

北海道医療大学歯学会雑誌

The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido

北 医 療 大 歯 誌
第24巻 第1号 平成17年6月
目 次

〔巻頭言〕

雑誌の名称変更にあたって
北海道医療大学歯学会会長 武田 正子

〔総 説〕

- 1 カルシウムシグナルと唾液分泌機能
東城 庸介……………(1)
- 13 A questionnaire study regarding local anesthesia in dentistry and
safety measures in dental clinics among dental students
Hanako OHKE, Masaru KUDO and Noboru SHINYA ……(13)
- 19 Evaluation of a practical skills education method
involving the determination of vital signs :
consciousness, pulse, respiration, body temperature, and blood pressure
Masaru KUDO, Hanako OHKE, Takuro KAWAI and Noboru SHINYA ……(19)
- 25 Development of a novel training model for dental infiltration anesthetic injections
Masaru KUDO and Noboru SHINYA ……(25)
- 31 成長期ラット顎関節円板におけるversican isoform mRNAの発現
—TaqMan probeを用いたreal - time quantitative PCRによる分析—
鳥谷奈保子, 荒川 俊哉, 田隈 泰信, 安彦 善裕, 溝口 到……………(31)
- 41 *Porphyromonas gingivalis*の自己融解酵素変異株の性状
鎌口 有秀, 宮川 博史, 中澤 太……………(41)
- 47 本学ヘリカルCT (ProSpeed F II) における空間分解能の評価
田中 力延, 細川洋一郎, 大西 隆, 佐野 友昭, 金子 昌幸……………(47)
- 51 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 感染による
ヒト単球細胞のアポトーシス発現について
杉村 典彦, 加藤 幸紀, 中島 啓介, 古市 保志……………(51)
- 61 超音波パワードプラ表示法による耳下腺領域の血流の検討
大西 隆, 田中 力延, 佐野 友昭, 細川洋一郎, 金子 昌幸……………(61)

北医療大歯誌

第24巻／第1号
pp. 1-128

平成17年6月

北海道医療大学歯学会

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

北海道医療大学歯学会役員

会	長	武 田 正 子
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	小 野 正 利・賀 来 亨	

Editorial Board

Editor-in-Chief : Hiroshi IZUMI

Members : Morio OCHI, Takashi SAITOU, Takanori SHIBATA,
Taishin TAKUMA, Yosuke TOJYO, Itaru MIZOGUCHI

The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido

President : Masako TAKEDA

Vice President : Toshihiko YAJIMA

Auditors : Masatoshi ONO, Tohru KAKU

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, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

Address of Editorial Board

Hiroshi IZUMI

Department of Oral Physiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido,
Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

E-mail: izumih@hoku-iryo-u.ac.jp

Phone: +81 133-23-1239; Fax: +81 133-23-1402

雑誌の名称変更にあたって

東日本歯学雑誌は、昭和57（1982）年12月に第1巻第1号が創刊され、以来23年間、年2回（6月と12月）定期的に発行されて来ました。この雑誌の目的は、歯学研究発展のために東日本歯学会会員の研究成果を国内、および国外へ広く発信することにより、さらにこのことによって会員の研究が前進することを目指して来ました。この間、雑誌には多数の原著、総説、臨床、教育に関する論文が掲載され、また、博士の学位論文発表の場ともなりました。近年の世界の歯科医学、生物学の進歩は目覚しく、本大学の歯学部の研究内容も世界の進歩に遅れることなく、日々変化してまいりました。

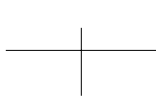
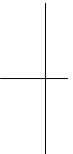
平成6（1994）年には、大学の名称が東日本学園大学から北海道医療大学に変更されましたが、法人名に東日本学園の名が残りましたので、東日本歯学会および東日本歯学雑誌の名称はそのままにしました。しかし、それから10年経過し、北海道医療大学の名も世間に広く周知されるようになりましたので、本年2月の総会で、北海道医療大学歯学会および北海道医療大学歯学雑誌に名称を変更することにいたしました。

会や雑誌の名称は変わっても、目指すところは変わりませんので、会員の皆様の今後のご協力、雑誌へのご投稿をよろしくお願い申し上げます。また、本学の廣重理事長・学長はじめ、多数の方々にご支援、ご協力いただいていることに深く感謝申し上げますとともに今後とも変わらず、ご支援下さいますようお願い申し上げます。

平成17（2005）年6月

北海道医療大学歯学会会長 武田正子





The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido
VOL.24, NO.1, DECEMBER, 2005
CONTENTS

REVIEW

- 1 **Calcium signaling and salivary secretory function**
Yosuke Tojyo (1)

ORIGINAL REPORTS

- 13 **A questionnaire study regarding local anesthesia in dentistry and safety measures in dental clinics among dental students**
Hanako OHKE, Masaru KUDO and Noboru SHINYA (13)
- 19 **Evaluation of a practical skills education method involving the determination of vital signs : consciousness,pulse,respiration, body temperature,and blood pressure**
Masaru KUDO, Hanako OHKE, Takuro KAWAI and Noboru SHINYA (19)
- 25 **Development of a novel training model for dental infiltration anesthetic injections**
Masaru KUDO and Noboru SHINYA (25)
- 31 **mRNA expression for versican isoforms in temporomandibular joint discs of growing rats**
-Analysis using real-time quantitative PCR with the TaqMan probe-
Naoko TORIYA, Toshiya ARAKAWA, Taishin TAKUMA, Yshihiro ABIKO and Itaru MIZOGUCHI. (31)
- 41 **Characterization of an autolysin mutant of *Porphoromonas gingivalis***
Arihide Kamaguchi, Hiroshi Miyakawa and Futoshi Nakazawa (41)
- 47 **Evaluation of the spatial resolution in helical CT (ProSpeed F II)**
Likinobu TANAKA, Yoichiro HOSOKAWA, Takashi OHNISHI, Tomoaki SANO and Masayuki KANEKO (47)
- 51 ***Actinobacillus actinomycesetemcomitans* induces apoptosis in human monocytic cells**
Norihiro SUGIMURA, Satsuki KATO, Keisuke NAKASHIMA and Yasushi FURUICHI (51)
- 61 **Evaluation of blood flows in the parotid gland by Power Doppler imaging**
Takashi OHNISHI, Likinobu TANAKA, Tomoaki SANO, Youichiro HOSOKAWA and Masayuki KANEKO. (61)

65 Basic study on the reproducibility of articular surfaces of mandibular condyles on transcranial and panoramic projections

Yoichiro HOSOKAWA, Takashi OHNISHI, Tomoaki SANO, Likinobu TANAKA,
Masayuki KANEKO, Kazuhiko OKUMURA and Takanori SHIBATA. (65)

[CLINICAL report]

71 A study on nasotracheal intubation to prevent injury to the nasopharyngeal mucous membrane

—Comparison of the bougie method and the gastric tube guide method—

Masaru KUDO and Noboru SHINYA (71)

77 Application of low-frequency electricity and stellate ganglion block therapy to inferior alveolar neuroparalysis following tooth extraction

—Evaluation of facial skin temperature elevations via thermography—

Takuro KAWAI, Masaru KUDO, Tomochika YANAGI and Noboru SHINYA (77)

[CLINICAL report]

83 The induction of sedation or general anesthesia in accompanied out patients with companion and the cooperation of the guardians at the Clinical Department of Dental Anesthesia

—To promote relief and feelings of satisfaction in dental treatment under sedation and general anesthesia so that disabled patients for dental treatment can adapt to the treatment—

Masaru KUDO, Hanako OHKE, Takuro KAWAI, Masahiro KOKUBU and Noboru SHINYA. (83)

91 Custom made tray for an early stage load implant :

A Clinical Report

Hiroya KUNIYASU, Atsushi NIIDA, Satomine KONDO, Mitsugi KAKIZAKI,
Yukito HIROSE, Morio OCHI, Hirohiko TAIRA, Masaru MURATA,
Hiroyuki KITAJO, Kaoru KUSANO, Masaru KUDOU, Hanako OHKE,
Yoichiro HOSOKAWA and Likinobu TANAKA (91)

[Systematic review]

99 Systematic review of polymorphisms related to osteoarthritis

Kaoru KANAZAWA and Takanori SHIBATA (99)

〔総説〕

カルシウムシグナルと唾液分泌機能

東城 庸介

北海道医療大学歯学部歯科薬理学講座

Calcium signaling and salivary secretory function

Yosuke Tojyo

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

Abstract

Calcium ion (Ca^{2+}) plays an essential role as a second messenger in secretion of water and electrolytes in salivary glands. Many studies using fluorescent Ca^{2+} indicators such as quin-2 and fura-2 have shown that stimulation of muscarinic, α -adrenergic, or substance P receptors cause a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in salivary gland cells resulting from the production of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP_3). The $[\text{Ca}^{2+}]_i$ response is attributed to Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} store followed by Ca^{2+} entry across the plasma membrane. The increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is initiated in the apical pole of acinar cells and then rapidly spreads as a Ca^{2+} wave toward the basolateral region. The apical-to-basal pattern of Ca^{2+} signaling is probably important to activate the ion transport systems in salivary glands. In this review, I discuss mechanisms and physiological significance of the polarized Ca^{2+} signaling in salivary gland cells.

キーワード：カルシウムシグナル，唾液腺，唾液分泌，カルシウム蛍光指示薬，イメージング

1. はじめに

体重60kgの人が体内に保持するカルシウム量は約1 kgである。その約99.5%がヒドロキシアパタイトとして骨や歯に存在しており，血液や軟組織に含まれるカルシウム量はわずか0.5%に過ぎない。硬組織以外のカルシウムは量的には取るに足りないものであるが，その一部は細胞内外の体液中にイオン化した形 (Ca^{2+}) で存在し，細胞機能を調節するセカンドメッセンジャーとして重要な役割を果たしている。

Ca^{2+} と細胞機能との関わりを初めて記載したのはリンゲル液で有名な英国の生理学者，Sydney Ringer (1835-1910) であろう。Ringerは，カエル摘出心臓を使って収縮実験をしていた時 Ca^{2+} を含まない栄養液中では心臓収縮が止まってしまうことに気づき，心臓収縮に Ca^{2+} がなくてはならないイオンであることを発見した (Ringer, 1883)。Ringerの報告は細胞機能と Ca^{2+} を結びつ

けた最初の発見と考えられているが，この時代は Ca^{2+} がなぜ筋収縮に必要なのかわからず，その後，細胞機能と Ca^{2+} との関係に注目する研究者はほとんどいなかったようである。 Ca^{2+} が筋収縮のセカンドメッセンジャーであることを確立したのは我が国の江橋節郎教授（当時東京大学医学部薬理）である。江橋教授が提唱した「筋収縮の Ca^{2+} 説」(1960年代)は，その後一大ブームとなる Ca^{2+} シグナル研究の先駆けになったと言えよう。

現在， Ca^{2+} は，筋収縮ばかりでなく，ホルモン分泌，神経伝達物質の放出，細胞運動，細胞分裂，代謝，遺伝子発現，受精など多岐にわたる機能を制御する最も基本的なメッセンジャーであると考えられている。唾液腺における分泌反応も Ca^{2+} によって制御されることはよく知られている。特に，水・イオン分泌では Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして必須の役割を果たしている。本稿では，細胞内 Ca^{2+} シグナルの概要を説明すると共に，唾

受付：平成17年3月31日

液腺細胞を使った私たちの研究の一端を紹介する。

2. Ca^{2+} シグナルとは

Ca^{2+} 濃度には細胞の内外で大きな差がある。細胞外の体液中には1～2 mMの Ca^{2+} が存在するのに対し、細胞内（細胞質）の Ca^{2+} 濃度は100 nM以下で、実に細胞外の1万分の1以下である。これは細胞膜に存在する Ca^{2+} ポンプによって Ca^{2+} が常に細胞外にくみ出されていること、また、細胞内には Ca^{2+} を取り込んで貯蔵する Ca^{2+} 貯蔵部位が存在することによる。細胞内にある Ca^{2+} 貯蔵庫の実体は小胞体（筋肉組織では筋小胞体）であることが多くの研究によって明らかにされており、おそらく小胞体内腔には細胞外液に近い濃度の Ca^{2+} が貯蔵されていると思われる。細胞内 Ca^{2+} 貯蔵庫は Ca^{2+} ストア（store）あるいは Ca^{2+} プール（pool）と呼ばれ、細胞が刺激を受けるとストアからの Ca^{2+} 放出、さらには細胞外からの Ca^{2+} 流入が起きて、細胞質の Ca^{2+} 濃度は非刺激時の数倍から数十倍に上昇する。この様にして動員された Ca^{2+} がセカンドメッセンジャーとして様々な細胞機能を活性化することから、この一連の反応をカルシウムシグナルという（図1）。

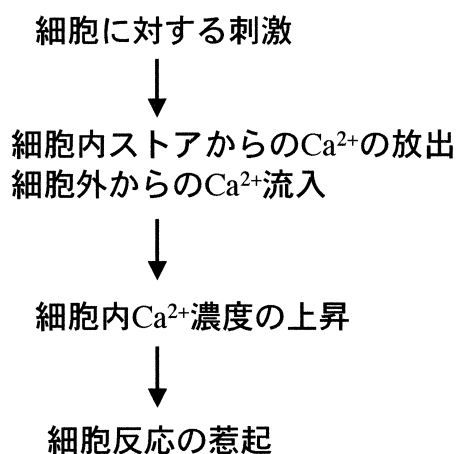


図1 細胞反応と Ca^{2+}

Ca^{2+} 動員のメカニズムについては1970年以降世界的に研究が進められてきた。神経や筋肉などの活動電位を発生する細胞（興奮性細胞）では膜の脱分極が引き金になって、小胞体あるいは筋小胞体から Ca^{2+} が放出される。また細胞膜に存在する電位依存性 Ca^{2+} チャネルが開き、細胞外からの Ca^{2+} 流入が引き起こされる。しかし、外分泌腺細胞や肝細胞などの非興奮性細胞における Ca^{2+} 動員のメカニズムについては1980年代までよくわからなかった。1975年、英国のR. H. Michellは、受容体を刺激するとホスホリパーゼCという酵素の働きによって細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質の代謝亢進

が起き、その結果 Ca^{2+} が動員されるという仮説を提唱した（Michell, 1975）。この説には反対する研究者も多く、 Ca^{2+} 動員が先かイノシトールリン脂質代謝が先かといった論争が長く続いたが、1983年、同じ英国の生物学者M. J. Berridgeが、イノシトールリン脂質の分解産物であるイノシトール1, 4, 5-三リン酸（ IP_3 ）が細胞内 Ca^{2+} ストアからの Ca^{2+} 放出を引き起こすことをラットの膵臓腺房細胞を使った研究で見事に証明し（Streb et al., 1983; Berridge and Irvine, 1984）、この論争に終止符が打たれた。現在、イノシトールリン脂質代謝を介する Ca^{2+} 動員のメカニズムはほぼ明らかになっている。すなわち、アゴニストが細胞膜受容体に作用すると、GTP結合タンパク質の一種であるGqタンパク質を介してホスホリパーゼCが活性化し、その結果、イノシトールリン脂質の代謝亢進が起き、ホスファチジルイノシトール4, 5-二リン酸（ PIP_2 ）の加水分解によって生成された IP_3 が小胞体に作用して Ca^{2+} 動員を引き起こす（図2）。唾液腺細胞でもこのシグナル伝達が分泌機能を制御する中心的な役割を果たしていることは広く認められている。

小胞体（ Ca^{2+} ストア）の膜には IP_3 が結合するイオンチャネル型受容体が存在する。 IP_3 が受容体に結合するとチャネルが開き、 Ca^{2+} が小胞体内腔から細胞質へ遊離される。ちなみに IP_3 受容体を発見し、クローニングしたのは現在東京大学医科学研究所におられる御子柴克彦教授である。現在 IP_3 受容体の機能解析や構造解析が活発に行われているが、この分野でも日本人研究者の功績は大きい。 IP_3 受容体の分子構造や調節機構については御子柴教授の最近の総説を参照してほしい（御子柴, 2003）。

3. 細胞内 Ca^{2+} 測定の革命

細胞内（細胞質）の Ca^{2+} 濃度が極めて低い（100 nM以下）ことは既に述べた。読者の中にはnMオーダーの極微量の Ca^{2+} 濃度をいったいどの様にして測定するのだろうかという疑問に思う方もいるに違いない。確かに1980年頃までは細胞内 Ca^{2+} 濃度（ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ）を正確に測定することはかなり難しい作業であった。 Ca^{2+} イオン電極やエクオリンという発光タンパク質を使う方法があったが、電極の細胞内挿入や発光タンパク質の細胞内注入にはかなり高度な技術が必要であり、誰でもすぐにできるというものではない。また、全ての細胞に応用できるものでもない。ところが1980年代、Roger Y. Tsienというアメリカの若い研究者（当時大学院生）が $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の正確な測定を可能にする画期的な試薬を開発し（Tsien, 1980 ;

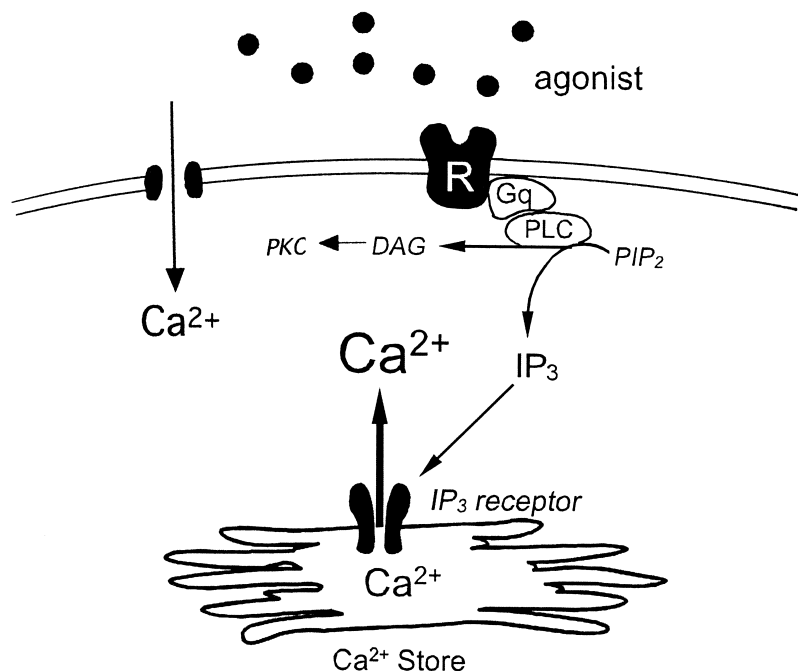


図2 イノシトールリン脂質代謝を介する Ca^{2+} 動員. R, 受容体; Gq, GTP結合タンパク質; PLC, ホスホオリパーゼC; PIP_2 , ホスファチジルイノシトール 4, 5-三リン酸; IP_3 , イノシトール 1, 4, 5-三リン酸; DAG, ジアシルグリセロール; PKC, プロテインキナーゼC

Grynkiewicz et al., 1985), Ca^{2+} シグナル研究の新時代が始まった。すなわち, Ca^{2+} 蛍光指示薬quin-2, fura-2の出現である(図3)。quin-2は1980年, fura-2は1985年に発表され, あっという間に世界中の細胞シグナルの研究者に受け入れられた。この試薬を使えばだれでも $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を容易に測定することができる。研究経験の全くない学生でも1週間, いや2, 3日練習すれば測定することが可能であろう。それほど簡単である。

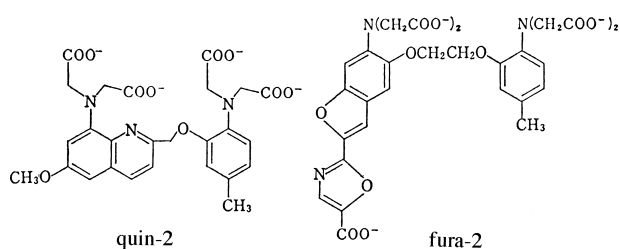


図3 R. Y. Tsienによって開発された Ca^{2+} 蛍光指示薬の構造

Ca^{2+} 蛍光指示薬は Ca^{2+} キレート剤に蛍光発色団を組み込んだ水溶性化合物で, 細胞膜を透過しない。Tsienはこの化合物にアセトキシメチル (AM) 基を付加し, 脂溶性にした。AM基を付けた蛍光指示薬は容易に細胞膜を通過し, 細胞内のエステラーゼで加水分解を受け, freeのquin-2やfura-2になり, 細胞内に貯留する(図4)。その細胞に励起光を照射すると細胞は蛍光を発する。これらの Ca^{2+} 蛍光指示薬はnMオーダーの Ca^{2+} の変化を感知して蛍光強度を変化させるので, その変化を蛍

光光度計で測定することにより $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を算定することができる。

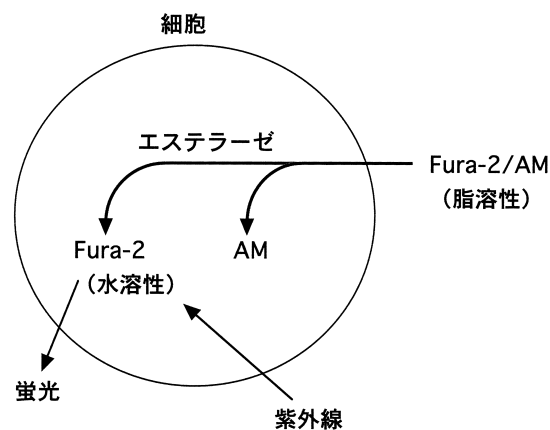


図4 fura-2/AMは細胞内に取り込まれた後, 細胞内エステラーゼによってfura-2になり, 細胞内に貯留する。fura-2を紫外線で励起し, 発生する蛍光の強度をモニターする。

最初に開発されたquin-2の場合, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定のために高濃度(～1.0mM)を細胞内に入れる必要があり, また Ca^{2+} 結合能が強過ぎるため細胞機能に影響する等の欠点もあり, 現在はほとんど使用されなくなった。一方, fura-2はquin-2より30倍以上蛍光強度が強く, 低濃度の取り込みで十分な蛍光が得られることから今でも Ca^{2+} 蛍光指示薬として最も頻用されている。

quin-2やfura-2の出現から20年が過ぎ, これらの試薬以外にも様々な特性を持った Ca^{2+} 蛍光指示薬が開発さ

れ、それぞれの実験目的や測定機器に合わせて使用されている。例えば、mag-fura-2は Ca^{2+} 感受性が低いので、細胞内オルガネラ内の高濃度 Ca^{2+} を測定するのに適している。また、calcium green C_{18} などの膜結合性 Ca^{2+} 蛍光指示薬は、細胞内オルガネラ近傍の Ca^{2+} 変化を測定するために使われている。これまでに開発された Ca^{2+} 蛍光指示薬は優に30種類は下るまい。quin-2を発表した当時まだ20代であったTsien（現在カリフォルニア大学サンジエゴ校教授）はその後画期的な可視化蛍光プローブを次々に開発し、常にバイオイメージング研究の先頭を走っている。昨年も第9回慶応医学賞を受賞、2000万円の賞金を受けたとの新聞記事を読んだ。生命現象をリアルタイムで可視化することを可能にしたTsienの功績は極めて大きく、ひょっとするとノーベル賞受賞も近いかも知れない。

4. 唾液腺細胞における細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) の測定

ところで蛍光指示薬を用いて唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を初めて測定したのは誰であろうか。1980年頃、唾液腺細胞を非興奮性細胞のモデル細胞として用いる研究者が多かったため、すでに複数のグループが唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を試みていたようである。その中で、論文として初めて発表した研究者はおそらく札幌医科大学薬理の竹村晴夫博士であろう。竹村博士は、カルバコール（ムスカリン受容体アゴニスト）によって引き起こされ

るラット耳下腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応をquin-2を使って初めて定量的に示した（Takemura, 1985）。この論文は、それまで ^{45}Ca の流入・流出実験から推測するに過ぎなかった Ca^{2+} の動きを直接的な実験的証拠として示したものであり、唾液腺分泌の研究者から高い評価を受けた。竹村論文に続き、 Ca^{2+} 蛍光指示薬を用いた Ca^{2+} 動態の研究が次々に発表され（Merritt and Rink, 1987a; 1987b; Aub and Putney, 1987; Gray, 1988）、唾液腺細胞における Ca^{2+} シグナルの仕組みが徐々に明らかにされてきた。

私たちの研究室では1988年に日立の分光蛍光光度計（F-2000）を購入し、唾液腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を開始した。F-2000蛍光光度計は蛍光強度を自動的に $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (nM) に変換する機能を内蔵しているなど、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を目的に開発された大変使いやすい機種である。ここでラット耳下腺の懸濁細胞（suspension）を用いた $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定の手順（図5）と実験結果の一例を紹介する。

ラット耳下腺を眼科用鉗でミンスし、トリプシン、さらにコラゲナーゼを含むハanks緩衝液でインキュベートする。トリプシン処理の後、必ずトリプシンインヒビターで短時間処理してトリプシン活性を止める必要がある。これが不十分だと細胞のダメージが大きく、きれいな結果が期待できない。最後に組織をナイロンメッシュ（女性用ストッキングで充分）で濾過し、濾液中の細胞を遠心で集め、ハanks液で2、3回細胞を洗って、6～10 mlの細胞懸濁液を調製する。こうして得た細胞の

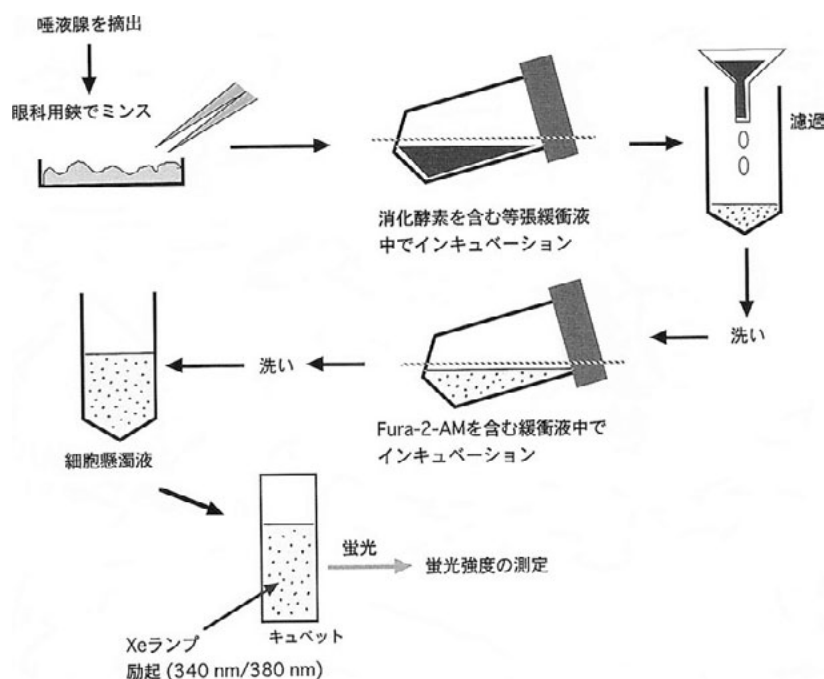


図5 唾液腺の懸濁細胞の調製とfura-2による細胞内 Ca^{2+} 濃度の測定

大部分は単一細胞あるいは数個の細胞から成る腺房である。トリプシン処理をせずにコラゲナーゼ処理のみで調製した細胞はぶどうの房状の細胞塊として得られ、分泌実験には適しているが、 Ca^{2+} 測定に使うとノイズが大きく、きれいなデータは得られない。調製した細胞を $2\ \mu\text{M}$ fura-2/AM を含む緩衝液中で30分から1時間インキュベートし、fura-2を細胞内に取り込ませる。fura-2を含まない緩衝液で細胞を洗い、細胞外のfura-2/AMを除いた後、細胞懸濁液を石英セルに移し、スターラーで細胞を攪拌しながら蛍光強度を計測する。fura-2を取り込んだ細胞に340 nmの励起光をあてると Ca^{2+} 濃度の上昇により細胞が発する蛍光強度が上昇する。一方、380 nmの励起光をあてると蛍光強度は Ca^{2+} 濃度の上昇により低下する。この性質を利用し、340 nmと380 nmの励起光を0.5秒間隔で交互に照射し、蛍光強度の比（340 nm/380 nm）から $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を算出する。

図6はラット耳下腺腺房細胞のムスカリン受容体をカルバコールで刺激した時の蛍光強度の変化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化である。340 nmの励起光による蛍光強度は上昇し、380 nmの励起光による蛍光強度は低下する。この値を Grynkiewicz et al. (1985) の式に入れて計算すると $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の経時変化に変換することができる。図7に示すように、カルバコールによる $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は刺激直後に見られる大きなピークとその後の持続的上昇の2相性からなる。アトロピン（ムスカリン受容体アンタゴニスト）を前もって添加すると完全に抑制されることから、この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応がムスカリン受容体の活性化によることがわかる。刺激直後に見られる大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出反応である。これは細胞外液の Ca^{2+} を除いてもほぼ同様の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が惹起されることから理解できる。細胞外からの Ca^{2+} 流入はストアからの Ca^{2+} 放出よりやや遅れて始まると考えられている。アゴニスト刺激が続く限り、細胞外からの Ca^{2+} 流入と細胞内ストアからの Ca^{2+} 放出が続き、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ は静止時より高いレベルが維持される。

ラット耳下腺細胞にはムスカリン受容体の他に、 α_1 -アドレナリン受容体やサブスタンスP受容体などのイノシトールリン脂質代謝を亢進させる受容体が存在する。これらの受容体を刺激した時も大きな $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇反応が引き起こされることが知られている。一方、 β -アドレナリン受容体は耳下腺アミラーゼの開口分泌において中心的な役割を果たしている受容体であるが、この受容体の活性化が Ca^{2+} 動員を起こすか否かについては今まで様々な議論が行われてきた。1990年頃までは β -受容体を介するアミラーゼ開口分泌の最終的な細胞内メッセン

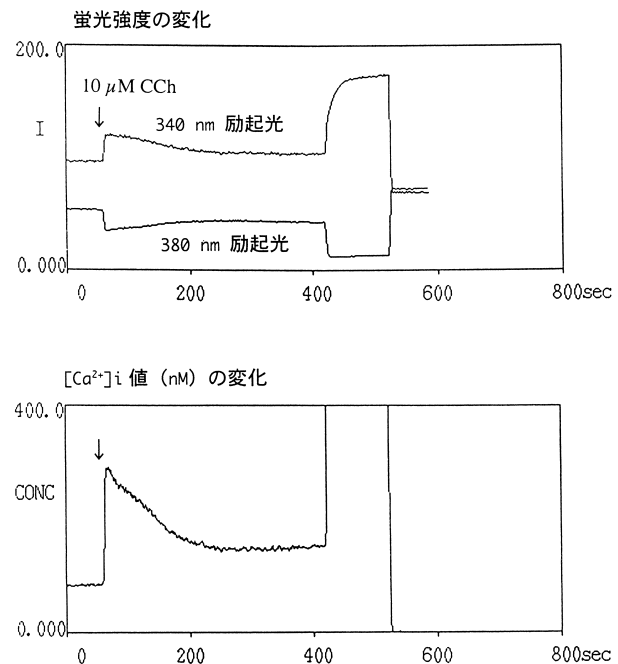


図6 fura-2を取り込ませたラット耳下腺細胞の蛍光強度の変化と $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇。矢印で10 μM カルバコール (CCh) を添加した。

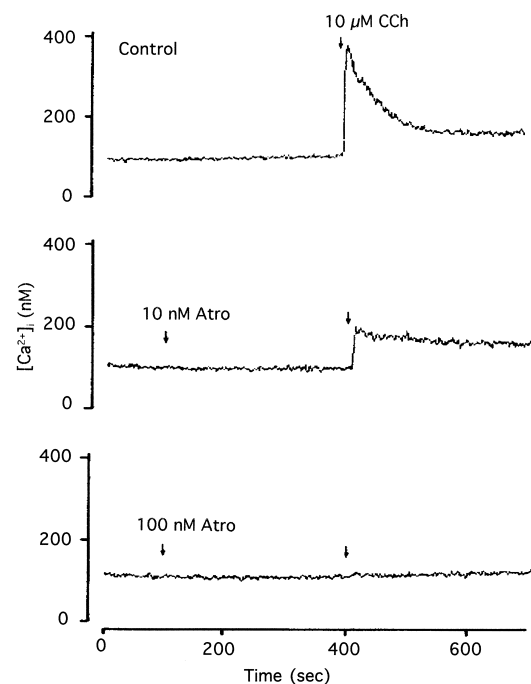


図7 ラット耳下腺細胞におけるカルバコール (CCh) 刺激による $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇とアトロピン (Atro) による抑制。

ジャーは Ca^{2+} であると考えた研究者が多かった (Putney, 1977; Butcher and Putney, 1980)。しかし、アミラーゼ分泌の最大反応を引き起こす1 μM イソプロテレノール (β -受容体アゴニスト) は耳下腺細胞の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させない (Hughes et al., 1989; Tanimura et al., 1990; Tojyo et al., 1998)。以前、アメリカNIHのグループが、ラット耳下腺細胞を比較的高濃度 ($\sim 100\ \mu\text{M}$) のイソプロテ

レノールで刺激するとイノシトール代謝の亢進と $[Ca^{2+}]_i$ の上昇を起こすことを報告したが (Horn et al., 1988), その後この反応はイソプロテレノールの極弱い α -作用によることが明らかになった (Hughes et al., 1989; Tanimura et al., 1990). 現在では β -受容体を介する Ca^{2+} 動員については否定的な研究者が多い. ただし, ラット顎下腺の導管細胞は例外で, β -受容体の活性化によって弱い $[Ca^{2+}]_i$ 上昇反応が起きることが明らかになっている (Dehaye et al., 1993). 私たちもこの現象を確認しているが (Nezu et al., 2000; 2005), その生理的意義についてはまったくわかっていない. β -受容体-cyclic AMP系を介する耳下腺アミラーゼの分泌機構については他に総説 (田隈, 1991; 東城, 田隈, 1995) があるので参照してほしい.

5. 唾液腺細胞における Ca^{2+} 流入機構 (容量性 Ca^{2+} 流入)

細胞内 Ca^{2+} ストアから Ca^{2+} が放出されるとやや遅れて細胞外からの Ca^{2+} 流入が起きることは既に述べた. ところで Ca^{2+} 放出が起きるとなぜ Ca^{2+} 流入が引き起こされるのだろうか. 興奮性細胞の場合は電位依存性 Ca^{2+} チャネルを通して Ca^{2+} が流入することはよく知られているが, 唾液腺細胞などの非興奮性細胞には電位依存性 Ca^{2+} チャネルがないので, Ca^{2+} がどのようなメカニズムで流入するのかは Ca^{2+} シグナルの研究者にとって興味深い研究対象であった. 20年ほど前, アメリカの NIEHS (国立環境衛生研究所) にいる J. W. Putney, Jr は, 非興奮性細胞の Ca^{2+} 流入機構の説明として「容量性 Ca^{2+} 流入」(Capacitative Ca^{2+} entry) と呼ばれ仮説モデルを提唱した (Putney, 1986; 1990). この仮説によると, 非興奮性細胞の Ca^{2+} 流入は細胞内 Ca^{2+} ストアの枯渇の程度に依存して活性化され, イノシトールリン脂質代謝や IP_3 産生と直接的には関係がないという. 当初このモデルは「実験的根拠に乏しい馬鹿げた理論だ」などとかなり辛辣な批判を受けたようであるが, 今日では非興奮性細胞における最も有力な Ca^{2+} 流入モデルとして多くの研究者に受け入れられている. 私は口腔生化学の田隈教授, 残念にも先年亡くなられた北里大学解剖学の故瀬川彰久博士と Putney の研究室を訪問したことがある (図 8). 当時, Putney は「容量性 Ca^{2+} 流入」モデルを発表したばかりの少壮の研究者であったが, その後このモデルが世界的に注目を集め, Putney 自身が Ca^{2+} シグナル研究の分野で今日のように大きな影響力を持つようになるとはとても予想できなかった.

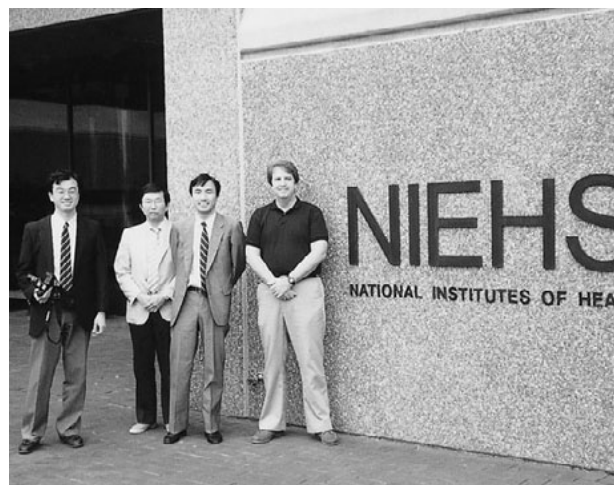


図 8 1988年にPutneyの研究室を訪問した時. 右端からPutney博士, 北里大学の瀬川彰久博士, 筆者, 口腔生化学の田隈泰信教授.

実は「容量性 Ca^{2+} 流入」モデルの誕生には唾液腺細胞を使った Ca^{2+} シグナルの研究が多大な貢献をしている. このモデルの生みの親である Putney は, 元々唾液腺の水・イオン分泌機構の研究者であったが, この仮説を提唱した頃は, 耳下腺細胞における $[Ca^{2+}]_i$ 動態やイノシトールリン脂質代謝を精力的に研究していた. 「容量性 Ca^{2+} 流入」モデルは耳下腺細胞を使った彼の一連の研究成果に基づいて提唱されたものであり, 唾液腺の研究が基本的な細胞機構の解明に結びついた代表的な例と言える. 私たちも以前, ラット耳下腺細胞の Ca^{2+} 流入がリン酸化酵素阻害薬や脱リン酸化酵素阻害薬によって増強したり低下したりすることを報告した (Tojyo et al., 1995a; 1995b). 私たちの実験結果は, 「容量性 Ca^{2+} 流入」がタンパク質のリン酸化や脱リン酸化によって調節されていることを示唆しているが, 残念ながらそれ以上に研究を進展させることはできなかった. 1990年代, transient receptor potential (TRP) と名付けられたイオンチャネル遺伝子が同定され, これが「容量性 Ca^{2+} 流入」に関与するイオンチャネルの正体ではないかといわれているが (Zhu et al., 1996), 未だ十分な確証はない. 「容量性 Ca^{2+} 流入」の分子機構の全貌が解明されるにはまだ時間がかかりそうである.

6. 唾液腺細胞の Ca^{2+} イメージング

細胞懸濁液を使った Ca^{2+} 測定実験では細胞集団の平均的な $[Ca^{2+}]_i$ 変化を知ることはできるが, 一個の細胞の, ましてや細胞内の特定部域の Ca^{2+} の動きをとらえることは不可能である. 近年は光学機器や画像解析技術が著しく進歩し, 一個の細胞の微弱な蛍光を画像として可視化することが可能になった. 人間の欲望とは果てしないもので, 私たちは細胞懸濁液による実験だけでは満足できず, ぜひ個々の唾液腺細胞の Ca^{2+} 動態を見てみたい

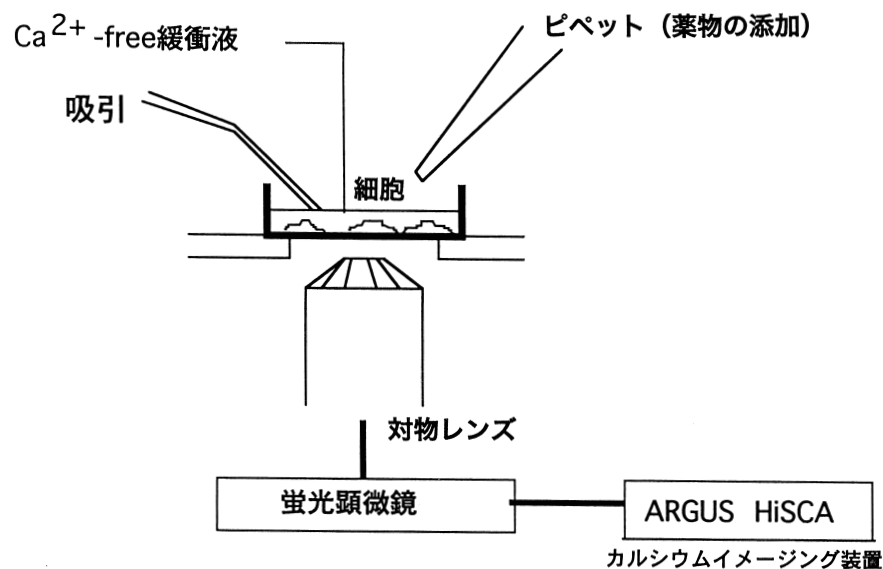


図9 カルシウムイメージングの実験システム。

と思うようになった。幸運にも1996年に浜松ホトニクス社の Ca^{2+} イメージングシステム (ARGUS HiSCA) を私たちの研究室に設置することができ、イメージング実験を本格的に開始した。

fura-2を取り込ませたラット耳下腺の細胞懸濁液を直径1 cm程の測定用チャンバーに注入し、しばらく放置するか軽く遠心して細胞をチャンバー底部のカバーガラスに固着させる。チャンバーのカバーガラスを前もってCell-Takでコートしておくで細胞が固着しやすい。チャンバーを倒立蛍光顕微鏡のステージに固定し、細胞に340nmと380nmの励起光を照射し、細胞から発する蛍光を高速冷却CCDカメラで取り込み、その情報をコンピュータ処理により画像化する (図9)。

唾液腺の腺房細胞は形態的に極性を持つ典型的な細胞である。すなわち、腺腔側には多数の分泌顆粒が密集しているのに対し、核や小胞体は基底側に偏っている。それゆえ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇、すなわちストアからの Ca^{2+} 放出反応が細胞のどの部域で始まり、どのように広がるかは大変興味ある問題であった。小胞体は主に基底側に分布していることから当初 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇は基底側領域で始まるだろうと考えられていたが、実際に腺房細胞をカルバコールで刺激すると、その反応は腺腔膜の近傍で始まり、1～2秒で細胞全体に広がることがわかった (図10A) (Tojyo et al., 1997)。これは Ca^{2+} ウエーブと呼ばれる現象で、膵臓腺房細胞や涙腺細胞でも見られる。私たちは、 Ca^{2+} ウエーブの発生は IP_3 受容体の細胞内分布に極性があるためではないかと考え、細胞内ストアを IP_3 で直接刺激して Ca^{2+} ウエーブが惹起されるかどうか調べた。 IP_3 は水溶性物質なので細胞膜を通らない。そこで、サ

ポニン (植物に含まれる界面活性剤) で細胞膜に小さな穴を開け、膜結合性 Ca^{2+} 蛍光試薬calcium green C_{18} で細胞内ストアの膜をラベルした後、ケージド IP_3 (不活性基と結合した IP_3) の光分解によって IP_3 を瞬時に遊離させた。その結果、 IP_3 がカルバコール刺激の時と同様の腺腔側から始まる Ca^{2+} ウエーブを引き起こすことがわかった (図10B) (Tanimura et al., 1998)。この結果は、 IP_3 に対する感受性が細胞内の部位によって異なること、 IP_3 に特に感受性の高い Ca^{2+} ストアが腺腔側に存在することを示している。免疫組織学的研究でも IP_3 受容体の分布が腺腔側に偏っていることが示されており、 Ca^{2+} イメージングの実験結果と良く符合する (Nezu et al., 2002)。

腺腔側に局在する高感受性 Ca^{2+} ストアの正体は何か。分泌顆粒は腺腔側に密に分布し、分泌顆粒には高濃度の Ca^{2+} が含まれていることから、以前、膵臓腺房細胞の分泌顆粒が Ca^{2+} ストアとして Ca^{2+} シグナルの発生に重要であるとする説が提唱され (Gerasimenko et al., 1996)、かなり注目された。しかし、前もって分泌顆粒を放出させておいた耳下腺細胞と顆粒を含む耳下腺細胞では Ca^{2+} ウエーブのパターンに全く差がないこと、ウエスタン・ブロットでは分泌顆粒膜に IP_3 受容体が検出されないことなどから、私たちは分泌顆粒が Ca^{2+} ストアであるという仮説には懐疑的である (Nezu et al., 2002)。顎下腺導管細胞の腺腔側には小胞体から独立した小さなvesicleが局在し、それが高感受性 Ca^{2+} ストアとして機能していると報告があるが (Yamamoto-Hino et al., 1998)、十分な確証はない。小胞体が主に基底側領域に分布しているにもかかわらず、 Ca^{2+} 動員は腺腔膜近傍で始まるという

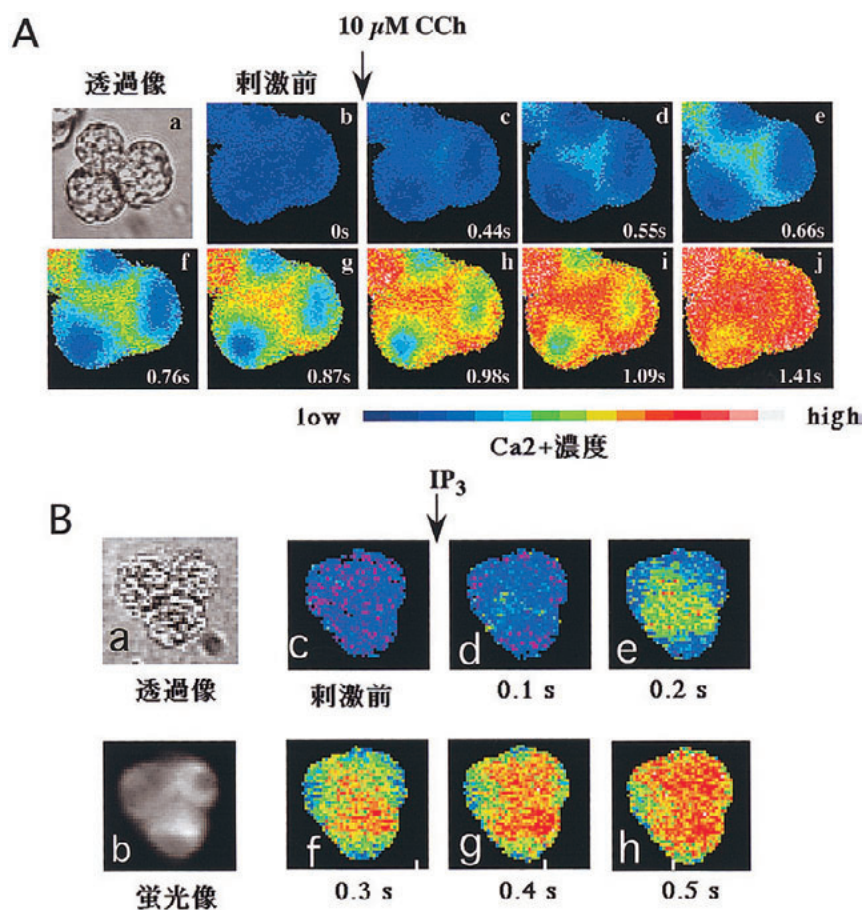


図10 ラット耳下腺房細胞におけるカルシウムウエーブ.

A: fura-2 を取り込ませた細胞を $10 \mu\text{M}$ カルバコール (CCh) で刺激し、イメージング装置 (ARGUS-HiSCA) で Ca^{2+} 反応をモニターした. (a), 透過像; (b) - (j), Ca^{2+} 反応の疑似カラー像.

B: サポニン処理した細胞を calcium green C_{18} でラベルし、ケージド IP_3 の光分解によって瞬時に IP_3 を遊離させた. (a), 透過像; (b), 蛍光像, (c) - (h), Ca^{2+} 放出反応の疑似カラー像.

現象は、今でも一つの謎である。しかし、近年、外分泌腺細胞の小胞体はトンネルのように一つに繋がっており、その先端が腺腔膜近傍に分布しているとする「小胞体トンネル説」が提唱された (図11) (Petersen et al., 2001)。この仮説では、 IP_3 受容体の密な部分が小胞体の先端 (腺腔側) に存在し、基底側領域の小胞体から取り込まれた Ca^{2+} は小胞体の内腔を通して腺腔側に移動し、 IP_3 受容体チャネルから細胞質に放出される。すなわち小胞体は Ca^{2+} が通るトンネル・ネットワークを形成しているというのである。この考えは Ca^{2+} ウエーブを説明するモデルとしても大変魅力的な仮説であり、現在かなり有力である。

7. 水・イオン輸送における Ca^{2+} シグナルの役割

唾液腺細胞には様々なイオンチャネルやイオン輸送体が存在し (図12), Ca^{2+} シグナルによってこれらのイオン輸送系が活性化し、水分泌が引き起こされる (東城, 谷村, 1996)。特に、腺腔膜に存在する Cl^- チャネルと基底側膜に存在する K^+ チャネルは Ca^{2+} 依存性イオンチャ

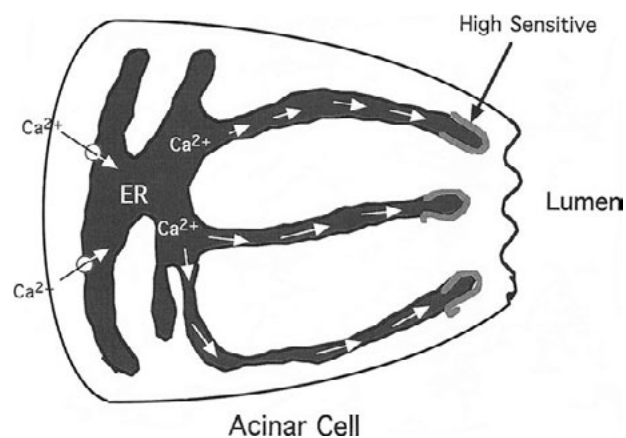


図11 小胞体ネットワークは Ca^{2+} が通るトンネルである。 Ca^{2+} は基底側領域で小胞体に取り込まれ、小胞体内腔を通して拡散する。腺腔膜近傍に分布する小胞体は IP_3 に対して感受性が特に高く、 IP_3 によって引き起こされる Ca^{2+} 放出反応は腺腔側領域で始まる。

ネルであり、 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の上昇が引き金になって開口する。 Cl^- チャネルと K^+ チャネルが開口すると Cl^- は細胞内から腺腔内へ、 K^+ は細胞内から間質液側に放出される。 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 上昇が水分泌にとって必須であることは BAPTA

(Ca^{2+} キレート剤)を細胞内に入れておくと K^+ 放出は止まってしまう(Tojyo et al., 1993)ことから明らかである。また基底側膜に存在する $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体も重要な役割を果たしている。共輸送体は持続的に Cl^- を細胞内に取り込み、基底側から腺腔側への Cl^- の流れを作っていると考えられている。この $\text{Na}^+-\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ 共輸送体の機能が止まってしまうと細胞内への Cl^- の供給がうまく行かず、水分分泌は停止する。こうして Cl^- が腺腔内に移動すると、負の電荷に引かれて Na^+ が細胞間隙を通過して腺腔内に移動することになる。腺腔内への NaCl の移動は基底側と腺腔側との間で浸透圧勾配をつくり出すので水が細胞間隙あるいは細胞内を通過して腺腔内へ動く。これが現在考えられている水分分泌機構の概略である。

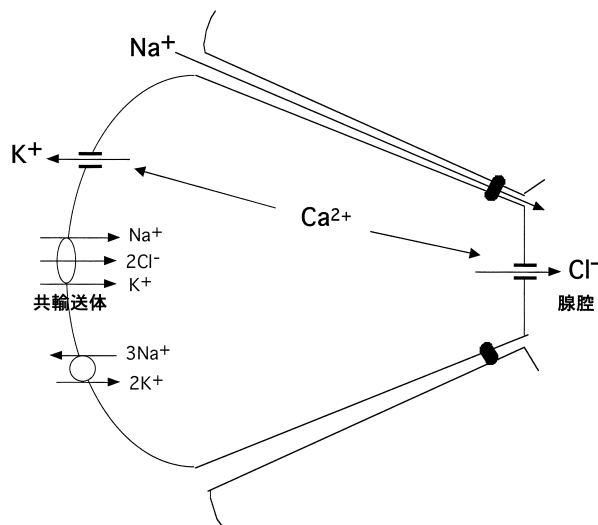


図12 唾液腺腺房細胞に存在する主なイオン輸送系

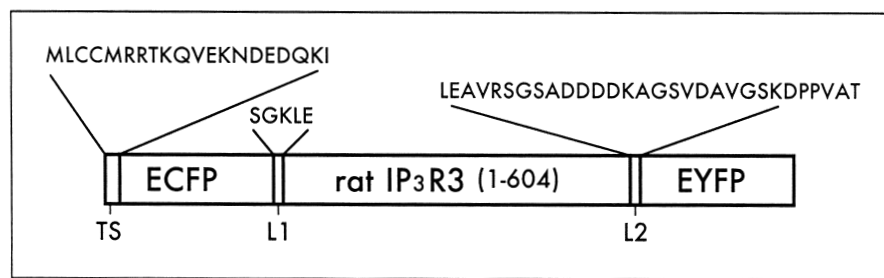
近年、唾液腺に存在するアクアポリン5という水チャネルの一種が唾液分泌の調節に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(Ma et al., 1999)。アクアポリン5の腺腔膜への移動がムスカリン受容体アゴニス

トによって促進されるとする報告があり(Ishikawa and Ishida, 2000)、水チャネルの機能が Ca^{2+} シグナルによって制御されているか否かは今後の重要な研究課題である。

唾液腺細胞のイオン輸送系の活性化になぜ Ca^{2+} ウェーブが必要なのかについては充分にはわかっていない。しかし、腺腔内への Cl^- の移動が水移動を起こす第一の駆動力であるので、 Ca^{2+} ウェーブによって Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルが最初に開口することはイオン輸送系を連鎖的に活性化させる上で理にかなった細胞反応であるのかも知れない。非生理的機序で $[\text{Ca}^{2+}]_i$ を上昇させる Ca^{2+} イオノフォアやタプシガージンは単独ではアゴニスト刺激に匹敵する K^+ 放出反応を起こすことはできない(Tojyo et al., 1993)。これは Ca^{2+} シグナルの特異的な時空間パターン(Ca^{2+} ウェーブ)が唾液腺における水分分泌に重要であることを示唆している。唾液分泌における Ca^{2+} ウェーブの役割については谷村が別の総説(谷村, 2001)で考察しているので、それを参照してほしい。

8. 今後の展望

これまでの研究で唾液腺細胞における Ca^{2+} シグナルのおおよその仕組みが明らかになってきた。今後の目標は Ca^{2+} シグナルと他のシグナル分子とを同時に可視化し、シグナル分子間の関連性や相互作用を明らかにすることである。イノシトールリン脂質代謝の亢進により IP_3 とジアシルグリセロールが生成し、 Ca^{2+} 動員と共にプロテインキナーゼC(PKC)が活性化する。もし、 IP_3 やPKCの時空間動態を $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の変化と同時に可視化することができれば Ca^{2+} シグナル研究の新たな地平を切り開くことが可能であろう。近年、クラゲ発光タンパク質Green Fluorescent Protein(GFP)とシグナル分子との融合タンパク質を生きた細胞に発現させ、シグナル分子の細胞内での動きを可視化することが試みられている。私たちの



Luminous Inositol Trisphosphate-Binding Domain for Ratiometric Analysis

LIBRA

図13 IP_3 の蛍光分子センサーLIBRAの構造。TS, 細胞膜局在シグナル; L1 and L2, リンカー部位; rat IP_3R (1-604), ラットのタイプ3 IP_3 受容体のリガンド結合部位; ECFP, enhanced cyan fluorescent protein; EYFP, enhanced yellow fluorescent protein.

