

Prostaglandin E₂はヒト破骨細胞分化を強力に阻害する

武 郁子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Prostaglandin E₂ strongly inhibits human osteoclast formation.

IKUKO TAKE

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Take I, Kobayashi Y, Yamamoto Y, Tsuboi H, Ochi T, Uematsu S, Okafuji N,
Kurihara S, Udagawa N and Takahashi N (2006) *Endocrinology* **146** : 5204-14.

【目的】

現在, Prostaglandin E₂ (PGE₂) は主要な骨吸収促進因子として考えられている. PGE₂は骨芽細胞における RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) 発現を上昇させる. さらに, PGE₂はマウス骨髄マクロファージ培養系において, 直接的に RANKL 誘導性の破骨細胞分化を促進する. 一方, ヒトにおける PGE₂の骨吸収促進作用に関する研究報告はほとんど認められない. そこで本研究において我々は, ヒト末梢血単核細胞から CD14陽性細胞を単離し, ヒト破骨細胞分化における PGE₂の作用を詳細に検討した.

【材料と方法】

ヒト CD14陽性細胞 (以下 CD14陽性細胞) は 2名の女性ボランティア (25, 28歳) および 8名の男性ボランティア (27-52歳) の末梢血から回収した. それぞれのボランティア間で破骨細胞形成に対する有意差はなかった. 単離した CD14陽性細胞を 96穴プレートに播種 (10⁵ cells/well) し, 10% FBS を含む α -MEM 培地にて, M-CSF (50 ng/ml) および RANKL (100 ng/ml) 存在下で各種試薬を添加し, 6日間培養した. 培養後, 抗ヒトロネクチンレセプター (VNR) 抗体

染色にて染色を行った. 染色された VNR 陽性細胞のうち 3核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した. マウス骨髄細胞は 5-8 週齢の ddY マウスの脛骨から採取し, 60mm ディッシュに播種し, 10% FBS を含む α -MEM 培地にて M-CSF (50 ng/ml) 存在下で培養した. 16時間後, 浮遊細胞 (血球系細胞) を回収し, 96穴プレートに播種 (10⁴ cells/well) し, M-CSF (50ng/ml), RANKL (100ng/ml) および PGE₂存在下で 7日間培養した. 培養後, TRAP 染色を行い, 染色された TRAP 陽性細胞のうち 3核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した.

【結果および考察】

ヒト CD14陽性細胞は RANKL および M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) の存在下で破骨細胞に分化する. CD14陽性細胞は 4つの PGE₂受容体のうち EP 2, EP 4 を発現しており, 一方で破骨細胞はどのサブタイプも発現が認められなかった. PGE₂および PGE₁ alcohol (EP 2/4アゴニスト) は CD14陽性細胞において cAMP の産生を促進した. マウス骨髄マクロファージ培養系とは異なり, PGE₂および PGE₁ alcohol は CD14陽性細胞培養系において,

RANKL 誘導性のヒト破骨細胞分化を抑制した。また、H 89 (PKA 阻害剤) はヒト破骨細胞分化における PGE₂ の抑制作用を阻害した。これらの結果から、ヒト破骨細胞分化における PGE₂ の抑制作用は、EP 2, EP 4 受容体を介していることが示唆された。SaOS 4/3細胞はヒト末梢血単核細胞との共存培養において、副甲状腺ホルモン (PTH) 存在下で破骨細胞を誘導する。PGE₂ は SaOS 4/3細胞と CD 14陽性細胞との共存培養系において、PTH 誘導性の破骨細胞分化を抑制し、COX-2 (cyclooxygenase-2) 阻害剤である NS 398は促進的に作用した。CD14陽性細胞とマ

ウス骨髄マクロファージを同一ディッシュ上にてお互いが接触しないようにスポットで播種し、同一の培養上清中で培養したところ、PGE₂添加により両者の破骨細胞形成が抑制された。PGE₂処理を行った CD14陽性細胞の培養上清は、CD14陽性細胞培養系のみならず、マウス骨髄マクロファージ培養系における RANKL 誘導性の破骨細胞分化も抑制した。以上の結果より、PGE₂は破骨細胞前駆細胞に作用し、何らかの因子の産生を促すことにより、ヒト破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

三叉神経運動核におけるサブスタンス P・セロトニン 共存終末の分布様相と生後変化

中村 雅明

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Colocalization of serotonin and substance P in the postnatal rat
trigeminal motor nucleus and its surroundings

MASAAKI NAKAMURA

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Nakamura M, Yasuda K, Hasumi-Nakayama Y, Sugiura M, Tomita I,
Mori R, Tanaka S and Furusawa K (2006) *Int J Devl Neuroscience* 24: 61-4.

【背景及び目的】

三叉神経運動核 (Vmo) は細胞構築によって背外側亜核 (Vmo.dl) と腹内側亜核 (Vmo.vm) に区別され、咬筋や側頭筋などの閉口筋運動ニューロン群は前者に、顎二腹筋前腹や顎舌骨筋などの開口筋運動ニューロン群は後者に局在する。また、三叉神経運動核の周囲300 µm (SVmo) には咀嚼リズム形成に関連する前運動ニューロンが存在するとされている。これらの運動ニューロンの活動は、延髄の縫線核細胞によって修飾され、その神経回路の伝達物質としてサブスタンス P とセロトニンが知られている。近年、成ラットの三叉神経運動核では、多くのサブスタンス P とセロトニンは同一の軸索終末内に共存し、咀嚼、嚥下、呼吸などの機能に関わる顎運動を制御していることが知られるようになった。しかしながら、それらの生後変化については不明な点が多く、サブスタンス P とセロトニンの共存の生理的意義については見解の一致をみていない。そこで Vmo の各領域における、サブスタンス P とセロトニン陽性終末の分布様相および生後変化につ

いて検討した。

【実験方法】

1) 免疫組織化学染色法：胎生19日、生後0, 4, 7, 10, 14, 21, 70日齢の Wistar 系ラットを用い、灌流固定後に脳幹を摘出しクライオスタットにて Vmo を含むレベルの凍結横断連続切片を作製した後、1次抗体として rabbit anti-substance P polyclonal antibody あるいは rabbit anti-serotonin polyclonal antibody を用いた一連の免疫組織化学染色を行った。光学顕微鏡下で Vmo.dl, Vmo.vm および SVmo の3領域におけるサブスタンス P とセロトニン陽性終末について、それぞれの分布密度の生後変化を検討した。

2) 二重蛍光免疫染色法：実験1と同様に凍結横断連続切片を作製し、1次抗体として goat anti-substance P polyclonal antibody と rabbit anti-serotonin polyclonal antibody, 2次抗体として donkey anti-goat IgG(H+L)-FITC と donkey anti-rabbit IgG(H+L)-Rhodamine を用いた一連の蛍光免疫組織化学染色を行った。蛍光顕微鏡

下で FITC に発色したサブスタンス P 陽性終末と, Rhodamine に発色したセロトニン陽性終末の分布や共存 (二重染色された軸索終末) について観察し, Vmo.dl, Vmo.vm および SVmo の 3 領域におけるサブスタンス P・セロトニン共存終末の生後変化について検討した。

【結果及び考察】

サブスタンス P とセロトニン陽性終末はそれぞれ 3 領域ともに, 出生後から増加し, 生後 7 日に最高値を示した後, 徐々に減少していた。また, 3 領域間の分布密度は, 胎生 19 日と生後 0 日では Vmo.vm の密度が最も高く, 以下 SVmo,

Vmo.dl の順であったのに対し, 生後 4 日以降ではすべての日齢で SVmo, Vmo.vm, Vmo.dl の順に高密度を示した。これらの結果は, 下顎運動に関わる中枢神経系には, 咀嚼機能の獲得や, 胎盤呼吸から肺呼吸への変化などの出生直後の環境に対応した生後変化がみられることを示していると考えられた。

サブスタンス P・セロトニン共存終末については, 3 領域ともすべての日齢でセロトニンを含有する終末の 89% 以上がサブスタンス P と共存していたことから, 出生前後を通じて一定の生理的役割を担っていることが示唆された。

覚醒時の噛みしめに関する臨床生理学的研究
-覚醒時噛みしめ自覚の有無における口腔顔面運動と
咬筋筋活動の特性, 臨床的要因, 精神的要因についての比較-

片瀬 (秋山) 志穂

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Electrophysiological study on daytime clenching in subjects with and without awareness of clenching habit. With additional comparisons of clinical and psychological features.

SHIHO AKIYAMA-KATASE

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

覚醒時の噛みしめ習癖 (daytime clenching) は非機能的な口腔顔面運動 (oral parafunction, parafunctional oral activity) もしくは口腔習癖 (oral habit) の一つで, 非睡眠時のブラキシズムに分類されている^{1,2)}。また, その発現率は, 一般に5~25%と報告されており, この値は被験者の自覚の有無に基づいて算出されている。顎関節症の症状を有する被験者では, これらの症状を有さない被験者と比べて, 覚醒時の噛みしめを自覚する割合が高いことが報告されており^{3,4)}, これらの研究から覚醒時の噛みしめ癖が顎関節症を引起す, または悪化させる因子の一つであると考えられてきた⁵⁾。しかし, 過去の研究において, 実験者からの指示を受けない状態で自発的に生じる口腔顔面運動を測定し, 定量評価した研究はきわめて少ない^{6,7)}。本研究では, 覚醒時に生じる自発的な口腔顔面運動と咬筋筋活動の発生様式や顎関節症の臨床徴候, 精神的要因を, 覚醒時の噛みしめ自覚の有無による被験者2群間で比較することによって覚醒時噛みしめの病態生理を解明することを目的とした。

【対象と方法】

覚醒時の噛みしめを自覚する被験者15名, 自覚しない被験者18名を用い, 30分間黙読中の咀嚼筋および前脛骨筋筋電図, 胸部呼吸運動, 体動, 喉頭運動, 嚙下音の記録を行い, 同時に音声ビデオカメラによる記録を行った。記録に基づいて同定した自発的な口腔顔面運動をイベントと定義し, 嚙下イベント, その他の機能的な口腔顔面イベント (嚙下以外の発声・あくび・ため息・深呼吸・微笑など), 口唇イベントの3種に分類して, その発生数を算出した。また安静時筋活動量の平均 + 2SD を超える咬筋バーストを検出し, それらの発生数や活動量, 持続時間を口腔顔面イベントごとに分析し, 2群間で比較した。また, 顎関節症の臨床徴候の有無や性格特性・心理状態を, それぞれ専門の質問表を用いて収集し, 2群間で比較した。

さらに, 咬筋バーストの多い群と少ない群の2群間における噛みしめ自覚率や臨床および心理的特性を比較すると共に, 臨床および心理的特性により分けられた2群間における噛みしめ自覚率や咬筋バースト数の比較を行った。それらの結果に基づいて噛みしめ自覚と被験者の臨床および心理

的特性や咬筋筋活動発生数の各諸因子間の相互関連を検討した。

【結果および考察】

噛みしめ自覚の有無による2群間において、自発的な口腔顔面イベントの発生数には有意差は認められなかった。また咬筋バーストにおいても活動量・持続時間ともに2群間において有意差は認められなかった。しかし、嚙下イベント、その他の機能的な口腔顔面イベント、および口唇イベントの3種のイベントとは関連の無い非機能的な咬筋バーストは、噛みしめ自覚群では非自覚群に比べ有意に多く発生していた。臨床的要因や精神的要因については噛みしめ自覚群は非自覚群に比べ、過去のクリック音や顎顔面の痛み疲労不快感、最大開口時の痛み、心配性を自覚する割合が有意に高かった。

また、咬筋バーストの発生数が多い被験者群と少ない被験者群の2群で覚醒時の噛みしめを自覚する割合を比較すると、咬筋バーストの発生数が多い被験者群は少ない群に比べて噛みしめの自覚率が高く、過去の起床時の顎の痛みこわばりの自覚率が有意に高かったが、心理的要因には2群間で有意差は認められなかった。

【考察】

覚醒時の噛みしめを自覚する被験者は自覚しない被験者に比べ、咬筋活動量が多いことから、これらの増加している筋活動が噛みしめの自覚に繋がっている可能性があること。増加している筋活動は顎顔面に臨床症状を生じる原因になりうること。そして、顎顔面に臨床症状を自覚することで

覚醒時の噛みしめに対する注意が高まることなどの可能性が考えられる。また、覚醒時の噛みしめ自覚には過去の臨床徴候、性格特性や咬筋筋活動の発生数が要因となっている可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Rugh JD and Robbins JW (1982) Oral habits disorders. In Ingersoll B. Behavioral Aspects in Dentistry. New York : Appleton-Century-Crofts : 179-202.
- 2) Kato T, Dal-Fabbro C and Lavigne GJ (2003) Current knowledge on awake and sleep bruxism : overview. Alpha Omegan **96** : 24-32.
- 3) Matsuka Y, Yatani H, Kuboki T and Yamashita A (1996) Temporomandibular disorders in the adult population of Okayama City, Japan. Cranio **14** : 158-62.
- 4) Huang GT, LeResche L, Critchlow CW, Martin MD and Drangsholt MT (2002) Risk factors for diagnostic subgroups of painful temporomandibular disorders (TMD). J Dent Res **81** : 284-8.
- 5) Glaros A G and Rao S M (1977) Effects of bruxism : a review of the literature. J Prosthet Dent **38** : 149-55.
- 6) Piquero k and Sakurai K (2000) A clinical diagnosis of diurnal (non-sleep) bruxism in denture wearers. J Oral Rehabil **27** : 473-82.
- 7) Kato T, Akiyama S, Kato Y, Yamashita S, Masuda Y and Morimoto T (2006) The occurrence of spontaneous functional and nonfunctional orofacial activities in subjects without pain under laboratory conditions : A descriptive study. J Orofac Pain **20** : 317-24.

咬合圧除去による歯周組織の変化 -特に加齢による比較-

安東 孝治

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Histological changes in the periodontal tissues surrounding hypofunctional teeth
-Age effects-

KOJI ANDO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

安東孝治, 石和田敏貴, 森山敬太, 影山康子, 影山 徹, 佐原紀行 (2007) 松本歯学 33 : 172-86.

【目的】

ラット臼歯を抜去や歯冠の削除などにより咬合機能を喪失させると、対合歯の歯周組織は1週間以内に機能的構造を失い、歯槽骨表面に骨の新生や歯根膜腔の狭窄などが起こることについては多くの報告がなされている。しかし、このような歯周組織の変化が加齢によりどのような影響を受けるのかを検討した研究はほとんどなされていない。そこで本研究では、10, 50, 80週齢のラットを用い、歯冠削除により咬合圧を除去した歯周組織の変化について比較観察し、加齢により歯周組織の変化がどのような影響を受けているのかについて検討した。

【材料と方法】

実験には10, 50, 80週齢のWistar雄性ラット各20匹、計60匹を用いた。各週齢ラット10匹は実験群として用い、対照群には未処置の各週齢ラット10匹を使用した。実験群の各週齢ラット10匹はケタール麻酔下で両側の上顎第1臼歯(M1)の歯冠を歯肉縁部まで削除した。術後10日目に屠殺し、下顎の非脱灰および脱灰組織標本作製

し、咬合圧を除去したM1周囲の歯周組織を観察した。実験群の10匹のラットは術後直後、5日後、屠殺12時間前の3回にテトラサイクリン(30 mg/kg)を腹腔内投与した。なお、各週齢の対照群の未処置のラット10匹にも、実験群と同様な間隔でテトラサイクリンを投与した。屠殺後、ラベリングを行った実験群と対照群の10匹については、非脱灰標本作製し、走査電顕による組成像観察およびテトラサイクリンによるラベリングを蛍光顕微鏡で観察した。残りの各10匹から脱灰標本作製し、H・E染色および酒石酸耐性酸性フォスファターゼ(TRAP)活性染色し、光学顕微鏡で観察した。

【結果】

本研究では10, 50, 80週齢ラットを用い、加齢に伴う咬合圧除去による歯周組織の組織変化の差異について比較検討し、次のような結果を得た。

1. 対照群においては、歯根膜腔の狭窄、細胞セメント質の肥厚化、固有歯槽骨の改造活性の低下など、歯周組織の加齢変化が確認できた。また、歯槽骨表面に存在する破骨細胞数は加齢に

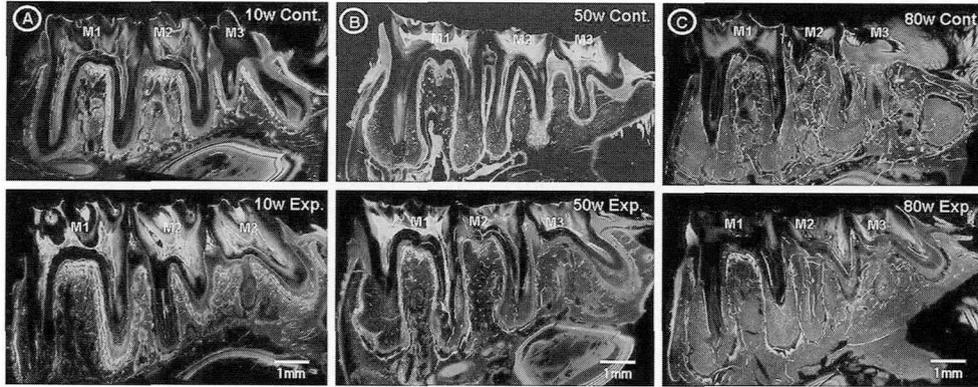


図1：各週齢ラット歯槽骨のテトラサイクリンラベリング像。上段が対照群，下段が咬合圧除去群。週齢に伴いラベリングラインの幅が減少していることが分かる。
A：10週，B：50週，C：80週

に伴い減少していた。

2. 実験群ではいずれの週齢でも，咬合圧除去後10日間で根間中隔頂と根尖の歯槽骨に新生骨の形成が認められた。しかし，骨形成量は加齢に伴い減少していた。
3. すべての週齢において，咬合圧除去後10日間にセメント質の新たな添加は認められなかった。
4. 咬合圧除去後，すべての週齢において歯根膜の著しい狭窄が認められた。
5. 歯槽骨表面の破骨細胞は減少し，80週齢の実験群ではほとんど観察されなかった。

【考察】

加齢に伴うラット歯周組織の変化については，わずかな報告があるだけである^{1,2)}。さらに，咬合圧除去に伴う歯周組織の変化が加齢によりどのような影響をうけているか検討した報告はほとんどない。本研究の結果は，咬合圧除去に伴う歯周組織の変化が，加齢変化と関連性を持っていることを示唆している。

【文献】

- 1) 上野和之，亀山洋一郎（1973）成熟ラット臼歯の生理的な動きと歯周組織の増令的变化について。日歯周誌 **15**：238-47.
- 2) Kindlova M, Merklas L, Marikova Z and Broukal Z (1981) Age-dependant changes in the rat periodontium. J Peiodontal Res **16**：497-503.

長頭型と非長頭を伴う反対咬合患者の長期治療効果
-オトガイ帽装置を用いて-

飯田 吉郎

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Chin cup treatment outcomes in skeletal Class III dolicho
-versus nondolichofacial patients.

YOSHIRO IIDA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Iida Y, Deguchi T Sr and Kageyama T (2005) *Angle Orthod* 75 : 502-9.

