

新潟歯学会学会抄録

平成15年度 新潟歯学会第一回例会

日時 平成15年7月12日(土) 午前9時00分～

場所 新潟大学歯学部第三講義室(5F)

[教授就任講演]

歯髄修復機構の解明から歯の再生研究への展開

顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野
大島 勇人

生物のもつ最も生命らしい現象の一つに再生がある。我々のからだは、外傷や切断などの物理的損傷に対しての治癒能力を備えており、その傷を受けた場所に応じて修復し、元通りに再生する。この様な再生現象において、細胞が作り出されるかなめの部分には組織幹細胞が存在する。歯科領域においても再生現象が知られており、窩洞形成や移植・再植等の歯の損傷に対して、歯髄は再生能力を有している。しかしながら、歯髄組織再生に必要な組織幹細胞の存在は臨床経験的に推察されているものの科学的には解明されていないのが現状であり、再生の場が大きく失われると再生が期待できない場合が多い。最近、NIHのShiの研究グループにより、ヒトの智歯や脱落乳歯から歯髄幹細胞を同定したという報告が相次ぎ、歯髄の再生医療は手の届きそうな段階まで来たかの印象を受ける。本講演ではまず、これまで我々が明らかにした研究データを基盤に、歯の損傷後の歯髄再生過程における抗原提示細胞とストレス蛋白の役割について紹介する。

ストレス蛋白heat shock protein (Hsp) とは、生物が高温などのストレスにさらされた時に一時的に合成が誘発される蛋白質で、ストレスによる損傷からの防御と修復に関与するが、炎症反応を活性化することも知られている。この様なストレス蛋白のうち低分子量のHsp25が象牙芽細胞に高濃度に発現している。窩洞形成・歯牙再植後の歯髄再生過程においても、再生象牙芽細胞がHsp25発現を獲得することが明らかになっており、歯髄間葉細胞の象牙芽細胞への最終分化にストレス蛋白が重要な役割を果たすとともに、変性した象牙芽細胞から漏出したストレス蛋白が免疫反応に影響を与えていることが推測された。一方、このような歯髄再生過程において、歯髄・象牙境にクラスII主要組織適合性複合体 (major histocompatibility complex: MHC) 分子をもつ抗原提示

細胞が一過性に出現することも明らかになっている。ストレス蛋白と抗原提示細胞の相互作用が歯髄侵襲後の迅速な象牙芽細胞分化に一役を担っているのかもしれない。歯髄の再生過程は、上皮組織が存在しない環境下で、象牙質を含む細胞外基質、免疫担当細胞の遊走、象牙芽細胞の変性という3つの側面から現象を捉える必要がある。講演の最後に、組織幹細胞を用いた歯髄再生研究の問題点ならびに展望について述べ、今後の我々の研究の展開についても述べてみたい。

大島 勇人 (おおしま はやと) 略歴

1961年 東京都に生まれる

1987年 新潟大学歯学部卒業

1991年 新潟大学大学院歯学研究科修了 (歯学博士)

1992年 新潟大学歯学部 助手 (口腔解剖学第二講座)

1997年 新潟大学歯学部 講師 (口腔解剖学第二講座), 文部省在外
研究員 (ヘルシンキ大学 バイオテクノロジー研究所 発生
生物学分野)

1998年 新潟大学歯学部 助教授 (口腔解剖学第二講座)

2001年 新潟大学大学院医歯学総合研究科 助教授 (顎顔面解剖学
分野)

2002年 新潟大学大学院医歯学総合研究科 教授 (硬組織形態学分野)

[一般講演]

1. 実験的筋への痛み刺激が顎反射に及ぼす影響

新潟大学大学院医歯学総合研究科

¹顎顔面機能学分野,²小児口腔科学分野黒瀬雅之¹, 山村健介¹, 井上誠¹, 野口真紀子²,
Sajjiv Ariyasinghe¹, 山田好秋¹

【目的】

近年健常者の咬筋の高張食塩水を注入することにより筋痛を伴う運動性障害の症状が引き起こせることが明らかになった。この手法により実験的な筋への痛み刺激が、様々な運動機能に及ぼす影響が研究されてきた。しかし、筋への痛み刺激が、モダリティの異なる2種類の刺激 (侵害性および非侵害性) により誘発される開口反射、並びに閉口反射に及ぼす影響を同一条件下で検討した報告はない。我々は、各反射応答が咀嚼筋 (側頭筋) の実験的筋痛によりいかなる影響を受けるのかを検討した。

【方法】

開口反射は下顎切歯の歯髄電気刺激 (侵害性刺激), 下
歯槽神経電気刺激 (非侵害性刺激) により誘発し, 誘発応
答は顎二腹筋筋電図として記録した。閉口反射は三叉神

経中脳路核微小電気刺激により誘発し、誘発応答は咬筋筋電図として記録した。実験的筋痛として、炎症性刺激物質であるMO (Mustard oil) 20 μ l を側頭筋に注入した。MO注入前と注入後の誘発応答を経時的に記録し、反射応答量を指標としてMO注入の効果を評価した。また、反射応答の変調が認められた場合には、その機序の検討のためにオピオイド系拮抗薬であるNaloxoneを投与し、反射応答の変調に対するオピオイド系下行性疼痛抑制系の関与を検討した。