研究室でもPKCやIP₃受容体のGFP融合タンパク質を培養細胞に発現させ、これらの情報分子の機能解析や動態解析を行ってきた (Tanimura et al., 2002; Morita et al., 2002; Morita et al., 2004). さらに、最近、谷村助教授が中心になって、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を利用したIP₃の蛍光分子センサーLIBRAを開発し、細胞内IP₃動態の解析を開始した (Tanimura et al., 2004). LIBRAは、IP₃受容体のリガンド結合ドメインの両端に2つの蛍光タンパク質 (CFPとYFP) を融合した新しい蛍光プローブである (図13). 現在、LIBRAを生きた培養細胞に発現させ、さらに同じ細胞にCa²⁺蛍光指示薬を導入し、IP₃とCa²⁺の細胞内動態の同時解析を行っている。将来は、LIBRAを唾液腺細胞に発現させ、IP₃、Ca²⁺、PKCの動きをイメージングシステムを使って総合的に解析することができればと考えている。いつの日かこの総説の続きとして、GFPを使った可視化解析の研究成果を紹介したい。

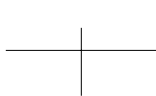
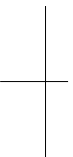
謝 辞

本学会誌に総説を書く機会を与えてくれた編集委員長の和泉博之教授に心から感謝申し上げます。また、これまで私と一緒に唾液腺細胞のCa²⁺シグナル研究を担ってくれた谷村明彦助教授、森田貴雄助手、根津顕弘助手に感謝いたします。

文 献

- Aub DL and Putney JW, Jr. Mobilization of intracellular calcium by methacholine and inositol 1, 4, 5-trisphosphate in rat parotid acinar cells. *J Dent Res* 66, 547-551, 1987.
- Berridge MJ and Irvine RF. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321, 1984.
- Butcher FR and Putney JW, Jr. Regulation of parotid gland function by cyclic nucleotides and calcium. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 13, 215-249, 1980.
- Dehaye JP, Valdez IH and Turner RJ. β -Adrenergic stimulation and cAMP mobilize Ca²⁺ from an IP₃-insensitive pool in rat submandibular granular ducts. *Am J Physiol* 265, C1356-C1362, 1993.
- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Belan PV and Petersen OH. Inositol trisphosphate and cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from single isolated pancreatic zymogen granules. *Cell* 184, 473-480, 1996.
- Gray PTA. Oscillations of free cytosolic calcium evoked by cholinergic and catecholaminergic agonists in rat parotid acinar cells. *J Physiol (Lond)* 406, 35-53, 1988.
- Grynkiewicz G, Poenie M and Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450, 1985.
- Horn VJ, Baum BJ and Ambudkar IS. β -Adrenergic receptor stimulation induces inositol trisphosphate production Ca²⁺ mobilization in rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 263, 12454-12460, 1988.
- Hughes AR, Takemura H and Putney JW, Jr. Does β -adrenoceptor activation stimulate Ca²⁺ mobilization and inositol trisphosphate formation in parotid acinar cells? *Cell Calcium* 10, 519-525, 1989.
- Ishikawa Y and Ishii H. Aquaporin water channel in salivary glands. *Jpn J Pharmacol* 83, 95-101, 2000.
- Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ and Verkman AS. Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem* 274, 20071-20074, 1999.
- Merritt JE and Rink TJ. Rapid increases in cytosolic free calcium in response to muscarinic stimulation of rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 262, 4958-4960, 1987a.
- Merritt JE and Rink TJ. Regulation of cytosolic free calcium in fura-2-loaded rat parotid acinar cells. *J Biol Chem* 262, 17362-17369, 1987b.
- Michell RH. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta* 415, 81-147, 1975.
- 御子柴克彦. IP₃レセプター. *日薬理誌* 121, 241-253, 2003.
- Morita T, Tanimura A, Nezu A and 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.
- Morita T, Tanimura A, Nezu A, Kurosaki T and Tojyo Y. Functional analysis of the green fluorescent protein-tagged inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor type 3 in Ca²⁺ release and entry in DT40 B lymphocytes. *Biochem J* 382, 793-801, 2004.
- Nezu A, Tanimura A and Tojyo Y. Characterization of the Ca²⁺ response mediated by activation of β -adrenoceptors in rat submandibular ducts. *Jpn J Pharmacol* 84, 25-31, 2000.
- Nezu A, Morita T, Tanimura A and Tojyo Y. Comparison of agonist-induced Ca²⁺ responses in rat submandibular acini and ducts. *Arch Oral Biol* 50, 585-592, 2005.
- Nezu A, Tanimura A, Morita T, Irie K, Yajima T and Tojyo Y. Evidence that zymogen granules do not function as an intracellular Ca²⁺ store for the generation of the Ca²⁺ signal in rat parotid acinar cells. *Biochem J* 363, 59-66, 2002.
- Petersen OH, Tepikin A and Park MK. The endoplasmic reticulum: one continuous or several separate Ca²⁺ stores? *Trends Neuroscience* 24, 271-276, 2001.
- Putney JW, Jr, Weiss SJ, Leslie BA and Marier SH. Is calcium the final mediator of exocytosis in the rat parotid gland? *J Pharmacol Exp Ther* 203, 144-155, 1977.
- Putney JW, Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12, 1986.
- Putney JW, Jr. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium* 11, 611-624, 1990.
- Ringer S. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol (Lond)* 4, 29-42, 1883.
- Streb H, Irvine RF, Berridge MJ and Schulz I. Release of Ca²⁺ from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1, 4, 5-trisphosphate. *Nature* 306, 67-69, 1973.
- Takemura H. Change in cytosolic free calcium concentration in isolated rat parotid cells by cholinergic and β -adrenergic agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 131, 1048-1055, 1985.
- 田隈泰信. 耳下腺のアミラーゼ分泌機構-“穴あき細胞”の利用-. *東日本歯学雑誌* 10, 1-14, 1991.
- Tanimura A, Matsumoto Y and Tojyo Y. Evidence that isoproterenol-induced Ca²⁺ mobilization in rat parotid acinar cells is not mediated

- by activation of β -adrenoceptors. *Biochim Biophys Acta* 1055, 273–277, 1990.
- Tanimura A, Matsumoto Y and Tojyo Y. Polarized Ca^{2+} release in saponin-permeabilized parotid acinar cells evoked by flash photolysis of 'caged' inositol 1, 4, 5-trisphosphate. *Biochem J* 332, 769–772, 1998.
- 谷村明彦. 唾液腺細胞の Ca^{2+} シグナルと水・電解質分泌の調節機構. 歯科基礎医学会誌 43, 343–352, 2001.
- Tanimura A, Nezu A, Morita T, Hashimoto N and Tojyo Y. Interplay between calcium, diacylglycerol, and phosphorylation in the spatial and temporal regulation of $\text{PKC}\alpha$ -GFP. *J Biol Chem* 277, 29054–29062, 2002.
- Tanimura A, Nezu A, Morita T, Turner RJ and Tojyo Y. Fluorescent biosensor for quantitative real-time measurements of inositol 1, 4, 5-trisphosphate in single living cells. *J Biol Chem* 279, 38095–38098, 2004.
- Tojyo Y, Tanimura A and Matsumoto Y. Activation of β -adrenoceptors does not cause any change in cytosolic Ca^{2+} distribution in rat parotid acinar cells. *Eur J Pharmacol* 360, 73–79, 1990.
- 東城庸介, 田隈泰信. 唾液腺-耳下腺腺房細胞における分泌機能と情報伝達. 生体の科学 46, 278–285, 1995.
- Tojyo Y, Tanimura A, Matsumoto Y and Sugiya H. Staurosporine enhances Ca^{2+} entry induced by depletion of intracellular Ca^{2+} stores in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 17, 32–40, 1995.
- Tojyo Y, Tanimura A and Matsumoto Y. Suppression of capacitative Ca^{2+} entry by serine/threonine phosphatase inhibitors in rat parotid acinar cells. *Jpn J Pharmacol* 69, 381–389, 1995.
- Tojyo Y, Tanimura A and Matsumoto Y. Imaging of intracellular Ca^{2+} waves induced by muscarinic receptor stimulation in rat parotid acinar cells. *Cell Calcium* 22, 455–462, 1997.
- 東城庸介, 谷村明彦. 器官-その新しい視点. 唾液腺, 生体の科学, 47, 359–362, 1996.
- Tojyo Y, Tanimura A, Matsui S and Matsumoto Y. Carbachol-induced potassium release in rat parotid acini: comparison of the roles of cytosolic Ca^{2+} and protein kinase C. *Jpn J Pharmacol* 63, 439–446, 1993.
- Tsien RY. New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties and prototype structures. *Biochemistry* 19, 2396–2404, 1980.
- Yamamoto-Hino M, Miyawaki A, Segawa A, Adachi E, Yamashina S, Fujimoto T, Sugiyama T, Furuichi T, Hasegawa M and Miko-shiba K. Apical vesicles bearing inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptors in the Ca^{2+} initiation site of ductal epithelium of submandibular gland. *J Cell Biol* 141, 135–142, 1998.
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E and Birnbaumer L. *trp*, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca^{2+} entry. *Cell* 85, 661–671, 1996.



〔ORIGINAL〕

A questionnaire study regarding local anesthesia in dentistry and safety measures in dental clinics among dental students

Hanako OHKE, Masaru KUDO and Noboru SHINYA

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

Abstract

This reports the results of a questionnaire study of dental students on the awareness of “local anesthesia” and “use of patient monitoring systems” in dental clinics. Subjects participated in the present study included 96 sixth year dental students (D6) and 93 first year dental students (D1).

The results indicate that the majority of respondents including both D6 and D1 support the notion that a “dentist” is the most suitable person to perform local anesthesia in dental treatment. With respect to education in local anesthesia, 49.0% of D6 respondents consider that education of local anesthesia is essential in post-graduate internships and 92.5% of the D1 group answered that it is essential in undergraduate education. About a third of respondents D6 : 30.2% and D1 : 34.4% were aware of the danger that patients may pass away during dental treatment, prior to enrollment in dental school. Effective measures when attempting to promote safety in dental local anesthesia reported by D6 indicated 50% or higher for painless local anesthesia using an electric-type syringe, allergy tests, topical anesthesia prior to local anesthesia, use of a patient monitoring system, nitrous oxide/oxygen inhalation sedation, intravenous sedation, and quantitative assessments of pain and anxiety. Regarding education in the use of a patient monitoring system and data assessment, 54.2% of D6 responded that it is “essential” for post-graduate internship, and 86.0% of D1 responded that it is “essential” in undergraduate education. Overall the study suggests that there is a need for more education in this area at an early stage to promote safety in dental clinical fields.

Key words ; Dental anesthesiology, Local anesthetic injection, Awareness questionnaire, Dental students

Introduction

The number of systemic accidents among dental patients' ranges from 4 to 7 cases per 100,000 patients, and of these 5 or more cases per year result in death. Eighteen cases of dental anesthesia-related accidents were reported during the period from 1981 through 2000, and of these 15 cases were deaths (Kaku et al., 2004). Most of these dental anesthesia-related accidents occurred due to local anesthetic injections with outpatients. To promote safety measures in dental clinics and improving the quality of dental education, a questionnaire study of dental student awareness of “local anesthesia” and the “use of a patient monitoring system” in dental clinics was conducted.

Methods

1. Places and Dates

The questionnaire was administered at the University Dental Hospital and at lectures in the Faculty of Dentistry in May and June of 2002.

2. Subjects and Education

受付：平成17年3月28日

1) Subjects

Subjects participating in the present study included 96 sixth year dental students (66 males and 30 females, mean 25.8 ± 2.7 years old, referred to as D6 in the following) who were enrolled in lectures and clinical training courses in dental anesthesiology and 93 first year dental students (64 males and 29 females, mean of 20.0 ± 2.8 years old, referred to as D1 below) who were introduced dental anesthesiology clinics. The responses of the two groups, D6 and D1, were compared.

2) Undergraduate education

The courses offered are visiting the dental anesthesiology clinic in the first semester of the first year, dental anesthesiology lectures (80 min $\times$ 30) and basic practice with measurement of blood pressure (120 min $\times$ 1) in the fourth year, lectures on dentistry for the handicapped (80 min $\times$ 2), a geriatric dentistry lecture (80 min $\times$ 1), and dental anesthesiology clinical training (5 days/ a week, twice : total 10 days) in the fifth year. The clinical training covers the following areas : infiltration/conduction of anesthetic injections using a dental local of anesthetic injection training model (Kudo et al., 2002), anesthetic infiltration injections among students, nitrous oxide/oxygen (N_2O/O_2) inhalation sedation (Kudo 2003), use of a patient monitoring system and interpretation of data, cardiopulmonary resuscitation using a simulator, and performance of the procedural practices that are needed for BLS (basic life support) and ACLS (advanced cardiac life support) in emergency cardiovascular treatment, and student visits to a pain clinic and observation of dental care under general anesthesia. In addition, a total of 14.1 hours of lectures concerning cardiopulmonary resuscitation and systemic accidents (fourth grade, 80 min $\times$ 2, fifth grade ; practice lectures 90 min.) and clinical training (5 hours $\times$ 2) are offered at the Faculty of Dentistry. It is thought that the courses offered are typical of dental education.

3. Questionnaire (Items questioned)

The questionnaire used a standard self-recording type questionnaire sheet. Questions included 40 items concerning dental anesthesiology clinics and dental anesthesiology education. Five questions concerning dental clinical accidents, local anesthesia, and the use of a patient monitoring system were tabulated and the percentages were calculated relative to the number of the students that responded. The questionnaire response sheets were collected from the cooperating students who understood the main objective of the study at the facilities where the questionnaire was administered.

1) Local anesthesia

(1) Optimal administration of local anesthesia in dental clinics

The question was "Select one person who should optimally perform the local anesthesia in dental clinics", and the suggested responses were "dentist", "medical doctor", "both dentist and medical doctor", "do not know" and "other, specify the choice".

(2) Education in local anesthesia

The D6 group was asked whether the following education is necessary, "internship in local anesthetics after graduation ;" and D1 were asked about "education in local anesthetics at the Faculty of Dentistry". The answer choices offered were "essential", "only if wanted", "not necessary", and "other, specify the choice".

2) Risks in dental clinics and preventive measures

(1) Knowledge about the risks of patient death during dental treatment

The question was "were you aware of the fact that patients may accidentally die during dental treatment before you enrolled in dental school?" and the answer choices offered were "yes" or "no".

(2) Measures to promote safety in local anesthesia

The D6 group was asked "to select measures that would be effective when promoting safety in dental local anesthesia", and answers could be selected from the following : topical anesthesia, painless local anesthesia using an electric-type syringe, use of a patient monitoring system, N_2O/O_2 inhalation sedation, intravenous sedation, quantitative assessment of pain and anxiety, allergy tests, and other, specify the choice.

(3) Education in the use of a patient monitoring system and data assessment

The question for the D6 group was "is a post-graduate internship in the use of a patient monitoring system and data assessment necessary?", and the question for the D1 group was "is education at the Faculty of Dentistry in the use of a patient

monitoring system and data assessment necessary?" The answer choices were "essential", "only if wanted", "not necessary", and "other, specify the choice".

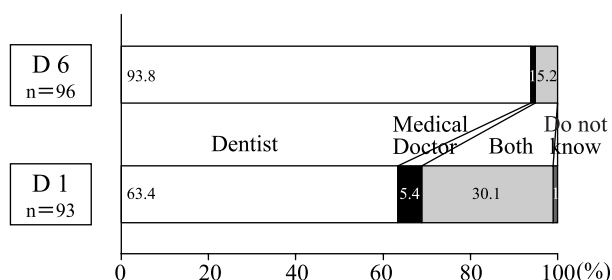


Fig.1 Optimal performers for local anesthesia in dental clinics
 "Dentist" was chosen by D6 : 93.8%/D1 : 63.4%, "medical doctor" was D6 : 1.0/D1 : 5.4%, "both dentist and medical doctor" was D6 : 5.2/D1 : 30.1%

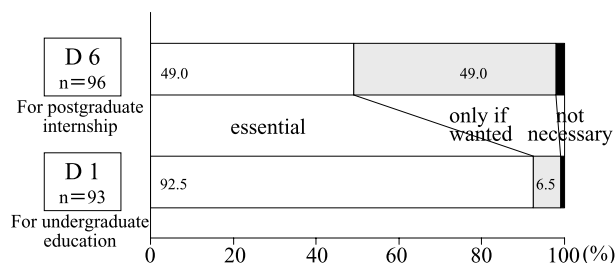


Fig.2 Education in local anesthesia
 The answer "essential" was 49.0% from D6 and 92.5% from D1.

Results

1) Questionnaire return rates

The questionnaire return rate was 100%.

2) Local anesthetics

(1) Optimal administration of local anesthesia in dental clinics

"Dentist" was chosen by 93.8% of D6 and 63.4% of D1 (the following results for the D6 and D1 groups are shown as D6/D1), "medical doctor" 1.0/5.4%, "both dentist and medical doctor" 5.2/30.1% (Fig.1).

(2) Education in local anesthesia

The answers from the D6 group about a post-graduate internship was "essential" 49.0%, "only if wanted" 49.0%, and "not necessary" 2.1%. The answers of the D1 group about undergraduate education was "essential" 92.5%, "only if wanted" 6.5% and "not necessary" 1.1% (Fig.2).

3) Risks in dental clinics and preventive measures

(1) Knowledge about the risk of patient deaths during dental treatment (prior to enrollment in dental school)

Those aware of this fact were 30.2/34.4% (Fig.3).

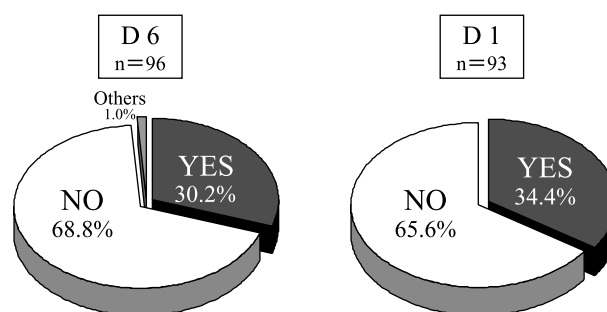


Fig.3 Knowledge about the risks of patients' death among dental patients before enrollment
 "Those who were aware of the fact" were D6 : 30.2/D1 : 34.4%.

(2) Measures to promote safety in local anesthesia

The responses from the D6 group higher than 50% were : 75.0% for both painless local anesthesia using an electric-type syringe and allergy tests ; 73.8% for topical anesthesia prior to local anesthesia ; 71.4% for use of a patient monitoring system ; 64.3% for N₂O/O₂ inhalation sedation ; 54.8% for intravenous sedation ; and 57.1% for pain and anxiety quantitative assessments (Fig.4).

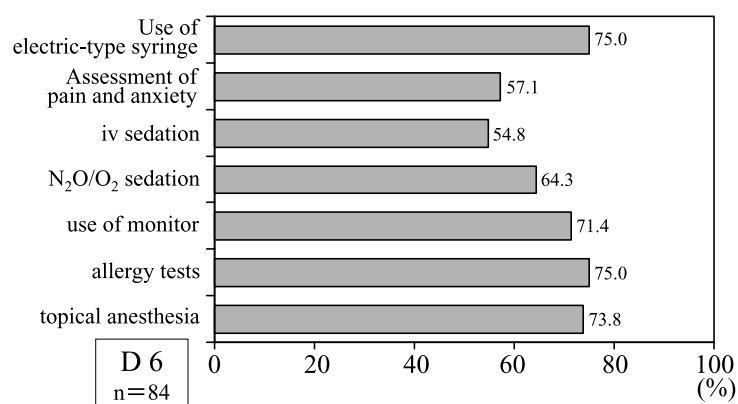


Fig.4 Effective measures for promoting safety of dental local anesthesia
The most popular response from D6 was painless local anesthesia using an electric-type syringe and allergy tests.

(3) Education in the use of a patient monitoring system and data assessment

The answers from the D6 group about post-graduate internship were : 54.2% “essential” ; 42.7% “only if wanted” ; and 2.1% “not necessary”. The answers from the D1 group about undergraduate education were : 86.0% “essential” ; 14.0% “only if wanted” ; and 0% “not necessary”(Fig.5).

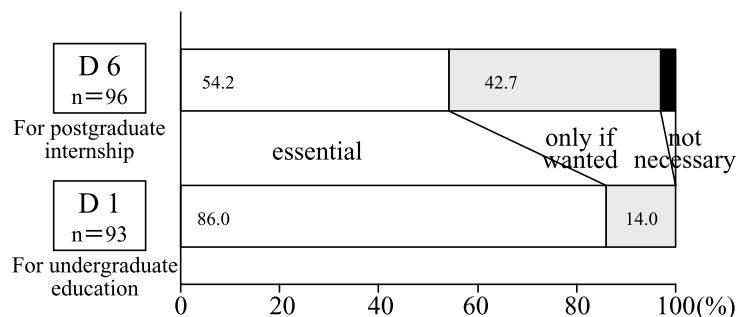


Fig.5 Education concerning the use of a patient monitoring system and data assessment
The most popular answer from D6 was 54.2% supporting as “essential”.
The most popular answer from D1 was 86.0% supporting as “essential”.

Discussion

Media coverage of clinical accidents has increased. At the time when the questionnaire was administered, a fatal dental outpatient accident due to a local anesthetic injection was widely reported (Asahi news paper, 2002). The 70% of students who, prior to the enrollment in dental school, were not aware that deaths of dental patients may occur would have very little awareness of the necessity for safety measures in dental clinics. According to Sakuki et al., visits to dental anesthetic clinics during the time immediately after enrollment in the first year of dental school results in a higher motivation to promote safety in medical care of dental patients (Sakuki et al., 2004). In addition, Miyamoto et al. reported that very small numbers of fourth and fifth year dental students demonstrated an interest in oral surgery and dental anesthesiology (Miyamoto et al., 2004). Therefore, opportunities to promote awareness and technical education must be given early to promote safety in dental clinics.

Over 90% of the D6 respondents suggested that the optimal person to perform dental local anesthesia is the dentist, leading to the conclusion that interest in local anesthesiology is very high. According to Shimada, accident cases are presently reported in the clinical training of dental students at many universities (Shimada et al., 2005). The School of Dentistry at Health Sciences University of Hokkaido has offered an introduction to technical education in how to conduct anesthesia by injection since 1984 using a dental local anesthetic injection training model (DLAITM) (Kudo et al., 2002) for pre-clinical training. Last year, a DLAITM was developed which introduced the possibility of training in low pressure injection of a solution for infiltration injection. With the introduction of technical education using the DLAITM at an early stage in dental school, we can expect better clinical education in local anesthetic injection beyond the requirements for OSCE (Basic Skills :

infiltration anesthetics).

Regarding education in the use of a patient monitoring system, 54.2% of the D6 group considered it essential in post-graduate internship and 86% of the D1 group in undergraduate education. This education must be introduced with a strong emphasis on case reports. In the field of clinical oral surgery, Sekine et al. have reported clinical examples of treatments with drainage and antibiotics after abnormalities such as pneumothorax and subcutaneous emphysema extensively spreading from the neck to the chest caused by third molar surgery were diagnosed early using a patient monitoring system (Sekine et al., 2000). The authors have previously reported a case where the induction of angina was avoided in an elderly outpatient with hypertension and diabetes during prosthetic treatment by using patient monitoring (Kawai et al., 1996). For the future, education in the use of a patient monitoring system for elderly dental outpatients, will become increasingly important to promote safety in dental clinics.

In the current report, we compared the results of the questionnaire between the two groups: D1 (pre-undergraduate educated) and D6 (post-undergraduate educated) to check the effects of our education and improve the curriculums for the undergraduate educated and the post-graduate internship.

The present study found that it is desirable to provide education in painless local anesthetic injection, N₂O/O₂ inhalation sedation, and clinical procedures to undergraduates as well as during graduate internship for an effective use of a patient monitoring system in the education to promote safety in dental clinics. There is a clear need to strengthen motives to promote safety in dental clinics at an early stage, ensure technical education in local anesthetic injection using various electric-type syringes, conduct early pre-graduation clinical training including N₂O/O₂ inhalation sedation and the effective use of a patient monitoring system, and the need to establish a flexible post-graduate internship curriculum. Yamamura has suggested differences in the directions of development of medical anesthesiology and dental anesthesiology (Yamamura, 2002). Therefore, to promote safety, the dental clinics at the Faculty of Dentistry provide local anesthetics (Kudo et al., 2004; Ohke et al., 2002), psychosedation (Kudo, 2003; Ohke et al., 2000), behavioral adjustment, and patient management methods in dental anesthesiology clinics for patients and elderly dental patients with existing complications (Kato et al., 2000; Kudo et al., 1994) as well as mentally handicapped patients (Kato et al., 2000), also oral implant treatments (Ohke et al., 2004), and promotion of safety by providing feedback through reports, publications, and clinical applications without screening out medical accidents (Kudo et al., 2002). Previously the authors have reported on local anesthesia (Kudo et al., 2001), general anesthesia (Kudo et al., 1999; Kudo et al., 1996), psychosedation (Kudo et al., 1997; Kawai et al., 2002), and a method to improve prevention as well as measures for preventing systemic accidents (Sano et al., 1994) to provide painless, safe, and comfortable dental treatment. For the future, we will apply this knowledge to clinical education.

Conclusion

A questionnaire study on the awareness of “local anesthetics” and “patient monitoring systems” in dental clinics among dental students was conducted. The results indicate that the majority of both the D6 and D1 groups (sixth and first year dental students) agree that a “dentist” is the most suitable person to perform local anesthesia in dental treatment. With respect to education in local anesthetics, 49.0% of the D6 group answered that it is essential in post-graduate internships and 92.5% of the D1 group answered that it is essential in undergraduate education. Those who, prior to the enrollment in dental school, were aware of the risk of patient death during dental treatment were D6 30.2% and D1 34.4%. Regarding education in the use of a patient monitoring system and data assessment, 54.2% of the D6 group considered it “essential” in post-graduate internship, and 86.0% “essential” in undergraduate education.

References

Asahi news paper(Tokyo), February 20, 2002.

Kaku Y, Cho M, Araki Y, Hosonuma H, Kobayashi K and Shibutani K. A review on articles related to anesthesia-related accidents and lawsuits published in newspapers and magazines between 1980 and 2004 J Jpn Dent Soc Anesthesiol 32 : 34-42, 2004.

Kato M, Kawai T, Ohke H, Kudo M, Kokubu M and Shinya N. Change in the cardiovascular system during dental treatment of medically compromised patients. HIGASHI NIPPON DENT J 19 : 193-199, 2000.

Kato M, Kudo M, Kawai T, Ohke H, Kokubu M and Shinya N. A clinical analysis of general management of handicapped patients in the Health Sciences University of Hokkaido Hospital. HIGASHI NIPPON DENT J 19 : 56-62, 2000.

Kawai T, Kudo M, Ohke H, Kokubu M and Shinya N. Electroencephalogram and electrocardiogram real time analysis measures sedation for gagging patient during dental. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 30 : 248-249, 2002.

Kawai T, Kudo M, Watanabe K, Kokubu M and Shinya N. A case report of an aged dental outpatient with consciousness disorder during prosthetic treatment. HIGASHI NIPPON DENT J 15 : 17-22, 1996.

Kudo M. Efficacy of nitrous oxide/oxygen inhalation sedation in dentistry -providing painless, and comfortable dental treatment-. Medical Gases 5 : 47-53, 2003.

Kudo M, Ohke H, Katagiri K, Sato Y, Kawai T, Kato M, Kokubu M and Shinya N. 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. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 29 : 173-178, 2001.

Kudo M, Ohke H, Kawai T, Kato M, Kokubu M and Shinya N. Risk management in anesthesiology at the Health Sciences University of Hokkaido Hospital for providing security and consent in dental treatment. HIGASHI NIPPON DENT J 21 : 281-288, 2002.

Kudo K, Ohke H, Kawai T, Kato M, Kokubu M and Shinya N. Dental local anesthetic injection simulation in dental anesthetic education - Educational effects in applying simulation models in clinical training -. HIGASHI NIPPON DENT J 21 : 275-279, 2002.

Kudo M, Ohke H, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. Effects of injection pressure and injection speed on anxiety and pain during gingival submucosal infiltration anesthesia. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 32 : 49-54, 2004.

Kudo M, Ohke H, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. Geriatric patient who suffered transitory cardiovascular collapse under sevoflurane anesthesia due to continuous medication with mexiletine hydrochloride. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 27 : 614-618, 1999.

Kudo M, Ohke H, Kawai T, Satoh Y, Kawano T, Kokubu M and Shinya N. A study of improvement in detecting nasal obstruction during 30% nitro oxide sedation-Application of external non-invasive nasal dilator and vasoconstriction agent for nasal drip-. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 25 : 445-450, 1997.

Kudo M, Ohmori K, Naya Y, Kokubu M and Shinya N. Statistical study of the older cases of cases of general management of Health Sciences University of Hokkaido Dental Hospital-Application of psychosedation by dental anesthetics-. HIGASHI NIPPON DENT J 13 : 63-70, 1994.

Kudo M, Shinya N, Takahashi T, Kawai T, Kato M and Kokubu M. Out patient use of our remodeled laryngeal mask airway for dental general anesthesia. J Jpn Dent Soc. Anesthesiol 24 : 815-819, 1996.

Miyamoto N, Okada S, Chie K, Yamada N, Toyota M, Kawase T and Terauchi T. Awareness study among dental students after 5 years since the enrollment to school. Journal of Japan Association of Dental Education 19 : 271-289, 2004.

Ohke H, Kudo M, Kato M, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. Effects of thinner dental disposable injection needle and nitrous oxide inhalation sedation on pain relief in the puncture of the oral mucosa. HIGASHI NIPPON DENT J 21 : 261-266, 2002.

Ohke H, Kudo M, Kato M, Kawai T, Sato Y, Katagiri K, Kokubu M and Shinya N. Research of sedation for dentistry -Part 3. Method of additional injection for midazolam intravenous sedation during operation-. HIGASHI NIPPON DENT J 19 : 171-179, 2000.

Ohke H, Kudo M, Kitajo H, Taira H, Murata M, Hosokawa Y, Niida A, Kuniyasu H, Yajima A, Hirose Y and Ochi M. 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. HIGASHI NIPPON DENT J 23 : 107-114, 2004.

Sakuki S, Sandai F, Nishida K, Yashiro M, Sumitomo M, Yoshida R, Furuya H and Nakahara I. Introduction of internships at a hospital during the first year at this department of dentistry. Journal of Japan Association of Dental Education 19 : 401-408, 2004.

Sano T, Kudo M, Shinya N and Kaneko M. Practical treatment for swallowing foreign objects, dental instruments. HIGASHI NIPPON DENT J 13 : 85-91, 1994.

Sekine J, Irie A, Dotsu H and Inokuchi T. Bilateral pneumothorax with extensive subcutaneous emphysema manifested during third molar surgery. Int J Oral Maxillofac Surg 29 : 355-357, 2000.

Shimada R, Noguchi I, Takano K, Sasao M, Sekita S and Fukayama H. A questionnaire study of clinical training of inferior alveolar nerve blocks. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 33 : 95-99, 2005.

Yamamura H. Development of Japanese anesthesiology and dental anesthesiology. J Jpn Dent Soc. Anesthesiol 30 : 153-159, 2002.

[ORIGINAL]

Evaluation of a practical skills education method involving the determination of vital signs : consciousness, pulse, respiration, body temperature, and blood pressure

Masaru KUDO, Hanako OHKE, Takuro KAWAI and Noboru SHINYA

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

Abstract

In 2003, practical skills education in vital signs (VS) was introduced to fourth-year dental students. The practical skills education consisted of an assessment of consciousness, pulse, respiration, and the determination of body temperature and blood pressure (vital signs check, VSC). The effect of the practical skills VSC education among fourth-year dental students were evaluated and the findings are discussed in this report. The subjects were two groups of fourth-year dental students ; the 2003 practical skills education group (n=94) and the 2002 group not receiving the practical skills training (n=104).

The practical skills training with respect to VSC [involving a 60-minute lecture and a 20-minute video learning session, description examination, written examination (50 questions to confirm accurate base knowledge of operations), a reading (4200 characters, four figures, and five tables equivalent), demonstrations and commentary : Following the presentation of slides describing the subject matter, a qualified instructor demonstrated VSC and provided commentary to resolve student misunderstanding (10-minute session), mutual training in VSC performed with pairs of student, with 1 instructor for 2 pairs of students, second written examination : the same as the first immediately after the practical skill training, general comment and a third written examination], involved evaluation of consciousness, pulse, respiration, and the measurement of body temperature and blood pressure, offered sufficient content and appropriate educational outcomes.

Key words ; Vital signs, Dental education, Practical skill education

Introduction

In 2003, practical skills education with respect to vital signs (VS) was introduced to fourth-year dental students. The practical skills education consisted of assessment of consciousness, pulse, respiration and the determination of body temperature and blood pressure (vital signs check, VSC). The effects of the practical skills VSC education among the fourth-year dental students were evaluated, and the findings are discussed in this report.

Methods

1. Subjects

There were two groups of fourth-year dental students ; the 2003 group receiving practical skills education (n=94) and the 2002 group not receiving practical skills education (n=104).

2. Assessment

The following items were assessed to determine the educational effect of the practical skills education after completion of

受付：平成17年3月30日



Fig. 1 A point to note with BP measurement

A Riva-Rocci-type sphygmomanometer was applied to the brachial artery in order to measure blood pressure. The reason why you put the Stethoscope under the manchette on the brachial

the practical skills regimen.

- 1) Comparison of written test scores prior to and immediately after the training.
- 2) Practical skills evaluation immediately prior to the practical skills training.
- 3) Comparison of the results of VSC in the Trial Objective Structured Clinical Examination (T-OSCE). The results of the VSC in T-OSCE were compared with the 2002 group.

3. Vital Signs (VS)

1) Consciousness

The degree of the state of consciousness was evaluated objectively employing the Japan Coma Scale (JCS, 3–3–9 degree method) and the Glasgow Coma Scale (GCS).

2) Pulse

Pulse was examined by palpation using the forefinger, middle finger, and digitus anularis with the radial artery in the bilateral head of the radius of centrifugation rank extremitas. In the presence of a normal pulse, the pulse was determined for a period exceeding 15 seconds (measurements were conducted for 15, 20, 30 and 60 seconds and repeated 4, 3, 2, and 1 time).

In the event of arrhythmia, the pulse was determined over a period of more than 30 seconds ; a precise determination for up to one minute was also made. In adults, the pulse was defined as tachycardic, normal or bradycardic ; additionally, the presence of a regular or irregular rhythm was established. All data were recorded.

3) Respiration

Respiration observations were conducted on the basis of thoracic movement to establish respiratory rate, depth, and rhythm ; as well as the presence of constrained respiration was examined. Bradypnea, normal, or tachypnea conditions were determined relative to the rest respiratory rate. In addition, the rate of respiration was measured in conjunction with the pulse number.

4) Body temperature

The body temperature was measured with an electronic thermometer (axilla temperature ; length of measurement one minute) or with a far infrared electronic thermometer (drum temperature ; length of measurement a few seconds).

5) Blood pressure

A Riva-Rocci-type sphygmomanometer was applied to the brachial artery to measure blood pressure. The systolic and diastolic pressures were measured via auscultation following the preliminary systolic blood pressure determination by touching.

4. Education in VSC

The practical skills education group participated in a 60-minute lecture and a 20-minute video learning session conducted in a lecture hall in the presence of a practical skills coach as well as a written examination was administered (50 questions aimed to confirm the base knowledge of the maneuvers ; first test) before the practical skills training. In addition, a reading (4200 characters, four figures, and five tables equivalent) which described the determination of consciousness, pulse, respiration, body temperature and blood pressure, was assigned prior to the lecture.

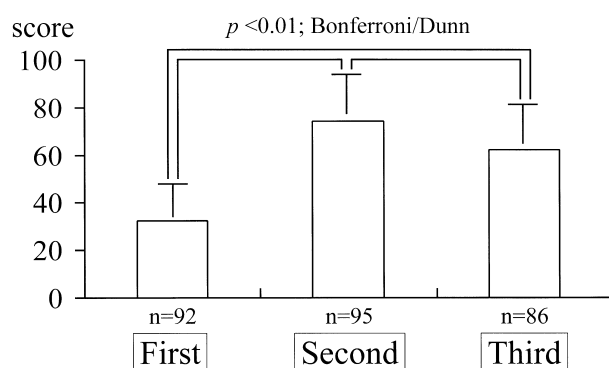


Fig.2 Description examinations

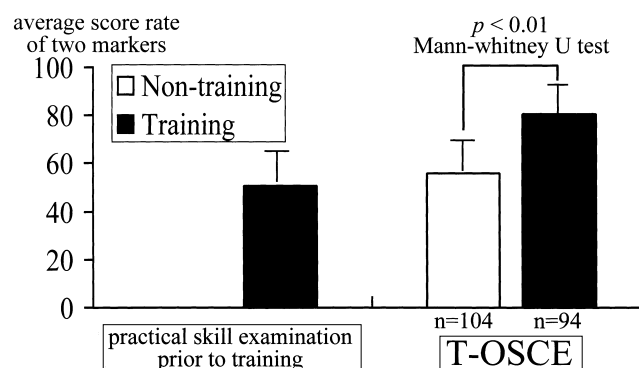


Fig.3 Average score of the practical skills examination prior to training and T-OSCE

The practical skills training was conducted in a practice room in the following order.

1) Practical skills evaluation immediately prior to practical skills training

Students checked the pulse, respiration, body temperature, and blood pressure over a five-minute period, which permitted assessment of the ability to perform this prior to the instruction and utilized as a basis for the evaluation.

2) Demonstrations and commentary

Following the presentation of the slides describing the subject matter, a qualified instructor demonstrated VSC and provided commentary to resolve student misunderstandings (10-minute session) (Fig. 1).

3) Instruction

Training was conducted by an instructor coach. Mutual training for VSC was performed with pairs of students, and with 1 instructor for 2 pairs of students. Each student checked consciousness, pulse, respiration, body temperature, and blood pressure over a five-minute period.

4) Written examination (second)

The same written examination was administered immediately after the practical skills training.

5) General comment

A third written examination for all fourth-year dental students was administered in a lecture hall ; commentary was reserved for a later date.

Results

1. Written examinations (three times)

The first written examination score of the practical skills education group was 32.5 ± 14.3 (mean $\pm$ SD), the second was 74.3 ± 15.2 , and the third 62.2 ± 15.8 . The second and the third scores were statistically significantly higher than the first score ($p < 0.001$, One-factor ANOVA and Post-hoc test)(Fig. 2).

2. Practical skills examination immediately prior to the practical skills training

The average score of the practical skills examination immediately prior to practical skill training was $50.6 \pm 13.7\%$ (mean $\pm$ SD) (Fig. 3).

3. Comparison of average T-OSCE score rates

The average T-OSCE score rate of the practical skills education group was $80.7 \pm 15.8\%$ (21.4–100, $n=94$), while the average T-OSCE score of the group not receiving practical skills instruction was $55.8 \pm 15.1\%$ (18.5–81.5, $n=104$). Statistically, the practical skills education group had a significantly higher average score of T-OSCE than the group not receiving the practical skills training ($p < 0.001$, Mann-Whitney's U test) (Fig. 3). The distributions of the scores are shown in Fig. 4 (Fig. 4).

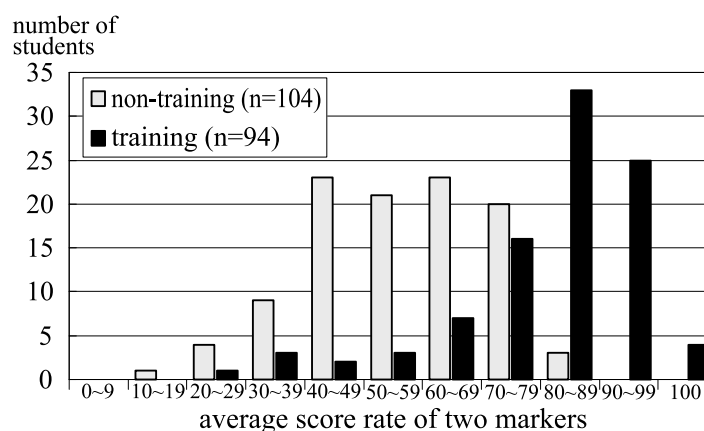


Fig. 4 Distributions of T-OSCE score

Discussion

At the Faculty of Dentistry in Health Sciences University of Hokkaido, the Department of Dental Anesthesiology conducts practical skills education for VSC to provide fourth-year dental students with basic clinical training. In addition, instruction in determining pulse and blood pressure is included in oral physiology training (sphygmomanometry) by the second-year training faculty. Further, in 2004, the department of oral surgery implemented an 80-minute practical skills training program to measure the pulse and also in sphygmomanometry for all fourth-year dental students. The educational effects were adequate as seen in the difference with the results of the practical skills examination which was performed immediately prior to the practical skills training. From 2004, three written examinations were conducted together with the practical skills training with feedback. As a result of this program, the average T-OSCE scores of the practical skills education group were above 80%. These data show that the instruction involving practical skills relating to VSC was of sufficient effectiveness. It was further demonstrated that this instruction was adequate for evaluation by T-OSCE. The success of this education method was due to the results of a measured practical skills instruction that systematized the AHA (American Heart Association) Basic Life Support for healthcare providers with a model, high quality feed-back, sufficient motivation, and promotion of retention of the learned skills. However, there is still a need for efforts to enhance student desire to learn (Suzuki et al., 2001). The education method may be incompatible with the T-OSCE, which may result in increases in teaching load due to understaffing. Resolution of these problems may involve tutorials in practical skills enhancement among marginally qualified students as well as periodic practical skills examinations. Consequently, the program implemented here assures efficiency and retention of the knowledge of VSC.

It is not possible to verify whether students have acquired adequate VSC determination skills with respect to pulse and sphygmomanometry. Practical skills education must be further extended to an evaluation of the state of consciousness, pulse, respiration, body temperature, and blood pressure via VSC like performed here. Further, it is suggested, like also Furutani reported (Furutani et al., 2002), that an accurate evaluation of student measurements of VS and development of capable instructors are needed to improve the education methods for VSC (Karnath et al., 2002).

Conclusion

The practical skills training with respect to VSC reported here, with the corresponding evaluation of consciousness, pulse, respiration, and measurements of body temperature and blood pressure, involved sufficient content and appropriate outcomes suggesting adequate educational retention.

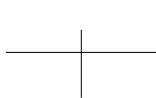
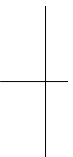
References

Furutani N, Kawamura T and Fukushima O. Assessment of a System for Evaluating Pulse and Blood Pressure Measurement Skills in the Objective Structured Clinical Examination. Medical Education 33 : 215–226, 2002.

Karnath B, Thornton W and Frye AW. Teaching and testing physical

examination skills without the use of patients. Acad Med 77 : 753, 2002.

Suzuki A, Suzuki Y, Takahata O, Fujimoto K, Nagashima K, Mamiya K, Sengoku K and Iwasaki H. A Survey of 3,303 6th-year Medical Students from 36 Universities Concerning Knowledge of Resuscitation – More than 80% of Medical Students Can Not Perform Standard Cardiopulmonary Resuscitation?–. Masui 50 : 316–322, 2001.



〔ORIGINAL〕

Development of a novel training model for dental infiltration anesthetic injections

Masaru KUDO and Noboru SHINYA

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

Abstract

A new dental training model (M2004IA) for infiltration local anesthetic injection was developed. In this new training model silicon gingival mucosa was designed to expand upon insertion of a needle, this to be followed by introduction of a local anesthetic solution into the silicon gum and silicon gingival mucosa (SGM). This study measured the injection pressure during injection under the SGM.

The model M2004IA-HP was designed for hard palate infiltration anesthetic injection training involving the anterior and middle superior alveolar (AMSA) branch of the maxillary nerve. The SGM surrounding the glass filter and the urethane resin jaw (URJ) are held together with glue to maintain space that will permit expansion. The injection pressure for the M2004IA was 241.3 ± 32.1 (mean $\pm$ SD) mmHg at the end of a 0.5 ml injection.

The lower jaw of the M2004IA (M2004IA-LMBG) was designed for infiltration anesthetic injection training involving the first molar buccal gingiva. The injection pressure for delivery of 0.5ml of solution over approximately 90 seconds was 357.2 ± 15.0 mmHg at the end of the injection. The pressure following the start of injection with the M2004IA-LMBG was 5.3 ± 2.3 mmHg one second after the start of injection, and 109.2 ± 12.0 mmHg at 10 seconds. These values approximated the actual injection pressures from previously reported (Kudo et al., 2004). Infiltration anesthetic injections; therefore, this novel device, the M2004IA, is effective to generate injection pressures similar to those actually experienced by human volunteers. The model is also suitable for low-pressure injection training. Training in pain-free local anesthetic injection, e. g., low-pressure injection, is essential to promote safe dental treatment under local anesthesia. The newly developed M2004IA enables the simulation of authentic infiltration anesthetic injection conditions. An intensive effort to provide safe training, and also with respect to continuing pre-clinical training in infiltration anesthetic injection with the introduction of the M2004IA can be anticipated.

Key words : Pre-clinical training model, Infiltration anesthetic injections, Local anesthetic injection, Dental students education, Promotion of dental safety

Introduction

The infiltration anesthetic injection model was developed for dental training in local anesthetic injection of solution (M2004IA; Fig.1). The silicon gingival mucosa in this model was designed to expand upon insertion of the needle and the introduction of local anesthetic solution into the silicon gum and silicon gingival mucosa (SGM). In addition, the injection pressure was measured during injection under the SGM. The primary characteristics and details of the performance of this novel model are presented in this report.

受付：平成17年3月31日

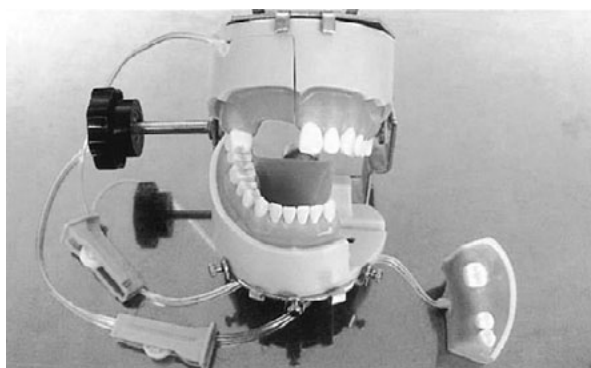


Fig.1 Complete view of Model-2004IA

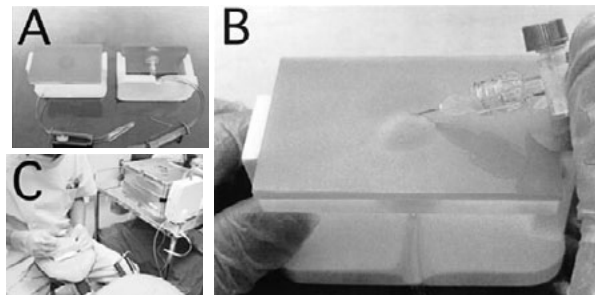


Fig.2 Local anesthetic injection training for 5th year dental students with electrical injection syringe and oral mucosa model (Model-2003IA)

A : Complete view of M2003IA (left ; Top view, right ; Bottom view)

B : Bulge formation at 0.5ml injection

C : Use the M2003IA for pre-clinical local anesthetic injection training in 5th year dental students with electric injection syringe

Methods

1. Development of bulge formation model for injection

The experimental model, which was designed to permit SGM expansion upon injection of 0.5ml of solution (M2003IA ; infiltration anesthesia model), was developed in 2002 and the model was employed in pre-clinical training in 2004. The silicon mucosa in M2003IA has a urethane resin jaw (URJ) equipped with an embedded glass filter (#100–120 μ m ; diameter, 18 mm ; thickness, 3mm) for solution penetration. A plastic tube is connected to the glass filter to facilitate solution drainage, and tube endings outside of the apparatus are clamped (Fig.2–A). The device was manufactured by Nissin Dental Products, Inc.. The bulge formation at 0.5ml solution injection is presented in Figure 2–B. Injection pressures for delivery of a 0.5ml solution over approximately 90 seconds (Hochman et al., 1997) was 157.3 ± 4.1 mmHg at the end of the injection. In this study, an infiltration anesthetic injection model (M2004IA) of the hard palate and the lower molar buccal gingival were developed for the bulge formation model (M2003IA) improving the silicon mucosa.

2. Measurement of injection pressure with M2004IA

The local anesthetic, 2% lidocaine hydrochloride with 0.0000125% epinephrine (supplied in a dental local anesthetic cartridge) was used. The syringe was an electric-type syringe, The WandTM, and the needle was a special disposable needle for this electric device (30G x 1/2", outer diameter 0.30 mm, and length 12 mm). The injection speed of the device can be adjusted to two levels : fast (30 sec/ml) or slow (160 sec/ml) (Hochman et al., 1997). The injection pressures with the slow injection speed were measured in this study.

For the connections between the pressure transducer and the injection apparatus, the methods of Rood (Rood, 1978) and Pashley (Pashley et al., 1981) were modified as follows. A pressure transducer (TP300T ; NIHON KOHDEN Co., Ltd.) was connected between the hub of the needle and the syringe, and injection pressure was measured continuously in real time from immediately before puncture till removal of the needle, using an invasive sphygmomanometer (AP-641G ; NIHON KOHDEN, Co., Ltd.) and analytical software (gmview II-CORE ; GMS Co., Ltd.). The sphygmomanometer could measure a maximum 2,000 mmHg.

Results

1. Novel infiltration anesthesia injection model of the hard palate

1) Development of the infiltration anesthesia injection model of the hard palate (M2004IA-HP)

The novel infiltration anesthesia injection model (M2004IA-HP) in 2004 was developed by the authors, and the M2004IA-HP was designed for palatum durum infiltration anesthetic injection training involving the anterior and middle superior alveolar (AMSA) branch of the maxillary nerve. The teeth from left upper premolar to the central incisors were considered to be absent, and a glass filter (diameter 7mm) was positioned in the middle of the free gingival border and epistome midline com-

pound suture at the bisector of the premolar. The SGM thickness was 2mm, and the SGM surrounding the glass filter and the URJ were held together with glue to maintain a space to permit expansion. The bulge formation at the time of the 0.5ml solution injection is presented in Figure 3.

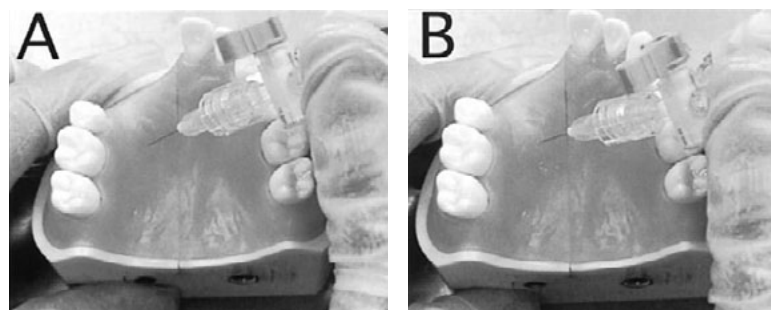


Fig.3 Bulge formation after 0.5ml solution injection with hard palate model (Model-2004IA-HP)

A : At the start of injection

B : At the end of the 0.5ml injection

2) Injection pressures of M2004IA-HP

The injection pressures for delivery of 0.5ml of solution over approximately 90 seconds were 5.3 ± 2.3 (mean $\pm$ SD, $n=3$) mmHg one second after the start of injection, 21.3 ± 12.2 mmHg at 3 seconds, 61.3 ± 18.5 mmHg at 10 seconds, 145.3 ± 32.6 mmHg at 30 seconds, 252.0 ± 4.0 mmHg at 60 seconds, and 241.3 ± 32.1 mmHg at the end of the 0.5ml injection (Fig.5).

2. Novel infiltration anesthesia injection model for the lower molar buccal gingival

1) Development of infiltration anesthesia injection model of the lower molar buccal gingival (M2004IA-LMBG)

The lower jaw of the M2004IA-LMBG was designed for infiltration anesthetic injection training involving the first molar buccal gingiva. The lower first molar was considered to be absent, and a glass filter (diameter 7mm) was positioned in the gingivobuccal fold. The SGM thickness was 2mm. The SGM and URJ were not glued within a 15mm radius of the glass filter. The bulge formation after 0.5ml solution injection is presented in Figure 4.

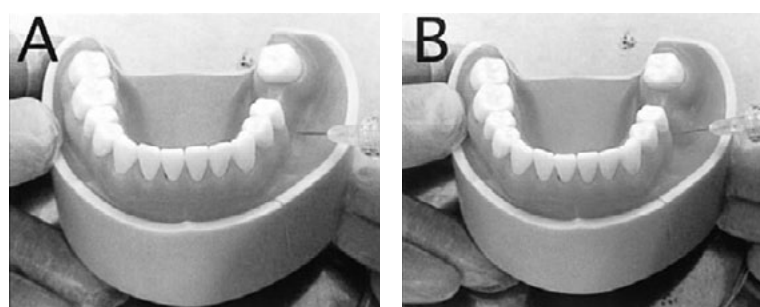


Fig.4 Bulge formation after 0.5ml solution injection with lower molar buccal gingival model (Model-2004IA-LMBG)

A : At the start of injection

B : At the end of the 0.5ml injection

2) Injection pressures of the M2004IA-LMBG

Injection pressures for delivery of 0.5ml of solution over approximately 90 seconds were 5.3 ± 2.3 mmHg (mean $\pm$ SD, $n=3$) one second after the start of injection, 29.3 ± 4.6 mmHg at 3 seconds, 109.2 ± 12.0 mmHg at 10 seconds, 223.9 ± 18.2 mmHg at 30 seconds, 295.9 ± 20.7 mmHg at 60 seconds, and 357.2 ± 15.0 mmHg at the end of the 0.5ml injection (Fig. 5).

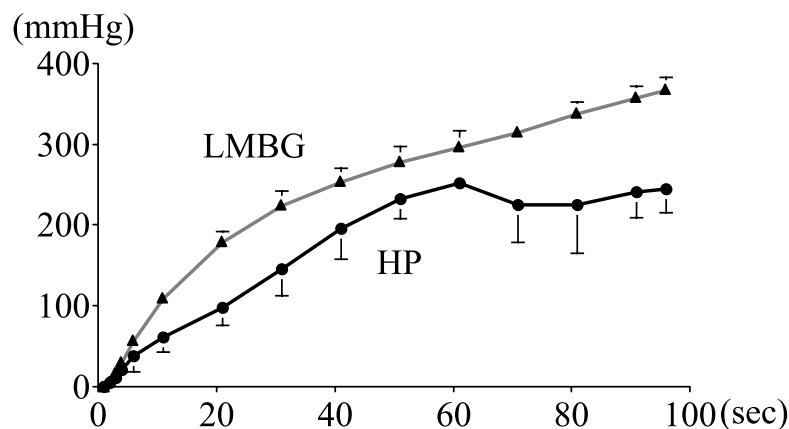


Fig.5 Results of injection pressures with the injection speed 0.5ml/90seconds for Model-2004IA-HP (n=3) and Model-2004IA-LMBG (n=3)

Discussion

The M2004IA, the newly developed infiltration anesthetic injection training apparatus, enabled the injection of solution into SGM. The M2004IA allows practice in low-pressure injection (approximately 250–350 mmHg) of 0.5ml of solution over 90 seconds. Injection conditions for conventional dental local anesthetics in pharmaceutical references state only that it is necessary to “inject very slowly with low pressure”, and there are no specific guidelines for the proper speed and pressure of an injection. A previous investigation (Kudo et al., 2004), which employed 0.5ml of local anesthetic (0.0000125% epinephrine) delivered via a 30G needle under the mucosa, produced pressures of 250 mmHg three seconds after the start of the injection reaching 550 mmHg at the end of injection. At the point of the initial injection, a pressure < 300 mmHg appears to be effective in terms of the absence of pain generation; moreover, pressures < 345 mmHg do not create anxiety in human volunteers, and pressures < 325 mmHg do not cause discomfort (Kudo et al., 2004).

The pressures recorded following the start of injection with M2004IA-HP were 5.3 mmHg at one second, 21.3 mmHg at three seconds, and 241.3mmHg at 0.5ml, and with M2004IA-LMBG they were 5.3 mmHg at one second, 29.3 mmHg at three seconds, and 357.2mmHg at 0.5ml. These values approximate the actual injection pressures in previously reported (Kudo et al., 2004) infiltration anesthetic injections suggesting that this novel device, M2004IA, is effective in generating injection pressures similar to those actually experienced by patients. This model is further suitable for low-pressure injection training although leakage was observed from a hole in the SGM due to a puncture and from the joint between the glass filter and URJ during injection.

From 1981 to 1986, a 5-year dental school pre-clinical training program in dental anesthesiology was performed involving localized anesthetic injections in the clinical training with respect to infiltration and periodontal anesthesia by trainees mutually performing injections in the lower front teeth and conducting anesthesia for the foramen mandibulae as well as in the infraorbital foramen by mutual training. However, Shimada et al documented incidental symptoms such as neurogenic shock and vasovagal syncope during such training (Shimada et al., 2005). Conducting anesthetic injections in the infraorbital foramen was discontinued in 1987 because of such incidents during injection training (Kudo et al., 2002).

The previous conduction anesthesia / needle injection model [M1993CA (Kudo et al., 2002) : developed in 1993, manufactured by Nissin Dental Products, Inc.] was introduced into clinical training in 1994, and the M1993CA was incorporated into a Pre-clinical training system (PCTS) for clinical injection training. Upon injection, the needle tip contacts electrodes in the device causing a lamp to light up and a buzzer to beep. The electrodes were arranged in the URJ and coated with SMG. In the upper jaw, the electrodes were positioned in the infraorbital foramen, incisive foramen and greater palatine foramen in the maxilla. In the lower jaw, the electrodes were positioned 5 mm above the foramen mandibulae and in the foramen mentale.

In pre-clinical training, the model was primarily utilized for needle insertion training for inferior alveolar nerve conduction

anesthetic injection in the foramen mandibulae. The most significant issue regarding the M1993CA corresponded to rupture of the SGM in the anterior ramus mandibulae following approximately 30 needle injections. In 1998, an improved model, M1998CA, was developed, it was characterized by the utility of a removable silicon mucosa in the anterior ramus mandibulae. Further, the silicon mucosa simulated the anatomical structure in conjunction with adjusted electrode placement. Electrodes were placed in the neck of the mandible of the URJ to enable Gow-Gate method training. The M1998CA posed several challenges: rusting of electrodes due to water-mediated electric currents, SGM rupture at the site of the needle insertion and undesirable lifting of SGM at the anterior ramus of the mandible. Presently, we are in the process of developing a further improved model. This new model, M2005CA, will offer improved durability of SGM; and additionally, SGM lifting will be eliminated.

Since 2001, clinical training in infiltration anesthesia and periodontal anesthesia of the lower anterior teeth and inferior alveolar nerve conduction anesthesia has been conducted exclusively with an injection training model. With full implementation of Objective Structured Clinical Examination (OSCE) scheduled for 2006, practical training in infiltration anesthetic injection is a necessity for 4th-year dental students. It is impossible to simulate actual patient sensation in reaction to injection with the models. However, dentists must recognize patient emotions, these involve a fear of injection needles, fear of pain, and fear of post-injection discomfort. Further, the medical staff involved, including dental hygienists, must exercise caution when handling syringes and needles in the presence of needle and injection phobic patients (Kudo et al., 2001). Shiny metal syringes, glass-type syringes, pistol-shaped syringes, and large syringes should be kept concealed from dental phobic patients (Kudo et al., 2001), children, and mentally disabled persons (Kudo et al., 2002). We have previously documented cases where patient anxiety intensified pain (Kudo et al., 2002; Ohke et al., 2002).

Most fatal medical accidents in the dental field occur during treatment following local anesthetic injection (Kaku et al., 2001). Uncertain ties in the administration of local anesthesia increases this kind of risk during dental treatment, and the addition of a vasoconstrictor to local anesthetics is necessary. The Japanese Society of Hypertension notes that reliable local anesthetic injections are more desirable for dental patients with hypertension than prohibiting the use of localized anesthetic injections consisting of epinephrine. The warnings and cautions sections of pharmaceutical reference materials for local anesthetic agent manuals state that "in rare cases patients may develop shock syndrome or poisoning. Before applying anesthetic agents, patient health conditions need to be fully assessed and it is necessary to always be prepared for emergency care and treatments." To prepare for such situations, the application of an AED in the resuscitation procedure during the first 10 minutes of in-office sudden cardiac arrest as well as participation in medication injection workshops is highly desirable.

