIROSE Yukito[1,2]，OCHI Morio[1,2]，YAJIMA Akihiro[1,2]，
NIIDA Atsushi[2]，TAIRA Hirohiko[1,3]，MURATA Masaru[1,3]，
KITAJYO Hiroyuki[1,3]，KUDOU Masaru[1,4]，OHKE Hanako[1,4]，
HOSOKAWA Youichiro[1,5]and TANAKA Rikinobu[1,5]

[1]Clinical Department of Implant Dentistry, Dental Hospital,
[2]Department of Fixed Prosthodontics,
[3]Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
[4]Department of Dental Anesthesiology,
[5]Department of Dental Radiology,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

An implant dentistry out patient section of the Health Sciences University of Hokkaido department－of－dentistry attached hospital was launched on November5,2002, and 46patients have visited the clinic. The report has as its object the consulting made for implant dentistry outpatients from November, 2002to December, 2003, detailing patient needs for implant medical treatment It is thought that it will be necessary to inprove the quality and quantity for implant dentistry visitors from with expectetions of the present condition to meet the wishes of the patients. Implant medical treatments which expected the speciality nature and advanced technology is increasing.

Key words：*Dental Implant patient actual condition of consultation*

受付：平成16年４月13日

緒　　言

近年，インプラント治療はオッセオインテグレーションの概念の確立により適応症が広がり，従来の歯の欠損部補綴治療に大きな変化もたらした．本学の歯科補綴学第二講座と口腔外科学第二講座は患者のQOL向上のために1986年からインプラント治療を行なっており，その希望患者数は年々増加傾向を示している．また，本学におけるインプラント治療が，学外研修先や他の医療機関に認知されるに伴って紹介患者も増加した．しかし，他機関から紹介される患者の大部分は重度の顎堤萎縮のためインプラント埋入に骨移植が必要であったり，全身疾患に対する注意が必要な症例が多く，さらなる専門医によるチーム治療が必要と考えていた．そのころ，北海道医療大学歯学部附属病院の専門外来構想が持上がり，インプラント歯科外来は2002年11月５日に発足し、これまでに46名の患者が当専門外来を受診している．

今回我々は，本学インプラント歯科外来患者の患者受診動態、患者ニーズおよび治療についての現状把握を目的に，過去に報告されたインプラント治療実態を参考にして[1~6]臨床的検討を行なった．また，クリニカルパスを含む当インプラント歯科外来の活動状況，改善点についても報告する．

調査対象および内容

１．対象

調査の対象は，本学インプラント歯科外来が発足した2002年11月５日から2003年12月末までのインプラント歯科外来受診患者（インプラント相談のみで終了した患者は除外）とし，インプラント歯科外来発足前に一度受診，治療しているが発足後にあらためて受診，治療したものはインプラント歯科外来受診患者とした．また,2004年３月31日までのインプラント歯科外来の活動状況も調査の対象とした．

２．内容

調査内容は，本学附属病院カルテ記載内容をもとに，患者受診実態の項目を塩田ら[7]，馬越ら[8]，色川ら[9]の報告を参考にして作成した．

１）患者（性別，年令，住所，職業，紹介，治療の希望動機，欠損状態）
２）インプラント（システム，本数，表面性状，直径，長さ，埋入部位）
３）エックス線診断（CT,SIM/Plant™処理）
４）外科（骨移植，骨増生）
５）麻酔（精神鎮静法，局所麻酔，入院）
６）補綴（上部構造，材料，装着方法）
７）その他（インプラント治療を回避したもの）
８）インプラント歯科外来の活動状況（会議，症例検討会，クリニカルパス，改善点）

以上の８項目に分類し，さらに細かく調査，検討した．

結　　果

2002年11月５日から2003年12月末までのインプラント歯科外来受診患者は46名であった．そのうちインプラント埋入手術を行った患者は33症例で，埋入本数は99本であった．オッセオインテグレーションが得られず再埋入を行なったのは２本であった．

１．患者

（性別，年齢，住所，職業，紹介，治療の希望動機，欠損状態）

患者の性別は，男性16例，女性30例と女性が男性の約２倍となり，女性が全患者数の65％を占めた．年代別では,50歳代が20例（43％）と多く，男女別でも50歳代が最も多かった（表１）．居住区は，石狩地方が35例（76％）と最も多く，地域では石狩北部，中部，南部の順である．ついで空知地方が７例であった．その他としては，北見，留萌，小樽，標茶町から来院

表1　患者数および埋入数

	患者数			埋入数		
年齢	男性	女性	合計	男性	女性	合計
20-29	2	4	6	1	5	6
30-39	1	4	5	0	10	10
40-49	0	6 (1)	6	0	10	10
50-59	9	11	20	24	23	47
60-69	3	5 (1)	8	10	15	26
70-79	1	0	1	1	0	1
合計	16	30 (2)	46	36	63	99

( ) 内は検査後に治療を回避した患者数

表2　地域別患者数

地域		患者数	
石狩北部	当別町	8	元町3　園生2
	新篠津村	2	
	石狩市	7 (2)	花川5
石狩中部	札幌市	12 (5)	北区4　東区2　手稲区2
	江別市	4 (1)	大麻3
石狩南部	北広島市	1 (1)	
	千歳市	1	
その他	空知	7 (3)	滝川2　砂川2　岩見沢2
	その他	4 (1)	北見　留萌　小樽　上川郡標茶町
合計		46 (14)	

( )内は他医療機関からの紹介患者数

していた．他医療機関から紹介された患者は14例で30%を占めた（表2）．職業は，会社員15例，主婦14例，自営業8例が多く，合計で全体の80%を占めた（図1）．インプラント歯科外来受診の動機は，インプラント希望で来院が26例，インフォームドコンセントに基づいた担当医の説明に同意が20例であった（図2－a）．受診理由は，床義歯補綴を拒否19例，義歯の使用に不満12例，歯の切削に抵抗感10例，その他の理由5例であった（図2－b）．

2．インプラント

（システム，本数，表面性状，直径，長さ，埋入部位）

使用したインプラントシステムは，POI Systemインプラント38本（表面性状ではチタン合金22本，ハイドロキシアパタイトコーティング16本）(38%)，FRIALIT®－2インプラント34本（34%），Brånemarkインプラント27本（27%）で，合計99本であった（図3）．直径は，3.4mm以下が11本，3.5–3.9mmと4.0–4.9mmが最

図1　職業

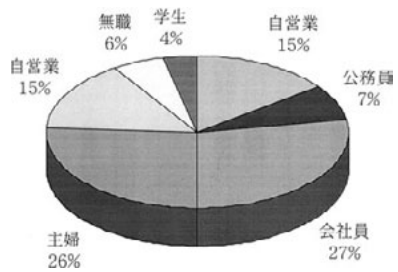


図2－a　インプラント歯科外来来院動機

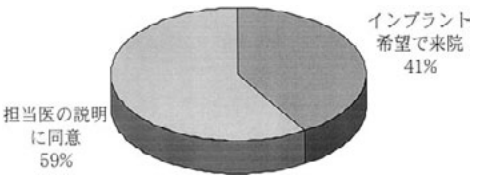


図2－b　インプラント歯科外来来院理由

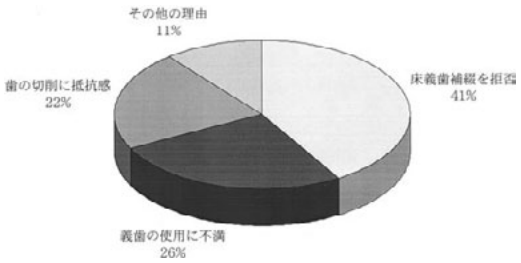


図3　インプラントの種類

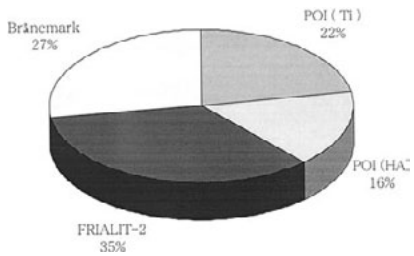


図 4　インプラントの直径

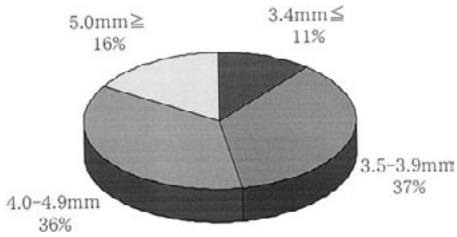


図 5　インプラントの長径

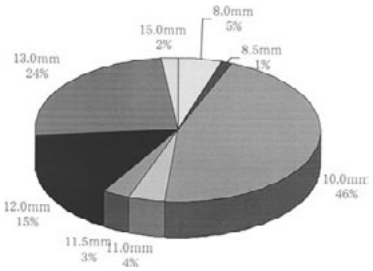


図 6　インプラント埋入部位

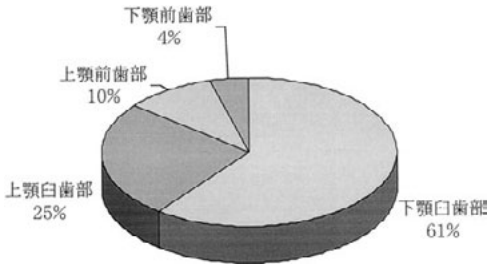


図 7　エックス線診断

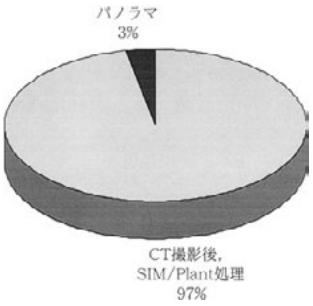


図 8　骨採取部

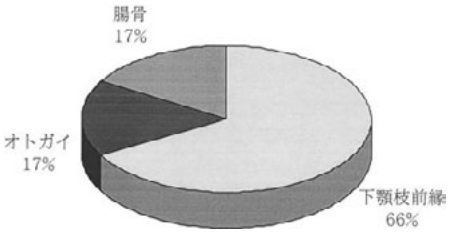


図 9　入院について

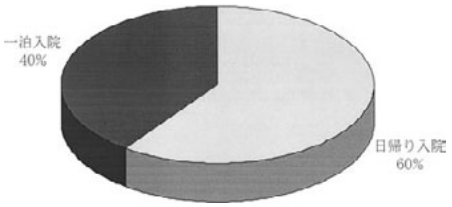


図10　装着した上部構造

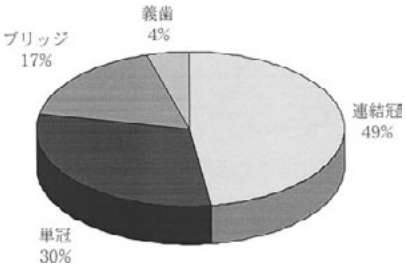
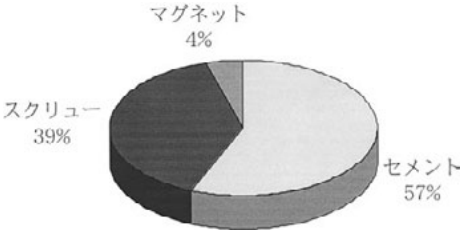


図11　上部構造の固定方法



も多くそれぞれ36本，5.0mm以上が16本であった（図４）．長さは，8.0mmが５本，8.5mmが１本，10.0mmが最も多く45本，11.0mmが４本，11.5mmが３本，12.0mmが15本，13.0mmが24本，15.0mmが２本であった（図５）．埋入部位別は，上顎臼歯部が25本，上顎前歯部が10本，下顎臼歯部が60本，下顎前歯部が４本であった（図６）．

３．エックス線診断

（CT,SIM/Plant™処理）

画像診断では,33埋入症例中CT撮影後にSIM/Plant™（インプラント術前シミュレーションソフト）処理を行なったものが32例，パノラマ撮影のみが１例，CT撮影のみが０例であった（図７）．

４．外科

（骨移植，骨増生）

インプラント埋入手術の前処置として骨移植または骨増生を行ったものは６例であった．採取部はオトガイ１例，腸骨１例，下顎枝前縁４例で（図８）術後に知覚異常などの偶発症は認めなかった．

５．麻酔

（精神鎮静法，局所麻酔，入院）

精神鎮静法を希望した患者は25症例で,12月末時点で20症例に精神鎮静法を行なった．インプラント埋入部位の麻酔方法は，全身麻酔の症例は無く，局所麻酔のみ，もしくは局所麻酔と精神鎮静法の併用であった．日帰り入院は12例，一泊入院は８例であった（図９）．

６．補綴

（上部構造，材料，装着方法）

装着したインプラント上部構造は連結冠が最も多く11例，単冠が７例，ブリッジが４例，義歯は少なく１例であった（プロビジョナルは除く）(図10)．

固定性上部構造の材料は全例がハイブリッド硬質レジンであった．装着方法は，セメント固定13例，スクリュー固定９例，マグネット１例で，セメント固定が最も多かった（図11）．セメント固定では全症例が仮着用セメントを使用していた．

７．その他

（インプラント治療を回避したもの）

CT撮影等の精密検査後にインプラント治療を回避した症例は２例であった.1例は，画像診断で骨移植の必要性が認められ，説明後，患者が骨移植を拒否し治療を回避した.1例は，本学附属病院総合診断科からインプラント歯科外来を受診し，治療について相談を行なうも，その後の精密検査，症例検討会，治療計画決定といったクリニカルパスに則った治療では治療開始

表３　クリニカルパス

まで長過ぎるという理由で治療を拒否された．

8．インプラント歯科外来の活動状況

（会議，症例検討会，クリニカルパス，改善点）

2002年11月5日に発足してから2004年3月31日現在までに，インプラント歯科外来の定例会議は18回開催された（少人数での臨時会議，検討会は除く）．会議の内容は，業務打合せ，症例検討会，器材説明，救命処置講習会であった．場所は，病院1F研修室，第1会議室で基本的に木曜日の診療業務終了後に行なっている．時間はほぼ2時間，説明会等では実習も含め3時間程度行なっている．他に，土曜日にインプラント歯科外来スタッフを対象にした救命処置講習会を開催した．現在準備中のクリニカルパスを示す（表3）．インプラント歯科外来会議で構成員から出された改善点は，治療に時間がかかる，細かなパスやマニュアルが完璧に完成されていない，他の業務と掛持ちのために現状では出席率が100%にならない，本学の患者説明用パンフレットが無い，インプラント歯科外来ホームページが無いなどであった．

考　　察

カリエス，歯周疾患，先天欠如，交通外傷などで歯を失った患者に対して，インプラント治療は予知性が良好なことより臨床において用いられる頻度は高くなってきていると思われる．オッセオインテグレーションの概念の確立により適応症が広がり，従来の義歯，ブリッジといった歯の欠損補綴治療に大きな変化をもたらした．本学の歯科補綴学第二講座と口腔外科学第二講座は1986年からインプラント治療を開始し，患者数は年々増加傾向を示している．インプラント歯科外来は2002年11月5日に発足し、2003年12月末までに46名の患者が当歯科外来を受診した．

患者の性別では女性が男性の約2倍となった．他の医療機関でも女性患者が多いと報告されている[7,10]．これはインプラント治療を希望する年齢層において仕事などの関係より，女性が男性に比べて歯科治療の受診可能時間が多く，また，口腔の審美性，機能回復に対する要求が高いことが原因と考えられる．住所は，石狩地方が35例（76%）と最も多かった．地域別では北部17例，中部16例，南部2例の順であった．札幌が存在し人口が最多の中部を抜いて，北部が17例（37%）と最も多く，南部は2例であった．北部のうち，本学が存在する当別町が8例，石狩市が7例と多かった．人口に対して患者が多い当別町の8例は，本学患者の中の当別町民の占める割合が45%弱と多いこと，札幌への通院の時間的制約などが考えられる．石狩市の7例は学外研修における歯科医師の説明によって本学でのインプラント治療を希望して来院した．石狩南部からは2例と特に少なく，これは本学までの通院ルート中に札幌，江別という都市が存在するため，都市部での病院が選択されるものと思われる．それに対して，空知地方からは7例であった．これは都市へのアクセスの途中に本学が位置するために来院しやすく，札幌より短時間で通院可能であることから選択されているのではないかと推察される．本学の地域特性を考えると，最大人口の中部からの来院を増加させると共に，北部，空知地方のインプラント希望患者を受け止め，都市へ流入しないようにアピールすることが病院としても重要ではないかと思われる．紹介患者率は30%と高く，今後さらなるインプラント歯科外来の整備と知名度の向上でさらに上昇すると考えられる．インプラント治療の希望理由は，床義歯補綴を拒否，義歯の違和感，クラスプをかけたり削ったりして残存歯に負担を掛けたくない，健全な天然歯を切削することへの抵抗感などが多く，これらの希望を満足させるためには従来の欠損補綴処置では対応できなく，患者の

QOLと歯科医療に対する新たなニーズが具体化されているものと思われる[7].

インプラントシステムはPOI System(38%), FRIALIT®−2(34%), Brånemark(27%)で,99本が埋入された.3システムとも同程度の使用頻度であった．その中で，POI Systemは日本人の顎骨に適したサイズのハンドピース，インスツルメントおよびインプラントが多く用意されているため，女性患者のように開口度が小さく，口腔内が狭い症例ではPOI Systemが選択されやすく，術者の人気も高かった．FRIALIT®−2は種類が少なく，ハンドピースやインスツルメントのサイズも大きく日本人の口腔内で使用しづらいシステムであったが，インプラント体がルートフォームである最大の特徴があるため，使用されていたと考えられる．Brånemarkは適応症の広いシステムであるが，術者が限られるため，やや少なかったと思われる．直径では,3.5−3.9mmと4.0−4.9mmがそれぞれ36本と合わせて72本（72%）を占め，次いで5.0mm以上が16本（16%）となった．予後と審美性より，できるだけ太くて歯断面と近いサイズを選択するようにしていることと，POI Systemの本学で多用している完全埋入型の3ピースフィクスチャーではラインナップが3.7と4.2mmの2種類であるため,3.5mm以上のサイズが89%を占めたと思われる．長さは,10.0mm以上が94%を占めた．これは，本学に来院された患者の6／46例,13%に対し，術前に骨増生等の処置が必要で，しかも残りの患者も術中に何らかの骨補填材，自家骨移植を半数以上が必要となるぐらい骨のボリュームが少ないことが背景になって，できるだけ長いインプラントを埋入しようとしていたことが考えられる．これにはCT撮影[11,12]，骨増生テクニック[13~15]，SIM/Plant™処理によるインプラント術前シミュレーション[16,17]が役立っており，今後も重要度は増すと推察される．インプラント埋入部位別では，臼歯部は上顎25本，下顎60本と下顎が2倍以上となった．これは大臼歯が欠損しやすいこと[18,19]，義歯が吸着しやすい上顎に比べて下顎義歯が安定しづらいことなどが考察される．前歯部では，上顎10本，下顎が4本と少なかった．これは臼歯に比べ前歯，特に下顎は歯の寿命が長く[18,19]，補綴処置をあまり必要としないこと，欠損しても審美性等の問題からブリッジを選択するのではないかと思われる．

画像診断では，ほぼ全ての症例でCT撮影[11,12]，SIM/Plant™処理によるインプラント術前シミュレーション[16,17]が行なわれた．これは，来院患者の多くが，骨のボリュームが少ないため1次医療機関で埋入不可能と診断されたり，予後を考えて解剖学的制約の中でできるだけ長く，太いインプラントを埋入するためには顎骨内部の情報が必要不可欠となり，ほとんどの症例で用いられたと思われる．残る1症例は5㎜ステンレス球をステントに応用し画像診断している．

骨移植，骨増生では，インプラント埋入手術の前処置として6例で骨移植，骨増生を行った．前処置を行わなかったインプラント通常埋入手術でもほぼ半数でドリルホールからの削片や，骨片で同時骨移植，骨増生を行なった．インプラント歯科外来が発足したため，外科的な高度処置が日常的に施行可能となったことと，術前の補綴診断より補綴学的に理想的な部位に手術用ステントを用いて埋入しているため[20]どうしても既存の骨そのままでは良好な埋入ができないことが要因と思われる．

麻酔方法は，全身麻酔の症例は無く，局所麻酔のみ，もしくは局所麻酔と精神鎮静法の併用であった．精神鎮静法希望は25症例,2003年12月末までにインプラント手術を行なった33症例中20症例に精神鎮静法を行なっている．精神鎮静法は危険因子を持っている患者のリスクを回避するのはもちろんのこと，痛くなく安心でき

る快適な手術管理を実現するには非常に有効である[21~23]．インプラント治療のように外科処置を伴い，痛みのイメージに結びつきやすい治療には特に有効と思われ，患者の精神鎮静法再希望が結果を表していると考える．そのため担当医が侵襲の少ない処置でも精神鎮静法を含む麻酔方法を全てのインプラント歯科外来患者に説明をしているため46人中25症例の希望があると考えられる（１人で複数回治療を受けているリピーターがいるため人と症例を別けた)．

インプラント上部構造では，連結冠，ブリッジ等の複数本のインプラント補綴が大多数を占めた．これは症例の大部分を占める臼歯部の欠損に対して，応力や補綴物にかかる回転力を考慮したためと考えられる[24]．デンチャータイプは１例と少ないが，インプラント希望の患者は義歯に対する不満が多く，できるだけ固定性の設計を望むためデンチャータイプは少なくなるのではと考えられる．固定性上部構造の材料は全例がハイブリッド硬質レジン前装冠であった．北海道地区の臨床医では，臼歯部で約25％に金属材料が選択されているが[5,6]，前歯部に限らず臼歯部でも歯冠色治療の希望が多く，審美性，耐磨耗性，耐衝撃性等の観点でもハイブリッド硬質レジン材料は十分満足できるので選択されている．装着方法は，セメント固定が多く，ついでスクリュー固定，患者可撤式（マグネット）であった．北海道地区の臨床医では，セメント，スクリュー，患者可撤式の順であり[5,6]，当歯科外来とほぼ同じであった．

スクリュー固定法はセメント固定法に比べてメタルフレームの適合を確認しやすい，定期検診時および修理などで上部構造をはずす場合に容易に行なうことができるが，セメント固定法は審美的[25,26]で上部構造の作製が比較的簡単なため多用されていると思われる．

精密検査後にインプラント治療が非適応と診断された患者は２名であった．非適応の理由は骨量不足部位への骨移植術を患者が拒否したこと，治療時間がかかり過ぎて困るとのことで患者さんの同意がえられず治療を拒否された．治療法の開発によって骨移植術以外の方法でインプラント治療可能となると思われるが，今後はこのように骨量不足の患者が他の機関から紹介されて増えることが予想され，当インプラント歯科外来での非適応の症例も増えることが考えられる．そのためにもさらなるチーム医療と高度な知識，技術が求められる．

インプラント歯科外来定例会は2004年３月31日現在までに18回開催されているが，少人数での臨時会議，検討会は除いているので，それらを含めると月に２～３回インプラント歯科外来での会議が開催されている．これは，インプラントを希望する患者が増加していることも大きな要因だが，その他の要因として基礎疾患，咬合状態，骨量の問題，患者サイドからの治療への要求の多様化と高度化が背景にあり，専門外来の特徴であるチーム医療が治療する術者側からも求められている．さらにこれらの要因はこれからも増加するものと思われ，本学におけるインプラント歯科外来の重要度は増すものと思われる．

結　　論

本学インプラント歯科外来患者の患者受診動態、患者ニーズ、治療についての現状把握を目的に,2002年11月５日から2003年12月末までにインプラント歯科外来を受診した患者と,2004年３月31日現在までのインプラント歯科外来の活動について臨床的検討を行なった結果，以下の結論を得た．

１．インプラント歯科外来受診患者46名は男女比が約1：２であり,50歳代が最も多かった．

２．インプラント歯科外来受診の動機は，インプラント希望で来院が26例，インフォームドコンセントに基づいた担当医の説明に同意が

20例であった．受診理由は，床義歯補綴を拒否19例，義歯の使用に不満12例，歯の切削に抵抗感10例，その他の理由５例であった．

３．埋入本数は99本であり，POI System,FRIALIT®-2, Brånemarkの順であった．直径は3.5-4.9mmが最も多く，長さは,10.0mm以上が多く埋入されていた．

４．エックス線診断，骨増生，快適な全身管理はインプラント埋入手術の適応症を広げるだけでなく，手術のリスクをも低減し，安全なインプラント治療となった．

５．本学インプラント歯科外来の定例会議は18回開催され，クリニカルパスなどの業務打合せ，症例検討会，器材説明，救命処置講習会が行なわれた．

本実態調査より，インプラント治療に対する患者ニーズは，専門性や高度先進技術を期待したものであった．すなわち，精神鎮静法を応用した全身管理下における安全かつ快適な手術，CT画像とコンピュータ３次元構築による正確な診断かつ明確なインフォームドコンセントを患者は期待している．インプラント治療を希望する患者が増加している現状に対して，我々は今後，インプラント歯科外来の質（技術）と量（スタッフ数）を充実させる必要があると考える．

参考文献

１．末次恒夫，古谷野潔，西田圭一，藤田和宏，原田　宙，古賀美香，住吉圭太：口腔インプラント臨床の現状調査―日本口腔インプラント学会評議員を対象とした調査―．日口腔インプラント誌　6：142-157，1993.