【結果及び考察】

下歯槽神経由来の開口反射応答はMO注入後抑制された。歯髄由来の反射応答はMO注入直後から有意に抑制され、下歯槽神経由来の反射応答のMO注入による抑制効果と比較すると、その効果は強かった。閉口反射応答は、MO注入直後に一過性に促進され、その後抑制された。以上より、モダリティの異なる刺激により誘発された開口反射に対して、実験的な筋痛は異なる変調を引き起こすこと、また閉口反射に対しても変調を引き起こすことが示唆された。また、MO注入後歯髄由来の反射応答が抑制されている段階(30分後)にNaloxoneの投与を行った結果、MO注入による反射応答に対する抑制効果が減弱した。この結果から、歯髄由来の反射応答の抑制には、オピオイド系の疼痛抑制機構が関与していることが示唆された。

2. 発話刺激の変化に対する幼児の発話応答時間

新潟大学大学院医歯学総合研究科
¹顎顔面機能学分野, ²顎顔面口腔外科学分野
 前新直志¹, 山田好秋¹, 寺尾恵美子²

【目的】

幼児の発話は主に成人話者の影響を受けているが、発話応答時間も影響している可能性が考えられる。

我々は成人の発話刺激の変化に対する健常幼児の発話応答時間 (speech response time; SRT) を検討した。

【方法】

対象児は言語能力を含む発達が正常範囲の3歳~5歳までの幼児90名(男児45名, 女児45名)。刺激は3音節10単語を用いた。健常成人女性(31歳)が「普通に」(以下, normal-speed), 「少し遅く」(以下, mild-slow), 「できるだけ遅く」(以下, slowest) 発話した音声と画像を提示した。刺激の基準値を求めるために、音声の平均発話持続時間を計測した。時間が一定になるよう加工・編集された音声と画像を提示し、幼児に模倣で発話応答させた。採取された幼児の発話サンプルは音響解析ソフトを用いて、そのSRTが計測された。

【結果】

全体と性差: SRTは全て1sec以内であった。全対象

児における刺激間に有意差を認めたと、性別間に差は示されなかった。発達的变化: 年齢群間ではnormal-speedとmild-slowに有意差が示された。多重比較により両刺激とも3歳児群と4歳児群に差はなく、5歳児群との間に有意差が示された。slowestには示されなかった。さらに、刺激間、特にnormal-speed~mild-slowにおいて、SRTの変化量が加齢に伴って小さくなった。

【考察】

幼児の発話応答時間は性差に関係なく成人の発話に影響される。しかし応答は1sec以内が限度であろう。ゆっくりとした発話は幼児の応答時間を長くさせ、発達差を生じさせない効果をもつと考えられる。さらに、普通の発話刺激~少しゆっくりとした発話刺激の影響力は、加齢に伴って小さくなると推測できる。

発話応答がスムーズに遂行できない症状に、幼児期に高頻する吃音のBlockageがある。本結果は吃音発症の予防的措置として、流暢性発話獲得初期における成人の言語的にかかわり方に有用な示唆を提供すると思われる。

3. Effects of sensory inputs on the extrinsic tongue muscle activity during cortically evoked rhythmic jaw movements

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

Sajjiv Ariyasinghe, Makoto Inoue, Yohji Harasawa,
 Kensuke Yamamura, Masayuki Kurose, Yoshiaki Yamada

【Objectives】

This study was designed to investigate the modulation of the extrinsic tongue muscle activities by sensory inputs during cortically evoked rhythmic jaw movements (CRJMs).

【Methods】

Seven male rabbits were anesthetized using a mixture of urethane (1g/kg) and alpha-chloralose (60 mg/kg). Electromyograms (EMGs) of jaw-closing (Masseter), jaw-opening (Digastric), tongue-retrusive (Styloglossus, Sg) and tongue-protrusive (Genioglossus, Gg) muscles, and jaw movements in the frontal plane were recorded. To elucidate the effects of the sensory inputs on the tongue muscle activities during CRJMs, a wooden stick was applied (Insertion) between the upper and lower molar teeth on the working side, the side opposite to the cortex stimulated. The peak amplitude, area and duration of EMG bursts of the muscles and jaw movement trajectories were compared between the conditions.

【Results】

The jaw and tongue muscles were rhythmically active during CRJMs. A clear double burst was seen in the Sg and Gg muscles on the working side. The first burst in the Sg muscle (Sg1) was in the jaw-opening (Op) phase and the second burst (Sg2) in the jaw-closing (Cl) phase. In the Gg muscle the first burst (Gg1) was in the early Op phase and the second (Gg2) in the late Op phase. The gape of the jaw increased and the lateral excursion decreased during Insertion. The Sg2 burst was significantly increased in peak amplitude, area and duration during Insertion and the Sg1 burst was also increased in the peak amplitude and area. The Gg2 burst was significantly increased in the peak amplitude, area and duration during Insertion and the Gg1 burst was also increased in the peak amplitude. The Sg burst in the Cl phase and Gg burst in the late Op phase were likely to be predominantly modulated by the sensory inputs.