Pain-free local anesthetic injections, low-pressure injections, and educational training is essential to promote safe dental treatment under local anesthesia. The newly developed M2004IA enables the simulation of authentic infiltration anesthetic injection. Intensive efforts in to ensure safety and with respect to the contents of continuing pre-clinical training in infiltration anesthetic injection may be anticipated with the introduction of the M2004IA. The current goal is to improve the M2004IA further for low-pressure injections with real-time measurements of the injection pressure. Presently, an improved infiltration anesthetic injection model is in the process of development. The M2004IA will offer improved durability of SGM to prevent leakage of anesthetic solution.

Conclusion

A new dental training model (M2004IA) for infiltration local anesthetic injection of solution was developed. The injection pressure of the M2004IA-HP was 241.3 ± 32.1 mmHg at the end of a 0.5ml injection over approximately 90 seconds. Pressures involved in M2004IA-LMBG injections were 5.3 ± 2.3 mmHg at one second from the start of injection, 29.3 ± 4.6 mmHg at 3 seconds, and 357.2 ± 15.0 mmHg at the end of the 0.5ml injection. The newly developed M2004IA enables the simulation of authentic infiltration anesthetic injections.

Acknowledgement

Development of the infiltration anesthetic injection training model was supported by the 2002 dental department budget

(committee for simulation training : PCT budget). We sincerely appreciate the assistance of the late Professor Koichi Matsuda, dean of the school of dentistry and head of the Simulation Training Committee of the school of dentistry in 2001, who strove for the introduction of this model. Additionally, we appreciate the efforts of Dr. Tsutomu Ishijima, Dr. Tomofumi Kawakami, Dr. Yuji Ibaraki, and all members of the 2001–2002 Simulation Training Committee in the school of dentistry.

References

- Hochman M, Chiarello D, Hochman CB, Lopatkin R and Pergola S. Computerized local anesthetic delivery vs. traditional syringe technique. *New York State Dental Journal* 1997 August/September : 24–29, 1997.
- Kaku Y, Cho M, Araki Y, Hosonuma H, Kobayashi K and Shibutani K. A review on articles related to anesthesia-related accidents and lawsuits published in newspapers and magazines between 1980 and 2004. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 32 : 34–42, 2004.
- Kudo M, Ohke H, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. Effects of injection pressure and injection speed on anxiety and pain during gingival submucosal infiltration anesthesia. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 32 : 49–54, 2004.
- Kudo K, Ohke H, Kawai T, Takagaki M, Katagiri K, Tateyama C, Kokubu M and Shinya N. Discomfort during dental local anesthetic injections correlated to pressure at the start of injection. *Higashi Nippon Dental J* 23 : 183–188, 2004.
- Kudo K, Ohke H, Kawai T, Kato M, Kokubu M and Shinya N. Dental local anesthetic injection simulation in dental anesthetic education – Educational effects in applying simulation models in clinical training –. *Higashi Nippon Dental J* 21 : 275–279, 2002.
- Kudo K, Ohke H, Kawai T, Kato M, Kokubu M and Shinya N. Pain, state-anxiety, and percentage of success in clinical practice of venous puncture and cannulation – Examination of mutual practice with fifth grade in Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido –. *Higashi Nippon Dental J* 21 : 127–135, 2002.
- Kudo M, Ohke H, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. Visual properties of dental local anesthetic injection needles can increase discomfort and anxiety. *Higashi Nippon Dental J* 21 : 75–79, 2002.
- Kudo M, Ohke H, Katagiri K, Sato Y, Kawai T, Kato M, Kokubu M and Shinya N. 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. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 29 : 173–178, 2001.
- Kudo M, Ohke H, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. The relationship between Trait Anxiety and Pain Sensation. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 28 : 587–593, 2000. (*Anesth Prog* 48 : 97–98, 2001.)
- Ohke H, Kudo M, Kato M, Kawai T, Kokubu M and Shinya N. Effects of thinner dental disposable injection needle and nitrous oxide inhalation sedation on pain relief in the puncture of the oral mucosa. *Higashi Nippon Dental J* 21 : 261–266, 2002.
- Pashley EL, Nelson R and Pashley DH. Pressures created by dental injections. *J Dent Res.* 60 : 1742–1748, 1981.
- Rood JP. The pressures created by inferior alveolar injections. *Br Dent J* 144 : 280–282, 1978.
- Shimada R, Noguchi I, Takano K, Sasao M, Sekita S and Fukayama H. A questionnaire study of clinical training of inferior alveolar nerve blocks. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 33 : 95–99, 2005.

〔原 著〕

成長期ラット顎関節円板におけるversican isoform mRNAの発現
—TaqMan probeを用いたreal-time quantitative PCRによる分析—鳥谷 奈保子¹⁾, 荒川 俊哉²⁾, 田隈 泰信²⁾, 安彦 善裕³⁾, 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生化学講座³⁾北海道医療大学歯学部口腔病理学講座mRNA expression for versican isoforms in temporomandibular
joint discs of growing rats
— Analysis using real-time quantitative PCR with the TaqMan probe —Naoko TORIYA¹⁾, Toshiya ARAKAWA²⁾, Taishin TAKUMA²⁾,
Yshihiro ABIKO³⁾ and Itaru MIZOGUCHI¹⁾¹⁾Departments of Orthodontics, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.²⁾Department of Oral Biochemistry, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.³⁾Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

Abstract

Versican is a large chondroitin sulphate proteoglycan distributed in a variety of interstitial connective tissue. Versican is thought to be involved in extracellular matrix assembly and various biological cellular interactions. This study examined mRNA expression of versican isoforms in the temporomandibular joint (TMJ) disc of growing rats using a real-time quantitative PCR (QPCR). Male Wistar rats of 2, 4, 8, 16 and 24 weeks of age were used. Total RNA was isolated from the TMJ discs, and cDNA was generated by reverse transcriptase (RT) reaction. The quantitative analysis of mRNA expression of the target genes, QPCR, was performed using sequence specific TaqMan probes. The copy number of versican was calculated by an external standard (plasmid including target cDNA diluted serially in log steps from 10^8 to 10 copies) and was normalized to a reference cDNA, GAPDH. The QPCR showed that expression for versican mRNA was highest at 2 weeks and decreased thereafter. With respect to mRNA expressions for each versican isoform, the mRNA expression of V0, V1, and V3 gradually decreased with the growth, while the expression of V2 increased up to 8 weeks and decreased after that. The mRNA expression of each versican isoform showed age-related changes in the TMJ discs of growing rats.

Key words : Versican · Real-time quantitative PCR · Temporomandibular joint disc

要 旨

Versicanは、大型のコンドロイチン硫酸proteoglycanで、様々な間質性結合組織に分布する。Versicanは、細胞外基質の構築や様々な生物学的細胞間相互作用に関係する。本研究では、成長期ラットの顎関節円板における

受付：平成17年3月31日

versican isoformのmRNA発現をreal-time quantitative PCR (QPCR)を用いて検討した。実験動物として、生後2週、4週、8週、16週、24週齢の雄性のWistar系ラットを用い、顎関節円板よりtotal RNAを抽出し、reverse transcriptase (RT)によりcDNAを調整した。目的遺伝子のmRNA発現のQPCRは、その遺伝子配列の特異的な

TaqMan probeを用いて行った。Versicanのコピー数は、目的遺伝子の配列を含んだplasmidを 10^8 から 10 コピーまで連続希釈して作製した標準試料とGAPDHによって計算した。QPCRによりversican mRNAの発現は、生後2週齢において最も高く、その後徐々に減少した。また、それぞれのversican isoformのmRNA発現は、V0, V1およびV3では成長と共に徐々に減少し、一方、V2では生後8週齢まで増加し、その後減少した。ラット顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現は、成長に伴い変化することが明らかとなった。

緒 言

顎関節は、側頭骨と下顎骨を連結する関節であり、生体の関節の中でも最も複雑な形態および機能を有する。解剖学的に顎関節は、側頭骨下顎窩・関節結節、下顎骨下顎頭、関節円板、円板後部組織、滑膜、靱帯等から構成される(Bell, 1990)。機能的にみると、顎関節は回転運動と前後的な滑走運動とを営むことから、ginglymoarthrodial jointに分類される。

顎関節の構成要素のひとつである顎関節円板は、側頭骨と下顎頭の間に介在する線維性の緻密結合組織である。顎関節円板は、関節面を完全に被覆し、関節腔を上下に分けている。したがって、顎関節は、側頭骨と円板間の上関節、および円板と下顎頭間の下関節からなる複合関節であるとみなすことができ、上関節は主に滑走運動を、下関節は回転運動を営む(Bell, 1990)。関節円板は、顎関節の滑走、回転運動によって生じる複雑な機能を吸収・分散し、関節の円滑な運動を可能としている(Osborn, 1985; Tanaka et al., 1994)。もし、顎関節円板

に基質的な変化(脆弱化, 変形および転位)が生じた場合には、顎関節の円滑な運動が阻害され、顎関節症のひとつである顎関節内障(internal derangement; I.D.)を生じる(Scapino, 1983; De Bont et al., 1986; Stegenga et al., 1991)。

顎関節円板の主要な細胞外マトリックスはcollagenとproteoglycanである(Kopp, 1976; Mills et al., 1988; Fujita and Hoshino, 1989; Nakano and Scott, 1989; Scott et al., 1989; Gage et al., 1990; Milam et al., 1991; Nakano et al., 1993; Scott et al., 1995; Landesberg et al., 1996; Nakano and Scott, 1996; Mao et al., 1998; Mizoguchi et al., 1998; Sindelar, 2000; Kuwabara et al., 2002)。Proteoglycanは、core proteinとそれに付着する糖鎖(glycosaminoglycan; GAG)からなり、core proteinの特徴から大きく2つのタイプ、すなわちmodular proteoglycanとsmall leucine-rich proteoglycanとに分けられる(Iozzo and Murdoch, 1996)。Modular proteoglycanに属するversicanは線維芽細胞から産生され(Zimmermann and Ruoslahti, 1989)、core proteinの分子量は350から550kDに達し、最大で20本前後のchondroitin sulphate側鎖を有する(Yamagata et al., 1993; Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995)。Versicanは、脳、軟骨、大動脈、皮膚、腱、等の様々な組織に分布し(Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994)、組織の形態維持、細胞増殖(Yamagata et al., 1993; Zimmermann et al., 1994)、細胞接着(Yamagata et al., 1989; 1993; 1994; Ang, 1999)、細胞遊走(LeBaron, 1992; Landolt et al., 1995)などの機能に関与していることが明らかとなった(Wight, 2002)(図1)。

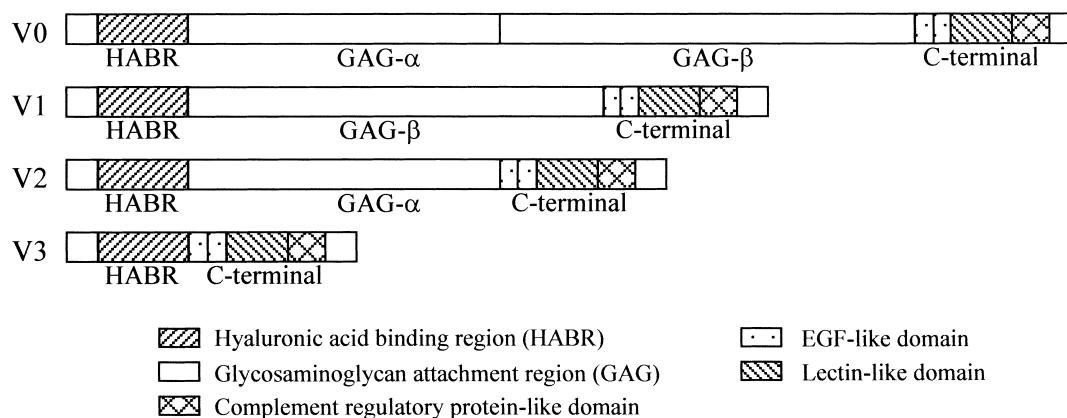


図1 Versicanの4つのisoformの模式図

VersicanはN-末端側からヒアルロン酸結合部位(HABR)、グリコサミノグリカン鎖が結合するGAG-αdomainとGAG-βdomain、そしてEGF-like domain, complement regulatory protein-like domein, lectin-like domeinから構成されるC-terminalから成り、グリコサミノグリカン鎖結合領域のsplicingによる4つのisoformのV0, V1, V2, V3が存在する。

表1 PrimerおよびTaqMan probeの設計

versican	GenBank accession	#AF072892	sequence	Length (bp)	Tm (°C)
forward primer	VC-F		cctgcaagaagggaacagttg	21	58.5
	F-0		aaaacaacttccaacctaagagtt	26	55.8
	F-1		gggtgagaaccctgtatcgt	20	55.4
reverse primer	VC-R		ttcaaaggcttggcatttc	22	54.8
	R-0		cctcactgtgatatatgtctatttcg	26	57.3
	R-2		gtaggatagcaggtgcctccat	22	60.4
TaqMan probe	Taq-VC		tgcggccaacccctgtgt	20	62.5
	TaqR-116		tgtcagggtgggaatttggtccctgcc	26	65.2
	TaqR-141		cagtaggcatacaatctatcaggagagg	32	65.7
	Taq-183		tgatctctgcaaaacaacctgcct	27	60.5

rat GAPDH	GenBank accession	#AB017801	sequence	Length (bp)	Tm (°C)
forward primer	GAPDH-F		tgcaccaccaactgcttagc	20	58.4
reverse primer	GAPDH-R		ggcatggactgtggtcatgag	21	60.4
TaqMan probe	Taq-GAPDH		cctggccaaggtcatccatgacaactt	27	63.5

表2 PrimerとTaqMan probeとの組合せ

	primer combination	TaqMan probe	amplicon size (bp)
VC	VC-F and VC-R	Taq-VC	66
V0	F-0 and R-0	TaqR-116	268
V1	F-1 and R-0	TaqR-141	240
V2	F-0 and R-2	Taq-183	161
V3	F-1 and R-2	Taq-183	133
GAPDH	GAPDH-F and GAPDH-R	Taq-GAPDH	87

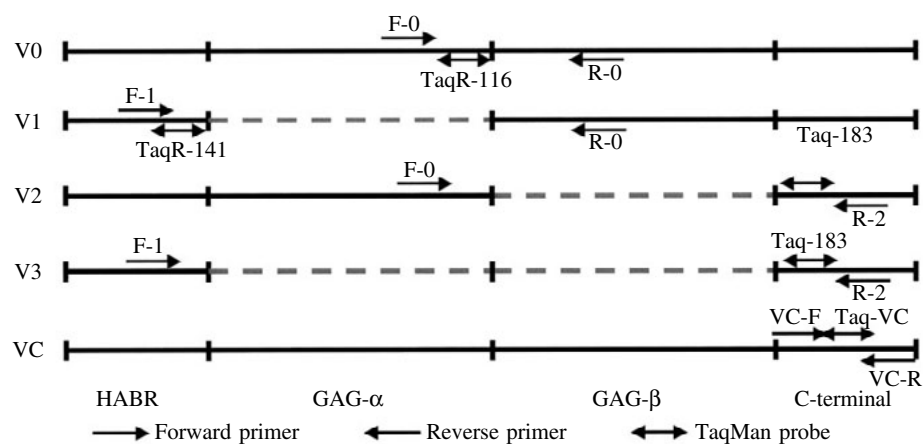


図2 PrimerとTaqMan probeの位置および組合せ
 2種類のForward primer (F-0, F-1) と2種類のreverse primer (R-0, R-2) の計4種類のprimerの組合せにより, versican isoformの4種類を検出することができる。

Versicanは関節円板においても豊富に存在すること (Mao et al., 1998; Mizoguchi et al., 1998), および成長に伴いversicanのmRNAとタンパク質発現が減少することが明らかにされている (Toriya et al., 2005). しかし, 成長に伴うversicanの各isoformの遺伝子発現の変化に関しては不明である.

本研究では, 顎関節円板の細胞外マトリックスの特性を明らかにすることを目的として, hydrolysis probe (TaqMan probe) を用いたreal-time quantitative polymerase chain reaction (real-time QPCR) 法により, versican isoform mRNAの発現の変化を検討した.

なお, 本研究では, versican mRNAの定量実験に先立ち, real-time QPCRの2つの方法の定量性, 感度に関して比較検討も行った.

【実験動物および方法】

実験動物には, 生後2週, 4週, 8週, 16週および24週齢の雄性 Wistar系ラットを用いた. なお, 生後(0週齢)のラット顎関節円板については, mRNAの定量に必要な試料を採取することが困難であること, およびこの時期では円板と下顎頭軟骨線維層が癒合しており, 円板の摘出が困難であったことから, 実験対象から除いた.

1. Total RNAの抽出とreverse transcription (RT) 反応

生後2週齢から24週齢までのラットより採取した顎関節円板および生後8週齢のラット脳組織からRNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いてtotal RNAを抽出した.

表3 PCRの反応条件

	denaturation	annealing	extension
LightCycler	95°C, 2min	60°C, 15sec	72°C, 30sec
GeneAmp	95°C, 10min	60°C, 1min	95°C, 15sec

なお, genomic DNAの試量への混入を防止するため, total RNAの抽出過程でRNase-free DNase (Qiagen) 処理を行った. 抽出されたtotal RNAに対しOmniscript reverse transcriptase protocol (Qiagen) を用いてRT反応を行った.

2. PrimerおよびTaqMan probeの設計

次に, rat versican分子のC-terminal (VC), rat versican isoform (V0, V1, V2, V3) およびrat GAPDHを検出できるprimerとTaqMan probeを設計した (表1). Versican isoformの識別のためには, 4種類のprimerと3種類のTaqMan probeとの組合せを適用した (図2, 表2).

Amplicon sizeは, V0で286bp, V1で240bp, V2で161bp, V3で133bpである. 各primerを用いてPCRを行い, 調整したcDNAをそれぞれplasmid pDrive (Qiagen) にsubcloningし, mRNA定量のための標準試料を作製した.

なお, primerの設計には, Primer Expression software (version 1.0, Applied Biosystems, Foster, CA, USA) を用いた.

3. Real-time QPCR法の感度の検討

Real-time QPCR法によるmRNAの定量化の方法および条件を確立するため, VCとrat GAPDHの標準試料から, 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料を作製した. この連続希釈系試料を用いてLightCyclerによるTaqMan probe法およびGeneAmp 5700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) によるTaqMan probe法を適用し, 最適な反応条件および2つの方法の定量性と感度を検討した.

QPCR法の条件は表3に示す. また, DNAポリメラーゼとして, LightCyclerによるTaqMan probe法ではPlatinum Taq DNA Polymelase (Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A.), GeneAmp 5700 Sequence Detection SystemによるTaqMan probe法ではAmpliTaQ Gold (Applied Biosystems) を用いた.

4. 顎関節円板におけるversican mRNAの定量

生後2週, 4週, 8週, 16週および24週齢のラットより摘出した関節円板からtotal RNAを抽出し, RT反応およびTaqMan probeを用いたreal-time QPCRを行った. VC, versican isoformおよびGAPDHに対するcDNAの連続希釈系 10^1 から 10^8 コピー数の連続希釈系試料を用いて各分子のmRNAを定量化後, GAPDHのコピー数に対するversican cDNAのコピー数を算出した.

結 果

1. Real-time QPCR法の定量性と感度

LightCyclerにTaqMan probeを用いた方法では, 10^2 コピー数以上でDNA濃度とcycle数に直線的な関係が認められた. その相関係数は0.997, slope値は3.62であった (data not shown). 電気泳動の結果では, 10^1 およびnegative controlにおいて非特異的なPCR産物が生成されていたが, 蛍光反応は認められなかった.

GeneAmp 5700 Sequence Detection SystemにTaqMan probeを用いた方法では, 10^1 コピー数以上でDNA濃度とcycle数に直線的な関係が認められ, その相関係数は

0.999, slope値は 3.37 (data not shown). 電気泳動の結果では, 10^1 コピー以上の濃度で特異的なPCR産物が生成されていることが確認された. Negative controlでは, 非特異的なPCR産物が生成されていたが, 蛍光反応は認められなかった.

2. 顎関節円板におけるversican mRNAの発現

GAPDH 10^4 コピー当りの試料中のVC cDNA濃度を定量した結果, ラット顎関節円板におけるversican mRNAの総発現量は, 2週齢以降徐々に減少していき, 16週齢よりほぼ一定となる傾向が認められた (図3).

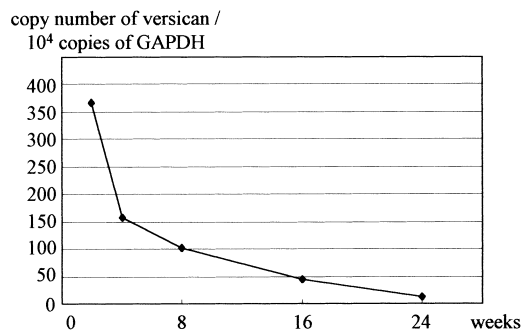


図3 Versican mRNAの総発現量の変化

ラット顎関節円板におけるversican mRNAの総発現量は, 2週齢以降徐々に減少していき, 16週齢よりほぼ一定となる傾向が認められた.

Versican isoform (V0, V1, V2, V3) それぞれのmRNA発現は, V0, V1, V3 において生後2週より成長に伴い減少した (図4). V2のmRNA発現は生後8週まで増加し, その後減少した.

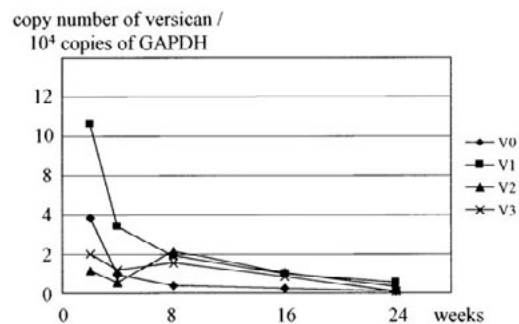


図4 Versican isoformのmRNAの発現量の変化

V0, V1, V3 のmRNA発現は生後2週より成長に伴い減少した. V2 のmRNA発現は生後8週まで増加し, その後減少した.

Versicanの4つのisoformの中で, V1のmRNA発現が生後2週から24週の期間を通してversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった (図5).

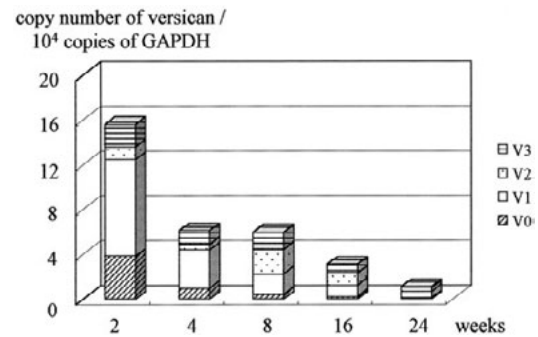


図5 Versican isoformのmRNA発現の割合

Versicanの4つのisoformの中で, V1のmRNA発現が生後2週から32週の期間を通してversican全体のmRNA発現に占める割合が大きかった.

考 察

1. Real-time QPCRを用いたmRNAの定量

従来, mRNAの定量化を目的として, Northern blot法, RNase protection法およびcompetitive PCR法が一般的に用いられてきた (Yin et al., 2001). これらの方法は, 電気泳動, 膜転写, probe作製などの時間のかかる煩雑な過程があること, および比較的多量のcDNA試料を必要とするという欠点がある. 近年, 一塩基多型 (SNP) の検出, 未知の疾患原因遺伝子の同定等を目的として real-time QPCRという新しい定量的PCR法が開発された. この方法は, (1)高い表面積をもつ硝子細管と定常的な温度域の無いkineticな温度変化による反応時間の短縮, (2)蛍光システムによるreal-timeでの計測, (3)反応のend pointではなく, 反応中の継続的な計測による正確な定量化という特徴を有し, 迅速で正確な定量化PCRを可能にしている (Wittwer et al., 2001).

Real-time QPCRには, 以下に示す3つの方法がある (Meuer et al., 2001). (1)dsDNA, すなわちPCR産物に結合することによって蛍光を生じるSYBR Green Iという色素を用いる方法 (Yin et al., 2001), (2)forwardおよびreverse primer間に特異的な配列のprobeを設計し, その両端に蛍光色素とそのquencher色素を付けたprobeを反応させ, Taq polymeraseの5'-exonuclease活性によってprobeが加水分解され, 両端の色素が離れることによって蛍光を発することを利用する方法, および(3)primer間に特異的な配列をもつ2つのhybridization probeを反応させFRET反応を利用する方法である. TaqMan probe法では, dimerおよび非特異なPCR産物が反応中に形成されても, 目的とするcDNAに特異的なprobeがそれらには結合しないため, 理論的には非特異な蛍光の発生は生じない (Kreuzer et al., 2000; Yin et al., 2001). 従って, 低濃度のcDNAをターゲットとする場合には, より感度の高

いTaqMan probe法を適用する必要があることが指摘されている (Yin et al., 2001). 本研究においてもGeneAmp 5700を用いてTaqMan probe法を適用した場合には、少なくとも 10^3 コピー数までのcDNAの定量が可能であることが明らかになった。そこで本研究では、低濃度のcDNA数でも正確な定量が可能なGeneAmp 5700を用いたTaqMan probe法を適用した。

2. Versican isoformのmRNA発現の組織特異性

Modular proteoglycanであるversicanは、ヒアルロン酸結合領域 (Hyaluronate Binding Region ; HABR), GAG鎖が共有結合する α ドメイン (GAG- α), β ドメイン (GAG- β), および上皮成長因子様ドメイン (EGF-like domain), レクチン様ドメイン (lectin-like domain), 補体調節タンパク質様ドメイン (Complement regulatory protein-like domain) を含むC-terminalから構成される (Zimmermann and Ruoslahti, 1989). 分子生物学的解析から, versicanには, RNA splicingによる4つのisoformが存在することが明らかにされ, α および β ドメインを含む versican V0, α ドメインの欠如した V1, β ドメインが欠如した V2, および両ドメインが欠如した V3 が存在する (Shinomura et al., 1993; Zimmermann et al., 1994; Ito et al., 1995; Zako et al., 1995; Sztrölovics et al., 2002). このversican isoformの比率は, 組織によって異なる割合で存在する. たとえば, 線維性結合組織では V0 が, 脳組織では V2 (Schmalfeldt et al., 1998) が多く存在する. 本研究の結果から, 顎関節円板の主要なversican isoformは, 実験期間を通じて V1 であったが, このことは, 顎関節円板が主に線維芽細胞から構成されること (Mills et al., 1988) によるものと考えられる.

3. Versicanの顎関節円板における遺伝子発現の変化

本研究でのQPCRの結果から, versican mRNA発現が生後2週齢をピークとして加齢に伴い減少していた. この結果は, 他の結合組織である関節軟骨, 膝靱帯, 皮膚, 椎間板, 骨におけるすべてのisoformを含めたtotal versicanのmRNA発現に関する報告 (Melching et al., 1997; Hart et al., 1998; Carrino et al., 2000; Melrose et al. 2001; Grzesik et al. 2002) と一致していた.

一方, 最近の研究によると, versicanの成長に伴う発現はversicanのisoformによって異なることが報告されている (Milev et al., 1998). Versicanの α ドメインと β ドメインに対する2つの抗体を用いた生化学的研究 (Milev et al., 1998) によると, versicanの β ドメインを含むisoformであるV0およびV1は, 出生時をピークとし, 2週齢ま

で急速に減少, その後減少は少し緩やかとなり, 約8週齢で一定となったとしている. また, α ドメインを含むV0およびV2では, 出生の約5日前をピークとし2週齢までわずかに減少, その後約16週齢まで徐々に増加し, その後ほぼ一定となった.

本研究での各isoformの発現の割合をみると, 2週齢ではV0が24.5%, V1が55.2%, V2が7.4%, V3が12.9%であるのに対し, 24週齢ではV0が9.8%, V1が50.3%, V2が3.5%, V3が9.4%であり, V2の比率が加齢に伴い増加傾向を示し, 前述したMilevらの報告と類似した傾向を示した.

4. 顎関節内障とversican

整形外科学の領域において関節内障 (Internal Derangement; I.D.) は, 「関節表層に介在する軟組織によって関節の円滑な運動が阻害された状態」と定義されている. 顎関節内障の原因としては, 円板の転位, 癒着, 退行性あるいは炎症性疾患などがあるが, 最も頻度の高い原因は円板の転位である (Scapino, 1983). 近年, 顎関節内障を含む顎関節症の患者の増加とその若年化傾向が歯科学全体での大きな問題となっており, その原因の究明が求められている. 矯正歯科の領域においても, 顎関節症の一つである下顎頭の退行性変化によって, 重度の骨格型の下顎後退症, あるいは非対称を引き起こすことが報告されているが (Schellhas et al., 1993), 顎関節内障の発症に関する正確なメカニズムは不明である.

近年, 顎関節内障のような慢性疾患では, 環境と宿主という2つの因子間における相互バランスの破綻によって発病するという考えが提唱されてきており, 環境要因として, パラファンクション, 慢性的外傷, 咬合異常等が危険因子として指摘されている (Osborn, 1985; Stegenga et al., 1991). 一方, 宿主要因として, 軟食摂取あるいは咀嚼機能の低下による顎関節組織の脆弱化, すなわち組織のメカニカルストレスに対する抵抗性の低下が指摘されているが (Osborn, 1985), この点に関する基礎的知見は極めて乏しい.

結合組織の粘弾性などの物理特性は, collagenやproteoglycanといった細胞外基質の組成によって決まっており (Jurvelin, 1988; Danielson et al., 1997; Tanaka et al., 2003), 円板の基質的变化を伴う顎関節内障の病態には, 細胞外基質の組成の変化が大きく関与していることが考えられる.

Versicanの機能に関しては, 細胞接着においてamino-terminal (G1) ドメインとの関連による非接着性 (Ang et al., 1999; Yang et al., 1999) およびG3ドメインによる接

着性促進 (Wu et al. 2002), また, 細胞増殖促進 (Zhang et al., 1998, 1999), 細胞移動 (Henderson et al., 1997; Camenisch et al., 2000), G1ドメインとhyaluronanの結合による細胞外マトリックスの構築 (Wight et al., 1991) などの生物学的機能が報告されている。さらに, 弾性線維構築への関連性としてfibulin-1, fibulin-2と相互作用 (Aspberg et al., 1999; Olin et al., 2001), fburilinと相互作用 (Isogai et al., 2002), 成長現象に関連するECMのremodeling (Westergren-Thorsson et al., 1998), などの機能を有することも報告されている (Wight, 2002)。

Versican の機能のひとつとして, 他の細胞外マトリックスと結合することによる, 細胞外基質の構築および組織への機械的特性の付与がある。Versicanはtenascinおよびヒアルロン酸と結合すること (LeBaron et al., 1992) が知られている。顎関節内障の原因の一つとして, ヒアルロン酸と磷脂質による関節潤滑システムの破綻が指摘されている (Nitzan and Etsion, 2002)。この仮説によれば, 関節に過剰な負荷が加わる条件下ではヒアルロン酸と磷脂質が破壊され, 関節面での摩擦抵抗が増加し, 円板周囲組織の緩みや円板の位置的変位, すなわち顎関節内障を引き起こすとしている。

ヒアルロン酸以外にも弾性線維系を構成するオキシラン線維, エロウニン線維, および弾性線維との組織学的共存から, versicanとの生物学的関連性が注目されている。弾性線維系は, elastinとmicrofibrilから構成され, 前者のelastinは血管や肺などの繰り返しの伸展を営む組織において多く存在し, 組織に弾性を付与するタンパク質である。また, microfibrilにはmicrofibril-associated glycoprotein (MAGP) (Kumaratilake et al., 1994), およびfibrillin-1 (Sakai et al., 1986) が含まれ, これらは弾性線維系におけるversicanのligand候補としても考えられている (Zimmermann et al., 1994)。弾性線維系はヒト顎関節円板組織にも存在することが知られているが, 特に, 円板後部結合組織において最も密度が高いとされている (木野, 1989)。顎関節の前方, あるいは回転運動の際, 円板は顎頭に同調して前方に変位し, 円板後方付着部には繰り返しの伸展・復元運動が加わる。もし, 円板の弾性特性が低下すれば, 円板は復位性, あるいは非復位性の転位を示すことになり, 顎関節内障を引き起こす可能性が考えられる。Versicanと組織の機械的強度との関係に関して, 動脈ではV0 isoformの減少が血管壁の粘弾性と被圧縮性を低下させ, 動脈の変形を惹起する事が報告されている (Theocharis et al., 2001)。また, V3 isoformを過剰発現させるとelastin-binding proteinの発現および弾性線維の合成が促進されることが報告されている

(Hinek et al., 2004)。したがって, 円板における弾性線維系およびversicanの動態は, 顎関節内障の発症のメカニズムに関与している可能性がある。今後は, 弾性線維系分子, および他の主要なproteoglycanであるdecorin, biglycan, fibromodulin, lumican, chondroadherin, aggrecan, syndecan, perlecanなどを指標として, ラット顎関節円板の成長変化, 食性あるいは顎関節の力学的環境の人為的改変などによる影響について検討していき, 顎関節内障の発症のメカニズムを解明していきたいと考えている。

結 論

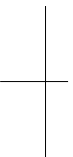
ラット顎関節円板におけるversican isoformのmRNA発現は, 成長に伴い変化することが明らかとなった。これには, ラットの成長に伴う顎機能系の発達による顎関節の力学的環境要因の変化が関与しているものと考えられる。

文 献

- Ang LC, Zhang Y, Cao L, Yang BL, Young B, Kiani C, Lee V, Allan K and Yang BB : Versican enhances locomotion of astrocytoma cells and reduces cell adhesion through its G1 domain. *J Neuropathol Exp Neurol* 58 : 597-605, 1999.
- Aspberg A, Adam S, Kostka G, Timpl R and Heinegard D : Fibulin-1 is a ligand for the C-type lectin domains of aggrecan and versican. *J Biol Chem* 274 : 20444-20449, 1999.
- Bell WH(1990)Normal craniomandibular structure. In "Temporomandibular Disorders : Classification, Diagnosis, Management", ed.by W.E. Bell, Year Book Medical Publishers, London, Chicago : 18-37, 1999.
- Camenisch TD, Spicer AP, Brehm-Gibson T, Biesterfeldt J, Augustine ML, Calabro A, Jr., Kubalak S, Klewer SE and McDonald JA : Disruption of hyaluronan synthase-2abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J Clin Invest* 106 : 349-360, 2000.
- Carino DA, Sorrell JM and Caplan AI : Age-related changes in the proteoglycans of human skin. *Arch Biochem Biophys* 373 : 91-101, 2000.
- Danielson KG, Baribault H, Holmes DF, Graham H, Kadler KE and Iozzo RV : Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J Cell Biol* 136 : 729-743, 1997.
- De Bont LG, Blankestijn J, van der Kuijl B and Boering G : The role of the articular disk in temporomandibular joint disorders. *Ned Tijdschr Tandheelkd* 93 : 345-350, 1986.
- Fujita S, Hoshino K : Histochemical and immunohistochemical studies on the articular disk of the temporomandibular joint in rats. *Acta Anat* 134 : 26-30, 1989.
- Gage JP, Viridi AS, Triffitt JT, Howlett CR and Francis MJ : Presence of type III collagen in disc attachments of human temporomandibular

- lar joint. *Arch Oral Biol* 35 : 283–288, 1990.
- Grzesik WJ, Frazier CR, Shapiro JR, Sponseller PD, Robey PG and Fedarko NS : Age-related changes in human bone proteoglycan structure. Impact of osteogenesis imperfecta. *J Biol Chem* 277 : 43638–43647, 2002.
- Hart DA, Sciore P, Boykiw R and Reno C : Pregnancy induces complex changes in the the pattern of mRNA expression in knee ligaments of the adolescent rabbit. *Matrix Biol* 17 : 21–34, 1998.
- Helen M. : The development of teeth in the albino rats. *Brit Dent J* 76 : 76–86, 1939.
- Henderson DJ, Ybot-Gonzalez P and Copp AJ : Over-expression of the chondroitin sulphate proteoglycan versican is associated with defective neural crest migration in the Pax3 mutant mouse (splotch). *Mech Dev* 69 : 39–51, 1997.
- Hinek A, Braun KR, Liu K, Wang Y and Wight TN : Retrovirally mediated overexpression of versican v3 reverses impaired elastogenesis and heightened proliferation exhibited by fibroblasts from Costello syndrome and Hurler disease patients. *Am J Pathol* 164 : 119–131, 2004.
- Iozzo RV, Murdoch AD : Proteoglycans of the extracellular environment : clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J* 10 : 598–614, 1996.
- Isogai Z, Asperger A, Keene DR, Ono RN, Reinhardt DP and Sakai LY : Versican interacts with fibrillin-1 and links extracellular microfibrils to other connective tissue networks. *J Biol Chem* 277 : 4565–4572, 2002.
- Ito K, Shinomura T, Zako M, Ujita M and Kimata K : Multiple forms of mouse PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan generated by alternative splicing. *J Biol Chem* 270 : 958–965, 1995.
- Jurvelin J, Saamanen AM, Arokoski J, Helminen HJ, Kiviranta I and Tammi M : Biomechanical properties of the canine knee articular cartilage as related to matrix proteoglycans and collagen. *Eng Med* 17 : 157–162, 1988.
- 木野孔司 : 円板後部結合組織における二層部の再検討. 第2報円板部結合組織の線維構成および円板との関係. *日顎関誌* 1 : 43–54, 1989.
- Kopp S : Topographical distribution of sulphated glycosaminoglycans in human temporomandibular joint disks. A histochemical study of an autopsy material. *J Oral Pathol* 5 : 265–276, 1976.
- Kreuzer KA, Bohn A, Lass U, Peters UR and Schmidt CA : Influence of DNA polymerases on quantitative PCR results using TaqMan probe format in the LightCycler instrument. *Mol Cell Probes* 14 : 57–60, 2000.
- 窪木拓男 : 顎関節部負荷ならびに顎関節構造の対負荷特性に関する生物力学的研究. *岡山歯誌* 9 : 179–195, 1990.
- Kumaratilake JS, Gibson MA, Fanning JC and Cleary EG : The tissue distribution of microfibrils reacting with a monospecific antibody to MAGP, the major glycoprotein antigen of elastin-associated microfibrils. *Eur J Cell Biol* 50 : 117–127, 1989.
- Kuwabara M, Takuma T, Scott PG, Dodd CM and Mizoguchi I : Biochemical and immunohistochemical studies of the protein expression and localization of decorin and biglycan in the temporomandibular joint disc of growing rats. *Arch Oral Biol* 47 : 473–480, 2002.
- Landesberg R, Takeuchi E and Puzas JE : Cellular, biochemical and molecular characterization of the bovine temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 41 : 761–767, 1996.
- Landolt RM, Vaughan L, Winterhalter KH and Zimmermann DR : Versican is selectively expressed in embryonic tissues that act as barriers to neural crest cell migration and axon outgrowth. *Development* 121 : 2303–2312, 1995.
- LeBaron RG, Zimmermann DR and Ruoslahti E : Hyaluronate binding properties of versican. *J Biol Chem* 267 : 10003–10010, 1992.
- Mao JJ, Rahemtulla F and Scott PG : Proteoglycan expression in the rat temporomandibular joint in response to unilateral bite raise. *J Dent Res* 77 : 1520–1528, 1998.
- Melching LI, Cs-Szabo G and Roughley PJ : Analysis of proteoglycan messages in human articular cartilage by a competitive PCR technique. *Matrix Biol* 16 : 1–11, 1997.
- Milam SB, Klebe RJ, Triplett RG and Herbert D : Characterization of the extracellular matrix of the primate temporomandibular joint. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 381–391, 1991.
- Milev P, Maurel P, Chiba A, Mevissen M, Popp S, Yamaguchi Y, Margolis RK and Margolis RU : Differential regulation of expression of hyaluronan-binding proteoglycans in developing brain : aggrecan, versican, neurocan, and brevican. *Biochem Biophys Res Commun* 247 : 207–212, 1998.
- Mills DK, Daniel JC and Scapino R : Histological features and in-vitro proteoglycan synthesis in the rabbit craniomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 33 : 195–202, 1988.
- Mizoguchi I, Scott PG, Dodd CM, Rahemtulla F, Sasano Y, Kuwabara M, Satoh S, Saitoh S, Hatakeyama Y, Kagayama M and Mitani H : An immunohistochemical study of the localization of biglycan, decorin and large chondroitin-sulphate proteoglycan in adult rat temporomandibular joint disc. *Arch Oral Biol* 43 : 889–898, 1998.
- Nakano T, Imai S, Koga T, Dodd CM, and Scott PG : Monoclonal antibodies to the large chondroitin sulphate proteoglycan from bovine temporomandibular joint disc. *Matrix* 13 : 243–254, 1993.
- Nakano T, Scott PG : Changes in the chemical composition of the bovine temporomandibular joint disc with age. *Arch Oral Biol* 41 : 845–853, 1996.
- Nakano T, Scott PG : A quantitative chemical study of glycosaminoglycans in the articular disc of the bovine temporomandibular joint. *Arch Oral Biol* 34 : 749–757, 1989.
- Nitzan DW, Etsion I : Adhesive force : the underlying cause of the disc anchorage to the fossa and/or eminence in the temporomandibular joint—a new concept. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31 : 94–99, 2002.
- Olin AI, Morgelin M, Sasaki T, Timpl R, Heinegard D and Asperger A : The proteoglycans aggrecan and Versican form networks with fibulin-2 through their lectin domain binding. *J Biol Chem* 276 : 1253–1261, 2001.
- Osborn JW : The disc of the human temporomandibular joint : design, function and failure. *J Oral Rehabil* 12 : 279–293, 1985.
- Sakai LY, Keene DR and Engvall E : Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 103 : 2499–2509, 1986.
- Scapino RP : Histopathology associated with malposition of the hu-

- man temporomandibular joint disc. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 55 : 382-397, 1983.
- Schellhas KP, Pollei SR and Wilkes CH : Pediatric internal derangements of the temporomandibular joint : effect on facial development. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 104 : 51-59, 1993.
- Schmalfeldt M, Dours-Zimmermann MT, Winterhalter KH and Zimmermann DR : Versican V2 is a major extracellular matrix component of the mature bovine brain. *J Biol Chem*. 273 : 15758-15764, 1998.
- Scott PG, Dodd CM, Ghahary A, Shen YJ and Tredget EE : Fibroblasts from post-burn hypertrophic scar tissue synthesize less decorin than normal dermal fibroblasts. *Clin Sci* 94 : 541-547, 1998.
- Scott PG, Nakano T and Dodd CM : Small proteoglycans from different regions of the fibrocartilaginous temporomandibular joint disc. *Biochim Biophys Acta* 1244 : 121-128, 1995.
- Scott PG, Nakano T, Dodd CM, Pringle GA and Kuc IM : Proteoglycans of the articular disc of the bovine temporomandibular joint. II. Low molecular weight dermatan sulphate proteoglycan. *Matrix* 9 : 284-292, 1989.
- Shinomura T, Nishida Y, Ito K and Kimata K : cDNA cloning of PG-M, a large chondroitin sulfate proteoglycan expressed during chondrogenesis in chick limb buds. Alternative spliced multiforms of PG-M and their relationships to versican. *J Biol Chem* 268 : 14461-14469, 1993.
- Sindelar BJ, Evanko SO, Alonza T, Herring SW and Wight T : Effects of intraoral splint wear on proteoglycans in the temporomandibular joint disc. *Arch Biochem Biophys* 379 : 64-70, 2000.
- Stegenga B, de Bont LG, Boering G and van Willigen JD : Tissue responses to degenerative changes in the temporomandibular joint : a review. *J Oral Maxillofac Surg* 49 : 1079-1088, 1991.
- Sztrolovics R, Grover J, Cs-Szabo G, Shi SL, Zhang Y, Mort JS and Roughley PJ : The characterization of versican and its message in human articular cartilage and intervertebral disc. *J Orthop Res* 20 : 257-266, 2002.
- Tanaka E, Tanne K and Sakuda M : A three-dimensional finite element model of the mandible including the TMJ and its application to stress analysis in the TMJ during clenching. *Med Eng Phys* 16 : 316-322, 1994.
- Tanaka E, Aoyama J, Tanaka M, Van Eijden T, Sugiyama M, Hanaoka K, Watanabe M and Tanne K : The proteoglycan contents of the temporomandibular joint disc influence its dynamic viscoelastic properties. *J Biomed Mater Res* 65 : 386-392, 2003.
- Toriya N, Takuma T, Arakawa T, Abiko T, Sasano Y, Takahashi I, Sakakura Y, Rahemtulla F and Mizoguchi I : Expression and localization of versican during postnatal development of rat temporomandibular joint disc. *Histochem Cell Biol*, in press, 2005
- Westergren-Thorsson G, Norman M, Björnsson S, Endresen U, Stjernholm Y, Ekman G and Malmström A : Differential expressions of mRNA for proteoglycans, collagens and transforming growth factor- β in the human cervix during pregnancy and involution. *Biochim Biophys Acta* 1406 : 203-213, 1998.
- Wight TN, Heinegard D and Hascall V : Proteoglycans : structure and function. In *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Edited by Hay E. Plenum Press, New York, USA, pp 39-50, 1991.
- Wight TN : Versican : a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol* 14 : 617-623, 2002.
- Wittwer C : Rapid cycle real-time PCR : Methods and applications. In : Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds) *Rapid cycle real-time PCR : Methods and applications*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York : 1-8, 2001.
- Wu Y, Chen L, Zheng PS and Yang BB : β 1-Integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican. *J Biol Chem* 277 : 12294-12301, 2002.
- Yamagata M, Suzuki S, Akiyama SK, Yamada KM and Kimata K : Regulation of cell-substrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates. *J Biol Chem*. 264 : 8012-8018, 1989.
- Yamagata M, Saga S, Kato M, Bernfield M and Kimata K : Selective distributions of proteoglycans and their ligands in pericellular matrix of cultured fibroblasts. Implications for their roles in cell-substratum adhesion. *J Cell Sci* 106 : 55-65, 1993.
- Yamagata M, Kimata K : Repression of a malignant cell-substratum adhesion phenotype by inhibiting the production of the anti-adhesive proteoglycan, PG-M/versican. *J Cell Sci*. 107 : 2581-2590, 1994.
- Yang BL, Zhang Y, Cao L and Yang BB : Cell adhesion and proliferation mediated through the G1 domain of versican. *J Cell Biochem* 72 : 210-220, 1999.
- Yin JL, Shackel NA, Zekry A, McGuinness PH, Richards C, Putten KV, McCaughan GW, Eris JM and Bishop GA : Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorogenic probes or SYBR Green I. *Immunol Cell Biol* 79 : 213-221, 2001.
- Zako M, Shinomura T, Ujita M, Ito K and Kimata K : Expression of PG-M(V3), an alternatively spliced form of PG-M without a chondroitin sulfate attachment in region in mouse and human tissues. *J Biol Chem* 270 : 3914-3918, 1995.
- Zhang Y, Cao L, Kiani C, Yang BL, Hu W and Yang BB : Promotion of chondrocyte proliferation by versican mediated by G1 domain and EGF-like motifs. *J Cell Biochem* 73 : 445-457, 1999.
- Zhang Y, Cao L, Yang BL and Yang BB : The G3 domain of versican enhances cell proliferation via epidermal growth factor-like motifs. *J Biol Chem* 273 : 21342-21351, 1998.
- Zimmermann DR, Dours-Zimmermann MT, Schubert M and Bruckner-Tuderman L : Versican is expressed in the proliferating zone in the epidermis and in association with the elastic network of the dermis. *J Cell Biol* 124 : 817-825, 1994.
- Zimmermann DR, Ruoslahti E : Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *EMBO J* 8 : 2975-2981, 1989.



〔原 著〕

*Porphyromonas gingivalis*の自己融解酵素変異株の性状

鎌口 有秀, 宮川 博史, 中澤 太

北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室

Characterization of an autolysin mutant of *Porphyromonas gingivalis*

Arihide Kamaguchi, Hiroshi Miyakawa and Futoshi Nakazawa

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The results of a BLAST search for autolysin indicated that one ORF was indentified as an autolysin which had 39% homology (58/147 amino acids) with the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase like protein of *Clostridium tetani*. This autolysin mutant of *Porphyromonas gingivalis* was constructed by alleic exchange. The growth curve of the autolysin mutant was the same as that of parent strain. However, the morphology of the autolysin mutant altered into chain forms at the early log-phase.

These results indicate that this autolysin may play an important role in cell division in *P. gingivalis*.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, autolysin, autolysis, growth

緒 言

*Porphyromonas gingivalis*は成人性歯周炎の主原因細菌の1つであり、線毛、内毒素、アルギニン特異的システインプロテアーゼ (Rgp), リジン特異的システインプロテアーゼ (Kgp) など多くの病原因子が報告されている (Slots and Genco, 1984. Slots, 1982). *P. gingivalis*は発育の為にエネルギー源として糖を利用できず、代わりにタンパク質を利用する (Takahashi et al., 2000). Rgp, Kgpは病原因子として働くことに加え、外部のタンパク質をプロセッシングし、プロセッシングを受けたタンパク質はその後、種々のペプチダーゼにより分解され菌体内にとりこまれ、エネルギー源として利用される (Kadowaki et al., 1998. Nakayama et al., 1996. Nelson et al., 1999). 細菌の細胞壁はペプチドグリカン主成分とする厚い膜であり、増殖時にはこのペプチドグリカンの一部を切断し、そこに新しいペプチドグリカン構成成分を連結させる。この古いペプチドグリカンを切断する

酵素が murein (glycan) hydrolase である。しかし、この酵素は過剰に働くと自己融解を起こす (Shungu and Shockman, 1979)。Kamaguchiらは先に *P. gingivalis* は *in vitro* において、増殖後、著しい自己融解を起こすこと、また、自己融解に伴い菌体外に多く遊離されるタンパク質の中に *P. gingivalis* の主要な病原因子である Rgp 等が存在することを報告した。これらの結果から、*P. gingivalis* は自己融解後もその Rgp によって成人性歯周炎の進行に重大な影響を及ぼしていることが示唆された (Kamaguchi et al., 2004)。 *P. gingivalis* の自己融解の機構を明らかにすることは本菌の生理作用の解明のみならず、病原性の解明にもつながる重要な課題である。しかし、*P. gingivalis* の自己融解の開始シグナルとなる因子および、関与する酵素については明らかにされていない。そこで、*P. gingivalis* の主要な自己融解酵素を解明する目的で、*P. gingivalis* と他の細菌の自己融解酵素とのホモロジーの高い遺伝子を検索し、ついで *P. gingivalis* の自己融解酵素の変異株を作成し、その性状を検

受付：平成17年3月31日

討した。

方 法

供試菌株と培養方法

P. gingivalis ATCC 33277株 (American Type Culture Collectionより購入), B4株 (自己融解酵素変異株: 今回作製), KDP112 (*rgpA*, *rgpB* 変異株), KDP129株 (*kgp* 変異株), KDP136株 (*rgpA*, *rgpB*, *kgp* 変異株) (これら3株は長崎大学, 中山浩次先生より分与) をイーストエキストラクト, ヘミン, メナジオン添加 tryptic soy broth (TYHM培地) で嫌氣的に培養した. *Escherichia coli* JM109 (タカラバイオ株式会社より購入), DH5 α (タカラバイオ株式会社より購入), pKD355 (中山浩次先生より分与) はLuria-Bertani (LB) 液体培地または寒天平板培地にて好氣的に培養した. LB培地は必要時にはアンピシリン (100 μ g/ml) またはエリスロマイシン (300 μ g/ml) を添加した.

供試プラスミドと抽出方法

pGEM (T easy vector, Promega Corporation), pGEM-K1 (*P. gingivalis* 自己融解酵素遺伝子含有, 今回作製), pGEM-K2 (自己融解酵素遺伝子にBam HIリンカー挿入, 今回作製), pGEM-K5 (Bam HIリンカー含有自己融解酵素遺伝子に*ermF-ermAM* cassetteを挿入, 今回作製), pKD355 (*ermF-ermAM* cassette含有). 各プラスミドをそれぞれの宿主菌にて培養後, Alkaline Lysis Method (Sambrook and Russell, 2001) にて抽出した.

*P. gingivalis*の自己融解酵素遺伝子の検索

*P. gingivalis*の他の細菌の自己融解酵素遺伝子とのホモロジー検索にNCBIのEntrezとTIGR (The Institute for Genomic Research) の*P. gingivais* W83のゲノム・データベースを使用した.

染色体 DNAの抽出

*P. gingivalis*からの染色体DNAはSimthらの方法 (Smith et al., 1989) に従った.

*P. gingivalis*の自己融解酵素変異株の作製方法

*P. gingivalis*の自己融解酵素遺伝子と示唆される部位をpGEM T-easyベクターにライゲーションし, pGEM K1を得た. これにBam HIリンカーを挿入しpGEM K2とした. pGEM K2にpKD355より得た*ermF-ermAM* cassetteを挿入しpGEM K5を得た. pGEM K5を*P. gingivalis* ATCC 33277にエレクトロポレーションにて挿入し, エ

リスロマイシン含有GAM寒天培地に塗抹, 培養後, 得られたコロニーを自己融解酵素変異株とした (Fig. 1).

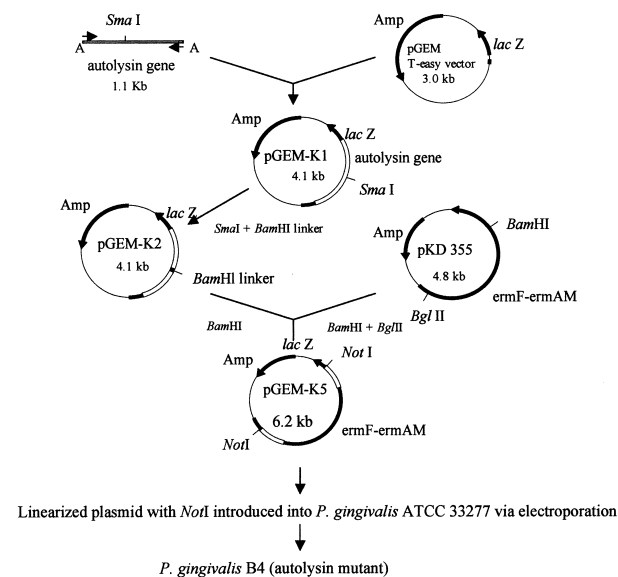


Fig. 1 Construction of a site specific mutant by allelic exchange. The pGEM-K5 containing autolysin gene interrupted by an *ermF-ermAM* cassette. The plasmid was linearized with NotI and introduced into *P. gingivalis* ATCC 33277 by electroporation. *P. gingivalis* was incubated on GAM agar containing erythromycin (10 μ g/ml) for 7 days at 37 $^{\circ}$ C.

*P. gingivalis*の発育曲線の測定方法

試験管 (12mm X100mm) にTYHM液体培地またはTYHM液体培地中のヘミンまたはメナジオンを減量した各培地10mlに一夜培養した各菌を0.5ml接種し, 嫌気培養培養後, 経時的に分光光度計 (U-1800 Spectrophotometer, 日立製作所) にてOD_{600nm}の濁度を測定した.

結 果

自己融解酵素変異株の作製

多くの他の細菌の自己融解酵素のアミノ酸配列と*P. gingivalis*全アミノ酸配列とのホモロジー検索の結果, *Clostridium tetani*のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-likeタンパクと39% (58/147 アミノ酸) のホモロジーがあることがわかった. *P. gingivalis*のこの自己融解酵素遺伝子に対するプライマーペア (Auto F: CGCTCCG AATCTCCCTGACGG, Auto R: TTCGAGGCCGACACTC CGCGC) を作製し, このプライマーペアと*P. gingivalis*染色体DNAをテンプレートとして, 1,094bpのPCR産物を得た. このPCR産物を用いallelic exchangeにより得られた変異株をB4株とした. B4株から抽出した染色体DNAをテンプレートとしてAuto FとAuto Rを用いてPCRを行ったところ3.2Kbpに1本のバンドが検出されたことより, 自己融解酵素遺伝子はダブルクロスオーバー変換により組換え体が生じていることを確認した (Fig. 2).

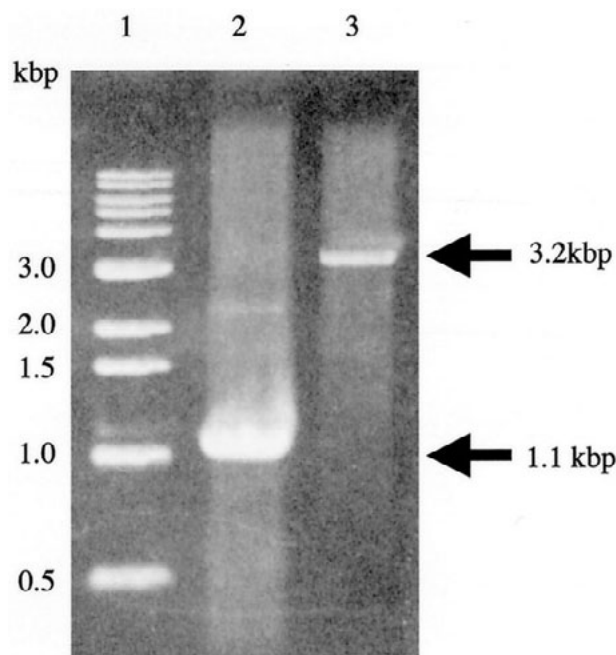


Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR product from *P. gingivalis* ATCC 33277 and B4. *P. gingivalis* ATCC 33277 and B4 were analyzed by PCR using the autolysin gene primer pairs (Auto F and Auto R). Lane1, Mw marker; lane 2, *P. gingivalis* ATCC 33277; Lane 3, *P. gingivalis* B4.

P. gingivalis ATCC33277株とB4株の発育曲線の比較

親株と変異株の発育曲線をTYHM培地を用いて比較したところ、B4株も親株と同様に自己融解し、この遺伝子の変異では自己融解は阻止されないことがわかった (Fig. 3). しかし、対数増殖期の両菌をグラム染色しその形態を比較すると親株はグラム陰性の短桿菌がみられるのに対して、B4株は連鎖した菌が多くみられた (Fig. 4).