２．榎本昭二：歯科インプラントの現状に関する調査研究．歯医学誌　13：53-75，1994.

３．武田孝之：プロトコールと統計．補綴臨床　28：273-280，1995.

４．村松　透，荻原芳幸，檜山礼秀，小泉政幸，五十嵐孝義：歯科インプラントに関するアンケート調査．日口腔インプラント誌　12：262-280,1999.

５．越智守生，廣瀬由紀人，坂口邦彦，松本弘幸，加々見寛行，八島明弘，鴫野隆博，國安宏哉，山崎慎一郎，木村和代，白井伸一，富田達洋，永山正人，三嶋　顕：北海道地区の口腔インプラント臨床の現状調査―北日本口腔インプラント研究会会員のアンケート調査より―．日口腔インプラント誌　12：408-421,1999.

６．越智守生，國安宏哉，廣瀬由紀人，伊藤　仁，高島成悟，白井伸一，加々見寛行，八島明弘，鴫野隆博，神成克映，坂口邦彦，平　博彦，有末　眞：北海道地区の口腔インプラント臨床の現状調査―本学卒業生のアンケート調査より―．東日歯誌　19：37-54,2000.

７．塩田　真，金子隆二，岡田常司，平　健人，立川敬子，榎本昭二：インプラント治療部への新来患者に関する臨床統計的検討．口病誌　66：15-19,1999.

８．馬越誠之，岡田宗久，江田　哲，鈴木正二，坂下英明：当科におけるインプラント患者の臨床統計的観察．明海大歯誌　30：147-151,2001.

９．色川裕士，佐藤孝弘，藤井規孝，橋本明彦，野村修一：当科における過去５年間のインプラント治療の臨床統計的検討．新潟歯誌　32：285-289,2002.

10．村上　慶，伊東隆利，和久田哲生，西村賢二，渡辺　諭，伊東泰蔵，竹田博文：当院における10年以上経過したインプラント症例の臨床的検討．日口腔インプラント誌　10：68-75,1997.

11．Melvyn S.S., Stephen L.G.R., Michael L.R. and Neil C.　：Computed Tomography：Part1. Preoperative Assessment of the Mandible for Endosseous Implant surgery.Int J Oral Maxillofac Implants 3 ：137-141,1987.

12．Melvyn S.S., Stephen L.G.R., Michael L.R. and Neil C.：Computed Tomography：Part2. Preoperative Assessment of the Maxilla for Endosseous Implant surgery. Int J Oral Maxillofac Implants　2：143-148，1987.

13．Wood R. and Moore D.L.　：Grafting of the maxillary sinus with intraorally　harvested autogenous bone prior to implant placement. Int. J. Oral Maxillofac. Impl. 3 ：209214,1988.

14．Kahnberg K.E., Nystrom E. and Baetholdsson L.　：Combined use of bone grafts　and Branemark fixtures in the treatment of severely resorbed maxillae. Int. J. Oral Maxillofac. Impl. 4：297304,1989.

15. Wheeler S.L., Holmes R.E. and Calhoun C.J. ：Six−year clinical and histologic study of sinus−lift grafts. Int. J. Oral Maxillofac. Impl. 11：2634, 1996.
16. 水木信之：SIM/Plantの特徴と有用性―術前診断および治療計画への臨床応用―. Quintessence DENTAL Implantology 3：300−307, 1998.
17. 井汲憲治：インプラント術前検査における病診連携と治療の実際―治療計画にSIM/Plantを用いた上顎多数歯欠損症例を通じて―. Quintessence DENTAL Implantology 5：315−322, 1998.
18. 青野正男，岩山幸雄，岡田　宏，原　宜興，福山　宏，前田勝正，村山洋二：歯周治療の科学，医歯薬出版, 20−21, 1991.
19. 岡田昭五郎，吉田　茂，境　修：歯周疾患の疫学. 新予防歯科学上，医歯薬出版, 148−150, 1996.
20. 日高豊彦：サージカルステント概論―インプラント治療における術前診断の重要性―. Quintessence DENTAL Implantology 9：570−580, 2002.
21. 金子　譲，一戸達也：インプラント治療における精神鎮静法の役割. Quintessence DENTAL Implantology 6：198−203, 1999.
22. 小谷順一郎：歯科インプラント手術を安全におこなうために2. 鎮静法の応用. Quintessence DENTAL Implantology 7：424−428, 2000.
23. 櫻井　誠，白鳥清人，平井　滋，飯島俊一：歯科診療所でのインプラント手術に対する静脈内鎮静法の検討. 日口腔インプラント誌 16：32−40, 2003.
24. 佐藤孝弘，草刈　玄，宮川　修：下顎臼歯部に適用したインプラント周囲骨の三次元有限要素法による応力解析―上部構造による連結の力学的影響―. 補綴誌 40：682−694, 1996.
26. Hebel KS, Gajjar RC：Cement−retained versus screw−retained implant restorations−Achieving optimal occlusion and esthetics in implant dentistry−. J Prosthet Dent 77：28−35, 1997.
25. 松林忠敏，田辺久憲：セメント合着・ネジ止め固定複合型上部構造の製作―吸収の高度な顎堤に対するインプラント補綴―. Quintessence DENTAL Implantology 9：65−76, 2002.

〔臨　床〕

北海道医療大学歯学部附属病院・インプラント歯科外来の局所麻酔手術症例に対する精神鎮静法の有効性の検討

大桶華子[1,2]，工藤　勝[1,2]，北所弘行[1,3]，平　博彦[1,3]，村田　勝[1,3]，細川洋一郎[1,4]，
新井田淳[1,5]，國安宏哉[1,5]，八島明弘[1,5]，廣瀬由紀人[1,5]，越智守生[1,5]

[1]北海道医療大学歯学部附属病院インプラント歯科外来
[2]北海道医療大学歯学部歯科麻酔学講座
[3]北海道医療大学歯学部口腔外科学第Ⅱ講座
[4]北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座
[5]北海道医療大学歯学部歯科補綴学第Ⅱ講座

Studies on the efficacy of conscious sedation in cases of surgery under local anesthesia for the clinical department of implant dentistry in the dental hospital of the Health Sciences University of Hokkaido

OHKE Hanako[1,2], KUDO Masaru[1,2], KITAJO Hiroyuki[1,3], TAIRA Hirohiko[1,3], MURATA Masaru[1,3], HOSOKAWA Yoichiro[1,4], NIIDA Atsushi[1,5], KUNIYASU Hiroya[1,5], YAJIMA Akihiro[1,5], HIROSE Yukito[1,5],and OCHI Morio[1,5]

[1]Clinical Department of Implant Dentistry,
Dental Hospital, Health Sciences University of Hokkaido.
[2]Department of Dental Anesthesiology,
[3]Second Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
[4]Department of Dental Radiology,
[5]Department of Fixed Prothodontics,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

Abstract

From November 2002 through December 2003, 20 cases of dental implant surgery under local anesthesia especially for outpatients with dental implants were subjected to monitored care conscious sedation. The induction of sedation by nitrous oxide (N_2O) ・ Midazolam, maintenance of sedation by N_2O ・ Midazolam or N_2O ・ Propofol, and their efficacy were studied. The efficacy of conscious sedation was verified after the procedure especially with respect to anti-anxiety effects, vital sign fluctuations, amnesic effects, and pain during operation and post-operatively, and also the status of use of sedatives and degree of patient satisfaction.

The results show reduced increases in anxiety during the operation and that variations in the circulatory kinetics were suppressed. The frequency of complaints of pain during the operations was an average of

東日本歯学会第22回学術大会　平成16年２月14日
受付：平成16年４月１日

1.3 times. Cases exceeding 90 minutes of operation time recorded 70% complaints of pain. The pain was scored to be 24.1 points at the end of the operation and 24.2 points 2 hours after the procedure. The time experienced by the patients for the time required for conscious sedation was about 1/3, indicating satisfactory amnesic effects. The results of the questionnaire show that 93.8% of the patients expressed a wish for conscious sedation for the next surgery, showing the degree of satisfaction with the application of conscious sedation under local anesthesia to dental implant surgery to be very high.

Providing conscious sedation by a surgeon and a dental anesthesiologist who accurately understand the characteristics of conscious sedation can promote and improve safety of dental implant surgery and the comfort level of the procedure.

Key words : Conscious sedation, Dental implant surgery, Dental local anesthesia, Anxiety, Pain

Ⅰ．緒　　言

2002年11月５日にインプラント歯科外来（以下，当専門外来）は北海道医療大学歯学部附属病院において診療を開始した．当専門外来は，痛くなく安心できる快適なインプラント手術の周術期管理を患者に提供しなければならない[1]．痛くなく安心できる，局所麻酔下の歯科インプラント手術（以下，手術）を希望する患者・有病者・難（長時間）症例・歯科恐怖症などに対して，意識のある鎮静状態を維持する意識下精神鎮静法（以下，鎮静法）を適応している．鎮静法は手術室において歯科麻酔科専従スタッフが実施し，手術の安全を推進するために生体情報モニターを用いて観察した．鎮静法には，低濃度ガス麻酔剤（亜酸化窒素；以下，笑気）の吸入[2]および麻酔導入剤・維持剤の静脈内投与を併用した．当専門外来で鎮静法を適応した局所麻酔下手術患者に対し，抗不安効果，バイタルサインの変動，健忘効果，手術中・後の痛み，鎮痛剤の使用状況，患者満足度に関して鎮静法の有効性を検証した．

Ⅱ．対象および方法

１．対象

対象は2002年11月から2003年12月まで，鎮静法とアンケート調査の目的に関する十分な説明を行い，同意が得られた当専門外来の手術室における20症例（女性13例，男性７例）を対象に，レトロスペクティブに検証した．患者の年齢は25～70歳（48.6±14.1歳，以下の括弧内は平均値±標準偏差），体重は45.5～77.4㎏（58.1±10.3㎏）であった．なお，患者背景を表１に示した（Table 1）．

２．手術内容

手術内容はインプラント埋入術，骨移植術，

Table1　患者背景

性別（M/F）	7/13
年齢（years）	48.6±14.1 (25~70)
身長（cm）	160.6± 7.3 (146.5~174.5)
体重（kg）	58.1±10.3 (45.5~77.4)
基礎疾患（cases）	高血圧症：8
	心 疾 患：2
	糖 尿 病：2
	そ の 他：3
ASA ps（cases）	Ⅰ：10 / Ⅱ：10

Table2　手術内容

予定手術時間（min）	82.6±16.9 (50~120)
手術時間（min）	83.3±30.0 (38~137)
術者所要時間（min）	100.2±31.7 (58~154)
麻酔管理時間（min）	142.3±33.9 (85~198)
術式 (cases)	埋入16 → 平均2.75本 (1~6本)
	骨移植 2
	サイナスリフト 1
	二次手術 1
	抜歯 2　　（重複あり）
術前後管理 (cases)	入院 8 / 外来 12

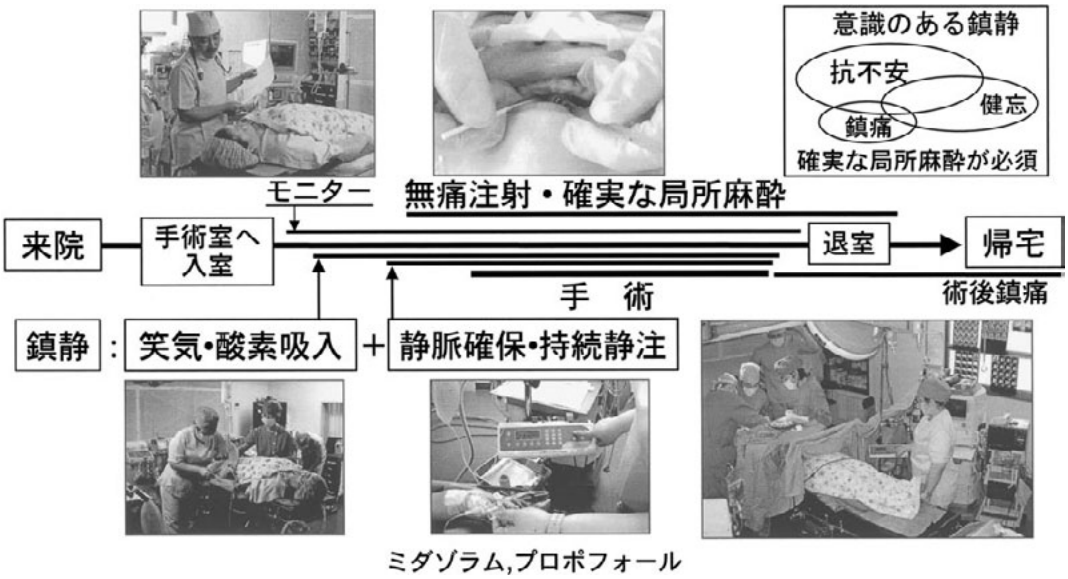


Fig.1　インプラント歯科外来におけるモニター観察下の鎮静法と局所麻酔法

上顎洞挙上術などであり，表２に詳細を示した．なお，手術予定時間は50～120分（82.6±16.9分）だが，結果的に要した時間は57～154分（98.5±32.6分）となった．術後の患者管理は，当日帰宅12症例，当日の１泊入院が８症例であった（Table 2）．

３．鎮静法

全症例において安全を推進するために，生体情報モニターを用いた心電図とパルスオキシメータ等で，バイタルサインを測定し，歯科麻酔科専従スタッフ（日本歯科麻酔学会認定医および指導医）が鎮静法を提供した．

鎮静の導入は30～50％笑気を酸素とともに鼻カニューレ（セキムラ，ISカニューレ）を用いて吸入した．笑気吸入10分後，静脈留置針の穿刺と留置の痛みを緩和するために皮膚表面麻酔剤を貼付した部位から静脈路を確保し[3,4]，ミダゾラムを鎮静導入量（注入速度：0.015mg/kg体重／分，注入量：0.075mg/kg体重を目安）緩徐に静注した[5,6]．意識のある適切な鎮静（意識下鎮静）状態を確認後，速やかに局所麻酔注射を実施した．手術中の意識下鎮静維持は笑気・ミダゾラムを用いたが，90分を超える症例などには笑気・プロポフォールによる維持を適応した．30％笑気を吸入した状態で，ミダゾラムを１時間あたり鎮静導入量の１／２～１／３量，またはプロポフォールを１～３mg／kg／時間で，インフージョンポンプを用いて持続注入した．なお，手術当日の一泊入院を予定した長時間症例の３症例には鎮静維持に麻酔用鎮痛剤の静注を併用した．

Table3　最適鎮静状態の指標

・発　語	→ 不明瞭化
・眼瞼下垂	→ 中等度（半眼状態）
・応　答	→ あり
・開口維持	→ 可能（短時間）
・体　動	→ なし
・顔不安スケール (FAS)	→ 上昇なし
・バイタルサイン	→ 血圧・脈拍の上昇なし SpO_2の低下なし

意識下鎮静を維持するために表３に示した基準で，抗不安効果，応答，半眼状態，発語の不明瞭化など臨床徴候を判定した（Table 3）．なお，鎮静法を適応した症例の来院から帰宅までのタイムスケジュールを示した（Fig. 1）．

4．局所麻酔

局所麻酔は術者が浸潤麻酔を行った．ただし，術者から依頼を受けた時には，歯科麻酔科医が電動注射器〔Milestone Scientific社製：The Wand™[7,8]，本器の注入速度は高速注入（注入圧：550mmHg）と低速注入（注入圧：200mmHg）の2段階〕を用いて浸潤〔注射針は専用注射針である外径0.30mm・長さ12mm（30G×1／2”）を用いた〕および伝達麻酔〔麻酔用穿刺針；外径0.40mm・長さ22mm（25G×1”）を用いた〕を行った．なお，手術開始後の局所麻酔注射は全症例，術者が実施した．

Table4 観察項目と評価法

観察項目
① 抗不安効果 → 顔不安スケール (FAS)
② 痛み → 手術中に訴えた回数
鎮痛剤の使用状況と使用理由
VAS-pain（手術終了時・終了2時間後）
③ 健忘 → 所要時間の短縮感・手術中の記憶
④ 患者の満足度・要望 → アンケート調査（終了2時間後）

Ⅲ　観察項目と評価方法（Table 4）

1．抗不安効果

不安は，術前（来院時），手術室入室時，鎮静導入直後，手術開始（切開）時，手術開始30分後，手術終了時，終了2時間後に，顔不安スケール(FAS)[9,10,11]（Fig. 2）を用いて評価した．

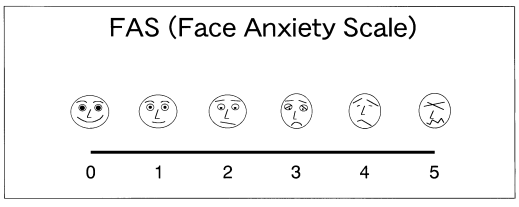


Fig.2 FAS
状態不安の評価に使用したFASは0～5の100ポイントスケールとした．FAS 2得点はSTAIの評価基準で高い状態不安に相当する．

2．バイタルサインの変動

生体情報モニターによる連続的なバイタルサインの測定，心電図所見の変化に対する治療の有無を集計した．

3．健忘効果

健忘効果は，手術直後に患者が感じた時間を聴取し，所要時間の短縮感（患者が感じた時間／鎮静管理時間×100）とした．加えて，局所麻酔注射を受けた記憶など，術中の記憶を聴取して評価した．

4．手術中・後の痛み

痛みの定量評価にはAitkenのVASスケール[12]の左端に「痛みなし」，右端には「耐えられない痛み」と記載したVAS-pain（Fig. 3）を用いた．手術終了時および終了2時間後に，ゼロから100得点で評価した．

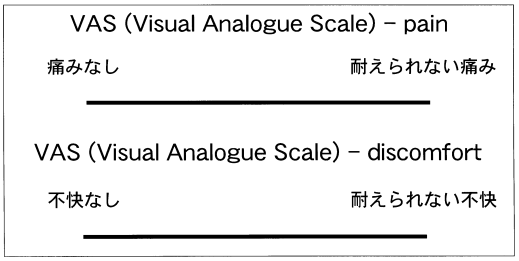


Fig.3 VAS-painとVAS-discomfort
痛みはVAS-painで，不快はVAS-discomfortにて評価した．VASは左右に100mmで目盛のない100ポイントスケールとした．

5．鎮痛剤の使用状況

鎮痛剤の初回内服時期，種類・量，そして必要とした理由を調査した．

6．患者満足度と要望

手術終了2時間後の時点で意見調査を実施した．すなわち，自記式アンケート調査票を作成し，手術中の耐えられない不快・痛みの記憶とその程度を評価した．不快の定量評価はAitkenのVASスケール[12]の左端は「不満なし」のゼロ得点，右端を「耐えられない不満」の100得点としたVAS-discomfort（Fig. 3）を用いた．手術終了時，および終了2時間後に患者の満足度を評価した．そして，次回同様の手術を受ける場合に希望する麻酔管理方法について回答を

求めた．

Ⅳ　結　　果

１．抗不安効果

FASは入室時と比較して鎮静開始時に有意な低下（p＝0.004）を示し，手術中は入室時と同程度であった．手術中の不安の増加は鎮静法により抑制した（Fig. 4）．

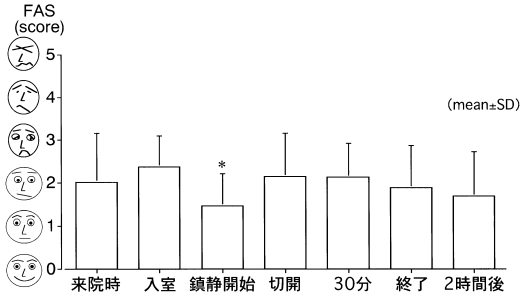


Fig.4　FASによる抗不安効果の判定
＊：p <0.01 (Wilcoxson signed rank test) vs 入室時

２．血圧と脈拍の変動

生体情報モニターを用いて観察した結果，75％では血圧と脈拍の変動，および経皮的酸素飽和度は大きな変動を認めなかったが，術中の高血圧２例，頻脈１例，期外収縮４例，酸素飽和度の軽度低下１例を認めた．循環治療薬（カルシウム拮抗薬；ニカルジピン，坑不整脈薬；リドカイン）を静注した２症例の他はどれも一時的であり，手術を中断・中止した症例は認めなかった．

３．健忘効果

鎮静導入から鎮静覚醒に要した時間（所要時間）142.3±33.9分に対し，患者が感じた体感時間は41.9±28.1分で有意な短縮（p＜0.001，t-test）を認めた．すなわち，実際に要した時間の32.6％に感じた（Table 5）．

Table5　所要時間の短縮感

鎮静所要時間（麻酔管理時間）	142.3±33.9 分
体感時間：患者自身が感じた時間	41.9±28.1 分*
体感時間／鎮静所要時間 ×100	32.6 %

＊：p ＜0.001 (t-test) vs 鎮静所要時間

４．手術中・後の痛み

55％には完全な無痛が得られたが，平均した手術中の痛みの訴えは1.3±1.6回であった．手術時間別の検討では，90分以内の症例では全く痛みを訴えなかった症例が73％（８／11例）を占めたが，それ以上の長時間症例では33％（３／９例）であった（Table 6）．手術終了時のVAS-painは０～96（24.1±31.3）得点，手術２時間後０～53（24.2±18.1）得点となった（Fig. 5）．

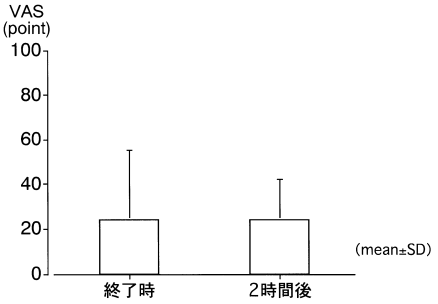


Fig.5　術後の痛み（VAS）

Table6　手術時間と手術中に痛みを訴えた回数

手術時間	各症例が手術中に訴えた痛みの回数
38～　60分（6症例）	０／０／０／０／０／０回
61～　90分（5症例）	０／０／２／２／３回
91～120分（7症例）	０／０／１／１／３／４／５回
121～137分（2症例）	０／３回
平均 83.3分（20症例）	平均 1.32±1.60 回（０～５回） 手術中の無痛 11/20 症例（55%）

５．鎮痛剤の使用状況

術後２時間以内における鎮痛剤の初回服用時期とその理由の内訳を表７に示す．４症例では術者の指示により術前から予防的に使用していた．手術後，疼痛を訴えた後の内服が45％（９症例）であった．一方，術前から術後２時間以内に鎮痛剤を全く使用しなかったのは15％（３症例）であった（Table 7）．

Table7　鎮痛剤の初回内服時期

	使用理由	症例数
術　前	予防的	4例
終了時	疼　痛	4例
	予防的	5例
2時間後まで	疼　痛	5例
	予防的	1例
2時間後まで未使用		5例（うち2例は術前予防投与あり）

6．患者満足度と要望

アンケート調査の回収率は80%であった．手術中に耐えられない痛みや不快を感じたと回答した症例は無かった.93.8%が次回の手術も鎮静法を希望すると回答した（Table 8, 9）.