【Conclusions】

The jaw and tongue movements were well coordinated during CRJMs and the EMG activities of tongue muscles were affected by the oro-facial sensory inputs.

4. 口腔外科手術患者の周術期心理状態と身体愁訴に関する心身医学的研究

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科
口腔生命科学専攻顎顔面再建学講座歯科侵襲管理学分野

²新潟大学医学部保健学科
田中 裕¹, 村松芳幸², 染矢源治¹

【目的】

術前の外科手術患者は高い不安や恐怖を有するのが一般的である。さらに、口腔外科手術では術後に呼吸・摂食・会話などの日常活動が強く障害されるため、患者は不安状態だけでなく抑うつ状態など特殊な心理状態にある可能性がある。一方、術後疼痛などの身体愁訴は同一手術であっても患者の反応は様々である。この背景因子の一つに患者の心理的因子の関与が推測される。しかし、現在まで口腔外科領域における周術期の心理状態の評価、および身体愁訴に關与する因子の解析についての詳細な報告はみられない。そこで、今回口腔外科手術患者の周術期の心理状態を評価するとともに身体愁訴に及ぼす心理的因子の影響について研究を行ったので報告する。

【方法】

対象は、新潟大学歯学部附属病院中央手術室において、全身麻酔下に口腔外科手術を予定した、既往歴のない患

者284名とした。心理状態の評価には、手術前日および手術後7 - 10日目の2時点において、Hospital Anxiety and Depression scale, State Trait Anxiety Inventory test, Somatosensory Amplification scaleを用いた。さらに、周術期の身体愁訴に關しては、患者問診、患者カルテ、アンケート調査、および術後の薬剤使用状況を用いて評価を行った。

【結果および考察】

心理状態の評価では、患者の不安得点は術前が高く、術後は有意に低下をしたが、抑うつ得点は術前後共に低く、術前後で有意差はみられなかった。SSASでは、術前後の得点変化は少ないものの術前に対して術後が増加する傾向がみられた。さらに身体愁訴のうち、術後の疼痛では、術前の不安、抑うつ得点が高いほど、強くかつ長期間訴え、鎮痛薬使用回数も増加する傾向がみられた。以上より、口腔外科手術患者では、術前は急性の強い不安状態にあり、さらに術前の不安、抑うつが強いほど術後の身体愁訴の訴えが強いことから、心理状態が身体愁訴に影響を及ぼす一因になっていることが示唆された。

5. 歯周炎患者におけるFcγレセプター遺伝子多型の解析

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科
摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野、
²新潟大学歯学部附属病院総合診療部
金子 進¹, 小林哲夫^{1,2}, 山本幸司¹,
杉田典子¹, 吉江弘正¹

【目的】

免疫グロブリンA (IgA) のFc部に対するレセプターであるFcγRは、多形核白血球 (PMN)、単球、マクロファージ、好酸球などの炎症性細胞に発現し、貪食、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害作用 (ADCC)、炎症性メディエーターの産生を誘導する。歯周炎病変部において、歯周ポケット中にFcγRを発現したPMNが多く集積し、FcγR発現が末梢血中PMNよりも亢進していることから、歯周病原性細菌の排除にFcγRを介した機構の重要性が示唆されている。近年、FcγR遺伝子の機能的プロモーター領域に+56T/C遺伝子多型が発見され、FcγRの発現レベルへの関与が示された。しかしながらFcγR遺伝子多型と歯周炎感受性との関連性については未だ明らかにされていない。そこで我々は、FcγR遺伝子上の新たな遺伝子多型の有無を検索し、検出された遺伝子多型ならびに+56T/C遺伝子多型と歯周炎との関連性を検証した。

【方法】

インフォームドコンセントが得られた侵襲性歯周炎 (Aggressive Periodontitis; AGP) 患者46名、慢性歯周炎 (Chronic Periodontitis; CP) 患者93名、日本人健常

者対照 (Healthy Control; HC) 群89名, およびコーカサス系白人HC群59名を対象とした。ダイレクトシーケンス法によりFc R遺伝子上の新たな多型の有無を検索後, 同定した多型部位ならびに+56T/C遺伝子多型についてアレル特異的PCR法を用いて遺伝子型を決定した。遺伝子型分布については3 × 2分割表, アレル頻度およびアレル保有率については2 × 2分割表において χ^2 検定にて解析した。

【結果】

リガンド結合部に相当する細胞外第1ドメイン(EC1)に新たな1塩基変異nt324A/Gを認め, この遺伝子多型の分布に民族差は認められなかった。AGP群とHC群間でnt324A/G遺伝子型分布に有意な偏りを認め($\chi^2=6.66$, $p=0.036$), AGP群でのnt324Aアレル保有率がHC群と比べて有意に高かった (OR=2.54, 95% CI 1.20-5.38, $\chi^2=6.66$, $p=0.014$)。一方, +56T/C遺伝子多型は各対象群間での遺伝子型分布に有意差は認められなかった。