ヘミンとメナジオン制限下での発育曲線

P. gingivalis の発育必須因子であるヘミンとメナジオン

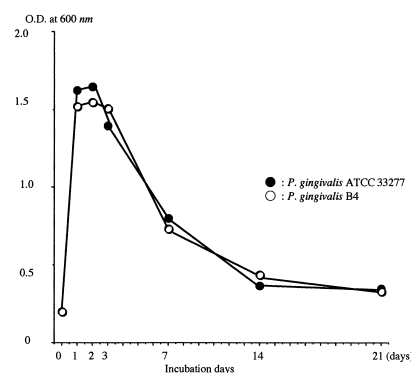


Fig. 3 Growth curve of *P. gingivalis* ATCC 33277 and B4. Overnight cultured cell suspensions of *P. gingivalis* (0.5ml) were inoculated into 10 ml of 3 % tryptic soy broth supplemented with 0.5 % yeast extract, 5 µg / ml hemin and 1 µg / ml menadione, and incubated anaerobically at 37°C for the appropriate number of days. The OD at 600 nm is shown along the y-axis.

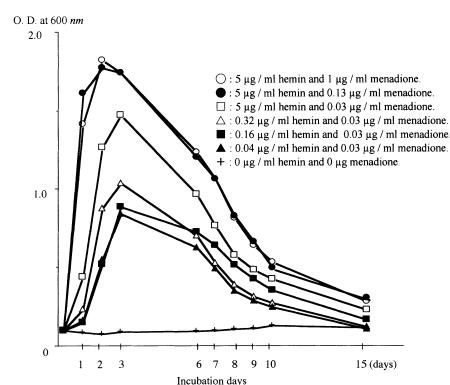


Fig. 5 Effect of hemin and menadione limitation of growth of *P. gingivalis* ATCC 33277. *P. gingivalis* ATCC 33277 was grown anaerobically at 37°C 24 hr in 3 % tryptic soy broth supplemented with 0.5 % yeast extract, 5 µg / ml hemin, and 1 µg / ml menadione. After incubation, cells were harvested by centrifugation at 5,000 g for 20 min and washed with the same volume of 3 % tryptic soy broth supplemented with 0.5 % yeast extract. The cell suspension (0.5 ml) was inoculated into each media, which consisted of 3 % tryptic soy broth, 0.5 % yeast extract, and various amounts of hemin and menadione. Concentration of hemin and menadione were indicated in the Figure. The OD at 600 nm is shown along the y-axis.

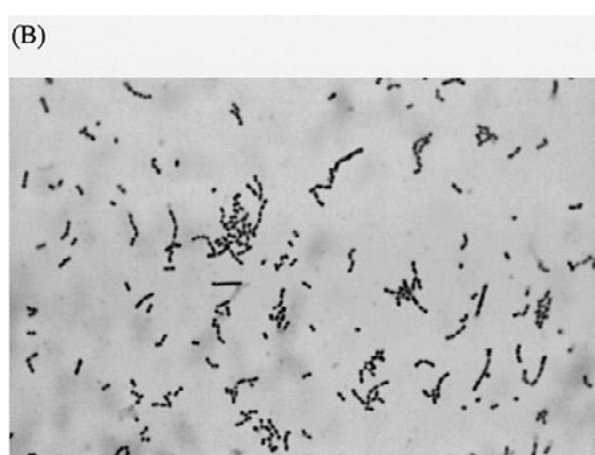


Fig. 4 Microscopic examination of Gram stained *P. gingivalis* ATCC 33277 and the autolysin mutant (B4). *P. gingivalis* ATCC 33277 (A) and B4 (B) were cultured in TYHM broth at 37°C for 10 hr. Each culture was washed with PBS twice and subjected to Gram staining.

ンを減量することにより、低発育状態における自己融解について観察した。ヘミンを5 µg/mlから0.32, 0.16, 0.04, 0 µg/mlと減量し、メナジオンを1 µg/mlから0.13, 0.03, 0 µg/mlと減量した組み合わせを作成し、発育曲線をみたところ、対数増殖期の濁度が1.8から1.45, 1.05, 0.9, 0.85と低下し、また、定常期に達する時間が24時間遅れた。しかし、いずれの培地においても自己融解は観察された (Fig. 5)。

考 察

細菌の自己融解はpeptidoglycan hydrolaseにより起こる。この酵素にはmuramidase, glucosaminidase, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (amidase) と endopeptidaseが含まれる (Smith et al., 2000)。Peptidoglycan hydrolaseは細菌の溶解以外に、抗生物質誘導細菌溶解、細菌の生育、細胞壁の転換、ペプチドグリカンの成熟、細胞の分裂、コンピテント状態、タンパク質分泌、病原性などにも関与するとされている (Smith et al., 2000)。近年、細菌の自己融解は真核細胞でのアポトーシスと同様に細菌のプログラム細胞死である可能性が示唆されている (Lewis, 2000)。自己融解による欠損細胞の除去は周囲の細胞への栄養の供給の可能性に加え、ダメージをうけたDNAを除去することによる集団での変異率を下げることに寄与していることが示唆されている (Lewis, 2000)。*P. gingivalis*は*in vitro*では定常期にはいるとすぐ、著しい濁度の低下が観察される (Kamaguchi et al., 2004)。この自己融解がどのような酵素によって生じるかを明らかにする目的で、他の細菌の自己融解酵素とホモロジー検索を行った結果、*Clostridium tetani*のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-likeタンパク質と39%のホモロジーがあるOpen reading frame (ORF)が検出された。このORFのアミノ酸配列はその他に*Bacillus subtilis*の自己融解酵素中の1つのyubBと32%、*Enterococcus faecalis*のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidaseと31%、*Enterococcus faecalis*の自己融解酵素とも26%のホモロジーがあった。この*P. gingivalis*のORFをgene-directed mutagenesisにより作製した変異株 (B4株)の発育曲線は親株と大きな変化はなかったが、対数増殖期の初期の菌体は親株に比較して連鎖することが観察された。*P. gingivalis*にいくつか存在すると示唆される自己融解酵素のうち、この自己融解酵素は対数増殖期における細胞の分裂に関与することが示唆された。*Lactococcus lactis*のacmB (peptidoglycan hydrolase) 産生は対数増殖期で増加後速やかに低下する。これはこの酵素の転写が細胞発育により制御されていることによると報告されている

(Huard et al., 2003)。*P. gingivalis*のこの自己融解酵素も増殖過程において、産生量に差異がある可能性も考えられた。*L. lactis*のacmBの産生を制御している具体的なものは明らかにされていないが、プロトン・モチープ・フォースが制御している可能性が指摘されている (Huard et al., 2003)。

最近、*P. gingivalis*において自己融解酵素の遺伝子が少なくとも3つ存在する可能性がデータベース上で示唆された (Nelson et al., 2003)。それらの殆どが自己融解の遺伝子として可能性は示唆されているが、その遺伝子産物の性状は不明確である。今回我々が検討した自己融解酵素のDNAおよびアミノ酸シーケンスをそれらと比較した結果、新しく自己融解酵素としての可能性は示唆されたが、性状が未知の自己融解酵素の中の1つと一致した (data not shown)。このことから、今回の実験は*P. gingivalis*の新しい自己融解酵素の性状の一端を変異株を用いて明らかにできたものと思われる。2つ目の自己融解酵素の1つはHayashiら (Hayashi et al., 2002)により報告されたN-acetylmuramoyl-L-alanine amidaseと一致しており、その遺伝子はamiとされている。今回の自己融解酵素遺伝子はDNAおよびアミノ酸のシーケンスにおいてamiとホモロジーはなかったことより、異なる自己融解酵素であることがわかった (data not shown)。Hayashiらもami変異株を作製し、その性状について報告しているが、変異株の発育曲線については述べられていない。ami変異株はvesicleを親株より多く放出することに加え長い連鎖と異常に長い桿菌になるとしている (Hayashi et al., 2002)。今回の自己融解酵素変異株は連鎖するが、異常に長い桿菌はみられず、またvesicle産生量にも変化はみられなかった (data not shown)。自己融解酵素としてデータベース上で可能性が示唆された3つ目の自己融解酵素については物質としての詳細な性状については検討されていない。*Bacillus subtilis*は35のpeptidoglycan hydrolase遺伝子が存在し、11のファミリーに分けられている (Smith et al., 2000)。このことから、*P. gingivalis*も複数の自己融解酵素の存在が考えられ、その中の1つを変異させても他の自己融解酵素が働き自己融解は変化しなかったことが推察された。

*P. gingivalis*において何が自己融解酵素の発現を制御しているか不明であるが、外部の栄養状態が自己融解酵素の発現を制御する可能性が報告されている (Centry et al., 1993)。*E. coli*において、アミノ酸が枯渇すると、発育が遅くなりGuanosin-5' -diphosphate-3' -diphosphate (ppGpp) 合成が活性化され、主な自己融解酵素の活性

が阻害される (Betgner et al., 1990). これは、発育が遅いと抗生物質誘導の自己融解に耐性になる機構とされている (Rodionove and Ishiguro, 1995). *P. gingivalis*においてヘミンおよびメナジオン量を変化させた低発育状態でも自己融解は観察された. このことより, *P. gingivalis*は発育状態に関わらず自己融解を生じることがわかった. この現象は*E. coli*におけるアミノ酸枯渇により自己融解が阻害される機構とは異なるものと思われた. *Staphylococcus aureus*において自己融解はLytS-R, IrgA-B, LytS-LytR, ArlR-ArlSとSarタンパク質ファミリーの2成分系により制御されている (Brunskill and Bayles, 1996. Fournier and Hooper, 2000. Fujimoto and Bayles, 1998. Groicher et al., 2000). さらに, LytS-R, IrgA-BとArlR-Sはこれらのタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターに結合するRATによって制御される (Ingavale et al., 2003). *P. gingivalis*においても何らかの外的因子を2成分系が感知し, 自己融解の制御に関与していることも推察される. *Pseudomonas aeruginosa*においてはクオラムセンシングに関与するオートインジューサー1が自己融解に関与することが, トランスポゾン挿入変異により示された (D'Argenio et al., 2002). *P. gingivalis*においてもオートインジューサー2 (AI-2)によりクオラムセンシングを行うことが報告されていることから (Burgess et al., 2002. Chung et al., 2001. 鎌口他, 2004), AI-2産生に関与する*luxS*変異株と親株との自己融解を比較検討したが, 差異は認められなかった (data not shown).

Kamaguchiらは*P. gingivalis*の産生するRgpとKgpは非常に安定であり, *P. gingivalis*の自己融解後も菌体外に活性を保ったまま遊離され, 成人性歯周炎との重要な関連性を指摘した (Kamaguchi et al., 2004). 菌体外に遊離されたRgp, Kgpと自己融解の関係をみるためRgp, Kgpの遺伝子である*rgpA*, *rgpB*, *kgp*の変異株の発育曲線を検討した. その結果, 親株は著しい濁度の低下が見られるのに対して, *rgpA*, *rgpB*, *kgp*の変異株はOD_{600nm}での濁度が0.9付近で停止した (data not shown). このことより, *P. gingivalis*の自己融解による濁度の低下のうち, 後半の濁度の低下はRgp, Kgpによる自己消化が関与している可能性が示唆された. しかし, *S. aureus*におけるトリトンX-100とペニシリン誘導自己融解においては自己融解酵素の前駆体がプロセシングをうけることが必要であるとされている (Groicher et al., 1993) ことより, *P. gingivalis*においてもRgpやKgpによりプロセシングを受ける必要がある酵素が存在する可能性も否定できない.

*P. gingivalis*の自己融解がバイオフィーム中においても*in vitro*で観察されるように生じるかどうかは不明であるが, ヘミン, メナジオン制限下で, 発育が悪くても自己融解は観察されたことより, 栄養状態が悪いと想定されるバイオフィーム中においても生じるものと考えられた. また, バイオフィーム中における自己融解の重要性として, *P. aeruginosa*においてはバイオフィーム形成に細菌由来のDNAが必要であるとされている (Whichurch et al., 2002). この様に, *P. gingivalis*の自己融解は口腔内でのバイオフィーム形成, 菌の発育および病原性等多面的に関与している可能性が考えられる.

結 語

*P. gingivalis*の自己融解酵素を明らかにする為に, 他の細菌の自己融解酵素とホモロジー検索を行い, *C. tetani*のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-likeタンパク質と高いホモロジーをもつ遺伝子を見いだした. この遺伝子の変異株を作製し, 親株との発育曲線を検討したが, 両菌株間に差異はみられなかった.

これは, 複数存在すると考えられる自己融解酵素のうち, 1つの自己融解酵素の変異のみでは, 自己融解現象には明らかな差異は認められない可能性も示唆された. しかし, 両菌株間の発育時の形態を比較した結果, 変異株は対数増殖期の初期に菌体がレンサする傾向がみられたことより, 少なくとも, この遺伝子産物は一般的な自己融解酵素の性状の1つである, 菌の分裂に関与する性状を保持している可能性が示唆された.

文 献

- Betzner AS, Ferreira LC, Holtje JV and Keck W. Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 55 : 161-164, 1990.
- Brunskill EW and Bayles KW. Identification of LytSR-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 178 : 5810-5812, 1996.
- Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL, Aduse-Opoku, Curtis MA and Camara M. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. Microbiology 148 : 763-772, 2002.
- Chung WO, Park Y, Lamont RJ, McNabe R, Barbieri B and Demuth DR. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. J Bacteriol 183 : 3903-3909, 2001.
- D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB and Pesci EC. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutant. J Bacteriol 184 : 6481-6489, 2002.
- Fournier B and Hooper DC. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity

- of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 182 : 3955–3964, 2000.
- Fujimoto DF and Bayles KW. Opposing roles of the *Staphylococcus aureus* virulence regulators, Agr and Sar, in triton X-100 and penicillin-induced autolysis. J Bacteriol 180 : 3724–3726, 1998.
- Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB and Cashel M. Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^s is positively regulated by ppGpp. J Bacteriol 175 : 7982–7989, 1993.
- Groicher KH, Firek BA, Fujimoto DF and Bayles KW. The *Staphylococcus aureus* IrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. J Bacteriol 182 : 1794–1801, 2000.
- Hayashi J, Hamada N and Kuramitsu HK. The autolysin of *Porphyromonas gingivalis* is involved in outer membrane vesicle release. FEMS Microbiol Lett 216 : 217–222, 2002.
- Huard C, Miranda G, Wessner F, Boltin A, Hansen J, Foster SJ and Chapot-Chartier MP. Characterization of AcMB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. Microbiology 149 : 695–705, 2003.
- Ingavale SS, Wamel WV and Cheung AL. Characterization of RAT, and autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 48 : 1451–1466, 2003.
- Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F, Okamoto K, Abe N and Yamamoto K. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem 273 : 29072–29076, 1998.
- Kamaguchi A, Nakano M, Shoji M, Nakamura R, Sagane Y, Okamoto M, Watanabe T, Ohya T, Ohta M and Nakayama K. Autolysis of *Porphyromonas gingivalis* is accompanied by an increase in several periodontal pathogenic factors in the supernatant. Microbiol Immunol 48 : 541–545, 2004.
- 鎌口有秀, 中村麗子, 大山徹, 渡部俊弘, 岡本公彰, 馬場久衛. *Porphyromonas gingivalis*のRgp (arginine specific cysteine proteinase)発現に対するquorum sensingの影響. 東日本歯学雑誌 22 : 137–148, 2003.
- Lewis K. Programmed Death in Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 : 503–514, 2000.
- Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T and Yamamoto K. Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fibrinolytic activity of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 178 : 2818–2824, 1996.
- Nelson D, Potempa J, Kordula T and Travis J. Purification and characterization of a novel cysteine protease (periodontin) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor. J Biol Chem 274 : 12245–12251, 1999.
- Nelson KE, Fleischmann R, Deboy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE and Fraser CM. Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. J Bacteriol 185 : 5591–5601, 2003.
- Rodionova DG and Ishiguro EE. Direct correlation between overproduction of guanosine 3', 5-bispyrophosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 177 : 4224–4229, 1995.
- Sambrook J, Russell DW, editors. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press : 2001.
- Shungu DL and Shockman. Morphological and physiological of autolytic-defective *Streptococcus faecium* strains. J Bacteriol 138 : 598–608, 1979.
- Slots J and Genco RJ. Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : virulence factors in colonization, survival and tissue destruction. J Dent Res 63 : 412–421, 1984.
- Slots J. Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. In Genco RJ, Mergenhagen SE, editors. Host-parasite interactions in periodontal diseases : American Society for Microbiology, 1982, p27–45.
- Smith GLF, Socransky SS and Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. Oral Microbiol Immunol 4 : 47–51, 1989.
- Smith TJ, Blackman SA and Foster SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis* : multiple enzymes with multiple functions. Microbiology 146 : 249–262, 2000.
- Takahashi N, Sato T and Yamada T. Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 182 : 4704–4710, 2000.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC and Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295 : 1487, 2002.

〔原 著〕

本学ヘリカルCT (ProSpeed F II) における空間分解能の評価

田中 力延, 細川 洋一郎, 大西 隆, 佐野 友昭, 金子 昌幸

北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

Evaluation of the spatial resolution in helical CT (ProSpeed F II)

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

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

Abstract

The image precision of a computed tomograph (CT) installed at our university was evaluated from a dental-clinical view-point. The effective slice width and spatial resolution were measured by photographing 0.3mm diameter microspheres. The results, with a set slice width of 0.6mm, resulted in an effective slice width in a helical pitch of 0.75 of 1.3mm and the spatial resolution was 0.64mm. With a slice width of 1.0mm, the effective slice width in a helical pitch of 0.75 was 0.92mm and the spatial resolution was 1.06mm. The following conclusions were obtained:

1. Even when the set slice width is smaller than 1 mm, the effective slice width is not reduced but it is possible that the smaller width will result in lower precision.
2. With decreasing helical pitch, the difference between the set slice width and the effective slice width decreases.
3. Smaller slice widths, result in better resolution.
4. It was inferred that there is an error of 0.6 - 1mm in the dimensional precision of the images, which are used clinically in the z axis direction.

Key words : Computed tomography, Setting slice width, Effective slice width, Spatial resolution

緒 言

歯科治療におけるCT画像を用いた軟・硬組織形態の把握や寸法計測が広く普及している。特に寸法計測は体表内に存在する病巣の大きさを非観血的に把握できる事や、インプラント埋入時に顎骨の厚みを予測できる等、有効性は高い。現在のCTはX線管の連続回転照射と寝台の連続スライドの組み合わせで、体軸方向に沿ってらせん状に撮像データを連続収集するヘリカルスキャン方式が主流であり、従来の1断層撮影ごとに寝台をずらして間欠的に撮像する方式に比べ広範囲を高速にデータ収集することが可能になってきた。それにより患者の負担

を軽減できるほか、ヘリカルスキャン方式で収集したデータは従来のCT撮像方式と比べて体軸方向に高性能な空間分解能を持つため、高精細な3D画像を作製することが可能となった。本学CTでもヘリカルスキャン方式によって撮像した画像を用いて歯科診療に活用している。

しかしながら、精度向上への鍵となる画像構築のメカニズムは各メーカーに完全に依存した状態であり、歯科で求められる精度は保証されているとは言い難い。つまり、現在普及しているCTの多くは医科用との兼用であり、歯科で多く必要とされる硬組織の解析に特化したものとはいえず、また、インプラント等で要求される数

受付：平成17年3月31日

mm～1 mm以下の寸法精度を評価している報告はみられない。

そこで我々は、歯科臨床的立場からCTに求められる精度を検証することを目的として、本研究を行った。

材料および方法

1. 実験材料と撮像条件

本学付属病院CT装置ProSpeed F II (GE横河メディカルシステム社)にて0.3mm Φ 微小球体(鉛ビーズファントム)を固定し撮像した。

撮影条件は一般的に用いている130kV 150mAs一定として行った。

スライス厚とヘリカルピッチは、スライス厚0.6および1 mm, ヘリカルピッチ0.75および1.50とし、本学付属病院においてインプラント用画像作成の際に用いられ得る条件を採用した。

2. 方法

1) 微小球体法によりSSPzの測定

直径0.3mmの微小球体を撮像し、Slice Sensitivity Profile z-position (SSPz)を求めた。ビーム幅5 mmを対象とし、得られた画像上で球体を中心に直径5 mmのROIを設定し、その中の平均値を球体のCT値とした。ビーム幅の1/20の0.25mmのデータ間隔で40点のデータを得た。横軸に寝台位置、縦軸にCT値の相対値をプロットしてグラフを作成し、裾野のCT値を全体から減じて、裾野がゼロになるように正規化してSSPを得た。

2) SSPzを用いての半値幅の測定

SSPより半値幅(Full Width at Half maximum: FWHM)を求め、これを実効スライス厚として評価した。

3) z-MTFの測定

SSPzをz軸方向のLine Spread Functionとみなしてフーリエ変換を行い、これをz軸方向のModulation Transfer Function (MTF)とし、体軸方向の分解能を評価した。

SSPzにて得られた40点のデータを64点にするため、約12点ずつ左右にゼロを埋めた後、フーリエ変換して、IMABS関数で絶対値を得た。はじめの値で全体を除し、正規化し周波数ゼロがMTF=1とした。このとき周波数間隔は $1/(0.25 \times 64) = 0.0625$ となり、はじめが周波数0 cycles/mm, 2番目は0.0625 cycles/mm, 次は0.125 cycles/mmとなる。よって $0.0625 \times 32 = 2$ cycles/mmまで値が得られる。以上の方法で、MTF曲線を作成し、評価を行った。

結 果

1. SSPz

図1に示す様にヘリカルピッチ1.5よりもピッチ0.75の場合におけるグラフの形状の方が裾野の広がりが大きくなり、また、設定スライス厚0.6mmの時の方が設定スライス厚1 mmのグラフの形状よりも裾野の広がりが大きくなった。

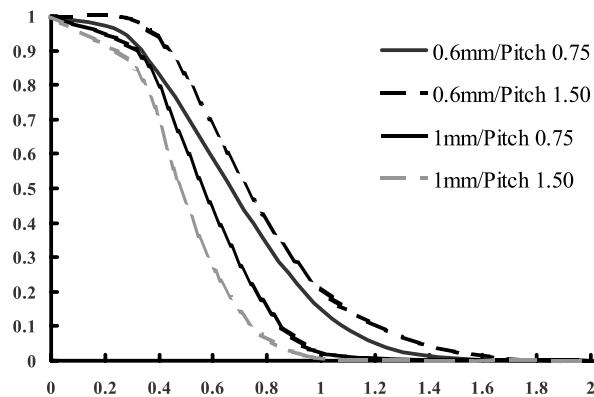


図1 本学CTにおけるSSPz
縦軸0.5に対する横軸の幅までのデータを画像構成に利用する。SSPzは左右に裾野を広げるので、このグラフの2倍の幅値が実効スライス厚となる。

2. 半幅値

半幅値を表1に示す。設定スライス厚が1 mmの時、ヘリカルピッチ0.75では1.06mm, ピッチ1.5では0.92 mmとなり、設定スライス厚に対して実効スライス厚に対する実効スライス厚の誤差が拡大した。また、設定スライス厚が0.6mmの時、ヘリカルピッチ0.75では1.30 mm, ピッチ1.5では1.44mmとなり、設定スライス厚に対して実効スライス厚が大幅に厚くなった。これより、ヘリカルピッチが大きくなると実効スライス厚との差が拡大する傾向になるという結果が得られた。また、設定スライス厚を1 mm以下に小さくしても実効スライス厚は希望される幅まで下がらなかった。

	FWHM
0.6mm Pitch 0.75	1.30mm
0.6mm Pitch 1.50	1.44mm
1.0mm Pitch 0.75	1.06mm
1.0mm Pitch 1.50	0.92mm

表1 本学CTの半幅値
設定スライス厚0.6mmにおいて有効なスライス幅は1 mm以下にならなかった。

3. z-MTF

MTF曲線を図2に、曲線から得られたz軸分解能を表2に示す。設定スライス厚0.6mm、ヘリカルピッチ0.75での撮影条件が最も分解能が高くなった。すなわち、スライス厚が薄いほど分解能が優れた画像を得られ、同様にヘリカルピッチも小さいほど分解能も高くなる結果となった。

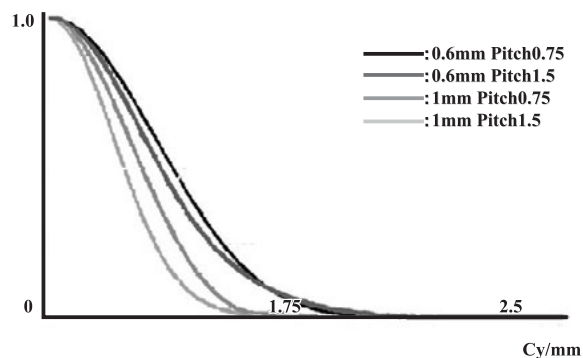


図2 本学CTにおけるzMTF
設定スライス厚とヘリカルピッチが小さいほど空間分解能も高くなった。

	50%MTF	Z軸分解能
0.6mm Pitch 0.75	0.78 cycle/mm	0.64 mm
0.6mm Pitch 1.50	0.65 cycle/mm	0.77 mm
1.0mm Pitch 0.75	0.55 cycle/mm	0.91 mm
1.0mm Pitch 1.50	0.47 cycle/mm	1.06 mm

表2 本学CTの空間分解能
スライス厚が薄く、ヘリカルピッチが小さいほど優れた分解能が得られた。

考 察

1. ヘリカルCTにおけるスライス厚の評価

CT撮像の際、スライス厚は薄ければ薄いほど実物に対する再現性に優れると考えられており（佐藤ら，2004），本学CTにおいても歯科用オーダーは「可能な限り薄く」との依頼が多い。近年ではヘリカル方式の開発によって、らせん状に高速撮像が可能なCT装置が広く普及し、本学でも患者の負担が少ない高性能な情報を提供出来るようになった。それに伴い、画像情報に関する評価方法も多数報告されている（白石，津田，1990）（Polacin et al., 1992；Polacin et al., 1994；Kalender et al., 1994；辻岡，1996；馬場ら，1997）。本実験では花井ら（1997）によって紹介された一般医療施設における汎用

性の高いビーズ法を用いて本学CTのスライス厚や空間分解能を評価した。

スライス厚の設定はエックス線管側と検出器側に二つのスリットを設置する事によりコリメーションを行っている。これにより1mm以下の極薄スライスが可能となったのだが、設定されたスリットの幅（＝設定スライス厚）に対して実際に検出される情報の幅（＝実効スライス厚）は理論上若干拡大される傾向をもつ（図3）。当然、これら2種類のスライス厚は差が小さいほど優れた情報を提供出来ることになる。

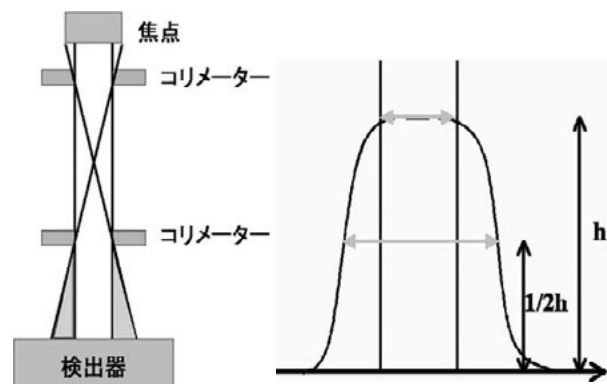


図3 スライス厚の原理
設定されたスライス厚よりも実際には広い範囲で情報が検出される。実際のCT画像では中央の最高感度領域の1/2の感度が得られる幅における情報を画像に構築している。

本実験において、設定したスライス厚が1mm以下になると誤差が拡大する結果となった（表1）。つまり要求したスライス内に多分なデータを含んでいる以上、信頼性が低下することになる。本学CTにおいては「可能な限り薄く」する事は、提供される情報の精度を低下させる原因になると推察された。

また、設定スライス厚1mmにおいてヘリカルピッチを大きくすると、実効スライス厚が薄くなる現象が発生した。これは、①テーブルの移動速度がある程度速いほうが検出した情報を処理するタイミングに合い易い。②フィルタリング再構成補間による影響などが推察されるが、百分の1mm単位の値では測定誤差と考えるほうが自然ではないかと思われた。特に設定スライス厚よりも薄い実効スライス厚となって情報を提供する事は理論的に不可解であることから、今後の検討課題になる結果を残した。

2. 体軸方向への空間分解能の評価

インプラント手術等の外科的手術を前提とする診断や、矯正治療においてCT画像を再構築した三次元（3D）イメージや多断面再構成（multi-planar reconstruction: MPR）像は解剖学的構造を自由に把握することが可能となり、非常に有用性が高い情報を提供できる。特

に解剖学的構造物の位置関係の把握や、距離を正確に測定した上で治療に挑むことは治療成績にも影響を与える。近年では、CTから提供された情報がセファログラムといった従来行われてきた画像情報による計測と比較しても優秀な評価を得られる性能を持つほどに至った(川原ら, 2000; 高根ら, 2001)。

空間分解能は0.5MTFにおける横軸の幅(=規格化空間周波数)を2倍した値の逆数から求められるので、図2に示した線形が右に広がるほど高い分解能を得ることが出来ることになる。本研究では、設定スライス厚が薄く、ヘリカルピッチが小さいほど空間分解能が高くなり、その精度は満足のいく結果となった。

しかしながら、設定スライス厚やヘリカルピッチを下げるのが必ずしも患者の利益に直結するとは限らない。

ヘリカルピッチは以下の式から求められる。

ヘリカルピッチ=エックス線管1回転の間にテーブルが移動する距離/設定スライス厚

従って、テーブルの移動スピードが遅いほど空間分解能を高めることが可能になるのだが、患者の拘束時間や被爆線量も増加することを考慮する必要がある。そこで今回、撮像距離1.2cmで電離箱型線量計(RADCHECK model 106-525, VICTOREEN)にて被爆線量を測定したところ、スライス厚0.6mm(スライス20枚)撮像の場合の吸収線量は0.39mGy、スライス厚1.0mm(スライス12枚)撮像の場合で0.38mGyとなった。その差は0.01mGyで、スライス幅0.6mmと1.0mmの撮像で大きな差があるとは考えられなかった。従って、臨床上スライス幅0.6mmの撮像に大きなリスクがあるとは言えない。

今回の研究では1mm以下に小さくしても、実効スライス厚は減少しないが、スライス厚が薄いほど空間分解能が優れた画像を得られるという結果が得られた。体軸方向への寸法精度は、設定スライス厚に近い分解能であることから、本学CTは0.6~1.0mm程度の誤差を含んでいる情報であるとも考えられが、空間的表示においてソフト面で補正を加えている可能性もあり今後も解決すべき点が多いと思われる。

結 論

本学CTにおいて、歯科臨床的立場から求められる計測値の精度を評価項目として検証した結果、次の結論を得た。

1. 設定スライス厚を1mm以下に小さくしても、実効

スライス厚は下がらない。逆に精度の低下を招く可能性がある。

2. ヘリカルピッチは小さい方が設定スライス厚と実効スライス厚との誤差は低くなる。

3. スライス厚が薄いほど空間分解能が優れた画像を得られる。同様に、ヘリカルピッチが小さいほど分解能も高くなる。

文 献

Kalender WA, Polacin A and Suss C: A comparison of conventional and spiral CT: an experimental study on the detection of spherical lesions. J Comput Assist Tomogr 18: 167-176, 1994.

川原英明, 下田信治, 小林 馨, 他: スパイラルX線CTによる3Dイメージの距離測定精度に関する研究. 日口腔インプラント誌 13: 321-327, 2000.

馬場仁, 広渡諭, 西村弘幸 他: X線CTにおけるスライス感度分布の測定—エアギャップを用いた方法—. 日放技学誌 53: 437-442, 1997.

花井耕蔵, 石田智広, 井田義宏, 他: ラセンCTの物理的な画像特性の評価と測定法に関する報告. 日放技学誌 53: 1714-1732, 1997.

Polacin A, Kalender WA and Marchal G: Evaluation of section sensitivity profiles and image noise in spiral CT. Radiology 185: 29-35, 1992.

Polacin A, Kalender WA and Brink J, et al: Measurement of slice sensitivity profiles in spiral CT. Med Phys 21: 133-140, 1994.

佐藤尚志, 川上俊光, 久保田徹, 曾根可南子: MultiDetector-row CTにおけるz軸の特性評価. 日放技学誌東北部会雑誌 13: 178-181, 2004.

白石順二, 津田和良: CTにおけるスライス厚の測定: partial volume effectを用いた測定法. 日放技学誌 46: 29-34, 1990.

高根ユミ, 一色泰成, 西川慶一: 顔面非対称のX線CT 3次元画像診断における距離計測の信頼性. 歯科学報 101: 1195-1206, 2001.

辻岡勝美: ヘリカルCTシステムの技術的問題点~性能評価と実際の運用~. 日放技学誌 52: 389-396, 1996.

〔原 著〕

Actinobacillus actinomycetemcomitans 感染による
ヒト単球細胞のアポトーシス発現について

杉村 典彦, 加藤 幸紀, 中島 啓介, 古市 保志

北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座

Actinobacillus actinomycetemcomitans induces
apoptosis in human monocytic cells

Norihiko SUGIMURA, Satsuki KATO, Keisuke NAKASHIMA and Yasushi FURUICHI

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

Abstract

We have reported that *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection induced apoptosis in a murine macrophage cell line, J774.1 cells. It is known that the human and murine immune cell response is different because of cell surface structure differences. In addition, mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity is directly involved in apoptosis of infected THP-1 cells. Previous studies have implicated protein kinase C (PKC) as an upstream regulator of MAPK. The aim of this study was to clarify whether human immune cells undergo apoptosis following *A. actinomycetemcomitans* infection.

A. actinomycetemcomitans and human monocytic THP-1 cells (1000:1) were suspended in microtubes. The tubes were centrifuged at 1000 x g for 10 min and incubated at 37°C for 30 min. Non-adherent bacterium were washed out by a series of centrifugations. Infected cells were transferred to a 24-well culture plate, and incubated for 24 h. Culture supernatant and nuclei were prepared from the infected cells to measure for LDH activity, DNA fragmentation, MAPK activity, and tumour necrosis factor α (TNF- α) levels.

A. actinomycetemcomitans-infected THP-1 cells were shown by an increase in the proportion of LDH release, fragmented DNA, p38 MAPK activity and TNF- α levels. The LDH release and DNA fragmentation were inhibited by the addition of p38 MAPK inhibitor (SB203580) or anti-TNF- α antibody or PKC inhibitor (H-7). The TNF- α levels in the infected cells decreased on addition of SB203580 or anti-TNF- α antibody. However, exogenous TNF- α did not induce apoptosis in uninfected THP-1 cells. Further, H-7 suppressed the p38 MAPK activity of the infected cells in a dose-dependent manner, while PKC activator (PMA) enhanced LDH release, DNA fragmentation, and p38 MAPK activity.

These results suggested that the p38 MAPK activity was the most important signal for apoptosis. The p38 MAPK activity was regulated by PKC and TNF- α in *A. actinomycetemcomitans*-infected THP-1 cells.

Key words : human monocytic cells, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, apoptosis

緒 言

歯周病は、歯を支持する歯周組織の破壊により、口腔機能に著しい障害をもたらす疾患である。この歯周病の

発症には、歯周病原性細菌と呼ばれる一部のグラム陰性細菌が深く関与していることが報告されている (Bragd et al., 1987) (Slots and Listgarten, 1988)。歯周病原性細菌の感染と、感染に伴う生体側の持続的な免疫応答の結果

受付：平成17年3月31日

として、歯周組織に炎症が生じると考えられる (Vandestein et al., 1984) (Sandholm, 1985). 歯周病原性細菌のひとつに *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) があり、様々な型の歯周病の発症と進行に関与する (Slots et al., 1980) (Haraszthy et al., 2000) (Muller et al., 2001) (Haubek et al., 2002). *A. actinomycetemcomitans* は、1) 歯肉上皮への侵入、2) ロイコトキシンなどの外毒素による細胞破壊、3) 細胞増殖抑制因子の産生、4) リポ多糖 (lipopolysaccharide, LPS) による細胞活性化、などの能力を有していることが明らかにされている (Henderson et al., 2002). これまで我々は、マウスマクロファージ細胞株である J774.1 細胞に *A. actinomycetemcomitans* を感染させる *in vitro* の実験系を確立したところ、*A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージ細胞に細胞死が惹起されることを明らかにした (Kato et al., 1995). この細胞死は、DNA 断片化の増加、TUNEL 陽性細胞の検出およびカスパーゼ 3 活性の上昇からアポトーシスによるものであることを報告した (Nonaka et al., 2001). また、ヒト口腔上皮細胞株である KB 細胞においても *A. actinomycetemcomitans* の感染によりアポトーシスが誘導されることを明らかにした (Kato et al., 2000). これらの結果から、われわれは *A. actinomycetemcomitans* が歯周組織を構成する細胞に感染すると、まず歯周組織の防御の最前線を担う上皮細胞がアポトーシスによる細胞死に至ることにより、結合組織層に *A. actinomycetemcomitans* が侵入しやすい環境を作る。さらに結合組織層に *A. actinomycetemcomitans* が侵入し、単球/マクロファージ細胞に感染し、その後感染細胞がアポトーシスによる細胞死に至ることで、免疫応答に何らかの影響を及ぼして歯周病の発症と進行に関与している可能性を推測した。しかし、一般にマウス由来免疫細胞とヒト由来免疫細胞とでは、細胞表面の抗原認識レセプターの違いにより、抗原認識における免疫応答が異なることが報告されている (Ferrero et al., 1990). このためヒト免疫細胞における感染後の細胞内情報伝達機構が、マウスマクロファージ細胞とは異なる可能性が考えられる。

近年、リン酸化によって活性化されるセリン/スレオニンキナーゼである mitogen-activated protein kinase (MAPK) がアポトーシス発現における細胞内情報伝達機構に関与するという報告がされた (Xia et al., 1995). MAPK は、放射線、紫外線、浸透圧などの物理的ストレスと腫瘍壊死因子- α (TNF- α)、インターロイキン 1 (IL-1) などの炎症性サイトカインや活性酸素といった化学的ストレスなど様々なストレス刺激により活性化され、細胞にアポトーシスを誘導すると考えられている

(Kyriakis and Avruch, 2001).

アポトーシスをはじめとした細胞の動態変化がサイトカインによって制御されていることが報告されている (Nagata, 1997). その中でも TNF- α は、骨吸収を惹起する過程における破骨細胞活性因子のひとつであり、歯周組織破壊において重要な役割を果たす (Kamaguchi et al., 1989) (MacEwan, 2002) (Stashenko et al., 1991). さらに、*A. actinomycetemcomitans* 感染マウスマクロファージ細胞において、感染前にすでに細胞内には TNF- α mRNA が存在し、感染による刺激によりすみやかに mRNA から翻訳が開始されて細胞外へ産生される (伊藤ら, 2004). また、*A. actinomycetemcomitans* Y4 株由来の LPS 刺激により活性化された末梢血中のヒト単球細胞から TNF- α が産生されることが報告されている (Lindemann et al., 1988).

Nonaka らは、マウスマクロファージ細胞のアポトーシス誘導に protein kinase の中で protein kinase C (PKC) が関与していることを明らかにした (Nonaka et al., 1998). 最近、白血病細胞株である U937 細胞をカルシウムチャンネルブロッカーである tetrandrine で処理するとアポトーシスが発現し、その細胞内情報伝達系において PKC が p38 活性を制御するという報告がされた (Jang et al., 2004).

そこで本研究では、1) *A. actinomycetemcomitans* をヒト単球系細胞である THP-1 細胞に感染させる実験系を確立し、感染細胞のアポトーシス発現について検討する、2) *A. actinomycetemcomitans* 感染ヒト単球細胞のアポトーシス誘導における細胞内情報伝達系について検討を加える、ことを目的とした。

材料および方法

1. 実験材料

1) 供試細胞株

本研究ではヒト骨髄単球性白血病細胞株である THP-1 細胞 (JCRB 0112.1) を用いた。THP-1 細胞は 10% 非働化牛胎仔血清 (FBS; Sigma) とペニシリン (10000 Units/ml, Sigma), ストレプトマイシン (10 mg/ml, Sigma) を含む RPMI 1640 培地 (Sigma) を使用して 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2) 供試細菌株

歯周病原性細菌として *A. actinomycetemcomitans* Y4 株を使用した。*A. actinomycetemcomitans* Y4 株は Todd-Hewitt (Difco) に 1% Yeast Extract (Difco) を加えた培地で 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2. 実験方法

1) 感染実験方法

抗生剤不含RPMI1640培地で調整した*A. actinomycetemcomitans* Y4株を、細菌：細胞比率が500：1, 1000：1, 2500：1となるようにそれぞれマイクロチューブ内のTHP-1細胞に添加し、1000×gで10分間遠心した。遠心後、37℃、5%CO₂存在下で30分間培養した。培養後、細胞に取り込まれなかった菌を取り除くために、遠心操作を用いてペニシリン、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン（200 µg/ml, Sigma）を添加したRPMI1640培地で3回洗浄した。洗浄終了後、細胞を同じ抗生剤を含んだ5%FBS-RPMI1640培地に懸濁し、6穴培養プレート（Becton Dickinson）に播種して培養した。

2) 細胞死の検出方法

(1) LDH活性の測定

細胞死の指標として、Cytotoxicity Detection Kit（Roche）を用いて培養上清中の乳酸脱水素酵素（LDH）活性を測定した。まず感染操作後、24時間培養した後に培養上清を採取した。この上清をサンプルとして使い、キット中の反応溶液を添加し室温で10分間反応させた。その後1N塩酸を添加し反応を停止させたのち、490 nmにおける吸光度を測定しLDH活性の指標とした。

(2) DNA断片化の測定

アポトーシスをおこした細胞では、細胞内にヒストン/DNA断片化複合体が出現する。このヒストン/DNA断片化複合体をCell Death Detection ELISA^{PLUS}（Roche）を用いて検出し、感染細胞内のDNA断片化の定量を行った。

(3) アガロースゲル電気泳動法

感染細胞から抽出したDNAを用いて2%アガロースゲル電気泳動法を行い、アポトーシスの指標となる断片化DNA（ラダーパターン）を検出した。培養終了後、あらかじめ4℃に冷やしておいた10 mM Tris-HCl（pH 7.4）、5 mM EDTA・2Na、1% TritonX-100からなる細胞溶解液に懸濁した。10,000×gで20分間遠心操作を行い、上清に0.5 mg/mlのRNase（Roche）を20 µl加え、37℃で1時間処理した。さらに10 mg/mlのProteinase K（Invitrogen Corp）を加え、50℃にて1時間処理した。さらにフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（25：24：1, v/v）（Gibco）を用いてDNAを抽出し、その後エタノール沈殿を行った。これをDNA緩衝液（10 mM Tris-HCl pH8.0, 1 mM EDTA pH8.0）で溶解し、DNA量を2.0 µg/µlに調整した。このDNAサンプルを2%アガロースゲル上に添加し、Mupid-2（コスモ・バイオ）を用いて100Vの低電圧にて電気泳動を行った。

泳動後、エチジウムブロマイド（1 µg/ml；和光純薬）で染色を行い、DNAを検出した。DNAマーカーとしては、100bp DNA Ladder（タカラバイオ）を用いた。

3) MAPK活性の測定

A. actinomycetemcomitans Y4株を感染させたTHP-1細胞を0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 および24時間培養した。培養後、10 mM Tris-HCl（pH 7.4）、100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM Na₂P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 1% SDS, 0.5% deoxycholate, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail（Sigma）からなる細胞溶解液に懸濁した。この溶解液中のリン酸化したextracellular signal-regulated kinase（ERK）、p38, c-jun N-terminal kinase（JNK）の各MAPKを各ELISA kit（ERK 1/2 ELISA kit, p38 MAPK ELISA kit, JNK 1/2 ELISA kit；BioSource）を用いて測定した。

4) *A. actinomycetemcomitans*感染細胞からのTNF-αの産生

*A. actinomycetemcomitans*感染細胞から産生されるTNF-αについて検討するために、感染12時間後に培養上清中に放出されたTNF-α量をHuman TNF-α ELISA Kit（BioSource）を用いて測定した。また感染実験時に抗TNF-α抗体（anti-human tumor necrosis factor-α antibody, 20 µg/ml；Sigma）を添加して、LDH活性とDNA断片化を測定した。

5) *A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導におけるPKCの影響について

PKC活性阻害剤であるH-7（生化学工業）と活性化剤であるphorbol 12-myristate 13-acetate（PMA；Sigma）を用いて検討を加えた。THP-1細胞にH-7（20 µM）あるいはPMA（10 nM）を添加して30分間培養した。培養後*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させ24時間培養し、LDH活性およびDNA断片化を測定した。

3. 統計処理

各測定値の比較は、unpaired *t*-検定あるいはTukey-KramerのHSD検定により検定を行い、*p* < 0.05を有意差ありと判定した。

結 果

1. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞の細胞死発現について

A. actinomycetemcomitans Y4株に感染したTHP-1細胞のLDH活性は、非感染細胞で0.06±0.01であったのに対して、細菌／細胞比率が500：1のときに0.18±0.05, 1000：1のときに0.29±0.05, 2500：1のときに

0.68±0.04となり、非感染細胞に比べて感染比率の増加に伴って、LDH活性の上昇を認めた。また、感染細胞のDNA断片化を調べたところ、非感染細胞で0.43±0.05であったのに対して、細菌／細胞比率が500：1のときに0.66±0.11, 1000：1のときに0.89±0.08, 2500：1のときに1.34±0.07となり、感染比率の増加に伴いDNA断片化の上昇を認めた（図1）。さらにアガロースゲル電気泳動像において、アポトーシス細胞に特徴的な

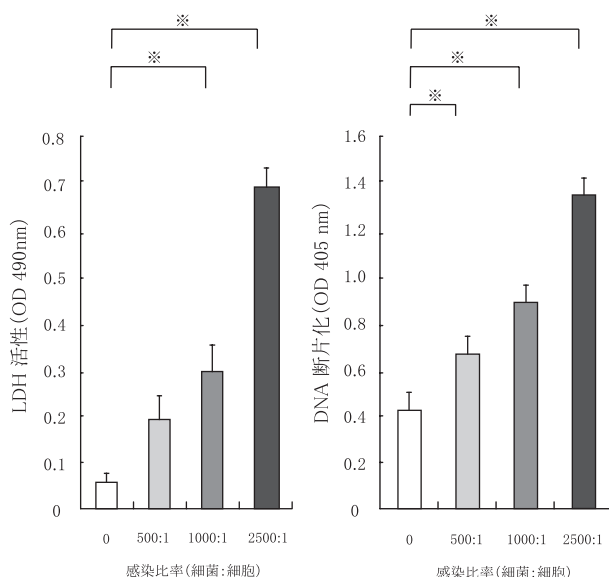


図1 *A. a*感染細胞のLDH活性およびDNA断片化
THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率（細菌：細胞）が0（□）, 500：1（▨）, 1000：1（■）, 2500：1（■）となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性および細胞内のDNA断片化を測定した。* $p < 0.05$ で有意差ありとした。

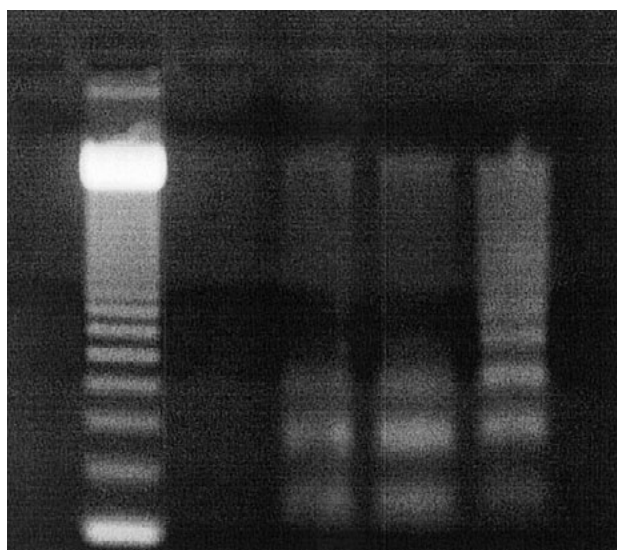


図2 *A. a*感染細胞の断片化DNA所見（2%アガロースゲル電気泳動）
THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率（細菌：細胞）が0, 500：1, 1000：1, 2500：1となるように感染させて36時間培養した。培養後、細胞内からDNAを抽出し、2%アガロースゲル電気泳動により断片化DNAを検出した。

断片化DNA所見（ラダーパターン）が、感染細胞にのみ認められ、その所見は感染比率の増加により鮮明化した（図2）。

2. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるMAPKの影響について

*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるMAPK活性について検討したところ、感染1時間において、非感染細胞におけるp38活性は、110 units/mlであるのに対して、感染細胞では607 units/mlと有意な活性の上昇を認

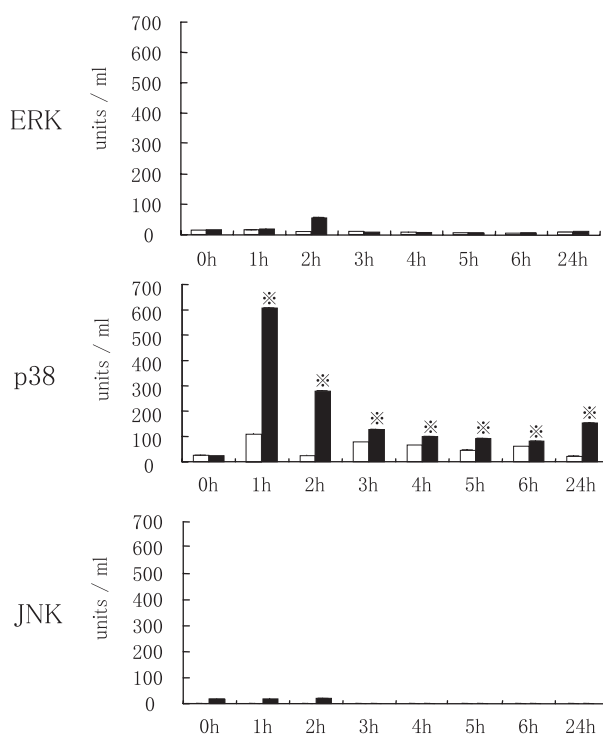


図3 *A. a*感染細胞のMAPKの活性
THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率（細菌：細胞）が1000：1となるように感染し、感染直後を0時間として6時間まで1時間毎に24時間までサンプルを回収した。回収したサンプルの細胞内からDNAを抽出し、ELISA法によりMAPK活性を測定した。非感染群を（□）、感染群（細菌：細胞=1000：1）を（■）で示す。*各時間に採取したサンプルにおいて、非感染群と感染群を比較し、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

め、その後ゆるやかに減少した。一方ERKおよびJNK活性では、非感染細胞、感染細胞ともに有意な活性の上昇は認められなかった（図3）。

3. p38活性阻害剤の感染細胞に与える影響について

これまでの結果から、感染細胞においてp38のみが活性の上昇を示した。そこでp38に着目し、p38活性を特異的に阻害するSB203580（Calbiochem-Novabiochem）を用いて、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるp38活性を阻害した。細胞数を 2×10^6 個/mlに調整したTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans* Y4株を感染させる前にSB203580を添加し、30分間培養した。培養後*A. actinomycetemcomitans* Y4株を細菌：細胞比率が1000：1となるように感染させた。24時間培養後に各種測定を

行った。SB203580を添加した*A. actinomycetemcomitans*感染細胞では、SB203580非添加細胞に比べ、LDH活性の低下が認められた。また、SB203580を添加した*A. actinomycetemcomitans*感染細胞では、SB203580非添加*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に比べ、DNA断片化の減少が認められた（図4）。さらにアガロースゲル電気泳

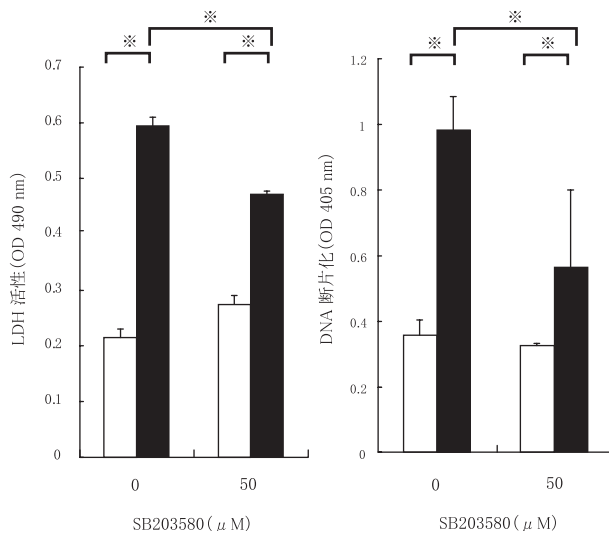
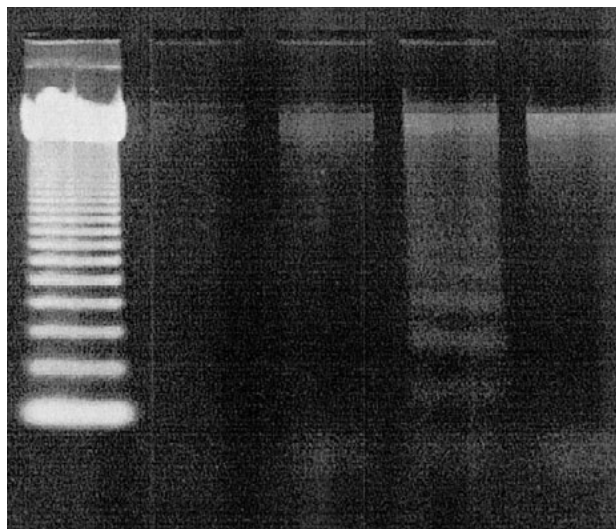


図4 *A. a*感染細胞のSB203580添加によるLDH活性およびDNA断片化への影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にSB203580（50 μM）を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率（細菌：細胞＝1000：1）となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性および細胞内のDNA断片化をELISA法により測定した。非感染群を（□）、感染群（細菌：細胞＝1000：1）を（■）で示す。※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。



感染	—	—	+	+
SB203580 (μM)	0	50	0	50

図5 p38活性阻害による*A. a*感染細胞の断片化DNA所見

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にSB203580（50 μM）を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率（細菌：細胞＝1000：1）となるように感染させて24時間培養した後、細胞内のDNAを採取し、2%アガロースゲル電気泳動法を行った。

動像から、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に認められたDNA断片化所見は、SB203580の添加により消失した（図5）。

4. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞からのTNF-α産生について

*A. actinomycetemcomitans*感染細胞からのTNF-α産生について検討を行った。感染12時間後におけるTNF-α産生量を測定したところ、非感染細胞では95 pg/mlであるのに対し、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞では1220 pg/mlとTNF-α産生の有意な増加を認めた。またこの感染細胞におけるTNF-α産生は、SB203580の添加により有意に減少した（図6）。さらに、抗TNF-α抗体を用いて*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に与える影響を検討したところ、抗TNF-α抗体添加により、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるTNF-α産生の減少が認められた（図7）。加えて、抗TNF-α抗体添加により、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のLDH活性およびDNA断片化は減少した（図8）。抗TNF-α抗体のp38活

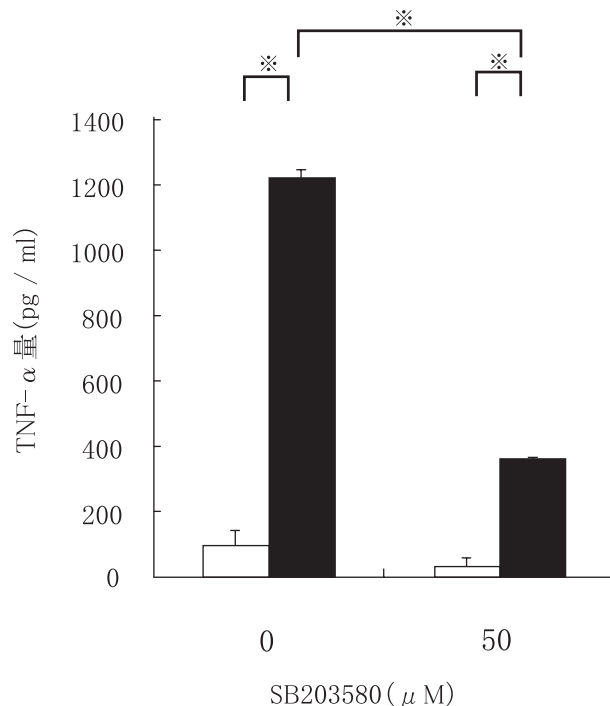


図6 p38活性阻害によるTNF-α産生に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にSB203580（50 μM）を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率（細菌：細胞＝1000：1）となるように感染させて12時間培養した後、培養上清中のTNF-α量をELISA法により測定した。非感染群を（□）、感染群（細菌：細胞＝1000：1）を（■）で示す。※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

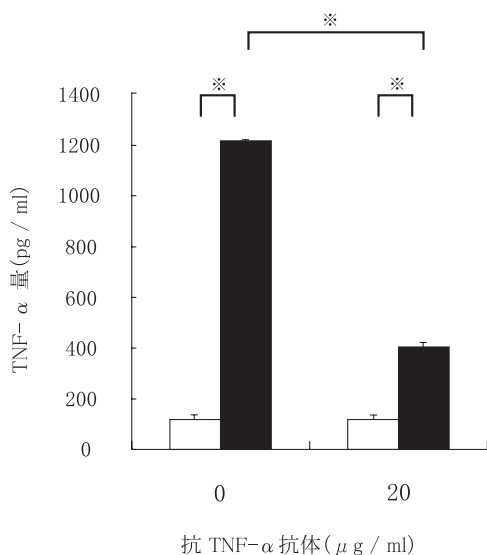


図7 抗TNF-α抗体のTNF-α産生に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前に抗TNF-α抗体 (20μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて12時間培養した後、培養上清中のTNF-α量をELISA法により測定した。非感染群を(□), 感染群 (細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

