

鹿児島大学歯学部紀要

Annals of Kagoshima University Dental School

Volume 24

2004

— 目 次 —

- 口と顔にかかわる咀嚼と姿勢 伊藤 学 而 ... 1
- 授乳期ラット舌前部の味覚感受性変化 原田 秀逸・金丸 憲一 ... 15
- TLR シグナルと歯周病 松 口 徹 也 ... 21
- 硬組織の病理組織標本作成法 仙波伊知郎・形岡 英子 ... 33
- 6自由度下顎運動測定による小児期顎口腔機能の観察 山 崎 要 一 ... 41
- 外胚葉異形成症の原因遺伝子群：歯の発生におけるその役割と最近のトピック
..... 田 畑 純 ... 53
- 鹿児島大学歯学部発表論文
[2002年 SCI (または JCR) リスト雑誌で公表された業績] 65

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。本学部の教員は下記の規定に従い、誰でも投稿することが出来る。投稿論文の採否は、編集委員会が決定する。
 2. 本誌は年1回発行する。
 3. 論文の掲載は受理の順とする。ただし編集委員会より特に依頼した原稿については、別に委員会が定める。
 4. 掲載料は無料とし、別刷50部を贈呈する。
 5. 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(5words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 & Huxley²⁾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, Spring-field, 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枚以内にまとめる。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 に帰属する。

編集委員

杉原 一正 仙波 伊知郎
原田 秀逸 山崎 要一
(50音順)

口と顔にかかわる咀嚼と姿勢

伊藤 学而

鹿児島大学医歯学総合研究科健康科学専攻発生発達成育学講座顎顔面育成学分野

Participation of masticatory function and posture in the orofacial complex

Gakuji Ito

Department of Orthodontics, Division of Developmental Medicine, Course of Health Research,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan

Abstract

In the orthodontic treatment, not only the corrective orthodontics in the permanent dentition but also the interceptive dentofacial orthopedics in the growing period are accepted as necessary therapeutic measures. However, neither the pathogenic process of malocclusion nor the clinical significance of interception have been fully clarified.

From the beginning of our Department in 1978, we have carried clinics and researches into effect to find clinical and basic evidences of this field. Based on the recent researches, the orofacial complex has close relationship with the locomotive functioning of head and neck and also of whole body.

Among the pathogenic factors of malocclusion, the present paper deals with masticatory function and posture and explains their participation in the growth and development of orofacial complex.

Key words: masticatory function, posture, muscle adaptation, skeletal adaptation, orofacial complex

矯正歯科治療の流れ

矯正歯科治療の流れには、歯あるいは顎の移動に対して、器械的に解決しようとする器械派と、生物学的に解決しようとする自然派、機能学的に解決しようとする機能派の3つの流れがある¹⁾。私が受けた教育は、歯列・咬合・顎顔面の成長変化を最大限に引き出そうとする自然派の流れを基盤として、その上に治療効率

に優れた器械派と、口腔周囲筋の機能を賦活する機能派の流れを組み合わせたものであった。

器械派の治療は、永久歯列期を中心として歯列の再配列と咬合の再構築を行う治療 (orthodontics) である。米国を中心に各種の multi-bracket 法が開発され、近年では顎骨の短縮術や延長術、アンカー植立術などを組み合わせて、かつての orthodontics では限界であった

ことが急速に解消されつつある。

咬合の異常（不正咬合）の多くは、乳歯の萌出期や、永久前歯、犬歯・小臼歯の萌出期、あるいは顎骨の思春期性成長スパート期など、歯列・咬合・顎顔面の発育の節目の時期に顕在化する。そこでこれらの発育段階に沿って、位置異常歯の移動や、顎発育の誘導、口腔習癖の除去、咀嚼嚥下機能の発達援助などを行うのが自然派と機能派の治療（dentofacial orthopedics）である。この治療法も、欧州、米国、日本など広い範囲で展開されてきた。

矯正歯科治療には、永久歯列期を中心とした咬合の器械的改善（orthodontics）だけでなく、発育過程における歯列・咬合・顎顔面の調整（dentofacial orthopedics）もともに不可欠である。しかしながら後者については、発育の各段階で咬合の異常が顕在化する機構も、それを調整することの意味も十分に解明されていなかった。私たちは1978年の開講以来、そのエビデンスを求めて臨床と研究を進めて内外に発表してきた。

本稿では、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科の最終講義（鶴陵会館，04.02.12）から咀嚼と姿勢とを取り上げて、それらが歯列・咬合・顎顔面の発育にどのようにかかわっているかを解説した。

歯列・咬合と顎顔面の位置づけ

歯科の対象である口腔は、食物の摂取以外に多くの機能を果たしている。たとえば、消化器として食物の咀嚼・嚥下を行う他に、味覚器、呼吸器、発声器としての役割、さらには感情表現の役割が重なっており、このために口腔は複雑な構造をしている。治療の面か

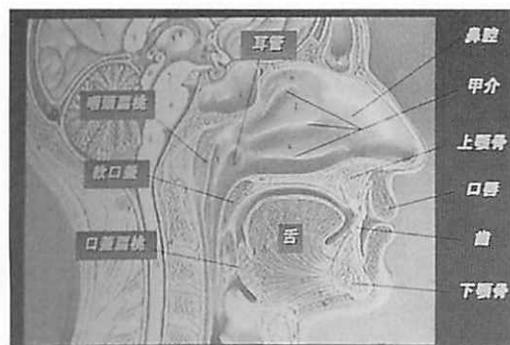


図1 歯列・咬合と顎顔面の位置づけ

歯列・咬合と顔面骨格は頬、口唇、舌、軟口蓋、口峡、口底などの軟組織に囲まれ、それらの機能的影響を常に受けている。

らみても、胃や腸の場合には病巣を治癒あるいは摘出すれば治療は終わるが、口腔の場合にはさらに元の形態と機能を取り戻す必要があるため、はるかに複雑な治療が要求される。

口腔の中心的な構造は歯列・咬合と顎骨である。これらは顔面骨格の中核をなしているが、頬、口唇、舌、軟口蓋、口峡、口底などの軟組織に囲まれていて、それらの機能的影響を常に受けている（図1）。しかも咀嚼、嚥下、呼吸、発声などの機能には個人差があるので、そのことが歯列・咬合と顎顔面の形態や機能に多様な変異をもたらしている。

口腔は咽頭を介して鼻腔や気管、食道に連なっているが、それだけではなく顔面頭蓋の下部2/3を占めて頭頸部の中心的位置にある。このため、隣接する鼻咽頭腔に通気障害があればその影響を直接に受けるが、さらに頭蓋と上肢帯を繋ぐ頭頸部の筋の機能も顎顔面の軟組織を介して歯列・咬合と顎顔面の形態と機能に密接な関連をもっている。

このように歯列・咬合と顎骨は、直接的には周囲軟組織の機能的影響下にあるが、それ自体が頭頸部の一部であり、必然的に頭頸部の軟組織の影響も強く受けているのである。

咀嚼と顎顔面の発育

咀嚼は口腔の重要な役割の一つであり、咬筋、内側翼突筋、側頭筋などの閉顎筋が顎骨を駆動して行われる。Sassouni²⁾によれば、閉顎筋が強大な者では下顎枝の発育がよく短顔貌で前歯部の噛み合わせは深い、閉顎筋が脆弱な者では下顎枝の発育が悪く長顔貌で前歯部の噛み合わせは浅いという（図2）。この理由として、咬筋と内側翼突筋は下顎角の外側と内側に付着し、側頭筋は筋突起に付着している、これらの筋の日常的な働きが下顎角と筋突起を中心として下顎枝の発育に影響を与えたと考えられている。

日本人古人骨の研究によれば³⁾、縄文人から現代人にかけて下顎枝の高さと幅が段階的に縮小してきたが（図3）、咀嚼の機能が時代とともに低下したと考えれば説明がつく。

そこで、咀嚼と顎顔面の発育との関連を実証するための研究を行った。

1) 飼料の形状と咀嚼器の発育

生体の器官では機能と形態に密接な関連があり、運動すれば運動器の発育はよい。咀嚼器も運動器であるので、よく咀嚼すれば閉顎筋も顎骨もよく発育するは

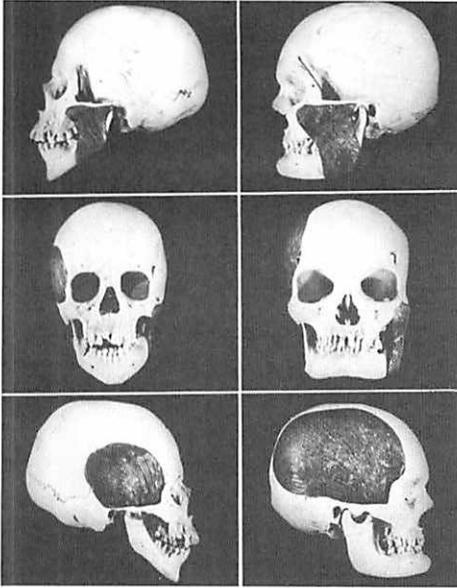


図2 長顔貌(左)と短顔貌(右)の顔面骨格と咬筋・側頭筋

(Sassouni, 1971)

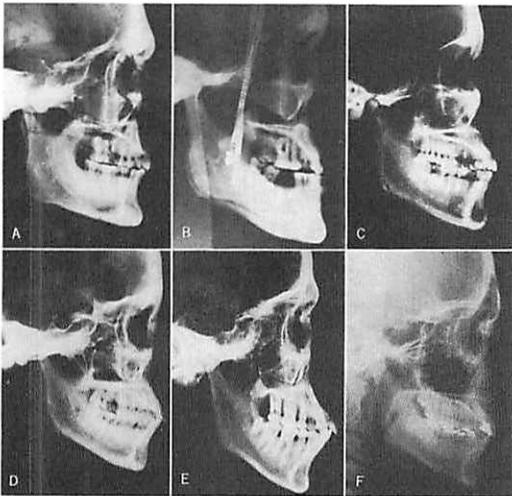


図3 縄文人から現代人までの頭部 X 線規格写真の比較 (井上ら, 1986)

A: 縄文人, B: 弥生人, C: 鎌倉人, D: 室町人,
E: 江戸人, F: 現代人

ずである。このことを確かめるため、顎骨の形態変異の小さい C3H/He 系マウスを用いて一連の飼育実験を

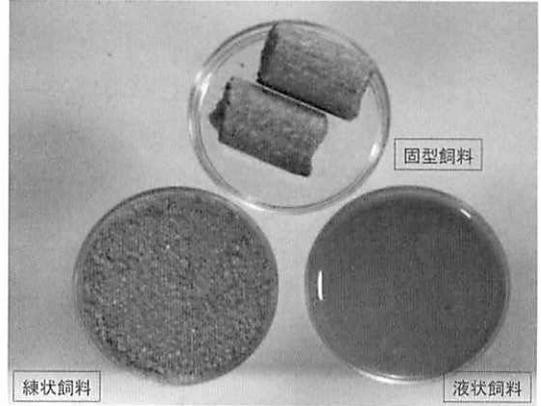


図4 マウスの実験飼料

行った。

実験飼料は、固型飼料（直径約14mm、長さ約18mmの円柱状、ビッカース硬度10~15）、練状飼料（1.5mmメッシュパスの粉末に1/3量の水を連和）、液状飼料（1.5mmメッシュパスの粉末をジェットミルで $20\mu\text{m}$ 以下の微粉末にし、4倍量の水を添加）の3種で、実験によって2種あるいは3種を用いた（図4）。

咀嚼器の発育の継代変化：

日本人の顎骨が時代とともに華奢になってきたと言われる背景を調べるために、マウスの継代飼育実験を行った。第1世代のマウスは3週齢の離乳時に無作為に固型飼料群と練状飼料群に分け、群内で無作為に選んだ雌雄を8週齢で交配した。こうして第5世代まで継代飼育し、頭尾長の成長がほぼ終了する15週齢の計測値を各世代で比較した⁴⁾。

頭尾長と体重には第5世代まで両群に差がなかったが、咬筋重量、下顎角、下顎枝高は第2世代から練状飼料群が有意に小さく、下顎骨長、上顎歯列幅径は第5世代で有意に小さくなっていた（図5）。このことから、飼料の形状によって咀嚼器の発育に有意差が生じ、しかも世代を重ねると有意差の現れる範囲が広がることが示された。

顎顔面の発育遅延が現れる経過：

飼料の形状による顎顔面の発育遅延が現れる経過を調べるため、各飼料群に3、5、7、12、20週齢の小群を設けて頭部 X 線規格写真を用いて分析した⁵⁾。

表1 哺乳形態と咀嚼器官の発育

計測項目	実験群		対照群		有意差
	平均	S.D.	平均	S.D.	
咬筋重量 (mg)	28	4	32	2	**
舌重量 (mg)	47	4	51	4	*
下顎骨長 (mm)	9.60	0.17	9.87	0.12	***
下顎枝高 (mm)	4.03	0.09	4.23	0.06	***
下顎頭前後径 (mm)	1.16	0.07	1.22	0.06	*
下顎角 (°)	95.8	1.3	94.6	2.3	*

