

鹿児島大学歯学部紀要

Annals of Kagoshima University Dental School

Volume 35

2015

— 目 次 —

【巻頭言】

羊の年の大学改革…………… 歯学部長 松口 徹也 … 1

【総説論文—退職教員—】

機能性修復材…………… 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野 鳥居 光男 … 3

老化に伴うラットの味覚嗜好性の変化

… 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療学専攻 生体機能制御学講座 口腔生理学分野 原田 秀逸・他 … 11

Are our scintigraphic results useful as a clue for interpreting kinetics of nuclear agents ?

… 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 腫瘍学講座 顎顔面放射線学分野 佐藤 強志 … 21

【特集—学部長インタビュー—】

歯学部の未来を考える～新学部長へのインタビュー…………… 29

【総説論文—教授・准教授・講師就任教員—】

歯冠補綴治療における接着技法の現状

… 鹿児島大学大学院医 歯学総合研究科 先進治療学専攻 顎顔面再建学講座 咬合機能補綴学講座 南 弘之 … 35

神経系の骨芽細胞分化・機能への関与について

… 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療学専攻 神経病学講座 歯科機能形態学分野 後藤 哲哉 … 45

口腔癌幹細胞を標的とした新規診断治療法の可能性

… 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療学専攻 顎顔面機能再建学講座 顎顔面疾患制御学分野 杉浦 剛 … 53

上顎欠損患者の補綴治療 —顎義歯難症例を中心に—

… 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 成人系歯科センター義歯補綴科 村上 格 … 61

口腔微生物学分野 講師就任にあたりましてのご挨拶と抱負

… 鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 発生発達教育学講座 口腔微生物学分野 松尾(川田)美樹 … 73

小児の摂食嚥下リハビリテーション

… 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 発達系歯科センター 小児歯科 佐藤 秀夫 … 77

【原著】

連続切片の *in situ* ハイブリダイゼーションを利用した遺伝子発現の3次元再構築法

… 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療学専攻 神経病学講座 歯科機能形態学分野 山中 淳之・他 … 87

【鹿児島大学歯学部発表論文】

2013年 SCI(または JCR) リスト雑誌に公表された業績(IF 2013)…………… 93

鹿 歯 紀

Ann. Kagoshima Dent.

鹿児島大学歯学部紀要投稿規定

1. 本誌は歯科医学の研究や教育に関して特定のテーマに基づき、総説あるいは啓発的・解説的な論文を主体に掲載する。本学部の教員は下記の規定に従い、誰でも投稿することが出来る。投稿論文の採否は、編集委員会が決定する。
 2. 本誌は年1回発行する。
 3. 論文の掲載は受理の順とする。ただし編集委員会より特に依頼した原稿については、別に委員会が定める。
 4. 掲載料は無料とし、別刷50部を贈呈する。
 5. 原稿はA4版にワープロで作成し、必要により、CDをつけて提出する。
 6. 表紙(原稿第一枚目)には、1)表題、2)著者名、3)所属、4)欄外見出し(和文25字以内)、5)図表の数、6)原稿の枚数、7)別刷請求部数(朱書)、8)編集者への希望などを書く。
 7. 英文抄録(Abstract)をつけ、その表紙には、1)タイトル、2)著者名、3)所属、4)Key words(5 words以内)、5)抄録本文は250語以内とする。
 8. 和文中の外国文字はタイプとし、和綴りにするときは片かなとする。イタリック指定をしたいところは、アンダーラインを引きその下にイタリックと書く。動物名などは原則として片かなを用いる。単位及び単位記号は、国際単位系による。
 9. 本文の欄外に赤字で図表を挿入すべき位置を指定する。
 10. 項目分は、I, II, …… さらにA, B …… さらに1, 2 …… さらにa, b …… というように分ける。
 11. 文献表の作り方
 - 1) 本文中に文献を引用するときは文中の該当する箇所または著者名の右肩の引用の順に従って、番号を付ける。3人以上連名の場合は、“ら”または“et al.”を用いる。

例1：前田ら³⁾によれば ……
例2：Hodgkin & Huxley¹⁾によれば ……
 - 2) 末尾文献表は引用の順に整理し、本文中の番号と照合する。著者名は、et al. と略さず全員を掲げる。
 - 3) 雑誌は著者：表題、雑誌名、巻、頁(始-終)、西暦年号の順に記す。
 - 例1：3) 前田敏宏, 渡辺 武, 水野 介, 大友信也：B型肝炎ウイルスに対するモノクローナル抗体. 細胞工学, 1, 39-42, 1982
 - 例2：1) Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. : The components of membrane conductance in the giant axon of *Loligo*. J. Physiol. (Lond.), 116, 473-496, 1952
 - 4) 単行本は著者名, 書名, 版数, 編集名, 章名, 引用頁, 発行所, その所在地の順に記す。論文集などの場合は雑誌に準じるが, 著者名:章名, 書名, 版数, 編集名, 引用頁, 発行所, 所在地, 西暦年号の順に記す。

例1：金子章道：視覚・感覚と神経系(岩波講座現代生物化学8), 初版, 伊藤正男編, 38-57, 岩波書店, 東京, 1974
例2：McElligott, J. G. : Chap 13, Long-term spontaneous activity of individual cerebellar neurons in the awake and unrestrained cat., In; Brain Unit Activity during Behavior, 1st ed., M. I. Phillips, Ed., 197-223, Charles C. Thomas, Springfield, 1973
 - 5) 孫引きの場合は原典とそれを引用した文献及びその引用頁を明らかにし, “より引用”と明記する。
 - 6) 雑誌名の省略名は雑誌により決めてあるものについてはそれに従い, 決めてないものについては日本自然科学雑誌総覧(1969, 日本医学図書館協会編, 学術出版会)またはIndex Medicusによる。これらにないものについては, 国際標準化機構の取り決めISO R4(ドクメンテーションハンドブック, 1967, 文部省, 大学学術局編, 東京電気大学出版局, 39 - 42頁参照)に従う。
12. その他
集会などの内容紹介, 海外だより, ニュース, 討論, 意見, 書評, 随筆など歯科医学または歯科医学者に関係あるあらゆる投稿を歓迎する。但し, 採否は編集委員会が決定する。
 13. 本紀要に掲載された論文, 抄録, 記事等の著作権は, 鹿児島大学歯学部へ帰属する。

編集委員
佐藤 友昭, 嶋 香織
南 弘之
(50音順)

巻頭言

羊の年の大学改革

歯学部長 松口徹也

平素より鹿児島大学歯学部の活動にご理解とご協力をいただき、厚くお礼申し上げます。私こと2014年4月より、口腔生化学講座の教授職に加えて歯学部長の責務を兼任させていただいております。このたび鹿児島大学歯学部紀要第35巻を皆様にお届けできることを、歯学部長として喜ばしく思います。

今年2015年は羊の年になります。羊の歯に関する話を1つさせていただきます。成長した羊には32本の歯があり、うち8本が門歯になります。門歯は4才までに生え揃い、それ以降は失われても補われることはありません。羊は上手く飼えば20年位生きますが、放牧した羊は4才を過ぎると次第に数が減っていくそうです。羊の様な反芻動物にとって、しっかり噛めなくなることは命取りなのです。人の世界でも高齢者医療で噛む力の大切さが叫ばれるようになってきましたが、改めて歯の大切さを思い出させる話です。

2015年はまた、鹿児島大学を始めとする国立大学法人にとってとても重要な年になります。4月1日から学校教育法と国立大学法人法の改定により学長の権限が強化され（ガバナンス改革）、学長を中心とした大学改革が本格化することになります。最近種々のメディアで取り上げられることも多い大学改革ですが、国が国立大学法人に求める変化とはどのようなものかご存じですか？その内容はもちろん多岐に渡りますが、個人的に考える2つのキーワードは、「ミッション（使命）の再定義」と「グローバル（国際）化」です。学部長は学部の代表者として大学全体の運営に関わることが求められ、歯学部の会議のみでなく大学本部での会議にも頻回に呼び出されることも多くなりますが、この2つは耳にタコができる位に何度も聞かされている言葉です。

「ミッションの再定義」とは、現況と社会の要望に合わせて、各々の大学の使命についてしっかり考え直してみようとするものです。鹿児島大学のような地方

大学の場合は、所謂「ミニ東大」を目指すのではなく、それぞれの地域に根付き、多かれ少なかれ地域の核となることを要求されます。鹿児島大学歯学部の場合も、最近行ったミッションの再定義において、離島を含めた南九州地域の歯科医療を担う旨を強調しています。地域重視のミッション以外にも、他の大学にない特徴的な研究や教育を強化していくことも重要なミッションの1つです。少し前の流行歌の文句を借りれば、「ナンバーワンにならなくても、オンリーワンを目指せ。」とでも言えるでしょう。

2つめのキーワードである大学の「グローバル化」は昔からよく言われてきたことで、何を今さらと思われるかもしれませんが、国が現在各大学法人に求めているのは、「開かれた大学にしましょう。」とか、「研究の国際協力を推進します。」というような聞こえの良い抽象的な掛け声ではなく、厳密な“hard evidence”（動かぬ証拠）です。例えば単に「海外からの留学生を増やします。」と言うのではだめで、「過去3年間で留学生が〇〇人増え、来年までにさらに〇〇人増やします。」などといった具体的なものである必要があります。他にも、「各部署における外国人教員の割合」とか、「職員のTOEIC（国際的英語能力検定試験）スコア」など、具体的な数字の目標を掲げ、それを期限までに確実に達成することが求められます。

その性急さの是非はとにかくとして、求められている改革の方向は真つ当なものですし、全国の国立大学法人はその方向に向かっています。立ち遅れてしまった大学は、国からの十分なサポートを得られなくなる可能性が高いからです。このような周囲の潮流に乗り遅れないよう、いやできればそれに先んじるように鹿児島大学歯学部も変わっていかなければいけません。もちろん、私達の学部には素晴らしい伝統と守らなければならない大切な個性もあり、それを全て変えようというわけではありません。しかし、伝統に固執するあまり、必要な変革の機を失ってしまえば、結果とし

て「座して死を待つ」ことになりかねません。現在はそんな時代なのです。

巻頭言の性格上詳細な具体的記述は控えさせていただきますが、私共歯学部では現在、英語授業の導入を含めた大胆な授業カリキュラム改革や、北米・東南アジア等の歯科大学との学部間学術協定の新たな締結と学部生レベルでの国際交流の開始、学生離島実習の与論・奄美・種子島3島への拡充など、多くの新たな試みを既に開始しています。これら新たな潮流の幾つかについては、この歯学部紀要の記事（私自身のインタビュー記事も掲載されるそうです）を通して知って頂けると思います。

最後になりますが、ご縁あって学部長に選出していただいたわけですので、他の関係者の皆様に負けない熱意をもって今後の学部業務に向き合っていく所存です。干支の羊にあてられる「未」の字は、「未完成で成長途上にあること」を意味します。今後とも、より良い学部への成長のために関係者の皆様のご支援とご協力を賜りますよう、宜しくお願い申し上げます。

機能性修復材

鳥居 光男

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科歯科保存学分野

Functional Restorative Materials

TORII Mitsuo

Department of Restorative Dentistry and Endodontology
Kagoshima University
Graduate School of Medical and Dental Sciences

ABSTRACT

The restorative materials have been developed on the basis of the idea that they should be tough and stable. They must bear the bite pressure and oral environment. We have tried to realize it by making restorative materials tough and inert. Fundamentally, restorative materials are not influenced by and do not work upon surrounding environment.

On the other hand, researchers have tried to give some functions to restorative materials for example antibacterial activity. They tried to reconcile material's stability and functional activity by using various methods.

This article reviewed trials to give several functions to restorative materials.

Key words: restorative materials, antibacterial activity, antiplaque activity, whitening activity

I はじめに

保存修復学は「歯の硬組織の疾患および異常による実質欠損の人工材料による修復法を考究することにより歯の形態、機能、審美性の回復を図り、さらにそれにより歯質、歯髄、歯周組織疾患の継発を防止し、全身の健康増進に寄与する学問」と定義されている。従って保存修復に使用される人工材料（修復材）は、歯の硬組織実質つまりエナメル質や象牙質の代替材料として咬合力や、口腔環境に耐えるため強靱な機械的強度と、物理的ならびに化学的な安定性を求められる。これらの要求を満たすために修復材料は強靱で inert、外部からの影響を受けない代わり、外部に対しても働きかけをせずじっとその場に居続けることを目標に開発が進められてきた。

しかし、旧来の修復材料に外部に対して何らかの働

きかけをするものがなかったかというところでもない。代表的なものとして古くに使われていたケイ酸セメントが挙げられる。本セメントは粉末にフッ化物を含有しており、充填後セメント硬化物から溶出したフッ化物が歯質に取り込まれることにより歯質が強化され、抗う蝕性が高まることが知られている¹⁾。また、ケイ酸セメントの改良型ともいえるグラスイオノマーセメントでも同様の機序で歯質強化作用があることが知られている^{2,3)}。しかし、このフッ化物は歯質強化を狙って加えられたものではなく、これらのセメントの粉末が基本的にガラス質であり、製造時に材料を加熱融解する際にフラックスとして加えられる氷晶石 (Na_3AlF_6) や蛍石 (CaF_2) に由来するものである。従って意図的に歯質強化機能を付与したのではない。

意図的に修復材に機能性を付与するために添加さ

れ、成功を取めたものとしては、HY剤（タンニン・フッ化物合剤）が挙げられる⁴⁾。本剤は大阪大学の山賀らによって開発されたもので、日本古来の“お歯黒”を施した歯にはう蝕がすくなくところから着想された⁵⁾。タンニンは獣皮のなめし加工にも用いられ、生皮タンパク質のコラーゲン分子に橋かけ結合をおこし革に変える。このようなタンニンとフッ化物を合剤で使い、歯の有機質と無機質の両方を強化しようとした。本材を配合したセメントを充填すると周囲歯質の無機質は耐酸性が上昇し、象牙質コラーゲンはコラゲナーゼに対する抵抗性が上昇する⁶⁾。細菌に対しては抗菌作用を発揮する⁷⁾。HY剤は株式会社松風が製造販売する充填用ハイボンド グラスアイオノマーセメントをはじめハイボンドシリーズとして合着用グラスアイオノマーセメント、カルボキシレートセメント、リン酸セメント、ユージオールセメント、テンポラリーセメント、ライナー等多くのセメント類に添加され広く使われている。HY剤の作用にはエビデンスがあり、日本歯科保存学会編の「う蝕治療ガイドライン」⁸⁾においても、暫間的間接覆髄法（深在性う蝕を有するが歯髄が健康あるいは可逆性歯髄炎と判断され、軟化象牙質を完全除去すると露髄の可能性がある場合、意図的に軟化象牙質を一部残して覆髄し再石灰化や修復象牙質の生成を促したのちに完全除去する）に使用する覆髄材として水酸化カルシウム製剤とならんでタンニン・フッ化物合剤配合カルボキシレートセメントがう蝕関連細菌を減少させ、う蝕象牙質を硬化させるとして推奨されている。

II レジン系材料への機能性の付与の意義

コンポジットレジンはその機械的強度と歯質接着性の改良により非常に優れた修復材料となり、前歯部・臼歯部を問わずまた、部位も含め適用範囲が広がり、今日では保存修復に使用される材料の大部分を占めるまでになっている。しかし、歯質接着性の向上とともに二次う蝕の頻度は減少してきてはいるが、まだ完全ではなく接着性も永久的なものではないので、いずれは次第に破壊されると思われる。二次う蝕は、修復物と窩壁の間に生じる微少漏洩（マイクロリーケージ）にう蝕原性菌が侵入して生じる。したがって、いずれは生じるであろうマイクロリーケージに備え、あらかじめ抗菌剤を配置しておくことは二次う蝕抑制の観点から意義あることと考えられる。

さらに、健全な歯面と修復物上の細菌の付着量を比較した研究によると、咬合面を除いて健全歯面より修

復物上の方が細菌の量が多いことが報告されている⁹⁾。これは、ある意味当然といえる。言うまでもなく、う蝕は感染症であり特に平滑面う蝕の発症には細菌の定着およびプラークの蓄積が必要である。したがって、平滑面う蝕のある場所はもともとプラークの蓄積しやすい部位といえる。そのため、修復後も細菌付着が多くなると考えられる。しかし、修復材料間で比較すると、他の材料よりコンポジットレジンの方が多くの細菌が付着している^{10,11)}。これは、マトリックスレジンから溶出する未重合モノマーが、ミュータンス連鎖球菌が産生するグルカン合成酵素（グルコシルトランスフェラーゼ）の活性を増強することが一因と考えられている¹²⁾。表面にプラークが蓄積することは、コンポジットレジン自体の劣化を引き起こすのみならず、二次う蝕の原因ともなりうる。

以上のことから、コンポジットレジンに抗菌性や抗プラーク性の機能を付与することは有効な二次う蝕予防措置となりうると思われる。

また、う蝕が歯面に定着した細菌の産生する酸による脱灰が原因というところから、歯面やコンポジットレジン修復物の表面を抗菌性レジンでコーティングし、細菌の定着と酸の歯質への拡散を防止することは、う蝕ならびに二次う蝕の防止の観点から有効な手段であると考えられる。

III 抗菌剤添加による抗菌性付与

修復材料に抗菌性を付与することにより修復物表面へのプラークの付着を抑制するというアイデアは以前よりあり、多くの試みがなされている¹³⁻¹⁹⁾。特にコンポジットレジンに関してはクロールヘキシジンを用いた研究が多く報告されている。しかし、これらの研究はすべて単に薬剤をコンポジットレジンに練り込んだだけの物で、修復物から周囲に溶出して来る薬剤によって抗菌性が発揮される。従って、当初は強い抗菌性を示すが、徐々に抗菌性は低下し薬剤の溶出が止まると当然抗菌性もなくなる。しかも、薬剤の抜けた後はvoidとなり水などが浸入し、物性の低下を来し変色の原因ともなる。さらに、溶出した薬剤はプラーク細菌叢のみならず周囲の口腔細菌叢ひいては他部の消化管細菌叢にまで影響をおよぼす可能性がある。このような薬剤溶出型の欠点を克服した抗菌性の付与を考えた場合、薬剤非溶出型あるいは薬剤溶出型でも薬剤が一方向的に溶出するのではなく、必要な時にのみ薬剤が溶出し、しかもできれば抗菌剤をリチャージできるような新たなドラッグデリバリーシステムを構築する

必要がある。

IV グルカン分解酵素固定化による抗プラーク性の付与

主要なう蝕原性菌であるミュータンスレンサ球菌は、グルカン合成酵素を産生し食餌中のスクロースより非水溶性・粘着性のグルカンを合成し、それにより歯面に定着してプラークを形成する。この性質が同球菌のう蝕原性因子のひとつとされている²⁰⁾。このグルカン合成を阻害あるいは産生されたグルカンを分解すれば、プラーク形成が阻害されると考えられ、グルカン分解酵素を配合した歯磨材が市販されている。また、ベースレジンにグルカン分解酵素を固定化して抗プラーク性を付与することが報告されている。

安永らは、Bis-GMA-TEGDMA系ベースレジンに重合可能でカルボキシル基を持つ化合物としてメタクリル酸を加えて重合硬化物を作成し、縮合試薬であるN-エチル-5-フェニルイソキサゾリウム-3'-スルホナート(ウッドワード試薬K)でカルボキシル基を活性化した後、デキストラナーゼを加え、レジンのカルボキシル基とデキストラナーゼのアミノ基とをペプチド結合させることにより固定化した。このデキストラナーゼ固定化レジンの表面では*S. mutans*のグルコシルトランスフェラーゼによるグルカン合成が70%阻害され、また人工プラークの付着も抑制された。メタクリル酸添加レジンを微粉砕しデキストラナーゼを固定化した物をフィラーとして用いることにより、コンポジットレジンに抗プラーク性を付与できると考えられる²¹⁾。

V 非溶出型抗菌性の付与

充填用コンポジットレジンのシステムは、コンポジットレジン本体の他に、歯質接着性に欠かすことのできない歯面処理材(セルフエッチングプライマー、ボンディングレジン等)で構成されている。前述のようにレジン硬化後に溶出してくる未重合モノマーには、グルカン合成の促進作用があるが、その他の酸性の強いエッチング材や重合触媒として含まれる3級アミン等抗菌性を有する成分が含まれている²²⁾。しかし、それらの抗菌性は重合が完了すると消失する。また、操作の上からも未重合状態で歯面に接する時間はせいぜい1分前後である。従って、重合後も抗菌性を保持させるには、積極的な抗菌剤の配合が必要となる。しかも、前述のように単に抗菌剤を添加するのではなく非溶出型にするデザインが必須になる。

今里らはレジンに非溶出型の抗菌性を実現させる方

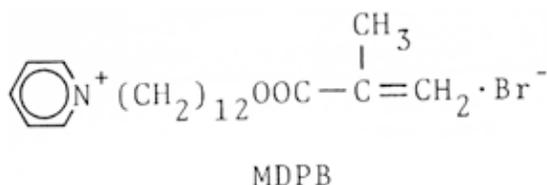


図1 抗菌性モノマー 12-methacryloyloxy-dodecylpyridinium bromide (MDPB)の構造式

策として、抗菌剤にベースレジンと同様の重合性基(メタクリル基)を導入することにより重合性を持った抗菌剤(抗菌性モノマー)を作成した。これにより抗菌剤がベースレジンに共有結合し、それにより非溶出すなわち接触型の抗菌性レジンを得ることができた。12-methacryloyloxy-dodecylpyridinium bromide (MDPB)が得られた抗菌性モノマーで(図1)、MDPBは単独でミュータンス連鎖球菌に対し高い抗菌性を発揮した。MDPBをフィラーとしてシラン処理した石英粉末を83w/w%含む試作Bis-GMA-TEGDMA系光重合レジンに添加して重合すると、98%以上の高率でベースレジンに化学結合し、蒸留水やn-heptane、エタノール等に長期間浸漬してもほとんど溶出してこなかった。しかも、長期間浸漬後も表面における接触型の抗菌性は保持されていた^{23,24)}。また、MDPBを添加してもベースレジンの重合には影響がなかった²⁵⁾。

MDPBについては、さらに広範な研究がなされており、例えばMDPBの殺菌作用が迅速に効果を発揮するうえ、組織為害性がないこと^{26,27)}。また、MDPB配合ボンディング材がヒトの脱灰根面象牙質に浸透して行くこと²⁸⁾。MDPBをプライマーに配合すると*in vivo*において、象牙質内に残存する細菌に対して抗菌効果を発揮することなどが証明されている²⁹⁾。

このようにMDPBの配合によりレジン系材料に非溶出型の抗菌性を付与できることが明らかになったが、コンポジットレジンシステムのどの部分にMDPBを配合することが最も効果的であるかを考えると、表面はともかくコンポジットレジン充填物の内部に非溶出型の抗菌性を与える意義はあまりないと考えられる。また現在、う蝕の修復に際して除去すべき軟化象牙質は細菌感染が生じている部分のみで良いということになっている。それを臨床的に鑑別する方法としてう蝕検知液の使用が推奨されている⁸⁾。しかし、う蝕検知液は細菌そのものを染色するわけではなく、マクロには鑑別できるがミクロな象牙細管ごとの検知はで

きない。したがって検知液を使用しても完全に細菌が除去できているかは保証の限りでない。これらのことを考え合わせると、コンポジットレジン本体よりも、接着のための歯面処理システム（セルフエッチングプライマー、ボンディング材）に組み込むことが最も効果的と考えられる。それによりエッチングの進行と同時に象牙質へ侵入し、取り残されているかもしれない細菌を殺菌することができる。さらに抗菌性ボンディング材を用いることにより二次う蝕の発生で最初の細菌侵入路になるコンポジットレジンと歯質の界面に抗菌剤を配置しておくことができる。これによりいずれは生じるであろうマイクロリーケージに起因する二次う蝕の発生を遅らせ、修復物の寿命の延長に寄与できると考えられる。この考えに基づきクラレメディカル（株）よりセルフエッチングプライマーにMDPBを配合した歯科用象牙質接着材“クリアフィル メガボンFA”が製造販売されている。将来的にはレジンセメントへの配合も有効なのではないかと考えられている。

この項ではレジン系材料に非溶出型の抗菌性を付与することについて述べてきたが、コンポジットレジンはその成分として85w/w%前後と大量のフィラーを含み表面積ではフィラーの占める部分の方が大きい。したがって、ベースレジンだけではなくフィラーにも抗菌性を付与する意義は大きい。たとえば、MDPBを利用した例としていわゆる有機質フィラー（ベースレジンに高密度で無機質フィラーを充填・硬化させた物を微粉碎しコンポジットレジンにフィラーとして用いる）を作成するベースレジンにMDPBを配合して非溶出の抗菌性フィラーを作成することが報告されている³⁰⁾。

MDPB以外にもフィラーに非溶出の抗菌性を付与する試みが報告されている。銀を用いるもので、銀を保持したリン酸ジルコニウム³¹⁾あるいはシリカゲル³²⁾をフィラーとして用いると充填物表面で銀の触媒作用で周囲の酸素が活性化され、それにより殺菌効果が生じるとされている。この作用は銀イオンの溶出によるものではなく、銀は非溶出のまま表面で触媒作用を発揮することから、非溶出型の抗菌性付与と考えられる。

VI 溶出型抗菌性の付与

これまでレジンあるいはフィラーに非溶出型の抗菌性を付与することを中心に述べてきた。非溶出型は抗菌効果や物性の低下を抑え、充填物としての永続性を

表1 試作溶出型抗菌性レジンの組成 (w/w %)

メタクリル酸	8.6
トリエチレングリコールジメタクリレート (TEGDMA)	85.5
塩化セチルピジニウム (CPC)	1.7
エタノール	1.7
メタクリル酸-2-ジメチルアミノエチル	1.5
カンファーキノン	1.0

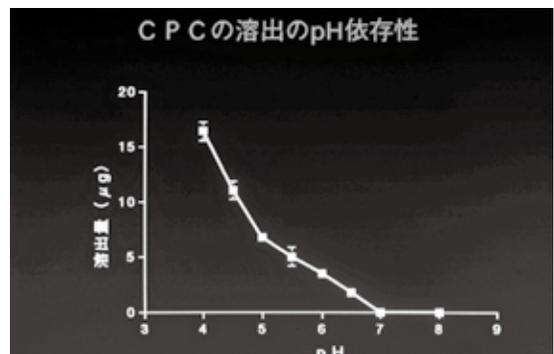


図2 試作溶出型抗菌性レジンからのCPC溶出のpH依存性

保つことには大きく寄与する。しかし、非溶出型はすなわち接触型であり、その抗菌効果は表面あるいはごく近傍に限られる。また、MDPBは重合性であり、レジン全体の重合を考えた場合、配合量には限度がある。従って、抗菌性の強度や有効範囲を考慮した場合、溶出型の方が勝っている場合も多いと考えられる。もし、溶出型における効果の永続性の点を解決できれば溶出型も利用できる³³⁾。

江原らは³⁴⁻³⁶⁾、溶出型ではあるが抗菌剤が一方向的に溶出するのではなく、必要な時にのみ抗菌剤が溶出し、しかも抗菌剤をリチャージすることが可能な新しいドラッグデリバリーシステムを考案した。すなわち、レジンにイオン交換性基を導入し、イオン性抗菌剤を保持させたのである。表1にその組成を示す。ベースレジンとしてTEGDMAを用い、それに重合可能でカルボキシル基を持つメタクリル酸を加えた。さらに陽イオン性抗菌剤として塩化セチルピジニウム(CPC)を加え光重合化している。この材料を光硬化させたものは、図2に示すように中性ないしアルカリ性の溶液に浸漬してもCPCを溶出しないが、酸性の溶液に浸漬するとpHの低下に従ってより多くのCPCを溶出してくる。さらに、中性溶液でも塩化ナトリウムを添加して溶液のイオン強度を上げると、上昇に従ってより多くのCPCが溶出されることから、CPC

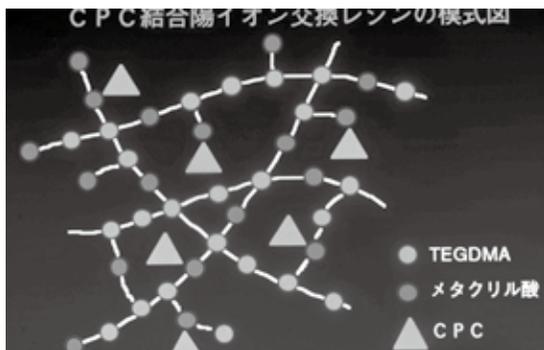


図3 硬化した試作溶出型抗菌性レジンの模式図

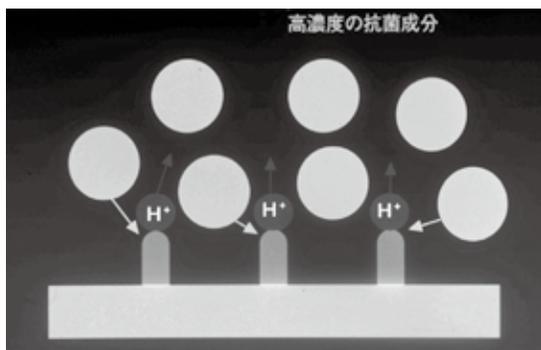


図4-3 試作溶出型抗菌性レジンのCPC溶出・再吸着の機構
抗菌剤が遊離して減少しても、高濃度の抗菌剤で処理すると、酸と抗菌剤が交換する。

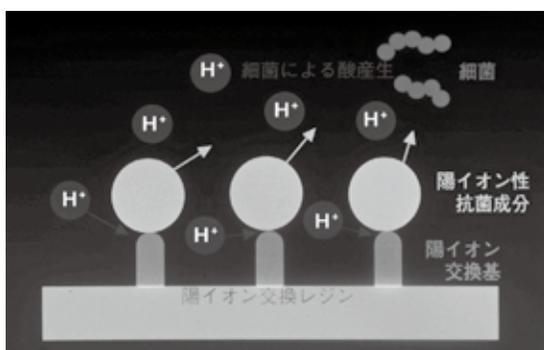


図4-1 試作溶出型抗菌性レジンCPC溶出・再吸着の機構
ベースレジンに重合した陽イオン交換基に、陽イオン性抗菌剤がイオン結合で保持されている。そこに細菌が来て酸産生する。

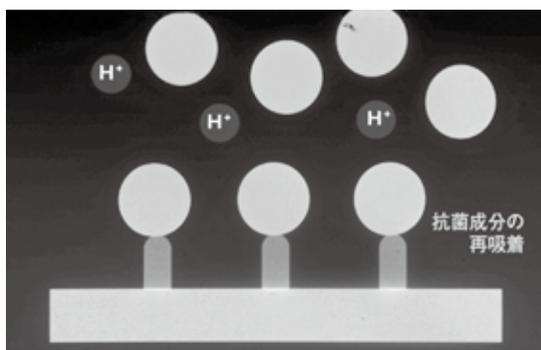


図4-4 試作溶出型抗菌性レジンCPC溶出・再吸着の機構
抗菌性を回復。

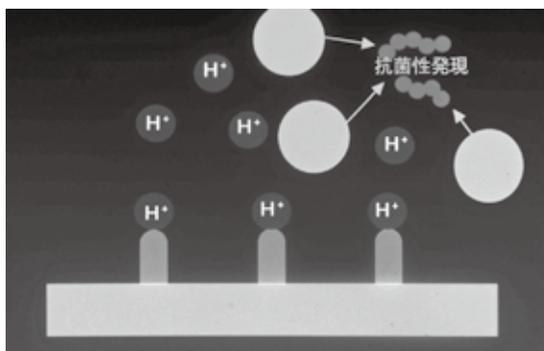


図4-2 試作溶出型抗菌性レジンCPC溶出・再吸着の機構
陽イオン性抗菌剤が産生された酸と交換して遊離し抗菌作用を発揮する。

がイオン結合で保持されていることが明らかになった。本レジン表面で *S. mutans* を培養しても全く増殖は観察されず、人工プラークの付着もほとんど観察されなかった。また、CPCを添加していないコントロールレジンに中性のCPC溶液に浸漬するとCPCを保持するようになった。

本レジン硬化物の模式図を図3にしめすが、2官能性であるTEGDMAが3次元網目構造で硬化している所々にメタクリル酸が共重合し、そのカルボキシル基が陽イオン交換基として働きCPCをイオン結合で保持している。そこに細菌が接近し酸産生をおこさう(図4-1)。周囲のpHが6.5以下になると保持されていたCPCが水素イオンと交換し溶出して抗菌効果を発揮する(図4-2)。この抗菌剤の溶出は細菌からの酸産生が停止し周囲の環境が中性にもどると、停止する。抗菌剤が溶出しても、高濃度のCPC溶液を作用させ

るとCPCがイオン結合で保持されていた水素イオンと交換し(図4-3), 抗菌効果が回復する(図4-4)。歯質の脱灰における臨界pHは, エナメル質で5.5~5.7, 象牙質で5.7~6.2とされているため, 細菌の酸産生によってプラーク内のpHが臨界pHにまで低下するまでにCPCの溶出が始まり, 抗菌作用が発揮されると考えられる。

この溶出型抗菌性レジン, 塗布剤の形で歯面特に露出根面などのう蝕抑制あるいはデンチャープラークの抑制。即時重合レジンで作成され長期間用いられる歯周治療用装置やプロビジョナルレストレーションのプラーク蓄積の抑制などの用途が期待される。

VII 漂白作用を備えた変色歯表面塗布材

歯の変色を改善する方法として, 従来からベニア修復や全部被覆冠による補綴処置などが行われているが, MI (Minimal Intervention) の考え³⁷⁾が浸透してきて, 歯質を削らずに歯の変色を改善する方法として歯の漂白法が多く用いられている³⁸⁾。その他, 迅速に変色歯の審美性を回復する方法として歯の色を持ったコーティングレジン, 変色をマスクするいわゆる歯のマニキュア法がある。本法は, 非常に容易かつ即時に審美性を回復することができるが, その耐久性は低く, おおむね数週間程度である。しかも, 単にコーティングしたものであるため, 脱落すると元の変色歯のままである。そこで, このコーティング材に漂白機能を付与することが考えられた。そうすると, 即時に審美性を回復し, しかも脱落までの間に変色歯の漂白を行うことができる。

江本らは³⁹⁻⁴¹⁾, 市販の変色歯コーティング材と歯面の間に漂白機能を組み込んだ下地レジン, 置く形の漂白作用を備えた変色歯コーティングシステムを考案した。すなわち, ベースレジン, Bis-GMA:TEGDMA=1:1とし, 過炭酸ナトリウムを漂白剤として添加した後, 光重合化した。本レジン, セルフエッチングプライマー処理したエナメル質に適度に接着し, 表面を過炭酸ナトリウム非添加のベースレジンでカバーした状態で水に浸漬すると, エナメル質表面を漂白した。水に浸漬することで, レジンが吸水しその水分によって過炭酸ナトリウムが分解し, 過酸化水素が発生したためと考えられる。さらに, 本システムは表面に接するであろう粘膜に有害作用は及ぼさず, また歯髄側への過酸化水素の拡散も見られなかった。以上のことから, 本システムは漂白作用を備えた変色歯コーティングシステムとして, 使用できると考えられる。

VIII おわりに

従来はinertで安定であることを主眼として開発されてきた修復材料であるが, 安定性はもちろん確保した上で, 周囲環境へ積極的に働きかけをする作用を付与できるようになってきた。

文献リスト

- 1) 三浦維四, 林 一郎, 川上道夫, 塩川延洋, 浜中人史 共訳: (8th ed.) スキンナー歯科材料学(下), 第5版, 第30章 充填用セメント, 窩洞パニシ, 裏装・ベース用材料, 475-481, 医歯薬出版(東京), 1985.
- 2) 山本洋子: フッ素徐放性の歯科材料から窩壁歯質へ取り込まれたフッ素の二次元分布—波長分散型X線分析装置(WDX)による解析—, 阪大歯学誌, 40(1), 50-71, 1995.
- 3) Momoi Y., McCabe J. F.: Fluoride release from light-activated glass ionomer restorative cements. Dent Mater, 9, 151-154, 1993.
- 4) 山賀禮一: H Y 剤の基礎的効果とその適用, 日本歯内療法協会雑誌, 1, 17-24, 1980.
- 5) 山賀禮一, 森脇 豊: 先人の英知 —お歯黒予防歯科材料の立場から—, 歯界展望, 45, 928-933, 1975.
- 6) 谷崎幸司: タンニン・フッ化物合剤による二次う蝕の抑制に関する基礎的研究, 日歯保存誌, 21(2), 279-296, 1978.
- 7) 松村和良, 内海信子, 和田ゆかり, 青山光徳, 風呂川 彰, 永峰道博, 遠藤 亨, 井上 清: タンニン・フッ化物合剤配合カルボキシレートセメントの深部う蝕中の細菌に及ぼす影響, 日歯保存誌, 31(4), 1033-1041, 1988.
- 8) 特定非営利活動法人 日本歯科保存学会編: MI (Minimal Intervention) を理念としたエビデンス(根拠)とコンセンサス(合意)に基づくう蝕治療ガイドライン, 永末書店(京都), 2009.
- 9) Lindquist B., Emilson C. G.: Distribution and Prevalence of Mutans Streptococci in the Human Dentition. J Dent Res, 69, 1160-1166, 1990.
- 10) Svanberg M., Mjor I. A., Orstavik D.: Mutans Streptococci in Plaque from Margins of Amalgam, Composite and Glass-ionomer Restorations. J Dent Res, 69, 861-864, 1990.
- 11) Skjorland, K. K., Plaque accumulation on different

- dental materials. Scand J Dent Res, 81, 538-542, 1973.
- 12) 河合啓治：複合レジン構成物が *Streptococcus mutans* の不溶性グルカン合成および増殖に及ぼす影響, 日歯保存誌, 31, 322-351, 1973.
- 13) 竹村金造, 阪本有三, Staninec M., 小林新吾, 末広和彦, 土谷裕彦：一種の Bis-GMA 系複合レジンの抗菌性とクロールヘキシジン配合による抗菌効果, 日歯保存誌, 26, 540-547, 1983.
- 14) 小林新吾, 土谷裕彦：抗プラーク性付与を目的とした修復用レジンに関する研究 (1) 抗菌剤を組込んだレジンの抗菌性, 日歯保存誌, 24, 1074-1075, 1981.
- 15) Ribeiro J., Ericson D.: In vitro antibacterial effect of chlorhexidine added to glass-ionomer cements. Scand J Dent Res, 99, 533-540, 1991.
- 16) Jedrychowski J. R., Caputo A. A., Kepper S.: Antibacterial and mechanical properties of restorative materials combined with chlorhexidines, J Oral Rehabil, 10, 373-381, 1983.
- 17) 熱田 充：抗プラーク付着性補綴物に関する研究, 昭和61年度科学研究費補助金研究成果報告書(60480424), 1987.
- 18) Bapna M. S., Murphy R., Mukherjee S.: Inhibition of bacteria colonization by antimicrobial agents incorporated into dental resins, J Oral Rehabil, 15, 405-411, 1988.
- 19) 平石典子, 田上順次：クロールヘキシジン含有歯科メチルメタクリレートセメントの長期性抗菌作用, 特定非営利活動法人 日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会 (第133回) プログラムおよび講演抄録集, 57, 2010.
- 20) Newbrun E. 著, 浜田茂幸, 長谷川 清, 井上昌一, 水野 純, 大嶋 隆, 鳥居光男, 梅本俊夫 共訳：う蝕の科学(Cariology), 医歯薬出版 (東京), 1980.
- 21) 安永哲也, 浦野昌明, 鳥居光男, 土谷裕彦：Dexstranase 固定化による抗プラーク性レジンの開発に関する研究, 日歯保存誌, 35, 春季特別号, 13, 1992.
- 22) Imazato S.: Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems, Dent Mater, 19(6), 449-457, 2003.
- 23) 今里 聡：薬剤非溶出型抗菌性コンポジットレジンの開発に関する研究, 日歯保存誌, 35(5), 1109-1129, 1992.
- 24) Imazato S., Torii M., Tsuchitani Y., McCabe J. F., Russell R. R. B.: Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite, J Dent Res, 73(8), 1437-1443, 1994.
- 25) Imazato S., McCabe J. F.: Influence of incorporation of antibacterial monomer on curing behavior of a dental composite, J Dent Res, 73(10), 1641-1645, 1994.
- 26) Imazato S., Ebi N., Tarumi H., Russell R. R. B., Kaneko T., Ebisu S.: Bactericidal activity and cytotoxicity of antibacterial monomer MDPB, Biomaterials, 20(9), 899-903, 1999.
- 27) Imazato S., Ohmori K., Russell R. R. B., McCabe J. F., Momoi Y., Maeda N.: Determination of Bactericidal Activity of Antibacterial Monomer MDPB by a Viability Staining Method, Dent Mater J, 27(1), 145-148, 2008.
- 28) Imazato S., Walls A. W. G., Kuramoto A., Ebisu S.: Penetration of an antibacterial dentin-bonding system into demineralized human root dentine *in vitro*, European J Oral Sci, 110(2), 168-174, 2002.
- 29) Imazato S., Kaneko T., Takahashi Y., Noiri Y., Ebisu S.: In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB, Oper Dent, 29(4), 369-375, 2004.
- 30) Imazato S, Ebi N., Takahashi Y., Kaneko T., Ebisu S., Russell R. R. B.: Antibacterial activity of bactericid-immobilized filler for resin-base restoratives, Biomaterials, 24(220), 3605-3609, 2003.
- 31) Yoshida K., Tanagawa M., Atsuta M.: Characterization and inhibitory effect of antibacterial dental resin composites incorporating silver-supported materials, J Biomed Mater Res, 47, 516-522, 1999.
- 32) Tanagawa M., Yoshida K., Matsumoto S., Yamada T., Atsuta M.: Inhibitory effect of antibacterial resin composite against *Streptococcus mutans*, Caries Res, 33, 366-371, 1999.
- 33) 鳥居光男：イオン交換機構による可逆性溶出型抗菌性歯面塗布剤の開発, 平成8年度～平成10年度科学研究費補助金基盤研究(B)(2)研究成果報告書(0845750), 1999.
- 34) 江原 篤, 鳥居光男, 恵比須繁之：イオン交換機序による抗菌成分の吸脱着に基づく抗菌性歯面塗布材の開発, 日歯保存誌, 39 (秋季特別号),

- 98, 1996.
- 35) 江原 篤, 鳥居光男, 恵比須繁之: イオン交換機序を利用した抗菌性歯面塗布材の開発—抗菌性の評価について—, 日歯保存誌, 40 (秋季特別号), 16, 1997.
 - 36) Ehara A., Torii M., Imazato S., Ebisu S.: Antibacterial Activities and Release kinetics of a Newly-Developed Recoverable Controlled Agent-release System, *J Dent Res*, 79(3), 824-828, 2000.
 - 37) Tyas M. J., Anusavice K. J., Frencken J. E., Mount G. J.: Minimal Intervention Dentistry — A review, FDI Commission Project 1-97, *Int Dent J*, 50, 1-12, 2000.
 - 38) 千田 彰, 寺下正道, 寺中敏夫, 宮崎真至 編: 保存修復学, 第6版, 第4章③—C変色歯の処置, 82-88, 医歯薬出版, 東京.
 - 39) 江本真規子, 徳田雅行, 鳥居光男: 漂白作用を備えた変色歯面塗布材の開発—漂白剤の選択—, 特定非営利活動法人 日本歯科保存学会2011年度春季学術大会 (第134回) プログラムおよび講演抄録集, 78, 2011.
 - 40) Emoto M., Tomita K., Kanemaru N., Tokuda M., Torii M.: Development of surface coating material for discolored tooth equipped with bleaching effect, *Dent Mater J*, 31(5), 797-805, 2012.
 - 41) 江本真規子, 川上克子, 徳田雅行, 鳥居光男: 漂白作用を備えた変色歯面塗布材の開発, 特定非営利活動法人 日本歯科保存学会2013年度春季学術大会 (第138回) プログラムおよび講演抄録集, 179, 2013.

老化に伴うラットの味覚嗜好性の変化

原田 秀逸・三浦 裕仁

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 先進治療学専攻
生体機能制御学講座 口腔生理学分野

Changes of gustatory preference with age in the rat

Shuitsu Harada, Hirohito Miura

Department of Oral Physiology,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

ABSTRACT

The effect of aging on taste were compared between the preference and neural responses from the greater superficial petrosal nerve (GSP) innervating the soft palate and the chorda tympani nerve (CT) innervating the fungiform papillae in the young (5-12 weeks) and aged (19-22 months) Sprague Dawley rat. A two-bottle preference test revealed that younger rats significantly preferred 0.001 M 5'-inosine monophosphate (IMP), 0.01 M mono sodium glutamate (MSG), and binary mixtures of 0.001 M IMP + 0.01 M MSG than deionized water. However, aged rats showed no significant preference to these umami solutions. Among the other four basic taste stimuli, there was no significant difference in preference between young and aged rats. Regardless of the age of the rat, neural responses from the GSP and CT produced robust integrated responses to all three umami solutions the same as used in the two-bottle test. These results indicate that the lack of preference to umami in aged rats is occurred in the central nervous system, suggesting that the loss of preference to umami taste in aged rats may be caused by homeostatic changes in the brain.