【目的】

本研究の目的は長顔型 (long face type) と非長顔型 (mesial face type) の2つの異なった歯・顎顔面形態の異常を示す反対咬合患者に対してオトガイ帽装置を使用し, 2つの症例群に適した整形力の方向を与え, その長期的治療の効果を検索することである。

【材料と方法】

資料は反対咬合を示す Angle Class III 不正咬合をオトガイ帽装置にて治療した男子33症例, 女子32症例で, 治療前 (T0; mean of 5y7m-8y7m), 動的治療終了時 (T1; 12y7m-13y4m), 保定終了時 (T2; 17y6m-18y2m) で口腔模型, 顔面・口腔写真, 側面セファログラムがととのっており, 満足な結果を得た症例を抽出した。各男女のセファロ分析は mandibular plane angle と the angle of mandible の計測値から男子資料33症例の17症例を長顔群に16症例を非長顔群に, 女子資料32症例は長顔群と非長顔群ともに16症例に分類し, 治療前 (T0), 治療後 (T1) および保定後 (T2) のセファロ分析値を算出して, 各段階で

の2群間の有意差検定を行った。

【結果】

両群の治療前のセファロ分析項目では, 1) 上下顎骨の前後関係を示す SNA, SNB, SNP 角の各項目に有意差 ($p < 0.01, 0.001$) を示した。垂直方向の関係を示す下顎下縁平面角 (mandibular plane angle), Y 軸角 (NSGn) 値にも有意差を認めた ($p < 0.001$)。2) 両群で, 上下顎骨の前後異常を示す ANB 角 ($0.9^\circ < \text{mean} < 1.4^\circ$) および Wits appraisal 値 ($-6.1 \text{ mm} < \text{mean} < -5.6 \text{ mm}$) は skeletal Class 3 の特徴を示した。3) 両群で治療前に有意差を示した顎顔面形態を維持しながら形態異常の改善が見られた。

【考察】

以上の結果より 1) 長顔型群と非長顔型群の間に, 下顎骨のみならず前頭蓋, 上顎骨部にも形態の相違が認められた。2) 両群の症例で, アンゲル III 級の形態異常の著名な改善が見られ, 患者の協力を得て後戻りを最小に抑えることが出来た。3) 両群の治療後の顎顔面形態は治療前の顎



	Number (Mean age at T0)	Mean age at T1	Mean age at T2	Mand. PI to SN (degree)	Go Angle (degree)
Male Dolichofacial	16 (8.7 ±1.6)	13.3±1.3	18.1 ±0.7	>39	>132
Male Non-dolichofacial	17 (5.7 ±2.4)	13.4 ±0.7	18.1 ±1.0	>39	>132
Female Dolichofacial	16 (8.1 ±1.2)	12.8 ±0.9	17.6±1.9	>39	>130
Female Non-dolichofacial	16 (7.8 ±1.3)	12.7 ±1.1	18.2±2.1	>39	>130

Fig.1 : オトガイ帽装置とその整形力の方向 (A : Vertical pull B : Occipital pull) および本研究における長顔型 (long face type) と非長顔型 (mesial face type) の2つの異なる歯・顎顔面形態の分類

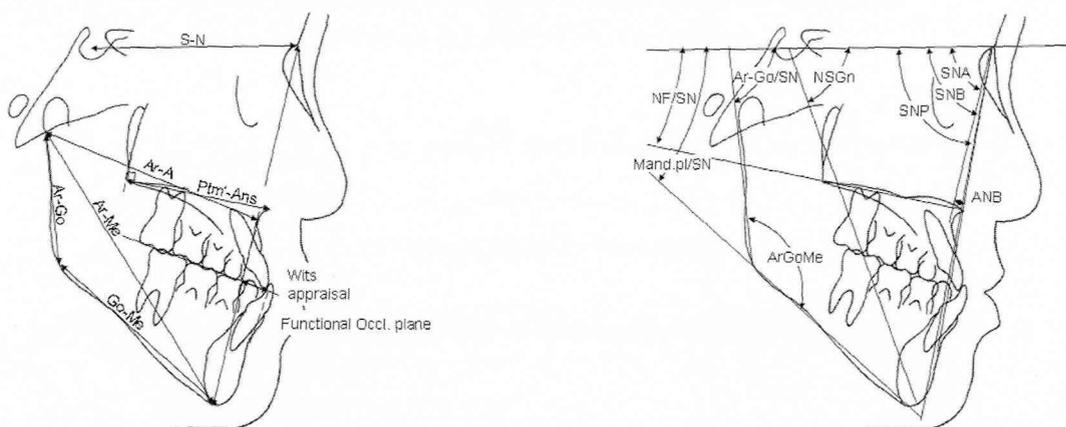


Fig. 2 : 本研究に使用したセファロ分析における角度計測および線分計測

Table 1 : 治療前 (T0), 治療後 (T1) および保定後 (T2) におけるセファロ分析値 (男子)

		Dolicho Group (N=16)								Non-dolicho Group (N=17)											
		T0		∠(T0-T1)		T1		∠(T1-T2)		T2		T0		∠(T0-T1)		T1		∠(T1-T2)		T2	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Cranial Base & Maxilla</i>																					
Antero-Posterior	S-N	64.0	2.8	3.6*	3.2	67.5*	3.6	3.2	2.3	70.8	3.0	64.3	3.1	5.7*	2.4	70.0*	3.3	2.7	2.2	72.7	2.8
	Ptm'-ANS	47.0	2.3	5.4	2.5	52.3	3.5	1.8	2.7	54.1	3.4	46.8	2.0	4.7	2.3	51.5	2.4	2.8	3.0	54.3	2.7
	Ar-A	77.7	4.1	8.4	3.5	86.1	5.5	3.9	2.3	90.0	5.2	79.6	3.6	8.2	3.1	87.7	3.2	4.0	3.2	91.7	4.0
	SNA	79.5	2.9	1.5	2.7	81.0	2.5	0.1	2.1	81.0	2.2	80.8	3.8	-0.5	3.3	80.3	2.6	0.4	2.6	80.7	3.0
Vertical	NF/SN	10.8	3.1	1.2	2.8	12.0	3.4	-0.5	2.6	11.4	2.1	9.3	2.6	1.3	2.2	10.6	2.3	-0.2	2.1	10.4	3.2
	<i>Mandible</i>																				
Antero-Posterior	SNB	78.1	2.5	-0.1	2.2	78.0	2.4	0.9	2.0	78.8	2.4	79.9	4.1	-1.6	4.6	78.3	3.1	0.1	3.2	78.4	3.0
	SNP	77.0	2.4	0.5	2.2	77.5	2.4	1.5	2.0	79.0	2.5	79.1	4.1	-1.4	3.1	77.8	2.8	1.4	2.1	79.1	3.1
Vertical	N-Me	116.7	5.9	13.2	7.4	129.9	8.6	8.8	5.8	138.7	7.2	113.3	4.3	15.1	5.0	128.4	5.2	6.8	5.5	135.2	5.3
	Mand p./SN	43.3***	3.4	-1.7	2.7	41.6***	3.8	-2.5	2.7	39.1***	3.9	37.0***	3.3	-0.7	2.8	36.3***	3.6	-2.3	2.0	34.0***	4.1
	NSGn	72.7*	2.3	1.1	1.7	73.8	2.3	-0.9	1.8	72.9	2.4	69.9*	3.5	2.1	2.7	72.1	3.0	-0.8	2.0	71.3	3.2
	Ar-Go/SN	87.3	4.6	2.9	3.1	90.1	4.6	-0.5	3.3	89.6	4.6	86.4	5.4	4.2	3.9	90.6	5.4	-1.0	2.1	89.5	5.4
Mandible	Ar-Me	97.1	6.7	10.4	8.4	107.5	9.1	9.8	4.1	117.2	8.4	98.1	5.9	10.0	4.5	108.0	4.4	7.9	4.1	115.9	4.9
	Ar-Go	38.3*	3.7	5.5	4.5	43.8	5.8	7.4	3.7	51.1	5.9	40.8*	3.0	5.2	2.5	46.0	3.0	6.5	3.2	52.5	3.8
	Go-Me	65.5	4.8	7.4	5.3	72.9	5.2	4.6	3.0	77.5	5.0	66.0	4.1	7.8	3.4	73.8	3.8	3.1	2.6	77.0	3.7
	ArGoMe	137.0**	4.4	-4.2	3.4	132.8**	5.1	-2.0	3.9	130.8*	6.4	132.1**	4.1	-4.7	3.4	127.4**	4.6	-1.3	2.5	126.0*	4.8
<i>Intermaxillary Relationship</i>																					
Antero-Posterior	ANB	1.4	2.6	1.6	2.7	3.0	1.5	-0.8	1.1	2.2	1.9	0.9	1.9	1.7	1.3	2.6	1.9	-0.3	1.4	2.3	1.4
	Wits appraisal	-7.3	3.2	4.9	3.3	-2.3	3.0	-0.1	2.2	-2.4	2.8	-5.6	2.2	4.4	1.9	-1.2	2.4	0.4	2.7	-0.8	2.4

The symbols mean the significant level: p<0.05(*), p<0.01(**) and p<0.001(***)

Table 2 : 治療前 (T0), 治療後 (T1) および保定後 (T2) におけるセファロ分析値 (女子)

		Dolicho Group (N=16)								Non-dolicho Group (N=16)											
		T0		Δ(T0-T1)		T1		Δ(T1-T2)		T2		T0		Δ(T0-T1)		T1		Δ(T1-T2)		T2	
		Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
<i>Cranial Base & Maxilla</i>																					
Antero-Posterior	S-N	64.5*	1.8	3.1**	1.6	67.7	2.3	0.9	1.3	68.6	2.5	62.5*	3.2	5.2**	2.2	67.7	2.7	0.8	1.0	68.5	2.7
	Ptm'-ANS	46.9	2.4	3.2	2.6	50.1	2.0	0.6*	1.2	50.7*	2.3	46.8	3.3	4.1	2.7	50.8	2.1	2.1*	2.1	53.0*	2.3
	Ar-A	76.8	2.0	5.1*	2.3	82.0*	2.5	1.1	1.3	83.1**	2.8	77.8	4.6	7.3*	2.6	85.1*	4.0	1.4	1.4	86.5**	3.9
	SNA	78.3***	2.1	0.9*	1.9	79.2	2.9	-0.7	1.4	78.6**	2.7	82.4***	3.6	-1.1*	3.1	81.3	3.1	0.2	1.5	81.5**	2.8
Vertical	NF/SN	10.3	2.4	-0.6	2.3	9.6	3.3	1.1	1.5	10.7	2.9	9.3	3.9	0.6	2.6	9.8	3.7	0.2	1.1	10.1	3.5
<i>Mandible</i>																					
Antero-Posterior	SNB	76.9***	2.7	-0.6	2.5	76.4*	3.0	-0.3*	1.6	76.0**	3.2	81.1***	3.5	-2.4	3.0	78.8*	2.6	0.7*	1.3	79.5**	2.5
	SNP	73.6**	2.6	0.1	2.6	76.4*	2.8	-0.2**	1.3	76.3***	3.0	80.3**	3.8	-1.6	3.0	78.8*	2.8	1.3**	1.6	30.0***	2.7
Vertical	N-Me	113.2*	4.8	11.2	5.7	124.4	5.5	5.1	3.9	129.5	4.5	108.6*	6.8	13.4	5.2	122.0	5.9	3.9	3.9	125.9	6.1
	Mand p./SN	43.1***	3.4	-0.9	2.2	42.2***	4.2	0.7**	1.4	42.9***	4.4	35.6***	3.2	-0.3	2.8	35.3***	3.9	-1.3**	2.0	34.0***	4.6
	NSGn	72.0***	2.1	1.3	2.0	73.3**	2.6	0.9**	1.2	74.2***	2.8	68.5***	3.0	2.1	2.5	70.7**	2.5	-0.5**	1.4	70.1***	2.4
	Ar-Go/SN	86.8	3.1	3.2	3.2	90.1	3.6	1.6	2.7	91.7*	3.5	86.3	5.0	3.1	4.4	89.4	4.5	-0.3	2.7	89.2*	3.3
Mandible	Ar-Me	95.9	3.8	7.6	5.4	103.4	4.4	4.0	3.2	107.5	3.3	95.6	5.5	9.6	3.6	105.2	4.0	5.0	3.1	110.2	4.5
	Ar-Go	37.6	3.4	3.9	3.6	41.5**	3.4	2.6	2.7	44.1**	3.6	39.8	3.7	5.3	2.5	45.1**	3.7	3.7	2.5	48.7**	4.2
	Go-Me	64.9	2.9	5.5	2.9	70.5	3.3	2.2	2.6	72.7	3.5	64.8	3.3	6.9	2.5	71.6	3.7	2.5	2.4	74.1	3.6
	ArGoMe	137.3**	4.6	-3.7	2.6	133.5**	4.5	-1.0	2.4	132.5**	4.5	131.0**	4.6	-3.4	3.3	127.6**	5.0	-1.0	2.4	126.6**	5.1
<i>Intermaxillary Relationship</i>																					
Antero-Posterior	ANB	1.3	2.2	1.5	1.7	2.8	1.3	-0.3	1.0	2.5	1.0	1.3	1.9	1.3	1.4	2.6	1.7	-0.5	0.9	2.0	1.4
	Wits appraisal	-6.0	2.3	4.0	2.0	-2.0	1.9	0.5*	1.2	-1.5*	2.5	-6.1	2.4	3.5	2.6	-2.6	1.9	-0.7*	1.3	-3.3*	1.8

The symbols mean the significant level: p<0.05(*), p<0.01(**) and p<0.001(***)

顔面形態の特徴を保ちながら治療効果を示した。

【文献】

Nakamura K, Nagata N, Iida Y, Iida Y, Kageyama T and Ishii N (2003) Difference in treatment outcome of British and Japanese surgical Class III patients associated with mandibular setback. 松本歯学 29 : 288-93.

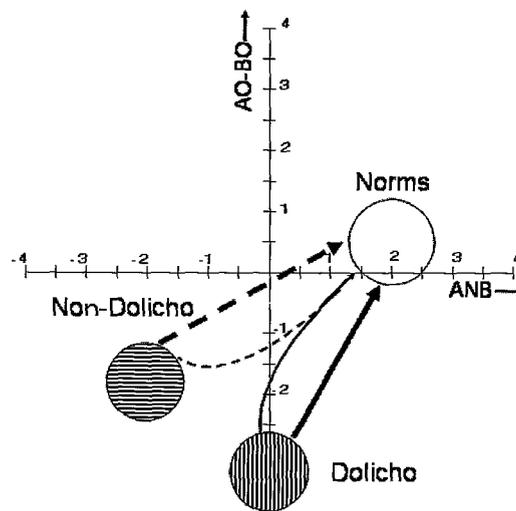


Fig.3 : 長期治療効果は治療前の顎・顔面形態の特徴を保ちながら, 正常な形態獲得への方向性を示す

脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収と炎症性サイトカイン

石和田敏貴

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Inflammatory cytokines and internal resorption of human deciduous teeth prior to shedding

TOSHIKI ISHIWADA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

石和田敏貴, 安東孝治, 森山敬太, 影山康子, 影山 徹, 佐原紀行 (2007) 松本歯学 **33** : 187-99.

【目的】

本研究では、脱落前のヒト乳歯の内部吸収を TRAP 陽性細胞を指標にして内部吸収段階を3段階にわけ、それぞれの段階での IL-1 α , IL-6, TNF- α などの炎症性サイトカイン陽性細胞の分布変化を免疫組織化学的に解析し、内部吸収の進行過程と炎症性サイトカインの関連性について検討した。

【材料と方法】

材料には動揺を示す歯根全体がほぼ吸収された齶蝕のない健全なヒト乳歯56例を用いた。今回観察に用いた歯種の内分けは、前歯12例、犬歯18例、臼歯26例である。

抜歯後、乳歯は直ちに4%パラホルムアルデハイド溶液に浸漬し、20時間固定した。固定後、10% EDTA 溶液中で約5週間脱灰した。脱灰した乳歯は唇舌的あるいは近遠心的に2分したのち、それぞれをマイクロスライサーで100 μ m の厚さで薄切した。

始めにすべての試料の内部吸収の進行状態を観察するため、アゾ色素法により TRAP 活性染色を行った。TRAP 活性染色の観察結果からそれぞれの試料を3つの内部吸収の段階に大別した。次に、マウス抗ヒト-IL-1 α , IL-6, TNF- α を

1次抗体として蛍光抗体法で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。また一部の試料については、各炎症性サイトカイン陽性細胞の細胞を同定するため、共焦点レーザー顕微鏡観察後、ペルオキシダーゼ-アンチペルオキシダーゼ-コンプレクス (PAP) 溶液中でさらに免疫染色し、エポソ包埋、超薄切し、透過電子顕微鏡で観察した。

【結果】

脱落前のヒト乳歯の内部吸収を観察し、内部吸収に関与する破歯細胞の分化過程と炎症性サイトカイン産生細胞の動態について免疫組織化学的手法を用い検討し、以下のような結果を得た。

1. 内部吸収が開始されていない乳歯の歯髄内には、炎症性サイトカイン陽性細胞はほとんど観察されなかった。
2. 破歯細胞による吸収が最初に認められる歯冠底部の象牙質表面付近には、吸収前に IL-1 α や TNF- α 陽性細胞が多数観察された。しかし、IL-6 陽性細胞は歯髄中央部に多かった (図1A)。
3. 内部吸収の進行に伴い吸収部位に隣接した IL-1 α (図1B), TNF- α (図1C) や IL-6 (図1D) 陽性細胞が観察された。また、歯髄

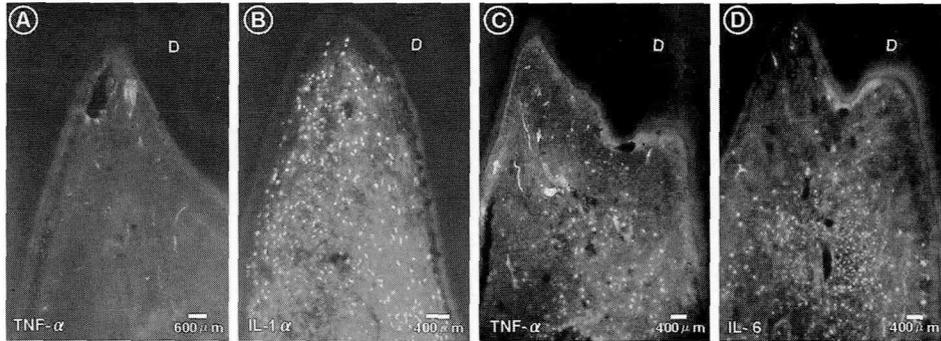


図1：歯髄内の各サイトカインの分布を示す吸収初期の歯髄内には陽性細胞はほとんど見られない (A)。内部吸収が開始される直前になると、歯髄内にはIL-1 α (B), TNF- α (C), IL-6 (D) などの陽性細胞が多数侵入する。

中央部でも炎症性サイトカイン陽性細胞が増加し、一部ではTRAP陽性の単核細胞と隣接して密接な関係をもっていた。

4. 一部の吸収窩表面とそれに隣接した単核細胞がIL-6抗体で反応を示した。IL-6は破歯細胞の分化形成に関与するだけでなく、吸収窩表面の硬組織による修復過程にも関与している可能性もあった。

【考察】

IL-1 α , IL-6やTNF- α などの炎症性サイトカインは脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収過程において、破歯細胞やその前駆細胞の分化、誘導あるいは活性化に密接に関与している可能性が示唆された。

ヒト歯髄細胞および歯根膜細胞は ヒト破骨細胞（破歯細胞）の分化を促進する

内山真紀子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

Human dental pulp cells and periodontal ligament cells support osteoclast formation
from human CD 14-positive cells

MAKIKO UCHIYAMA

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

歯根の外部吸収や歯髄における内部吸収は、破歯細胞がその中心的役割を担うとされている。破歯細胞と破骨細胞が具備する特異形質は同一であり、細胞の分化誘導機構には違いはないと考えられている。また破骨細胞の分化とその骨吸収機構には、各種骨吸収促進因子の刺激によって、骨芽細胞または骨髄間質細胞の細胞膜表面に発現誘導される破骨細胞分化因子（RANKL）が必須であることが明らかとなっている¹⁻³⁾。そこで我々は、ヒト由来の歯髄および歯根膜細胞を用いて破骨細胞（破歯細胞）の分化・誘導に、歯根膜細胞や歯髄細胞由来の間質細胞が関与しているのか否かを明らかにすることを目的に、培養系を用いて実験を行い検討した。

【試料及び方法】

ヒト健全上顎第3大臼歯を抜去し、ハンマーにて破砕すると同時に歯髄細胞および歯根膜細胞を採取し、コラゲナーゼ酵素処理を行い、それぞれの細胞群を調製した。こうして得た歯髄細胞と歯根膜細胞膜をそれぞれ48穴プレートに播種し、10% FBSを含む α -MEM培地にて、1日間培養した。次に4名のボランティア由来の末梢血

から単核細胞群を比重遠心分離法を用いて調整し、末梢血単核細胞から、MACS マイクロビーズシステムを用いることにより、純化したCD 14陽性細胞を単離し、歯髄細胞、歯根膜細胞上に播種し、各種試薬（OPG, PGE₂, RANKL, M-CSF）を添加し、14日間共存培養を行った。その後、抗ヒトロネクチンレセプター（VNR）抗体を用い、VNR陽性細胞のうち3核以上の多核細胞を破骨細胞として計測した。

【結果と考察】

(1) CD 14陽性細胞、歯髄細胞、歯根膜細胞、いずれの単独培養において、VNR陽性細胞は全く認められなかったが、CD 14陽性細胞を歯髄細胞または歯根膜細胞と共存培養することにより、VNR陽性の多核破骨細胞の形成が認められた。

(2) 共存培養系で形成されたVNR陽性多核破骨細胞の形成は、RANKLのデコイ受容体であるオステオプロテゲリン（OPG）の添加によってほぼ完全に抑制された。RANKLとM-CSFによって誘導されるヒト破骨細胞分化を強く抑制するPGE₂をこれらの共存培養系に添加すると、VNR陽性多核破骨細胞の形成を強く抑制した。

(3) 歯根膜細胞と歯髄細胞からmRNAを調製

し、PCR法にて破骨細胞分化因子 (RANKL) の発現を検討したところ、歯髄細胞においてのみ RANKL mRNA の発現が認められた。

【結論】

以上の実験結果より、歯髄細胞は RANKL シグナルを介して、ヒト破骨細胞を誘導・活性化することが示された。一方、歯根膜細胞は CD 14陽性細胞との共存培養の際において RANKL シグナルを介して、ヒト破骨細胞を誘導・活性化することが示された。今後、歯根吸収や内部吸収の際に出現する破骨細胞の分化における歯髄細胞や歯根

膜細胞の生理的役割を明らかにするために、より詳細に検討を行っていく予定である。

【文献】

- 1) 小林泰浩, 宇田川信之, 高橋直之 (2003) 骨吸収調節機構, 最新医学 **58**: 2631-9.
- 2) 高橋直之, 宇田川信之, 須田立雄 (1999) 破骨細胞の分化と機能を調節する新規の TNF 様因子 (破骨細胞分化因子) の役割, 生化学 **71**: 241-53.
- 3) 宇田川信之, 中村美どり, 高橋直之 (2004) 破骨細胞分化因子 RANKL, 日本臨床 **62**: 97-101.