* : P<5% ** : P<1% *** : P<0.1%

までは60分、それ以降16日齢までは90分の間隔で与えた⁷⁾。対照群では、母マウスの乳房から母乳を飲ませた。

実験終了の16日齢では、頭尾長、体重の増加には対照群と差がなかったが、下顎骨長、下顎枝高、下顎頭前後径、咬筋重量、舌重量は有意に小さかった(表1)。このことから、人工哺乳では顎骨と咀嚼筋、舌の発育が遅れることが確かめられた。

下顎頭と下顎窩の発育：

咀嚼時の顎運動を支えているのは顎関節である。顎関節症患者では咀嚼が少なく、下顎頭は華奢なことが

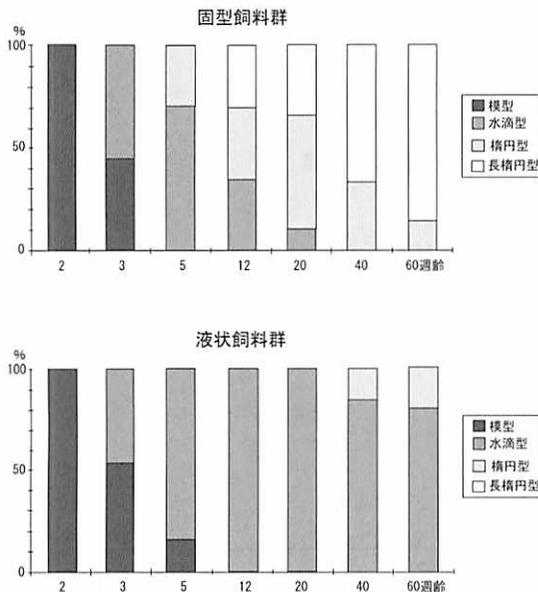


図7 下顎頭上面観の形の発育変化

多い。そこで、固型飼料群と液状飼料群の下顎頭と下顎窩の発育経過を、離乳前の2週齢から老齢期に入る60週齢まで比較した⁸⁾。

下顎頭の上面は2週齢では棒型をしているが、固型飼料群では成長につれて水滴型、楕円型、長楕円型に変化した。しかし液状飼料群では60週齢でも大部分が水滴型に止まっていた(図7)。下顎頭の側面は2週齢では凸型をしているが、固型飼料群ではサドル型、延長型に変化した。しかし液状飼料群では60週齢でも凸型が残っていた。下顎窩の下面は2週齢では楕円型をしているが、固型飼料群では長楕円型に変化した。しかし液状飼料群では遅れてわずかに変化したに過ぎなかった。

大きさを比較すると、下顎頭の前後径と幅径は液状飼料群で小さく(図8)、しかも咬筋重量、側頭筋重量、下顎骨長、下顎枝高と有意の相関があった。下顎窩の前後径には両群で差がなかったが下顎骨長と有意の相関を示し、幅径は液状飼料群で小さく下顎枝高と有意の相関があった(図9)。

以上から、液状飼料で飼育したマウスの下顎頭は老齢期でも幼児型に止まり、下顎窩では幅径が小さいこ

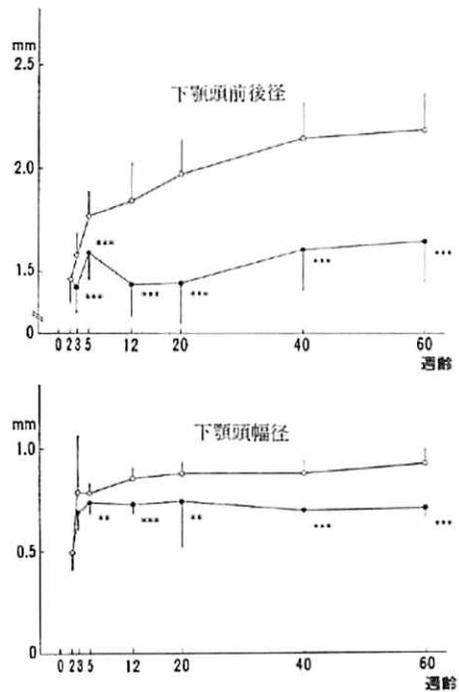


図8 下顎頭の大きさの発育変化
白：固形飼料群，黒：液状飼料群

とから、これらのマウスでは咀嚼時の下顎頭の運動範囲が狭く、運動様式も違っていると考えられた。

咀嚼と咀嚼筋の発育：

若年の顎関節症患者には人工乳哺育経験者が多く、多数歯齧蝕の経験があり、既製乳歯冠の既往が多く、

雑音歴や耳疾患既往が多く、硬固食物を好まず、罹患側での偏咀嚼があることから、発育期の咀嚼が十分でない顎運動機構は脆弱であると指摘されている⁹。しかも顎機能障害者では、側頭筋前部や咬筋の活動は左右非対称であると報告されている¹⁰。そこで閉顎筋の咬筋と側頭筋と開顎筋の顎二腹筋について、筋腹中央部の横断凍結切片に ATPase 染色を行って筋線維を染め分け、筋線維の発育をそのタイプ別に固形飼料群と液状飼料群とで比較した¹¹。

液状飼料群では閉顎筋の重量は小さく、どのタイプの筋線維も細かったが(図10)、開顎筋では固形飼料群と差がなかった。各筋に含まれる筋線維のタイプ別の比率をみると、未分化な 2C 線維は両群とも3週齢で消失し、それ以降は易疲労性の 2B 線維の比率が減少して難疲労性の 2A 線維の比率が増大した。ただし、2A 線維の増加は開顎筋では少なく群間にも差がなかったが、閉顎筋では 2A 線維の増加が著しく、しかも液状飼料群では固形飼料群より増加が少なかった(図11)。

以上から、液状飼料で飼育すると閉顎筋の筋組織の量的発達と筋線維の分化が遅れ、筋の生理的性質が固形飼料群と異なることが確かめられた。

2) 噛みしめ訓練による顎発育の促進

これまでの研究から、咀嚼が顎発育に重要な役割を果たしていると考えられるようになってきた。そこで、下顎の発育が劣っている成長期の骨格型不正咬合に対して、閉顎筋を賦活して下顎の発育を促進する治療法を確立し、検証を行った。

着目した矯正装置は、アクチベーターないし FKO

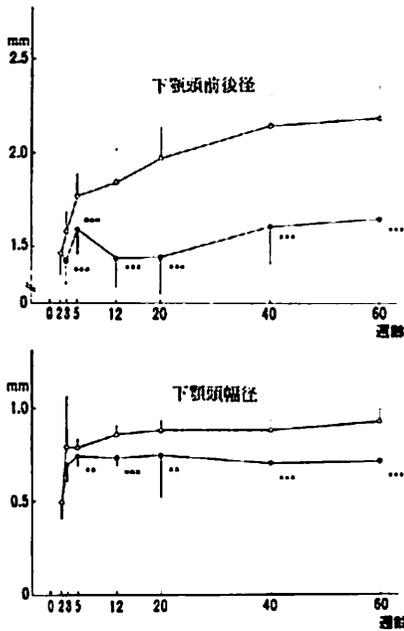


図9 下顎窩の大きさの発育変化
白：固形飼料群，黒：液状飼料群

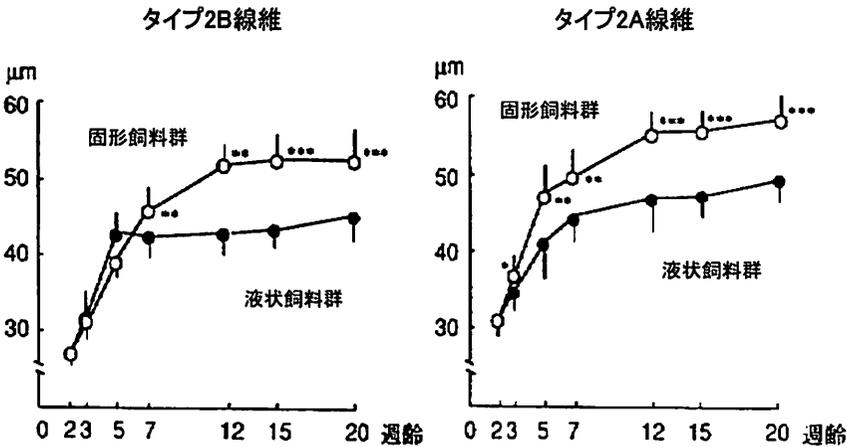


図10 閉顎筋の筋線維の太さ(咬筋深層)

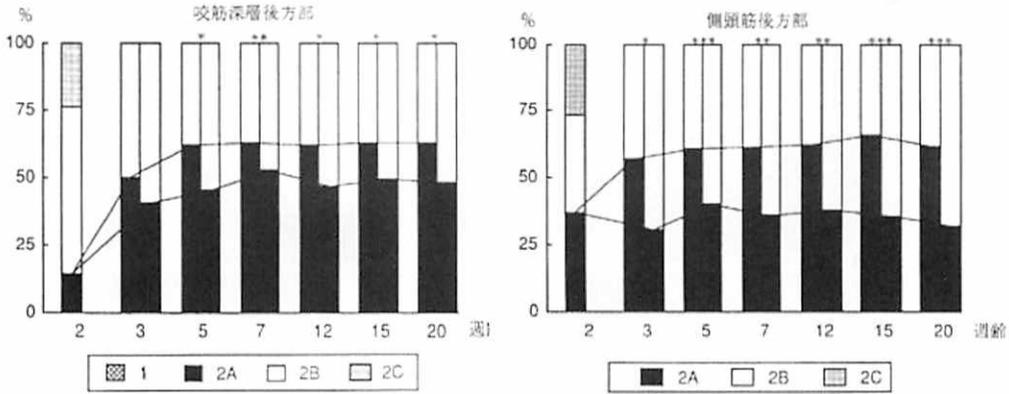


図11 閉顎筋の筋線維のタイプ別比率
棒グラフの左は固形飼料群，右は液状飼料群

(Funktionäre Kieferorthopädie)と呼ばれるものである。この装置は1930年前後にノルウェーで開発され、発育の遅れた下顎を前下方へ誘導し元の位置へ戻ろうとする筋力を利用して上下前歯の前後的位置を改善し、同時に臼歯の挺出を促して下顎を新しい位置に順応させるというものであった。九州歯科大学元教授の佐藤通泰先生は、前下方へ誘導した位置に下顎を適応させるには、臼歯を挺出させるよりむしろ臼歯に噛む刺激を与える方が効果的であると考えて、FKOの臼歯咬翼部を臼歯で噛みしめる使い方を開発された。

この考え方は、私たちのマウスの飼育実験の結果とも符合する。そこで患児に毎晩50回、FKOの臼歯咬翼部を臼歯でゆっくり噛みしめてもらうと、下顎枝の発育が促されてオトガイが前方へ移動し、上下顎骨のバランスが改善されることが確かめられた(図12)。これに伴って口裂が自然に閉鎖できるようになり、口裂幅が増大して口裂は水平になり、オトガイ筋の緊張も消失する(図13)。

