

鹿児島大学歯学部紀要

Annals of Kagoshima University Dental School

Volume 23

2003

— 目 次 —

- ミュータンスレンサ球菌の歯面定着の生物化学的メカニズム 井上 昌一 ... 1
- 哺乳類の発育に伴う味蕾の成熟と分布の変化 笠原 泰夫, 原田 秀逸 ... 11
- Prevention of Muscle Necrosis Induced in Rats after Envenomation of *Trimeresurus flavoviridis*
(Amami-Oshima Island) Venom and Its Components, Phospholipase A₂ Isozymes
..... Motoo Kitano, Aichi Yoshida, Shosaku Hattori, Motonori Ohno ... 15
- 肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor)
—その発見の歴史と特に歯科医学分野での生理的意義— 大工原 恭 ... 25
- 鹿児島大学歯学部発表論文
[2001年SCI(またはJCR)リスト雑誌で公表された業績] 37

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、総説あるいは啓蒙的・解説的な論文を主体に掲載する。本学部の教官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. 和文原稿はA4版またはB5版400字詰め原稿用紙を用いて書き、英文原稿はA4版用紙に10ピッチ、ダブルスペースでタイプする。別にコピー部をつける。原稿をワープロで作成した場合は、フロッピーディスクをつける。
 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A4版タイプ用紙で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。全て図表、写真などを含めて400字詰原稿用紙5枚以内にとめる。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、鹿児島大学歯学部には帰属する。

編集委員

笠原 泰夫 長岡 英一
西川 殷維 山崎 要一
(50音順)

ミュータンスレンサ球菌の歯面定着の生物化学的メカニズム

井上 昌一

鹿児島大学歯学部予防歯科学講座

はじめに

主要な齲蝕原因菌であるミュータンスレンサ球菌 (mutans streptococci: 現在7菌種8血清型があるが, “*Streptococcus mutans*” と総称されることがある) は, スクロース (あるいは砂糖) との関わりにおいて, 他の口腔微生物にはみられない特徴的な様態を示す¹⁻³⁾。

すなわち, 構成酵素として保有するグルコシルトランスフェラーゼ (以下GTaseと略す) の作用によってスクロースから菌体外に特異な水溶性および非水溶性のグルカン (グルコース重合体) を合成する。何れも, 自身あるいはその他の口腔細菌の菌体を凝集する活性を有し, それらの歯面への付着 (cell-to-surface adherence) と歯垢への参入と蓄積 (cell-to-cell adherence) を助ける。また, 非水溶性のグルカンは, きわめて粘着性に富み, 細菌細胞の歯面への強固な付着を促す。さらには, 歯面に定着した種々の細菌が糖質代謝の結果排泄した有機酸が唾液中へ拡散するのを妨げるバリアーとしても働き, 歯垢内の酸の蓄積を促進する。このように, ヒトの歯垢マトリックスの構成成分の一つとして存在する^{4, 5)}, mutans streptococci が合成するグルカンは, 歯垢の形成と歯質の溶解に密接に関与しており, 現在, この齲蝕原因菌の主要なビルレンス因子は, 菌体外多糖類, ことに粘着性の非水溶性グルカンの合成能に求められている。

本稿では, mutans streptococci の齲蝕原性の発現に深く関わっている粘着性グルカンの合成能, 化学構造, 微細形態および生合成のシステムについて, ヒトの口腔において多勢を占める *Streptococcus mutans* と非水溶性グルカン合成能が高い *Streptococcus sobrinus* の場合を中心に述べる。

I. Mutans Streptococciの産生するグルカン

Mutans streptococci は, スクロース培地で培養すると菌体外水溶性と菌体結合性アルカリ可溶性のグルカン (ESG, CA-ISG) を, またグルコース培養して得

られた菌体外GTaseをスクロースと反応させると水溶性と非水溶性のグルカン (SG, ISG) を合成する。

1. グルカン合成能と一般性状

Mutans streptococci の各菌種はグルカンの合成に明瞭な違いがある⁶⁻¹⁰⁾ (表1)。スクロース寒天平板培地上でのコロニーの形態的特徴が端的に示すように, 菌体外GTaseが合成したグルカン (SGとISGが混在) は, *S. mutans* (c, e, f型菌) と *S. rattus* (b型菌) では反応液が一樣に混濁するのに対して, *S. sobrinus* (d, g型菌) と *S. cricetus* (a型菌) では顆粒状に凝集して管底に沈殿する傾向にある。これに対応して, 前者に比べて, 後者では水に不溶性の画分 (CA-ISGおよびISG) の合成量の割合が高く, 斜めに保った試験管のガラス壁に強固に粘着するグルカン (主にISG) の量も極めて多い。

生物化学的性状¹⁰⁻¹³⁾ においても (表2), *S. sobrinus* の産生するISGは, *S. mutans* のものに比べて, 高分子量画分を多く含み, 固有粘度が高く, エンド- α -1, 3グルカナーゼ (ムタナーゼ) 感受性は高く, “*S. mutans*” 菌体凝集活性は低い。一方, SGの性状の多くは, 両菌種間にそれほど明瞭な違いがないが, *S. sobrinus* のSGはエンド- α -1, 6グルカナーゼ (デキストラナーゼ) 感受性および “*S. mutans*” 菌体凝集価が低い傾向がある。*S. cricetus* が産生するグルカンは殆どの性状が *S. sobrinus* のものに, *S. rattus* のグルカンは *S. mutans* のものに類似するが, ときにこれを外れる場合がある。

また, グルカナーゼ感受性^{6, 14-17)} (表2) や化学結合分析¹⁰⁾ (表3) の結果が示すように, 水に可溶性のグルカン (ESG, SG) は, α -1, 6グルコシド結合を主体に, α -1, 3結合を含み, 水に不溶性のもの (CA-ISG, ISG) は, 主に α -1, 3結合から構成されている。何れもかなりの α -1, 3, 6分枝を含む。ESGとSGで分岐度が高い傾向にある。

表1 Mutans Streptococciの各菌種のグルカン合成能

菌種	血清型	菌株	グルカン合成量 (比)		菌体外GTaseによって合成された	
			スクロース培養時の CA-ISG/ESG* ¹	菌体外GTaseによる ISG/SG* ²	壁付着グルカン量* ² (mg/ml)	全グルカン液の 肉眼像* ²
<i>S. mutans</i>						
<i>c</i>		OMZ 70	0.83	0.47	0.01	均一混濁
		Ingbritt	0.44	0.27	—	〃
<i>e</i>		B 14	0.33	0.21	0.04	均一混濁
		LM 7	0.67	0.43	—	〃
<i>f</i>		OMZ 175	0.36	0.17	0.02	均一混濁
		MT 3940	1.00	0.08	—	〃
<i>S. rattus</i>						
<i>b</i>		BHT	1.50	0.39	0.02	均一混濁
		FA-1	1.10	0.08	—	〃
<i>S. sobrinus</i>						
<i>d</i>		OMZ 176	2.50	1.10	5.11	顆粒状
		P 1	—	2.80	—	〃
<i>g</i>		AHT	5.50	2.00	5.97	顆粒状
		6715	5.10	1.50	—	〃
		KI-R	9.20	3.10	—	〃
<i>S. cricetus</i>						
<i>a</i>		HS-6	3.50	2.00	4.86	顆粒状
		HS-1	1.20	5.90	—	〃

*¹: スクロース培養時の合成: CA-ISG (菌体結合性・アルカリ可溶性画分), ESG (菌体外水溶性画分)⁹⁾*²: 菌体外GTaseによる合成: ISG (非水溶性画分), SG (水溶性画分)¹⁰⁾

表2 菌体外GTaseによって合成された水溶性および非水溶性グルカンの物理化学的性状*

菌種	血清型	菌株	非水溶性グルカン (ISG)				水溶性グルカン (SG)					
			グルカナゼ感受性**		固有感度 (η)	分子量分布 (Mw>30万) (%)	“ <i>S. mutans</i> ” 菌体凝集力 (相対度)	グルカナゼ感受性**		固有感度 (η)	分子量分布 (Mw>30万) (%)	“ <i>S. mutans</i> ” 菌体凝集力 (相対度)
エンド-1, 6- グルカナゼ	エンド-1, 3- グルカナゼ	エンド-1, 6- グルカナゼ	エンド-1, 3- グルカナゼ									
<i>S. mutans</i>												
<i>c</i>		OMZ 70	高	低	1.42	67.6	強	高	非	0.27	22.6	強
		<i>e</i>	B 14	高	低	1.38	60.2	強	高	非	0.50	34.7
<i>f</i>		OMZ 175	高	低	1.42	49.4	強	高	非	0.85	49.9	強
<i>S. rattus</i>												
<i>b</i>		BHT	高	低	2.33	82.1	強	高	非	0.54	66.5	強
<i>S. sobrinus</i>												
<i>d</i>		OMZ 176	低	高	2.12	85.7	弱	低	非	0.08	3.6	弱
<i>g</i>		AHT	低	高	3.88	96.2	弱	低	非	1.10	30.5	弱
<i>S. cricetus</i>												
<i>a</i>		HS-1	低	低	1.93	77.6	強	高	非	0.70	22.2	弱

*: Yakushiji, Inoue & Koga¹⁰⁾

**: ISGあるいはSGのそれぞれにおける相対度

SGには、各グルコシド結合含量の構成にも各菌種間に明確な差はない。一方、ISGの α -1, 3結合含量は*S. sobrinus*のほか*S. mutans* (特に*c*型菌) や*S. rattus*のものでも高い。一般に、*S. mutans*と*S. rattus*のISGは α -1, 6結合含量も高く、*S. cricetus*のものは他になく

α -1, 3, 6分岐に富む。また、 α -1, 6に対する α -1, 3結合残基量の比率は、*S. sobrinus*のISGは総じて高く、*S. mutans*など他の3菌種のものでは全て低い。

表3 菌体外粗GTaseによって合成されたグルカンのグルコシド結合分析*

菌種血清型	菌株	O-methyl-D-glucose (モル%)									
		非水溶性グルカン (ISG)					水溶性グルカン (SG)				
		2,4,6-トリ-	2,3,4-トリ-	2,4-ジ-	2,3,4,6-テトラ-	2,4,6-/2,3,4-比	2,4,6-トリ-	2,3,4-トリ-	2,4-ジ-	2,3,4,6-テトラ-	2,4,6-/2,3,4-比
<i>S. mutans</i>											
<i>c</i>	OMZ70	57	31	5	8	1.82	3	63	13	20	0.05
	Ingbritt	46	36	6	12	1.27	6	58	17	20	0.10
<i>e</i>	B14	27	47	15	11	0.58	5	57	16	22	0.08
	P4	26	41	11	22	0.63	11	54	18	17	0.20
<i>f</i>	OMZ175	35	41	9	14	0.85	17	53	12	19	0.32
	MT3940	60	26	6	7	2.32	19	49	10	23	0.38
<i>S. rattus</i>											
<i>b</i>	BHT	41	40	9	10	1.05	10	58	15	18	0.17
	FA1	56	34	2	8	1.63	1	63	16	21	0.01
<i>S. sobrinus</i>											
<i>d</i>	OMZ176	61	15	12	12	4.03	4	76	7	13	0.05
	P1	48	16	16	20	2.98	17	48	16	19	0.36
<i>g</i>	AHT	55	15	14	16	3.55	9	58	15	19	0.15
	6715	66	15	8	11	4.53	15	34	18	33	0.43
<i>S. cricetus</i>											
<i>a</i>	HS1	41	15	22	23	2.83	1	51	22	26	0.02
	FIL	26	24	20	30	1.06	2	60	15	22	0.04

*: Yakushiji, Inoue & Koga¹⁹⁾

表4 *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株のGTaseによってデキストラナーゼあるいは低分子デキストランの存在下に合成されたISGの性状*

ISG合成時の添加物	合成量 (相対度) %	付着量 (相対度) %	スミス分解 (グルコース) mol %	固有粘度 η	分子量分布 (Mw>30万) (%)	" <i>S. mutans</i> " 菌体凝集価 希釈倍数
なし	100	100	55-66	1.3-2.5	72-91	16-64
Dextranase (180 mU/ml)	40	8	87-91	0.4-0.7	16-20	- 1
Dextran T20 (13.4 mg/ml)	25	9	47-56	0.3-0.5	43-54	512-

*: Koga & Inoue²⁷⁾, Sato *et al.*²⁸⁾

2. グルカンの化学構造

Mutans streptococciの産生するグルカンの二次構造は、*S. sobrinus*, ことにOMZ 176株のSGとISGについて^{18, 19)}, 詳細な検討がなされている。

1) 水溶性グルカン

*S. sobrinus*など各菌種のスクロース培養菌あるいは菌体外GTaseによって合成された水溶性グルカン (ESGとSG)^{6, 17)}あるいは代表菌株の精製GTase-Sが合成する水溶性のisozyme-SG^{18, 21)} (表5参照)は、主に α -1, 6グルコシド結合からなり(約50%~), エンド型デキストラナーゼに分解されるがエキソ型デキストラナーゼの作用は受けない(表2, 3)。これらを基に、*S. sobrinus* OMZ 176 (*d*型) 株などのmutans streptococciのSGは、 α -1, 6結合直鎖を主鎖とし、そのかなりの

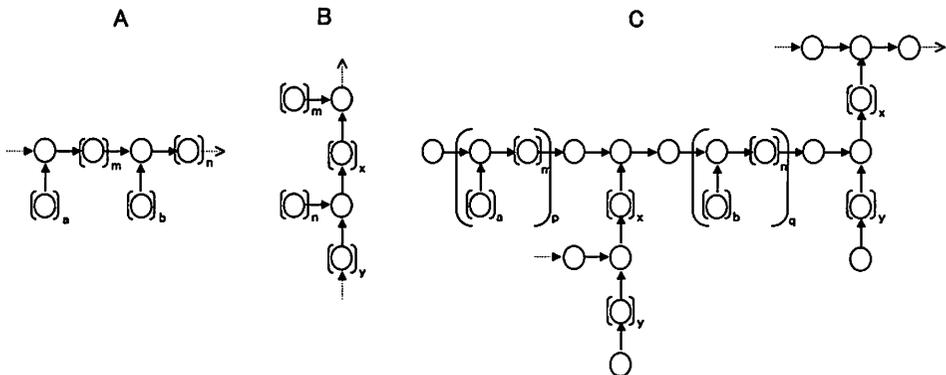
グルコース残基(約半数あるいはそれ以下)から短い α -1, 3結合側鎖が分岐していると推定されている(図1-A)。

2) 非水溶性グルカン

一方、OMZ 176株の菌体外GTaseによって合成されたISGは、 α -1, 3結合グルコース残基(61モル%)を主体にして α -1, 6結合残基(15%)を含む分枝型グルカンである(α -1, 3, 6分枝結合と α -1, 末端は各12%;表3)。その緩和スミス分解後にも残る(約6割強)水になお不溶の部分は、エンド型ムタナーゼによく分解され、ほとんどが α -1, 3グルコシド結合(95%)からなることから、分枝にあずからない α -1, 3結合グルコース残基は比較的長い直鎖を形成して存在する。エンド型デキストラナーゼ存在下に合成させ

表5 *S. sobrinus* OMZ176 (*d*型) 株のGTase標品によって合成された非水溶性および水溶性グルカンのグルコシド結合分析

グルカン標品	(用いた酵素標品の標記号) (量比)	O-メチル-D-グルコース (モル%)				
		2,4,6-トリ-	2,3,4-トリ-	2,4-ジ-	2,3,4,6-テトラ-	2,4,6-/2,3,4-比
粗GTaseが合成した非水溶性グルカン						
ISG* ¹	(crude GTase)	51	21	14	15	2.43
ISG* ²	(CEF)	57	18	10	15	3.17
ISG* ³	(crude GTase)	61	15	12	12	4.07
GTase-Sが合成した水溶性グルカン						
isozyme-SG* ²	(GTF-S)	0	31	32	37	<0.01
isozyme-SG* ³	(GTase-S)	28	56	5	12	0.50
GTase-Iが合成した非水溶性グルカン						
isozyme-ISG* ²	(GTF-I)	88	7	1	4	12.7
isozyme-ISG* ³	(GTase-I)	90	4	2	4	22.5
Dextranaseで修飾した非水溶性グルカン						
dextranase-modified ISG* ¹		95	2	2	2	47.5
GTase-SとGTase-Iが協同して合成した非水溶性グルカン						
isozyme-SG/-ISG* ⁴	S/I : 0.6	73	19	4	4	3.93
isozyme-SG/-ISG* ⁴	S/I : 1.5	66	27	2	6	2.47
isozyme-SG* ¹	S/I : ∞	29	55	5	11	0.53
isozyme-ISG* ¹	S/I : 0	92	2	2	4	57.8

*¹: Ebisu *et al.*¹⁸⁾ *²: Hare, Svensson & Walker¹⁹⁾ *³: Koga *et al.*²¹⁾ *⁴: Inoue & Yakushiji³⁰⁾図1 *Mutans streptococci*の産生する水溶液および非水溶性グルカンの推定化学構造

A: 水溶性グルカン (SG) の基本構造

B: 非水溶性グルカン (ISG) の樹状構造 (Ebisuら¹⁸⁾ より改変)*S. sobrinus* OMZ176 (*d*型) 株では $x+y=7$, $m+n=3$, $m=0\sim3$ C: 非水溶性グルカン (ISG) の樹状構造 (Hareら¹⁹⁾ より改変)*S. sobrinus* (*d, g*型) 菌では $x+y > p+q$, $m, n=1$ ↑: α -1, 3 グルコシド結合 →: α -1, 6 グルコシド結合

た水に不溶のISG画分あるいは単離されたGTase-Iが合成するisozyme-ISGはいずれも、 α -1, 3結合よりなること (87~95%; 表4, 5 参照) もこれを支持する。さらに、エキソ型およびエンド型デキストラナーゼによってほとんど分解されないこと、僅かに生じた少量

の分解産物に α -1, 6結合に加えて α -1, 3結合が存在することから、 α -1, 6結合鎖が3位の炭素から枝分れしていると思われる。

これらの成績から、*S. sobrinus* OMZ 176株の産生するISGは、 α -1, 3結合したグルコース残基の直鎖を骨

格（主鎖）とし、その一部のグルコース残基の6位の炭素から比較的短い α -1, 6結合した側鎖が高度に分枝する「櫛状構造」¹⁸⁾、あるいは、長めの α -1, 3結合直鎖と比較的短い α -1, 6結合直鎖が、 α -1, 3, 6分岐を介して次々に枝別れしている「樹状構造」¹⁹⁾をとるものと想定されている（図1-B, -C）。

この菌株のISGについて導かれた二次構造（図1-C）を基に、メチル化分析の成績¹⁰⁾（表3）から推定すると、*S. sobrinus*のISGは α -1, 3結合鎖が α -1, 6結合鎖に比べて比較的長く（ $x+y/p+q$ 比=3.0~4.5）、*S. mutans*のものでは両鎖の長さの差は縮まり（*c*型菌で1.3~1.8）、しばしばほぼ同じか短い（*e*, *f*型菌で0.6~0.9）。*S. cricetus*と*S. rattus*のもの（1.1~1.6）は一部の場合（2.7）を除き*S. mutans*（*c*型菌）に近い。

II. グルカンの微細形態

スクロース培養すると、*mutans streptococci*の菌体は試験管壁や培養液に浸漬したエナメル小片の表面に付着する。走査型電子顕微鏡下に観察すると、増殖菌体が、自身が産生したグルカンと思われる水糊状の夾膜様物質に埋没したり、交錯する太さ不定の帯状・糸状物の網目によって互いに連結されて付着しているのがみられる¹⁶⁾。また、グルカンは、大小の回転楕円体様の粒状物が数珠様に連なる様相（beaded fiber）を呈するという。

1. “globular, fibrillar, amorphous particle” グルカン

透過型電子顕微鏡下に観察すると、スクロース培養した*S. sobrinus*や*S. mutans*の産生するグルカンには、形態の異なる3種の構造物がみられる^{14, 22, 23)}。1つは一般に均一無構造の“globular（球状）”の形態を示すもの、第2は幅約2 nmの“原繊維”が2本平行しているかのように観察される“fibrillar（繊維状）”のもの、第3は高度に濃染性の“amorphous particle（不定形の小粒状）”のものである。

このうち、“globular”グルカンはデキストラナーゼにより分解され、またガラス壁付着能を失った突然変異株の産生するグルカンはこの形態の水溶性のもののみであった^{25, 26)}ことから、“globular”グルカンは主に α -1, 6結合からなり、一方“fibrillar”グルカンは α -1, 3結合が主体の非水溶性のものであると推定されている。

2. 2種類の繊維状グルカン

グルコース培養した*S. sobrinus* AHTの菌体細胞（菌

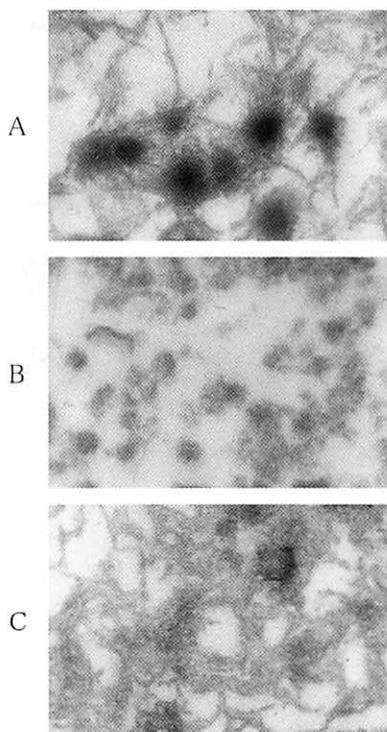


図2 *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株の菌体外粗GTaseによって合成された非水溶性および水溶性グルカンの微細形態²⁵⁾