Key words: taste, aging, umami, neural information, preference

はじめに

老化に伴って、ヒトでは四基本味である甘味、苦味、酸味、塩味の全ての閾値が上がるという報告¹⁾、苦味と酸味に対する味覚強度だけが減少する²⁻⁵⁾、あるいは苦味に対する味覚強度だけ減少する⁶⁻⁸⁾という報告がある。さらに、甘味と塩味の閾値は老化によって変わらない^{4, 5, 8, 9)}という報告もあり、老化が味覚におよぼす影響は明確ではない。一方、うま味に対する味覚感受性の老化に伴う変化については、グルタミン酸ナトリウム (MSG) に対する味覚閾値が老人では5.04倍上

昇するという報告¹⁰⁾があるが、若者と老人の間では、うま味の好ましい味の濃度には差が無いという報告¹¹⁾もあり明確ではない。このように、報告によって味覚に対する感受性が異なる原因は、対象グループの年齢構成、口腔の健康状態、薬物使用の有無などによる可能性が指摘されているし¹⁾、老化に伴う嗅覚の減退がおよぼす影響も無視できない¹²⁾。

ラットの行動実験では蔗糖 (Suc) と食塩 (NaCl) に対する嗜好性は年齢の増加と共に閾値が上がるが、塩

酸キニーネ (QHCl) に対しては変化しない¹³⁾。しかし、C57BL/6J と 129X1/SvJ マウスでは、年齢によって味覚嗜好性はほとんど変化しない¹⁴⁾。また、動物のうま味嗜好性が年齢によって変化するか否かは明らか

にされていない。

味覚情報は口腔内部位によって異なる3つの主要な味覚神経を介して中枢へ伝えられる。茸状乳頭味蕾は鼓索神経 (chorda tympani nerve, CT), 軟口蓋 (soft

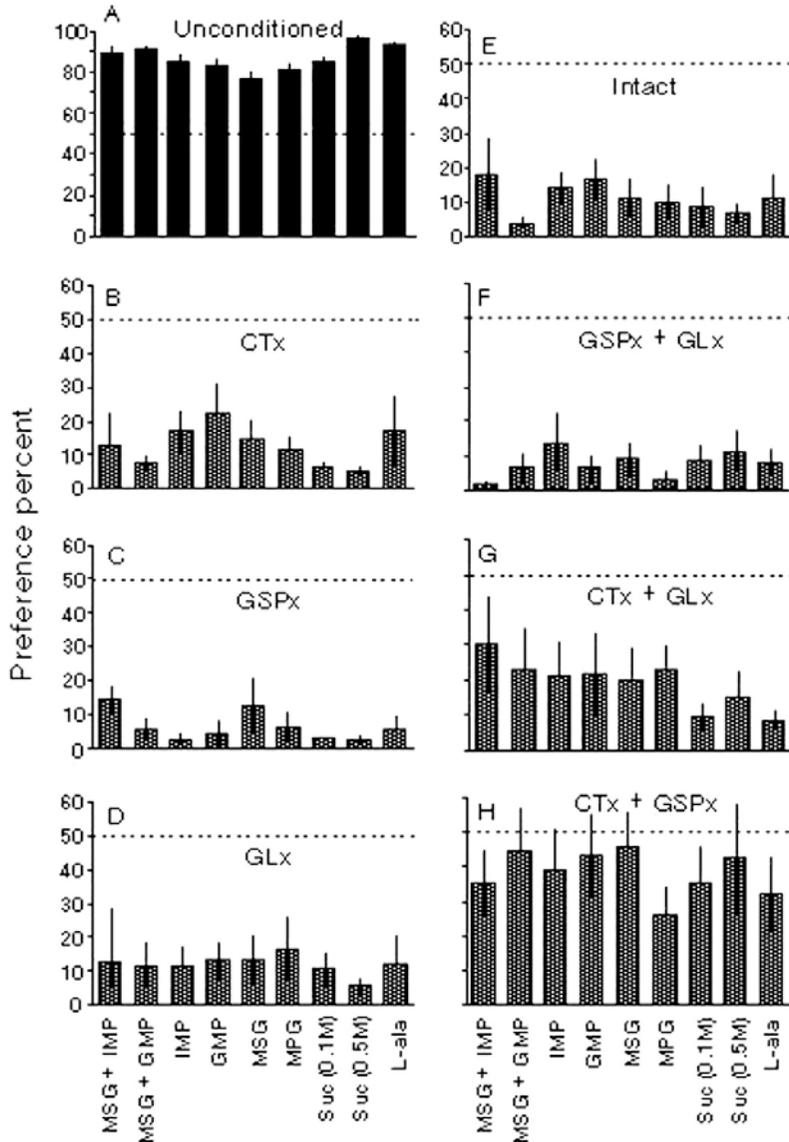


図1 うま味と甘味刺激に対する嗜好性に対する味覚神経切断の影響。Aは非条件付け、B~Hはうま味に対して忌避条件付けした後、GSP, CT, 舌咽神経 (GL) 両側切断によってうま味物質、甘味に対する忌避の程度が変化するかを調べた。0.1 M MSG + 0.01 M IMP 混合液によりうま味忌避条件付けを行ったが、うま味物質がNa塩であり、条件付けの際のNa味の効果を減退するために 5×10^{-5} M アミロライドを加えた。切断した味覚神経は B: CT, C: GSP, D: GL, E: 切断神経なし, F: GSP+GL, G: CT+GL, H: CT+GSP。エラーバーは標準誤差を示す。0.1 M MSG+0.01 M IMP, 0.1 M MSG+0.01 M guanosine 5'-monophosphate (GMP), 0.03 M IMP, 0.03 M GMP, 0.3 M MSG, and 0.3 M monopotassium glutamate (MPG), 0.1 M Suc, 0.5 M Suc, 0.25 M L-alanine. (Sako et al., *Physiol. Behav.*, 2000²⁰⁾ から)

palate, SP) 味蕾は大錐体神経 (greater superficial petrosal nerve, GSP), 舌奥の有郭乳頭および葉状乳頭味蕾の一部は舌咽神経 (glossopharyngeal nerve, GL) によって支配されている¹⁵⁻¹⁹⁾。うま味情報は, ラットでは主に軟口蓋を支配する GSP と舌茸状乳頭味蕾を支配する CT によって中枢へ伝えられることを著者らは明らかにした (図 1)。そこで, 本研究では, 老化に伴う味覚の変化, 特にならうま味嗜好性の変化のメカニズムを解明するためにラット GSP と CT に注目して実験を行った。

材料および方法

2-1 実験動物

動物は, 雄ラット (Sprague Dawley, 若齢: 5~12 週, 老齢: 19~22ヶ月) を用いた。二瓶選択法による嗜好実験の後に, GSP および CT からの神経応答解析実験を行った。全ての動物実験は, 鹿児島大学動物実験規則に従い, 動物実験委員会の許可を得て実施した。

2-2 二瓶選択法嗜好実験

実験には若齢 (5~12 週, n = 7) および老齢 (21~22ヶ月, n = 4) の雄ラットを用いた。動物はポリカーボネートのケージに 1 匹ずつ入れ, 固形餌 (CE-7, Clea Japan, Inc.) を自由に摂取させた。実験室温および試験液の温度は 22 ± 1°C に維持し, 08:00~20:00 の昼夜サイクルにした。リッキング行動で流量を制御するステンレス製の吸い口 (直径 4.7 mm, 東洋理工) を付けた 2 本のガラス瓶で溶液を提示した。2 本の吸い口間の水平距離は 3 cm とした。

嗜好実験スケジュール (表 1) は, 実験開始から第 1 期間は, 脱イオン水 (DW) を入れた試験瓶 1 本のみを 24 時間, 4 日間提示して, 吸い口からの摂水を学習させた。第 2 期間の 4 日間は, DW を入れた試験瓶 2 本を 08:00 から 20 分間, 20:00 から 20 分間提示し, それ以外は絶水状態にした。吸い口の位置効果を避ける

ために, 2 本の試験瓶は 1 日 2 回の提示開始時に左右を入れ替えた。第 3 期間は, 試験溶液と DW を同時に 08:00 から 20 分間提示し, 左右の試験瓶を入れ替えて 20:00 から 20 分間提示し, それぞれの消費量を 2 日間測定した。第 4 期間は, DW を入れた試験瓶 2 本を 08:00 に 20 分間, 20:00 に 20 分間, 1 日測定した。その後は試験物質を変えて期間 3, 4 を繰り返した。

試験溶液は, 0.1 M NaCl, 0.3 M Suc, 0.01 M HCl, 0.001 M QHCl, 0.001 and 0.003 M 5'-inosine monophosphate (IMP), 0.01 and 0.03 M mono sodium glutamate (MSG), 0.001 M IMP + 0.01 M MSG 混合物, 0.003 M IMP + 0.03 M MSG 混合物を用いた。

嗜好率は, 次の式により求めた。

$$\text{嗜好率} = 2 \times a / (a + b) - 1; a = \text{試験溶液の摂取量}, \\ b = \text{DW の摂取量}$$

2 本の試験瓶の試験溶液と DW の間に有意差があるか否かを Student's t-test で検定した。

2-3 神経応答記録実験

若齢 (5~12 週, n = 7) および老齢 (21~22ヶ月, n = 9) の雄ラットを用いた。GSP と CT の分離方法については, 別の論文で述べた^{21, 22)}。神経束からのインパルス応答は増幅して積分し (時定数 0.3 sec), 1 mm/sec のスピードでサーマルアレイ・レコーダーに描記した²¹⁾。DW および刺激液は直径 2 mm のポリエチレンチューブで刺激領域に 1 ml/sec で流した。刺激部位を DW で常時洗浄し, 三方向電磁バルブで 10 秒間刺激液に切り替えた。刺激液の濃度は切り替え後 1 秒以内にその最大濃度に達した。

用いた刺激液は, 0.1 M NaCl, 0.5 M Suc, 0.01 M HCl, 0.01 M QHCl, 0.001 and 0.003 M IMP, 0.01 and 0.03 M MSG, および 0.001 M IMP + 0.01 M MSG 混合物, 0.003 M IMP + 0.03 M MSG 混合物を用いた。DW 洗浄液および刺激液は 20 ± 1°C で与えた。

CT 応答は, Na 塩である IMP and MSG の Na⁺ に対

表 1 嗜好実験スケジュール

期間	試験瓶	提示時間	日数	備考
1	DW1本	24時間	4	licking 学習
2	DW2本	08:00-08:20, 20:00-20:20	4	licking 学習
3	DW1本, 試験溶液1本	08:00-08:20, 20:00-20:20	2	左右入れ替え
4	DW2本	08:00-08:20, 20:00-20:20	1	
5以降	期間3,4を繰り返す	08:00-08:20, 20:00-20:20		

して大きな積分応答を引き起こし、うま味応答をマスクしてしまうので、うま味刺激と同一濃度のNaClで10秒間前順応してからうま味刺激を与えた。0.001 M NaCl 前順応後0.001 M IMP, 0.01 M NaCl 前順応後 0.01 M MSG, また, 0.001 M IMP + 0.01 M MSG の混合物刺激には0.011 M ではなく0.01 M NaCl で前順応した。

GSP および CT 積分応答の基線からの初期の phasic 応答値を測定し、標準刺激 (0.1 M NaCl) に対する phasic 応答値に対する比率を%で表した。うま味物質に対する CT 応答では、10秒間の NaCl 前順応後の tonic 応答からの応答の大きさ (図5 矢印) を測定した。

2-4 血液検査

若齢 (8週齢, $n = 5$) および老齢 (19ヶ月齢, $n = 5$) ラットについて、血漿総蛋白質、血漿アルブミン、血漿尿素窒素、クレアチニン、血糖レベルを SPOTCHEM EZ (SP-4430, ARKRAY USA, Edina, Minnesota) を用いて測定した。

2.5 統計解析

行動解析は、刺激溶液と DW との間の摂取量に差があるか否かを Student's t-test で検定した。神経生理学実験で得られたデータは3種のうま味刺激に対する応答について、two-way ANOVA および Bonferroni/Dunn を用いて有意差の検定を行った。

結果

3-1 二瓶選択法嗜好実験

二瓶選択法嗜好実験の結果、若齢および老齢ラットの両方とも0.001 M QHCl を有意 ($p < 0.0005$) に忌避し、0.3 M Suc を有意に (若齢 $p < 0.0005$, 老齢 $p < 0.005$) 好んだ。うま味溶液 0.001 M IMP, 0.01 M MSG, 0.001 M IMP + 0.01 M MSG については、若齢ラットは強い嗜好性を示した ($p < 0.0005$) が、老齢ラットは嗜好性を示さなかった (図2)。

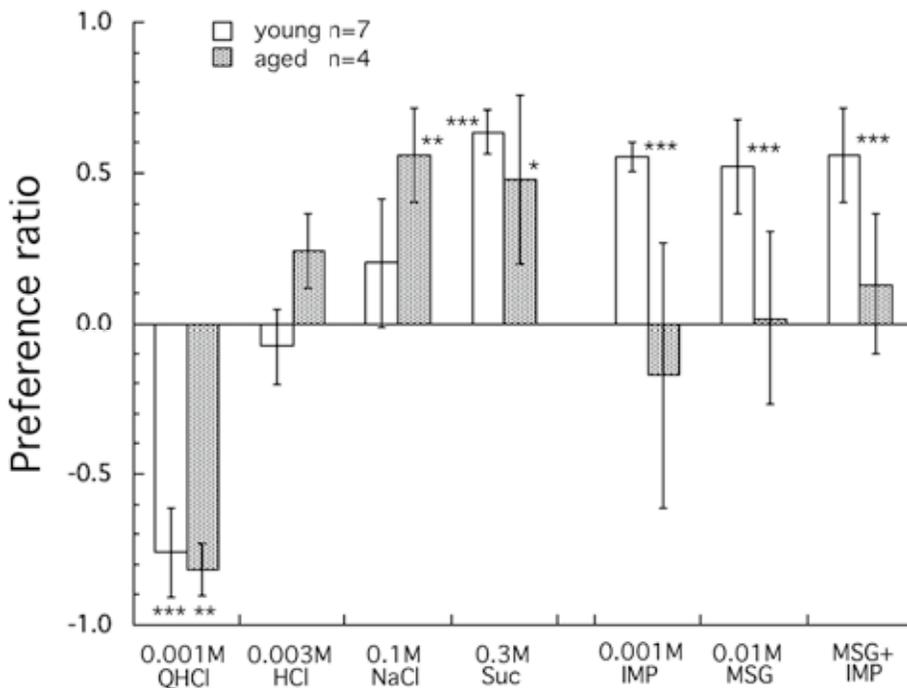


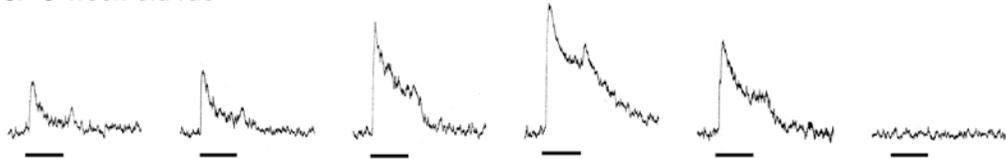
図2 四基本味およびうま味刺激に対する二瓶選択法で得られた嗜好率。若齢ラット (5~12 週齢, $n = 7$) および老齢ラット (21~22 月齢, $n = 4$) から得られた結果。エラーバーは標準誤差を示す。米印は試験溶液と DW 間の摂取量の Paired t-test による有意差を示す: *** $p < 0.0005$, ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ 。(Miura et al., Neurosci. Lett., 2014²³) から)

3.2 GSP および CT からの神経応答記録実験

若齢ラットの結果と同様に²⁰⁾、四基本味、うま味物質に対して、老齢ラットで明瞭な GSP 応答を生じた (図 3, 4)。また、0.001 M IMP + 0.01 M MSG 混合物

刺激は、有意な増強効果を示した (図 4)。CT 応答では、NaCl (0.001, 0.01, 0.1 M NaCl) は10秒の前順応開始時に大きな応答を生じ (図 5-A), NaCl 前順応10秒後に与えたうま味物質は明瞭なうま味応答 (図 5 A 矢

GSP-8-week-old rat



GSP-2-year-old rat

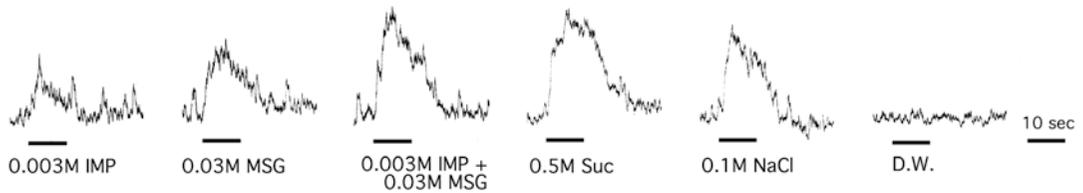


図 3 若齢 (8週齢, 上段) および老齢 (24月齢, 下段) ラット GSP から得られた、0.003 M IMP, 0.03 M MSG, 0.003 M IMP + 0.03 M MSG 混合物, 0.5 M Suc, 0.1 M NaCl および DW で刺激した場合の積分応答の一例。刺激は 10 秒間与えた。(Miura et al., Neurosci. Lett., 2014 から²³⁾)

GSP-aged rat

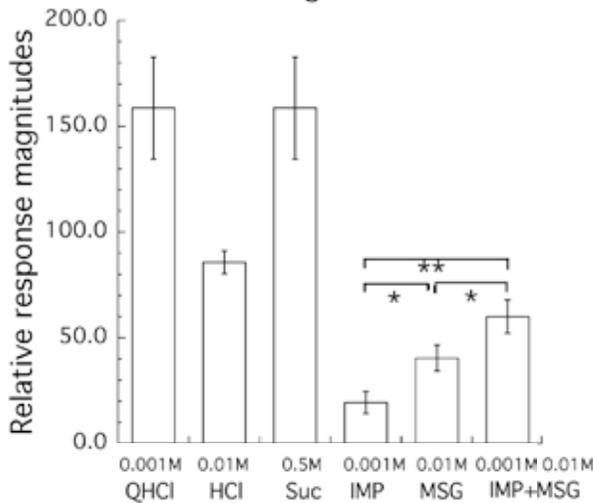


図 4 老齢ラット (21~24月齢, n=4) ラット GSP から得られた 0.01 M HCl, 0.01 M QHCl, 0.5 M Suc, 0.001 M IMP, 0.01 M MSG および 0.001 M IMP + 0.01 M MSG 混合物に対する積分応答の平均値。0.1 M NaCl phasic 応答を 100 とした相対値。エラーバーは標準誤差。米印は post hoc test による有意差を示す: ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ 。(Miura et al., Neurosci. Lett., 2014²³⁾ から)

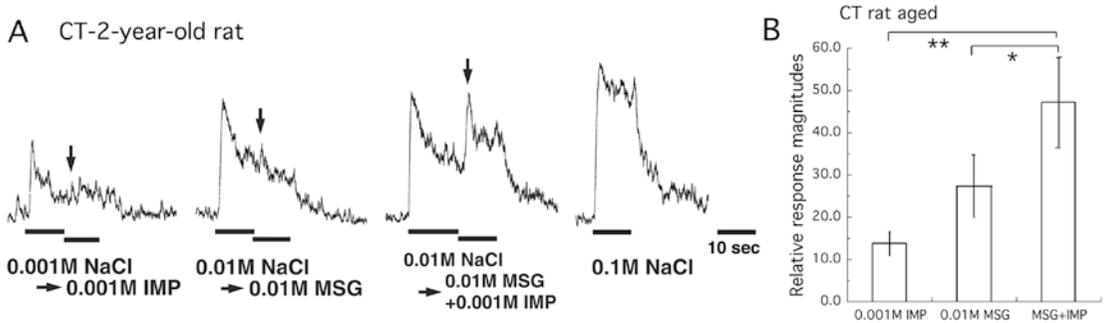


図5 A: 老齢(24月齢)ラットCTから得られた、0.001 M NaCl 前順応後の0.001 M IMP, 0.01 M NaCl 前順応後の0.01 M MSG, 0.01 M NaCl 前順応後の0.001 M IMP+0.01 M MSG 混合物, 0.1 M NaCl 単独で刺激した場合の積分応答の一例。順応および刺激はそれぞれ10秒間与えた。B: 老齢ラット(21~24月齢, n=5)CTから得られた0.001 M IMP, 0.01 M MSG, and the binary mixture of 0.001 M IMP + 0.01 M MSG 混合物に対する積分応答の平均値。0.1 M NaCl phasic 応答を100とした相対値。エラーバーは標準誤差。米印は post hoc test による有意差を示す; ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ 。(Miura et al., Neurosci. Lett., 2014²³)から)

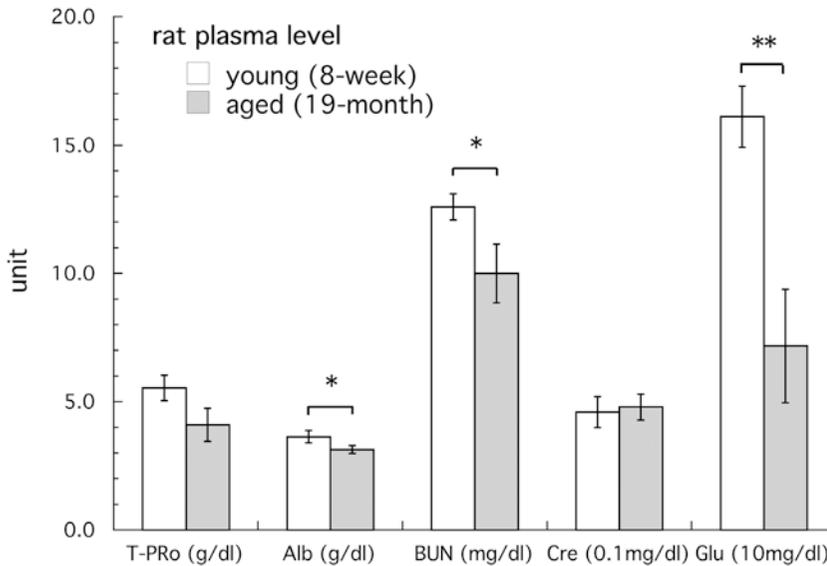


図6 若齢(8週齢, n=5)および老齢(19月齢)ラットの血液検査結果。T-Pro: 総血漿タンパク質, Alb: 血漿アルブミン, BUN: 血漿尿素窒素, Cre: クレアチニン, Glu: 血糖。エラーバーは標準誤差。米印は post hoc test による有意差を示す; ** $p < 0.005$, * $p < 0.05$ 。(Miura et al., Neurosci. Lett., 2014²³)から)

印)を生じた。以前の若齢ラットでの実験結果²⁰⁾と同様に、老齢ラットで、0.001 M IMP+0.01 M MSG うま味混合刺激に対してCT応答においても有意な増強効果が認められた(図5)。

3.3. 血液検査

老齢ラットの生理学的状態を若齢ラットと比較するために、血液検査を行った。結果は、総血漿蛋白およびクレアチニンレベルは若齢と老齢ラット間で差がなかったが、血漿アルブミン ($p < 0.05$), 尿素窒素 ($p < 0.05$), 血糖値 ($p < 0.005$) は老齢ラットの方が若齢ラットより有意に低かった(図6)。

考 察

うま味は出生後から摂食行動の重要な手がかりとなる。母乳は遊離グルタミン酸に富み^{24, 25)}、ヒト新生児はMSGに対して強い嗜好性を示す²⁶⁾。著者らは、味覚神経を切断したラットの行動解析によって、3種の主要な味覚神経の中で、うま味情報が主にGSPとCTを介して運ばれることを明らかにした²⁰⁾。本研究は、ヒトと同様に若齢ラットはIMP, MSGおよびIMPとMSGの混合物に対して強い嗜好性を示すが、老齢ラットのうま味物質に対する嗜好性が消失することを明らかにした。

うま味嗜好性が消失しているにも関わらず、老齢ラットでGSPとCTの両神経共に、IMPの混合によって現れるMSG+IMPのうまみ相乗効果の特徴²⁷⁾をもつ、うま味神経応答を生じた。Sucに対する応答と同様に、IMP, MSGおよびIMP+MSG混合物に対して若齢ラットでも老齢ラットでもGSPから大きな応答が得られ、このことは、うま味情報は老化に関係なく脳へ運ばれていることを示している。

うま味とは対照的に、甘味は若齢ラットのみならず、老齢ラットでも強い嗜好性を生じさせた。Tas1rファミリーの特定の組み合わせが甘味あるいはうま味受容体として機能する。すなわち、うま味はTas1r1とTas1r2、甘味はTas1r2とTas1r3のヘテロダイマーである²⁸⁾。このように、うま味と甘味は、味蕾の同じ味覚受容体のサブユニットを共有しているから、神経生理学実験および行動実験の両方において老化の影響は同じであることが予測される。しかしながら、本研究結果で、老齢ラットはSucを有意に好むのにも関わらず、若齢ラットで観察されたうま味に対する嗜好性が老齢ラットでは消失した。

タンパク質あるいは必須アミノ酸のLリジン (Lys) を欠乏した餌で飼育したラットは、Lys, グリシン, NaClの消費量が増加するが、うま味物質に対する嗜好性は増えない。しかし、それらの欠乏から回復するとうま味物質に対する嗜好性は現れる²⁷⁾。本実験では、総血漿タンパク質は若齢ラットと老齢ラットの間で差が無く、病的な飢餓の兆候がないことを示し、老齢ラットにおけるうま味物質に対する嗜好性の減少は血漿タンパク質のレベルとは関係ないと考えられる。

血糖の影響について、血糖値が低下すると摂食行動が惹起する²⁹⁾。本実験では、血糖値は老齢ラットで若

齢ラットよりも低く、同様の雄ラットの老化に伴う血糖値の低下の報告がある³⁰⁾。一方、食物摂取とエネルギー消費は老化と共に減少する³¹⁾。老齢ラットで血糖値が低いにも関わらず、逆に食物摂取が低下している関係は、他の制御機構の関与が関与していると考えられる。食欲には多くのニューロペプチドやホルモンが関与しており、それらの効果が老化に伴い変化する可能性を示唆している³²⁻³⁴⁾。成ラットで、saccharin 甘味溶液摂取は視床下部のorexin-AとNPYのmRNAレベルが増加させ、orexin-A, NPY, melanin-concentrating hormone (MCH)の脳室内投与 (intracerebro ventricular, ICV)はsaccharin 摂取を増加させる³²⁾。orexin-A, NPYおよびghrelinのICV注入は4月齢および11月齢ラットの食物摂取を濃度依存的に増加させる³¹⁾。一方、老齢ラット(24~27月齢)では、ghrelinは効果は小さくなるが食物摂取を増加させる。しかし、orexin-AとNPYはどの濃度でも食物摂取を刺激しない³¹⁾。これらの報告から、甘味とうま味の間の味覚嗜好に対する老化の影響の違いは、ニューロペプチドの寄与の違いに基づく可能性が考えられる。すなわち、うま味物質に対する嗜好行動は、ghrelinではなく、orexin-AとNPYのような効果は老齢ラットでは有効ではない因子を介していると考えられる。うま味の神経情報はCTとGSP神経によって脳に送られるのに、うま味に対する嗜好性は惹起されず、一方、Sucに対する嗜好は老齢ラットでも有効なghrelinあるいは別のニューロペプチドによって媒介される可能性が考えられる。

謝 辞

本研究は、一部、平成17~18年度うま味研究会研究助成金によって行った。

参考文献

1. Mojet, J., Christ-Hazelhof, E., Heidema, J.: Taste perception with age: Generic or specific losses in threshold sensitivity to the five basic tastes? *Chem. Senses*, 26, 845-860, 2001
2. Bartoshuk, L. M., Rifkin, B., Marks, L. E., Bars, P.: Taste and aging. *J. Gerontol.*, 41, 51-57, 1986
3. Cowart, B. J.: Relationships between taste and smell across the adult life span. *Ann. New York Acad. Sci.*, 561, 39-55, 1989
4. Hyde, R. J., Heller, R. P.: Age and sex effects on taste of

- sucrose, NaCl, citric acid and caffeine. *Neurobiol. Aging*, 2, 315-318, 1981
5. Murphy, C., Gilmore, M. M.: Quality-specific effects of aging on the human taste system. *Percept. Psychophys.*, 45, 121-128, 1989
 6. Mojet, J., Heidema, J., Christ-Hazelhof, E.: Taste perception with age: Generic of specific losses in supra-threshold intensities of five taste qualities. *Chem. Senses*, 28, 397-413, 2003
 7. Schiffman, S. S., Sattely-Miller, E. A., Graham, B. G., Erickson, R. P.: Taste perception of monosodium glutamate (MSG) in foods in young and elderly subjects. *Physiol. Behav.*, 56, 265-275, 1994
 8. Stevens, D. A., Lawless, H. T.: Age-related changes in flavor perception. *Appetite*, 2, 127-136, 1981
 9. Warwick, Z. S., Schiffman, S. S.: Sensory evaluations of fat-sucrose and fat-salt mixtures; relationship to age and weight status. *Physiol. Behav.*, 48, 633-636, 1990
 10. Schiffman, S. S., Frey, A. E., Luboski, J. A., Foster, M. A., Erickson, R. P.: Taste of glutamate salts in young and elderly subjects: Role of inosin 5'-monophosphate and ions. *Physiol. Behav.*, 49, 843-854, 1991
 11. Mojet, J., Christ-Hazelhof, E., Heidema, J.: Taste perception with age: pleasantness and its relationships with threshold sensitivity and supra-threshold intensity of five taste qualities. *Food Quality Preference*, 16, 413-423, 2005
 12. Doty, R. L., Shaman, R., Dann, M.: Development of the university of Pennsylvania smell identification test: A standardized microcapsulated test of olfactory function. *Physiol. Behav.*, 32, 489-502, 1984
 13. Thaw, A. K.: Changes in taste threshold over the life span of the Sprague-Dawley rat. *Chem. Senses*, 21, 189-193, 1996
 14. Tordoff, M. G.: Taste solution preferences of C57BL/6J and 129X1/SvJ Mice: Influence of age, sex, and diet. *Chem. Senses*, 32, 655-671, 2007
 15. Cleaton-Jones, P.: Histological observations in the soft palate of the albino rat. *J. Anat.*, 110, 39-47, 1971
 16. Fish, H. S., Malone, P. D., Richter, C. P.: The anatomy of the tongue of the domestic Norway rat. I. The skin of the tongue; the various papillae; their number and distribution. *Anat. Rec.*, 89, 429-440, 1944
 17. Guth, L.: The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat. Rec.*, 128, 715-731, 1957
 18. Miller, I. J., Jr. Gustatory receptors of the palate. In: Katsuki, Y., Sato, M., Takagi, S. F., Oomura, Y., editors. *Food intake and chemical senses*. Tokyo: University Tokyo Press; 1977. p. 173-185.
 19. Miller, I. J., Jr., Spangler, K. M.: Taste bud distribution and innervation on the palate of the rat. *Chem. Senses*, 7, 99-108, 1982
 20. Sako, N., Harada, S., Yamamoto, T.: Gustatory information of umami substances in three major taste nerves. *Physiol. Behav.*, 71, 193-198, 2000
 21. Harada, S., Smith, D. V.: Gustatory sensitivities of the hamster's soft palate. *Chem. Senses*, 17, 37-51, 1992
 22. Harada, S., Yamamoto, T., Yamaguchi, K., Kasahara, Y.: Different characteristics of gustatory responses between the greater superficial petrosal and chorda tympani nerves in the rat. *Chem. Senses*, 22, 133-140, 1997
 23. Miura, H., Ooki, M., Kanemaru, N., Harada, S.: Decline of umami preference in aged rats. *Neurosci. Lett.*, 577, 56-60, 2014
 24. Kurihara, K.: Glutamate: from discovery as a food flavor to role as a basic taste (umami). *Am. J. Clin. Nutr.*, 90 (Suppl), 719S-722S, 2009
 25. Rassin, D. K., Sturman, J. A., Guall, G. E.: Taurine and other free amino acids in milk of man and other mammals. *Early Human Develop.*, 2, 1-13, 1978
 26. Steiner, J. What the neonate can tell us about umami. In: Kawamura, Y., Kare, M. R., eds. *Umami: A Basic Taste*. New York: Marcel Dekker; 1987. pp. 97-123.
 27. Torii, K., Mimura, T., Yugari, Y. Biochemical mechanism of umami taste perception and effect of dietary protein on the taste preference for amino acids and sodium chloride in rats. In: Kawamura, Y., Kare, M. R., editors. *Umami: A basic taste*. Kawamura, Y., Kare, M. R. eds. New York: Marcel Dekker; 1987. pp. 513-563.
 28. Damak, S., Rong, M., Yasumatsu, K., Kokrashvili, Z., Varadarajan, V., Shiyong Zou, Jiang, P., Ninomiya, Y., Margolskee, R. F.: Detection of sweet and umami taste in the absence of taste receptor T1r3. *Science*, 301, 850-853, 2003
 29. Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Seeley, R. J., Baskin, D. G.: Central nervous system control of food intake. *Nature*, 404, 661-671, 2000
 30. Van Liew, J. B., Davis, P. J., Davis, F. B., Bernardis, L.

- L., Deziel, M. R., Marinucci, L. N., Kumar, D.: Effects of aging, diet, and sex on plasma glucose, fructosamine, and lipid concentrations in barrier-raised Fischer 344 rats. *J Gerontol.*, 48, B184-190, 1993
31. Akimoto, S., Miyasaka, K.: Age-associated changes of appetite-regulating peptides. *Geriatr Gerontol. Int.*, 10 (Supple.1), S107–S119, 2010
32. Furudono, Y., Andoa, C., Yamamoto, C., Kobashi, M., Yamamoto, T.: Involvement of specific orexigenic neuropeptides in sweetener-induced overconsumption in rats. *Behav. Brain Res.*, 175, 241-248, 2006
33. Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S., Schwartz, M. W.: Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*, 443, 289-295, 2006
34. Yamamoto, T.: Central mechanisms of taste: Cognition, emotion and taste-elicited behaviors. *Jpn. Dent. Sci. Rev.*, 44, 91-99, 2008

Are our scintigraphic results useful as a clue for interpreting kinetics of nuclear agents ?

Tsuyoshi Sato, Yasuhiko Morita*, Hideyuki Majima

Department of Maxillofacial Radiology, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

*Department of Oral and Maxillofacial Radiology, Tokushima University Graduate School of Oral Sciences,
3-18-15 Kuramoto-cho, Tokushima 770-8504, Japan

ABSTRACT

Until about ten years ago, we have performed scintigraphy with 201-thallium chloride (201-TlCl) and 99m-Tc-hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile (99m-Tc-MIBI) for malignant tumors. In this article, we re-evaluated scintigraphic images retrospectively with a hope that the results might be a clue, even if it is small, for dentists to try to improve the accuracy of diagnosis of malignant tumors. From scintigraphy, we obtained the tumor retention index as a factor to estimate the uptake of radioactive agents in tumor cells. Moreover, we estimated transport proteins of Na⁺/K⁺-ATPase and permeability-glycoprotein (P-gp) expressed on the cell membrane that might regulate the kinetic condition of radioactive agents. Among the tumor retention index, the transport protein and the histopathologic finding of tumors, there were relatively well correlations. The tumor retention index showed a difference clearly between malignant tumor and benign tumor. The transport protein revealed a distinct expression in accordance with the malignancy of tumor, and the uptake clearly depended upon the expression of transport protein.

Key words: Tumor scintigraphy, Malignant tumor, Transport protein, Gamma camera

1. INTRODUCTION

Until about ten years ago, not a few radioactive agents have been introduced for the purpose of diagnosing malignant tumors of the head and neck, for example 67-Ga (gallium), 201-Tl (thallium), 99m-Tc (technetium), 198-Au (aurum), 131-I (iodine) and so forth. However, these radioactive agents are now not popularly used as those times in routine examinations, because 18-F-fluoro-deoxy-glucose positron emission tomography (FDG-PET) is taking places of these radioactive agents. FDG-PET is a very superior method for malignant tumors.¹ At the time when FDG-PET has been introduced, we almost believed that most malignant tumors could be detected precisely and qualitatively with this method. However, this our expectation unfortunately ended with a fragile dream. This is not any all-purpose method. Even FDG-PET has some weak points. For example, FDG-PET is not able to distinguish malignant tumors from inflammatory lesions.²

This radioactive agent shows almost the same accumulation in both malignant tumors and inflammatory lesions depending on its high sensitivity and affinity both to tumors and inflammatory tissues. This weak point is also an eternal, essential problem among usual tumor scintigraphies for a long time. Many researchers have tried to resolve this problem for a long time, but this is left unresolved. Against this problem, we also did in spite of a small ability. We focused our eyes on transport proteins of radioactive agents as one of means of solving this problem. We performed evaluations concerning several subjects, for example an expression of transport proteins on cell membrane and a relation of transport proteins with accumulation. Among the results of our evaluations, we searched to pick up some factors that seemed to be helpful and useful for diagnosing malignant tumors, and we tried to find out a possibility of qualitative diagnosis of malignant tumors of the head and neck using the factors.³⁻⁸ In our scintigraphy for tumors, we

usually employed ^{201}Tl -thallium chloride ($^{201}\text{TlCl}$) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile ($^{99\text{m}}\text{Tc-MIBI}$) as radioactive agents. We selected a couple of factors that control and closely relate with the uptake of these radioactive agents. We evaluated the expression of Na^+/K^+ -ATPase and permeability-glycoprotein (P-gp) on the tumor cell membrane and the role of them as transport proteins in relation with both accumulation and washout of radioactive agents in tumor cells.

In this article, we re-evaluated retrospectively our results of tumor scintigraphy that we carried out. With this thing and that, most data used in this article were quoted from some of our previous reports on journals³⁻⁸ and modified to some extent.

2. SCINTIGRAPHY FOR TUMORS

2-1. Clinical evaluation of scintigraphy with ^{201}Tl

^{201}Tl was first used to evaluate the viability of the myocardium. After a while, this agent was introduced for the examination of malignant tumors of the head and neck.^{9,10} In this section, we evaluated the usefulness of ^{201}Tl for malignant tumors of the head and neck.

(Methods and Materials of Scintigraphy with ^{201}Tl)

We used 85 patients with a malignant tumor of the head and neck (squamous cell carcinoma) and 10 patients with a benign tumor (7 with pleomorphic adenoma and 3 with Warthin's tumor).

Intravenous injection of 74MBq of ^{201}Tl was performed. An early dynamic scan (for 5 min immediately after injection), a delayed dynamic scan and a spot scan (at 2.5 hrs after injection) were carried out using a gamma camera. From the dynamic scan, 2-second scans were obtained continuously. A single 2-second scan constituted a frame data. Two regions of interest (ROI) on each frame covering both tumor and control areas were used to estimate the uptake of ^{201}Tl (Figure 1). Early and delayed retention indexes were calculated from the results of each dynamic scan. The early retention index was the ratio of count of tumor to count of control in the early dynamic scan. The delayed retention index was the ratio of count of tumor to count of control in the delayed dynamic scan. From these two indexes, the tumor retention index was calculated; the ratio of the delayed retention index to the early retention index (Figure 2). We used this tumor

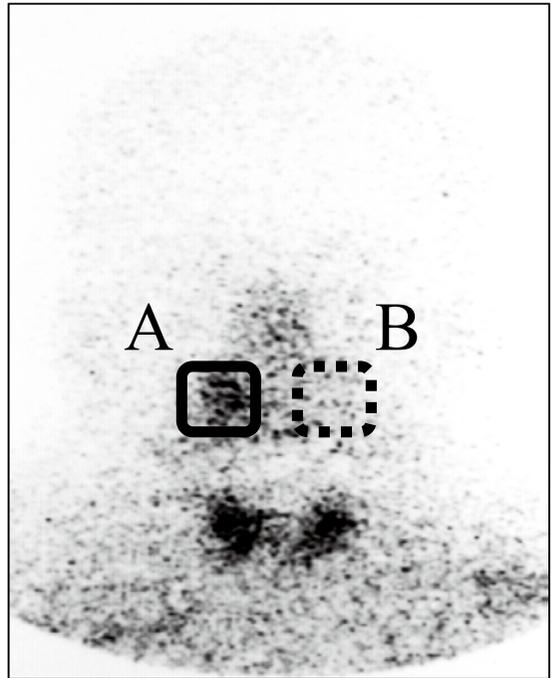


Figure 1: Two regions of interest (ROI) on a frame image covered the tumor area (A) and the symmetrical region (B: control region).

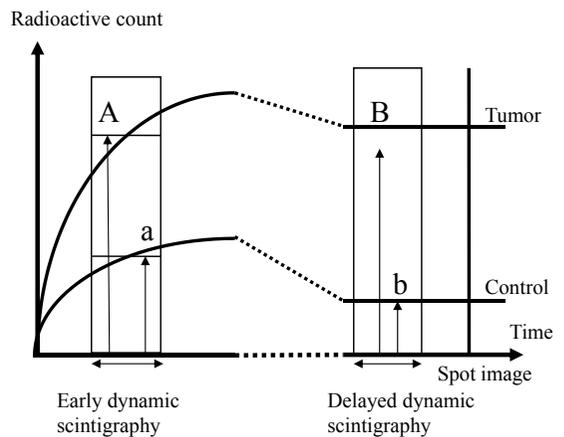


Figure 2: Two curves showed radioactive count after injection in the tumor and control areas. In the dynamic scintigraphy, the early retention index was A/a and the delayed retention index was B/b . The tumor retention index was (delayed retention index) / (early retention index).

retention index for the evaluation of scintigraphy. The tumor retention index was compared with the histopathologic type and tissue differentiation.

(Results: Tumor retention index of 201-Tl, Histopathologic type and Tissue differentiation)

Tumor retention indexes varied widely ranging from 0.76 to 1.46 in patients. In the histopathologic type, the tumor retention indexes ranged from 0.76 to 0.93 (average was 0.82) in the benign group, and 0.78 to 1.46 (1.04) in the malignant group, respectively. In the tissue differentiation, tumor retention indexes ranged from 0.78 to 1.24 (average was 1.03) in the well group, from 0.91 to 1.42 (1.09) in the moderate group, and from 1.05 to 1.46 (1.24) in the poor group, respectively. We classified these tumor retention indexes into three groups: decreased (<0.9), unchanged (0.9-1.1), and increased (1.1<). The increased tumor retention index means that the washout of 201-Tl from tumor is delayed or the washout function is lost. On the other hand, the decreased tumor retention index indicates that the washout of 201-Tl is fast. As for histopathologic type, 80% of patients in the benign group belonged to the decreased tumor retention index group and no patient showed the increased. On the other hand, 28% and 67% of patients in the malignant group were included in the increased and unchanged groups. Only 5% of patients indicated the decreased. As for the tissue differentiation, 86% of patients in the poor group were included in the increased group and no patient showed the decreased. On the other hand, only 13% of patients in the well group belonged to the increased group (Table 1). These results showed that 201-Tl once taken up in malignant tumors had a tendency to remain.

2-2. Accumulation of 201-Tl and Na⁺/K⁺-ATPase expression

It was reported that the expression of Na⁺/K⁺-ATPase on cell membrane was one of the most important factors concerning the accumulation mechanism of 201-Tl in malignant tumors.¹¹ However, the role of Na⁺/K⁺-ATPase on the uptake mechanism of 201-Tl is not clearly understood, and there are few reports on tumors of the head and neck. In this section, we evaluated the role of Na⁺/K⁺-ATPase expression on 201-Tl scintigraphy of malignant tumors of the head and neck.

(Methods and Materials of Immunohistochemistry for Na⁺/K⁺-ATPase expression)

Sixty-five patients with malignant tumor of the head and neck (squamous cell carcinoma) and 22 patients with benign tumor were used.

Immunohistochemical staining was performed with tumor samples. Briefly, sections of tumors were treated with sodium citrate buffer, heated for the antigen retrieval, and then treated hydrogen peroxide for 10 min to block endogenous peroxidase activity. Sections were incubated with the primary and secondary antibody. After incubation, the sections were washed with Tris buffer saline, reacted with avidin-biotinylated-peroxidase complex, and stained with diaminobenzidine.¹² Na⁺/K⁺-ATPase expression was graded into score 0 (stained under 5%), score 1 (from 5 to 49%), or score 2 (over 50%)¹³ with reference to histopathologic findings in malignant tumors of the head and neck.