Table8　アンケート調査結果：手術中の痛み・不快に関する記憶

「手術中，耐えられない痛みや不快を感じましたか？」	
あ　り	0症例
な　し	16症例

（アンケート調査回収率：16/20=80%）

Table9　アンケート調査結果：患者が希望する麻酔管理法

「もし，次回同じ手術を受けるとしたら，どの麻酔管理法を希望しますか？」	
① 局所麻酔のみ	1症例
② 今回と同じく，鎮静	15症例（回答の93.8%）
③ 全身麻酔	0症例

（アンケート調査回収率：16/20=80%）

V　考　　察

患者は中・高齢者が多く，55%が基礎的な全身疾患を認めていた．手術を安全に行うために呼吸・循環モニターは必須である[13]．心電計・パスルオキシメータ・自動血圧計・体温計等をを備えた生体情報モニターを用いて観察した結果，2症例に治療薬の静注を必要とした．近年の歯科麻酔関連の訴訟は0.56例／年の頻度で発生している[14]．生体情報モニター監視下に点滴注射を行う鎮静法は，手術の安全推進に対する有効性を実証したと考える．鎮静法の特性を正確に理解した術者と，歯科麻酔科医が連携した周術期を提供することで，より良い歯科インプラント診療が提供できる．

手術と手術時間，そして麻酔管理時間（手術室への，入室から退室まで）を検討した結果，インプラントの埋入本数は平均2.75本，平均手術時間は83分，1／4口腔単位での手術が主であった．平均手術時間を平均インプラント埋入本数で除すると，埋入一本に30分を要し，桜井らの報告の2.5倍である[15]．今後，手術操作時間を短縮するためには,1回の手術における埋入本数を増加させることで，一本当たりの埋入時間は半減すると推察できる．

鎮静法の抗不安効果は入室時に比較して鎮静導入時で有意な不安の低下を認め，術中の不安増大も防止したと考える．

健忘効果に関する結果から，手術前に受けた局所麻酔注射，「術中の術者や麻酔科医との会話」や「痛い」と発言したことなどを記憶していない症例が多数認められた.「今回の手術で何が一番，辛く，耐えられなかったですか」の質問には「辛いことは何も覚えていないから，わからない」と回答する患者も多く，良好な健忘効果が得られた．加えて，患者が感じた時間は実際に要した時間の1／3程度となる新たな知見が得られた．

局所麻酔注射が与える不快と痛みの結果では，手術前の局所麻酔注射に痛みを訴えた症例を認めた．痛くない局所麻酔注射の実施が必須であり，手にする注射器が小さい電動注射器を有効利用したい．患者に注射器を見せないようにし[16]，注入圧を200mmHg程度に低く保ち，注入時間は90秒を超えないよう，浸潤麻酔注射[8]を最初に行うことが，不安と痛みの軽減化に有効である．その後，傍骨膜注射や伝達麻酔注射

を実施することが望まれる．

佐久間は，歯科医療紛争の１割が伝達麻酔後の感覚麻痺であると報告している[17]．特に下顎臼歯部の手術では，伝達麻酔の注射による感覚麻痺を警戒しなければならない．当専門外来の歯科麻酔科医が行う場合には，下歯槽神経伝達麻酔は翼突下顎隙内・下顎孔前方の骨面に針先を直達[18]，薬液を極めて緩徐に注入する方法を実施している．加えて，針先を骨に当てても捲れない麻酔用穿刺針（25G×１”）を用いることで，伝達麻酔の注射による感覚麻痺を認めた症例はない．

手術中の完全な無痛が得られたのは73％であった．90分を超えた手術では67％に痛みの訴えを認め，手術終了時には４例で耐えられない痛みを訴えた．特に，90分以上の長時間手術の完全無痛化を実施するために，効果持続時間の長い局所麻酔薬の使用および骨髄内持続注射の導入を積極的に検討し，局所麻酔法の効果を手術終了まで延長させなければならない[19]．さらに，手術後の疼痛緩和のための局所麻酔注射も必要と考える．

患者の満足度に関するアンケート調査の結果，鎮静法を適応した15名のうち14名が「次回の手術も鎮静法を希望」と回答した．患者の満足度は非常に高いと考える．すなわち，帰宅時，患者は手術中や手術直後に患者自身が訴えていた「不快」や「痛み」の記憶がないため，満足していると考える．この健忘効果のため，手術に関する術後のアンケート調査から，手術中の「耐えられない不快」や「耐えられない痛み」を訴えた患者はいなかった.「鎮静は健忘効果が重要」であるとの宮脇の意見[20]があるが，手術中の痛みや辛いことを記憶していないから良いとは考えない．手術前から術後までの，抗不安効果，呼吸・循環の安定，そして完全無痛が必須と考える．この健忘効果は30％笑気吸入と共にミダゾラムを必要量与薬して鎮静導入し，局所麻酔注射または手術開始にともないインフュージョンポンプを用いたミダゾラムまたはプロポフォール持続注入を実施したためと考える．ミダゾラムでの鎮静維持は１時間に鎮静導入量の１／２～１／３量，プロポフォールでは１～４mg/kg／時間を持続静注した．この投与方法は手術に対し良好な鎮静と健忘効果を維持するため，有効な方法であることを証明できたといえる．今後，歯科における鎮静法を発展させ，高齢社会に積極的に対応しなければならない[21]．

鎮静法の特性を正確に理解した術者と，歯科麻酔科医が生体情報モニター下の鎮静法と局所麻酔法を改良・発展させることで，一般診療である当専門外来の手術症例の周術期管理における安全と快適，満足度の向上を推進できる．

Ⅵ 結　語

当専門外来開設後１年間の20症例に対し，笑気・ミダゾラムによる鎮静導入，笑気・ミダゾラムまたは笑気・プロポフォールでの鎮静維持を適応し，その有効性を事後検証した．その結果，手術中の不安増加を抑制し，循環動態の変動を制御した．鎮静所要時間に対する患者の体感時間は１／３程度となり良好な健忘効果を得た．手術中の痛みの訴えは平均1.3回であった．手術時間90分を超える症例では70％が手術中に痛みを訴えた．手術終了時の痛みは24.1得点，手術２時間後では24.2得点であった．アンケート調査の結果，患者の93.8％は次回の手術も鎮静法を希望すると回答し，鎮静法を適応した局所麻酔下の手術に対する満足度は高かった．

文　献

１）工藤　勝：米国歯科麻酔事情．東日本歯誌 **17**：69-73,1998.
２）工藤　勝：歯科における亜酸化窒素・酸素吸入鎮

静法の有効性　－痛くない、安心・快適な歯科医療を目指した笑気吸入鎮静法の有効利用－.Medical Gases **5** : 21-27, 2003.

3）大桶華子，工藤　勝，河合拓郎，高垣美智子，河野　隆，國分正廣，新家　昇：静脈路確保部位における貼付用局所麻酔剤の効果に関する研究．東日本歯学雑誌 **16** : 35-40, 1997.

4）大桶華子，工藤　勝，加藤元康，河合拓郎，國分正廣，新家　昇：極細歯科用ディスポーザブル注射針と笑気吸入鎮静法が口腔粘膜刺入の疼痛緩和におよぼす影響．東日本歯学雑誌 **21** : 261-266, 2002.

5）三浦一恵：ミダゾラム静脈内鎮静法の研究－異なる投与速度による鎮静と回復の関係について－．日本歯科麻酔学会雑誌 **24** : 228-237, 1996.

6）大桶華子，工藤　勝，加藤元康，河合拓郎，佐藤雄季，片桐和人，國分正廣，新家　昇：歯科における鎮静法の研究　－第３報　ミダゾラム静脈内鎮静法における術中鎮静維持のための追加投与方法－．東日本歯誌 **19** : 171-179, 2000.

7）Hochman M, Chiarello D, Hochman CB, Lopatkin R, Pergola S : Computerized local anesthetic delivery vs. traditional syringe technique.NY State Dent J. **63** : 24-29, 1997.

8）工藤　勝，大桶華子，河合拓郎，他：歯肉粘膜下浸潤麻酔時の注入圧と注入時間が不安と痛みに及ぼす影響．日本歯科麻酔学会雑誌 **32** : 49-54, 2004.

9）Kudo M, Kato M, Kokubu M, Naya Y, Shinya N : Evaluation of the relationship between a Face Anxiety Scale and the State-trait anxiety inventory.HIGASHI NIPPON DENTAL JOURNAL **14** : 57-62, 1995.

10）工藤　勝，大桶華子，河合拓郎，加藤元康，國分正廣，新家　昇：簡単な不安評価方法の考案－顔不安スケールと状態－特性不安尺度の相関性－．日本臨床麻酔誌 **19** : 243,1999.

11）Kudo M, Ohke H, Shinya N : Positive correlation between the face anxiety scale and the state anxiety inventory in elderly Dental patients.HIGASHI NIPPON DENTAL JOURNAL **22** : 29-33, 2003.

12）Aitken RCV：Measurement of feelings using visual analogue scales.Proc Roy Soc Med **62** : 989-993, 1961.

13）小谷順一郎：歯科インプラント手術を安全に行うために．Quintessence Dental IMPLANTOLOGY **7** : 568-572, 2000.

14）加來洋子，長　政隆，荒木　豊，細沼　弘，小林加代子，渋谷　鉱：報道機関紙（誌）にみられた麻酔・歯科麻酔事故に関する記事について－第２報　1980～2002年の訴訟記事を中心に－．日本歯科麻酔学会雑誌 **32** : 34-49, 2004.

15）桜井　誠，白鳥清人，平井　滋，飯島俊一；歯科診療所でのインプラント手術に対する静脈内鎮静法の検討．日本口腔インプラント誌 **16** : 32-40, 2003.

16）M. Kudo, H. Ohke, K. Katagiri, Y. Sato, T. Kawai, M. Kato, M. Kokubu, N. Shinya : The Shape of Local Anesthetic Injection Syringes with Less Discomfort and Anxiety -Evaluation of Discomfort and Anxiety Caused by Various Types of Local Anesthetic Injection Syringes in High Level Trait-Anxiety People. Anesth Prog **48** : 138-140, 2001.

17）佐久間康司：歯科麻酔・歯科臨床の法律学序説．日本歯科麻酔学会雑誌 **30** : 632-635, 2002.

18）TAKASUGI N, FURUYA H, MORIYA K, OKAMOTO Y : Clinical Evaluation of Inferior Alveolar Nerve Block by Injection into the Pterygomandibular Space Anterior to the Mandibular foramen. Anesthesia Progress **47** : 125-129, 2000.

19）深山治久：歯科局所麻酔法の効率化に関する研究．日本歯科麻酔学会雑誌 **32** : 1-6, 2004.

20）宮脇卓也：ミダジラムによる鎮静．LiSA **7** : 130-137, 2000.

21）金子　譲：歯科における高齢者の静脈内鎮静法．臨床麻酔 **24** : 1263-1271, 2000.

〔臨　床〕

クローン病患者に見られた顎関節滑膜炎の一例

金澤　　香，柴田　考典，櫻井　博理*，吉澤　信夫*

北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座
*山形大学医学部代謝再生統御学講座顎顔面口腔外科学分野

Temporomandibular joint synovitis in patients with Crohn's disease：a case report

Kaoru KANAZAWA, Takanori SHIBATA, Hiromasa SAKURAI and Nobuo YOSHIZAWA

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery,
School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Course of Metabolic and Regenerative Medicine,
School of Medicine, Yamagata University

Abstract

We report a case of bilateral temporomandibular joint (TMJ) synovitis in a patient with Crohn's disease. The patient was an eighteen year old male, who had been diagnosed with Crohn's disease in February 1992 at Yamagata University Medical Hospital. The patient complained of jaw opening pain of the bilateral TMJ, and was referred to the Department of Oral and Maxillofacial Surgery of the Hospital. The magnetic resonance images demonstrated severe joint effusion in the upper and lower compartments of the bilateral TMJ. The synovial fluids, aspirated with the direct method from the upper and lower cavities of the right TMJ, were analyzed biochemically on glycosaminoglycans, cytokines, and oxidation products of nitric oxide.

These results showed a higher concentration of IL-1β and TNF-α in the synovial fluid of the right TMJ in this patient. This report is the first to demonstrate a higher concentration of IL-1β and TNF-α in the synovial fluid of the TMJ in patients with Crohn's disease. This result suggests that an initial treatment method for TMJ synovitis with Crohn's disease is to irrigate by a large volume of saline, TMJ irrigation therapy.

Key words : TMJ Synovitis, Crohn's disease, Synovial Fluid Analysis, Cytokine

受付：平成16年４月１日

緒　　言

クローン病は回腸末端と大腸に好発する肉芽腫性炎が主病変であり[1]，長期経過中に肝胆道系，筋肉骨格系，皮膚，眼，泌尿器系，血管血液系，心臓系，呼吸器系，内分泌系などの腸管外の症状を合併すると報告されている[2]．

このうち，筋肉骨格系合併症には末梢関節炎，強直性脊椎炎，仙腸関節炎などの関節症状が多く，その出現率は2.4～22.2%[3]である．特に末梢関節炎は，大腸型クローン病に多く合併し[4]，その好発部位は下肢関節，特に膝関節，足関節，中足趾節関節とされている[3]．なお，顎関節炎については，われわれが渉猟した限りでは報告されていない．

今回，われわれは顎関節滑膜炎を伴ったクローン病患者に顎関節洗浄療法を行い，臨床症状の消退を経験するとともに，治療前に滑液の採取を行い生化学的分析を行った結果，興味ある知見を得たので，文献的考察を加え報告する．

症　　例

患　者：18歳，男性
初　診：1999年11月２日
主　訴：右顎関節部の自発痛と開口障害
既往歴：生後３か月時からアトピー性皮膚炎
家族歴：母方の祖母は大腸癌にて死亡．父親は腸閉塞の既往がある．同胞は男子２名，症例は第３子，第２子は過敏性大腸炎の既往があったが，母親には特記すべき事項なし．
現病歴：1991年７月頃に腹痛，下痢および，血便が出現した．その後も持続したため，翌年２月21日に山形大学医学部附属病院小児科を初診し，第１回目の入院となった．慢性炎症と鉄欠乏性貧血と低タンパク血症，慢性下痢，炎症反応が続くという状態のため，腸管造影エックス線検査と内視鏡検査を実施した．その結果，上行・下行結腸に縦走潰瘍，敷石状外観を認め，さらに生検により非乾酪壊死性類上皮細胞肉芽腫が認められたため，クローン病と診断された．なお，抗アメーバ赤痢抗体，ツベルクリン反応，便培養，抗酸菌培養も行い，全て陰性であった．サラゾスルファピリンの内服と経腸栄養を開始し，退院後は経口摂取との併用となり，しばらく自覚症状の消退をみていた．

1998年１月頃より下痢が再発し，サラゾスルファピリンをメサラジンに変更するも,4月になり症状がさらに悪化し，炎症反応と血便が認められたため第２回目の入院となった．再度の腸管造影エックス線検査により，小腸にも敷石状外観が一部認められたため，小腸・大腸型のクローン病と診断された．副腎皮質ステロイド薬の内服を開始し，経腸栄養により症状が一時的に改善したが，その後症状の増悪，軽減を繰り返した．すなわち，同年12月に第３回目入院となり，絶食と点滴静注による栄養管理にて症状が一時的に改善し，徐々に経腸栄養に移行した．また，このころより肛門部より膿状浸出液を認め，1999年１月に発熱が続き第４回目入院となり，再び絶食と中心静脈栄養を開始した．症状が改善し，経腸栄養と中心静脈栄養に戻った．翌月の第５回目入院では再び，絶食と中心静脈栄養の併用から，症状の改善に伴い経腸栄養，食事療法を行った．

1999年９月頃には咬みしめ時に一過性の左顎関節痛が発現していたが，大腸症状の軽減に伴い自然緩解していた．翌月に下痢，下血，食欲不振が続いたため第６回目入院となり絶食となった．この第６回入院中に左顎関節の咬みしめ時痛が再発し，夜間の自発痛，発語痛，右顎関節痛，開口障害も発現した．さらに同年11月１日には左側大臼歯部での咬交不能となったため，11月２日同院歯科口腔外科を紹介され受診した．なお，同科初診後11月４日頃から両側手関節痛も発現したが，腫脹は認められなかっ

た．

現　症：

全身所見；身長168㎝，体重51.8㎏，両側手関節痛に疼痛はあるが腫脹は認めず，強直性脊椎炎，仙腸関節炎など徴候は認めなかった．自力歩行は可能であった．口腔内アフタ性潰瘍，結節性紅斑，壊疽性膿皮症などの皮膚症状や，ブドウ膜炎，強膜炎などの眼症状もみられなかった．

顔貌所見；顔貌左右対称．両側顎関節部に腫脹はなく，左顎関節に自発痛，運動痛，嚥下時痛を，右顎関節に自発痛と圧痛を認めた．座位では下顎が前方位をとり切端咬合位，横臥位では咬頭嵌合位を呈した．最大開口時の上下顎切歯間距離は19㎜であった．

画像所見：1999年11月２日に撮影したパノラマエックス線写真では，下顎頭に異常所見は認められなかった．同月11日の顎関節部MRI（写真1.－a.b.c.d）では，両側ともに関節円板前方転位や変形を認めなかったが，上下関節腔，特に下関節腔に多量の滑液貯留が認められたので，血液検査および右上下関節腔からの滑液採取を実施した．

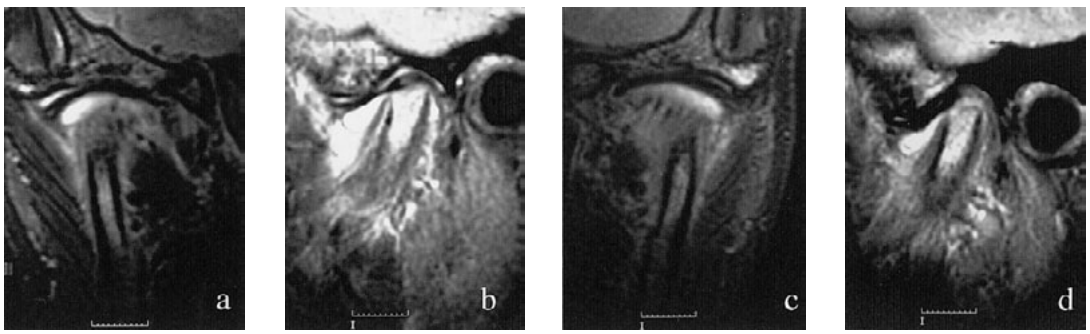


写真１　顎関節部MRI（1999.11.11）
ａ．右前額断　ｂ．右矢状断　ｃ．左前額断　ｄ．左矢状断．両側上下関節腔内に多量の関節液貯留を認めた・

臨床診断：両側顎関節炎．関節水腫疑い

検査：血液検査（11月11日）では，末梢血検査および，血清CRP値，リウマトイド因子，血清サイトカイン（TNF－α,IL－１β）の測定を行った．またHLAのタイピングをDQ４，DR２，DR３，DR７，DR９，DRB３*0301について行った．

滑液検査（11月11日）では，タンパク量，グリコサミノグリカンとしてコンドロイチン６硫酸（C６S）とコンドロイチン４硫酸（C４S），炎症性サイトカインとしてTNF-αとIL-１β，一酸化窒素（nitric oxide：NO）として亜硝酸ナトリウムと硝酸ナトリウムの測定を行った．なお，滑液採取には原液採取法を用い，ただちに遠心分離（3000回転，10分間）し，上清検体を計測まで－80℃のフリーザーにて保存した．タンパクはLowry法にて分析し，C６S，C４Sは，検体を生理食塩水で希釈後，試料中のグリコサミノグリカンを特異的分解酵素で消化し，得られた二糖をHPLC法（High-performance Liquid Chromatography）にて分析した．TNF-α，IL-１β，およびNOx濃度の測定は，ELISA法に

表１　血液検査結果（1999.11.11）

検査項目	結果
RBC	449×10⁴／μℓ
HGB	11.1
HCT	35.0%
WBC	5820／μℓ
NEUT	65.8%
EOS	5.2%
BASO	0.5%
LYMP	19.8%
MONO	8.6%
CRP	4.9㎎／dℓ
RF	＜10IU／mℓ

表２　HLAタイピング結果（1999.11.11）

検査項目	結果
DQ 4	－
DR 2	＋
DR 3	－
DR 7	－
DR 9	＋
DRB 3 *0301	－

表３　滑液分析結果（1999.11.11）

項目	上関節腔	下関節腔
血液混入	有	無
液量g	0.03	0.14
ΔDi-6S　μg／mℓ	14.21	13.24
ΔDi-4S　μg／mℓ	14.68	10.63
ΔDi-6S／ΔDi-4S	0.97	1.25
タンパク　㎎／mℓ	82.72	74.97
IL-1β　pg／mℓ	1772.57	183.60
TNF-α　pg／mℓ	192.03	166.60
$NaNO_2$　μℓ／mℓ	29.05	26.74
$NaNO_3$　μℓ／mℓ	26.92	40.02

血清　IL-1β　pg／mℓ　8.29
　　TNF-α　pg／mℓ　43.18

より各測定キット（TNF-α：BIOSOURCE EUROPE S.A., IL-１β：BIOSOURCE EUROPE S.A., NOx：BioDynamics Laboratory Inc.）を用い，通法に従って行った．

検査結果：血液検査では，CRPが4.9㎎／dℓと高値を示すほかは異常値は認められなかった．リウマトイド因子は陰性であった（表１）．HLAタイピングは，DR２，DR９のみが認められた（表２）．C６SとC４Sの比は，上関節腔0.97，下関節腔1.25といずれも低かった．タンパク濃度は，上関節腔82.72㎎／mℓ，下関節腔74.97㎎／mℓ，IL-１βは，上関節腔1772.57pg／mℓ，下関節腔183.60pg／mℓ，TNF－αは上関節腔192.03pg／mℓ，下関節腔166.60pg／mℓであった.（表３）

処置および経過：開口距離は11月２日に19㎜だったが，右関節液採取直後の14日目の25日には28㎜，12月13日には30㎜と改善傾向を示したので，同日右顎関節部の関節腔内洗浄療法（乳酸化リンゲル液1000mℓ）を施行した．関節洗浄後１週後の12月20日には38㎜で右顎関節の疼痛は消失した．さらに2000年１月６日では開口距離は44㎜となり両側顎関節部の疼痛は消失していた．

考　　察

クローン病は，原因不明で消化管の浮腫，線維（筋）症や潰瘍を伴う肉芽腫性炎症病変からなる．口腔から肛門までの消化管のあらゆる部位に起こりうるとされているが，好発部位は回腸末端と大腸右半である．四大症状は腹痛，下痢，体重減少，発熱であり，4～６割の症例に肛門部病変が見られる．本症の病変は非連続性でスキップして病変が見られることが多く，腸管に対して非対称性に起こることが多い．主要な病変は，縦走・縦列する不整形潰瘍またはアフタ様びらん，玉石敷石像および非乾酪性類上皮細胞肉芽腫である[1]．

クローン病の有病率は，本邦では全体で人口10万あたり5.85，男子7.94，女子3.83，男女比は男子が女子の2.22倍で，男子に高いのが特徴である．男子の初発年齢は20～24歳の層にピークがみられ，25～29歳に患者群のピークがみられる．また，家族内発症率は1.5%にみられた[5]．

クローン病では主たる病変以外に，肝胆道

系，筋肉骨格系，皮膚，眼，泌尿器系，血管血液系，心臓系，呼吸器系，内分泌系などの腸管外合併症がある[2]．

クローン病の皮膚症状で最も多くみられるのは結節性紅斑であり，その出現は腸管病変の病勢と比例するとされている．一般に，腸管病変が出現してから皮膚病変が末梢関節炎とともに生じることが多い[2]．本症例では，病期の全期間を通じて結節性紅斑の発現はみられなかった．

眼病変の合併疾患として報告されている，結膜炎，ブドウ膜炎，虹彩毛様体炎[2]は，本症例ではみられなかった．

筋骨格系合併症には，末梢関節炎，強直性脊椎炎，仙腸関節炎などの関節症状があり，それらの出現率は2.4～22.2%である．末梢関節炎の症状は，関節痛が一般的であり性差はない．その特徴は腸炎の活動性と関連し，自己限定的，少数関節罹患，特に単関節罹患が多く，非対称性，移動性，再発性で6週間以内に軽快する．また，変形を残さず，血液反応陰性の関節痛ないし関節炎である[3]．なお，Farmerら[4]はクローン病における末梢関節炎は，大腸型が多く16%で，小腸・大腸型が最も少なく3.6%と報告している．好発部位は下肢関節，特に膝関節，足関節，中足趾節関節である[3]．本症例では，パノラマエックス線写真やMRI画像において顎関節における骨の変形は見られず，上下関節腔内，特に下関節腔内に多量の滑液が認められた．通常，滑液は上関節腔に貯留することが多いことから，本例の特記すべき所見といえる．