精神鎮静法における鎮静レベルの客観的評価法
-PAMR の変化による評価-

大河 和子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Evaluation of conscious sedation
-Application of post auricular muscle response (PAMR)-

KAZUKO OKAWA

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

大河和子 (2007) 松本歯学 33 : 281-90.

【緒言】

後耳介筋 (post auricular muscle) は耳介の運動に参与する筋であるが、ヒトでは痕跡的でその作用はほとんど失われている。しかし近年、後耳介筋反射 (post auricular muscle response, PAMR) は聴性誘発反応の中潜時反応 (middle latency response, MLR) を測定する時にしばしば現れる筋原性の反応波として注目され、その性質が検討された。これまで PAMR は、睡眠により振幅が減少することが知られていたが、本研究では、PAMR が覚醒時の笑気や鎮静薬の鎮静作用にも振幅が変化することに注目し、臨床応用を考えた。

歯科臨床では精神鎮静法が、快適で円滑な歯科治療を提供できるとともに、脳血管障害、循環器疾患の合併症発症予防に有用であり繁用される。精神鎮静法の至適鎮静レベルの判定は、バイタルサインにより行われているが、薬剤効果に個人差のあることをよく経験する。

本研究では、笑気やミダゾラム (ベンゾジアゼピン系鎮静薬) が PAMR に対し、どのように影響するのかを明らかにするとともに、PAMR が

精神鎮静法の鎮静度モニタとなり得るかどうかの検討を行った。

【対象と方法】

対象は、手術時に精神鎮静法の適応とした ASA 分類 1 度の成人で、研究目的、検査内容を説明し、インフォームドコンセントを得た笑気吸入鎮静法 10 名、静脈内鎮静法 14 名とした。歯科臨床で繁用している笑気吸入鎮静法、およびミダゾラム静脈内投与による精神鎮静法での PAMR 変化と笑気吸入濃度、血漿ミダゾラム濃度および臨床的至適鎮静レベルとの関連を検索した。PAMR 波形の誘出にはシグナルプロセッサ (7S 12, 日本電気三栄製, 日本) を用いて、音刺激および加算平均法により行った。

【結果】

1. 笑気吸入濃度と PAMR 変化

PAMR の振幅変化は対照 (純酸素吸入時) に比し、笑気吸入濃度 10% では増加したが、20% および 30% では有意に減少した。PAMR 潜時は対照値に比し、30% 笑気吸入時において N 波が有

意に延長した。

2. 血漿ミダゾラム濃度とPAMR変化

- 1) ミダゾラム投与量は、レベル1では0.02 mg/kg, レベル2における総投与量は 0.04 ± 0.00 mg/kg, 臨床的至適鎮静であるレベル3では 0.1 ± 0.01 mg/kgであった。血漿ミダゾラム濃度の上昇につれPAMR振幅は有意に減少した。
- 2) 対照値のPAMR潜時は、症例により異なり平均 12.3 ± 0.7 msecであった。
- 3) レベル3における血漿ミダゾラム濃度とPAMR振幅に相関関係は認められなかった。

【考察】

聴性誘発反応のうち、誘出が比較的容易で再現性に富む後耳介筋反射 (PAMR) の変化, 特に振幅変化と臨床的至適鎮静レベルとの関連性に着目し, 客観的な鎮静レベルモニタとしての有用性を検討して次の結果を得た。

1. PAMRの振幅について

笑気濃度30%時にはPAMR振幅は減少した。

ミダゾラム静脈内鎮静法における臨床的至適鎮静レベルでのPAMRの振幅は, 減少した。また, 臨床的至適鎮静レベルでのPAMRの振幅減少と血漿ミダゾラム濃度には相関関係は認めなかった。

2. PAMRの潜時について

笑気濃度30%時のN波は, 対照値に比し有意に延長した。

ミダゾラム静脈内鎮静法における, 臨床的至適鎮静レベルでのN波, およびP波の潜時は, 対照値に比し有意に延長し, ピーク間潜時も対照値に比し有意に延長した。

3. 睡眠に陥る深度の鎮静ではPAMR波形は消失した。

以上の結果より, PAMRは精神鎮静法の至適鎮静レベル判定に有用であり, 特に薬剤効果に個体差の多い有病者や高齢者の精神鎮静法のモニタとして, 有用性が高いと思われる。

ダウン症候群における歯周疾患発症関連遺伝子の検索

大森由里子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

Analysis of mutations of inflammatory cytokine, Toll-like receptor and β 2-integrin genes in periodontitis in Down syndrome patients

YURIKO OOMORI

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Oomori Y, Imamura Y, Fujigaki Y, Hosaka K, Miyazawa H, Kasahara H and Wang PL (2007)

Pediatric Dental Journal 17 : 19-26.

【目的】

ダウン症候群（以下ダウン症）は21番染色体トリソミーによる染色体異常で、極めて特異な身体的特徴や精神遅滞を伴う¹⁾。また、呼吸器感染症、慢性肝炎、白血病などの発症頻度が高く、免疫機能低下が示唆されている。口腔内では顎骨、歯牙の形態異常や若年期から急速に増悪する歯周疾患が見られる²⁾。これは精神遅滞などによる口腔内清掃不良に加え、免疫機能（感染抵抗性）低下が一因と考えられる。ダウン症の歯周疾患罹患率は、同程度の知的障害と比べ高いことが示唆されている。本研究では、免疫応答の一連の情報伝達経路に関わる Interleukin (IL)-1 A, IL-1 B, Toll-like receptor (TLR) 2, TLR 4 及び細胞接着分子 β 2-インテグリンの各遺伝子について一塩基多型 (Single nucleotide polymorphisms : SNPs) 解析を行い、ダウン症の歯周疾患発症・進行に関わる遺伝的要因の検索を目的とした。

【材料と方法】

被験者は標準型21番染色体トリソミーと診断されたダウン症患者34名、ダウン症でない健常者30名とした。健常者で歯周疾患非罹患患者以外は、松

本歯科大学病院外来受診或いは施設出張診療による治療管理された者とした。本学倫理委員会指針に従い、インフォームドコンセント取得後、診査と細胞の採取を行った。歯周疾患の評価基準は世界保健機関の Community Periodontal Index (CPI) を用い、歯肉からの出血 (bleeding on probing : BOP) (+), 歯周ポケットの深さ (probing depth : PD) 4 mm 以上を歯周疾患罹患患者とし、BOP (-), PD 4 mm 未満を歯周疾患非罹患患者 (コントロール) とした。歯ブラシにより被験者舌細胞を回収し、ゲノム DNA を抽出後、polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP) 解析を行った。

【結果】

各候補遺伝子の SNPs 発生率は、IL-1 A : ダウン症コントロール群で1例 (8.33%), 疾患群で3例 (13.64%), 健常者コントロール群で2例 (20.00%), 疾患群で3例 (15.00%), IL-1 B : ダウン症コントロール・疾患群共に0例, 健常者コントロールで1例であった。また、TLR 2, TLR 4 及び β 2-インテグリンは、全てにおいて

変異が確認されなかった。

【考察】

本研究の候補遺伝子 IL-1 と TLR は、ダウン症発症の原因とされる21番染色体上に存在しないが、歯周疾患原因菌由来リポポリサッカライドやペプチドグリカンによる免疫細胞応答に関わる細胞性因子である。一方、 β 2-インテグリンは21番染色体上にあり、白血球に特異的な細胞接着分子である。この異常は白血球のローリングを低下させ、細胞接着不全を起こすことが示唆されている。本研究では、健常者とダウン症患者間並びにそれぞれのコントロール群と疾患群間において、これら遺伝子の SNPs と歯周疾患間には相関性が無い結果となった。本研究の被験者数は少なかつたため、これを増やすことで統計学的信頼性の高

いデータを得る必要がある。ダウン症患者における歯牙喪失の最大原因は歯周疾患であるため、早期の診断・予防を念頭に置いた適切な個人指導を行うことが重要である。本研究では決定付ける標的遺伝子の SNPs を見出すことは出来なかったが、仮に歯周疾患関連遺伝子が判明した場合、これを指標とした早期診断が可能となる。また、歯周疾患の予防や治療を確立する上で重要な要素となることが予想される。

【文献】

- 1) Lee LG and Jackson JF (1972) Diagnosis of Down's syndrome : clinical vs. laboratory. Clin Pediatr (Phila) 11 : 353-6.
- 2) Desai SS (1997) Down syndrome : A reviews of the literature. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 84 : 279-85.

歯肉上皮の異型変化によるサイトケラチンの異常発現

落合 隆永

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Abnormal expression of cytokeratin due to dysplastic transformation of gingival epithelium

TAKANAGA OCHIAI

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

口腔粘膜前癌病変の病理診断は苦慮する症例が多く、客観的診断基準は確立されていない。上皮組織に存在する cytokeratin (以下 CK) は悪性化で変化することが知られるが、口腔上皮の部位特異性を考慮した報告は少なく、歯肉に限定した報告はない。そこで歯肉上皮の悪性化を客観的に診断するために、歯肉上皮と異型上皮の CK 発現を免疫組織学的に検討した。

【材料と方法】

対照群は成人性歯周炎の初期治療後に歯周外科処置で採取した組織で、異型を欠き炎症の軽微な外縁上皮 (80例) を用いた。異型上皮群 (22例) は軽度上皮異形成症を軽度異型上皮群 (14例)、中等度上皮異形成症、重度上皮異形成症及び上皮内癌を重度異型上皮群 (8例) とした。対照群はティッシュアレイヤーで2~3mm大の組織アレイを作成し、異型上皮群は検体毎に薄切した。各種 CK を1次抗体とする免疫染色を通法に従って行った。統計解析は対照群と異型上皮群、対照群と軽度異型上皮群及び重度異型上皮群間で χ^2 検定を行い $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果と考察】

対照群の CK 4, CK 7, CK 8, CK 18および

CK 20は全例陰性だった。CK 5とCK 14は全例全層に発現した。CK 16は全例で傍基底細胞から表層に発現した。CK 1は94%で傍基底細胞から表層細胞に発現した。CK 10は41%で有棘細胞から角化細胞に発現したが、斑状や全層性に陰性部位が混在した。CK 15は15%で基底細胞に発現した。CK 13は21%で傍基底細胞から表層細胞に発現した。CK 17は45%で中層に発現した。CK 19は38%で基底細胞に発現した。

異型上皮群の CK 7, CK 18及びCK 20は全例陰性だった。CK 5とCK 14は全例全層に発現した。CK 16は95%で傍基底細胞から表層細胞で発現した。CK 1は全例で中層細胞から角化細胞で発現したが、67%で傍基底細胞から表層細胞に陰性細胞がみられた。CK 10は77%で傍基底細胞から表層細胞に発現したが、斑状や全層性に陰性部位がみられた。CK 4は23%で有棘細胞から表層細胞に発現した。CK 13は77%で傍基底細胞から表層細胞に発現した。CK 15は55%で基底細胞に発現した。CK 17は86%で傍基底層から表層細胞で発現し、角化異常細胞に陽性だった。CK 19は45%で基底細胞から表層細胞に発現した。CK 8は32%で全層に発現した。

統計解析の結果、対照群と異型上皮群間、対照群と軽度異型上皮群及び重度異型上皮群間の CK 4, CK 8, CK 10, CK 13, CK 15, CK 17が有意

差を示した。

異型上皮群でCK1は散在性に陰性細胞がみられ、CK10は対照群と異型上皮群共に陰性細胞がみられた。通常角化重層上皮に局在するCK1とCK10の陰性化は角化重層上皮の性格を失った上皮への脱分化と考えられた。しかしCK10の対照群での発現消失は炎症性変化でもみられたので、脱分化以外の原因も考えられる。CK4は対照群で陰性だが、異型上皮群は表層細胞に発現した。CK13は異型上皮群の傍基底細胞から表層細胞で発現が増加した。CK17は傍基底細胞から表層細

胞で、CK19は基底細胞から表層細胞で異所性に発現した。CK8は異型上皮群で全層に発現した。非角化重層上皮や単純上皮に存在するCK4、CK8、CK13、CK17およびCK19の発現は脱分化に伴う異所性発現と考えられた。

歯肉ではCK1の発現減少やCK4、CK8、CK13、CK17およびCK19の異所性発現が重層扁平上皮の分化異常の客観的指標となり、形態学的に判定困難な異型上皮の診断に有用な情報をもたらすことが示唆された。

口腔乾燥症に対する漢方薬の効果 -臨床評価と漢方薬の作用に関する検討-

小野 裕輔

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Effect of Chinese herbal medicine in patients with xerostomia -Clinical evaluation and pharmacologic effect of Chinese herbal medicine-

YUSUKE ONO

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

口腔乾燥症は、唾液腺機能低下、自己免疫疾患、薬物投与など様々な要因で発症する疾患で増加傾向にある。治療には塩酸セビメリン、漢方薬などが適用されているものの、漢方薬の唾液分泌機構への作用機序は明らかにされていない。

近年、水分泌膜蛋白（アクアポリン AQP）が唾液腺に分布していることが明らかとなり、唾液分泌と AQP の関係が注目されている。そこで本研究では漢方薬の臨床効果とその作用機序を明らかにすることを目的として、漢方薬の臨床効果を唾液分泌量とレーティングスケールで評価するとともに、正常唾液腺組織と耳下腺由来 HSY 細胞を用いて AQP の発現を検討した。

【対象と方法】

1. 口腔乾燥症に対する各種薬剤の臨床効果

1) 被験者は男性25名、女性139名、平均年齢65.6歳の164名を対象とした。

2) 診査項目：問診に加え粘膜保湿度、ガム試験、Saxon テスト、Schirmer 試験、蛍光色素試験、血液一般、血液生化学検査、血清免疫学検査、病理組織学検査（口唇腺）、唾液腺造影、唾液腺シンチグラフィを行った。

3) 診査と診断は日本シェーグレン症候群研究会1999年改定診断基準を適用した。

4) 治療方法：自覚・他覚症状の診査後、シェーグレン、非シェーグレン症候群患者に対して漢方薬あるいは塩酸セビメリンを投与し、3か月後の臨床症状を評価した。

5) 臨床症状の評価：(1) 唾液分泌量評価では有歯顎者にはガム試験、無歯顎者には Saxon テストを行った。(2) 臨床症状の改善度評価ではレーティングスケールを用いて数値化した。

(3) 薬剤の臨床効果判定は、自覚・他覚症状から判定した。

2. 統計学的評価は Wilcoxon signed-rank test を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

3. 薬剤の細胞生物学的効果

1) 正常唾液腺における AQP 発現

(1) ヒト顎下腺を免疫組織染色して使用した。1次抗体には抗ヒト AQP 抗体 Goat 抗体を使用し、2次抗体にはビオチン化抗 Goat IgG 抗体を使用し染色した。

2) ヒト耳下腺由来 HSY 細胞における AQP 発現

(1) 漢方薬の唾液腺細胞に対する細胞生物学的作用

- ① ヒト耳下腺由来上皮細胞として HSY 細胞を、10%牛胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) で培養した。
- ② 漢方薬は麦門冬湯、加味逍遙散、桔梗湯、五苓散、八味地黄丸、白虎加人参湯、半夏厚朴湯を使用した。これらの漢方薬を72時間 HSY 細胞に添加培養した。
- ③ Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法については GAPDH を internal control とし、特異的プライマーを用いて行い PCR 産物を検出した。
- ④ Western Blot 法は一次抗体には Goat 抗ヒト AQP 抗体を使用し、二次抗体には抗 Goat IgG HRP 標識抗体を使用し、化学発光した AQP を検出した。

【結果】

1. 薬剤の口腔乾燥症に対する臨床効果
 - (1) 唾液分泌量の評価：シェーグレン症候群患者に麦門冬湯、塩酸セビメリンを内服すると唾液分泌は増加傾向を示した。また、非シェーグレン症候群患者に漢方薬を投与すると、増加傾向を示した。
 - (2) 臨床症状の改善度：薬剤投与前と投与開始後3か月における自覚、他覚症状をレーティングスケールで比較した。シェーグレン症候群患者に塩酸セビメリンを投与すると、口腔乾燥感のみ改善した。シェーグレン症候群患者と非シェーグレン症候群患者に麦門冬湯を投与すると、口腔乾燥感、口腔内灼熱感、飲水切望感が改善した。非シェーグレン患者に加味逍遙散、八味地黄丸を投与すると、口腔乾燥感、口腔内灼熱感が改善し舌痛が緩和した。
 - (3) 臨床効果判定：シェーグレン症候群患者に塩酸セビメリンを適用すると「やや有効」以上50%、麦門冬湯53.8%であった。一方、非

シェーグレン症候群に漢方薬を投与したところ、麦門冬湯77.8%、加味逍遙散70%、八味地黄丸71.4%で「やや有効」以上の効果がみられた。

2. 漢方薬の唾液腺細胞に対する細胞生物学的作用

- (1) 正常唾液腺における AQP 発現：基底側細胞膜に AQP 3 が、管腔側細胞膜に AQP 5 が局在していた。
- (2) HSY 細胞における AQP mRNA 発現：漢方薬を添加培養しない HSY 細胞に、AQP 3 mRNA と AQP 5 mRNA が恒常的に発現していた。さらに、異なる濃度の漢方薬を含む培地で72時間培養すると、濃度依存的に発現量が増加した。
- (3) HSY 細胞における AQP の発現：Western blot 法で検討したところ、各種 AQP の発現が認められた。漢方薬を添加培養しない対照群に比べ、漢方薬を添加培養した HSY 細胞では、AQP 3, 5 で発現が増加した。

【考察】

唾液腺は、交感神経と副交感神経による自律神経の二重支配を受けているが、腺房部管腔側に存在する AQP 5 が水のチャンネルとして存在することが明らかとなり、自律神経系を介する経路のほかに、水チャンネルが唾液分泌に関与していると推測される。

本研究によって、AQP 3 は腺房細胞基底側膜に、AQP 5 は管腔側膜に局在し、漢方薬を添加して培養した HSY 細胞では、AQP 3 mRNA と AQP 5 mRNA の発現が増加した。

以上の結果から、漢方薬による AQP 3 と AQP 5 の発現誘導が、腺房細胞から唾液を分泌させる機能の一端を担っていると推測された。

成長期咬合挙上動物における咀嚼運動の解析

金山 隼人

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Analysis of masticatory movement in the bite-raised growing animal