(Results: Na⁺/K⁺-ATPase expression, Histopathologic finding and Tumor retention index)

As for the Na⁺/K⁺-ATPase expression and histopathologic finding, patients of the benign group showed score 0 (32%),

Table 1. Tumor retention index of 201-Tl, Histopathologic type and Tissue differentiation

Tumor retention index	Histopathologic type		Tissue differentiation		
	Benign	Malignant	Well	Moderate	Poor
	10 patients	85	53 patients	25	7
Decreased (<0.9)	80%	5	8%	0	0
Unchanged (0.9-1.1)	20	67	79	56	14
Increased (1.1<)	0	28	13	44	86

score 1 (59%) and score 2 (9%). In the malignant group, scores 0, 1 and 2 were shown in 44%, 40.5% and 15.5% in the well group, respectively. Patients of the moderate group showed score 1 (56%) and score 2 (44%). In patients of the poor group, scores 0, 1 and 2 were shown in 16.7%, 16.7% and 66.6%, respectively. As for the Na^+/K^+ -ATPase expression and tumor retention index, patients of the decreased group showed scores 0, 1, and 2 in 41%, 45% and 14%, respectively. Patients of the unchanged group revealed score 0 (4%), score 1 (58%) and score 2 (38%), respectively. In patients of the increased group, scores 0, 1 and 2 were observed in 12%, 35% and 53%, respectively (Table 2). The frequency of score 2 was elevated according as the tumor retention index became large. These results indicated that Na^+/K^+ -ATPase expression was typical in malignant tumors and played the role of uptake of 201-Tl.

2-3. Clinical evaluation of scintigraphy with 99m-Tc-MIBI

This scintigraphic agent has been widely used to evaluate the viability of the myocardium, and the accumulation of this agent in malignant tumors has been also reported.¹⁴ In this section, we evaluated the usefulness of 99m-Tc-MIBI scintigraphy for the diagnosis of malignant tumor of the head and neck.

(Methods and Materials of Scintigraphy with 99m-Tc-MIBI)

Nineteen patients with squamous cell carcinoma of the head and neck were used. The method of scintigraphy was almost the same as that of 201-Tl. Scintigraphy was performed with an intravenous injection of 600MBq of 99m-Tc-MIBI.¹⁵ The tumor retention index was compared with the tissue differentiation.

(Results: Tumor retention index of 99m-Tc-MIBI and Tissue differentiation)

Retention indexes ranged from 1.1 to 3.1 in the early dynamic scan, and averages were 1.03 (well group), 1.8 (moderate) and 1.65 (poor). In the delayed dynamic scan, retention indexes ranged from 1.0 to 2.9, and averages were 1.1 (well group), 1.48 (moderate) and 1.27 (poor). From these retention indexes, tumor retention indexes were calculated. Tumor retention indexes ranged from 0.70 to 1.0, and averages were 0.91 (well group), 0.93 (moderate) and 0.79 (poor), respectively. Then, we classified grades of tumor retention indexes into >0.9 (slightly decreased), 0.9 to 0.8 (intermediately decreased) and 0.8> (severely decreased). Most of tumor retention indexes were under 1.0. We could find a decreasing tendency of tumor retention indexes from the early dynamic scan to delayed dynamic

Table 2. Na^+/K^+ -ATPase expression, Histopathologic finding and Tumor retention index

Na^+/K^+ -ATPase	Histopathologic finding			Scintigraphy			
	Benign	Malignant		Tumor retention index			
		Well	Moderate	Poor	Decreased	Unchanged	Increased
	22 patients	32	27	6	24	24	17
Score 0	32%	44%	0	16.7	41%	4	12
Score 1	59	40.5	56	16.7	45	58	35
Score 2	9	15.5	44	66.6	14	38	53

Table 3. Tumor retention index of 99m-Tc-MIBI and Tissue differentiation

Tumor retention index	Tissue differentiation		
	Well	Moderate	Poor
	7 patients	8	4
Slightly decreased (>0.9)	71%	12.5	0
Intermediately decreased (0.9-0.8)	29	50	50
Severely decreased (0.8>)	0	37.5	50
% decrease from early to delayed (average)	9%	17.8	21

scan in malignant tumors of the head and neck. All patients in the well group belonged to the slightly or intermediately decreased indexes. On the other hand, 50% of patients in the poor group showed the severely decreased index. The "% decreases from the early to delayed tumor retention index" were ranged from 0% to 30%, and the average of poor group was 21% (Table 3). These results revealed that ^{99m}Tc-MIBI once taken up in malignant tumors was discharged from tumors gradually, and this was opposite to ²⁰¹Tl.

2-4. Accumulation of ^{99m}Tc-MIBI and P-gp expression

^{99m}Tc-MIBI once accumulated is discharged gradually from tumors. This washout of ^{99m}Tc-MIBI from tumors is recognized with a tumor retention index, which is considered to depend on the expression of P-gp in tumor cell membrane.^{14,16} P-gp is observed on the cell membrane of both normal and tumor cells, and the expression is more distinct in malignant tumor cells.⁷ However, there are few reports concerning the role of P-gp on Tc-^{99m}-MIBI scintigraphy in malignant tumor of the head and neck. In this section, we evaluated immunohistochemically the level and role of P-gp in malignant tumors.

(Methods and Materials of Immunohistochemistry for P-gp expression)

One group of 19 patients underwent both ^{99m}Tc-MIBI scintigraphy and an immunohistochemical examination. Moreover, another group of 71 patients underwent an immunohistochemical examination of P-gp expression.

Samples of malignant tumor were treated in citrate buffer to retrieve the antibody activity. They were incubated with H₂O₂, horse serum and a primary monoclonal antibody of JSB-1. They were incubated with secondary antibody

solution, diaminobenzidine, H₂O₂, and peroxidase substrate solution. Finally, the nuclei were counter-stained with hematoxylin. In addition to these samples, we used three other tissue sections for the control of negative, a moderately positive and a severely positive stains.¹⁶ We classified grades of staining of P-gp expression into score 0 (less than 5% of tumor cells), score 1 (5-50%) and score 2 (over 50%).¹⁷ We compared P-gp expression with the tissue differentiation and the tumor retention index in malignant tumors of the head and neck.

(Results: P-gp expression, Tissue differentiation and Tumor retention index)

With respect to the P-gp expression and tissue differentiation in 71 patients, 43% and 49% of patients in the well group showed score 0 and 1. On the other hand, most patients in the poor group showed score 1 and score 2. No patient showed score 0. As for the P-gp expression and tumor retention index in 19 patients, 67% of patients in the slightly decreased group showed score 0, and no patient showed score 2. On the other had, 40% of patients in the severely decreased group showed score 2, and no patient showed score 0 (Table 4). These results indicated that P-gp expression was distinct in patients of low differentiation group and showed a well correlation with the discharge of ^{99m}Tc-MIBI.

2-5. Comparison of ²⁰¹Tl with ^{99m}Tc-MIBI

^{99m}Tc-MIBI and ²⁰¹Tl had each different uptake mechanism. ^{99m}Tc-MIBI accumulated distinctly in malignant tumors in the early phase, but the accumulation became less intense in the late phase. ²⁰¹Tl also accumulated in malignant tumors in the early phase, but the accumulation in the delayed phase of malignant tumors did

Table 4: P-gp expression, Tissue differentiation and Tumor retention index

P-gp expression	Tissue differentiation (71 patients)			Tumor retention index (19)		
	Well	Moderate	Poor	>0.9 (Slightly)	0.9-0.8 (Intermediately)	0.8-> (Severely)
	39 patients	19	13	6 patients	8	5
Score 0	43%	11	0	67%	12.5	0
Score 1	49	63	69	33	50	60
Score 2	8	26	31	0	37.5	40

not show any distinct decrease. In this section, we compared and evaluated the usefulness of 201-Tl and 99m-Tc-MIBI for the diagnosis of malignant tumors of the head and neck.

(Results: Diagnostic reliability of 201-Tl with 99m-Tc-MIBI)

The true positive, false positive, false negative, true negative, sensitivity, specificity and accuracy of the two scintigraphic agents are shown (Table 5). The sensitivity, specificity and accuracy of 201-Tl scintigraphy were 82.9%, 80.1% and 82.7%, respectively. On the other hand, the sensitivity and accuracy were 68.4% and 68.4% in 99m-Tc-MIBI scintigraphy. Thus, 201-Tl is a little superior to 99m-Tc-MIBI as an agent for malignant tumors of the head and neck.

3. DISCUSSION

We made re-evaluation of some of our previous reports³⁻⁸ on scintigraphy for malignant tumors and lymph node metastasis. There were some clues to find a solution to problems in scintigraphy. The results in this article indicated a possible hint to make a qualitative diagnosis of malignant tumors or to differentiate malignant tumors from inflammatory lesions. For example, tumor retention indexes showed different tendencies between malignant lesions and benign lesions including inflammatory changes, or the level of transport proteins on cell membrane have a possible clue to reveal grades of tissue differentiation of tumors like tumor markers.

Scintigraphy for tumors with 201-Tl and 99m-Tc-MIBI:

Both 201-Tl and 99m-Tc-MIBI are now rarely used for diagnosis of malignant tumors of the head and neck⁸ because FDG-PET has been widely introduced for the same purpose.¹ However, 201-Tl and 99m-Tc-MIBI have some advantages to FDG-PET, for example, transport proteins (Na⁺/K⁺-ATPase for 201-Tl and P-gp for 99m-Tc-MIBI) were helpful for qualitative diagnosis and have a possibility to become factors like tumor markers. In addition, 201-Tl and 99m-Tc-MIBI are not so expensive. In this article, we re-evaluated retrospectively the usefulness of 201-Tl and 99m-Tc-MIBI for a diagnosis of tumors of the head and neck. We could obtain important information from dynamic scintigraphy. In the early phase, both 201-Tl and 99m-Tc-MIBI accumulated well in viable tumor cells,^{9,15} although they have physical differences. Tl⁺ has physical effects

Table 5. Diagnostic reliability of 201-Tl and 99m-Tc-MIBI

	201-Tl	99m-Tc-MIBI
True positive	77%	68
False positive	1	0
False negative	16	32
True negative	5	0
Sensitivity	82.9%	68.4
Specificity	80.1	-
Accuracy	82.7	68.4

similar to K⁺ and is taken up actively because it has an ion radius similar to K⁺, and malignant tumors need a large amount of K⁺.^{18,19} On the other hand, 99m-Tc-MIBI accumulated in tumor cells by plasma membrane potentials.⁶ With respect to the accumulation mechanism in the delayed phase, we performed some evaluations and obtained some useful results. 99m-Tc-MIBI first reached tumor cells through the tumor vascular system and was taken into tumor cells by plasma membrane potentials. Next, the accumulated 99m-Tc-MIBI was discharged from tumor cells by P-gp expressed on the cell membrane which was well known as a responsible protein in the multi-drug resistance.²⁰ On the other hand, 201-Tl was first brought to tumor cells like 99m-Tc-MIBI, and the accumulation in tumor cells was increased by the active transportation with Na⁺/K⁺-ATPase expressed on the cell membrane.²¹ In our investigation, the accumulation of 201-Tl in the delayed phase correlated well with Na⁺/K⁺-ATPase.⁵ As for the relationship with the tumor retention index, the tissue differentiation and tumor retention index showed an evident correlation. This suggested that tumor retention indexes correlated with transport proteins. Tomura and co-workers²² reported a tendency that the tumor retention index of malignant tumors decreased in 99m-Tc-MIBI scintigraphy. They reported an about 30% decrease. On the other hand, Tonami and co-workers²³ reported a decreased tumor retention index of 4.6% to 6% in benign tumors, and demonstrated an increase of more than 20% in malignant tumors in 201-Tl scintigraphy. Thus, the tumor retention index decreased with 99m-Tc-MIBI and increased with 201-Tl when tumors were malignant.²⁴ In this article, we showed the usefulness of 99m-Tc-MIBI and 201-Tl, especially we showed that the tumor retention index

showed a good correlation with the grade of tumor malignancy, and that the accumulation chiefly depended on transport proteins of Na^+/K^+ -ATPase and P-gp.^{5,25,26}

4. SUMMARY

At the present time that 201-Tl and 99m-Tc-MIBI became not to be used popularly in comparison with FDG-PET, we do not expect that our previous results are useful or helpful to the routine dental practice directly. However, FDG-PET is recently found to have a problem in diagnosis of malignant tumors, for example FDG-PET accumulates both in malignant tumors and inflammatory lesions. This is just the problem that we also tried to resolve until now. Therefore, we hope that even a small part of our results shown in this article could be a clue or hint for dentists to try to find out a solution of problem, if it is a very small help.

5. REFERENCES

- Gambhir SS, Cernin J, Schwinner J, et al. A tabulated summary of the FDG PET literature. *J Nucl Med* 2001;42:1-93.
- Shreve PD, Anzai Y, Wahl RI. Pitfalls in oncologic diagnosis with FDG-PET imaging physiologic and benign variants. *Radiographics* 1999;19:61-77.
- Sato T, Indo H, Kawabata Y, Iwashita Y, Morita Y, Noikura T, Sugihara K, Mimura T. Dynamic scintigraphy with thallium-201 chloride (Tl-201) for the diagnosis of tumors of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;92:228-235.
- Sato T, Kawabata Y, Indo H, Suenaga S, Kawano K, Iwashita Y, Morita Y, Majima H, Sugihara K, Mimura T. Scintigraphic evaluation of patients with malignant tumor of the head and neck by thallium-201-chloride (Tl-201) scintigraphy. *Oral Science International* 2005;2:8-16.
- Sato T, Indo H, Kawabata Y, Kobayashi T, Suenaga S, Iwashita Y, Nitta T, Sugihara K, Majima H. Thallium-201 chloride (Tl-201) accumulation and Na^+/K^+ -ATPase expression in tumours of the head and neck. *Dentomaxillofacial Radiology* 2005;34:212-217.
- Sato T, Kawabata Y, Saigo Y, Iwashita Y, Suenaga S, Indo H, Hamahira S, Kawano K, Nitta T, Morita Y, Majima H, Sugihara K. Interpretation of scintigraphic findings of oral malignant tumours with a new scanning agent of technetium-99m-hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile (Tc-99m-MIBI). *Dentomaxillofacial Radiology* 2006;35:24-29.
- Sato T, Kawabata Y, Nitta T, Saigo Y, Iwashita Y, Suenaga S, Hamahira S, Indo H, Morita Y, Majima H, Sugihara K. Expression of permeability-glycoprotein (P-gp) and uptake of technetium-99m-hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile (^{99m}Tc-MIBI) in malignant tumour of the head and neck. *Dentomaxillofacial Radiology* 2005;34:274-278.
- Sato T, Kawabata Y, Kobayashi Y, Suenaga S, Indo H, Kawano K, Iwashita Y, Morita Y, Majima H. Scintigraphy for interpretation of malignant tumours of the head and neck: comparison of technetium-99m-hexakis-2-methoxy-isobutyl-isonitrile (Tc-MIBI) and thallium-201-chloride (Tl-201). *Dentomaxillofacial Radiology* 2005;34:268-273.
- Hisada K, Tonami N, Miyamae Y, Yamazaki T, Maeda T, et al. Clinical evaluation of tumor imaging with 201-Tl chloride. *Radiology* 1978;129:497-500.
- Kostakoglu L, Uysal U, Özyar E, Hayran M, Uzal D, Demirkazik FB, Kars A, Atahan L, Bekdik CF. Monitoring response to therapy with thallium-201 and technetium-99m-sestamibi SPECT in nasopharyngeal carcinoma. *J Nucl Med* 1997;38:1009-1014.
- Takekawa H, Itoh K, Abe S, Ogura S, Isobe H, Furudate M, et al. Thallium-201 uptake, histopathological differentiation and Na-K-ATPase in lung adenocarcinoma. *J Nucl Med* 1996;37:955-958.
- Abbott A, Ball WJ. The epitope for the inhibitory antibody M7-PB-E9 contains Ser-646 and Asp-652 of the sheep Na^+/K^+ -ATPase alpha-subunit. *Biochemistry* 1993;32:3511-8.
- Espineda C, Seligson DB, James Ball W Jr, Rao J, Palotie A, Horvath S, Huang Y, Shi T, Rajasekaran AK. Analysis of the Na, K-ATPase alpha- and beta-subunit expression profiles of bladder cancer using tissue microarrays. *Cancer* 2003;97:1859-68.
- Kao CH, Tsai SC, Wang JJ, Ho YJ, Ho ST, Changlai SP. Technetium-99m-sestamethoxyisobutylisonitrile scan as a predictor of chemotherapy response in malignant lymphomas compared with P-glycoprotein expression, multidrug resistance-related protein expression and other prognosis factors. *Br J Haematol* 2001;113:369-

- 74.
15. Taki J, Sumiya H, Tsuchiya H, Tomita K, Nonomura A, Tonami N. Evaluating benign and malignant bone and soft tissue lesions with technetium-99m-MIBI scintigraphy. *J Nucl Med* 1997;38:501-506.
 16. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham, M. C. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987;84:7735-8.
 17. Yamashita K, Yonezawa S, Tanaka S, Shirahama H, Sakoda K, Imai K, Xing PX, McKenzie Ian FC, Hilken J, Kim YS, Sato E. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in hepatolithiasis and cholangiocarcinoma. *Int J Cancer* 1993;55:83-91.
 18. Kasarov LB, Friedman H. Enhanced Na⁺-K⁺-activated adenosine triphosphatase activity in transformed fibroblasts. *Cancer Res* 1974;34:1862-5.
 19. Orihashi N, Suga K, Yoneshiro S, Fujita T, Ohno Y, Arita T, et al. Evaluation of Tl-201 SPECT in differential diagnosis of benign and malignant lesions of the chest. *Yamaguchi Med J* 1992;41:274-83 (in Japanese).
 20. Hendrikse NH, Franssen EJ, Van-der Graaf WT, Meijer C, Piers DA, Vaalburg W, de Vries EG. 99mTc-sestamibi is a substrate for P-glycoprotein and the multidrug resistance-associated protein. *Br J Cancer* 1998;77:353-8.
 21. Schweil AM, Mckillop JH, Milroy R, Wilson R, Abdel-Dayem HM, Omar YT. Mechanism of 201-Tl uptake in tumors. *Eur J Nucl Med* 1989;15:376-379.
 22. Tomura N, Hirano H, Watanabe O, Kato K, Watarai J, Sasaki K, Tamura K. Evaluation of single photon emission tomography of tumors in the head and neck with technetium-99m MIBI. *Kaku Igaku* 1997;34: 471-479 (in Japanese).
 23. Tonami N, Shuke N, Yokoyama K, Seki H, Takayama T, Kinuya S, et al. Thallium-201 single photon emission computed tomography in the evaluation of suspected lung cancer. *J Nucl Med* 1989;30:997-1004.
 24. Yamamoto Y, Kawasaki Y, Nishiyama Y, Fukunaga K, Satoh K, Takashima H, et al. Comparative evaluation of 99m-Tc-MIBI (hexakis 2-methoxy isobutyl isonitrile) and 201Tl-chloride in primary lung cancer. *Kaku Igaku* 1996;33:501-11 (in Japanese).
 25. Kostakoglu L, Elahi N, Kiratli P, Ruacan S, Sayek I, Baltali E, Sungur A, Hayran M, Bekdik CF. Clinical validation of the influence of p-glycoprotein on technetium-99m-sestamibi uptake in malignant tumors. *J Nucl Med* 1997;38:1003-1008.
 26. Rabkin D, Chhieng DC, Miller MB, Jennings T, Feustel P, Steiniger J, Parnes SM. P-glycoprotein expression in squamous cell carcinoma of the tongue base. *LARYNGOSCOPE* 1995;105:1294-1299.

LEGENDS

Figure 1: Two regions of interest (ROI) on a frame image covered the tumor area (A) and the symmetrical region (B: control region).

Figure 2: Two curves showed radioactive count after injection in the tumor and control areas. In the dynamic scintigraphy, the early retention index was A/a and the delayed retention index was B/b. The tumor retention index was (delayed retention index) / (early retention index).

特別企画

歯学部の未来を考える～新学部長へのインタビュー

平成24年4月から松口新学部長が就任されております。特別企画として松口新学部長にお忙しい時間を頂いて、鹿児島大学歯学部の近未来について語って頂きました。

インタビューア：佐藤友昭

イ：松口先生、本日はどうかよろしくお願ひ致します。

松：こちらこそ、宜しくお願ひ致します。

イ：そろそろ、学部長になられて、1年が経とうとしているのですが、1年間振り返ってどうでしたでしょうか？

松：本音で言っていていいですか？（笑）。

イ：もちろん、本音をお願いします（笑）。

松：やはり、思っていたよりも大変でした。

イ：どのようなところが？

松：忙しいとは聞いていたのですが、単純な学部の業務以外にもたくさん仕事がありました。例えば、来年度から学校教育法と国立大学法人法の改定が行われますので、それに伴った各種の改定、改革を大学本部でやらなければいけない。それに関する大学全体の会議が例年に比べてかなり頻繁に行われたこと。また、大学全体が変更されるに当たって、当然、医歯学総合研究科と歯学部の規約や今までのやり方を変えなければいけないことがあります。これらについての話し合いやそのための資料作成の業務がたくさん入ってきたという事です。それに、昨年は学部長の仕事の当たり年（笑）でもあったそうで、例えば、学部長になって間もなくの昨年6月には、全国の歯学部関係者が集まる全国歯科大学学長・歯学部長会議が鹿児島で初めて行われましたので、それについての企画や準備、そして大会での司会・議事進行に非常に気を使いました。



イ：会場の手配なども先生がされたのですか？

松：それに関しては、事務方にやって頂いたのですが、会議のタイムスケジュールや議題の選び方、果てはお土産を何にするかまで決定しなければならなかった。それは例年には無い仕事でした。また、今年は歯科医学教育学会が鹿児島で行われることになりまして、これも鹿児島では初めての事です。この学会は学部長が会頭になる決まりですから、去年の北九州で行われた歯科医学教育学会に次期会頭として出席して挨拶をして参りました。このような訳で、今後は歯科医学教育学会についての来年に向けての準備が入ってきます。煩雑な業務の殆どは、実行委員長の田口教授と歯科医学教育実践学分野のスタッフが中心になって行っているのですが、会頭としての会議の出席や決定事項もありますので、そういうのも追加の仕事になりました。

松：先ほど話した大学改革についての追加事項として、鹿児島大学では今年4月から教員組織と教育組織が分離されることになっています。新たに学術研究院というものを創設して、教員人事に関してはその学術研究院の管轄として一括してしまう。つまり従来の学部のシステムと教員人事をセパレートなものとする事に決まっています。これに関しても、全体の会議や学部における規約変更の為の仕事が現在も続いています。このような訳で、思った以上に忙しかったと言うのが正直な本音です。

イ：学術研究院を置くメリットは何なのでしょう？

松：これが上手く機能発揮すると、我々の所属と仕事
が分離しますので、学部間の交流が盛んになりま
す。例えば、今まで歯学部
に在籍していた教員が他の
学部
に講義に行くことができる。逆に、例えば工
学部
でしか講義していなかった先生が、歯学部
で講
義することができるようになる。つまり、自分の専
門の分野の教育を他の学部
で講義することができま
す。学術研究院を置くことで、学部間の閉塞性を無
くし交流を盛んにすることが究極の狙いだと思いま
す。

イ：歯学部が創立されて30年以上経っているわけで、
そろそろ未来的な話に移って行きたいのですが、取
り敢えず、現在の鹿児島大学の長所と短所をどのよ
うに分析されていますか？

松：よく言われる事ですが、私達の鹿児島大学歯学部
は南九州の唯一の歯科大学と言う立場ですから、地
域医療、特に南九州、数多くある離島、沖縄も含め
て地域一体の歯科医療に責任を持つ立場にあります。
特に離島に関しては、私達は他大学には無いよう
な特別な立場にあると認識しています。更に南九州
は高齢者も多い地域です。離島医療や高齢者医療
を学ぶ目的であれば、地理的なメリットは大きいと
思います。

デメリットとしては、鹿児島大学は地方大学でも
ありますので、卒業生にとっての魅力的な受け皿を
作っていかないと、人材が中央や大都市の大学に出
て行ってしまふケースが結構多い。せっかく、良い
学生さんや研究者が育っても、最終的に他のところ
に移ってしまふ、この大学に最終的な貢献をして
もらえないと言うことが、よくありますので、そこ
ら辺がデメリットかなと考えています。

イ：このようなことから、鹿児島大学歯学部はどのよ
うな方向で改革をしていくのが、ベター、ベストな
のでしょうか？

松：多分、一番基本的な考えは、この学部にとって地
域医療に対する責任が重要であるということです。
文科省や厚労省も鹿児島大学のような地方大学には
そのような責任をメインに求めてきているのだと思
います。よく言われますが、単なるミニ東大を目指

すというだけではダメで、地域のニーズに根ざした
教育、研究、それを担える人材の育成というのが一
番重要になってくると思います。ただ、個人的な見
解としては、大学は当然最先端で国際的な教育・研
究を行う場であるわけですから、単に地域限定の医
療・歯科医療を行うだけではいけない。文科省から
最近強く求められている大学のグローバル化が良い
例ですが、世界に開かれた大学にしなければならない。
つまり国際的なレベルでの交流も要求されている。
特に鹿児島は地理的に東南アジアとか東アジア
に近い訳ですから、この地域との交流をもっと盛ん
にしていって、そういう地域から人を呼ぶ、学生を
取り入れる。あるいは、鹿児島大学から東南アジア
とか東アジアの歯科医療の遅れている地域などに人
を派遣する、その地域の歯科医や研究者を指導す
る。そのようなことができる人材を育てて行かなけ
ればならないと思います。また、グローバル化と言
うからには、他の国から見えるような魅力作りが必
要となってきます。そうするとやはり、国際レベル
の研究、教育内容を持ちそれを磨いて行かなければ
ならないので、単に地域医療をやっていれば良いと
は、考えておりません。それゆえ、国際的に認めら
れるように研究のレベルや教育の質を上げていかな
ければならないと考えております。魅力的な内容を
持っていないと、いくら人を呼んでも来てくれない
でしょうから（笑）。これは歯学部に限ったことで
はなく、鹿児島大学全体に他の国から来ていただけ
る為のレベルの高い研究・教育というのを持つこと
は必要で、これを実現するための改革はやって行か
なければならぬと考えています。

イ：そのためにも人材の育成は大切と考えますが、現
在、鹿児島大学歯学部は新しい教育プログラムに改
革しようとしています、これは人材育成の点でど
のようなもの、または、考えに基づいているので
しょうか？このプログラムの売りとなる点はどのよ
うなものなのでしょうか？

松：カリキュラム改革に関して今、小松澤、田口両教
授がメインになって担当を行っていただいています。
考え方の基本となっているのは、アウトカム（成果）
を基盤とした6年間の一貫教育ということです。目
的となるアウトカムについては幾つかの柱を立てて
います。例えば、患者さんや同僚とのコミュニケーション能力とか、診療・基礎知識とか、リサーチマ

インドとかいったものです。それぞれの能力を、6年間一貫して培っていけるようなプログラムにしようとしています。つまり、ある成果の実現を目的として教授する場合、各学年の理解のレベルにあった内容をよく吟味して、それを6年間に渡ってカリキュラム上に散りばめ、順序よく高めていくのが大きな柱だろうと思っています。

また、コミュニケーション能力の一環として新しく導入されるのが英語教育です。今まで、2年生以降の学生さんは、語学の教育は受けていなかったですので、それを導入することになりました。これも先程話したように、グローバルな人材育成という点では、国際的に通用する人材には不可欠な要素だと思います。もう一つの新しい試みは、学生の研究室配属の義務化です。将来の医学・歯学研究を志向する、もちろん必ずしも志向しなくてもよいのですが、学生さんが実際に研究の現場に入って、出来るだけ早い時期から研究とはどのようなものなのかを見てもらって、研究に対する学生さんのモチベーションを上げてもらいたいし、臨床をしながら研究をしていくような、いわゆるリサーチマインドを持った学生さんを出来るだけ育てていきたいと考えています。もう一つ、新しいカリキュラムで重視しているのが、アクティブラーニングと呼ばれているもので、これは、学生さん達が自分で考えて自分で学習をして行けるような科目や内容を出来るだけ取り入れていこうとするものです。例えばPBL(*Project-Based LearningやProblem Based Learningのアクロニウム)が代表的なものですが、これについての検討も行っているのです、順調に行けばカリキュラムの中に取り入れて活用できることになります。この辺が今回の改革の大きな柱となると思います。

イ：どれ位の期間でカリキュラムの改革達成をすることになるのでしょうか？

松：来年度の一年生を皮切りにやっていこうと思っています。カリキュラムを担当している教育委員会は、私が難しいかなあと思っていたことに対しても素早く実行してくれていて、来年度4月からの改革の意思を持ってやっていただいています。順当に言えば来年度の4月入学の学生さんからカリキュラムを変更していくという形で次第に置き換えていくことになります。ですから、当面は既存の旧カリキュラムと新カリキュラムを並行してやっていくという

ことになっていくと思います。ただし、実際に新カリキュラムをやり始めていくと色々問題点も見えてくるでしょうから、それらについては適宜対応していかなければならないでしょうし、当初想定していたものが必ずしも上手くいくとは限らないので、その辺に関しては注意しては行かなければならないと思っています。

イ：若手研究者育成についてはどのようにお考えでしょうか？今まで若手の採用は学部には任されていましたが、学長主導型になって、今後どうなるのか？この機会に学部長先生から実際にどのようなことになるのか？分かりやすくお話していただけたらと思います。

松：人事権は全て学長に移りますので、最終的な人事の決定権は学部の手を離れます。ただ現状のシステムによりますと、学長は学部の意見を聞いた上で、人事を決めることになっていますので、私達が色々考えて適任者を上程していき、それをしっかり学長に説明して理解していただく。ですから、決して学部の意思に反する人事がなされるというわけではなく、また逆に学部の意思を無視したような人事があってはいけないと思います。

イ：若手研究者の育成に関してはいかがですか？

松：難しい問題ですね。(笑)

松：先程も少しお話しましたが、大学の執行部が各部署の実情を必ずしも詳細に知っているわけではありません。また、大学全体の繁栄のためには各学部・研究科の繁栄が必要になるわけです。つまり、部局のどこかのポジションを吸い上られて、若手の研究ポジションがなくなるとか、忙しすぎて研究時間がなくなるとかは、あってはならないことだと思います。逆に若手研究者が働ける環境を増やしていくために、学部の状況について、こちらから大学執行部に話して行って、「このような事を考えているから、このような人事をお願いします。」といったコミュニケーションやお願いをしていけるでしょうし、していかなければなりません。

イ：男女共同参画についてはいかがでしょうか？

松：それについては、本歯学部では昔から問題になっていて、現状でここでは、女性の教授職はいらっしやいません。准教授の先生はいらっしやいます。男女共同参画の意味としては、男女とも平等に学部に貢献していただける環境づくりしたいと思っております。しかしこれは、男女平等の面からいって、女性だから雇うと言った様な簡単なものでもありません。女性に学部の運営や研究教育をしっかりと関わってもらいたいと言う意向はあります。学部としては女子学生が多い学部でもありますので、今後、当然、積極的に考えていきます。しかしこれは平等なスケールで考える事が大事で、女性だから、逆に男性だからといって差別があってはいけないと考えております。もちろん、女性教員については、基本的に数を増やしていきたいと考えておりますが、それを焦って、頭数だけを合わせてしまうと良くないと思っております。

イ：忙しい中、モチベーションの維持や気分転換、時間の使い方はどのようにされているのですか？

松：今までやってきた生化学の教授としての仕事、つまり教育とか研究を極端に減らすつもりはありません。その分ちょっと忙しくはなるのですが、出来るだけ空いた時間を使って、研究に関しては、研究室のセミナーとか研究指導とかは以前と変えてはいないですし、自身で手を動かす機会も残すようにしています。まあ、それに関しては大変な部分もあるのですが、出来るだけ守っていきたくと思います。

イ：時間の遣り繰りの秘訣みたいなのはありますか？

松：決して上手に遣り繰りしているとは思いませんが、学部長として24時間勤務している訳ではありませんし、決して今までの教授としての仕事が無効された訳でもありません。教授としての仕事もやらなければなりませんので、教授としての講義の時間があれば学部長の仕事を他の時間に回してもらおう。また、逆の事もあります。つまり仕事の priority を考えながら、時間を上手く遣り繰りしていくしかありませんね。

イ：分かりました。いままで、出て来た事以外に先生が行いたい改革はありますか？

松：能力のある人たちが沢山いても、それを発揮できる場がないというのが一番いけないと思いますので、そのようなことが絶対ないようにしていきたいと思います。もう一つ、この学部の学生さんや若手の研究者の考え方、意識の問題かもしれませんが、研究に関してももうちょっと積極的に行ってってもらいたいなと強く思っています。こちらとしては、できるだけ機会を作ろうとしているのですが・・・例えば、研究セミナーを開催してもあまり人が集まらないとか・・・。各々個人の意識改革が必要と考えれば、なかなか難しい問題ですね。

イ：生化学講座の学生ゼミは先生自身が行っているものですか？

松：はい。

イ：先生の行っている学生ゼミに対する質問もあります。例えば、先生の英語ゼミに対する効果はいかがでしょうか？

松：歯学部生を対象にした英語ゼミのことですね。効果については、個人的にはそれなりにはあるだろうと思っております。例えば、実用英語という点で言うと、ゼミに参加した学生さんの TOEIC（国際的な実用英語検定試験）のスコアが飛躍的に上がった事を経験しています。ただ、私が行っている英語ゼミは週1回1時間のみのスケジュールで行っていますし、他の仕事が入ると休ませてもらっていることも多いです。だから、これだけ受けていれば（英語が）上手くなりますとか、論文が読めるようになりますとか、そのようには思っていないですね。一つは（勉強の）きっかけを作って行けば良いと思っています。（英語の勉強に関しては）自分自身のやり方を模索する参考にしてもらいたいと思っています。週一回1時間の勉強だけでは到底足りないと思いますので、これをきっかけにして自分で勉強してもらおう。英語に関しては、よく言われる事ですが、毎日10分間ずつ勉強しようとか、それだけでもかなり効果は出てくるのですね。つまり、知識を教えるのではなくて、きっかけに成るような事とか、英語の勉強の仕方とか考え方とかについてもできるだけ教えるようにはしています。

イ：最後に纏めとして、鹿児島大学歯学部の近未来像

をお話し頂ければと考えております。

松：近未来像ですか……。希望を言えば、幾らでもありますね。やはり、鹿児島大学の歯学部には是非来たいと言う学生さんが増えてもらいたいです。教員にしても、ここで是非研究したいとか、或いは教育をしたい、その様なスタッフが集まってくるような学部になればいいなどは思っております。そのためには、色々やらなければならぬ事は多いと思いますけれど……。

イ：それについては、先ほどの改革の話に集約されるわけですよ。

松：そうですね。つまり、現状に満足してはいけなと思いますし、勿論、不満があるばかりではありませんし、それなりにきちんとやっている学部だと思います。これはスタッフの皆さんの努力のお陰ですね。ただ、現状で満足するのではいけない。例えば、学部の入試の競争率にしても、本当はもっと上げていきたい。単純に、「偏差値がこれくらいだから、あそこに行きましょう。」と言うのではなくて、受験生に名指しで来てもらえるような学部になって欲しい。そのためには、やはり、我々がそのような学部に変えていかなければならないと思っています。良くないところがあれば、変えないといけないでしょうね。もちろんそれは簡単では無いでしょう。そのようなことが沢山あるから、希望する近未来像の実現は簡単ではないですね。我々ができる範囲で、しっかりした教育と研究をやって、それが評判になれば、学生さんも来たがるだろうし、良い学生が集まれば卒業生の国試の合格率も上がるでしょうし、そういう良いサイクルに入っていければ良いです。これが逆になれば、今度は悪循環になってしまいますからね。皆で努力して、できるだけ良い方向にむけて行きたいですね。

イ：松口先生、お忙しい中、時間をオーバーして語って頂いて有難うございました。

松：こちらこそ、あまりまとまらない話になって済みませんでした。

歯冠補綴治療における接着技法の現状

南 弘之

鹿児島大学大学院医 歯学総合研究科
先進治療科学専攻 顎顔面再建学講座
咬合機能補綴学講座

Current state of bonding systems in fixed prosthodontic treatment

Hiroyuki Minami

Department of Fixed Prosthetic Dentistry
Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation
Advanced Therapeutic Course
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences

ABSTRACT

Progress of bonding techniques in dental materials is prompting to come through with the diverse demands in dental practice. Applications of bonding techniques enable the preservation of intact tooth structures during prosthetic and restorative treatments by minimal tooth reduction, which realize the minimally invasive clinical practice.

In these days, bonding to dentine, enamel, many kinds of alloys, and zirconia has been improved, however, definite technique has not yet been established for the bonding to ceramics and indirect resin composites. This article introduces the current state of bonding systems available to indirect resin composite, ceramics, metal-ceramic gold alloys, and zirconia, on the basis of the study results achieved in our laboratory. Some clinical cases are also presented to show how these bonding techniques should be used in clinical practice.

1. はじめに

歯科診療における接着技法の進歩は、多様化する歯科治療のニーズに応えるのにおおいに役立っている。臨床において接着技法を可及的に応用することは、最小限の歯質削除で欠損補綴を行う事により、修復治療において健全歯質を可及的に保存することを可能にしており、ミニマル・インターベンションの概念を具現化していると言える。

また、破折や顎堤との不適合を来した義歯修正は、確実で強固に補修を行うことで、使い慣れた義歯の継続使用を可能にする。これは、超高齢化社会を迎える

にあたり、外来診療への来院回数や、訪問診療時の訪問回数を減らして、患者および術者双方の負担軽減につながる。また、離島巡回診療や災害時の避難所等での診療活動にも有効であろう。

現在では、歯質、金属、ジルコニアなど、種々の修復材料に対する接着性は著しく向上しているが、セラミックス、コンポジットレジンなど、未だに十分な接着が得られていない材料もある。本稿では、日常の歯冠補綴治療に用いる材料について、当講座での研究成果と臨床例を中心に、接着技術の現状を紹介したい。

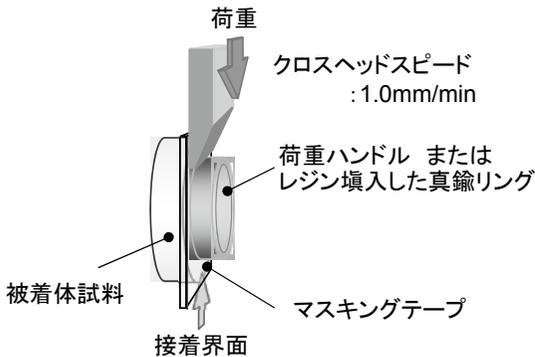


図1. 剪断接着試験片と剪断試験

2. 接着試験の概要

接着試験片と、接着強さ測定の概要を図1に示す。接着試験は、当講座では多く場合に剪断接着強さで評価している。剪断接着試験片は、被着体（何かを接着しようとする対象）と荷重用ハンドルを接着材で貼付けた構造、もしくは、被着体の上に目的とする材料を築盛した構造をしている。いずれも、被着体の被着面には評価の対象となる接着のための表面処理を行なう。

完成した試験片は、試験片作製直後の接着強さを測定するとともに、口腔内での接着耐久性を評価することが重要なので、耐久試験（加速試験、疲労試験、加齢試験）に曝される。耐久試験としては、熱サイクル試験が用いられることが多い。これは、試験片を5（±1）℃の冷水と55（±1）℃の温水に各1分ずつ交互に浸漬する方法で、温度変化による接着界面の膨縮とそれに伴う水分の侵入により、接着界面の劣化を促す方法である。5,000回の負荷が口腔内で半年に相当すると言われている¹⁾。通常、熱サイクルを数千回から数万回与えた後に接着強さを測定している。

剪断試験は、図1に示すように、接着界面に沿って界面に平行に削ぐような力を加え、剥離に要する荷重を測定することによって行なう。破折に要する荷重(N)を接着面積(mm²)で除することによって、剪断接着強さ(N/mm²=MPa)を算出している。

3. 硬質レジン（ハイブリッドレジン）とレジンセメントの接着

臼歯部の歯冠修復においても、金属による鑄造修復物から、審美的要求を満たす材料の使用が望まれるようになっており、これは、金属アレルギーや辺縁歯肉への着色に対する懸念²⁾もこの傾向を促進している。

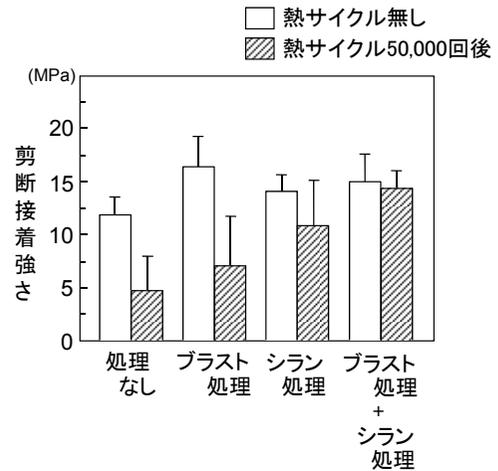


図2. ハイブリッドレジンに対するレジンセメントの接着強さ

その代表はオールセラミック修復であり、生体親和性³⁾や、審美性に優れる⁴⁾一方で、脆さ⁵⁾や、歯質切削量が多いこと、テクニクセンシティブであること⁶⁾、高価であることなどの欠点も持つ。

セラミッククラウンの安価な代替物として、ハイブリッドレジンを含むコンポジットレジンをを用いて製作するジャケットクラウンがある。近年のコンポジットレジンは改良が進み、セラミックに近い機械的強度⁷⁾や耐磨耗性⁸⁾を有する。しかし、完全に硬化し、表面の未重合層を除去したコンポジットレジンは、現在の歯科材料の中でも接着が最も困難な材料の一つとされる。

そこで、ハイブリッドレジン (Estenia C&B, クラレ) と接着性レジンセメント (Panavia F2.0, クラレ) の接着の実態を明らかにした⁹⁾。接着のため表面処理としては、平均粒径50μmのアルミナ粉末を用いたプラスト処理、シランカップリング剤 (Clearfil porcelain bond activator, クラレ) の塗布、およびそれらの組合せである。結果を図2に示した。両者の接着にあたっては表面処理が必須で、アルミナ粉末によるサンドプラスト処理後に、レジン中のガラス系フィラーに対してシラン処理を行なうことが重要であることが明らかとなった。

さらに槌打試験を用いて、ジャケットクラウンの耐久性に及ぼす、支台材料と装着材料の影響について、破折に至るまでの槌打回数によって評価した¹⁰⁾。これは、硬質レジン (Meta Color Prime Art, サンメディカル) とハイブリッドレジン (Estenia C&B) の2種類

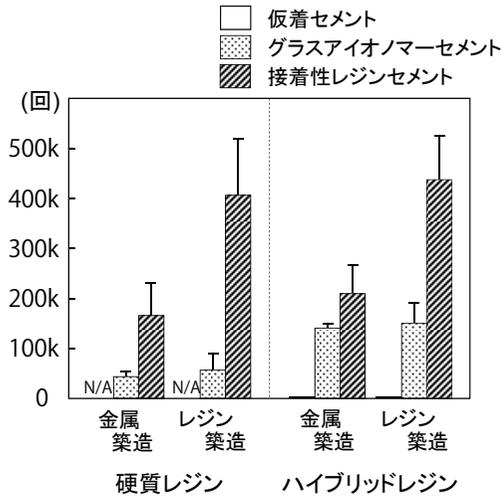


図3. ジャケットクラウンの耐久性に及ぼす支台材料と装着材料の影響



図4. CAD/CAM 冠製作に用いるハイブリッドレジンブロック

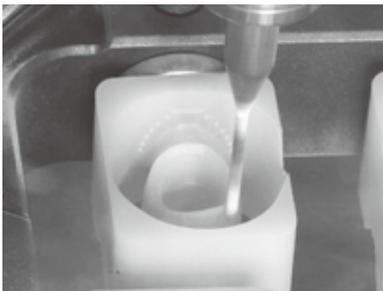


図5. CAD/CAM によるジャケットクラウンの削り出し

の材料で製作したジャケットクラウンを、金属支台またはレジン支台に、維持力の異なる3種類のセメントで装着した場合を比較している。結果を図3に示す。いずれのジャケットクラウンにおいても、支台材料に関わらず、接着性レジンセメントで接着することによって高い耐久性が得られることが実証された。

折しも、平成26年4月より、CAD/CAM 冠が保健診



図6. 支台歯形成



図7. 完成したCAD/CAM 冠

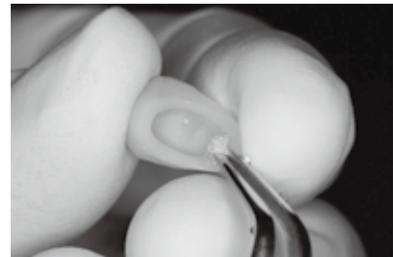


図8. 冠内面の接着用表面処理

療に導入された。これは、ハイブリッドレジンブロック（図4）からCAD/CAM システムを用いてジャケットクラウンを削り出して（図5）補綴物を製作するものである。

CAD/CAM 冠の臨床例を図6～10に示した。口腔内装着にあたって、従来法のジャケットクラウンと同様に、シラン処理が接着処理の要となると思われる。しかし、ブロックのフィラー含有率は製品により異なることから、フッ化水素によるエッチング⁹⁾が有効な可能性もあり、現在、詳細について検討を継続中である。また、コンポジット材料の修復材料としての導入は今後拡大することが予想されることから、フィラーへのシラン処理のみならず、接着処理が可能なマトリックステジンの開発等、新素材の開発を行なう必要がある。