- A：全グルカン。2種類の繊維状グルカンが存在する。1つは周囲に短い突出繊維をもつ、常に平行している2本鎖状繊維、他は1本鎖細繊維である。（図3-A, -B参照）
- B：水溶性グルカン画分（SG）。Aに認められたのと基本的に同じ1本鎖細繊維のみからなる。多くは互いに交叉して細かい網目構造を形成している。星芒様の濃染部分は、エタノール沈殿操作に伴い、この繊維が密に集合した塊と思われる。（図5-B参照）
- C：非水溶性グルカン画分（ISG）。Aに示したのと同じ形態の特徴をもつ2種類の繊維状グルカンが存在する。粘着性ISG。
ルテニウム・レッド染色 ×2万倍

体結合性GTaseを有する）あるいは菌体外GTaseをスクロースと反応させると、“globular”と“fibrillar”なものに相当する2種類の繊維状構造物が、透過型電子顕微鏡下に観察される^{24, 25)}（図2-A, 図3）。（なお、“amorphous particle”^{14, 23)}に相当すると思われる構造物は特定できていない）。

1つは、ISGに固有のもので、濃染性の2本の“骨格繊維”が平行して走る像を示し、その周囲からは綿毛様の短い繊維が突出している（図2-C, 3-A, -B）。

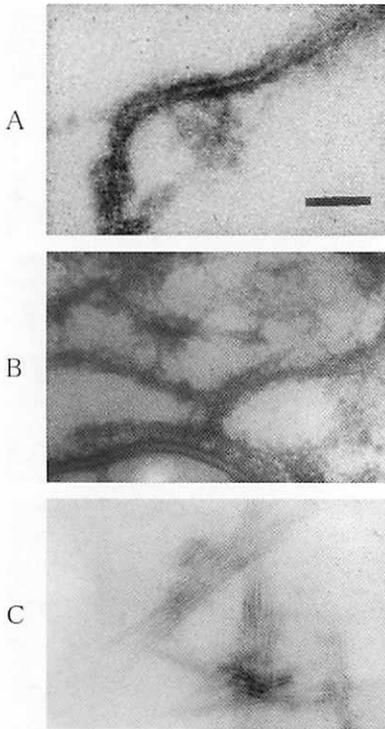


図3 *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株の菌体結合性GTaseによって合成されたグルカンの強拡大図²⁴⁾

- A: 2本鎖状繊維の強拡大。常に平行して走る2本の原繊維からなり、原繊維の周囲から短い綿毛様繊維が突出している。原繊維の幅は約4nm, 2本鎖全体の厚みは12nm。スケール: 0.05 μ m
- B: 2本鎖状繊維とは離れて1本鎖細繊維のみが個別に存在している。2本鎖状繊維の周辺突出繊維あるいは1本鎖細繊維が菌体表層“fuzzy coat”と結合していることにも注目。
- C: デキストラナーゼ存在下に合成されたグルカン。2本鎖状繊維は周囲の綿毛様突出繊維を失い、骨格繊維(幅は約2.5nm)のみが認められる。1本鎖細繊維とその網目構造物は存在しない。(図5-A参照) ルテニウム・レッド染色

1本の繊維の幅は約4nm, 2本鎖全体の厚みは12nmである。2本の骨格繊維は、ほぼ等間隔で平行配列しており交叉による繕れはないことから、1本の糖鎖が周密なラセン状をなしており、見掛け上は2本鎖様を示すものと推察される。“fibrillar”グルカンと基本的に同じ形態である。

他の1つは、淡染性の1本鎖の細繊維(幅は約2nm)で、通常は互いに交叉して細かな網目状の構造を示す(図3-B)。また、この細繊維とその網目構造物は隣在の2本鎖状繊維とからみ合い、粗な網状の凝集塊を

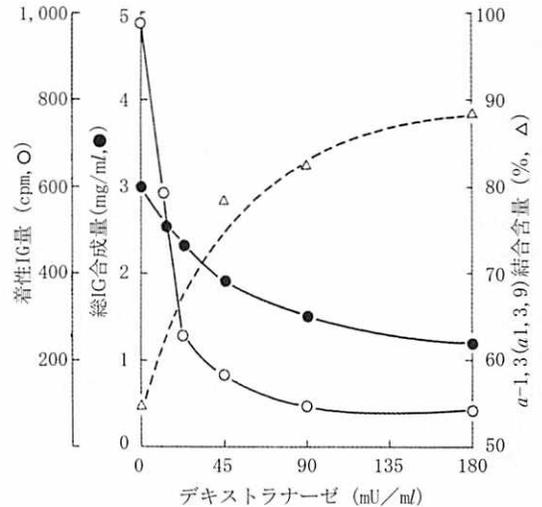


図4 エンド型デキストラナーゼの共存下における *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株の菌体外GTaseによる粘着性非水溶性グルカンの合成抑制²⁷⁾
5%スクロース, 0.1Mリン酸緩衝液pH6.0, 37 $^{\circ}$ C 18時間

形成している。“globular”グルカンに相当する。

一方、SGは、ISGにみられるのと同じ形態の1本鎖細繊維のみからなる(図2-B)。互いにかみ合って微細な網目を形成しており、ときに密集してルテニウムレッド濃染性の星芒状の塊を形成している。水溶性グルカンのみを合成するGTase-Sが合成したisozyme-SGも、同じ形態の1本鎖細繊維のみからなる(図5参照)。

ところで、ISGには、2本鎖状繊維構造が多量に局在する部位と1本鎖細繊維構造が支配的である部位とがみられ、必ずしも全視野にわたって均質な構造物が均等に分布していない²⁵⁾(図2-B)。事実、粗GTaseによって合成されたISG画分からさらに水に可溶性の副画分が得られることがあり、またCA-ISGは分子量の異なるいくつかの副画分に分けられる^{8, 26)}。したがって、mutans streptococciの合成する非水溶性グルカン画分は、 α -1,3結合で連なるグルコース残基の直鎖から α -1,6結合の分岐鎖をもつ(2本鎖状繊維を示す)ものと、 α -1,6結合で連なる直鎖から α -1,3結合の分岐鎖をもつ(1本鎖繊維状を示す)ものとの、化学構造の異なる2種類の分子が混在するものと考えられる。

3. 繊維状グルカン成分の機能

菌体外GTaseにより合成されるISGのガラス壁への

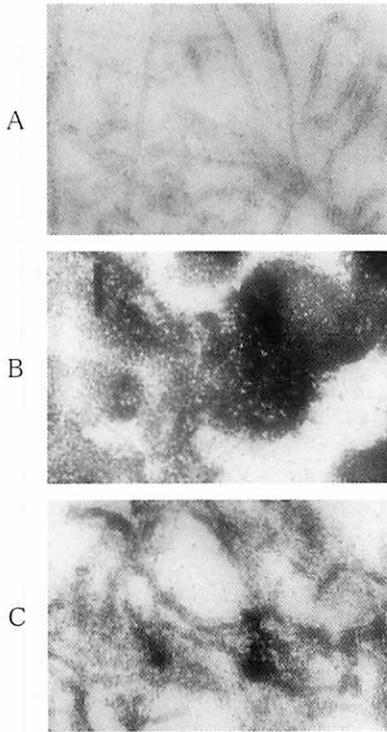


図5 *S. sobrinus* OMZ176 (*d*型) 株のGTase-IおよびGTase-Sによって合成されたグルカンの微細形態²⁰⁾
 A: GTase-Iによって合成されたisozyme-ISG。周囲に突出物のない2本鎖を示す骨格繊維のみからなる。非水溶性、粘着性を欠く。(図3-C参照)
 B: GTase-Sによって合成されたisozyme-SG。きわめて密な集合塊を形成していて鮮明ではないが、1本鎖細繊維のみからなる。(図2-B参照)
 C: GTase-IおよびGTase-Sの相互作用によって合成された粘着性非水溶性グルカン。2本鎖状繊維は短い周辺突出小繊維を回復し、1本鎖細繊維と絡み合っている。(図2-A, -C参照)
 アルカリ・ビスマス染色 ×5万倍

付着(表1参照)は、ムタナーゼ¹²⁾あるいはデキストラナーゼ²⁷⁾の共存によって抑制される。*S. sobrinus* AHT株のGTaseによるISGのガラス壁付着量は、エンド型デキストラナーゼが低濃度存在しても著しく低下する²⁷⁾(図4)。ISGの合成自体も添加量に応じて抑制されるが、その程度はグルカン付着量ほどには著しくない。この時の合成ISGは、固有粘度が低く低分子化しており、水に不溶性のままであるが軽く振盪すると容易に均一に分散する。“*S. mutans*”菌体凝集能もほとんどない^{27, 28)}(表4)。この付着性を欠くISGは、直線的に平行する2本鎖状の骨格繊維のみから構成され、周辺の突出細繊維を失って輪郭が明瞭になり、均一な幅約2.5nmを示す²⁴⁾(図3-C)。1本鎖細繊維とその網

目構造は認められない。したがって、構成グルコース残基のほとんど(94%以上¹⁸⁾)は α -1, 3結合していると考えられる。

同様に、低分子のdextran T20などを相当量共存させても、ISGの合成と付着が抑制される。生成産物は、低粘度、低分子であり、2本鎖状繊維のみからなる²⁸⁾(表4)。

III. 粘着性グルカンの生合成

これらの特徴的な化学構造と形態をもつmutans streptococciの粘着性グルカンの合成機序について、幾つかの菌株の菌体外GTaseを用いて酵素学的検討がなされてきた^{19, 21)}。

1. GTase-IとGTase-Sの分離と性状

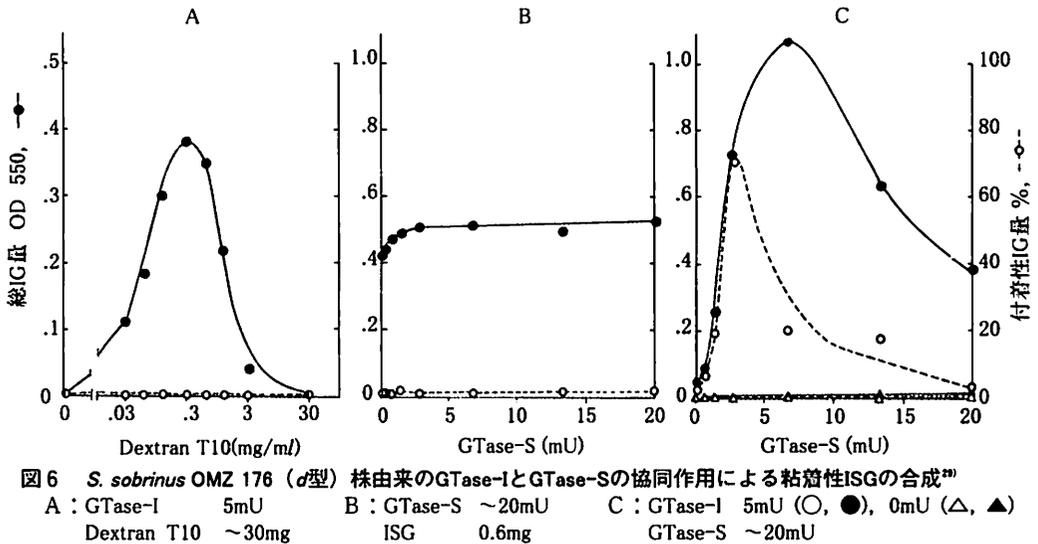
筆者らは、*S. sobrinus* AHTあるいはOMZ 176株の菌体外GTase標品から、それぞれにSGおよびISGのみを合成する2つの酵素画分(GTase-SおよびGTase-I)を分離精製した²¹⁾。

GTase-Sは、スクロースから水溶性グルカン(SG)のみを合成した。一方GTase-Iは、短時間ではほとんどグルカンを生成しないが、きわめて長時間反応させると有意の量の非水溶性グルカン(ISG)を合成した。また、GTase-Sとは異なり、その活性は、水溶性dextran T10などの添加により著しく増強され、高いプライマー依存性を示した^{21, 29)}。

GTase-Sが合成したSGは、主に α -1, 6結合グルコース残基(56%)からなるが、相当量の α -1, 3結合と α -1, 3, 6分岐を含んでいる^{21, 30)}(表5)。また、粗GTaseが合成したSG画分(図2-B)と同様、1本鎖細繊維と、それらが網目状を形成する像を示す(図5-B)。一方、GTase-Iがprimer dextran非添加の下に長時間の後に合成したISGは、大部分(90%)が α -1, 3結合グルコース残基からなり、ほとんど分岐のない α -1, 3結合直鎖を構成していた。この非水溶性産物は、エンド型デキストラナーゼの共存下に粗GTaseによって合成された非粘着性IG(図3-C)に酷似して、水に容易に分散し、ガラス壁への付着性を全く欠いており²⁹⁾、2本鎖状の骨格繊維のみからなる³¹⁾(図5-A)。

2. 粘着性IGの再構成

プライマーの添加によるGTase-IによるISG合成の増強の程度は、dextran T10の増量とともに増大し、ピークに達したのち低下する²⁷⁾(図6-A)。しかし、この時に合成されたISGは、たとえ合成量が最大の時にも



水に容易に分散し、ガラス壁への付着性がない。また、あらかじめ調製しておいたISG標品をGTase-SによるSG合成時に共存させても、ISG分子はガラス壁に全く付着しない(図6-B)。

そこで、粘着性ISGの再構成を試すため、GTase-IとGTase-Sとの量比を変えてISGの合成量と管壁付着量を追ってみると、GTase-Sの増量とともにISGの合成量は急激に高まり、GTase-Iに対するGTase-Sの割合が1.5近辺で最大となり、その後速やかに低下した。この時合成されたISGはガラス壁への付着能を獲得したが、付着量はGTase-S/GTase-I比が0.6の時に最大であり、総ISG合成量のそれとは一致しない(図6-C)。生じた粘着性ISGは、 α -1, 3結合を70%強、 α -1, 6結合を約20%含んでいる^{28, 30)}(表5)。また、粗GTaseが合成する粘着性ISGの形態的特徴(図2参照)を備えており、周囲に短い突出繊維をもつ2本鎖状繊維と1本鎖細繊維とが複雑に混在している³²⁾(図5-C)。

ところで、GTase-IとGTase-Sの協同作用による粘着性ISG合成は、プライマー変量時のGTase-IによるISG合成に酷似した山型のプロフィールを示す^{29, 31)}(図6-C, -A)。GTase-Sの活性はプライマー非依存性であること^{21, 29)}を考えると、mutans streptococciの菌体外GTaseによる粘着性ISGの合成には、GTase-Sによる α -1, 6結合に富むSGの合成が先行して、GTase-IによるISGの合成を促す、つまり自己プライマー効果^{31, 33)}が働いているものと考えられる。ISGの合成反応には通常lagが認められている^{28, 34)}。

以上のことから、GTase-Iによる α -1, 3結合よりな

るISGの迅速な合成は、GTase-Sによる α -1, 6結合を主とするSGの合成がプライムすること、そうして合成されたISGが粘着性、付着性を得るには、GTase-SとGTase-Iが適切な割合で作用する必要があること、また、その*de novo*の合成が必須であることがわかる。

IV. おわりに

以上、主に*S. sobrinus*と*S. mutans*の場合を中心に齶蝕原性レンサ球菌による粘着性グルカンの合成能、化学構造と微細形態、合成機序について述べた。

mutans streptococciの各菌株は、非水溶性および水溶性のグルカン(ISGとSG)、特に前者の合成能に違いはあるが、何れにも共通して形態と構造が異なる2種類のグルカンを産生する。1つは、約4nm幅の骨格繊維が平行して2本鎖状の像を呈する、 α -1, 3結合直鎖を主鎖とし、周囲に短い α -1, 6結合側鎖をもつ。他は、約2nm幅の1本鎖の細繊維のもので、 α -1, 6結合主鎖と α -1, 3結合側鎖よりなる。それぞれISGおよびSGを特徴づけるものであるが、いわゆる粘着性グルカンには、常にこれら2種類の構造物が混在している。 α -1, 3結合鎖がISGの水不溶性を担っており、 α -1, 6結合鎖がISGの固相表面への粘着能およびISGとSGの“*S. mutans*”菌体凝集能を発揮する。

因に、ヒトの歯垢の菌体間マトリックスの基本成分として、mutans streptococciなどの口腔細菌が産生する多糖類が歯垢重量の約10%を占めている^{5, 35)}。また、歯垢マトリックスには、多糖類染色に染まる“fibrillar”構造物とそのフェルト様集塊¹⁾あるいは些か細めと粗

い太めの2種の繊維状構造物³⁶⁾など、mutans streptococciが産生する1本鎖細繊維状あるいは2本鎖繊維状のグルカンに形態が酷似のものの存在が観察されている。

mutans streptococciの菌面への強固な付着には、次のような粘着性ISGの合成機序が働いている。すなわち、その合成には、 α -1, 3および α -1, 6グルコシド結合の形成を触媒する2種類の酵素が関与する。後者による α -1, 6鎖の合成が先行して、前者による α -1, 3鎖の迅速な合成を誘導する。また、合成ISGが粘着性を発揮するには、適切な α -1, 3/ α -1, 6結合比率をもっている必要があること、そのようなISGの*de novo*の合成が菌面の*in situ*において生じることが必須である。さらに、ISG合成に伴って進行するSG合成と相俟って、粘着性グルカン産物には、両者をそれぞれに特徴づける2種類の繊維状グルカンが共存している。この結論は、 α -1, 3グルカナーゼ（ムタナーゼ）のみならず α -1, 6グルカナーゼ（デキストラナーゼ）の口腔内投与も歯垢形成の抑制に有効であるという、ヒトやゲツ菌類での*in vivo*研究の成績³⁷⁾をよく支持する。

文 献

- 1) Guggenheim, B.: Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.* 20: 657-678, 1970.
- 2) Gibbons, R.J. & van Houte, J.: Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 19-44, 1975.
- 3) Hamada, S. & Slade, H.D.: Mechanisms of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces *in vitro*. E.H. Beachey (ed.): *Bacterial Adherence*, pp.106-135, Chapman and Hall, London, 1980.
- 4) Schroeder, H.E. & de Boever, J.: The structure of microbial dental plaque. W.D. McHugh (ed.): *Dental plaque*, 49-74, E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970.
- 5) Hotz, P., Guggenheim, B. & Schmit, R.: Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.* 6: 103-121, 1972.
- 6) Ellwood, D.C., Baird, J.K., Hunter, J.R. & Longyear, V.M.C.: Variations in surface polymers of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 55C: 42-49, 1976.
- 7) Trautner, K., Felgenhauer, B. & Rieder, H.: Extracellular polysaccharide synthesized by the oral bacterium *Streptococcus mutans* of serotype a to e *in vitro*. *Arch. Oral Biol.*, 26: 1005-1013, 1981.
- 8) Inoue, M. & Koga, T.: Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 25: 922-931, 1979.
- 9) Inoue, M., Shibata, H., & Morioka, T.: Serotype specificity for some biochemical characteristics of *Streptococcus mutans*. *Microbios*, 33: 7-14, 1982.
- 10) Yakushiji, T., Inoue, M. & Koga, T.: Interserotype comparison of polysaccharides produced by extracellular enzymes of *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.*, 127: 253-266, 1984.
- 11) Newbrun, E.: Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Composition and susceptibility to hydrolysis. *Caries Res.*, 6: 132-147, 1972.
- 12) Takehara, T. & Inoue, M.: Inhibitory effects of endo- α -1, 3-glucanase on glucan film formation and glucan synthesis by the glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 26: 217-222, 1981.
- 13) Takehara, T., Inoue, M., Morioka, T. & Yokogawa, K.: Purification and properties of endo- α -1, 3-glucanase from a *Streptomyces chartreusis* strain. *J. Bacteriol.*, 145: 729-735, 1981.
- 14) Guggenheim, B. & Schroeder, H.E.: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. *Helv. Odontol. Acta*, 11: 131-152, 1967.
- 15) Guggenheim, B.: Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odont. Acta*, 14: 89-198, 1970.
- 16) Hamada, S., Mizuno, J., Murayama, Y., Ooshima, T., Masuda, N. & Sobue, S.: Effect of dextranase on the extracellular polysaccharide synthesis of *Streptococcus mutans*: chemical and scanning electron microscope studies. *Infect. Immun.*, 12: 1415-1425, 1975.
- 17) Koga, T. & Inoue, M.: Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption, and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants. *Infect. Immun.*, 19: 402-410, 1978.
- 18) Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. & Kotani, S.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. *Carbohydr. Res.*, 38: 374-381, 1974.