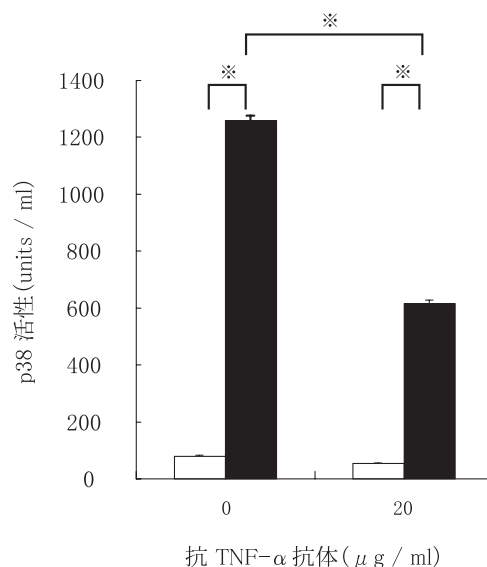


図9 抗TNF-α抗体のp38に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前に抗TNF-α抗体 (20μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて1時間培養した後、細胞内のp38活性をELISA法により測定した。非感染群を(□), 感染群 (細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

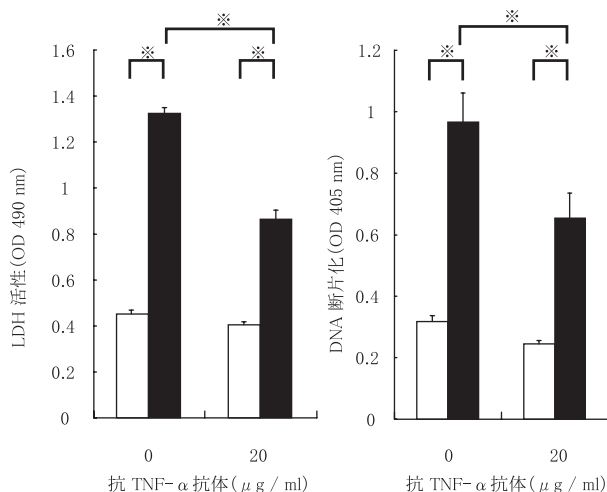


図8 抗TNF-α抗体の細胞死に与える影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前に抗TNF-α抗体 (20μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性およびDNA断片化をELISA法により測定した。非感染群を(□), 感染群 (細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

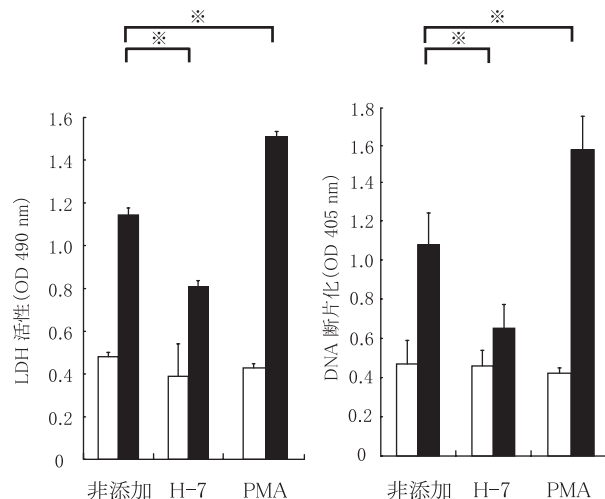


図10 PKC活性阻害および活性化による*A. a*感染細胞の細胞死への影響

THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染させる30分前にH-7 (20μM)あるいはPMA (10μM)を加えた。その後THP-1細胞に*A. a* Y4株を感染比率 (細菌:細胞=1000:1)となるように感染させて24時間培養した後、培養上清中のLDH活性およびDNA断片化をELISA法により測定した。非感染群を(□), 感染群 (細菌:細胞=1000:1)を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

性に与える影響を検討したところ、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞におけるp38活性は、抗TNF-α抗体添加により活性の有意な低下を認めた (図9)。

5. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導におけるPKCの影響について

まず*A. actinomycetemcomitans*感染細胞における細胞死の影響を調べるために、LDH活性およびDNA断片化を測定した。感染細胞におけるLDH活性は、H-7の添加に

よって低下し、PMAの添加によって上昇した。また感染細胞におけるDNA断片化もLDH活性同様に、感染細胞においてH-7の添加によって減少し、PMAの添加によって増加した (図10)。次にPKCのp38活性への影響について検討したところ、H-7の添加によって感染細胞のp38活性は非添加細胞に比べて有意に低下した。またPMAの添加によって感染細胞のp38活性は、非添加細胞

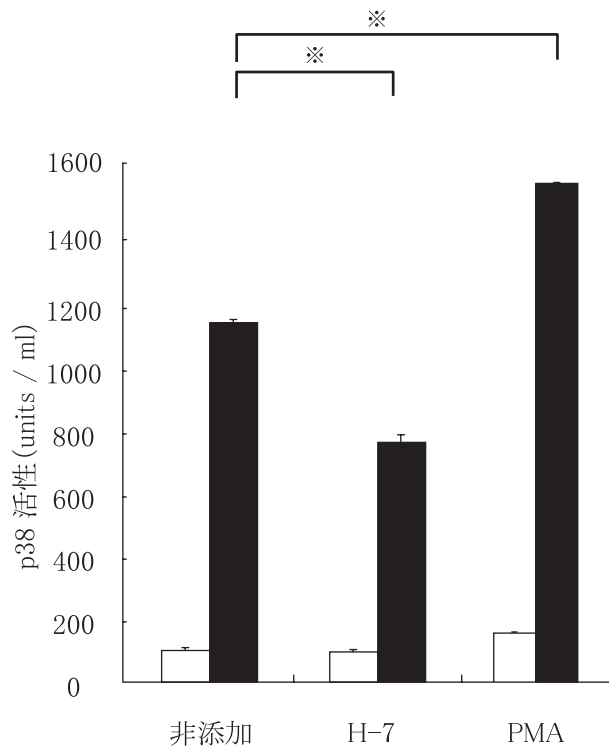


図11 PKC活性阻害およびPKC活性化によるp38活性の変化（感染後1時間）

THP-1細胞に*A.a* Y4株を感染させる30分前にH-7 (20 μ M) あるいはPMA (10 μ M) を加えた。その後THP-1細胞に*A.a* Y4株を感染比率（細菌：細胞＝1000：1）となるように感染させて1時間培養した後、細胞内のp38活性をELISA法により測定した。非感染群を(□)、感染群（細菌：細胞＝1000：1）を(■)で示す。
※ $p < 0.05$ で有意差ありとした。

に比べて有意に上昇した（図11）。

考 察

歯周病の発症メカニズムについては、これまで様々な研究がされてきたが未だ不明な点が多い。われわれは歯周病原性細菌のひとつである*A. actinomycetemcomitans*が感染した上皮細胞やマウスマクロファージ細胞が、アポトーシスによる細胞死に至ることを報告した（Muro et al., 1997）。この結果から、歯周組織破壊に*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現が関与していることが考えられた。単球／マクロファージ細胞は、免疫応答に関して重要な役割を担う細胞である。Manganらは、ヒト単球細胞におけるアポトーシス発現が慢性炎症において重要な役割を果たしているとして報告した（Mangan et al., 1993）。そこで本研究では、ヒト単球系白血病細胞株であるTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans*を感染させる*in vitro*の実験系を確立し、感染細胞動態をアポトーシスの観点から検討した。

まずTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans*をマイクロチューブ内で感染させる*in vitro*の実験系を確立したところ、本菌の感染により細胞死の指標であるLDH活性

が増加し、さらにELISA法によるDNA断片化が増加した（図1）。2%アガロースゲル電気泳動法においても感染細胞において断片化DNAが検出されたことから、アポトーシスによる細胞死が発現していることが明らかになった（図2）。これらのことからマウスマクロファージ細胞と同様に、*A. actinomycetemcomitans*の感染によりヒト単球細胞においてもアポトーシスにより細胞死に至ることが明らかになった。近年、アポトーシス発現における細胞内情報伝達機構の1つとしてMAPKファミリーが注目されている。MAPKはそれぞれ特定の部位がリン酸化することにより活性化し、多様な生命現象を制御する（Yamagishi et al., 2003）。MAPKのうちERK経路は、細胞の増殖や分化の情報を媒介する。一方で、JNKやp38 MAPK経路はストレス応答キナーゼ経路とも呼ばれる（Salh et al., 1999）（Place et al., 2003）。細胞は物理的・化学的ストレスに対して生存を維持しようとするが、決定的なダメージを受けた場合にはアポトーシスを引き起こす。そこで本研究においても*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導へのMAPKの関与について検討した。各MAPKに対して特異的にリン酸化部位に結合する抗体を用いたELISA法により各MAPK活性を調べたところ、*A. actinomycetemcomitans*感染後1時間でp38活性の上昇を認めたが、ERKとJNK活性は著明な変化を認めなかった（図3）。このことから*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス誘導にp38が関与している可能性が考えられた。そこでp38に着目して検討を進めた。p38活性阻害剤であるSB203580を添加し、LDH活性とDNA断片化を測定したところ、感染細胞のLDH活性とDNA断片化が減少した（図4）。さらに2%アガロースゲル電気泳動においては、SB203580添加により濃度依存的にラダーパターンが消失した（図5）。これらの結果から*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現にp38が関与していることが考えられた。

TNF- α は、単球／マクロファージなどから産生される炎症性サイトカインであり、破骨細胞の活性化とそれに伴う骨吸収に大きく関与していると報告されている（MacEwan, 2002）。また、p38はTNF- α により活性化される（Park et al., 2002）。そこで*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現におけるTNF- α の役割について検討を加えた。まず感染後12時間後のTNF- α 量をELISA法にて測定したところ、非感染細胞に比べ感染細胞において約13倍のTNF- α 産生を認めた（図6）。またSB203580添加して同様の感染実験を行ったところ、非添加細胞に比べ添加細胞でTNF- α 産生量の有意な減少を認めた（図6）。感染細胞から産生されるTNF- α を

中和するために抗TNF- α 抗体を用いて検討を加えたところ、感染細胞からのTNF- α 産生は減少した（図7）。Eissnerらは、ヒトマクロファージに20 $\mu\text{g/ml}$ の抗TNF- α 抗体を添加するとアポトーシスが抑制されたと報告している（Eissner et al., 2000）。本研究においても抗TNF- α 抗体の添加によりLDH活性とDNA断片化が減少した（図8）。このことから、培養上清中に産生されたTNF- α が*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシスに関与している可能性が考えられた。Rivadeneiraらは、マウス腹腔マクロファージに10 ng/ml のTNF- α を添加したところ、細胞にアポトーシスが誘導されたと報告した（Rivadeneira et al., 2001）。我々は、感染細胞から産生されたTNF- α 量と同程度の濃度のTNF- α を非感染細胞に添加して培養しても、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞に見られたような細胞死が発現しないことを確認した（Kato et al., 2005）。このことから、TNF- α が直接的に感染細胞にアポトーシスを引き起こすのではなく、感染細胞から産生されたTNF- α が何らかの細胞内情報伝達系を活性化することで、アポトーシスを発現させる可能性が考えられた。そこで、抗TNF- α 抗体のp38活性に与える影響について検討したところ、抗TNF- α 抗体の添加により感染細胞のp38活性は有意に低下した（図9）。これよりp38活性は感染細胞から産生されるTNF- α と関連している可能性が示された。Parkらは、p38がTNF- α によって誘導されるアポトーシスにおいて重要な役割を果たしていることを報告している（Park et al., 2002）。Gretheらもp38がTNF- α によって活性化され、Bcl-X（L）の活性を抑制することによりアポトーシスを発現させると報告した（Grethe et al., 2004）。これらの報告は、本研究結果を支持するものと考えられる。

近年、前立腺腫瘍細胞において活性化されたPKCがp38を活性化させてアポトーシスを促進するという報告がされている（Tanaka et al., 2003）。またわれわれは、*A. actinomycetemcomitans*感染によるマウスマクロファージのアポトーシス発現にPKCが関与していることを報告した（Nonaka et al., 1998）。そこでヒト単球細胞のアポトーシス発現におけるPKCの影響について検討を加えた。まず*A. actinomycetemcomitans*感染細胞における細胞死の影響を調べるために、LDH活性およびDNA断片化を測定した。感染細胞におけるLDH活性は、H-7の添加によって低下し、PMAの添加により上昇した（図10）。また感染細胞のDNA断片化においてもLDH活性同様に、H-7の添加によって減少し、PMAの添加によって増加した（図10）。Zhuangらもまた、PKC活性を抑制するとカスパーゼ8活性を抑制しアポトーシスを抑制すると

報告している（Zhuang et al., 2001）。さらにPKCのp38活性への影響について検討したところ、H-7の添加によって感染細胞のp38活性は有意に低下し、PMAの添加によって有意に上昇した（図11）。これらの結果から、*A. actinomycetemcomitans*感染細胞のp38の活性化にPKCが影響している可能性が考えられた。

本研究により、ヒト単球細胞であるTHP-1細胞に*A. actinomycetemcomitans*を感染させると、マウスマクロファージ細胞と同様にアポトーシスによる細胞死が発現することが明らかになった。またこのアポトーシス発現には、細胞内のp38活性が重要な役割を果たしており、この活性化は感染細胞から産生されるTNF- α とPKCにより影響されている可能性が考えられた。歯周組織内の免疫細胞に*A. actinomycetemcomitans*が感染することによりアポトーシスを誘導し、結果として炎症を持続させると考えられる。さらにこれによる慢性炎症の存在は歯周組織破壊へと結びつく。*A. actinomycetemcomitans*が感染した単球／マクロファージ細胞のアポトーシス誘導機序を明らかにすることにより、歯周病の発症メカニズムの解明ならびに歯周病治療に寄与すると考えられる。

結 語

本研究では、*A. actinomycetemcomitans*をヒト単球細胞に感染させる*in vitro*の実験系を確立し、感染細胞のアポトーシス発現について検討し、以下の結果が得られた。

1. ヒト単球細胞に*A. actinomycetemcomitans*を感染させるとアポトーシスによる細胞死が発現することが明らかになった。
2. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞のアポトーシス発現において、MAPKのなかでp38活性の上昇を認めたが、ERKおよびJNK活性の上昇は認められなかった。さらに、感染細胞のp38活性を阻害したところ、感染細胞のアポトーシス発現が減少した。
3. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞において、TNF- α 産生量が非感染細胞に比べて有意に増加した。p38活性を阻害したところ、感染細胞からのTNF- α 産生量は有意に減少した。また抗TNF- α 抗体の添加により、感染細胞のアポトーシス発現とp38活性は有意に低下した。
4. *A. actinomycetemcomitans*感染細胞において、PKC活性抑制剤の添加によりアポトーシス発現が有意に減少したが、PKC活性化剤の添加によりアポトーシス発現が有意に増加した。さらに、PKC活性抑制剤の添加によりp38活性は有意に減少したが、PKC活性化剤の添加によりp38活性は有意に増加した。

以上の結果より、*A. actinomycetemcomitans* 感染細胞のアポトーシス発現における細胞内情報伝達系にMAPKのなかでp38が最も重要な役割を果たしている可能性が示唆された。このp38活性は、細胞内から産生されるTNF- α あるいはPKCにより影響されている可能性が考えられた。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えてくださり、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました本学歯学部歯科保存学第一講座 故 小鷺 悠典教授、古市 保志教授、本学歯学部歯科理工学講座 大野 弘機教授に深甚なる感謝の意を表します。また、適切な御指導、御校閲を賜りました本学歯学部口腔解剖学第一講座 矢嶋 俊彦教授、本学歯学部口腔病理学講座 賀来 亨教授に深く感謝致します。さらに、本研究を行うにあたり、御助言、御協力を頂きました本学歯学部歯科保存学第一講座の諸先生に心よりお礼を申し上げます。

文 献

- Bragd L, Dahlen G, Wikstrom M and Slots J. The capability of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides intermedius* to indicate progressive periodontitis; a retrospective study. J Clin Periodontol 14 : 95-99, 1987.
- Eissner G, Kirchner S, Lindner H, Kolch W, Janosch P, Grell M, Scheurich P, Andreesen R and Holler E. Reverse signaling through transmembrane TNF confers resistance to lipopolysaccharide in human monocytes and macrophages. J Immunol 164 : 6193-6198, 2000.
- Ferrero E, Hsieh CL, Francke U and Goyert SM. CD14 is a member of the family of leucine-rich proteins and is encoded by a gene syntenic with multiple receptor genes. J Immunol 145 : 331-336, 1990.
- Grethe S, Ares MP, Andersson T and Porn-Ares MI. p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). Exp Cell Res 298 : 632-642, 2004.
- Haraszthy VI, Hariharan G, Tinoco EM, Cortelli JR, Lally ET, Davis E and Zambon JJ. Evidence for the role of highly leukotoxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of localized juvenile and other forms of early-onset periodontitis. J Periodontol 71 : 912-922, 2000.
- Haubek D, Ennibi OK, Abdellaoui L, Benzarti N and Poulsen S. Attachment loss in Moroccan early onset periodontitis patients and infection with the JP2-type of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Clin Periodontol 29 : 657-660, 2002.
- Henderson B, Wilson M, Sharp L and Ward JM. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J Med Microbiol 51 : 1013-1020, 2002.
- 伊藤泰城, 中島啓介, 富岡 純, 加藤幸紀, 小鷺悠典. *A. actinomycetemcomitans* 感染マクロファージから産生される炎症性サイトカインのアポトーシス誘導への関与. 日歯保存誌 47 : 420-428, 2004.
- Jang BC, Lim KJ, Paik JH, Cho JW, Baek WK, Suh MH, Park JB, Kwon TK, Park JW, Kim SP, Shin DH, Song DK, Bae JH, Mun KC and Suh SI. Tetradrine-induced apoptosis is mediated by activation of caspases and PKC- δ in U937 cells. Biochem Pharmacol 67 : 1819-1829, 2004.
- 鎌形有祐, 宮坂伸之, 井上祐子, 橋本純子, 飯田正人. ヒト歯周炎歯周組織から産生されるサイトカインの検討—特にインターロイキン-1 ($IL-1\alpha, \beta$) と腫瘍壊死因子 (TNF- α) について—. 日歯周誌 31 : 843-848, 1989.
- Kato S, Muro M, Akifusa S, Hanada N, Semba I, Fujii T, Kowashi Y and Nishihara T. Evidence for apoptosis of murine macrophages by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. Infect Immun 63 : 3914-3919, 1995.
- Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T and Kowashi Y. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. J Med Microbiol 49 : 739-745, 2000.
- Kato S, Sugimura N, Nakashima K, Nishihara T, Kowashi Y. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* induces apoptosis in human monocyte THP-1 cells. J Med Microbiol 54 : 293-298, 2005.
- Kyriakis JM and Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev 81 : 807-869, 2001.
- Lindemann RA, Economou JS and Rothermel H. Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. J Dent Res 87 : 1131-1135, 1988.
- MacEwan DJ. TNF ligands and receptors—a matter of life and death. Br J Pharmacol 135 : 855-875, 2002.
- Muller HP, Heinecke A, Zoller L, Fuhrmann A and Eger T. Gingivitis in young adults with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Clin Oral Invest 5 : 83-88, 2001.
- Mangan DF, Mergenhagen SE and Wahl SM. Apoptosis in human monocytes. Possible role in chronic inflammatory diseases. J Periodontol 64 : 461-466, 1993.
- Muller HP, Heinecke A, Fuhrmann A, Eger T and Zoller L. Intraoral distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults with minimal periodontal disease. J Periodontal Res 36 : 114-123, 2001.
- Muro M, Koseki T, Akifusa S, Kato S, Kowashi Y, Ohsaki Y, Yamato K, Nishijima M and Nishihara T. Role of CD14 molecules in internalization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* by

- macrophages and subsequent induction of apoptosis. *Infect Immun* 65 : 1147–1151, 1997.
- Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 88 : 355–365, 1997.
- Nonaka K, Ishisaki A, Muro M, Kato S, Oido M, Nakashima K, Kowashi Y and Nishihara T. Possible involvement of protein kinase C in apoptotic cell death of macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *FEMS Microbiol Lett* 159 : 247–254, 1998.
- Nonaka K, Ishisaki A, Okahashi N, Koseki T, Kato S, Muro M, Nakashima K, Nishihara T and Kowashi Y. Involvement of caspases in apoptotic cell death of murine macrophages infected with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J Periodontol Res* 36 : 40–47, 2001.
- Park JG, Yuk Y, Rhim H, Yi SY and Yoo YS. Role of p38 MAPK in the regulation of apoptosis signaling induced by TNF- α in differentiated PC12 cells. *J Biochem Mol Biol* 31 : 267–272, 2002.
- Place RF, Haspeslagh D and Giardina C. Induced stabilization of Ikappa B alpha can facilitate its re-synthesis and prevent sequential degradation. *J Cell Physiol* 195 : 470–478, 2003.
- Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackrell PJ, Mestre JR, Stapleton PP and Daly JM. Malnutrition-induced macrophage apoptosis. *Surgery* 129 : 617–625, 2001.
- Salh B, Marotta A, Matthewson C, Ahluwalia M, Flint J, Owen D and Pelech S. Investigation of the Mek-MAP kinase-Rsk pathway in human breast cancer. *Anticancer Res* 19 : 731–740, 1999.
- Sandholm L. The cellular host response in juvenile periodontitis. A review. *J Periodontol* 56 : 359–366, 1985.
- Slots J, Reynolds HS and Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease : a cross-sectional microbiological investigation. *Infect Immun* 29 : 1013–1020, 1980.
- Slots J and Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 15 : 85–93, 1988.
- Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J and Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol* 62 : 504–509, 1991.
- Tanaka Y, Gavrielides MV, Mitsuuchi Y, Fujii T and Kazanietz MG. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *J Biol Chem* 278 : 33753–33762, 2003.
- Vandesteen GE, Williams BL, Ebersole JL, Altman LC and Page RC. Clinical, microbiological and immunological studies of a family with a high prevalence of early-onset periodontitis. *J Periodontol* 55 : 159–169, 1984.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ and Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270 : 1326–1331, 1995.
- Yamagishi S, Yamada M, Koshimizu H, Takai S, Hatanaka H, Takeda K, Ichijo H, Shimoke K and Ikeuchi T. Apoptosis-signal regulating kinase-1 is involved in the low potassium-induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun in cultured cerebellar granule neurons. *J Biochem* 133 : 719–724, 2003.
- Zhuang S, Demirs JT and Kochevar IE. Protein kinase C inhibits singlet oxygen-induced apoptosis by decreasing caspase-8 activation. *Oncogene* 20 : 6764–6776, 2001.

〔原 著〕

超音波パワードプラ表示法による耳下腺領域の血流の検討

大西 隆, 田中 力延, 佐野 友昭, 細川洋一郎, 金子 昌幸

北海道医療大学歯学部歯学科放射線学講座

Evaluation of blood flows in the parotid gland by Power Doppler imaging

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 purpose of this study is to evaluate whether Power Doppler imaging can demonstrate the characteristics of arterial blood flows around the parotid gland and to calculate the means of blood flow velocities.

Among the external carotid arteries the characteristics of arterial blood flows in the facial artery, superficial temporal artery, and middle temporal artery, both in the lengthwise and transverse sections could be depicted. There were differences in the means of the velocities, the pulsatility index (P. I.), and the resistance index (R. I.) between these various arteries.

Power Doppler imaging appears to be valuable in the diagnosis of blood flows around the parotid gland.

Key words : Ultrasonography, Power Doppler imaging, Parotid gland, Blood flow

緒 言

超音波ドプラ検査法は現在ではパワードプラ表示法が開発され臨床応用されてきている (Rubin et al., 1994; 山田ら, 1995). パワードプラ表示法はドプラ偏移周波数の平均値の代わりにドプラ信号強度の積算をカラー表示するものであるが, この方法は以前から心臓の診査で使用され, 主に狭窄や逆流の描出に適用されている (和賀井ら, 1985). またエリアジングを起こすことがなく低血流状態に対してより高感度であるが, 腹部などの深部において超音波減衰による影響や動きによって画像が劣化する欠点も指摘されている (山田ら, 1995).

頭頸部領域の血流を対象に超音波ドプラ検査は行われているが (三輪ら, 1996; 有地ら, 2001), 耳下腺実質に血液を供給する動脈に限定してパワードプラ超音波検査法を行った場合の画像情報は見られない. そこで今回これら動脈にパワードプラ超音波検査法を使用した時の血流の描出性と血流速度を調べた.

方 法

観察は唾液腺疾患の既往のない健常耳下腺15例 (男性12例, 女性3例, 22-29歳, 平均24.4歳) を対象とした. 耳下腺に分布して血液を供給するのは外頸動脈, 顔面動脈, 後耳介動脈, 浅側頭動脈, 中側頭動脈, 顔面横動脈, そして前耳介枝である (上條ら, 1978). それぞれの動脈に対して超音波検査を実施した. 対象とした各動脈および動脈が分岐する本幹との位置関係を図に示す (図1).

超音波装置はSSD-1700 (ALOKA社製) で, 7.5MHz電子リニア走査探触子を使用して, パワードプラ検査を実施した. 血流自体の描出性に関して, 動脈の横断層像と縦断層像の両方を描出できたものを描出性 (+) と評価した. また本幹動脈との連続性に関して, 本幹動脈との分岐基部が連続性のある像を示すことが出来たものを連続性 (+) と評価した (図2). その後, 検査によって得られたドプラ波形から最大血流速, 最小血流速, 平

受付: 平成17年3月31日

均血流速を求め、これらの数値を使って、末梢血管系の血管抵抗を表すことができるPulsatility Index (P. I.) と Resistance Index (R. I.) の各動脈における計測した (図3)。

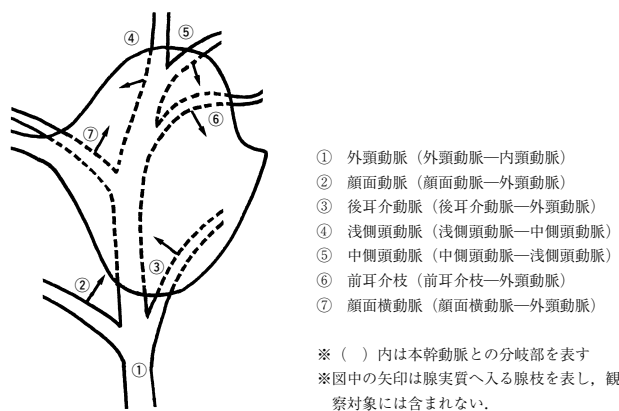


図1 観察対象の耳下腺に分布する各動脈

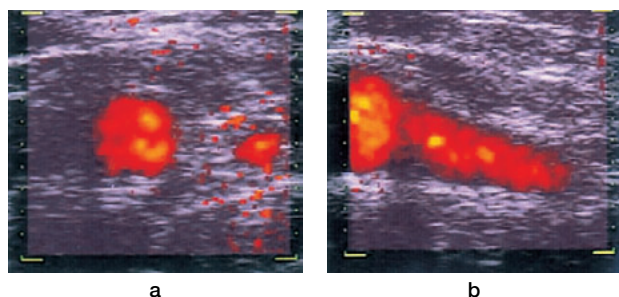
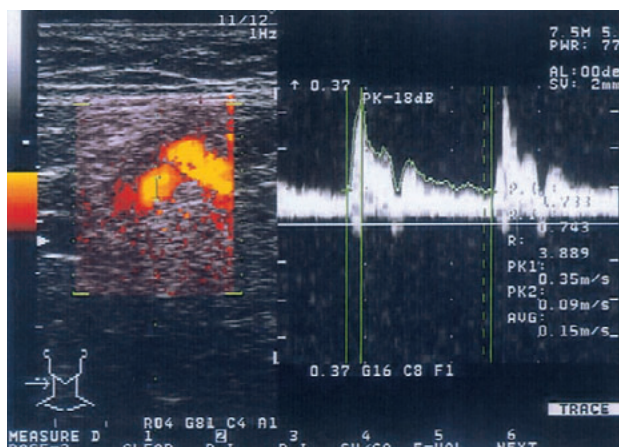


図2 各動脈の描出性、連続性の評価基準
描出性: 血管の横断層像 (a) と縦断層像 (b) の両方を描出できたものを描出性 (+) とした。
連続性: 本幹動脈との分岐基部が連続性のある像 (b) を示したものを連続性 (+) とした。

結 果

耳下腺に分布する各動脈における血流の描出性に関して、横・縦断層像の両方を描出可能だったものは、外頸動脈では15例 (100%)、顔面動脈では15例 (100%)、浅側頭動脈では11例 (73%)、中側頭動脈では11例 (73%) 認められ、これらの動脈で描出性が高くなって



いた。これに対して後耳介動脈では8例 (53%)、前耳介枝では8例 (53%)、顔面横動脈では7例 (47%) が横・縦断層像の両方を描出可となり約半数に留まっていた。本幹動脈との分岐基部の連続性の描出に関しても同様の傾向になっていて、外頸動脈、顔面動脈、浅側頭動脈、中側頭動脈で連続性を示すことが出来たものが多く、後耳介動脈、前耳介枝、顔面横動脈で少なかった。特に顔面横動脈は4例 (27%) であった。(表1)。

P. I. の15例における平均値を求めると、外頸動脈、浅側頭動脈、前耳介枝で高く、後耳介動脈で低くなっていた。R. I. の平均値は後耳介動脈で 0.54 ± 0.23 となり、他動脈と比べて低い傾向にあった。外頸動脈、浅側頭動脈、前耳介枝で高く、平均血流速は浅側頭動脈、中側頭動脈で他動脈と比べて高くなっていた (表2)。

表1 耳下腺に分布する各動脈のパワードブラ検査法における抽出と連続性

	抽出性 (+)	連続性 (+)
外頸動脈	15 (100%)	15 (100%)
顔面動脈	15 (100%)	15 (100%)
後耳介動脈	8 (53%)	8 (53%)
浅側頭動脈	11 (73%)	15 (100%)
中側頭動脈	11 (73%)	13 (83%)
前耳介枝	8 (53%)	8 (53%)
顔面横動脈	7 (47%)	4 (27%)

n=15

表2 耳下腺に分布する各動脈のパワードブラ検査法における血管抵抗性 (P. I. R. I.) と平均血流速

	P.I.	R.I.	平均血流速 (m/s)
外頸動脈	2.15 ± 0.77	0.94 ± 0.23	0.13 ± 0.01
顔面動脈	1.15 ± 0.53	0.74 ± 0.22	0.16 ± 0.03
後耳介動脈	0.58 ± 0.41	0.54 ± 0.23	0.11 ± 0.04
浅側頭動脈	2.20 ± 1.02	0.93 ± 0.39	0.18 ± 0.04
中側頭動脈	1.53 ± 0.75	0.84 ± 0.33	0.17 ± 0.05
前耳介枝	3.00 ± 0.69	0.96 ± 0.15	0.06 ± 0.02
顔面横動脈	1.94 ± 0.67	0.91 ± 0.25	0.08 ± 0.03

平均±標準偏差 n=15

考 察

超音波検査法は無侵襲的で操作が容易なので頭頸部の軟組織領域を中心に広く使用されており (Isaza et al.,

図3 耳下腺に分布する各動脈の血管抵抗性の計測法

血流から得られたFFT波形より一次ピークと二次ピークを求め、次の計算式から血管抵抗性の指数を計測した。

P. I. (Pulsatility Index) = $|PK1 - PK2| / AV$

P. I. (Resistance Index) = $|PK1 - PK2| / PK1$

AV: 平均血流速

PK1: 一次ピーク血流速 (最大血流速)

PK2: 二次ピーク血流速 (最小血流速)

1989; Sato et al., 1998; Shimizu et al., 1999; Shimizu et al., 1999; Ishii et al., 1999; Jager et al., 2000), 唾液腺の診査において、唾液腺造影法、エックス線CT, MRIと共に有効で病巣の性状や脈管系をリアルタイムで描出できる (Bartlett and Pon, 1984; Seibert and Seibert, 1986; Sugahara et al, 1989; 中村ら, 1995; 吉田, 1997). そしてこの血管系における血流の画像検査法としては、臨床的に超音波ドプラ検査法が利用されている (Yoshida et al, 1995; Arijii et al, 1998).

超音波検査におけるパワードプラ表示法は、ドプラ信号強度のスペクトルの積算に基づいていて、カラーの色調と輝度はドプラ信号の強度を表し、ドプラ偏移を生じる赤血球の数と関係している (和賀井ら, 1985). そしてパワードプラ表示法において、画像検査する部位や方向、動脈の内径の大きさや血流速度、撮像条件によって様々に変化することが考えられ、耳下腺領域に分布する動脈を超音波ドプラ検査する場合の画像の特徴や血流速度を知る必要がある. そこで今回我々は、耳下腺に分布する動脈における血流の全てを対象にして、パワードプラ超音波検査法を使用した時の血流の描出性と血流速度を調べ検討した.

耳下腺に分布する各動脈における血流の描出性に関して、横・縦断層像の両方を描出可能だったものは、外頸動脈、顔面動脈、浅側頭動脈、中側頭動脈で多くなり、これに対して、後耳介動脈、前耳介枝、顔面横動脈では横・縦断層像の両方を描出可能だったものは全体の約半数に留まっていた (表1). この結果には、動脈の位置、表層からの深さ、内径の大きさなどが関係していると考えられるが、特に隣接する骨組織など撮像の障害となる部分が近くにあると、動脈に対する探触子の方向を適切に設定できなくなる為、動脈の位置的な要因が大きいものと思われた.

本幹動脈との分岐基部の連続性の描出に関して、外頸動脈、顔面動脈、浅側頭動脈、中側頭動脈で連続性を示すことが出来たものが多く、後耳介動脈、前耳介枝、顔面横動脈で少なかったが、これは描出性の結果と同様に、動脈の位置、表層からの深さ、内径の大きさなどが関係していると考えられるが、ここでは特に内径の大きさ、つまり血流状態の低さが画像に影響して、本幹動脈との分岐基部の連続性の判定に差が生じたものと思われた.

血流の超音波ドプラ変位周波数をスペクトルで表したFFT波形から、最高血流速、最低血流速、平均血流速が分かるが、これらの数値を使って血管抵抗の度合いを定量的に表したものがPulsatility Index (P. I.), とResis-

tance Index (R. I.) である (水口, 2004). これらの指数は二次ピーク血流速 (最低血流速) の方向の違いによって使い分けるのが一般的だが、今回は両方計測して各動脈で比較検討した. 今回の結果では (表2), P. I.の平均値は外頸動脈、浅側頭動脈、前耳介枝で高く、後耳介動脈で低くなり、R. I.の平均値は後耳介動脈が他動脈と比べて低い傾向にあり、外頸動脈、浅側頭動脈、前耳介枝で高く、平均血流速は浅側頭動脈、中側頭動脈で他動脈と比べて高くなっていたが、これらの変化には内径の大きさの他に組織学的変化や年齢による変化が影響していると推測される. そのため唾液腺の変性による血流減少や唾液腺腫瘍の異常血管の鑑別、腫瘍内部の圧迫による血管抵抗性の大小の測定などの応用に際し、これら各動脈における相違に十分注意する必要があると考えられた. なお、各動脈の描出性と連続性には強い関連性があったが、これらと血管抵抗性 (P. I., R. I.) とには明白な関連性は認められなかった.

耳下腺は比較的表層部に位置するが、下顎枝後縁の深部まで存在し、各動脈も超音波ドプラ検査をする時には、骨による多重反射を防ぐ必要があり、呼吸・体動によるカラーアーティファクトによる影響も考慮しなければならなかった. 以上の点を踏まえて、各動脈の描出性や血管抵抗性の相違を考慮しながらパワードプラ超音波検査法を行うことによって、耳下腺領域の血管の変化を正確に判断できるものと考えられた.

結 論

耳下腺付近に分布する動脈における血流に関して、パワードプラ表示法は有効な検査法であるが、後耳介動脈、前耳介枝、顔面横動脈では描出性が低く、平均血流速および血管抵抗性は各動脈で相違があった. そのため各動脈の描出性や血流速度の相違について十分に考慮する必要がある.

文 献

- 有地榮一郎, 有地淑子, 佐久間重光, 木村泰男: 超音波ドプラ法による血流の描出: 顎顔面領域への応用. 歯科放射線 41: 3-12, 2001.
- Arijii Y, Yuasa H and Arijii E. High-frequency color Doppler sonography of the submandibular gland. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 86: 476-481, 1998.
- 荒川圭二, 斎藤泰博, 佐藤順一, 鳥谷部純行, 峯田昌之: 頭頸部領域の超音波診断, 中外医学社, 東京, 1995, 1-6.
- Bartlett LJ and Pon M. High-resolution real-time ultrasonography of the submandibular salivary gland. J Ultrasound Med 3: 433-437, 1984.

- Isaza M, Ikezoe J, Morimoto S, Takashima S, Kadowaki K, Takeuchi N, Sano M, Nakao K and Kozuka T. Computed tomography and ultrasonography in parotid tumors. *Acta Radiologica* 30 : 11–15, 1989.
- Ishii J, Nagasawa H, Wadamori T, Yamashiro M, Ishikawa H, Yamada T, Miyakura T and Amagasa T. Ultrasonography in the diagnosis of palatal tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 87 : 39–43, 1999.
- Jager L, Menauer F, Holzknecht N, Scholz V, Grevers G and Reiser M. Sialolithiasis : MR Sialography of the Submandibular Duct—An Alternative to Conventional Sialography and US?. *Radiology* 216 : 665–671, 2000.
- 上條雍彦：口腔解剖学，第7版，アナトーム社，東京，1978，1403–1416.
- 水口 仁：ドプラ検査の基本，日本放射線技術学会雑誌 60 : 245–250，2004.
- 三輪邦弘，吉浦一紀，神田重信：舌癌組織内照射後の顎下腺の超音波カラー Doppler 像．*歯科放射線* 36 : 102–103，1996.
- 中村みちる，谷口信行，林 良夫，川井夫規子，入江喬介，伊東紘一：小児顎下腺エコーレベルの年齢的变化．*超音波医学* 22 : 775–780，1995.
- Rubin JM, Bude RO, Carson PL, Bree RL and Adler RS. Power Doppler US : A Potentially Useful Alternative to Mean Frequency-based color Doppler US. *Radiology* 190 : 853–856, 1994.
- Sato N, Kawabe R, Fujita K, and Omura S. Differential diagnosis of cervical lymphadenopathy with intranodal color Doppler flow signals in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 86 : 482–488, 1998.
- Seibert RW and Seibert JJ. High resolution ultrasonography of the parotid gland in children. *Pediatr Radiol* 16 : 374–379, 1986.
- Shimizu M, Ussmuller J, Hartwein J, Donath K and Kinukawa N. Statistical study for sonographic differential diagnosis of tumorous lesions in the parotid gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 88 : 226–233, 1999.
- Shimizu M, Ussmuller J, Doz P, Hartwein J and 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.
- Sugahara T, Yanagihara Y, Uyama C, Maeda H, Takafuchi M and Azumi T. Measurement of distensibility of blood vessels using cineangiograms. *Invest Radiol* 4 : 672–677, 1989.
- 和賀井敏夫，松尾裕英，編集：超音波医学，永井書店，大阪，1985，27–32，131–180.
- 山田麗子，平井都始子，大石 元，佐々木義明，今井照彦，打田日出夫，地挽隆夫：腎疾患に対するカラー Doppler パワー表示法の評価．*超音波医学* 22 : 449–454，1995.
- 吉田美苗子：超音波による健常舌下腺の描出に関する検討．*口腔科誌* 46 : 28–35，1997.
- Yoshida H, Yuasa H and Ueno E. Use of Doppler Color Flow Imaging for Differential Diagnosis of Vascular Malformations : A Preliminary Report. *J Oral Maxillofac Surg* 53 : 369–374, 1995.

〔原 著〕

経頭蓋側斜方向エックス線撮影法ならびに回転パノラマエックス線撮影法による
下顎頭関節面の描出再現性に関する基礎的検討細川洋一郎¹⁾, 大西 隆¹⁾, 佐野 友昭¹⁾, 田中 力延¹⁾, 金子 昌幸¹⁾, 奥村 一彦²⁾, 柴田 考典²⁾¹⁾北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座²⁾北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座Basic study on the reproducibility of images of the articular surfaces of mandibular
condyles on transcranial and panoramic projectionsYoichiro HOSOKAWA, Takashi OHNISHI, Tomoaki SANO, Likinobu TANAKA,
Masayuki KANEKO, Kazuhiko OKUMURA and Takanori SHIBATA.Department of Dental Radiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido
First Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Experiments were made on the reproducibility of images of the articular surface of the mandibular condyle by transcranial and panoramic projections were attempted. A sprue fixed in a cross-shape was fixed with an adhesive on the skin above the condyle of each of three volunteer adult men. Pictures were then taken by transcranial projection and by panoramic projection. Further, orthodontic wire was pasted in line with the anterior limit and the inferior limits of the articular area by the use of three dry mandibles, and pictures were taken by transcranial and panoramic projections. The results showed that the deformation in the transcranial projection was slight in the vertical and horizontal directions, and that the articular surface was only observed the part connecting the mandibular condyle and the incident X ray. In the panoramic projection, there was a slight extension in the vertical direction and a slight contraction in the horizontal direction. Images of the temporomandibular joint taken by panoramic projection were observed as images like fluoroscopy from the front of the opposite side (the part diagonal to the front of the opposite side), and the anterior limit of the articular area was different from the inferior limit of the articular area. The above results allow the condition that it is appropriate to regard images of the temporomandibular joint taken by transcranial and panoramic projections as objects for screening examinations of gross osseous changes as it now done for observations of mild osseous changes of the articular surface.

Key words : articular surface, temporomandibular joint, transcranial projection, panoramic projection

緒 言

顎関節症は顎関節疾患のなかで日常臨床で最も多くみられる疾患である。顎関節内部の構造は外部から直視できないので、その診断では、画像情報がきわめて重要である。そこで、顎関節症を疑う患者の初診時スクリーニ

受付：平成17年3月31日

ング検査として、従来より経頭蓋側斜方向エックス線撮影法、回転パノラマエックス線撮影法が広く行われている（高村，1998）。これら撮影法が広く利用されるのは、歯科診療所に普及しているデンタルエックス線撮影装置や回転パノラマを利用して、容易にそして簡便に撮影可能であるためである（高橋ら，1992）。また、最近

の顎関節症の症型分類に関する画像診断プロトコルでも、最初に行われるべき検査として位置付けられている(和光ら, 1997)。

これらの検査法から得られる情報は骨変化であり, 下顎頭の位置および形態変化の観察が中心になる。従って, 顎関節のエックス線診断に際し, おおのこの撮影法により顎関節がどのように画像化されるかを検討しておく必要がある。本研究は経頭蓋側斜方向エックス線撮影法ならびに回転パノラマエックス線撮影法による顎関節描出の基礎的検討を目的に行われた。

材料および方法

今回, 使用した撮影装置は北海道医療大学歯学部附属病院放射線部に設置されている回転パノラマエックス線撮影装置 (Super Veraview, モリタ) および顎関節規格撮影装置 (Super-Max70, モリタ) である。経頭蓋側斜方向エックス線撮影法の入射角度は上方から30度で固定されており, 70kVp, 8mAの条件で撮影した。回転パノラマは75kVp, 10mAの条件で撮影した。なお, 乾燥下顎骨を用いた 実験2ではスリット部分に銅板を付加し, 下顎骨が描出されるようにした。

実験1: ステンレス製のチューブスプルー (1.25mm×20mm) (ムラカミプロダクツ) 2本を直角に十字の型にユティリティーワックスで固定した。この十字型のチ

ューブスプルーをボランテニア成人男性3名の下顎頭外側極上の皮膚面に絆創膏で固定した。このとき2本のチューブスプルーは水平ならびに垂直になるよう固定した。閉口状態で, 経頭蓋側斜方向エックス線撮影法, 標準回転パノラマエックス線撮影法, 顎関節モード回転パノラマエックス線撮影法を行った。得られた写真のチューブスプルーの長さを, ノギス (ミットヨ) で1回測定した。

実験2: アジア人成人乾燥頭蓋骨の下顎骨3個を使用し, 下顎頭関節面の前縁および後縁に合わせて矯正用結紮線を貼付した (図1-a)。これらの下顎骨の経頭蓋側斜方向エックス線撮影法, 標準回転パノラマエックス線撮影法, 顎関節モード回転パノラマエックス線撮影法を行った。撮影位置は閉口位に準じた位置とし, 頤部をチンレストに載せ, イヤーロッドに下顎頭がくるように固定した。得られたエックス線写真上で金属線の形態を観察するとともに, 金属線の先端の垂直方向と水平方向の長さを, ノギスで1回測定した (図1-b)。

実験1および2ともに, 測定にあたっては歯科放射線科医3人が測定し, 6顎関節の平均値を求め, 比較検討した。平均値の比較には, ウィルコクソンの順位和検定を用い, 危険率5%で検定を行った。統計用ソフトはSPSS ver. 6.1 (SPSS) を用い, マッキントッシュコンピュータにて行った。

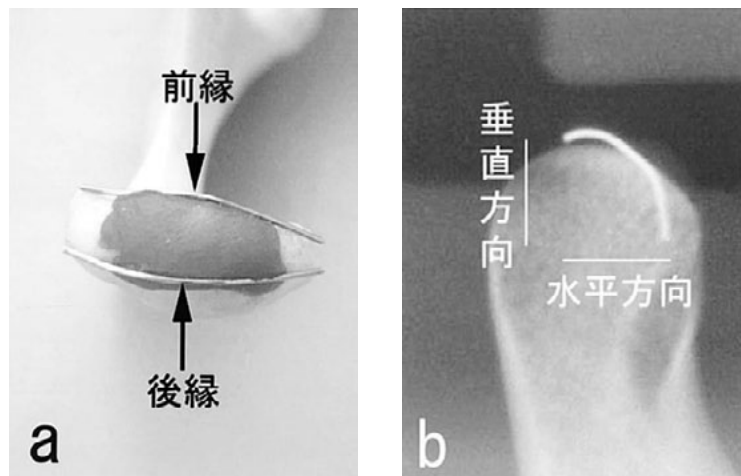


図1 矯正用結紮線の貼付と測定方法

a: 関節頭前縁と後縁に矯正用結紮線を貼付したところ。
b: 回転パノラマの矯正用結紮線像 (関節頭前縁のみ)。

結 果

実験1の撮影結果を図2-a, b, cに示す。経頭蓋側斜方向エックス線撮影法ではスプルー長はわずかに伸長する傾向を示したが, 歪みはほとんどみられなかった (図2-a)。標準回転パノラマエックス線撮影法では水平方向のスプルー長が短縮していた (図2-b)。顎関節

モードにおいても同様の所見がみられた (図2-c)。実験1におけるスプルーの計測結果を図3に示す。スプルー自体の誤差はごくわずかで, 6本測定したときの標準偏差は0.03-0.06mmであった。経頭蓋側斜方向エックス線撮影法では水平方向に比較して垂直方向で伸長する傾向がみられたが, 垂直方向と水平方向で有意な差はみられなかった。標準回転パノラマエックス線撮影法では

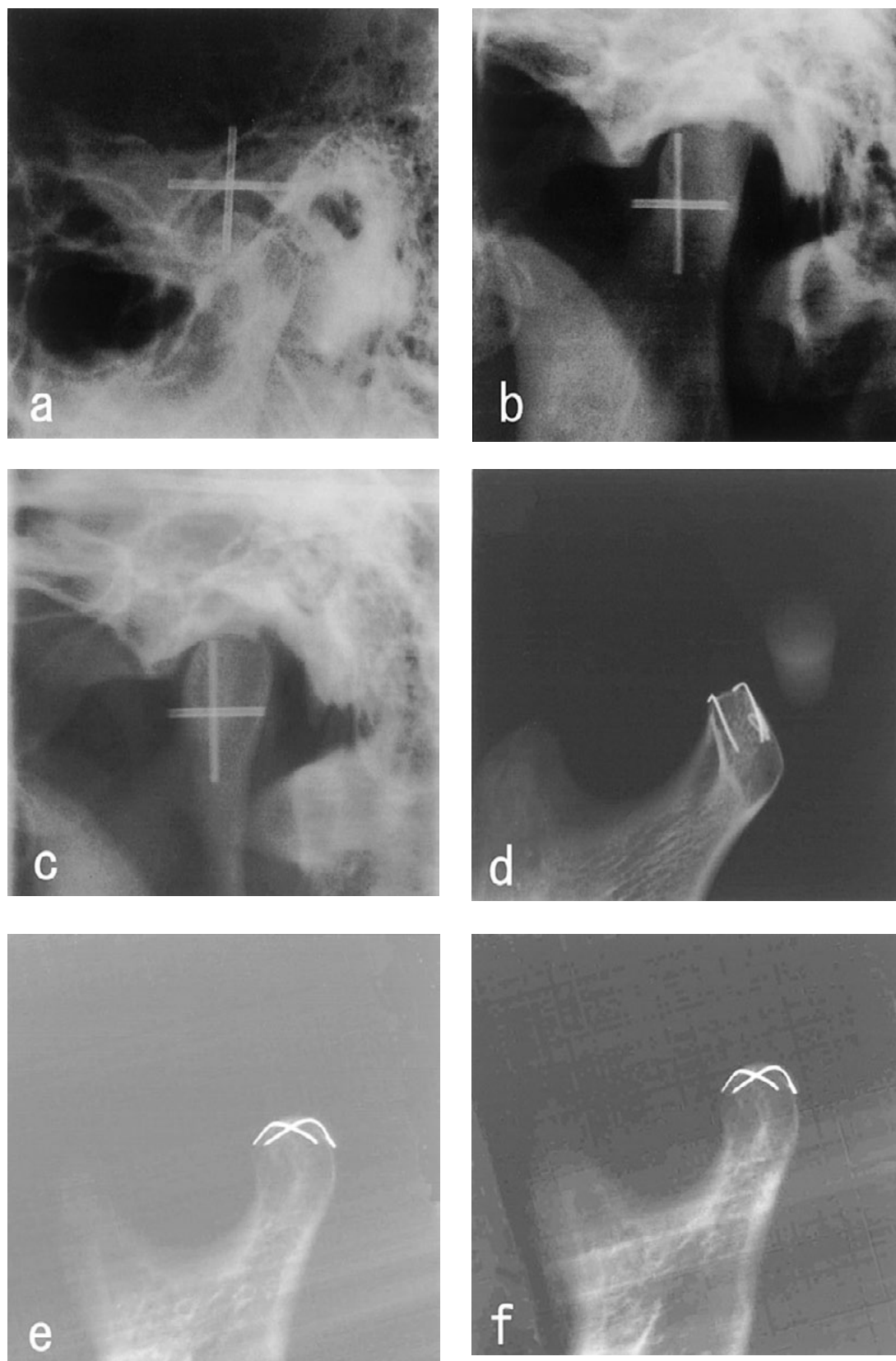


図2 スプルーと矯正用結紮線の撮影結果

- a: 経頭蓋側斜方向エックス線撮影法によるスプルーの撮影
- b: 標準回転パノラマエックス線撮影法によるスプルーの撮影
- c: 顎関節モード回転パノラマエックス線撮影法によるスプルーの撮影
- d: 経頭蓋側斜方向エックス線撮影法による矯正用結紮線の撮影
- e: 標準回転パノラマエックス線撮影法による矯正用結紮線の撮影
- f: 顎関節モード回転パノラマエックス線撮影法による矯正用結紮線の撮影

垂直方向で軽度伸長し、水平方向で短縮していた。このときの垂直方向と水平方向の長さは有意な差があった。顎関節モードパノラマ撮影では水平方向の短縮はわずかに改善されたが、ほぼ同じ傾向を示した。

実験2の撮影結果を図2-d, e, fに示す。経頭蓋側斜方向エックス線撮影法では金属線は垂直方向に長く描出されていた。また、金属線は前後方向にも傾く傾向がみられたが、関節面の一部は観察可能であった。標準回転パノラマエックス線撮影法では前方の金属線が前方にみられたが、後方の金属線が交叉しており、関節面の断面は観察が困難であった。また、金属線は両者ともに水平方向に広がっており、金属線は端からすべて撮影されていた。顎関節モードパノラマ撮影ではこの水平方向の広がりはずかに減少していたが、撮影された形状は基本的に同じだった。金属線先端の距離の測定結果を図4に示す。シーラー法では上方30度から撮影されており、垂直方向に金属線は長く観察された。一方、標準回転パノラマエックス線撮影法では、垂直方向のずれは少なかったが、水平方向に広がっていた。経頭蓋側斜方向エックス線撮影法と標準回転パノラマの平均値の比較では、垂直方向ならびに水平方向で有意な差があった。顎関節モード回転パノラマエックス線撮影法では水平方向のずれが減少していき、有意な差はなかった。

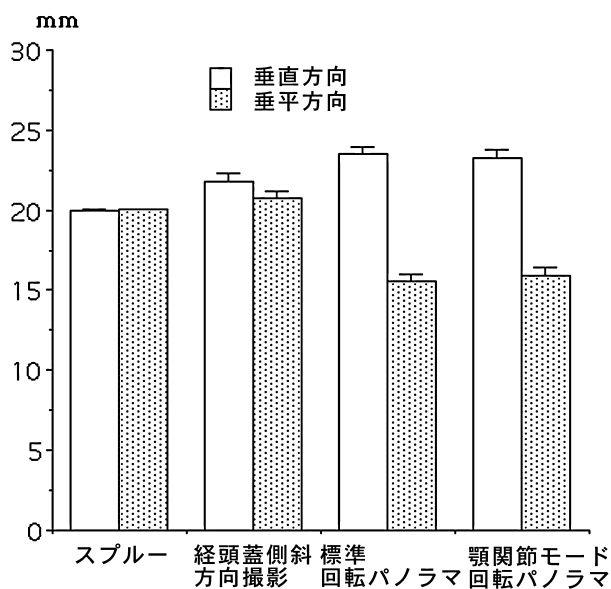


図3 スプルーの実測値と撮影上の計測値

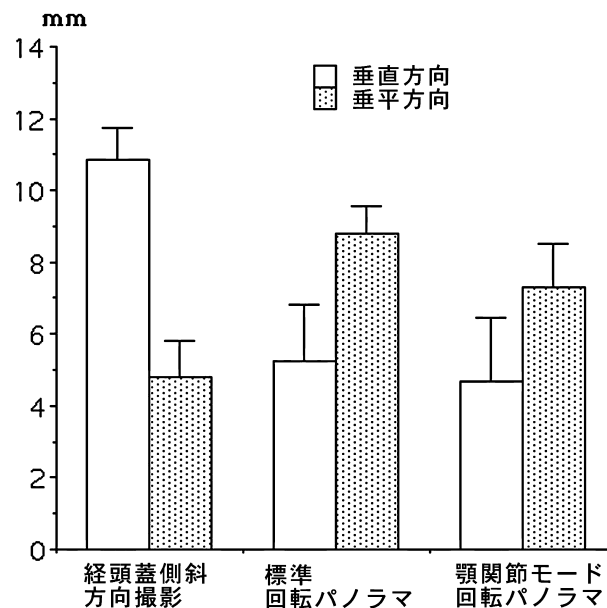


図4 矯正用結紮線の断端間距離

考 察

2001年に改訂された日本顎関節学会の顎関節症診断基準によると、IV型は変型性関節症と分類されており、画像所見として骨辺縁部の局所的不透過性増生、骨皮質の断裂を伴う吸収性変化、吸収性変化を伴う下顎骨の縮小化が診断要件とされている(飯塚ら, 2003)。回転パノラマや単純エックス線所見におけるIV型の従来の評価は、主として関節面付近を中心に観察しており、また、画像上その付近の骨変化を記載、報告しているものが多い(Honda et al., 1994)。

従って、日常臨床において回転パノラマや経頭蓋側斜方向エックス線撮影法の読影は、下顎頭長軸に対して水平に関節面付近を観察することを期待してなされているように思われる(工藤ら, 2000)。しかし、回転パノラマや経頭蓋側斜方向エックス線撮影法における関節面部の画像再現性を定量的に評価した報告は、今までほとんどみられなかった(竹内ら, 1997)。そこで今回は下顎頭の位置的再現性を保証するため、閉口位における関節面部の画像的再現性を検討した。

まず初めに、経頭蓋側斜方向エックス線撮影法および回転パノラマエックス線撮影法の像の垂直方向および水平方向の変化率をスプルーにより調べた。その結果、経頭蓋側斜方向エックス線撮影法ではわずかに伸長する傾向がみられたものの、垂直方向と水平方向の伸長アンバランスはほとんどなかった。水平方向にも僅かな伸長を示したのは、エックス線管球からの線錐のひろがりであると思われる。それに対して、標準回転パノラマエッ

クス線撮影法では垂直方向で軽度伸長し、水平方向で短縮していた。垂直方向で軽度伸長したのは、回転パノラマのスリットが垂直方向に長く、線錐による伸長が反映することと、被写体（この場合はスプルー）とフィルム間に距離があるためこの傾向が助長されたと考えられる。一方、回転パノラマの水平方向の画像形成は、スリット撮影と回転断層に原理を複雑に組み合わせて構成されており、Super Veraviewの画像構成原理が不明であるため、水平方向のスプルーが短縮した理由は不明だが、顎関節モードパノラマ撮影では水平方向の短縮はわずかに改善された（田村ら、1986）。顎関節モードパノラマ撮影では、下顎の位置を前方に移動するように指定されており、顎関節の位置を移動することにより、この欠点を解決しようとしていると考えられた。しかしながら、基本的に伸長、短縮の傾向はあまり変わらず、回転パノラマの像は垂直方向と水平方向の比率に違いのあることを理解しておく必要がある。

次に、関節面の前縁および後縁に金属線を取り付け顎関節を撮影し、観察した。一般に下顎頭はラグビーボールのような形をしていることから、我々が期待するように、関節面断面を側方から、すなわち下顎頭長軸方向に平行に観察しているのであれば、これら金属線が短く撮像される程、良好な像であることになる（中沢、1993）。実験の結果、経頭蓋側斜方向エックス線撮影法では金属線は垂直方向に長く描出されていた。これは経頭蓋側斜方向エックス線撮影法が上方から撮影されており、このため垂直方向に金属線が長く描出されたと考えられる。従って従来より指摘されているように、経頭蓋側斜方向エックス線撮影法で観察されているのは、入射エックス線と関節面の接線部分のみである（図5）（高村、1998）。このため経頭蓋側斜方向エックス線撮影

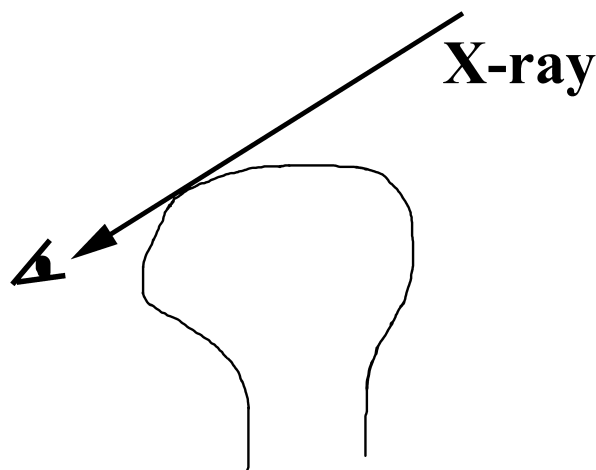


図5 経頭蓋側斜方向エックス線撮影による撮影部分

法単独での正診率は比較的低いとされる。（米津ら、1998）

一方、標準回転パノラマエックス線撮影法では金属線が交叉しており、金属線は両者ともに水平方向に広がって下顎頭部を金属線が覆っていた。これは下顎頭長軸と異なる水平的角度でエックス線が入射され、関節面が下顎頭前縁と後縁の線と重複してしまうことを意味している。橋本らも下顎頭に金属線を貼付し、回転パノラマを撮影して観察している。その結果、パノラマ写真での下顎頭像の後縁は下顎頭の内側部が、また、後縁は外側部が描出されていたと言っており、これは表現が異なるが、我々の結果とほぼ同じ現象を観察していると考えられる（橋本ら、1997）。今回の研究では、顎関節モードパノラマ撮影で、この水平方向の広がりはずかに減少していたが、撮影された形状は基本的に同じで、計測の結果でも有意な差はなかった。このため、今回、回転パノラマが顎関節を撮影する状況を確認したところ、反対側の方（水平的角度20度程度）からエックス線が入射していた（図6）。そして、この時、撮影されるフィルムを反対側から観察すると、描出される金属線と同じ形態であることが確認された。また、回転パノラマエックス線撮影法において金属線は端からすべて撮影されていたことを考えると、これは断層像ではなく透視像であり、下顎頭部分は断層撮影されていない領域にあると結論できる。この点について竹内らは、骨形態異常の回転パノラマの検出率が断層撮影の78.1%であり、その原因のひとつが、多くの回転パノラマ装置で顎関節部が断層領域にないことをあげている。その欠点を克服するため、顎関節を回転パノラマの断層領域に設定する研究も存在するが、一般化はされていない。（工藤ら、2000）

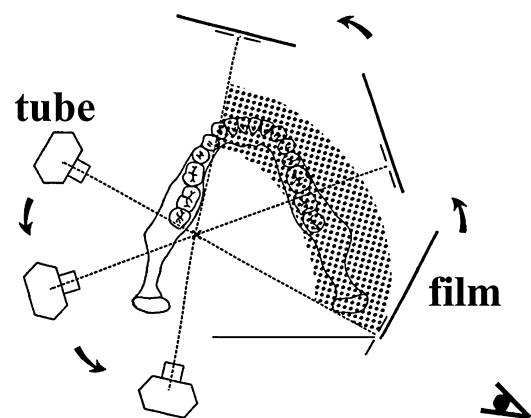


図6 回転パノラマによる、顎関節部の撮影状況

回転パノラマにおける骨形態変化に関する臨床的な正診率は、一般に断層撮影による骨変化の検出をgold

70 細川 洋一郎, 他/経頭蓋側斜方向エックス線撮影法ならびに回転パノラマエックス線撮影法による下顎関節面の描出再現性に関する基礎的検討

standardとして比較する. 各報告でばらつきのあるものの標準回転パノラマエックス線撮影法で71–84%, 顎関節モード回転パノラマエックス線撮影法で78%–85%と報告されている. 米津らは回転パノラマの下顎頭外形異常の正診率は80%を超えて高く, 顎関節症におけるエックス線学的ルーチン検査として有用であると述べている(米津ら, 1998). 一方, 72剖検下顎頭における骨形態異常の検討を行った報告では, 今回の撮影方向とほぼ同じ条件における回転パノラマエックス線撮影法の正診率は58%であったと述べている(菅原ら, 1997).