HAYATO KANAYAMA

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

临床上、患者にとって不適切な咬合高径を設定すると口腔機能に障害をきたすことが知られている¹⁾。しかし、その障害の誘因となる病態生理学的メカニズムはなお不明である。このメカニズムを知る第一段階として、咬合高径を変化させた場合の咀嚼時の顎運動や咀嚼筋活動の変化を明らかにすることが求められる。従来の研究からモルモットの前歯部に咬合挙上装置を装着して、臼歯部に空隙を作ると、数日以内に臼歯が萌出し、高められた咬合高径で臼歯が咬合することが報告されている^{2,3)}。また、このような動物で挙上装置を撤去すると、数日以内に装置を装着しなかった対照動物とほぼ同じ咬合高径にまで低下させることも明らかにされている。つまり、上下天然歯が高い咬合高径から適切な咬合高径へ経日的に変化する。そこで、本研究では、咬合挙上装置撤去後、咀嚼時の顎運動および咀嚼筋活動を経日的に調べることにより咬合高径の変化に伴う咀嚼運動の変化を明らかにすることを目的とした。

【対象と方法】

実験には Hartley 系雄性モルモットを用いた。咬合挙上は咬合挙上装置を装置上面が咬合平面に一致するよう下顎切歯に装着した。この操作によって上下臼歯間で約 3 mm の空隙ができるが、10日後には臼歯の萌出により上下臼歯が咬合

して空隙はなくなる。マイクロ CT 画像⁴⁾にて上下の臼歯が咬合していることを確認したのち、装置を撤去した。咀嚼運動の記録は咬合挙上前、装置撤去後 1 日目、4 日目、7 日目および 11 日目に行った。対照動物として咬合挙上を施さない同週齢の動物を用い、同様な経日的変化を記録した。まず、頭部に対する下顎の位置を経日的かつ定量的に評価するため、動物の下顎骨に脱着式の LED を装着し、頭部を固定した状態で CCD カメラにて前頭面での顎運動を記録した。なお、咀嚼を行わせるために、術者が口腔内に飼料を挿入した。解析項目としては、咀嚼中の最小開口位、最大開口位、開口量および 1 咀嚼サイクル時間 (total cycle length 以下、TCL) を対象とした。次に、咬合高径の変化による筋活動の変化を調べるために、自由行動下で顎運動と同時に両側咬筋および顎二腹筋の筋電図活動を記録した。この場合、前頭面の顎運動は、下顎骨に固定した磁石の動きを、頭部に装着した 2 つの磁気センサーを用いて記録した。実験では 5 時間の絶食の後、自由行動下で 1 時間自由に摂食させた。このようにして記録された顎運動および筋電図について、TCL、咬筋および顎二腹筋の筋活動量と筋活動持続時間を解析した。

【結果】

咬合挙上装置撤去日の咬合高径は咬合挙上前に

比べ平均120%であった。咬合高径は、装置撤去後4日間で急激に減少し、その後暫減し、11日目には対照群とほぼ同様の咬合高径となった。咀嚼運動中の頭頂部に対する下顎の位置を調べると、最小開口位は、装置撤去後1日目で対照群に比べ有意に開口位にあった。しかし、最大開口位は、対照群に比べて有意な変化が認められなかった。開口量は、装置撤去後1日目で対照群に比べ有意に減少した。また、TCLは咬合挙上前と比較して有意な変化が認められなかった。咬筋筋活動量は装置撤去後1, 7, 11日目で有意に増大し、筋活動持続時間は、装置撤去後1日目で有意に増大した。また、顎二腹筋筋活動量は、装置撤去後1日目で有意に増大した。顎二腹筋筋活動持続時間は、咬合挙上前と比較して有意な変化が認められなかった。

【考察】

天然歯の高い咬合高径が咀嚼中の顎運動および咀嚼筋活動に影響を与えることが明らかとなっ

た。本研究結果から、装置撤去後に適切な咬合高径に戻すためには咬筋活動の増大が重要な働きをしている可能性が示された。

【文献】

- 1) Christensen J (1970) Effect of occlusion-raising procedures on the chewing system. *Dent Practit* **20** : 233-7.
- 2) Yagi T, Morimoto T, Hidaka O, Iwata K, Masuda Y, Kobayashi M and Takada K (2003) Adjustment of the occlusal vertical dimension in the bite-raised guinea pig. *J Dent Res* **82** : 127-30.
- 3) Zhang W, Kobayashi M, Moritani M, Masuda Y, Dong J, Yagi T, Maeda T and Morimoto T (2003) An involvement of trigeminal mesencephalic neurons in regulation of occlusal vertical dimension in the guinea pig. *J Dent Res* **82** : 565-9.
- 4) Arai Y, Yamada A, Ninomiya T, Kato T and Masuda Y (2005) Micro-computed tomography newly developed for In vivo small animal imaging. *Oral Radiol* **21** : 14-8.

エムドゲイン®ゲルを用いた低侵襲性歯周外科手術の研究

久野 知子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

Study of minimally invasive periodontal surgery using Emdogain®Gel

TOMOKO KUNO

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

歯周組織再生療法は、組織誘導再生法 (Guided Tissue Regeneration), エナメルマトリックスプロテインを応用した方法, 骨移植, およびその併用療法がさかんに行われているが, その適応症には限界があり, 患者に与える外科的侵襲やストレスの大きいことが指摘されている^{1,2)}. 近年, ミニマルインターベンション (minimal intervention: MI) の概念の重要性が報告され, 歯周病治療学の分野においても低侵襲性歯周外科手術の開発が期待されている³⁻⁵⁾.

そこで本研究では, 骨内欠損に対して Emdogain®ゲル (EMD) と改良新付着術⁶⁾を併用した低侵襲性歯周組織再生療法の効果を, 臨床パラメーター, および歯肉溝滲出液 (GCF) 中の骨代謝マーカーで評価検討した.

【対象と方法】

被験者は, 歯周基本治療後, 骨内欠損を有する 30名 (男性14名, 女性16名) の慢性歯周炎患者の 45部位について, 以下の 3群に分けた. すなわち, コントロールとして歯肉剥離掻爬術単独 (FLAP) 群, 改良型新付着術 (改良 ENAP) と EMD を併用した改良 ENAP+EMD 群, および FLAP 手術に EMD を併用した FLAP+EMD 群であった.

術直前, 術後 6ヶ月の臨床パラメーターとし

て, プロービング時の出血, Silness & Loe の歯肉炎指数⁷⁾, 歯の動揺度, プロービングデプス, 臨床的アタッチメントレベルを診査し, 口内法 X線写真, 3DX®CT 画像所見の評価, さらに GCF 中の骨代謝マーカーとして, アルカリフォスファターゼ, および骨形成マーカーの Gla 型, 骨吸収マーカーの Glu 型オステオカルシンを測定評価した. 比較検定にはウィルコクソン符号順位和検定, クラスカル・ウォリス検定, 多重比較検定を用いた.

【結果】

FLAP 群に比較して, FLAP+EMD 群, 改良 ENAP+EMD 群の方が有意に大きな臨床的アタッチメントの獲得が認められた ($P < 0.01$). 歯槽骨吸収量も, 術直前に比べ, 術後 6ヶ月で両群共に有意に改善した ($P < 0.01$). さらに, 著明な骨再生所見を 3DX®CT 画像で確認できた. すなわち, 改良 ENAP+EMD 群は, FLAP+EMD 群と比較して, 術後 6ヶ月での臨床効果は同程度にまで改善した.

また, 骨代謝マーカーにおいても, 改良 ENAP+EMD 群と FLAP+EMD 群は, FLAP 群と比較して, Gla 型オステオカルシン量は著明に増量し, 骨形成傾向が認められた. さらに, FLAP 手術単独や EMD を併用した術式よりも, 改良 ENAP は術後の疼痛が早期に消失し, 疼痛も軽

度で、手術時間も短く、低侵襲性であることが認められた。

【考察】

現在、医学の分野のみならず歯科臨床の場においても minimal intervention (MI) にもとづいた治療³⁻⁵⁾が行われ、その重要性が広く認識されるようになった。改良 ENAP⁵⁾の利点は、メスで必要最低限の歯肉溝切開を加え、一塊として不良肉芽を搔爬、除去し、ルートプレーニング後に縫合するため、歯肉剥離および翻転が最小限ですみ、手術侵襲を抑制できることである。これらの結果より、改良 ENAP+EMD の低侵襲性の歯周組織再生療法は効果があることが示唆された。

【文献】

- 1) Sculean A, Windisch P and Chiantella GC (2004) Human histologic evaluation of an in-

trabony defect treated with enamel matrix derivative, xenograft, and GTR. *Int J Periodontics Restorative Dent* **24** : 326-33.

- 2) 八重柏 隆, 菊池 隆, 藤本 淳, 矢菅隆利, 西尾俊彦, 阿部仰一, 梁川輝行, 熊谷敦史 (1997) 歯周外科における循環動態を指標としたストレスについて. *日歯周誌* **39** : 143-6.
- 3) Jones SB and Jones DB (1998) Extending the limits : minimally invasive surgery. *Curr Opin Anaesthesiol* **11** : 629-36.
- 4) Harrel SK, Wilson TG and Nunn ME (2005) Prospective assessment of the use of enamel matrix proteins with minimally Invasive surgery. *J Periodontol* **76** : 380-5.
- 5) 鴨井久一, 太田紀雄監訳 (1997) コーエン審美再建歯周外科アトラ, 38-51, 西村書店, 新潟.
- 6) Loe H and Silness J (1963) Periodontal disease in pregnancy. 1. prevalence and severity. *Acta Odontol Scand* **21** : 515-33.

咬みしめ時の下顎頭変位に対する矢状顆路傾斜角の影響

小池 秀行

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Influence of condylar guidance inclination to condylar displacement during clenching

HIDEYUKI KOIKE

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

遊離端欠損が生じ臼歯部咬合支持が喪失した場合に、欠損部位に対して可及的速やかに適切な補綴処置を行うことが歯科医師としての重要な役割であるという考え方がこれまでの歯科教育の根幹となっていた。これに対し、1980年頃から北欧を中心に、遊離端欠損に補綴処置をあえて行わないとする短縮歯列 (Shortened Dental Arch : SDA) の概念が論じられるようになった¹⁾。本邦においては、この概念に対してまだ懐疑的であり、遊離端欠損に対して補綴の介入の有無といった二つの相反する処置方針が混在する中、それぞれの適応症を明確に判別できる基準の一刻も早い策定が待たれている。

これまで欠損補綴を論ずる場合の根拠になっているのは、咬合支持の喪失により咬合が不安定になり、最終的には顎機能障害にまで至るという概念である。咬合支持が喪失した状態で咬みしめが起こると、そこで発現する下顎頭変位は天然歯列の場合とは様相を異にしていることがこれまでの研究²⁾で判明したが、そこには、顎顔面形態の影響が関与していると考えられている³⁾。本研究では、関節結節の形態が下顎頭あるいはその周囲組織の動態、さらに咬合接触状態などと強く関わっている^{4,5)}ことに注目し、臼歯部咬合支持の喪失に伴う咬みしめ時の下顎頭変位の様相に対して、関節結節の傾斜角により決定される矢状顆路傾斜

角⁶⁾が及ぼす影響について検索を行った。

【対象と方法】

被験者は、健全歯列を有する松本歯科大学総合診療科所属の臨床研修医19名とした。内訳は男性15名、女性4名、年齢分布は24歳から31歳、平均年齢25.7歳である。上顎歯列にレジン製スプリントを装着し、後方歯部分より両側性に順次これを切断することで、擬似的な咬合支持喪失の条件を設定した。6自由度顎運動測定装置を用いて、各咬合条件における咬みしめ時の下顎頭変位の測定および矢状顆路傾斜角の測定を行った。基準平面は咬合平面とし、下顎頭の代表点には全運動軸点を選択した。

【結果】

1. スプリントを上顎歯列に装着後、順次後方から咬合支持を喪失させると、咬みしめ時の下顎頭変位量は有意に大きくなる傾向にあったが、臼歯部咬合支持の喪失範囲の増大とともに被験者間のばらつきが大きくなった。
2. 上下顎天然歯列同士の咬合接触状態における咬みしめ時の下顎頭変位量と、スプリント上での臼歯部咬合支持喪失前後における咬みしめ時の下顎頭変位量の差との間には、正の相関が認められた。
3. 矢状顆路傾斜角と、上下顎天然歯列同士の咬

合接触状態における咬みしめ時の下顎頭変位量, さらに, スプリント上での臼歯部咬合支持喪失前後における下顎頭変位量の差との間には, 負の相関が認められた。

【考察】

臼歯部咬合支持の喪失に伴う咬みしめ時の下顎頭変位の様相に対して, 矢状顎路傾斜角で代表される関節結節の形態と関わりのあることが判明し, これは, 上下顎天然歯列の場合にも咬合支持喪失時においてもあてはまることが示唆された。

【文献】

- 1) Käyser AF (1981) Shortened dental arches and oral function. *J Oral Rehabil* **8** : 457-62.
- 2) Kirihara T, Yamashita S and Igarashi Y (2005) Mandibular displacement related to simulated loss of posterior occlusal support. *Eur J Prosthodont Rest Dent* **13** : 170-6.
- 3) de Sa e Frias V, Toothaker R and Wright RF (2004) Shortened dental arch : a review of current treatment concepts. *J Prosthodont* **13** : 104-10.
- 4) Isberg A and Westesson PL (1998) Steepness of articular eminence and movement of the condyle and disk in asymptomatic temporomandibular joints. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **86** : 152-7.
- 5) Okeson JP (1993) Management of temporomandibular disorders and occlusion, 3rd ed. 127-46. St. Louis : Mosby Year Book.
- 6) Pullinger AG, Bibb CA, Ding X and Baldiaceda F (1993) Contour mapping of the TMJ temporal component and the relationship to articular soft tissue thickness and disk displacement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **76** : 636-46.

急性炎症時におけるサイトカインの関与 -三叉神経節細胞での STAT 3 の変化-

飯島 暁子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Involvement of cytokine intracellular molecules in the rat trigeminal ganglion
under acute inflammation

-A change of STAT3 molecules in the rat trigeminal ganglion-

AKIKO IJIMA

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

飯島暁子, 奥村雅代, 田中文也, 姫野勝仁, 時崎匡史, 金銅英二 (2007) 松本歯学 33 : 291-8.

【目的】

歯科疾患は、歯髄炎や歯周炎といった炎症と関連するものが大半を占め、激的な「痛み」を伴って来院する症例が多く認められる。この「痛み」は医療現場における重要な課題であり「痛み」のメカニズム解明、特に炎症性疼痛の病態を解明することは重要であるといえる。

これまでにサイトカイン受容体の一部となる gp-130 の局在やサイトカインのシグナル伝達に必須とされる JAK (Janus kinase)-Tyk (tyrosin kinase) ファミリーが存在することから、急性炎症時に炎症性サイトカインが三叉神経節細胞に何らかの影響を与えていることが示唆される。しかし、その詳細な報告はみられない。

本研究では急性炎症が三叉神経節においてどのような影響を及ぼしているのかを明らかにすることを目的とし、サイトカイン細胞内シグナル伝達分子である STAT 3 の発現についてラット急性炎症モデルを用いて検討した。

【方法】

SD 雄性ラット (6 週齢) の右側上口唇に Capsaicin (Cap) を 50 μ l 注入した。注入後 30 分、3 時間、1 日、3 日、7 日と経時的に三叉神経節を深麻酔下にて摘出した。免疫組織化学に供する組織は灌流固定後摘出した。蛋白定量 (ウエスタンブロッティング) に供する組織は、断頭後速やかに凍結し、その後蛋白の抽出精製をおこなった。免疫組織化学用三叉神経節は後固定した後シェクロース置換して脱水を行い、粉末状ドライアイスにて凍結、15~20 μ m 厚径の切片を作成し免疫組織化学を行った。一方 western blotting 用組織は、TRIZOL (Invitrogen 社) を使用し、通法にて蛋白の抽出・精製を行った。

1. 免疫組織化学法による STAT 3 およびリン酸化 STAT 3 の細胞内局在の検討

STAT 3 抗体 (Cell Signaling 社 #9132) とリン酸化 STAT 3 抗体 (Cell Signaling 社 #9134) を用いた。一次抗体反応 (4 $^{\circ}$ C, 108-120 時間) 後、洗浄しビオチン化した二次抗体 (biotinylated anti-rabbit IgG ; BA-1000, Vector

社)の反応を行った(4℃, 48-60時間)。その後, ABCキット(Vector社)にて反応しDAB(3, 3'-Diaminobenzidine, 同仁化学研究所)にて発色し光学顕微鏡(OLYMPUS BX 51)下で観察した。

2. Western BlottingによるSTAT3およびリン酸化STAT3蛋白の定量

各タイムコースの三叉神経節より精製したサンプルは, 吸光度計を用いて蛋白濃度を一定に調整し, アクリルアミドゲル(7.5%)に装填した。次に電気泳動により展開した蛋白をPolyvinylidene Fluoride membrane (PVDF膜)に転写し, STAT3抗体(Cell Signaling社#9132)とリン酸化STAT3抗体(Cell Signaling社#9134)を用いて免疫反応をおこなった。その後二次抗体反応さらに発色反応を行い可視化した。明らかになったバンドは全て画像解析装置(VersaDoc 5000, Bio Rad社)にて数値化した。

【結果と考察】

1. 免疫組織化学法によるSTAT3およびリン酸化STAT3陽性細胞の検討

1) カプサイシン注入後3時間のラット三叉神経節の第1枝と第2枝領域では, 神経節細胞の細胞質に, STAT3が濃染する傾向がみられた。STAT3が染色された細胞は, 主に痛覚伝達に関与するといわれている中型(直径30-40 μm)や小型(直径30 μm以下)の神経細胞であった。

2) カプサイシン注入後3時間のラット神経節細胞では, 注入側において67.3%の神経節細胞が陽性反応を示したが, 注入側と対側間, または, カプサイシン注入(Cap:急性炎症モデル)動物群と無処置動物群(Cont)間で有意な差は認められなかった。さらに, カプサイシン注入後30分, 3時間, 1日, 3日, 7日の経時的変化を検討したところ, STAT3陽性細胞の割合は, Contでは全神経細胞に対し約30%であったのに対し, 急性炎症モデル動物群(30 m-7 d)では, 注入3時間(3 h)後にSTAT3陽性細胞の割合がCap注入側で67.3%まで増加した。その後, STAT3陽性細胞はCap注入側では60%台を維持し7日(7 d)には66%となった。対側は3時間まで20~30%とCont値に近い割合であったが, 1日で44.9%, 3日で63.7%, 7日で57.5%と上昇し

た。

3) p-STAT3陽性細胞の割合は, Contでは約80%あった。カプサイシン注入以降, 徐々に低下し7日では69.4%であった。対側は注入30分で, 64.8%に低下し, その後60~70%で変動した。

2. Western blottingによるSTAT3およびリン酸化STAT3蛋白の検出

1) STAT3抗体またはp-STAT3抗体を用いたWestern blottingでは, それぞれ79 kDaまたは80 kDaの蛋白バンドが検出された。検出された蛋白バンドの濃度をContを1.0としてデンストメトリーで比較したところ, カプサイシン注入後の注入側三叉神経節のSTAT3蛋白量は, Cont群と差が認められなかった。これに対し, 対側では30分後に0.8に減少し, 3日, 7日と増加した。

2) p-STAT3蛋白バンドの濃度は, カプサイシン注入側において, 30分で1.38, 3時間で1.3と増加した後, 3日目を以降にCont値まで減少した。これに対し, 対側では3日, 7日に再び増加する傾向がみられた。

以上の結果より, 急性炎症時の三叉神経節細胞では, STAT3の活性化が炎症側のみならず対側の神経節細胞に及ぶこと, さらにSTAT3の発現とリン酸化の経時的変動は, 急性炎症による疼痛誘発のほか, 疼痛の抑制や神経修復物質の発現など複数の要因に影響されることが示唆された。

【文献】

- 1) Mizuno M, Kondo E, Nishimura M, Ueda Y, Yoshiya I, Tohyama M and Kiyama H (1997) Localization of molecules involved in cytokine receptor signaling in the rat trigeminal ganglion. *Mol Brain Res* **44**: 163-6.
- 2) Watanabe D, Toshimura R, Khalil M, Yoshida K, Kishimoto T, Taga T and Kiyama H (1996) Characteristic localization of gp-130 (the signal-transducing receptor component used in common for IL-6/IL-11/CNTF/LIF/OSM) in the rat brain. *Eur J Neurosci* **8**: 1630-40.
- 3) Darnell Jr JE, Kerr IM and Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* **264**: 1415-21.
- 4) Harpur AG, Andress AC, Ziemiecki A, Aston

- RR and Wilks AF (1992) JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7** : 1347-57.
- 5) Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto T, Thierfelder WE, Kleider B and Silvennoinen O (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* **19** : 222-7.
- 6) Lutticken C, Wegenka UM, Yuan J, Buschmann J, Schindler C, Ziemicki A, Harpur AG, Wilks AF, Yasukawa K, Taga T, Kishimoto T, Barbieri G, Pellegrini S, Sendtner M, Heinrich PC and Horn F (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak 1 with the interleukin-6 signal transducer gp-130. *Science* **263** : 89-92.
- 7) Muraoka O, Xu B, Tsurumaki T, Akira S, Yamaguchi T and Higuchi H (2003) Leptin-induced transactivation of NPY gene promoter mediated by JAK1, JAK 2 and STAT 3 in the neural cell lines. *Neurochem Int* **42** : 591-601.
- 8) 木山博資 (1999) 神経栄養因子とサイトカインの観点からペインを考える. *ペインクリニック* **20** : 41-7.