- 19) Hare, M.D., Svensson, S. & Walker, G.J.: Characterization of extracellular, water-insoluble α -d-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydr. Res.*, 66: 245-264, 1978.
- 20) Ceska, M., Granath, K., Norman, B. & Guggenheim, B.: Structural and enzymatic studies on glucans synthesized with glucosyltransferases of some strains of oral streptococci. *Acta Chem. Scand.*, 26: 2223-2230, 1972.
- 21) Koga, T., Sato, S., Yakushiji, T. & Inoue, M.: Separation of insoluble and soluble glucan-synthesizing glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* OMZ176 (serotype d). *FEMS Microbiol. Lett.*, 16 : 127-130, 1983.
- 22) Nalbandian, J., Freedman, M.L., Tanzer, J.M. & Lovelace, S.M.: Ultrastructure of mutans of *Streptococcus mutans* with reference to agglutination, adhesion, and extracellular polysaccharide. *Infect. Immun.*, 10 : 1170-1179, 1974.
- 23) Johnson, M.C., Bozzola, J.J., & Shechmeister, I.L.: Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharide mutants. *J. Bacteriol.*, 118 : 304-311, 1974.
- 24) Yakushiji, T. & Inoue, M.: Ultrastructure of glucans produced by cell-bound glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans* AHT. *Arch. Oral Biol.*, 25: 297-303, 1980.
- 25) Yakushiji, T., Koga, T. & Inoue, M.: Morphology of water-insoluble and -soluble glucans of the dental plaque organism *Streptococcus mutans* AHT and their interaction with the cell surface envelope. *Arch. Oral Biol.*, 26 : 931-937, 1981.
- 26) Freedman, M., Birkhed, D. & Granath, K.: Analysis of glucans from cariogenic and mutant *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 21: 17-27, 1978.
- 27) Koga, T. & Inoue, M.: Effects of dextranases on cell adherence, glucan-film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Arch. Oral Biol.*, 24: 191-198, 1979.
- 28) Sato, S., Koga, T., Yakushiji, T., Nagasawa, S. & Inoue, M. Effects of exogenous soluble dextrans on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Microbios*, 34: 99-112, 1982.
- 29) Inoue, M., Koga, T., Sato, S. & Hamada, S.: Synthesis of adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glucosyltransferase components of *Streptococcus mutans*. *FEMS Lett.*, 143 : 101-104, 1982.
- 30) Inoue, M. & Yakushiji, T.: Chemical and morphological properties of *Streptococcus mutans* glucans. S. Hamada et al. (ed.), *Molecular Microbiology and Immunobiology of Streptococcus mutans*, Elsevier Science Publishers B.V., pp. 133-143, 1986.
- 31) Koga, T., Sato, S., Inoue, M., Takeuchi, K., Furuta, T. & Hamada, S.: Role of primers in glucan synthesis by glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* strain OMZ176. *J. Gen. Microbiol.*, 129 : 751-754, 1983.
- 32) Inoue, M., Yakushiji, T. & Takehara, T.: Ultrastructural changes produced in the oral bacterium *Streptococcus mutans* glucans by the action of endo- α -1, 3-glucanase. *Arch. Oral Biol.*, 27: 753-757, 1982.
- 33) Germaine, G.R., Harlander, S.K., Leung, W.L.S. & Schachtele, C.F.: *Streptococcus mutans* dextranucrase; Functioning of primer dextran and endogenous dextranase in water-soluble and water-insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.*, 16 :637-648, 1977.
- 34) Ciardi, J.E., Beaman, A.J. & Wittenberger, C.L.: Purification, resolution, and interaction of the glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* 6715. *Infect. Immun.*, 18: 237-246, 1977.
- 35) Krembel, J., Frank, R.M. & Deluzarche, A.: Fractionation of human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, 14: 563-565, 1969.
- 36) Frank, R.M. & Houver, G.: An ultrastructural study of human supragingival dental plaque formation. W. D. McHugh (ed.), *Dental Plaque*, pp.85-108. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh, 1970.
- 37) Sherp, H.W.: Dental caries ; Prospects for prevention. *Science*, 173 : 1199-1205, 1971.

哺乳類の発育に伴う味蕾の成熟と分布の変化

笠原 泰夫, 原田 秀逸

鹿児島大学歯学部口腔生理学講座

Changing of maturation and distribution of taste buds in mammals.

Yasuo Kasahara and Shuitsu Harada

Department of Oral Physiology, Kagoshima University Dental School

Abstract

Taste bud distribution on the soft palate (SP) and within three types of tongue papillae (fungiform; FF, foliate; FL, and circumvallate; CV) were examined histologically in the rat and marmoset at different postnatal ages. Serial paraffin sections (10 μ m) were made and stained by HE, and digitized images of each section were examined. At birth, the number of matured (i.e. containing taste pore) SP taste buds preceded to that of FF taste buds in the rat. One week after birth, 90% of SP taste buds and 80% of FF matured taste buds. In contrast, no taste buds with a pore were observed at birth within FL and CV in the rat. In the marmoset, the number of FF taste buds at day 1 was 334. While only 20% of all the taste buds at birth possessed a taste pore, 39% of 174 SP taste buds at day 1 possessed a taste pore. The number of matured taste buds at day 1 was small for the center CV (19 of 59), one side CV (7 of 25), and one side FL (2 of 16) in the marmoset. The total number of taste buds increased with increasing age, reached a maximum at two months of age: FF, 1069; SP, 609; CV-center, 530; CV-side, 390; FL, 201, and decreased thereafter in the marmoset. These results suggest that the maturation of SP taste buds precedes to that of taste buds in other areas of the tongue and plays important roles in the processing of gustatory information during preweanling mammals.

Keywords: taste buds, distribution, development, rat, marmoset

I. はじめに

哺乳動物では、生まれ出て来ると同時にそれまで臍帯を介して行われていた栄養補給を断たれ、以後は自らの口を介して栄養を摂取する状態に強制的に切り替えられる。この出生直後からの栄養摂取の機能を遂行するために、新生児(仔)には乳首から母乳あるいはミルクを吸って飲み込む吸啜運動と同時に味を感じる機能が完備されており、生命維持に必須の機能として出生後直ちに活動を始めることになる。Steiner¹⁾は、味刺激による新生児の顔の表情や頭の動きなどの仕草の観察結果から、新生児が、甘い、酸っぱい、苦いという味のみならず、うま味も味分けることができる事を明らかにした。また、ヒトよりも遥かに未熟な状態で生まれ出て来るラットも、好ましい味や忌避すべき味を味分けることができることが明らかにされている²⁾。

一方、解剖組織学的研究によれば、口腔内の特定部位に味蕾が集中して分布している³⁻⁶⁾が、味蕾の出現と成熟はこれらの部位によって異なっている⁶⁻⁹⁾。しかし、出生時の口腔機能に関連づけての味蕾分布に着目した研究はほとんど行われて来なかったし、特に、軟口蓋に分布する味蕾の出現と成熟については注目されていなかった。我々は、この軟口蓋味蕾に注目して、出生直後からの味蕾分布の変化をラットおよびマーモセットで詳細に調べた結果、出生時の軟口蓋味蕾の機能的な重要性を確信させる結果を得たので報告する。

II. 材料および方法

妊娠したラットを別々のケージに飼育し、仔ラットが生まれた日を0日とした。幼ラットは離乳後は雌雄に分離し別々のケージに数匹ずつ飼育した。0-1, 2, 3, 4, 8-9週齢, 28-31月齢(ほぼ寿命)の42匹のラットからデータを得た。また、マーモセットは、1-3日齢, 2カ月齢, 2, 7, および9歳を用いた。動物はNembutal®の腹腔内へ致死量投与により不動化して頭部を切断し、通法に従って完全な10 μ mパラフィン連続切片を作成し、HE染色を施した¹⁰⁾。全ての切片の光学像をデジタルカメラで撮影してパソコンに取り込み(Power Macintosh 7300, Macintosh)プリントアウトして、個々の味蕾について、成熟度の指標としての味孔の有無, 大きさ, 形, 切片上の位置を記録した。

III. 結果

A. ラット味蕾の成熟と分布の発育に伴う変化

出生時には味孔がある味蕾数と味孔が観察されない

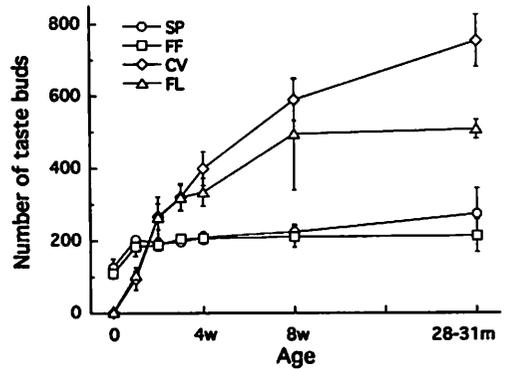


図1 出生後のラットの発育に伴う口腔内各部位の味蕾総数の変化。

w: 週齢, m: 月齢. SP: 軟口蓋, FF: 茸状乳頭, CV: 有郭乳頭, FL: 葉状乳頭. 葉状乳頭の味蕾数は一側の味蕾数を2倍したものの。3匹の平均値で、エラーバーはSDを示す。

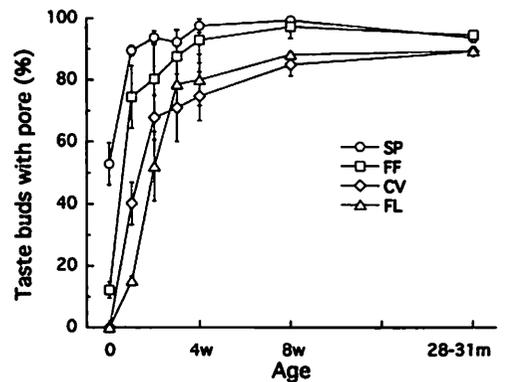


図2 出生後のラットの発育に伴う味孔を持つ味蕾数の割合(%)の変化。

w: 週齢, m: 月齢. SP: 軟口蓋, FF: 茸状乳頭, CV: 有郭乳頭, FL: 葉状乳頭. 3匹の平均値で、エラーバーはSDを示す。

味蕾数を併せて100個以上の味蕾が軟口蓋および茸状乳頭に観察され(軟口蓋; 126.7 ± 23.7 個, 茸状乳頭; 110.3 ± 13.7 個), 味蕾数は1週齢まで急激に増加しほぼ通常のレベルに達した後, 28-31月齢までほとんど変化しなかった(軟口蓋; 273.7 ± 70.6 個, 茸状乳頭; 213.7 ± 44.9 個)(図1)。一方, 有郭および葉状乳頭には出生時には数個の味蕾しか存在せず(有郭乳頭; 1.0 ± 1.4 個, 葉状乳頭; 3.0 ± 4.2 個), 葉状乳頭では8週齢まで味蕾数は増加を続け 247.0 ± 77.2 個(一側)で定常状態に達したが, 有郭乳頭ではその後も増加を続け28-31月齢で 588.7 ± 57.5 個に達した。

さらに、味蕾が成熟しているかどうか、すなわち機能できるかどうかの指標となる味孔を持つ味蕾の割合を部位別に調べた。軟口蓋味蕾は出生時に $52.9 \pm 6.8\%$ もの味蕾が成熟しているが、茸状乳頭味蕾はわずか $12.2 \pm 2.6\%$ であった(図2)。出生後一週の間、味孔を持つ味蕾の割合は急速に増加し、1週齢で軟口蓋では90%、茸状乳頭では75%に達した(図2)。一方、有郭および葉状乳頭では味孔を持つ味蕾は0%で、その後も成熟の速度は軟口蓋および茸状乳頭味蕾よりも遅く、2-3週齢でも70-80%であった(図2)。28-31月齢では口腔内のどの部位においてもほぼ全ての味蕾に味孔が観察された(図2)。

B. マーモセット味蕾の成熟と分布の発育に伴う変化

1日齢のマーモセット茸状乳頭では334個(図3A)の味蕾のうちわずか20%しか味孔を有する味蕾は観察されなかった(図3B)。軟口蓋に分布する味蕾は1日齢では茸状乳頭の半分の182個であったが(図3A)、その39%は味孔を有しており(図3B)、茸状乳頭の味孔を有する味蕾の割合の2倍であった。それぞれの部位の味蕾数は年齢の増加に伴って増加し、2ヶ月齢で最大数に達し(図3A)、ほぼ100%の味蕾が味孔を有していた(図3B)。2ヶ月齢以降は、茸状乳頭味蕾数はあまり変化しないが軟口蓋味蕾数は年齢の増加とともに減少する傾向が認められた(two-way ANOVA, $P=0.0189$, $F=4.895$, $DF=3$)。また、7歳以降は味孔を有する味蕾の割合が減少する傾向が認められた。

IV. 考 察

走査電顕による研究では1日齢のラット茸状乳頭にたった1個の味孔しか観察できないが、12日齢では72%の茸状乳頭味蕾に味孔が観察されたことが報告されている⁹⁾。また、1日齢のハムスターの軟口蓋味蕾の39%が味孔を有していることが報告されている⁷⁾。電気生理学的¹¹⁻¹³⁾および行動学的研究¹⁴⁻¹⁵⁾は、軟口蓋味蕾を支配する大錐体神経が甘味物質やアミノ酸などの栄養物の味覚受容に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、本実験結果から明らかのように、出生時の軟口蓋味蕾が他の部位に先駆けて成熟していることから、軟口蓋味蕾が授乳期の吸啜運動に伴う味覚受容に果たす役割の重要性が示唆される。

一方、出生時のラットに有郭および葉状乳頭に味孔を持つ味蕾が観察されず、成熟した味蕾の割合は軟口蓋および茸状乳頭味蕾よりも2-3週間遅れて増大し、寿命に近い28-31ヶ月齢でようやく100%近くに達する。

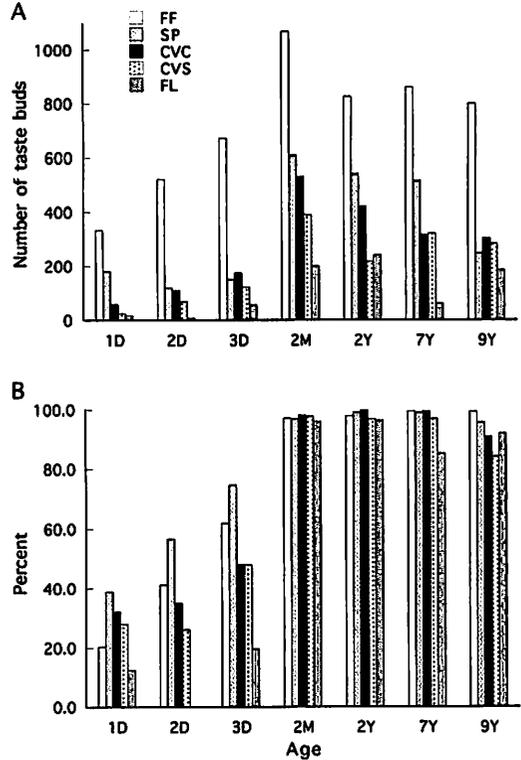


図3 出生後のマーモセットの口腔内各部位の総味蕾数(A)、および味孔を持つ味蕾数の割合(B)の成長に伴う変化。

D: 日齢, M: 月齢, Y: 年齢。各齢一匹の観察値。

また、ラット有郭乳頭の味孔を持つ味蕾は出生時には認められず、90日齢で 610 ± 87 個であること⁸⁾、味孔を持つ味蕾は10日齢で観察されること¹⁶⁾が報告されている。さらに、出生時にはハムスター有郭および葉状乳頭にはほとんど味蕾が観察されないが、71日齢では121個、120日齢で150個の味蕾が観察されている¹⁷⁾。

マーモセットの味蕾の分布を調べてみると、ラットと同様に、出生直後では成熟している味蕾の割合は軟口蓋の部位で最も高いことが明らかになった。しかし、3ヶ月齢以降は軟口蓋味蕾の数は有意に減少する傾向があった。さらに、ヒト新生児の軟口蓋には400個もの味蕾が分布することが報告されている⁶⁾が、老人の軟口蓋には片側にたった3個の味蕾しか観察できなかった¹⁸⁾。成人の軟口蓋についての報告でも、軟口蓋に分布する味蕾数は50-150とマーモセットに比べて著しく少ない¹⁹⁾。このことは、ヒトでは生まれてから成長するにつれて軟口蓋味蕾は急速に数が減っていくことを

示唆している。

哺乳類では、授乳時に、乳首から出てくる母乳あるいはミルクの味を受容するのに軟口蓋味蕾は非常に都合のいい部位に分布している²⁰⁻²¹⁾。さらに、本実験から明らかのように、出生時に軟口蓋には他の部位に先駆けて既に成熟した味蕾が多数分布している。これらの結果は、授乳期の母乳の摂取の際に軟口蓋味蕾が重要な役割を果たしていることを示唆している。

REFERENCES

- 1) Steiner, J. E.: The gustofacial response: Observations on normal and anencephalic newborn infants., In; Fourth Symposium on Oral Sensation and Perception, J.F. Bosma, ed., 254-278, Bethesda, MD, U.S. Dept. H.E.W., 1973
- 2) Ganchrow, J. R., Steiner, J. E. & Canetto, S.: Behavioral displays to gustatory stimuli in newborn rat pups. *Dev. Psychobiol.*, 19, 163-174, 1986
- 3) Farbman, A. I.: Electron microscope study of the developing taste bud in rat fungiform papilla. *Dev. Biol.*, 11, 110-135, 1965
- 4) 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
- 5) Guth, L.: The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat. Rec.*, 128, 715-731, 1957
- 6) Lalonde, E. R. & Eglitis, J. A.: Number and distribution of taste buds on the epiglottis, pharynx, larynx, soft palate and uvula in a human new born. *Anat. Rec.*, 181, 91-95, 1957
- 7) Belecky, T. L. & Smith, D. V.: Postnatal development of palatal and laryngeal taste buds in the hamster. *J. Comp. Neurol.*, 293, 646-654, 1990
- 8) Hosley, M. A. & Oakley, B.: Postnatal development of the vallate papilla and taste buds in rats. *Anat. Rec.*, 218, 216-222, 1987
- 9) Mistretta, C. M.: Topographical and histological study of the developing rat tongue, palate and taste buds., In; Oral Sensation and Perception III, J.F. Bosma, ed., 163-187, Charles C. Thomas, Springfield, 1972
- 10) Harada, S., Yamaguchi, K., Kanemaru, N. & Kasahara, Y.: Maturation of taste buds on the soft palate of the postnatal rat. *Physiol. Behav.*, 68, 333-339, 2000
- 11) Harada, S. & Smith, D.V.: Gustatory sensitivities of the hamster's soft palate. *Chem. Senses*, 17, 37-51, 1992
- 12) 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
- 13) Nejad, M. S.: The neural activities of the greater superficial petrosal nerve of the rat in response to chemical stimulation of the palate. *Chem. Senses*, 11, 283-293, 1986
- 14) Krimm, R. F., Nejad, M. S., Smith, J. C., Miller, I. J., Jr. & Beidler, L. M.: The effect of bilateral sectioning of the chorda tympani and the greater superficial petrosal nerves on the sweet taste in the rat. *Physiol. Behav.*, 41, 495-501, 1987
- 15) Harada, S.: Effects of transection of the greater superficial petrosal and the chorda tympani nerves on conditioned taste aversion to sucrose in the hamster. *Jpn. J. Oral Biol.*, 34, 690-700, 1992
- 16) State, F. A., El-Fish, H. I. & Naga, I. A.: The development of taste buds in the foliate papillae of the albino rat. *Acta Anat.*, 89, 452-460, 1974
- 17) Miller, I. J., Jr. & Smith, D. V.: Proliferation of taste buds in the foliate and vallate paillae of postnatal hamsters. *Growth Dev. Aging*, 52, 123-131, 1988
- 18) Harada, S.: Gustatory system of the soft palate in mammals, *Ann. Kagoshima Dent.* 14, 25-41, 1994
- 19) Imfeld, T.N. & Schroeder, H.E.: Palatal taste buds in man: Topographical arrangement in islands of keratinized epithelium. *Anat. Embryol.*, 185, 259-269, 1992
- 20) Ardran, G. M., Kemp, M. B. & Lind, J.: A cineradiographic study of bottle feeding. *Br. J. Radiol.*, 31, 11-22, 1958
- 21) Ardran, G. M., Kemp, F. H. & Lind, J.: A cineradiographic study of breast feeding. *Br. J. Radiol.*, 31, 156-162, 1958

Prevention of Muscle Necrosis Induced in Rats after Envenomation of *Trimeresurus flavoviridis* (Amami-Oshima Island) Venom and Its Components, Phospholipase A₂ Isozymes

Motoo Kitano,¹ Aichi Yoshida,² Shosaku Hattori,³ Motonori Ohno⁴

¹Department of Oral Pathology, Kagoshima University Dental School, ²Department of Biopathology, Kagoshima University School of Health Sciences, Faculty of Medicine, ³Amami Laboratory of Injurious Animals, Institute of Medical Science, University of Tokyo and ⁴Applied Life Science, Faculty of Engineering, Sojo University

Abstract

The lesions caused by sublethal doses of *Trimeresurus flavoviridis* (*Tf*) venom injected into the anterior thigh muscle (quadriceps femoris muscle; QFM) of rats were studied using paraffin sections. A dose of 50 µg of *Tf* venom produced a large area of necrosis in the QFM together with the neighboring muscles. Phagocytosis of necrotic remnants was followed by marked regeneration of muscle fibers. Myonecrosis was microscopically evident 30 minutes after injection, and over the following 72 hours the necrotic muscles remained acellular and were devoid of inflammatory reaction, except at the very edge where liquefaction necrosis associated with inflammatory infiltrate was marked from the beginning. Blood vessels within and outside the necrotic foci were occasionally involved in collapse and/or in inflammatory changes with thrombosis, to some degree. However, marked hemorrhage was never noted in and around the foci. Phagocytosis of debris proceeded from the periphery, and after 24 hours the muscle was replaced by granulation tissue containing many regenerating myoblastic cells. Abscesses developed in the vicinity of the injection site in several rats receiving *Tf* venom but never after injection of its phospholipase A₂ isozymes, PLA₂, BPI, or BPII. Muscle necrosis after envenomation of *Tf* venom seems to be due primarily to direct action of the venom, although vascular thrombosis and ischemia may also contribute. Interestingly, in rats, myonecrotic *Tf* venom itself may cause marked and extensive activation of muscle fiber regeneration. The venom seems to be a strong myotoxin but not a hemorrhagenic toxin.

Tf serum proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation to six portions depending on its degree of saturability, 0–20%, 20–30%, 30–40%, 40–50%, and 50–70%. The effects of these proteins on *Tf* venom-induced rat skeletal muscle damage were investigated with closer attention to histopathological features of impairment, necrosis, and regeneration of muscle fibers. The results indicated that the rats injected with *Tf* crude venom together with the serum protein fraction of ammonium sulfate saturation 40–50% showed necrotic changes were smallest of all in the rats treated together with the other serum protein fractions. The knowledge that *Tf* serum proteins are effective in preventing local lesions caused by *Tf* venom should shed light on effective medical treatment following *Tf* snake bites.