P. C. Stokkersら[6]はクローン病とヒト白血球抗原タイピングとの関連性についてメタ・アナリシスを行い，DR7, DRB 3 *0301，DQ 4 が正の相関，DR 2，DR 3 が負の相関がみられたと報告している．しかし，HLAとクローン病との関連性には人種差があり，モンゴロイドについてK. Fujitaら[7]は62名の日本人クローン病患者について同様の調査を行い，DR 4 とDR 5 に強い相関がみられたが，強直性脊椎炎，小児脂肪便症等に比べ関連性は低いと報告した．本例ではDR 2，DR 9 のみが陽性を示し，P. C. StokkersらおよびK. Fujitaらの示した傾向は認められなかった．

クローン病のように炎症が慢性に持続する場合，貪食細胞からの活性酸素生成の亢進に基づく酸化ストレス過剰状態となり，抗酸化防御機構の破綻を来たし，活性酸素による組織破壊が引き起こされる[8]．また，活性化された好中球やマクロファージから炎症性サイトカイン（特にIL－1，TNF－α，IFN－γ）により発現される誘導型nitric oxide synthaseにより産生されるNOxは，活性酸素と結合することにより腸管の炎症を惹起し，組織障害因子として作用する[9]．

本症例では，滑液分析より，亜硝酸ナトリウム，硝酸ナトリウムが検出され，上腔より下腔で高い値を示しており，下腔におけるラジカル活性の亢進が関与していることが示唆された．

活動期クローン病における病変部粘膜では，有意に高いIL-1およびTNF-αの濃度が報告され，末梢血液中でもIL-1およびTNF-αの濃度増加が確認されている[10,11,12]．このようなサイトカイン・カスケードによって，IL-1の産生に引き続いてTNF-αなどの産生が誘導され，また，炎症の場ではIL-1による正のフィードバック機構が作動しうる[13]．これらのことより，腸管病変部で産生されたサイトカインはその血中濃度を高め，これらのサイトカインの働きにより末梢関節炎が惹起されると考えられる．

コンドロイチン硫酸異性体のうちのC 6 S濃度は，外傷性関節炎で著しく高く，軟骨の急激な破壊を反映しており，C 4 Sは関節リウマチ（RA）で変形性関節症（OA）に比べて高く，C 6 SとC 4 Sとの比はRAはOAや外傷性関節炎に

比べて低い[14]．また，T. Shibataら[15]は日本人女性28名の30顎関節（OA５関節，関節円板前方転位復位なし（WOR）13関節，関節円板前方転位復位あり（WR）７関節，RA５関節）の滑液分析の結果，OA, WOR, WRのC６SとC４Sの比は有意にRAより高かったと報告している．本例の滑液分析では，IL-1βとTNF-αは高値，C６SとC４Sとの比は低値を示し，これらは顎関節に滑膜炎が生じていることを示す所見といえる．よって，経過中にみられた臼歯部咬交不能は滑膜炎による滑液産生能の亢進による滑液貯留により生じたものと推測される．

さらに，一般に報告が少ない顎関節に症状が発症した理由として，上記の条件下に，従来からの睡眠中の歯ぎしりやかみしめ等による過剰負荷が顎関節に加わり，滑膜炎のさらなる増悪を招いたものと推測された．

以上より本症例は，クローン病の活動期に，末梢関節炎の一症状として両側顎関節の滑膜炎を発症した希有なる症例といえる．

結　　語

今回，われわれは18歳男性クローン病患者に発症した顎関節滑膜炎の一例を報告した．本症例では，治療前に採取した罹患顎関節滑液の生化学的分析で，IL-1βとTNF-αの高値，C６SとC４Sの比の低値を示した．このことから，クローン病患者における顎関節滑膜炎に対して，消化管病変の管理とともに，関節腔内洗浄療法が早期に顎関節の臨床症状の軽減をもたらす有効な方法であり，一次選択療法として採用できると考える．

参 考 文 献

1．朝倉均：炎症性腸疾患の疾患概念．診断から治療まで，日本メディカルセンター：13－17，1998.

2．高添正和：炎症性腸疾患の腸管外合併症．診断から治療まで，日本メディカルセンター：220－230，1998.

3．齋藤輝信：腸疾患性関節炎．最新内科学体系74 関節疾患，中山書店：138－143，1995.

4．Farmer RG, Hawk WA, Turnbull RB Jr : Clinical patterns in Crohn's disease : a statistical study of 615 cases. *Gastroenterology* **68** : 627－635, 1975.

5．守田則一，守田佳子：発病率，有病率，食習慣，死亡率．消化器病セミナー77，へるす出版：１－23，1999.

6．Stokkers PC, Reitsma PH, Tytgat GN, van Deventer SJ：HLA-DR and-DQ phenotypes in inflammatory bowel disease : a meta-analysis. *Gut* **45** : 395－401, 1999.

7．Fujita K, Naito S, Okabe N, Yao T：Immunological studies in Crohn's disease. I. Association with HLA systems in the Japanese. *J Clin Lab Immunol* **14** : 99－102, 1984.

8．安藤朗，住吉健一：炎症メディエーター．消化器病セミナー77，へるす出版：83－94，1999.

9．Miller MJ, Sadowska-Krowicka H, Chotinaruemol S, Kakkis JL, Clark DA：Amelioration of chronic ileitis by nitric oxide synthase inhibition. *J Pharmacol Exp Ther* **264** : 11－16, 1993.

10．Nakamura M, Saito H, Kasanuki J, Tamura Y, Yoshida S：Cytokine production in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* **33** : 933－937, 1992.

11．Murch SH, Braegger CP, Walker-Smith JA, MacDonald TT：Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease. *Gut* **34** : 1705－1709, 1993.

12．Reinisch W, Gasche C, Tillinger W, Wyatt J, Lichtenberger C, Willheim M, Dejaco C, Waldhor T, Bakos S, Vogelsang H, Gangl A, Lochs H：Clinical relevance of serum interleukin-6 in Crohn's disease：single point measurements, therapy monitoring, and prediction of clinical relapse. *Am J Gastroenterol* **94** : 2156－2156, 1999.

13．宮坂信之：サイトカインとそのレセプター．サイトカイン研究の最前線，ライフ・サイエンス：６－９，1995.

14．宮内聡：プロテオグリカン，GAGs，ヒアルロン酸．炎症と免疫２：186－193，1994.

15．Shibata T, Murakami KI, Kubota E, Maeda H：Glycosaminoglycan components in temporomandibular joint synovial fluid as markers of joint pathology. *J Oral Maxillofac Surg* **56** : 209－213, 1998.

［学会記録Ⅰ］

第22回東日本歯学会学術大会　定例講演会

歯周疾患発症機序試論：病原性バイオフィルムによる歯周自然免疫システム

松本歯科大学歯科薬理学講座
王　　宝禮　教授

生体の防御機構として免疫系は，大きく「自然免疫系（innate immunity）」と「獲得（適応）免疫系（adaptive immunity）」に分類されている．生体内に生じる免疫機能の数々は，数種類の免疫担当細胞によって行われ，生体防御システムのなかで活躍している．自然免疫系とは，抗原性を示す傷害に対する，一次的な防御線となり，皮膚や，補体，リゾチーム，非リンパ球系細胞（骨髄系幹細胞）である好中球やマクロファージなどの構成要素からなる．獲得免疫系とは，病原体の構造を認識するリンパ球による免疫機構であり，さらに，液性免疫（humoral immnunity）と細胞性免疫（cell-mediated immunity）に分けられる．これまで，自然免疫は病原体を非特異的にしか認識できないとされてきたが，新しい自然免疫の概念においては，病原体（非自己）に共通する分子構造，病原体の一群に共通する分子構造，病原体関連分子パターン（Pathogen-associated molecular patterns，：PAMP）を認識できる．自然免疫系の受容体がPAMP受容体と総称された．PAMPの認識機構に極めて重要な役割を果たす膜タンパク質受容体としてToll様受容体（Toll－like receptor：TLR）が登場した．現在まで10以上のTLRがクローニングされ，ファミリーを形成していることが判明した．それぞれのTLRには，様々な病原体認識機構が報告されている．そのうちのひとつToll-like receptor　4（TLR 4）が，リポ多糖（LPS）低応答性のマウスにおける原因遺伝子であることが判明され，TLR 4 がLPSの病原体認識を担っていることが明らかにされた．これらの発見は，1996年にHoffmannらと1997年にJanewayらからの報告であり，僅か数年前のことである．そして，歯周病に対しても自然免疫の新しい扉は叩かれ始めた．

歯周病の免疫学的研究は，1976年に，歯周病の発症過程を開始期病変期，初期病変期，確立期病変期，発展期病変期の 4 期に分類し説明したPageとSchroederに始まった．この報告は，歯周病が局所免疫応答に伴い，病態を形成していくことを示唆しているものであった．私の研究グループは，歯周病原因菌であるグラム陰性細菌群のPorphyromonas gingivalis（P.g.菌）による，歯周病罹患歯肉組織内の細胞間の複雑なサイトカインネットワークを解明してきた．最近になり，歯周病患者の歯周ポケット内の病原性バイオフィルムから遊離し，歯周組織に侵入したP.g．菌の外膜構成成分の一つである菌体内毒素LPSが，歯肉細胞膜上のTLR 4 に結合後，アダプター分子であるMyD88がセリン／スレオニンキナーゼであるIRAKを活性化し，リン酸化を誘導し，核内転写制御因子のAP－1，NFk－Bを活性化することによって，IL－１などのサイトカインが産生され，マクロファージ，好中球を活性化し，病原体を攻撃していく，生体防御系を発見した．これまでにない，新しい歯周自然免疫システムの解明であった（Crit Rev Oral Biol Med, 2002）．すなわち，歯周組織に特有に存在する歯肉細胞は，樹状細胞による自然免疫系と同様に，初期に歯周病原因菌のPAMPに対しての認識に積極的に関与し，獲得免疫反応の誘導機能を有する可能性を明ら

かにした．以上より，歯周疾患機序試論の仮説を構築した．

現在，歯周組織におけるPAMPの実態解明は，病原体初期認識機構の全容につながり，臨床面から遺伝子診断，ワクチン開発に発展している．

［学会記録Ⅱ］

東日本歯学会第22回学術大会　一般講演抄録

1．おしゃぶり使用の実態調査

○丹下　貴司，佐藤　　標，亀廣　　文，桜井　有子，千秋　宜之，五十嵐清治
（北海道医療大学歯学部　小児歯科学講座）

【目的】近年，おしゃぶりを使うことによって「鼻呼吸が身につく」，「アレルギー性鼻炎等が予防できる」という点からおしゃぶりの長期使用を推奨する見解がある．

本調査は，おしゃぶり，吸指癖に関して保護者に適切な育児指導を行う為の基礎資料として，おしゃぶり使用の実態と歯列・咬合状態への影響について明らかにすることを目的として実施した．

【対象と方法】調査は当別町歯科健診（2003年６月～７月まで）を受けた２～６歳児の男女計178名を対象とし，質問票法（アンケート法）により実施した．咬合状態の診査は，３歳児歯科保健指導要領の不正咬合の分類を参考に行った．

【結果および考察】おしゃぶりは，ほとんどの保護者が知っており半数近くが使用していた．歯列・咬合状態については，対象群と比較すると，おしゃぶりのみを使用している群では開咬症例の発現がみられた．おしゃぶりの使用は無いが吸指癖の見られる群では，上顎前突・開咬がさらに多く認められ，おしゃぶりの使用より吸指癖の方が歯列・咬合状態への影響が大きいことが示唆された．この傾向はおしゃぶりの使用が有り，かつ吸指癖の有る群では，上顎前突・開咬の発現する割合がさらに大きくなることから，両方の習癖がある乳幼児については適切な育児指導が必要であると考えられる．

また，おしゃぶり・吸指癖のやめる時期についてみてみると，吸指癖については３歳前にやめた場合ではほとんどの場合，歯列への影響は少なく，３歳以降も継続している場合のみ上顎前突・開咬が現れる確率が高くなる傾向にあった．

おしゃぶりの使用については３歳前に使用をやめても，その後吸指癖に移行して上顎前突や開咬が見られるケースがあるため，歯科保健の立場からみるとおしゃぶりの使用は極力控えるよう指導すべきと考えられた．しかし，今回は調査人数が少ない為，今後例数を増やしさらに検討する必要がある．

2．βディフェンシン１プロモーター領域の転写活性

○倉重　圭史*，安彦　善裕*，西村　学子*，草野　　薫*，山崎　真美*
竹嶋麻衣子*，荒川　俊哉**，田隈　泰信**，賀来　　亨
（*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座）

【目的】βディフェンシン（hBD）は，主に上皮細胞で発現する抗細菌性タンパクである．hBD－１は，恒常的に発現し，hBD２と３は，炎症性刺激により発現が誘導され，いずれも上皮細胞の細菌感染防御機構に関与していると示唆されている．発現を誘導する転写調節因子としては，hBD２でNF－κBが関与しているとの報告があるにすぎず，hBD１と３については未だ不明である．そこで，今回われわれは，hBD１のプロモーター領域の転写

活性について検索した．

【方法】hBD 1 遺伝子の翻訳開始コドンatgより上流710 bpのプロモータ領域遺伝子コンストラクトおよび上流から－100bpずつ段階的に削除するよう設計した遺伝子コンストラクトをホタルルシフェラーゼベクター（PGL 3 - Basic,Promega）に組み込んだ．ベクターは，HaCaT細胞にエレクトロポレーション法で導入し，細胞培養後，蛋白を抽出，ルミノメーターにより転写活性を測定した．また，転写活性が著しく低下した領域にAP－4，C/EBPβが含まれていたため，これらに変異を組み込んだベクターを作製した．変異遺伝子の作製は，GeneEditor in vitro Site-Direct Mutagenesis Kit（Invitrogen）によって行なった．また，それぞれの転写調節領域と核タンパクとの結合親和性をゲルシフトアッセイにより検索した．

【結果および考察】ルシフェラーゼアッセイの結果，AP－4とC/EBPβ領域の2箇所に変異を入れたものでは転写活性が著しく低下し，核タンパクとの結合親和性にも違いがみられた．

以上のことから，hBD 1 のbasal promoter activityにAP－4とC/EBPβが強く関わっているものと考えられた．

3．本校における協同学習の実践と教育的効果について

○長田　真美*，五十嵐清治**，岡橋　智恵*，大山　静江*，沢辺千恵子*，小田島千郁子*
（*北海道医療大学歯学部附属歯科衛生士専門学校・北海道医療大学歯学部附属歯科衛生士専門学校・
**北海道医療大学歯学部小児歯科学講座）

【目的】質の高い医療サービスを継続的に提供するための医療人の育成には綜合的な思考力や問題解決能力を身につけさせることが求められている．そのためには自己教育力（自ら学ぶ）や分散知（共に学ぶ）が必要条件と思われる．

そこで，これらの諸能力を形成育成するために歯科衛生士専門学校の授業形態について検討した．すなわち，教員主導型（pedagogy）だけでなく学習者主導型の原理を応用した教育法（andragogy）を試みた．

今回はandragogyの原理を導入した協同学習の効果について適性処遇交互作用（aptitude－treatment interaction：ATI）の視点から分析したので報告する．

【方法】対象学生は2003年度1年生30名である．

協同学習は，歯石除去の基礎実習で行った．協同学習の教育効果の判定は事前（5月）と事後（7月）における自己教育力の比較により行った．

【結果と考察】5月と7月を比較したところ，自己教育力において約7割の学生が向上していたが，自己教育力の高い約3割の学生が低下していた．さらにこの結果より協同学習班別の比較を行ったところある特定の班において低下している傾向が多くみられた．

このことより，学習の班編成による学習環境の整備が協同学習の効果に影響し，自己教育力の育成を左右する因子であることが示唆された．

4．歯学部第1学年におけるテーマ型Problem-Based Learningの学生参加型授業「人体の科学」の試み

国永　史朗*，○坂倉　康則**，安彦　善裕***，谷村　明彦****，荒川　俊哉*****
（*北海道医療大学歯学部人間基礎科学，**口腔解剖学第1講座，***口腔病理学講座，
****歯科薬理学講座，*****口腔生化学講座）

平成15年度第1学年後期で学生参加型授業を取り入れることとなった．授業計画設計の段階で，Problem-Based Learning（PBL）のテーマ型が検討された．この授業では，1）自ら問題を探求し解決する能力を高め，2）発表や発言する能力を身に付け，3）歯学部学生としてのモチベーションを高め，そして4）学生間のコミュニケーションをはかることとした．

各班は4・5名の学習者からなり，各班を1名のチューターがテーマに沿って問題の探求から発表の資料作成まで指導した．細胞から免疫系までの10大項目を，さらに各大項目には身近で理解しやすい表現でテーマを設定した．発表2週間前に担当する2班を抽選し，担当班にはテーマを自由選択させた．担当チューターは学習者に対してテーマに沿った問題を探求させ，進捗状況を把握しながら，学習者の収集した情報を共有した．また，共有した情報に基づいてレポートフォームを作成した．

発表は各班10分程度とし，オーディエンスの学習者は発表前に配布したレポートフォームで，予備知識を与えず質問事項にYes or No選択形式で答えさせ，発表中にはメモを取らせた．さらに15分程度で質疑応答，チューターによる補足説明，発表内容のレポート記述を行わせた．提出レポートは担当チューターが，また発表は５名のチューターが３段階で評価した．

学生によるアンケートの自由記述では，「調べ，聞き取り，書く能力が養えた．」「資料作りや発表形式のノウハウが身に付いた．」など，また自信・遣り甲斐・責任が持てたとの意見もあった．また，チューターとして学習者に接したとき，テーマに沿って基礎的知識の整理から発病メカニズムや臨床的問題点までの発表ストーリーを学習者自ら構築するようになったことから，モチベーションを高めることに繋がったと思われる．さらに，コミュニケーションがはかれたとの意見もあり，当初の狙いはほぼ達成できたと思われる．反面，学生からの不満として，レポートの記述時間が短く，知識が残らないとの意見や，発表内容の難易度に差があり過ぎるとの意見があった．問題点を整理すると，発表内容が高度であれば，発表者の理解不足を招き，結果として原稿の棒読みや早口な発表となり，一方オーディエンスの学習者にとって難解なため理解できず，知識が残らないなどの不満が残ってしまう．今後，学習者の主体性・積極性も尊重しつつ，テーマ設定や指導法を検討しなければならないと考える．

５．歯科医療問題研究会活動報告　ー第１報ー

○鈴木　真野*，栗原　洋平*，斉藤　精也*，澤田　有希*，鈴木　りな*，村井　雄司*，小林　直人**，
佐藤　　標***，設楽　彰子***，林　　綾子***，福田　敦史***，馬渕　多栄***，伊藤　昭文****，
水谷　博幸*****，松本　大輔***，関口　五郎******，道谷　弘之*******，五十嵐清治***
（*北海道医療大学歯学部４年生・**同　矯正歯科学講座・***同　小児歯科学講座・
****同　口腔外科学講座・*****口腔衛生学講座・
******東京都立心身障害者口腔保険センター・*******苫小牧青葉病院歯科・口腔外科）

【目的】歯科医療問題研究会は，在学中より健診補助やブラッシング援助活動などの社会福祉活動を行い，受信者の方々と直接会い，実際の臨床の場で何が求められており，どのようなケアが必要なのかを学ぶことを目的としている．さらにこのような活動を行うことにより，そこでの問題解決能力を養い，社会福祉活動に必要な知識や技術，それを発表や発言できる能力を身につけるために，毎年数回のフィールド実習を行っている．今回は，その活動内容について報告した．

【活動内容】社会福祉活動の一環として，①新篠津村にある知的障害者施設F苑で歯科健診とブラッシング援助活動を実施した．また，②苫小牧市にあるA総合病院内の入院患者の歯科健診の補助，および入院患者への歯科的サービスの実際に触れ，高齢者歯科医療の現場を体験した．なお，健診およびブラッシング援助活動を行う前には毎週数回の勉強会を開き，検診参加者全員に健診に必要な知識を習得できるように考慮した．

【考察】勉強会に必要な内容は４年生が中心となり検討した．まず，歯に関する知識，歯科健診に使われる言葉や記号，ブラッシング方法，義歯の取り扱いや清掃方法が必要ではないかと考え，歯科の専門知識のない１，２年生には「わかりやすい」，「覚えやすい」，「親しみやすい」資料を作成した．勉強会は1，2年生に対して一方通行の講義や指導とならないように，OBの先生方や施設の職員の方にも参加していただき，全員参加型のチュートリアル方式で行った．この方法は新入部員達からの反応もよく，施設職員の方にも好評であった．歯科健診参加前のこのような勉強会は有効であり，今後も継続していきたいと考えている．

実際の健診の場では①，②共に筆記および見学を行い，さらに健診結果をまとえめた．その結果①では76名中45名に全体的に歯肉炎が認められたため，ブラッシング指導を行った．ブラッシング法は受診者が障害者ということもあり，簡単でプラーク除去効率が高いと思われる水平スクラッピング法を使って指導した．学生１人１人が受信者に声をかけて，コミニケーションをとりながら勉強会で身につけた知識を使ってブラッシングを行うことができた．

今後は②の体験も生して対象とする人々にどのような活動が必要か，またそのためには，何を行わなければならないかを整理する予定であるが，今年度の活動を来年度につなげていきたい．

6．唾液腺由来細胞HSYの構成的分泌におけるVAMPの役割

○大石　洋平*,**，荒川　俊哉**，溝口　　到*，田隈　泰信**
（*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座）

【目的】VAMP－２は多くの分泌細胞の分泌顆粒膜にv-SNAREとして存在し，細胞膜に存在するt-SNAREと複合体を形成することにより，両膜のドッキング・融合を促進する．VAMP－２は破傷風毒素により切断され失活するが，最近，毒素非感受性のVAMP（TI-VAMP/VAMP－７）が報告され，開口分泌とエンドサイトーシスにおける役割が注目されている．本研究では，HSY細胞とPC12細胞の構成的および調節的分泌におけるVAMPの役割を解析した．またGFP標識ヒト成長ホルモン（hGH）を用い，分泌過程の可視化と定量を試みた．
【方法】ラット耳下腺から，各VAMPのcDNAをPCRクローニングし，C端をGFP標識するプラスミドを構築した．分泌実験では，HSY細胞，PC12細胞にhGHを発現させ，1μMイオノマイシン刺激による分泌量をELISA法で測定した．各VAMP-GFPとhGHを共発現し，それらの局在部位と動態を共焦点レーザー顕微鏡にて観察した．
【結果】hGHは，HSY細胞では構成的に分泌され，PC12細胞では調節的に分泌された．共焦点レーザー顕微鏡を用いた連続撮影では，GFP標識したhGHは細胞内を高速で移動する像が観察された．PC12細胞では，hGHを含む分泌顆粒はVAMP２－GFPと一致して存在したが，HSY細胞ではVAMP７－GFPと一致して存在し，VAMP２－GFPとは一致しなかった．
【結論】TI-VAMP/VAMP－７は，構成的分泌のv-SNAREとして機能している可能性が示唆された．

7．歯髄中のBone morphogenetic protein（BMP）mRNAの定性および定量
―マウス骨芽細胞MC３T３-E１とのBMP発現量の比較検討―

○伊藤　勝敏*,**，村田　　勝*，荒川　俊哉**，田隈　泰信**，有末　　眞*
（*北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座・**北海道医療大学歯学部口腔生化学講座）