FKOを用いた臼歯の噛みしめ訓練は、閉顎筋の機能強化と下顎の前下方成長の促進をもたらす。しかし

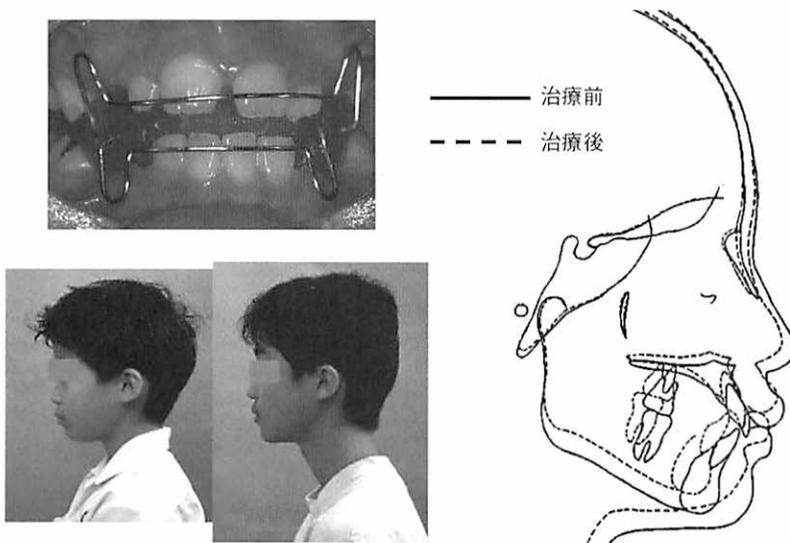


図12 FKOを用いた噛みしめ訓練の効果

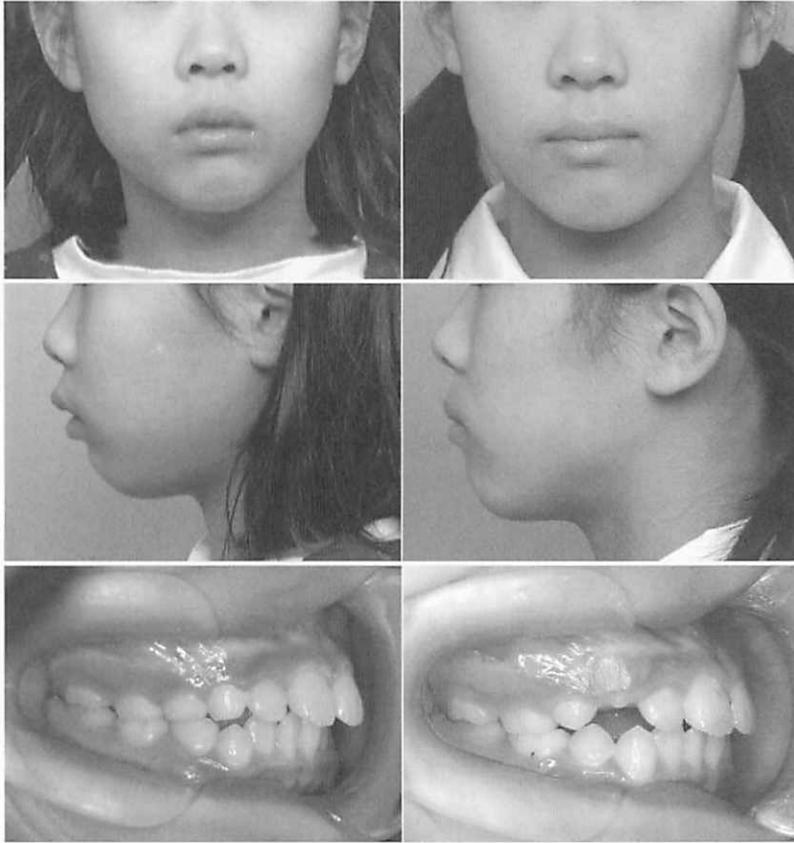


図13 FKOを用いた噛みしめ訓練の咬合と口裂周囲筋に及ぼす効果

左：9歳7ヵ月 右：12歳1ヵ月

それだけでなく、歯列・咬合を取り巻く表情筋の機能にも良い影響が及ぶんでいる可能性がある。これは今後の研究課題である。

姿勢と顎顔面形態

1) 前方頭位と顔面骨格の特徴

頭頸部の姿勢は頭位とも呼ばれ、頭蓋と上肢帯をつなぐ筋群で支えられている。頭位の不良には頭部の前後的・側方的な偏位や傾斜、頭蓋の上向き・下向きがあるが、頭部が身体の重心線より前方にある前方頭位(forward head position)がもっとも一般的である。

日常的に前方頭位をとる者はいわゆる猫背と呼ばれ、頸椎が前傾して頭蓋は下向きで前に出ている。顎顔面では下顎角が開大して下顔面高が大きく、下顎骨が後下方に回転している¹²⁾。猫背で前方頭位の者が、前方

を見ようとするすると頭蓋を上向きにして視線を水平にするので、顎顔面の軟組織が伸展されて(soft-tissue stretching)下顎骨が後下方へ回転すると考えられている¹³⁾。事実、頸椎が前傾して頭蓋頸椎角が大きい者では、下顎骨前方部の発育の軌跡はもっぱら下方である¹⁴⁾。

前方頭位は顎関節症患者にも多いが、前方を見ようとして頭蓋を上向けにすると頭部を支える首や肩の筋に異常な緊張が生じやすい¹⁵⁾。このことは、頭位の不良が顎顔面の形態と筋機能の両方に影響を及ぼすことを物語っている。

長久保¹⁶⁾は、男子学生103名の立位の規格写真から正面姿勢と側面姿勢を評価し、頭部X線規格写真の分析から顎顔面形態との関連を解析した。立位姿勢はクラスター分析でそれぞれ4群に分類され、正面姿勢で

正面姿勢	A 群	B 群	C 群	D 群
姿勢の特徴	 <p>水平的な姿勢</p>	 <p>頭蓋と骨盤が左下がり 肩が右下がり</p>	 <p>頭蓋, 肩, 骨盤が右下がり 体軸が右へ傾斜</p>	 <p>頭蓋が右下がり 骨盤が左下がり</p>
側面姿勢	E 群	F 群	G 群	H 群
姿勢の特徴	 <p>平均的な姿勢</p>	 <p>頭蓋が下向き 頭部と体軸が前傾</p>	 <p>頭蓋が上向き 頭部, 背面, 体軸が前傾</p>	 <p>頭蓋が上向き</p>

図14 立位姿勢の分類と特徴

は、A 群：良姿勢、B 群：頭蓋と骨盤が左下がり、肩が右下がり、C 群：頭蓋、肩、骨盤が右下がり、体軸も右傾斜、D 群：頭蓋が右下がり、骨盤が左下がりの特徴があった。また、側面姿勢では、E 群：平均的な姿勢、F 群：頭蓋が下向きで頭部と体軸が前傾、G 群：頭蓋が上向きで頭部、体軸が前傾、H 群：頭蓋が上向きであった（図14）。

正面姿勢と顔面形態との関連を見ると、外眼角傾斜角は頬骨傾斜角や咬合平面傾斜角と逆相関、肩峰傾斜角は上顎歯槽基底傾斜角と逆相関、腸骨稜傾斜角は前下顎角傾斜角と正相関であった。すなわち、頭蓋と上肢帯の側方傾斜は頬骨、上顎歯槽基底、咬合平面の側方傾斜と逆の関係にあった。

また、側面姿勢と顔面形態との関連を見ると、頭蓋回転角は下顎骨長、下顎骨体長、SNB 角、SN-Pog 角と逆相関、SN 下顎枝後縁平面角、Y 軸角と正相関、頸部傾斜角は下顎骨体長、下垂体窩舌骨間距離と逆相関、下顎角と正相関、頸部頭蓋角は下顎骨長、下顎骨体長、SNB 角、SN-Pog 角と逆相関、SN 口蓋平面角、SN 下顎下縁平面角、Y 軸角と正相関、背面傾斜角は前頭蓋底長と逆相関、側面体軸傾斜角は Y 軸角と正相関であった。すなわち、頭蓋が上向きであると下顎骨長や下顎骨体長が短く、Y 軸角や下顎枝の下縁傾斜

あるいは後縁傾斜が大きくてオトガイが後退していた。側面姿勢と側面の顔面形態との関連を、二つの代表例で示す（図15）。

これらの結果は、顎顔面の軟組織と頸部の軟組織とが互いに連携して頭頸部の力学的平衡をとり、その影響が顔面形態に強く現れることを示唆している。

2) 前方頭位と顔面骨格の成長

姿勢が顔面頭蓋の発育に及ぼす影響は、顎発育の盛んな成長期において顕著に現れると考えられる。そこで成長期の不自然な姿勢が顔面頭蓋の発育に及ぼす影響を実験的に検証するため、ウイスター系雄ラット80匹を実験群2群(E1, E2)と対照群(C), 正常群(N)各20匹に分けて飼育した¹⁷⁾。

E1 群と E2 群のラットは背面の高さより低い円柱状のかごに入れて頭部を伸展させ、E1 群のかごは水平に、E2 群のかごは斜め上向きに設置した。C 群のラットは背面の高さより高い楕円柱状のかごに入れて頭部を伸展しないで飼育し、N 群は通常の飼育ケージで自由な姿勢で飼育した（図16）。飼育期間は25日齢から85日齢までの60日間である。

全身の X 線写真によれば、E1 群と E2 群では頸部が伸展して前方頭位となり（図17）、特に E2 群の頭

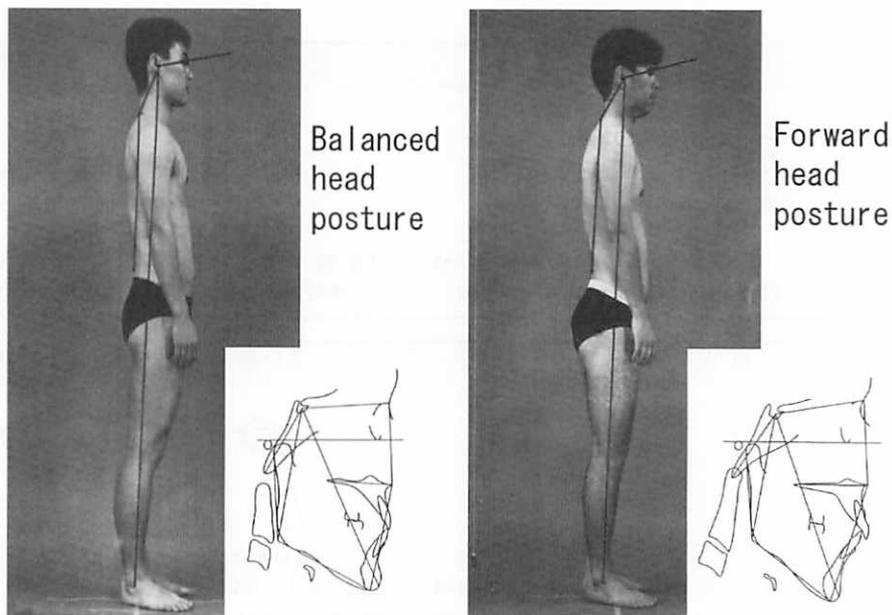


図15 側面姿勢と側面の顔面形態との関連
 左：バランスのとれた姿勢 右：体軸の前傾と前方頭位

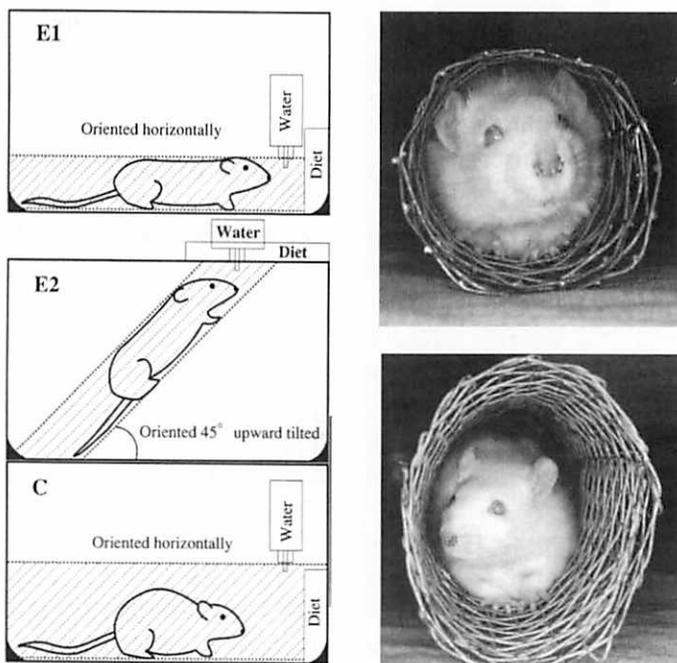


図16 ラットの飼育姿勢
 E1と E2：背の高さが抑えられた飼育ケージ C：背の高さに余裕のある飼育ケージ

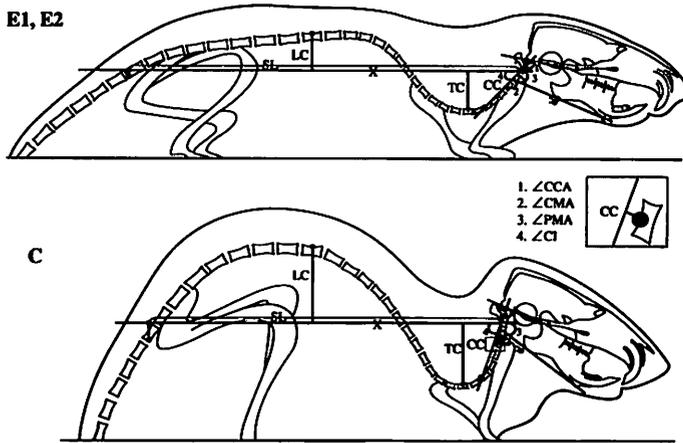


図17 実験群の全身姿勢の成長変化

E1, E2: 実験群 C: 対照群

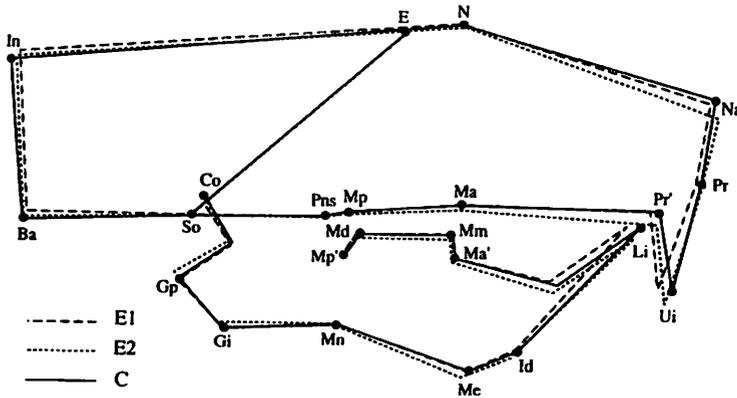


図18 実験群の顔面頭蓋の成長変化

上顎と下顎は後下方へ回転している。
E1, E2: 実験群 C: 対照群

頸部筋の重量比は有意に大きかった。頭部 X 線規格写真によれば、E1 群と E2 群の顔面頭蓋の成長は C 群より少なく、特に E1 群では顔面頭蓋の前後径も高径も有意に小さくて切歯は舌側傾斜し、E2 群では顔面頭蓋が後下方へ回転していた (図18)。