Keywords:

Trimeresurus flavoviridis(*Tf*), Snake venom, Phospholipase A₂ (PLA₂) isozymes, Envenomation, Myotoxin, Myonecrosis, Skeletal muscle, Quadriceps femoris muscle (QFM), Regeneration of muscle fibers, Myoblasts, Hemorrhage, Serum proteins, Ammonium sulfate

Introduction

Envenomation of *Trimeresurus flavoviridis* (*Tf*) snake venom causes two main symptoms in humans, one local and the other systemic. The local symptoms are severe pain, swelling, hemorrhage, and necrosis in the bitten extremity and often result in permanent disability or amputation.¹⁾ In the Amami islands of Kagoshima Prefecture, this accident accounts for more than 90% of snake bites.²⁾ Consequently, experimental pathological studies of venom of *Tf* of Amami-Oshima island, one of the Amami islands, have been centered on local muscle necrosis and on local hemorrhage.

We have examined the short-term effects of the various components of *Tf* venom on the rat quadriceps femoris muscle (QFM), with closer attention to histopathological changes in the skeletal muscles. Impairment, necrosis, and regeneration of muscle fibers have occurred even several hours after the exposure to the *Tf* venom.³⁾ However, the rats were strongly resistant to hemorrhage by envenomation of *Tf* venom. Renewed interest in this venom has stemmed from our recent studies^{3,4)} of its action on the muscle and the vascular wall of the rat and of its fractionated components which may intimately relate to the pathogenesis of local lesions caused by snake bite.

In our recent studies,^{3,4)} *Tf* serum proteins were fractionated by ammonium sulfate precipitation to five portions depending on its degree of saturability — 0–20%, 20–30%, 30–40%, 40–50%, and 50–70%. The effects of these proteins on *Tf* venom-induced rat skeletal muscle damage were investigated histopathologically. A knowledge of which portion of *Tf* serum proteins are most effective for prevention of local lesions caused by *Tf* venom should provide a clue for the future medical treatment of those having been bitten by a *Tf* snake. In all the rats treated with the mixtures of *Tf* venom and its serum protein fractions, those that received a mixture of *Tf* venom and its serum protein fraction of ammonium sulfate at 40–50% saturation had the smallest necrotic changes.⁴⁾

Phospholipase A₂ isozymes of *Tf* venom

The main components of *Tf* venom contributing to myonecrosis are phospholipase A₂ (PLA₂) isozymes. Five PLA₂ isozymes have been isolated from *Tf*

venom^{5,6,7,8)}: [Asp⁴⁹]PLA₂ called PLA2 (pI 7.9, highly lipolytic to egg-yolk emulsion and myolytic), more basic [Asp⁴⁹]PLA₂ called PLA-B (pI 8.6, edema-inducing), most basic [Asp⁴⁹]PLA₂ called PLA-N (pI 10.3, neurotoxic), and two [lys⁴⁹]PLA₂s called BPI and BPII (pls, 10.1 and 10.2, respectively, extremely weakly lipolytic to egg-yolk emulsion but strongly myolytic). BPI and BPII can cleave arachidonate at the *sn*-2 position of phospholipids in the micellar state and in bilayer membranes with activity similar to PLA2.⁹⁾ Thus, most PLA₂ isozymes can be considered to be myotoxins. The myotoxic action of PLA₂s is not necessarily associated with their catalytic activity toward ordinary micellar substrates such as egg-yolk emulsion. They are able to disrupt the integrity of skeletal muscle plasma membranes and possibly cause an increased permeability to Ca²⁺ and other ions.

Rats

For histopathological analysis of the susceptibility to tissue injury by *Tf* venom, myonecrosis was induced by envenomation of *Tf* venom in young adult female and male rats (80–100 g) of F344 (Charles River Japan, Inc.), Dark-Agouti (Shizuoka Laboratory Animal Center), or Wistar/Furth (maintained in our laboratory¹⁰⁾ by sister-brother mating) strains.

Envenomation and muscle preparation for pathological examination

Tf crude venom and its PLA₂ isozymes were weighed and dissolved in sterile physiological saline immediately prior to use. The experimental rats were anesthetized with pentobarbital sodium (Nembutal: Abbot Lab, U.S.A.). The crude venom or one of the three PLA₂ isozymes, [Asp⁴⁹]PLA₂, BPI, and BPII (50 μg each), in 100 μl physiological saline were injected into the upper two thirds of the right QFM of the rats, which had been divided into four groups. The control rats were similarly injected with 100 μl sterile physiological saline.

The animals were allowed to survive for periods ranging from 30 minutes to 72 hours and were sacrificed under ethyl ether anesthesia. Both the right and left hindlimbs and visceral organs, including the brain were immersed for several days in 10% buffered formalin (pH

7.4). All tissue was embedded in paraffin, sectioned at 5–6 μm and routinely stained for histopathological examination.

Pathological observations in skeletal muscle after envenomation (Table 1)

Macroscopically, there were more or less marked changes of liquefaction necrosis (Fig. 1) with mild to marked edematous swelling of the muscle mass in the

venom-injected right hind leg. A close examination of the injected QFM revealed an absence of marked hemorrhage.

Histologically, there were groups of affected cells accompanied by some decrease in fine cytoplasmic structures, which were located in the periphery of the muscle as early as 30 minutes after inoculation. At this time edema without inflammatory cells was observed and many of the skeletal muscle cells showed edema-

Table 1: Histopathological data* following *Tf* venom injection into the QFM of rats

<i>Tf</i> venoms	Time following envenomation duration**	Necrosis of skeletal muscle	Inflammatory infiltration	Regeneration of skeletal muscle fibers	Hemorrhage	Edema	Others [‡]
Crude venom	30m	—	—	—	— ~ +	+	
	6h	— ~ +	+	—	— ~ +	+	
	24h	++ ~ +++	+++	+	— ~ +	++	Thrombosis (+; focal)
	48h	++ ~ +++	+++	++	— ~ +	++	Thrombosis (+; focal)
	72h	++ ~ +++	++	++	— ~ +	++	Thrombosis (+; focal)
[Asp ⁴⁹] PLA ₂	24h	++	++	+	— ~ +	++	Thrombosis (+; focal)
	48h	++	++	+	— ~ +	++	
BP I	24h	++	+ ~ +++	+	— ~ +	++	Thrombosis (+; focal)
	28h	++	+ ~ +++	++	— ~ +	+	
BP II	24h	++	+ ~ +++	++	— ~ +	+	
	48h	++	+ ~ +++	+++	— ~ +	+	
	72h	+	+	+++	— ~ +	+	
Control (physiological saline)	30m	—	—	—	—	—	
	24h	—	—	—	—	—	
	48h	—	—	—	—	—	

Total No of rats***

90 (45 males, 45 females)

*There were no strain differences in the fundamental histopathological changes between the various types of venom or time post-envenomation. There is no sex difference in the histopathological changes among the various kinds of venom and duration.

**Each group consists of 6 rats (2 Fischer 344 rat, 2 DA rats, and 2 WF rats, one of each sex).

***The total number of experimental rats was 90 (45 males and 45 females).

[‡]There are occasional findings of angitis with thrombi.

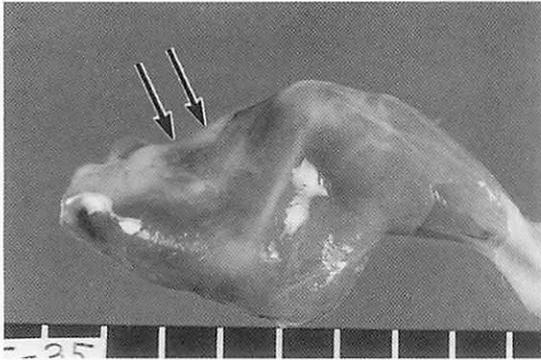


Fig. 1: A large necrotic lesion in the QFM of a F344 male rat 48 hours after the inoculation of the crude venom of *Tf*. Note the severe and extensive atrophy of the skeletal muscles of the anterior thigh (arrows) due to changes of liquefaction necrosis without marked hemorrhage.



Fig. 2: Massive liquefaction necrosis of the QFM of a F344 male rat 48 hours after the inoculation of the crude venom of *Tf*. Marked inflammatory infiltration is seen in the peripheral layer (arrow heads). Hemorrhage is not noted.

tous swelling. Six hours after injection, necrosis of muscle fibers in the QFM was indicated by nuclear pyknosis and fragmentation of myofibrils into homogeneous eosinophilic masses separated by empty-looking segments. There were many areas where necrotic cells were predominant. Some of them appeared in the initial stage of cell degeneration, i.e. some muscle cells had only edematous swelling, whereas other cells were in the more advanced stage of damage, with formation of dense clumps of myofibrils alternating with cellular spaces apparently devoid of myofibrillar material. The findings support the view that the earliest alterations seem to take place in the periphery of the necrotic focus. A very mild inflammatory infiltrate was observed at this time.

After an elapse of 24 hours there was widespread myonecrosis; the myofibrillar material in necrotic cells was more amorphous and its distribution within the cellular space was more homogeneous, instead of forming dense and clumped masses characteristic to the features of liquefaction necrosis (Fig. 2). A marked and dense inflammatory infiltrate was present outside the necrotic cell nests.

Forty-eight hours after toxin inoculation, there was an abundant inflammatory infiltrate mainly in the surrounding layers of necrosis (Fig. 3). Even after 72 hours, the QFM still showed an extensive area of coagulative necrosis, but in some rats the central mass



Fig. 3: Necrotic mass is surrounded by a granulation tissue (arrows) with marked inflammatory infiltration. Note numerous spindle-shaped myoblastic cells in the granulation tissue. The QFM of a F344 female rat 48 hours after the inoculation of the crude venom of *Tf*.

of necrotic fibers was surrounded by active-looking granulation tissue with neutrophils, macrophages, and fibroblasts. Very little fibrosis was observed.

Simultaneously, regenerative proliferation of myoblasts, which are characterized by the presence of myofibrils and rows of centrally-located nuclei, was observed in the periphery of necrotic cells. Proliferation of small regenerating muscle fibers was most marked in the rats treated with BPII and was seen to a lesser amount in those treated with BPI, the crude venom, and PLA2. Twenty-four hours after toxin inoculation, regenerating cells were spindle shaped with scant

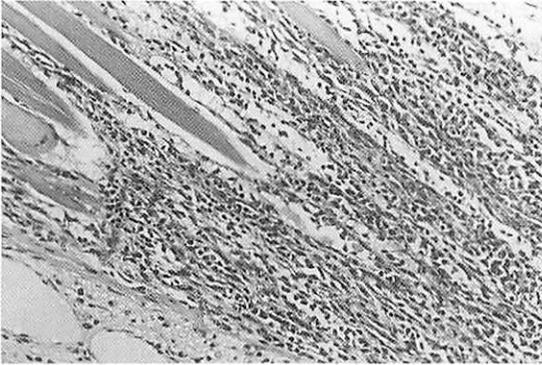


Fig. 4: A granulation tissue in the periphery of a necrotic focus in a DA male rat 48 hours after inoculation of the BPI. Many spindle-shaped myoblastic cells have sprouted from the viable skeletal muscle fibers around a necrotic mass.

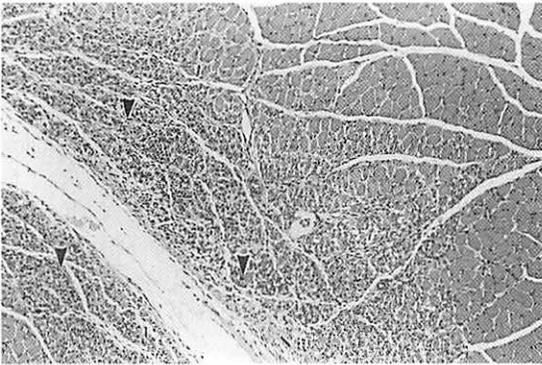


Fig. 5: Numerous myoblastic cells around the necrotic focus in a F344 male rat 72 hours after inoculation of the BPI. Myoblastic cells are hypertrophied and have a round nucleus in their central cytoplasm (arrow heads). Inflammatory infiltration becomes mild.

basophilic cytoplasm and a central nucleus. Some of these cells revealed mitotic activity after 48 hours (Fig 4). Muscle regeneration was observed in the peripheral fibers of necrotic muscles, while the inner parts of those muscles were still necrotic. The regenerating cells gradually became hypertrophic with a light acidophilic cytoplasm after 72 hours (Fig. 5).

Histological examination of muscle tissue 8 weeks after the onset of muscle necrosis revealed the presence of abundant regenerated muscle cells with centrally-located nuclei and a diameter similar to that of normal muscle cells, indicating that regeneration had

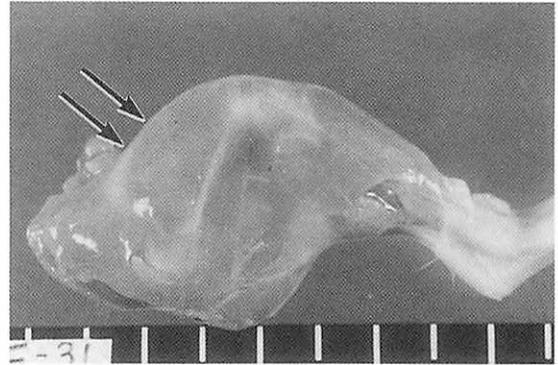


Fig. 6: Macroscopic findings of the QFM of a WF male rat 48 hours after the inoculation of a mixture of the crude venom of *Tf* and its serum protein of ammonium sulfate saturation percentage, 40-50%. Slight edematous swelling of the anterior thigh (arrows) without a hemorrhage and there is neither marked necrotic change nor atrophy of the skeletal thigh muscles.

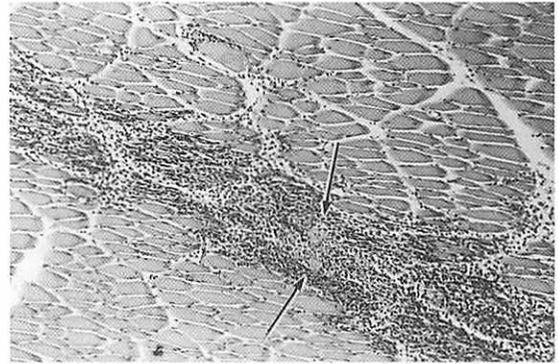


Fig. 7: A photomicrograph of a very small necrotic focus (arrows) in the QFM of the same rat as shown in Fig. 6.

taken place successfully (data, not shown).

There was little hemorrhage through the whole duration of 8 weeks. Most blood vessels looked normal, but in some animals inflammatory infiltrate was noted in the vascular walls and platelet thrombi were found in some medium-sized blood vessels. There were several peripheral nerves showing marked edema in the endoneurium, but without apparent structural disintegration.

Muscle necrosis followed by muscle regeneration

Thirty minutes after injection of *Tf* venom the

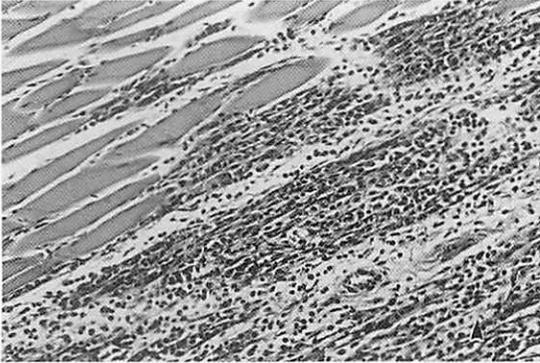


Fig. 8: A higher magnification of Fig.7. The field is composed mainly of numerous inflammatory cells and regenerating myoblastic spindle cells.

initial change of muscle fiber necrosis was widespread in the QFM, where most blood vessels looked normal and contained no thrombi. These findings suggest that necrosis is an early event, which probably results from a direct venom action on muscle fibers. However, 24 hours later the venom caused collapse of blood vessels with or without vasculitis and thrombosis. The resulting ischemia may have contributed to the genesis of the myonecrosis, as seen in animals receiving the various types of snake toxins, i.e., the crude venom, BPI, BPIL, and PLA₂.⁶⁾ The absence of inflammatory cells and unphagocytosed necrotic muscle fibers suggest that there was no blood flow through the central necrotic area. A delay in phagocytosis was also observed after inoculation of the venoms from other snakes. The collapse of blood vessels was also considered important in the pathogenicity.

On the other hand, muscle necrosis induced by local inoculation of the various kinds of snake venoms is usually followed by rapid phagocytosis of debris at the periphery of the necrotic area. The clearing of necrotic materials by phagocytes was followed by a rapid regeneration process. Myoblasts were observed 24 hours after the onset of myonecrosis, and by 8 weeks regeneration was complete (data not shown). It was common to find many regenerative cells of a size similar to that of adult muscle fibers but with centrally-located nuclei. The success of regeneration after myonecrosis induced by *Tf* myotoxins might be due to the fact that neither nerves nor blood vessels are markedly affected

by these toxins, since adequate blood supply and innervation are essential requirements for muscle regeneration.^{11, 12)}

***Tf* venom and hemorrhage**

The most striking effects produced by parenteral injection into animals of many snake venoms including *Tf* venom are local and consist of marked hemorrhage, myonecrosis, and edema.^{13, 14, 15)} It is well known that the pathological signs characteristic of *Tf* bite in humans, rabbits, and mice are extensive hemorrhage and necrosis.¹⁴⁾ Our experimental rats, however, failed to demonstrate hemorrhage as a predominant sign of snake venom injection. We used three strains of rats and four kinds of preparations derived from *Tf* venom for our experiments. In spite of the different strains of rats and the kinds of venom preparations, we could not observe hemorrhage in and around the injection area.

It is of great interest whether or not the same factor of this venom is responsible for necrosis and hemorrhage. However, little is known about this point.³⁾ Many researchers stated that hemorrhage is due, at least in part, to the action of myonecrotic enzymes such as PL A₂s.¹⁵⁾ However, in terms of local hemorrhage, our results did not agree with the general view that snake venoms produce bleeding at the injection site. Pathological observations indicated that the easily discernible local changes produced in humans, rabbits, and mice by *Tf* bite injury were related to hemorrhage. In the present experiment, *Tf* venom did not give rise to any prominent bleeding in rats even locally, but produced myolysis accompanied by edema.

Some investigators have suggested that proteolytic enzymes are the factors in hemorrhage and necrosis.^{13, 14)} We observed, however, that the degrees of hemorrhage and necrosis were not always in parallel with proteolytic activities. Furthermore, there is a report that crystalline trypsin produces local hemorrhage but almost no myonecrosis.¹⁾ This seems to indicate that both changes depend not only on proteolytic enzymes but also on other certain enzymes or factors.

A few reports have described the occurrence of vascular lesions in a poisonous snake bite.^{16, 17, 18)} It was confirmed that *crotalinae* and *viperinae* venoms containing both myonecrogenic and hemorrhagic

activities inflicted damage on the arteries and *elapidae* venoms devoid of hemorrhagic activity fail to cause significant changes in arterial walls. The important changes responsible for developing arterial lesions appear to be injury of the endothelium and disintegration of the media. It has been reported that *Tf* venom attacks endothelium and smooth muscle of the media when the venom is injected close to the arteries. This suggests that both hemorrhagic and myonecrotic factors play an important role in the involvement of local blood vessels.¹⁷ Thrombi were observed in local arteries at the sites injected with several kinds of venoms. In our experiments the frequency of thrombus formation was not always in parallel with the severity of arterial lesions and of local hemorrhage and swellings. Important factors causing thrombosis are slowing or eddying of the blood stream, injury to the lining of a blood vessel, and alterations of the blood. If a longer period of time had been allowed to elapse between injection and autopsy, there would probably have been more thrombus formation, as *viperinae* and *crotalinae* venoms produce the conditions bringing about this kind of lesion.¹¹

Serum proteins acting as inhibitors against *Tf* venom

In conformity with improvement of the medical treatment of *Tf* snake bite, the majority of recent victims have been saved from severe generalized symptoms and death. However, local tissue damage is inevitable, and in some severe cases this is responsible for subsequent serious slough in the major extremity and eventually leads to amputation. Therefore, it is still an important task to prevent the severe and extensive damage of skeletal muscle tissues caused by myotoxins in *Tf* venom.

Recently, the proteins with binding affinity to *Tf* venom PLA₂s were fractionated from the serum of *Tf* itself on four columns, each conjugated with one of four PLA₂ isozymes, PLA₂, PLA-B, BPI, and BPII.¹⁹ Five PLA₂ inhibitory proteins, termed PLA₂ inhibitors, PLI-I~PLI-V, were obtained. PLI-IV and PLI-V is mostly bound to PLA₂, whereas PLI-I has affinity mostly toward basic PLA₂s such as PLA-B, BPI, and BPII.

Purification of PLA₂ inhibitors from *Tf* serum by affinity chromatography is quite laborious and it is

difficult to obtain the inhibitors in large quantities using this method. For these reasons, *Tf* serum proteins were fractionated into six portions, using ammonium sulfate precipitation. The fractions were based upon degree of saturability — 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, and 50-70%. The effects of these proteins on *Tf* venom-induced rat skeletal muscle damage were investigated with closer attention to histopathological features of impairment, necrosis, and regeneration of muscle fibers. Such studies have stemmed from our recent detailed studies of the injurious action of *Tf* venom and its components — some PLA₂s — on skeletal muscle fibers.⁹

Fractionation of *Tf* serum proteins

Blood of *Tf* was collected and its serum was prepared by removing precipitated erythrocyte and fibrous proteins after keeping the blood at 4°C overnight and stored at -80°C. Ammonium sulfate was added to the serum portion at 0°C. At 20% saturation of ammonium sulfate the precipitate was collected by centrifugation. The supernatant was then brought to 30% ammonium sulfate saturation and the precipitate was collected. The same procedure was repeated. The proteins collected were dissolved in water (or 0.05M Tris-HCl, pH 8.0), dialyzed against water, and lyophilized. The proteins obtained from 50 ml of *Tf* serum were 0.15g, 0.36g, 0.35g, 1.33g, and 0.55g for 0-20%, 20-30%, 30-40%, 40-50%, and 50-70% ammonium sulfate saturation, respectively.¹⁹ Each serum protein fraction was weighed and dissolved in sterile physiological saline just before use.