図9. 支台歯の接着用表面処理



図10. 口腔内装着

4. 金属の接着

修復物の製作材料が、金属から非金属材料に進む一方で、現在のところ、金属を用いなければ達成し得ない治療も存在する。その代表として接着ブリッジが挙げられる。金銀パラジウム合金製の接着ブリッジは、信頼性を増したことから平成20年度に前歯部が、平成24年度に臼歯部が健康保険適応され、臨床で選択される頻度も増加している。金属の接着技法においては、プライマーの使用は不可避である。

1) 近年の金属用プライマー

金属用プライマーは、接着性モノマーを有機溶媒に溶解したもので、それぞれに異なる接着性モノマーを含有している(表1)。最近は、貴金属もしくは貴金属・非貴金属両用のものが普及している(図11)。



図11. 各種の金属接着用プライマー

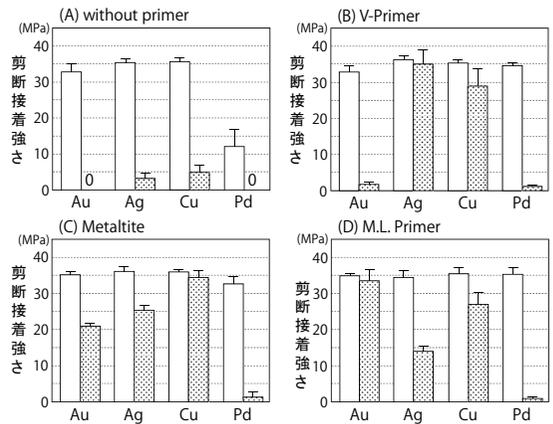


図12. 成分純金属とレジセメントの接着強さに及ぼす各種プライマーの効果

表1. 金属接着性プライマー

用途	製品名	接着性モノマー	製造元
非貴金属用	ボンディングライナー	4-META	サンメディカル
	MR ボンド	MAC-10	トクヤマデンタル
	アクリルボンド	4-AET	松風
	エブリコードオパークプライマー	MDP	クラレノリタケデンタル
貴金属用	V-プライマー	VBATDT	サンメディカル
	メタルタイト	MTU-6	トクヤマデンタル
貴金属・非貴金属両用	アロイプライマー	VBATDT, MDP	クラレノリタケデンタル
	メタルリンク	MDDT, MHPA	松風
	メタルプライマーII	MEPS	ジーシー

4-META, MAC-10, 4-AET: カルボン酸系モノマー
 MDP: リン酸エステル系モノマー
 VBATDT: トリアジンジチオール系モノマー
 MDDT: チオクト酸系モノマー
 MTU-6: チオウラシル系モノマー
 MHPA: ホスホン酸モノマー
 MEPS: チオリン酸エステル系モノマー

成分純金属とスーパーボンドC&Bの接着における貴金属用プライマーの効果を、熱サイクル試験前と熱サイクル2,000回負荷後に評価した¹¹⁾。図12に結果を示した。プライマーによって反応性を示す成分純金属が異なり、V-プライマーは銀と銅、メタルタイトは銅、銀、そして金に対しても効果を認めた。メタルリンクは、金と銅に対して効果が高い効果を示した。これらの結果から、金銀パラジウム合金であるキャストウェル MC12（ジーシー）では、銀を46%、銅を20%含むことから、いずれのプライマーも金銀パラジウム合金に有効であることは想像に難くない。

対象金属の種類に関係なく各接着性モノマーに共通していることは、分子鎖の一端に金属と結合する構造を、他端にレジセメントと結合する構造を持つことである。貴金属用の接着性モノマーの金属に結合する構造にはイオウ（S）が含まれ、これが金属表面に結合する。しかし同時に、この構造はBPO-アミン重合開始系のレジセメントの重合を阻害するとされる。そのため、貴金属接着プライマーを用いる場合には、TBBO 重合開始系のスーパーボンドC&Bを使用することが多い。

2) 陶材焼付用貴金属合金への応用

金銀パラジウム合金を用いて作製される接着ブリッジの問題点は、大きく2点に集約される。一つは、合金などに比較すると、歯肉との親和性、腐食・変色の問題、 casting精度などでは若干劣る可能性である。もう一つは、前装に用いる硬質レジンの磨耗や、外来色素由来の着色、紫外線による変色、歯肉との親和性の悪さ、などである。この問題を解決するためには、貴金属の焼付用合金を使用してリテーナーを作製し、ポニティックを陶材で前装することが望ましいが、臨床応用されてこなかった。これは、初期の貴金属用接着性モノマーが焼付用貴金属合金に効果を示さなかったためであるが、これは、陶材焼成時の変色を防ぐために、接着性モノマーとの反応性が高い銅（Cu）が含まれないことや、やはり反応性の高い銀（Ag）も

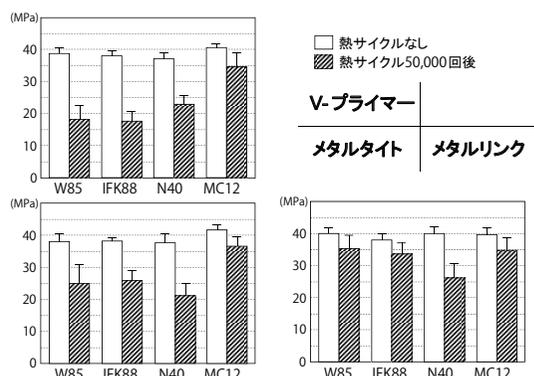


図13. 陶材焼付用貴金属合金とレジセメントの接着強さに及ぼす各種プライマーの効果

多少の変色を来すことから少量しか含まれない（表2）ためと考えられる。しかし、最も新規のメタルリンクが金（Au）に有効であったことから、表2に示す3種類の焼付用合金に対する貴金属用プライマーの効果を、金銀パラジウム合金の場合と比較した¹²⁾。熱サイクル試験前と熱サイクル50,000回負荷後の接着強さを図13に示した。金の含有率の高い焼付用合金は、メタルリンクを用いることで、金銀パラジウム合金の場合と同等にスーパーボンドC&Bと接着することが明らかとなった。

これらの結果をもとに、陶材焼付用貴金属合金でリテーナーを製作した接着ブリッジの臨床応用を行っている。

図14～18に、上顎左側中切歯欠損例の治療経過を示す。支台歯形成や（図15）印象採得の手順は、金銀パラジウム合金接着ブリッジの場合と何ら違いはない。

完成した接着ブリッジは、口腔内で試適した後に、接着のための処理を行う。金属用プライマーを適用する前に不可欠なことは、50μm 粒径のアルミナ粉末を用いたサンドブラスト処理である（図16）。サンドブラスト処理の目的は、微細な凹凸の形成による機械的嵌合の獲得や被着面積の増大、被着面の機械的清掃、酸化膜の形成、などである。この例では金属用プラ

表2. 各種合金の組成

合金の種類	製品名	製造元	含有率（重量%）				略号
			Au	Ag	Pd	Cu	
陶材焼付用合金	Super Metal W-85	クラレノリタケデンタル	78	2	10	-	W85
	IFK88 GR	石福金属	88	-	10	-	IFK88
陶材焼付用パラジウム合金	Super Metal N-40	クラレノリタケデンタル	43	2	44	-	N40
金銀パラジウム合金	Castwell M.C.12	ジーシー	12	46	20	20	MC12



図14. 上顎左側中切歯の欠損例



図18. 口腔内装着



図15. 充填物を除去し最小限の支台歯の削合を行なう



図19. 右側中切歯の欠損例

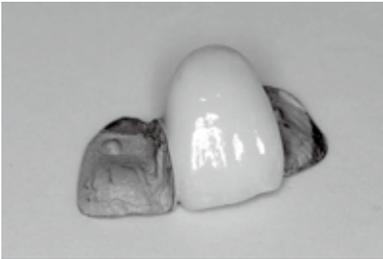


図16. リテーナにプラスト処理後金属用プライマーを塗布



図20. 支台歯形成



図17. 歯面の表面処理後に装着



図21. 歯面の表面処理後に装着

イマーとしてメタルリンクを、メーカー指示に従ってスポンジペレットを用いて塗布した(図16)。支台歯にも必要な表面処理を施したうえで、スーパーボンドC&Bを用いて支台歯に強固に接着することができる(図17, 18)。

図19~22には上顎右側中切歯の治療例を示した。ボンティックを陶材焼成により作製した接着ブリッジ(図18, 22)では、審美的にも隣接する天然支台歯に近い質感が得られる。製作に要する期間や装着手順も従来の硬質レジンで前装するブリッジとほとんど変わ



図22. 口腔内装着



図26. 歯面および修復物の表面処理後に装着

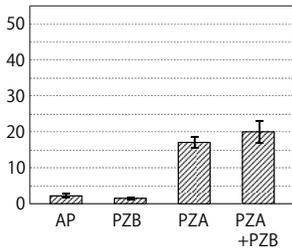


図23. 陶材とレジンセメントの接着に及ぼす各種プライマーの効果



図27. 口腔内装着



図24. 窩洞形成 (第一小臼歯)



図25. 加圧成形によって製作した修復物

5. セラミックスの接着

金属に替わる修復材料の一つがセラミックスである。インレーやアンレー、ラミネートベニアの製作に用いる、アルミノシリケートガラスセラミック（ヴィンテージ ZR プレスオーバー，松風）に対する接着性レジンの接着強さを報告している¹³⁾。セラミック表面には、プラスト処理後に非貴金属用接着性モノマーを含有するプライマー（アロイプライマー，クラレ：AP，およびPZプライマーB液，サンメディカル：PZB）と，シラン処理材（PZプライマーA液：PZA，およびPZプライマーA液とB液の混合：PZA+PZB）を適用し，スーパーボンドC & Bを接着した。熱サイクルを50,000回付与した後の接着強さを図23に示した。非貴金属用接着性モノマーのAPおよびPZBはセラミックスには効果がなく，シラン処理材を含むPZAまたはPZA+PZBが有効であった。

近年は，加圧成形によって修復物を製作する二ケイ酸リチウムガラスセラミックス（IPS e.max Press，Ivoclar Vivadent）を用いる機会も増えている。従来の陶材に比較してセラミックス自体の物性が高く¹⁴⁾，シラン処理^{15, 16)}によって得られる接着強さはリユーサイト系セラミックスと同等である^{14, 17)}とされている。

このセラミックスによる上顎右側第一小臼歯の修復例を図24～27に示した。歯質と強固に接着し，一体化するこのよって成立している。また，部分的な修復で

りない。なお，プライマーを含む接着システムのみ頼ることは危険である。機械的な維持力や嵌合力をできる限り利用することが好ましい（図15，20）。

も、周囲の歯質に調和した修復が可能である。

6. ジルコニアの接着

審美歯冠修復物の中では、陶材焼付鑄造冠の代替としてジルコニアを用いたクラウンが使用される頻度も

増えてきた。これは、ジルコニアが高い強度をもちながら、高いレベルでの審美的再現性や生体親和性を持ち合わせている¹⁸⁻²⁰⁾ためである。ジルコニアを用いた審美歯冠修復物の臨床例を図28～33に示した。支台歯に適合するクラウンの下層構造を、ジルコニアを用い



図28. 補綴治療前(矯正終了後)



図32. 陶材の焼成



図29. 支台歯形成



図33. 口腔内装着



図30. CAD/CAMシステムを用いて製作したジルコニア下層構造

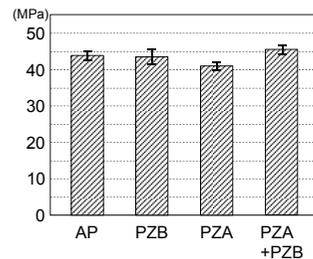


図34. ジルコニアとレジンセメントの接着強さに及ぼす各種プライマーの効果



図31. 口腔内試適, 色調選択



図35. 下顎根分割歯への応用



図36. 口腔内装着



図37. 上顎白歯部ブリッジへの応用



図38. 口腔内装着

てCAD/CAMシステムにより製作し(図30)、これに陶材を焼成してクラウンを製作する(図32)。陶材焼付鑄造冠と同様の二層構造からなるが、歯頸部での金属の影響がなく、透過光を応用できるため、審美的に優れた修復物が得られる(図33)。

ジルコニアは非常に強度の高い材料であるが、口腔内では支台歯に対して接着性レジンセメントを用いて強固に装着することにより、破壊強度が改善することが報告されている²¹⁾。そこで、ジルコニア(Cercon, Dentsply)とスーパーボンドC&Bの接着強さを評価した¹³⁾。前項目のセラミックスとの接着(図23)と同じ条件で表面処理を行ない、熱サイクル50,000回負荷後のデータのみを図35に示した。ジルコニアは、非貴金属用プライマーやシランカップリング剤など、多くの方法で強力に接着できることが明らかとなった。

一方で、陶材焼付ジルコニアクラウンでは、両者の焼付状態に問題が生じることがあり、陶材が剥がれたり欠けたりすることが報告されている²²⁾。したがって、近年は強い咬合力が加わる臼歯部では、全体をジルコニアで作製し、審美的表現は表面への着色(シェイディング)のみで行なう方法が用いられるようになった。これは、クラウン(図35, 36)でもブリッジ(図37, 38)でも応用可能である。審美的な限界が許容されれば、強度と審美性のバランスがとれ、しかも強力に接着できることから、非常に優れた修復物として普及するものと考えられる。

今後の課題

接着技法の進歩は、ミニマルインターベンションの具現化とともに、耐久性に優れた審美補綴治療を可能にしている。これは、接着材の高強度化、修復材料自身の強度や、接着剤との反応性の高い修復材料の開発などを通じて、リテーナーの小型化や、複数歯欠損へのブリッジの応用などが実現するものと考えている。今後も、日常の臨床に速やかに役立つ成果を生むような研究を続けて行きたい。

引用文献

- 1) Gale, M.S., Darvell, B.W.: Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *J Dent*, 27, 89-99, 1999.
- 2) Wataha, J.C.: Biocompatibility of dental casting alloys: a review. *J Prosthet Dent*, 83, 223-234, 2000.
- 3) Sjögren, G., Sletten, G., Dahl, J.E.: Cytotoxicity of dental alloys, metals, and ceramics assessed by Millipore filter, agar overlay, and MTT tests. *J Prosthet Dent*, 84, 229-236, 2000.
- 4) Siervo, S., Pampalona, A., Siervo, P., Siervo, R.: Where is the gap? Machinable ceramic systems and conventional laboratory restorations at a glance. *Quintessence Int*, 25, 773-779, 1994.
- 5) Anusavice, K.J.: Recent developments in restorative dental ceramics. *J Am Dent Assoc*, 124, 72-84, 1993.
- 6) Kassem, A.S., Atta, O., El-Mowafy, O.: Fatigue resistance and microleakage of CAD/CAM ceramic and composite molar crowns. *J Prosthodont*, 21, 28-32, 2012.
- 7) Andriani, W. Jr., Suzuki, M., Bonfante, E.A., Carvalho, R.M., Silva, N.R., Coelho, P.G.: Mechanical testing of indirect composite materials directly applied on

- implant abutments. *J Adhes Dent* 12: 311-317, 2010
- 8) Ghazal M, Albashaireh ZS, Kern M: Wear resistance of nanofilled composite resin and feldspathic ceramic artificial teeth. *J Prosthet Dent* 100: 441-448, 2008.
 - 9) Hori, S., Minami H., Minesaki, Y., Matsumura, H., Tanaka, T.: Effect of hydrofluoric acid etching on shear bond strength of an indirect resin composite to an adhesive cement, *Dent Mater J*, 27, 515-522, 2008.
 - 10) Sakoguchi, K., Minami, H., Suzuki, S., Tanaka, T.: Evaluation of fracture resistance of composite crowns by cyclic impact test: Influence of indirect composite and abutment material, *Dental Materials Journal*, 32, 433-440, 2013.
 - 11) Okuya, N., Minami H., Kurashige H., Murahara, S., Suzuki, S., Tanaka, T.: Effects of metal primers on bonding of adhesive resin cement to noble alloys for porcelain fusing, *Dent Mater J*, 29, 177-187, 2010.
 - 12) Minami, H., Murahara, S., Suzuki, S., Tanaka, T.: Effects of metal primers on the bonding of an adhesive resin cement to noble metal ceramic alloys after thermal cycling, *J Prosthet Dent*, 106, 378-385, 2011.
 - 13) 村原貞昭, 南 弘之, 迫口賢二, 塩向大作, 柳田廣明, 村口浩一, 嶺崎良人, 鈴木司郎, 田中卓男: メタルフリー修復物の装着に広く応用可能なプライマーの開発に関する研究, *接着歯学*, 30, 129, 2012.
 - 14) Lin, W.S., Ercoli, C., Feng, C., Morton, D.: The effect of core material, veneering porcelain, and fabrication technique on the biaxial flexural strength and weibull analysis of selected dental ceramics. *J Prosthodont*, 21, 353-62, 2012.
 - 15) Marocho, S.M., Ozcan, M., Amaral, R., Bottino, M.A., Valandro, L.F.: Effect of resin cement type on the microtensile bond strength to lithium disilicate ceramic and dentin using different test assemblies. *J Adhes Dent*, 5, 361-368, 2013.
 - 16) Kalavacharla, V., Lawson, N, Ramp, L., Burgess, J.: Influence of etching protocol and silane treatment with a universal adhesive on lithium disilicate bond strength. *Oper Dent*, [Epub ahead of print], 2014.
 - 17) Rigolin, F.J., Miranda, M.E., Flório, F.M., Basting, R.T.: Evaluation of bond strength between leucite-based and lithium disilicate-based ceramics to dentin after cementation with conventional and self-adhesive resin agents. *Acta Odontol Latinoam*, 27, 16-24, 2014.
 - 18) Stawarczyk, B., Ozcan, M., Roos, M., Trottmann, A., Sailer, I., Hämmerle, CH.: Load-bearing capacity and failure types of anterior zirconia crowns veneered with overpressing and layering techniques. *Dent Mater*. 27, 1045-1053, 2011.
 - 19) Raigrodski, A.J., Hillstead, M.B., Meng G.K., Chung, K.H.: Survival and complications of zirconia-based fixed dental prostheses: A systemic review. *J Prosthet Dent*, 107, 170-177, 2012.
 - 20) Stawarczyk, B., Ozcan, M., Roos, M., Trottmann, A., Sailer, I., Hämmerle, C.H.: The fracture load and failure types of veneered anterior zirconia crowns: an analysis of normal and Weibull distribution of complete and censored data. *Dent Mater*, 28, 478-87, 2012.
 - 21) Lim, H.P., Yoo, J.M., Park, S.W., Yang H.S.: Fracture load of implant-supported zirconia all-ceramic crowns luted with various cements. *Int J Prosthodont*, 23, 361-363, 2010.
 - 22) Zesewitz, T.F., Knauber A.W., Northdurft, F.P.: Fracture resistance of a selection of full-contour all-ceramic crowns: an in vitro study. *Int J Prosthodont*, 27, 264-266, 2014.

神経系の骨芽細胞分化・機能への関与について

後藤 哲哉

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 神経病学講座 歯科機能形態学分野

Involvement of nervous system on the osteoblastic differentiation and function

Tetsuya Goto

Department of Oral Anatomy and Cell Biology, Neurology, Advanced Therapeutics Course,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
8-35-1 Sakuragaoka, 890-8544, Japan

ABSTRACT

Recently the relationships between nervous system and bone metabolism have been revealed. Though recent evidences suggest that both sympathetic and sensory nerves affect bone metabolism, little is known about the involvement of neuropeptides on the differentiation of stem cells into osteoblastic (OB) cells. The aim of our study was to investigate the expression patterns of neuropeptide receptors at each differentiation stage to evaluate the putative effects of neuropeptides during the differentiation from mouse induced pluripotent stem (iPS) cells, embryoid bodies (EBs), to calcified tissue-forming OB cells. Among neuropeptide receptors, $\beta 2$ -adrenergic receptor (AR) and calcitonin gene-related peptide receptor (CGRP-R) were expressed at all stages of cell differentiation, including the iPS cell stage, with peak expression occurring at the early osteoblastic differentiation stage. Another sensory nervous system receptor, neurokinin 1-R (NK1-R), was expressed mainly in the late osteoblastic differentiation stage. Furthermore, the expression of CGRP-R mRNA showed an additional small peak corresponding to EBs cultured for 3 days, suggesting that EBs may be affected by serum CGRP. These evidences suggest that the sympathetic nervous system receptor $\beta 2$ -AR and the sensory nervous system receptor CGRP-R may be involved in the differentiation of iPS cells into the osteoblastic lineage. NK1-R is likely to involve the late stage of osteoblastic cell differentiation. In other words each neuropeptide has an optimal period for the influence during the differentiation process of osteoblastic cells.

Key words: Induced pluripotent stem cells, osteoblastic cells, sympathetic nervous system, sensory nervous system, neuropeptide receptors

はじめに

骨を形成する骨芽細胞は間葉系幹細胞と神経堤由来の幹細胞から分化する。骨芽細胞の分化を研究する場合、これら間葉系幹細胞や神経堤由来幹細胞からの分化を調べた研究はなされているが、間葉系幹細胞や神

経堤由来幹細胞を純粋に分けて培養することは難しい。一方、Yamanakaらは4つの遺伝子、Oct3/4, Sox2, Klf4, および c-Myc を導入することによりマウス皮膚線維芽細胞からES細胞様多分化能をもつiPS細胞を作成した⁹⁾。いままでiPS細胞からいろいろな細胞へ

分化する方法が開発されており、マウスの iPS 細胞から骨芽細胞へと分化させる方法もいくつか報告されている^{10,11)}。この iPS 細胞から骨芽細胞へと分化させる方法を用いて、分化段階における受容体の発現を調べれば、どのような分化段階にどのような生理活性物質が作用する可能性があるのか調べることができるようになった。

骨には自律神経、知覚神経が骨膜のみならず骨端部など隅々まで多く分布している。過去の報告では自律神経または知覚神経は骨代謝との関連が示されており^{1,2)}、自律神経が骨代謝に影響を及ぼす事は実験的にも示されている³⁾。骨芽細胞上の β -adrenaline receptor (β -AR) を活性化することによる骨吸収の促進が認められており⁴⁾、骨芽細胞における interleukin 6 (IL-6)、IL-11、および receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) の発現の促進も認められている^{3,5)}。これらの所見は、 β -AR antagonist が交感神経系の活性に影響して骨粗鬆症の改善をもたらす事と関連している⁶⁾。知覚神経においても神経の軸索が骨組織に分布しており⁷⁾、substance P、calcitonin gene related peptide (CGRP)、neurokinin や hemokinin などの神経ペプチドが骨代謝を調節していることが明らかになっている^{2,8)}。ここでは、神経がどのように骨代謝に関わっているかと、未分化幹細胞である iPS 細胞から骨様組織を形成する成熟骨芽細胞に分化する過程における神経ペプチド受容体の発現を示す事で、神経ペプチドの骨形成への関わりを概説する。

1. 骨における神経分布

知覚神経線維には、有髄の A α / β 線維と A δ 線維、無髄の C 線維があり、A α / β 線維は主に触覚・深部知覚を伝え、A δ 線維は鋭い痛み、C 線維は鈍い痛みを伝える。また、感覚神経の末端は種々の感覚受容器の形態をとり、主に深部知覚を伝える固有感覚受容器と、侵害刺激を感知する侵害受容器がある。特に侵害受容器は自由神経終末の形態をとり、A δ 線維と C 線維に支配されている。骨における神経分布については骨膜以外神経があまり分布していないと考えられていた時期もあったが、神経を標識する技術の進歩により、骨の外表面のみならず骨髄側にも神経が分布していることが明らかとなった¹²⁻¹⁴⁾。骨膜は神経、血管に富み、自由神経終末と固有感覚受容器のいずれにも存在する。また、骨膜の表層や内層に痛覚関連の神経ペプチドである substance P や CGRP 陽性の神経線維が同定されている。さらに骨基質や骨髄中にもハバース

管やフォルクマン管を通じて神経が分布しており、A α / β 、A δ 線維、C 線維のいずれもが骨組織全体に広く分布している。無髄神経の分布密度は骨膜が最も高いが、骨髄腔にも多数の神経細胞が分布している。また、皮質骨や海綿骨内の神経線維は、骨幹部と比較して近位・遠位骨端部に高密度に分布している¹⁴⁾。一方、交感神経は骨膜や骨組織に分布するとともに、ハバース管内を通る血管を取り巻くように分布しており、骨組織内の造血系細胞の分化や機能の調節をしていると考えられている。交感神経の分布密度は骨膜と皮質骨・海綿骨では遠位骨端部が高く、骨髄腔では近位骨端部が高い¹⁴⁾。これらの所見は骨組織においても知覚神経・交感神経が分布しており、直接的もしくは間接的に骨代謝影響を及ぼしている可能性を示唆している。

2. 骨に対する神経分泌物質の作用

骨に神経が分布しているのは明らかになった。どのような神経が、どのように神経分泌物質を介して働いているかについて、現在までいくつか報告されている(表1)。神経から分泌される物質としては、自律神経ではアミン類である noradrenaline、神経ペプチドである vasoactive intestinal peptides (VIP)、pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) や neuropeptide Y などがあり、知覚神経からは C 線維の自由終末から放出される substance P や CGRP などが存在する。従来これらの神経分泌物質は神経伝達物質と考えられていたが、神経伝達物質としての作用以外に侵害刺激を受けた部位にも放出され神経原性炎症 neurogenic inflammation を生じる事が明らかになっている。つまり、侵害刺激を受けた C 線維を有する無髄の知覚神経は後根神経節もしくは三叉神経節で substance P や CGRP を産生し、一部は中枢側に運ばれるが、大部分は軸索を逆行して侵害刺激を受けた部位にそれらを分泌し、血管透過性の亢進などの炎症症状を起こすのが

表1 神経分泌物質による骨形成、骨吸収に対する影響

		骨形成	骨吸収
自律神経	NA	↓	↑
	VIP	↑	↓
知覚神経	CGRP	↑	↓
	SP	↑	↑

NA: noradrenalin; VIP: vasoactive intestinal peptide; CGRP: calcitonin gene-related peptides; SP: substance P

神経原性炎症である。従って、侵害刺激を受けた部位の近くに破骨細胞や骨芽細胞が存在し、それら神経ペプチドの受容体を有すれば、破骨細胞や骨芽細胞に直接的に神経ペプチドが働くことになる(図1)。

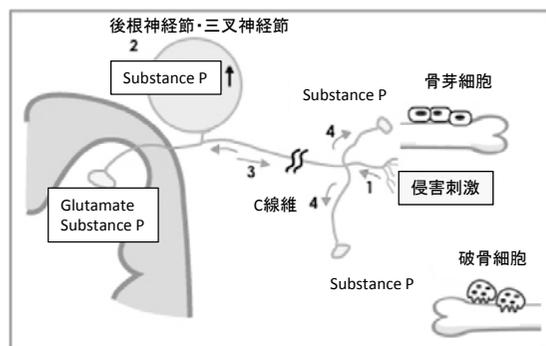


図1. 末梢神経が骨代謝に作用する経路

C線維を有する無髄の知覚神経が侵害刺激を受けると(1)、後根神経節もしくは三叉神経節において substance P等の神経分泌物質の産生が上昇し(2)、逆行性に末梢方向に運ばれ(3)、自由神経終末より放出され(4)、骨芽細胞や破骨細胞に直接はたらく。

A. 交感神経による骨代謝調節

交感神経系による骨代謝調節機構では、交感神経そのものより脂肪細胞から分泌されるレプチンを介しての中樞神経性の調節が報告されている。この、レプチンの骨代謝に対する影響の根拠としては、レプチン欠損マウス (*ob/ob* マウス) や、レプチン受容体欠損マウス (*db/db* マウス) では、肥満に加え、骨量増加が生じていることがあげられている¹⁵⁾。この結果を詳細に調べた結果、肥満や骨量増加が生じた原因は、レプチンの骨芽細胞に対する直接作用に影響したからでなく、中枢神経系の特に関与する交感神経系の活性が低下したためであることが明らかとなった。このことは、交感神経系は通常、骨形成を抑制するが、レプチン欠損マウスでは交感神経の働きが促進されないため、骨形成の抑制が行われず、結果として骨量の増加が生じたと考えられている。

交感神経による直接的な骨芽細胞の骨形成抑制については受容体が重要な働きをする。交感神経より放出された noradrenaline が骨芽細胞上の受容体と結合すると、転写因子 ATF4のリン酸化が増加し、破骨細胞分化に必須の RANKL の発現が亢進するとともに¹⁶⁾、転写因子 CREB (cAMP response element-binding protein) のリン酸化が低下し、骨芽細胞の増殖が低下する¹⁷⁾。このように、adrenaline は骨芽細胞を介して破骨細胞

の骨吸収を促進させるとともに骨形成を低下させるので、交感神経は骨量を低下させると考えられている。

B. 副交感神経による骨代謝調節

副交感神経は交感神経と平衡しながら骨代謝を調節していると考えられるが、実際、M-3ムスカリン受容体欠損マウスでは、交感神経系が活性化され、骨形成の低下と骨吸収の亢進に伴う骨量低下が認められる¹⁸⁾。また、副交感神経単独の作用としては、主として副交感神経終末から放出される神経伝達物質 VIP (vasoactive intestinal peptide) は骨芽細胞に作用し、アルカリフォスファターゼ活性の上昇と石灰化を促進する事が示されている¹⁹⁾。

C. 知覚神経と骨代謝

痛覚の伝達物質である CGRP は脊髄神経節で産生され、CGRP 受容体は骨芽細胞、破骨細胞での発現が確認されている。CGRP の働きとしては、骨芽細胞の分化を促進し、骨芽細胞の増殖を促進する²⁰⁾。同じ痛覚の伝達物質である substance P も骨芽細胞分化を促進する事が明らかとなっている²¹⁾ (表1)。Substance P を始め neurokinin A, neurokinin Bなどはタキキニンファミリーと呼ばれるが、これらもそれぞれの受容体を介して骨芽細胞の分化あるいは骨形成に影響を与えている。特に substance P 以外では neurokinin B が CGRP と同程度の骨形成促進作用があることが示されている (unpublished data)。

また、感覚神経の形成に重要な働きをしている分子とし Sema3A が骨形成に関与していることが報告されている²²⁾。神経特異的 Sema3A 欠損マウスを使った実験ではカプサイシンを投与してもさらなる骨形成の減少が認められなかったことや、骨再生時には神経特異的 Sema3A 欠損マウスでは骨髄の破壊後の骨再生の低下と新生骨への神経形成の低下が認められている。

3. 骨芽細胞と神経分泌物質受容体

A. 骨芽細胞分化における神経分泌物質受容体の発現

ある生理活性物質が作用する時にはその作用点における局所的な濃度のみならず、標的細胞上の受容体の発現に影響される。神経分泌物質の局所濃度を計測することは非常に難しいので、標的細胞つまり骨芽細胞における神経分泌物質の受容体の発現について調べる事はどの神経分泌物質が作用するかを明確にする手助けとなる。骨芽細胞もしくはヒト骨肉腫由来骨芽細胞における神経ペプチドの受容体発現に関して RT-PCR

によって調べられた報告によると、CGRP 受容体、NPY 受容体、VIP-1受容体、 $\beta 2$ adrenaline 受容体 ($\beta 2$ -AR) は確認されたが、substance P 受容体、VIP-2受容体、PACAP 受容体、 $\beta 1$ -AR および $\beta 3$ -AR 受容体は検出されなかった²³⁾。一方、我々のラット長管骨の免疫組織学的検索と、ラット頭蓋冠由来初代培養系骨芽細胞を使った実験では骨芽細胞、破骨細胞ともに substance P 受容体である neurokinin 1 受容体 (NK1-R) の局在および mRNA 発現が確認された^{21, 24)}。また、知覚神経由来の神経ペプチドである CGRP と substance P についての作用を調べた所、骨芽細胞についてはいずれも骨形成を促進するのに対して、破骨細胞は CGRP が骨吸収を抑制したが²⁵⁾ substance P は骨吸収を促進した²⁶⁾。この骨芽細胞の substance P 受容体の発現の相違や substance P の作用の疑問点に関して、当初ヒトとラットの種の違いによることが考えられたが、他の可能性として骨芽細胞における神経ペプチド受容体の発現時期の相違が考えられた。そこで、NK1-R についてラット初代培養骨芽細胞、ラット骨肉腫由来骨芽細胞様細胞を用いて調べた所、初代培養骨芽細胞では NK1-R の発現が認められたが、骨肉腫

由来骨芽細胞様細胞では発現が認められなかった。さらに、初代培養系骨芽細胞を骨芽細胞分化培地で培養したところ、分化の初期ではあまり NK1-R の発現は認められなかったが、分化後期の骨形成期において NK1-R の強い発現が認められた²¹⁾ (図 2)。また、NK1-R の発現時期に応じて、substance P の添加により骨形成の促進が認められた。これらの結果により NK1-R については骨肉腫由来の骨芽細胞様細胞を含む未分化な骨芽細胞には発現せず、骨芽細胞の分化に従いその発現が増加し、特に骨形成期の骨芽細胞に発現して substance P の影響を受けることが考えられた。実際ヒトで考えると C 線維が関わるような鈍い痛み、もしくは不快感程度の刺激を受け続けると、その刺激を受けた部位の神経終末から substance P 等が分泌され、反応性に骨形成がおこるものと考えられる。例えば、Garre 骨髄炎として知られている軽度の慢性炎症の場合は反応性に骨添加が生じることが知られているが、このような場合に substance P 等の神経分泌物質の影響をうけている可能性が考えられる。

B. iPS 細胞から骨芽細胞への分化における神経ペプチド受容体の発現

CGRP と substance P は同じ C 線維を有する知覚神経由来の神経ペプチドであるが、骨芽細胞への影響は CGRP, substance P の濃度で骨形成を調節しているのではなく骨芽細胞自身がそれらの受容体の発現を分化依存的に変化させてそれらの作用を受けていることが考えられた。そこで、新たな実験として iPS 細胞から成熟骨芽細胞に分化する過程で種々の神経ペプチドがどのように発現変化をするのかを調べた²⁷⁾。iPS 細胞がコロニーを形成した後フィーダー細胞を除去し、トリプシンで一旦細胞皿よりはがしたのち、非接着性培養皿を用いて胚様体を形成させた。その後、胚様体をフィブロネクチンでコートした培養皿に移し、骨芽細胞用培地で4週間培養し、骨芽細胞を形成させて骨様組織を産生する成熟骨芽細胞まで分化させた (図 3)。分化過程を多分化能維持期、胚様体形成期、骨芽細胞分化期の大きく3段階に分けて、それぞれ RNA 抽出し、RT-PCR および real-time PCR にて、各種神経ペプチド受容体の mRNA 遺伝子発現を調べた。その結果、 $\beta 2$ -AR と CGRP-R は iPS 細胞から成熟骨芽細胞の分化全過程において発現が認められた。 $\alpha 2$ -AR および NPY2-R の発現は認められなかった。 $\alpha 1$ -AR は成熟骨芽細胞にのみ発現が認められた。NPY1-R は iPS 細胞にわずかに認められた。 $\beta 2$ -AR,

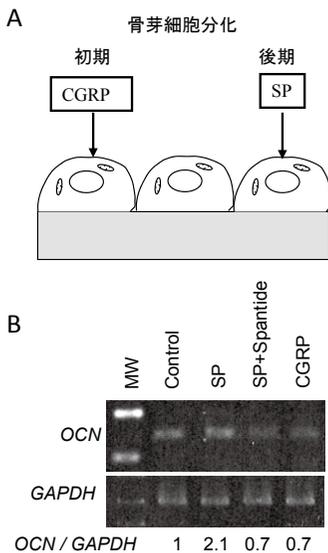


図 2. 骨芽細胞に対する CGRP, SP の作用

A: 知覚神経から分泌される神経ペプチドのうち calcitonin gene-related peptides (CGRP) は骨芽細胞分化初期に作用し、substance P (SP) は骨芽細胞分化後期に作用する。B: 骨芽細胞分化後期に SP, SP および Spantide (SP 受容体 antagonist), CGRP を加えた時の osteocalcin (OCN) と GAPDH の mRNA 発現、および発現比を示す。MW: molecular weight。

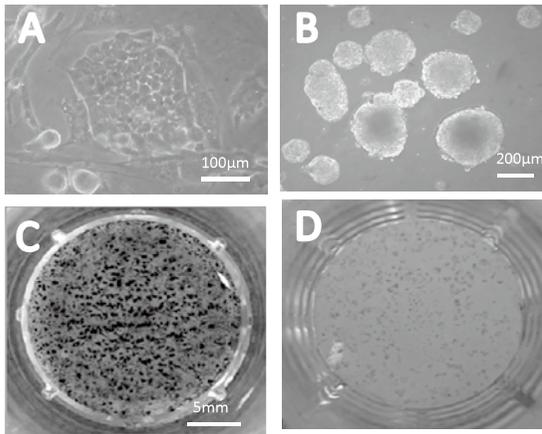


図3. iPS細胞から、胚様体、骨芽細胞の分化過程
 マウス iPS 細胞をフィーダー細胞上で培養した後 (A), 胚様体を形成させた (B)。胚様体をレチノイン酸で処理することにより中胚葉に分化誘導しデキサメタゾン、β グリセロリン酸、アスコルビン酸を含む骨芽細胞用培地で培養し骨様組織を形成させ von Kossa 染色で黒染された骨 (C)。骨芽細胞用培地で培養しなかった場合は骨はわずかしか形成されなかった (D)。文献27より、一部改変。

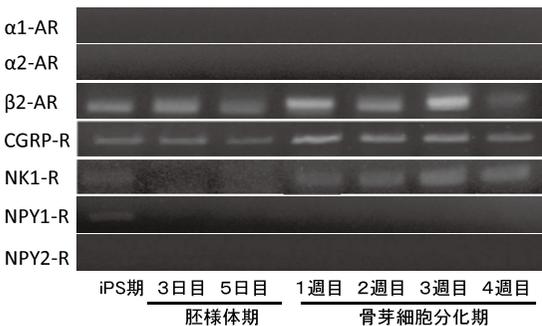


図4. iPS 期、胚様体期、骨芽細胞分化期における各受容体の遺伝子発現

iPS 期から骨芽細胞分化後期までの受容体の mRNA 発現を RT-PCR により検索した。AR: adrenalin receptor, CGRP-R: calcitonin gene-related peptides receptor; NK1-R: neurokinin-1 receptor, NPY: neuropeptide Y。文献27より、一部改変。

CGRP-R, および NK1-R は iPS 細胞から骨芽細胞への分化段階で強く発現していた (図4)。さらに real-time PCR で定量的に調べると、β2-AR, CGRP-R, は骨芽細胞分化1週目目でピークとなり、それ以降骨芽細胞の分化に従って減少した。さらに CGRP-R は胚様体3日目に小さいピークが認められた、これは CGRP

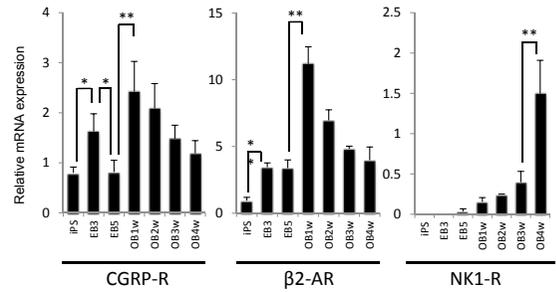


図5. 骨芽細胞分化段階における遺伝子発現の定量的解析
 CGRP-R, β2-AR, および NK1-R の mRNA 発現を、iPS 細胞から骨芽細胞分化まで real-time PCR により定量的解析を行った。グラフは同じ時期の β-actin の発現量を 1 とした時の値 (平均値 ± 標準偏差) を示す。EB3, EB5: 胚様体形成3日目および5日目, OB1w, OB2w, OB3w, OB4w: 骨芽細胞培地による培養1週目, 2週目, 3週目, 4週目。* p < 0.05, ** p < 0.01。

が胚様体の分化にも関与している事を示している。CGRP-R と異なり、知覚神経から分泌される神経ペプチド, substance P の受容体である NK1-R は骨芽細胞分化段階で発現が始まり骨芽細胞の分化4週目では1週目に比べ9倍も発現が増加していた (図5)。これらの発現は免疫蛍光染色法により確かめられた。すなわち、全分化過程において β2-AR および CGRP-R の免疫陽性反応が認められた。

いろいろな神経ペプチドのうち β2-AR および CGRP-R が未分化な iPS 細胞に発現したことは、未分化な幹細胞は知覚神経および交感神経の神経ペプチドから影響を受けていると考えられる。さらに同じ知覚神経から分泌される substance P と CGRP であるが、それらの受容体の発現時期が異なっているため受容体の発現にあわせて異なる作用を示すものと考えられる。これらの所見は、骨代謝が単に神経から神経ペプチドが分泌されるかどうかだけではなく、未分化な細胞を含み骨芽細胞の分化過程によって神経ペプチドの受容体の種類が異なる事で、神経による骨代謝の調節を受けている事が示唆された。

我々は以前 substance P が骨芽細胞の分化後期に働くことを示したが²¹⁾、今回我々は別の神経ペプチドである CGRP の受容体が iPS 細胞に発現していることを示した。以前の研究結果により自律神経の神経ペプチドは骨芽細胞の分化初期に、知覚神経は骨芽細胞分化後期に働くと考えられたが、今回の研究結果は知覚神経ペプチド, CGRP の受容体は骨芽細胞の分化初期および未分化な細胞にも発現していることが明らかと

なった。さらには、知覚神経から逆行性に分泌される substance P と CGRP は同じ知覚神経が産生することが示されている。骨芽細胞に対する substance P, CGRP の作用はいずれも骨形成を促進するが、破骨細胞に対する substance P と CGRP の作用は、substance P が破骨細胞の骨吸収を促進するのに対し CGRP は骨吸収を抑制する反対の作用をすることが示されている。今回の結果より知覚神経ペプチドの substance P と CGRP が同じ神経細胞から産生されるにも関わらず反対の作用を示すのは、標的細胞の分化段階における受容体の発現によって調節されている可能性が示された。

未分化な細胞において神経ペプチドの受容体が発現することが確認されたが、果たしてその時期に近くに神経終末があり、そこから神経ペプチドが放出されて細胞分化に影響しているかは明確ではない。むしろ、神経ではなく血中に含まれる神経ペプチドが影響しているのではないかと考えられる。例えば、ヒトの場合妊娠中の胎盤において CGRP の濃度が上昇することが示されている^{28, 29)}。これらの報告によるとエストロゲンやプロゲステロンが血中の CGRP の濃度を上昇させ、そのことで妊娠中の血管透過性の拡大をもたらしていると考えられている。これらのことは妊娠中の未分化な胎児の細胞に CGRP-R を介して働く CGRP は細胞の近くの神経の軸索から放出されたものではなく、血中の CGRP が細胞分化に関与している可能性を示している。

4. 結論と今後の展望

今回の総説では神経分泌物質がどのように骨芽細胞に影響を及ぼすかを、神経線維の分布と、骨芽細胞の分化段階に応じた神経分泌物質の受容体発現について説明した。特に強い発現がみとめられたのは交感神経系の β 2-AR と知覚神経系の CGRP-R であり、いずれも未分化な iPS 細胞から成熟骨芽細胞に発現しているが、未分化な骨芽細胞に最も多く発現していた。一方、同じ知覚神経由来の SP の受容体である NK1-R は未分化な細胞では発現せず、骨芽細胞の分化に伴い発現が上昇し、成熟骨芽細胞でピークを示した。このように神経による神経ペプチドを介しての骨形成調整は骨芽細胞側の分化依存性に受容体の発現が変化することによって調節されている事が示唆された。受容体の発現変化のまとめを図6に示す。今後は、実際の生体内で神経ペプチドがどの部位の骨形成でどのように調節しているかを明らかにする必要がある。また、再生医療等でも再生組織、特に再生骨組織でどのように神経が関