以上から、頸部の伸展による前方頭位は顔面頭蓋の前方部軟組織を伸展させ、周囲筋の活動を变化させて顔面頭蓋の成長方向を後下方に変更することが示唆された。

3) 前方頭位による頸部筋の活動性と筋線維構成比の変化

顎顔面の軟組織の伸展が顔面頭蓋の形態形成に対する要因の一つであることを筋機能の面から検証するために、成長期のラットに持続的に前方頭位をとらせ、頸部の筋群の筋電図活性と筋線維の構成を解析した¹⁸⁾。

オスのウイスターラット36匹を、25日齢で二つの実験群 (E1, E2) と対照群 (C) に分けて飼育した。ラットが55日齢に達した時点で安静位に置き、自然な頭

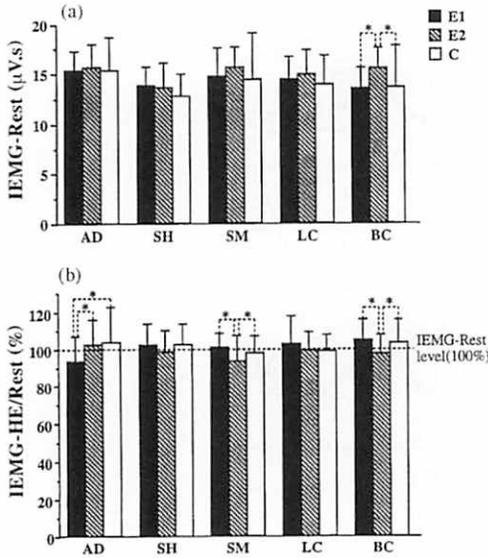


図19 前方頭位ラットの筋電図積分値

上：自然な頭位，下：前方頭位，E1, E2：実験群
 C：対照群，AD：二腹筋前腹，SH：胸骨舌骨筋，
 SM：胸骨乳突筋，LC：頭長筋，
 BC：biventer cervicis

位と前方頭位とで顎二腹筋前腹 (anterior digastricus, AD), 胸骨舌骨筋 (sternohyoideus, SH), 胸骨乳突筋 (sternomastoideus, SM), 頭長筋 (longus capitis, LC), biventer cervicis (BC) から筋電図を記録し, 筋電図積分値 (IEMG) を求めた。また, 筋腹横断面のミオシン ATPase 染色から, 筋線維の構成を求めた。

E1 群ではタイプ I 線維が多く, biventer cervicis (BC) の IEMG が自然な頭位で低かった。E2 群ではタイプ I 線維が多く, 顎二腹筋前腹 (AD) の IEMG が自然な頭位で高く, 前方頭位で低かった (図19)。どちらの実験群でも胸骨乳突筋 (SM) と頭長筋 (LC) のタイプ IIA 線維と IIB 線維の構成比が違って (表2), しかも多くの筋でサブタイプ線維が増え, タイプ II 線維の断面積が減少していた (表3)。

以上から, 前方頭位は, 頸部の筋線維の転移, 分布, 断面積, 動員パターンに影響を及ぼすことが示された。

4) チンキャップによる下顎骨の前方成長の抑制

成長期の子どもに前方頭位があると, 顎顔面の軟組織が伸展して下顎は後下方へ回転した成長変化を起こすことが確かめられた^{12, 14, 17)}。

一方, 矯正歯科治療には以前から, 下顎の前方成長

表2 頸部筋の筋線維タイプの構成比(%)

Muscle	Group			F value	SNK test		
	E1 n=12	E2 n=12	C n=12		E1:C	E2:C	E1:E2
AD							
(I+IIA)/IIB	26.91 ± 5.52	18.84 ± 5.26	24.03 ± 4.26	5.73**	NS	*	*
IIA/IIB	0.71 ± 0.23	0.65 ± 0.13	0.64 ± 0.17	0.43 ^{NS}	—	—	—
SH							
(I+IIA)/IIB	3.69 ± 2.58	3.99 ± 2.36	9.01 ± 5.53	4.93**	*	*	NS
IIA/IIB	0.33 ± 0.07	0.45 ± 0.09	0.36 ± 0.07	6.85**	NS	*	*
SM							
(I+IIA)/IIB	21.63 ± 7.83	22.36 ± 4.43	20.77 ± 7.24	0.15 ^{NS}	—	—	—
IIA/IIB	0.82 ± 0.23	0.68 ± 0.15	1.17 ± 0.28	13.49***	*	*	NS
LC							
(I+IIA)/IIB	34.47 ± 7.90	28.30 ± 6.40	36.66 ± 11.03	2.70 ^{NS}	—	—	—
IIA/IIB	1.11 ± 0.27	0.89 ± 0.23	1.83 ± 0.74	11.38***	*	*	NS
BC							
(I+IIA)/IIB	23.40 ± 5.40	25.36 ± 5.85	20.17 ± 6.09	2.26 ^{NS}	—	—	—
IIA/IIB	0.45 ± 0.14	0.41 ± 0.09	0.44 ± 0.09	0.39 ^{NS}	—	—	—

Values are means ± SD; AD, anterior digastricus; SH, sternohyoideus; SM, sternomastoideus; LC, longus capitis; BC, biventer cervicis.

*P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001; NS, not significant.

表2 頸部筋の筋線維タイプの構成比(%)

Muscle	E1		E2		C		F value	SNK test		
	n=12		n=12		n=12			E1:C	E2:C	E1:E2
AD										
Type I	123.47 ± 32.90	110.76 ± 27.47	120.39 ± 25.78	4.97**	NS	*	*			
Type IIA	126.51 ± 36.63	124.82 ± 32.96	116.93 ± 34.40	5.62**	*	*	NS			
Type IIB	173.69 ± 47.25	176.24 ± 51.64	170.93 ± 51.14	0.95 ^{NS}	—	—	—			
SH										
Type I	88.83 ± 22.87	97.65 ± 29.49	83.58 ± 17.71	4.38*	NS	*	NS			
Type IIA	94.64 ± 23.91	92.28 ± 31.62	94.65 ± 28.76	0.36 ^{NS}	—	—	—			
Type IIB	309.93 ± 159.46	336.94 ± 164.36	316.90 ± 154.50	2.53 ^{NS}	—	—	—			
SM										
Type I	153.57 ± 53.97	164.73 ± 42.18	158.66 ± 42.08	1.79 ^{NS}	—	—	—			
Type IIA	162.76 ± 54.54	168.20 ± 48.80	177.44 ± 50.10	5.50**	*	*	NS			
Type IIB	294.23 ± 113.90	311.12 ± 128.83	338.79 ± 121.46	7.54***	*	*	NS			
LC										
Type I	112.88 ± 31.00	142.49 ± 52.23	129.55 ± 43.72	21.99***	*	*	*			
Type IIA	158.46 ± 45.51	181.89 ± 64.05	169.83 ± 56.18	12.42***	*	*	*			
Type IIB	265.04 ± 87.43	284.92 ± 98.50	302.05 ± 99.01	6.66**	*	*	NS			
BC										
Type I	134.97 ± 45.71	132.16 ± 48.79	154.39 ± 43.64	7.90**	*	*	NS			
Type IIA	164.48 ± 55.84	164.22 ± 57.27	178.24 ± 48.79	3.30*	*	*	NS			
Type IIB	332.21 ± 112.27	352.22 ± 117.37	352.49 ± 142.06	2.38 ^{NS}	—	—	—			

Values are means ± SD; AD, anterior digastricus; SH, sternohyoideus; SM, sternomastoideus; LC, longus capitis;

BC, biventer cervicis.

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$; NS, not significant.

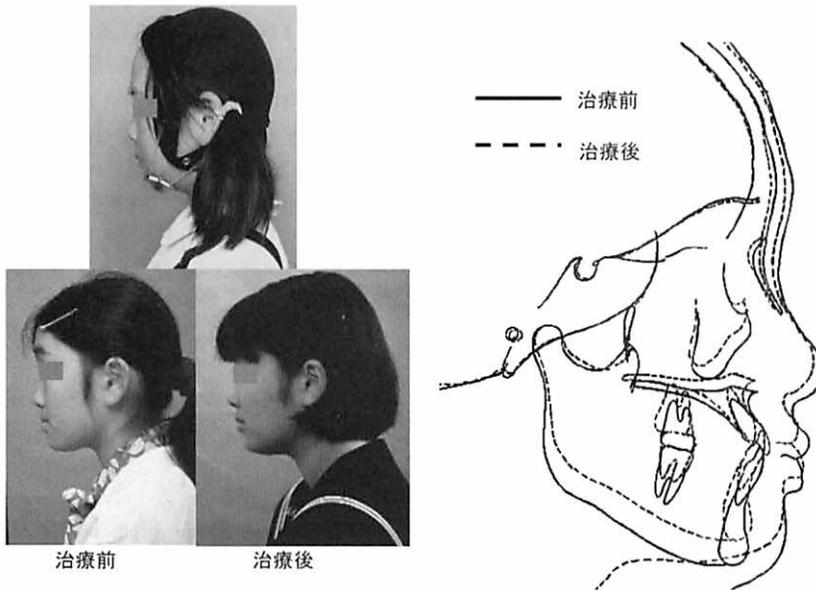


図20 チンキャップによる下顎の前方成長の抑制

が旺盛な患児に対してチンキャップを用いてオトガイを後上方に牽引し、下顎の成長方向を下方へシフトさせる治療法がある(図20)。前方頭位による顎顔面の成長変化と対比すると、チンキャップによる下顎骨の前方成長の抑制は前方頭位を伴わないこと以外は違いがなく、同じ原理による成長変化である。

おわりに

歯科は、口と顔を介して患者さんの健康にかかわる領域である。その一分野である矯正歯科では、歯列・咬合を整えることを中心に治療の体系が組まれているが、整った歯列・咬合を育てることもそれに劣らず大切である。

矯正歯科では、20世紀の初頭から、歯列・咬合を顔面頭蓋の一部と位置づけた診断の体系がとられていた。しかし、近年の学問的成果によれば、歯列・咬合は頭頸部の一部として機能し、全身の運動器の一部としても機能していることが明らかになってきた。

しかし、整った歯列・咬合を育てるという視点からすれば、局所の機能としての咀嚼・嚥下を正常化するのみならず、頭頸部や全身のバランスを整えることも顎顔面の機能的バランスを得るために大切である。顎機能障害を有する患者さんに対する指導の項目として、すでに姿勢を正すことが採り入れられている。

米国矯正歯科学会では1986年に、学会誌の名前を *American Journal of Orthodontics* から *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* に改めたが、うれしい限りであった。