Injection of *Tf* venom together with its serum proteins into rat skeletal muscle

The rats were anesthetized with pentobarbital sodium (Nembutal: Abbot Lab, U.S.A.). A mixture of *Tf* crude venom (50 µg each) and each serum protein fraction (50 µg each) in 100 µl physiological saline was injected into the anterior aspect of the QFM of each rat of the first five groups (Group 1-5) in the order of increasing degrees of ammonium sulfate saturation — 0~20%, 20~30%, 30~40%, 40~50%, and 50~70% (Table 2). The crude venom (50 µg) alone in 100 µl physiological saline was injected into the rats of the

Table 2 Histopathological findings in QFM of rats treated with mixtures of *Tf* venom and its serum protein fractions

<i>Tf</i> venom + Fraction* of <i>Tf</i> serum protein (Group of rats)**	Necrosis [‡] of skeletal muscle tissue	Inflammatory infiltration	Regeneration of skeletal muscle fibers	Hemorrhage	Edema	Others
0~20%* (Group 1)	++~++++	+~+++	++	-~+	+++	
20~30% (Group 2)	++	+~+++	++	-~+	+~+++	
30~40% (Group 3)	-~+	+~+++	++	-~+	-~+++	
40~50% (Group 4)	-~+	+~+++	++	-~+	-~+	
50~70% (Group 5)	+~+++	+~+++	++	-~+	-~+++	
Crude venom (Group 6)	+++	++	++	-~+	+++	thrombosis -~+
Saline only (Group 7)	-	-	-	-	-	

*The percentage values represent the ammonium sulfate saturation ranges for fractional precipitation of the serum proteins.

**Each group consists of 6 rats (Wistar/Furth strain; 3 females + 3 males).

‡The necrotic changes are composed mainly of liquefaction necrosis. Coagulative necrosis is focally noted.

sixth group (Group 6). Sterile physiological saline was injected into the rats of the seventh group (Group 7) as a control. The animals were allowed to survive for a period of 48 hours. Hindlimb muscles for pathological observations were prepared as described in Table 2.

Effects of *Tf* serum proteins on rat skeletal muscle necrosis induced by *Tf* venom

In the rats inoculated with *Tf* venom (Group 6) and with a mixture of *Tf* venom and its serum protein fraction of ammonium sulfate saturation percentage 0~20% (Group 1), there was a widespread myonecrosis. The myofibrillar material in necrotic cells was more amorphous and distributed within the cellular space as dense and clumped masses which show liquefaction necrosis instead of being more homogeneous looking coagulative necrosis. An abundant inflammatory infiltrate was seen outside the necrotic cell areas, mainly at the surrounding tissue layers of the necrotic muscle cells.

Simultaneously, regenerative proliferation of myoblasts, which are characterized by the presence of scanty basophilic cytoplasm, was observed in the periphery of the necrotic cell areas. The regenerating cells were spindle-shaped with a central nucleus, with some revealing mitotic activity. There was little hemorrhaging, although edema was considerably marked. Fibrosis was not conspicuous.

The size of the necrotic areas became smaller and smaller in Groups 2, 3, and 4 in the order of increasing ammonium sulfate saturation — 20~30%, 30~40%, and 40~50% — which agreed well with the fact that proliferation of small regenerating muscle fibers seemed more and more marked (Fig. 4). However, the rats of Group 5 (ammonium sulfate saturation 50~70%) showed relatively greater necrotic changes than those of Groups 3 or 4.

Significance of serum proteins for treatment of snake bite

Many venomous snakes are resistant to their own venoms. Their natural resistance to their toxins is due to neutralizing factors in their sera. These factors must protect against toxicity due to accidental bites by a venomous snake itself or by fellow snakes. Inhibitors against snake venom PLA₂s have been isolated from the sera of various snakes and their primary structures determined. A PLA₂ inhibitor (PLI) that neutralizes *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (mamushi snake) PLA₂ was isolated from its serum.²¹⁾ *Crotalus* PLA₂ - neutralizing factor was isolated from *Crotalus durissus terrificus* serum.^{22,23)} As mentioned above, five PLIs (PLI-I-V) were isolated from *Tf* serum.¹⁹⁾ PLI-IV and PLI-V are identical to PLI-A and PLI-B purified by Inoue et al.²⁰⁾ However, purification of these inhibitors from snake sera is laborious and the yields are low. Thus, an effective method for the preparation of a massive volume of inhibitors is necessary. The ammonium sulfate precipitation procedure was thus employed in the present study to obtain the effective fraction in a large quantity.

The present study demonstrated that the rats of Groups 3 and 4 inoculated with the mixtures of *Tf* venom and its serum protein fractions of ammonium sulfate saturation 30-40% and 40-50% had much smaller necrotic foci in muscle as compared with the rats which were treated with *Tf* venom alone and with the mixtures of *Tf* venom and its serum protein fractions of ammonium sulfate saturation 0-20 and 20-30%. The foci for Groups 3 and 4 were surrounded mainly by granulation tissue containing numerous macrophages and regenerative myoblastic cells. Edema was also not so marked. These facts suggested that inhibitory proteins against myotoxins were contained at high concentration in the *Tf* serum protein fractions precipitated by ammonium sulfate saturation 30-40% and 40-50%.⁴⁾

The results obtained in the present work suggest that the inhibitors in *Tf* serum against its venom myotoxins were effective in improving the myotoxic injury caused by *Tf* bite. Since application of excessive doses and/or repetitive application of anti-*Tf* venom antisera induce serious medical problems, it is expected that application of *Tf* serum inhibitors in an appropriate

way could provide a useful method of therapy for snake bite in the near future.

Acknowledgements; This work was supported, in part, by a Fund for Promotion and Development of Amami Islands sponsored by Ministry of Land, Infrastructure, and Transport of Japan and Kagoshima Prefecture Health and Social Welfare Department.

References

- 1) Homma M & Tu AT: Morphology of local tissue damage in experimental snake envenomation. *Br J Exp Pathol* 52, 538-542, 1971.
- 2) Kagoshima Prefecture Health and Social Welfare Department Pharmaceutical Affairs Division: Outline of measures taken against poisonous snake "Habu", in the financial year 2001. Kagoshima Prefecture, 2002.
- 3) Kitano M, Hirano M, Yahata M, Umemura E, Yoshida A, Hattori S, Ueda N, Tsuru D & Ohno M: Muscle necrosis and regeneration with lack of marked hemorrhage induced in the rat after envenomation of *Trimeresurus flavoviridis* venom and its components, phospholipase A2 isozymes. *South Pacific Study* 22, 31-39, 2001.
- 4) Kitano M, Hirano M, Ishihara T, Yoshida A, Hattori S, Ueda N, Chijiwa T & Ohno M: *Trimeresurus flavoviridis* serum protein can prevent skeletal muscle necrosis induced by its venom in rat. *South Pacific Study*, 2002 (in press).
- 5) Liu S-Y, Yoshizumi K, Oda N, Ohno M, Tokunaga F, Iwanaga S & Kihara H. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. *J. Biochem. (Tokyo)*, 107, 400-408, 1990
- 6) Kihara H, Uchikawa R, Hattori S & Ohno M. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A2. *Biochem. Int.*, 28, 895-903, 1992.
- 7) Tanaka S, Mohri N, Kihara H & Ohno M. Amino acid sequence of *Trimeresurus flavoviridis* phospholipase A2. *J. Biochem. (Tokyo)* 99, 281-289, 1896.
- 8) Yoshizumi K, Liu S-Y, Miyata T, Saita S, Ohno M,

- Iwanaga S & Kihara H. Purification and amino acid sequence of basic protein I, a lysine-49-phospholipase A2 with low activity, from the venom of *Trimeresurus flavoviridis* (*habu* snake). *Toxicon* 28, 43-54, 1990
- 9) Shimohigashi Y, Tani A, Matsumoto H, Nakashima K, Yamaguchi Y, Oda N, Takano Y, Kamiyama H, Kishino J, Arita H & Ohno M. Lysine-49-phospholipase A2 from *Trimeresurus flavoviridis* venom are membrane-acting enzymes. *J. Biochem.* 118, 1037-1044, 1995.
 - 10) Kitano M, Hatano H & Shisa H: Strain difference of susceptibility to 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue carcinoma in rats. *Jpn J Cancer Res* 83, 843-850, 1992.
 - 11) Queiroz LS, Santo-Neo H, Rodriguez-Simioni L & Prado-Fraceschi J: Muscle necrosis and regeneration after envenomation by *Bothrops Jararacussu* snake venom. *Toxicon* 22, 339-346, 1984.
 - 12) Gutierrez JM, Chaves F, Gene JA, Lomonte B, Camacho Z & Schosinesky K: Myonecrosis induced in mice by a basic myotoxin isolated from the venom of the snake *Bothrops Nummifer* (jumping viper) from Costa Rica. *Toxicon* 27, 735-745, 1989.
 - 13) Ohsaka A, Ikezawa H, Kondo H, Kondo S & Uchida N: Haemorrhagic activities of *Habu* snake venom, and their relations to lethal toxicity, proteolytic activities and other pathological activities. *Br J Exp Pathol* 41, 478-486, 1960.
 - 14) Okonogi T., Hosugi S, Homma M, Mitsuhashi S, Maeno H & Sawai Y: Studies on the *Habu* snake venom. 3-2. A comparative study of histopathological changes caused by crude venom, purified *Habu*-proteinase and other proteinases. *Jpn J Microbiol*, 4, 189-192, 1960.
 - 15) Lomonte B., Lundgren J, Johansson B & Bagge U: The dynamics of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom and myotoxin II on the mouse cremaster muscle: an intravital and electron microscopic study. *Toxicon*, 32, 41-55, 1994.
 - 16) Mandelbaum FR, Serrano SM, Sakurada JK, Rangel HA & Assakura MT. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the *Crotalinae* and *Viperinae* subfamilies. *Toxicon*, 27, 169-177, 1989.
 - 17) Matsui T, Fujimura Y & Titani K: Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta* 1477, 146-156, 2000.
 - 18) Estevao-Costa MI, Diniz CR, Magalhaes A, Markland FS & Sanches EF: Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb. Res.* 99, 363-376, 2000.
 - 19) Nobuhisa I, Inamasu S, Nakai M, Tatsui A, Minori T, Ogawa T, Shimohigashi Y, Fukumaki Y, Hottori S & Ohno M: Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhibits basic phospholipase A2 isozymes in the snake's venom. *Eur. J. Biochem.* 249, 838-845, 1997.
 - 20) Inoue S, Kogaki H, Ikeda K, Sami Y & Omori-Satoh T: Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J Biol Chem*, 266, 1001-1007, 1991.
 - 21) Ohkura N, Inoue S, Ikeda K & Hayashi K: Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *J. Biochem.* (Tokyo), 113, 413-419, 1993.
 - 22) Fortes-Dias CL, Lin Y, Ewell J, Diniz CR & Liu T-Y: A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). *J. Biol. Chem.* 269, 15646-15651, 1994.
 - 23) Perales J, Villela C, Domont GB, Chomet V, Saliou B, Moussayche H, Bon C & Faure G: Molecular structure and mechanism of action of the cotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur. J. Biochem.*, 227, 19-26, 1995.

肝細胞増殖因子 (Hepatocyte Growth Factor) —その発見の歴史と特に歯科医学分野での生理的意義—

大工原 恭

鹿児島大学歯学部口腔生化学講座

Hepatocyte Growth Factor - Its Discovery and Physiological Roles in Dentistry -

Yasushi Daikuhara

Department of Biochemistry, Kagoshima University Dental School,
35-1 Sakuragaoka-8-chome, Kagoshima, 890-8544, Japan.

Abstract

Human hepatocyte growth factor (HGF) was first discovered in plasma from fulminant hepatic failure as a potent mitogen for adult hepatocytes in 1985, and it was purified from the patients' plasma in 1986 in our laboratory. However, subsequent studies have revealed that HGF has various physiological activities such as mitogen, motogen, morphogen and angiogen to most of epithelial and endothelial cells. Thus, HGF is now known as a broad-spectrum and multifunctional cytokine involved in a variety of physiological processes, including tissue development, regeneration and wound healing. In this review, a history how HGF was discovered is described. It is also described the physiological roles of HGF, especially in oral biology.

Keywords: hepatocyte growth factor, scatter factor, physiological role, oral biology.

はじめに

肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor, 以下 HGF と略す) は、肝実質細胞に特異的な増殖因子としてラットなどの実験動物で長年研究が続けられてきたものであるが、1985年に我々は初めてヒトでの存在を明らかにし、1986年に劇症肝炎患者血漿から精製し

たペプチド性因子である。さらに1989年には、ヒトの HGF の cDNA が分子クローニングされてその推定 1 次構造が明らかにされ、次いで組換え体 HGF の発現により大量の HGF の供給が可能になるに及び、その臨床的な応用が模索されるようになってきている。また、当初肝実質細胞に特異的と考えられてきた HGF は、

1991年になって種々の生物学的な活性を持つことが明らかとなり、さらにその受容体がc-Met原癌遺伝子産物であることも明らかにされた。従って、それ以降HGFは広範囲・多機能型増殖因子の1つとして分類されるようになり、肝臓学者のみならず、広く細胞生物や癌医学の研究者に注目を浴びることになった。このように、現在ではHGFは種々の臓器の発生、再生、修復に不可欠の因子と考えられている。本稿は、我々の講座でHGFを発見するに至った経緯を中心に述べ、その後の研究による特に歯科医学分野での意義について、その現状を我々の研究成果を中心に概説する。

なお我々の研究の大部分は、医学部内科学第二講座(当時の主任:橋本 修治 教授)の坪内 博仁 博士(現 宮崎医科大学内科学第二講座教授)らのグループとの共同研究であることをあらかじめお断りしておきたい。

1. HGF研究の歴史とヒトHGFの発見

肝臓は極めて再生能力の高い臓器であって(図1参照)、この能力が肝切除や肝移植手術を可能にしている。この再生能力を初めて実験的に証明したのは、1931年のHigginsとAnderson¹⁾によるラット部分肝切除法の確立である。すなわち彼らは、2/3の肝臓を切除されたラットの残存肝が、2日後には約2倍に、1週間後にはほぼ元の大きさにまで達することを示したのである。このラット部分肝切除術は、組織の再生や細胞増殖の実験モデルとして、現在でも広く用いられている。この肝再生の機序は今も未だ完全には解明されていないが、1967年にMooltenとBucher²⁾が2匹のラットの血管系を結合する実験系(パラビオシス)を用いて、一方のラットが部分肝切除を受けると、そのパートナーである正常ラットの肝細胞増殖能が増加することを見出し、部分肝切除ラットの血漿中に体液性の肝再生促進因子が存在していることを示唆した。しかし、当時はこの肝再生因子の活性を測定する適当なin vitroの系がなかったため、その後の研究はほとんど進展しなかった。

一方、1960年代後半に研究が始まったラットの初代培養肝細胞調製法³⁾は、その後多くの人たちによって改良が加えられた結果⁴⁾、1980年代に入ってこれが肝再生因子活性のin vitroの測定系に応用されるようになり⁵⁾、主として米国及び日本でラットの部分肝切除ラット血清から肝再生因子を精製する試みが始まった。しかし、それら部分精製標品の分子量は、12万以上の高分子、あるいは3,000以下の低分子と一定せず、本

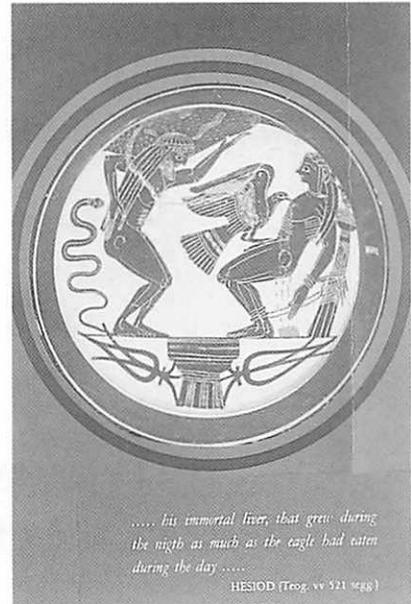


図1 鷲に肝臓をついばまれるプロメテウス。

ギリシャ神話のティタン(巨人)神族の一人であるプロメテウスは、天上の火を盗んで人間に与えるなど人間に親切であったことから、ゼウスの怒りを買って、コーカサスの山の岩に鎖でつながれて、毎日鷲に生きた肝臓をついばまれた。しかし、彼の肝臓は夜の内に何時も元に戻ったという。肝臓学者の間では、これが肝臓の再生能力を記述した最初の文献とされている。

体は不明のままであった⁶⁻⁸⁾。これとは別に、Strainら⁹⁾は1982年にラットの血小板に肝細胞の増殖を強く促進する活性があることを見出した。さらに彼らのグループはこの血小板由来の因子を部分精製して、1984年に分子量約65,000の既知の細胞増殖因子とは異なる、熱に不安定な物質であることを示した¹⁰⁾。しかし、ヒトの血小板をラットのそれと同様に処理しても肝細胞の増殖を促進する活性は得られず、ヒトの体液中にこのような肝再生因子が存在するか否かについてはその時点では全く不明で、ヒトにはそのような因子はないという意見の方がむしろ主流であった。なお、肝再生因子にhepatocyte growth factorという名称を用いたのは、ラット血小板由来の因子を部分精製したBucherらのグループが最初であり、我々もこの名称を踏襲した。

このような背景の下で、我々は医学部第二内科の肝臓グループと共同して1984年からヒトHGFの研究に着手し、種々の肝疾患患者血清のスクリーニングを開始した。活性測定系はラットの初代培養肝細胞である。しかし、期待するようなpositiveな結果はなかなか得

られず、スクリーニングを始めてほぼ1年後、もうこの研究は止めようかと話し合っている時に、偶然にも第二内科に緊急入院した劇症肝炎の患者があり、その血清中に肝細胞のDNA合成を強く促進する因子が存在することを発見したのである¹¹⁾ (図2)。劇症肝炎

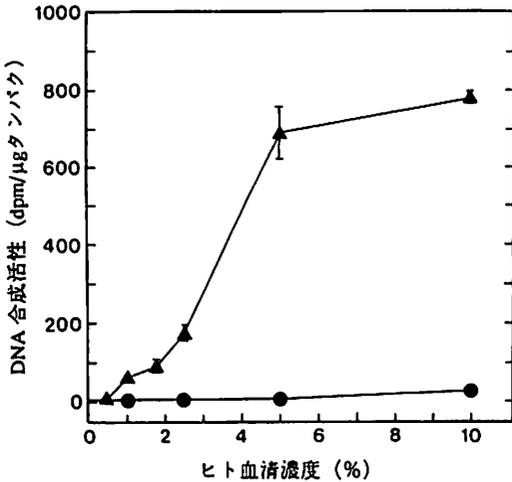


図2 ラット初代培養肝細胞のDNA合成に対する健康および劇症肝炎患者血清の影響¹¹⁾。

細胞は、図に示した濃度の血清存在下で48時間培養した後、³H-チミジンを加えて2時間パルス培養を行い、DNA合成活性を測定した。●、健康者8名の混合血清；▲、劇症肝炎患者血清。

は、70~80%の肝細胞が急速に壊死に陥る重篤な肝不全症であって、これは前述の2/3肝部分切除ラットに匹敵することから、このような状態で血清中にHGFが出現することは、後で考えれば当然のことであったが、その当時は全く気付かなかったことである。

我が国では、劇症肝炎の治療法の1つに血漿交換が行われている。そこで我々は、この血漿交換療法時に得られる患者血漿からHGFの精製を試み、約1年後の1986年に成功した¹²⁾。すなわち、HGFは分子量約6万の重鎖と約3万の軽鎖がS-S結合した分子量約9万のヘテロダイマーであり、肝細胞に対する増殖因子としてそれまで知られていた上皮増殖因子(EGF)やインスリンとは相加的あるいは相乗的に作用することから、これら既知の増殖因子とは異なる新しい因子であることを明らかにして、その年の日本生化学会大会で発表した。一方、ほぼ同時期にNakamuraら¹³⁾(九大、現阪大)は、ラット血小板からHGFの精製に成功し、HGFは分子量約27,000のシングルペプチドであると発表した。

その当時、「増殖因子はシングルペプチドで、分子量は数千からせいぜい3万まで」というのが一般的な常識であった。従って、我々の発表は「そんなに大きい増殖因子があるはずはない、ヘテロダイマーの軽鎖と称している3万の部分が活性部分で、未だ精製不十分なのであろう」と、学会などで強く批判された。我々の結果を投稿した英文誌のrefereeも同様で、ようやく