新規活性型ビタミン D 誘導体 (19-nor-(20S)-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃) は破骨細胞形成を強力に促進する

佐藤 将洋

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

New 19-nor-(20S)-1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ analogs strongly stimulate osteoclast formation both *in vivo* and *in vitro*

MASAHIRO SATO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Sato M, Nakamichi Y, Nakamura M, Sato N, Ninomiya T, Muto A,
Nakamura H, Ozawa H, Iwasaki Y, Kobayashi E, Shimizu M, DeLuca HF,
Takahashi N and Udagawa N (2007) *Bone* 40 : 293-304.

【目的】

2002年に DeLuca らは、骨形成を強力に誘導する新規ビタミン D₃誘導体 1 α , 25-ジヒドロキシ-2-メチレン-19-ノル-ビタミン D₃ (2 MD) を開発した (文献). 2 MD は、血清 Ca 濃度を上昇させる作用が弱く、骨に対する作用が強力である誘導体として報告されたものである. 2 MD は、19位のエキソメチレン基が2位に移動し、さらに20位の立体配置が非天然型の S 配置 (20-epi) に置換した構造を有している. 19位のエキソメチレン基が取り除かれ、ビタミン D に特徴的な共役トリエン骨格を持たない誘導体を19-ノル-ビタミン D とする. そこで我々は、2 MD の構造を参考にしさらに強力なビタミン D₃誘導体の合成を目指し、19-ノル-ビタミン D で20位を20-epi にし、さらに2位を修飾させた誘導体 (2 MD 誘導体) 4種類と、2 MD 誘導体の2位の立体配置を天然型に置換した誘導体 (2 MD 誘導体 20位天然型) 4種類、および更にこれらの誘導体に対応して22位炭素を酸素原子に置換した誘導体

(2 MD-22-oxa 誘導体) 4種類、計12種類の新規誘導体を用いて、破骨細胞分化に対する効果を検討した.

【材料と方法】

破骨細胞分化の評価は、マウスの骨芽細胞と骨髄細胞の共存培養系を用いて検討した. マウス骨芽細胞における RANKL, OPG, M-CSF, 24-水酸化酵素 mRNA 発現を RT-PCR 法で検討した. 象牙質切片上で共存培養を行い各種ビタミン D₃誘導体による吸収窩形成活性を検討した. また各種ビタミン D₃誘導体を、RANKL のデコイ受容体である OPG の遺伝子欠損マウスに投与し、血清中の Ca と RANKL 濃度を測定し、骨、胸腺、脾臓での RANKL mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて検討した. また、大理石骨病を呈する c-fos 欠損マウスと正常マウス (C57BL/6J) に活性型ビタミン D₃と各種ビタミン D₃誘導体を投与し、脛骨における破骨細胞に関する組織学的解析と、血清中の Ca と RANKL 濃度を測定し

た。

【結果】

- (1) *in vitro* において、2 MD 誘導体は活性型ビタミン D₃と比較して約100倍の破骨細胞誘導活性を示した。さらに、骨芽細胞における24-水酸化酵素と RANKL mRNA 発現誘導作用を有する事が明らかとなった。
- (2) 2 MD-20位天然型誘導体と 2 MD-22-oxa 誘導体の破骨細胞形成活性は、2 MD 誘導体より有意に低かった。
- (3) 2 MD 誘導体の象牙質の吸収窩形成活性は、活性型ビタミン D₃と比較して強力であった。
- (4) 2 MD 誘導体のビタミン D 受容体 (VDR) 結合能および転写活性は、上記の破骨細胞形成活性ならびに吸収窩形成促進活性と相関性が認められなかった。
- (5) OPG 欠損マウスへの 2 MD 誘導体投与では破骨細胞が多数形成され、活性型ビタミン D₃投与と比較して血清 Ca と可溶性 RANKL 濃度が有

意に上昇した。

- (6) *c-fos* 欠損マウスへの 2 MD 誘導体投与では、破骨細胞を全く誘導せず、血清 Ca 濃度も上昇しなかった。

【考察】

1. 我々が新規に合成した 2 MD の 2 位の構造を変化させた新規ビタミン D₃誘導体は、*in vivo* と *in vitro* において強力な破骨細胞分化促進活性を有することが明らかとなった。
2. ビタミン D₃誘導体投与により上昇した血清 Ca 濃度は、破骨細胞による骨吸収を介する可能性が唆された。

【文献】

Shevde NK, Plum LA, Clagett-Dame M, Yamamoto H, Pike JW and DeLuca HF (2002) A potent analog of 1 a, 25-dihydroxyvitamin D₃ selectively induces bone formation. Proc Natl Acad Sci USA **99**: 13487-91.

下顎頭軟骨発生における Runx 2 の関与

清水 貴子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Participation of Runx2 in mandibular condylar cartilage development

TAKAKO SHIMIZU

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Shimizu T (2006) Eur J Med Res 11 : 455-61.

【目的】

一次軟骨である関節軟骨と異なり遅れて分化する二次軟骨としての下顎頭軟骨は、細胞外基質成分が相違すること、および形態形成の制御機構が異なることなど、骨の特徴を強く併せ持っている事を報告してきた^{1,2)}。そこで、骨の発生に必須な因子である Runx 2 に着目し、発生時における発現状態をペプチドと遺伝子レベルにて追究した。

【材料と方法】

胎生14日齢 (E 14) から出生直後 (E 19相当) までの ddY マウスを通法により固定した。下顎頭軟骨の中央部分で厚さ 4 μm の矢状断連続切片を作製し、トルイジンブルー染色 (TB)、免疫組織化学 (IHC) および遺伝子組織化学 (ISH) 的手法によって検索した。IHC は、一次抗体として anti-rabbit Runx 2 monoclonal antibody : PEB 2 αA-m-70 (Santa Cruz Biotechnology Inc, USA) を用い Dako Envision™ Kit によって行なった。ISH には、0.82 kb の DIG 標識 RNA プローブを用いた。ハイブリダイズ後 DIG 抗体を用いて NBT により発色させた。

【結果】

下顎頭軟骨の初期発生は、E 14において、下顎

骨体遠心上部に未分化間葉細胞の凝集および増殖として認められた。しかし、TB による異染性はなかった。E 15では明瞭に TB に異染性を示した。E 16から軟骨内骨化が開始していた。同時に、下顎頭軟骨の鞘部分において軟骨外骨化が開始していた。IHC によって、E 14においては、Runx 2 は凝集した未分化間葉細胞の核および細胞質に観察された。E 15になると増殖する細胞の核および細胞質 Runx 2 ペプチドが強発現していた。E 16~E 18の前肥大軟骨細胞層に Runx 2 陽性産出物が観察された。E 17以降において Runx 2 は下顎頭軟骨の鞘部分にある細胞に出現した。ISH では、E 14~E 15において Runx 2 シグナルは凝集間葉細胞あるいは増殖する軟骨細胞の細胞質に認められた。E 16~E 18においては全ての細胞層の細胞に発現していた。

【考察】

今回得られた結果は、Runx 2 ペプチドは下顎頭軟骨の発生、とくに二次軟骨の初期分化ならびにその後の分化発育に重要な役割を果たしていることを示唆していた。その発現と役割についての模式図を図 1 に示す。すなわち、以下の3点である。①E 14における Runx 2 ペプチドの発現は未分化間葉細胞の軟骨細胞への初期分化を調節して

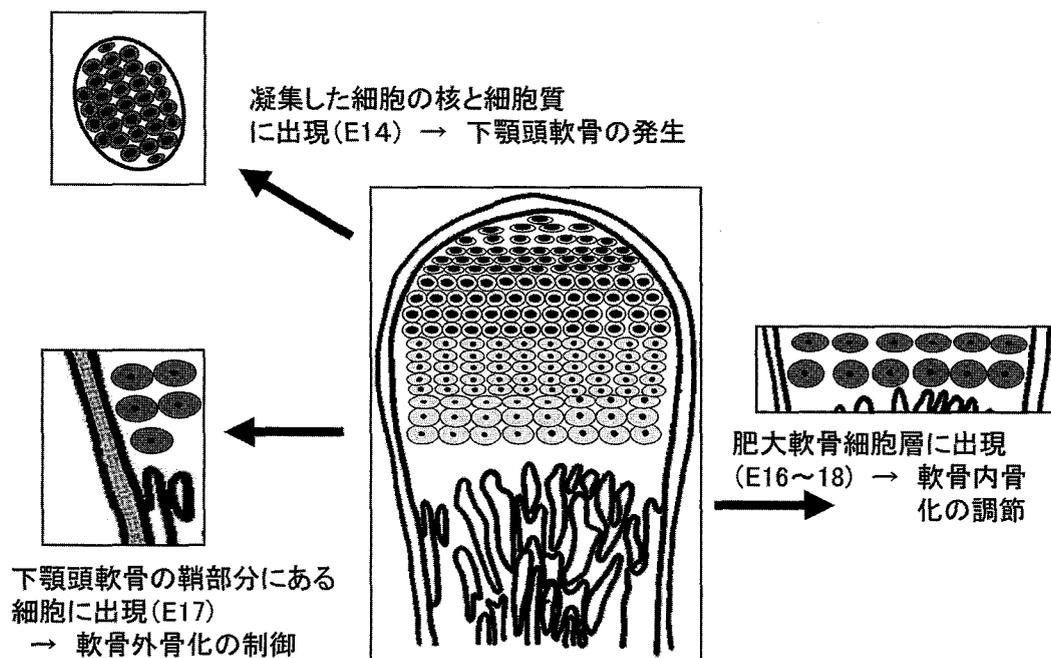


図1：下顎頭軟骨における Runx2 の発現とその役割

いる。②E 17に下顎頭軟骨の鞘部分にある細胞における出現は、この時期に開始される軟骨外骨化の開始を司っている。③E 16～E 18前肥大軟骨細胞層における発現は軟骨内骨化の進行に関与している。

【文献】

- 1) Shimizu T, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Okafuji N, Kurihara S, Nagai N and Kawakami T (2005) Expression of Notch 1 and Math 1 in mandibular condyle cartilage in neonatal mice. *Angle Orthod* **75** : 993-5.
- 2) Kawakami T, Shimizu M and Shimizu T (2005) Immunohistochemical characteristics of developing mandibular angle in fetal mice. *Eur J Med Res* **10** : 547-8.

マウスガードの歯および歯周組織への効果

正村 正仁

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

Effect of mouthguard on tooth and periodontal tissue

MASAHITO SHOMURA

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

正村正仁 (2007) 松本歯学 33 : 255-68.

【緒言】

スポーツに起因する外傷は、それ本来の目的とは相反するものであり、予防対策が必要となる。そのため、各種スポーツに適した様々な防具の開発がなされており、顎口腔領域の保護装置としてのマウスガードもその代表的なものの一つである。

マウスガードには優れた顎口腔外傷予防効果があるとされ¹⁻⁴⁾、コンタクトスポーツを中心とした多くのスポーツで使用することが推奨されている。しかし、その外傷予防効果についての研究の多くは、単にマウスガード材に衝撃を加えたり、頭蓋骨模型や牛の抜去歯などにマウスガードを装着することにより、その衝撃吸収能についての検討を行ったものであり、実際の生体への衝撃を想定し、歯根膜、歯槽骨、歯肉といった歯周組織が存在する条件でなされたものではない。当然、歯周組織に対してのマウスガード効果も、現在まで明らかとはなっていない。

そこで、実際の生体に近い状態で歯周組織が保存されている牛下顎骨体に対し、振り子式の衝撃試験機を用いて衝撃を加え、マウスガードの有無、マウスガードの厚みの違い、およびマウスガード材の違いが、歯と歯周組織に対して及ぼす効果についての検討を行った。

【実験材料及び方法】

実験には生体に近い状態で歯周組織が保存されている牛下顎骨体を用いた。マウスガードは、1) 厚みの異なる4種類(1~4 mm)、2) マウスガード材の異なる4種類を作製し、振り子式の衝撃試験機を用いて、一定の衝撃を歯に加えるようにした。歯および歯槽骨には STRAIN GAGE を設置して、衝撃試験時に発生するひずみを記録し、マウスガードの有無、マウスガードの厚みの違い、およびマウスガード材の違いにより生ずるひずみの値の変化について検討を行った。また、衝撃試験の際に生じた衝撃力を衝撃試験機の鉄球部に付与した超小型定容量加速度変換器で記録し、これについても同様に検討を加えた。

【結果および考察】

実験により以下のような結果が得られた。

1. マウスガード装着時は非装着時に比べて、歯に加わる衝撃力と同部に生ずるひずみの値が有意に減少した。
2. 同様に、マウスガード装着時においては非装着時に比べて、歯周組織である歯槽骨部に生ずるひずみの値も有意に減少した。
3. 1 mm のマウスガード装着時に比べて、4

mm のマウスガード装着時では、歯に加わる衝撃力と同部に生ずるひずみの値が有意に減少した。

4. 同様に、1 mm のマウスガード装着時に比べて、4 mm のマウスガード装着時では、歯周組織である歯槽骨部（舌側）に生ずるひずみの値も有意に減少した。
5. マウスガード材の違いにより、歯に加わる衝撃力と同部に生ずるひずみの値に有意差が生じることはなかった。
6. マウスガード材の違いにより、歯周組織である歯槽骨部に生ずるひずみの値に有意差が生じることはなかった。

以上の結果から、マウスガードは、歯および歯槽骨部に加わる衝撃力に対して、それらのひずみと衝撃加速度を減少させ、歯および歯周組織に対して保護的に働くことが示唆された。加えて、マウスガードの厚みが増すことにより、歯と歯周組織に対する衝撃吸収効果も増大することが確認された。また、マウスガードの歯と歯周組織に対す

る衝撃吸収効果には、使用したマウスガード材の違いによる明らかな差は生じないことが示唆された。

【文献】

- 1) 石島 勉, 山口敏樹, 月村雅史, 平井敏博, 武田秀勝 (1991) マウスガードの使用とその外傷予防効果-北海道学生アメリカンフットボール選手における調査-. 東日本歯学雑誌 **10**: 23-32.
- 2) 武田友孝, 石上恵一, 月村直樹, 島田 淳, 太見義寿, 豊嶋建広, 大木一三 (1995) 顎口腔系の状態と全身状態との関連に関する研究-ボクシングのパンチ力に対するマウスプロテクターの効果-. 臨床スポーツ医学 **12**: 261-70.
- 3) 武田友孝, 月村直樹, 島田 淳, 石上恵一, 太見義寿, 大木一三, 豊嶋建広 (1996) 顎口腔系の状態と全身状態との関連に関する研究-ボクシングのパンチ力に対するマウスプロテクターの効果(その2)-. 臨床スポーツ医学 **13**: 1152-60.
- 4) 月村直樹, 武田友孝, 小川 透, 中島一憲, 内藤 薫, 黒川勝英, 島田 淳, 石上恵一, 富田貴志, 石上友彦 (2004) マウスガードの衝撃吸収能について. 日大歯学 **78**: 115-20.

オトガイ舌骨筋一次求心線維の入力による副交感神経 節後ニューロンの NK1 受容体活性化

富田 真貴

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

NK1 receptor activation by geniohyoid primary afferents modulates
parasympathetic postganglionic neuronal excitability in the rat

MAKI SUGIURA-TOMITA

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Sugiura-Tomita M, Yasuda K, Mori R, Hasumi-Nakayama Y, Tomita I, Nakamura M,
Tanaka S and Furusawa K (2006) *Brain Res* **1112** : 106-13.

【背景】

当研究室ではこれまでに、ラットのオトガイ舌骨筋は舌下神経本幹を末梢軸索経路とする体性運動神経と、頸神経ワナを経由する副交感神経によって二重の遠心性支配を受けることを明らかにするとともに、この副交感神経系が、舌骨の位置決めに関与していることを示した (Exp Brain Res 2003).

オトガイ舌骨筋に分布する一次求心線維については、その末梢軸索経路は頸神経ワナと報告されているが、中枢投射部位や機能特性については不明である。そこで、本研究では電気生理学的及び形態学的手法を用いて検討した。

【実験方法】

実験には10週齢の Wistar 系ラット (224±16 g) を38匹用いた。

1) 電気生理学検討 (*in vivo*) : オトガイ舌骨筋に分布する神経枝からの求心性神経放電を、頸神経ワナあるいは舌下神経本幹の末梢側切断端から導出し (J Comp Neurol 1996), 神経放電

パターンの解析を行った。

2) Horseradish peroxidase (HRP) 神経標識法による検討 : 頸神経ワナあるいは舌下神経本幹の切断と HRP 神経標識法 (Somatosens Mot Res 2002, Brain Res 2003) を組み合わせることによって、オトガイ舌骨筋一次求心線維の中枢投射部位と細胞体の局在について検討した。なお、HRP は tetramethylbenzidine (TMB) を用いて可視化した。

3) 免疫組織化学染色による検討 : 副交感神経節後ニューロン局在部位を中心に神経幹を一塊として摘出し、Zamboni 液で固定後、連続切片を作製した。一次抗体としてサブスタンス P (SP) 抗体 (一次求心線維標識用) と Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) 抗体 (副交感神経節後ニューロン標識用) を用いた一連の免疫組織化学染色を行った。

4) 電気生理学検討 (*in vitro*) : 副交感神経節後ニューロンからの神経放電の導出し (Exp. Brain Res 2003), NK1 受容体の作動薬 (SP) や拮抗薬 (GR 82334) の投与による神経放電

の変化について検討した。

【結果および考察】

電気生理学検討 (*in vivo*) によって、オトガイ舌骨筋の一次求心線維は頸神経ワナを経由することが確認された。HRP 神経標識法では、第2 脊髄神経節に HRP 標識細胞が認められたことから、一次求心線維の細胞体の局在が明らかになった。しかし、中枢内に HRP 標識終末は認められず、これは一次求心線維が直接中枢に投射しないことを示していた。

免疫組織化学染色では VIP 陽性を示す副交感神経節後ニューロンの周囲に、オトガイ舌骨筋一次求心線維と考えられる SP 陽性終末が観察された。更に、電気生理学検討 (*in vitro*) では、節後ニューロンの神経放電数は SP の投与によって増加し、GR 82334 の前投与によって SP の作用は block された。これらより、オトガイ舌骨筋一次求心線維からの感覚情報は、副交感神経節後ニューロンの NK 1 受容体を活性化することによって節後ニューロンの活動を興奮性に修飾していると考えられた。

歯科教育における汎用性のあるコンピュータ支援学習プログラムの開発
-口内法エックス線写真を整理してマウントする方法を
例としたアプリケーション-

谷本 英之

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Further development of a versatile computer-assisted learning program
for dental education with an exemplifying application on how to logically arrange
and mount periapical and bitewing radiographs

HIDEYUKI TANIMOTO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Tanimoto H, Gröndahl HG, Gröndahl K and Arai Y (2006) *Oral Radiol* 22 : 75-9.