今回の基礎実験の結果から判明した回転パノラマエックス線撮影法下顎頭像の形成方法から考えると, パノラマエックス線撮影法では我々が期待するような下顎頭長軸に平行な関節面形状を把握できるとは言い難い.

従って, 回転パノラマエックス線撮影法は関節面の微細な骨変化の観察よりは, 大きな骨異常のためのスクリーニングと位置付けるほうが適切であると思われた(高橋ら, 1993).

結 語

経頭蓋側斜方向エックス線撮影法および回転パノラマエックス線撮影法の顎関節関節面の画像再現性について, 基礎実験を行った. その結果, 経頭蓋側斜方向エックス線撮影法では垂直方向と水平方向の歪みは少なかったが, 下顎頭と入射エックス線の接線部分のみ, 関節面の観察が可能であった. 回転パノラマエックス線撮影法では垂直方向で軽度伸長し, 水平方向では短縮していた. また, 顎関節の撮影は反対側前方からの透視像として撮像されており, 関節面の形状は下顎頭前縁と後縁の線と重複していた. 以上から, 経頭蓋側斜方向エックス線撮影法および回転パノラマエックス線撮影法の顎関節像は, 関節面の微細な骨変化の観察よりは, より大きな骨異常のためのスクリーニングと位置付けるほうが適切であると思われた.

謝 辞

本研究を行うにあたり, 御協力いただきました北海道医療大学歯学部附属病院放射線部の方々に深謝申し上げます.

文 献

- 深井智美, 小林 馨, 若江五月, 山本勝之, 田中 守, 山本 昭. 回転パノラマX線撮影装置における顎関節部濃度補正システムの開発. 歯放 29:435–439, 1989.
- 橋本光二, 新井嘉則, 本田和也, 桑島永治, 江島堅一郎, 岩井一男, 篠田宏司. 回転パノラマX線写真の顎関節像に関する基礎研究. 日大歯学 71:800–806, 1997.
- Honda E, Yoshino N and Sasaki T. Condylar appearance on panoramic radiograms of asymptomatic subjects and patients with temporomandibular disorders. Oral Radiol. 10:123–133, 1994.
- 飯塚忠彦. 顎関節症診療のガイドライン, 日本顎関節学会編, 顎関節症, 東京:永末書店, 2003, p7–18.
- 工藤隆治, 天野 稔, 細木秀彦, 川口真一, 竹内 徹, 下村 学, 前田直樹, 坂野啓一, 多田章久, 安友基勝, 岩崎裕一, 上村修三郎. パノラマX線撮影装置を利用した顎関節撮影法 第五報 顎関節側面パノラマ4分割撮影法における断層域の検討. 歯放40:242–250, 2000.
- 中沢勝宏. 入門顎関節症の臨床. 第1版. 東京:医歯薬出版:1993.
- 菅原千恵子, 高橋 章, 竹内 徹, 下村 学, 細木秀彦, 小中ひとみ, 上村修三郎, 柴田考典. パノラマX線撮影装置を利用した顎関節撮影法 第三報 撮影方向の違いによる剖検下顎頭の骨形態異常検出率の比較. 歯放 37:127–135, 1997.
- 高橋 章, 呉 好宗, 村上秀明, 西山秀昌, 藤下昌巳, 瀧端 孟. 顎関節画像検査に関する調査成績 1. 検査法の実施状況. 歯放 32:34–47, 1992.
- 高橋 章, 呉 好宗, 村上秀明, 西山秀昌, 藤下昌巳, 瀧端 孟. 顎関節画像検査に関する調査成績 2. 歯科放射線科医の立場から見た検査の意義および望ましい検査体系. 歯放 33:18–30, 1993.
- 高橋 章, 呉 好宗, 村上秀明, 西山秀昌, 藤下昌巳, 瀧端 孟. 顎関節画像検査に関する調査成績 3. 顎関節のX線的变化に関する用語. 歯放 33:31–35, 1993.
- 高村敬純. 経咽頭顎関節撮影法の研究 一経頭蓋撮影法との比較一. 歯放 28:377–392, 1998.
- 竹内 徹, 高橋 章, 菅原千恵子, 下村 学, 前田直樹, 多田章久, 上村修三郎. パノラマX線撮影装置を利用した顎関節撮影法 第二報 水平方向の至適X線入射角度の検討. 歯放 37:41–48, 1997.
- 田村俊晶, 丹羽克味. オルソパントモグラフィにおける画像形成の理論解析. 歯放 26:188–198, 1986.
- 田中達朗, 森本泰宏, 鬼頭慎司, 岡部幸子, 篠原裕二, 大場 健. 顎関節症患者における初診時としてのX線検査法. 日口診誌 17:11–16, 2004.
- 和光 衛, 原田卓哉, 西河慶一, 光菅裕治, 小林紀雄. 顎関節症を見直す 5. 画像検査法と診断. 歯科学報 102:853–868, 2002.
- 米津博文, 野沢健司, 柴田慶郎, 須賀賢一郎, 小枝弘実, 木住野義信, 重松知寛. 顎関節Ⅳ型に対するスクリーニング法としての回転パノラマX線撮影法の診断的意義. 歯科学報98:77–81, 1998.

〔CLINICAL report〕

A study on nasotracheal intubation to prevent injury to the nasopharyngeal mucous membrane - Comparison of the bougie method and the gastric tube guide method -

Masaru KUDO and Noboru SHINYA

Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry, Health sciences University of Hokkaido

Abstract

Nasotracheal intubation with general anesthesia is performed for dental treatment and oral surgery. However, nasotracheal intubation causes nasal bleeding and injury to the mucous membrane of the nasopharynx. This report describes the introduction of Nasogastric tubes with the guide intubation (NTGI) method and discusses its usefulness, and further reports a comparison of the clinical usefulness of the NTGI method (our novel method) and the bougie inferior nasal meatus (BINI) method.

The NTGI was performed clinically and the results of 30 cases were confirmed by fiberoscopy, showing no cases of injury. The proportion of cases with bleeding from the inferior nasal meatus was similar in the NTGI and bougie inferior nasal meatus as nasotracheal intubation (BINI) methods. The NTGI method prevented injury to the pharyngeal mucous membrane at the time of nasotracheal intubation. Therefore, the results indicated that the NTGI method is safe for nasotracheal intubation.

In the present study, the intubation tube was changed to prevent pharyngeal injury. The tube tip was made of a soft material (soft PVC; polyvinyl chloride) and with an obtuse angle, and the tube shape was changed. Although the intubation procedures were safe because the intubation tube material was soft, there is the possibility of obstruction of the nasal cavity during general anesthesia. Further studies are required to develop tubes for safer tracheal intubation during general anesthesia and when regaining consciousness as well as during intubation.

Key words : Nasotracheal intubation, Safe propulsion, Nasogastric tubes as guide intubation (NTGI), Bougie inferior nasal meatus as nasotracheal intubation (BINI)

Introduction

Nasotracheal intubation with general anesthesia was performed for dental treatment and oral surgery. However, nasotracheal intubation causes nasal bleeding and injury to the mucous membrane of the nasopharynx (Domino et al., 1999), and we have used the bougie inferior nasal meatus as the nasotracheal intubation (BINI) method to expand the inferior nasal meatus before nasotracheal intubation. In July 2003, we experienced a case where a tracheal tube punctured the pharyngeal mucous membrane during nasotracheal intubation, causing injury to the rhinopharyngeal and mesopharyngeal mucous membranes. For promotion of safety during nasotracheal intubation, the nasogastric tube as guide intubation (NTGI) method has been used since September 2003 (Nakanishi et al., 1995). This paper reports a comparison of the clinical usefulness of the NTGI method (our novel method) and the BINI method.

Methods

1) Nasotracheal intubation

A gastric tube is passed through a tracheal intubation tube [soft PVC; polyvinyl chloride, Satin Soft Hi-Lo™ Tracheal

受付:平成17年3月31日

Tube, Mallinckrodt, St. Louis, MO], the inside of which is wetted with lidocaine or physiological saline solution.

After induction of anesthesia, a vasoconstrictor solution containing 0.01% tramazoline hydrochloride is administered to the nasal cavity. The inferior nasal meatus is wiped with a unilateral swab with a wooden axis soaked in benzalkonium chloride, and 1 ml of lidocaine jelly (20 mg/ml) is applied for wetting and for surface anesthesia of the inferior nasal meatus.

Laryngoscopy is performed using a laryngoscope, and 4% lidocaine is sprayed into the trachea and larynx. The tip of the intubation tube through which the gastric tube was passed is inserted through the nasal cavity (Fig. 1).

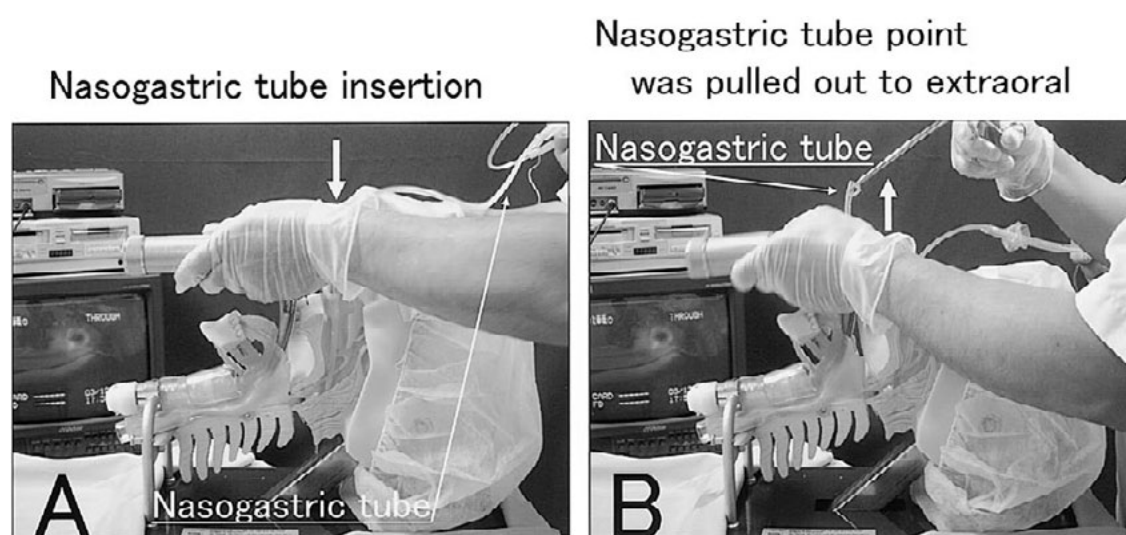


Fig. 1 Nasogastric tubes as guide intubation (NTGI) - 1

The location of the gastric tube tip in the pharynx is confirmed from the oral side in the open view and the gastric tube tip is pulled out of the oral cavity using Magill's forceps. Then, the intubation tube is inserted into the inferior nasal meatus and turned to the right near the curve of the pharyngeal mucous membrane (Fig. 2).

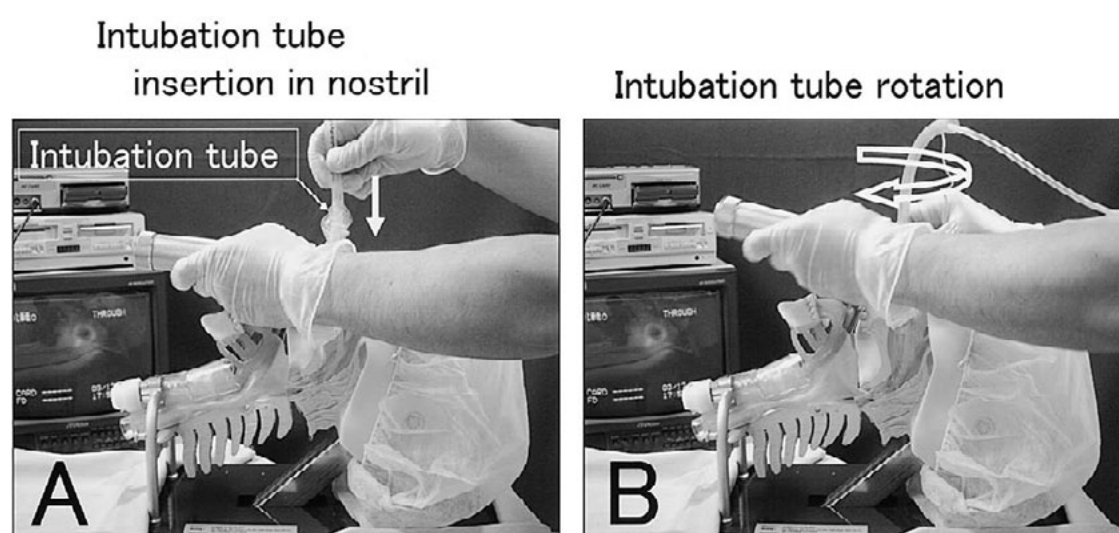


Fig. 2 Nasogastric tubes as guide intubation (NTGI) - 2

Further, the gastric tube is lifted up, as shown Fig. 3-B. Lifting the tube enables the introduction of the intubation tube tip from the rhinopharynx to the mesopharynx without making a forced contact with the pharyngeal mucous membrane. This prevents injury to the pharyngeal mucous membrane. Next, nasal discharge and blood attached to the intubation tube tip can be aspirated by removal of the nasogastric tube (Fig. 3).

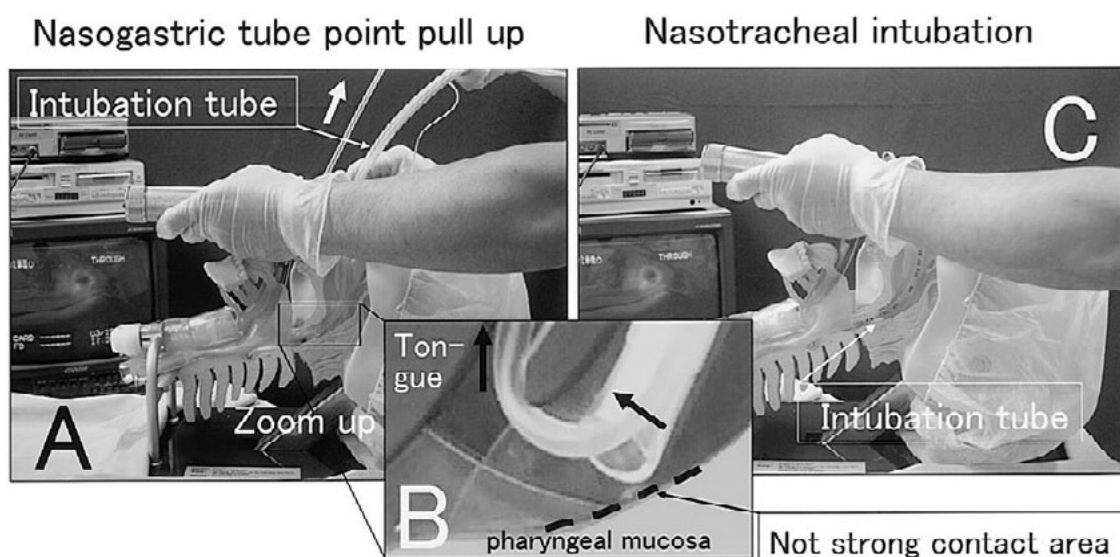


Fig.3 Nasogastric tubes as guide intubation (NTGI) - 3

The anesthesiologist conducts laryngoscopy and tracheal intubation in the open view of the vocal cord. Tracheal intubation was confirmed at five points and six auscultations were performed to check for tarnishing of the inside of the tube. Secondary confirmation is conducted using a capnometer and determination of the end tidal CO₂ level.

An anesthesiologist and an anesthesiology instructor confirm the distance from the intubation tube tip to the tracheal bifurcation site using a fiberscope and photograph. The presence or absence of injury in the larynx and pharynx is then confirmed by fiberscopy and the condition is photographed. In addition, the instructor confirms the position of the intubation tube and presence or absence of injuries by monitoring (Fig. 4).

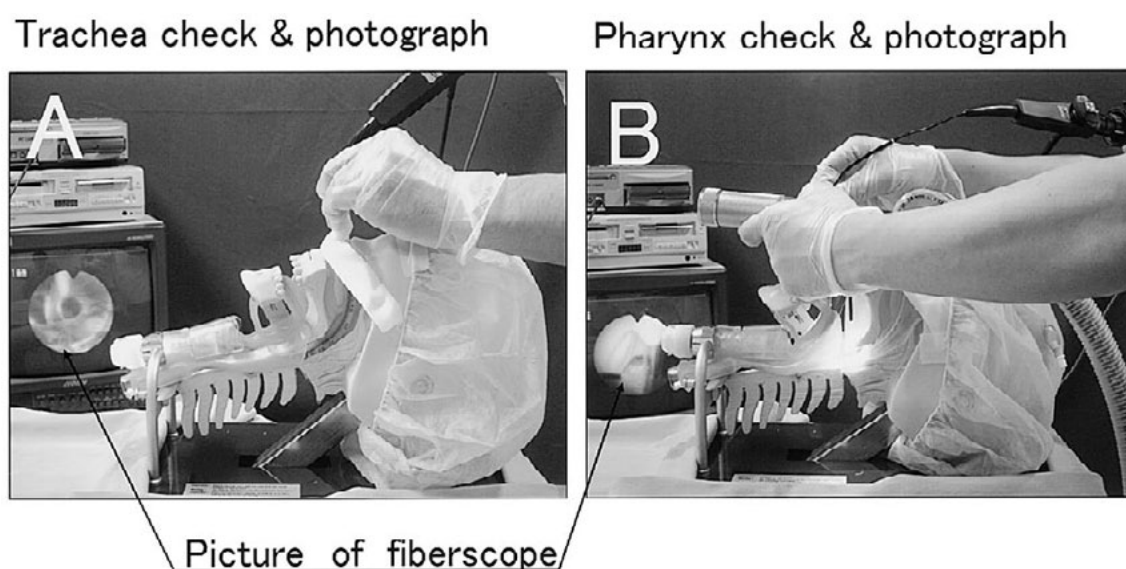


Fig.4 Nasogastric tubes as guide intubation (NTGI) - 4

2) NTGI comparison with BINI

A reactive comparison between the NTGI and BINI methods in terms of amount of bleeding and intubation time was conducted with 30 cases by the same dental anesthesiologist. Blood loss was measured with respect to four different suctioned levels: no, little (0.1–1.0ml), medium (1.1–5.0ml), and heavy bleeding (>5.1ml). The intubation time was set from the start of the general anesthetic inhalation to the nasotracheal intubation (mean $\pm$ SD).

The two groups were compared, and for the statistical analysis, Fisher's exact test was utilized for nasal blood loss volume,

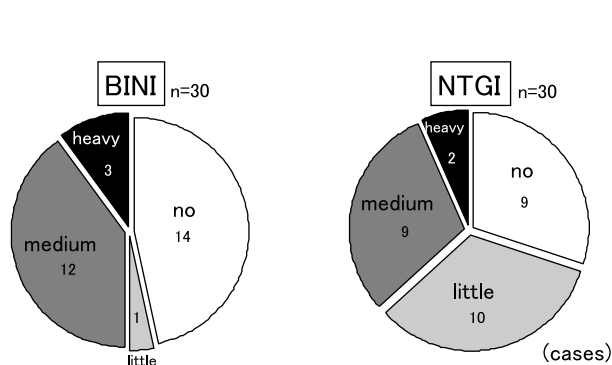


Fig.5 Breakdown of the nasal bleeding level(BINI vs NTGI)
Blood loss was measured with respect to four different suctioned levels : no, little (0.1–1.0 ml), medium (1.1–5.0 ml), and heavy bleeding (>5.1 ml).
BINI : bougie inferior nasal meatus as nasotracheal intubation
NTGI : nasogastric tubes as guide intubation.
No significant difference with Fisher's test (n=30).

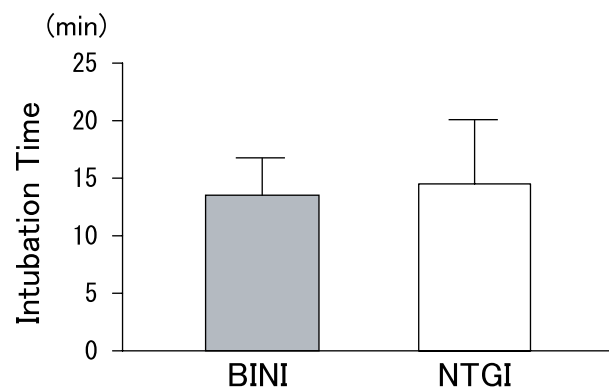


Fig.6 Intubation Time(BINI vs. NTGI)
Intubation time was set from the start of the general anesthetic inhalation to the nasotracheal intubation (mean ± SD).
No significant difference with Mann–Whitney U test (n=30).

and the Mann–Whitney U–test (with Y–stat) was used to compare the intubation time.

Results

Nasal bleeding due to nasotracheal intubation demonstrated no statistically significant differences between the two groups (Fig. 5).

One case involving a tear of the oropharynx occurred in the BINI group, no oropharynx tear was determined in the NTGI group.

There were no meaningful differences in the intubation time from the start of the general anesthetic inhalation to nasotracheal intubation between the BINI (12.7±7.6min) and NTGI (13.2±3.2min) methods (Fig. 6).

Discussion

The NTGI method using a gastric tube (Nakanishi et al., 1995 ; Sugiura et al., 1996), or aspiration tube (Sloan, and Van Rooyen, 1994), can prevent large pharyngeal mucosa injuries. As the gastric tube is long, its contact with the pharyngeal mucous membranes, especially the pharyngeal posterior wall, can be reduced by pulling it outside the oral cavity, thus preventing pharyngeal injuries. However, as there have been reports of pharyngeal injury by gastric tubes (Domino et al., 1999), precaution should be exercised. Other nasotracheal intubation methods using fiberoptic (Kawamura et al., 2003) or Lightwand (Manabe et al., 2004) have been reported. These will be further examined in future studies.

The results of the present study indicate that pharyngeal mucosa injuries also occur with the NTGI method. There was no significant difference in the amount of bleeding when compared with the BINI method. However, the NTGI method tended to cause micro–bleeding more frequently. This finding was confirmed by a fiberoptic, and nasal bleeding which could not be confirmed macroscopically was recorded as micro–bleeding. As a result, the proportion of micro–bleeding may be higher. However, the NTGI performed in the present study did not cause large injuries and was considered to have provided the promotion of safety during nasotracheal intubation.

There were no differences in the time taken till intubation, as compared with the BINI method. The trachea, larynx, and pharynx were confirmed by fiberoptic.

In the present study, the intubation tube was changed to prevent pharyngeal injury. The tube tip was made of soft material and with an obtuse angle, and the tube shape was changed. Although the intubation procedures were safe because the intubation tube material was soft, there is the possibility of obstruction of the nasal cavity during general anesthesia. Nasotracheal

tubes fabricated from soft materials reduce the extent of tear in the nasal mucous and pharynx mucous membranes. In this study, no complications from tube (PVC : polyvinyl chloride) occlusion or applanation were observed. However, we have previously encountered several cases in which non-PVC type silicon tubes led to applanation in the inferior nasal meatus (a transtracheal aspiration tube, 4 mm in diameter, was unable to pass through the trachea). Further study is required to develop tubes for safer tracheal intubation during surgery and on regaining consciousness as well as during intubation.

Conclusions

The NTGI protocol was substituted for the BINI method due to the occurrence of tears in the epipharynx and the oropharynx. The NTGI was performed clinically, and 30 cases were verified fiberoptically. A reactive comparison was performed between NTGI and BINI.

No instances of oropharynx tearing were observed in the subjects undergoing NTGI. Blood loss from the inferior meatus in NTGI patients was comparable to that in BINI patients.

The NTGI prevented pharynx mucous membrane tearing as well as blood losses exceeding 5 ml, and these findings confirm the safety and efficacy of the NTGI approach for nasotracheal intubation.

References

- Domino KB, Posner KL, Caplan RA and Cheney FW. Airway injury during anesthesia—A closed claims analysis—. *Anesthesiology* 91 : 1703–1711, 1999.
- Kawamura S, Matsubara Y, Tamai Y, Fujiwara M, Kuri M and Amano M. The usefulness of the processed nasal airway for fiberoptic guided nasotracheal intubation. *Masui* 52 : 298–303, 2003.
- Manabe Y, Seto M, Mise K and Taniguchi S. Use of narrow lightwand device reduces nasotracheal intubation related epistaxis. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 32 : 13–17, 2004.
- Nakanishi O, Murayama F, Hattori K, Mizoguchi S, Kawano S, Tohda Y, Ishikawa M and Nishi M. A novel method for passing nasotracheal tube from nostril to oropharynx. *J Jpn Dent Soc Anesthesiol* 23 : 426–429, 1995.
- Sloan EP and VanRooyen MJ. Suction catheter-assisted nasotracheal intubation. *Acad Emerg Med* 1 : 388–90, 1994.
- Sugiura N, Miyake T, Okui K, Hibi G, Oka T, Yamada M and Arai T. Increased success of blind nasotracheal intubation through the use of nasogastric tubes as guide. *Anesth Prog* 43 : 58–60, 1996.

〔CLINICAL report〕

Application of low-frequency electricity and stellate ganglion block therapy to inferior alveolar neuroparalysis following tooth extraction –Evaluation of facial skin temperature elevations via thermography–

Takuro KAWAI¹⁾, Masaru KUDO¹⁾, Tomochika YANAGI^{2),3),4)} and Noboru SHINYA¹⁾

¹⁾Department of Dental Anesthesiology, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

²⁾Department of Dental Materials Science

³⁾Second Department of Oral Maxillofacial Surgery

⁴⁾Takikawa Dental Clinic

Abstract

Mentolabial paralysis occurs as a result of inferior alveolar nerve injury consequent to tooth extraction. Stellate ganglion block (SGB) therapy, acupuncture and magnetic electrotherapy (AME) are utilized for the treatment of neuroparalysis following tooth extraction. The SGB therapy includes 30 injections (2–3 times/week) as a single set, and subsequently, the therapeutic effects are re-evaluated. To determine the efficacy of the treatment, patient symptoms and skin temperature increase at the site of the hypoesthesia serves as indices.

Subtle temperature changes, which were detected via thermography, were converted into numeric values in this study. Treatment was conducted in collaboration with the family dentist over a 20-month period from the 5th to the 25th month from the onset of the hypoesthesia. The mean temperatures at the site of the hypoesthesia was compared, for an SGB-only (n=5) and an SGB/AME combination (n=5) treatment.

The results found that the level of hypoesthesia, which was measured with a Semmes–Weinstein monofilament (SW) sensory tester, improved from $\phi 3.84$ to $\phi 2.44$ – 3.22 . The temperature at the site of the hypoesthesia increased by 0.8°C following the SGB injection; in contrast, the temperature at the site of hypoesthesia increased by 2.5°C following application of the SGB/AME combination. In inferior alveolar neuroparalysis arising as a consequence of tooth extraction, the surface thermographic temperature measurement at the site of the hypoesthesia was effective to observe the temperature increase due to SGB injection and to the SGB/AME combination; additionally, it offers a substantiation for the treatment efficacy for the patients.

Key words : Stellate ganglion block, Acupuncture and magnetic electrotherapy, Thermography, Inferior alveolar neuroparalysis, Medical lawsuit

Introduction

Stellate ganglion block (SGB) therapy, acupuncture, and magnetic electrotherapy (AME) are utilized in the treatment of neuroparalysis following tooth extraction. The SGB therapy comprises of a set of 30 injections (2–3 times/week); subsequently, the therapeutic effects are re-evaluated.

To assess the suitability of injections, subjective symptoms of each patient as well as the skin temperature elevation at the site of the paralysis were evaluated. The skin temperature elevation was examined via thermography (THG) following implementation of AME and SGB in a case characterized by paralysis. Originally, the individual had been subjected to continuous dental laser irradiation.

受付：平成17年3月31日

Methods

1. Therapeutic Methods

1) SGB (Stellate Ganglion Block)

The SGB, which offers temporary pain relief in terms of sympathetic tone, is achieved via the injection of local anesthetic in the cervical sympathetic ganglion area. Consequently, the blood flow (Kakuyama et al., 2000) and metabolism at the site are stimulated as a result of vascular dilation; thus, the body temperature is elevated on the side of the cervical sympathetic ganglion injection (Matsumoto et al., 1992). The SGB is applied to various disorders, including allergic rhinitis, sudden deafness, autonomic nerve imbalance, angina and lower limb pain. In the dental field, SGB is employed in instances of post-extraction pain and paralysis, tongue pain and peripheral facial paralysis. The treatment at the hospital here uses lidocaine hydrochloride (6ml, 2% solution) or a mixture of lidocaine hydrochloride (4ml, 2%) and bupivacaine hydrochloride (2ml, 0.25%, total 6ml, solution) as local anesthetics for the SGB injections.

Injection is conducted from the front side with the patient in the dorsal position. The cervical transverse process serves as an indicator point (Fig. 1).

Body temperature elevation at the block side, blepharoptosis, pupil constriction and palpebral conjunctiva hyperemia are evaluated to assess the sympathetic tone relief. Most patients experience a “warm sensation” and sleep for 30–60 minutes following the injection. The injection diagram depicted in Figure 1, which offers an explanation for the SGB procedure, is shown to the patient.

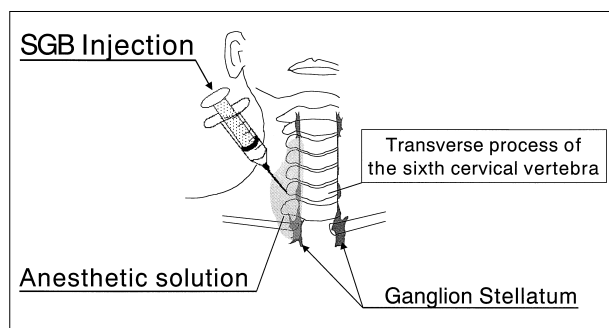


Fig. 1 Front penetration image SGB injection
An expanse of anesthetic solution Injection of Stellate ganglion block(SGB).

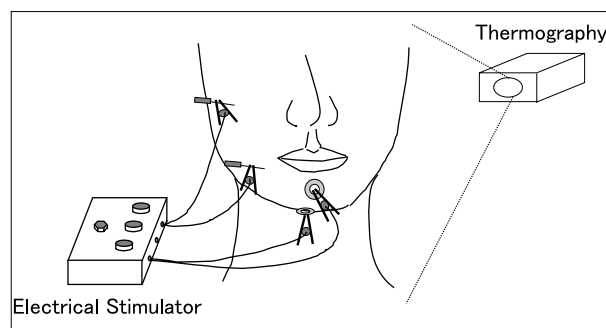


Fig. 2 The method of electrical stimulation
Magnet or acupuncture was used for the treatment of electrical stimulation.
Stimulation conduction : 2Hz, bipolar pulse wave. Intensity of stimulation : either muscle contraction(+)and pain(-).
The effect of electrical stimulation was assessed by the increase of surface temperature.
Surface temperatures of patient's face were measured by thermography.

2) AME

In AME, magnetic electrode attachment or acupuncture needle insertion is completed at various pressure points(3points on the face, between the bases of the thumbs and index fingers, the inner side of the elbow and underneath the chin); subsequently, a 2-Hz electric current is applied (Fig. 2). The AME is reported to promote blood flow and to elevate skin temperature via a stimulation of polymodal receptors with low-frequency electricity and magnetic force (Takeshige and Sato, 1996). The objective of this particular treatment is restoration of patient sensory function. Reduction of the nerve paralysis level and minimization of the paralysis area were examined. In addition, appropriate sympathetic tone relief was estimated by monitoring the skin surface temperature and temperature increases in the mucous membranes and the tongue of the mouse employing the THG apparatus (TH5104R, NEC) or an infrared eardrum thermometer (Genius™, Tyco Healthcare).

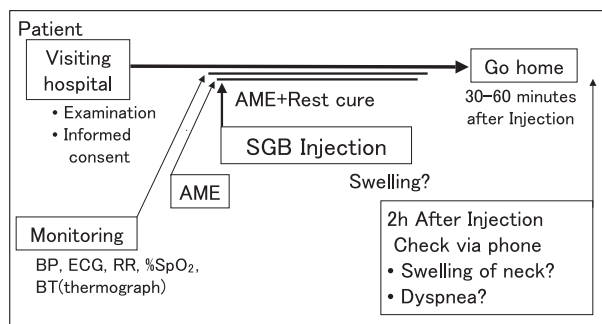


Fig. 3 Therapeutic flow of SGB injection in dental anesthesia
SGB injection was administered 30 minutes following the initiation of AME. The patient rested for 30–60 minutes following application of SGB. The patient was monitored continuously during the resting phase for early detection of any incidental symptoms..
SGB : stellate ganglion block AME : Acupuncture magnetism of electrical therapy

Days after onset	-14 days	15 – 89 days	90 – days
Examination	• Sensory test • Facial skin temperature • Dental pulp blood flow	• Sensory test • Facial skin temperature • Dental pulp blood flow	• Sensory test • Facial skin temperature • Dental pulp blood flow
Treatment	• SGB injection 2 – 5 / week 30 times	• SGB injection 2 / week 30 times	• SGB injection 1 – 3 / week • AME
Drug	• Vit B ₁₂ : 1.5g • ATP :180mg 3x/14days	• Vit B ₁₂ : 1.5g • ATP :180mg 3x/14days	• Vit B ₁₂ : 1.5g 3x/14days
Prognosis	• good	• moderate	• severe

Table1 The guideline for trigeminal nerve injury in dental anesthesiology at HSUH dental hospital

If patients start to receive our treatment as soon as they can, their prognoses will get better.

HSUH : Health sciences university of Hokkaido SGB : stellate ganglion block AME : Acupuncture magnetism of electrical therapy.

3) Therapeutic process

Monitoring was initiated with the patient lying down in a face-up position, and SGB injection was administered 30 minutes after the initiation of AME. The sites for needle insertion were compressed for 5 minutes to establish the absence of dizziness, light-headedness, swelling or bleeding. The patient rested for 30–60 minutes application of SGB therapy. The patient was monitored continuously during the resting phase to ensure a speedy detection of incidental symptoms. The patient was released after confirming the absence of abnormal vital signs, hematoma, respiratory difficulties, dizziness, or light-headedness (Fig. 3). Table1 shows a therapeutic plan of SGB and AME from the initial screening till the goal of the treatment, which adheres to the Japan Society of Pain Clinicians treatment guidelines (Table1). A Semmes-Weinstein monofilament (SW) sensory tester, was utilized for the initial diagnosis and re-evaluation. The SW sensory tester quantitatively evaluated patient sensory functions with silicon filaments of various thicknesses. The thinner filament indicated stronger paralysis.

Case Report

1. Patient condition and medical history

Following an explanation of the risks involved, the individual underwent lower left wisdom tooth extraction at the age of 38 years. The patient received a local anesthetic (2% lidocaine hydrochloride with 1 : 80,000 epinephrine) injection with sedative, and the vital signs were monitored. The patient repeatedly complained of pain despite the delivery of 12.2 ml of anesthetic during the 145-minute procedure. Antibiotics and a sedative were prescribed after the operation. The day immediately after the tooth extraction, the individual complained of occlusion discomfort as well as numbness in the chin. Partial neuromesis of the inferior alveolar nerve was suspected. Vitamin B12, multivitamins and ATP medication were administered. Low-level laser irradiation (1–2 times/week) was also administered for five months ; however, this was ineffective.

2. Diagnosis and treatment in the dental anesthetic department.

At 5 months after the tooth removal, the patient was admitted to dental anesthetic department at HSUH dental hospital. Sensory tester diagnosis indicated a paralysis of 48 mm × 40 mm, > ϕ 3.84 in the right mental nerve area. The individual also complained of other discomfort such as abnormal heat sensitivity (hot drinks felt excessively hot). A diagnosis of the paralysis by drug-induced temporary conduction disturbance was administered. The individual was advised about and asked to choose SGB and/or AME treatment (needle electricity : insertion of Japanese acupuncture needles in facial and frontal arm pressure points for conduction of an electric current).

The patient chose AME, and evening treatments were planned (once per week). Additionally, CO₂ laser irradiation was used to improve the effectiveness of the therapy. No improvement was seen after five months of AME treatment (total 10 treatments, now 10 months after the tooth extraction). Consequently, SGB therapy was initiated. Further, after a 9-month AME regime (20 treatments, till 14 months after the tooth extraction), a combination of the SGB injections and AME therapy was performed.

To evaluate the efficacy of the SGB injections as well as the combination SGB injection/AME therapy, the skin surface temperature was non-invasively and continuously monitored via thermography. The SGB injection efficacy is illustrated in Figures 4 and 5. Average skin temperature of the paralysis site and the lower eye socket served as indicators.

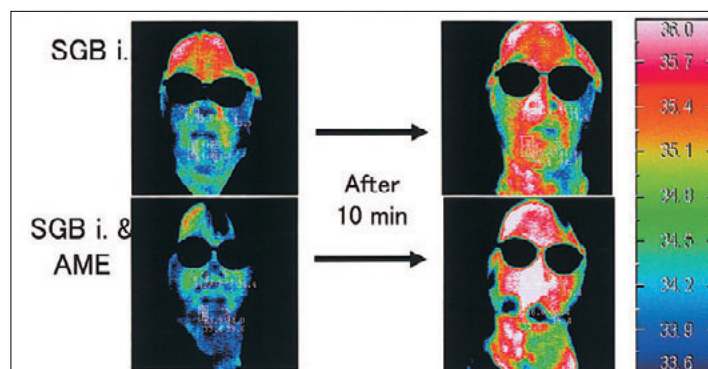


Fig. 4 Effect of increase BT by SGB injection and AME

The changing of patient's facial skin temperature by thermography in a case of Disturbance of inferior alveolar nerves. Room temperature was 26–28°C. SGB i: stellate ganglion block injection

3) Therapeutic medical effects

In Fig. 4, the upper left corner indicates the conditions prior to the block, while the upper right corner indicates the conditions 10 minutes after the SGB injection. The temperature increase was 0.9°C (34.4–35.3°C) on the injection side and 0.7°C on the normal side (Fig. 4). The combined therapy involving SGB and AME demonstrated higher temperature elevations in the head and neck area than with the application of SGB alone. The area of hypoesthesia had a 0.8°C increase with SGB, and using AME the increase was 2.5°C (Fig. 5).

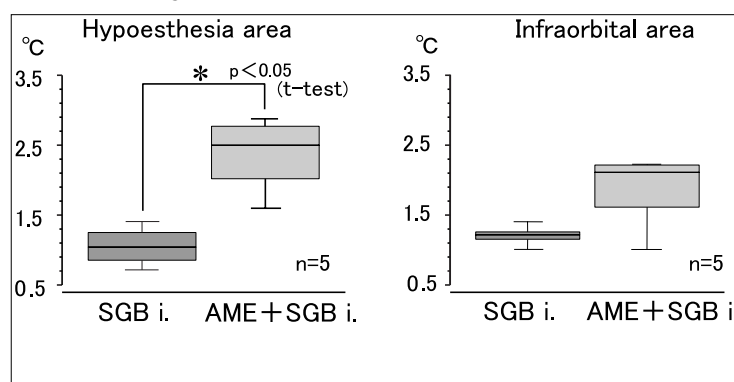


Fig. 5 Difference of hypoesthesia area and infraorbital area BT

Increase of temperature on surface of facial skin, after 10 minutes from the end of SGB injection. Dates of SGB injection are shown as the average of five times increases of temperature on surface of facial skin for one patient. Facial temperatures were increased 0.8°C at hypoesthesia area by SGB injection, and 2.5°C at hypoesthesia area by AME+SGB. The increase of AME+SGB was significantly higher than that of SGB. SGB i: stellate ganglion block injection

The individual did not complete the treatment (Final treatment 32 courses of SGB injection, at 20 months from initiation of therapy, 26 months from the tooth extraction). At the last treatment the area of hypoesthesia was unchanged (38mm X40 mm), the paralysis level had improved to $\phi 2.44$ –3.22, occlusion discomfort had improved (from + to $\pm$), and the abnormal heat sensitivity had decreased. The patient was informed of the low probability of a complete cure with continued therapy and the treatment was discontinued. The patient continued the laser irradiation treatment at a family practice clinic.

Discussion

The pain clinic at the hospital treats patients with inferior alveolar paralysis, facial paralysis, glossalgia, masticatory muscle myofascial syndrome, and temporomandibular disorders, conditions that are not caused by brain nerve or blood vessel dysfunction. In the current case, the numbness and paralysis in the lower lip resulted from a partial rupture of the inferior alveolar nerve due to extraction of a lower jaw wisdom tooth. Paralysis in this instance is iatrogenic in nature. Consequent to the ap-

pearance of this disorder, many patients refuse SGB or needle-type treatments, and patient refusal results in a delayed start of SGB treatment. The initiation of SGB treatment as rapidly as possible is essential in cases involving neural paralysis (Imamura et al., 2000), but an early implementation of the SGB treatment, and thus prevention of further induction of incidental symptoms, requires resolution of patient fears regarding needle-type regimes involving the neck and head regions. At the hospital dental anesthetic department (pain clinic), patients are carefully monitored to facilitate delivery of immediate medical attention in the event of complications arising from anterior neck region needle insertion. The patient reported here had 32 needle insertions with no serious side effects. Currently, magnetic electricity is employed for induction of SGB, and the introduction of SGB under nitrogen monoxide and oxygen inhalation / sedation with careful vital sign monitoring and near-infrared exposure is presently under review with respect to patient anxiety (Kudo, 2003).

Many patients are referred by other in-hospital departments or by dental professionals in nearby cities, for patient convenience, the pain clinic is open in the evenings twice a week. Close communication with the patients' family dentists and doctors is essential. In general, office hours of general hospitals and university medical centers are more limited, and to assess patient needs there are plans to expand pain clinic hours to two nights per week.

Following the combination of SGB and AME therapy and SGB application alone, facial skin temperature was elevated at the site of the paralysis. The combined therapy allowed the detection of the elevation in facial skin temperature at the site of the paralysis with improvement in paralysis levels (temporary conduction disturbance); however, paralysis was not completely cured.

The main factor influencing this outcome was the delayed SGB and AME application following the development of the paralysis; further, patient age (38 years) and a busy work schedule contributed to the therapeutic delay. Treatment was ultimately discontinued, but a medical malpractice suit was avoided due to patient understanding.

Many instances of inferior alveolar neuroparalysis can be attributed to nerve damage in the mandible as a result of tooth removal. Therefore, an assessment of treatment efficacy requires careful observation of blood flow increases in the mandible and the mandibular canal in addition to thermography. Our department is also capable of blood flow measurements in the peripheral dental pulp, and future combinations of such methodologies with conventional therapies is desirable in order to accommodate long-term inferior alveolar neuroparalysis. There are several reports of successful steroid therapy in similar cases (Seo et al., 2004). To improve sensory function, immediate hospital admission at the time of symptom development, administration of short-term concentrated therapy, application of laser irradiation and near-infrared exposure, all in combination with steroid therapy appear desirable. Many dentists will require instruction in these novel therapeutic strategies.

Conclusion

Measurement of the skin surface temperature via thermography were effective in the diagnosis and prognosis predictions in cases of inferior alveolar neuroparalysis following tooth removal. Five months after the development of paralysis, SGB and/or AME therapy was conducted for 20 months with the cooperation of the family dentist; subsequently, paralysis symptoms improved. An early start of SGB therapy is desirable to promote iatrogenic peripheral nerve damage treatment and to avoid intractability.

References

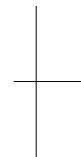
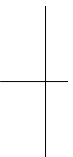
- | | |
|---|--|
| <p>Imamura. Y, Sakamoto Y, Shiiba E, Iwamoto M, Kawahara H, Yasusaka M, Tahara F, Nakashima A, Fukuda J and Nakanishi O. Predicting the prognosis of abnormal sensation after dental treatment -Using self reported symptoms-. J Jpn Dent Soc Anesthesiol 28 : 27-35, 2000.</p> <p>Kakuyama M Toda H, Osawa M and Fukuda K. The bilateral effect of stellate ganglion block on the facial skin blood flow. Reg Anesth</p> | <p>Pain Med 25 : 389-392, 2000.</p> <p>Kudo M. Efficacy of nitrous oxide/oxygen inhalation sedation in dentistry -providing painless, and comfortable dental treatment. Medical Gases 5 : 47-53, 2003.</p> <p>Matsumoto S, Mitsuhata H and Hasegawa J. Thermographic assessments of the sympathetic blockade after stellate ganglion block (no.3) -the block at the base of the 6th cervical transverse process. Masui 41 : 111-118, 1992.</p> <p>Seo K, Tanaka Y, Terumitsu M and Someya G. Efficacy of steroid</p> |
|---|--|

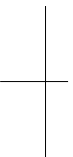
82 Takuro KAWAI et al./Application of low-frequency electricity and stellate ganglion block therapy to inferior alveolar neuroparalysis following tooth extraction

Treatment for sensory impairment after orthognathic surgry. J Oral
Maxillofac Surg 62 : 1193-1197, 2004.

Takeshige C and Sato M. Comparisons of pain relief mechanisms be-

tween needling to the muscle, static magnetic field, external qigong
and needling to the acupuncture point. Acupunct Electrother Res
21 : 119-131, 1996.





〔システムティックレビュー〕

変形性関節症に関連する遺伝子多型についてのシステムティックレビュー

金澤 香, 柴田 考典

北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座

Systematic review of polymorphisms related to osteoarthritis

Kaoru KANAZAWA and Takanori SHIBATA

First Department of Oral and Maxillofacial Surgery, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

Osteoarthritis (OA) is the complex multifactorial disease of which the etiology is not yet well defined, and recently increasing attention has focused on the genetic risk factors of OA. The purpose of this study was to analyze the published literature on the association between genetic polymorphisms and OA by a systematic review method.

Papers published from 1995 to March 2005 with the keywords cytokines, polymorphisms and OA, as well as papers among the references in these papers were obtained from Plumbed. The inclusion criteria were papers on the relationship between genetic polymorphisms of the Interleukin (IL)-1, IL-1 receptor antagonist (RA), or the Tumor Necrosis Factor (TNF)-alpha and OA, and the paper includes retrospective studies that compare the prevalence of genetic polymorphisms of OA and healthy controls. Studies with fewer than ten subjects were excluded. Only three papers met the selection criteria, and these were reviewed. Evidence-based medicine data tables were drawn for each of the three papers respectively. There were significant differences ($P=0.0007$) in the frequencies of the T allele of IL-1 β C3954T in the genetic polymorphism between OA patients with total hip or knee replacement and healthy controls.

The evidence from the articles reviewed indicated a statistically significant correlation between OA and some specific polymorphisms of IL-1, but some of the reports showed bidirectional results. Further rigorous studies based on well-defined disease and control criteria will be required to contribute to the prevention and management of OA.

Keywords : Cytokine, Polymorphism, Osteoarthritis, Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA)

緒 言

顎関節における変形性関節症 (Osteoarthritis, OA) は、関節軟骨、関節円板などの退行性変性から関節軟骨の破壊と同時に骨・軟骨のリモデリングをきたし、関節形態が変化する疾患で、退行性関節疾患 (DJD: degenerative joint disease) とも呼ばれる。

一般に変形性関節症は、関節表面に加わる負荷 (おもに剪断力) と負荷に耐える能力やリモデリングによる代償との平衡関係がくずれるのが原因と考えられている。

特に、顎関節における変形性関節症では円板障害を伴わないそれが比較的稀であることから、円板障害に継発する関節負荷の増大と滑膜炎が引き金になると考えられているが、個々の症例の発症および増悪を制御している因子については不明である。

最近、顎関節症患者の顎関節滑液を用いた生化学的分析から、顎関節でも身体他部の滑膜関節と同様に、サイトカインIL-1 β , TNF- α が関節破壊に重要な役割を果たしていることが示されている (Kubota et al., 1997; Yamamori et al., 2000)。

受付: 平成17年3月31日

これらシグナル伝達タンパクにおいては遺伝子多型が多く、それらが変形性関節症の発症あるいは増悪に関与しているとの報告がある (Smith et al., 2004; Stern et al., 2003)。

そこで本研究では、変形性関節症の発症あるいは増悪に関与している遺伝子多型を探索することの一助とするため、まず変形性関節症の発症あるいは増悪に関与している遺伝子多型を推定するため、メタアナリシスを行った (丹後, 2002)。

方 法

1. 一次検索

1995年から2005年3月までのPub Medデータベースを用い、キーワードとしてCytokines (cytokines.mp. あるいはexp *CYTOKINES), Polymorphism (polymorphism. mp. またはexp *POLYMORPHISM, RESTRICTION FRAGMENT LENGTH またはexp *POLYMORPHISM, SINGLE-STRANDED CONFORMATIONAL またはexp *POLYMORPHISM, GENETIC またはexp *POLYMORPHISM, SINGLE NUCLEOTIDE), OA (exp *OSTEOARTHRITIS, HIP またはosteoarthritis.mp. またはexp *OSTEOARTHRITIS またはexp *OSTEOARTHRITIS, KNEE) を選択し、記述用語が英語、かつ研究対象がヒトに限定して検索を行った。

2. 二次選択

検索された論文の二次選択の基準として、以下の4条件を設定し絞り込んだ。

1) OA診断基準が明示されていること

2) IL-1, IL-1RA, あるいはTNF- α の遺伝子多型の解析がなされていること

3) 健常者対照群の設定があること

4) 対象患者数が10名以上であること

3. 抽出論文の評価と解析

選択された文献をevidence-based medicine data table (以下EDTと略す) を用いて評価した (森實, 2004)。EDTの主な項目は、仮説、疾患、診断法、症例群や対照群の総数、男女比、年齢、結果、結論とした。

なお、各論文中遺伝子型の頻度についてのみ検討し、アレル頻度についての検討を加えていない論文については、遺伝子型の頻度をアレル頻度に換算した上で、さらに統計処理を実施した。

4. 統計処理

統計処理には χ^2 独立性の検定法を適応し、 $P < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

結 果

1. 一次検索

Pub Medによる一次検索でCytokines, Polymorphism, OAを選択したところ、それぞれ150,596件、63,773件および13,095件が抽出され、3キーワードの複合により14件が抽出された。抽出された14論文は、すべて症例対照研究であった。さらに、記述用語を英語、かつ研究対象をヒトに限定しても抽出件数に変化はなかった。ついで、これら14論文のフルテキストを入手し以下の検討を行った。

2. 二次選択

二次選択によって、3論文 (Stern et al., 2003; Loughlin et al., 2002; Moos et al., 2000.) が抽出された。除外論文の内訳は、診断基準の不明示 (1編)、異なるサイトカイン遺伝子多型の検索 (8編)、対象患者数の不足 (2編) であった。

3. EDT

抽出された3論文について、それぞれEDTを作成した (表1, 2, 3)。

4. 評価・解析結果

1) IL-1 α 多型

C-889Tにおいてマイナーアレルを持つ健常者と膝関節全置換OA患者との間で $P=0.03$ を示していた (Loughlin et al., 2002) が、遺伝子多型の記載がTからCへの一塩基置換となっており信頼性に欠けた。

2) IL-1 β 多型

C3954T, G5810A, C-511T, C1423T, T1903C, C5887Tの6多型について検索され、C3954TおよびG5810Aについてのみ何らかの有意差を認める報告が認められた。

C3954Tでは、膝または股関節全置換OA患者群におけるTホモタイプが健常者群より有意に大きな値を示していた ($P=0.00062$) という報告 (Moos et al., 2000) と、膝および/または股関節全置換OA患者と健常者間において、Tアレル数に有意差はなかった ($P=0.83$) とする相反する報告 (Loughlin et al., 2002) がある。そこで、膝または股関節全置換OA患者に限定し、アレル頻度に換算し再計算を行ったところ、Moosら患者群ではTアレルが健常者群より有意に多かったが ($P=0.0007$)、Loughlinらの患者群および両者を合算した患者群では、ともに健常者群と差が見られなかった ($P=0.76$, および $P=0.43$)。

また、Moosらは膝または股関節全置換OA患者群をさらに軟骨細胞のTNF- α 産生能の高低により2群に分

表1 EDT Stern et al., 2003.

番号	# 1
疾患／病態	変性性関節 変性性関節
疾患／病態の診断法	American college of rheumatology Clinical Criteria
民族性	白人
採用基準	OA, IL-1 β polymorphism, 健康者の対象有り, 対象患者数10名以上
除外基準	なし
総症例数	68 (変性性26人, 変性性42人)
男性／女性	14／54 (変性性 5／21, 変性性 9／33)
年齢：中央値、範囲	(変性性 男73 $\pm$ 6.6 女71 $\pm$ 7.1 変性性 男69 $\pm$ 6.4 女65 $\pm$ 10.8) 平均 $\pm$ SD
対照群症例数	51
男性／女性	6／45
年齢：中央値、範囲	男 (72 $\pm$ 6.7) 女 (69 $\pm$ 10.0)
マッチング(有意差のある項目)	IL-1 B5810AA統計学的に変性性hand OAのグループと関係があった。相対危険度3.8p=0.007. これはまた変性性と変性性OAのグループでも関連があった (相対危険度4.01p=0.008)
結果	IL-1A-889, IL-1B5887, IL-1B1903, IL-1B5810, IL-1B1423, IL-1RN8006, IL-1RN VNTR, IL-1RN11100を検索した。hand OAのグループと関係があった。相対危険度3.8P=0.007 これはまた変性性LI-1B5810遺伝子型ではハーディーヴァインベルク平衡ではなかった。IL-1B5810AA遺伝子型は統計学的に変性性と変性性OAのグループでも関連があった (相対危険度4.01p=0.008)
統計学的解析法	chi-square tests
結論	変性性hand OAとアメリカ白人のIL-1B5810SNPを含むゲノム領域において関連の統計学的証拠を示す。これは、hand OAの重篤度表現型の病因におけるIL-1の潜在的役割をサポートする。変性性関節OAと健康者で、IL-1 β 5810とは関連がある。

表2 EDT Loughlin et al., 2002.