表1 HGF研究の歴史

-
- 1931: ラットの部分肝切除法の確立 (Higgins and Anderson¹⁾)。)
 - 1967: 部分肝切除ラットと正常ラットのparabiosis実験 (Moolten and Bucher²⁾)。)
 - 1969: ラットの初代培養肝細胞調製法の確立 (Berry and Friend³⁾)。)
 - 1982: ラットの初代培養肝細胞を用い、部分肝切除ラット血清が正常ラット血清よりDNA合成促進活性が高いことを報告 (Michalopoulos, et al.⁴⁾)。)
 - 1982: ラットの血小板にHGF活性が存在することを発見 (Strain, et al.⁵⁾)。)
 - 1984: 部分肝切除ラット血清からのHGF部分精製。分子量12万以上と3000以下の2種類がある (Michalopoulos, et al.⁷⁾)。分子量15万以上 (Nakamura, et al.⁸⁾)。)
 - 1985: 劇症肝炎患者血清中にHGF活性が出現することを発見 (Nakayama, et al.¹¹⁾)。)
 - 1986: 劇症肝炎患者血漿から、分子量約85,000 (ヘテロダイマー) のヒトHGFを精製 (Gohda, et al.¹²⁾)。)
 - 1986: ラット血小板から分子量27,000 (シングルペプチド) のHGFを精製 (Nakamura, et al.¹³⁾)。)
 - 1989: ヒトHGFのcDNAクローニングと1次構造の決定 (Miyazawa, et al.¹⁶⁾)。)
 - 1989: ヒトHGF (?) のcDNAクローニングと1次構造の決定 (Nakamura, et al.¹⁷⁾)。)
 - 1990: HGFとScatter Factor (SF) との構造類似性を指摘 (Gherardi and Stoker²⁴⁾)。)
 - 1991: HGFとSFが同一タンパクであることを証明 (Weidner, et al.¹⁹⁾)。)
 - 1991: HGFが種々の上皮系および内皮系細胞に対する増殖因子であることを証明 (Rubin, et al.²⁰⁾)。)
 - 1991: HGFとTumor Cytotoxic Factorが同一タンパクであることを証明 (Shima, et al.²¹⁾)。)
 - 1991: HGF受容体の1つがc-Met原癌遺伝子産物であることを発見 (Comoglioのグループ²⁵⁾ とAaronsonのグループ²⁶⁾ がほぼ同時)。
-

acceptされ、印刷公表された時は1988年になってしまっていた¹⁴⁾。また、その頃にはラット血小板やウサギの血清からも、我々が報告したHGFと同様のサブユニット構造を持つHGFが精製され¹⁵⁾、ようやく世の中に認められるようになった。しかしNakamuraらは、今もHGFを最初に精製したのは自分達であると主張し、HGFは分子量3万と6万のヘテロダイマーであると言いながらも、その文献には上記の「分子量約27,000のシングルペプチドである」と書いた1986年の論文¹³⁾を引用しているのである(表1参照)。

2. HGFの構造

HGFの構造は、1989年に2つのグループからは同時に発表されたcDNAのクローニングにより明らかにされた。その1つは、我々が関西医科大学の喜多村直実教授(現東工大)と三菱化学総合研究所との共同研究により、精製HGFから得た部分アミノ酸配列に基づいて作成したプローブを用いて、ヒト胎盤cDNAライブラリーから得られたものである¹⁶⁾(図3)。その結果、HGFは31アミノ酸残基からなるシグナルペプチドに続く463アミノ酸残基の重鎖と、234アミノ酸

残基の軽鎖が、1本のmRNAからまず不活性型のシングルペプチド(pro-HGF)として合成された後、Arg¹⁹⁴とVal¹⁹⁵間でプロセッシングを受け、生物学的な活性のある成熟型のヘテロダイマーに転換されることが明らかとなった。

一方、Nakamuraらは東洋紡研究所との共同研究により、ラット血小板由来の精製HGFの部分アミノ酸配列からプローブを合成し、ヒト肝臓のcDNAライブラリーからクローニングを行ったと発表した¹⁷⁾。しかし、これら2種のHGF cDNAを比較すると、その塩基配列から推定されるHGFの1次構造は、総アミノ酸の数では728個と一致するものの、この内14個のアミノ酸に相違が認められる。この相違の真の理由は明らかではないが、その後東洋紡のグループは、ヒト白血球のcDNAライブラリーから我々が得たcDNAと同一の塩基配列を持つものと、483~497番目の15塩基が欠如しているもの(deleted variant HGF, dHGF)の2種のHGF cDNAを得ている¹⁸⁾(図3参照)。また、ドイツのBirchmeierのグループ¹⁹⁾も東洋紡のグループがヒトの白血球から得た2種のcDNAと同じ配列を持つHGFのcDNA(MRC-5細胞由来)のクローンを得ており、NIHのAaronsonのグループ²⁰⁾はヒト胎児線維芽細胞(M426)からHGFと同一の増殖因子を精製したが、そのcDNAの塩基配列も我々の得たものと完全に一致している。さらに、雪印乳業生物科学研(当時)のHigashioのグループ²¹⁾が得たtumor cytotoxic factorは、次項で述べるようにHGFと同一タンパクであるが、このcDNA(IMR-90細胞由来)も、やはり483~497番目の15塩基が欠如しているものの、他は我々が得たcDNAと同一の塩基配列である。このように、我々が1989年に発表したHGFの1次構造は、その後4つの独立したグループからconfirmされていることになる。しかし、Nakamuraらが得たとするヒトHGF cDNAの配列は、その後もconfirmされていない。なお、Nakamuraらも、今はHGFの1次構造として我々が得たものと同じものを記載しているが、その文献には彼らの発表論文¹⁷⁾を引用し、我々の文献には触れていないことを付記しておく。

このcDNAから推定されるHGFのアミノ酸配列と、既知のタンパクのそれとの相同性を比較したところ、プラスミノーゲンなどの凝固線溶系のタンパクと高い相同性が認められ、特にプラスミノーゲンはCysの位置もほぼ一致した。図4は、ヒトのプラスミノーゲンの構造から推定したHGFの構造である。この内、重鎖N-末端付近には2個のS-S結合からなるヘアピン

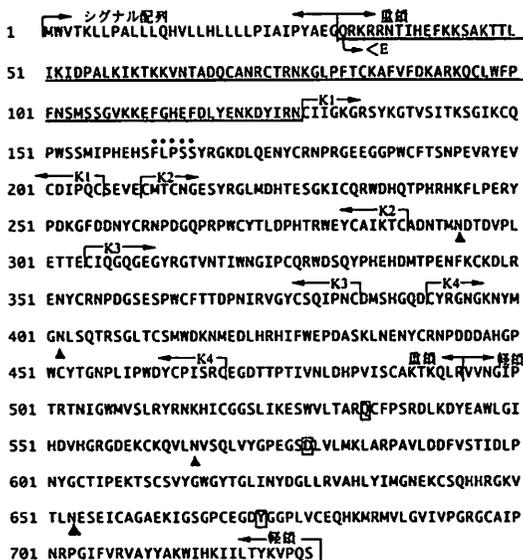


図3 HGF cDNAから推測されるHGFのアミノ酸配列(Miyazawaら¹⁶⁾に一部加筆)。

下線、ヘパリン結合部位；<E>、ピログルタミン酸；K1~K4、クリンゲル構造相当部位；●、dHGFで欠損しているアミノ酸残基；▲、N-結合型糖鎖結合部位；□、プラスミンにおけるセリンプロテアーゼ活性中心相当部位。

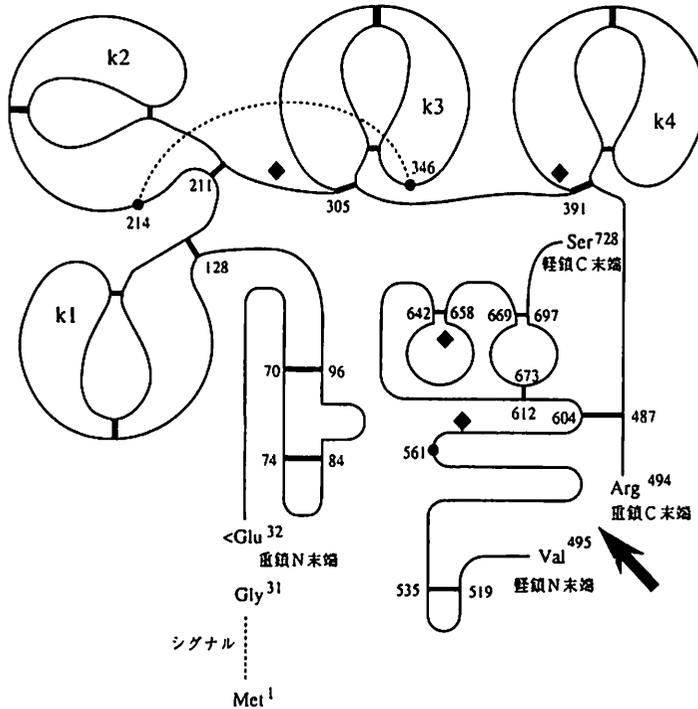


図4 プラスミノゲンの構造から推定したヒトHGFの構造。

数字は、タンパク合成開始部位のメチオニンから数えたアミノ酸残基の番号を示し、一本のmRNAから合成されたPro-HGFは、←の部位でHGFAなどによりプロセッシングを受けて活性化される。一、S-S結合部位；<Glu, ピログルタミン酸；K1~K4, クリングル構造；●, Cys残基；◆, N-結合型糖鎖結合部位。

ループが存在し、このヘアピンループを含む部位はヘパリンに対する親和性が高い。Pro-HGFはこの部位で細胞外基質に結合していると考えられている²²。ヘパリン結合部位に続くクリングル構造は、3個のS-S結合を基に描かれた平面構造が北欧のクリングルビスケットに似ていることから命名されたもので、血液凝固線溶系のタンパクによく見られ、タンパク間の相互作用に重要なドメインと推定されている。HGFでは、このクリングル構造が4個あり、受容体(c-Met)との結合に重要な役割を果たしていると推定されている。

Pro-HGFは、プラスミノゲンと同様にArgとValの間がプロセッシングを受けて生物学的な活性のあるHGFに転換されるが、HGFの軽鎖のアミノ酸配列を見ると、セリンプロテアーゼの活性中心であるHis, Asp, Serの内、HGFではHisとSerが他のアミノ酸と置換しているため(図3)、プロテアーゼとしての活性

はない。しかし、このようなHGFと凝固線溶系のタンパクと高い相同性は、HGFが生物進化の過程で、この凝固線溶系の遺伝子を利用して獲得されたものと推定される。

また、劇症肝炎患者血漿から精製したHGFおよび組換え体HGFの重鎖と軽鎖のN-末端アミノ酸をそれぞれ決定したところ、重鎖のN-末端は、最初のMetから数えて32番目のGlnが環状化したピログルタミン酸、軽鎖のそれは495番目のValであることを明らかにした²³。一方、Nakamuraらは重鎖のN-末端が55番目のProであると報告しているが²⁴、これも何らかの誤りであろう。

3. HGFの多様な生物活性

我々がこの研究を始めた当初、HGFは肝細胞に特異的な増殖因子と考えていたが、1991年に至り、HGF

には多様な生物活性のあることが次々と明らかにされた。その1つは、HGFが細胞分散因子 (scatter factor, SF) と同一タンパクであることの証明である。SFは、通常互いに固く結合している上皮細胞を個々に分散させ、さらに細胞に運動性を与える因子として、組織の発生や癌細胞の転移に関与していると考えられ、主としてヨーロッパで長く研究されていたものであるが、1990年頃からこのSFとHGFの構造類似性が指摘されるようになった²³⁾。これについて、我々はドイツのEssen大学との共同研究により、HGFとSFが同一タンパクであることを、その生物活性およびcDNAの分子クローニングにより明らかにした²⁴⁾。一方、東尾侃二博士ら(雪印乳業生物科学研究所)が、ある種の癌細胞に対して増殖抑制的に働く因子として研究を進めていたtumor cytotoxic factorも、HGFと同一タンパクであることが証明された²⁵⁾。さらに、米国NIHのAaronsonのグループが、広く上皮系および内皮系の細胞に対する増殖因子として研究を進めていた因子 (fibroblast-derived mitogen) も、1991年にHGFと同一タンパクで

あることが明らかとなった²⁶⁾。また、HGFの受容体は、c-Metと呼ばれる原癌遺伝子産物であることも同年に明らかとなった^{25, 26)}。従って、1991年以降HGFという1つのペプチド性因子は、1つの受容体を介して多種多様な生物活性を発現する広範囲・多機能型サイトカインの1つとして認識されるようになり、肝臓のみならず、種々の組織の再生、修復に不可欠の因子と考えられるようになったのである。表1は、ここまでのHGF研究の歴史をまとめたものである。

このような多様な生物活性のあるHGFの受容体が1つということは、c-Met以降の標的細胞内でのシグナル伝達経路が多様であることを意味している。c-MetにHGFが結合すると、c-Metの膜貫通型 β -鎖細胞内領域に存在するチロシキナーゼが活性化され、次いでそのC-末に位置する多機能型結合部位 (multi-functional docking domain) 中のチロシン残基 (特にTyr¹³⁰⁹とTyr¹³⁵⁶) が、自己リン酸化され、さらにSH2ドメインを持つ種々のシグナル伝達物質がここに結合して、以降の多様なシグナルを伝達すると考えられてい

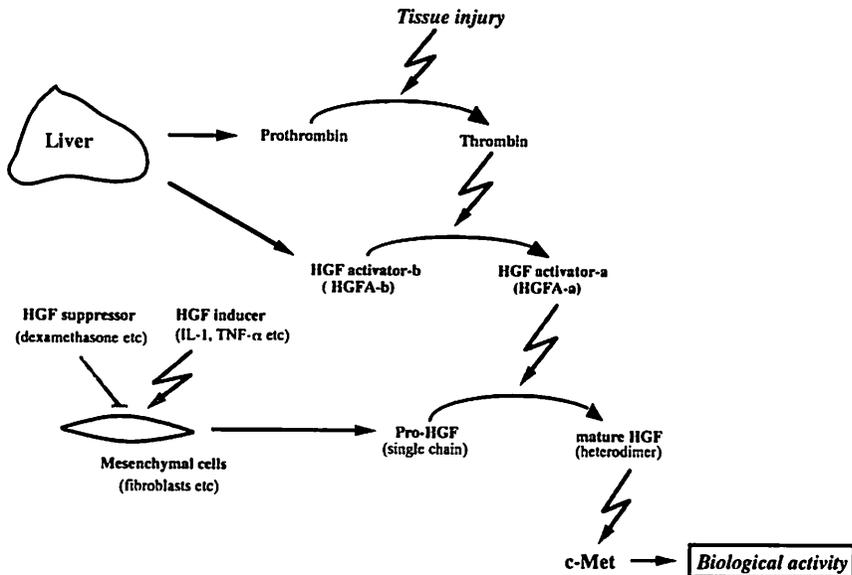


図5 HGF活性化のカスケード機構。

ProthrombinとHGFAの前駆体 (Pro-HGFA, HGFA-b) は、肝臓で合成され、血中に分泌されて循環している。一方不活性型のHGF (Pro-HGF) は、線維芽細胞などの間葉系細胞で合成され、細胞外基質に結合している。組織の傷害などで血液凝固系が活性化されると、prothrombinがthrombinに活性化され、thrombinがHGFAを活性化 (HGFA-a) する。このHGFA-aはヘパリンに親和性が高く、活性化された部位の細胞外基質に結合して、その部位のPro-HGFを活性型のHGFに転換する。次いで、HGFが上皮細胞などの受容体 (c-Met) に結合し、種々の生物学的な活性を現す。

る。これらについても多くの報告があるが、ここでは省略する。詳細は、その方面の総説など^{27, 28)}を参照されたい。

4. HGFの産生誘導と活性化

上記の研究結果から、それまで不明であったHGFの産生細胞は、主に間葉系の細胞(例えば繊維芽細胞)であることが分かってきた。これを受けて我々は、繊維芽細胞でのHGF産生が、IL-1やTGF- α などの炎症性サイトカインで誘導されることを初めて明らかにした²⁹⁾。さらにその後、多くのHGF産生誘導因子が示され²⁸⁾、また、口腔内細菌の菌体成分もHGF産生を誘導することが明らかになっている^{30, 31)}。

前述したように、HGFは1本のmRNAから生物学的な活性を持たないpro-HGFとして産生され、その後プロセッシングを受けて生物学的な活性のある成熟型(ヘテロダイマー)HGFとなる。このプロセッシングは、HGFの産生細胞内で起こると考えられていたが、その後、細胞からはpro-HGFとして分泌されることが明らかとなり、我々は、この細胞外でHGFを活性化

する因子がurokinaseであると1992年に発表した³²⁾。しかし、その約1年後にMiyazawa³³⁾らはpro-HGFに対してurokinaseよりはるかに活性の高い新規のセリンプロテアーゼを血清中に発見し、HGF-activator (HGFA)と命名した。現在では、HGF活性化の主役はこのHGFAと考えられている。

このHGFAも不活性型のpro-HGFAとして、主として肝臓で合成され、血中に分泌された後、thrombinなどによりプロセッシングを受けると活性型のHGFAとなる³⁴⁾。すなわち、HGFは血液凝固系のセリンプロテアーゼカスケード反応を介して活性化されるのであるが、さらに興味深いことに、pro-HGFAはヘパリンに対して親和性が低く、反対に活性化型HGFAはヘパリンに対して親和性が高い。前項で記したように、pro-HGFはヘパリンに対する親和性が高いため、細胞外基質と結合していると考えられていることから、HGFAはthrombinなどにより活性化された局所で細胞外基質と結合し、その部位のpro-HGFを活性化して、近傍のc-Metを発現している上皮系或いは内皮系の細胞に対してパラクリン的に作用し、組織の再生、修復

表2 種々のヒト体液中のHGF濃度 (Ohnishi and Daikuhara²⁹⁾を1部改変)

体 液	疾 患	HGF濃度 (pg/ml)	文 献
血清	健常	200 ± 170	(41)
	劇症肝炎	12,140 ± 14,420	(40, 41)
	急性肝炎	550 ± 1,040	(41)
	肝がん	480 ± 300	(41)
	急性膵炎	2,300 ± 610	(47)
脳脊髄液	対照疾患*1	30.7 ± 9.8	(48, 49)
	アルツハイマー病	81.2 ± 32.7	(48, 49)
涙	健常	186 - 290*2	(50)
	術後	453 - 619*2	(50)
歯肉溝滲出液	健常歯肉	1,700 ± 730	(44)
	歯周疾患	3,230 ± 1,010	(44)
尿		(pg/mg creatinine)	
	健常	9 ± 2	(51)
	健常	19.3 ± 7.1*3	(43)
	膀胱がん	139 ± 45	(51)

数値は、*2を除き平均 ± SD。

*1 神経障害および筋障害疾患。

*2 下限および上限値。

*3 高感度HGF ELISAで測定。

に関与していると考えられる (図5)。

5. HGFの生理的意義 (特に歯科医学分野)

HGFと同一タンパクと同定されたSFは、前述したように、胚の形成過程に関与する因子として研究されていたものである。Sonnenbergら³⁵⁾は、マウス発生期の種々の臓器で、HGFが間葉系組織で発現し、c-Metはその近傍の上皮組織で発現していることを明らかにして、HGFが上皮-間葉相互作用のmediatorであることを初めて示唆した。その後HGF欠損マウスが作られたが、このいわゆるHGFノックアウトマウスは胎生13~16日目にすべて死に至る^{36, 37)}。この事実は、HGFが種々の臓器の発生に不可欠の因子であることを示すものである³⁸⁾。

歯の発生においても同様であって、HGFは歯胚の歯乳頭細胞に、c-Metは内エナメル上皮細胞に発現して、正常な歯胚の形成に関与している。Tabataら³⁹⁾は、歯胚の器官培養系を用いて、HGFの発現を抑制すると異常な形態 (いわゆる'inside-out')の歯胚が形成されることを報告している。また、歯胚の形成期ではc-Metが歯乳頭の細胞にも発現しており、HGFがオーソクリンの歯乳頭の発育にも関与していると考えられる³⁹⁾。

体液中のHGF濃度は、種々の生理的或いは病理的な条件、特に組織の炎症時に上昇する (表2)。この内、最も顕著なものは劇症肝炎の時の血中濃度であって、劇症肝炎の診断に応用されているが⁴⁰⁾、この他にも種々の肝疾患の際に血中HGFの上昇が認められている⁴¹⁾。このような炎症或いは組織の再生時でのHGFの上昇は、炎症性サイトカインなどによるHGF産生誘導に由来すると考えられ、生体防御反応の1つとして、傷害を受けた組織の修復、再生に関与していると考えられている。特に、口腔内の粘膜組織は皮膚などに比べて傷の治癒が早く、また瘢痕形成が少ないことは古くから知られている事実であるが、その理由について口腔内の粘膜細胞でのHGF発現が皮膚などの細胞に比べ、より高いことが最近報告されており⁴²⁾、HGFを創傷治癒のための治療薬として応用し得る可能性を示唆している。さらに、種々の体液でHGFレベルの上昇を、疾患の診断に応用することも可能となろう。

上記のように、組織に炎症や傷害が起こるとHGFの産生が誘導されることは、種々の臓器でHGF mRNAレベルの上昇により確認されているが²⁸⁾、その局所での程度HGF濃度が上昇しているか、実際に測定し

た報告はない。我々は、歯周疾患患者の歯肉溝滲出液中に、その炎症の程度に応じて局所で産生されるHGF濃度が反映しているのではないかと考えた。しかし、採取量が10~20 μ lという微量な歯肉溝滲出液のHGF濃度を測定することは、我々が以前に開発し⁴⁰⁾、現在市販されているHGF ELISA (大塚製薬、測定感度: 200 pg/ml)では不可能である。そこで我々は、先ず高感度HGF ELISA (測定感度 2 pg/ml)を開発し⁴³⁾、これを用いて歯肉溝滲出液中のHGF濃度を測定したところ、健康歯肉では1.7 ng/ml、また歯周疾患歯肉では3.2 ng/mlであった⁴⁴⁾ (表2)。この濃度は、in vitroの系で歯肉上皮細胞の増殖を促進するに十分なものである³⁰⁾。またこの結果は、健康者血清中のHGF濃度が0.2 ng/ml (表2)であることを考え合わせると、歯肉では実際にHGFが産生され、さらにその炎症ではその産生が他の組織と同様に、種々のサイトカイン²⁹⁾やPGE₂⁴⁵⁾あるいは口腔内細菌の菌体成分^{30, 31)}などで誘導されていることを示している。ただ、歯周疾患では、上皮の増殖が疾患をかえって増悪させることも考えられるため、このHGFの産生誘導が生体防御反応なのか、或いはその反対なのかは議論の分かれるところであろう。しかし、HGFは強い血管新生作用も有することから、我々はHGFが歯周疾患の修復に働いていると考えている。また我々は、歯肉上皮組織ではHGFAも産生されていることも明らかにした⁴⁴⁾。