【目的】Bone morphogenetic protein（BMP）は強力な骨誘導因子である．我々はリコンビナントヒトBMP－２とコラーゲンなどの担体基質を利用して骨誘導研究を行うとともに抜去歯象牙質の骨・軟骨誘導を組織学的に証明した．また歯髄には幹細胞とBMPが存在することが報告されており，硬組織再生のための細胞・成長因子の供給源として再利用可能であると考えられる．そこで，歯髄中のBMPが骨再生に利用できる濃度を維持しているかを検討するためにBMP mRNAの定性および定量を行った．さらに，発現量の有効性を検討するためにマウス骨芽細胞MC３T３－E１でのBMP発現量との比較を行った．
【方法】インフォームドコンセントによって同意を得た抜去歯歯髄細胞およびマウス骨芽細胞MC３T３－E１より，Tryzol reagentを用いてtotal RNAを抽出し，Reverse transcriptase-PCR（RT-PCR）によりBMP－2,4,6,7の発現を検討した．BMP mRNAの定量は，ATTO Light-Captuerによって半定量を，またRoche LightCyclerおよびABI Prismを用いたSyberGreenによって定量を行った．
【結果および考察】RT-PCRによりBMPの発現を検討した結果，MC３T３－E１細胞にはBMP－2,4,7が，歯髄中にはBMP－2,4,6,7の全てが発現していることが明らかになった．ATTO Light－CaptuerによるPCR産物の半定量によって，歯髄ではBMP－４および７がBMP－２および６よりも多く発現していることが明らかになり，またMC３T３－E１細胞のBMPの発現量と比較した結果，同等もしくはそれ以上の発現が認められた．したがって，歯髄中には骨誘導可能なBMP量の存在が示唆された．

8．アメロゲニンが骨髄細胞の分化に与える影響

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

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

【材料及び方法】7週齢の雄性Fischer344ラットの大腿骨を採取し，付着性の細胞を15％ウシ胎児血清含有α-MEMにて，37℃，５％CO_2，湿度100％の条件下で培養した．培地交換は３日ごとに行った．継代後コンフルエントになったところで実験を開始した．アメロゲニンをそれぞれ0, 10, 100, および1000ng/mlの濃度で無血清培地中に加えた．添加後，30分，24時間後にTRIZOLにて細胞を回収した．さらにAGPC変法を用いて全RNAを抽出し，cDNAを合成した．その後，LightCycler™（Quick system3301，Roche Diagnostics, Germany）を用いた定量PCR法により，アメロゲニンにより刺激された骨髄細胞における硬組織関連mRNA（BMP－2, BMP－4, osteonectin, osteopontin, osteocalcin, type I collagen, DMP－1，mRNA）の発現の変化についての分析を行った．また，アメロゲニン添加後の骨髄細胞のアルカリフォスファターゼ活性測定，およびvon Kossa染色を行った．

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

9．NEVA METER®を用いた唾液粘稠度と喫煙状態の関連

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

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

【材料および方法】

（実験１）唾液中コチニン濃度と唾液粘稠度の関連

１．被験者と唾液サンプル採取

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

２．粘稠度の測定

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

３．コチニン量の測定

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

（実験２）喫煙停止による唾液粘稠度の経時的変化

１．被験者と唾液サンプル採取

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

２．唾液粘稠度の測定・唾液中コチニン濃度の測定

実験１と同様に唾液粘稠度と唾液中コチニン濃度を測定した．

３．唾液中細菌数の測定

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

４．唾液中コルチゾール濃度の測定

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

【結果】

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

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

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

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

塚越　慎
（北海道医療大学歯学部歯科保存学第二講座）

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

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

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

ニッケルチタン製ファイルではロータリーファイルを用い，特にデンツプライ社のプロファイルの使用頻度が高かった．69％の研修医が軟化ガッタパチャを用いた垂直加圧根管充填を行っており，９施設においては側方加圧根管充填を指導していた．逆根管充填材料としてはMTA（Mineral trioxide aggregate）とSuper EBAセメント（Super ethoxybenzoic acid）が用いられていた．使用マイクロスコープはほとんどの施設においてGlobal社製のみ，または複数社の製品を用いていた．11施設においてマイクロスコープを研修医自身に購入させていた．ペンシルベニア大学研修医外来におけるマイクロスコープの使用の割合について，研修医が治療を行った152症例についてまとめると２年目の研修医の根管拡大時の使用が82.1％と高い値であった．1年目では天蓋の除去時において32.4％と一番低い値を示していた．アメリカ合衆国の歯内療法専門医が行った上顎第一大臼歯を治療時の２根管性の近心頬側根の出現率は18.6％から33.3％と報告されていたが，ペンシルベニア大学ではマイクロスコープを使用することにより41.2％の出現率を認めた．また，ペンシルベニア大学では外科的歯内療法の全ての症例にマイクロスコープが用いられていた．

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

11. 放射線学的にいわゆる球状上顎嚢胞と診断された１例

○藤井　茂仁*,***，細川洋一郎**，金子　昌幸**，松嶋　宏篤***，矢嶋　俊彦***
大内　知之****，賀来　　亨****，高橋　陽夫*****
（*医療法人ルミエール歯科・**北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座・***北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座・****北海道医療大学歯学部口腔病理学講座・*****大分大学医学部歯科口腔外科）

【目的】放射線学的に，いわゆる球状上顎嚢胞を経験したので報告する．

【症例】

患者：25歳女性

初診：平成15年10月２日

主訴：上顎左側臼歯部違和感

既往歴，家族歴：特記すべき事項なし

現病歴：平成15年９月より上顎左側第１小臼歯口蓋部に違和感があり，平成15年10月より同部に腫脹を生じたため，医療法人ルミエール歯科を受診した．

現症：上顎左側側切歯から第１小臼歯の頬側歯肉に圧痛が認められたが，初診時には同部の腫脹や粘膜の異常はみられなかった．側切歯および第１小臼歯は軽度打診痛を認めるも，生活反応があった．

画像所見：回転パノラマならびにデンタルエックス線写真にて，上顎左側側切歯歯根と犬歯歯根を離開する楕円形の嚢胞様エックス線透過像を認める．

病理所見：嚢胞壁の大部分は，高度の炎症細胞浸潤および著明な出血像を伴った線維性結合組織からなっており，角化を認める平坦な重層扁平上皮による裏装と，上皮下結合組織中に，裏装上皮との連続性が乏しい上皮島が散見された．以上の所見より本病変は歯原性角化嚢胞に２次的に高度の炎症性変化が加わったと考えられた．

【結果および考察】球状上顎嚢胞は，従来，顔裂性嚢胞に分類される非歯原性嚢胞として定義されてきたが，1992年のWHO分類では，球状上顎嚢胞の名称を採用していない．すなわち球状上顎嚢胞は特徴的なエックス線像を示すが，病理組織学的に１つの独立した疾患と考える根拠はないと考えられており，それらは歯原性嚢胞や腫瘍であるとされている．しかし多くの臨床家が共通した臨床所見を想起するという点で，「いわゆる球状上顎嚢胞」の名称を画像診断的に用いることの意義は現在も存在していると思われる．

12. 断層回転パノラマエックス線写真に描出される嚢胞様偽像についての考察

○田中　力延，佐野　友昭，細川洋一郎，藤井　茂仁*，館山　佳季**，金子　昌幸
（北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座・*医療法人ルミエール歯科・
**サッポロファクトリーデンタルクリニック）

【目的】断層パノラマエックス線写真において描出される偽像は誤診の原因となるが，その出現部位は特定されている．しかし近年，嚢胞様の類円形エックス線透過像を示す偽像が不特定に出現することを我々は経験していた．そこで，これら偽像の出現原因を検討した．

【症例１】20歳女性．右側下顎側切歯と犬歯の歯根間に円形の透過像をパノラマ上で認める．隣接する歯根は圧排されて傾斜しているようだが，吸収は認められない．しかし，臨床的に異常所見はなく，デンタルフィルム上でも同部位に異常透過像は認められなかった．

【症例２】56歳女性．両側下顎第一大臼歯根尖部に境界やや不明瞭な透過像をパノラマ上で認めるが，同部の歯牙や歯周組織に臨床的な異常所見は見られなかった．

【症例３】69歳女性．左側上顎残存歯牙の違和感を主訴に来院．同側上顎洞内にパノラマ上にて嚢胞様の所見を認める．

【考察】断層パノラマエックス線写真は歯科で広く用いられている診断用画像であるが，断層領域から外れた部分の形態を正確に描出することは出来ない．今回我々は，顎骨の形態により特殊な偽像を呈する２症例を体験したので，CTなど他の画像所見を加えて偽像の原因を追求したので報告する．

13. 本学臨床実習生の回転パノラマによる口腔内統計調査

○石毛　　薫，細川洋一郎，大西　　隆，飯沼　英人，金子　昌幸
（北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座）

【目的】回転パノラマは，歯科疾患における口腔全体の把握という点では優れている．したがって，各種特殊検査法が発達した現在でも，歯科臨床において，スクリーニング検査としての意義は大きく，使用頻度も高い．本研究では，過去６年間の本学臨床実習生の回転パノラマを観察し，口腔内状況の検討を行った．

【方法】過去６年間（1996年・2001年），本学歯学部５学年の歯科放射線科臨床実習で撮影された，479人（男316人，女163人）のパノラマX線写真において欠損歯，埋伏歯，金属修復物，根管充填済歯，根尖部透過像の有無について調べた．

【結果・考察】初めに，左右における違いを検討したところ，その数に明らかな違いは認められなかったため，左右の歯を同一歯種とみなしまとめて集計した．欠損は第三大臼歯が上顎で42.0%，下顎で37.7%，次いで下顎第一小臼歯（3.3%），上顎第一小臼歯（3.2%），下顎第一大臼歯（2.2%），上顎第一大臼歯（1.7%）の順で多かった．残存している第三大臼歯については，顎骨内完全埋伏歯は下顎より上顎に多く（上顎：31.7%，下顎：21.1%），逆に不完全埋伏歯は上顎より下顎に多かった（上顎：16.4%，下顎：40.2%）．金属修復物は，上下顎ともに大臼歯が多く，50%前後の割合を示し，次いで小臼歯が多かった．大臼歯では上下顎の金属修復物の割合に差はみられなかったが，前歯ならびに小臼歯では上顎で有意（$p < 5\%$）に金属修復物が多かった．根管充填済の歯は下顎第一大臼歯で13.2%と最も高い割合を示した．下顎の根管充填済歯の根尖部エックス線透過像発現の割合は30.6%であった．この根尖部エックス線透過像発現は，パノラマX線写真上で根尖部から１mm以内のアンダー根管充填では27.3%であったが，根尖部から２mm以上のアンダー根管充填では36.5%であった．充填材の根尖部までの距離が長い場合，根尖病巣の発現率が高いと考えられた．

14. 三次元CT像を用いた顎矯正手術シミュレーション

○上地　　潤*，東海林貴大*，六車　武史*，柴田　考典**，有末　　眞***，溝口　　到*
（*北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座・**北海道医療大学歯学部口腔外科学第一講座・
***北海道医療大学歯学部口腔外科学第二講座）

【目的】重度の骨格系の不調和を伴う症例に対して適用される外科的矯正治療は，顎顔面骨格形態と咬合を三次元的に大きく改変させるものであり，治療目標の設定を三次元的に行わなければ，予知性の高い治療を顎変形症患者に提供することは極めて困難である．近年，コンピュータグラフィックス技術が飛躍的に進歩したことにより，正面および側面頭部X線規格写真を用いた従来の二次元的予測に変わってCT像を用いた三次元的予測が可能となってきた．今回我々は，三次元CT像を用いて顎矯正手術シミュレーションを行ったので，その基本的概要および臨床応用の実例を紹介する．

【方法】本学歯学部附属病院矯正歯科を受診した著しい顔面非対称を示す顎変形症患者（22歳５か月：女性）を対象とした．使用したCT装置はLightSpeed Ultra（GE）で，手術シミュレーションには，V-Works4.0（CyberMed）およびI-DEAS（SDRC）を使用した．

画像処理で得られたDICOMデータは，オフラインでV-Worksに取り込まれた．三次元構築後，CT値に閾値を設定して二値化処理を行い，サーフェイスモデルを生成した．このデータを用いて仮想三次元空間上で骨切り術を以下のステップで施行した．①上顎骨Le Fort I，下顎骨SSRO，およびgenioplastyによるセグメント化，②下顎歯列を上顎歯列に咬合させるように下顎骨のみを移動，③上下顎を咬合させた状態での上下顎同時移動，④オトガイ部の移動．各ステップで左右の対称性を確認して手術の必要性について検討し，骨片の移動量を算出した．

【結果および考察】従来の二次元的方法では不可能であ

った顔面非対称患者のtreatment goalの設定と骨片の移動　　量の計測が可能となった．

15. インプラント歯科外来患者の受診実態

○廣瀬由紀人*，越智　守生*，國安　宏哉*，八島　明弘*，新井田　淳*，平　　博彦**，
村田　　勝**，北所　弘行**，工藤　　勝***，大桶　華子***，細川洋一郎****，
田中　力延****，田中　　隆*****，柿崎　　税*****. ******，曽我部元尚******，
有末　　眞**，新家　　昇***，金子　昌幸****，田中　春樹*****
（*北海道医療大学歯学部歯科補綴学第２講座，**口腔外科学第２講座，***歯科麻酔学講座，
****歯科放射線学講座，*****附属病院技工部，******，附属病院技工研修）

【目的】北海道医療大学歯学部附属病院のインプラント専門外来は2002年11月５日に発足し，これまでに46名の患者が当専門外来を受診している．本発表では，歯科インプラント専門外来患者の患者受診動態，患者ニーズ，治療予後，クリニカルパスおよびに当専門外来の改善点について報告する．

【方法】対象は2002年11月から2003年12月末までのインプラント専門外来受診患者（相談のみで終了した患者は除外）の症例とした．

【結果および考察】本学歯科インプラント専門外来患者の患者受診動態，患者ニーズ，治療についての現状把握を目的に，2002年11月５日から2003年12月末までに当専門外来を受診した患者と，現在までの専門外来の活動について臨床的検討を行い，以下の結論を得た．

１．インプラント専門外来患者46名は男女比が約１：２であり，50歳代が最も多かった．
２．他医療機関からの紹介は14人であった．
３．静脈内鎮静法を希望した患者は25人であった．
４．埋入本数は99本であり，直径3.5－4.9mm，長さ10.0mm以上が最も多かった．
５．インプラント埋入の前処置として骨移植または骨増生を行ったものは６症例であった．
６．欠損状態は，２歯以上の遊離端欠損が顕著に多く，２歯以上の中間欠損と１歯欠損がほぼ同数，無歯顎が最も少なかった．
７．装着した上部構造の種類は，単冠が７，連結冠が11，ブリッジが４装置，義歯が１床であった．
８．インプラント埋入から上部構造装着までに要した期間の平均は約９か月であった．

本実態調査より，インプラント治療に対する患者ニーズは，専門性や高度先進技術を期待したものであった．すなわち，静脈内鎮静法を応用した全身管理下における安全かつ快適な手術，CT画像とコンピュータ３次元構築による正確な診断かつ明確なインフォームドコンセントを患者は期待している．インプラント治療を希望する患者が増加している現状に対して，我々は今後，専門外来の質（技術）と量（スタッフ数）を充実させる必要があると考える．

16. インプラント歯科外来患者に対する鎮静法と局所麻酔法の検討

○大桶　華子*，工藤　　勝*，北所　弘行**，平　　博彦**，村田　　勝**，
細川洋一郎***，新井田　淳****，國安　宏哉****，廣瀬由紀人****，
新家　　昇*，有末　　眞**，金子　昌幸***，越智　守生****
（*北海道医療大学歯学部歯科麻酔学講座，**同口腔外科学第２講座，
同歯科放射線学講座，*同歯科補綴学第２講座）

【目的】北海道医療大学歯学部附属病院は2002年11月５日に歯科インプラント専門外来（当専門外来）をスタートした．当専門外来は一般診療であり，痛くなく安心できる快適なインプラント手術管理が強く求められ，有病者・難（長時間）症例・歯科恐怖症などに対して鎮静法を適応している．手術室を使用し，生体情報モニター監視下に，亜酸化窒素（笑気）吸入と催眠剤の静脈内投与による鎮静法を提供し，鎮静導入後に局所麻酔注射を実施している．当専門外来の鎮静・局所麻酔法の有効性を検証する．

【方法】対象は2002年11月から2003年12月まで，当専門外来の手術室における症例とした．対象を鎮静薬剤の差異でプロポフォール・ミダゾラム・笑気（PMN），ミダゾラム・笑気（MN）の２群に分けた．痛みは手術中の訴えの回数，鎮痛剤の使用状況，VAS-painにより評価した．不安は顔不安スケール（FAS），健忘効果は所要時間の短縮感（患者が感じた時間／鎮静管理時間×100）と術中の記憶で評価し，患者の満足度や要望などの意見調査を実施した．

【結果および考察】対象は17症例（男性７症例，平均年齢51.4歳），平均手術時間：97.2分，平均鎮静管理時間：140.6分であった．手術中の痛みの訴えは平均1.4回だが,90分以上の症例では多く認めた．終了時・手術２時間後ともに，VAS－painは両群で差を認めなかった．FASは術前から術後まで両群で差を認めず，手術中の上昇を抑制した．所要時間は実際のPMN群（８症例）25.8%，MN群（９症例）40.1%に短縮したと感じ，PMN群の健忘効果が強かった．術中の耐えられない痛みや不快な記憶が残った症例は無かった．アンケート調査（回収率88.2%）では93.3%が次回の手術も鎮静法を希望すると回答し，患者の満足度は高かった．今後の課題は，長時間手術への局所麻酔法の改良，手術時間の短縮，全身麻酔の適応などがあげられる．

【文献】

１）大桶華子，他：歯科における鎮静法の研究－第３報ミダゾラム静脈内鎮静法における術中鎮静維持のための追加投与方法－，東日本歯誌，(19) 2 ,171－179，2000.
２）工藤　勝：歯科における亜酸化窒素・酸素吸入鎮静法の有効性－痛くない，安心・快適な歯科医療を目指した笑気吸入鎮静法の有効利用－，Medical Gases，（５）１，21－27，2003.

17. rhBMP－２／FRIOS®Algipore®複合体による象牙質形成誘導

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

【目的】骨形成タンパク質（BMPs）は未分化間葉細胞を骨芽細胞に分化誘導し，骨形成を誘導する成長分化因子である．その強力な硬組織形成誘導活性から各分野への応用が期待されているが，徐放系となり細胞分化のためのScaffoldとなる有効な担体が見つかっていない．我々は生体親和性を有し積極的に象牙質形成を誘導する歯髄保存療法剤の開発を目標としている．本研究の目的は，骨形成タンパク質（BMP）の担体として，石灰藻由来の多孔質ハイドロキシアパタイトであるFRIOS®Algipore®が有効であるかをラット直接覆髄実験において検討することであった．

【材料および方法】E.coli-derived human recombinant BMP－２variant（rhBMP－２）を使用した．rhBMP－２の担体としては，多孔質ハイドロキシアパタイト顆粒であるFRIOS®Algipore®を用いた．rhBMP－２ 25ngとAlgipore® 50μgを複合して，８週齢オスWistarラットの上顎第一臼歯近心咬頭人工露髄面に直接覆髄した．さらにコントロールとして担体のみ，水酸化カルシウム製剤（マルチカル™PULPDENT®）による覆髄を行った．１～３週後にラットを屠殺し，歯を顎骨ごと摘出後，10%中性ホルマリン緩衝液にて固定，ギ酸－ホルマリン脱灰し，通法に従ってH－E染色を施した．標本の組織学的観察と形態計測を行い，それぞれの試料による新生象牙質形成誘導を比較検討した．

【結果および考察】覆髄後１週で新生象牙質の厚さは，rhBMP－２／Algipore®複合体が68μm，水酸化カルシウム製剤が28μmであり，覆髄後２週では，rhBMP－２／Algipore®複合体が141μm，水酸化カルシウム製剤が80μmであった．覆髄後３週では，両者の間に統計学的有意差が認められなかったことから，rhBMP－２／Algipore®複合体は早期のうちに新生象牙質が旺盛に形成されていることが認められた．さらにrhBMP－２／Algipore®複合体は，壊死層を形成した水酸化カルシウム製剤よりも生体親和性的な材料であると考えられる．現在，イヌにおいても同様な実験を行っている．

18. チーム医療を考慮したクリニカルパス導入の取組み「顎変形症手術パス」作成まで

○石原比利美，蜂谷　幸子，藪　　恵子，杉原由里子
（北海道医療大学歯学部附属病院看護部）

【目的】医療の変革に伴い，クリニカルパス（以下パス）の普及はめざましい．当院でも平成14年に病院職員研修会が開催された．看護部では，１）周術期における医療ケアーの基本過程の明確化　２）チーム医療活動の促進　３）看護業務基準の改善を目標に「パス」の導入に取組んだ．その経過と結果を報告する．

【方法】「顎変形症手術パス」の作成〈第一段階〉看護部のパス基本学習会と，当院の過去の事例分析．結果，予測される治療・処置・看護ケアーを縦軸に，経過時間を横軸に組み込んだパスのフォーマットを試作．〈第二段階〉口腔外科から提出された，顎変形症手術標準治療計画をもとに「顎変形手術パス」の原案を作成．各職種と話合い修正し，運用手順を決め試行．〈第三段階〉９例実施後の話合いで，評価と修正．現在，患者の経過と各職種全体の活動が把握できる一体型の「顎変形症手術パス」を作成した．

【期間】平成13年４月～平成15年10月

【結果および考察】１）顎変形症手術の一連の医療過程が明確化し，患者に対して計画的な準備と調整が可能となった．２）他職種と情報交換が円滑になり，各専門職との機能連携が促進した．３）チームの一員として，看護の役割が明確になり，業務改善が促進した．具体的には①外来と病棟の連携促進（外来患者情報用紙の作成・患者用パス用紙の作成・外来術前指導の実践）②看護指導内容の改善（呼吸訓練・皮膚保護・口腔衛生・唾液の喀出・経管栄養・③看護基準の改善（周術期の観察項目と頻度の検討・測定基準・記録方法・栄養出納バランス調整・ヴァリアンスと看護過程への連動）④業務の効率化（指示確認・変更とその理由の把握・検査処置漏れの防止・重複記載の省略）などが挙げられる．

パスは画一化ではない．標準の明示は，逸脱や個別性を明らかにする．結果，専門職として，提供する情報・標準的ケアーの実践・個別性に対応する力量が問われる．従って，チーム医療の促進は，個々の専門職が充分役割を果たすことにあり，クリニカルパス導入の過程は，看護業務の改善や専門職業人として個人の研鑽を促した．今後も質の向上のために，チームの一員として，患者・職員の満足度調査や，アウトカム（目標）の妥当性，ヴァリアンス（逸脱）の対応など，活動の継続が必要である．

19. 手術室におけるリスクマネジメント～手洗い実態調査の結果～

○曽山三千代，菊地　修代，佐々木洋子，小野　政子
（北海道医療大学歯学部附属病院看護部）

【目的】当院手術室では手術前手洗いの方法として従来より，手指用殺菌消毒剤を用いたブラッシング法を基本としてきた．

しかし，従来から手洗い時間の個人差が大きすぎるため，手洗いの有効性に疑問が生じていた．一方，最近ではブラッシングにより皮膚表面の損傷が生じ，かえって易感染性の亢進や微生物の増加をきたす等の理由からブラシを用いず，速乾性手指殺菌剤を併用する手揉み法を採用する施設が増加している．さらに，手洗い時の洗浄液も，流水であれば水道水と滅菌水との間に有意差が無いという報告があり，滅菌処理液の使用が疑問視されている．以上の点から，今回当院の手術前手洗いの実態を把握するために，手洗い後における手指の細菌検査を試行したので，その結果を報告した．

【調査方法】対象者は歯科医師５名，看護師３名である．手洗い方法は，ブラッシング法６名，手揉み法２名である．有効性の検証方法は，パームスタンプ培地を使用し，密着時間は右手で15秒とし，培養時間は35℃で48時間とした．今回は水道液あるいは滅菌処理液をともに流水下で使用した２条件下で手洗いを実施した．なお，

流水水道液の手洗い時には速乾性手指殺菌剤を併用した．

【結果及び考察】ブラッシング法の６名では滅菌処理液および水道液のいずれでも菌が培養された．手揉み法（揉み洗いと速乾性手指殺菌剤の擦り込み）の２名では，菌は全く検出されなかった．また，水道液と滅菌処理液とでは，流水下であれば手洗い効果に差は認められなかった．