【考察】

本研究により, Fc R遺伝子のリガンド結合部相当領域EC1におけるnt324A/G遺伝子多型がAGPの感受性に関与している可能性が示唆された。

6. 慢性歯周炎罹患者の重症度とTNFレセプター2型遺伝子多型の関連性について

¹新潟大学大学院医歯学総合研究科
摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野,

²新潟大学歯学部附属病院総合診療部
島田靖子¹, 田井秀明¹, 遠藤基広¹, 小松康高¹,
小林哲夫^{1,2}, 山崎和久¹, 吉江弘正¹

【目的】

近年, 歯周炎はcommon diseaseの一つとして位置づけられ, その発症, 進行に遺伝子多型の関与が示唆されている。我々はこれまでにTNF- α 遺伝子多型やIL-1遺伝子多型と侵襲性歯周炎との関連性を明らかにしてきた。そこで, 今回我々は, 日本人におけるTNFレセプター2型+587 (T/G) の遺伝子多型と慢性歯周炎の関連性について検討を行った。

【材料と方法】

新潟大学歯学部附属病院歯周病診療室を受診しインフォームドコンセントを得た日本人慢性歯周炎患者196名(40~65歳, うち5年以内の喫煙歴がある者は対象から除外)から採取した末梢血よりゲノムDNAを抽出した。TNFR2+587 (T/G) の遺伝子多型はPCR-RFLP法にて検出し, 遺伝子型, アレル頻度を決定した。慢性歯周炎患者はKornmanら(1997)による重症度の分類基準に基づき, 軽度~健常者(n=66), 中等度(n=72), 重度(n=58)の3群に分け, 各遺伝子多型の頻度と疾

患との関連性についての統計学的解析を行い, $p<0.05$ の場合を統計学的に有意差があるものとした。

【結果】

- 1) TNFR2 +587 (T/G) の遺伝子多型のアレル頻度において, またアレル保有率でも重度慢性歯周炎患者では軽度~健常者群に比べ, TNFR2 (+587G) alleleが有意に高く見られた(カイ2乗検定, 重度群vs. 軽度~健常者群; アレル頻度20.7% vs 9.1% $p=0.0097$, オッズ比=2.61, アレル保有率37.9% vs. 16.7%, $p=0.0075$, オッズ比=3.06)。
- 2) 患者群を+587Gアレル保有の有無で分け, 臨床パラメーターとの関連性について検討したところ, PPD, CAL, 骨吸収度において+587Gアレル保有群の方が有意に高かった(マン・ホイットニー検定 $p=0.035$, $p=0.022$, $p=0.018$)。
- 3) ロジスティック回帰分析により, 性別, 年齢, プラークの量による影響を補正した上でもTNFR2 +587 (T/G) の遺伝子多型が重度歯周炎に関連することが分かった。

【結論】

以上より, TNFR2 (+587T/G) 遺伝子多型は慢性歯周炎においてリスクマーカーとなる可能性が示唆された。

7. 禁煙によるヒト歯肉微小循環ならびに好中球mRNA発現の変化

新潟大学大学院医歯学総合研究科
摂食環境制御学講座歯周診断・再建学分野
両角俊哉, 久保田健彦, 佐藤 匡, 板垣真奈美,
杉田典子, 奥田一博, 吉江弘正

【目的】

禁煙が歯周組織に及ぼす影響や免疫機能の回復期間における好中球の働きに関しては未だ詳細には知られていない。そこで我々は8週間の禁煙を行う喫煙者の歯肉において, 歯肉血流・歯肉溝滲出液量の変化を測定し, 歯肉微小循環機能に及ぼす禁煙の影響を検討した。さらには, 禁煙期間において好中球より発現する炎症性サイトカインやMMPsのmRNA発現の変化についても検討した。

【方法】

全身性および歯周疾患がない喫煙者(20本以上/日の喫煙歴5年以上)16名を被験者として選定し, 8週間にわたって禁煙を行った。対照被験者は喫煙歴の無い非喫煙者11名とした。禁煙の確認には呼気中CO濃度(Micro Smokerlyzer γ), 血清中ニコチン・コチニン濃度を調べた。

【実験1】

禁煙直前(0日)および禁煙後1, 3, 5日目, 1週, 2週, 4週, 8週目に上顎左側中切歯における歯肉血流(Laser Doppler DRT4イ), 歯肉溝滲出液量(GCF, Periotron 6000イ)を測定した。

〔実験2〕

0日, 1, 4, 8週後に各々より末梢血を採血し, 好中球を採取した。各群の好中球よりtotal RNAを抽出・精製し逆転写後, Semiquantitative RT-PCR法により各種mRNA(IL-1b, IL-8, TNF-a, VEGF, MMP-8)の発現量を定量し, 比較検討した。

【結果】

被験者16名中11名が8週間の禁煙を継続し, いずれも1日で呼気中CO濃度が有意に減少した。歯肉血流は禁煙前と比較して3日後に有意に増加した。GCF量は禁煙前と比較して5日後に有意に増加し, 非喫煙者と比べ禁煙1週までは有意に低かった。また, MMP-8のmRNA量は禁煙前と比較して禁煙8週後に有意に増加した。