6. HGFの臨床応用

我々がヒトのHGFを発見して約20年が経過した。この間、肝疾患、腎疾患、血管病変などの実験動物疾患モデルにHGFを投与、あるいはHGF遺伝子を導入すると、症状の改善、死亡率の低下など、投与の有効性が数多く報告されている⁴⁶⁾。しかし、その実用応用はまだ緒についたばかりである。このうち、大阪大学の森下竜一助教授が、メドジーンバイオサイエンスとの協力により、HGF遺伝子をヒト閉塞性動脈硬化症などに導入する試みで成果を挙げておられ、近い内に実用化が期待されている。また、遺伝子組換え体HGFは、すでに1995年からSigmaなどから試薬として市販されており、これを用いてこれまで多くのHGF研究がなされたが、海外 (特にヨーロッパ)では、組換え体HGFを用いた人工肝臓の開発も進んでいる。さらに、2002年4月からは、京都大学医学部附属病院探索医療流動プロジェクトの1つとして、組換え体HGFを劇症肝炎などの肝疾患治療に用いる試み (研究代表者: 坪内博仁 宮崎医科大学第二内科教授)も発足し

た。これらの研究により、HGFの臨床応用が1日も早く実現することを期待すると共に、齒科分野での臨床応用にも道が開かれることを願っている。

謝 辞

我々のHGF研究の一部は、文部省（文部科学省）及び日本学術振興会の科学研究費補助金（一般研究、基盤研究、がん特別研究、特定領域研究など）、及びいくつかの民間企業からの奨学寄付金により遂行された。

文 献

- 1) Higgins, G. M. & Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver: I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *Arch. Pathol.*, 12, 186-202, 1931
- 2) Moolten, C. D. G. & Bucher, N. L. R.: Regulation of the rat liver. Transfer of humoral agent by cross circulation. *Science*, 158, 272-274, 1967
- 3) Berry, M. N. & Friend, D. S.: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell Biol.*, 43, 506-520, 1969
- 4) Seglen, P. O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Meth. Cell Biol.*, 13, 29-83, 1975
- 5) McGowan, J. A.: Hepatocyte proliferation in culture., In: *Isolated and Cultured Hepatocytes*, A. Guillouzo & C. Guguen-Guillouzo, Ed., 13-38, John Libbey Eurotext, Montrouge, 1986
- 6) Michalopoulos, G., Cianciulli, H. D., Novotny, A. R., Kligerman, A. D., Strom, S. C. & Jirtle, R. L.: Liver regeneration studies with rat hepatocytes in primary culture. *Cancer Res.*, 42, 4673-4682, 1982
- 7) Michalopoulos, G., Houck, K. A., Dolan, M. L., & Luetke, C.: Control of hepatocyte replication by two serum factors. *Cancer Res.*, 44, 4414-4419, 1984
- 8) Nakamura, T., Nawa, K., & Ichihara, A.: Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 122, 1450-1459, 1984
- 9) Strain, A. J., McGowan, J. A. & Bucher, N. L.: Stimulation of DNA synthesis in primary cultures of adult rat hepatocytes by rat platelet-associated substance(s). *In Vitro*, 18, 108-116, 1982
- 10) Russel, W. E., McGowan, J. A. & Bucher, N. C. R.: Partial characterization of a hepatocyte growth factor from rat platelets. *J. Cell. Physiol.* 119, 183-192, 1984
- 11) Nakayama, H., Tsubouchi, H., Gohda, E., Koura, M., Nagahama, J., Yoshida, H., Daikuhara, Y. & Hashimoto, S.: Stimulation of DNA synthesis in adult rat hepatocytes in primary culture by sera from patients with fulminant hepatic failure. *Biomed. Res.*, 6, 231-237, 1985
- 12) 合田栄一, 中山宏幸, 弘野修一, 坪内博仁, 崎山修, 橋本修治, 大工原恭: 劇症肝炎患者血漿からの肝細胞増殖因子の精製. *生化学*, 58: 906, 1986
- 13) Nakamura, T., Teramoto, H. & Ichihara, A.: Purification and characterization of a growth factor from rat platelets for mature parenchymal hepatocytes in primary culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 6489-6493, 1986
- 14) Gohda, E., Tsubouchi, H., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Miyazaki, H., Hashimoto, S. & Daikuhara, Y.: Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. *J. Clin. Invest.*, 81, 414-419, 1988
- 15) Tsubouchi, H., Gohda, E., Strain, A. J. & Daikuhara, Y.: The role of HGF-SF in animal and human hepatic physiology and pathology., In *Hepatocyte Growth Factor-Scatter Factor and the c-MET Receptor*, I. D. Goldberg, & E. Rosen, Ed., 251-273, Birkhauser Verlag, Basel, 1993
- 16) Miyazawa, K., Tsubouchi, H., Naka, D., Takahashi, K., Okigaki, M., Arakaki, N., Nakayama, H., Hirono, S., Sakiyama, O., Takahashi, K., Gohda, E., Daikuhara, Y. & Kitamura, N.: Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 163, 967-973, 1989
- 17) Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., & Shimizu, S.: Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature*, 342, 440-443, 1989
- 18) Seki, T., Ihara, I., Sugimura, A., Shimonishi, M., Nishizawa, T., Asami, O., Hagiya, M., Nakamura, T. & Shimizu, S.: Isolation and expression of cDNA for different forms of hepatocyte growth factor from

- human leukocyte. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 321-327, 1990
- 19) Weidner, K. M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y. & Birchmeier, W.: Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7001-7005, 1991
 - 20) Rubin, J. S., Chan, A. M.-L., Bottaro, D. P., Burgess, W. H., Taylor, W. G., Chech, A. C., Hirschfield, D. W., Wong, J., Miki, T., Finch, P. W. & Aaronson, S. A.: A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 415-419, 1991
 - 21) Shima, N., Nagao, M., Ogaki, F., Tsuda, E., Murakami, A. & Higashio, K.: Tumor cytotoxic factor/hepatocyte growth factor from human fibroblasts: Cloning of its cDNA, purification and characterization of recombinant protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 180, 1151-1158, 1991
 - 22) Aoyama, H., Naka, D., Yoshiyama Y., Ishii, T. & Kondo, J.: Isolation and conformational analysis of fragment peptide corresponding to the heparin-binding site of hepatocyte growth factor. *Biochemistry*, 36, 10286-10291, 1997
 - 23) Yoshiyama, Y., Arakaki, N., Naka, D., Takahashi, K., Hirono, S., Kondo, J., Nakayama, H., Gohda, E., Kitamura, N., Tsubouchi, H., Ishii, T., Hishida, T. & Daikuhara, Y.: Identification of the N-terminal residue of the heavy chain of both native and recombinant human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 175, 660-667, 1991
 - 24) Gherardi, E., & Stoker, M.: Hepatocyte growth factor and scatter factor. *Nature*, 346, 228, 1990
 - 25) Naldini, L., Weidner, M., Vigna, E., Gaudino, G., Bardelli, A., Ponzetto, C., Narsimhan, R., Hartmann, G., Zarnegar, R., Michalopoulos, G., Birchmeier, W. & Comoglio, P. M.: Scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable ligands for the Met receptor. *EMBO J.*, 10, 2867-2878, 1991
 - 26) Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chen, A. M.-L., Kmieciak, T. E., Vande Woude, G. F. & Aaronson, S. A.: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science*, 251, 802-804, 1991
 - 27) Schaeper, U., Gehring, N., Fuchs, K., Sachs, M., Kempkes, B., & Birchmeier, W.: Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J. Cell Biol.* 149, 1419-1432, 2000
 - 28) Ohnishi, T. & Daikuhara, Y: Hepatocyte growth factor/scatter factor in development, inflammation and carcinogenesis: Its expression and role in oral tissue. *Arch. Oral Biol.*, 48, 2003 (in press)
 - 29) M. Tamura, N. Arakaki, H. Tsubouchi, H. Takada and Y. Daikuhara. Enhancement of human hepatocyte growth factor production by interleukin-1 α and 1 β , and tumor necrosis factor- α by fibroblasts in culture. *J. Biol. Chem.*, 268, 8140-8145 (1993).
 - 30) A. Sugiyama, R. Arakaki, T. Ohnishi, N. Arakaki, Y. Daikuhara and H. Takada. Lipoteichoic acid and interleukin 1 stimulate synergistically production of hepatocyte growth factor (scatter factor) in human gingival fibroblasts in culture. *Infect. Immun.*, 64, 1426-1431 (1996).
 - 31) A. Sugiyama, T. Ogawa, Y. Daikuhara, and H. Takada. Enhancement of hepatocyte growth factor (scatter factor) production by human gingival fibroblasts in culture stimulates with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. *J. Med. Microbiol.*, 49, 319-325 (2000).
 - 32) Naldini, L., Tamagnone, L., Vigna, E., Sachs, M., Hartmann, G., Birchmeier, W., Daikuhara, Y., Tsubouchi, H., Blasi, F. & Comoglio, P. M.: Extracellular proteolytic cleavage by urokinase is required for activation of hepatocyte growth factor/scatter factor. *EMBO J.*, 11, 4825-4833, 1992
 - 33) Miyazawa, K., Shimomura, T., Kitamura, A., Kondo, J., Morimoto, Y. & Kitamura, Y.: Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for a human serine protease responsible for activation of hepatocyte growth factor. Structural similarity of the protease precursor to blood coagulation factor XII. *J. Biol. Chem.*, 268, 10024-10028, 1993
 - 34) Shimomura, T., Kondo, J., Ochiai, M., Naka, D., Miyazawa, K., Morimoto, Y. & Kitamura N.: Activation of the zymogen of hepatocyte growth factor activator by thrombin. *J. Biol. Chem.*, 268, 22927-22932, 1993

- 35) Sonnenberg, E., Meyer, D., Weidner, K. M. & Birchmeier, C.: Scatter factor/hepatocyte growth factor and its receptor, the c-met tyrosine kinase, can mediate a signal exchange between mesenchyme and epithelia during mouse development. *J. Cell Biol.*, 123, 223-235, 1993
- 36) Schmidt, C., Bladt, F., Goedecke, S., Brinkmann, V., Zschiesche, W., Sharpe, M., Gherardi, E., and Birchmeier, C. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature*, 373: 699-702, 1995
- 37) Uehara, Y., Minowa, O., Mori, C., Shiota, K., Kuno, J., Noda, T., and Kitamura, N. Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature*, 373: 702-705, 1995
- 38) Tabata, M. J., Kim, K., Liu, J.-G., Yamashita, K., Matsumura, T., Kato, J., Iwamoto, M., Wakisaka, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kumegawa, M. & Kurisu, K.: Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in murine molars. *Development*, 122, 1243-1251, 1996
- 39) Kajihara, T., Ohnishi, T., Arakaki, N., Semba, I. & Daikuhara, Y.: Expression of hepatocyte growth factor/scatter factor and c-met in human dental papilla and fibroblasts from dental papilla. *Arch. Oral Biol.*, 44, 135-147, 1999
- 40) Tsubouchi, H., Niitani, Y., Hirono, S., Nakayama, H., Gohda, E., Arakaki, N., Sakiyama, O., Takahashi, K., Kimoto, M., Kawakami, S., Setoguchi, M., Tachikawa, T., Shin, S., Arima, T. & Daikuhara, Y.: Levels of the human hepatocyte growth factor in serum of patients with various liver diseases determined by an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology*, 13, 1-5, 1991
- 41) 武藤泰敏ほか23名：肝疾患患者における血清ヒト肝細胞増殖因子 (hHGF) レベル測定の臨床的意義—全国19施設による検討—。 *肝胆臓*, 25: 541-549, 1992
- 42) Okazaki, M., Yoshimura, K., Uchida, G. & Harii, K.: Elevated expression of hepatocyte and keratinocyte growth factor in cultured buccal-mucosa-derived fibroblasts compared with normal-skin-derived fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.*, 30, 108-115, 2002
- 43) Ohnishi, T., Kakimoto, K., Hashida, S., Fujii, M., Hirono, S., Nishiyama, K., Amita, Y., Ishikawa, E., Tsubouchi, H. & Daikuhara, Y.: Development of highly sensitive enzyme-linked immunosorbent assays for hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF): determination of HGF/SF in serum and urine from normal human subjects. *J. Immunol. Meth.*, 244, 163-173, 2000
- 44) Kakimoto, K., Machigashira, M., Ohnishi, T., Kajihara, T., Semba, I., Setoguchi, T., Tamura, M., Izumi, Y. & Daikuhara, Y.: Hepatocyte growth factor (HGF) levels in gingival crevicular fluid and distribution of HGF-activator in gingival tissue from adult periodontitis. *Arch. Oral Biol.*, 47, 655-663, 2002
- 45) Ohnishi, T., Suwa, M., Oyama, T., Arakaki, N., Torii M., & Daikuhara, Y.: Prostaglandin E₂ predominantly induces production of hepatocyte growth factor/scatter factor in human dental pulp in acute inflammation. *J. Dent. Res.*, 79, 748-755, 2000
- 46) 田村正人, 大工原恭: HGF (肝細胞増殖因子), 蛋核酵, 45 (増刊号, 最先端創薬), 1152-1157, 2000
- 47) Ueda, T., Takeyama, Y., Toyokawa, A., Kishida, S., Yamamoto, M. & Saitoh, Y.: Significant elevation of serum human hepatocyte growth factor levels in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*, 12, 76-83, 1996
- 48) Tsuboi, Y., Kakimoto, K., Akaku, H., Daikuhara, Y. & Yamada, T.: Hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid in neurologic disease. *Acta Neurol. Scand.*, 106, 79-103, 2000
- 49) Tsuboi, Y., Kakimoto, K., Nakajima, M., Akatsu, H., Yamamoto, T., Ogawa, K., Ohnishi, T., Daikuhara, Y. & Yamada, T.: Increased hepatocyte growth factor level in cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.*, 107, 81-86, 2003
- 50) Li, Q., Weng, J., Mohan, R. R., Bennett, G. L., Schwall, R., Wang, Z.-F., Tabor, K., Kim, J., Hargrave, S., Cuevas, K. H. & Wilson, S. E.: Hepatocyte growth factor and hepatocyte growth factor receptor in the lacrimal gland, tears, and cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 37, 727-739, 1996
- 51) Rosen, E. M., Joseph, A., Jin, L., Yao, Y., Chau, M. T., Fuchs, A., Gomella, L., Hastings, H., Goldberg, I. D., & Weiss, G. H.: Urinary and tissue levels of scatter factor in transitional cell carcinoma of bladder. *J. Urol.*, 157, 72-78, 1997

平成14年度鹿児島大学歯学部公開講座

「歯科医療の最前線：顎口腔機能の再建」

日 時：平成14年12月8日（日）

場 所：鹿児島県歯科医師会館

主 催：鹿児島大学歯学部

共 催：鹿児島県歯科医師会

開会式：鹿児島県歯科医師会長 四元 貢

鹿児島大学歯学部長 大工原 恭

1. 総義歯難症例への対処法とガラス繊維補強型高分子材料のクラスプへの応用
濱野 徹（歯学部附属病院第二補綴科，講師）
2. 顔と口の機能再建－矯正学的アプローチ－
黒江 和斗（歯学部歯科矯正学講座，助教授）
3. 顎口腔機能の再建に関連する組織破壊と再生の機構
仙波伊知郎（歯学部口腔病理学講座，助教授）
4. 言葉と容貌を治す－最近の唇裂・口蓋裂治療－
三村 保（歯学部口腔外科学講座，教授）

実施報告

世話人 北野 元生（歯学部口腔病理学講座，教授）

本公開講座は鹿児島大学歯学部の主催で、鹿児島県歯科医師会の協力により開催された。顎口腔顔面領域における、形態的機能的の障害の回復ないしは克服は歯科医療および歯科医学の本来の課題である。そこで今回は再建医療再建医学の現状について、臨床から3題、病理から1題、上記のタイトルで、4人の専門領域の方々に講演を依頼した。講演時間が限られていたが、内容は豊富且つ高度で、しかも平易な表現を心掛けていただき、聴講生にとっても益するところ大であったと考えられる。本公開講座の最後に設けられた総合討論の時間内にも、熱心な質疑応答があった。ある種の感動を覚えた公開講座であった。

鹿児島大学歯学部公開講座

「三次元的X線診断に基づく歯科治療」を終えて

世話人 馬嶋 秀行 (歯学部歯科放射線学講座, 教授)

平成14年7月28日, 鹿児島県歯科医師会館にて鹿児島大学歯学部公開講座「三次元的X線診断に基づく歯科治療」を鹿児島大学歯学部の主催, 及び鹿児島県歯科医師会の共催のもとに行った。鹿児島県歯科医師会から16名の参加を賜った。

当日のプログラムは以下のとおりであった。

7月28日

- 9:00 開講式 司会・進行 和泉 雄一 教授 (歯科保存学講座Ⅱ)
- 9:02 鹿児島県歯科医師会会長挨拶 四元 貢 会長
- 9:06 鹿児島大学歯学部長挨拶 大工原 恭 学部長
- 9:10 X線CT再構築画像を用いたインプラントのための診断法
馬嶋 秀行 教授 (歯科放射線学講座)
- 10:00 歯周治療とインプラント治療への三次元的X線診断の応用
古市 保志 助教授 (歯科保存学講座Ⅱ)
- (10:50~11:00 休憩)
- 11:00 X線CTを用いたインプラントシミュレーターシステムの実際
森田 康彦 講師 (歯科放射線学講座)
- 11:50 顎変形症治療における歯列・顎骨・顔面軟組織三次元画像の臨床応用
野添 悦郎 講師 (口腔外科学講座Ⅱ)
- 12:40 総合討論
- 13:00 閉講式

プログラムにあるように, 本公開講座の司会は鹿児島大学歯学部歯科保存学講座Ⅱの和泉雄一教授が行った。鹿児島大学歯学部附属病院では, 平成13年8月に歯科インプラント専門外来を開設し, 現在に至っている。専門外来は, 歯周病治療科, 第1口腔外科, 第2口腔外科, 第1補綴科, 第2補綴科および歯科放射線科が協力して担当し, (1)これまで各々の診療科単位で計画・実施されていたインプラント治療を外科的, 補綴的, 歯周病学的, 放射線学的見地を踏まえて総合的に行うために, また, (2)顎堤増大術などの前処置を積極的に行い, インプラント適応患者の拡大を図る, という目的のもとに開設された。和泉雄一教授は歯科インプラント専門外来の中心的存在である。

講座の開会に際し, まず, 鹿児島県歯科医師会会長 四元 貢先生に, 「IT革命により情報・通信技術が急速に進行している昨今ではあるが, こう言ったことから, 今年度の公開講座は, 極めて価値あるものになると確信する。本講座「三次元的X線診断に基づく歯科治療」—インプラント・顎変形症への応用—は, 鹿児島県においてもインプラントが臨床家の間でこの数年間に着実に定着しつつあり, また, 放射線もデジタル化が急速に進んでいるので, 実に時期を得たものと思う。」と御挨拶を賜った。次に, 鹿児島大学歯学部長 大工原恭教授より, 「歯科放射線学講座の教官と, 実際にインプラントや顎変形症の診療を行っている教官が協力して, 三次元的なX線診断に基づくこれらの診断と治療, そしてその問題点などを提示し, 本講座が, 皆様方の今後の診療に少しでもお役に立てば幸いです。このような公開講座は地域に密着した大学のあり方であり, 本学部も今後さらにその方向への努力を続けたいと考えております。皆様方の御支援をお願いいたします。」と挨拶された。

講演の第一番目は, 私, 馬嶋秀行が「X線CT再構築画像を用いたインプラントのための診断法」と

題して行った。インプラント術の成功は、オーラルセルフケア管理指導、診断、インプランテーション計画、スーパーストラクチャー計画、術式、スーパーストラクチャー試適、治療管理、スーパーストラクチャー調整、そして術後管理からなる。通常、インプランテーションでは、インプラント挿入に十分な骨量保持が顎骨に得られることは、その喪失の経過から少なく、また、下顎管の位置等の隣接により、術前に骨量の3次元的な把握が要求され、しかも植立方向等の術前計画の必要性から、顎口腔の全体の把握が要求される。そのため、インプラント術式の成功の第1のステップとしては診断は重要である。このような診断にはCTを用いた3次元的診断が有効となる。このCTを用いたインプラント診断は15年程前にさかのぼり始められ、演者はその応用開発に携わった。講演では、インプラントのためのCTを用いた診断の歴史的背景とその意義について解説した。

2番目の講演では歯科保存学講座Ⅱの古市保志助教授が「歯周治療とインプラント治療への3次元的X線診断の応用」と題して行った。歯を支えている歯槽骨の形態が3次元的に分析され、立体的な像として表記されれば歯周治療において治療計画を立案するにあたり有意義なものになる。そこで、診療科においては、歯周支持骨の形態に関して3次元的に構築されたX線写真像と従来のレントゲン写真の両者間で診断結果を比較・検討する研究を行っている。講演ではその結果を紹介した。

3番目の演者は歯科放射線科の森田康彦講師で、「X線CTを用いたインプラントシミュレータシステムの実際」について講演し、CT3次元画像やMPRを駆使した歯科インプラントシミュレータについて、実際の運用例について報告した。現在、新しい世代のインプラントシミュレータと術中ガイドが開発されている。頭頸部診断のためにSiemens社CT装置、Somatom Plus（スパイラルCT）を運用しているが、このCT装置で撮影して得られた画像データをもとに、Materialize社Mimics（医療用画像変換、3D画像作成用コンピューターソフト）、Surgicase Pro（インプラント設計用コンピューターソフト）を用いてインプラント植立のシミュレーションを行なっている。加えて、講演ではこの新しい世代のインプラントシミュレータの使用例から今後の方向についても演者の展望を述べた。