今回は手掌だけの試行的な細菌検査であったので，直ちにブラッシング法と手揉み法の優劣を結論づけることは困難である．今後さらに，定期的あるいは抜き打ち的に頻繁に手洗い検査を実施し，より詳細な検討を加える必要があろう．なお，今回の実験試行から手術前手洗い，および手術時無菌操作の重要性が再認識され，医療スタッフ全員の意識の向上に向け，注意を喚起すべく，手術室にポスターなどを掲示した．

20．義歯を誤飲し緊急開腹手術を行った１例

○藏口　　潤*,**，里見　貴史*，続　　雅子*，安彦　善裕**，賀来　　亨**，千葉　博茂*
（*東京医科大学口腔外科学講座・**北海道医療大学歯学部口腔病理学講座）

【目的】各種の歯科用器材や部分床義歯は時に気管や食道内に落下する危険がある．誤飲による消化管内異物は多く自然に排出されるが，近年の内視鏡技術の進歩により保存的に摘出されることも多い．しかし，異物の種類や摘出時期が遅れるなどによって，まれに消化管に穿孔し，出血あるいはイレウス，膿瘍形成などの合併症を引き起こし，開腹手術をする場合がある．

今回，われわれは交通外傷で入院中に義歯破折片を誤飲し，義歯床鋭縁が回腸壁を穿孔したため，緊急開腹手術を要した１例を経験した．

【症例】患者は36歳の男性で，平成14年４月２日交通外傷で日本医科大学多摩永山病院救命救急センターへ搬送された．同年４月28日12時頃，使用中の部分床義歯の小破折片を誤飲した．

【経過および考察】義歯を誤飲して約13時間後より腹部痛が出現した．腹部は当初平坦で軽度の圧痛と筋性防御を認め，血液検査はWBC：22500／μℓ，CRP：2.3mg/dℓ，CK：192IU/Lと上昇した．数時間おきに腹部単純X線写真を撮影したが義歯は移動せず，４月29日11時頃には腹膜刺激症状が出現し，腹部痛が自制不可能となったため，同日13時30分，急性汎発性腹膜炎の臨床診断のもとに緊急開腹手術を行い，破折片を含む回腸部分切除術，端々縫合術を施行した．術後，患者は順調に回復し，同年６月10日退院した．

21．二回法を用いた下顎智歯抜歯症例ー術後知覚麻痺回避のためにー

○南　　誠二*,**，細川洋一郎**，篠崎　広治**，西　とも子**，金子　昌幸**
（*みなみ歯科医院・**北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座）

【目的】日常臨床において問題となる合併症の一つに，下顎智歯抜歯後の下歯槽神経麻痺がある．その防止策として，二回法抜歯[1,2]が挙げられるが，その報告は少ない．今回，X線写真上で智歯根尖部が下顎管と重なっている症例に対し，本法を適用し，良好な結果を得たので報告する．

【症例１】30才女性．下顎左側の水平埋伏智歯の歯髄炎による疼痛で来院．回転パノラマ所見において，根尖が下顎管の下壁まで達していた．初めに，抜髄および糊剤根充後，歯冠部を切断除去した．処置から約２年後，パノラマにて根尖が下顎管から離れているのが確認されたため，残る歯根を抜去した．

【症例２】26才男性．下顎左側の水平埋伏智歯の違和感のため抜歯希望で来院．回転パノラマ上で根尖が下顎管と重なっているのが観察されたため，抜髄せず歯冠部のみ切断除去した．しかし翌日より冷水痛を訴え，徐々に自発痛が出現したため，9日後に抜髄即時根充したところ，その後は，症状無く経過した．３カ月後の回転パノラマにて根尖が下顎管から離れつつあることが確認されたため，５カ月後に歯根を抜去した．

【結果および考察】２症例共，歯冠部除去，歯根の抜去は短時間で終了し，術後経過は良好で，下歯槽神経麻痺等の合併症は生じなかった．さらに歯根の移動により，第２大臼歯の歯槽骨レベルの回復もみられた．しかし，

症例２において，抜髄処置の省略を試みたが，歯髄炎と思われる疼痛が発現した．本法適用時は完全埋伏でない限り，術前の抜髄もしくは歯冠除去時の抜髄や断髄等の処置が必要と思われる．

二回法抜歯は１回目，２回目共に手術侵襲が小さいので，下歯槽神経麻痺の回避だけでなく，長時間に及ぶ抜歯によって起きる術後の不快症状や合併症の予防にも有効と報告されている[1]．困難が予想される下顎智歯抜歯に際しては術前に本法適応の可能性を患者に伝えておけば，安全でゆとりある抜歯が行えるのではないかと思う．

【参考文献】

1．仲井義信，和気裕之，岩城博：２回法智歯抜歯　術後知覚麻痺を回避する一方法，デンタルダイヤモンド19（12）：25－42，1994

2．野村泰慎，野口信宏，後藤昌昭，他：埋伏智歯２回法抜歯についての検討　智歯と下顎管が近接した症例に対して，The Quintessence 19（９）：1899－1904，2000

22. 第４学年口腔外科学の系統講義における各種試みについて

○柴田　考典，金澤　　香，有末　　眞，武藤　寿孝，
平　　博彦，永易　裕樹，奥村　一彦，村田　　勝
（北海道医療大学歯学部口腔外科学教室）

【目的】2005年度から第４学年における共用試験（全国共通登院資格試験，CBT：Computer Based TestingおよびOSCE：Objective Structured Clinical Examination）の導入，2006年度からの歯科医師国家試験への実技試験，および筆記試験の判定における相対評価の導入，さらに同年からの歯科医師卒直後研修の義務化の開始など，歯科医師の養成に関わる環境は厳しさを増している．そこで，口腔外科学教室では卒前における口腔外科学の教育体制を抜本的に改革することとし，2002年10月より検討を始め，2003年度の第４学年の系統講義から試行を開始したので，現在進行中の改革の骨子について報告した．

【方法】まず，2003年２月16日日曜日に当別キャンパスにて口腔外科学教室の教員全員が参加して「本学における口腔外科学卒然教育の問題点」についてワークショップを実施し，問題点の抽出および教育改革に対する共通認識の醸成を図った．ついで，バイタルサインと頭頸部診察の実習導入，すなわち，第４学年を２班に分け，各班全員で医学教育学会編ビデオテープの「脈拍・血圧測定」および「頭頸部の診察」を再生・視聴した後，各７名の小グループに別れ，各１名のインストラクターの指導のもと約２時間の相互実習を行った．さらに，従来は講座単位のカリキュラムにより，学生は平行して異なる単元について講義を受けていたのを，一つの単元について連続して受講できるよう改めた．さらに，系統講義の問題点抽出の一助とすべく，全講義に授業評価を取り入れた．すなわち，授業評価は５段階のレイティング・スケールからなる質問10問，自由記載欄，および100点満点の総合的評価点３項目の評価票を作製し，原則として講義終了直前に評価票を配布し実施した．なお，評価票は無記名で記載させた．

【結果および考察】ワークショップによる検討の結果，第４学年の系統講義における抜本的改革の骨子として，

１）講座間のカリキュラムの統合，
２）全講義に対する授業評価の導入，
３）実習の導入，
４）チュートリアル演習の試行，
５）学習効果の形成的評価への多肢選択式客観試験の採用を抽出し，2003年度の第４学年の系統講義から試行した．

23. 第４学年口腔外科学の系統講義における授業評価について

○金澤　　香，柴田　考典，有末　　眞，武藤　寿孝，
平　　博彦，永易　裕樹，奥村　一彦，村田　　勝
（北海道医療大学歯学部口腔外科学教室）

【目的】第４学年の系統講義を抜本的に改革するため，2003年度の第４学年から講座間のカリキュラム，およびシラバスの統合を図った．すなわち，従来は講座単位のカリキュラムにより，学生は平行して異なる単元について講義を受けていたのを，一つの単元について連続して受講できるよう改めた．

さらに，系統講義の問題点抽出の一助とすべく，全講義に授業評価を取り入れたので，その概要を報告する．

【方法】授業評価は５段階のレイティング・スケールからなる質問10問，自由記載欄，および100点満点の総合的評価点３項目の評価票を作製し，原則として講義終了直前に評価票を配布し実施した．なお，評価票は無記名で記載させた．

【結果および考察】授業評価票の配布は，72回の講義全てで行われ，回収率は，最高100％，最低12.4％，平均43.7％であった．当初100％近かった回収率は徐々に低下し，11月中旬には20％程度まで低下した．自由記載欄の記入率も同様であった．

このような回収率および記入率の低下は，毎回，回収した授業評価票の集計結果，および自由記入欄に対する教員の回答を学生に逐次公表しなかったために，学生が授業評価の意義を実感できなかったことに起因すると推測された．但し，全講義の授業評価と逐次集計結果の公表を実施するためには膨大なマンパワーが必要であり，今後の課題と考えられた．

24. 第４学年口腔外科学の系統講義における実習導入について

○平　　博彦，金澤　　香，柴田　考典，有末　　眞，
武藤　寿孝，永易　裕樹，奥村　一彦，村田　　勝
（北海道医療大学歯学部口腔外科学教室）

【目的】共用試験歯学系OSCE実施のためのモデル・コア・カリキュラムにおいて，案として提示されているOSCE課題のうち，口腔外科に科せられることが予想される課題は，基本的診察および検査能力のうちのバイタルサイン，頭頸部診察，基本的技能のうちの手洗いと手袋着用，および基本的臨床技能のうちの単純抜歯と推測した．そこで，まず2003年度の第４学年前期において，バイタルサインと頭頸部診察を実施した．Pre-Clinical Training System（P.C.T. System）は，臨床実習への円滑な移行と歯科診療における基本的な原理と手技を習得させることを目的に本学が開発し，当科では，従来より術前消毒，局所麻酔，単純抜歯（縫合も含む）などに応用され実績を挙げてきた．

さらに，当科では臨床実習をより臨床参加型に改良するにあたり，単純抜歯（縫合も含む）の技術の習得を到達目標に設定した．それにより，単純抜歯（縫合も含む）実習において反復して実施する必要が生じ，反復履修が可能なPCTモデルが必要になったので，その開発を本研究の目的とした．

【方法】まず，第４学年97名を２班に分け，バイタルサインについては７月11日㈮４講時および14日㈪５講時，頭頸部診察については８月18日㈪５講時および25日㈪５講時に実習を実施した．まず，各班約49名全員で医学教育学会編ビデオテープの「脈拍・血圧測定」および「頭頸部の診察」をそれぞれ再生・視聴した後，各７名の小グループに別れ，各１名のインストラクターの指導のもと約２時間の相互実習を行った．

ついで，従来の一体型PCTモデルは実習に１回しか使用できない欠点を有していた．そこで，まず反復使用できるように歯列を一部分割することが可能かどうか検討するため，左下顎臼歯部分割モデルを試作した．ついで上下顎base，上下顎前歯部，両側臼歯部の計８ブロックからなる分割PCTモデルを㈱ニッシンの協力のもと開発した．

【結果および考察】正規の系統講義の時間外にもかかわらず，学生の参加はそれぞれ96%，94%であり，授業評価においても好評であった．また，開発した上下顎分割モデルは，上下顎base，上下顎前歯部，両側臼歯部の計８ブロックからなり，上下顎baseを大学備品として準備することにより，実習者は実習で必要な部分のみを購入・準備すればよくなる．これにより，学習者の技術修得度に応じ，必要なブロックの交換のみで繰り返し実習を行うことが可能となり，より確実な教育目標への到達が可能となった．

さらに，本モデルを採用する大学が増えることにより，各ブロックの量産効果が期待され，実習生の経済的負担を軽減できると考えられる．

25. 第４学年口腔外科学の系統講義におけるチュートリアル学習の導入について

○武藤　寿孝，金澤　　香，柴田　考典，有末　　眞，
平　　博彦，永易　裕樹，奥村　一彦，村田　　勝
（北海道医療大学歯学部口腔外科学教室）

【目的】第４学年における口腔外科学系統講義の目標は，口腔外科学に関連する幅広い知識を獲得とともに，自らの疑問に対し適切な回答を探索し，発見し解決する態度，習慣，および技能を身につけることである．しかし，講義形式による情報伝達には限界があり，後者の問題発見，情報検索，コミュニケーション，および発表などの能力を身につけるためには，チュートリアル学習の導入が必須と考え，試行したので報告した．

【方法】まず，全員にチュートリアル学習の目的，方法について解説した．ついで，1グループ４～５名となるよう20グループに班分けし，各グループに異なった課題を４月中に提示し，1名のチューターを配置した．チューターは講師以上の７名が務め，それぞれ２～３グループを受け持ち，予めstory makingについて演習を行い準備した．チュートリアル学習は講義時間外に行い，発表は11月中旬からの10コマをあて，１グループ発表20分間，質疑応答15分間，チューターのコメント５分間とした．グループ発表の評価は学生による相互評価とし，５段階のレイティング・スケールからなる質問10問，自由記載欄，および100点満点の総合的評価点３項目からなる評価票を作製し，発表開始前に評価票を配布し実施した．なお，評価票は記名とし，相互評価票の提出をもって出席とした．

【結果および考察】チュートリアル学習の成果発表に対する学生の出席率は高く，最低でも60%を超えており，相互評価票における自由記載欄の記入率も常に40%以上と格段に高く，本演習は学習意欲の向上に寄与すると考えられた．

学生による相互評価のうち100点満点の総合的評価点では，それらのグループごとの平均点が85～60点の間に分布し，おおむね妥当な評価と考えられ，相互評価を形成的評価に採用できると考えられた．

また，学習目標の達成度を100点満点で自己評価させたところ，49%が100～80点を，41%が79～60点を，10%が60点未満を示し，さらに，68%の学生が，次年度の学生にこのチュートリアル学習を継続することについて賛意を示しており，大多数の学生が何らかの達成感を得ているものと推測された．

26. 本学歯学部附属病院地域支援医療科活動報告　第３報

○松原　国男*，越野　　寿*,**，平井　敏博*,**，吉野　夕香***
（*歯学部附属病院地域支援医療科・**歯学部歯科補綴学第１講座・***歯学部附属病院事務部）

本学歯学部附属病院は地域からの要望に応えるべく，平成12年11月に「地域支援医療科」を新設し，訪問歯科診療室所属の歯科医師と各科・部署の担当者が診療にあたる体制を整備した．

今回は，平成15年１月から11月末までの「地域支援医療科」としての活動について報告する．

１．訪問歯科診療の実績

訪問診療を実施した患者数は135名（平成13年同期間：257名）であり，延べ訪問診療回数は995回（平成13年同期間：716回）であった．

訪問先については，居宅が559回（56%）で最も多く，高齢者施設が296回（30%），入院中の医科病院が140回（14%）であった．

訪問先の地域別分布では，当別町が324回（33%），江別市が250回（25%），厚田村が219回（22%），月形・浦臼町が99回（10%），浜益が32回（３%），札幌市北区が31回（３%），岩見沢市が18回（２%），北村が17回（２%），石狩市が５回（１%）であった．

患者数に関しては，昨年度は大幅な増加を記録したため，それと比較すると本年度は半減したことになるが，一昨年よりは多く，長期的には増加傾向を示している．一方，訪問診療回数は増加した．このことは，患者１人あたりの診療回数の増加を示しており，数回の義歯調整等で終了する患者が減少する一方，多くの診療回数を要する患者が増えていることを示している．

２．歯科医療従事者への学術講演の実施

歯科医師に対する学術的な情報を提供するための講演・セミナーへの講師派遣は２回，歯科技工士に対するそれは１回であった．

３．地域住民への啓発活動

地域住民に対して，疫学調査を含む研究結果をもとに口腔・顎・顔面領域の機能を概説し，顎口腔系機能の全身の健康維持に果たす役割の重要性を啓発するための活動として，講演会への講師派遣は２回であった．

今後も，「地域支援診療科」としては，「治療」の観点からの訪問歯科診療と，「予防」の観点からの啓発活動に対して，さらなる積極的な取り組みが必要であると考える．

27. チェアーサイドで可能な嚥下機能評価法の考案

○岩崎　一生*，松実　珠千*，越野　　寿*，平井　敏博*，横山　雄一*，木下　憲治**
（*北海道医療大学歯学部歯科補綴学第１講座・**北海道医療大学医科歯科クリニック）

【目的】近年，不顕性誤嚥と老人性肺炎との関連が問題視されている．通常，誤嚥の有無の検査には嚥下造影法（以下，VF法とする）が用いられるが，被曝の問題が避けられない．一方，演者らは，チェアーサイドで可能な嚥下機能評価法を確立する目的で，食塊を後方に送り込むための舌運動が開始した時点，すなわち口腔期の開始時点から，咽頭期における喉頭蓋閉鎖時点までの食塊の移動状態と嚥下の進行状況を把握するための超音波診断装置と心音マイクを用いる方法（以下，US法とする）を検討している．今回は，演者らのUS法の妥当性を検証する目的で，VF法との同時記録を行った結果を報告する．

【方法】被験者は健常者５名とした．US法で嚥下時の舌運動と嚥下音の記録を行うと同時に，VF法を行った．US法における舌運動の観察には，汎用超音波診断装置とコンベックス型浅部用探触子を用いた．また，嚥下音は，心音マイクを用いて，舌運動と同時にUltrasono Recorderに記録した．US画像およびVF画像をDigital Video Recorderに記録した．なお，両画像を同期させるために，施行開始の直前に同一信号をRecorderに入力した．分析では，入力された同一信号を基準として，１／30秒毎の連続した静止画としてMagneto Optical Diskに出力した．なお，被験食品として，ムースアップ®をGastrografin®に溶解した３mlを用いた．US法では，記録紙上の舌運動軌跡および嚥下音波形上に舌運動（T_0～T_5）および嚥下音（S_1，S_2）の計測ポイントを設定し，波形分析用プログラムを用いて計測した．

【結果と考察】US画像上の嚥下第一音であるS_1と，VF画像上の喉頭蓋閉鎖時点とが一致していることが確認された．また，US画像上の舌と口蓋との最終接触時点，すなわち食塊の送り出し完了時点と考えられるT_4と，VF画像上の食塊の食道入口部通過時点とが一致していることが確認された．

以上の結果から，US画像に設定したS_1とT_4は，食塊の移動状態と嚥下の進行状況を正確に反映していることが判明した．

28. 障害者における服薬内容と歯科治療への影響について 第二報：新薬服用者における影響

○関口　五郎
（東京都立心身障害者口腔保健センター）

【目的】さまざまな疾患・障害のある者（以下，障害者とする）は，日常薬剤を継続的に服用している場合が多い．しかし近年では処方内容について以前と変化がみられる他，新たに適用承認を受けた新薬を服用している例も少なくない．しかしそのような薬剤の中には，歯科治療への影響について未だ不明な点がみられるものも多い．本発表においては近年新たに適用承認を受け，障害者が服用している薬剤の現状について調査し，歯科治療への影響を知ることにより，障害者に対する歯科治療を安全かつ効果的に進めることを目的とした．

【対象および方法】歯科治療を目的に来所した障害者（精神遅滞，自閉症，脳性麻痺，ダウン症，それぞれ30名，合計120名，平均年齢25.0歳）を対象とした，服薬内容について，調査時点より過去５年間に新たに適用承認を受け販売を開始した薬剤を新薬とし，その服用状況および相互作用について検討を行った．

【結果および考察】ダウン症者を除き，対象者の約３分の２の者が何らかの薬剤を継続的に服用していた．その中で５名（精神遅滞者２名，自閉症者３名）の者が新薬を服薬していた．新薬は向精神薬の服用例が多かったが，未承認の薬剤を服用している例もみられた．歯科治療への影響について，多くは歯科用局所麻酔薬に含まれるエピネフリンとの相互作用の可能性例であった．しかし相互作用が明確であるもの以外にも，相互作用の可能性が必ずしも明確ではないものや，薬理作用としては相互作用の可能性が考えられるものの，医科臨床での使用経験の報告が少なく，歯科治療への影響や薬剤との相互作用について未だ不明な点が多いものもみられた．

そして今回歯科治療を行うにあたり，検討を要したケースもあった．さらに近年では以前と異なった作用機序概念のもとで開発された向精神薬が，わが国でも多く処方される傾向にあり，今後は障害者における精神症状の改善にも，このような新薬が多く使われることが予想される．したがって今回の調査を踏まえ，障害者に対して歯科治療を行うにあたっては，医科担当医や薬剤師との連絡を密にし，最新の服薬内容や患者の全身状態，歯科治療への影響について術前に十分把握し，検討を加えた上で治療を進めるべきであると考えられた．

29. 安全・迅速に解除しやすい顎間固定方法の検討

○河合　拓郎*，山崎　敦永**，宇賀　　茂***，大桶　華子*，
工藤　　勝*，國分　正廣*，溝口　　到**，新家　　昇*
（*北海道医療大学歯学部歯科麻酔学講座・**北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座・***宇賀歯科医院）

【目的】顎変型症患者に対して，北海道医療大学歯学部附属病院では1980年から顎骨切り術に併せて全身麻酔下に全顎の顎間固定を施行してきた．しかし，1995年に当院で麻酔覚醒後，上気道閉塞のため顎間固定緊急解除しワイヤー端を誤嚥させた事がある[1)]．その後，周術期の安全を推進させるために，顎間固定方法は，麻酔覚醒直後に手術室でチタンニッケルワイヤーを用いた迅速に解除しやすい暫間的な顎間固定（以下，補助２箇所）を行った[2)]．さらに病棟帰室２時間後以降に，意識清明で嘔気・嘔吐等のない事を確認し，従来のステンレス鋼ワイヤーで顎間固定（以下，７箇所固定）を施行していた．最近，口腔外科の意向にて，ステンレス鋼ワイヤーで前歯部，左右臼歯部の３箇所顎間固定を施行している（以下，３箇所固定）．そこで，各顎間固定方法によって解除時間を検証し，安全な方法を考案した．

【方法】顎間固定解除モデルを作製し，モデルに矯正歯科認定医が顎間固定を施行した．顎間固定方法は，１．従来施行していた７箇所固定，２．チタンニッケルワイヤーを用いた補助・２箇所は，左右側方歯部２箇所固定して，補助ワイヤーを口腔外に残す方法．３．現在行っている３箇所固定，４．現行の方法に補助ワイヤーを口腔外に残す方法を併用した（以下，補助３箇所）．解除

者は当院スタッフ11名（男／女：６／５名）とした．解除時間と口腔咽頭の残存ワイヤー数を測定（平均値±SE）した．

【結果および考察】 ７箇所固定は，最も長時間（129.0±13.0秒）を要し，残存ワイヤーも3.0±1.0本と，最も多かった．補助２箇所は，最も迅速（14.5±3.0秒）で，残存ワイヤーを認めなかった．３箇所固定は79.1±16.0秒,7箇所固定より早く，補助２箇所より遅かった．また残存ワイヤーは0.5±0.3本認めた．３箇所固定と補助３箇所では解除時間・残存ワイヤー数，共に差を認めなかった．補助２箇所は，前歯部で確実に切断でき，少ない切断部位のため，最も迅速で解除でき，残存ワイヤーも全例認めなかった．すなわち，チタンニッケルワイヤーを用いた補助２箇所は，最も安全な方法と考えられる．

文献１）渡辺一史ら：東日本歯誌,2001,20（１),47－53
２）工藤　勝ら：麻酔,2002,51（３),329－330

30. 生体親和性に優れたカルボキシレート系仮着用セメントの開発

○柳　　智哉，遠藤　一彦，大野　弘機，川島　　功，山根　由朗
（北海道医療大学歯学部歯科理工学講座）

【目的】 補綴物の口腔内への装着は厳密な咬合調整後に行われるが，臨床においては仮着用セメントを用いて補綴物を装着し，咬合の確認を行う方法を併用している．また，口腔インプラントにおける上部構造体の装着方法は，スクリュー固定法とセメント固定法があるが，審美性や術式の簡便さなどから，仮着用セメントを用いたセメント固定法を使用する頻度が増加しつつある．

本研究では，遷移金属元素や亜鉛族元素を全く含まない生体安全性の高い仮着用セメントを開発することを目的とした．今回は，粉末にリン酸カルシウムを用いたカルボキシレート系セメントを試作し，その操作性と物性を調べた．