本稿では、鹿児島大学大学院医歯学総合研究科最終講義(鶴陵会館, 04.02.12)のうち、咀嚼と姿勢に関する部分を整理して示した。

文 献

- 1) 高橋新次郎: 高橋新編歯科矯正学, 141-142, 永末書店, 京都・東京, 1960
- 2) Sassouni, V.: Facial types and malocclusion, in *Orthodontics in Dental Practice*, Ed. by Sassouni, V. and Forrest, E. J., St. Louis, 1971, C. V. Mosby Co., 121-144.
- 3) 井上直彦, 伊藤学而, 亀谷哲也: 咬合の小進化, 医歯薬出版, 東京, 1986.
- 4) 伊藤学而, 黒江和斗, 安田秀雄, 井上直彦, 亀谷哲也: 顎骨の退化に関する実験的研究, 日矯歯誌 41(4): 708-715, 1982.
- 5) Ito, G., Mitani, S. and Kim, J. H.: Effect of soft diets on craniofacial growth in mice, *Anat. Anz.*, 165: 151-166, 1988.
- 6) 坂下玲子: 母乳哺育児と哺乳瓶哺育児の吸啜パターンの検討, 小児保健研究 50(4): 514-520, 1991
- 7) 大迫恒伸, 黒江和斗, 松尾 光, 宇都博幸, 小野晴美, 押川昌一郎, 山形圭一郎, 伊藤学而: 授乳形態と顎発育に関する実験的研究, 西日矯歯誌 33: 33-38, 1988.
- 8) 黒江和斗: 下顎頭と下顎窩の加齢変化に及ぼす咀嚼の影響, 日矯歯誌 50: 196-209, 1991.
- 9) 田口 望, 桑原未代子, 水野信介, 丸山高広, 浅井嗣久, 小谷久也, 峰野泰久, 中田茂樹, 金田敏郎, 岡 達: 若年発症顎関節症の臨床研究 - 発症誘因・素因に関する検討 -, 口科誌 35: 46-60, 1986.
- 10) Nielsen, I. L., McNeill, C., Danzig, W. Goldman, S., Levy, J. and Miller, A. J.: Adaptation of craniofacial muscles in subjects with craniomandibular disorders, *Am J Orthod Dentfac Orthop.* 97: 20-34, 1990.
- 11) 吉田礼子: 液状飼料飼育マウスの咀嚼筋線維の分化と発達に関する研究, 日矯歯誌 54: 52-63, 1995.
- 12) Solow, B. and Tallgren, A.: Postural changes in craniocervical relationships. *Tandlaegebladet.* 75: 1247-1257, 1971
- 13) Solow, B. and Kreiborg, S.: Soft-tissue stretching: a possible control factor in craniofacial morphogenesis, *Scand J Dent Res* 85: 505-507, 1977.
- 14) Solow, B. and Siersbaek-Nielsen, S.: Cervical and craniocervical posture as predictors of craniofacial growth, *Am J Orthod Dentfac Orthop* 101: 449-458, 1992.
- 15) Darnell, M. W.: A proposed chronology of events for forward head posture, *J Craniomand Pract* 1: 49-54, 1983.
- 16) 長久保千春: 男子学生における立位姿勢の評価と顎顔面形態との関連, 日矯歯誌 54: 37-51, 1995.
- 17) Gu, GM: Effects of altered posture on the craniofacial growth in rats: A longitudinal cephalometric analysis, 日矯歯誌 55(6): 427-444, 1996.
- 18) Gu, GM, Yoshida, R, Liu, ZJ, Hirose, T. and Ito, G.: Muscle fiber composition and electromyographic features of cervical muscles following prolonged head extension in growing rats. *Euro J Orthod.* 25(1): 21-33, 2003.

授乳期ラット舌前部の味覚感受性変化

原田 秀逸・金丸 憲一

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科生体機能制御学講座口腔常態解析学分野

Changing in gustatory sensitivity on the rostral part of the tongue in preweanling rats

Shuitsu Harada and Norikazu Kanemaru

Department of Oral Physiology, Division of Functional Biology and Pharmacology, Course of
Advanced Therapeutics, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan

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. Also, the integrated taste responses from the rat chorda tympani (CT) nerve were recorded and analyzed at different postnatal ages. At birth, the number of matured SP taste buds preceded to that of FF taste buds, then taste buds within the two loci matured up to 80-90% at 2-weeks. In contrast, no taste buds with a pore were observed at birth within FL and CV, and the number of taste buds gradually increased until 8-weeks. The integrated taste responses magnitudes relative to 0.1 M NH₄Cl from the rat CT were recorded and analyzed. Even at 1 week of age, the CT responded well to all tested 0.1 M mono-chloride salts. The responses to 0.1 M NaCl and LiCl increased with increasing age while response magnitudes to KCl, RbCl, CsCl did not change up to 8 weeks. At 1 to 2 weeks, the integrated response patterns and the concentration-response functions for NaCl, HCl, quinine-HCl and sucrose were essentially the same as those as in the adult rat. The response magnitudes for various sugars increased and reached a maximum at 4-weeks, then decreased gradually with increasing age. Among the six sugars, sucrose was the most effective followed by lactose. The response magnitude to lactose at 4-weeks had decreased compared to that for the other sugars. These results suggest that after one week of age during postnatal development in the rat, taste information from the CT rapidly increases in its importance for feeding behavior.

Key words: taste bud, fungiform papilla, development, preweanling, rat

I. はじめに

ヒトの胎生期は10ヶ月余であり、出生時にはほとんど全ての感覚器官がほぼ完全に機能するまで成熟している。味覚刺激に対する新生児の顔の表情や、唇や舌の動き、頭の動きなどの詳細な観察から、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ことが明らかになっている¹⁾。一方、ラットの胎生期は僅か20日余りで、出生時には視覚は眼瞼が閉じていて機能し得ないし、内耳の諸構造物は未分化で聴覚も機能しないという、ヒトよりも遙かに未熟な状態で生まれ出てくる。しかしながら、出生直後のラットも、licking 行動、口唇の開閉運動、頭の動きの観察から、出生後1日目に既に甘味物質、酸、苦味物質の味刺激に対する識別能力を有しており、味覚系がヒトと同様にほぼ完全に機能していることが明らかになっている²⁾。これらのことから、哺乳動物の新生児(仔)では出生時に生命維持に必須の機能として吸啜運動と併せて味を感じる機能が完成していると考えられる。

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。しかし、出生時の味蕾分布と口腔機能とを関連づけた研究はほとんどなく、特に味蕾の出現と成熟に注目した味覚感受性の変化については十分な研究報告がない。著者らは、この点に着目して出生直後からの味覚感受性との関連について研究を進めており、いくつか新しい知見を得たのでまとめてご紹介したいと思う。

II. 材料および方法

A. 組織学的実験

妊娠したラット (Sprague-Dawley) 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。幼若ラットは離乳後は雄雌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 週齢の42匹のラットからデータを得た。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³⁾。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 (Power Mac 7300, Macintosh) に取り込み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、切片上の位置を測定・記録した。

B. 電気生理学的実験

実験には1-8週齢雄ラットを用いた。動物をネンブータル (1ml/kg bw) により麻酔後、鼓索神経を既述の方法⁴⁾により露出し、活動電位を Ag-AgCl 電極により双極誘導で導出し、時定数0.3秒で積分してインク書きレコーダーに描記した。記録装置および味覚刺激装置は既述のもの⁴⁾を使用した。記録した積分応答は基線から応答開始直後のピーク値までの phasic 応答および刺激開始後10秒の tonic 応答の大きさを測定し、0.1M NH₄Cl の phasic 応答量に対する相対値を求めて応答値とした。

III. 出生後のラット味蕾の成熟と分布の発育に伴う変化

哺乳動物の舌および口腔内の味蕾は、大きく5つの部分、すなわち、舌前部の茸状乳頭、葉状乳頭、有郭乳頭、軟口蓋、および咽喉頭・食道上部に集中して分布している^{3,5-12)}。茸状乳頭味蕾は顔面神経の分枝である鼓索神経、葉状乳頭と有郭乳頭味蕾は舌咽神経、軟口蓋味蕾は顔面神経の分枝である大錐体神経、咽喉頭・食道上部の味蕾は迷走神経の分枝である上喉頭神経が支配している。ラットでは、大錐体神経が支配する鼻切歯溝と軟口蓋に分布する味蕾の数は220から227個¹³⁻¹⁴⁾であり、鼓索神経支配の茸状乳頭味蕾数179から187個^{6,14)}に匹敵する。ハムスターでは軟口蓋に88個、茸状乳頭味蕾が130個という報告がある¹⁵⁾。

味蕾の出現と成熟は口腔内の各部分によって大きく異なっていることがラット^{3,9)}、ハムスター⁹⁾、マーマセット¹²⁾で明らかにされている。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は、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¹¹⁾。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⁹⁾。著者らはラット口腔内の味蕾分布の成長変化を調べ、部位による味蕾の分布および成熟の差を明らかにした³⁾。ラットでは、出生時には味孔がある味蕾数と味孔が観察されない味蕾数を併せて100個以上の味蕾が軟口蓋 (126.7 \pm 23.7) および茸状乳頭 (110.3 \pm 13.7) に観察され、味蕾数は1週齢まで急激に増加しほぼ定常のレベルに達した後 (軟口蓋; 273.7 \pm 70.6, 茸状乳頭; 213.7 \pm 44.9), 28-31月齢までほとんど変化しない。一方、有郭 (1.0 \pm 1.4) および葉状乳頭 (3.0 \pm 4.2) には出生時には数個の味蕾しか存在せず、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、味孔を持つ味蕾の割合をラット部位別に調べた結果³⁾、軟口蓋味蕾は出生時に52.9 ± 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 ± 2.6%であった（図1）。出生後一週の間に、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1）。一方、有郭および葉状乳頭では味孔を持つ味蕾は出生時には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%であり、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1）。

IV. 軟口蓋味蕾の機能と出生時の機能

電気生理学的¹⁴⁻¹⁷⁾および行動学的研究¹⁸⁻¹⁹⁾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（図2）。さらに、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、出生時のラットでは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週間遅れて増大する。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、味孔を持つ味蕾は10日齢で観察されること²⁰⁾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る¹⁵⁾。これに対して、ラット鼓索神経支配の茸状乳頭味蕾は前述のように軟口蓋味蕾よりも1週間程度遅れて成熟するし、次項で述べるように鼓索神経は出生時には十分に機能していないようである。

V. ラット茸状乳頭味蕾の機能変化

新生ラットの軟口蓋味蕾の味孔の開孔率は53%以上であるのに対して、茸状乳頭味蕾の味孔の開孔率は14%以下であった^{3,11)}。茸状乳頭味蕾の成熟の経過と、2-3日齢のラット鼓索神経からは再現性のある安定した応答が得られない²⁰⁾ことから、1週齢以前では鼓索神経は十分な味覚情報を媒介しないと推測される。

著者らは、出生後1週間に成熟した茸状乳頭味蕾の数は急速に増加し80%にまで達することを明らかにした³⁾。1週齢になると0.5 M NH₄Clおよび0.1 M クエン酸に対する神経応答²¹⁾、0.1 M 各種塩類と0.01 M HClに対する安定した積分応答²¹⁾が記録可能になることから、ラット鼓索神経は出生後最初の1週間の間に中枢への味覚情報を媒介するのに十分に成熟している

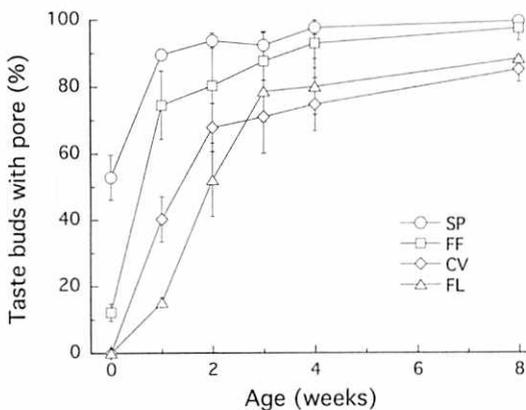


図1 出生後のラットの発育に伴う味孔を持つ味蕾数の割合(%)の成長に伴う変化。

w: 週齢。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。(Harada et. al 2003³⁾から)

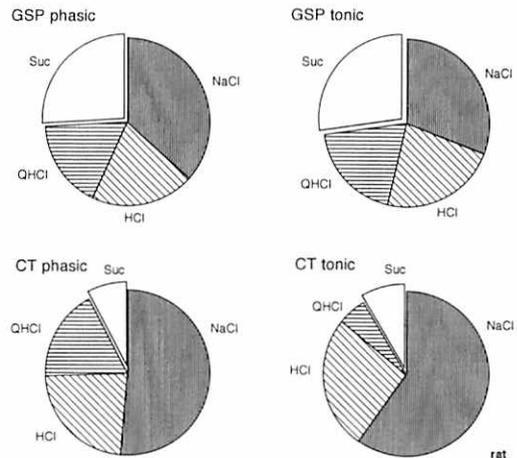


図2 蔗糖(Suc)、食塩(NaCl)、塩酸(HCl)、塩酸キニーネ(QHCl)に対するラット大錐体神経(GSP)と鼓索神経(CT)積分応答量の比較。

左側はphasic応答、右側はtonic応答。(Harada 1994³⁴⁾, Figure 6を改編)

と考えられる。

ラット鼓索神経の NH_4Cl に対する応答は出生後早い時期に安定する²²⁻²⁴。しかしながら、 NaCl および LiCl に対する鼓索神経応答は1から5週齢にかけて成長に伴って増加しており、これはアミロライド感受性線維の増加によることが明らかにされている^{20, 21-25}。同様に1-8週齢まで、 0.1M KCl , RbCl , および CsCl に対する応答を 0.1M NH_4Cl に対する相対的な応答値と比較すると、相対応答値ほとんど変化しないが、 0.1M NaCl および LiCl に対する相対応答値は週齢の増加と共に増加する²¹。さらに、成長期のラット単一神経線維の NH_4Cl に対する応答のインパルス頻度は変化しないが NaCl および LiCl に対するインパルス頻度は増加する²⁶。