【緒言】

口内法エックス線写真を整理することができる、インターラクティブなコンピュータ支援学習ソフトウェアの開発をした。

【方法】

マイクロソフト社の Visual Basic®. NET プログラミング言語を用いて、オブジェクト指向のあるメニューウィンドウ、作業画面および関数を開発した。関数は一般関数と特定関数に分けて開発した。一般関数は、*Select* 関数、*Shuffle* 関数、*Clock* 関数、*Evaluation* 関数、*Answer* 関数、*Score* 関数、*Question* 関数、*Teacher* 関数、*Conditions* 関数、*Message* 関数、*Color* 関数、*Sound* 関数、*Initialization* 関数、*Help* 関数に分けて開発した。特定関数は、*Rotate* 関数(特定関数1)と *Mount* 関数(特定関数2)に分けて開発した。また、メニューウィンドウ、作業画面およびそれぞれの関数と口内法エックス線写真(以下; フィルム)を加えて、「フィルムをフォルダーに

マウントする」という課題を行うプログラム”(以下; プログラム)を開発した。

【結果】

プログラムを開始すると、メニューウィンドウが表れた。そのメニューウィンドウから、それぞれの作業画面を開けることができた。メニューウィンドウでは *Select* 関数によって、5つのセーブデータから1つを選択することができた。メニューウィンドウ内のスタートボタンを押すと、*Mount* 作業画面(図1)が表示され、プログラムが開始された。*Shuffle* 関数によって全てのフィルムがランダムに並べられ、*Clock* 関数によってタイマーがスタートした。制限時間内に学生はフィルムを1枚ずつ選び、専用フォルダーに置くことができた。*Rotate* 関数(特定関数1)によって、そのイメージを90度ずつ回転および反転することができた。*Mount* 関数(特定関数2)によって全てのフィルムをマウントすれば、*Evaluation* 関数によって仮想上の先生がその結

果をチェックすることができた。全てのフィルムを正確にマウントできない場合、あるいは制限時間内にマウントできなければ、コンピュータ上の先生に注意され、先程と同じマウントの状態から2回まで再トライすることができた。もし不正解あるいは時間切れを3回すると、“You lost.”と表示し、プログラムを停止することができた。Answer 関数によって、どこを間違えたのか確認することができた。もし全て正解したら、マウントしたフィルムの枚数をポイントとして加算することができた。そのポイントがある域まで達したら、特別な画面を見ることができた。メニュー画面上で Score 作業画面を表示することができた。Score 関数によって過去の操作日時とスコアは自動で記録できた。

メニュー画面上で設定の作業画面を表示することができた。Question 関数および Teacher 関数を用いることで、出題のフィルムと先生の写真を新たに追加することができた。Conditions 関数、Message 関数、Color 関数、Sound 関数、Initialization 関数も同様にそれぞれ設定することができた。Help 関数によって、これらの操作方法についてすぐに確認することができた。

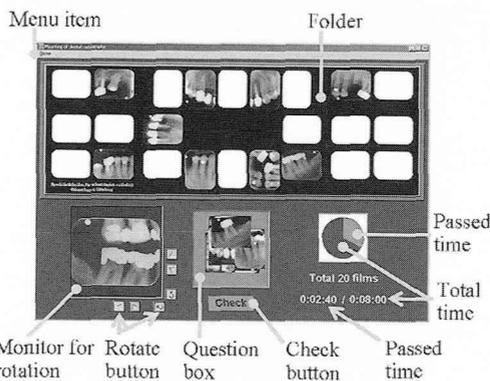


図1：Mount 作業画面 (Oral Radiology. Vol. 22. 2006. pp 77. Fig. 2 から引用)

【考察】

このプログラムは上記の関数を用いることによって、パーソナルコンピュータ上で仮想的に動作することができた。単一ユーザーのみならず、グループでの使用も可能にした。毎回のスタート時にフィルムをランダムに表示させることで、問題の順番を暗記して正解を求めることを不可能にした。フィルムの向きもランダムに表示させるこ

とで、学生の知識レベルが真の実力かどうか確認することができるようにした。また、実際に箱の中からフィルムを取り出しているかのような動作をさせることができた。それらのフィルムを正しい方向に直して、特定のフォルダー上にマウントすることで、実際の状況のようにシミュレートできた。制限時間を設けることで、学生のレベルに応じた時間で学習することができるようになった。全フィルムのマウントを終了した後に評価を行った。全問正解できない場合は2回まで再チャレンジさせることで、自分の不正解の部位を確認し学習できるようにした。正解すればポイントや学習した時間などが記録され、そのスコアを見ることで自分の学習過程を知ることができると考えた。それによって、学生に達成感や自信を持たせることが期待できた。さらに出題や先生の画像の追加、各設定変更を短時間で行うことが可能となった。学生がプログラムに飽きてしまっても、これらの設定変更によりレベルを変化させることで、より興味のあるものを作成できると考えた。そして、これらの関数は学生とコンピュータの間でインタラクティブに動作することがわかった。

【文献】

- 1) Rohlin M, Shinoda K and Takano Y (2004) Educational strategies in oral and maxillofacial radiology. *Oral Radiol* **20** : 2-8.
- 2) Bissell V, McKerlie RA, Kinane DF and McHugh S (2003) Teaching periodontal pocket charting to dental student : a comparison of computer assisted learning and traditional tutorials. *Br Dent J* **195** : 333-6.
- 3) Cohen HB, Walker SR, Tenenbaum HC and Spero L (2003) Interdisciplinary, web-based, self-study, interactive programs in the dental undergraduate program : a pilot. *J Dent Educ* **67** : 661-7.
- 4) Holt RD and Oliver M (2002) Evaluating web-based learning modules during an MSc programme in dental public health : a case study. *Br Dent J* **193** : 283-6.
- 5) Halvorson M (2003) Microsoft Visual Basic. NET Step by Step-Version, Microsoft Press, Washington.
- 6) Schitteck M, Mattheos N, Lyon HC and Attström R (2001) Computer-assisted learning.

- a review. *Eur J Dent Educ* **5** : 93-100.
- 7) Johnson LA and Schleyer T (1997) Development of standards for the design of educational software. *Quintessence Int* **30** : 763-8.
 - 8) Ayoub JL, Vanderboom C, Knight M, Walsh K, Briggs R and Grekin K (1998) A study of the effectiveness of an interactive computer classroom. *Comput Nurs* **16** : 333-8.
 - 9) Wenzel A and Gotfredsen E (1997) Student's attitudes toward and use of computer assisted learning in oral radiology over a 10-year period. *Dentomaxillofac Radiol* **26** : 132-6.
 - 10) Mileman PA, van den Hout WB and Sanderink GCH (2004) Looking for caries? Teachers evaluate a program to improve caries diagnosis from radiographs. *Eur J Dent Educ* **8** : 35-42.

in vitro 歯周病バイオフィルムモデルに対する抗菌薬の効果

田村 集

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Effect of antimicrobials on *in vitro* periodontal biofilm model

ATSUMU TAMURA

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University

Oh H and Tamura A (2007) Jap J Antimicrob 60 : 52-7.

【目的】

口腔内の2大疾患であるう蝕や歯周病は、口腔内細菌が形成するプラークが原因となって発症する細菌感染症である。近年、Costertonらによって、う蝕や歯周病が、口腔内細菌によって形成された「バイオフィルム」が原因となる感染症であると提唱された¹⁾。最近では様々な抗菌薬を利用した歯周病治療が試みられるようになっており、歯周病関連細菌に対する抗菌薬の効果が報告されている。歯周ポケット内への局所投与としてはテトラサイクリン系抗菌薬のミノサイクリンが歯周病組織への局所薬物配送療法 (Local Drug Delivery System) 用薬剤として用いられる。近年、歯周病がバイオフィルム感染症であるという観点からバイオフィルムに有効であるマクロライド系抗菌薬を用いた歯周病治療が報告されている²⁾。このような背景から抗菌薬の歯周病関連細菌に対する薬理効果を検討することは重要であると考えられる。本研究では歯周病関連細菌由来によるバイオフィルムモデルを作製し、マクロライド系抗菌薬のエリスロマイシン・アジスロマイシン・ジョサマイシンおよびテトラサイクリン系抗菌薬のミノサイクリンのバイオフィルムモデルに対する薬理効果を検討することを目的とした。

【材料と方法】

唾液処理を行ったプレート上で初期付着に関与する *Streptococcus gordonii* を37℃で嫌気培養した³⁾。さらに代表的な歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* を共培養し、*in vitro* 歯周病バイオフィルムモデルとした⁴⁾。このエリスロマイシン、ジョサマイシン、アジスロマイシンおよびミノサイクリンの抗菌薬を添加した。バイオフィルムの形成前と形成後の二群に分け、抗菌薬の影響を比濁定量により生菌数を測定し、表面形状を走査型電子顕微鏡 (SEM) で、各薬剤の浸透能を共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて解析した。

【結果・考察】

本研究は *in vitro* 培養系において歯周病バイオフィルムモデルを作成しエリスロマイシン、アジスロマイシン、ジョサマイシン、ミノサイクリンなど4種類の抗菌薬を投与した。その結果4種類の抗菌薬全てにバイオフィルム形成抑制能を確認でき、アジスロマイシンには顕著なバイオフィルム破壊効果を持つことが明らかとなった。SEMの観察によりエリスロマイシン、アジスロマイシン投与時と比べバイオフィルムの表面性状が明らかに異なることが確認できた。また CLSM の観

察により、アジスロマイシン、エリスロマイシン、ジョサマイシン、ミノサイクリンの順でバイオフィーム深層への薬剤の浸透性の違いが確認できた。すなわち、バイオフィームへ薬剤が浸透することによりバイオフィーム構成細菌の結合が阻害されバイオフィーム構造に変性が生じ、破壊されるのではないかと考えられた。またエリスロマイシン、アジスロマイシンのバイオフィームへの良好な浸透性は、それぞれのもつラクトン環の糖鎖構造が関係しているのではないかと推察される。

【結論】

エリスロマイシン、アジスロマイシンがバイオフィーム感染症としての歯周病に対して有用な抗菌薬である可能性が示唆された。

【文献】

- 1) Costerton JW, Stewart PS and Greenberg EP Bar (1999) Bacterial biofilms—a common cause of persistent infections. *Science* **284** : 1318–22.
- 2) Fujii T, Wang PL, Hosokawa S, Tamura A, Hikita K, Maida T, Ochi M, Pierre C and Baehni P (2004) Effect of systemically administered Azithromycin in early onset aggressive periodontitis. *Perio* **1** : 321–5.
- 3) Kolenbrander PE and London J (1993) Adhere today, here tomorrow : oral bacterial adherence. *J Bacteriol* **175** : 3247–52.
- 4) Wang PL and Ohura K (2002) *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide signaling in gingival fibroblasts—CD14 and Toll-like receptors. *Crit Rev Oral Biol* **13** : 132–42.

三叉神経中脳路核ニューロン h チャンネル活性の 5-HT 依存性神経修飾作用に関する検討

富田 郁雄

松本歯科大学院 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Analysis of 5-HT-dependent neuromodulation of h-channel activities
in trigeminal mesencephalic neurons.

IKUO TOMITA

Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University

【目的】

一次感覚ニューロンである三叉神経中脳路核 (Mes V) ニューロンは, 筋紡錘や歯根膜受容器からの求心性情報を統合し^{1,2)}, 運動核ニューロン同様に, セロトニン (5-HT) を始めとする神経伝達物質により興奮性が修飾され, 咀嚼や吸啜運動において観察される様々な顎運動パターン形成に関与している³⁻⁶⁾. 内向き整流作用は, 膜の過分極変化に伴い活性化される h-電流により誘発される特性であり^{4,7,8)}, 静止膜電位の保持, スパイク発射特性調節, 周波数依存性膜応答特性形成を通じて Mes V ニューロンの興奮性維持に関わっているが⁷⁾, 神経伝達物質による h-チャンネル活性への神経修飾機構については未だ明らかとされていない. そこで本研究では, 新生仔ラット (P2-12) の Mes V ニューロンより Whole-cell patch-clamp 記録法を用いて, 5-HT 受容体活性に伴う h-電流の神経修飾特性について電気生理学的ならびに形態学的に検討を行った.

【研究方法】

1. 電気生理学的検討

生後2から12日齢 (P2-12) のSD系新生仔ラットより Mes V を含む厚さ300mm の脳幹冠状

スライス標本を作製した. Whole-cell patch-clamp 記録法を用いて, Voltage-clamp 記録条件下で膜抵抗値, 膜電流値が安定した後に, channel blocker を含んだ細胞外液を還流して h-電流を誘発した. h-電流に対する神経修飾効果を検討するために, 種々の薬剤を Bath 内投与し

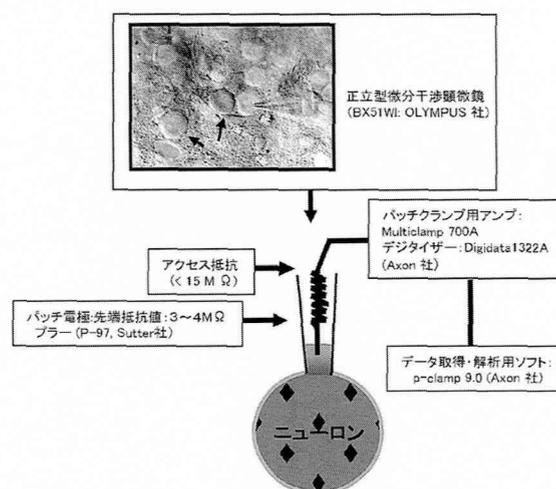


図1：中脳路核ニューロンからの Whole-cell patch-clamp 記録

図上は赤外線透視条件下での中脳路核ニューロン (P12) のコントラストイメージ (直径約40μmの偽単極性の類円形細胞) を示す. ニューロンより導出された電流はデジタル信号化された後, データ取得・解析ソフト p-clamp 9.0上にて解析された.

て得られた電流変化は、デジタル信号化された後、Patch-clamp専用データ解析ソフト(p-clamp 9.0: Axon社)を用いて解析した(図1)。

2. 形態学的検討

免疫組織化学染色法を用いた形態学的検討に当たっては、P12のSD系ラットを各抗体毎に5匹ずつ用いた。Mes Vを含む凍結横断連続切片を厚さ30mmで作製し、5-HT¹⁻⁷受容体にそれぞれ特異的な一次抗体を使用し、免疫組織化学染色を施行後、光学顕微鏡下で各サブタイプの陽性細胞の染色状態を観察した。

【結果】

1. 5-HTによるhチャンネル(電流)基本特性の変化について

Mes Vニューロンにおけるh-電流特性は5-HTにより濃度依存性に抑制的に制御されていることが明らかとなった(図2)。本修飾効果は生後発達の増大し、h-チャンネルの活動曲線特性には影響なく、最大コンダクタンス値の減少が観察された(図3)。

2. 5-HTによるh-チャンネル(電流)修飾作用に關与する細胞内情報伝達機構の解明

5-HTによるh-電流抑制効果は、AC-inhibitorであるSQ 22,536, さらにProtein kinase A-inhibitorであるH 89投与条件下において有意に低下した(図4)。

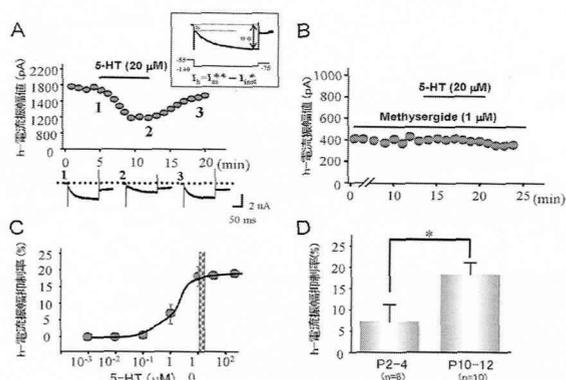


図2: h-電流に対する5-HTの薬剤効果

A: -140 mVの過分極電位パルスを細胞内通電してh-電流を誘発し、5-HT (20 μM)を投与するとh-電流の振幅は有意に減少した。B: Methysergide (1 μM)前投与下で5-HTによる抑制効果は観察されなかった。5-HTの修飾効果は濃度依存性に上昇し(C: 斜線内は80%の修飾効果発現を示す濃度領域を示す)、生後発達に伴う有意な抑制効果の増大が観察された(D)。*p<0.05。

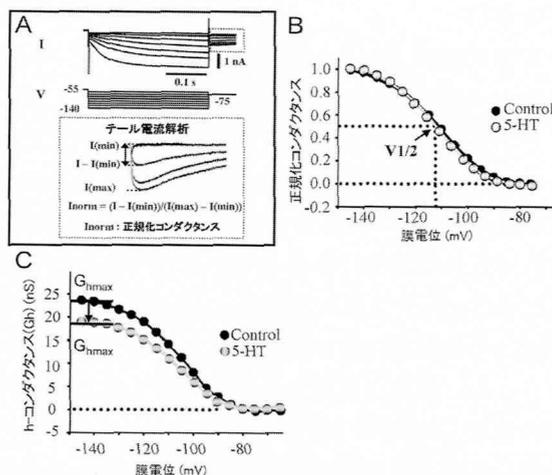


図3: 5-HTによるh-電流活動曲線

A: -140から-50 mVの連続した過分極電位パルスを細胞内通電して、-75 mVに膜電位を保持するとテール電流が観察される。テール電流解析(点線枠内)では、各刺激条件下で誘発されるテール電流を最大振幅値に対する対比として標準化する。B: テール電流解析によるh-電流活動曲線を示す。5-HT投与によるV_{1/2}値(50%のチャンネル開口率を示す膜電位)の変化を始め、明らかな活動曲線の偏位は認めなかった。C: h-電流のコンダクタンス-電位曲線を示す。5-HT投与により、最大h-コンダクタンス値(Gh_{max})は有意に低下した。

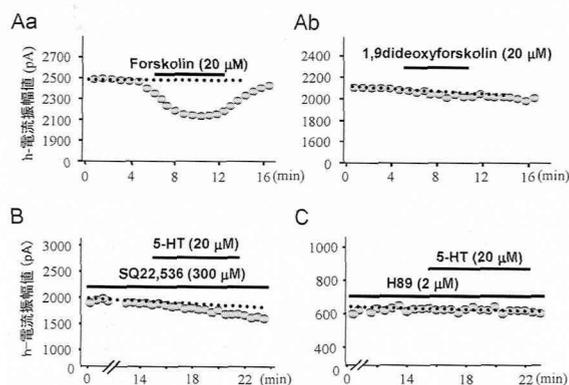


図4: 5-HT依存性h-電流修飾におけるAC-cAMP-PKA伝達経路の関与

Forskolin投与により、h-電流振幅は有意に抑制された(Aa)が、Forskolinの非活性体である1,9 dideoxyforskolin投与時にはh-電流の振幅値に変化を認めなかった(Ab)。SQ 22536(B)あるいはH-89(C)前投与条件下では、5-HTによるh-電流抑制効果は殆ど観察されなかった。

3. 5-HTによるh-チャンネル(電流)修飾作用に關与する5-HT受容体サブタイプの解明

免疫組織化学的検討により、Mes Vには5-HT₁と5-HT₂受容体に対する陽性細胞が優位に観察された(図5, 6)。さらに電気生理学的検討から、5-HTによるh-電流抑制は、特に5-HT_{1A}受容体活性に伴って発現する反応であることが示唆された(図7, 8)。

【考察】

本研究結果より5-HTによるMes Vニューロンのh-電流抑制効果は生後発達の増大し、h-チャンネルのゲート特性変化ではなく、単一チャンネルを通過する電流密度の減少により抑制効果が発現すると考えられた。また本修飾作用は、5-HT_{1A}受容体活性に優位に依存していることや、作用発現にAC-cyclic AMP-Protein kinase Aを介する細胞内情報伝達機構が関わっていることが明らかとなった。対象としたニューロンは生後12日齢までの歯牙未萌出期であるため、末梢感覚受容体の発達を考慮すると、本結果は主に筋紡錘からの投射を受けたニューロンの特性を表していると考えられるものの、脳幹レベルにおいては、咀嚼運動へ移行するためのニューロンの機能分化が既に始まっている可能性も否定できない^{7,9)}ことから、吸啜前期から後期、咀嚼運動への移行期にかけてのMes Vニューロンの機能分化と神経修飾機構を

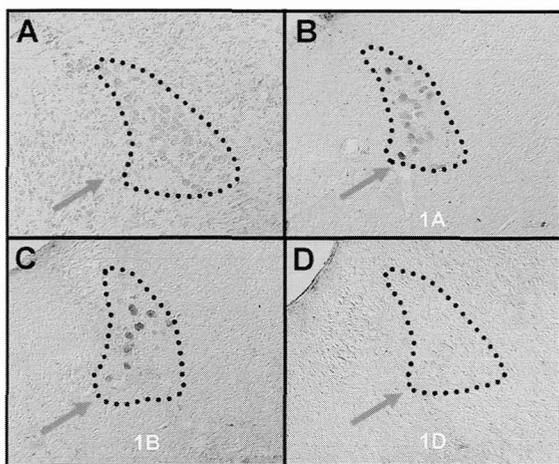


図5：中脳路核における5-HT受容体の発現様相(5-HT₁受容体)