【材料および方法】 試作セメントの粉末には，Tetracalcium phosphate（TTCP，和光純薬）を用いた．ポリカルボン酸の水溶液には市販されているカルボキシレートセメントの液（LIVCARBO,GC）を用いた．標準粉液比で練和したセメントの硬化時間および硬化体の圧縮強さは，JIS T6602に従って測定した．また，口腔インプラントのアバットメントと上部構造体を仮着し，引張試験を行って保持力を測定した．

【結果および考察】 試作したセメントの硬化時間は，24分15秒であった．JISではカルボキシレートセメントの硬化時間は９分以内と規定されており，液と粉末の反応性を高くし，硬化時間を短くするために粉末あるいは液の成分・組成を検討する必要がある．試作セメントの圧縮強さは5.4±2.5MPaであり，市販されている一般的な仮着用セメントで得られた圧縮強さの平均値にほぼ近い値を示した．また，試作セメントを用いたアバットメントに対する上部構造体の保持力は，33.9±18.6Nであった．13種類の仮着用セメントで得られた保持力は，2.7～183.9Nであったことから，試作セメントは口腔インプラント上部構造体のセメント固定に使用できる物性を有していることが分かった．

試作したカルボキシレート系セメントは，Ca以外の金属を含まず，生体に対する安全性が極めて高い．今後，操作性や物性を向上させ，金属アレルギー患者に対しても，接着・合着用セメントとして使用できるように改良を加える予定である．

31. ハイブリッド型硬質レジンインレーを用いた前歯部の審美修復について

○曽我部元尚*，國安　宏哉**，新井田　淳**，柿崎　　税*･***，
八島　明弘**，廣瀬由紀人**，越智　守生**
（*技工研修科，**歯科補綴学第Ⅱ講座，***歯科技工部）

【目的】 審美修復材料として代表的なものにコンポジットレジンが挙げられる．近年，患者からの審美性への要求と認識がより一層高まり，臼歯部においても歯冠色の材料が望まれ，レジン材料の開発が盛んに行なわれている．最近ハイブリッド型硬質レジンインレーが臼歯部審美修復の選択肢の１つとして臨床報告がなされている．

しかし，前歯の部分修復で多用されているのは比較的簡便であるCR充填であるため，ハイブリッド型硬質レジンと比べて収縮，色調，着色，研磨精度などに関してはどうしても否めなかった．今回，前歯部の部分修復にハイブリッド型硬質レジンインレー修復を応用し，技工操作の観点から検討した．

【症例】22歳の男性．12隣接面にカリエス．通法に従いエックス線と窩洞マージンの咬合状態を検査後，ラバーダムを使用して軟象を除去し，アンダーカットを処理して口腔内で直接作製したカスタムトレーにて印象採得を行なった．歯形固着式模型を用いてハイブリッド型硬質レジン（グラディア，GC社）にてインレーを製作し，装着は通法に従いラバーダム処理を行ない，レジン系接着剤（バリオリンクⅡ，イボクラール社）にて接着した．

【まとめ】今回，前歯部の部分修復にハイブリッド型硬質レジンを用いたインレー修復を応用し，技工操作の観点から検討した．その結果，仮想の修復物着脱方向を十分に歯科医師と共に適応について考慮すれば通常の臼歯部のインレーと同様に修復物が作製可能であった．また，研磨精度も満足できるものであった．

会　務　報　告

第22回東日本歯学会総会記録

1．庶務報告

(1) 会員数（平成15年12月31日現在）

正 会 員	1,260
準 会 員	17
賛助会員	15
名誉会員	9
臨時会員	5
合　　計	1,306

(2) 役員数

常任理事	8
理　　事	25
監　　事	2
評 議 員	75

(3) 会務報告

理事・監事会

第1回理事・監事会　平成15年1月8日(水)

報告事項　国立情報学研究所による「東日本歯学会雑誌」の電子化について

審議事項　①　東日本歯学会役員の一部変更について

②　評議員会の総会との同時開催について

③　第22回(平成16年)東日本歯学会総会･学術大会は歯科補綴学第二講座(越智守生　教授)が担当

第2回理事・監事会　平成15年2月12日(水)

報告事項　庶務報告．編集報告．企画報告について

審議事項　平成14年決算報告と平成15年予算について（案）

第3回臨時理事・監事会　平成15年2月19日(水)

特別講演①が承認された。

第4回臨時理事・監事会　平成15年4月9日(水)

特別講演②が承認された。

第5回臨時理事・監事会　平成15年5月14日(水)

特別講演③が承認された。

第6回臨時理事・監事会　平成15年7月9日(水)

特別講演④が承認された。

第7回臨時理事・監事会　平成15年9月24日(水)

特別講演⑤と⑥が承認された。

平成15年評議員会・総会　平成15年2月15日(土)

庶務報告・編集報告・企画報告及び平成14年決算報告と平成15年予算（案）の説明があり、審議のうえ、承認された。

2．編集報告

東日本歯学雑誌（22巻1号)(本文120)

総説1編　原著4編　臨床4編

東日本歯学雑誌（22巻2合)(本文66)

総説1編　原著1編　臨床2編　その他（博士論文）

3．企画報告

第21回学術大会

日時：平成15年２月15日㈯

場所：北海道医療大学サテライト．キャンパス

担当講座：歯科薬理学講座　演題29題

定例講演会

平成15年第21回学術大会と併催

演題:「薬物代謝酵素の遺伝的多型：個別化医療と疾患リスク」

講師：北海道大学大学院薬学研究科・代謝分析学分野　鎌滝哲也教授

特別講演会

①平成15年２月25日㈫　担当講座　歯科保存学第一講座

演題：歯槽骨破壊を抑制する歯肉線維芽細胞

講師：東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科

歯周病学分野　長澤敏行助手

②平成15年４月14日㈪　担当講座　口腔病理学講座

演題：口腔外科と再生医療

講師：名古屋大学大学院医学研究科　頭頸部感覚器外科学講座

顎顔面外科学・咀嚼障害制御学　上田実教授　重富俊雄講師

③平成15年５月22日㈭　担当講座　口腔生理学講座

演題:「顔面・口腔領域の副交感性神経支配に関する形態学的研究」

講師：鹿児島大学医学部第一解剖学教室　口岩　聡助教授

④平成15年７月22日㈫　担当講座　口腔病理学講座

演題：頭頸部診断

講師：北海道大学歯学部附属病院高次口腔医療センター　箕輪和行講師

⑤平成15年10月１日㈬　担当講座　口腔病理学講座

演題：唾液腺疾患の画像診断法の変遷と最近のアプローチ

講師：九州大学大学院歯学研究科

口腔顎顔面病態学講座　口腔画像情報科学教室　神田重信教授

⑥平成15年10月２日㈭　担当講座　口腔外科第一講座

演題：歯科におけるヘリカルCTを用いた研究・診断について

講師：大阪歯科大学歯科放射線学講座　四井資隆助手

会計報告

東日本歯学会　平成15年　決算書（平成15年１月１日～平成15年12月31日）

収　入　の　部		
科　　目	本　年　予　算　額	本　年　決　算　額
①会費　入会金	5,520,000	5,596,000
正会員		
本年納入分	3,400,000	3,350,000
	(680名×5,000円)	(670名×5,000円)
滞納分	600,000	740,000
	(120名×5,000円)	(148名×5,000円)
前々年度前受金	295,000	295,000
	(59名×5,000円)	(59名×5,000円)
前年前受金	400,000	400,000
	(80名×5,000円)	(80名×5,000円)
準会員	51,000	33,000
	(17名×3,000)	(11名×3,000円)
賛助会員		
本年納入分	450,000	450,000
	(15名×30,000円)	(15名×30,000円)
新規会員		
新卒	300,000	295,000
	(60名×5,000円)	(59名×5,000円)
新規会員		
その他	15,000	15,000
	(３名×5,000円)	(３名×5,000円)
新規会員		
臨時	0	15,000
	(０名×5,000円)	(３名×5,000円)
入会金	9,000	3,000
	(３名×3,000円)	(１名×3,000円)
②事業収入	550,000	576,900
広告料	250,000	270,000
別刷料	50,000	18,900
掲載料	250,000	288,000
③雑収入	154,000	29,914
利息	4,000	2,784
その他	150,000	27,130
当期収入(A)	6,224,000	6,202,814
前期繰越金(B)	13,456,932	13,456,932
次期繰越金(C)	985,000	1,015,000
前年前受金	380,000	＊1　380,000
	(76名×5,000円×１年)	(76名×5,000円×１年)
本年前受金	600,000	＊2　620,000
	(60名×5,000円×２年)	(62名×5,000円×２年)
	5,000	＊3　15,000
	(１名×5,000円)	(３名×5,000円)
収入合計(D)		
(＝A+B+C)	20,665,932	20,674,746

＊1　平成16年の預かり分（19期生３回目）
＊2　平成16年と平成17年分（20期生と新規その他）預かり分
＊3　正会員重複入金の為平成16年分の預かり金

支　出　の　部		
科　　目	本　年　予　算　額	本　年　決　算　額
①学術大会及び定例講演	600,000	579,510
開催費	400,000	392,885
印刷費	100,000	86,625
宿泊費等	0	0
旅費	0	0
謝礼	100,000	100,000
②特別講演会補助金	300,000	180,000
③雑誌発行費	3,400,000	2,454,185
印刷費	2,900,000	2,061,570
発送費	500,000	392,615
④事務経費	1,540,000	1,385,213
事務委託費	1,080,000	1,040,000
事務印刷費	10,000	1,040
事務通信費	250,000	208,233
事務用品	200,000	135,940
⑤備品費	35,000	35,595
⑥デンタルトピックス補助金	300,000	300,000
⑦会議費	40,000	8,379
⑧予備費	100,000	0
⑨諸雑費	100,000	30,379
当期支出合計(E)	6,415,000	4,973,261
当期支出差額(F)		
(A－E)	－191,000	1,229,553
次期繰越金(G)		
(B+F)	13,265,932	14,686,485
次期繰越前受金(C)	985,000	1,015,000
前年前受金	380,000	380,000
	(76名×5,000円×１年)	(76名×5,000円×１年)
本年前受金	600,000	620,000
	(60名×5,000円×２年)	(62名×5,000円×２年)
	5,000	15,000
	(１名×5,000円)	(３名×5,000円)
収支差引残額(H)		
(D－E)	14,250,932	15,701,485
総支出（E+H)	20,665,932	20,674,746

本年度の帳簿等関連諸表を調査の結果，決算報告に誤りのないことを認めます。

平成16年１月28日
会計監事　新　家　　昇　㊞
会計監事　小　野　正　利　㊞

東日本歯学会　平成16年　予算書（平成16年１月１日～平成16年12月31日）

収　入　の　部		
科　　目	前　年　予　算　額	本　年　予　算　額
①会費・入会金	5,520,000	5,425,000
正会員		
本年納入分	3,400,000	3,300,000
	(680名×5,000円)	(660名×5,000円)
滞納分	600,000	600,000
	(120名×5,000円)	(120名×5,000円)
前々年前受金	295,000	390,000
	(59名×5,000円)	(78名×5,000円)
前年前受金	400,000	310,000
	(80名×5,000円)	(62名×5,000円)
準会員		
本年納入分	51,000	51,000
	(17名×3,000円)	(17名×3,000円)
賛助会員		
本年納入分	450,000	450,000
	(15名×30,000円)	(15名×30,000円)
新規会員		
新卒	300,000	300,000
	(60名×5,000円)	(60名×5,000円)
新規会員		
その他	15,000	15,000
	(３名×5,000円)	(３名×5,000円)
新規会員		
臨時		
入会金	9,000	9,000
	(３名×3,000円)	(３名×3,000円)
②事業収入	550,000	550,000
広告料	250,000	250,000
別刷料	50,000	50,000
掲載料	250,000	250,000
③雑収入	154,000	153,000
利息	4,000	3,000
その他	150,000	150,000
当期収入(A)	6,224,000	6,128,000
前期繰越金(B)	13,456,932	14,686,485
次期繰越前受金(C)	985,000	915,000
前年前受金	380,000	310,000
	(76名×5,000円×１年)	(62名×5,000円×１年)
本年前受金	600,000	600,000
	(60名×5,000円×２年)	(60名×5,000円×２年)
	5,000	5,000
	(１名×5,000円)	(１名×5,000円)
収入合計(D) (＝A+B+C)	20,665,932	21,729,485

支　出　の　部		
科　　目	前　年　予　算　額	本　年　予　算　額
①学術大会及び定例講演会	600,000	700,000
開催費	400,000	400,000
印刷費	100,000	100,000
宿泊費	0	20,000
旅費	0	80,000
謝礼	100,000	100,000
②特別講演会補助	300,000	300,000
③雑誌発行日	3,400,000	3,400,000
印刷費	2,900,000	2,900,000
発送費	500,000	500,000
④事務経費	1,540,000	1,540,000
事務委託料	1,080,000	1,080,000
事務印刷料	10,000	10,000
事務通信費	250,000	250,000
事務用品	200,000	200,000
⑤備品費	35,000	1,000,000
⑥デンタルトピックス補助金	300,000	300,000
⑦会議費	40,000	40,000
⑧予備費	100,000	100,000
⑨諸雑費	100,000	100,000
当期支出合計(E)	6,415,000	7,480,000
当期支出差額(F) (A－E)	－191,000	－1,352,000
次期繰越金(G) (B+F)	13,265,932	13,334,485
次期繰越前受金(C)	985,000	915,000
前年前受金	380,000	310,000
	(76名×5,000円×１年)	(62名×5,000円×１年)
本年前受金	600,000	600,000
	(60名×5,000円×２年)	60名×5,000円×２年)
	5,000	5,000
	(１名×5,000円)	(１名×5,000円)
収支差引残額(H) (D－E)	14,250,932	14,249,485
総支出（E+H）	20,665,932	21,729,485

資産の部

現金		86,722円
北海道銀行当別支店	普通預金	5,045,513円
北海道銀行当別支店	定期預金	9,000,000円
北洋銀行当別支店	定期預金	1,500,000円
郵便局		69,250円
合計		15,701,485円

東日本歯学会会則

（平成８年４月１日改正）

Ⅰ　総　　則
（名　称）
第１条　本会は東日本歯学会（英文Higashi Nippon Dental Society）と称する。
（目　的）
第２条　本会は北海道医療大学歯学部（以下本学部と略す）を中心に，会員相互の緊密な協力により，学術研究の推進・専門技術の練磨を計り，歯学の進歩・発展に寄与するとともに，会員の親睦を図ることを目的とする。
Ⅱ　会　　員
（会　員）
第３条　本会は以下の会員よりなる。
１．正会員
歯学の研究に従事し，本会の目的に賛同する者，本学部教職員・大学院生・研究生・臨床研究生・歯科臨床研修医・卒業生および本学部元教育関係者で理事会の承認を得た者。
２．名誉会員
本会の設立または発展に，特に功労のあった者で，常任理事会が推挙し，理事会，評議員会の議を経た者。なお，名誉会員には名誉会員証を贈るほか会員の権利を保有し，年会費一切の費用は徴収しない。
３．準会員
歯学教育・診療関係者で理事会の承認を得た者。
４．学生会員
本学部専門課程の学生で理事会の承認を得た者。ただし，学生会員は卒業後正会員に移行するものとする。
５．賛助会員
本会の目的および事業に賛同し，協力・支援する個人・団体等で，理事会の承認を得た者。
（入　会）
第４条　本会に入会を希望する者は，所定の申し込み書に必要事項を記入の上本会事務局に申し込むものとする。
（退　会）
第５条　会員で退会を希望する者は，速やかにその旨を本会事務局に通知すること。ただし，納入済み会費の返還はこれを行わない。
（会員資格喪失）
第６条　会員は以下の事由によりその資格を喪失する。
１．２年以上会費の未納，所在不明または連絡のつかない者。
２．本会の名誉に反する言動のあった者について，会長は理事会，評議員会の議を経て退会を勧告または除名することがある。
（再入会）
第７条　会費未納により会員資格を喪失した者が再入会を希望する場合は，２年分の未納会費を納入後入会手続きをとるものとする。
Ⅲ　役員および運営
（役　員）
第８条　本会に以下の役員をおく。
会長１名，専務理事１名，常任理事　若干名，理事　若干名，監事２名，評議員　若干名，および常任委員　若干名
１．会長は本学部教授の中より，理事会が推薦し，評議員会の議を経てこれを決める。会長は本会を代表し，会務を統括する。
２．専務理事は理事会の議を経て会長が委嘱する。専務理事は会務の運営処理を推進する。
３．常任理事は理事の中より選出し，会長がこれを委嘱する。常任理事は常任理事会を組織し，会務を分担，執行する。分担する会務は，庶務，会計，編集，企画，その他とする。
４．理事は本学部教授，ならびに３名以上の理事の推薦を受け理事会の承認を得た者とする。理事は，理事会を組織し，役員の推薦など会務に関する重要事項を審議する。
５．監事は理事会の議を経て会長がこれを委嘱する。監事は会計およびその他の会務を監査する。また必要に応じ，理事会に出席する。
６．評議員は本学部教授，助教授，専任講師で構成するほか，会長の推薦により理事会の承認を得た者とする。評議員は評議員会を組織し，会長の諮問に応じて必要事項を審議する。
７．常任委員は理事会の議を経て，会長がこれを委嘱する。常任委員は常任理事を補佐し，会務の分掌処理にあたる。
（会議の成立条件）
第９条　理事会，評議員会は構成員の２分の１以上の出席（委任状を含む）をもって成立し，議事は出席者の過半数によりこれを決する。
（任　期）
第10条　各役員の任期は２年を原則とする。ただし，再任を妨げない。
Ⅳ　事　　業
第11条　本会は第２条の目的を達成するため以下の事業を行う。
１．総会
総会は会長の召集により年１回学術大会を開催し，会務等について報告する。また，必要に応じ会長は臨時総会を開催することがある。
２．学術大会
学術大会は年１回以上開催し，会員の研究発表，その他学術発展に関する行事を行う。
３．学術講演会，研修会
４．会誌
本会は機関誌“東日本歯学雑誌（英文Higashi Nippon Dental Journal）”を年２回発行し会員に配布する。会誌は逐次増刊することが出来る。東日本歯学雑誌の投稿規定ならびに論文査読規定については別に定める。
５．その他
本会の目的達成に必要と認めた事業。
Ⅴ　会　　計
（運営経費，会計）
第12条
１．本会の運営経費は会員の納入する会費，寄付金，その他の収入をもってこれにあてる。
２．各会員の会費は以下の通りとする。
イ　正会員　　入会金 3,000円　年会費　5,000円
ロ　準会員，学生会員　　年会費　3,000円
ハ　賛助会員　　入会金10,000円　年会費 30,000円
ただし新入会員（正会員，賛助会員）で会費３年以上を前納した者に対しては入会金を免除する。なお事業の目的に応じ，臨時会費を徴収することがある。
３．本会の会計年度は１月１日より12月31日とする。
（会計報告）
第13条　本会の収支決算については，理事会，評議員会の承認を得て，総会において会員に報告しなければならない。
Ⅵ　雑　　則
（事務局）
第14条　本会の事務局は本学部内におく。
（会則の改廃）
第15条　この会則に定めるもののほか，本会則の実施に必要な内規は理事会の議を経て別に定めるものとする。
第16条　本会則の改廃は理事会，評議員会の承認を得て，会長は会員に報告しなければならない。
附　則
１．本会則は昭和61年８月１日より施行する。
２．本会則は平成７年３月１日より施行する。
３．本会則は平成８年４月１日より施行する。

「東日本歯学雑誌」投稿規程

1．投稿資格
著者は，原則として共著者を含め，本会会員に限る．ただし，非会員が共著者となる場合には，１年分の会費を徴収する．

2．生命倫理への配慮
1）臨床研究は，ヘルシンキ宣言の主旨にそったもので，「北海道医療大学倫理委員会」の承認を得たものとする．
2）人の遺伝子解析を含む場合は，本学の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究の計画および実施に関する倫理規程」に基づき，「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理審査委員会」の審査をへて学長の許可を得たものとする．
3）動物実験は，「北海道医療大学動物実験の指針」に基づき，「動物実験センター管理運営委員会」の承認を得たものとする．
なお，本学以外の研究機関等で行われた研究については，当該研究機関等の倫理委員会等で承認を得たものとする．

3．論文の種類及び内容
1）論文の種類は，原著論文，症例報告，総説，解説とする．
2）論文の内容は，他の刊行物に未発表のものに限る．

4．査読および採否
1）投稿論文は，編集委員会および編集委員会の依頼する専門家により査読される．
2）採否については，査読の結果に基づき編集委員会が決定する．

5．投稿論文の作成
1）投稿論文は，投稿規程ならびに別に定める「投稿の手引き」に準拠して作成すること．
2）投稿論文は，表紙，チェックリストシート，英文抄録（150語以内），本文，表，図および図表説明文の順番にまとめる．
3）投稿原稿は，２部（正１部，コピー１部）とする．投稿原稿とともにフロッピーディスクを提出すること．なおディスクには，使用したワードプロセッサーのソフト名とファイル名を記載する．
4）和文論文の本文については，原則として，緒論（緒言），方法（材料および方法），結果，考察，結論（結言），謝辞（必要な場合のみ），文献の順に記載するものとする．
5）英文論文の本文については，原則として，ABSTRACT（150語以内），INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION, CONCLUSION，ACKNOWLEDGMENT（必要な場合のみ），REFERENCESの順に記載するものとする．

6．証明書等の発行
1）投稿原稿の受付日は，編集委員会に到着した日付とする．
2）受理証明が必要な場合には，掲載が決定した後に受理証明書を発行する．

7．掲載料および別刷料
1）掲載料は，刷り上がり10頁まで無料とする．これを超過した場合には，編集委員会が依頼したものを除き，１頁１万円の著者負担とする．
2）カラー頁については，著者の実費負担とする．
3）別刷料については，50部まで無料とし，これを超過する場合（50部単位）には著者の実費負担とする．

8．著作権の帰属
本誌に掲載された著作物の著作権は東日本歯学会に帰属する．本会はこれら著作物の全部または一部を，ネットワーク媒体を含む媒体に掲載・出版することが出来る．ただし，論文の内容については，全て著者が責任を負う．

9．原稿の送付先
住所：〒061－0293北海道石狩郡当別町字金沢1757番地
北海道医療大学歯学部
東日本歯学雑誌編集委員会

「東日本歯学雑誌」投稿の手引き

本学会誌の体裁を統一するために，「投稿の手引き」に準拠して，ご執筆下さいますようお願い致します．

原稿はすべてＡ４版とし，下記の項目１）～８）のすべてを，２部提出して下さい．和文抄録，英文抄録，本文については，フロッピーディスクを投稿原稿とともに提出して下さい．なおディスクには，使用したワープロのソフト名とファイル名を記載して下さい．

１）投稿原稿表紙
２）チェックリストシート
３）英文抄録（ABSTRACT，英文表題を含む）
４）本文
５）図表説明文
６）表
７）図

１．投稿原稿表紙

表紙には以下の事項を和文および英文で記入する．

１）原稿の種類
２）表題
３）著者名
４）キーワード（５語以内）
５）著者の所属および所在地
６）別刷数（50部単位）
７）連絡先（郵便番号，住所，電話番号，Fax番号，E－mail番号）

１）表題

⑴ 一般固有名詞として通用していない商品名は用いない．

⑵ 和文表題には，原則として略号以外の英文字を用いない．スペースも含めて35字以内のランニングタイトルを付ける．

⑶ 英文表題は和文表題の内容と一致させる．文頭のみ大文字とし，他は小文字とする．また，スペースも含めて45字以内のランニングタイトルを付ける．

⑷ 副題はできる限り用いない．ただし，必要な場合は次の例に準拠する．続報，第２報などの表記は認めない．

和文・英文：－□□□□□□□□－

２）キーワード

５語以内のキーワードを付ける．英文の場合は，キーワードの先頭のみを大文字とし，他は小文字とする（例：Impression materials，Bone morphogenetic proteins）．

３）氏名および所属

⑴ 英文氏名（和文）は，姓は大文字，名は先頭のみを大文字とする（例：YAMADA Akira（山田　昭）and HOKKAI Taro（北海太郎））．

⑵ 著者の所属が２ヶ所以上の場合には，第２番目以降の所属の著者に[1),2),3)]を付ける．

２．チェックリストシート

チェックリストの指示に従い，投稿原稿を確認する．

３．抄録

150語以内の英文抄録を付ける．

４．本文

１）原稿はA４判用紙にワードプロセッサなどによる横書きとする．原則として12ポイント文字を使用し，１頁35文字×30行とする．句読点は「．と，」を用いる．英文の場合は，ダブルスペースとする．

⑴ フロッピーディスクに，使用機種名，ソフト名，所属，著者名を明記する．
⑵ 著者がテキストファイルへ変換できる場合は，変換したファイルを提出する．

2）原稿の下段中央にページ番号を記す．
3）論文の原則的な構成は，緒論（緒言），方法（材料および方法），結果，考察（結果および考察），結論（結言），謝辞，文献，図の説明，図表とする．
4）見出しを用いるときは次の順に項目をたてる．

3→3)→(3)→a→a)→(a)

5）文章は，専門用語を除いて，常用漢字，新かなづかい，ひらがなは口語体とする．
6）数字はアラビア数字とし，単位の記号はJIS･Z8202およびZ8203に準じ，国際単位系（SI）を使用するよう努める．また単位にピリオドをつけない．(例：GHz，MPa，kW，cm，mV，μm，nA，pF，ml，mmol，N（kgf），K，℃，min)
7）学術用語は，原則として「文部省学術用語集」に準拠する．
8）商品名，器械名などは，可能な限り一般化されている「カタカナ書き」とする．英文字で表す場合は，かしら文字のみ大文字にする．
9）外国の人名などの固有名詞は原則として原綴とする．
10）連続した数値は「，」でつなぎ，最後に単位をつける．(例：10，20，30℃)
11）製造社の表記法は（ ）内に会社名のみを記し，社製および製作所，工業社製，株式会社などを入れない．

例：（型式名，製造会社名），（略号，製造会社名）
（X－3010, 日立） （EPMA，日本電子）

12）図表の挿入場所を本文右欄外に朱書きする．

5．文献

1）文献は，本文中の引用箇所の肩に引用した文献番号（1．2．3．－－－－－－）を付け本文の末尾に一括して掲載する．体裁は，[1,2]，[1~3]，のようにする．
2）文献として不適当なもの，例えば未公表のデータや私信などは文献として引用しない．
3）文献の記載方法の基本は次のとおりとする．
⑴ 雑誌の場合
著者名(複数の場合，氏名を「，」で区切る．)：氏名：表題－サブタイトル－ 雑誌名 巻：引用ページの始めと終わり，発行年．
（例：Buckingham TL：Expansion of plaster of Paris．*Dent Cosmos* 1：117－119，1859.）
⑵ 単行本の場合
著者名：書名．版数 発行所名：引用ページの初めと終わり，発行年．
（例：Phillips RW：Skinner's science of dental materials. 9th ed, *WB Saunders*：219－221, 1991.）
⑶ 分担執筆の場合
分担執筆者名：分担執筆の表題．書名 巻など，発行所名：引用ページの始めと終わり，発行年．
（例：山田早苗：橋義歯の力学－傾斜歯ブリッジの形成と設計について－，新臨床歯科学講座3，医歯薬出版：157－165，1978.）
⑷ 翻訳書の場合
著者（翻訳者）：書名（原著書名）．発行所名：引用ページの始めと終わり，発行年．
（例：Davidge RW（鈴木弘茂，井関孝善）：セラミックスの強度と破壊（Mechanical behavior of ce-

ramics)．共立出版：34－55,1982.