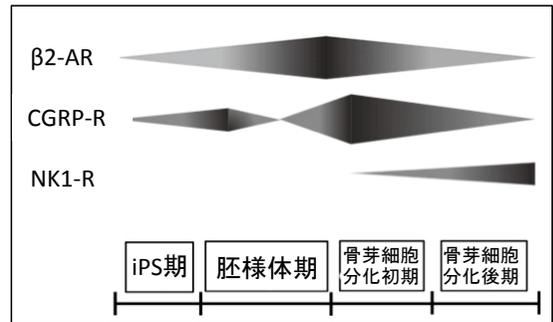


図6. iPS細胞から骨芽細胞に分化する段階における β 2-AR, CGRP-R, NK1-R の発現変化

わっているのかを調べるにより再生医療に関しても新たな展開が期待できる。

文献

- 1) Togari, A., Arai, M.: Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption. *J. Pharmacol. Sci.*, 106, 542-546, 2008
- 2) Lerner, U.H., Persson, E.: Osteotropic effects by the neuropeptides calcitonin gene-related peptide, substance P and vasoactive intestinal peptide. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.*, 8, 154-165, 2008
- 3) Kondo, A., Togari, A.: In vivo stimulation of sympathetic nervous system modulates osteoblastic activity in mouse calvaria. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 285, E661-667, 2003
- 4) Moore, R.E., Smith, C.K. 2nd, Bailey CS, Voelkel EF, Tashjian AH Jr: Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone Miner.*, 23, 301-315, 1993
- 5) Kondo, A., Mogi, M., Koshihara, Y., Togari, A.: Signal transduction system for interleukin-6 and interleukin-11 synthesis stimulated by epinephrine in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Biochem. Pharmacol.*, 61, 319-326, 2001
- 6) Arai, M., Sato, T., Takeuchi, S., Togari, A.: Dose effects of butoxamine, a selective β 2-adrenoceptor antagonist, on bone metabolism in spontaneously hypertensive rat. *Eur. J. Pharmacol.*, 701, 7-13, 2013
- 7) Sisask, G., Silfverswård, C.J., Bjurholm, A., Nilsson,

- O.: Ontogeny of sensory and autonomic nerves in the developing mouse skeleton. *Auton. Neurosci.*, 177, 237-243, 2013
- 8) Fukuda, A., Goto, T., Kuroishi, K.N., Gunjigake, K.K., Kataoka, S., Kobayashi, S., Yamaguchi, K.: Hemokinin-1 competitively inhibits substance P-induced stimulation of osteoclast formation and function. *Neuropeptides*, 47, 251-259, 2013
- 9) Takahashi, K., Yamanaka, S.: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676, 2006
- 10) Li, F., Bronson, S., Niyibizi, C.: Derivation of murine induced pluripotent stem cells (iPS) and assessment of their differentiation toward osteogenic lineage. *J. Cell. Biochem.*, 109, 643-652, 2010
- 11) Bilousova, G., Jun, du H., King, K.B., De Langhe, S., Chick, W.S., Torchia, E.C., Chow, K.S., Klemm, D.J., Roop, D.R., Majka, S.M.: Osteoblasts derived from induced pluripotent stem cells form calcified structures in scaffolds both in vitro and in vivo. *Stem Cells*, 29, 206-216, 2011
- 12) Bjurholm, A., Kricbergs, A., Brodin, E., Schultzberg, M.: Substance P- and CGRP-immunoreactive nerves in bone. *Peptides*, 9, 165-171, 1988
- 13) Bjurholm, A., Kricbergs, A., Terenius, L., Goldstein, M., Schultzberg, M.: Neuropeptide Y-, tyrosine hydroxylase- and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in bone and surrounding tissues. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 25, 119-125, 1988
- 14) Mach, D.B., Rogers, S.D., Sabino, M.C., Luger, N.M., Schwei, M.J., Pomonis, J.D., Keyser, C.P., Clohisy, D.R., Adams, D.J., O'Leary, P., Mantyh, P.W.: Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur. *Neuroscience*, 113, 155-166, 2002
- 15) Takeda, S., Eleftheriou, F., Levasseur, R., Liu, X., Zhao, L., Parker, K.L., Armstrong, D., Ducy, P., Karsenty, G.: Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system. *Cell*, 111, 305-317, 2002
- 16) Eleftheriou, F., Ahn, J.D., Takeda, S., Starbuck, M., Yang, X., Liu, X., Kondo, H., Richards, W.G., Bannon, T.W., Noda, M., Clement, K., Vaisse, C., Karsenty, G.: Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART. *Nature*, 434, 514-520, 2005
- 17) Kajimura, D., Hinoi, E., Ferron, M., Kode, A., Riley, K.J., Zhou, B., Guo, X.E., Karsenty, G.: Genetic determination of the cellular basis of the sympathetic regulation of bone mass accrual. *J. Exp. Med.*, 208, 841-851, 2011
- 18) Shi, Y., Oury, F., Yadav, V.K., Wess, J., Liu, X.S., Guo, X.E., Murshed, M., Karsenty, G.: Signaling through the M(3) muscarinic receptor favors bone mass accrual by decreasing sympathetic activity. *Cell Metab.*, 11, 231-238, 2010
- 19) Lundberg, P., Boström, I., Mukohyama, H., Bjurholm, A., Smans, K., Lerner, U.H.: Neuro-hormonal control of bone metabolism: vasoactive intestinal peptide stimulates alkaline phosphatase activity and mRNA expression in mouse calvarial osteoblasts as well as calcium accumulation mineralized bone nodules. *Regul. Pept.*, 85, 47-58, 1999
- 20) Bo, Y., Yan, L., Gang, Z., Tao, L., Yinghui, T.: Effect of calcitonin gene-related peptide on osteoblast differentiation in an osteoblast and endothelial cell co-culture system. *Cell. Biol. Int.*, 36, 909-915, 2012
- 21) Goto, T., Nakao, K., Gunjigake, K.K., Kido, M.A., Kobayashi, S., Tanaka, T.: Substance P stimulates late-stage rat osteoblastic bone formation through neurokinin-1 receptors. *Neuropeptides*, 41, 25-31, 2007
- 22) Fukuda, T., Takeda, S., Xu, R., Ochi, H., Sunamura, S., Sato, T., Shibata, S., Yoshida, Y., Gu, Z., Kimura, A., Ma, C., Xu, C., Bando, W., Fujita, K., Shinomiya, K., Hirai, T., Asou, Y., Enomoto, M., Okano, H., Okawa, A., Itoh, H.: Sema3A regulates bone-mass accrual through sensory innervations. *Nature*, 497, 490-493, 2013
- 23) Togari, A., Arai, M., Mizutani, S., Mizutani, S., Koshihara, Y., Nagatsu, T.: Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and beta-adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neurosci. Lett.*, 233, 125-128, 1997
- 24) Goto, T., Yamaza, T., Kido, M.A., Tanaka, T.: Light- and electron- microscopic study of the distribution of axons containing substance P and the localization of neurokinin-1 receptor in bone. *Cell Tissue Res.*, 293, 87-93, 1998
- 26) Goto, T., Yamaza, T., Kido, M.A., Tanaka, T.: Substance P activates osteoclast formation and osteoclastic bone resorption through the neurokinin-1

- receptor. *Acta Histochem. Cytochem.*, 34, 31-38, 2001
- 27) Nagao S, Goto T, Kataoka S, Toyono T, Joujima T, Egusa H, Yatani H, Kobayashi S, Maki K. Expression of neuropeptide receptor mRNA during osteoblastic differentiation of mouse iPS cells. *Neuropeptides*, 48, 399-406, 2014
- 28) Stevenson, J.C., Macdonald, D.W., Warren, R.C., Booker, M.W., Whitehead, M.I.: Increased concentration of circulating calcitonin gene related peptide during normal human pregnancy. *Br. Med. J.*, 293, 1329-1330, 1986
- 29) Gangula, P.R., Wimalawansa, S.J., Yallampalli, C.: Pregnancy and sex steroid hormones enhance circulating calcitonin gene-related peptide concentrations in rats. *Hum. Reprod.*, 15, 949-953, 2000

口腔癌幹細胞を標的とした新規診断治療法の可能性

杉浦 剛

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 顎顔面機能再建学講座 顎顔面疾患制御学分野

The possibilities for utility of oral cancer stem cells as new diagnostic and therapeutic targets

Tsuyoshi Sugiura

Department of Maxillofacial Diagnostic and Surgical Science, Field of Oral and Maxillofacial Rehabilitation,
Advanced Therapeutic Course, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

ABSTRACT

The accumulating evidences that cancer stem cells (CSCs) involve in cancer invasion and metastasis gives us the concept of CSC targeted therapy. We have reported the involvement of epithelial–mesenchymal transition (EMT) and CSCs in invasion and metastasis model *in vivo* and *in vitro* with established adenoid cystic carcinoma (AdCC) cell lines. In this model, highly metastatic AdCC cell line shows not only the character of EMT, but also sphere forming ability and high expression of EMT related genes, stem cell markers and differentiation markers suggesting cancer stem cell (CSC) involved in EMT of AdCC. Surprisingly, silencing of T-box transcription factor Brachyury by shRNA results in down regulation of all EMT and stem cell markers. In addition, sphere forming ability, EMT character and tumorigenesis *in vivo* are simultaneously lost. We have also reported that Brachyury is a reliable prognostic factor for patients with oral carcinoma. We conclude that EMT directly link to CSC, and Brachyury is a one of the central regulator of EMT and CSC. These results suggest the possibility that Brachyury could be a possible diagnostic and therapeutic target for anti-CSC therapy for oral carcinoma in future.

Key words: cancer stem cell, epithelial–mesenchymal transition, Brachyury

I. 緒言

癌の動態は一様でなく、同一個体における癌組織をとってもその中に多様な形質発現をした細胞集団が存在することは、臨床的にも実験的にも証明されている。さらに限界希釈法で単一の細胞由来から樹立したモノクローナルな培養癌細胞株から、*in vitro*においても、*in vivo*、特に実験的動物転移モデルにおいても

高浸潤能を獲得し、転移をおこす細胞が分離されることがその実例である。つまり、癌組織が発生当初、遺伝子異常をきたした少数の細胞集団から構成されていたとしても、その発育過程において様々な形質を有する細胞集団に成長すると考えられる。このことは組織発生における“分化”のプロセスに近似している。癌細胞の集団の中に特別な性質（造腫瘍性、高転移性な

ど)を持つ細胞集団が存在するのではないかという考え方は古くから提唱されており、正常組織幹細胞や造血幹細胞の発見とともに、これらの特別な細胞集団を「癌幹細胞」と考えるようになった¹⁾。

しかし一方で、組織幹細胞が発見されていない組織もあることから、未だに癌幹細胞の存在については異論が存在する。本稿では癌幹細胞についてその性格や定義を整理するとともに、われわれの最新の知見を概説し、治療への展開の可能性について述べる。

II. 癌幹細胞の存在の証明

腫瘍組織の中に自己複製能をもつ細胞集団が存在することは白血病幹細胞の存在の発見で証明されている。ヒト白血病細胞の中には免疫不全マウスにAML(急性骨髄性白血病)を発症させる白血病幹細胞が非常にわずかな頻度で存在する。この非常に稀な細胞集団は正常造血幹細胞と同様にCD34⁺CD38⁻の性質をもち、フローサイトメトリーで分取される。他の白血病細胞はAMLを発症させる能力がなく、自己複製能力がないと考えられる。すなわち、白血病幹細胞の、自己複製能と共に多様な白血病細胞への分化メカニズムが存在することを示唆している²⁾。これは造血幹細胞における分化システムと同様である。同じような考え方から細胞表面マーカーの発現を利用した固形腫瘍(乳癌^{3,4)}、大腸癌^{5,6)}、頭頸部扁平上皮癌⁷⁾など)からの癌幹細胞の存在の報告が相次いだ。しかし、このような細胞表面マーカーを利用した癌幹細胞の分取には考慮すべき問題が存在する。細胞表面マーカーにより純化した細胞集団はマウスに接種し、造腫瘍性が検討されるが、この細胞集団が単にマウスにおいて生着しやすいか否かを見ているだけではないかとの議論がある。

さらに、腫瘍内の細胞集団の多様性は、造血細胞のように多様性への分化機構によっても説明できるが、従来から個々の細胞は様々な障害をうけており様々な遺伝子異常が様々な程度に蓄積するために多様化するという確率論的モデルが存在している。

2006年のAACR(American Association for Cancer Research)では、癌幹細胞の定義として「腫瘍内で自己複製能と腫瘍を構成する様々な分化系統の癌細胞を生み出す能力を持つ細胞」であり、「持続的に拡大する腫瘍の形成を繰り返す能力によって、実験的にのみ定義され得る」と説明した⁸⁾。すなわちこのレポートを解釈すると、癌幹細胞の具備すべき要件は、①造腫瘍性を持つ ②自己複製能がある ③様々な性格を有

する癌細胞へ変化する。ということになる。さらに近年、分離した癌幹細胞様細胞が非対称性分裂をすることが視覚的に証明され、癌幹細胞の存在が証明されたと言える⁹⁾。

我々は、腺様嚢胞癌細胞株を用いた動物自然転移モデルを作成することを目的に、腺様嚢胞癌細胞株ACCSにGFPを発現させたACCS-GFPを用い、ヌードマウスの舌に様々な条件で腫瘍の接種を行った。その結果、腺様嚢胞癌細胞株ACCS-GFPは造腫瘍性を持たないが、ある一定条件以上の細胞数をマトリゲルに浮遊させて接種した場合にのみ、わずかに約17%で腫瘍形成が認められることが明らかとなった。造腫瘍性の高い細胞を得るため、ACCSにGFPを発現させたACCS-GFPを用い、再度舌に同様の条件で接種し、形成された腫瘍を再度培養皿上で培養することをくりかえした(*in vivo selection*)。これにより100%の造腫瘍性を持ったACCST-GFPが樹立された。興味深いことに、ACCST-GFPは約30%に顎下リンパ節に転移をきたし、これをGFPの発光で確認することができた。さらに原発巣からの*in vivo selection*を繰り返行くと、100%の顎下リンパ節転移をきたすACCSM-GFPを樹立できた。これらのマウスには約60%に肺転移が存在していた¹⁰⁾。

この実験結果は親株ACCS-GFPの細胞集団の中に、ごく一部の造腫瘍性を有する細胞集団が存在し、*in vivo selection*によって純化されたことを示している。さらに、造腫瘍性を持つ細胞集団の中に、リンパ節転移をきたす細胞集団も存在しており、造腫瘍性を指標としたセレクションを繰り返すだけで転移率が増加したことから、造腫瘍性を持つ限られた細胞集団の中にもさらに階層化があることを示唆している。ACCSM-GFPはスフェア形成実験で著明なスフェア形成能を示したことから、前項の三つの条件をみたし、腺様嚢胞癌幹細胞をリッチに含む細胞集団であると考えられた。さらに、幹細胞のマーカーについてReal-time PCRを用いて発現を検討した。胚性幹細胞のマーカー(Nodal, Lefty, Oct-4, Pax6, Rex1, Nanog)、体性幹細胞マーカー(未分化マーカー)(SOX2, Brachyury, AFP)は、いずれもACCSM-GFPにおいて親株の2~9倍の発現を示した¹¹⁾。

III. 癌幹細胞の由来とは(癌幹細胞と癌細胞における上皮間葉移行)

癌幹細胞は組織幹細胞が癌化したものだと考えられている。すなわち、癌組織における癌細胞形質の不均

一性は、癌幹細胞の各段階の分化程度の細胞が混在することによって生じているという考え方である。ところが、正常上皮細胞においては最終分化状態にあるような細胞が上皮としての性格を失い、間葉系の組織に形質転換し幹細胞様に変化する現象が、特に発生段階において知られている。これが上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) である。正常組織における EMT は、リプログラミングと呼ばれる機構により制御されている。近年、癌細胞においても EMT の現象が認められること、EMT をおこした癌細胞が幹細胞に極めて類似した遺伝子発現をしていること^{12, 13)}、実験的に EMT を起こした癌細胞が幹細胞様の性質を有すること^{14, 15)} から、分化の進んだ細胞から発生した癌細胞が、正常細胞におけるリプログラミングに類似した機転で EMT を起こし、高分化な癌細胞からの癌幹細胞を発生させているのではないかと仮説されている。EMT の重要な現象として、上皮系のマーカーである E-cadherin の消失と間葉系マーカーである vimentin の増加が特徴的である^{16, 17)}。これにより、腫瘍細胞の細胞間接着が阻害され、腫瘍細胞は原発巣からの逸脱が可能になる。そのため、EMT は非転移性腫瘍が転移性腫瘍に転換するための、重要なステップと考えられている¹⁸⁾。このように、浸潤転移過程における EMT も癌幹細胞が中心となったイベントであると考えると非常に説明しやすい。

我々の実験系でも ACCS-GFP (親株)、ACCST-GFP (造腫瘍性)、ACCSM-GFP (造腫瘍性高転移) をウエスタンブロットにより、E-cadherin および vimentin の発現比較をおこなうと、E-cadherin は ACCSM-GFP のみ発現が完全に消失しており、vimentin は ACCS-GFP、ACCST に比べ、ACCSM-GFP において強い発現が認められた。さらに E-cadherin の裏打ち蛋白である β -catenin は ACCSM-GFP では細胞膜から細胞質にシフトが認められた。EMT 関連遺伝子 (snail, Twist1, Twist2, slug, ZEB1, ZEB2, GSK3 β および TGF- β 2)¹⁹⁻²³⁾ は、いずれも ACCSM-GFP において親株の 2~3 倍の発現を示した。

以上より、ACCSM-GFP は ACCS-GFP が EMT をおこした状態であると考えられる。ACCSM-GFP が癌幹細胞様形質を持つことから、他の研究者の主張と同様に、癌幹細胞様細胞は EMT の現象と本質的に同一で、本腫瘍の悪性形質に寄与していると考えられる。

IV. Brachyury・・・癌幹細胞を標的とした治療の可能性

癌幹細胞は一般に、抗がん剤に対する薬剤耐性成立しており、放射線感受性が低下していることがよく知られている^{15, 24)}。臨床上認められる、放射線化学療法による完治症例における再発は、癌幹細胞が関与していると考えられている。すなわち、癌幹細胞から派生した癌細胞は抗がん剤に反応するし、放射線によっても反応して十分な治療効果を示すが、癌幹細胞に対してはこのいずれも効果が十分でない為、放射線化学療法からエスケープして生存する。この細胞が再発腫瘍を生じさせる。再発腫瘍は放射線化学療法に対する耐性が成立しているため治療は極めて困難となる。さらに外科的治療によって切除断端の検索で腫瘍細胞が検出されなくても再発や転移を起こす症例にも癌幹細胞が関与している可能性がある。癌幹細胞は EMT 様形質を示す為、原発巣から離脱し、間質中を遊走し、外科的切除からエスケープする。さらに、このような癌幹細胞は早期に脈管に侵入する。癌幹細胞は自己複製能があるため着床せずとも脈管中で増殖しスフェアを形成し、腫瘍塞栓をおこし転移巣を形成すると考えられる。これらの事実は癌幹細胞を治療の標的とする新しい治療法の根拠となっている。

さて、癌幹細胞標的治療のアプローチとしては次のような方法が考えられる。

1. 癌幹細胞に特異的な表面抗原を用いたモノクローナル抗体による治療
2. 癌幹細胞の自己複製能の維持に必要な細胞内シグナルの阻害 (分化誘導を含む)
3. 癌幹細胞のもつ薬剤耐性や放射線耐性を克服した上での化学療法

上記のアプローチに用いる分子標的は正常細胞では発現しないことが望まれ、さらに癌病巣に選択的に輸送するシステムも考慮されるべきであろう。

このような考え方から、我々は癌幹細胞様細胞を含む ACCSM-GFP を用いて、癌幹細胞の幹細胞形質を制御する因子の検索を試みた。その理由としては、前述した癌幹細胞標的治療のストラテジーにおいて、癌幹細胞形質を制御する因子が明らかとなれば、これを用いて上記の 2 および 3 を同時に満足させる強力な治療ツールと成り得ると考えたからである。

そこで我々は幹細胞マーカーとして、今回癌幹細胞の検索に使用した遺伝子群に着目した。これらの遺伝子群は全て高転移細胞株 ACCS-M GFP で高発現していた。この遺伝子群の多くは転写因子をコードし、幹

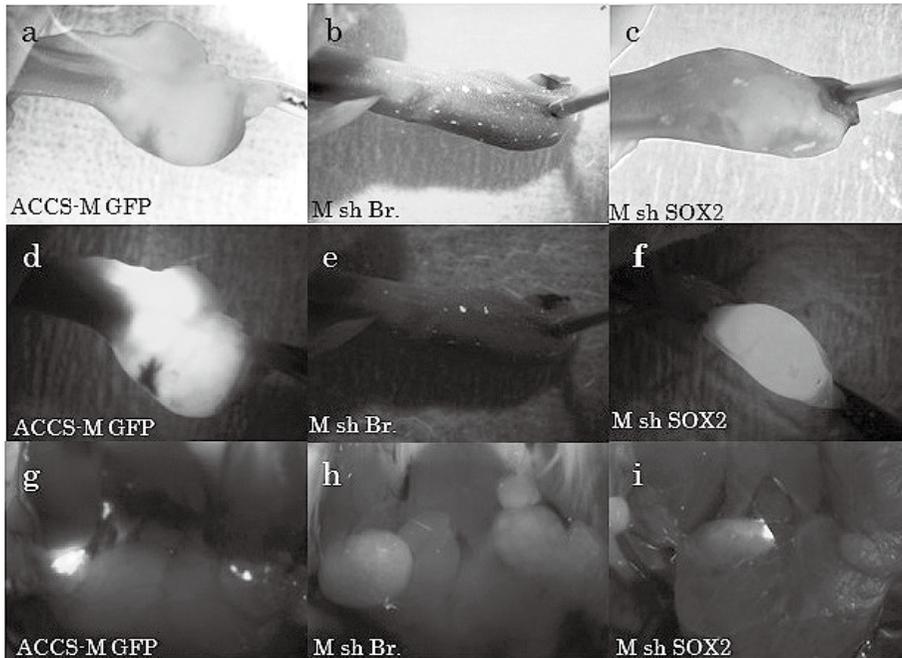


図1. Brachyury ノックダウンによる造腫瘍性・転移能の抑制

ACCS-M GFP (a, d, g), ACCS-M GFP に対する Brachyury ノックダウン M sh Br (b, e, h), ACCS-M GFP に対する SOX2 ノックダウン M sh SOX2 (c, f, i) をヌードマウス舌に接種した。その後舌 (a-f), 顎下リンパ節 (g-i) を摘出し、転移の有無を470nmの励起光下で観察し、腫瘍形成と転移の有無を検出した。肺の微小転移巣を○印で示す。(Shimoda, M., Sugiura, T. *et al.* BMC cancer, 12, 377. 2012. より改変)

細胞機能の根底に関与していることが予想される。この中でも、Fernando らは2010年に T-box 転写因子である Brachyury が腫瘍細胞において EMT を誘導していることを報告している²⁵⁾。そこで腺様嚢胞癌幹細胞様細胞である ACCS-M GFP に対して Brachyury shRNA (short hair-pin RNA) を遺伝子導入することによって Brachyury をノックダウンし、EMT および癌幹細胞形質が変化するか否か検討した。その結果、Brachyury ノックダウンによって、1. 全ての幹細胞マーカーの減弱が認められた。2. EMT の現象が消失した。3. スフェア形成能が著しく低下した。4. マウスにおける造腫瘍性が消失した (図1)。一方で、SOX2などの iPS 細胞作製に重要な遺伝子をノックダウンしてもこれらの効果は Brachyury ノックダウンほど強力ではなかった¹¹⁾。

このことから、Brachyury は癌幹細胞の重要な制御因子であると推察される。

Brachyury は脊椎動物の脊索の分化や後方中胚葉の形成に重要な役割を担うものとして知られている^{26, 27)}。Fernando の報告にもあるように、Brachyury は、

ヒトの癌細胞において、E-cadherin のプロモーター領域に結合することが知られている Slug の発現を高め、Brachyury 自身も E-cadherin のプロモーター領域に結合することで、互いに協調して E-cadherin の発現を抑制している²⁵⁾。Slug は、E-cadherin の転写抑制とは別に、EMT に特徴的で重要なステップである、デスモゾームによる細胞間結合の破壊を制御していることが示されている^{28, 29)}。つまり Slug は、EMT の最初のステップでは、デスモゾームによる細胞間結合に関与する蛋白質の制御を主に行っており、EMT の最終的なステップでは、Brachyury と共に E-cadherin の制御を行っていると思われる。脊椎動物での発生過程において、Brachyury はさらに、Wnt/PCP シグナル経路、NF κ B や TGF β といったシグナル経路を構成する下流遺伝子を制御している³⁰⁾ ことも考えると、Brachyury が、上皮間葉移行と癌幹細胞に関わる複数のシグナルに同時に関与して制御を行っていると思定される。さらに、Brachyury は発生過程においては重要で高発現を認めるものの、成熟正常組織では発現を認めなくなる。このことは先に述べた癌の治療標的として

Brachyury が適切であることを意味している。

以上のことから、Brachyury ノックダウンによる癌幹細胞標的治療を想定し、Brachyury ノックダウンが薬剤耐性に与える影響、放射線感受性に与える影響を検討した。その結果、癌幹細胞である ACCS-M GFP は抗癌剤耐性および放射線耐性を示し、Brachyury ノックダウンによりこれらの耐性は改善された³¹⁾。薬剤耐性に関わる遺伝子には薬剤排泄に関わる ABC ファミリー遺伝子、薬剤流入に関わる SLC ファミリー遺伝子がある。これらの遺伝子群の発現を検討すると、ABC ファミリー遺伝子は癌幹細胞である ACCS-M GFP でわずかに増加しているのみであった。一方、薬剤耐性の確立に細胞内への薬剤流入に重要であるとされる SLC19A1 の遺伝子発現が著明に低下しており、癌幹細胞では抗癌剤の細胞内流入が抑制されていることが確認された。この SLC19A1 の低下は Brachyury ノックダウンにより親株と同等レベルに回復した。さらに Brachyury による薬剤耐性については

さらに、Brachyury による細胞周期調節機構も関与している可能性がある。Huang らは Brachyury が癌幹細胞の細胞周期を静止期である G₀ 期に維持するために重要であることを示した³²⁾。化学療法も放射線治療も細胞周期にある細胞に対し治療が細胞障害性を発揮することによって効果をもつ。細胞周期上のチェックポイントが癌細胞では機能しておらず、細胞障害を受けた細胞は M 期になるとアポトーシスをおこす。Brachyury が細胞周期を制御する機能は、癌幹細胞の化学放射線療法に対する耐性の根本的なメカニズムかもしれない。

以上より Brachyury を分子標的として癌幹細胞制御を行うことにより、従来の放射線化学療法が癌幹細胞に対する効果を発揮すると考えられる。

V. 診断治療への展開

Brachyury のような強力な標的分子は診断や治療に有効であると想像されるが、実際に口腔癌で発現して

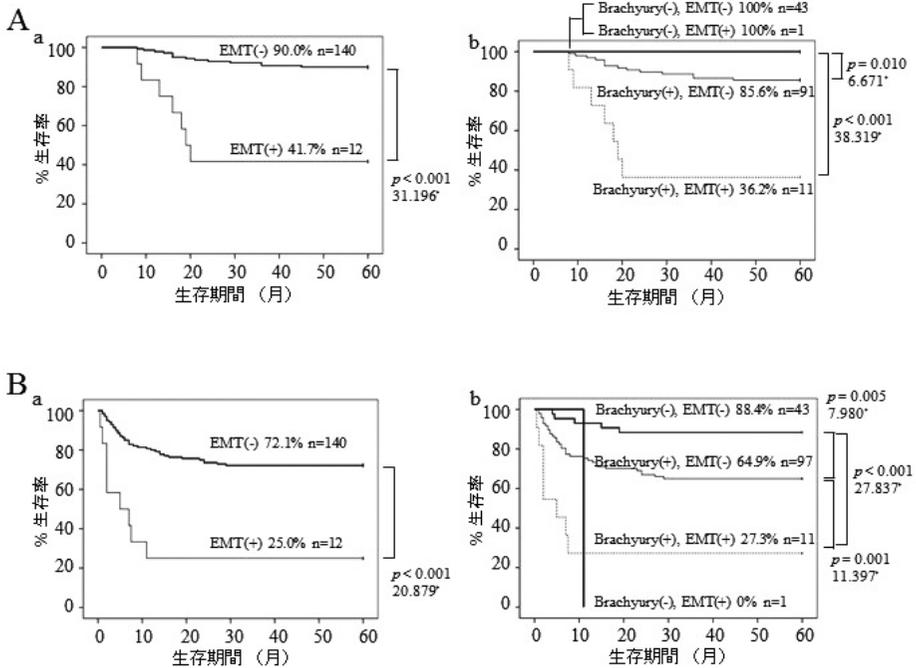


図2. SCCにおけるBrachyury発現、EMTと生存率との相関

Kaplan-Meier 法にて Brachyury 発現、EMT の有無と 5 年生存率の相関を調べた。染色結果をもとに陰性群、陽性群に分類して検討したところ、EMT の有無、Brachyury 発現および EMT の有無と 10 年生存率、無病生存率に負の相関を認めた。(Imajyo, I., Sugiura, T. *et al.* International journal of oncology, 41, 1985-1995. 2012. より改変)

A: 生存率 B: 無病生存率

a: EMT の有無 b: Brachyury の発現および EMT の有無

*: Chi-square statistic

いるのであろうか。そこで口腔扁平上皮癌患者152名の生検材料を用いて免疫染色法により Brachyury もしくは EMT を検出し、予後との相関を検討した³³⁾。Brachyury 発現と関連を認めたものは、腫瘍の大きさ (T 分類)、リンパ節転移、腫瘍の分化度、腫瘍の浸潤様式 (いずれも $p < 0.05$) であった。ロジスティック解析を行うとこの中でもリンパ節転移と最も強く相関し、オッズ比4.390 ($p = 0.001$) であった。さらに、5年生存率において、Brachyury 陽性群 (80.6%) は Brachyury 陰性群 (100%) より有意に生存率が低かった ($p = 0.002$)。E-cadherin 陰性 (-) 群 (75.0%) は E-cadherin 陽性 (+) 群 (91.1%) および強陽性 (++) 群 (91.7%) に比較して有意に生存率が低かった ($p = 0.032, p = 0.027$)。Vimentin 強陽性 (++) 群 (54.5%) は Vimentin 陰性 (-) 群 (90.3%) に比較して有意に生存率が低かった ($p < 0.001$)。さらに EMT, Brachyury 発現および EMT と 5 年生存率、5 年無病生存率の相関を検討した (図 2)。EMT 陰性 (-) 群 (5 年生存率 90.0%, 無病生存率 72.1%) に比較して EMT 陽性 (+) 群 (5 年生存率 41.7%, 無病生存率 25.0%) で顕著な生存率の低下を認めた (ともに $p < 0.001$)。また、Brachyury 陽性 (+) かつ EMT 陽性 (+) 群 (5 年生存率 36.2%, 無病生存率 27.3%) は、Brachyury 陰性 (-) かつ EMT 陰性 (-) 群 (5 年生存率 100%, 無病生存率 88.4%) に比較して生存率が有意に低かった (ともに $p < 0.001$)。このことから Brachyury が実際の生体においても機能し、予後因子となり得ること、さらに治療標的となり得ると考えられた。

しかし Brachyury を治療標的とすることにはおおきな障壁がある。何故なら現在分子標的薬の主流は抗体製剤であり、全て細胞表面分子を標的としている。一方 Brachyury は細胞質内もしくは核に存在する為抗体製剤は機能しない。すなわち Brachyury を制御するためには遺伝子制御が必要である。In vitro レベルでは先に述べたような遺伝子ノックダウンは遺伝子導入技術を用いて可能であるが、生体における遺伝子ノックダウンは困難である。生体への遺伝子導入においては導入遺伝子のサイズが小さく安定で、導入効率が大きく、さらにその運搬役であるキャリア自体も有毒でなく安定であることが求められる。現在、キャリアの選定、遺伝子抑制のツールについて検討しており、鹿児島大学発の新規治療薬の開発に向け、更なる戦略を推進していく予定である。

参考文献

- 1) Wicha, M.S., S. Liu, and G. Dontu: Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res*, 66, 1883-1890; discussion 1895-1886. 2006.
- 2) Bonnet, D., and J.E. Dick: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3, 730-737. 1997.
- 3) Al-Hajj, M., M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S.J. Morrison, and M.F. Clarke: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 3983-3988. 2003.
- 4) Yu, F., H. Yao, P. Zhu, X. Zhang, Q. Pan, C. Gong, Y. Huang, X. Hu, F. Su, J. Lieberman, and E. Song: let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*, 131, 1109-1123. 2007.
- 5) Bao, S., Q. Wu, R.E. McLendon, Y. Hao, Q. Shi, A.B. Hjelmeland, M.W. Dewhirst, D.D. Bigner, and J.N. Rich: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*, 444, 756-760. 2006.
- 6) Ricci-Vitiani, L., D.G. Lombardi, E. Pilozzi, M. Biffoni, M. Todaro, C. Peschle, and R. De Maria: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445, 111-115. 2007.
- 7) Prince, M.E., R. Sivanandan, A. Kaczorowski, G.T. Wolf, M.J. Kaplan, P. Dalerba, I.L. Weissman, M.F. Clarke, and L.E. Ailles: Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 973-978. 2007.
- 8) Clarke, M.F., J.E. Dick, P.B. Dirks, C.J. Eaves, C.H. Jamieson, D.L. Jones, J. Visvader, I.L. Weissman, and G.M. Wahl: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res*, 66, 9339-9344. 2006.
- 9) Tamari, K., K. Hayashi, H. Ishii, Y. Kano, M. Konno, K. Kawamoto, N. Nishida, J. Koseki, T. Fukusumi, S. Hasegawa, H. Ogawa, A. Hamabe, M. Miyo, K. Noguchi, Y. Seo, Y. Doki, M. Mori, and K. Ogawa: Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. *International journal of oncology*, 45, 2349-2354. 2014.
- 10) Ishii, K., M. Shimoda, T. Sugiura, K. Seki, M.

- Takahashi, M. Abe, R. Matsuki, Y. Inoue, and K. Shirasuna: Involvement of epithelial-mesenchymal transition in adenoid cystic carcinoma metastasis. *Int J Oncol*, 38, 921-931. 2011.
- 11) Shimoda, M., T. Sugiura, I. Imajyo, K. Ishii, S. Chigita, K. Seki, Y. Kobayashi, and K. Shirasuna: The T-box transcription factor Brachyury regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC cancer*, 12, 377. 2012.
 - 12) Aktas, B., M. Tewes, T. Fehm, S. Hauch, R. Kimmig, and S. Kasimir-Bauer: Stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers are frequently overexpressed in circulating tumor cells of metastatic breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 11, R46. 2009.
 - 13) DiMeo, T.A., K. Anderson, P. Phadke, C. Fan, C.M. Perou, S. Naber, and C. Kuperwasser: A novel lung metastasis signature links Wnt signaling with cancer cell self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in basal-like breast cancer. *Cancer Res*, 69, 5364-5373. 2009.
 - 14) Mani, S.A., W. Guo, M.J. Liao, E.N. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken, J. Yang, and R.A. Weinberg: The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 133, 704-715. 2008.
 - 15) Sarkar, F.H., Y. Li, Z. Wang, and D. Kong: Pancreatic cancer stem cells and EMT in drug resistance and metastasis. *Minerva Chir*, 64, 489-500. 2009.
 - 16) Iwatsuki, M., K. Mimori, T. Yokobori, H. Ishi, T. Beppu, S. Nakamori, H. Baba, and M. Mori: Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. *Cancer Sci*, 101, 293-299. 2010.
 - 17) Wells, A., C. Yates, and C.R. Shepard: E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas. *Clin Exp Metastasis*, 25, 621-628. 2008.
 - 18) Micalizzi, D.S., and H.L. Ford: Epithelial-mesenchymal transition in development and cancer. *Future Oncol*, 5, 1129-1143. 2009.
 - 19) Liu, Y., F. Ye, Q. Li, S. Tamiya, D.S. Darling, H.J. Kaplan, and D.C. Dean: Zeb1 represses Mitf and regulates pigment synthesis, cell proliferation, and epithelial morphology. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5080-5088. 2009.
 - 20) Kurrey, N.K., S.P. Jalgaonkar, A.V. Joglekar, A.D. Ghanate, P.D. Chaskar, R.Y. Doiphode, and S.A. Bapat: Snail and slug mediate radioresistance and chemoresistance by antagonizing p53-mediated apoptosis and acquiring a stem-like phenotype in ovarian cancer cells. *Stem Cells*, 27, 2059-2068. 2009.
 - 21) Niessen, K., Y. Fu, L. Chang, P.A. Hoodless, D. McFadden, and A. Karsan: Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol*, 182, 315-325. 2008.
 - 22) Wendt, M.K., T.M. Allington, and W.P. Schiemann: Mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition by TGF-beta. *Future Oncol*, 5, 1145-1168. 2009.
 - 23) Wellner, U., J. Schubert, U.C. Burk, O. Schmalhofer, F. Zhu, A. Sonntag, B. Waldvogel, C. Vannier, D. Darling, A. zur Hausen, V.G. Brunton, J. Morton, O. Sansom, J. Schuler, M.P. Stemmler, C. Herzberger, U. Hopt, T. Keck, S. Brabletz, and T. Brabletz: The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat Cell Biol*, 11, 1487-1495. 2009.
 - 24) Al-Assar, O., R.J. Muschel, T.S. Mantoni, W.G. McKenna, and T.B. Brunner: Radiation response of cancer stem-like cells from established human cell lines after sorting for surface markers. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 75, 1216-1225. 2009.
 - 25) Fernando, R.I., M. Litzinger, P. Trono, D.H. Hamilton, J. Schlom, and C. Palena: The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *J Clin Invest*, 120, 533-544. 2010.
 - 26) Kispert, A., B.G. Herrmann, M. Leptin, and R. Reuter: Homologs of the mouse Brachyury gene are involved in the specification of posterior terminal structures in *Drosophila*, *Tribolium*, and *Locusta*. *Genes Dev*, 8, 2137-2150. 1994.
 - 27) Vidricaire, G., K. Jardine, and M.W. McBurney: Expression of the Brachyury gene during mesoderm development in differentiating embryonal carcinoma cell cultures. *Development*, 120, 115-122. 1994.
 - 28) Lindley, L.E., and K.J. Briegel: Molecular

- characterization of TGFbeta-induced epithelial-mesenchymal transition in normal finite lifespan human mammary epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 399, 659-664. 2010.
- 29) Savagner, P., D.F. Kusewitt, E.A. Carver, F. Magnino, C. Choi, T. Gridley, and L.G. Hudson: Developmental transcription factor slug is required for effective re-epithelialization by adult keratinocytes. *J Cell Physiol*, 202, 858-866. 2005.
- 30) Savagner, P., K.M. Yamada, and J.P. Thiery: The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol*, 137, 1403-1419. 1997.
- 31) Kobayashi, Y., T. Sugiura, I. Imajyo, M. Shimoda, K. Ishii, N. Akimoto, N. Yoshihama, and Y. Mori: Knockdown of the T-box transcription factor Brachyury increases sensitivity of adenoid cystic carcinoma cells to chemotherapy and radiation in vitro: implications for a new therapeutic principle. *International journal of oncology*, 44, 1107-1117. 2014.
- 32) Huang, B., J.R. Cohen, R.I. Fernando, D.H. Hamilton, M.T. Litzinger, J.W. Hodge, and C. Palena: The embryonic transcription factor Brachyury blocks cell cycle progression and mediates tumor resistance to conventional antitumor therapies. *Cell death & disease*, 4, e682. 2013.
- 33) Imajyo, I., T. Sugiura, Y. Kobayashi, M. Shimoda, K. Ishii, N. Akimoto, N. Yoshihama, I. Kobayashi, and Y. Mori: T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 41, 1985-1995. 2012.

上顎欠損患者の補綴治療

－顎義歯難症例を中心に－

村上 格

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 成人系歯科センター義歯補綴科

Prosthetic rehabilitation for the difficult cases of maxillectomy patients

Mamoru Murakami

Denture Prosthodontics Restoration, Advanced Dentistry Center,
Kagoshima University Medical and Dental Hospital,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

ABSTRACT

Prosthetic rehabilitation is a major concern for the post-maxillectomy patient, because maxillectomy results in communication between the oral and nasal cavities, which leads to dysfunction of speech, mastication and swallowing. Key factors for achieving optimal functional recovery after surgery are retention and stability of the obturator prostheses; however, their quality is greatly influenced by the patient's remaining teeth, residual ridge and the size of the defect. Support, bracing and retention of obturator prostheses are relatively easily achieved using the remaining teeth in partially edentulous patients. However, for edentulous patients with extensive maxillary defects, functional recovery is challenging due to the poor retention and stability of their obturator prosthesis. Even in some partially edentulous cases in which maxillary reconstruction is undertaken to counteract the stability of the obturator prosthesis, functional recovery is a difficult task.

Here I describe several typical cases of prosthetic rehabilitation of patients with extensive maxillary defects and complex maxillary reconstruction.