【考察】

禁煙により歯肉組織の代謝が活性化され, それにより免疫防御機能が回復しうることが示唆された。また, 喫煙者ではfMLP刺激後の好中球の転写産物の産生量が低下していることが示唆され, MMP-8の発現は禁煙後, 早期に増加し, 禁煙の影響を反映することが明らかになった。

8. Three dimensional evaluation of mid-facial development in unilateral cleft lip and palate

¹Div. of Orthodontics, ²Polyclinic Intensive Oral Care Unit, ³Ishii Orthodontic Clinic, ⁴Div. of Oral and Maxillofacial Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
C.E.Gramaticescu¹, K.Terada², K.Ishii³, N.Watanabe¹, K.Ono⁴, S.Morita¹, K.Hanada¹

This study investigate the effects of the two stage palatoplasty combined with Hotz ' plate on sagittal mid-facial development in complete unilateral cleft lip and palate (UCLP) individuals, using the Optical Surface Scanner. The sample included 48 UCLP patients (age:10-19) treated by two different surgical techniques: one-stage palatoplasty and two-stage palatoplasty and 24 age-and gender-matched non-cleft subjects with skeletal Class I. Mid-facial sagittal depth was determined by evaluating the z-coordinate values of 15 corresponding facial measurement points on both sides for each cleft group and the control group. Mid-facial asymmetry was obtained by calculating the difference in z-values of these 15 corresponding facial

measurement points between both sides for cleft groups and left and right sides for the control group and then evaluated by Student 's paired t-test. The differences among the three groups were statistically compared by ANOVA 's Fisher ratio, at a significance level of $p < 0.05$. Mid-facial depth assessment revealed significant differences ($p < 0.05$) between the three groups, in almost all the measurement points values calculated. No significant difference was found in the case of sagittal mid-facial asymmetry, except on the level of Exocanthion plane in the I stage group. The study clearly demonstrates that two-stage palatoplasty combined with Hotz ' plate has a beneficial effect on mid-facial development and facial balance in UCLP patients.

9. 軟骨細胞においてFGFR3はJAK/STAT系を介してPTH/PTHrP受容体発現抑制を行う

新潟大学大学院医歯学総合研究科
¹口腔健康科学講座 顎顔面口腔外科学分野,
²摂食環境制御学講座 顎顔面解剖学分野,
³顎顔面再建学講座 硬組織病態生化学分野
関 雪絵^{1,2}, 網塚憲生², 永田昌毅¹, 織田公光³,
高木律男¹, 前田健康²

【目的】FGFR3は軟骨細胞に直接作用し, その増殖を抑制する負の調節因子と考えられている。現在のところ, FGFR3の軟骨細胞への作用は直接的であり, それはJAK/STAT系を介する事が知られている。一方で, PTHrP, PTH/PTHrP受容体(PTH-R)も軟骨細胞の分化に重要な因子であり, 特に肥大化細胞層に発現するindian hedgehog(IHH)とnegative feedback機構を形成することが知られている(PTHrP/IHH negative loop)。そこで, 本研究では培養軟骨細胞を用いて, FGFR3, PTHrP, PTH-R間における発現制御とその機構について検索した。

【材料と方法】

正常ラット由来の軟骨細胞株であるCFK2にPTHrP, PTH-RまたはFGFR3 cDNAsをtransfectionし, これら遺伝子発現をRT-PCR, またはReal time PCRにて検討した。また, FGFR3cDNAをtransfectionした細胞におけるStat1の免疫局在を観察した。さらに, JAK Inhibitorsで処理した場合のPTHrP, PTH-Rの発現をReal time PCRにて検討した。

【結果と考察】

培養軟骨細胞であるCFK2は, PTHrP, PTH-R, FGFR3を発現したが, IHHは検出されなかった。従って, PTHrP/IHH negative loopはこの培養系において成

立せず、PTHrPとPTH-R発現におけるIHHの関与は排除された。PTHrPまたはPTH-Rの過剰発現を行ったCFK2ではFGFR3の発現変化を認めることはできなかった。ところが、FGFR3 cDNAをtransfectionしたCFK2では、FGFR3蛋白はその細胞膜にほぼ一致して観察され、そのようなCFK2ではPTHrPの発現は若干減少し、またPTH-Rの発現は著しく抑制された。FGFR3を過剰発現した細胞ではStat1の核局在が認められたことから、JAK/STAT系を介する可能性が推測された。JAK2 Inhibitor処理を行った場合はPTH-Rの発現は影響を受けなかったが、JAK3 Inhibitor処理によってPTH-Rの遺伝子発現が減少したことから、FGFR3のPTH-R発現抑制機構はJAK3を介する可能性が推測された。

10. 骨折の初期治癒過程における組織化学的検討

新潟大学大学院歯学総合研究科
¹顎顔面解剖学, ²顎顔面口腔外科学
 李 敏啓^{1,2}, 網塚憲生¹, 竹内亀一¹,
 高木律男², 前田健康¹

【目的】

骨折治癒過程における骨・軟骨形成と骨吸収の初期変化を明らかにする目的で、マウス肋骨骨折モデルを作製し、骨形成あるいは軟骨形成といった骨外膜の反応を組織学的に検討した。