6．図

1）用紙はＡ４版とし，１枚ずつ別葉にする．

2）各葉枚に，図の番号，著者名，片段あるいは両段の指定，カラー印刷の有無を明記する．

3）図の大きさは，片段か両段一杯になることがのぞましい．刷り上がりを想定して，図の大きさが片段で横幅45～68mm,両段で100～150mmになるように縮小コピーし，文字，記号の大きさ，線の太さなどをチェックする．棒グラフなどのハッチングは識別可能なものにする．

4）図中の文字は，刷り上がりで本文とほぼ同じ10～13級（７～９ポイント），線の太さは0.15～0.3mmになるよう原図を作成する．

5）図のタイトルおよび説明は，まとめて，文献の後につける．

6）組図の原稿は，貼込み間隔や角度を正確にする．

7）写真は，Ａ４判の用紙に貼り，必要な文字，記号などを記入する．写真の拡大率は，単位長さのバーで表す．

8）患者の顔や特徴ある身体の一部の写真を使用する場合は，目隠し等により個人が特定できないように配慮するとともに，患者本人あるいは後見人から文書により許可を得ること．

9）記号は中心の明確な○●□■◇◆などを使用する．

10）記号を使用する場合の凡例は，脚注に置かずに図中に入れる．

7．表

1）罫線はできる限り入れない．

2）標準偏差は，（　）もしくは±とし，信頼区間との混同を避けるために説明を入れる．

3）表題が英文字の場合は書き出しのみを大文字にし，それ以後は小文字とする．しかし略号はこの限りでない．

4）単位などの表記は同一言語に統一する．単位（unit），平均（mean），標準偏差（SD）

（例）

Table 1　Mechanical properties of specimen

Specimen	Tensile strenght MPa	Elongation %
A	500(20)	10.2(3.3)
B	300(15)	5.4(2.3)

(　):SD

表１　試料の力学的性質

試料	引張強さ MPa	伸び %
A	500±20	10.2±3.3
B	300±15	5.4±2.3

平均±標準偏差

8．その他

本規定ならびに「投稿の手引き」に規程されていない事項については，編集委員会にお尋ね下さい．

会費納入のお願い

正会員，準会員，賛助会員で平成15年度会費の未納の方は，事務整理上至急ご納入下さるようお願いします。

払込みは北海道銀行当別支店（普通No. 128259）宛，または同封郵便振替用紙をご利用下さい。　（会計委員）

原稿募集について

次号（第23巻，第２号）の発行は平成16年12月31日です。
会員各位の投稿原稿募集の締切りは平成16年９月30日必着と致します。期日厳守の上，ご投稿を願い上げます。本誌投稿規定ご参照の上“提出原稿の書き方”を編集委員会にご請求下さい。　（編集委員会）

編　集　後　記

平成15年１月８日開催の理事会で東日本歯学会役員が一部変更され，私，和泉博之，と田隈泰信教授が編集担当と決まりました。私が編集委員長として平成16年６月発行（第23巻／第１号）から発行の東日本雑誌の編集に携わらせていただくことになりました。宜しくお願いします。

本号には原著論文９編と論床論文４編が収録されております。この数は近年の投稿数からみると非常に多く編集長としては大変有り難い事と思っております。若い研究者の先生方の投稿も多くこれからのご活躍を祈念しております。活字になった自分の最初の論文はやはり嬉しいものです。東日本雑誌の査読では基本的にあまり厳しいコメントは無いようですが，これをスタート台に自分の専門とする分野の最高峰の雑誌に投稿して自分の研究が世界のどの程度の位置で認められているのかをトライするのも良いことを思います。決して甘いものではないでしょう。何度もrejectという形で戻ってくるのが普通なのですが，それに負けないで頑張るしかないのです。人間というのは負け（失敗）からしか学べない動物のようです。運動でも仕事（勉強）でも間違った時，失敗した時からの経験が多くを学ばせているようです。その失敗の多さがその人の人間性を作っていくようです。決して負け，失敗を恐れずに挑戦していってください。北海道医療大学の若い（本人がまだ若いと思っている）研究者の皆様のこれからの研究の発展をお祈りしております。

次号平成16年12月発行予定（第23巻／第２号）の巻頭総説には私たちの研究室（口腔生理学教室）での研究を執筆したいと思っております。このようにして自分を鼓舞しながら東日本雑誌の編集に携わりたいと思っております。

歯科コンポジットレジン用接着材料

AQボンド プラス

極薄ボンディングがさらに進化

特長1
極薄ボンディング 3ミクロン

特長2
1ボトル 1ステップ 1回塗布

特長3
キセノン系・LED系 光照射器対応

特長4
ハロゲン系の照射時間は5秒間

歯科コンポジットレジン用接着材料
AQボンド プラス

医療用具承認番号 21500BZZ00138

ボンド……5.5mL
キャタスポンジ……175粒
キャタブラシ……10本
V型ダッペン……5個

■標準価格は2003年4月1日現在のものです。消費税は含まれておりません。

製造 サンメディカル株式会社
本　社／〒524-0044 滋賀県守山市古高町571-2　TEL 077-582-9980
東京オフィス／〒113-0034 東京都文京区湯島3-13-8　TEL 03-3835-9089
サンメディカル Home Page URL http://www.sunmedical.co.jp

発売 株式会社 ニッシン
本　社／〒601-8469 京都市南区唐橋平垣町8　TEL075-681-5719
東京営業所／〒110-0005 東京都台東区上野3-13-8　TEL03-3836-3691
ニッシン Home Page URL http://www.nissin-dental.co.jp

局麻の新しい世界
局麻の使い分け

NISHIKA

局所麻酔剤の選択が可能になりました。

処置時間・処置内容や患者さんの全身状態に応じた
局所麻酔剤の使い分けは世界の潮流です。

世界40ケ国で30年以上の使用実績。

塩酸メピバカイン製剤 歯科用局所麻酔剤 日本薬局方 塩酸メピバカイン注射液

スキャンドネスト® カートリッジ 3%

劇薬 指定医薬品 | 薬価基準収載 | 薬価 1.8mL 1管:97.00円 (貯法) 室温保存

スキャンドネスト® カートリッジ 3% の特徴は

▶▶短時間処置に適しています。

30分間はリドカイン製剤と同等の麻酔効果が得られ、その後のしびれは速やかに消失します。
治療後、患者さんのしびれの負担は少なくてすみ、また、小児や障害者の咬傷のリスクが軽減されます。

▶▶血管収縮薬のエピネフリンや添加物のパラベン・亜硫酸塩が一切配合されていない国内初の局所麻酔剤です。

エピネフリン配合剤が原則禁忌の高血圧、動脈硬化、心不全、甲状腺機能亢進、糖尿病のある患者さん
および血管攣縮の既往のある患者さんに使用可能です。(慎重投与)
また、パラベン・亜硫酸塩に対するアレルギーの患者さんにも使用可能です。

【禁忌】(次の患者には投与しないこと) 本剤またはアニリド系局所麻酔薬に対し過敏症の既往歴のある患者

※効能・効果、用法・用量、禁忌・原則禁忌を含む使用上の注意等は添付文書をご参照ください。

〔輸入発売元〕 NISHIKA 日本歯科薬品株式会社
本社 〒750-0015 下関市西入江町2-5 お客様窓口 0120-8020-96
[ホームページ] http://www.nishika.co.jp/

〔製造元〕 septodont セプトドント社
フランス

PROVINICE

SHOFU

実感していただきたい“操作性”“審美性”常温重合レジンの進化はプロビナイスからはじまる。

PROVINICE
SELF-CURING ACRYLIC RESIN

特長

優れた操作性
- 抜群の付形性
- 適切な操作時間

優れた審美性
- 色ムラ・気泡が少ない
- 混和法、筆積法での色調差が少ない

キレイな研磨面

耐久性の追求

医療用具承認番号　21400BZZ00451

歯科用常温重合レジン
プロビナイス

【包装】
粉　50g（粉量計付）
　　250g（粉量計付）
液　50mL（スポイト付）
　　250mL（スポイト付）

《色調》
A2、A3、A3.5、Inc、56（歯冠色）
U2、U3、8S（歯肉色）

記載の価格は2003年5月現在の標準医院価格（消費税抜き）です。

SHOFU
世界の歯科医療に貢献する
株式会社 松風
●本社：〒605-0983京都市東山区福稲上高松町11・TEL(075)561-1112㈹
http://www.shofu.co.jp
●支社：東京(03)3832-4366 ●営業所：札幌(011)232-1114/仙台(022)299-2332/名古屋(052)709-7688/大阪(06)6252-8141/福岡(092)472-7595

無針注射器
シリジェット

キーストン社 (U.S.A.)

シリジェットは

- 麻酔液を圧力により、ジェット噴流として粘膜下に到達させます。
- 疼痛・恐怖感を取り除くとともに、感染予防にも効果的です。

本体寸法 272㎜ ×19㎜

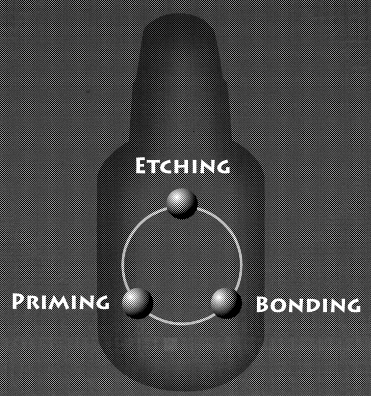
特　長

- 針が無いので**刺入時の疼痛・恐怖**を与えることなく、麻酔効果が得られます。
  特に疼痛に対して敏感な**小児・老人**に対してはぜひ本器の使用をお薦め致します。
- 麻酔液が霧状となって粘膜下に拡散される為、**即効的**に効果が現れます。
  針を用いた場合よりも、広範囲にわたってその効果を得ることができます。
- 国際規格の局所麻酔用カートリッジがそのまま使用できます。（1.0 mL・1.8 mL）
- 操作が極めて簡単で、注入量は 0.00 ～ 0.20 cc まで無段階に調節できます。
- 加圧式ですから麻酔液は決して逆流しません。
  注射針を使用しないので、感染の心配もありません。
- **SRP処置時**や、**レーザー治療**の前麻酔にも、非常に効果的だと大好評です。

MOKUDA DENTAL Co., Ltd.
KOBE,JAPAN TEL:(078)251-1243 FAX:(078)251-1479 http://www.mokuda.co.jp/

ONE&ONLY

1ボトル、1ステップ、しかも1回塗布。



光重合型1液性ボンディング材

ジーシー G-ボンド

今までになかったシンプル&スピーディで、
確実に接着する1液性ボンディング材「G-ボンド」。

「G-ボンド」は、エッチング・プライミング・ボンディングに必要な成分を1液に凝縮したボンディング材です。今までなかった本当のワンステップタイプで、1回塗布するだけの簡単操作を実現しています。

包装・希望医院価格

1箇:G-ボンド(5mL)1本、マイクロチップアプリケーター(レッド)50本、
チップホルダー1本、採取皿1個=**¥15,000**

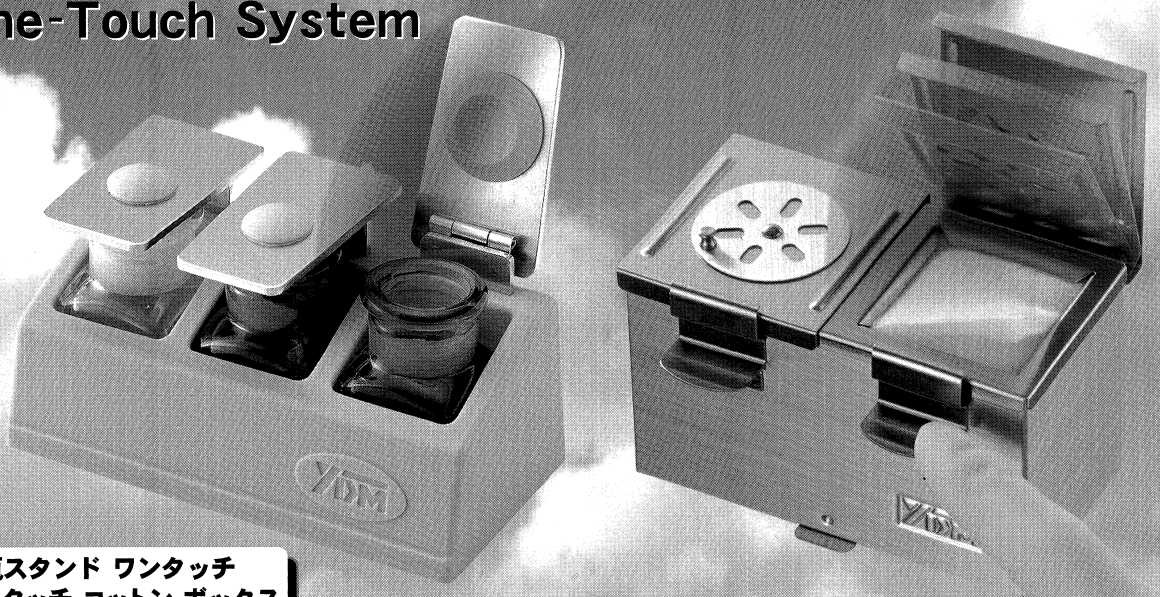
医療用具承認番号:21600BZZ00028000号

※掲載の価格は希望医院価格です(消費税は含まれておりません)。

株式会社 ジーシー

DIC(デンタルインフォメーションセンター)
東京都文京区本郷3-2-14 〒113-0033
フリーダイヤル 0120-416480
受付時間 9:00a.m.~5:00p.m.(土曜日、日曜日、祭日を除く)
※アフターサービスについては、最寄りの営業所へお願いします。
GC homepage URL
http://www.gcdental.co.jp/

診療効率アップ
ワンタッチシステム
One-Touch System

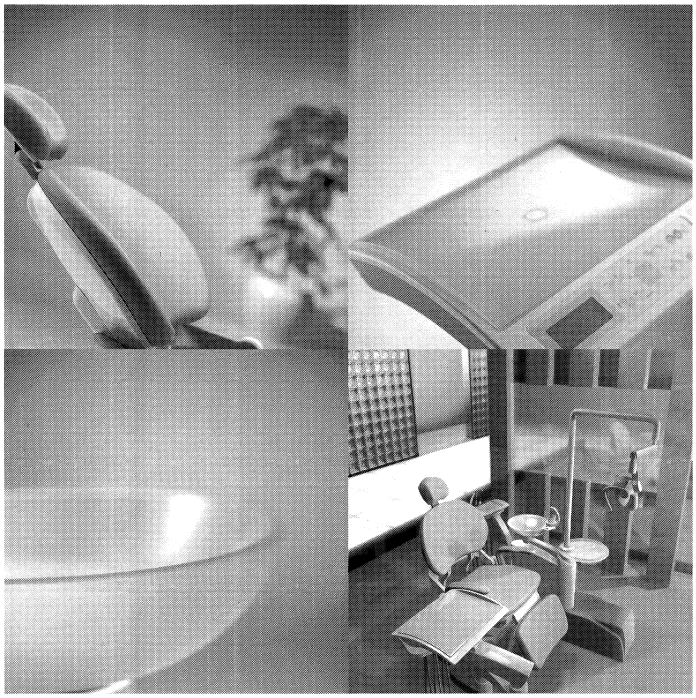


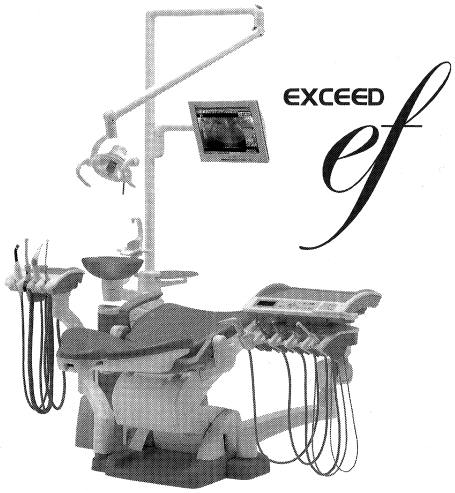
薬瓶スタンド ワンタッチ
ワンタッチ コットン ボックス
2連　3連
アルコール用S・L
綿球用

※詳しくは、資料をご請求下さい。

製造元 YAMAURA YDM 株式会社ワイディエム
本社 〒114-0014 東京都北区田端6丁目5番20号
TEL03-3828-3161 FAX03-3827-8991
URL http://www.ydm.co.jp/ E-mail ydm@ydm.co.jp

そうエクシードef（エフ）が創るのは、
いままで出逢ったことのないデンタルオフィス。





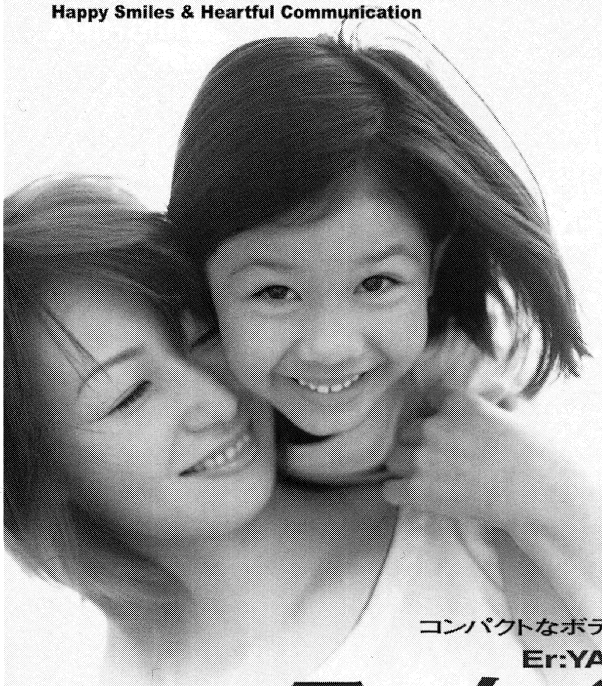
ニューコンセプト・デザインユニット
エクシード エフ

●標準価格：3,780,000円（I型）
●承認番号：21300BZZ00628

株式会社ヨシダ 〒110-8507 東京都台東区上野7-6-9 TEL.03-3845-2941（診療機器部直通）

Happy Smiles & Heartful Communication

MORITA



レーザー治療なら、
痛みの少ない治療ができるって
聞いたんですけど？

コンパクトなボディにぎっしり詰まった高機能
Er:YAGレーザー装置

アーウィン アドベール

11種類の多彩な「コンタクトチップ」と共にデビュー!!

● 主な使用目的と効能・効果 ●

硬組織疾患 効能・効果／蒸散
- う蝕除去
- くさび状欠損の表層除去

歯周疾患 効能・効果／蒸散・切開
- 歯周ポケットへの照射
- 歯石除去
- ポケット掻爬
- 歯肉整形
- フラップ手術

軟組織疾患 効能・効果／切開・止血・凝固・蒸散
- 小帯切除
- 歯肉切開・切除
- 口内炎の凝固層形成
- 色素沈着除去

11種類の多彩な
アーウィン アドベール
コンタクトチップ
（レザチップ）

●医療用具承認番号 21500BZZ00720 ●医療用具承認番号21500BZZ00721
※標準価格は2004年1月5日現在のものです。標準価格には消費税等は含まれておりません。
※仕様及び外観は製品改良のため予告なく変更することがありますのでご了承ください。

開発・製造 株式会社モリタ製作所

品質マネジメントシステム ISO9001 認証 JQA-0933
環境マネジメントシステム ISO14001 認証 JQA-EM0543

株式会社モリタ
東京本社 東京都台東区上野2-11-15 〒110-8513 TEL:03-3834-6161
大阪本社 大阪府吹田市垂水町3-33-18 〒564-8650 TEL:06-6380-2525

株式会社モリタ製作所
本社工場 京都市伏見区東浜南町680 〒612-8533 TEL:075-611-2141
久御山工場 京都府久世郡久御山町大字市田小字新珠城190 〒613-0022 TEL:0774-43-7594

株式会社モリタ東京製作所
本社工場 埼玉県さいたま市中央区上落合2-1-24 〒338-8538 TEL:048-852-1315
伊奈工場 埼玉県北足立郡伊奈町小室7129 〒362-0806

www.dental-plaza.com

編集委員会

委員長　和泉博之

越智守生・斎藤隆史・柴田考典・田隈泰信

東城庸介・溝口　到

（アイウエオ順）

東日本歯学雑誌　第23巻　第1号

平成16年6月30日

発行者　新家　昇

編集　東日本歯学会

〒061-0293 北海道石狩郡当別町字金沢1757番地
北海道医療大学内
電　話　0133－２３－１２１１(代)

印刷　山藤三陽印刷株式会社
札幌市西区宮の沢1条4丁目16番1号
電話　011(661)7163(代)

Vol.23 No.1 JUNE 2004

HIGASHI NIPPON DENTAL JOURNAL

HIGASHI NIPPON DENT.J.
Vol. 23, No. 1, pp. 1-152
JUNE 2004

Higashi Nippon Dental Society