番号	# 2
疾患／病態	股関節, 膝関節
疾患／病態の診断法	臨床的な評価, 代謝的な原因はのぞく, 患者は関節置換術経験あり
民族性	Caucasian
採用基準	OA, IL-1 β polymorphism, 健康者の対象有り, 対象患者数10名以上
除外基準	なし
総症例数	557 OA CASE THR total hip replacement (390), TKR total knee replacement (136), THR&TKR (31)
男性／女性	(342／215) THR (146／244), TKR (58／78), THR&TKR (11／20)
年齢：中央値、範囲	男74 (61-88) 女72 (56-90) 平均 (range)
対照群症例数	557 (215W, 342M)
男性／女性	(342／215)
年齢：中央値、範囲	男74 (61-89) 女71 (59-88) 平均 (range)
マッチング(有意差のある項目)	4 SNPs (IL-1RN9589, IL-1A-889, IL-1B3954, IL-1B5810)
結果	IL-1A-889, IL-1B3954, IL-1B5810, IL-1B-31, IL-1B-511, IL-1RN VNTR, IL-1RN9589, IL-1RN11100を検索した。IL-1B-31と-511, IL-1RNA9589とVNTRは完全連鎖していた。膝関節 (136) と、男性膝関節 (58) について有意差を認めた。
統計学的解析法	chi-square tests
結論	IL-1リガンドは、男性の膝関節OAの罹病率に関係がある。

表3 EDT Moos et al., 2000.

番号	# 3
疾患／病態	膝関節, 股関節
疾患／病態の診断法	臨床的な評価, 代謝的な原因はのぞく, 患者は関節置換術経験あり
民族性	白人
採用基準	OA, IL-1RA, IL-1 β polymorphism, 健康者の対象あり, 対象患者数10名以上
除外基準	なし
総症例数	関節置換術経験があるhip or kneeのend stage OA患者61人
男性／女性	記載なし
年齢：中央値、範囲	記載なし
対照群症例数	254
男性／女性	記載なし
年齢：中央値、範囲	記載なし
マッチング(有意差のある項目)	IL-1 β 3954, IL-1RA VNTR
結果	IL-1 β 3954では、アレル1ホモは、コントロールで61%, OAで42%. アレル2ホモは、コントロール5%, OAで20%. P=0.00062 オッズ比5.687 95%区間 (2.12-15.26) IL-1 β 3954では、軟骨細胞の低TNF- α 産生能グループにおいて、Cアレルを持つ者とTアレルをもつものとのP=0.0096で有意差あり。IL-1RA VNTRでは、軟骨細胞の高TNF- α 産生能グループにおいて、2回繰り返し配列をもつ割合が高い (p=0.0058)
統計学的解析法	chi-square tests
結論	IL-1 β 多型 (3954) とTNF- α high (-308) のphenotype, IL-1 RA多型 (VNTR) とTNF- α lowのphenotypeの間にはOAにおいて関連がある

け、低産生能患者群では健常者群よりTTおよびTCの発現頻度が有意に高かった ($P=0.0096$) と報告している。

G5810Aでは、手関節にエロージョンを認めるOA患者群においてハプロタイプのうちホモタイプAAのみが、健常者群より有意に高い値を示した ($P=0.007$) (Stern et al., 2003) という報告がある一方、膝かつ／または股関節全置換OA患者群のAアレル頻度は健常者群と差はなかったとする報告もあった ($P=0.80$) (Loughlin et al., 2002)。そこで、アレル頻度の再計算を行ったところ、Sternらの患者群においても有意差は認められなかった ($P=0.0784$)。

3) IL-1RA多型

T8006C, T11100Cの多型について検索されていた

が、いずれも有意差は認められなかった。

IL-1RA VNTR (variable-number of tandem repeats) については、Loughlinら、Moosら、およびSternらは、各患者群と健常者群との間で有意差は認められなかったと述べている。

なお、Moosらは軟骨細胞の高TNF- α 産生能グループの膝または股関節全置換OA患者群では、2回繰り返し配列を持つ頻度が健常者群と比べて有意に高い ($P=0.0058$) と報告している。

4) TNF- α 多型

TNF- α G-308Aは、膝または股関節全置換OA患者群と健常者群の間に有意な関連性は認められなかった (Moos et al., 2000)。(表4)

表4 解析結果

遺伝子多型	文献	患者 多型なし／あり	対照 多型なし／あり	
IL-1 β C3954T	# 2-1	膝または／かつ股関節症患者 842/260	841/267	$P=0.83$
	# 2-2	膝または股関節症患者 795/245	841/267	$P=0.76$
	# 3	膝または股関節症患者 55/35	368/104	$P=0.0007$
	(# 2-2)+(# 3)	850/280	1209/371	$P=0.43$
IL-1 β G5810A	# 1-1	エロージョンがある 手関節症患者のみ 26/26	66/36	$P=0.078$
	# 1-2	手関節症患者 81/55	66/36	$P=0.42$
	# 2	膝または／かつ股関節症患者 691/399	708/398	$P=0.80$
	(# 1-2)+(# 2)	772/454	774/434	$P=0.57$
IL-1RA VNTR 4 回配列／その他	# 1	手関節症患者 90/46	67/33	$P=0.86$
	# 2	膝または股関節症患者 763/263	795/315	$P=0.15$
	# 3	膝または股関節症患者 72/20	358/80	$P=0.44$
	計	925/329	1220/428	$P=0.86$

1 Stern et al., 2003. # 2 Loughlin et al., 2002. # 3 Moos et al., 2000

考 察

1. 遺伝子多型について

ヒト遺伝子の塩基配列は個人ごとに多部位で差異があり、一般に、この違いを遺伝子多型と呼ぶ。全人口中1%以上の頻度で存在する塩基配列の差異を、遺伝子多型と定義している。これら遺伝子多型には以下のような種類がある。

1) 1個の塩基 (C, T, A, G) が他の塩基に置き換わっているもの (single nucleotide polymorphism, SNP) で、一般に数百から一千塩基対に約1か所の割合で存在し、全ゲノムでは300万～1000万個のSNPがあるとされ

ている。

2) 1塩基から数十塩基の欠損や挿入があるもの

3) 2塩基から数十塩基の配列が一つの単位を構成し、それらが繰り返し発現する部位において、その繰り返し回数が個々で異なるもの。1単位が数塩基から数十塩基のものをVNTR、1単位が2から4塩基のものはマイクロサテライト多型と呼ばれている。

これら遺伝子多型は、疾患の発症を決定する因子ではなく、疾患の易罹患性を高めたり、病態の継続や進行に関与する危険因子として作用するものがあることが知られている。特に、糖尿病、高血圧、肥満、などの生活習慣病の場合には複数の危険因子の重複により易罹患性が

異なる。変形性関節症は生活習慣病の一つと考えられることから、遺伝子多型の影響を受け易罹患性が異なることが予測される。

2. 方法について

一次検索では、データベースとしてPub Medを用い、1995年から2005年3月までの期間、3キーワード(Cytokines, Polymorphism, OA)の複合により14件が抽出された。なお、前述のキーワードにTMJを追加した場合には、該当論文はなかった。

また、1985年から1994年までの期間で同様の検索を行ったところ、該当論文は皆無であった。

今回の検索では、Bogardusら(1999)に基づき10例以上を採用したが、最近の悪性腫瘍に関する遺伝子多型の解析では症例および対照それぞれ最低200症例以上、計400症例以上が必要とされる傾向がある(湯浅ら, 2003)。今後の遺伝子多型研究では、研究サンプルサイズをより大きなものにすることが必要となるであろう。

また、すべての選択基準に該当したのは3論文と少なく、すべての研究が白人を対象として行われていた。蒙古人種におけるOA患者のサイトカイン遺伝子多型の研究および顎関節OAに関する同様の研究は、われわれが渉猟した限りでは報告されていない。

3. OA関連遺伝子多型について

IL-1 β C3954T, G5810A, およびIL-1RA VNTRについてメタアナリシスを行った結果、IL-1 β C3954TのみがOA発症と有意に関連があると考えられた。しかし、この遺伝子多型をもつOA患者群と健常者群の間にOA発症について有意差を認める報告がある一方で相反する報告もあり、これらの症例を合算し解析したところ、患者群と健常者群においてOA発症に有意な差は認められなかった。これはIL-1 β C3954TがOA発症に関与していると仮定しても、この多型がOA発症の危険因子としての寄与率が低いと考えられた。

また、IL-1 β G5810Aについては、OA発症に関連するという報告とないとする相反する報告があり、この多型単独ではOA発症の危険因子としての寄与率が低いことを示唆していると思われる。

IL-1RA VNTRはいずれも各患者群と健常者群との間で、OA発症に差はみられなかった。

なお、IL-1 β C3954T, IL-1RA VNTRについて、軟骨細胞のTNF- α の産生能の高低により患者群を分けた場合、健常者群との間にOA発症に有意差がみられたという報告は、OA発症に関する危険因子として複数の遺伝子多型が関与していることを示唆する傍証ではないかと

考えられた。

以上より、OA発症に関する危険因子としてIL-1 β C3954Tを始めとする複数の遺伝子多型が関与しているものと考えられた。

結 語

顎関節OAの発症あるいは増悪に関与している遺伝子多型を探索するため、OA発症あるいは増悪に関与している遺伝子多型の推定を目的としてメタアナリシスを行った。データベースPub Medより14論文を選択し、二次選択基準より抽出された3論文について、評価し解析を行った。

その結果、各文献における遺伝子多型をアレル頻度に換算したところ、OA発症の危険因子としてIL-1 β C3954Tが何らかの関与を果たしていることが判明した。また、OA発症の危険因子として複数の遺伝子多型が関連している可能性が示唆された。

以上より、顎関節OAの発症においても、危険因子としてIL-1 β C3954Tを含む複数の遺伝子多型の関与の可能性が考えられた。

文 献

- Bogardus ST Jr, Concato J and Feinstein AR. Clinical epidemiological quality in molecular genetic research—the need for methodological standards—. JAMA26 : 1919–1926, 1999.
- Kubota E, Imamura H, Kubota T, Shibata T and Murakami K. Interleukin 1 β and Stromelysin (MMP3) activity of synovial fluid as possible markers of osteoarthritis in the temporomandibular joint. J Oral Maxillofac Surg 55 : 20–27, 1997.
- Loughlin J, Dowling B, Mustafa Z and Chapman K. Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. Arthritis Rheum 46 : 1519–1527, 2002.
- Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Hohlig K, Sieper J and Muller B. Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1 beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. Arthritis Rheum 43 : 2417–2422, 2000.
- 森實敏夫・EBMデータテーブル(EDT)の作成. EBM実践のための医学文献評価選定マニュアル, ライフサイエンス出版: 2004, 32–33.
- Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR, Sims JE, Doherty M, Spector TD and Bidwell JL. Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. Genes Immun 5 : 451–460, 2004.
- Stern AG, de Carvalho MR, Buck GA, Adler RA, Rao TP, Disler D, Moxley G and I-NODAL Network. Association of erosive hand osteoarthritis with a single nucleotide polymorphism on the gene encoding interleukin-1 beta. Osteoarthritis Cartilage 11 : 394–402, 2003.
- 丹後俊郎. メタ・アナリシス入門. 朝倉書店: 2002, 1–5.

Yamamori I, Shibata T, Murakami K, Kubota E and Yoshizawa N.

Detection of tumor necrosis factor- α in TMJ synovial fluid. J Dent Res 79: 1235, 2000.

湯浅秀道, 浜島信之, 内藤徹, 横田誠. 歯周病と遺伝子多型に関する論文に基づくシステマティックレビュー. 日歯周誌 45: 150-162, 2003.

[学会記録 I]

第23回東日本歯学会学術大会 定例講演会

『脳血管障害患者と口腔機能』

医療法人 禎心会病院 リハビリテーション部
副部長 小橋 透 先生

脳血管障害によって口腔機能に障害をきたし、構音障害や嚥下障害を生じることがあります。構音障害や嚥下障害のリハビリテーションにおいては歯科医師の協力が不可欠であると考えます。言語聴覚士の立場からその必要性について述べさせていただきます。

構音障害について

軟口蓋が麻痺すると鼻から息がもれてしまい「かきくけこ」が「はー、いー、ふー、へ、ふおー」といった声になってしまいます。この対応法として、軟口蓋挙上装置（palatal lift prosthesis）を使用します。これを装着することによって軟口蓋機能を代償、賦活化し、構音障害の改善をはかります。使用するのはできるだけ早い時期がよいと考えています。言語聴覚士が依頼を躊躇していることもあって、関心を持っていただける先生が少ないと感じています。

嚥下障害について

口腔機能の保全が全身の健康に与える影響について解明されつつある現在、歯科医師にも摂食・嚥下障害のリ

ハビリテーションに関心を持っていただきたいと思います。なかでも在宅の嚥下障害者の診断、評価について協力していただきたいと思います。

診断、評価の有力な方法として内視鏡検査（Videoendoscopy: VE）があります。現在は耳鼻咽喉科医やリハビリテーション科医が主に行っていますが、口腔ケアの指導も考慮しますと、歯科医師にも積極的に行っていただきたいと考えます。

内視鏡検査は、以下の利点があります。いつでも、どこでも、繰り返し行える。X線被曝の心配がない。必要に応じて長時間の観察が可能である（嚥下反射が遅延していて嚥下が起るかわからない症例でも、安心して観察を続けることができる）。咽喉頭の運動・知覚がわかりやすい。模擬食品を作る必要がない。

今後、構音障害や嚥下障害の方に対して歯科医師と言語聴覚士が良好な協力関係を築いていければと考えています。

[学会記録Ⅱ]

東日本歯学会第23回学術大会 一般講演抄録

レーザーマイクロダイセクション法による味蕾NeuroDの検出

○鈴木 裕子*, 武田 正子*, 溝口 到**

*北海道医療大学歯学部口腔解剖Ⅱ講座, **北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座

【目的】レーザーマイクロダイセクション装置（ライカASLMD）を用い、味蕾よりRNAの抽出を試みた。

【方法】マウス舌有郭乳頭の凍結切片を作製し、味蕾をレーザーで上皮より切り取った。回収した微量サンプルからAGPC法にてRNAを抽出しRT-PCR法によりNeuroDの発現を調べた。

【結果および考察】塩基性ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子は神経細胞の分化決定と促進に働く。その一つであるNeuroDは嗅上皮では嗅細胞の前駆細胞と未熟嗅細胞に発現し、樹状突起と軸索の伸長を促進させる。Mash1, Neurogenin1は前駆細胞に発現し分化決定因子として働き、これらのKOマウスではNeuroDは発現せず、嗅細胞への分化がストップする。一方、味蕾では基底細胞からⅠ、Ⅱ、Ⅲの各細胞型がそれぞれ分化すると推測されているが、前

駆細胞に相当する基底細胞にこれらの転写因子は発現しない。神経終末との間にシナプス構造を有するⅢ型細胞にはMash1が発現することが報告されている。Ⅱ型細胞はシナプスを持たないが、味覚受容体が発現することがわかってきた。われわれは主に免疫組織化学によりⅡ型細胞にNeuroDが発現することを示し、上皮由来である味蕾はパラニューロンの性質を持つため、神経組織である嗅上皮と同様、NeuroDが分化に働くと考えたがin situ hybridization法では検出できなかった（Suzuki et al., Cell Tissue Res., 307: 423-428, 2002）。窒素UVレーザーにより、組織の損傷なく微小部分を切り抜くことができるマイクロダイセクションで味蕾を切り抜き、味蕾約10個分の組織からRNAを抽出し、PCR（50 cycle）によりNeuroDの発現を確認することができた。

口腔がんおよび前がん病変におけるp15, p16のCpG islandメチレーションについて

○竹嶋麻衣子*, 安彦 善裕*, 西村 学子*, 山崎 真美*, 倉重 圭史*, 中村寿実子*, 草野 薫****, 永易 裕樹****, 荒川 俊哉**, 田隈 泰信**, 太田 亨***, 千葉 逸郎****, 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, ***北海道医療大学個体差健康科学研究所, ****北海道医療大学歯学部口腔衛生学講座, *****北海道医療大学歯学部口腔外科学講座

【目的】がんにもみられるエピジェネティックな変化の一つにCpG islandのメチル化がある。癌抑制遺伝子であるp15, p16のCpG islandに高メチル化があることで、これらの機能が抑制され、発がんに関与するとの報告がある。口腔がん、および前がん病変でのp15, p16 CpG islandのメチル化については未だ不明な点が多い。本研究では、Sri Lankaでのbetel-quid chewerにみられた口腔がん、および口腔前がん病変でのp15, p16 CpG islandのメチル化の有無について検索した。

【方法】上皮異形成でmild dysplasia（MD）、severe dysplasia（SD）と診断されたものと口腔扁平上皮癌（OSCC）の症例を用いた。通法

に従いパラフィン切片を作製し、病変部からDNAを抽出した。P15, p16のメチル化の検索はMSP法（Herman et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996）により行った。

【結果および考察】MD, SD, およびOSCCの一部にp15, p16 CpG islandのメチル化が認められたが、正常粘膜では認められなかった。また、p16のメチル化は病変間の頻度に有意差は認められなかったが、p15では、SDで有意に高頻度のメチル化がみられた。以上のことから、betel-quid chewerの口腔がんの発生にp15, p16 CpG islandのメチル化の関与することが示唆された。

Porphyromonas gingivalisのバイオフィルム形成能の検討

○鎌口 有秀, 宮川 博史, 中澤 太
北海道医療大歯学部口腔細菌学教室

【目的】Porphyromonas gingivalisは成人性歯周炎の主病原細菌の1つとされ、その進行に伴い歯肉縁下歯垢中で増加することが報告されている。近年、本菌種のバイオフィルム形成能が重要な病原因子の1つとして注目されているが、その詳細は不明である。今回は、black-pigmented P. gingivalis ATCC 33277（親株）から継代培養により得られたnon-pigmented P. gingivalis np-4（変異株）を用いて、そのバイオフィルム形成能について親株のそれと比較検討したので、その成績を報告する。

【方法】親株をGAM半流動寒天培地にて継代し、血的寒天培地に塗抹、培養後、出現する非黒色コロニーを分離し、変異株とした。親株および変異株はyeast extract, hemin, menadione添加tryptic soy broth（TYHM）にて嫌気培養した。バイオフィルム形成能は96 wellプラスチックプレートに各菌液を接種し、嫌気培養後、クリスタルバイオレット染色性で表した。

【結果および考察】親株を約20回継代することにより、非黒色コロ

ニーが出現した。この中の1つをnp-4とした。プレートの種類により多少の差異は認められるが、np-4は親株に比較し、肉眼的にも明らかに弱いバイオフィルム形成能を示した。また、np-4の菌体表層のアルギニン特異的システイン・プロテアーゼ（Rgp）活性は低いが、培養上中のRgp活性は親株のそれに比較して数倍高いことが判明した。本菌の黒色化に関与する因子として、RgpのC末にあるアドヘジンドメインのHgp15の関与が指摘されている。np-4は菌体表層にRgpとアドヘジンドメインの複合体を保持する何らかの成分の遺伝子に変異が起き、その結果バイオフィルム形成能が低下したと推測された。また、np-4の線毛形成性は現時点では不明であるが、本菌のfimA変異株のバイオフィルム形成能が親株のそれと差異がないことより、np-4のバイオフィルム形成能の低下とfimA線毛の関連性はないものと考えられた。

以上のことより、本菌のバイオフィルム形成にはRgpとアドヘジンドメイン複合体を含む種々の物質が関与することが示唆された。

ニコチンによるβディフェンシン発現量の変化と、インヒビターによるそのpathwayの検索

○中村寿実子*, 安彦 善裕*, 倉重 圭史*, 西村 学子*, 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、主に上皮細胞に発現している抗細菌性蛋白である。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。ニコチンはタバコを介して口腔粘膜に悪影響をおよぼし、歯周炎や口腔がんの誘発に関与していることが知られている。ニコチンのhBD発現に対する影響については明らかにされていない。本研究では、ケラチノサイトであるHaCaT細胞に、ニコチンを添加しhBD-1, -2, -3の発現変化を観察し、その時の細胞内のpathwayについて検索した。

【方法】HaCaT細胞を10%FBS含有DMEMにて培養し、ニコチンを2.5, 5, 10, 25μg/ml添加した。4, 8, 12, 24, 48時間後にRNAを抽出し、hBD-1, -2, -3の発現量変化をRT-PCR法とTaqMan

probeを用いたreal-time PCR法で行った。この時の細胞内のpathwayを明らかにするために、それぞれの経路のインヒビターであるSB 203580, MG132, PDTCを添加し、同様にhBDmRNAの発現変化を検索した。

【結果および考察】HaCaT細胞にニコチンを添加したところ、濃度および時間依存的にhBD-1, -2の発現の上昇することが明らかになった。この中で、特にhBD-1の発現が著明であった。これらの発現のpathwayにはp38およびNF-κBの関与していることが明らかとなった。以上のことから、口腔粘膜上皮では、発がんイニシエーターとなるニコチンによりhBDsが上昇することにより、プロモーターとなりうる細菌感染を回避して、発がんに対する防御機構を担っているものと考えられた。

本学歯学部附属病院地域支援医療科活動報告 第4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16年1月から12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114名（平成15年同期間：135名）であり、延べ訪問診療回数は1144回（平成15年同期間：1085回）であった。訪問先については、高齢者施設が530回（46%）で最も多く、居宅が414回（46%）、入院中の医療病棟が200回（17%）であった。訪問先の地域別分布では、当別町が267回（23%）、江別市が249回（22%）、厚田村が524回（46%）、月形町が27回（2%）、札

幌市北区が6回（0.5%）、岩見沢市が63回（5.5%）、空知郡北村が8回（0.7%）であった。施設の訪問回数については、当別町が減少し、厚田村が顕著に増加した。当別町の減少は去年、今年と定期的な啓発活動を行わなかったことが挙げられる。厚田村の増加は新たに往診を開始した障害者施設が増えたためである。またそれに伴い、歯科医師2人の体制とした。

2. 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。

3. 歯の健康プラザの開設

当別町によって立案された「みんなでつくろう健康とうべつ」という健康推進計画の推進に対して、本学は、「当別町二万人歯の健康プロジェクト」を立ち上げ、歯科健診の実施や保健支援活動に加えて、種々の職能団体や高齢者サークルでの講演会などを実施し、町民の口腔の健康の維持・増進に関する種々の啓発活動を行っている。その一環として、JR当別駅前の店舗スペースを借り受け、「歯の健康プラザ」を開設した。

今後も、「地域支援医療科」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える。

患者の相談記録から見た患者ニーズとその対応

○吉野 夕香*, 越野 寿**

*北海道医療大学医療管理部センター事務課, **北海道医療大学歯学部附属病院地域支援医療科, ***北海道医療大学歯学部歯科補綴学第1講座

近年、患者中心の総合的な医療が求められており、その対象は疾患のみならず、患者個人やその権利に焦点が当てられている。我々は、附属病院において医療相談を受けた事例から、患者と医療者の良好な関係を維持する方策を探っている。今回は、2つの事例を中心に検討を行ったので報告する。

平成14年6月以降、直接患者から、または院内スタッフからの依頼で対応した相談36件（電話17、直接面談19）の傾向について分析した。相談の内訳は、「専門的な医療技術の要求」8件、「苦情や不満の訴え」11件、「受診援助」、相談者の性別は、男性8件、女性28件、相談者分類は、一般19件、医療関係10件、施設4件、福祉事業所2件、行政1件で、相談者の居住地域は当別町9件、石狩市、岩見沢市各3件、江別市、月形町、浦臼町各2件で、本院受診者地域分布と近い傾向であった。他に、札幌市からも8件あった。相談を受けた時間帯は、午後3時頃に集中し、1件あたりの所要時間は、一件あたり15.7分であった。

事例1：経済的理由から肺がんの検査を拒否

医師による相談担当への連絡が福祉ニーズの発見となり、行政の介入を含む地域全体での援助が実現し、受診に至った。

事例2：施設入所で訪問歯科を利用している患者の家族からの受診

内容への不信

進行する病変による状況変化から、治療計画を見直す必要性が生じた。意思表示困難な患者にしばしば起こる事例で、より高度な洞察力が求められ、生活ケアスタッフとの連携が重要であることが明らかとなった。

医療機関は、受診に係る相談、調整にもリスクを抱える。しかし、そのリスクが放置された場合、患者に、①保健・医療・福祉サービスからの逸脱②その質の低下③福利の破綻といった影響を及ぼす恐れがある。したがって、患者の生の声に耳を傾けることに努め、「何をリスクと考えるか」という医療機関の姿勢や組織的な取り組みが必要となる。このことは、患者ばかりか医療機関の安全確保にも繋がるため、医療者のリスクコスト抑制も期待される。よって患者に適切に医療に参加してもらうためには、同一の疾病でも、患者一人ひとりの背景を理解したアプローチ方法での多角的な働きかけが求められる。

今回の分析結果から、生活背景等の問題解決が円滑な受診行動に繋がるということが明らかになり、今まで以上に患者の立場に立ったコミュニケーションによって、患者に安心した受診の機会を提供できることが示唆された。

系統的関節疾患と遺伝子多型に関するシステマティックレビュー

○金澤 香, 柴田 考典

北海道医療大学歯学部口腔外科学教室

【目的】顎関節における変型性関節症（OA）は、関節円板前方方位に継発する二次性OAがほとんどであり、それに移行する機序については不明である。最近の顎関節症における疫学調査の結果、顎関節滑液分析の成果から「顎関節におけるOAの発生機序は、他関節のOAのそれと同様である可能性が高いと考えられる」。そこで本研究では、系統的関節疾患のうちOAの発生機序に関与している遺伝子多型についてメタアナリシスを行い、顎関節のOAの機序に関与する遺伝子多型を推定することを目的とした。

【方法】1995年から2004年までのMedlineデータベースを用い、Cytokines, Polymorphism, OAをキーワードとして抽出された14論

文を対象とした。それら抽出論文について、OA診断基準の明示、Interleukin-1（IL-1）、Interleukin-1 receptor antagonist（IL-1RA）、Tumor necrosis factor- α （TNF- α ）についての遺伝子多型の検索、健常者対照群の設定、対象患者数が10名以上の4条件をもとに二次選択を行い、それらについて内的、外的妥当性の評価を行った後、解析を行った。

【結果および考察】二次選択より3論文が抽出され、これらについてEBMデータテーブルを用いて評価し解析を行ったところ、複合症例では、どの遺伝子多型についても有意差を認めなかった。各文献における遺伝子多型をアレル単位に換算したところ、IL-1 β C

3954TとOA発症の関係が $p=0.0007$ で有意を示した。また、OA発症には複数の遺伝子多型が関連している可能性が示唆された。

今後、顎関節OA患者および健常者における、OA関連遺伝子多型

IL-1 β C3954Tの発現率を比較検討するとともに、複数の遺伝子多型の検索を行う予定である。なお、DNAは頬粘膜SWAB法を用いて抽出する予定である。

北海道医療大学歯学部附属病院における悪性腫瘍入院患者の臨床統計的観察

○富岡 敬子*, 柴田 考典*, 有末 眞**, 武藤 壽孝*, 永易 裕樹**, 平 博彦**, 村田 勝**, 奥村 一彦*

*北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座, **北海道医療大学歯学部口腔外科学第2講座

【目的および方法】北海道医療大学歯学部附属病院病棟が、1980年6月2日に24床で使用開始されてから2004年12月末までの24年間に入院した悪性腫瘍患者87例を対象に性別、年齢、紹介の有無、年間当たりの症例数、合併疾患、原発部位、組織型、TNM分類、治療、予後について調査・報告した。

【結果】1. 性別は男性57例、女性30例。2. 年齢は28歳から89歳で平均は64.5才であった。3. 紹介の有無は、紹介「あり」78例(89.7%)に対し「なし」9例(10.3%)で、「紹介」78例の内訳は、歯科診療所42例、他歯科口腔外科13例、医科診療所6例、院内4例、不明13例であった。4. 年間当たりの症例数は1～6例で、最頻値は3例であった。5. 合併疾患は58例(66.7%)でみられ、循環器疾患24例、代謝性疾患18例(糖尿病12例、高脂血症6例)、肝疾患7例、呼吸器疾患6例、脳血管障害5例、消化器疾患と他臓器癌各3例であった。6. 原発部位は「舌」32例、「歯肉」32例、「口底」9例で、以下、「頬部」「口蓋」各4例、「耳下腺」「その他」各2例、「上顎洞」「口腔粘膜」各1例であった。7. 組織型は87例

中、扁平上皮癌70例、腺癌5例、悪性リンパ腫4例、悪性黒色腫2例、粘表皮癌2例、不明4例であった。8. 治療は74例に実施し、外科療法64例(うち化学療法併用が46例)、化学療法単独8例、放射線療法単独と放射線と化学療法の併用が各1例であった。9. TNM分類: 扁平上皮癌70例中、一次症例は64例で、そのうちTMN分類を判定した症例は46例(71.9%)であった。その内訳は「T2」23例、「T4」11例、「T3」7例、「T1」5例、いずれも「N0M0」が最も多く、それぞれ21例、6例、4例、5例であった。なお、TMN分類を判定しなかった18例中17例は、1992年以前の症例であった。10. 予後: 扁平上皮癌一次症例でTNM分類されている46例中、治療を行った43例では、2004年12月末時点で生存23例、死亡14例(原病死7例、他病死4例、不明3例)、不明6例で追跡率86%であった。なお、1994年から1999年までに外科治療を行った20例では、術後5年経過時点で生存13例、死亡7例(原病死3例、他病死4例)で、追跡率は100%に向上していた。

臨床実習における本学CT装置の活用状況

○佐野 友昭*, 細川洋一郎*, 大西 隆*, 田中 力延*, 飯沼 英人*, 南 誠二**, 篠崎 広治***, 金子 昌幸*

*北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座, **みなみ歯科医院, ***しのぎ歯科医院

【目的】平成15年10月、本学にCT装置が導入されてから1年以上が経過した。CT導入の目的としては臨床的活用が主であるが、その他に研究的活用と教育的活用も忘れてはいけない。特に、教育的活用として歯学部学生に装置の構造、検査手順、そして、画像の読影を理解してもらうことは臨床教育上重要であると考えられる。今回我々は、平成16年歯学部臨床実習生に初めてCT撮影実習を導入したのでその活用状況について紹介することを目的とした。

【方法】対象は平成16年度臨床実習の歯学部5年生である。CT実習は木曜日の午前中に行った。撮像は断層厚2mm、管電圧140kVp、管電流130mA、撮像方式はガントリー0度のスパイラルを基本としたが、撮像上アーチファクトを避ける目的で任意の角度にガントリーを傾斜させるコンベンショナルな単純CTも行った。撮像実習に際して以下の点について配慮した。1) 被験者全員に承諾書

を作成した。2) 撮像範囲は必要細小範囲とした。3) 撮像した写真は個々の班内だけで使用した。4) 臨床上必要であるなら貸し出しを行った。

撮像終了後、必要であるなら再構成画像を作成し、写真をプリントアウトした。CT写真は他の画像写真と比較し読影に供した。

【結果】実習期間中に撮像された被験者は実習参加者90名(男性69名/女性21名)中、23名(男性21名/女性2名)であった。1班当たりの平均は2.7名、1班で最高4名、最低1名であった。部位別では上顎洞12件、上顎智歯2件、下顎智歯12件、顎関節1件であった。

【考察】臨床実習におけるCT実習は、装置の構造や検査手順の理解、そして他の画像検査(回転パノラマ、デンタル写真)と比較することで病態の本質を理解するうえで必要であると思われる。

授業を通じた医療事故防止対策の取り組み

○大山 静江*, 小田島千郁子*, 沢辺千恵子*, 岡橋 智恵*, 長田 真美*, 五十嵐清治**

*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教室

【目的】平成15年12月に厚生労働省より「厚生労働大臣医療事故対策緊急アピール」が発出されて医療安全は医療政策の最重要課題の

ひとつに位置づけられた。そこで本校では、学生の事故防止に対する意識を高めることを目的として授業の中でヒヤリ・ハット(イン

シデント)の調査やアクシデントとヒヤリ・ハット事例検討を実施している。

【方法】対象学生は平成15年度第2学年45名と平成16年度59名である。方法は学生の事故報告レポートやヒヤリ・ハットレポートを調査し集計した。事例検討の授業は5月と8月に実施し、5月は過去に多くあった典型的な事例を取り上げ検討した。8月はこれまで学生が経験したアクシデントやヒヤリ・ハットの事例を検討し、企画・進行は学生が主体となる一部参画型の方法で実施した。平成16年度はこの方法に加え、15年度のアクシデントとヒヤリ・ハットの集計結果を学生に提示した。また臨床実習指導者に対しても臨床実習指導者懇談会にて結果を報告し、ヒヤリ・ハットやアクシデントの再発防止を依頼した。

【結果および考察】ヒヤリ・ハットとアクシデントは15年度、16年度ともに上半期より下半期が減少した。また15年度より16年度の方

がヒヤリ・ハット、アクシデント共に減少した。ヒヤリ・ハット報告が減ったことは直ちに安全につながるわけではない。しかし学生の提出レポートによると、授業を行ったことにより医療事故防止に関心を持つなどの反応を示し、自主的活動の動機づけになっていることが示唆された。

一方、アクシデント、ヒヤリ・ハットの内訳は器具洗浄が一番多く、それ以外の内容については15年度、16年度ともに異なる傾向であった。これは前年度の結果を16年度の学生に提示したことにより注意を喚起したことや指導者側の支援も大きいことがあげられた。

さらに学校側で安全なシステムを構築していくことが重要と考え、「事故処理型」から「事故防止型」の姿勢へと変換し、ヒヤリ・ハットや事故防止対策を考察できる環境づくりが必要と思われる。

歯科医療問題研究会活動報告 第二報

○本田 睦子*, 鈴木 真野**, 澤田 有希**, 鈴木 りな**, 村井 雄司**, 大友 栄二***, 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*****, 他部員一同
*北海道医療大学歯学部附属歯科衛生士専門学校1年, **歯学部5年, ***歯科保存学第2講座, ****口腔外科学第1講座, *****口腔衛生学講座, *****小児歯科学講座, *****東京都立心身障害者口腔保健センター, *****苫小牧青葉病院歯科・口腔外科

【目的】昨年の本会では、第一報として我々歯科医療問題研究会(医療研)の発足から現在に至るまでの活動について報告した。そこで今回は、知的障がい者施設における口腔内診査補助やPlaque Control Record (PCR)を利用したブラッシング援助の経験より、今後のこれらの結果や補助態勢の経験を基に、クラブとしての社会福祉活動のあり方を検討した。

【活動内容】新篠津村にある知的障がい者授産施設F苑に入所および通所している74名(男性47名、女性27名)、平均年齢:32.6歳を対象に口腔内診査補助とブラッシング援助を行った。

【結果および考察】当施設には年2回の歯科健診であるが、我々が実施するブラッシング援助は、清掃不良部位を指摘し改善を図らせることであった。反省点としては、知的障がい者についての知識が少ない状態で、健診に参加したことであった。普段の調子で援助をしたのでは相手には伝わらないことがあり、言葉でいくら言っても理解してもらえないことがあった。しかしながら、言葉が通じなければ手を添えて、言葉も掛けながらコミュニケーションをとることで、少しずつ気持ちを伝えることが出来た。「歯を磨いているところ

を、見られるのが恥ずかしい」と訴えて、しきりに隠したり、鏡を見ながらブラッシングすることに抵抗を感じるという声もあった。この気持ちは勉強会で実際にブラッシング援助を行ったときに、我々が感じた気持ちそのものであり、少なからず、自分たちが感じたことは、他人も感じているということがわかった。コミュニケーションで一番大切なことは、自分が相手に興味を持って接することではないかと思っている。それは、今回の健診だけでなく、いろいろな場面で言えることである。深入りするのではなく、初対面の人に対してどんな人なのか興味を持つことで、その気持ちが何らかの形で相手に伝わり、警戒心を解いてくれることがあるからである。楽しく、規則に縛られすぎず、歯科健診を楽しんでもらうように心がけた。

今回の健診では受診者の方々と良い信頼関係が築けた。当然それには、必要な知識があれば、より良い時間が過ごせたことも事実である。

今後この経験を踏まえて、障がいを持つ方とそうでない方の区別することなく歯科医療に従事したいと考えている。

歯科インプラント専門外来スタッフのBLSとACLS研修 —歯科診療室における突然の心停止に対する最初の10分間の蘇生処置—

○工藤 勝*, 大桶 華子*, 北所 弘行**, 平 博彦**, 細川洋一郎***, 新井田 淳****, 國安 宏哉****, 廣瀬由紀人****, 越智 守生****

*北海道医療大学歯学部歯科麻酔学講座, **口腔外科学第2講座, ***歯科放射線学講座, ****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(本院)の歯科インプラント外来(当専門外来)の患者は痛くなく安心・快適な治療を強く求めている。本院手術室では歯科麻酔科医が生体情報モニター監視、亜酸化窒素(笑気)吸入・静脈内鎮静法の適応と局所麻酔注射を実施し、口腔外科医と補綴科医が手術を行い入院管理も実施してい

る。当専門外来発足2年目を機に、歯科医療の安全推進を目的として、患者急変時のチーム医療としての対応法、すなわち二次救命処置(ACLS)の研修を独自に開始したので、その概要を報告する。

【方法】当専門外来スタッフ(歯科医師)のACLS研修コースは、AHA CPR&ECC G2000に則って本邦で開催されているACLS基礎

(ICLS) コースを歯科医師用にアレンジした。歯科診療中の意識消失、呼吸・循環なしでの対処法について、シミュレーターを用いた研修計画を立案した。第一回目のコースは患者急変に対する最初の10分間の蘇生処置を行動目標として、2004年3月20日(日)に開催し、6名が受講した。インストラクターは歯科麻酔科医(歯科麻酔学会指導医と認定医、救急医学会ACLS基礎コース受講済)が務め、自動体外式除細動器(AED)を用いた一次救命処置(BLS)、気道確保・気管挿管、生体情報モニターの使用、静脈確保、治療薬静注のスキルをトレーニングした後、歯科救急シナリオでのチーム医療を実践した。研修の最後にはシナリオによる実技試験を個別に実施した。なお、実技テストにおいて、意識なしの発見から人(応援者)と器材(救急カート、心電図モニタ、自動体外式除細動器:AED)の要請に16秒以上、心臓マッサージ開始まで91秒以上、発見からAED開始まで181秒以上の受講者は、CP(Critical Problem)と評価して再試験を実施した。

【結果および考察】受講者全員がCPに抵触し、再試験を必要とした(表)。今後は定期的にコースを開催することで研修内容の充実

化と定着を図り、コメディカルとの連携による早急な普及が必須と考える。また、将来的には外部評価者を迎えたコース開催が必要である。

	修了試験	再試験
人と器材を集める 目標:15秒以内	27.0±10.8秒 (12.6~41.9秒)	22.6±5.9秒 (17.1~29.9秒)
発見から心臓マッサージ開始まで 目標:60秒以内	109.6±17.2秒 (91.0~130.8秒)	104.4±15.2秒 (87.0~123.5秒)
発見からAED開始まで 目標:180秒以内	299.6±5.0秒 (295.0~306.4秒)	270.0±42.1秒 (238.0~330.8秒)

mean±S.D. (最小~最大)

【結語】平成16年度、受講者6名、インストラクター2名、タスク1名で、独自にBLSとACLS研修を開始した。第1回研修の修了実技試験では受講者全員がCP(Critical Problem)に抵触した。受講者全員が研修の継続を希望し、当専門外来でのBLSとACLS研修が定例化された。

マイクロアレイを用いたブタマラッセ上皮特異的遺伝子単離の試み

○倉重 圭史*, 安彦 善裕*, 齋藤 正人**, 西村 学子*, 山崎 真美*, 竹嶋麻衣子*, 中村寿実子*, 荒川 俊哉***, 田隈 泰信***, 五十嵐清治**, 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小児歯科学講座, ***北海道医療大学口腔生化学講座

【目的】歯根膜中に存在するマラッセ上皮遺残は、歯周組織の再生を促進するといわれている物質を含むヘルトウィヒ上皮鞘が断裂したものである。マラッセ上皮遺残にも歯周組織再生に関与した成分が含まれているものと考えられるが、この細胞が発現している遺伝子については詳細な検索が行われていない。本研究では、口腔上皮とマラッセ上皮のmRNAの発現を比較することから、マラッセ上皮が発現している特異的な遺伝子の単離を行うことを目的とした。

【方法】マラッセ上皮(PLE)と口腔上皮(GE)を培養するために、生後6ヶ月齢のブタ小白歯を用いた。Nishimuraらの方法(Med. Electron Microsc. 1999)に従い単離を行い、それぞれ両者からoligoTM-d30(super)mRNA purification Kit RNによりmRNAを抽出した。cDNAを作製の後、GEをCy3に標識したものとPLEをCy5

に標識したものを2つ(test1, 2)、反対にPLEをCy3、GEをCy5に標識したもの(test3)を用い、DNA microarray上でhybridizationを行った。それぞれの蛍光強度を数値化し、Cy3とCy5の発現強度の違いとその再現性から、それぞれに特異的に発現しているmRNAを同定した。同定されたmRNA発現の信頼性を確認するために、再度、両者の細胞からRNAを抽出し、定量的RT-PCR法を行った。

【結果および考察】test1, 2, 3の結果比較検討したところ、GEに特異的な遺伝子が5種類、PLEでは26種類の特異的な遺伝子があることが明らかになった。PLE特異的と判断された遺伝子の中には、既知の成長因子、転写因子などのもの以外に遺伝子情報のみで、機能の不明なものも含まれていた。今後の詳細な機能解析により新たな歯周組織再生誘導因子のみつかる可能性があるものと思われた。

ラット耳下腺スライス標本および分離導管細胞を用いたカルシウム応答の検証

○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講座

【目的】唾液腺の導管細胞はイオンの再吸収および分泌によって原唾液の組成を変化させる。我々は、ラット耳下腺導管細胞のCa²⁺情報伝達機構を明らかにするため、多光子レーザー顕微鏡を用いてエピネフリン(Epi)刺激による細胞内遊離Ca²⁺濃度([Ca²⁺]_i)の変化を検証した。

【方法】マイクロスライサーを用いてラット耳下腺から300μmの標本を作製した。分離耳下腺細胞は、細切した耳下腺をコラゲナーゼとヒアルロニダーゼで処理して調製した。これらのサンプルにCa²⁺蛍光指示薬であるfura-2/AMを取り込ませ、蛍光強度の変化を多光子レーザー顕微鏡にて観察した。

【結果および考察】耳下腺スライス標本を10 μM Epiで刺激すると

導管細胞の[Ca²⁺]_i上昇がみられた。[Ca²⁺]_i上昇が始まるタイミングは個々の細胞でわずかにずれがあり、数個の細胞から始まったCa²⁺反応が導管全体へ広がる細胞間Ca²⁺ウェーブ様の反応も観察された。同様の[Ca²⁺]_i変化は分離耳下腺導管細胞においてもみられた。また、高速測定により腺腔側から基底側へ向かってCa²⁺シグナルが伝播していく細胞内Ca²⁺ウェーブが観察された。これらの反応を定量的に検証したところ、1.0μM Epi刺激で全体の約80%の細胞が最大の[Ca²⁺]_i上昇を示した。そのうち約1/2は0.1μM Epiではほぼ最大反応を示すEpi高感受性細胞であることがわかった。細胞外液のCa²⁺を除去しても同様の反応が観察されたことから、これらの反応は主に細胞内ストアからのCa²⁺放出反応であること

が確認された。このようなEpiに対する反応性の違いには導管細胞の細胞膜表面のアドレナリン受容体やCa²⁺ストアのイノシトール三リン酸受容体の発現量が関与していると考えられる。今後はこれ

ら受容体の発現とCa²⁺反応の関係について検討していく予定である。

マウス味蕾細胞における、神経栄養因子のNGF、NTN、およびそれらのレセプターTrkA、GFR α 2の発現

○川越 俊太郎*, 奥村 一彦*, 内田 暢彦*, 伊藤 昭文*, 柴田 考典*, 鈴木 裕子**, 武田 正子**
*北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座, **北海道医療大学歯学部口腔解剖学第2講座

【目的】 NGF (nerve growth factor) とNTN (neurturin) は、ニューロンの増殖、分化、生存維持に関与する神経栄養因子 (neurotrophic factor) である。本研究は二重免疫染色法を用いて味蕾細胞に、NGFとNTN、およびそれらのレセプターのTrkAとGFR α 2が発現するかどうかを検索した。また、これらが発現した場合、味蕾の中のどの型の細胞に発現するかを合わせて検索した。

【方法】 正常マウスの有郭、葉状、および茸状乳頭の凍結切片を作製し、それぞれの抗体を用いて蛍光抗体法を行った。味蕾のⅢ型細胞は神経との求心性シナプス接合を持つが、この細胞にNCAMが発現し、またⅢ型細胞と一部のⅡ型細胞にPGP9.5が、他のⅡ型細胞に α -gustducinが発現することが報告されている。そこで本研究では、味蕾の細胞型を決めるためのマーカーとしてNCAM、PGP9.5、および α -gustducinの抗体を使用して二重染色を行い、共焦点レーザー走査顕微鏡で観察した。

【結果】 正常の味蕾細胞は、NGF、NTN、TrkA、およびGFR α 2を発現した。二重免疫染色後では、ほとんどすべての抗NCAM、抗PGP9.5、および抗 α -gustducin免疫陽性細胞は、NGFにも陽性を示した。このことから、NGF免疫陽性細胞にはⅡ型とⅢ型細胞、そしておそらくⅠ型細胞も含まれることがわかった。ほぼすべての抗PGP9.5陽性細胞は、TrkA、NTN、そしてGFR α 2に陽性を示した。これはⅢ型細胞がTrkA、NTN、GFR α 2を発現することを示している。しかし他の型の細胞もこれらのレセプターやNTNを発現した。

【結論】 これらのことから、味蕾細胞に発現するNGFとNTNは、自己および近隣の細胞のレセプターのTrkAとGFR α 2に結合することにより栄養効果を及ぼし、さらにⅢ型細胞から味覚神経へのシナプス伝達にも関与するのではないかと推測された。

癌細胞の同所移植法による頸部リンパ節転移の観察 —組織片移植と細胞注入移植の比較—

○伊藤 昭文*, 奥村 一彦*, 村岡 勝美**, 川越 俊太郎*, 荒川 俊哉***, 安彦 善裕****, 細川 洋一郎*****, 柴田 考典*
*北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座, **口腔外科学第2講座, ***口腔生化学講座, ****口腔病理学講座, *****歯科放射線学講座

【目的】 すでに我々は、高浸潤性舌扁平上皮癌細胞SAS-H1に緑色蛍光蛋白 (GFP)、本GFP遺伝子を導入し、GFP高発現安定化細胞であるSAS-H1/GFPを作製後、ヌードマウスの舌へ同所移植すると、原発巣の局所浸潤と頸部リンパ節転移が認められることを報告した。そこで今回は、先に行った細胞注入移植法と比較し、組織片移植法を用いて、原発巣の進展度と転移巣の発現頻度について検討することを目的とした。

【方法】 SAS-H1/GFP細胞を、ヌードマウスの背部皮下に2×10⁶個/20 μ l: PBS (リン酸緩衝液) の細胞浮遊液を注入し、1週経過後に形成された腫瘍塊を摘出後、各組織片 (0.5×0.5×0.5 mm, 1×1×1 mm, 2×2×2 mm) を切り出した。得られた組

織片を舌粘膜下に埋入し、経時的に実体蛍光顕微鏡による観察を行った。また、同時に転移巣と周辺組織を0.2% glutaraldehyde添加2% formaldehydeで固定後、凍結切片を作製し蛍光顕微鏡で微小転移の検討を行った。

【結果】 細胞注入移植法と比較して組織片移植法は、原発巣の腫瘍増殖性が高く、膨脹性に発育するため、局所浸潤の観察には適さないことが示された。また、組織片移植法による頸部の観察においては、リンパ管内の癌細胞の微小集団が観察されるとともに、細胞注入移植法と比較して、早期に頸部リンパ節転移が認められた。

これらのことから、組織片移植法において、頸部リンパ節転移を早期に観察できることが明らかとなった。

ラットにおける固形から粉末飼料への変更が自発運動に及ぼす影響

○岩崎 一生, 横山 雄一, 平井 敏博, 牧浦 哲司, 越野 寿, 田中 慎介
北海道医療大学歯学部歯科補綴学第1講座

【目的】 ストレス応答に関して、視床下部-下垂体-副腎皮質系が重要な役割を果たしている。また、神経-内分泌-免疫系の相互作用が指摘されている。われわれはラットにおける咬合・咀嚼障害が

対角帯核・内側中隔核のコリン作動性ニューロン数を減少させること、記憶・学習機能を低下させることなどを報告した。一方、ラットの習性に反する飼料による飼育が情動ストレスとなり、日常動作

や活動能に影響を及ぼすことが推測される。そこで、咬合・咀嚼と脳機能との関連を検討する目的で、ラットにおける固形飼料から粉末飼料への変更が自発運動量と脳内セロトニン（5-HT）濃度に及ぼす影響を検討した。なお、5-HTは副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン（CRH）を介して副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の分泌を惹起することが報告されている。

【方法】実験では、Wistar系雄性ラットを用い、6週齢からの実験期間中を固形飼料にて飼育する固形飼料群と、17週齢から固形飼料と同一成分の粉末飼料にて飼育する粉末飼料群の2群を設定した。

自発運動量の測定には小動物運動解析装置を使用し、各群5匹ずつの暗期12時間と明期11時間の運動量を測定した。また、5-HT濃

度は、飼育飼料変更1, 3, 5, 7日後において、各群10匹から海馬を摘出し、高速液体クロマトグラフィーで測定した。

【結果と考察】固形飼料群における自発運動量は加齢に伴い減少した。粉末飼料群における自発運動量は飼料変更直後に有意に増加し、18週齢時に最大値を示した。それ以後、漸次減少するものの、30週齢の時点においても固形飼料群のそれには至らなかった。一方、粉末飼料群における5-HT濃度は、固形飼料群のそれに比して、3日後、7日後で有意な増加を示した。これらの結果から、ラットへの習性に反する粉末飼料給餌が情動ストレスとなって5-HT濃度を増加させ、粉末飼料群における自発運動量の増加を引き起こす可能性が示唆された。

歯科鑄造用Ag-In合金の耐食性向上に関する研究

○中嶋 智仁, 遠藤 一彦, 大野 弘機, 川島 功, 山根 由朗, 柳 智哉
北海道医療大学歯学部歯科理工学講座

【目的】Ag-In合金（JIS第2種銀合金）は、金銀パラジウム合金に続いて2番目に多く生産されている歯科鑄造用合金である。本合金には、InやZnなどの卑金属が多量に配合されているため、その耐食性は他の貴金属合金と比較すると著しく低い。したがって、Ag-In合金は、唾液に直接触れる用途には使用せず、主に、歯台築造に使用されている。そこで本研究では、Ag-In合金に微量のAuを添加することによって、耐食性を向上させることを目的とした。

【方法】Ag-20InにAuを1～6%添加した合金を作製し、0.9% NaCl溶液中で耐食性を評価した。試験片は、通法にしたがって14x14x1mmの大きさに鑄造した。合金試料は、表面を0.05μmのアルミナ懸濁液を用いて鏡面に仕上げた。合金試料の腐食挙動は、超高純度Arガスで脱気した0.9% NaCl溶液中で、動電位分極法を用いて調べた。自然浸漬状態における合金試料の耐食性は、合金表面の分光測色測定と交流インピーダンス測定を行うことによって評価した。

【結果および考察】実験合金の分極曲線を測定した結果、Au含有量の増加とともに腐食電位は貴となり、低電位領域（-150～+100 mV）における電流密度は低下した。この結果から、Ag-In合金の低電位領域におけるアノード反応は、Auを1%添加することによって効果的に抑制されることが明らかとなった。Ag-20In合金における ΔE_{a*b} の値は、浸漬1日後に急激に増加し、その後は時間の経過とともにわずかに増加した。Auを1～6%含有する3種類の合金試料は、 ΔE_{a*b} の値がAg-20In合金と比較すると約1/2と小さく、耐食性が向上していることが分かった。交流インピーダンス法で得られた分極抵抗の値から、合金の腐食速度は、Au含有量の増加とともに低下することが確かめられた。

以上の結果から、Auを微量添加することによって、Ag-In合金の0.9% NaCl溶液中における耐食性を改善できることが明らかとなった。

Properties of an experimental prosthetic resin composite containing finely powdered enamel

○Masaki Sakamoto, Kanae Toda, Tatsuhiko Hidaka, Sayaka Fujiwara and Kunio Yamamoto
Health Sciences University of Hokkaido, School of Dentistry

【Purpose】Mechanical strengths and wear resistance of prosthetic resin composites have recently been improved due to a significant increase in the filler/matrix ratio. However, it may have adverse effects on antagonistic dentition when composite restoratives contain large amounts of hard filler particles. In the present study, we used finely powdered enamel as a filler to develop a prosthetic resin composite that has good mechanical properties and no potential to abrade opposing tooth structure.

【Materials and Methods】Crowns of bovine teeth were ground into powder by a crusher, and then the enamel particles were separated from the powder by centrifugation in bromoform-ethanol solution at a rotation speed of 3,000 rpm for 10 min. The particle size distribution of the enamel powder was determined by the laser diffraction particle size analyzer. The resin matrix consisted of UDMA (60 mole %) and Tri-EDMA (40 mole %). Camphorquinone (0.5 mass %) was added to the monomer as a photo-initiator. Fillers were incorporated directly into

the resin matrix in amounts of 80 or 85 mass %. The hardness (Hv) of the specimens was measured on a Vickers Hardness Tester under a 1kg load. The bending strength was measured using a universal testing machine operated at a cross-head speed of 1 mm/min.

【Results and Discussion】Scanning electron micrographs showed that the enamel particles are characterized by their prismatic shape, probably due to the structure of the enamel rod. The size of the particles ranged from 0.2 μm to 100 μm. An increase in filler content resulted in an increase in the HV and the bending strength of the resin composite. The average hardness value and the average bending strength for specimens having 85 mass % filler that had been subjected to heat treatment after light-curing were higher than those for most commercially available resin composites. This finding suggests that the experimental resin composite having a large amount of finely powdered enamel would be used clinically for inlays and full-coverage crowns.