Key words: obturator prosthesis, maxillectomy, maxillary defect, case report

I. はじめに

顎顔面補綴とは、腫瘍、外傷、炎症、先天奇形などが原因で、顎骨とその周囲組織に生じた欠損に対し、非観血的にあるいは手術との併用により人工物で補填・修復し、失われた機能と形態の回復を図るもので、その欠損部位により顔面補綴と顎補綴に大別される¹⁾。一般に、上顎欠損患者では、術後の経過観察が

容易であること、欠損部のアンダーカットを顎義歯の維持に有効利用できること、顎義歯装着による機能回復が大きく期待できることなどの理由から外科的再建術に優先して顎補綴治療が行われる²⁾。このような治療が必要となる患者は、咀嚼、嚥下ならびに構音などの口腔機能に大きな障害を受ける³⁾だけでなく、審美的、心理的な影響も受ける⁴⁾。そのため、患者の社会

復帰には、顎補綴治療による機能回復だけでなく⁵⁾、患者の抱える様々な問題に対する適切な診察と診断が必要となる。図1に日本補綴歯科学会の補綴歯科診療ガイドライン⁶⁾に掲載されている無菌顎の症型分類の評価用紙を示す。上顎欠損患者では、これらの診察項目に加え、顎欠損部の大きさや配置、再建法、術後に生じる開口障害や口腔乾燥など顎欠損患者特有の状況が存在するため慎重な診察が必要である。特に、顎欠損部の大きさ、配置ならびに残存歯の有無は、顎義歯装着後の咀嚼機能に影響を及ぼす因子であることが報告されており⁷⁾、術後の機能回復を予測するうえでも重要な診察項目である。

顎義歯装着による良好な機能回復を得るためには、顎義歯の維持と安定が重要である³⁾が、これには、残存歯、残存顎堤ならびに顎欠損部のアンダーカットが利用されるため、両側にわたる広範囲な上顎欠損では硬組織による再建なしに顎義歯の維持と安定を得ることは難しい。そのため、血管柄付き骨皮弁による再建、口腔インプラントならびにスリット形成などを利用して顎義歯の維持と安定を図ろうとする試みが報告されている⁸⁾。このような広範囲で複雑な欠損を有する症例に対する顎補綴治療には高度な知識と技術が要求される⁵⁾ため、補綴専門医として果たすべき役割は非常に大きい。

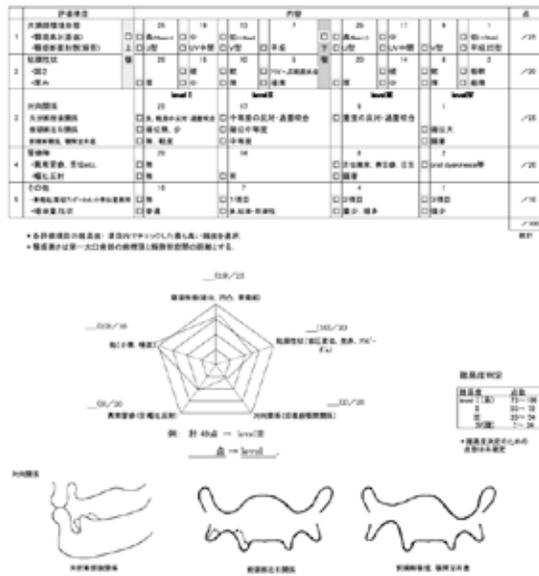


図1 無菌顎の症型分類の評価用紙

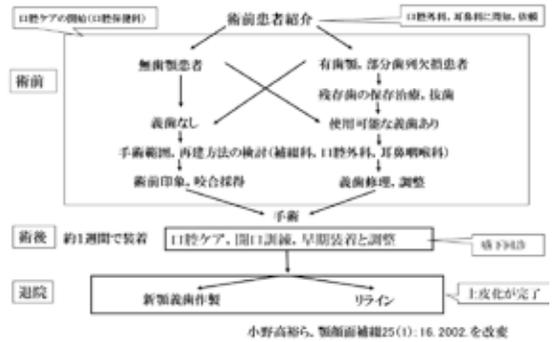


図2 術後早期の顎義歯装着プログラム

本稿では、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院義歯補綴科外来にて著者が担当する上顎顎補綴治療について、周術期における取り組みやこれまで経験した広範囲な上顎欠損や複雑な再建例など顎義歯難症例に対する補綴的治療例についてその手技や治療成績を供覧するとともに若干の考察を加えて報告する。

II. 上顎全摘出症例に対する早期顎義歯の装着と分割式顎義歯の適用

上顎顎補綴における第1の目標は、欠損腔の閉塞であり、鼻腔への唾液や食物などの漏出を防止することが重要である³⁾。一般に、術後の上顎欠損患者に対しては、創部の止血や保護を目的にサージカルオプチュレーターが適用され、創部の上皮化が完了する術後3か月から6か月で顎義歯の製作が行われる⁹⁾。これに対し、術後に生じる患者の機能障害、審美障害ならびに精神的苦痛を改善する目的で術後早期に顎義歯を装着する取り組み⁹⁾も報告されている。図2に小野らの報告をもとにした早期顎義歯装着に関する一連のフローチャートを示す。術前の患者紹介をもとに、口腔ケア、補綴前処置、義歯製作の必要性の有無、手術範囲や再建方法について検討を行い、必要であれば術前に顎義歯製作のための印象採得を行い、術後1週間を目途に早期顎義歯の装着を行っている。この利点としては、患者の口腔機能が早期に回復しQOLの向上をはかる上で有効であるほか、顎義歯を治療用義歯として使用することで新義歯への適応が容易となる、義歯の着脱自体が開口訓練となるなどがあげられるが、咬合力が創面に及び治療を妨げないように注意も必要である⁹⁾。そのため栓塞部は粘膜調整材を用いて調整を行うが、顎義歯の支持、把持、維持が十分得られるような設計を行うことが肝要である。

本セクションでは、上顎全摘出患者に術後早期に顎義歯を装着し機能回復を図り、その後、分割式顎義歯を適用した症例を供覧する。

症例

患者は79歳の男性で、主訴は口蓋部の腫瘤形成である。以前より硬口蓋正中部の腫瘤形成を自覚していたが放置していた。2008年11月に受診した近医にて腫瘤を指摘されるも痛みがないため放置を続ける。2009年11月に腫瘤が増大し、鼻出血も認めため精査と加療目的で鹿児島大学医学部・歯学部附属病院耳鼻咽喉科を受診した。2010年1月に術前検査と術後早期の顎義歯装着依頼で当科を受診した。

図3に術前の口腔内写真とMRI画像を示す。口蓋部後方に腫瘤が認められ、MRI画像からは上顎口蓋部から鼻腔まで広範囲に及ぶ腫瘍の存在が認められる。上顎基底細胞癌の鼻腔進展と診断され、上顎全摘出予定となった。図4に旧義歯装着時の写真を示す。上顎義歯後縁部は、腫瘤を避けるように調整されていた。診察の結果、義歯の維持と安定はある程度良好であったこと、手術までの日数が短かったことから、こ

の義歯を改造して術後1週間程度で早期顎義歯として装着し、調整していく治療計画を立案した。

図5は術後4日目に耳鼻科病棟へ往診した時のものである。創部はタイオーバーされていたが、欠損部の概形を確認し、床後縁の延長や、ワックスで栓塞部の形成を行った。咬合関係を調整した後に技工室にてワックスを中空型栓塞子に置換した。図6は術後7日目に補綴科外来受診時のものである。タイオーバーは除去され、後方に蝶形骨翼状突起が認められる。顎義歯を試適後にティッシュコンディショナーにて粘膜調整を行ったが、義歯の重量が重くなったため再度軽量化を図るため、義歯を預かり技工操作を行った。図7に技工室における操作を示す。義歯を用いて作業用模型を製作し、義歯研磨面と人工歯のコアを採得後に石膏を分割して義歯を取り出した。新たに栓塞部を重合し、口蓋と人工歯部分はコアを用いて栓塞部と接合した。図8に完成した顎義歯と義歯装着時の写真を示す。術後8日目で装着となった。義歯の軽量化が奏功し、十分な維持と安定が得られた。患者は、義歯装着日から経口摂取を開始し、摂食状況が良好となった



図3 術前の口腔内写真とMRI画像

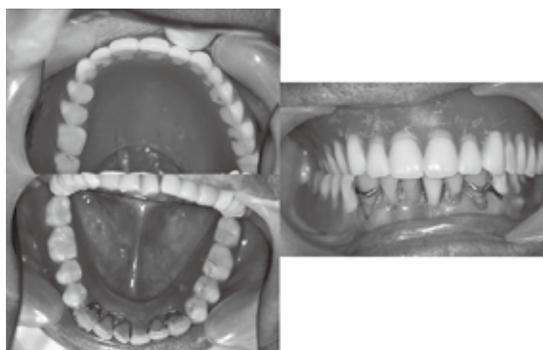


図4 旧義歯装着時の口腔内写真

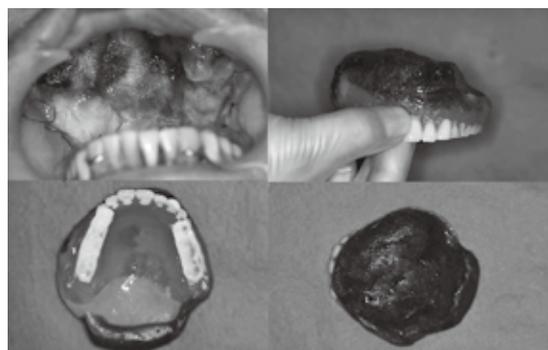


図5 術後4日目（往診）の状態

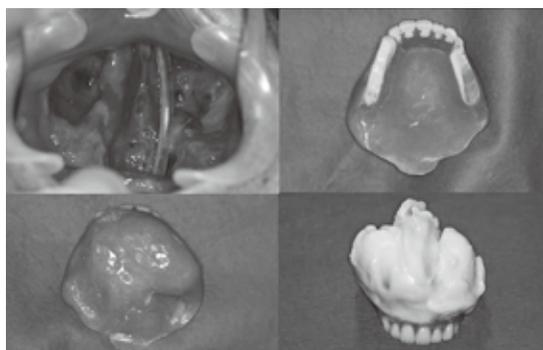


図6 術後7日目（外来受診）の状態

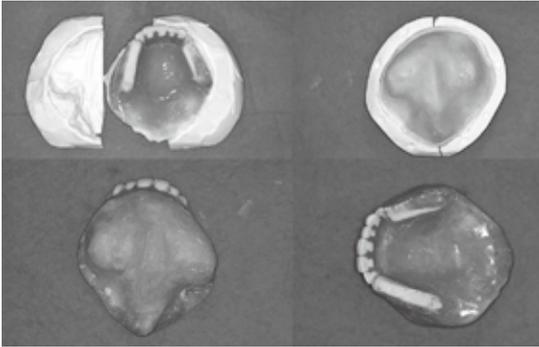


図7 術後7日目（技工室における操作）



図8 術後8日目（早期顎義歯の装着）

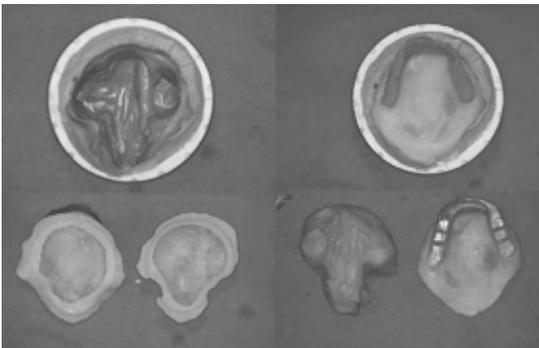


図9 分割式顎義歯の製作

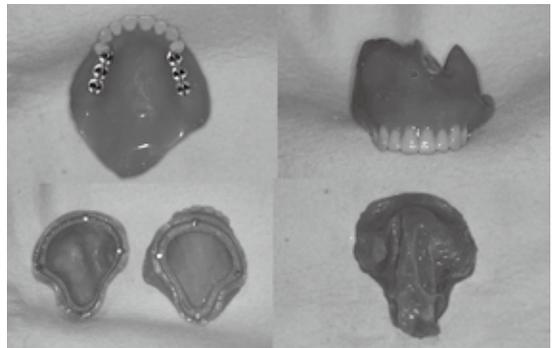


図10 完成した分割式顎義歯

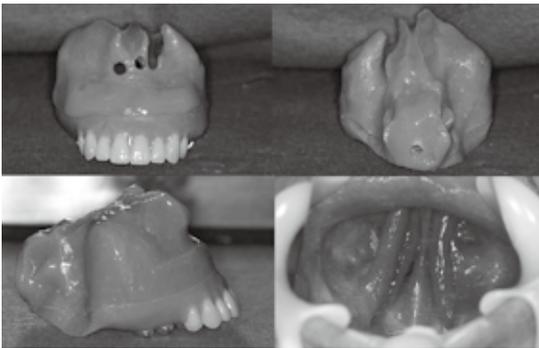


図11 経過観察時の顎義歯と口腔内写真

ため術後1カ月で退院した。その後、耳鼻科再診時にあわせ義歯調整を行っていたが、術後の放射線治療により一時治療が中断した。2010年6月の再来院時に、義歯が大きく装着が難しいとの訴えがあり、新義歯を分割式顎義歯^{10, 11)}として製作する計画を立てた。

図9に分割式顎義歯製作時の写真、図10に完成した

分割式顎義歯の写真を示す。人工歯は剪断効率の高いブレードティースを用い、栓塞部と義歯部は磁性アタッチメントを用いて分割できるよう設計した。栓塞部は、軟性裏装材とレジンの2層構造となっており、軟性裏装材で鼻孔前縁のアンダーカットを維持するよう設計されている。

図11に経過観察時の義歯と口腔内を示す。栓塞子の鼻孔相当部には鼻呼吸用の穴を開けている。口腔内写真からは顎欠損部の上皮化が進んでいることが伺える。図12に顔貌所見を示す。左が義歯非装着時、右が義歯装着時である。上顔面の審美性の回復は良好である。図13に義歯装着時の写真を示す。栓塞部を先に装着し、口腔内で義歯と栓塞部を結合する。開口時の維持も良好である。患者は装着しやすくなったと大変喜んでおり、咀嚼、嚥下、構音などの各機能に問題は認められなかった。装着後の経過が良好のため定期検査に移行したが、現在は、患者の体調が崩れ中断している。

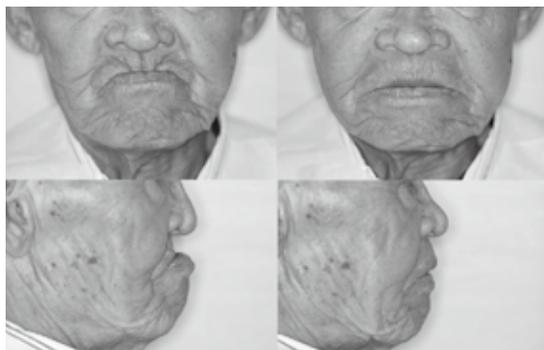


図12 顔貌所見



図13 分割式顎義歯の装着時

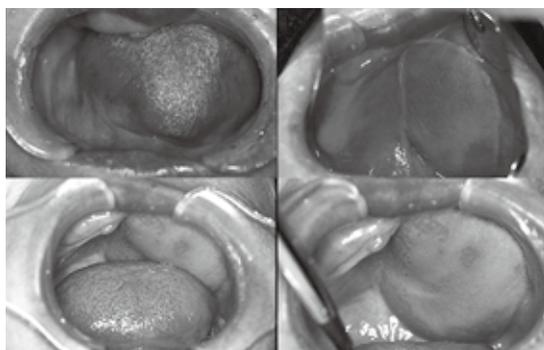


図14 上顎切除後の腹直筋皮弁による再建例

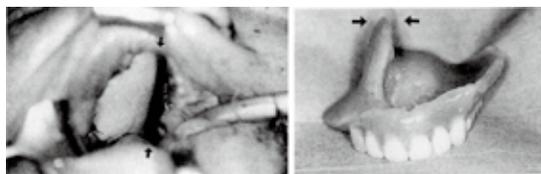


図15 スリット型口蓋再建法

Ⅲ. スリット型口蓋再建後に可動性顎義歯を適用した顎補綴症例¹²⁾

外科的、補綴のリハビリテーションは上顎欠損患者の術後の口腔機能を維持するために不可欠であり^{6, 13, 14)}、上顎腫瘍切除後の顎欠損が広範囲な場合には顎義歯による補綴的閉鎖を前提に再建が行われる場合も多い^{6, 13, 14)}。これには腹直筋などによる筋皮弁^{13, 15)}や遊離骨を利用した再建^{16, 17)}などが報告されている。筋皮弁のみの再建では、皮弁の下垂により義歯の維持や安定を損なうことが報告されているが¹³⁾(図14)、近年、筋皮弁を用いた場合の顎義歯の維持と安定の低下を回避する目的でスリット型口蓋再建法の適用が報告されている¹³⁾。図15にスリット型口蓋再建法を示す。腹直筋皮弁の口蓋断端部は縫合せずにスリット間隙を作り(図15左矢印)、その部分に顎義歯の栓塞子(図15右矢印)を挿入して維持と安定を図るものである。無歯顎患者では、栓塞子がスリット腔内で維持されることにより顎義歯装着時の機能が向上する¹³⁾。一方、部分歯列欠損患者におけるスリット型

口蓋再建法には問題がある。本セクションでは、左上顎腫瘍切除後にスリット型口蓋再建法を受けた部分歯列欠損患者に通法での顎義歯補綴治療が奏功せず、可動性顎義歯を適用したところ良好な結果が得られた症例¹²⁾を供覧する。

症例

患者は、59歳女性で、2006年10月に鹿児島大学医学部・歯学部付属病院耳鼻咽喉科を左鼻閉と鼻出血の主訴で受診し、左側上顎洞扁平上皮癌(T3N0M0)と診断された。術前CT像を図16aに示す。腫瘍は鼻腔内、翼口蓋窩、上顎洞後壁、篩骨洞、側頭下窩に浸潤していた。術前放射線治療(40Gy)と化学療法後、2006年12月に左上顎全摘出、左頸部郭清ならびに腹直筋にて顎欠損部のスリット型口蓋再建が行われた。再建方法については、事前に耳鼻科担当医と協議し、顎欠損部は通常の栓塞子が挿入できるような前腕皮弁にてソケット状に再建予定であった。しかし、術中に切除範囲が眼窩窩底から頬骨に及んだため、眼窩内容物の下垂や眼窩下部の審美障害防止のため、腹直筋による再

Sakuraba M, et al. Simple maxillary reconstruction using free tissue transfer and prostheses. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(2): 594-8. 29)引用

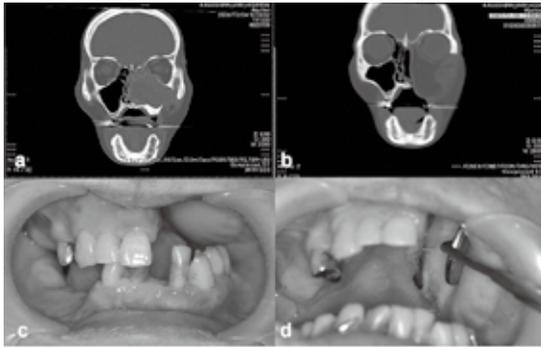


図16 術前CT画像(a), 術後CT画像(b), 術後の口腔内(c, d)

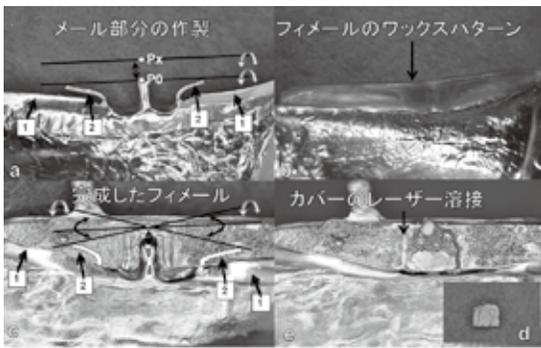


図18 メール部分の製作(a), フィメールのワックスパターン(b), 完成したフィメール(c), カバーのレーザー溶接(d)

建に変更となった。術後 CT 像を図16bに示す。口蓋断端部は縫合されずにスリット間隙が認められる。術後、2007年1月に上顎腫瘍摘出後の補綴治療を希望して当科を受診した。術後の口腔内を図16c, dに示す。上顎は Aramany の class1 の欠損¹⁸⁾ となり、再建された腹直筋皮弁のため術前に使用していた義歯が使用できなかった。

左上顎欠損による咀嚼障害ならびに審美障害と診断した。治療方針は、まず、機能回復のため早期に顎義歯の装着が必要と考えられたが、術後間もないため創部の状態が変化しやすいと考え、まず旧義歯を改造した暫間義歯を装着し、これを調整しながら創部の安定を待って最終義歯を製作することとした。

患者が使用していた部分床義歯を改造し2007年1月に暫間義歯として装着した。義歯の左側臼歯部は皮弁のボリュームと浮動性のため義歯床を設定できず前歯部のみとなり、右側義歯床正中部にスリット腔内を栓塞する栓塞子を付与した。装着後は皮弁の下垂と浮動

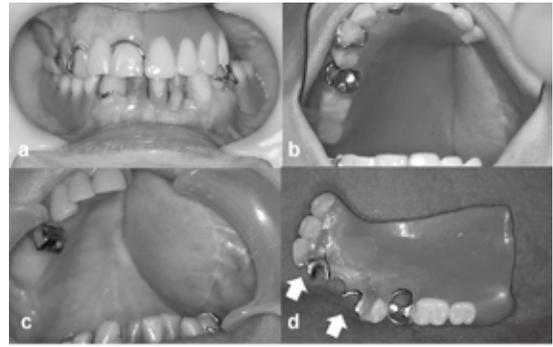


図17 旧義歯装着時の口腔内写真(a, b), 皮弁の下垂(c), クラスプの破折(d)

性のため顎義歯の維持と安定の低下、鼻漏ならびにクラスプ破折が頻発した。顎義歯の調整と残存歯の補綴前処置を行いながら創部の治癒を待ち、2008年7月に通法に従って顎義歯(旧義歯)を装着した(図17a, b)。しかし、皮弁の下垂が著明となり(図17c)、顎義歯の安定が得られず、クラスプの破折が生じ、義歯修理と栓塞子の調整を繰り返すなど症状は改善されなかった(図17d)。

皮弁の下垂と浮動性により顎義歯の安定不良が生じていると診断し、皮弁の減量手術を行った後に義歯を再製作する計画を提案したが患者の同意が得られなかった。そこで、皮弁の影響を緩和する目的で、義歯床と栓塞子が可動的に連結される可動性顎義歯の製作を立案した。可動性顎義歯は、金属床の口蓋断端部に自家製メールを付与し、栓塞子内に設置したこれに対応するフィメールが可動的に連結する構造とした。(図18)。図18aのPXはフィメールが最大変位した位置を示す。図18の「1」は栓塞子が可動時に金属床との間に間隙が生じないためのレール様構造、図18の「2」は、栓塞子の回転範囲を調節するコバルトクロムワイヤ線である。直線と両矢印線は、それぞれフィメールの回転軸と可動方向を示す。まず、金属床と自家製メールを製作した(図18a)。フィメールは、メール周囲をシートワックス(#28)でリリースした上から金属床を被覆するようパターンレジンで製作した(図18b)。フィメールの粘膜面側のメール相当部は開放し(図18c)、そこにメールとフィメールとを結合するためのアンダーカットを付与したカバーが取り付けられよう別にパターンを製作した(図18d)。フィメールとカバーを鋳造し、カバー内部にアンダーカットをレーザー溶接にて付与し、メールとフィメールを結合



図19 完成した可動性顎義歯と装着時の写真.



図20 グミゼリー咀嚼時のグルコース溶出量と平井らの咀嚼スコア(a), タッピング運動時の顎義歯の動揺(b), 気分の評価結果(c)

するためカバーをフィメールにレーザー溶接した(図18e)。その後、連結部をブロックアウトして通法に従ってレジンの重合を行い完成させた。図19dに完成した可動性顎義歯を示す。図19d左は義歯と栓塞子が密着し、図19d右は最大に可動した状態を示す(矢印)。

可動性顎義歯は、2010年11月に装着した(図19)。装着後の顎義歯の安定は良好で、鼻漏、鼻腔へ食渣の混入、義歯の維持力低下などは認めず、メンテナンスに移行した。図19a～cに装着時の口腔内と顔貌写真を示す。顔貌は、左眼窩部と鼻翼部に下垂が認められるが、腹直筋の充填で頰部の陥没感はほとんど認められない。義歯装着後は現在まで良好に経過している。

顎義歯装着時の咀嚼能率は、グミゼリーを20秒間咀嚼させた時のグルコース溶出量を血糖測定器で測定したもの¹⁹⁾と、平井らの35品目の摂食可能食品質問票を用いて算出した咀嚼スコア²⁰⁾により評価した。可動性顎義歯のグルコース溶出量は、旧義歯よりも高くな

り、正常値である100(mg/dl)以上となった。咀嚼スコアも可動性顎義歯が旧義歯より高い値となった(図20a)。タッピング運動時の顎義歯の動揺は、大塚らの報告²¹⁾に従ってマグネットを上顎左側中切歯に取り付け、下顎運動分析記録装置(K7 Evaluation System)を用いて計測した。上段に旧義歯、下段に可動性顎義歯の結果を示す。可動性顎義歯では旧義歯と比較して、矢状断面、前頭断面ともに義歯の動揺が小さいことが示された(図20b)。患者の気分をFaces Scale²²⁾を用いて評価した(図20c)。可動性顎義歯では旧義歯より優れた結果となった。

考察

外科的再建により顎欠損部を閉鎖すると、構音や嚥下機能の回復や唾液や食物の漏出が防止され、患者の心理面に対する利点がある²³⁾。しかし、術後経過観察が困難になり、筋皮弁のボリュームや浮動性により義歯の維持や安定が損なわれる^{13, 23)}。

顎義歯の安定を得るため、上顎全摘出患者に対して腭骨や腸骨など血管柄付き骨皮弁での再建^{16, 17, 24)}、口腔インプラント²⁵⁾を利用した試みが報告されている。このような再建が出来ない場合、筋皮弁のスリット形成は、術式の簡便さや患者の身体的負担の点で有効な方法である¹³⁾。しかしながら、有歯顎患者においてはスリット形成による口蓋再建は顎義歯の安定の点から問題がある。Funkらは、義歯の維持に十分な支台歯が存在する場合、口蓋は完全に閉鎖すべきだと述べている²⁶⁾。Sakurabaら¹³⁾も、スリット型口蓋再建は、上顎残存歯が支台歯として不十分な場合に適用すべきだと述べている。本症例では、残存歯は顎義歯の支台歯として十分機能できるものであったため、スリット形成は不要であったと考えられる。

栓塞子と義歯を可動的に連結し皮弁からの力を緩圧するよう設計された可動性顎義歯により顎義歯の維持と安定、咀嚼能率および患者の満足度が向上し、設計は奏功したと考えられる。軟組織のみの皮弁による閉鎖はスリットを付与しても皮弁の下垂や浮動性を避けることは出来ないため、可動性顎義歯の適用は、皮弁が顎義歯の安定を妨げないようにする有効なオプションであることが示された。

結論

左上顎腫瘍切除後にスリット型口蓋再建法を受けた部分歯列欠損患者に対して、可動性顎義歯を適用したことで義歯の動揺が減少し、咀嚼機能だけでなく気分も改善されるなど良好な結果が得られた。

IV. 上顎半側欠損を有する無歯顎患者への暫間顎義歯の応用

上顎腫瘍切除後患者の機能回復における顎義歯の役割は重要である。部分歯列欠損患者では、顎義歯の支持、把持、維持を残存歯に求めることが出来るため、比較的顎義歯の安定や患者の満足は得られやすい³⁾。しかしながら、無歯顎患者では、義歯の支持組織の減少や辺縁封鎖による顎義歯の維持が期待できないことなどから顎義歯装着後の機能回復は難しく、欠損範囲が拡大した上顎半側欠損症例では、顎義歯の維持と安定がきわめて不良となり³⁾、顎欠損腔周囲のアンダーカットの積極的な利用や顎義歯自体の軽量化が必要となる³⁾などその対応に苦慮することが多い。

一方、暫間義歯とは、最終義歯を装着するまでの間、外観、機能などの義歯の目的を達成させるためにある一定期間使用するもの¹⁾であり、義歯形態、機能性、審美性などを確認した後に最終補綴に移行することにより良好な予後を得ることが可能である²⁸⁾。

本セクションでは、上顎右側半側欠損を有する高齢無歯顎患者に対して、旧義歯を改造した暫間義歯により機能回復を行った後に新義歯作製に移行し、良好な治療成績を得る事が出来た症例を供覧する。

症例

患者は県内の老人施設に入所中の70歳の男性である。咬みにくさと話しにくさを主訴に来院した。約15年前に県外の大学病院にて上顎腫瘍切除術とその後の補綴治療を受けたが、転居により治療は中断し、不調時のみ近医で歯科治療を受けていた。平成26年春頃より咬みにくさと話しにくさを強く自覚するようになり、同医を受診したところ当院での治療を勧められ2014年6月に当科を受診した。

上顎は無歯顎で、Aramany の class1¹⁸⁾ に相当する右

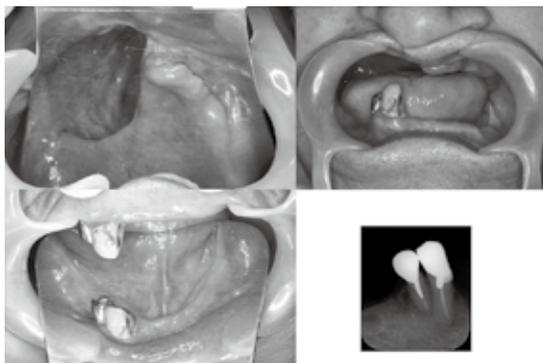


図21 初診時の口腔内写真とデンタルX線写真



図22 旧義歯装着時の口腔内と顔貌所見

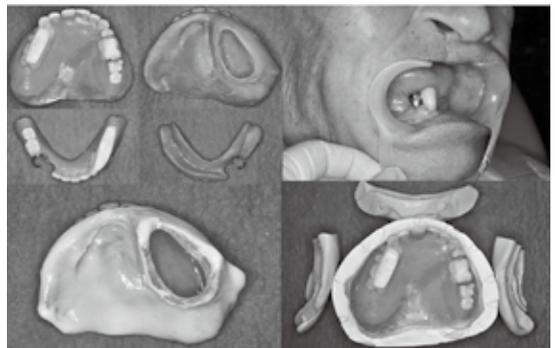


図23 暫間顎義歯の製作と顎義歯製作過程

半側欠損を認めた。下顎は右下犬歯と第1小白歯のみが残存し、歯冠修復が行われていたが歯冠周囲に多量のプラークの付着を認め、デンタルX線写真から右下犬歯歯頸部にう蝕を認めた。残存歯に深い歯周ポケットや動揺は認められなかった(図21)。上下顎義歯は、増歯や修理が行われていたが、支台歯であった上下顎左側の小白歯は喪失したままで、栓塞子には劣化した軟性裏装材を認めた。義歯の清掃状態は不良で、患者は、歯牙欠損部や栓塞部にティッシュペーパーをつめて使用していた。義歯の適合は不良で、開口時に上顎義歯の落下と下顎義歯の浮上を認め、開鼻声も認められた(図22)。

義歯の不備(義歯床と栓塞子の不適合、人工歯排列位置と咬合接触関係の不正)による咀嚼障害、構音障害と診断した。治療方針は、義歯の構成要素に多岐に渡る問題点が認められたため、旧義歯の不備を修正した暫間義歯により機能回復を行い、調整が終了した暫間義歯をガイドに新義歯を作製すること、患者は施設入所中のため来院に職員の送迎が必要であるため治療スケジュールを事前に職員と相談しながら決定するこ

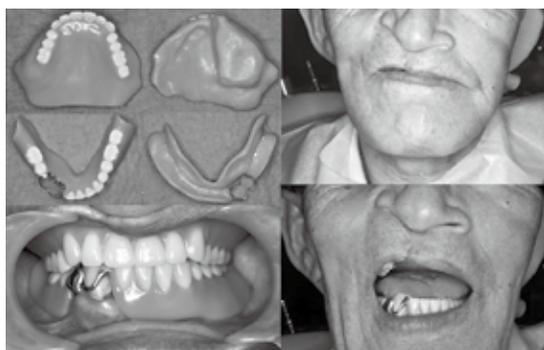


図24 完成した新義歯と装着時の状態

	旧義歯	暫間義歯	新義歯
グルコース溶出量 正常値 >100 (mg/dl)	47 (mg/dl)	80 (mg/dl)	99 (mg/dl)
摂食可能食品質問票 による咀嚼スコア	22.2	60.44	84.76
O'LearyのPCR (%)	100	25	12.5

図25 咀嚼機能と PCR の結果



鼻漏れがなくなった、話しやすくなった
歯に力が入る、咬み切り易い
頬がふっくらして見える

図26 気分評価の結果

と、残存歯や義歯の清掃、管理指導を十分に行うこととした。

初診から2014年7月までに、旧義歯に増歯、床延長、咬合面再形成、栓塞部の再形成、リラインを行い暫間義歯として装着した。義歯の調整と併せて口腔衛生指導を行いながら、右下犬歯のう蝕にはレジン充填を行った(図23)。2014年8月には患者の主訴が解消されたため新義歯作製に移行した。上顎は経過が良好と

なった暫間義歯の情報を新義歯に反映させるため、ダイナミック印象と研磨面のコアを採得し義歯作製に利用した(図23)。上顎顎義歯は中空型栓塞子とし2014年10月に装着した(図24)。新義歯装着後の経過は良好であり、定期検査に移行した。旧義歯、暫間義歯ならびに新義歯装着時における各評価結果を図25、26に示す。評価には、グミゼリー咀嚼時に溶出されるグルコース濃度¹⁹⁾、摂食可能食品アンケートを用いた咀嚼スコア²⁰⁾、O'Learyのプラークコントロールレコード(PCR)ならびにFaces Scale²²⁾を用いた、全ての項目で治療に伴いスコアは改善され、新義歯装着時で最良となった。

考察

上顎腫瘍切除後の咀嚼、嚥下、構音障害に対するリハビリテーションには一般的に顎義歯が用いられるが、近年では、欠損が広範囲の場合は、スリット型再建¹³⁾、血管柄付き骨皮弁^{17, 18)}などの再建や口腔インプラント^{18, 26)}の利用などの外科処置も報告されている。上顎片側切除後の機能回復における顎義歯装着群と血管柄付骨皮弁による再建群の咀嚼機能、構音、術後のQOLを比較した研究^{2, 9)}では、いずれの評価項目でも再建群が顎義歯装着群より優れた結果が報告されている。本症例では、術後十数年が経過していることや患者自身が外科的処置を希望しなかったため、顎義歯による補綴を行ったが、顎義歯は35gまで軽量化を行い、顎欠損腔内のアンダーカットを維持に利用できたことで良好な結果が得られたと考えられる。

前田²⁸⁾は、全部床義歯患者の咬合平面、咬合高径、下顎位を修正した暫間義歯を装着し、装着6カ月後の評価で患者の満足が得られたことを確認して新義歯作製を行うことで良好な成績が得られたと述べている。本症例では、暫間義歯装着後2カ月で新義歯作製に移行したが、比較的早期に状態が改善されたことは、下顎位に大きな問題がなかったことや暫間義歯の維持と安定が良好であったためと考えられる。

顎義歯装着後の治療効果については、咀嚼、構音に関する客観的評価^{30, 31)}ならびに患者の主観的評価^{32, 33)}について報告されているが、松山らは、客観的評価結果と主観的評価結果には相関がないものも多く、患者のQOLを考慮するとこれら双方から治療効果を判定することが望ましい³³⁾と述べている。本症例で用いたグミゼリー咀嚼時のグルコース溶出量と摂食可能食品アンケートを用いて算出した咀嚼スコアの結果は治療経過の進行に伴い改善し、両者の結果は一

致していたと考えられる。平井らが示した咀嚼スコアは、健常無歯顎患者の診断用義歯装着時で47.2、新義歯装着時で92.0、顎補綴患者では33.5であった²⁰⁾。本症例の咀嚼スコアは、初診時で22.2、暫間義歯装着時で60.44、新義歯装着時で84.76と上昇し、平井らの診断用義歯装着時や顎義歯装着者よりも大きな値となった。これらの結果は、新義歯のグルコース溶出量がほぼ正常値となったこととも一致し、良好な咀嚼機能の回復が得られたことを示唆している。

顎義歯は通常の義歯と比べ、形状が複雑で、大型化し、不潔になり易いため、残存歯や顎堤などの口腔内組織が健康な状態で維持されることが望ましい³⁾。土岐らは上顎顎義歯装着患者の口腔衛生管理について、顎義歯装着患者は一般義歯装着者と比較して清掃習慣に差は認められなかったが、顎義歯特有の複雑な形状や患者が夜間も義歯を装着する割合が高いことから、これらを踏まえた口腔清掃指導の必要性を示唆している³⁴⁾。本症例では、当初は口腔衛生に関心が低かったが、初診時から良好な口腔衛生を維持できるような動機づけと毎回の口腔衛生指導を行った結果、PCRは改善し、義歯の清掃も良好となった。

結論

上顎右側半側欠損を有する無歯顎患者に対して、旧義歯を改造した暫間義歯により機能回復をはかり、その情報を新義歯作製に利用した結果、良好な治療成績を得る事が出来た。

V. おわりに

本稿では、上顎欠損患者の補綴治療について主に広範囲な顎欠損症例や複雑な再建症例への対応を中心に報告した。顎補綴が必要となる患者に生じる各種障害の程度は極めて重篤である。これらの障害を改善するために顎補綴治療は欠かせないものであり、効果的な顎補綴治療を行うためには歯科衛生士、歯科技工士、言語聴覚士などを含めた関係診療科との十分な連携が必要である。今後も顎補綴治療を担当する一員として患者のQOL向上に努めたい。

謝辞

本稿で報告した各症例において困難な技工作業や口腔衛生指導にご尽力いただいた濱村俊一氏、梅園 稜氏、竹之内佳久氏ならびに中禮ゆかり氏に深甚なる謝意を表します。

参考文献

- 1) 社団法人日本補綴歯科学会編：歯科補綴学専門用語集：第3版，p41，医歯薬出版，東京，2009.
- 2) 大畑昇：上顎の顎補綴，顎顔面補綴，13，30-43，1990.
- 3) 大山喬史，谷口 尚偏：顎顔面補綴の臨床：第1版，p165-172，医学情報社，東京，2006.
- 4) 岩瀬かおる，小野寺進二，吉川建美，細井紀雄：上顎腫瘍摘出例における即時顎義歯の応用，顎顔面補綴，8，25-32，1985.
- 5) 松浦正朗，神谷順子，高橋裕，佐藤淳一，下郷和雄，鱒見進一，後藤昌昭：本邦の上顎欠損に対する顎補綴治療の現状－アンケートによる調査－，顎顔面補綴，32，15-26，2009.
- 6) (社)日本補綴歯科学会編：補綴歯科診療ガイドライン 歯の欠損の補綴歯科診療ガイドライン2008. http://www.hotetsu.com/s/doc/guideline_2008.pdf.
- 7) Koyama S, Sasaki K, Inai T, Watanabe M. Effects of defect configuration, size, and remaining teeth on masticatory function in post-maxillectomy patients : J Oral Rehabil, 32, 635-41, 2005.
- 8) 日本口腔腫瘍学会，日本口腔外科学会編：科学的根拠に基づく口腔癌診療ガイドライン：2009年度版，p83-84，金原出版，東京，2009.
- 9) 小野高裕，耕田英樹，小野雅則，中村公一，藤井克則，野首孝嗣，古郷幹彦：上顎部分切除症例に対する術後早期顎補綴，顎顔面補綴，20，79-88，1997.
- 10) Kanazawa T, Yoshida H, Furuya Y, Shimodaira K : Sectional prosthesis with hollow obturator portion made of thin silicone layer over resin frame, J Oral Rehabil, 27, 760-764, 2000.
- 11) 西元謙吾，岩元光明，唐木敦子，黒野祐一，西恭宏，森田康彦：硬口蓋全欠損をきたした硬口蓋悪性腫瘍症例に対するプロテーゼ使用経験，日本耳鼻咽喉科学会会報，105，1093-1096，2002.
- 12) Murakami M, Nishi Y, Umezono M, Kamashita Y, Nishimura M : Fabrication of a Movable Obturator Following Maxillary Reconstruction with Slit-Shaped Fenestration, J Prosthodont, doi: 10.1111/jopr.12199, 2014.
- 13) Sakuraba M, Kamata Y, Ota Uchiyama K, Kishimoto S, Harii K, Ebihara S: Simple maxillary reconstruction using free tissue transfer and prostheses, Plast

- Reconstr Surg, 111, 594-598, 2003.
- 14) Keyf F : Obturator prostheses for hemimaxillectomy patients, *J Oral Rehabil*, 28, 821-829, 2001.
- 15) Muneuchi G, Miyabe K, Hoshikawa H, Hata Y, Suzuki S, Igawa HH, Mori N: Postoperative complications and long-term prognosis of microsurgical reconstruction after total maxillectomy, *Microsurgery*, 26, 171-176, 2006.
- 16) Mukohyama H, Haraguchi M, Sumita YI, Iida H, Hata Y, Kishimoto S, Taniguchi H: Rehabilitation of a bilateral maxillectomy patient with a free fibula osteocutaneous flap, *J Oral Rehabil*, 32, 541-544, 2005.
- 17) Kazaoka Y, Shinohara A, Yokou K, Hasegawa T : Functional reconstruction after a total maxillectomy using a fibula osteocutaneous flap with osseointegrated implants, *Plast Reconstr Surg*, 103, 1244-1246, 1999.
- 18) Aramany MA: Basic principles of obturator design for partially edentulous patients. Part I: Classification, *J Prosthet Dent*, 40, 554-557, 1978.
- 19) Kobayashi Y, Shiga H, Yokoyama M, Arakawa I, Nakajima K: Differences in masticatory function of subjects with different closing path, *J Prosthodont Res*, 53, 142-145, 2009.
- 20) Hirai T, Ishijima T, Koshino H : Age-related change of masticatory function in complete denture wearers: evaluation by a sieving method with patients and a food intake questionnaire method, *Int J Prosthodont*, 7, 454-460, 1994.
- 21) Ohtsuka A, Kishita C, Hamano T, Kamashita Y, Kawahata N, Nagaoka E: Reconstruction of edentulous ridge with flabby tissue by application of hydroxyapatite granules, *J Jpn Soc Oral Implant*, 12, 220-232, 1999.
- 22) Kamashita Y, Sonoda T, Kamada Y, Nishi Y, Nagaoka E: Reliability, validity, and preference of an original faces scale for assessing the mood of patients with dentures, *Prosthodont Res Pract*, 6, 93-98, 2007.
- 23) Iwata Y, Yamaguchi S, Matsuyama M, Toriya K, Koyano K: A case report of prosthetic treatment after free-tissue transfer reconstruction of a maxillectomy patient. *Maxillofacial Prosthet*, 27, 20-26, 2004.
- 24) Peng X, Mao C, Yu GY, Guo CB, Huang MX, Zhang Y: Maxillary reconstruction with the free fibula flap, *Plast Reconstr Surg*, 115, 1562-1569, 2005.
- 25) Leles CR, Leles JL, de Paula Souza C, Martins RR, Mendonça EF: Implant-Supported Obturator Overdenture for Extensive Maxillary Resection Patient: A Clinical Report, *J Prosthodont*, 19, 240-244, 2010.
- 26) Funk GF, Arcuri MR, Frodel JL Jr.: Functional dental rehabilitation of massive palatomaxillary defects: cases requiring free tissue transfer and osseointegrated implants, *Head Neck*, 20, 38-51, 1998.
- 27) 細井紀雄, 平井敏博編: 無歯学補綴治療: 第1版, p262-269, 医歯薬出版, 東京, 2004.
- 28) 前田 望: 暫間義歯を用いて下顎位を決定した後金属床義歯を作製した無歯顎症例, *日補綴会誌*, 5, 309-312, 2013.
- 29) Genden EM, Okay D, Stepp MT, Rezaee RP, Mojica JS, Buchbinder D, Urken ML: Comparison of functional and quality-of-life outcomes in patients with and without palatomaxillary reconstruction: a preliminary report, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 129, 775-780, 2003.
- 30) Matsuyama M, Tsukiyama Y, Tomioka M, Koyano K : Clinical assessment of chewing function of obturator prosthesis wearers by objective measurement of masticatory performance and maximum occlusal force, *Int J Prosthodont*, 19, 253-257, 2006.
- 31) 伊東節子, 高木明夫, 三浦正人, 奥村英彦, 中村仁昭, 井口次夫, 佐々木元賢: 上顎切除2症例の義顎による言語機能及び咀嚼機能の改善, *顎顔面補綴*, 8, 33-39, 1985.
- 32) 堀 一浩, 小野高裕, 耕田英樹, 野首孝詞: 上顎顎義歯装着者の発話に対する満足度に影響を及ぼす因子, *顎顔面補綴*, 26, 9-16, 2003.
- 33) Matsuyama M, Tsukiyama Y, Tomioka M, Koyano K : Subjective assessment of chewing function of obturator prosthesis wearers, *Int J Prosthodont*, 20, 46-50, 2007.
- 34) 土岐聡子, 杉崎博美, 瀬戸純子, 石上友彦, 高村昌明, 大山哲生, 中林晋也, 澤野宗如, 小豆畑拓夫, 川本善和, 松本光彦: 歯科衛生士による上顎顎義歯装着者の口腔衛生管理, *顎顔面補綴*, 29, 35-40, 2006.