【材料と方法】

生後7週齢ICR系雄性マウスにおける第8番肋骨を中央部で切断した。術後2, 4, 6, 10日目に4%パラホルムで灌流固定、骨折させた肋骨を提出し10%EDTAで脱灰、パラフィン包埋した。同試料において、ALP, TRAP, オステオポンチン, type II collagenおよび抗マクロファージ抗体(F4/80)を用いた免疫組織化学を行った。

【結果】

術後2日後の骨折断面及びその周囲には変性組織が形成され、周囲の骨芽細胞のALP反応も上昇した。骨折部位に近い骨外膜では強ALP陽性を示す骨芽細胞層が肥厚し、これら骨芽細胞様細胞の周囲には極弱いtype II collagen陽性反応も認められた。ところが、骨折部位から離れた骨外膜直下にはオステオポンチン陽性を示す骨基質の添加が観察された。一方、骨折部位にマクロファージ・破骨細胞の顕著な集積は観察されなかった。4日後では、骨折部位に近い骨外膜においてtype II collagen陽性を示す細胞外基質が増加したが、依然としてその中に存在する細胞は強ALP陽性を示した。一方、骨折部位から離れた位置の骨外膜ではオステオポンチン陽性を示す骨基質の添加が観察されたが、type II collagen陽性反応は認められなかった。また、骨折部位

にはTRAP陽性破骨細胞が骨片上に局在していたが、F4/80陽性マクロファージの集積は認められなかった。術後6日では、骨折近傍の骨外膜部位にtype II collagen陽性を示す軟骨塊が形成しており、その表層をALP陽性細胞が覆っていた。また、骨折部位には破骨細胞が多数局在したが、依然としてマクロファージの集積は観察されなかった。10日目では、骨折付近で形成された軟骨には血管侵入および骨置換が認められた。

【考察】

骨折部位からの距離により骨外膜の反応が異なることが明らかとなった。骨折近傍ではALP陽性細胞周囲にtype II collagen陽性基質が存在したことから、骨外膜の細胞は骨芽細胞と軟骨細胞の性質を備えていると考えられた。一方、マクロファージの集積はそれほど顕著ではないことから、骨折による炎症よりも露出した骨基質からの何らかの因子、あるいは骨折時の血管破壊による酸素供給の低下などが、周囲の骨外膜細胞の分化を調節している可能性が推測された。

11. ラット上顎骨における吸収性膜を用いたGBR法の組織学的観察

新潟大学大学院歯学総合研究科
¹口腔健康科学講座 加齢・高齢者歯科学分野,
²摂食環境制御学講座 顎顔面解剖学分野
 田口裕哉^{1,2}, 網塚憲生², 中館正芳^{1,2}, 大西英夫¹,
 藤井規孝¹, 野村修一¹, 前田健康²

【目的】

骨欠損部における骨増生を目的としたGuided Bone Regeneration (GBR) 法に用いる遮断膜には生体吸収性膜と非吸収性膜がある。e-PTFE膜に代表される非吸収性膜を用いたGBR法に関しては、多くの基礎的・臨床的成果が報告されているが、近年その使用が盛んとなってきた吸収性膜を用いたGBR法に関する研究報告の多くが術後に獲得された骨量に焦点を当てており、その骨形成過程の詳細について着目したものは少ない。そこで今回我々は、ラット上顎骨骨欠損部に吸収性膜を用いたGBRを行い、新生骨形成過程を吸収性膜と骨形成系細胞との関連性に注目して経時的組織学的に観察した。

【方法】

生後4週齢雄性Wistar系ラットの上顎臼歯を抜歯し、抜歯窩の治癒後に規格化した骨窩洞を形成し、吸収性膜(Bio-Gide[®])を用いたGBR法を行った。なお、反対側は骨窩洞のみの対照群とした。術後1, 2, 3, 4週に灌流固定を行い、試料作成後、H-E染色およびアルカリフォスファターゼ(ALP), 酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP), オステオポンチン(OPN), オステオカルシン(OCN)の検出を行った。

【結果および考察】

術後1, 2週の対照群では, 窩洞底からの線維性骨の形成が認められ, 多くのALP陽性骨芽細胞が観察された。線維性骨にはTRAP陽性破骨細胞は少なく, 骨形成が優位であることが示唆された。術後3, 4週では, 多数のALP陽性骨芽細胞ばかりでなく, TRAP陽性破骨細胞が新生骨表層に散在した。また, 新生骨の高さは既存の歯槽骨頂部まで達しておらず, 陥凹した形態を呈していた。一方, 術後1, 2週の実験群では, 対照群と同様に窩洞底からの線維性骨の形成ならびに多数のALP陽性骨芽細胞の存在が確認された。術後2週になると, 吸収性膜直下および膜由来膠原線維間にもALP陽性細胞が観察され, それにほぼ一致してOPNならびにOCN陽性反応が膠原線維の表層に検出された。従って, 今回用いた吸収性膜は骨芽細胞の分化促進に関与しているものと推測された。術後3, 4週の実験群では, 線維性骨の緻密骨への置換が進み, 骨窩洞はほぼ新生骨で満たされた。また, 膜由来と思われる膠原線維が新生骨骨基質中に取り込まれており, 骨芽細胞が吸収性膜の膠原線維を基質沈着の足場としても利用していることが推察された。以上より, 吸収性膜を用いたGBR法において, コラーゲン性吸収性膜は骨原生細胞から骨芽細胞への分化促進に関与し, 基質合成の足場として機能すると推察された。