また、様々な糖刺激に対して1週齢ラットでも、識別できる十分な大きさの積分応答が得られる²¹。興味深いことに、 0.1M NH_4Cl に対する相対的な応答値で比較すると糖応答は3から4週齢まで増加し、その後成長するにしたがって減少する。この糖応答の成長に伴う減少は 0.1M NH_4Cl 応答の増大によって相対的に減少するのではない。なぜなら、 0.01M HCl と QHCl に対する応答は同じ期間にほとんど変化しないからである。したがって、糖応答の減少は糖感受性線維数の減少か、味覚受容細胞の受容サイト数の減少によると考えられる。ラットにおける鼓索神経の糖応答性の減少は大錐体神経の大きな糖応答性で補填されう

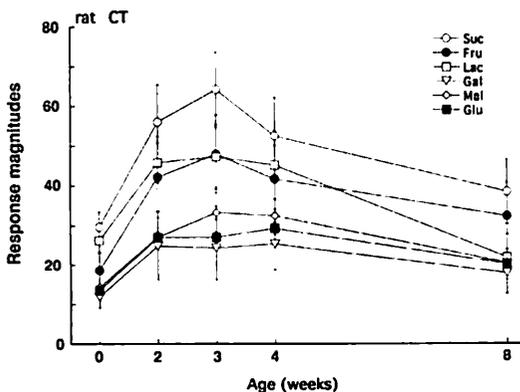


図3 6種の糖に対するラット鼓索神経積分応答の発達に伴う変化。

応答量は 0.1M NH_4Cl に対する相対値。n=5。エラーバーはSD。(Harada and Maeda 2004²¹から)

る^{1, 15-16, 27}。一方、ハムスターでは蔗糖とマルトースに対する濃度-応答曲線は14-35日齢では差がないのに、55-73日齢では増加しており²⁷、ラットとハムスターでは成長に伴う糖応答性の変化に種差があることを示している。

様々な実験結果²⁸⁻³⁰によって、糖とサッカリンは受容体が異なることが示唆されている。また、電気生理学的な交差順応実験によって、成ラットと同様に幼若な2週齢ラットでも糖受容サイトはそれぞれの糖について独立していることが分かった³¹。このことは、各糖に対する受容サイトは成長に伴って分離していくのではなく、発達の初期に既に独立しており、吸啜行動で各種の糖を識別できる可能性を示唆している。

離乳前に、ラット鼓索神経のラクトースに対する味覚応答量は蔗糖のそれと同じである(図3)。また、授乳期にはラクトース応答量は他の糖に対する応答よりも有意に大きいが、離乳後は減少してフルクトースと順位が入れ替わる(図3)。このラクトース応答量の変化は離乳後にラクトース受容サイトの数が減少することを示唆しているが、腸管のラクターゼの合成および活性の変化と相関しており³¹⁻³²、ラクトースに対する味覚変換に関与するタンパク質の減少と関連しているのかもしれない。一方、マウスでは糖やアミノ酸の鼓索神経応答は成長に伴って変化しないが、グルタミンに対する応答は7-10日齢よりも8-16週齢は有意に小さい³³。これらの結果は同じ味質に対しても種によって異なる成長変化を辿ることを示している。

以上述べてきたことをまとめると、1) 哺乳類では出生時に味覚が正常に機能し、軟口蓋に分布する味蕾が重要な役割を果たすと考えられる、2) 軟口蓋味蕾に続いて舌前部の茸状乳頭味蕾の数が増え成熟する、3) 授乳期に口腔内の各部の味蕾は急速に数を増し成熟する、4) 部位によって成長と共に特定の味覚刺激に対する感受性の変化が異なる、ということになる。これらの末梢受容器レベルの味覚情報が中枢でどのように処理されているのかについてはほとんど明らかになっていない。中枢の味覚情報処理系が発達初期にどのように構築され発達していくのか非常に興味深い所であり、今後さらに研究を進めて行きたい。

文献

- Steiner, J. E.: The gustofacial response: Observations on normal & anencephalic newborn infants., In: Fourth Symposium on Oral Sensation and Perception (Bosma JF eds), Bethesda, MD, U. S. Dept. H. E. W.,

- pp. 254-278, 1973
- 2) Ganchrow, J. R., Steiner, J. E. & Canetto S: Behavioral displays to gustatory stimuli in newborn rat pups. *Develop. Psychobiol.* 19, 163-174, 1986
 - 3) 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
 - 4) Harada, S., Yamamoto, T., Yamaguchi, K. and 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)
 - 5) Farbman, A. I.: Electron microscopic study of the developing taste bud in rat fungiform papilla. *Develop. Biol.* 11, 110-135, 1965
 - 6) Fish, H. S., Malonc, 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
 - 7) Guth, L.: The effects of glossopharyngeal nerve transection on the circumvallate papilla of the rat. *Anat. Rec.* 128, 715-731, 1957
 - 8) 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
 - 9) Belecky, T. L. & Smith, D. V.: Postnatal development of palatal and laryngeal taste buds in the hamster. *J. Comp. Neurol.* 293, 646-654, 1990
 - 10) Hosley, M. A. & Oakley, B.: Postnatal development of the vallate papilla and taste buds in rats. *Anat. Rec.* 218, 216-222, 1987
 - 11) Mistretta, C. M.: Topographical and histological study of the developing rat tongue, palate and taste buds., In: *Oral Sensation and Perception III*, (Bosma, J. F. ed), Charles C. Thomas, Springfield, pp. 163-187, 1972
 - 12) 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
 - 13) Kaplick, M.: Concerning the presence, distribution, & histological aspects of the taste buds on the roof of the mouth of certain mammals, especially rodents. *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 38, 571-590, 1953
 - 14) Miller, I. J.: Gustatory receptors of the palate. *Food Intake & Chemical Senses (Int. Symp. on Food Intake & Chem. Senses)* Univ. Tokyo Press, pp.173-185, 1977
 - 15) Miller, I. J. & Smith, D. V.: Quantitative taste bud distribution in the hamster. *Physiol. Behav.* 32, 275-285, 1984
 - 16) Harada, S. & Smith, D. V.: Gustatory sensitivities of the hamster's soft palate. *Chem. Senses* 17, 37-51, 1992
 - 17) 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
 - 18) Krimm, R. F., Nejad, M. S., Smith, J. C., Miller, I. J. & 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
 - 19) 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
 - 20) Hill, D. L. & Almili, C. R.: Ontogeny of chorda tympani nerve responses to gustatory stimuli in the rat. *Brain Res.* 197, 27-38, 1980
 - 21) Harada, S. & Maeda, S.: Developmental changes in sugar responses of the chorda tympani nerve in preweanling rats, *Chem. Senses*, 29, 209-215, 2004
 - 22) Yamada, T.: Chorda tympani responses to gustatory stimuli in developing rats. *Jpn. J. Physiol.* 30, 631-643, 1980
 - 23) Hill, D. L. & Bour, T. C.: Addition of functional amiloride-sensitive components to the receptor membrane: a possible mechanism for altered taste response during development. *Develop. Brain Res.* 20, 310-313, 1985
 - 24) Hendricks, S. J., Stewart, R. E., Heck, G. L., DeSimone, J. A. & Hill, D. L.: Development of rat chorda tympani sodium responses: Evidence for age-dependent changes in global amiloride-sensitive Na⁺ channel kinetics. *J. Neurophysiol.* 84, 1531-1544, 2000
 - 25) Ninomiya, Y., Tanimukai, T., Yoshida, S. & Funakoshi, M.: Gustatory neural responses in preweanling mice. *Physiol. Behav.* 49, 913-918, 1991
 - 26) Hill, D. L., Mistretta, C. M. & Bradley, R. M.: Developmental changes in taste response characteristics

- of rat single chorda tympani fibers. *J. Neurosci.* 2, 782-790, 1982
- 27) Hill, D. L.: Development of chorda tympani nerve taste responses in the hamster. *J. Comp. Neurol.* 268, 346-356, 1988
- 28) Iwasaki, K. & Sato, M.: Inhibition of taste nerve responses to sugars and amino acids by cubic and zinc ions in mice. *Chem. Senses* 11, 79-88, 1986
- 29) Vlahopoulos, V. & Jakinovich, W.: Antagonism of the gerbil's sucrose taste response by p-nitrophenyl D-glucopyranoside and chloramphenicol. *J. Neurosci.* 6, 2611-2615, 1986
- 30) Faurion, A. & Vayssettes-Courchay, C.: Taste as a high discriminative system: a hamster intrapapillar single unit study with 18 compounds. *Brain Res.* 512, 317-332, 1990
- 31) Tsuboi, K. K., Kwong, L. K., Neu, J. & Sunshine, P.: A proposed mechanism of normal intestinal lactase decline in the postweaned mammal. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 101, 645-652, 1981
- 32) Johanson, I. B. & Shapiro, E. G.: Intake and behavioral responsiveness to taste stimuli in infant rats from 1 to 15 days of age. *Develop. Psychol.* 19, 593-606, 1986
- 33) Ninomiya, Y., Kajiura, H. & Mochizuki, K.: Differential taste responses of mouse chorda tympani and glossopharyngeal nerves to sugars and amino acids. *Neurosci. Lett.* 163, 197-200, 1993
- 34) Harada, S.: Gustatory system of the soft palate in mammals, *Annals of Kagoshima University Dental School* 14, 25-41, 1994

TLR シグナルと歯周病

松口 徹也

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科発生発達成育学講座口腔分子生物学分野

Toll-like receptor signals and periodontitis

Tetsuya Matsuguchi

Department of Biochemistry and Molecular Dentistry, Division of Developmental Medicine,
Course of Health Research, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences,
8-35-1 Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan

Abstract

Toll-like receptors (TLRs) are a family of mammalian proteins homologous to *Drosophila* Toll, which was first identified as a protein controlling dorso-ventral pattern formation in the early development. TLR structure is characterized by proline-rich repeats (PRRs) in the extracellular domain and Toll/IL-1 receptor (TIR) motif in the cytoplasmic domain. Each TLR is essential for the recognition of specific pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Among TLRs, TLR4 is essential for LPS responsiveness, and TLR2 is a receptor for bacterial lipoproteins and peptidoglycan. Although TLRs share many downstream signaling molecules, various reports have also suggested differences among the biological responses induced by TLRs. We have recently found that JNK-interacting protein (JIP) 3, a scaffold protein of JNK and its upstream kinases, associates with TLR4 and enhances LPS-mediated JNK activation. As TLR signals (such as JNK activation) induce significant amounts of inflammatory mediators from various cell types, they need to be tightly controlled. We have recently cloned a novel MAP kinase phosphatase, MKP-M, and found that it is specifically essential in the downregulation of JNK activity induced by LPS. LPS has been identified as an important pathogenic factor of periodontitis. We found that osteoblasts express both TLR2 and TLR4 mRNAs and directly respond to LPS by increasing RANKL protein expression. Mice with disrupted RANKL gene completely lack osteoclasts and exhibit severe osteopetrosis and a defect in tooth eruption, suggesting that RANKL is essential for osteoclastogenesis. Thus, LPS may promote periodontitis by directly inducing RANKL expression via TLRs in osteoblasts.