口腔微生物学分野 講師就任にあたりましてのご挨拶と抱負

松尾（川田） 美樹

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 発生発達教育学講座 口腔微生物学分野

はじめに

口腔微生物学分野 講師に就任いたしました松尾美樹（旧姓：川田）です。

私は平成7年度鹿児島大学歯学部を卒業し（19期生）、九州大学にて博士（歯学）を取得後、鹿児島大学 口腔微生物学分野に6年前に助教として着任し、昨年7月に講師に就任いたしました。

この度、鹿児島大学歯学部紀要への執筆の機会を賜りました。本稿では、これまでの研究、母そして子としてのワークライフバランス、今後の抱負の大きく3つについてご紹介させていただきます。

これまでの研究

私は、鹿児島大学歯学部卒業後、九州大学の予防歯科学分野に大学院生として入局いたしました。当時は研修医制度の義務化はまだない時代でしたので、私は卒後研修医にはならず、大学院進学道を選びました。大学院卒業後は臨床に進む予定にしており、研究者の道へ進むことは全く考えておりませんでした。学部学生のころから学位取得をしたいという気持ちがありました。九州大学への進学を決めた理由は、九州大学予防歯科学分野の教授でいらっしゃった古賀先生が特別講義でされた研究のお話に感銘を受けたためです。しかし、当時の私は学位は取りたいものの、研究とはどういうものか全くわからず入局しましたので、指導医の先生方には大変ご迷惑をおかけしました。大学院生時代は、う蝕細菌・歯周病細菌同定や、う蝕細菌の調節因子の解析を行ってまいりました。指導医の先生の温かいご指導の元、無事学位を取得することができました。

卒後、研究をもう少し続けたいと思い、九州大学予防歯科にて研究生となり、日本学術振興会の研究員制度に応募しました。採用には至りませんでした。その時受け入れ研究室となって下さったのが鹿児島大学に教授として赴任されたばかりの小松澤先生（口腔微

生物学分野 教授）でした。これがご縁で助教として採用いただくことになり、鹿児島大学に助教として着任させて頂きました。着任当初は、大学院時代細菌を扱っていたので基礎で細菌研究を行っていくことに支障はないであろうという、安易な気持ちがあったのだと思います。しかし、蓋を開けてみると、何をやってもダメ、結果が出るどころか、かえって周囲のスタッフの足手まといになってしまう始末で、最初の1年は失意の日々を過ごしておりました。臨床研究と基礎研究の違いを痛感した1年でした。当時、私は3歳の息子がおりましたが、幸いにも両親が同居し、子供の面倒を見てくれましたので、私は時間を気にせず研究を行うことができました。さらに、今思えば、助教であるのに、大半の時間を研究のみに充てることができていたのは、小松澤先生のご配慮があったことだったと思います。2年が過ぎた頃、鹿児島大学着任後1報目の論文が出たときには、喜びとともに大きな安堵感がありました。着任から現在は、小松澤先生の主要研究テーマである黄色ブドウ球菌の抗菌剤耐性機構の解明とともに、大学院生時代から行っていたう蝕細菌の環境適応機構や糖代謝機構解明の研究を継続させて頂いております。周囲の方々のご指導やご協力を頂きながら研究を行っております。まだまだ技術も発想も未熟な私ですが、一日一日を大事にしながらあきらめずに研究を続けていきたいと思っています。

母として、子としてのワークライフバランス

昨今、女性の参画が叫ばれており、安倍政権においても「女性が輝く日本へ」を成長戦略のスローガンの一つとして掲げています。女性の仕事への参画の機運が高まってきていることは大変良いことであり、今後多くの女性研究者が増え、今まで以上に質の高い切磋琢磨の時代が来るのが非常に楽しみです。しかし、このような国の後押しがなくとも、子育てや介護をされながら、素晴らしい業績を上げてこられている女性

はたくさんいらっしゃいます。そのようなロールモデルと呼べる女性の間にも、多種多様なワークライフバランスが存在しているように感じます。仕事と家庭のワークライフバランスは、一概に「こうあるべきである」というものではなく、個々の生活環境にあったワークライフバランスがあるべきだと考えています。私は幸いにも、両親のいる鹿児島に戻ることができ、それを家族も受け入れてくれました。そのため、私は大変恵まれた環境にあったことは間違いありません。さらに、近年は保育施設の充実や家事代行サービス等、働く女性にとっては大変ありがたい施設やサービスが増えてきています。私は鹿児島に戻るにあたり、基礎研究者として鹿児島大学歯学部と歯科医療への貢献をしたいという強い気持ちがありましたので、一人ですべてを抱え込まず、受けられる手助けは遠慮なく頂きました。一厚軽かましようでしたが、手を差し伸べて下さった方々に対しおのずと感謝の気持ちが湧いて、さらに仕事を頑張らねば、という気持ちになりました。今でも多くの方への感謝の気持ちが、日々の研究を後押ししてくれています。私のワークライフバランスは、一般的に見てロールモデルになりうるようなものではないと思いますが、研究を行うためにはどうしても時間が重要でしたので、両親や家族の協力の元生活環境を変え、ほとんどの時間を研究に費やせるようにしました。この5年間を振り返ると、周囲(特に両親や子供)に迷惑をかけたことや、しまった、と思うこともたくさんありましたが、低空飛行ながらも墜落はしませんでしたので、結果的にはよいワークライフバランスだったのではないかと考えています。

近い将来、女性のみならず男性にも家事育児の負担が求められる時代が来ると思います。結婚出産で生活環境が変わったら、仕事をするための生活環境を積極的に整える、つまり利用できるサービスや手助けは積極的に頂くことが大事ではないかと思えます。そうすれば、仕事量を減らすことなく継続的に仕事ができるようになると思います。結果、職場内での信頼も生まれ、多くのチャンスを与えて頂き、さらなる高みへとステップアップすることも可能になると思えます。また、生活環境を整えるにあたって助けて下さった方々への感謝の気持ちを持つことで、自然と仕事への意欲も湧いてきます。私自身も、両親や子供、友人、ラボのスタッフの方々等の理解や助けがなければ研究の量も質も中途半端になり、研究者を続けていくことはできなかつたと思っています。今後も、私を支えてくれる方々に常に感謝の気持ちを忘れず、一日一日を

無駄なく大切に過ごすことを心がけたいと思っています。

講師に就任して

現在は、自身の研究ならびに大学院生・学部学生の研究指導と、学部学生への講義を主に行っております。講師着任後は、本学男女参画委員会、本学学生生活委員会、歯学部学生委員会に所属させて頂き、多くのことを学ばせて頂いております。また、本年度、歯学部研究体制委員会の下部組織として発足いたしました若手研究者ワーキンググループにも所属させていただいております。本ワーキンググループには現在9分野の若手の先生方が参画し、歯学部の研究活性化に向けて、セミナー開催やメーリングシステムの構築等研究の活性化に向けた話し合いを毎月行っております。我々のような若手にこのような機会を与えて頂いたことで、改めて研究の重要性を認識できる場になると同時に、分野を超えた横の連携の強化が強まり、さらなる研究の発展につながると感じております。また、学外活動として、日本細菌学会の助成による細菌学若手コロッセウムのワーキンググループに昨年参画させて頂いております。本会は、学会の垣根を越えた若手微生物研究者同士が、自己の研究成果を発表し、切磋琢磨するという非常に画期的な会です。今年は鹿児島で開催させて頂くことになり、代表世話人 小松澤先生の元で、現在慶応大学や国立遺伝学研究所、宮崎大学、群馬大学、学習院大学から成る6名のワーキンググループとともに会の準備を行っております。

昨年講師就任後に、研究者として、さらに子供を持つ親として、本学の学生に向けて、子育てと仕事のワークライフバランスについての講義をさせて頂きました。このような貴重な講義の機会を頂いたことは、講師という役職がいかに責任の重い役職であるかということに再認識した瞬間でした。

講師へのご推薦を頂いた当初は、大変うれしく思った反面、正直私ごときに勤まる役職であるかどうかで大変悩みました。鹿児島大学に助教として赴任して5年が経過した時点でご推薦を頂きましたが、それまでの5年間は、研究と教育を日々こなすことで精いっぱい、今後の将来展望を考える間もなく月日があっという間に過ぎていきました。

講師就任後1年が経ち、強く感じていることとしましては、研究、教育、運営の時間やバランス配分の重要性です。現在、幸いにもいくつかの委員会に所属させて頂き、学外でも研究会の世話人や学会の準備事務

局等をさせて頂き、助教の頃には経験し得なかった大変多くのことを学ばせて頂いております。教育につきましても、学年副担任をさせて頂き、これまで以上に学生さんたちと接する機会を多く頂いております。これらの教育や運営に加え、研究もこれまで以上に進めたい意欲が強いので、これらを遂行するための時間のやりくりがまだまだ不十分である点が今の反省点です。

今後の抱負

鹿児島大学に着任させて頂いて以降、たくさんの先生方のご指導ご協力の元、大変貴重な経験をさせて頂いております。また、講師就任後は、これまでにはない多くの経験をさせて頂き、責任の重さを痛感しております。鹿児島大学歯学部に対する感謝の気持ちと共に、歯学部を活性化するための一員となれるよう努力していく所存です。また、研究につきましては自身の研究に加え、研究の楽しさを学生さんたちに伝え、より多くの学生さんに大学院へ進学して頂けるような魅力ある大学づくりの一助になれるよう努力いたします。

最後に

最後までご清覧いただきまして、本当にありがとうございました。これからも何卒ご指導ご鞭撻のほど、よろしく願いいたします。

小児の摂食嚥下リハビリテーション

佐藤 秀夫

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 発達系歯科センター 小児歯科

Dysphagia rehabilitation for infant, child and adolescence

Hideo Sato

Kagoshima University Medical and Dental Hospital Department of Pediatric Dentistry

ABSTRACT

Eating function is acquired with integration of various and repeated sensor-motor experiences (e.g. suckling, biting hobby) from unborn stage till 3 years old. This function is classified into eight stages from the acquired swallowing stage to the acquired eating with tool stage. Generally, there is complementary relationship between development of eating function and growth of body. Hence development of eating function is linked with development of gross-motor and micro-actuation of hand. In opposition, eating disorder often occur if a baby has sickness or disorder congenitally, or born as immature state because lack of sensor-motor experiences inhibit with development of eating function. Therefore, beginning of dysphagia rehabilitation for infants is recommended under 1 years old. Dysphagia rehabilitation clinic for infants, children and adolescences has been opened in department of pediatric dentistry of Kagoshima-university hospital from 2010. For 3 years, 117 children visited the clinic. Almost 40 percent of all the patients have been introduced by medical doctors. This fact indicates that the needs and demands for the dysphagia rehabilitation by dentist are very high.

Key words: eating disorder, dysphasia rehabilitation, eating function, eight stages of eating function, habilitation

緒言

現在、我が国の摂食嚥下リハビリテーション（以下、摂食嚥下リハ）においては高齢社会を迎え、高齢者を中心とした需要が高い。高齢者の摂食嚥下リハでは回復、維持が主たる目的となるが、生後間もない小児の場合では特に発達および機能獲得（リハビリテーション）を考慮したアプローチが必要となり、その点において大きく対応が異なる。

また同様に摂食嚥下プロセスは、①先行期（認知期）、②準備期、③口腔期、④咽頭期、⑤食道期の5つに分類されるが、そのうえで、食べる機能の発達を考慮した対応が必要となる。

小児の摂食嚥下障害を考えた場合、主に脳性麻痺児に代表されるように、中枢神経系の障害が成長発育のバランスを崩してしまうことが広く知られている。このアンバランスに対して発達の視点から口腔周囲筋に対する治療を行ったのが、発達機能療法であり、小児患者の摂食機能療法の原点ともいえる¹⁾。

さらに近年になり、低出生体重・早産を原因とする未熟児の増加または成育環境の変化に伴い、自閉症スペクトラムに代表される発達障害児が増えており、偏食や早食などの食行動に問題が見受けられ、従来型の肢体不自由児の摂食嚥下障害とは異なる食べる機能の発達の遅れが認められる^{2,4)}。

本稿では、小児の摂食嚥下リハの歴史および食べる機能の発達と小児の摂食嚥下リハの実際について述べるとともに、鹿児島大学病院小児歯科「もぐもぐ外来」における取組みと研究について紹介する。

小児の摂食嚥下リハビリテーションの歴史

小児の摂食嚥下リハは脳性麻痺などの肢体不自由児の全身のリハテクニックの1つとして、食事指導の観点から行われており、1980年代には小児の摂食嚥下障害とその対応の重要性が、主として理学療法、作業療法、言語療法などの療育の場で広まっていった^{5,8)}。

摂食嚥下を営む口腔領域の動きに異常運動が起こらないように、異常反射活動の抑制や運動療法などによって食事のための姿勢作りを中心とした対応がボバース法、ボイタ法などのなかで日常生活訓練として行われてきた。

ボバース法は1940年代に理学療法士であるベルタ・ボバースと神経学者であった夫のカレル・ボバースによって体系づけられた。

その概念は、脳などの中枢神経系が障害されることによって生じる姿勢や運動の障害を神経生理学的に分析し、ヒトが新生児から1歳前後までに示す姿勢や運動、知覚や認知の発達過程を基にリハビリ治療に発達学的考察を取り入れた手技である。

ボイタ法は、小児神経科医であるボイタが、脳性麻痺になる疑いのある乳児に対して開発した訓練法である。訓練としては、運動発達の基礎になる反射性運動発達を促進させることによって、その後の運動を正常に発達させようとするものである。

ボバース法、ボイタ法ともに食事指導を含めて専門的研修を受けた理学療法士、作業療法士、言語聴覚士を中心に介助指導および訓練がなされている。

一方で、小児の摂食嚥下リハの歯科領域における取り組みは1970年代まではほとんどみられなかった。その後、1977年の夏に当時東京歯科大学助教授であった金子芳洋氏がWHOのfellowshipを受けての視察研究で、ケンタッキー大学歯学部を訪れた。その際に、障害児部門の主任であるJose M. Lucenteに障害児歯科治療に加えて嚥下障害への対応の必要性を示唆されたと金子は報告している¹⁾。さらに同年冬にデンマークのバンゲード小児病院を訪れた際に、歯科医師のBjorn G. Russellから障害児の嚥下障害リハについて師事を受け日本の歯科医療領域に摂食嚥下リハをもたらすことになった⁹⁾。その後、1979年に昭和大学の教授に赴任した金子は、発達療法の考えに基づいた脳性麻痺な

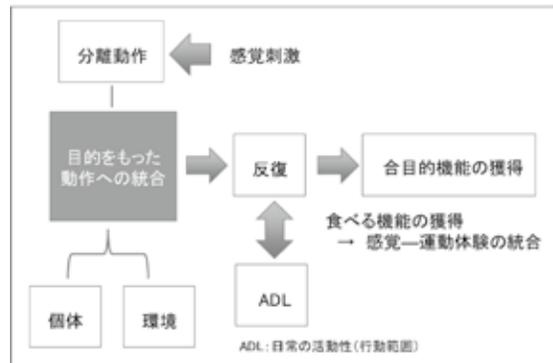


図1 食べる機能の獲得



図2 口腔の感覚運動体験（指しゃぶりやおもちゃ等の刺激が運動体験となる）

どの障害児（者）の摂食嚥下リハの研究、臨床を積極的に進め日本の摂食嚥下リハ医療の礎を築き、摂食機能療法の保険導入や摂食嚥下リハビリテーション学会の発展に貢献した。さらに金子の後任として教授に赴任した向井美恵は、摂食指導の対象を肢体不自由児のみならず、自閉症スペクトラムなどの発達障害児や健常児にまで広げた。また、摂食嚥下リハ領域に多職種連携ならびに口腔ケアの概念を導入することに尽力した。

食べる機能の発達

健康な子どもの摂食嚥下機能は出生後の食環境や口腔の感覚-運動体験を通して、新たな機能を獲得しながら発達する運動機能である（図1, 2）。

すなわち、摂食嚥下機能の発達は他の全身の発達と同様に感覚運動系の発達をなすといわれており、感覚刺激に対して引き出される種々の運動を食べる目的に

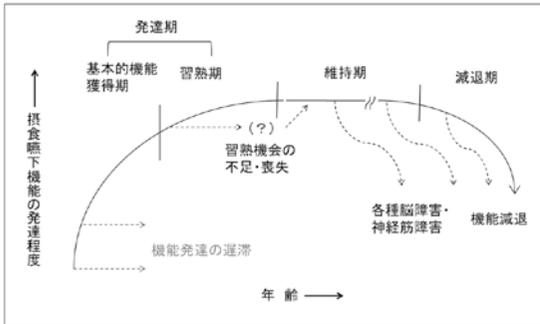


図3 機能発達の面からみた各ライフステージにおける摂食機能障害の発生

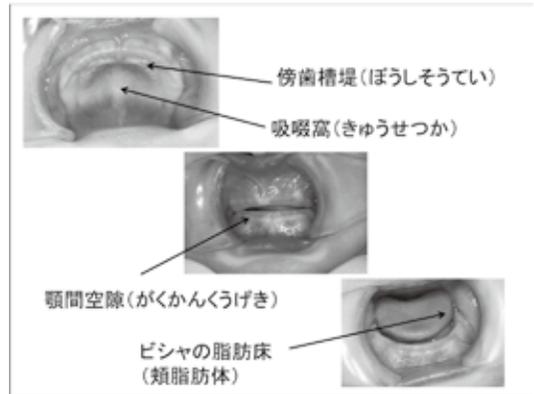


図5 乳児期に特徴的な口腔内

表1 小児の摂食嚥下障害の原因疾患

<ol style="list-style-type: none"> 1. 未熟性(未熟児, 低体重児, 早産児) 2. 解剖学的な構造異常(先天性, 後天性) 3. 中枢神経, 末梢神経, 筋障害 4. 咽頭・食道機能障害 5. 全身状態 6. 精神心理的問題 7. その他

(図3)¹⁰⁾。

実際に負となる因子として、はっきりしているものでは、中枢神経系の障害や筋疾患、先天性異常、幼児経管依存症^{11, 12)}なども報告されているが(表1)、健常児でも、保護者からの因子で過介助(過保護)やネグレクトなど負の因子も多因子にわたるため、正しい摂食嚥下機能の獲得を知ることが、この時期の子どもたちへの支援となる。

幼児期における摂食機能の発達は段階を踏んでステップアップするため、更なる発達の指標が必要となる。そこで、向井は摂食機能を健常児の成長発達をもとに8つに分類している(図4)¹³⁾。実際にはこれらの8つの発達段階に沿った、摂食指導が求められるが近年では8つの段階は細かすぎるのとの指摘から、3つのステップに分類する考え方が主流となっている。

しかしながら、摂食機能の発達段階を理解する上で有用な分類であることは間違いない。

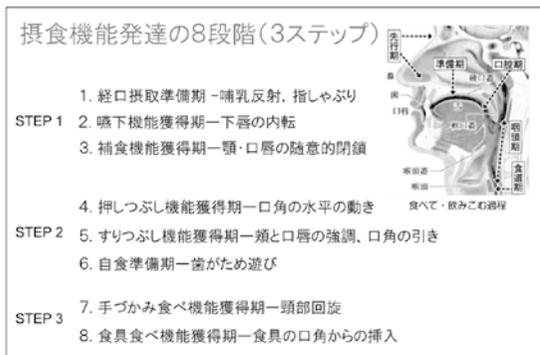


図4 摂食機能の8段階 (3ステップ)

合った動作に統合させることで営まれる随意運動である。

この摂食嚥下機能と関連の機能の多くは乳幼児期に獲得される。同時に口腔・咽頭部の形態の成長が著しい時期であり、形態的な成長変化とともに機能発達がなされるが、反対にその学習時期に負の因子が加わることによって、小児期の摂食嚥下機能障害は発生する

1. 経口摂取準備期

この期の特徴は出生後の乳児の主な口の動き(哺乳運動)は、原始反射(探索反射, 吸啜反射, 咬反射)によって営まれる。この反射運動の中心となる乳汁摂取のための吸啜運動は、舌・口唇・頬などが一体として動き、各器官が独立して異なる組み合わせで動くことができない。そこで、哺乳期に相当するこの時期は、口から乳汁以外の食物を取り込むための準備の時期(経口摂取準備期)として捉えることができる。形態的な吸啜による陰圧形成を容易にするため(乳首を支えるため)の口蓋の傍歯槽堤, 頬粘膜の脂肪床(ピシヤの脂肪床), 顎間空隙などの特徴的な形態がみられる(図5)。これらの口腔の形態の特徴に加えて、



図6 下唇の内転

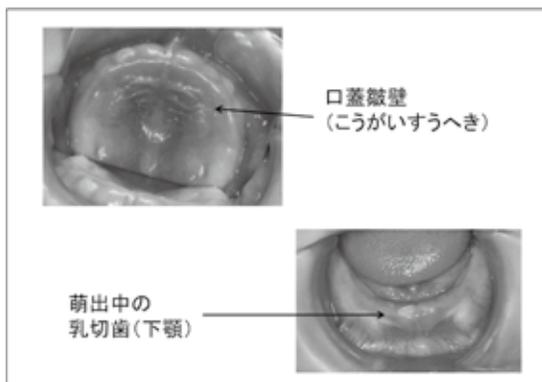


図7 離乳食中期頃の口腔内



図8 すりつぶし機能獲得期の口角の引き (左右非対称)

喉頭は鼻腔に近い位置にあり、口蓋垂と喉頭蓋が非常に近接しているため、喉頭蓋の左右から立体的に交差し、直接食道に乳汁が流入するため誤嚥しにくい形態となっている。

2. 嚥下機能獲得期

原始反射の消失に伴って口腔領域で最初に発達する摂食嚥下に関わる機能は随意的な嚥下の動きである。口に取り込まれた食物を食塊形成しながら、嚥下反射誘発部位の咽頭部近くまで移送する舌の蠕動様運動の獲得ならびに舌正中部の陥凹が主役となる。

舌運動の起点となる舌尖部と舌側縁が、口蓋前方部および口蓋側壁に押しつけやすくするため、下唇が舌尖を誘導するように内側に入る動き(図6)がみられる。

3. 捕食機能獲得期

食物を上下口唇で口腔内へ取り込む動きを捕食と呼ぶ。捕食の動きは、下口唇に食具(食器)が刺激などにより開口する動きが誘発され、食具上の食物を上唇で触覚認知して、口唇で食物を口腔内に擦り取るようにして舌の先端部に取り込む。このような捕食の動きは、随意的な開閉口運動を自分の意志と目的に合わせて動かすことが出来る最初の動きである¹⁴⁾。

4. 押しつぶし機能獲得期

捕食の動きによって舌と口蓋前方部(図7)で食物の物性(硬さや粘稠性)を感知する動きに伴い、硬さに応じて舌の動きを中心にして異なる動きで対応できるようになる。舌で食物を押しつける口蓋の部位は、口蓋皺壁と呼ばれ、押しつけられた食物が滑らないような皺があり、硬さなどの物性を感知しやすく、舌による押しつぶしを容易にする構造となっている。

5. すりつぶし機能獲得期

舌と口蓋で食物を押しつぶす動きは(図8)、同時にその動き(圧)でつぶせないものを分別することを可能とする。この感覚が硬い固形食に対処する動きすなわち咀嚼を引き出す第一歩である。この時期は乳臼歯の萌出の有無¹⁵⁾で、口腔機能は大きく様変わりする。個人差もあるため、歴齢だけによる指導は「丸飲みくせ」やささらには「窒息事故」を生じる危険性があるため、口腔内の視診特に歯の萌出を注意深く観察する必要がある。

6. 自食準備期・手づかみ食べ機能獲得期・食具食べ機能獲得期

食物をつかんで口に運び、顎・口唇・舌などの動きと連動させて、捕食がなされる動きが手づかみ食べである。健常児では離乳食後期頃から1歳半近くまでみられ、スプーンなどの食具を用いる基礎となる。発達の初期の頃には、食物のある手指に向かって頸部が回旋して捕食する。手づかみ食べが上手になるに従い、顔が横向きにならずに正面を向いたままで、手指により口裂の中央部に食物を運ぶことができるようになる(図9)。



図9 手づかみ食べ機能獲得期(口と手の協調運動が学習される)

小児の摂食嚥下リハビリテーションにおける歯科的対応 歯科疾患の予防と口腔ケア

1. 口腔周囲の過敏の確認

口腔内の発達状態を確認する方法として口腔ケアは有用な方法である。しかしながら、口腔ケアはそれ自体が強い刺激になるので、過敏症状(触刺激異常)がみられるときには、特に経口摂取との関係が重要になる。無理強いをした口腔ケア(口腔内への強い刺激)は拒食(口腔内への接触拒否)を生じる可能性があるため、最新の注意が必要である。

2. 誤嚥性肺炎と口腔ケア

摂食嚥下機能障害がある小児患者の場合、誤嚥性肺炎が高頻度に見られる。これは、食物の気管・肺への侵入が挙げられるが、重度な小児患者の場合には、経口摂取をほとんど行っていないのに誤嚥性肺炎が生じることがしばしばみられる。これには、胃食道逆流などその他の原因も考えられるが、口腔内細菌の誤嚥(不潔な口腔内の唾液の誤嚥)大きな原因の一つとして挙げられる。そのような観点からも、普段からの口腔ケアの励行は誤嚥性肺炎の予防の観点からも、全身状態の向上のためにも重要であるといえる。

装置を用いた摂食嚥下障害への対応

1. 舌接触補助床 (palatal augmentation prosthesis ; PAP)

PAPの利用は、言語療法として、また舌腫瘍の術後の機能障害のリハとして開発されてきた。現在は菊谷ら¹⁶⁾の報告のように、舌機能の補助的役割として用いていることが多く、筆者らは舌機能の発達の遅れかがみられる患児に対しても応用している。前述のように、小児患者のなかには、舌運動の未発達な患者も多く、また高口蓋のように物理的に押しつぶすことが不可能な患者にも適応である(図10左図)。図10左写真のように、歯を支点として口腔内に装着し、食べる機能の発達に合わせて、厚い床を少しずつ削除していく。本装置は2010年4月に保険に導入された。

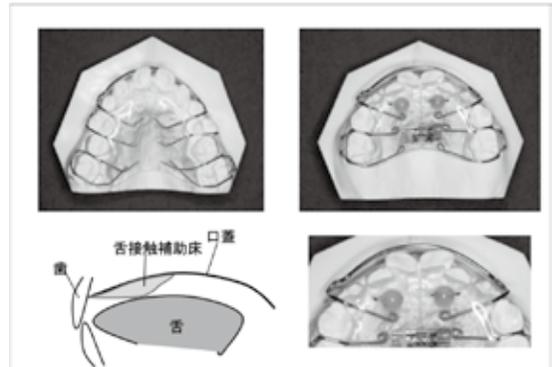


図10 舌接触補助床(左上)とCastillo-Morales床(右)

2. Castillo-Morales 床

Castillo-Morales 床は1985年にCastillo-Morales が考案した。舌位の誘導を行う装置である(図10右)。特にDown症児の舌突出防止に、日中に間歇的に用いられる。写真中央にあるビーズが、舌運動により回転し、患児からは、遊具的装置として、舌位の安定を促すよう設計されている。欠点として遊具的要素が高いため、数年単位の長期間の使用は不適である。また、患児の協力性も必要のため、慎重な装置の検討が必要となり、本装置は保険の適応もない。一方で、言語聴覚士が徒手的に口腔内マッサージなどを行うことと比較して、直接口腔内でビーズが作用することから、その効果は高いと言える。

鹿児島大学病院 小児歯科「もぐもぐ外来」における取組み

著者は平成22年に当時の昭和大学歯学部口腔衛生学教室で、小児の摂食嚥下リハビリテーションについて学ぶ機会を得た(図11)。その後平成22年7月に鹿児島大学小児歯科内に小児の摂食嚥下リハビリテーション専門外来「もぐもぐ外来」を開設した(図12)。開設から平成25年7月までの3年間で初診患者総数は、男64人、女53人、計117人であった。年齢分布は生後2か月から41歳1か月で、平均年齢は6歳7か月であり、そのうち、12.8%は1歳未満であった(図13)。

心身障害者が103名で、健常者が14名であった(表2)。紹介元として、歯科46.1%、小児科・新生児科33.3%、リハビリ病院6.0%、療育センター1.7%、保健センター2.6%、紹介無が10.3%であった。栄養摂取法は、経口摂取69.2%、経鼻チューブと経口19.7%、胃ろうと経口2.6%、経鼻チューブのみ5.9%、胃ろう

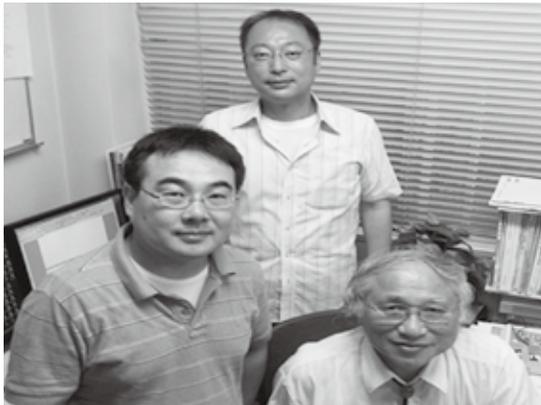


図11 昭和大学口腔衛生学教室での研修 (向井美恵名誉教授 (前方右) および弘中祥司教授 (後方), 前方左は著者)

表2 もぐもぐ外来初診患者の疾患 (障害) 別人数

疾患名	人	疾患名	人	疾患名	人
CP+MR	22	CP	1	新生児脳室周囲白質軟化症	1
ダウン症候群	15	発達障害+MR	1	Pallister-Killian症候群	1
MR	9	Beckwith-Wiedemann症候群	1	SP+リソレ-症候群	1
CLP	6	4P+リソレ-症候群	1	五肢神経麻痺	1
その他染色体異常	4	難聴聴覚性聴障害+CP	1	上肢障害四肢麻痺	1
Retin症候群	4	Corneal de Lange症候群	1	心疾患	1
自閉症	2	喉嚨軟化症	1	18p+リソレ-症候群	1
発達遅延症併発	2	Turner症候群	1	リソレ+管理	1
総嚥下口蓋裂	2	部分無歯症	1	ピロリ菌感染木鼻肺炎喘咳合併文庫症	1
Pierre Robin症候群	2	心室中隔欠損症	1	気管狭窄併発	1
CHARGE症候群	2	気管軟化症	1	健常	14
水頭症+キアリ奇形	1	situs 逆置	1	計	117
水頭症+MR	1	早幼粒細胞症下症	1		
ファロ-四徴症	1	Zellweger症候群	1		
ファロ-四徴症+CLP	1	胃食道逆流症	1		
ファロ-四徴症+MR	1	メランゴウム腫瘍性気管支肺炎	1		



図14 特別支援学校における摂食指導



図12 もぐもぐ外来のポスター (右) と紹介新聞記事 (左)

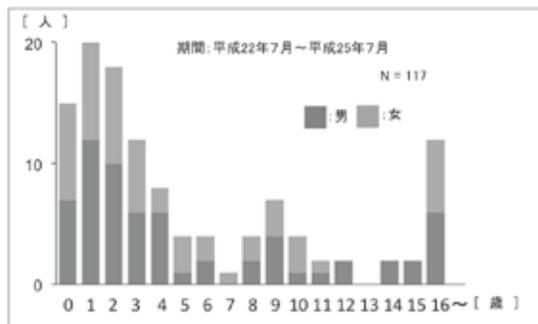


図13 もぐもぐ外来への来院患者内訳

のみ2.6%であった。さらに、18.8%に呼吸状態の不良を認め、出生体重が1000g未満である超低出生体重児が6.0%であった。連携先として、療育センターとリハビリ病院が18.8%，養護学校が12.8%，訪問看護が6.8%であった。

約4割の患者が小児科・新生児科等の医科系からの紹介であり、摂食指導と機能評価への需要が高いことを示唆している。

さらに、未熟児や重症心身障害児は、訪問看護サービスやリハビリテーション訓練を受けており、各施設や学校への訪問指導等により多職種との緊密な連携を図っている。効果的な摂食指導を行う上で、より低年齢から訓練を開始することが不可欠である。そのため、著者は鹿児島県こども総合療育センター、国立病院機構南九州病院、鹿児島こども病院、菊野病院、鹿児島県立鹿児島養護学校、桜丘養護学校等にて、摂食指導を実施することで、より早期かつ的確な介入を行っている (図14)。

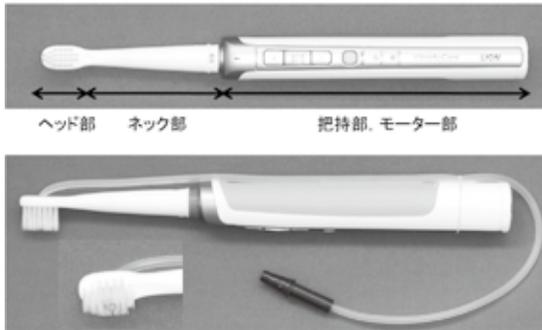


図15 本研究で使用した電動歯ブラシ（上）および試作吸引付き電動歯ブラシ（下）

吸引付き電動歯ブラシによる舌振動刺激による摂食嚥下リハビリテーション法の開発¹⁷⁾

摂食嚥下の一連の過程で、舌は準備期および口腔期の食塊形成や食塊輸送において重要な役割を果たしている^{18,19)}。摂食嚥下障害の原因の多くは、舌が主体を担う口腔期に存在すると考えられており、実際に脳性麻痺およびダウン症を有する障害児の多くはその未熟性、解剖学的な構造異常、神経・筋障害等により摂食嚥下障害を認めることが多い^{1,4)}。口腔期嚥下障害の実態は、舌と顎運動の不調和、特に舌の口蓋への接触困難であり、その結果、咽頭への食塊送り込み不全、咽頭残留や誤嚥を引き起こす可能性があると考えられている。一方で摂食嚥下障害を有する障害児の多くは口腔閉鎖不全などによる流涎の増加および口腔内乾燥により口腔内細菌の誤嚥リスクが高まる。そのため適切かつ効率的な口腔内清掃（器質的口腔ケア）が求められる。

よって、器質的口腔ケアと摂食嚥下機能訓練は互いに切り離すことのできない不可欠の関係を有する。

しかしながら、障害児特有の課題として、コミュニケーションが取れない、長期間の対応が求められるなどがある。さらに保護者により介助を受けることが多い。そのため、効率的で簡便に口腔ケアが実施でき、かつ口腔機能訓練が可能な器具が求められている。

電動歯ブラシは、従来から効率的に刷掃ができるなどの理由で脳性麻痺児の口腔ケアに用いられてきた⁶⁾。近年では、汎用歯ブラシに吸引チューブを付与することで刷掃性の向上と、唾液による誤嚥性肺炎の予防を図っている²⁰⁾。

本研究では、電動歯ブラシに吸引チューブを付与することで、効率的な刷掃と、電動歯ブラシの振動刺激

表3 健常児の各年齢、最大舌圧値

年齢	最大舌圧[kPa]
1歳9か月	33.7
2歳10か月	38.5
3歳10か月	27.0
7歳5か月	20.0
平均舌圧	29.8

表4 障害児の年齢、障害名、口腔機能、食形態

番号	年齢	障がい名	変換時口唇閉鎖	変換時舌挙上	食形態
1	2歳8か月	ダウン症	—	—	ペースト
2	2歳1か月	脳性麻痺	—	—	ペースト
3	12歳3か月	脳性麻痺	—	—	ペースト
4	3歳2か月	脳性麻痺	—	—	ペースト
5	5歳8か月	ウエスト症候群	—	—	きざみ食
6	7歳1か月	染色体異常	—	—	ペースト
7	4歳5か月	頸部リンパ管腫	—	—	きざみ食
8	1歳8か月	脳性麻痺	—	—	きざみ食
9	7歳10か月	脳性麻痺	—	—	きざみ食
10	7歳8か月	脳性麻痺	—	—	きざみ食
11	5歳6か月	ウエスト症候群	—	—	きざみ食
12	9歳2か月	精神発達遅滞	—	—	普通食

—：口腔閉鎖および舌挙上なし

により、舌機能の向上を目的とした「吸引付き電動歯ブラシ」の開発と臨床応用を検討した。

1. 材料

電動歯ブラシは、市販されている各器種²¹⁾の中で、ライオン歯材社製の音波式電動歯ブラシ DENTEX systema vibrato care を選択した（図15）。

2. 対象

鹿児島大学医学部・歯学部附属病院 発達系歯科センター小児歯科外来に来院した、健常児4名および障がい児12名を対象とした（表3、表4）。

なお、本研究の全ての対象者および保護者に対し、鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床研究倫理委員会承認を受けた（受付番号24-25、平成24年5月）説明書を用いて説明し、書面による同意を得ている。



図16 舌圧測定器

3. 方法

汎用吸引チューブで、口腔内吸引用として使用頻度の高い、8 Fr および10 Fr について比較検討した。水温36℃に設定した精製水100mlに増粘剤を各0 g, 1.0 g, 1.5 g を付加して、汎用吸引器にて吸引圧40 kPa での溶液に対する両チューブの吸引時間を測定した。

4名の健常児の舌圧を、図16に示す舌圧測定器 (TPM-01, JMS 社, 広島) を用いて、1分間口腔内に保持させ、唾液の自由嚥下を指示した。出力結果は専用解析ソフトを用いて、0.5秒毎に圧力表示され、1分間中の最大圧力を最大舌圧と定義した。さらに各障害児の安静時の口唇閉鎖状態および舌挙上状態を歯科医師1名により確認した。同舌圧測定器を用いて、障害児の舌圧を先述の方法により測定した。さらに、音波式電動歯ブラシ DENT.EX systema vibrato care を用いて、舌表面の振動刺激を行った。振動数およびパターンは約13000~33000回/分 (無負荷時) のマッサージスイングとして、図5に示す手順で、電動歯ブラシのヘッド部を3分間舌表面に当て続けた。振動刺激後は再び舌圧を測定した。

4. 結果

吸引チューブの結果は図17に示すとおり、10 Fr チューブが8 Fr と比較して溶液の性質に関わりなく、吸引時間が短いことより、10 Fr が適切であることが分かった。吸引チューブは電動歯ブラシのヘッド部の基部中央に穴をあけて、毛束より約1 mm 下にチューブ先端が保持されるように設定した (図15)。

表3に健常児の舌圧の結果を示す。最大値が38.5 kPa, 最小値が20.0 kPa, 平均29.8 kPa であった。表4に障害児の年齢, 障害名, 安静時口唇閉鎖, 安静時舌挙上, 食形態を示す。対象者全員が安静時は口唇が開

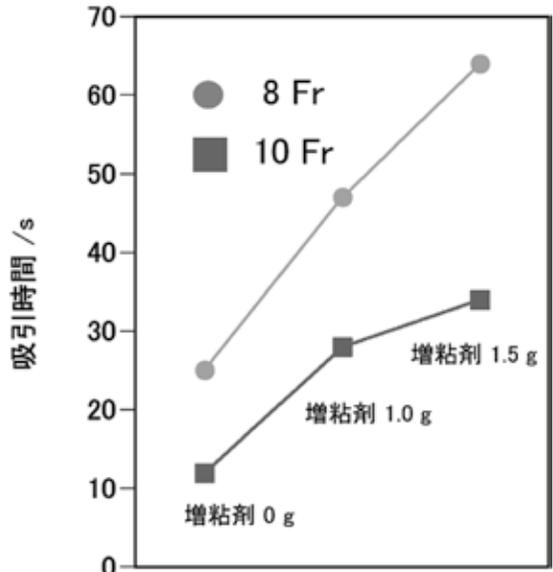


図17 2種の吸引チューブの溶液別吸引時間

表5 障害児の舌振動刺激前後の舌圧値

番号	刺激前最大舌圧[kPa]	刺激後最大舌圧[kPa]
1	2.7	6.3
2	1.5	3.4
3	2.0	3.5
4	0.0	3.0
5	4.5	3.3
6	0.0	8.3
7	5.3	4.0
8	4.9	4.6
9	3.4	3.1
10	5.2	11.9
11	3.7	4.7
12	9.0	8.8

いている状態であり、かつ舌の挙上は確認されなかった。また、食形態は5名がペースト, 6名がきざみ食, 1名が普通食であった。表5に舌振動刺激前後の最大舌圧値を示す。障害児12名中7名が舌振動刺激後に最大舌圧が上昇した。図18に示すように、障害児において、舌振動刺激後において、舌圧が約2倍上昇することが明らかとなった。

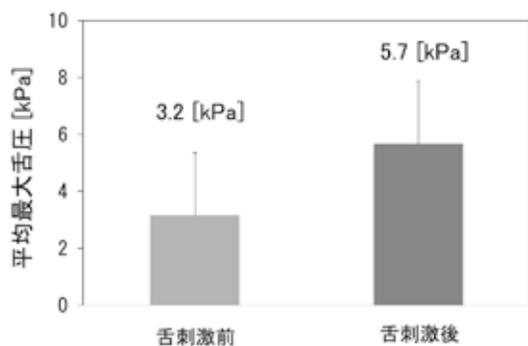


図18 障害児における舌振動刺激前後の最大舌圧平均値

5. 考察

最近の研究²²⁾で、高齢者ならびに成人の舌圧の測定結果は得られている。本研究により、高齢者・成人で使用された舌圧測定器を用いて、健常児ならびに障害児の舌圧が明らかとなった。さらに、健常児と障害児の舌圧の違いも明らかとなった。障害児の多くは筋緊張の低下により、口唇閉鎖力ならびに舌の運動機能が低下していることがしばしば見受けられる。これらの運動機能を賦活させるためには、周囲筋への直接または間接的な感覚刺激が求められる。

成人の中途障害者における、舌振動刺激による舌機能の向上に関しては報告があるが^{23, 24)}、障害児における舌振動刺激による舌機能の向上に関する報告はみられない。また、本研究が電動歯ブラシを用いている点において、歯科医師、歯科衛生士による専門的口腔ケアが、舌機能を含む口腔機能の向上に貢献できる可能性を示した点においても意義深いものであるとともに、保護者による家庭での簡便な口腔機能の向上法を示すことができたと考えられている。

6. 結論

吸引付き電動歯ブラシによる障害児の舌表面への振動刺激により、舌圧が上昇する可能性を示した。今後は継続的な舌振動刺激が摂食嚥下機能の向上に寄与することを明らかにしたい。

まとめ

小児の摂食嚥下リハビリテーションにおいては口腔機能の未発達もしくは不全が多く見受けられることから、歯科医師の役割は特に重要であると考えている。

しかしながら、現在の我が国の歯科医師に小児の摂

食嚥下リハビリテーションの専門性を有している者が、まだまだ少数であるのが現実である。小児の歯科医療は、齲蝕の洪水を通り過ぎ、齲蝕予防や歯列咬合の管理が中心となっている。一方で、成育環境の変化から摂食嚥下障害を有する在宅療養患児も増加しており、開業歯科医院および多職種との連携も摂食嚥下リハビリテーションにおいては必要不可欠である。口腔機能の障害が歯列咬合の異常を生じさせることは、すべての歯科医師が知っていることである。摂食機能療法や舌接触補助床などが保険導入されるなど、齲蝕や歯周病から口腔機能へ歯科全体がシフトしているので、今後、さらに連携を必要とする歯科医師が増えてくると思われる。

今後も小児の摂食嚥下リハビリテーションの質がさらに高まり、若い患者さんが、一口でも「美味しい」という喜びを保護者と分かち合える機会がさらに増えることを心から願っている。

謝辞

本総説を寄稿するにあたり、小児の摂食嚥下リハビリテーションへの道を照らして頂いた、山崎要一教授をはじめ、研修中に丁寧にご指導下さった、昭和大学向井美恵名誉教授、弘中祥司教授に心より御礼申し上げます。また、鹿児島県における小児の摂食嚥下リハビリテーションの普及にご尽力頂いた、奥猛志先生、北上真由美歯科衛生士に感謝申し上げます。最後に公私ともに協力頂いた橋口真紀子助教と本稿のモデルとなった私の4人の子供に本稿を捧げます。

参考文献

- 金子芳洋（編著）：食べる機能の障害—その考え方とリハビリテーション—，医歯薬出版，1987.
- 田角 勝，向井美恵（編著）：小児の摂食嚥下リハビリテーション，第2版，医歯薬出版，2014.
- 佐藤秀夫（編著）：よくわかる乳幼児期の口腔機能発達支援ガイドブック，鹿児島県・鹿児島県歯科医師会・かごしま口腔保健協会，朝日印刷2013.
- 西尾正輝：小児の摂食・嚥下リハビリテーションにおける最近の国際的動向．日摂食嚥下リハ会誌，12(1)：11-19，2008.
- Morris SE: Program guidelines for children with feeding problem, Childcraft Education Corp. Newjersey, 1977（鷲田孝保訳：障害児食事指導の実践，協同医書出版，1979）.
- Finnie NR: Handling the young cerebral palsied child at home, 2nd Ed, William Heineman Medical Books

- Ltd. London, 1978 (梶浦一郎監訳：脳性麻痺児の家庭療育, 第2版, 医歯薬出版, 1982).
- 7) Gallender D: Eating handicaps—Illustrated techniques for feeding disorders—, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1979 (坂本竜生, 竹田契一監訳：障害児の食事指導・言語援助の技法, パシフィックサプライ, 1984).
 - 8) Arvedson JC, Brandsky L: Pediatric swallowing and feeding, Singular Publishing Group, Inc, California, 1993.
 - 9) 金子芳洋, 向井美恵：心身障害児の摂食困難をいかにして治すか—バンゲード法の紹介—. 歯科展望
 - 10) 金子芳洋：障害者の摂食のためのリハビリテーション. 日本歯科医師会雑誌, 43:143-148, 1990.
 - 11) 田角 勝ほか：幼児経管依存症の成因. 日本小児科学会雑誌, 101: 232, 1997.
 - 12) Ishizaki A, Hironaka S, Tatsuno M, Mukai Y: Characteristics and weaning strategies in tube-dependent children. *Pediatr Int*, 55: 208-13, 2013.
 - 13) 向井美恵：摂食機能療法—診断と治療法—. 障歯誌, 16: 145-155, 1995.
 - 14) 尾本和彦：乳幼児の摂食機能発達, 第1報：行動観察による口唇・舌・顎運動の経時変化. 小児保健研究, 51(1):26-66, 1992.
 - 15) 日本小児歯科学会：日本人小児における乳歯・永久歯の萌出時期に関する調査研究. 小児歯科学雑誌, 26(1):1-18, 1988.
 - 16) 菊谷 武ほか：筋萎縮性側索硬化患者の嚥下及び構音障害に対する舌接触補助床 (PAP) 適応の1例. 障歯誌, 21(2): 200-204, 2000.
 - 17) 北上真由美：吸引付き電動歯ブラシによる舌振動刺激による摂食・嚥下リハビリテーション法の開発：鹿児島大学歯学部総合研究科医科学専攻修士論文, 2013.
 - 18) Shaker R, Cook IJ, Dodds, WJ, et al. Pressure-flow dynamics of the oral phase of swallowing. *Dysphagia*, 3:79-84, 1988.
 - 19) Palmer JB. Bolus aggregation in the oropharynx does not depend on gravity. *Arch Phys Med Rehabil*, 79:691-696, 1998.
 - 20) 向 里香, 安達裕美, 土田範行, 花森順子, 大西真奈美, 川岸良子, 太田律子：電動歯ブラシを用いた口腔ケアによる嚥下機能改善への取り組み. 老年看護 38:85-87, 2007.
 - 21) 金子知弘ほか：電動歯ブラシの種類と特徴について. 奥羽大歯学誌 29(2):149-157, 2002.
 - 22) 武内和弘ほか：嚥下障害または構音障害を有する患者における最大舌圧測定の有用性. 日摂食嚥下リハ会誌 16(2):165-174, 2012.
 - 23) 外山慶一ほか：舌運動機能障害に対して振動刺激が有効であった多発性脳梗塞の1例. 鹿児島大学医学部・歯学部附属病院臨床技術部業績集, 129-134, 2009.
 - 24) 五十嵐一吉：ヒト下顎舌反射の神経機構. 口病誌 63(1):108-121, 1996.

連続切片の *in situ* ハイブリダイゼーションを利用した 遺伝子発現の3次元再構築法

山中 淳之, 岩井 治樹, 倉本 恵梨子, 後藤 哲哉

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科
先進治療科学専攻 神経病学講座 歯科機能形態学分野

Three-dimensional gene expression pattern reconstructed from serial section *in situ* hybridization

Atsushi Yamanaka, Haruki Iwai, Eriko Kuramoto and Tetsuya Goto

Department of Oral Anatomy and Cell Biology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima 890-8544, Japan

ABSTRACT

Identifying the cells expressing a specific gene in adult or developing tissues is the most basic step in the field of histochemistry and developmental biology. This article presents a sophisticated method of visualizing three-dimensional (3-D) gene expression patterns in organs or tissues with high precision. In this method, 3-D gene expression data are reconstructed on a computer from serial histological sections after *in situ* hybridization is performed. As an application of this method, we reconstructed 3-D gene expression patterns in the developing tooth, which is an organ with complex morphology, such as a number of cusps on the tooth crown. This method showed several advantages over the usual procedures, enabling us to extract any tissue structures and compare them with 3-D expression patterns of specific genes. In addition, it enabled us to reconstruct 3-D complex tissue morphology and gene expression patterns of the developing tooth in great detail and examine their spatial relationship with accuracy. Thus, the present method will be applicable to various organs and tissues, and can offer more precise and useful information about gene expression patterns in the field.