A：ニュートラルレッド染色像。B-D：5-HT_{1A}(B), 5-HT_{1B}(C), 5-HT_{1D}(D)に対する免疫染色像を示す。中脳路核は5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}に対して有意な陽性染色像を示した。

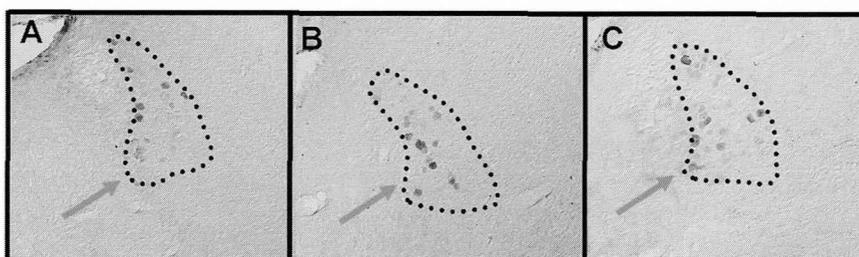


図6：中脳路核における5-HT受容体の発現様相(5-HT₂受容体)

A-C：5-HT_{2A}(A), 5-HT_{2B}(B), 5-HT_{2C}(C)に対する免疫染色像を示す。5-HT_{2A}, 5-HT_{2B}, 5-HT_{2C}共に約半数のニューロンで陽性染色像を示した。

解明する上で、重要な知見を与えるものと考えられる。

【文献】

- 1) Corbin KB and Harrison F (1940) Function of mesencephalic root of fifth cranial nerve. J Neurophysiol 3: 424-35.
- 2) Jerge CR (1963) Organization and function of the trigeminal mesencephalic nucleus. J Neurophysiol 26: 379-92.
- 3) Trueblood PR, Levine MS and Chandler SH (1996) Dual-component excitatory amino acid-mediated responses in trigeminal motoneurons and their modulation by serotonin in vi-

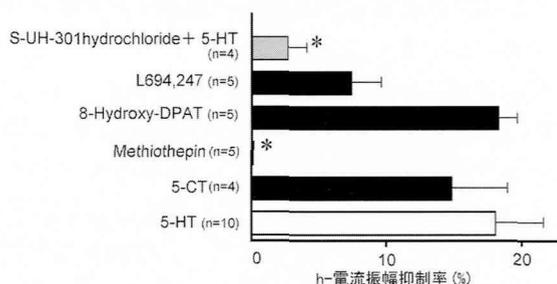


図7：5-HTによるh-チャンネル修飾作用に関与する5-HT受容体サブタイプ(5-HT₁受容体)

5-HT₁受容体の作動薬、拮抗薬に対するh-電流振幅抑制率を示す。h-電流は5-HT_{1A}受容体活性に伴って有意に抑制された。*p<0.01.

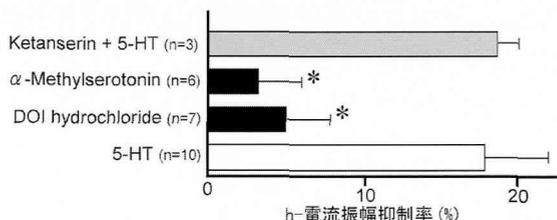


図8：5-HTによるh-チャンネル修飾作用に関与する5-HT受容体サブタイプ(5-HT₂受容体)

5-HT₂受容体の作動薬、拮抗薬に対するh-電流振幅抑制率を示す。5-HT₂受容体活性による明らかなh-電流抑制効果は観察されなかった。*p<0.05.

- tro. *J Physiol* **76** : 2460–73.
- 4) Hsiao CF, Trueblood PR, Levine MS and Chandler SH (1997) Multiple effects of serotonin on membrane properties of trigeminal motoneurons in vitro. *J Neurophysiol* **77** : 2910–24.
 - 5) Hsiao C, Del Negro CA, Trueblood PR and Chandler SH (1998) Ionic basis for serotonin-induced bistable membrane properties in guinea pig trigeminal motoneurons. *J Neurophysiol* **79** : 2847–56.
 - 6) Tanaka S and Chandler SH (2006) Serotonergic modulation of persistent sodium currents and membrane excitability via cyclic AMP–protein kinase A cascade in mesencephalic V neurons. *J Neurosci Res* **83** : 1362–72.
 - 7) Tanaka S, Wu N, Hsiao CF, Turman J Jr and Chandler SH (2003) Development of inward rectification and control of membrane excitability in mesencephalic v neurons. *J Neurophysiol* **89** : 1288–98.
 - 8) Pape HC (1996) Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* **58** : 299–327.
 - 9) Wu N, Hsiao CF and Chandler SH (2001) Membrane resonance and subthreshold membrane oscillations in mesencephalic V neurons: participants in burst generation. *J Neurosci* **21** : 3729–39.

慢性歯周炎に対する炭酸ガスレーザーの作用

中村 哲

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Effect of the carbon dioxide laser on chronic periodontitis

SATOSHI NAKAMURA

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University

【目的・背景】

近年、歯科領域において各種レーザーが応用されつつある。特に炭酸ガス (CO₂) レーザーは深部組織への影響が少なく、効率的に切開や蒸散が可能であることから、口腔外科処置や歯周病治療などに使用されている。このように、CO₂ レーザーは歯科臨床に広く応用されているものの、その臨床効果と生物学的作用について検討した報告は少ない。本研究では、CO₂ レーザーの慢性歯周炎に対する作用を明らかにすることを目的とし、1) ヒト歯肉線維芽細胞と歯周病関連菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) に対する CO₂ レーザーの作用、2) CO₂ レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動について検討した。

【対象と方法】

1) ヒト歯肉線維芽細胞と *P. gingivalis* に対する CO₂ レーザーの作用

96穴のマルチウェルプレートの各ウェルに 5 × 10⁵個のヒト歯肉線維芽細胞を含む100 μl の DMEM を分注し、24時間培養した。培養上清を吸引し、Panalas C 05 Σ[®]CO₂ レーザーと 4A チップを用いてレーザーを照射後、DMEM を添加してさらに72時間培養した。レーザー照射後の生細胞数を MTT 法で算定した。*P. gingivalis* に対する CO₂ レーザーの作用では、BHI 寒天上で形成

された *P. gingivalis* のコロニーを PBS で懸濁して菌液とし、レーザー照射した。嫌気的条件下で96時間培養後、相対菌数を透過光濁度法で算定した。

2) CO₂ レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動

名古屋市高辻歯科クリニックを受診し、臨床研究の主旨を説明してインフォームドコンセントが得られた全身疾患を有しない慢性歯周炎患者のうち、6 mm 以上の歯周ポケットが4歯以上存在する、男性13名、女性13名、計26名 (平均年齢52.6歳) を被験者とした。CO₂ レーザーは、発振波長 10.6 μm の Panalas[®]C 05 Σ を用いた。レーザーの照射条件は、2 W, スーパーパルスモード, エア冷却, 30 sec/tooth とし、7A チップを用いて歯周ポケット内に照射した。レーザー照射前と照射後1~4週における Pocket Probing Depth (PPD), Gingival Index (GI), Clinical Attachment Level (CAL), Bleeding on Probing (BOP) を診査するとともに歯肉溝滲出液 (GCF) を採取して炎症性サイトカインである Interleukin (IL)-1 α, IL-1 β, Tumor necrosis factor (TNF) -α ならびにそれらの阻害物質である IL-1 ra, IL-1 sR II, sTNF R I, sTNF R II の濃度を Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で定量した。

【結果および考察】1) ヒト歯肉線維芽細胞と *P. gingivalis* に対する CO₂レーザーの作用

CO₂レーザーを照射していない対照の吸光度を100%として相対生細胞数を比較すると、ヒト線維芽細胞の生細胞数は、2.5 Jでは有意な減少はみられなかったが、7.5 Jでは78.1% ($p < 0.05$), 12.5 Jで61.6% ($p < 0.05$), 25 Jで33.0% ($p < 0.01$) とそれぞれエネルギー依存的に生細胞数の減少がみられた。一方、*P. gingivalis* に対する作用を検討したところ、2.5 Jの照射で12%の増殖抑制がみられ、照射エネルギー量の増加とともに菌数は減少し、25 Jでは *P. gingivalis* の増殖は阻止された。

2) CO₂レーザー照射による臨床パラメータと GCF 中のサイトカインの変動

臨床パラメータの PPD, BOP ならびに GI

は、照射後2週で改善がみられたが CAL には変化は認められなかった。GCF パラメータを測定したところ、IL-1 α と IL-1 β は照射後1週で有意に濃度が上昇し、その後減少した。TNF- α 濃度も統計学的有意差はないものの、レーザー照射後に上昇し、その後経時的に減少した。一方、IL-1ra 濃度は、レーザー照射後1週と2週で上昇し、IL-1 活性比は、レーザー照射後3週まで有意に低値を示した。また、sTNFR II 濃度は、照射後1週と2週に上昇し、sTNFR II/sTNFR I 比は、照射後1週と2週に高値を示した。

以上の結果から、慢性歯周炎に対する炭酸ガスレーザーの作用として消炎効果が期待されること、さらに、この消炎効果は、炎症性サイトカインに対する阻害物質の誘導により、炎症の進展を抑制している可能性が示唆された。

唾液腺癌細胞におけるドセタキセル交差耐性に関与する MRP7 の発現

榎本 浩子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Multidrug resistance-associated protein 7 expression is involved in cross-resistance to docetaxel in salivary gland adenocarcinoma cell lines

HIROKO NARAMOTO

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University

Naramoto H (2007) Int J Oncol 30 : 393-401.

【目的】

頭頸部癌における抗癌剤多剤併用療法では、唾液腺癌 (SGA) は口腔扁平上皮癌 (SCC) に比べ、治療抵抗性を示すことから、SGA と SCC では薬剤感受性や抗癌剤耐性獲得機構が異なっていると推測される。癌細胞の薬剤耐性には様々な機構が関与し、そのひとつとして、ATP binding cassette (ABC) transporter の関与が考えられる。本研究では、頭頸部癌の主な組織型である SCC と SGA における ABC transporter の発現と抗癌剤耐性獲得機構について検討した。

【材料と方法】

- 1) 頭頸部癌細胞として、マウス SCC 細胞株 Sq-1979, ヒト SCC 細胞株 SCCHA, マウス SGA 細胞株 NR-PG ならびにヒト SGA 細胞株 HSY を用いた。
- 2) 薬剤感受性試験：ドセタキセル (DOC), ビンクリスチン (VCR), シスプラチン (CDDP), ドキソルビシン (DOX) を異なる濃度で添加して培養し, MTT 法で生細胞数を算定した。
- 3) VCR 処理モデル (*in vitro*) : 20%増殖抑制濃度 (IC₂₀) の VCR 含有増殖培地で反復処理し, VCR 耐性細胞を得た。

- 4) RT-PCR 法で遺伝子発現を解析した。
- 5) ペプチド抗原を用いて MRP7 polyclonal antibody を作製した。
- 6) 各培養癌細胞の膜蛋白を抽出し, 蛋白定量後 Western blot を行った。
- 7) 培養癌細胞を用いたヌードマウス異種移植モデルで MDR 1, MRP 1, MRP 7 を免疫細胞化学的に検出した。
- 8) フローサイトメトリーによる細胞内 DOX の蓄積を検出した。

【結果および考察】

- 1) 頭頸部癌細胞における ABC transporter の発現：RT-PCR による検討では, Sq-1979/VCR は, MDR 1, MRP 1, MRP 4, MRP 5 を発現し, NR-PG/VCR では, MDR 1, MRP 1, MRP 3, MRP 5, MRP 7 を発現した。HSY/VCR と NR-PG/VCR は VCR 処理によって MRP 7 の発現が誘導された。Western blot 法では, VCR 処理によって MDR 1 と MRP 1 の発現が増加した。また, HSY/VCR と NR-PG/VCR は MRP 7 の発現がみられた。
- 2) ヌードマウス可移植性腫瘍モデルを用いた MDR 1, MRP 1, MRP 7 の発現：SCCHA/VCR

と HSY/VCR に MDR1 と MRP1 の発現がみられたが, MRP7 は HSY/VCR のみに発現した。

- 3) E₂17 βG と Cyclosporin A による HSY/VCR の DOC 感受性の変化: Cyclosporin A を添加して培養すると, SCCHA/VCR と HSY/VCR の DOX と DOC に対する IC₅₀ 値が低下した。E₂17 βG を添加して培養すると MRP7 が発現している HSY/VCR の DOC と DOX に対する IC₅₀ 値が低下した。また, HSY/VCR では, Cyclosporin A と E₂17 βG を添加して培養すると Cyclosporin A 単独に比べ, DOC に対する IC₅₀ 値は著しく低下した。
- 4) E₂17 βG と Cyclosporin A による細胞内 DOX

の蓄積: Cyclosporin A は, SCCHA/VCR と HSY/VCR の DOX の細胞内蓄積を増加させた。一方, E₂17 βG と Cyclosporin A の存在下では, HSY/VCR における DOX の細胞内蓄積がさらに増加した。すなわち, MRP7 の阻害剤である E₂17 βG によって HSY/VCR の DOC に対する感受性が増加することが明らかとなった。

以上の結果から, 頭頸部癌の薬剤耐性獲得機構には, MDR1, MRP1, MRP7 が関与し, 特に SGA では MDR1 と MRP1 に加え, MRP7 の発現がドセタキセル感受性に影響を与えられた。

顎顔面領域における炎症モデルラット三叉神経節細胞の遺伝子発現動
-カルモジュリンキナーゼと K⁺チャネルの解析-

姫野 勝仁

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

Gene expression patterns in the rat trigeminal ganglion neurons
under orofacial inflammation.

-Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and potassium ion channel-

KATSUHIITO HIMENO

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

姫野勝仁, 奥村雅代, 田中丈也, 時崎匡史, 澁谷 徹, 金銅英二 (2007) 松本歯学 33 : 269-75.

【目的】

顎顔面領域における炎症発痛メカニズムの解明を目的に, ラット炎症モデル動物を用いて炎症発痛関連遺伝子の動態解析を行った。我々は, これまでに三叉神経節細胞の遺伝子動態をマイクロアレイにて網羅的に解析し, 約420遺伝子の発現変化を明らかにしている。これらの結果に基づき個々の細胞レベルにおける発現パターンを追跡調査し, また, 経時的変化についても定量性に優れた Real Time-PCR を行い解析した。

今回は, 特にカルモジュリンキナーゼ (CaMK II β) および K⁺イオンチャネル (KCNK3) の mRNA 発現動態に着目した。

【材料と方法】

SD 雄性ラット (6 週齢) の左側上嘴唇に CFA (Complete Freund's Adjuvant) を 50 μ l 注入した。注入後, 1 日, 3 日, 5 日, 7 日と経時的に三叉神経節を摘出した。新鮮凍結切片 (厚径 5 ~ 10 μ m) を作製し in situ ハイブリダイゼーションを行った。また, 三叉神経節, 組織から total

RNA の抽出精製も行い Real Time-PCR に供した。

・疼痛逃避行動試験

上記のモデル動物を用い, 熱刺激による疼痛逃避行動試験を行った。断水下の動物に対し給水を暗箱に入れて毎日行った。さらに給水時, 左側上嘴唇に対し光を集積した熱刺激を照射し, 照射開始から逃避までの時間 (潜時) を測定した。次に CFA を注入後, 同様の潜時を計測し, 注入前や生理食塩水を注入した群と比較検討した。

・in situ ハイブリダイゼーション

CaMK II β および KCNK3 のジゴキシゲニン (DIG) 標識 RNA プロブを作製した。その後, 恒温槽にてハイブリダイゼーション反応 (55 $^{\circ}$ C, 20時間) をおこなった。洗浄した後, 発色反応を行い光学顕微鏡下で観察した。

・Real Time-PCR

精製したサンプルより cDNA を作製し probe を用いて Real Time-PCR を行い反応蛍光物質を解析装置にて測定した。

【結果】

・疼痛逃避行動試験

CFA 注入1日後から潜時の短縮が見られた。

4日目以降、潜時は戻りはじめ1週間後には対照群との差が認められなくなった。

・in situ ハイブリダイゼーション

三叉神経節において神経細胞のほぼ全てに反応がみられ、CaMK II β 及び KCNK3 共に対照群と CFA 注入群 (3日目) を比較すると CFA 注入群 (3日目) が濃染する傾向が認められた。

・Real Time-PCR

CaMK II β の発現動態においては、1日、3日、5日、7日を通じて対照群と有意な差は認められなかった。また、KCNK3 の注入側においては、対照群と比較して、3日目、5日目、7日目で上昇傾向を示した。

【考察】

今回の炎症モデル動物の三叉神経節細胞において、CaMK II β の mRNA 発現が in situ ハイブリダイゼーションでは強く認められた。一方、Real

Time-PCR では著明な発現変化が検出できなかった。その理由として二つの可能性が考えられる。

・3つの実験 (マイクロアレイ、in situ ハイブリダイゼーション、Real Time-PCR) それぞれに使った検出領域の差が挙げられる。それぞれが異なっている、もしくは重複していても完全に一致するものではないため、選択的スプライシングの存在などの影響により結果そのものや、検出効率が変化する可能性がある。

・CaMK II β は細胞内の Ca²⁺ 濃度に対応した細胞内情報伝達分子であり、炎症による発現変動が現れにくい。

今回、CaMK II β 及び KCNK3 は、両者共に炎症による痛みの伝達との関連が疑われた。しかし、遺伝子発現動態による有意差はなかった。これまでの報告において中枢神経系での CaMK II の機能が確認されている。また KCNK3 においても pH 依存性という特殊なチャネル構造から炎症との関連性は高いと考える。

加齢に伴う歯根周囲歯槽骨の骨改造変化

影山 康子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

Effect of age on alveolar bone turnover adjacent to maxillary molar roots in male rats :
A histomorphometric study

YASUKO KAGEYAMA

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

Misawa Y, Kageyama T, Moriyama K, Kurihara S, Yagasaki H, Deguchi T,
Ozawa H and Sahara N (2007) Arch Oral Biol **52** : 44-50.