尚、本歯科インプラントシミュレータ平成14年春から運用を開始し、開業歯科医院より十数例の患者さんを紹介していただき、ご好評をいただいている。まだご利用のない先生方からもぜひ患者さんをご紹介していただき、このシステムを活用していただきたいと述べた。

4番目の演者は口腔外科学講座Ⅱの野添悦郎講師であり、「顎変形症治療における歯列・顎骨・顔面軟組織三次元画像の臨床応用」と題して講演を行った。当科では、顎変形症患者の外科矯正術について、セファログラム上で骨移動の計画を作成し、患者さんへの術前の説明では、骨ラインの外側に術後の軟組織の予測ラインを描記し、顔貌の変化の説明を行っている。今回、外科矯正術後の骨移動量と軟組織移動量に関する報告をもとに、顎変形症（下顎前突症）患者の術後の軟組織移動量を予測し、骨格上に軟組織を構築するコンピューターソフトを用いて術後の顔貌（正面像、側面像）予測を行った。その結果、予測値と実測値を比較したところ、よい一致が得られたので、今後患者さんへの術前の説明に活用できるのではないかと考えていると締めくくった。

最後にお忙しいところ参加していただいた鹿児島県歯科医師会会長四元 貢先生はじめ鹿児島県歯科医師会の16名の参加された先生方、また歯科医師会側で準備をしてくださった先生方、歯学部長大工原恭先生はじめ歯学部側で準備をいただいた歯学部事務の方々、諸先生方に感謝をいたします。鹿児島大学歯学部では、インプラント診療を初め、益々と患者サービスを行って参りたいと思いますので、今後とも是非よろしく願います。

鹿児島大学歯学部発表論文〔2001年 SCI (またはJCR) リスト雑誌で公表された業績〕

1. Yasui, K., Saiga, H., Wang, Y., Zhang, P.J., & Semba, I.: Early expressed genes showing a dichotomous developing pattern in the lancelet embryo. **Develop. Growth Differ.**, 43(2), 185-194, 2001
2. Kaji, T., Aizawa, S., Uemura, M., & Yasui, K.: Left-right asymmetric oral innervation involving the oral nerve ring in lancelets. **Zool. Sci.**, 18(4), 460-461, 2001
3. Kaji, T., Aizawa, S., Uemura, M., & Yasui, K.: Establishment of left-right asymmetric innervation in the lancelet oral region. **J. Comp. Neurol.**, 435(4), 394-405, 2001
4. Sato, I. & Shimada, K.: Quantitative analysis of tenascin in chordae tendineae of human left ventricular papillary muscle with aging. **Ann Anat.**, 183, 443-448, 2001
5. Itoh, M., Moriyama, H., Tokunaga, Y., Miyamoto, K., Nagata, W., Satriotomo, I., Shimada, K., & Takeuchi, Y.: Embryological consideration of drainage of the left testicular vein into the ipsilateral renal vein: analysis of cases of a double inferior vena cava. **Int J Androl.** 24, 142-152, 2001
6. Takenaka, M., Mine, K., Ogata, T., Someda, H., Onishi, T., & Nakano, K.: Human skeletal remains of the protohistoric Kofun period from the Shimauchi underground corridorstyle burial chambers in Ebino, Miyazaki prefecture. **Anthropol Sci.** 109, A19, 2001
7. Mine, K., & Ogata, T.: Flat head in Chin-Dan described in the Chinese historical records, with special reference to deformed crania from the Yean-ri site, Korea. **Anthropol Sci.** 109, P4, 2001
8. Iyota, H., Shimada, K., Abe, K., Ikeda, N., Motomura, K., & Aratono, M.: Effect of the head group of surfactant on the miscibility of sodium chloride and surfactant in an adsorbed film and micelle. **J Colloid Interf Sci.** 234, 322-327, 2001
9. Yamaguchi, K., Harada, S., Kanemaru, N., & Kasahara, Y.: Age-related alteration of taste bud distribution in the common marmoset. **Chem. Senses**, 26, 1-6, 2001
10. Sugawara, S., Uehara, A., Nochi, T., Yamaguchi, T., Ueda, H., Sugiyama, A., Hanzawa, K., Kumagai, K., Okamura, H., & Takada, H.: Neutrophil proteinase 3-mediated induction of bioactive IL-18 secretion by human oral epithelial cells. **J. Immunol.**, 167, 6568-6575, 2001
11. Nashimoto, M., Nashimoto, C., Tamura, M., Kaspar, R.L., & Ochi, K.: The inhibitory effect of the autoantigen La on in vitro 3' processing of mammalian precursor tRNAs. **J. Mol. Biol.** 312, 975-984, 2001
12. Qian, Z., Gelzer-Bell, R., Yang, S.X., Cao, W., Ohnishi, T., Wasowska, B.A., Hruban, R. H., Rodriguez, E. R., Baldwin, 3rd, W.M., & Lowenstein, C.J.: Inducible nitric oxide synthase inhibition of weibel-palade body release in cardiac transplant rejection. **Circulation**, 104, 2369-2375, 2001
13. Warn, R., Harvey, P., Warn, A., Folney-Comer, A., Heldin, P., Versnel, M., Arakaki, N., Daikuhara, Y., Laurent, C. J., Sarah, S. E., Herrick, E., & Mutsaers, S. E.: HGF/SF induces mesothelial cell migration and proliferation by autocrine and paracrine pathways. **Exp. Cell Res.**, 267, 258-266, 2001
14. Hirano, M., Tanuma, J., Shimoda, T., Sugihara, K., Tsuneyoshi, M., & Kitano, M.: Solitary fibrous tumor in the mental region. **Pathol. Intern.**, 51, 905-908, 2001
15. Semba, I., Funakoshi, S., & Kitano, M.: Histomorphometrical analysis of age changes in the human inferior alveolar artery. **Arch. Oral Biol.**, 46, 13-21, 2001
16. Tanuma, J., Fujii, K., Hirano, M., Matsuuchi, H., Shisa, H., Hiai, H., & Kitano, M.: Five quantitative trait loci affecting 4-nitroquinoline 1-oxide-induced tongue cancer in the rat. **Jpn. J. Cancer Res.**, 92, 610-616, 2001
17. Kanbara, K., Sato, S., Tanuma, J., Tamura, H., Gotoh, K., Yoshimori, M., Kanamoto, T., Kitano, M., Fujii, N., & Nakashima, H.: Biological and genetic characterization of a human immunodeficiency virus strain resistant to CXCR4 antagonist T134. **AIDS Res. Hum. Retrov.**, 17, 615-622, 2001

18. Watanabe, N., Okochi, E, Hirayama, Y., Shimada, Y, Yanagihara, K., Yoshida, M. C., Takahashi, S., Mochizuki, M., Sugimura, T., Nagao, M., & Ushijima, T.: Single nucleotide instability without microsatellite instability in rat mammary carcinomas. **Cancer Res.**, 61, 2632-2640, 2001
19. Oba, K., Matsuyama, H., Yoshihiro, S., Kishi, F., Takahashi, M., Tsukamoto, M., Kinjo, M., Sagiyama, K., & Naito, K.: Two putative tumor suppressor genes on chromosome arm 8p may play different roles in prostate cancer.: **Cancer genetics and cytogenetics.**, 124(1), 20-26, 2001
20. Monodane, T., Kawabata, Y., Yang, S., Hase, S., & Takada, H.: Induction of necrosis factor-alpha and interleukin-6 in mice in vivo and in murine peritoneal macrophages and human whole blood cells in vitro by *Micrococcus luteus* teichuronic acids.: **Journal of medical microbiology.**, 50(1), 4-12, 2001
21. Jiang, Y., Satoh, K., Aratsu, C., Komatsu, N., Fujimaki, M., Nakashima, H., Kanamoto, T., & Sakagami, H.: Diverse biological activity of polycapphenol.: **In vivo Athens.**, 15(2), 145-149, 2001
22. Miura, K., Inouye, S., Sakai, K., Takaoka, H., Kishi, F., Tabuchi, M., Tanaka, T., Matsumoto, H., Shirai, M., Nakazawa, T., & Nakazawa, A.: Cloning and characterization of adenylate kinase from *Chlamydia pneumoniae*.: **The Journal of biological chemistry.**, 276(16), 13490-13498, 2001
23. Kanamoto, T., Kashiwada, Y., Kanbara, K., Gotoh, K., Yoshimori, M., Goto, T., Sano, K., & Nakashima, H.: Anti-human immunodeficiency virus activity of YK-FH312 (a betulinic acid derivative), a novel compound blocking viral maturation.: **Antimicrobial agents and chemotherapy.**, 45(4), 1225-1230, 2001
24. Yang, S., Sugawara, S., Monodane, T., Nishijima, M., Adachi, Y., Akashi, S., Miyake, K., Hase, S., & Takada, H.: *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14- and toll-like receptor 4-dependent manner.: **Infection and Immunity.**, 69(4), 2025-2030, 2001
25. Suminami, Y., Kishi, F., Murakami, A., Sakaguchi, Y., Nawata, S., Numa, F., & Kato, H.: Novel forms of squamous cell carcinoma antigen transcripts produced by alternative splicing.: **Biochimica et biophysica acta.**, 1519(1-2), 122-126, 2001
26. Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Gotoh, K., Kanamoto, T., Xu, Y., Kodama, E., Matsuoka, M., Hattori, T., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otaka, A., & Fujii, N.: Development of specific CXCR4 inhibitors possessing high selectivity indexes as well as complete stability in serum based on an anti-HIV peptide T140.: **Bioorganic and medicinal chemistry letters.**, 11(14), 1897-1902, 2001
27. Tamamura, H., Omagari, A., Hiramatsu, K., Kanamoto, T., Gotoh, K., Kanbara, K., Yamamoto, N., Nakashima, H., Otaka, A., & Fujii, N.: Synthesis and evaluation of bifunctional anti-HIV agents based on specific CXCR4 antagonists-AZT conjugation.: **Bioorganic and medicinal chemistry.**, 9(8), 2179-2187, 2001
28. Gunshin, H., Allerson, C.R., Polycarpou-Schwartz, M., Rofts, A., Rogers, J.T., Kishi, F., Hentze, M.W., Rouault, T.A., Andrews, N.C., & Hediger, M.A.: Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter.: **Federation of European Biochemical Societies Letters.**, 509, 309-316, 2001
29. Omori, K., Arikawa, H., & Inoue, K.: An evaluation of elastomeric impression materials based on surface compressive strength. **J Oral Rehabil.**, 28, 320-327, 2001
30. Song, Y. X. & Inoue, K.: Linear shrinkage of photo-activated composite resins during setting. **J Oral Rehabil.**, 28, 335-341, 2001
31. So, T., Ito, H.-O., Hirata, M., Ueda, T., & Imoto, T.: Contribution of conformational stability of hen lysozyme to induction of type 2 T-helper immune responses. **Immunology**, 104, 259-268, 2001
32. Sakai, Y., Shimauchi, H., Ito, H.-O., Kitamura, M., & Okada H.: *Porphyromonas gingivalis*-Specific IgG subclass antibody levels as immunological risk indicators of periodontal bone loss. **J. Clin. Periodontol.**, 28, 853-859, 2001
33. Furuichi, Y., Ito, H.-O., Izumi, Y., Matsuyama, T., Yotsumoto, Y., Mishige, Y., Kojima, M., Yamashita,

- K., & Inoue, M.: Periodontal status and serum antibody titers for *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in a rural population in Japan. **J. Clin. Periodontol.**, 28, 264-269, 2001
34. Sakuta, T., Matsushita, K., Yamaguchi, N., Oyama, T., Motani, R., Koga, T., Nagaoka, S., Abeyama, K., Maruyama, I., Takada, H., & Torii, M.: Enhanced production of vascular endothelial growth factor by human monocytic cells stimulated with endotoxin through transcription factor SP-1. **J. Med. Microbiol.**, 50, 233-237, 2001
35. Tokuda, M., Sakuta, T., Fushuku, A., Torii, M., & Nagaoka, S.: Regulation of Interleukin-6 Expression in Human Dental Pulp Cell Cultures Stimulated with *Prevotella intermedia* Lipopolysaccharide. **J. Endodont.**, 27, 273-277, 2001
36. Suthin, K., Matsushita, K., Machigashira, M., Torii, M., & Izumi, Y.: Possible Roles of Vascular Endothelial Growth Factor in Periodontal Tissue: Expression of VEGF in Human Gingival and Periodontal Ligament Fibroblasts and Its Effects on the Cells in Culture. **J. Hard Tissue Biology**, 10, 85-88, 2001
37. Noguchi, K., Tominaga, Y., Matsushita, K., Izumi, Y., Endo, H., Kondo, H., & Ishikawa, I.: Upregulation of matrix metalloproteinase-1 production by prostaglandin F2 α in human gingival fibroblasts. **J. Periodont. Res.**, 36, 334-339, 2001
38. Sugiyama, A., Uehara, A., IKI, K., Matsushita, K., Nakamura, R., Ogawa, T., Sugawara, S., & Takada, H.: Activation of human gingival epithelial cells by cell-components of black-pigmented bacteria: augmentation of production of interleukin-8, granulocyte colony stimulating factor and granulocyte-macrophage colony stimulating factor and expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1). **J. Microbiol.**, In press. 2001
39. Imamura, T., Matsushita, K., Travis, J & Potempa. J.: Inhibition of Trypsin-Like Cysteine Proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* by Tetracycline and the Analogues. **Antimicrob. Agents Chemother.** 45, 2871-2876, 2001
40. Tamai, R., Sakuta, T., Matsushita, K., Torii, M., Takeuchi, O., Akira, S., Espevik, T., Sugawara, S & Takada, H.: Interferon- γ Primed Gingival Fibroblasts that Highly Express CD14 to Enhance Production of Interleukin-8 in Response to Lipopolysaccharide through Up-Regulation of CD14, Toll-Like Receptor 4 and Myd88 mRNA Expression. **Infect. Immun.**, In Press. 2001
41. Noguchi, K., Iwasaki, K., Shitashige, M., Umeda, M., Izumi, Y., Murota, S., & Ishikawa, I.: Downregulation of lipopolysaccharide - induced intercellular adhesion molecule-1 expression via EP2 /EP4 receptors by prostaglandin E₂ in human fibroblasts. **Inflammation**, 25, 75-81, 2001
42. Noguchi, K., Shitashige, M., Endo, H., Kondo, H., Yotsumoto, Y., Izumi, Y., Nitta, H., & Ishikawa, I.: Involvement of cyclooxygenase-2 in serum-induced prostaglandin production by human oral gingival epithelial cells. **J. Periodont. Res.**, 36, 124-130, 2001
43. Di Gregorio, G.B., Yamamoto, M., Ali, A.A., Abe, E., Roberson, P., Manolagas S.C. & Jilka, R.L.: Attenuation of the self-renewal of transit-amplifying osteoblast progenitors in the murine bone marrow by 17 β -estradiol. **J. Clin. Invest.**, 107, 803-812, 2001
44. Mancino, A.T., Klimberg, V.S., Yamamoto, M., Manolagas, S.C. & Abe, E.: Breast cancer increases osteoclastogenesis by secreting M-CSF and upregulating RANKL in stromal cells. **J. Surg. Res.**, 100, 18-24, 2001
45. Tanaka, N., Sugihara, K., Odajima T., Mimura, T., Kimijima, Y. & Ichinose, S.: Oral squamous cell carcinoma: electron microscopic and immunohistochemical characteristics **Med Electron Microsc.**, 35, 127-138, 2002
46. Sakamoto, R., Nitta, T., Kamikawa, Y., Kono, S., Kamikawa, Y., Sugihara, K., Tsuyama, S. & Murata, F.: Histochemical, immunohistochemical, and ultrastructural studies of gingival fibromatosis: a case

- report. *Med Electron Microsc.* 35, 248-254, 2002
47. Kaneko, S., Yoshimura, T., Ikemura, K., Shirasuna, K., Kusukawa, J., Ohishi, M., Shiba, R., Sunakawa, H., Tominaga, K., Sugihara, K., Shinohara, M., Katsuki, T., Yanagisawa, T., Kurokawa, H., Mimura, T., Ikeda, H., Yamabe, S. & Ozeki, S.: Primary neck management among patients with cancer of the oral cavity without clinical nodal: :metastases: A decision and sensitivity analysis
 48. Soejima, K., Klein-Nulend, J., Semeins, C.M., & Burger, E.H.: Different responsiveness of cells from adult mouse and neonatal mouse bone to mechanical and biochemical challenge, *J Cell. Physiol.* 186: 366-370, 2001
 49. Bakker, A.D., Soejima, K., Klein-Nulend, J., & Burger, E.H.: The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent, *J. Biomech.*, 34: 671-677, 2001
 50. Yoshihara, T., Matsumoto, Y., Honma, S., Ogura, T. & Honma, K. Liquid meal attenuates meal anticipation in rat adrenocortical activity *Physiol Behav.* 74(12), 133-137, 2001
 51. Yoshihara, T., Matsumoto, Y., & Ogura, T. Occlusal Disharmony Affects Plasma Corticosterone and Hypothalamic Noradrenaline Release in Rats *J Dent Res.* 80, 2089-2092, 2001
 52. Zhao, Y., Xue, Y., Oberley, TD., Kiningham, KK., Lin, SM., Yen, HC., Majima, H., Hines, J., & St Clair, D.: Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Res.*, 61, 6082-8, 2001
 53. Motoori, S., Majima, H.J., Ebara, M., Kato, H., Hirai, F., Kakinuma, S., Yamaguchi, C., Ozawa, T., Nagano, T., Tsujii, H., & Saisho, H.: Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res.*, 61, 5382-8, 2001
 54. Ando, K., Furusawa, Y., Suzuki, M., Nojima, K., Majima, H., Koike, S., Aoki, M., Shimizu, W., Futami, Y., Ogino, T., Murayama, S., & Ikeda, H.: Relative biological effectiveness of the 235 MeV proton beams at the National Cancer Center Hospital East. *J. Radiat. Res.*, 42, 79-89, 2001
 55. Sato, T., Indo, H., Kawabata, Y., Agarie, R., Ishigami, T., & Noikura, T.: Scintigraphic evaluation of chronic osteomyelitis of the mandible in SAPHO syndrome. *Dentomaxillofac. Radiol.*, 30, 293-5, 2001
 56. 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.*, 92, 228-35, 2001
 57. Sato, T., Kawabata, Y., Morita, Y., Noikura, T., Mukai, H., Kawashima, K., & Sugihara, K.: Radiographic evaluation of malignant fibrous histiocytoma affecting maxillary alveolar bone: a report of 2 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 92, 116-23, 2001
 58. Sato, T., Indo, H., Takasaki, T., Kawabata, Y., Morita, Y., & Noikura, T. A rare case of intraosseous polymorphous low-grade adenocarcinoma (PLGA) of the maxilla. *Dentomaxillofac. Radiol.*, 30, 184-7, 2001
 59. Suenaga, S., Abeyama, K., Hamasaki, A., Mimura, T., & Noikura, T. Temporomandibular disorders: relationship between joint pain and effusion and nitric oxide concentration in the joint fluid. *Dentomaxillofac. Radiol.*, 30, 214-8, 2001
 60. Suenaga, S., Indo, H., & Noikura, T.: Diagnostic value of dynamic magnetic resonance imaging for salivary gland diseases: a preliminary study. *Dentomaxillofac. Radiol.*, 30, 314-8, 2001
 61. Suenaga, S., Abeyama, K., Indo, H., Shigeta, K., & Noikura, T.: Temporomandibular disorders: MR assessment of inflammatory changes in the posterior disk attachment during the menstrual cycle. *J Comput. Assist. Tomogr.*, 25, 476-81, 2001
 62. Sugiyama, K. & Yokoyama, K.: Head extension angle required for direct laryngoscopy with the McCoy laryngoscope blade. *Anesthesiology*, 94, 939, 2001

63. Yokoyama, K. & Sugiyama, K.: Temporomandibular joint pain analgesia by linearly polarized near-infrared irradiation. **The Clinical Journal of Pain**, 17, 47-51, 2001
64. Sugiyama, K., Wakamatsu, A., & Yokoyama, K.: Difficult laryngoscopy due to the abnormal palatoglossal arch. **Anesthesiology**, 95, 1540-1541, 2001

編 集 後 記

鹿児島大学歯学部紀要も今回で第23巻を発行する運びとなった。昭和52年10月に鹿児島大学に歯学部が設置され、平成15年3月で25年5ヶ月が経過した。今年は、4名の教授が停年退官される。創設期からの笠原泰夫教授、大工原恭教授、井上昌一教授、と昭和61年に歯学部へ赴任された北野元生教授である。鹿児島大学歯学部と同付属病院の教育・研究・診療活動と管理運営に大いにご努力を頂いた4教授に心から感謝の意を捧げたい。お陰をもって、南九州の歯科医学教育・研究・診療の拠点大学として立派にその責務を果たせるようになった。また、本年度から、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科も発足する。4教授の業績とは直接関係ないが、本年10月には鹿児島大学医学部歯学部附属病院も発足する。今回は、停年退官される4教授に多忙なところを執筆依頼した。4教授のご健勝を祈念する。公開講座は2度行い、地域医療に貢献した。また、本誌投稿規程に1項を追加し、著作権の帰属を明確にした。本誌発行にご協力頂いた関係各位に感謝申し上げます。

(編集委員 西川殷維)

平成 15 年 3 月 15 日 印刷

平成 15 年 3 月 25 日 発行

発行所

鹿児島大学歯学部 代表 大工原 恭
鹿児島市桜ヶ丘八丁目35-1

印刷所

斯 文 堂 株 式 会 社
鹿児島市新屋敷町14-16
電話番号 099-226-3747