Key words: TLR, periodontitis, JIP3, LPS, RANKL

I. はじめに

都会にお住まいの方なら、スモッグと喧噪に汚れた生活に疲れて、少し離れた山里に「きれいな空気」を吸いに足をのびされた経験はおそらく誰にでもあるだろう。しかし感染免疫学の立場から言えば、山里の空気も都会同様に汚い。もし人間の目が顕微鏡のように精密で、ウイルスや細菌を見つけられるなら、とても山里の空気を深く吸い込もうなどという気分にはなれないだろう。本当の「きれいな空気」を吸いたければ、実は手術室かクリーンベンチの前に行った方が随分ましである。最初から夢のない話で申し訳ないが、それほど我々の周囲は微生物にあふれているのである。

免疫とは「疫を免れる」との名のごとく、多細胞生物（ホスト）と周りの病原体とのせめぎ合いから生まれてきたものである。哺乳類のような多細胞生物では体に存在する多数の細胞（人間の成人で約60兆個）を栄養するために体液環境を整え、生体の恒常性（ホメオスタシス）を保とうとする。しかし都合の悪いことに、体内の細胞にとって良い環境は、外界にあふれる微生物の生存にとっても理想的な環境なのである。そのため外界の微生物はわずかな隙をついてホストの中に侵入しようとする。さらに微生物のなかには、進化の過程で、多細胞生物に侵入するための様々な特別な“装置”を身につけたものも多い。

よって、侵入しようとする微生物の存在を認識し排除する機構は昆虫や植物もふくめたあらゆる多細胞生物にとって必須であり、この基本的な排除機構を自然免疫（innate immunity）と呼んでいる。これはより高等な生物（脊椎動物）にのみ存在する獲得免疫（acquired immunity）とは異なり、リンパ球のクローン増殖のステップを含まないため、急な病原体の侵入にも素早く対応することができ（図1）、生体防御の最前線を担う重要な役割を果たしている。また、自然免疫

を担う貪食細胞の一部（樹状細胞、マクロファージなど）は、貪食した病原体を抗原としてリンパ球に提示することでその後の獲得免疫を誘起することができる。つまり、実はこれらの2つの免疫機構は密接に繋がっているわけである。

図1に示すように、自然免疫は獲得免疫に対して特異性が低いとされている。確かに獲得免疫を担うリンパ球に見られる遺伝子再構成を伴うようなエレガントな抗原認識機構（T細胞：T細胞レセプター、B細胞：抗体）は自然免疫には存在しない。しかし、もし自然免疫に自己と非自己（病原体）を区別する機構が備わっていないとすれば、好中球やマクロファージが自己の細胞に対して無差別に攻撃を始めることになり、ホストの体の中はあっという間に大変な事態となる。だから自然免疫にもちゃんと自己と非自己を見分けるだけの特異性が備わっているはずである。最近の Toll-like receptors (TLRs) とよばれる蛋白ファミリーの発見は自然免疫における特異性をうまく説明し、今まで現象論でとどまっていた自然免疫と病原体の関わりを分子レベルで説明することを容易にした。以下これについて概説したい。

II. TLR について

A. PAMPs と PRRs

自然免疫の担当細胞が認識しうる病原体の分子構造を PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), PAMPs を認識する自然免疫細胞側の受容体を PRRs (pattern recognition receptors) と呼ぶことが提唱されている。最近 PRR の代表として新たに注目されている一群の蛋白群が Toll-like Receptor (TLR) である。TLR の原型はショウジョウバエで発見された Toll と呼ばれる蛋白であり、また、Toll に似た蛋白は植物でも見ついている。これらの事実は、Toll 様蛋白による自然免疫能が、あらゆる生物の生存に必須であることを如実に物語っている。

現在のところ、哺乳類では、TLR 1 から10までの10種類が報告されている。Toll ファミリーの蛋白は特徴的な構造を有し、その細胞外ドメインはロイシンに富む繰り返し構造 (leucine-rich repeat: LRR) を持つ。LRR は22-28アミノ酸からなる比較的短いモチーフであり、βシート構造をとって蛋白質同士の結合に関与すると考えられる。TLR が PRR として働くことを考えると理にかなっているといえる。実に様々な PAMPs がそれぞれの TLR に認識されることが報告されている（図2）。実際に TLR の多型性がヒトの易感

	Innate Immunity 自然免疫	Acquired Immunity 獲得免疫
反応の速さ	速い (hours)	遅い (days~weeks)
特異性	低い	高い
免疫学的メモリ	なし	あり
系統進化	古い	新しい (脊椎動物以降)
担当細胞	マクロファージ 好中球 NK 細胞 樹状細胞 など	T細胞 B細胞

図1 2つの免疫系 —自然免疫と獲得免疫—

染性に関係する例がいくつかあげられており、たとえば TLR 4 の機能欠陥型突然変異とされる Asp299Gly の変異を持ったヒトは統計的にグラム陰性菌感染による敗血症になり易いと報告されている¹⁾。面白いことにいくつかの Heat shock proteins (HSPs) やリポ蛋白など一部の内在性物質も TLR によって認識されることが次々と報告されている (図 2) が、これについての生物学的意義の詳細はまだはっきりしていない。

B. LPSレセプターの TLR 4、マルチプレーヤーの TLR 2

良く知られた PAMP である LPS はグラム陰性菌の細胞壁を構成する糖脂質であり、その生物活性の殆どは lipid A といわれる脂質部分が受け持つ。LPS が多

量に存在すると、過剰な免疫反応によるエンドトキシンショックを惹起することから、臨床的にも極めて重要である。LPS は血中の LBP (LPS binding protein) と結合し、この LPS/LBP 複合体が貪食細胞などの細胞膜上に存在する CD14 によって認識されるが、CD14 は細胞内ドメインを持たず、LPS の強力な生物活性は TLR 4 によって伝達される。

一方、TLR 2 はペプチドグリカン、細菌性リポ蛋白、グラム陽性菌に認められるリポアミノ酸 (LTA)、マイコバクテリアに見られるリポアラビノマンナン (LAM)、酵母の成分である zymosan などに反応すると報告された。一つのレセプターが全く構造の異なる多種の細菌成分に反応する理由は不明であったが、Aderem ら

	bacterial	fungal	viral	endogenous	others
TLR1 (+TLR2)	OspA (Borrelia) Lipoprotein (mycobacterial)				
TLR2	Lipoprotein LTA LPS (cylindrical) Group B streptococcus secreted factor Fimbriae (<i>P. gingivalis</i>) Yersinia V-antigen OmpA (<i>K. pneumoniae</i>) Lipoarabinomannan (LAM) PIM	Aspergillus	HCV core lipopeptides Measles virus H protein	GP96 Hsp70 Necrotic cells	Schistosome (phosphatidylserine)
TLR3			dsRNA		
TLR4	LPS (conical) Fimbriae Poly-M (<i>P. aeruginosa</i>) Chlamydial hsp60 Pneumolysin (<i>S. pneumoniae</i>)	mannan (<i>Cryptococcus</i> , <i>Candida</i> , yeast)	RSV MMTV HCV core lipopeptides	Fibronectin Fibrinogen heparan Hsp60 Hsp70 Saturated fatty acid Surfactant protein-A GP96 Hyaluronan β -defensin 2	Taxol Safflower polysaccharides
TLR5	flagellin				
TLR6 (+TLR2)	MALP-2 Peptidoglycan Soluble tuberculosis factor Phenol-soluble modulin (<i>S. aureus</i>)	zymosan			
TLR7					imidazoquinoline
TLR8					Imidazoquinoline (human only)
TLR9	CpG DNA			Chromatin-IgG complex	

図 2 TLR は各種の分子構造を認識する。

各 TLR によって認識されることが報告されている分子を列記した。すべてを網羅しているわけではないので留意。Hsp70 に関しては TLR への反応は混在する LPS によるとの最近の報告もある。

は、TLR 2 が TLR 6 とヘテロダイマーを形成してペプチドグリカンや zymosan に反応するらしいことを見いだした²。一方、リポ蛋白の TLR 2 による認識にはその種類 (triacylated あるいは diacylated) によって TLR 1 もしくは TLR 6 との共同による³⁾。また、TLR 2 はある種の (レプトスピラや歯周病の原因菌である *P. gingivalis*) の LPS のレセプターとしても働краしい。

C. TLR メンバーの遺伝子発現様式の差

生体内での TLR の役割を考える場合、各 TLR の発現レベルとその分布の検討は極めて重要である。我々は、マクロファージにおけるマウス TLR 2 および 4 の遺伝子発現の違いを報告した⁴。TLR 2 は無刺激状態の細胞では弱くしか発現していないが、LPS, Lipid A, および各種炎症性サイトカインによる刺激でその mRNA 発現量は著明に増加した。一方、TLR 4 は常時発現しており、上述の各種刺激によってもその発現は変化しなかった。このことより、例えば細菌感染時に、TLR 4 は初期より働くが、TLR 2 はその発現が誘

導されて強く効果をあらわす二段式のモデルが考えられる (図 3A)。同様に他の TLR メンバーについてもその発現調節を調べたところ、構成的に発現されているグループ (TLR 4, 6) と、LPS などの刺激で誘導されてくるグループ (TLR 2, 3, 5) に二分されることが分かった (未発表データ)。さらに TLR 2 の遺伝子発現誘導のメカニズム解明のため、マウス TLR 2 遺伝子を単離しその 5' 調節領域を調べたところ、2つの NF- κ B 結合部位と、CREB, C/EBP, STAT の認識部位が存在し、それぞれが各刺激物質に対する反応性を規定していた⁵。これは別に報告された TLR 4 遺伝子の 5' 調節領域の構造と大きく異なっており、それぞれの遺伝子発現様式の違いを説明するものであった (図 3B)。

III. 各細胞種における TLR の役割

A. 上皮細胞と TLR

自然免疫の細胞というと貪食細胞が代表にあげられるが、実は自然免疫の最前線にいるのは上皮細胞である。外界からの病原体の侵入は普通、上皮のバリアに

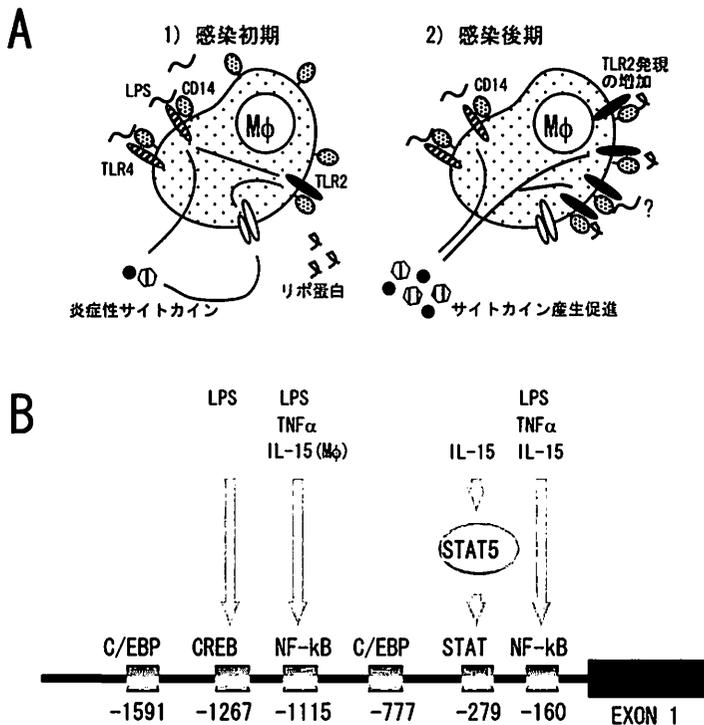


図 3 TLR2遺伝子の発現誘導

よってブロックされる。厚い角化層に覆われた健全な皮膚を突破するのは困難なため、殆どの感染病原菌は口腔、気道、消化管、あるいは尿路の粘膜上皮を突破してくることになるが、粘膜上皮をとりまく環境は決して同じではない。例えば腸管上皮細胞 (intestinal epithelial cells: IECs) は外来病原菌の侵入門戸として重要であるが、同時にホストに様々な利益を与えてくれる常在腸管細菌の共生を許しておく必要がある。一方腎臓尿管上皮は尿を介して外界と接していることになるが、腸管上皮と異なって基本的に周囲は無菌環境下にある。逆にいうと上皮細胞に触れる極少量の細菌の存在も体にとっての異常事態であり、細菌感染を厳しく取り締まるためにそのアンテナの感度を上げておくことが可能になる。

実際に IEC にも TLR (TLR 1, 2, 3, 4, 5, 6) は発現されているが、TLR 2, TLR 4 の発現レベルはかなり低く、それぞれのリガンドに対する反応性は極めて悪い⁶⁾。腸管の常在菌叢には TLR 2, TLR 4 を強く反応させるものがあるので、これは極めて合目的的といえる。実際に代表的な常在菌である乳酸菌の壁成分にふくまれる LTA には TLR 2 を強く刺激する作用があり、TLR 2 を強く発現するマクロファージなどからは多量のサイトカインを誘導する⁷⁾。また、鞭毛の主成分である flagellin を認識する TLR 5 蛋白の腸管上皮細胞における細胞内発現分布は、管腔面には殆ど認められず基底面、細胞側面に集中している⁸⁾。これは腸管腔に存在する細菌は認識せず、上皮層を侵入してきた細菌のみを認識するための巧妙なメカニズムと言えよう。面白いことに潰瘍性大腸炎や Crohn 病では TLR 4 の発現が上昇することが知られており⁹⁾、これらの炎症性腸疾患では常在菌叢が病勢に関係することを考えると興味深い。歯科領域で言えば、腸管と同様に歯肉上皮細胞における TLR の発現レベルも顕著ではない。しかし歯肉上皮細胞は IFN γ に反応して TLR 2 および TLR 4 を強く発現するようになるとの報告があり⁹⁾、局所の炎症時には細菌成分に対してよく反応するようになることも考えられる。

一方、尿路を逆行性に上昇してきた細菌に腎臓で直接対応するのは腎尿管上皮細胞 (renal tubular epithelial cells: TECs) である。IECs と異なり、TECs は構成的に比較的多量の TLR 1, 2, 3, 4, 6 を発現している¹⁰⁾。特に TLR 2, 3, 4 の発現量は同時に検討したマクロファージと十分比肩しうるものである。これは前述のように TECs が普段は無菌環境下であり、わずかな細菌量に反応する鋭敏さをもつことができること

と関連があると考えられ興味深い。このように生体の上皮細胞はそれぞれを取り巻く環境によって TLR の発現量 (あるいはパターン) を変化させることでそれぞれの細菌感染に対する感度を調節していることが考えられる。