12. 突然変異型アルカリホスファターゼD289Vの細胞生物学的解析

新潟大学医歯学総合研究科
¹摂食機能再建学, ²硬組織病態生化学
 石田陽子¹, 河野正司¹, 小丸圭一²,
 伊藤将広², 天谷吉宏², 織田公光²

【目的】

低ホスファターゼ症は, 硬組織の低石灰化と血中における組織非特異型アルカリホスファターゼ活性の低下によって特徴付けられる遺伝性疾患である。本疾患は, 組織非特異型アルカリホスファターゼ(以下TNSALP)遺伝子の突然変異に起因していることが知られており, これまでに数々の突然変異が同定・報告されてきた。さらに近年, 289番目のアミノ酸であるアスパラギン酸がバリンに変異した周産期致死型症例が報告された。本研究ではこの変異タンパク質TNSALP(D289V)に注目し, その活性・細胞内動態を解析した。

【方法】

野生型および本変異型タンパク質をCOS-1細胞に発現させ, p-ニトロフェニルリン酸を基質とした活性測定, アゾ色素法による活性染色, 蛍光抗体染色, 放射性アミノ酸標識/免疫沈降法, ウエスタンブロッティング法を用いて比較検討した。

【結果】

変異型は野生型とは異なり高分子量凝集物を形成しており, 酵素活性を示さなかった。蛍光抗体染色では, 野生型が細胞表面に発現するのに対して, 変異型は大部分が小胞体に局在していた。変異型は生合成後分解されたが, その分解はプロテアソーム阻害剤であるMG132の添加により阻害され, その結果細胞内にポリユビキチン化された変異タンパク質が貯留した。これより, 本変異酵素はユビキチン/プロテアソーム系で分解を受けることが示された。

【結論】

TNSALP(D289V)は細胞内分解を受けることにより細胞表面で機能発現できず, 本変異を有するホモ型の患者は低ホスファターゼ症を発症すると考えられる。

13. 突然変異型アルカリホスファターゼ(1559delT)の細胞内での動態

新潟大学医歯学総合研究科
¹硬組織病態生化学, ²摂食機能再建学
 小丸圭一¹, 石田陽子², 河野正司²,
 天谷吉宏¹, 織田公光¹

【目的】

組織非特異的アルカリホスファターゼ(TNSALP)の遺伝子は低ホスファターゼ症の原因となる遺伝子で, 種々の変異により骨や歯などの硬組織に影響を及ぼすことが報告されている。この中で1559番目のチミン(T)の欠失変異型(1559delT)は日本人低ホスファターゼ症患者からのみ報告されているものである。本研究はこのTNSALP(1559delT)の細胞内での動態を解析した。

【方法】

野生型および本変異型酵素をin vitro translation/translocation系で解析し, またCOS-1細胞に発現後, 細胞内動態を細胞生物学的手法を用いて比較検討した。

【結果】

変異型酵素は欠失変異によるフレームシフトのため野生型に比べ80アミノ酸残基大きい分子であることが確認された。COS-1細胞においては変異酵素は活性を有していたが細胞表面には発現せず, 一部は分泌された。これは変異酵素がGPI(グリコシルホスファチジルイノシトール)で修飾されないことによる。大部分の新生変異酵素は高分子凝集体を形成し, 合成後急速に分解されたが, さらにその分解はユビキチン/プロテアソーム系によるものであった。

【結論】

TNSALP(1559delT)はフレームシフト突然変異のためGPI化されず, 大部分は小胞体内腔で凝集体を形成後プロテアソームにて分解された。

14. primary Sjogren's syndrome 患者唾液中におけるMMP-2,9およびTIMP-1,2量

新潟大学大学院医歯学総合研究科
摂食環境制御学講座

¹摂食・嚥下障害学分野, ²加齢・高齢者歯科学分野
浅妻真澄¹, 渡部 守¹, 五十嵐敦子¹, 野村修一²

【目的】

Sjogren's syndrome は外分泌腺の障害による口腔乾燥症や乾燥性角結膜炎を主徴とする全身性自己免疫疾患の一つであるが、その病因はいまだ明らかにされていない。そのような中で本疾患とプロテアーゼとの関連を示唆する報告もなされている。そこで今回、我々はprimary Sjogren's syndrome患者の唾液中における細胞外マトリックス分解酵素の一つであるmatrix metalloproteinases (MMPs) と、その阻害因子であるtissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) を測定し、これらの酵素と本疾患の病態との関連を調べることを目的とした。