Key words: 3-D reconstruction, *in situ* hybridization, serial histological sections, gene expression, tooth development

I. Introduction

Identifying a cell or a group of cells, which expresses a specific gene in adult or developing tissues, is the most basic step to study in the field of histochemistry and developmental biology. *In situ* hybridization (ISH) is a method of detecting the localization of mRNA in tissues or organs *in situ*, and nowadays it is a major technique for investigating when and where a specific gene is transcribed.

There are two approaches in ISH, depending on the sample to be examined: whole-mount *in situ* hybridization (WISH) is applied for small-sized fixed samples, such as a whole embryo and an explanted tissue; section *in situ* hybridization (section ISH) is applied for histological sections prepared on the slide glass^{1,2)}. In WISH, we can get the whole picture of gene expression in an examined sample, but it lacks precision. On the other hand, in section

ISH, we can detect the detailed localization of gene expression on a cellular level, but it lacks the whole three-dimensional (3-D) information.

Here we introduce a technique of visualizing 3-D localization of gene expression in organs or tissues with high precision. In this method, first, we prepare serial histological sections from a sample embedded in paraffin, and second, we apply section ISH to all the serial sections. Third, we reconstruct 3-D data from serial gene expression images on a computer. This technique will enable us to visualize detailed 3-D gene expression patterns, compensating for the shortcomings of WISH and section ISH, and combining the advantages of both.

As an application of this technique, we reconstructed 3-D gene expression patterns in the tooth germ during tooth development. One tooth is formed from one tooth germ, which is composed of ectodermal dental epithelium and neural crest-derived dental mesenchyme³⁾. The dental epithelium takes on the shape of a suspended bell, called the enamel organ, whereas the dental mesenchyme inside of the enamel organ is called the dental papilla. Enamel and dentin matrices are later secreted and deposited at the boundary between the enamel organ and the dental papilla, and the tooth is formed there by calcifying the matrices. Therefore, we can speculate the final shape of the tooth crown, which usually shows great complexity, by tracing the boundary morphology between the enamel organ and the dental papilla during tooth development. For these reasons, 3-D reconstruction of the dental epithelium from serial histological sections has frequently been used for studies on tooth morphogenesis⁴⁻¹¹⁾. Furthermore, a few studies have been performed using gene expression patterns superimposed onto the 3-D dental epithelial morphology¹²⁻¹⁶⁾. Here we present an application of the present technique to show the much higher-resolution 3-D relationship between tooth morphogenesis and gene expression patterns, and discuss its great utility.

II. Materials and Methods

Serial histological sections from sample embedded in paraffin

Embryos of an experimental animal, *Suncus murinus*, were used (Jic: CR strain, the Central Institute for Experimental Animals, Kawasaki, Japan). All the procedures mentioned below followed the guidelines of the Animal Experiment Committee of Kagoshima University.

Heads of the embryos were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) in PBS at 4°C for 1 day. The fixed samples were then decalcified with 12.5% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and 2.5% PFA for several days. The samples were dehydrated and embedded in paraffin. Paraffin blocks were serially sectioned in the frontal plane at 7 µm thickness.

H-E staining and section *in situ* hybridization with two different probes

We prepared three sets of MAS coated slide glasses (S9443, Matsunami Glass, Kishiwada, Japan), and arranged serial sections in a sequence shown in Figure 1A–C, i.e., every three sections on each slide. Three sets of slides were then prepared from one sample, on each of which serial sections were arranged at 21-µm intervals. The first set of slides was stained with haematoxylin–eosin (H–E) (Fig. 1A'). For the second and third sets of slides, ISH was performed with digoxigenin (DIG)-labeled antisense RNA

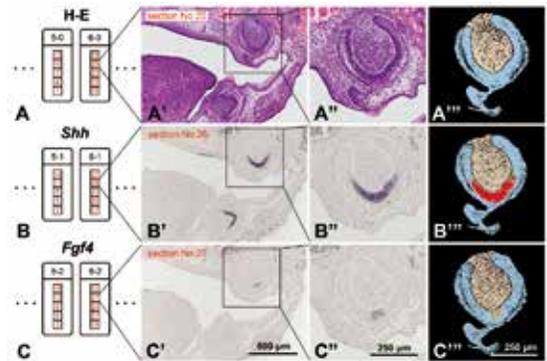


Fig. 1. Preparation of three sets of serial histological sections from one sample, and image processing after H–E staining and *in situ* hybridization. (A–C) A sample embedded in paraffin is serially sectioned at 7 µm thickness, and the serial sections are arranged on three sets of slide glasses in a sequence shown in red-colored numerals (i.e., every three sections on each slide). Through this procedure, serial sections are arranged at interval of 21 µm on each set of slides. (A'–C') The first set of slides is stained with haematoxylin–eosin (H–E). For the second and third sets of slides, *in situ* hybridization is performed with the antisense probes of *Shh* and *Fgf4* genes. Signals are detected with NBT/BCIP, and no counter-staining is performed. (A''–C'') The contour of the enamel organ, the epithelial component of the tooth germ, is outlined on each image. (A'''–C''') Extraction of the enamel organ (colored in light blue) and the dental papilla, the dental mesenchyme inside of the enamel organ (colored in cream). Gene expression domains are also extracted. *Shh* and *Fgf4* expressions are colored in red and yellow, respectively.

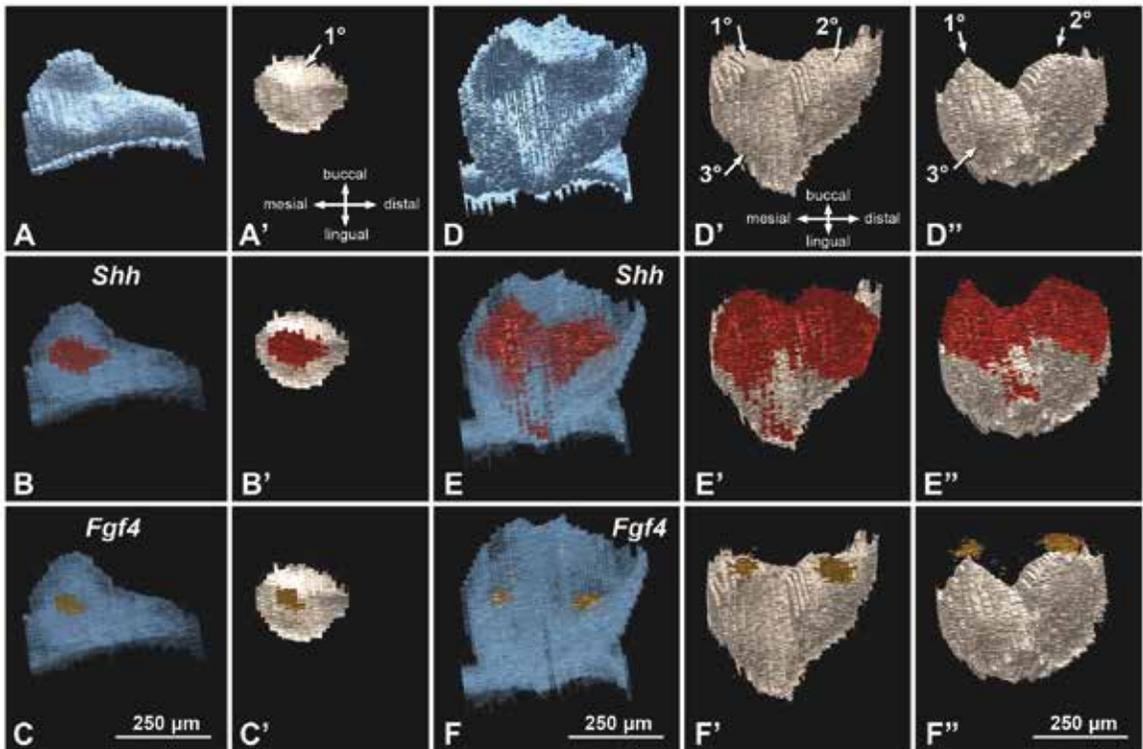


Fig. 2. Three-dimensional (3-D) reconstructions of enamel organs, dental papillae, and two different gene expression patterns. (A–C, A'–C') Tooth germs in the cap stage at embryonic day 20 (E20). (D–F, D'–F', D''–F'') Tooth germs in the bell stage at E23. The enamel organs are viewed from the mesenchymal side (A–F), depicting their hollow shapes, whereas the dental papillae are viewed from the epithelial side (A'–F') and from the lingual side (D''–F''), depicting their tubercular shapes. The tubercles of the dental papilla are numbered from 1° to 3° in a sequence of formation. These correspond to the numbered cusps on the completed tooth, shown in Figure 3. Directions are indicated by the crossing arrows. (B, B', E–E'') Localization of *Shh* expression colored in red with translucent enamel organs (B, E) and with dental papillae (B', E', E''). (C, C', F–F'') Localization of *Fgf4* expression colored in yellow with translucent enamel organs (C, F) and with dental papillae (C', F', F'').

probes of two different genes, respectively, according to standard protocols²⁾. DIG signals were detected by Anti-DIG reaction (anti-DIG-AP Fab fragments, Roche, Basel, Switzerland) and were colored with NBT/BCIP (Fig. 1B', C'). No counter-staining was performed.

3-D reconstruction of tissue morphology and gene expression domain

For the three sets of serial sections, digital microscopic images were taken with a digital camera system (DP-25, Olympus, Tokyo, Japan). The image processing outlined below was performed using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, San Jose, CA, USA). To depict the whole picture of tooth germs, we first outlined the contour of the

enamel organ on each image (Fig. 1A''–C''), and then extracted only the enamel organ and the dental papilla (Fig. 1A'''–C'''). For the second and third sets of images, gene expression domains were also extracted (Fig. 1B''', C'''). Furthermore, we superimposed serial images by rotating and moving each image manually to align their midlines and the contours of the enamel organ. Through these processes, we obtained three sets of aligned serial images on which enamel organ, dental papilla, and expression domains of two genes were extracted. The adjusted sets of serial images were stacked and reconstructed into 3-D data using AVS/Express software (Advanced Visual Systems, Waltham, MA, USA) (Fig. 2).

III. Results

Following the method outlined above, we reconstructed 3-D images of tooth germs of the upper first molar (M^1) of *Suncus murinus*, with two different gene expression patterns (Fig. 2). The enamel organs were viewed from the mesenchymal side, depicting their hollow shapes (Fig. 2A–F). The dental papillae were viewed from the epithelial side, depicting their tubercular shapes, which were associated with the final shapes of the tooth crowns (Fig. 2A'–F', 3). The dental papillae were also viewed from the lingual side (Fig. 2D''–F''). Localization of mRNAs of two genes, *Shh* and *Fgf4*, was also visualized with the enamel organ (Fig. 2B, C, E, F) and with the dental papilla (Fig. 2B', C', E', E'', F', F''). During tooth development, *Shh* and *Fgf4* are expressed only in the epithelium^{12, 17}. Here, the enamel organs were represented in translucent color (Fig. 2B, C, E, F).

At embryonic day 20 (E20) in this animal, the tooth germ of M^1 was in the cap stage. The enamel organ took on a slightly hollow appearance (Fig. 2A). Corresponding to this, the dental papilla showed a hill-like rounded

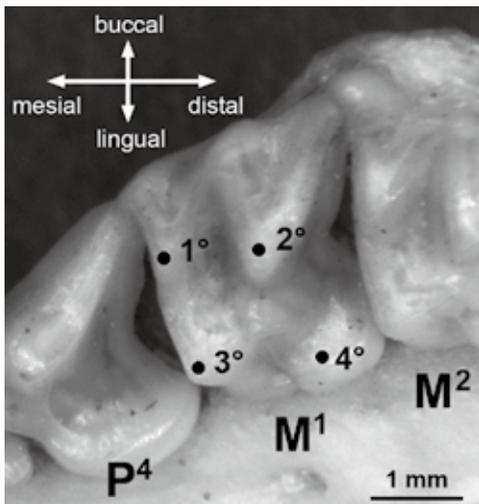


Fig. 3. The occlusal view of the upper first molar (M^1) of the house shrew, *Suncus murinus*. The major cusps of M^1 are numbered from 1° to 4° in a sequence of formation during development. These cusps are referred to as the paracone, the metacone, the protocone, and the hypocone, respectively. The numbered cusps correspond to the numbered tubercles of the dental papilla, shown in Figure 2, although cusp 4° has not yet appeared there. Directions are indicated by the crossing arrows. P⁴: the upper fourth premolar, M²: the upper second molar.

appearance (Fig. 2A'). *Shh* and *Fgf4* were both expressed in the center of the enamel organ; however, the expression domain of *Shh* was more widely distributed mesiodistally and buccolingually than that of *Fgf4* (Fig. 2B, C). Viewed from the positional relationship with the dental papilla, *Fgf4* was localized just upon the top of the hill, whereas *Shh* was spread more widely as if the top was covered with *Shh* expression (Fig. 2B', C').

At E23, the tooth germ of M^1 was in the bell stage. The enamel organ increased in size, and took on a more deeply hollow appearance (Fig. 2D). Correspondingly, the dental papilla increased in size, showing a triangular shape as a whole (Fig. 2D'). It had two large tubercles with peaks in the mesiobuccal and distobuccal corners (indicated by 1° and 2° in Fig. 2D', D''). These tubercles of the dental papilla probably correspond to the mesiobuccal cusp (1° cusp in Fig. 3, which is referred to as the paracone) and the distobuccal cusp (2° cusp in Fig. 3, which is referred to as the metacone) of the completed tooth crown of M^1 , respectively. In addition, the third faint tubercle of the dental papilla was observed in the lingual side (indicated by 3° in Fig. 2D', D''), which is probably the future mesiolingual cusp (3° cusp in Fig. 3, referred to as the protocone). Gene expression patterns were closely associated with these morphological traits. *Fgf4* was localized just upon the peaks of the mesiobuccal and distobuccal tubercles of the dental papilla (Fig. 2F–F''). On the other hand, *Shh* was widely distributed, as if covering the two large tubercles with its expression (Fig. 2E–E''). In addition, *Shh* was weakly expressed upon the third faint tubercle. However, *Fgf4* was not yet expressed there.

In summary, the present technique enabled us to visualize the precise and detailed 3-D gene expression patterns related to complicated morphological traits. We were able to detect subtle changes in gene expression that corresponded to minute morphological changes in tissues, which were in turn associated with the shape of the completed organ.

IV. Discussion and Conclusion

This study introduced a sophisticated technique for the visualization and localization of gene expression in organs or tissues with complicated morphologies, as a detailed 3-D image. As an application of this technique, we reconstructed 3-D gene expression patterns in the tooth germ during tooth

development. Through this application, we propose several advantages of the technique.

First, the present technique is not a novel one itself, but is a combination of several universally used techniques. It does not require special equipment. The necessary skills are simply sectioning of a fixed sample embedded in paraffin, section ISH, and 3-D reconstruction from serial images on a computer. The present technique could be applicable to any organs and tissues for general purposes.

Second, using this technique, we can extract any tissue structures and compare them with 3-D expression pattern of a specific gene. We can select any tissue structures which we want to reconstruct, because we pick them up on each histological section. In this study, although *Shh* and *Fgf4* are expressed within the epithelium^{12,17}, 3-D reconstruction of the dental mesenchyme with these genes clearly depicts the relationship between tooth morphogenesis and gene expression. In our previous study, we simultaneously reconstructed the dental epithelium and bone matrices of the jaw to depict their positional relationship¹¹. However, with this technique, picking up the structure on each image is extremely time-consuming and effort-intensive, which is a limitation.

Third, we are able to reconstruct 3-D tissue morphology and gene expression patterns in great detail and examine their spatial relationship with accuracy. In this study, we visualized the process of sequential cusp formation (Fig. 2A–A', D–D"). *Fgf4* showed expression domains strictly localized to the future cusp tips (Fig. 2C–C', F–F"), whereas *Shh* expression preceded the cusp formation and later spread to cover the whole area forming cusps (Fig. 2B–B', E–E"). These accurate spatial relationships between gene expression patterns and morphological features can support many inferences about gene functions, and provide sound guidelines for future studies. A few studies have been performed from such a viewpoint using gene expression patterns superimposed onto 3-D dental epithelial morphology, and have updated our knowledge on tooth development^{12–16}. The present method would provide the 3-D correlation data with much higher resolution. Although WISH enables us to detect 3-D gene expression patterns in whole embryos or explanted organs, the samples shrink and deform in the process. WISH could not deliver quality equivalent to that of the present technique^{15,16,18}.

Thus, the present 3-D method will be applicable to various organs and tissues, and can offer more precise and useful information about gene expression patterns. It will be an excellent tool to investigate the timing and location of specific gene transcription in tissues or organs, which usually have very complex 3-D morphology with different compositions.

V. References

- 1) Wilkinson, D. & Green, J. : *In situ* hybridization and the three-dimensional reconstruction of serial sections., In; Postimplantation Mammalian Embryos: A Practical Approach, A. J. Copp & D. L. Cockroft, Ed., 155–171, Oxford University Press, Oxford, 1991
- 2) Xu, Q. & Wilkinson, D. G. : *In situ* hybridization of mRNA with hapten labelled probes., In; *In Situ* Hybridization: A Practical Approach, D. G. Wilkinson, Ed., 87–106, Oxford University Press, Oxford, 1998
- 3) Nanci, A. : Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function, 7th ed., Mosby Elsevier, St. Louis, 2008
- 4) Ooe, T. : Human Tooth and Dental Arch Development. (in Japanese), Ishiyaku Publishers, Tokyo, 1968
- 5) Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J. L. & Ruch, J. V. : Multiple developmental origin of the upper incisor in mouse: histological and computer assisted 3-D-reconstruction studies. *Int. J. Dev. Biol.*, 37, 581–588, 1993
- 6) Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J. L. & Ruch, J. V. : Contribution of 3-D computer-assisted reconstructions to the study of the initial steps of mouse odontogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 39, 239–247, 1995
- 7) Peterková, R., Peterka, M., Vonesch, J. L., Turecková, J., Viriot, L., Ruch, J. V. & Lesot, H. : Correlation between apoptosis distribution and BMP-2 and BMP-4 expression in vestigial tooth primordia in mice. *Eur. J. Oral Sci.*, 106, 667–670, 1998
- 8) Peterkova, R., Hovorakova, M., Peterka, M. & Lesot, H. : Three-dimensional analysis of the early development of the dentition. *Aust. Dent. J.*, 59(Suppl 1), 55–80, 2014
- 9) Hovorakova, M., Lesot, H., Peterkova, R. & Peterka, M. : Origin of the deciduous upper lateral incisor and its clinical aspects. *J. Dent. Res.*, 85, 167–171, 2006

- 10) Yamanaka, A., Yasui, K., Sonomura, T., Iwai, H. & Uemura, M. : Development of deciduous and permanent dentitions in the upper jaw of the house shrew (*Suncus murinus*). Arch. Oral. Biol., 55, 279–287, 2010
- 11) Yamanaka, A., Iwai, H., Uemura, M. & Goto, T. : Patterning of mammalian heterodont dentition within the upper and lower jaws. Evol. Dev., in press
- 12) Jernvall, J., Kettunen, P., Karavanova, I., Martin, L. B. & Thesleff, I. : Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating *Fgf-4* gene. Int. J. Dev. Biol., 38, 463–469, 1994
- 13) Jernvall, J., Aberg, T., Kettunen, P., Keränen, S. & Thesleff, I. : The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces p21 and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. Development, 125, 161–169, 1998
- 14) Jernvall, J., Keränen, S. V. E. & Thesleff, I. : Evolutionary modification of development in mammalian teeth: quantifying gene expression patterns and topography. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 97, 14444–14448, 2000
- 15) Prochazka, J., Pantalacci, S., Churava, S., Rothova, M., Lambert, A., Lesot, H., Klein, O., Peterka, M., Laudet, V. & Peterkova, R. : Patterning by heritage in mouse molar row development. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 107, 15497–15502, 2010
- 16) Hovorakova, M., Prochazka, J., Lesot, H., Smrckova, L., Churava, S., Boran, T., Kozmik, Z., Klein, O., Peterkova, R. & Peterka, M. : *Shh* expression in a rudimentary tooth offers new insights into development of the mouse incisor. J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol., 316, 347–358, 2011
- 17) Keränen, S. V., Aberg, T., Kettunen, P., Thesleff, I. & Jernvall, J. : Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. Dev. Genes Evol., 208, 477–486, 1998
- 18) Cho, S. W., Lee, H. A., Cai, J., Lee, M. J., Kim, J. Y., Ohshima, H. & Jung, H. S. : The primary enamel knot determines the position of the first buccal cusp in developing mice molars. Differentiation, 75, 441–451, 2007

鹿児島大学歯学部発表論文 (2013年 SCI(または JCR) リスト雑誌に公表された業績 (IF2013))

1. Sonomura T, Furuta T, Nakatani I, Yamamoto Y, Unzai T, Matsuda W, Iwai H, Yamanaka A, Uemura M, Kaneko T. Correlative analysis of immunoreactivity in confocal laser-scanning microscopy and scanning electron microscopy with focused ion beam milling. *Frontiers in Neural Circuits* 2013; 7(26): 1-7. (3.333)
2. Shimotakahara R, Shimada K, Kodama K. Anatomical study on the sinuatrial nodal branch in the human coronary artery. *Anat Sci Int* 2014; 89(2): 79-84. (0.625)
3. Nakao J, Fujii Y, Kusuyama J, Bandow K, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. Low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS) inhibits LPS-induced inflammatory responses of osteoblasts through TLR4-MyD88 dissociation. *Bone*, 2014 Jan; 58: 17-25. (3.823)
4. Ohnishi T, Bandow K, Kakimoto K, Kusuyama J, Matsuguchi T. Long-Time Treatment by Low-Dose N-Acetyl-L-Cysteine Enhances Proinflammatory Cytokine Expressions in LPS-Stimulated Macrophages. *PLoS ONE* 2014; 9(2): e87229. (3.730)
5. Kusuyama T, Bandow K, Shamoto M, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. Low Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) Influences the Multilineage Differentiation of Mesenchymal Stem and Progenitor Cell Lines through ROCK-Cot/Tpl2-MEK-ERK Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 2014 Epub 2014 Feb 18 (4.651)
6. Matsui I, Hamano T, Mikami S, Inoue K, Shimomura A, Nagasawa Y, Michigami T, Ohnishi T, Fujii N, Nakano C, Kusunoki Y, Kitamura H, Iwatani H, Takabatake Y, Kaimori JY, Matsuba G, Okoshi K, Kimura-Suda H, Tsubakihara Y, Rakugi H, Isaka Y. Retention of fetuin-A in renal tubular lumen protects the kidney from nephrocalcinosis in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013; 304(6): F751-760. (3.612)
7. Ballak DB, van Essen P, van Diepen JA, Jansen H, Hijmans A, Matsuguchi T, Sparrer H, Tack CJ, Netea MG, Joosten LA, Stienstra R. MAP3K8 (TPL2/COT) affects obesity-induced adipose tissue inflammation without systemic effects in humans and in mice. *PLoS One.* 2014; 24;9(2):e89615. (3.730)
8. Li S, Sheng J, Hu JK, Yu W, Kishikawa H, Hu MG, Shima K, Wu D, Xu Z, Xin W, Sims KB, Landers JE, Brown RH Jr, Hu GF. Ribonuclease 4 protects neuron degeneration by promoting angiogenesis, neurogenesis, and neuronal survival under stress. *Angiogenesis.* 2013; 16(2): 387-404. (3.972)
9. Yamauchi M, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Liao X, Qian ZR, Nishihara R, Morikawa T, Shima K, Wu K, Giovannucci E, Meyerhardt JA, Fuchs CS, Chan AT, Ogino S. Physical Activity, Tumor PTGS2 Expression, and Survival in Patients with Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013; 22(6): 1142-52. (4.559)
10. Nishihara R, Morikawa T, Kuchiba A, Lochhead P, Yamauchi M, Liao X, Imamura Y, Nosho K, Shima K, Kawachi I, Qian ZR, Fuchs CS, Chan AT, Giovannucci E, Ogino S. A Prospective Study of Duration of Smoking Cessation and Colorectal Cancer Risk by Epigenetics-related Tumor Classification. *Am J Epidemiol.* 2013; 178(1): 84-100. (4.780)
11. Kibe T, Fuchigami T, Kishida M, Iijima M, Ishihata K, Hijioka H, Miyawaki A, Semba I, Nakamura N, Kiyono T, Kishida S. A novel ameloblastoma cell line (AM-3) secretes MMP-9 in response to Wnt-3a and induces osteoclastogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013; 115: 780-8. (1.495)
12. Kawada-Matsuo M, Yoshida Y, Zendo T, Nagao J, Oogai Y, Nakamura Y, Sonomoto K, Nakamura N, Komatsuzawa H. Three distinct two-component systems are involved in resistance to the class I bacteriocins, Nukacin ISK-1 and nisin A, in *Staphylococcus aureus*. *PLoS One.* 2013; 22:8(7): e69455. (3.730)
13. Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Zendo T, Nagao J, Shibata Y, Yamashita Y, Ogura Y, Hayashi T, Sonomoto K, Komatsuzawa H. Involvement of the novel two-component NsrRS and LcrRS systems in distinct resistance pathways against nisin A and nukacin ISK-1 in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 2013; 79(15): 4751-5. (3.678)
14. Kukita K, Kawada-Matsuo M, Oho T, Nagatomo M, Oogai Y, Hashimoto M, Suda Y, Tanaka T, Komatsuzawa H. *Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to the salivary agglutinin gp340, derived from human saliva. *Infect Immun.* 2013; 81(6): 1870-9. (4.074)

15. Shimotahira N, Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Yamada S, Fukutsuji K, Nagano K, Yoshimura F, Noguchi K, Komatsuzawa H. The surface layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial coaggregation. *Infect Immun*. 2013; 81(4): 1198-206. (4.074)
16. Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Fujita T, Iwata T, Rathvisal K, Ouhara K, Takeda K, Fujita T, Komatsuzawa H, Kurihara H. The antimicrobial peptide LL37 promotes bone regeneration in a rat calvarial bone defect. *Peptides*. 2013; 46: 136-42. (2.522)
17. Kittaka M, Shiba H, Kajiya M, Ouhara K, Takeda K, Kanbara K, Fujita T, Kawaguchi H, Komatsuzawa H, Kurihara H. Antimicrobial peptide LL37 promotes vascular endothelial growth factor-A expression in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 2013; 48(2): 228-34. (1.990)
18. Zulfiqar M, Yamaguchi T, Sato S, Oho T. Oral *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum* binds to human salivary α -amylase. *Mol Oral Microbiol* 2013; 28: 425-434. (2.648)
19. Kukita K, Kawada-Matsuo M, Oho T, Nagatomo M, Oogai Y, Hashimoto M, Suda Y, Tanaka T, Komatsuzawa H. *Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to salivary agglutinin, gp340, derived from human saliva. *Infect Immun* 2013; 81: 1870-1879. (4.074)
20. Sakaguchi K, Yagi T, Maeda A, Nagayama K, Uehara S, Saito Y, Kanematsu K, Miyawaki S. Association of problem behavior with sleep problem and gastroesophageal reflux symptoms. *Pediatr Int*. 2014 Feb; 56(1): 24-30. (0.875)
21. Yagi T, Asakawa A, Ueda H, Ikeda S, Miyawaki S, Inui A. The Role of Zinc in the Treatment of Taste Disorders. *Recent Pat Food Nutr Agric*. 2013 Apr; 5(1): 44-51.
22. Yagi T, Asakawa A, Ueda H, Miyawaki S, Inui A. The role of ghrelin in patients with functional dyspepsia and its potential clinical relevance (Review). *Int J Mol Med*. 2013 Sep; 32(3): 523-531. (1.957)
23. Ueda H, Yagi T, Amitani H, Asakawa A, Ikeda S, Miyawaki S, Inui A. The roles of salivary secretion, brain-gut peptides, and oral hygiene in obesity. *Obes Res Clin Pract*. 2013 Sep-Oct; 7(5): e321-329. (0.506)
24. Maeda A, Sakoguchi Y, Miyawaki S. Patient with oligodontia treated with a miniscrew for unilateral mesial movement of maxillary molars and alignment of an impacted third molar. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013 Sep; 144(3): 430-440. (1.458)
25. Kohjitani A, Miyawaki T, Miyawaki S, Nakamura N, Iwase Y, Nishihara K, Ohno S, Shimada M, Sugiyama K. Features of lateral cephalograms associated with difficult laryngoscopy in Japanese children undergoing oral and maxillofacial surgery. *Paediatr Anaesth*. 2013 Nov; 23(11): 994-1001. (2.436)
26. Iwasaki T, Yamasaki Y: Relation between maxillofacial form and respiratory disorders in children, *Sleep and Biological Rhythms*, 2014; 12: 2–11. (1.052)
27. Inada E, Saitoh I, Murakami D, Kubota N, Takemoto Y, Iwasaki T, Nakakura-Ohshima K, Hayasaki H, Yamasaki Y. Relationship between nasal and skeletal landmarks on lateral cephalograms of adults. *Australian Journal of Forensicscience* 2013 (accepted). (0.528)
28. Yamada-Ito C, Saitoh I, Yashiro K, Inada E, Maruyama T, Takada K, Iwasaki T, Hayasaki H, Yamasaki Y. Smoothness of Jaw Movement during Gum Chewing in Children with Primary Dentition. *Journal of Craniomandibular Practice* 2013; 31(4): 260-269. (1.111)
29. Sato M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent *in vivo* electroporation in mice. *Biotechnology Journal* 2013; 8(11): 1355-1361. (3.446)
30. Kikuchi K, Tancharoen S, Ito T, Morimoto-Yamashita Y, Miura N, Kawahara K, Maruyama I, Murai Y, Tanaka. "Potential of the Angiotensin Receptor Blockers (ARBs) Telmisartan, Irbesartan, and Candesartan for Inhibiting the HMGB1/RAGE Axis in Prevention and Acute Treatment of Stroke." *Int. J. Mol. Sci*. 2013; 14(9): 18899-18924. (2.464)
31. Shirakata Y, Takeuchi N, Yoshimoto T, Taniyama K, Noguchi K. Effects of enamel matrix derivative and basic fibroblast growth factor with β -tricalcium phosphate on periodontal regeneration in 1-wall intrabony defects: An experimental study in dogs. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2013; 33(5): 641-649. (1.081)

32. [Nakamura T](#), [Shinohara Y](#), [Momozaki S](#), [Yoshimoto T](#), [Noguchi K](#). Co-stimulation with bone morphogenetic protein-9 and FK506 induces remarkable osteoblastic differentiation in rat dedifferentiated fat cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2013; 440(2): 289-294 (2.406)
33. [Shirakata Y](#), [Nakamura T](#), [Shinohara Y](#), [Taniyama K](#), [Sakoda K](#), [Yoshimoto T](#), [Noguchi K](#). An exploratory study on the efficacy of rat dedifferentiated fat cells (rDFATs) with a poly lactic-co-glycolic acid/hydroxylapatite (PLGA/HA) composite for bone formation in a rat calvarial defect model. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25(3): 899-908 (2.141)
34. [Irish J](#), [Virdi AS](#), [Sena K](#), [McNulty MA](#), [Sumner DR](#). Implant placement increases bone remodeling transiently in a rat model. *J Orthop Res* 2013; 31(5): 800-806 (2.875)
35. [Schwarz F](#), [Mihatovic I](#), [Shirakata Y](#), [Becker J](#), [Bosshardt D](#), [Sculean A](#). Treatment of soft tissue recessions at titanium implants using a resorbable collagen matrix. A pilot study. *Clin Oral Implants Res* 2014; 25(1): 110-115. (3.433)
36. [Shirakata Y](#), [Eliezer M](#), [Nemcovsky C](#), [Weinreb M](#), [Dard M](#), [Sculean A](#), [Bosshardt D](#), [Moses O](#). Periodontal healing after application of EMD in surgical supra-infrabony periodontal defects in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Periodontal Res* 2014; 49(1): 93-101. (1.99)
37. [Murahara S](#), [Minami H](#), [Suzuki S](#), [Sakoguchi K](#), [Shiomuki D](#), [Minesaki Y](#), [Tanaka T](#). Effect of adherend temperature on bond strengths of resin bonding systems to denture base resin and a semi-precious alloy. *Dental Materials Journal* 2013; 32: 341-348. (0.809)
38. [Sakoguchi K](#), [Minami H](#), [Suzuki S](#), [Tanaka T](#). Evaluation of fracture resistance of composite crowns by cyclic impact test: Influence of indirect composite and abutment material. *Dental Materials Journal* 2013; 32: 433-440. (0.809)
39. [Shiomuki D](#), [Minami H](#), [Suzuki S](#), [Tanaka T](#). The influence of light irradiation on polymerization degree of dual-cure cement beneath restorations by measuring Vickers hardness. *Dental Materials Journal*; 32: 449-455. (0.809)
40. [Tanoue N](#), [Matsuda Y](#), [Yanagida H](#), [Matsumura H](#), [Sawase T](#). Factors affecting the bond strength of denture base and reline acrylic resins to base metal materials. *J Appl Oral Sci* 2013; 21: 320-326 (0.797).
41. [Kanie T](#), [Kadokawa A](#), [Nagata M](#), [Arikawa H](#). A comparison of stress relaxation in temporary and permanent luting cements. *J Prosthodont Res* 2013; 57: 46-50.
42. [Kukita K](#), [Kawada-Matsuo M](#), [Oho T](#), [Nagatomo M](#), [Oogai Y](#), [Hashimoto M](#), [Suda Y](#), [Tanaka T](#), [Komatsuzawa H](#). *Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to the salivary agglutinin gp340 derived from human saliva. *Infection and Immunity* 2013; 81: 1-10 (4.074).
43. [Murakami M](#), [Nishi Y](#), [Kamashita Y](#), [Nagaoka E](#). Dry mouth and denture plaque microflora in complete denture and palatal obturator prosthesis wearers. *Gerodontology* 2013; doi:10.1111/ger.12073. (1.828)
44. [Honda, KK](#), [Kawamoto T](#), [Ueda HR](#), [Nakashima A](#), [Ueshima T](#), [Yamada RG](#), [Nishimura M](#), [Oda R](#), [Nakamura S](#), [Kojima T](#), [Noshiro M](#), [Fujimoto K](#), [Hashimoto S](#), [Kato Y](#): Different Circadian Expression of Major Matrix-Related Genes in Various Types of Cartilage: Modulation by Light-Dark Conditions, *J Biochem.* 2013; 154(4): 373-381. (2.719)
45. [Mikami, S](#), [Nakashima A](#), [Nakagawa K](#), [Maruhashi T](#), [Iwamoto Y](#), [Kajikawa M](#), [Matsumoto T](#), [Kihara Y](#), [Chayama K](#), [Noma K](#), [Ochi M](#), [Nishimura M](#), [Tsuji K](#), [Kato Y](#), [Goto C](#), [Higashi Y](#): Autologous Bone-Marrow Mesenchymal Stem Cell Implantation and Endothelial Function in a Rabbit Ischemic Limb Model, *PLOSone* 2013; 8(7): e67739. (3.730)
46. [Kimori H](#), [Yamamoto K](#), [Yamachika S](#), [Tsurumoto A](#), [Kamikawa Y](#), [Sasao M](#), [Morito M](#), [Saito I](#), [Ohshima T](#), [Maeda N](#), [Nakagawa Y](#): Factors associated with the presence of atrophic tongue in patients with dry mouth. *Gerodontology* 2013 May 30. doi: 10.1111/ger.12045 (1.828)
47. [Kamikawa Y](#), [Mori Y](#), [Nagayama T](#), [Fujisaki J](#), [Hirabayashi D](#), [Sakamoto R](#), [Hamada T](#) and [Sugihara K](#): Frequency of clinically isolated strains of oral *Candida* species at Kagoshima University Hospital, Japan, and their susceptibility to antifungal drugs in 2006–2007 and 2012–2013, *BMC Oral Health* 2014; 14: 14. (1.339)
48. [Kibe T](#), [Fuchigami T](#), [Kishida M](#), [Iijima M](#), [Hijioka H](#), [Miyawaki A](#), [Senba I](#), [Kiyono T](#), [Nakamura N](#), [Kishida S](#). A novel ameloblastoma cell line (AM3) secretes MMP-9 in response to Wnt-3a and induces osteoclastogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2013; 115(6): 780-788. (1.495)
49. [Kume K](#), [Haraguchi M](#), [Hijioka H](#), [Ishida T](#), [Miyawaki A](#), [Nakamura N](#), [Ozawa M](#). The transcription factor Snail

- enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein-2. *Biochem Bioph Res Co* 2013; 430(3): 889-894. (2.406)
50. Ishida T, Hijioka H, Miyawaki A, Nakamura N. Notch signal induces EMT in oral squamous cell carcinoma under hypoxic environment. *Oncol Lett*. 2013; 6:1201-1206. (0.108)
 51. Matsunaga K, Mori K, Asamura S, Isogai N. Initial swallowing function in those undergoing subtotal mobile tongue component resection and reconstruction with a myocutaneous pectoralis major flap. *Acta Med Kinki Univ* 2013; 38(2): 1-5. (0.230)
 52. Nishihara K, Nozoe E, Maeda A, Hirahara N, Okawachi T, Miyawaki S, Nakamura N. Outcome following secondary autogenous bone grafting before and after canine eruption in patients with unilateral cleft lip and palate. *Cleft Palate-Craniofac J* 2014; 51(2): 165-171.(1.238)
 53. Sulaiman FK, I Haryanto IG, Hak S, Nakamura N, Sasaguri M, Ohishi M. 15-year follow-up results after presurgical orthopedics followed by primary correction for unilateral cleft lip nose in Program SEHAT, Indonesia. *Cleft Palate-Cran J* 2013; 50(2): 129-137. (1.238)
 54. Fuchigami T, Nakamura N, Nishihara K, Matsunaga K, Hasegawa H. Short-term molding effects on the upper alveolar arch following unilateral cleft lip repair with/without nasal vestibular expansion. *Cleft Palate-Cran J* in press.(1.238)
 55. Maeda A, Uehara S, Suga M, Nishihara K, Nakamura N, Miyawaki S. Changes in grafted autogenous bone during Edgewise treatment in patients with unilateral cleft lip/palate or alveolus. *Cleft Palate-Cran J* in press. (1.238)
 56. Kohjitani A, Miyawaki T, Miyawaki S, Nakamura N, Iwase Y, Nishihara K, Ohno S, Shimada M, Sugiyama K. Features of lateral cephalograms associated with difficult laryngoscopy in Japanese children undergoing oral and maxillofacial surgery. *Pediatr Anesth* . 2013; 23: 994-1001. (2.436)
 57. Nakao Y, Mitsuyasu T, Kawano S, Nakamura N, Kanda S, Nakamura S. Fibroblast growth factor-7 and -10 stimulate cell proliferation in ameloblastoma via mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol* 2013; 43: 1377-1384. (2.657)
 58. Morotomi T, Matsunaga K, Kusuhara H, Itani Y, Nakao H, Asamura S, Isogai N. Long-term result of a biodegradable osteo-inductive copolymer for the treatment of orbital blowout fracture. *J Cranio Maxill Surg* 2013; e-pub. (1.610)
 59. Kawada-Matsuo M, Yoshida Y, Zendo T, Nagao J, Oogai Y, Nakamura Y, Sonomoto K, Nakamura N, Komatsuzawa H. Three distinct two-component systems are involved in the resistance to class I bacteriocins, nisin A, and nukacin ISK-1 in *Staphylococcus aureus*. *Plos One* 2013; 8(7) 1-10, e69455. (3.730)
 60. Habu M, Koyama H, Kishida M, Kamino M, Iijima M, Fuchigami T, Tokimura H, Ueda M, Tokudome M, Koriyama C, Hirano H, Arita K, Kishida S. Ryk is essential for Wnt-5a-dependent invasiveness in human glioma. *J. Biochem.* 2014; 1-10. (2.719)
 61. Suzuki H, Asakawa A, Amiani H, Fujitsuka N, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia pathophysiology and translational aspect of herbal medicine. *Jpn J Clin Oncol* 2013; 43:695–705. (1.898)
 62. Suzuki H, Asanuma A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. Cancer cachexia-pathophysiology and management. *J Gastroenterol* 2013; 48(5): 574–594. (3.788)
 63. Suzuki H, Asanuma A, Amitani H, Nakamura N, Inui A. Ghrelin and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2013 ; 28:521–526. (2.939)
 64. Nakanishi-Ueda T, Majima HJ, Watanabe K, Ueda T, Indo HP, Suenaga S, Hisamitsu T, Ozawa T, Yasuhara H, Koide R. Blue LED light exposure develops intracellular reactive oxygen species, lipid peroxidation, and subsequent cellular injuries in cultured bovine retinal pigment epithelial cells. *Free Radic Res* 2013; 47: 774-780. (3.279)
 65. Tamura M, Matsui H, Tomita T, Sadakata H, Indo HP, Majima HJ, Kaneko T, Hyodo I. Mitochondrial reactive oxygen species accelerate gastric cancer cell invasion. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 54: 12-17. (2.245)
 66. Ito H, Tamura M, Matsui H, Majima HJ, Indo HP, Hyodo I. Reactive oxygen species involved cancer cellular specific 5-aminolevulinic acid uptake in gastric epithelial cells. *J Clin Biochem Nutr.* 2014; 54: 81-85. (2.245)
 67. Kohjitani A, Miyata M, Iwase Y, Ohno S, Tohya A, Manabe Y, Hashiguchi T, Sugiyama K. Associations between the autonomic nervous system and the second derivative of the finger photoplethysmogram indices. *J Atheroscler Thromb*

2014 (in press) . (2.933)

68. Sugiyama K, Manabe Y, Kohjitani A. A styletted tracheal tube with a posterior-facing bevel reduces epistaxis during nasal intubation: a randomized trial. *Can J Anaesth* 2014; 61: 417-22. (2.306)
69. Kohjitani A, Miyawaki T, Miyawaki S, Nakamura N, Iwase Y, Nishihara K, Ohno S, Shimada M, Sugiyama K. Features of lateral cephalograms associated with difficult laryngoscopy in Japanese children undergoing oral and maxillofacial surgery. *Pediatr Anesth* 2013; 23: 994-1001. (2.436)
70. Ouchi K, Koga Y, Nakao S, Sugiyama K. Dexmedetomidine dose-dependently enhances local anesthetic action of lidocaine. *J Oral Maxillofac Surg* 2014; 72: 474-80. (1.333)
71. Ouchi K, Sekine J, Koga Y, Nakao S, Sugiyama K. Establishment of an animal model of sedation using epidural anesthesia that uses the tail-flick test for evaluating local anesthetic effects in rats. *Exp Anim* 2013; 62: 137-44. (1.456)
72. Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T. Ventral medial nucleus neurons send thalamocortical afferents more widely and more preferentially to layer 1 than neurons of the ventral anterior-ventral lateral nuclear complex in the rat. *Cereb Cortex* 2014 (in press). (6.828)
73. Tomoyasu Y, Higuchi H, Mori M, Takaya K, Honda Y, Yamane A, Yabuki A, Hayashi T, Ishii-Maruhama M, Jinzenji A, Maeda S, Kohjitani A, Shimada M, Miyawaki T. Chronic orofacial pain in dental patients: retrospective investigation over 12 years. *Acta Medica Okayama* 2014 (in press) . (0.652)

編 集 後 記

歯学部紀要の第35号をお届け致します。今回は、退職、新任教員が多くおりましたので、総説掲載について色々な先生に声をかけさせて頂きました。お忙しいところ、無理を申し上げて執筆をして頂いた事に感謝申し上げます。今号にどうしても都合のつかなかった新任の先生方には、是非、次号での執筆をお願い申し上げます。また、投稿して頂いた歯科機能形態学分野については、本当に厚くお礼を申し上げます。

特集については、松口学部長にインタビューを行い、歯学部の近未来の方向性について語って頂きました。公開講座につきましては、締め切りまでに終了しておりませんでしたので、次回にまとめた掲載になると思います。学部長には、お忙しいところ、予定の時間以上のお時間を頂いた事にこの場を借りて感謝申し上げます。

(編集委員長 佐藤 友昭)

平成 27 年 3 月 25 日 印刷

平成 27 年 3 月 25 日 発行

発行所

鹿児島大学歯学部 代表 松口 徹也
鹿児島市桜ヶ丘八丁目35-1

印刷所

斯文堂株式会社
鹿児島市南栄2-12-6
電話番号 099-268-8211