One Step 象牙質接着システムにおける象牙質接着性と封鎖性

○伊藤 修一, 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】近年、エッチング、プライミング、ボンディング機能を合わせ持ったOne Step接着システムが開発され、歯科臨床に用いられている。しかしながら、接着強さにおいて現在一般的に用いられているTwo Stepシステムと比較すると、相対的に低い値が報告されている。そこで、本研究の目的は、操作時間あるいは多層コーティングにより、象牙質接着性と封鎖性に影響を及ぼすかを検討するものである。

【方法】本研究において、う蝕を有しないヒト大白歯を用いた。通法どおり試料を調製し、得られた健全象牙質表面にiBond（Heraeus Kulzer社）あるいはXⅢ（Caulk Dentsply社）を指示書どおりに塗布し、エアブローした後、10秒間光照射した。その後、コンボジットレ진을築盛した。試料を37℃の水中で24時間浸漬した後、表面積が0.9mm²になるように試料を調製した。Microtensile bond strength testを行い、接着強さを測定した。また、同様の条件下において象牙質に対する封鎖性を測定した。

【結果および考察】XⅢにおいては4コートまで、iBondにおいては5コートまで塗布を重ねることにより、接着強さが増加すること

がわかった。ANOVA検定により、2つの材料間での有意差はないが、コート間では有意差がある事がわかった。また、象牙質に対する封鎖性の測定において、XⅢとiBondは、コート毎にdwelling timeとevaporationを行うことにより、封鎖性を向上させる事がわかった。

Microtensile bond strengths (X±SD, n=16 in MPa)					
layer	1	2	3	4	5
adhesive					
XⅢ	7.2±6.3a	22.6±9.2b	30.0±9.9c	43.5±7.7d,e	41.4±8.0d
iBond	12.2±7.5a	18.5±6.2b	30.6±7.0c	34.2±6.0c	51.6±14.8e

Fisher's PLSD test. により上付きの同様の文字は、有意差がないことを示す (p>0.05)。

【結論】One Step接着システムにおいて、多層コートを行う事により、象牙質に対する接着強さとレジンの浸透度を改良することができる。コート間のdwelling timeとevaporationを行うことにより、レジンの浸透度を改良し、象牙質の封鎖性を向上させることができる。

NTロータリーファイルを用いた根管拡大

○薮 富美子, 畑 良明, 塚越 慎, 永井 康彦, 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】Ni-Tiはステンレススチールと比較して非常にしなやかであり、その使用頻度は増加している。また、最近ではテーバーを大きくし、刃部を破折しにくく、切削片を根管口へと送りやすい形態に変えたNi-Ti製ファイル、さらにその術式が開発されてきた。

今回、マイクロCTを用いて彎曲根管の根管拡大に関してNi-Ti製ファイルによるクラウンダウン法とステンレスファイルによるステップバック法との比較検討を行なったのでここに報告する。

【実験方法】ヒト抜去上顎大白歯15本、下顎大白歯15本を用い、彎曲を有する40根管を選択し、2群に分けた。これらをGTロータリーファイル、プロファイル（Dentsply-Sankin）によるクラウンダウン法とKファイル（Mani）を用いたステップバック法による根管拡大との比較を行った。なおイニシャル・アピカル・ファイルにて根管長を計測した後、アピカル・マスター・ファイルをイニシャル・アピカル・ファイルの200%増と規定した。また、根管長から1mm減じたものを作業長とした。そして、これらをマイクロCTを用いて幅0.2mm間隔で断層撮影を行い、術前・術後における根管口

部、根尖孔の大きさの変化、彎曲根管における偏曲点部の角度変化などの比較を行った。

【結果】1. 彎曲部の内角は、ステップバック法で147.8°から156.7°へ、クラウンダウン法で145.0°から152.9°と変化し、術前・術後において差が存在し、直線化することが認められた。両術式間ではステップバック法がその傾向は大であった。

2. 彎曲部の外角は、内角と同様に術前・術後で若干直線化する傾向が認められた。

3. 根管口から彎曲部までの距離は、ステップバック法において、距離が長くなることがわかった。

4. 逆に彎曲部から根尖孔までの距離で、ステップバック法において逆に距離が短くなる傾向が認められ、クラウンダウン法では認められなかった。

【結論】NTロータリーファイルを用いたクラウンダウン法は、ステップバック法より本来の根管形態を損なわない根管形成法であることがわかった。

4日目歯垢における緩衝能の口腔内部位特異性について

○福田 敦史, 広瀬 弥奈, 八幡 祥子, 松本 大輔, 五十嵐清治
北海道医療大学歯学部小児歯科学講座

【目的】齲蝕の発生には部位特異性が認められていることは疫学的に明らかである。その原因の一端を明らかにするために、我々は歯

垢の齲蝕誘発能における口腔内部位特異性について研究を行っている。今回は、上下顎前・臼歯部唇（頬）・舌側の8か所から採取した4日目歯垢のpHと緩衝能を測定し、部位の差を比較検討した。

【方法】実験に先立ち、本研究への理解と同意の得られた成人被験者15名に対し、PMTC後に4日間口腔清掃を停止させ、4日目歯垢を採取した。採取部位は上顎前歯部唇（UAB）・舌側（UAL）、下顎前歯部唇（LAB）・舌側（LAL）および上顎臼歯部頬（UPB）・舌側（UPL）、下顎臼歯部頬（LPB）・舌側（LPL）の8か所である。部位別に採取した歯垢の湿重量を測定後、KClを添加し、30秒間超音波で粉碎後、pH電極でpHを測定した（初期pH）。次いで、HClを適量ずつビペットにて添加しながら、pH3.0に至るまで滴定した。滴定曲線は $y=ax^3+bx^2+cx+d$ （ y : pH, x : 添加したH+量）で表され、各定数を求めた後、歯垢重量当りのpH6.0～3.0に至るま

で要したH+量（緩衝能: nmolH+/mg）を算出した。8部位の初期pH、緩衝能の比較には、2way-ANOVAおよびSheffの多重比較検定を用いた。

【結果および考察】歯垢の初期pHには有意差が認められ、危険率0.01%でLALが最も高く、UABとLPBが最も低かった。緩衝能についても有意差が認められ、pH6.0～5.5、pH5.5～3.0のいずれも最も高いLALと最も低いLPBとの間に有意差が認められた（前者は危険率5%、後者は1%）。LALは唾液分泌量の多い顎下腺唾液開口部に近接しているため唾液クリアランスも高く、糖発酵後に低下したpHが他の部位に比べて速く回復し易い環境といえる。また、pHが高いとミネラルなど緩衝能に影響を与える成分などが歯垢中から遊離しにくいいため、緩衝能も高くなったと考えられる。以上の結果からLALは最も齲蝕誘発能が低い歯垢であることが示された。

口腔内から摘出された硬固物のXRDおよびEPMAによる分析

○川島 功*, 飯沼 英人**, 大野 弘機*, 金子 昌幸**, 遠藤 一彦*, 山根 由朗*
*北海道医療大学歯学部歯科理工学講座, **北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座

【目的】エナメル質やセメント質は大半がハイドロキシアパタイト（HAp）で構成され、後者は生体による修復の能力を有する。歯槽骨近傍で軟組織から線維組織を有する硬組織を経て、HApまで含む複合体の創製の可能性が見出されれば、インプラント体の耐久性の向上が期待できる。今回、歯肉内から摘出した硬固物について、X線回折とEPMA観察を行い、高結晶度のHApが観察され、2、3の知見を得たので報告する。

【方法】○摘出物：50歳男性の上顎左側第2小臼歯歯根近心部から摘出された軟組織を含む径1mm弱の硬固物

○EPMA用の試料：生物顕微鏡用試料にAuまたはカーボン蒸着を施した。X-650, (Hitachi製)を使用し、加速電圧20kVで観察した。

○X線回折測定用の試料：樹脂に包埋後、鏡面研磨を施し、RINT-2500 (Rigaku製)を使用した。

【結果および考察】摘出した硬固物は、皮膜で覆われ一部に石灰化してない線維組織が強固に付着していた。硬固物中心部のmicro-XRDによる分析結果から、大部分を占める結晶様の領域はHApで

あり、ピーク幅の比較から、その結晶性はエナメル質よりも高いことも明らかとなった。硬固物の外周部はCaもPもない石灰化してない線維組織とその内側に石灰化した線維組織域があった。石灰化した線維組織域は高度結晶部よりCaとPの特性X線の強度は低かった。

石灰化した線維組織域はブロードでかつ強度が低い回折線で、セメント質に似た結晶性の低いHApであった。石灰化してない線維組織と石灰化線維域の境界は天然歯におけるセメント質と歯根膜の境界と極めて類似していた。石灰化してない線維組織が存在する領域で石灰化線維領域は著しい成長をしていた。石灰化してない線維組織から成長のためのCaやP、有機物が送られていると考えられた。石灰化した線維組織が厚く成長した近傍で、HAp成長の先進界面は細いカーブした円柱状となっていた。おそらく体液中のたんぱくや有機物などが成長界面でインヒビターとなり、先進界面の形態を制御していることが示唆された。HAp結晶の奥深くでは、CaやPイオンを含む溶液からゆっくりと霜柱状に成長していた。

本学ヘリカルCTにおける空間分解能の測定

○田中 力延*, 細川洋一郎*, 大西 隆*, 佐野 友昭*, 飯沼 英人*, 西 とも子**, 金子 昌幸*
*北海道医療大学歯学部歯科放射線学講座, **にし歯科医院

【目的】現在、ヘリカルCT画像を用いた硬組織形態の把握や寸法計測が広く普及している。その画像上での計測値の信頼性の一般的な評価は肯定的な結果と更なる進歩を促すものが主であった。しかしながら、精度向上への鍵となる画像構築のメカニズムは各メーカーに完全に依存した状態であり、歯科で求められる精度は保証されていないと思われる。そこで今回我々は、歯科臨床的立場から求められる計測値の精度を評価項目として検証した。

【材料と方法】撮影条件は本学付属病院で一般的に用いている130kV 150mAsとして行った。スライス厚は0.6mmと1.0mm、ヘリカルピッチは0.75と1.5とし、本学CTで歯科用3D画像作成の際に用いられる条件を採用した。

直径0.3mmの微小球体を撮影し、SSPzを求めた。ROIの直径は5

mmとし、その中の平均値を球体のCT値とした。SSPzより半値幅を求め、これを実効スライス厚として評価した。また、SSPzをz軸方向のLine Spread Functionとみなしてフーリエ変換を行い、これをz軸方向のMTFとし、体軸方向の分解能を評価した。

【結果および考察】スライス厚0.6mmヘリカルピッチ0.75における空間分解能は0.64mm、スライス厚1.0mmヘリカルピッチ1.5における空間分解能は1.06mmだった。

今回の結果から本学CTで臨床的に利用される撮像のz軸方向への寸法精度は0.6～1mm程度の誤差を含むと考えられる。この誤差が臨床士どの程度の影響を与えるのかは本研究で提示するものではないが、利用の際には念頭におくべきであると思われた。

成人男性における鼻腔通気度計測

○小林 成匡, 山崎 敦永, 溝口 到
北海道医療大学矯正歯科学講座

【目的】矯正歯科の領域では鼻呼吸障害と顎顔面形態との関連については従来から多くの研究がなされてきた。しかしながら鼻呼吸機能については、鼻粘膜が外的（外気、温度、湿度など）および内的（体位、精神的状態、運動など）要因により鼻腔通気度に影響をあたえているので評価が難しいとされている。また、左右の鼻粘膜が時間の経過と共に交代性に腫脹、収縮を繰り返す生理的変動（nasal cycle）の存在も報告されている。そこで今回、鼻腔通気度計 RYNO 2000（Menfis biomedica s.r.l. BOLOGNA）を用いて鼻呼吸抵抗の測定方法を紹介するとともに、成人男性における鼻呼吸抵抗の日内変動について報告する。

【方法】1. 対象と資料 対象は本学歯学部附属病院勤務の平均年齢32歳4カ月の成人男性15名を対象とした。被験者は、鼻アレルギー

ーなどの鼻疾患、および呼吸器疾患、鼻中隔湾曲のある者は除外した。

2. 計測方法 測定にはRYNO 2000を用いた。この鼻腔通気度計は自然の鼻呼吸状態で測定する方法（active法）で、片側鼻腔で気流速度を測り、他側外鼻孔から上咽頭圧を誘導するanterior法である。測定時は室温を25℃と一定にし、測定10分前に被験者を椅子に自然な姿勢で座らせてから行った。測定時間は、午前9時から測定を開始し、1時間ごとに午後6時までの計10回とした。測定結果の分析はANOVA分析を用いて行った。

【結果】本研究における計測時間内で鼻腔通気度に有意差が見られなかったことから、鼻腔通気度計測の有用性が確認された。

本学歯学部附属病院矯正歯科外来における唾液検査およびう蝕予防プログラム

○佐々木真弓*, 柴 浩実*, 北口 佳奈*, 六車 武史**, 山崎 敦永**, 溝口 到**

*北海道医療大学歯学部附属病院歯科衛生部, **北海道医療大学歯学部矯正歯科学講座

【目的】本学歯学部附属病院矯正歯科外来では、1998年度から以下の項目を目的として唾液検査を実施している。

1. 個人のリエスリスクの把握
2. 矯正歯科治療中の口腔衛生指導におけるモチベーションの強化
3. 個人に合ったう蝕予防プログラムの作成

今回は唾液検査の内容、カリオグラムに基づいたう蝕予防プログラム例および2003年度までの実行率について報告する。

【方法】対象は矯正歯科治療を開始した患者全員とし、以下の手順で唾液検査を行い、う蝕予防プログラムを作成した。

1. 予約時に検査前の禁止事項などについての説明をする。食生活調査表を渡し、休日を挟んだ4日間の生活全般の内容を記入してもらい、検査時に提出してもらう。
2. 5分間の刺激唾液を採取し、唾液分泌量、唾液緩衝能、ミュー

タンス菌数、ラクトバチラス菌数を調べる。

3. 検査結果とその他の情報を3段階評価し、レーダーチャートに記入する。記入内容をカリオグラムソフトに入力し、リエスリスクを評価する。

4. リスクに応じて個人のう蝕予防プログラムを作成し、提示する。

【結果および考察】唾液検査を導入した1998年度は53.1%、2003年度は88.4%と徐々に実行率は上がっている。ただ、唾液検査を希望しない、長期的な抗生物質の服用などの理由から全員に実行するには至っていない。またう蝕予防プログラムを作成し提示することで、口腔衛生指導におけるモチベーション強化へつなげることができた。

根管治療に関するアンケート調査 I

○小林 孝雄*, 森 真理*, 塚越 慎**, 加藤 幸紀*, 中島 啓介*, 斎藤 隆史***, 古市 保志*

*北海道医療大学歯学部歯科保存学第一講座, **浦臼町歯科診療所, ***北海道医療大学歯学部歯科保存学第二講座

【目的】術前に自覚症状がない歯に対して感染根管治療を行うと、急性症状が引き起こされることがある。このようなことが起こると患者との信頼関係を確立する上で障害となる。しかし、そのような急性発作の原因、対処方法、および予防に関しては、個々の歯科医師の経験によるものが大きく、コンセンサスが得られていないのが実態である。そこで本研究では、感染根管治療開始後の急性発作の発現に関する実態を把握するために、根管治療に関するアンケート調査を行い検討した。

【方法】調査対象は、北海道医療大学在籍する歯科医師171名であ

った。質問内容は、臨床経験年数、抜髄治療の回数と治療間隔、感染根管治療の回数と治療間隔、感染根管治療開始時の急性症状の有無、感染根管治療開始後の急性発作の頻度、部位、対処方法および急性発作の原因であった。集計結果を χ^2 検定を用いて解析した。

【結果および考察】本調査では110名から回答を得た。回答者の臨床経験は1～30年で、平均7.93±6.60年であった。全回答者を経験年数で1年、2～5年、6～9年および10年以上の4群に分類して解析を行った。経験年数が1年の群では他の3群に比べ、「感染根管治療開始後に急性発作を引き起こすことがよくある」との回答

が、有意に多かった。また急性発作の頻度は1年の群では他の3群に比べ有意に高かった。急性発作が起こった部位は上下顎左右大臼歯と上顎切歯が多かった。急性発作後の処置に対する回答では、抗菌薬、鎮痛薬の投与、根管開放が多かった。急性発作が起こった原因として考えられたのは、器具の突き出しと削片の押し出しとの回答が多かった。結果より経験年数に関わらず、感染根管治療の開始

後に急性発作を起こすことがあると答えたものは、ないと答えたものより多かった。急性発作の原因としては器具の突き出しや削片の押し出しによるとの回答が多かった。急性発作を予防するためには、基本的な根管器具の使用方法を徹底することが重要であると考えられた。

北海道医療大学歯学部浦臼町歯科診療所でのアンケート調査

○塚越 慎*, 越野 寿**

*北海道医療大学歯学部浦臼町歯科診療所, **北海道医療大学歯学部歯科補綴学第一講座

【目的】浦臼町歯科診療所は北海道医療大学歯学部の地域支援活動の一事業として運営されている。地域支援活動として診療を行うためには、その地域、住民の情報、歯科治療に関する知識やニーズについて知る必要があると思われる。そこで今回浦臼町において歯科治療を行うための参考資料とすることを目的として浦臼町歯科診療所に来所している患者に対しアンケート調査を行った。

【対象および方法】北海道医療大学歯学部浦臼町歯科診療所に来所中の患者50名に対し、本歯科診療所へ来所した動機、本歯科診療所の良いところ、悪いところ、治療に対する希望、診療所に望むこと、歯科予防処置、自費診療の項目についてアンケート調査を行った。

【結果および考察】来院理由については、家から近いからが78%と圧倒的に多く、次に従業員が親切だからとの項目が46%と多くなっている。診療所のよいと思うところについては治療の内容を説明してくれる、対応が親切であるが、それぞれ72%、68%と高い割合を示していた。このような診療所においてはただ診療を行うだけでなく、患者との信頼関係をより深く築いていかなければならない

と考えられた。

診療所の悪いと思うところについては治療期間が長い18%と一番多く、治療に対する希望では、痛くない治療、時間がかかってもしっかりした治療がそれぞれ34%、26%と多くなっている。診療所に望むことでは治療時間が長くなっても来院の回数を少なくしてほしいが30%と多くなっている。浦臼町の主要産業が農業であることを考慮すると患者が来院できる時期や時間が制約されることがあると考えられた。

予防処置については必要がないとの回答が0%であり、積極的に行っていくべきであると考えられる

保険外の治療については保険の治療で十分であるが50%を示していますが、必要なら行ってもよいが26%を占めており、来院している患者の歯科治療に対する理解の程度が高いと考えられる。

以上のことより本診療所が町立の診療所として学理に則った診療を行うとの診療方針が地域に受け入れられているものと考えられた。

本学歯学部附属病院における臨床実習到達度の調査 一歯科衛生士専門学校生の小児歯科でのアンケート調査より一

○駒木 千絵*, 小川原詩織*, 武井 貴子*, 五十嵐清治**

*北海道医療大学歯学部附属病院歯科衛生部, **北海道医療大学歯学部小児歯科学講座

【目的】本学歯科衛生士専門学校の小児歯科臨床実習での到達目標は、大きく分けると次のとおりである。

- 1) 小児および保護者への適切な対応ができる。
- 2) 適切な齲蝕予防処置や口腔衛生指導ができる。
- 3) Four handed dentistryの実際を習得できる。

これらの目標を達成させるために実習項目は細かく分かれている。そこで、すべての課題を習得して目標に到達させるためには、学生の理解度を指導者が認識しておくことが必要であることより本調査を行った。

【方法】対象は歯科衛生士専門学校2年生、59名である。H16.5.10～H16.11.14期間の臨床実習終了後にアンケート調査を無記名で実施した。調査内容は実習開始前に配布しているプリント、実習初日のオリエンテーション、診療の準備、口腔衛生指導および診療補助についてである。

【結果および考察】アンケート結果からは、「コミュニケーションが取れなかった。」「技術不足を痛感した。」「伝えたい事を上手く伝えられなかった。」などの意見が多く見られた。学生は、頭の中である程度理解して実習に挑んでいるようだが、患者さんを前にすると緊張や経験不足から知識や能力が十分に発揮されていないことが推測された。限られた臨床実習期間ではあるが、多くの患者さんと接し、多くの経験を積むことによって職業意識をしっかりと持つ医療人になると思われるため、より多くの満足感を得ることができる臨床実習のあり方を再考する必要があると示唆された。したがって今後の小児歯科での課題として、口腔衛生指導・口腔ケアの実技を100%の学生が体験できるシステムを構築すること、事前学習としてのプリントやシミュレーション実習のあり方を見直すこと、また、患者さんの来院までの待ち時間を有効に利用するなど、検討を重ねていきたいと考えている。

施設職員を対象とした口腔ケアについての集団指導の効果

○工藤美代子*, 林 千代美*, 佐藤 万美*, 宮崎 明香*, 大谷 優子*,
牧浦ひろみ*, 越野 寿**, 松原 国男**, 越智 守生*

*北海道医療大学歯学部附属病院歯科衛生部, **地域支援医療科訪問診療室

【目的】近年、顎口腔系機能と心身の健康との関係が注目されており、顎口腔系機能の保持・増進のためには口腔ケアの充実が不可欠であると考えられる。しかし、障がい者（児）においては、自身によるブラッシングのみで十分な管理を行うことは困難であり、介助者によるブラッシングの補助が必要になるケースが多い。

知的障がい者援護施設「厚田はまなす園」の職員を対象に、入所者に対する介助歯磨きを含めた口腔ケアの集団指導を実施し、指導実施前後にアンケート調査を行ったので報告する。

【方法】調査対象は、厚田郡厚田村知的障がい者援護施設「厚田はまなす園」に従事する直接支援職員21名であり、指導前（1回目）に4項目について、指導後（2回目）に、前回の質問と感想を含む6項目についてアンケート調査を行った。

【結果および考察】アンケートの回答率は、1回目100%、2回目

76.2%であった。1回目の調査では、口腔ケアの組織的な取り決めが不十分であること、口腔ケアに対する知識不足などの問題点が明らかになった。

2回の調査を通じて、就寝時仕上げ歯磨きを行う職員数の増加（0名から3名に）平均歯磨き回数の増加（4回から5回に）、平均歯磨き時間の増加（1分から1.5分に）が認められた。また、歯科衛生士による集団指導について、95%の職員から年数回、継続的に行って欲しいとの回答が寄せられた。

以上のことから、我々の集団指導が、施設職員個々の口腔ケアについての問題解決に結びつき、意識の向上がなし得たと考えられる。しかし、口腔ケアを行える環境の整備等の組織として取り組むべき問題は残っており、施設職員への啓発も必要であると考えられる。

成人知的障害者における口腔衛生管理について ーグループホーム居住者における問題点ー

○関口 五郎

東京都立心身障害者口腔保健センター

【目的】近年障害のある方々を取り巻く生活環境や施設の形態も多様化している。そしてこれまでの学校や施設での生活から、社会参加への環境が広がっている。その中でもグループホームは、少人数での共同生活を通じて障害のある方々の自立を目指す新たな生活形態として、全国的にその数が増加している。今回入所施設からグループホームに移り、それまでの口腔内の状況にも変化がみられたものの、グループホーム担当者の援助も受けることにより、改善の方向をみている一症例について報告した。

【症例】43歳女性。養護学校卒業後、通勤寮と入所更生施設をへて、40歳時よりグループホームで4人の共同生活を続けている。当センターには施設入所当時より13年間継続して受診していた。しかしグループホームに転居し、以前よりも日常の口腔清掃が不十分であることにホーム担当者も気がかりとなっていた。転居約一年後、担当者に付き添われ再び当センターを受診した。

【経過および考察】本症例では施設入所時のように職員が関わるケ

ースが少なくなり、また自分の身の回りのことで各個人に任される範囲が広がったことから、日常の口腔清掃も不十分となり、これまで良好に保ちつつあった口腔内の状況が不良となっていた。歯科医師、歯科衛生士にグループホーム担当者をまじえ、本人の生活状況や日常生活習慣の自立度などを再確認し、診療方針の再検討を行った。また歯科通所にはグループホーム担当者も同伴していただくなど連携をとりながら、現在当センターで歯科治療、予防指導を継続している。口腔内には依然として課題は残るものの、時間をかけた本人磨きそして担当者による仕上げ磨きの習慣が定着しつつある。

今回のケースを通じ、障害のある方々を取り巻く生活環境や施設の形態が、口腔衛生管理にも及ぼす影響が考えられた。今後も同様のケースがみられることも予想され、患者さんを取り巻く環境を再確認し、対応の仕方や診療方針について、再考する機会を持つ必要があるものと思われた。

口蓋Implantを用いて矯正治療を行ったAngle Class I上下顎前突症例

○岡山 三紀*, 村田 勝**, 有末 真**, 柴田 考典***, 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2講座,

***北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座

【目的】矯正治療における固定源は、治療結果を左右する重要な因子の一つである。解剖学的に、上顎骨は下顎骨に比べて皮質骨の厚みが薄いため、白歯を固定源として用いた場合、近心移動すなわち

anchorage lossを生じやすい。

白歯咬合関係が正常（Angle I級）の場合、小白歯抜去後に上顎白歯部の近心移動により前歯部後退量の減少や、白歯の正常咬合関

係を崩す事が問題となる。そのため加强固定として顎外、顎内や顎間装置などが用いられる。しかし成人症例においては社会的、審美的受け入れられない事が多く、十分な患者の協力を得ることは困難で、満足な治療結果が期待出来ない場合がある。今回、我々は、著しい上下顎前歯部の唇側傾斜で確実な固定源が要求される成人症例において、矯正用口蓋implantを使用して良好な治療結果が得られたので報告する。

【症例】初診時年齢20歳6か月、前歯部の突出を主訴として当科を受診。SNA 82.0°, SNB 83.0°, ANB -1.0°, FMA 24.5°, Overbite +5.0mm, Overjet +1.5mm, A. L. D. は上顎 -0.9mm, 下顎

0.0mm, 臼歯関係はClass I上下顎前突症例。

【治療経過】矯正用口蓋implantを埋入後、加强固定のためimplant用パラタルバーを左右上顎第一臼歯に連結し、上下顎第一小臼歯を抜去しマルチブラケット装置により、上下顎犬歯および前歯の遠心移動を同時に行った。

【結果および考察】本症例において矯正用口蓋implantを用いて臼歯の加强固定として使用する事により、顎外装置などによる患者の協力なく上下顎臼歯の近心移動を最小限にする事ができ、動的治療期間が短縮され、良好なプロファイルと咬合関係を得ることができた。

Proceraシステムを使用した審美修復

ー北海道医療大学歯学部附属病院で行われたオールセラミック修復とインプラント補綴ー

○廣瀬由紀人*, 越智 守生*, 國安 宏哉*, 松原 秀樹*, 新井田 淳*, 仲西 康裕*, 田中 隆**, 柿崎 税**
*北海道医療大学歯学部歯科補綴学第2講座, **北海道医療大学歯学部附属病院歯科技工部

【目的】歯科補綴学第二講座は、CAD/CAM技術を応用したNobel Biocare社のProceraを2004年5月に導入し、本システムによるオールセラミック修復とインプラント補綴を行っている。ProceraのAll-Ceram Crownは1983年に開発され、1994年にNobel Biocare社が本システムを導入、同年に設立したミシガン大学のCenter For Excellenceの臨床研究によると世界40カ国で170万本以上のProcera All-Ceram クラウン、ブリッジ、ラミネートベニアが装着されている。2003年末に新しいCAD/CAMスキャニングシステムのProcera Piccoloが発表され、日本でもこのシステムが確立されつつある。今回、Proceraの新システムの概略ならびに本学での臨床例について報告した。

【方法】対象は2004年5月から12月までに北海道医療大学歯学部附属病院を受診し、Proceraで製作した審美修復物とインプラント上部構造を装着した症例とした。

【結果および考察】修復物の総数はクラウン20、ラミネートベニア

1、インプラント支台が7であった。全ての症例で脱離、破折および臨床的不快症状は認められず、良好に経過している。Proceraの付加価値はCAD/CAMが寄与する技工操作の省力化であり、技工士は陶材築盛の色調再現、歯冠形態とオクルージョンに対して時間を集中して使える点にある。そしてProcera AllCeram Crownは天然歯に類似した自然な透明感の再現性に優れ、滑沢な表面性状は舌感が非常に良い。患者はAllCeram Crownの審美的要件、感覚的要件に対して十分に満足していた。しかし、従来の陶材焼付鑄造冠と比較してProcera AllCeram Crownは適合精度が劣るため、支台やクラウンマージンを修正した場合があった。現在、患者の歯科医療に対するQOLの要求は向上し、歯科審美、インプラント補綴を希望する人、さらには金属アレルギーの既往者が増加している。このような背景から、Proceraの修復システムは今後の補綴臨床において非常に有効であると思われる。

早期負荷を行ったボーンアンカーダフルブリッジの印象用カスタムトレーについて

○近藤 里峰*, 國安 宏哉****, 新井田 淳**, 柿崎 税****, 廣瀬由紀人****, 越智 守生****, 吉田 純也****, 田中 隆****, 田中 春樹****, 溝口 到****, 平 博彦***, 村田 勝***, 北所 弘行***, 草野 薫***, 工藤 勝***, 大桶 華子***, 細川洋一郎***, 田中 力延***
*北海道医療大学歯学部附属病院歯科技工研修科, **歯科補綴学第二講座, ***附属病院インプラント歯科外来, ****歯科技工部, *****矯正歯科学講座

【目的】今回、インプラント上部構造を依頼された症例に対して、下顎複製総義歯を利用したカスタムトレーを作製し、作業日数3日で上部構造を作製したので報告する。

【症例】初診時79歳、上下無歯顎の男性。担当医より下顎インプラントに対する上部構造作製について相談を受けた。早期負荷を行うため、埋入から数日で上部構造を装着した症例である。

【経過および考察】治療計画初期から技工士も補綴物作製者として症例検討会に参加し計画に加わった。担当医がシミュレーションしたSIMPlant画像によって導かれた埋入予定部位に印象用コーピング

を想定し、複製総義歯内面にコーピングスペースを設定してカスタムトレーとした。16年11月18日に埋入手術が担当医にて行われた。埋入後、直ちにカスタムトレーにて咬座印象採得が行われ、即日作業用模型作製、咬合器装着、wax up、埋没、鑄造を行った。19日に試適、ロウ付け後、再度外来でフレーム試摘し、22日に上部構造を完成した。トレーと印象用コーピングの適合状態、完成上部構造の調整の少なさから、作製者も治療計画に加わり、治療内容を理解することは有効と感じられた。

早期負荷を行ったボーンアンカードフルブリッジ症例について

○國安 宏哉^{* **}, 柿崎 税^{***}, 新井田 淳^{**}, 廣瀬由紀人^{* **}, 越智 守生^{* **}, 平 博彦^{* ****},
村田 勝^{* ****}, 北所 弘行^{* ****}, 草野 薫^{* ****}, 工藤 勝^{* ****}, 大桶 華子^{* ****},
細川洋一郎^{* ****}, 田中 力延^{* ****}

^{*}歯学部附属病院インプラント歯科外来, ^{**}歯科補綴学第2講座, ^{***}歯科技工部, ^{****}口腔外科学第2講座,
^{*****}口腔外科学第1講座, ^{*****}歯科麻酔学講座, ^{*****}歯科放射線学講座

【目的】インプラント治療は、上部構造装着までに埋入後3～6か月の治癒、免荷期間が必要である。この長期の治癒、免荷期間はオッセオインテグレーション獲得に必要とされていたが、患者のQOLを考えるとできるだけ短期間であることが望まれる。最近では、各メーカーからも即時埋入や新しい表面性状システムの開発、早期インプラント補綴法の報告がなされており、臨床報告のデータにおいても早期負荷インプラントの結果は良好である。今回、早期の咬合機能回復のためにインプラント治療を希望する下顎総義歯患者に早期負荷インプラント治療を行ったので報告する。

【症例】初診時79歳の男性。上下無歯顎症例で、早期の咬合機能回

復を希望して本学インプラント歯科外来を受診した。

【経過および考察】16年11月17日に入院し、18日に静脈内鎮静法下で埋入手術を行った。即日に技工室にて作業用模型作製、咬合器装着、Wax up、埋没、フレームワーク鑄造まで行った。翌日19日にフレームワーク試適、ロウ付後、再度外来でフレームワーク試摘・咬合確認し、22日に上部構造を装着した。退院後、経過は良好であり、患者は非常に満足されていた。患者のQOLが向上している現在、本学インプラント歯科外来でも早期負荷症例やボーンアンカードフルブリッジ症例が増加しており、チームアプローチ、インターディシナリアプローチがますます重要になると考えられた。

北海道医療大学歯学部付属病院における入院症例の臨床的観察

○川上 譲治^{*}, 柴田 考典^{*}, 有末 眞^{**}, 武藤 寿孝^{*}, 永易 裕樹^{**}, 平 博彦^{**}, 村田 勝^{**}, 奥村 一彦^{*}
^{*}北海道医療大学歯学部口腔外科学第1講座, ^{**}北海道医療大学歯学部口腔外科学第2講座

【はじめに】北海道医療大学歯学部付属病院病棟（以下、付属病院病棟）は1980年6月2日に24床の使用が開始され、2005年に札幌市あいの里での北海道医療大学病院の開院に伴い、病棟は同病院への移転が決定している。そこで、これまでの24年間における付属病院病棟入院患者の臨床統計的観察を行ったので報告した。

【方法】調査は各年度の病院概況報告書をもとに、付属病院病棟開設から2004年3月末日まで入院患者数、病床稼働率、1人平均在院日数、総計ないし患者1人あたりの入院収入などについて臨床統計的に調査した。

【結果】入院患者総数は2,850例、年間あたりの最高は1999年の203例最低は初年度の49例、平均入院患者数は118.8例であり、年を追うごとに増加傾向を示していた。一方、病床稼働率では年間あたりの最高は1986年の23.8%、最低は1981年の10.9%、平均病床稼働率は18.2%であり、年を追うごとに低下傾向を示していた。また、患

者1人あたりの平均在院日数では年間あたりの最高は1984年の25.6日、最低は2003年の6.4日で、平均在院日数は15.1日であり、年を追うごとに短縮傾向を示し、特に2002年以降が著しく減少していた。年間の入院総収入は2000年に最高を、1980年に最低を示していたが、明らかな漸増傾向を示していた。なお、患者1日あたりの平均収入は、1999年に最高を、1983年に最低を、その差は約3倍近い比率を示し、明らかな増加傾向であった。

【おわりに】入院患者の病院収入に対する割合が大きくなっているため、入院患者を重視していく施策が望まれる。そこで、入院患者の利便性の向上を図ることにより、入院患者や全身麻酔下の口腔外科手術および歯科治療件数の増加を目指すとともに、病床稼働率の向上、平均在院日数の短縮、高密度治療を心がけて行く必要がある。

乳歯萌出障害を生じさせた複雑性歯牙腫

○藤井 茂仁^{* ****}, 細川洋一郎^{**}, 金子 昌幸^{**}, 松嶋 宏篤^{***}, 大内 知之^{****},
賀来 亨^{****}, 高橋 陽夫^{****}, 矢嶋 俊彦^{***}

^{*}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】歯牙腫は、その発生部位が歯の発育部位と重なるため、歯の萌出障害を引き起こすことが多く、また、エックス線写真によって偶然発見されることも多い。我々は、萌出障害の乳歯保存のため開窓手術を行い、5年経過観察後、歯牙腫を摘出した症例を経験したので、その概要をエックス線所見を中心に報告する。

【症例】

患者：女兒

年齢：初診時2歳0カ月

主訴：上顎左側乳中切歯萌出遅延

既往歴、家族歴：特記事項なし

現病歴：平成11年9月に上顎左側乳中切歯の未萌出のため、医療法人ルミエール歯科を受診した。

現症：口腔内の所見は上顎左側乳中切歯部に硬い膨隆を認めるも、歯肉は腫脹、発赤、出血等は認めなかった。デンタルエックス線写真にて、埋伏した左乳中切歯から左乳側切歯の歯根部にかけて、X線不透過像と透過像の混在した類円形の疾患を認め、この異常陰影は左永久中切歯の歯胚と交叉していた。

臨床診断：歯牙腫

【経過および考察】平成11年11月に歯牙腫摘出手術を予定したが、乳歯の保存が不可能であると考え、開窓手術を行った。その後、乳歯は萌出し、経過良好だったが、乳歯を晩期残存し、永久歯の萌出遅延がみられた。平成16年11月、乳歯を抜歯し、歯牙腫を摘出した。病理検査の結果は、集合性歯牙腫であった。今回のように、歯の萌出を障害している歯牙腫の症例において、審美上や咬合の維持回復という観点から、開窓手術は有用であると思われる。

高周波ラジオ波メス「エルマデントサージ」を使用した症例報告

○木村 和代*, 國安 宏哉**, 新井田 淳*, 廣瀬由紀人***, 越智 守生****, 平 博彦*****, 村田 勝*****, 北所 弘行*****, 草野 薫*****, 工藤 勝*****, 大桶 華子*****, 細川洋一郎*****, 田中 力延*****,

*北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座, **附属病院インプラント歯科外来, ***口腔外科学第二講座, ****口腔外科学第一講座, *****歯科麻酔学講座, *****歯科放射線学講座

【目的】インプラント治療における二次手術の切開は、金属製メスが用いられることが多い。理由は、電気メスは周囲組織に対する熱抵抗が大きく、またレーザーは軟組織への微細な操作が困難であることが挙げられる。しかし、金属製メスもまた「止血不可」、「組織学的に挫滅創」、「刃がすぐに切れなくなる」等の欠点もある。そこで、近年注目されている高周波ラジオ波メスをインプラント症例に応用したので報告する。

【症例】インプラント専門外来におけるインプラント埋入後の二次手術に高周波ラジオ波メスを使用した4症例。

【経過および考察】高周波ラジオ波メス使用後は、異常出血、疼痛、インプラント周囲の損傷も認められず経過良好であった。切開時に金属製メスのような出血を認めないため明瞭な視界を確保でき、臨床操作もスムーズであった。金属製メスでは、切開・縫合が必要であったが、ラジオ波メスでは縫合が必要なく、治癒が早いいため二次手術において非常に有効であった。日常臨床においても、これからはインプラントに限らず使用範囲が広い高周波ラジオ波メスが電気メスに代わって使用されるものと思われる。

剖検後の個人識別事例における一考察

○大熊 一豊****, 花岡 洋一**, 古市 保志***, 斎藤 隆史****, 森 真理***

*大熊歯科医院, **東京歯科大学法歯学講座, ***歯科保存学第一講座, ****歯科保存学第二講座

【目的】大規模災害時等における個人識別作業については、依頼から実際の作業に至る基本的な一連のシステムが構築されつつある。しかしながら、いわゆる平時における身元不明遺体の個人識別は、各地域の事情に委ねられている部分が未だ多い。演者は北海道中川郡池田町で開業しており、第21回本学会で発表した如く、池田警察署所轄内での身元不明遺体は、池田署からの直接の依頼を受け、個人識別作業に携わっている。今回はその概要についてご紹介したが、今回演者としては初めて、司法解剖後に個人識別を目的とした口腔内検査を行った事例を経験したので、若干の知見と共にご報告する。

【事例】平成12年9月26日、北海道十勝郡浦幌町厚内の浜辺で女性水死体が発見された。検視・検案の結果、死因は溺死と判定されたが、身元に関する決め手がなく、同日池田署より演者に口腔内所見の検査が依頼された。その後旭川医科大学で司法解剖の手続き中に該当者らしき人物が浮上し、すでに口腔内所見を採取していた演者のもとに、剖検後の遺体との異同識別が改めて依頼され、生前所見

との比較の結果、同一人であると判定した。

【結果及び考察】解剖を要する身元不明の異状死体において、特に事件性が強い場合、より詳細かつ正確な記録が要求されることは言うまでもない。演者にとって剖検後の口腔内所見採取は初めての経験であったが、舌や汚物の除去を考慮する必要がなく、より詳細な観察が可能であったことから、一層これらのことを念頭に置いて作業にあたらなければいけないと改めて強く実感した。一方現在、剖検頻度の極端な減少が懸念されると共に、遺体誤認の事実も少なからず存在していることから、今後は、解剖頻度が上昇傾向に転じる可能性も指摘されている。こうした状況と、警察歯科医会が全国規模で整備された現状とを照らし合わせれば、これまで主として大学法医学・法歯学教室等に委ねられていた剖検後の口腔内検査が、今後は開業医である警察歯科医により多く依頼されるであろうことも十分予測し得る。従って演者自身の自戒も含め、今後警察歯科医のより一層の質の向上が社会から望まれており、さらなる研鑽が必要であると再認識した。

北海道医療大学歯学会会則

第1章 総 則

(名 称)

第1条 本会は北海道医療大学歯学会（The Dental Society of Health Sciences University of Hokkaido）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・専門技術の錬磨を計り、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。

第2章 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、年会費一切の費用を徴収しない。

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は、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。

第3章 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. 常務理事は理事の中より選出し、会長が委嘱する。常任理事は常任理事会を組織し、会務を分担し、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。

第4章 事業

第11条 本会は第2条の目的を達成するために以下の事業を行う。

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“北海道医療大学歯学雑誌（The Dental Journal of Health Sciences University of Hokkaido）”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。北海道医療大学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。

第5章 会計

(運営経費、会計)

第12条 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。

第6章 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。

4. 本会則は平成17年4月1日より施行する。

「北海道医療大学歯学会雑誌」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、システマテックレビューとする。

2) 論文の内容は、他の刊行物に未発表のものに限る。

3) 本誌はその他に、歯学情報、本学会講演抄録、学会関係記事、学位論文などを掲載する。

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(300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CD-R/RWまたはフロッピーディスク(CD-R/RWが望ましい)を提出すること。なおディスクには、使用したOS、ワードプロセッサ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(結語)、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(300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. 投稿論文の校正

1) 投稿論文に対する著者校正は2回までとする。

2) 1回の校正を48時間以内に提出するものとする。

7. 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。

8. 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。

9. 著作権の帰属

本誌に掲載された著作物の著作権は北海道医療大学歯学会に帰属する。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、著者が全ての責任を負う。

10. 著者のプロフィール

巻末に著者のプロフィールを記すので、著者のスナップ写真と経歴を提出すること。

11. 原稿の送付および本誌に関する問い合わせ

住所：〒061-0293 北海道石狩郡当別町宇金沢1757番地

北海道医療大学歯学部・口腔生理学講座

北海道医療大学歯学雑誌編集委員会

Tel; 0133-23-1239

e-mail; izumih@hoku-iryo-u.ac.jp 和泉博之

「北海道医療大学歯学会雑誌」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、CD-R/RWまたはフロッピーディスク（CD-R/RWが望ましい）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OS、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 | 5) 図表説明文 |
| 2) チェックリストシート（著者全員分のサインと連絡先を記載） | 6) 表 |
| 3) 英文抄録（ABSTRACT、英文表題を含む） | 7) 図 |
| 4) 本文 | |

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 | 5) 著者の所属および所在地 |
| 2) 表題 | 6) 別刷数（50部単位） |
| 3) 著者名 | 7) 連絡先（郵便番号、住所、電話、Fax、e-mail） |
| 4) キーワード（5語以内） | |

1) 表題

- (1) 一般固有名詞として通用していない商品名は用いない。
- (2) 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。
- (3) 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。
- (4) 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

- (1) 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：Akira Yamada（山田昭）and Taro Hokkai（北海太郎））。
- (2) 著者の所属が2ヶ所以上の場合には、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。

著者全員分のサインを取り、連絡先を記載する。

3. 抄録

300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。
 - (1) 提出メディアに、使用機種名、OS名、ソフト名、所属、著者名を明記する。
 - (2) 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（結語）、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, $^{\circ}\text{C}$, 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°C)

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) 文献リストは, アルファベット順(A, B…Z順)で作成する. また本文中の引用箇所以下の体裁に従い, 文献内容を記載する.

例: 単著者 (Izumi, 1999), 2名 (Izumi and Ito, 1998), 3名以上 (Izumi et al., 1970)

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) 文献の著者または編集者が複数の場合にはet al., 他などとせず, その全部を記載する.

4) 著者名が欧字綴の場合は姓の後に名前の頭文字をつけ, また著者が複数の場合は最後の著者の前にandを入れる.

5) 文献の記載方法の基本は次のとおりとする.

(1) 雑誌の場合

著者名 (複数の場合, 氏名を「,」で区切る.). 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: Izumi H. Functional roles played by the sympathetic supply to lip blood vessels in the cat. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 277 : R682–R689, 1999.

Izumi H and Ito Y. Sympathetic attenuation of parasympathetic vasodilatation in oro–facial areas in the cat. J Physiol (Lond) 510 : 915–921, 1998.

Izumi H, Ito Y, Sato M, Karita K and Iwatsuki N. The effects of inhalation anesthetics on the parasympathetic reflex vasodilatation in the lower lip and palate of the cat. Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 273 : R168–R174, 1997.

(2) 単行本の場合

i) 章を参考にしたとき

例: Weinstein L, Swartz MN. Pathologic properties of invading microorganisms.

In: Sodeman WA Jr, Sodeman WA, editors. Pathologic physiology : mechanisms of disease. Philadelphia : Saunders, 1974, p457–472.

ii) 個人または複数の著者の場合

例: Colson JH, Armour WJ. Sports injuries and their treatment. 2nd ed. London : S. Paul ; 1986.

iii) 編集者, 監修者が著者の場合

例: Diener HC, Wilkinson M, editors. Drug-induced headache. New York : Springer-Verlag ; 1988.

iv) 団体, 組織が著者で, かつ出版社の場合

例: Virginia Law Foundation. The medical and legal implications of AIDS. Charlottesville : The Founda-

tion; 1987.

v) 会議録全体を参考にした場合

例: Vivian VL, editor. Child abuse and neglect: a medical community response. Proceedings of the First AMA National Conference on Child Abuse and Neglect; 1984 Mar 30-31; Chicago. Chicago: American Medical Association; 1985.

(3) 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: 発行年, 引用ページの始めと終わり.

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: 1978, 157-165.

(4) 翻訳書の場合

著者(翻訳者): 書名(原著書名). 発行所名: 発行年, 引用ページの始めと終わり.

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 ceramics). 共立出版: 1982, 34-55.

6. 図

- 1) 用紙はA4版とし, 1枚ずつ別葉にする.
- 2) 各葉杖に, 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, 文献の後に付ける.
- 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はない.
- 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:)

Table1 Mechanical properties of specimen

specimen	Tensile strength 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

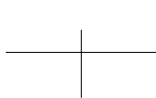
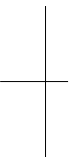
本規定ならびに「投稿の手引き」に規定されていない事項については, 編集委員会にお尋ね下さい.

編 集 後 記

本号から大幅に編集様式が変わりました。第一に雑誌名が東日本歯学雑誌から北海道医療大学歯学雑誌へ、第2に今までB5版であった雑誌がA4版に、第3に本文中と引用文献の書式の様式などが変更になりました。頑なに昔のままでも問題はなかったのですが、雑誌名の変更を機会に多少紙面をできるだけ見やすいように、論文が書きやすいように、修正しやすいように、などと考えて雑誌の大幅な変更となった次第です。これが最も良いものとは思っていませんので今後、会員の皆様のご助言をいただきながらより良い雑誌にしたいと思っておりますので宜しくお願いします。

口腔解剖学教室の武田正子教授にお願いして歯学雑誌の創刊の目的、名称変更らの歴史を巻頭言に書いていただきました。武田先生は来年3月をもって定年退官予定です。昭和54年から医療大（前身は東日本学園大学）に奉職され丸26年間、医療大で講義をなされて、医療大の基礎教育の礎を作られました。

本号には総説、原著論文と臨床報告、さらにシステムチックレビューの14編が収録されております。このように多数の論文が投稿されていることは編集長としては大変うれしい次第です。ただ今回も私の努力不足、能力不足で予定の発行日（6月30日）を大きく遅れてしまったことをお詫び申し上げます。次回からは投稿者にもっと厳しく対応して迅速な編集をしたいと思っておりますので御協力をお願いします（和泉博之）



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 077-582-9990
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 京都市南区唐橋平畑町 8 TEL 075-681-5719
東京営業所/〒110-0005 東京都台東区上野 3-13-8 TEL 03-3836-3691
ニッシン Home Page URL <http://www.nissin-dental.co.jp>

新発売



染まりすぎない 齲蝕検知液

for Minimal Intervention

取り残しを防げます!

削りすぎを防げます!

赤～淡いピンク染部すべてを削除すれば
過不足なく齲蝕象牙質感染層を
取り除けます。

『染まりすぎない』という基本
性能はそのまま、歯髄付近
の感染象牙質とピンクスポット
を識別しやすい

ニシカカリエスチェック^{PAT.P}ブルー
も揃えさせていただきました。

齲蝕検知液

ニシカ

カリエスチェック^{PAT.P}

ニシカカリエスチェック	《付属品》	1,750円
ニシカカリエスチェック・ブルー	4mL ノズル:1, 穴開きキャップ:1, ノズルキャップ:2	

(別売) ニシカカリエスチェックノズル【包装】ノズル:5, 中栓:5, ノズルキャップ:5【価格】2,500円



【レッド】

【ブルー】



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/>

PROVINCE



PROVINCE

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

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。



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。



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 (代)

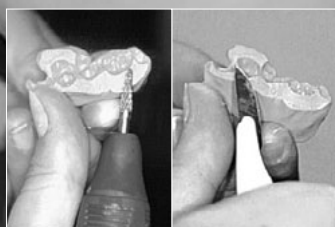
<http://www.shofu.co.jp>

●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

DETAX
GERMANY



グリーンアップル
フレーバー



バーでもナイフでも
自由自在



歯列上だけに注出
アンダーカットや
ブラケットも安心

〈ドイツ製〉

グリーンバイト・アップル 販売4周年 謝恩キャンペーン

■期間/2005年12月末日迄

高精度の咬合記録

な・ん・て・硬・い!
(ショアA95/D45)

口腔内60秒で
完全硬化
シリコン系咬合採得用印象材

- 伸びがよく軟らかいため
咬合抵抗がありません
- 遊離端・多数歯欠損も
正確に記録・再現
- 薄型チップ採用
使用量を1/3に節約
トリミングも簡単

対象品

グリーンバイト・アップル

口腔内60秒で完全硬化

NEW

グリーンバイト・アップル・スロータイプ

口腔内90秒で完全硬化

医療用具許可番号28BY0007

増量セール



◎製品セット
カートリッジ50mL×2
ミキシングチップ×12
コントロールチップ×12

カートリッジ50mL×1
ミキシングチップ×6
コントロールチップ×6

販売限定数量に達しましたら、期間中でもキャンペーンを
終了させて頂くことがありますので、ご了承下さい。

MOKUDA DENTAL Co., Ltd.

KOBE, JAPAN TEL(078)-251-1243 FAX(078)-251-1479
E-mail: info@mokuda.co.jp <http://www.mokuda.co.jp/>

弊社 総合カタログ
＝ 近日完成予定 ＝

ご注文および総合カタログご請求は、お出入りのディーラー様にお申し付け下さい

やさしい診療空間、誕生。

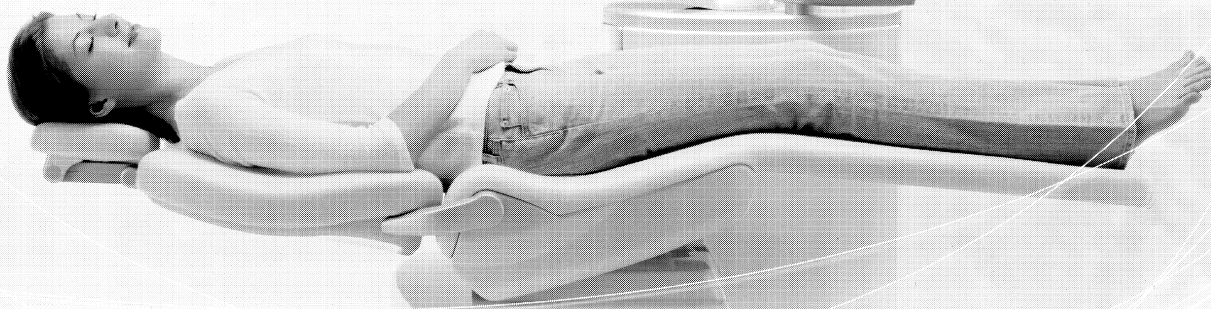
./GC./

「コクーン=繭」をテーマにしたシンプルで丸みのあるデザイン、
身体にフィットする快適な座り心地。

「イオム プラス」は患者さんのリラクゼーションのために
様々な工夫や機能を盛り込みました。

もちろん、ユニットとしての機能はさらに充実。

シリーズ最高の操作性が理想的な診療環境を実現します。



EOM-PLUS

株式会社 ジーシー

※仕様は改良などのためにお断りなく変更することがございますのでご了承ください。

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。

www.gcdental.co.jp/

支 店 ●東京 (03)3813-5751 ●大阪 (06)4790-7333

営業所 ●北海道 (011)729-2130 ●東北 (022)283-1751

●名古屋 (052)757-5722 ●九州 (092)441-1286



真剣勝負



山藤三陽印刷株式会社

〒063-0051 札幌市西区宮の沢1条4丁目16-1 [営業部] 代表電話 (011) 661-7163 FAX. (011) 661-7173

東京支店/電話 (03) 3518-4631 FAX. (03) 3518-4633 苫小牧営業所/電話 (0144) 34-8078 FAX. (0144) 31-2423 千歳営業所/電話 (0123) 26-3555



With the utmost care, and the most advanced manufacturing technology, our innovative products are designed and produced!

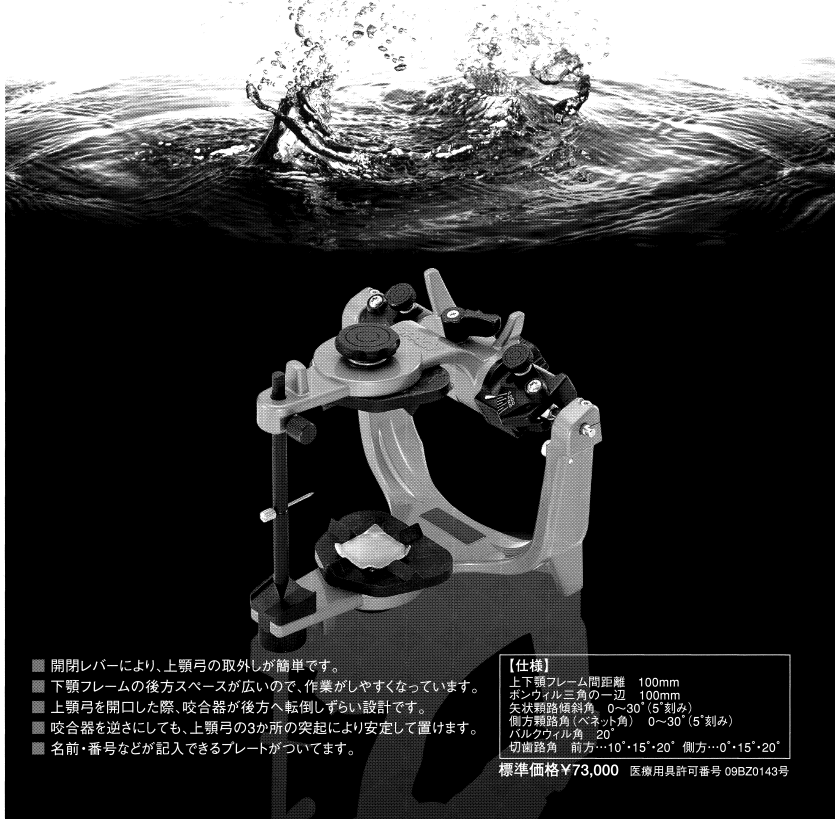
よりよい品質と
新たな信頼を求めて



株式会社 YDM
http://www.ydm.co.jp/

Spacy Articulator (Semi-Adjustable) Wing

スペイシー咬合器(半調節)ウイング



- 開閉レバーにより、上顎弓の取外しが簡単です。
- 下顎フレームの後方スペースが広いので、作業がしやすくなっています。
- 上顎弓を開口した際、咬合器が後方へ転倒しづらい設計です。
- 咬合器を逆さにしても、上顎弓の3か所の突起により安定して置けます。
- 名前・番号などが記入できるプレートがついています。

【仕様】
上下顎フレーム間距離 100mm
ボンウィル三角の一边 100mm
矢状軸路傾斜角 0°~30°(5°刻み)
側方軸路角(ベネット角) 0°~30°(5°刻み)
ハルグウィル角 20°
切歯路角 前方…10°・15°・20° 側方…0°・15°・20°

標準価格 ¥73,000 医療用具許可番号 09BZ0143号

毛先の届きにくい歯間部や
歯周ポケットのプラークを
効果的に除去。

米国特許技術 ソニックテクノロジーによる
『ダイナミックフルイドアクション』が
歯垢を効果的に除去。

超高速振動

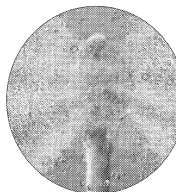
+

左右の
幅広い振れ幅

毎分約31,000回の超高速振動と左右約5mmの
幅広い振れ幅がパワフルな液体流動力を引き
起こし、毛先の届かない歯間と歯周ポケットの
歯垢までより効果的に除去します。*

ソニックアーの特許技術とは・・・

- 毎分31,000回(261Hz)の超高速振動。
- 左右約5mmの幅広い振れ幅。



この最適なコンビネーションにより特許を取得。
だから、ソニックアーだけが「ダイナミックフルイドアクション」を発生させることができ、歯垢除去効果が高いのです。



音波歯ブラシ ソニックアーエリート

sonicare®

◎ソニックアーエリート7800プロフェッショナル●セット内容:ハンドル1本、ブラシ1本、充電器1台、トラベルケース、ブラスタンド●患者参考価格:17,640円(税込)◎別売品:替えブラシ●患者参考価格:3,150円(税込)

●発売元: 株式会社 **ヨシタ** 〒110-8507 東京都台東区上野7-6-9 TEL.03-3845-2931 (器材営業本部)

※) Clark M. Stanford, J Clin Dent 1997: Special Issue Vol. VIII.



スペースライン イムシア タイプⅢ PdW

使いやすく優しさに満ちた

Spaceline EMCIA PdWトレーシステム

タイプⅢ

ユーザビリティとヒーリングの融合を先進のテクノロジーで実現した
新開発のスペースライン イムシア タイプⅢ PdWトレーシステム
(Proprioceptive derivation Wide movement tray system)

きめこまやかな心配りと、優しさに満ちた機能性と快適性は、
オンリーワンの満足をご提供します。

Spaceline EMCIA typeⅢ PdW Tray system features at a glance

- 術者が求める機能性を追及したユーザビリティデザイン
- 患者さんの快適性を高めたヒーリングデザイン
- 自然体の姿勢を広範囲に実現したPdWトレーシステム
- 最大7本のインスツルメントを装着
- 操作スイッチを集中装備したオペレーションパネル
- 患者さんとコミュニケーションを深める液晶ディスプレイ
- 着脱とアルコール清拭が可能なワンタッチコネクションチューブ

Happy Smiles & Heartful Communication

販売元

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 大阪府吹田市里水町3-33-18 〒564-8650 TEL (06) 6380-2525

旭川・札幌・帯広・青森・盛岡・仙台・山形・郡山・新潟・宇都宮・水戸・前橋・千葉・松戸・さいたま
八王子・横浜・長野・静岡・名古屋・岐阜・三重・金沢・彦根・滋賀・京都・宇治・綾部・和歌山・田辺
吹田・神戸・岡山・広島・高松・徳島・北九州・福岡・九大前・長崎・熊本・大分・宮崎・鹿児島・沖縄

製造販売・製造元

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学新築 190 〒613-0022 TEL (0774) 43-7594



スペースライン イムシア
タイプⅢ PdW FT

MORITA

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)

北海道医療大学歯学会雑誌 第24巻 第1号

平成17年 6 月30日

発行者 武 田 正 子

編 集 北海道医療大学歯学会

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757番地

北海道医療大学内

電話 0133-23-1211(内線2563)

電話/FAX 0133-23-1345(直通)

メールアドレス：iryodds@hoku-iryodds.ac.jp

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)

Dent J Health Sci Univ Hokkaido

- 65 経頭蓋側斜方向エックス線撮影法ならびに回転パノラマエックス線撮影法による
下顎頭関節面の描出再現性に関する基礎的検討
細川洋一郎, 大西 隆, 佐野 友昭, 田中 力延,
金子 昌幸, 奥村 一彦, 柴田 孝典…………… (65)

〔CLINICAL report〕

- 71 A study on nasotracheal intubation to prevent injury to the nasopharyngeal mucous membrane
-Comparison of the bougie method and the gastric tube guide method-
Masaru KUDO and Noboru SHINYA …………… (71)
- 77 Application of low-frequency electricity and stellate ganglion block therapy
to inferior alveolar neuroparalysis following tooth extraction
-Evaluation of facial skin temperature elevations via thermography-
Takuro KAWAI, Masaru KUDO, Tomochika YANAGI and Noboru SHINYA…………… (77)

〔症例報告〕

- 83 歯科麻酔科外来における患者と患者関係者同伴協力による鎮静・麻酔導入
-患者関係者の同伴協力による鎮静導入および全身麻酔導入を適応した
知的障がい歯科患者への歯科麻酔科診療-
工藤 勝, 大桶 華子, 河合 拓郎, 國分 正廣, 新家 昇…………… (83)
- 91 早期負荷インプラント用カスタムトレーについて
國安 宏哉, 新井田 淳, 近藤 里峰, 柿崎 税, 廣瀬由紀人,
越智 守生, 平 博彦, 村田 勝, 北所 弘行, 草野 薫,
工藤 勝, 大桶 華子, 細川洋一郎, 田中 力延…………… (91)

〔システムティックレビュー〕

- 99 変形性関節症に関連する遺伝子多型についてのシステムティックレビュー
金澤 香, 柴田 孝典…………… (99)

〔学会記録〕

- 105 第23回東日本歯学会学術大会 定例講演会 …………… (105)
- 106 東日本歯学会第23回学術大会 一般講演抄録 …………… (106)
- 122 北海道医療大学歯学会会則 …………… (122)
- 124 「北海道医療大学歯学会雑誌」投稿規程 …………… (124)
- 125 「北海道医療大学歯学会雑誌」投稿の手引き …………… (125)