【方法】

対象は、1999～2002年の間に本学医学部附属病院においてprimary Sjogren's syndrome患者と確定診断された32名(男性1名, 女性31名: 平均年齢55.3±14.4歳)と、健常者26名(男性3名, 女性23名: 平均年齢52.6±9.8歳)とした。全被験者に対しパラフィンガムによる刺激唾液を吐出法にて採取した。遠心分離して得られた上清を試料としてELISA法, sandwich-ELISA法によってMMP-2,9, TIMP-1,2量を測定した。また, zymography法, reverse zymography法によってそれぞれMMP, TIMPを同定した。各々のタンパク量, さらにMMP/TIMP比を比較し検討した。

【結果および考察】

MMP-9量は健常者群で145.87±111.65ng/ml, 患者群で213.02±151.77ng/mlと有意差をみとめた。MMP-2量は両群とも検出不可能であった。zymographyでは両群にMMP-9は認められたがMMP-2は確認できなかった。TIMP-1,2量は両群間に有意差は認められず, reverse zymographyにおいても両群でほぼ同程度の像が確認された。MMP/TIMP比においてはMMP-9/TIMP-1は健常者群で1.28±1.11, 患者群で2.60±1.18と有意差をみとめた。これらのことから, primary Sjogren's syndrome患者の唾液中MMP-9/TIMP-1は本疾患における唾液腺破壊を反映している可能性が示唆された。

15. 嚥下造影検査における被曝線量の測定

¹新潟大学医学部保健学科放射線技術科学専攻,
新潟大学大学院医歯学総合研究科

²摂食・嚥下障害学分野,

⁴顎顔面放射線学分野, ⁵加齢・高齢者歯科学分野,

³新潟大学歯学部附属病院・放射線室

長濱航永¹, 豊里 晃², 竹内由一³, 植田耕一郎²,
林 孝文⁴, 野村修一⁵

【目的】

ビデオX線透視検査は障害された器官の構造と機能を同時に評価することができるため、摂食・嚥下障害の診断には、嚥下造影検査(VF: Video-Fluorography)がゴールドスタンダードとなっている。しかし、長時間の検査や回数が多くなると、VF検査による被曝線量も大きくなる。そこで今回我々は、VF検査時の皮膚吸収線量を測定し、適切な検査時間、防護方法を検討したので報告する。

【方法】

皮膚吸収線量の測定には、TLD素子(MSO-S)を使用した。頭部ファントムに、TLD素子を3本1組で外眼角部、側頭部、甲状腺部に貼り付け、各部位における皮膚吸収線量を測定した。さらに、摂食・嚥下障害者のVF検査時に本人の同意を得て同様の測定を行った。ビデオX線透視装置の設定条件は、FSD=60cm, 管電圧55kV, Dose index 100, フレーム数は12.5フレーム/秒, パルス幅の最大値を8msに設定した。

【結果および考察】

単位時間当たりの皮膚吸収線量は、外眼角部で3.6mGy/s, 側頭部, 甲状腺部で4.3mGy/sであった。この線量で、水晶体白濁が起こるしきい線量(1Gy)を越えるまでの時間は4分30秒, 初期皮膚紅斑が起こるしきい線量(2Gy)を越えるまでの時間は7分30秒である。新潟大学歯学部附属病院では一回の検査時間はおよそ2分30秒であるため、これらの確定的影響がでる心配は少ないと考えられる。しかし確率的影響については、一回当たり200mGy程度が望ましく、一回の検査時間が45秒でこの値に達する。VF検査時の被曝線量を軽減するためには、検査時間の短縮のほか、読影可能な範囲で装置の線量を減らす、管球からの距離を離すことが有効であった。

16. 過去24年間に於ける当科口内法撮影による患者被曝の推移

1 新潟大学歯学部附属病院・放射線室，
2 新潟大学医学部保健学科・放射線技術科学専攻，
3 新潟大学大学院医歯学総合研究科・顎顔面放射線学分野
竹内 由一¹，長濱 航永²，林 孝文³

【はじめに】

我々は1979年3月より2003年4月まで口内法撮影における患者被曝線量を測定している。今回、過去24年間に於ける当科での口内法撮影による患者被曝線量の推移を検討したので報告する。

【材料と方法】

使用した歯科用X線装置は吉田社製パンパースE，シーメンス社製ヘリオデント70，同ヘリオデントMD。測定対象はMix-Dファントム，ランドファントム，成人ボランティアである。1979年3月から2003年4月にかけて行ったTLD測定（KYOKKO TLD測定システム）5回と，1999年5月の照射線量測定（電離箱式線量計CAPINTEC Model192）1回の結果を，測定値を時系列として検討し，装置の変更などの事項を加味して評価した。

【結果と考察】

上顎大白歯撮影における皮膚線量を指標とすると，フィルム変更時（ISO規格C感度からD感度へ）に半減していた。しかし現在も当科の患者被曝線量は全国歯学部附属病院のなかでは高いグループに属しており，今後も被曝軽減への努力が必要であると考えられた。