【目的】

歯科臨床において、年齢により歯根周囲歯槽骨に相違があることを日々経験している。しかし、加齢に伴う歯根周囲歯槽骨の骨改造活性の基礎的なデータはあまりみられず、不明確な点が多く残されている。本研究では、加齢に伴うラット歯根周囲歯槽骨の骨改造活性を骨形態計測法により定量的に評価し、加齢に伴う骨改造活性の変化を明確にすることを目的とした。

【材料と方法】

6～100週齢のWistar系雄性ラットを10週間隔で11グループ用いた。実験期間は4週間で、歯

根周囲の骨形成活性を計測するため骨ラベリング剤を2週間間隔で計3回投与した。観察部位は

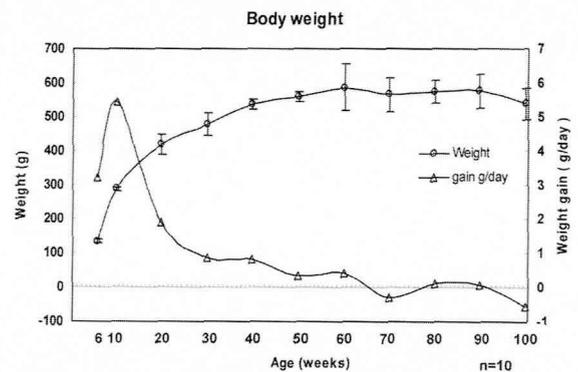


Fig.1：雄性 Wistar ラットの体重変化および1日における体重の増加量の変化

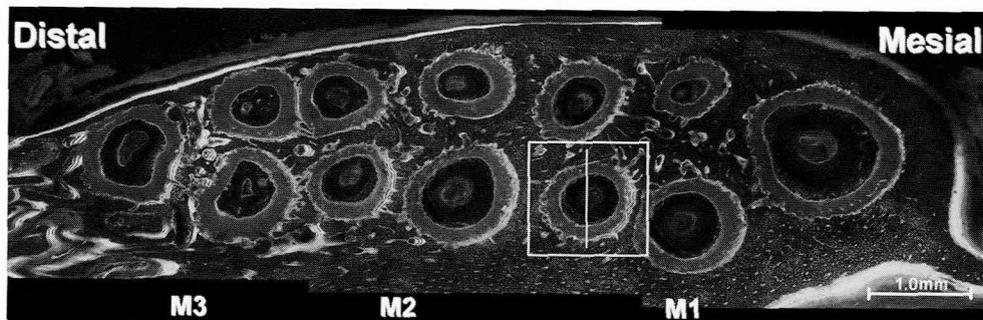


Fig.2：雄性 Wistar ラット上顎骨のラベリング像（10週齢）

M1の遠心舌側根で、咬合面と平行に根分岐部直下から60 μ mの厚さで切片を採取し研磨切片作成後、近心側と遠心側にわけて計測した。さらに同部位を用い、脱灰切片を作製しTRAP染色を行い、近心側と遠心側にわけて骨吸収活性の計測をし、加齢による骨改造変化を骨形態計測をもちい

て観察した。

【結果】

生理的条件下において、体重は6週齢で135g前後であり、50週齢まで増加し約560gとなりその後は100週齢まで大きな変化はみられなかつ

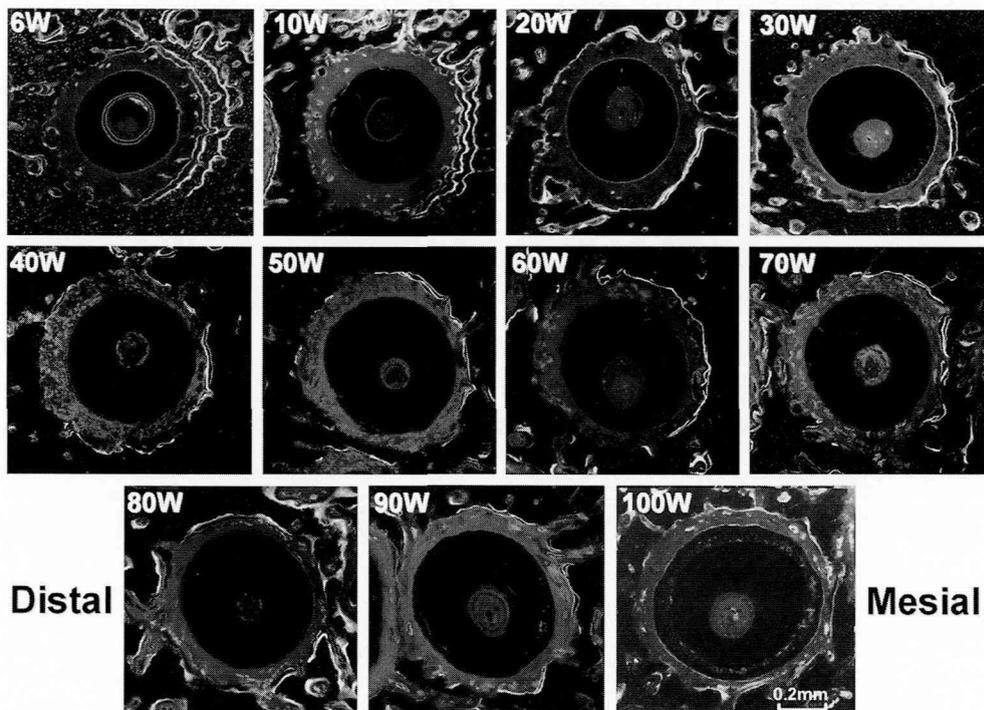


Fig.3 : 6~100週齢の M 1 遠心舌側根周囲歯槽骨のラベリング像

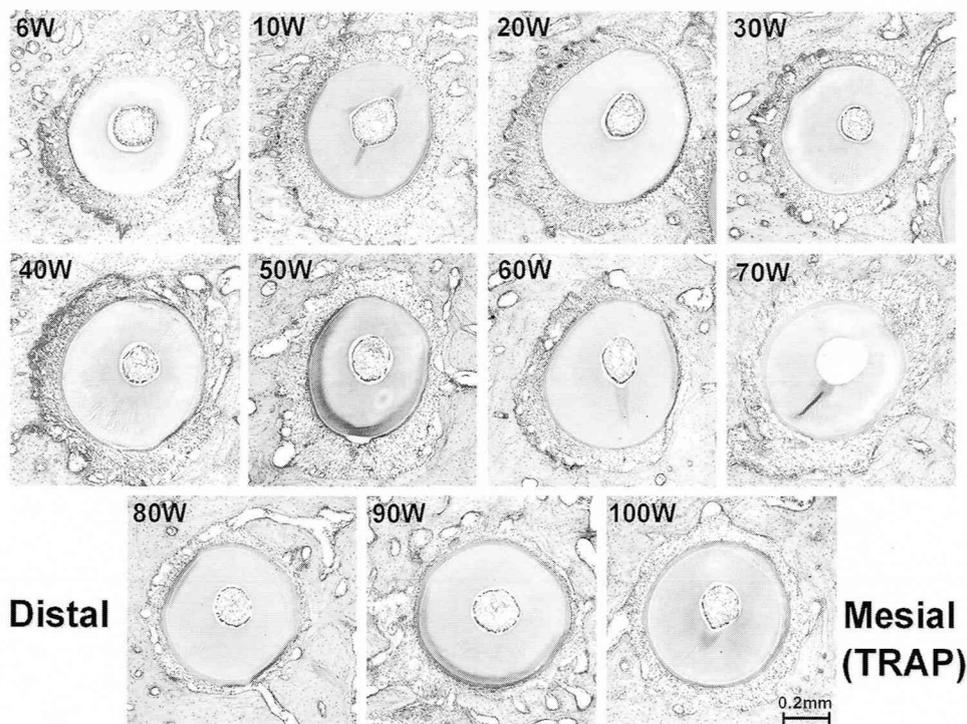


Fig.4 : 6~100週齢の M 1 遠心舌側根周囲歯槽骨の TRAP 活性染色像

た。一日における体重の増加率は6週齢から10週齢まで急激に増加し、その後30週齢にかけて急激に減少し、50週齢まで緩やかに減少し、その後は大きな変化はみられなかった。歯根周囲歯槽骨全周による検索では骨吸収系および骨形成系の全パラメーターは共に加齢に従い減少を示し、6週齢から30週齢にかけて有意に減少し (P<.0001), その後100週齢まで緩やかに減少した。近遠心側による検索においては、2重ラベリング面積および骨形成率では近心側に有意に認められ (P<.0001), 破骨細胞数と骨吸収面積は遠心側に有意に認められた (P<.0001)。また、遠心側における2重ラベリング面積および骨形成率と近心側における破骨細胞数および骨吸収面積は、加齢による有意差が認められなかった。

【考察】

ラット歯槽骨の骨改造活性は加齢により急激な減少が認められた。しかし、100週齢のラットにおいても歯の機能を維持するために歯槽骨では骨吸収、骨形成が認められることが示唆された。

【文献】

- 1) Misawa-Kageyama Y, Kageyama T, Moriyama K, Kurihara S, Yagasaki H, Deguchi T, Ozawa H and Sahara N (2007) Histomorphometric study on the effects of age on orthodontic tooth movement and alveolar bone turnover in rats. Eur J Oral Sci 115 : 124-30.

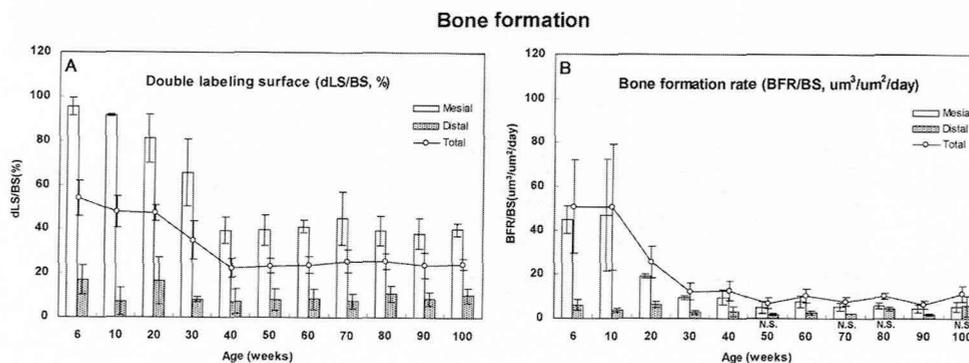


Fig.5 : 6 ~100週齢の M 1 遠心舌側根周囲歯槽骨の骨形態計測法を用いた骨形成量

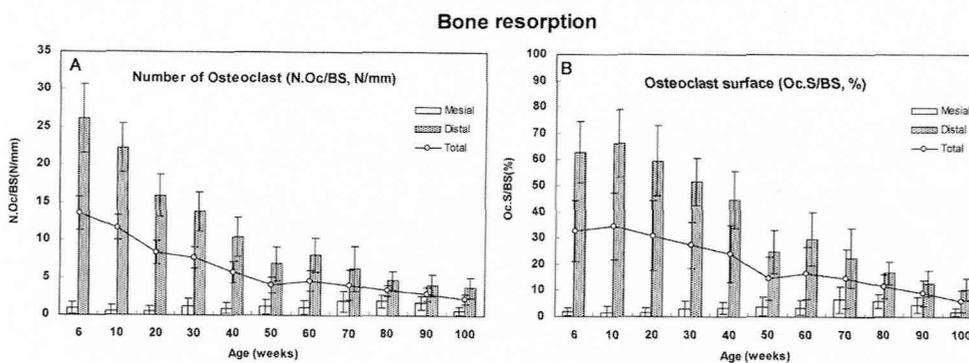


Fig.6 : 6 ~100週齢の M 1 遠心舌側根周囲歯槽骨の骨形態計測法を用いた骨吸収量

Table 1 : 6 ~100週齢の M1 遠心舌側根周囲歯槽骨の骨形態計測法を用いた骨形成率

Table 1. Mineral apposition rate (MAR : um/day)

Age (weeks)	6	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
mean	9.016	6.340	3.371	1.628	1.481	1.073	1.807	1.146	0.605	0.298	0.658
S. D.	1.114	0.700	0.506	0.182	0.286	0.339	0.237	0.272	0.138	0.113	0.109
significance		S.	S.	N.S.							

Symbol (S.) indicate the level of significance at P<0.0001. : N.S. No sinificance. n=8

球状ヒドロキシアパタイトの加熱処理による骨芽細胞への効果

浅見 彩路

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

In vitro effects of heat treatment of hydroxyapatite on osteoblasts

AYAJI ASAMI

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

ヒドロキシアパタイトは、インプラント手術の際には骨補填材としてだけでなく、インプラント体表面のコーティング材としても使用されている¹⁾。そこで、我々は早期に術後組織を治癒促進させるアパタイトを開発することによりインプラント手術の成功率を高められるのではないかと考えた。外科的侵襲によって酸性化した組織を早期に中和させるため、Ca/Pモル比を変化させた非晶質リン酸カルシウムを加熱処理することにより、高結晶で高いアルカリ性を有するアパタイトを試作した。骨形成に関しては、アルカリホスファターゼは石灰化に関与する骨芽細胞の重要なマーカーであり²⁻⁵⁾、Caイオンの濃度によりアルカリホスファターゼ活性が増減するといった報告もされている⁶⁾。そこで、非晶質なリン酸カルシウムと結晶化させたアパタイトの形状・性状を調べるとともに、これらアパタイトのpH付与の経時変化、Ca溶出性、アルカリホスファターゼをマーカーとする骨芽細胞の分化に対して検討した。

【材料と方法】

Ca/Pモル比を変化させた4種類の試作ヒドロキシアパタイトを900℃の温度で各々6時間の加熱処理を行い、ヒドロキシアパタイトの表面の走査型電子顕微鏡による観察、X線回折、pHおよ

びCaイオンの溶出量を測定した。また、マウスの頭蓋骨からコラゲナーゼ処理により採取し7日間培養した骨芽細胞様細胞に4種類の試作アパタイトを播種し、その後アルカリホスファターゼ活性の顕微鏡による観察および活性値の測定を行った。

【結果】

試作ヒドロキシアパタイトアパタイトを浸漬した溶液中のpHを1ヵ月にわたり測定した結果、加熱処理ヒドロキシアパタイトは非加熱処理ヒドロキシアパタイトに比べ高いpHを示し、強アルカリ性のヒドロキシアパタイトはpH減弱の変動差が小さく、アルカリ性の持続傾向が認められた。また、同様に試作ヒドロキシアパタイトを浸漬した溶液中のカルシウムイオン溶出量を測定した結果、加熱処理ヒドロキシアパタイトは非加熱処理ヒドロキシアパタイトに比較してカルシウム溶出量が高値であった。ヒドロキシアパタイト無添加のコントロール群に比べ、非加熱処理ヒドロキシアパタイト添加群は、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性値の低下がみられた。一方、加熱処理ヒドロキシアパタイト添加群においては、非加熱処理ヒドロキシアパタイト添加群に比べて、アルカリホスファターゼ活性値の上昇が認められた。ヒドロキシアパタイト無添加のコントロール群に比べ、非加熱処理ヒドロキシアパタイト

ト添加群は、骨芽細胞のタンパク量の減少が認められた。一方、加熱処理ヒドロキシアパタイト添加群は非加熱処理ヒドロキシアパタイト添加群に較べてタンパク量の増加が認められた。

【考察】

加熱処理ヒドロキシアパタイトによる骨芽細胞の分化促進が認められ、本実験では、中性の培養液に高アルカリ性を有するヒドロキシアパタイトを加えて骨芽細胞を培養した場合、アルカリホスファターゼ活性を促進する効果が認められた。今後は、培養液を酸性にして強アルカリ性のヒドロキシアパタイトを加えた場合のアルカリホスファターゼ活性を確認する必要があると思われる。今後、加熱処理ヒドロキシアパタイトによる骨芽細胞の分化促進の作用メカニズムの解明のため、ヒドロキシアパタイトからのCaイオン溶出がこ

の現象に起因するか否かを含めて検討していく必要がある。

【文献】

- 1) 田中 收 (2001) ハイドロキシアパタイト (HA) コーティングインプラントの現状, インプラントジャーナル **6**: 9-20, ゼニス出版, 東京.
- 2) 和島武毅 (1997) ヒト由来骨芽細胞様細胞株 Human osteosarcoma cell line (HOS) に対する持続的圧縮力の及ぼす影響. 日矯歯誌 **56**: 83-91.
- 3) 庄村兼治 (1997) 骨芽細胞様細胞株 MC 3 T 3-E 1 の増殖と石灰化に及ぼすパルス電磁場刺激の影響. 日矯歯誌 **56**: 211-23.
- 4) 織井弘道 (1999) 骨芽細胞様細胞の細胞増殖, 石灰化物形成および細胞外マトリックス成分の発現におよぼすカルシウムイオンの影響. 日大歯学誌 **73**: 558-66.
- 5) 須田立雄, 小澤英浩, 高橋栄明 (1985) 骨の科学, 129-54, 医歯薬出版, 東京.

口腔顔面慢性疼痛モデルラットの副腎皮質における 機能的ならびに微細構造学的解析

矢ヶ崎利衣子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

The functional and ultrastructural analyses of adrenal cortex in the rat model with
chronic orofacial pain

RIEKO YAGASAKI

*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University*

【目的】

TMD, いわゆる顎関節症のさまざまな徴候の複合的な病態因子の一つである筋症状について, 近年, 線維筋痛症(FMS: fibromyalgia syndrome), すなわち慢性筋痛, 痛覚過敏, allodynia, および精神症状を呈する症候群とほぼ同様な範疇内の症状として論じられることが多い^{1),2)}. FMSの病因はまだ明らかではないが, 内分泌調節系, すなわち視床下部-脳下垂体前葉-副腎皮質系(HPA系)の関与に関心が集まり, 有力な仮説として神経内分泌学的外乱が要因となり悪循環を引き起こすという説が提唱され³⁾今日に至っている. しかしながら, 慢性疼痛に至る病態形成過程への慢性疼痛モデル動物を用いた内分泌調節系の関与の解明を目的とした研究は非常に少ない⁴⁾. Bennetら⁵⁾は, ラットの坐骨神経を軽く結紮する方法(chronic constriction injury, CCI)により, 当該神経支配領域に慢性疼痛様症状が発現することを明らかにしているが, 以来, 口腔顎顔面領域でも応用され眼窩下神経を結紮するCCIモデルラットも報告されている. そこで, 本研究は, 口腔顔面痛と内分泌調節系との関係を明らかにすることを目的としてラットの眼窩下神経にCCIを施した慢性疼痛モデルラットを作製し, 次いで副

腎皮質の内分泌学的病態を機能的ならびに微細構造学的に解析した.

【材料と方法】

実験には, Wister系ラットのオスを用いた. ペントバルビタールナトリウム麻酔下にて眼窩下神経をChromic gutで緩めに結紮する群と皮膚切開のみの偽手術対照群に分けて実験を行った. 疼痛発症の評価には, 眼窩下神経支配の顎顔面領域にvon Frey hairを用い, 圧力をかけた時の逃避行動を, 術前と術後25, 30, 35, 40, および45日後の5回観察した. (タッチテスト)さらに, 術後45日目に血液と副腎を採取し, 血中コルチコステロンならびに副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)量の測定と副腎皮質の微細構造学的解析を行った.

【結果】

慢性疼痛の発症を評価するタッチテストの結果, CCIモデルラット群で, 術後25~45日目においてコントロール群と比較し逃避行動指数が増加し, CCIにより慢性疼痛様症状が持続していることが確認された.

ラットの作用型グルココルチコイドであるコル

チコステロンの血中濃度は CCI モデルラット群で、コントロール群と比較して有意に低下していた。一方、血中 ACTH 濃度は CCI モデルラット群とコントロール群との間に有意な差は認められなかった。

術後45日の副腎皮質の組織像を観察した結果、CCI ラットの束状帯では、コントロールラットと比較して脂肪滴が増加した。さらにその異常な集積は、Li ら⁶⁾がホルモン感受性リパーゼ欠損によりステロイドホルモン産生に異常をきたしたマウスの副腎皮質で観察した Syncytial-lipid structures (SLS) に類似していた。また、透過電子顕微鏡の観察により、CCI ラット副腎皮質の束状帯細胞が、不規則な内部構造を持つ膨化した脂肪滴や変性したミトコンドリアで占められ、SLS が脂肪滴や変性ミトコンドリア、コレステリン結晶をも含む巨大な集合体であることが示された。

【考察】

これらの結果から、眼窩下神経を Chronic gut による CCI モデルラットは、顎顔面領域の機械的刺激に対して慢性疼痛様反応を発現し、HPA 系の内分泌異常を引き起こすことが示唆された。副腎皮質束状帯ではステロイドホルモンの原料となるコレステロールの貯蔵を示す脂肪滴の増加の他、多数のステロイドホルモン合成酵素の局在が指摘されているミトコンドリアの変性が認められ、ステロイドホルモンの合成能が低下していることを示唆した。通常の組織像から合成されるス

テロイドホルモンを特定することは出来ないが、同ラットの血中コルチコステロン値が低下していることから、CCI モデルラットにおいて、副腎皮質でのコルチコステロンの産生能が低下している可能性が強く示唆された。

【文献】

- 1) Stohler CS (2001) Chronic orofacial pain : is the puzzle unraveling? *J Dent Educ* **65** : 1383-92.
- 2) Hedenberg-Magnusson B, Ernberg M and Kopp S (1997) Symptoms and signs of temporomandibular disorders in patients with fibromyalgia and local myalgia of the temporomandibular system. A comparative study. *Acta Odontol Scand* **55** : 344-9.
- 3) Geenen R, Jacobs JW and Bijlsma JW (2002) Evaluation and management of endocrine dysfunction in fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am* **28** : 389-404.
- 4) Ulrich-Lai YM, Xie W, Meij JT, Dolgas CM, Yu L and Herman JP (2006) Limbic and HPA axis function in an animal model of chronic neuropathic pain. *Physiol Behav* **88** : 67-76.
- 5) Bennett GJ and Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33** : 87-107.
- 6) Li H, Brochu M, Wang SP, Rochdi L, Cote M, Mitchell G and Gallo-Payet N (2002) Hormone-sensitive lipase deficiency in mice causes lipid storage in the adrenal cortex and impaired corticosterone response to corticotropin stimulation. *Endocrinology* **143** : 3333-40.