B. マクロファージと TLR

単球・マクロファージは報告された全ての TLRs を発現し (TLR 3, TLR10 の発現レベルはかなり低い)¹¹⁾、TLR 2 や TLR 4 の補助因子として働く CD14 も細胞表面に高レベルに発現する。上皮を通り抜けてきた病原細菌に対して各組織で主に立ち向かうものがマクロファージであることを考えると当然ともいえる。TLR からのシグナルを受けたマクロファージは細胞性免疫に重要な CD80 などの補助刺激分子と TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 などのサイトカインを産生し¹²⁾、T 細胞や好中球をからめた炎症反応を誘起する。また NO 産生などによって、結核菌などの細胞内寄生細菌に対する殺菌能が高まる¹³⁾。

C. マスト細胞と TLR

喘息などの即時型アレルギーにおける悪役としての役割ばかりが強調されるマスト細胞であるが、実は末梢組織に存在し、感染局所でマクロファージとならんで感染防御に重要な役割を果たしている¹⁴⁾。我々を含めたいくつかの研究室で、マウス骨髄由来マスト細胞における TLR の発現が解析され^{15, 16)}、TLR 2, 4, 6, 8 の遺伝子の発現が確認されたが、TLR 5 の発現は認められなかった。興味深いことに、マスト細胞の LPS 刺激により IL-5, 10, 13 といった Th2 サイトカインの産生、分泌が起こる。また、TLR 2 の活性化はマスト細胞からの脱顆粒をも惹起する¹⁷⁾。これらのことはマスト細胞が直接 PAMP を認識して各種のサイトカイン産生および脱顆粒によって病原体のクリアランスに関与することを示し、細菌やウイルス感染が喘息の経過に影響するという古くから知られた現象¹⁸⁾ と関連するものかもしれない。

D. 樹状細胞と TLR

末梢組織で外来病原体の抗原を取り込んだ未熟樹状細胞 (DC) は TLR からのシグナルを受けると成熟分化し、MHC クラス II, CD80, CD86, CD40 の発現が増加し抗原提示能、リンパ球刺激活性が増強する。同時に単球由来の DC (myeloid DC) では IL-12, リンパ系由来の DC (pDC = plasmacytoid DC) では IL-12/

IFN α の産生量が上昇する¹⁹⁾。さらにケモカインレセプターの発現変化により2次リンパ組織に移動したDCは、そこで抗原特異的なT細胞の増殖・分化を促し、病原体に対する強力な獲得免疫機構が発動される。DCから抗原提示を受けたヘルパーT細胞(Th)は主に産生するサイトカインの異なるTh1(IFN γ)またはTh2(IL-4)タイプの細胞に分化し、それぞれの病原体にとっての最適な免疫機構が誘導される仕組みになっている。面白いことにDCにおけるTLRの発現パターンはDCのタイプ別に異なることが報告されており、myeloid DCではTLR1, 2, 4, 5, 7, 8, 9といった各種がよく発現されているのに対し、pDCではTLR7, 9はよく発現されているが、TLR2, 4などの発現レベルはとても低い。Myeloid DCおよびpDCがそれぞれTh1あるいはTh2を選択的に規定するという報告もあるが、最近の論文では、どちらのDCも少ない抗原量ではTh2, 多い抗原量ではTh1優位の

分化を誘導することが示されている²⁰⁾。

IV. 歯周病とTLR

A. 歯周病の原因としての細菌感染

口腔内には常時400種類以上もの細菌が生息していることが知られている。前述のように歯肉上皮細胞は反応性にTLR2やTLR4を発現する。また、歯肉線維芽細胞は比較的高いレベルのTLR4を発現しており、これらの細胞が局所からの細菌の侵入に対する防御壁となっていることが想定される。さて、LPSは破骨細胞による骨吸収を増加することが知られ、細菌感染による歯周病の誘導に深く関与していると考えられている²¹⁾。LPSによる骨吸収誘導の詳細なメカニズムについては不明な点が多いが、以前より、骨芽細胞(osteoblast)はLPS反応性にIL-1, IL-6, GM-CSF, PGE₂, NOなどを分泌することが報告されており²²⁾、歯肉組織に存在するマクロファージや線維芽細胞など

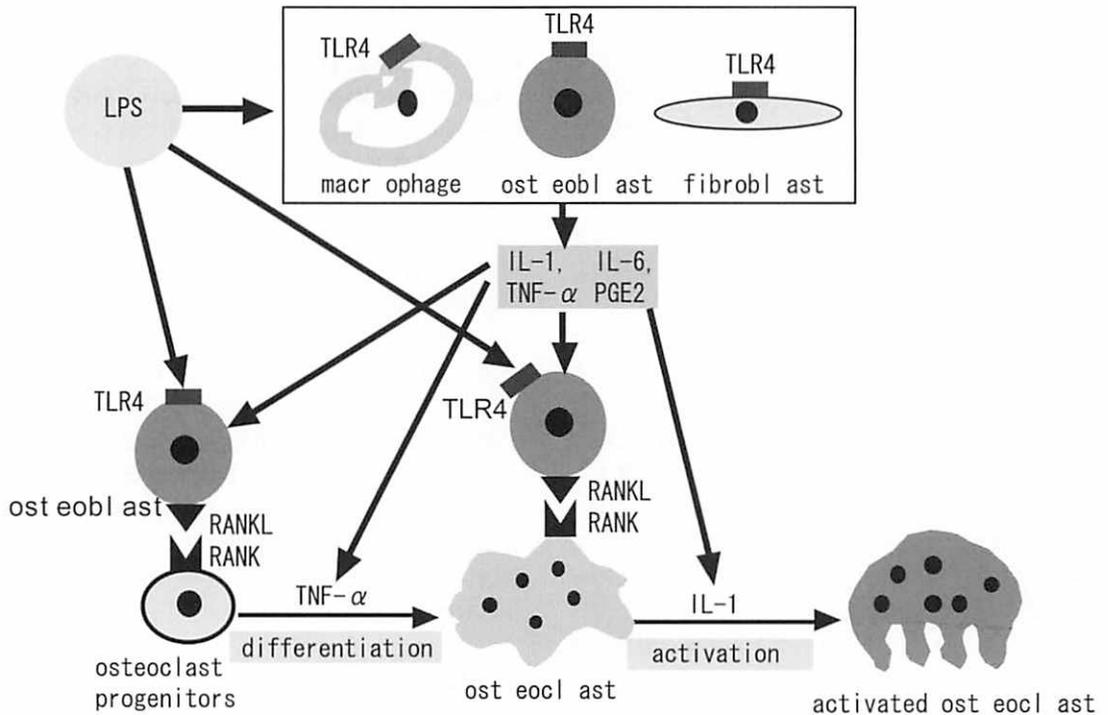


図4 RANKL産生におけるLPSシグナル伝達経路

LPSは骨芽細胞表面のTLR4によって(多くの場合CD14と共同して)認識され、ERK, PKCを介してシグナル伝達しRANKL産生を誘導する。また、TLR4より恒常的発現の弱いTLR2はLPSにより産生が誘導される。リボ蛋白等のレセプターであるTLR2の発現の誘導により、生体防御反応の強化につながると考えられる。

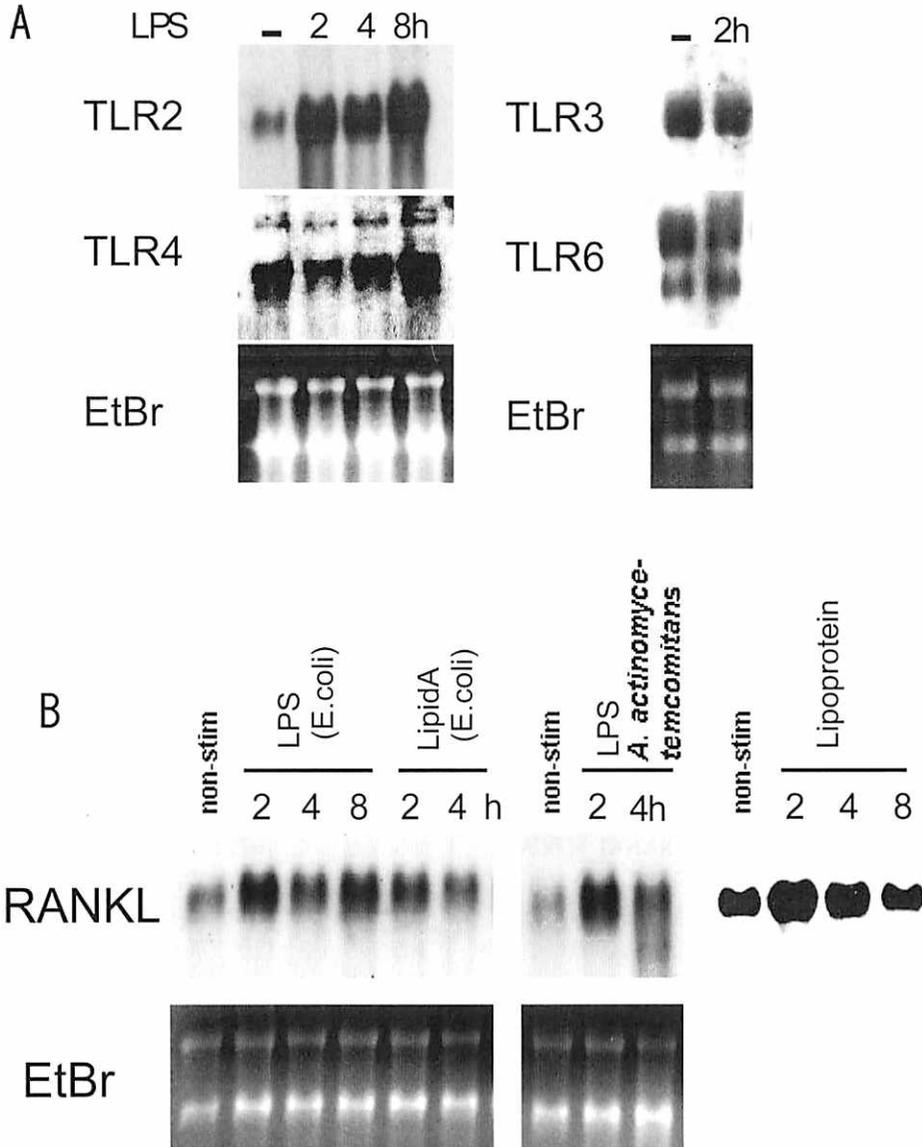


図5 骨芽細胞における TLR の役割

- A. マウス骨芽細胞における TLRs の遺伝子発現：マウス骨芽細胞を LPS で刺激し、各種 TLR の遺伝子発現をノーザンブロットで解析した。TLR2, 3, 4, 6 mRNA は骨芽細胞に構成的に発現しており、TLR2 mRNA は LPS による刺激で著明に増加した。一方、LPS のレセプターである TLR4 の遺伝子発現に著変は認められなかった。
- B. マウス骨芽細胞における RANKL の遺伝子発現調節：マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞を LPS 及び合成 lipid A, 合成 lipoprotein で刺激し、RANKL 遺伝子発現をノーザンブロットで解析した。RANKL の mRNA は各種因子の刺激により 2 時間以内に著明に増加した。

とともに、LPSの直接のターゲットとなりうることが考えられた(図4)。

B. RANKLによる破骨細胞分化誘導

RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand) は、ストローマ細胞、骨芽細胞やT細胞などから産生されるTNFファミリーに属するサイトカインで、破骨細胞前駆細胞に発現するレセプターであるRANKを介して、破骨細胞の分化、活性化に重要な役割を担っている²³⁾。骨芽細胞、ストローマ細胞が産生するRANKLは膜結合タンパクであるが、T細胞からは分泌型のRANKLが産生される²⁴⁾。RANKL遺伝子を欠損したマウスは破骨細胞が見られず、大理石骨病を発症することから、RANKLは破骨細胞の分化に必須である²⁴⁾。骨芽細胞や線維芽細胞はまた、恒常的に相当量のosteoprotegerin(OPG)を分泌している。OPGは可溶性でRANKLに対するおとり受容体として働きその活性を消失させる。このように二つの相反する機能的因子により破骨細胞の分化、活性化はコントロールされている。骨芽細胞はIL-1, TNF- α , PGE₂等に反応してRANKLを発現し、炎症局所において破骨細胞の増加に関与していると考えられる。LPSはマクロファージ等からのこれらのサイトカインの分泌を刺激することで間接的に破骨細胞の分化と活性化をもたらしうる(図4)。一方、我々は、LPSが直接骨芽細胞でのRANKL発現を誘導する可能性について検討した。

C. TLRを介した骨芽細胞からのRANKL発現誘導

マウス頭頂骨より分離した骨芽細胞は高レベルのTLR4と低レベルのTLR2 mRNAを構成的に発現していた(図5A)²⁵⁾。また、TLR3とTLR6遺伝子も構成的に発現していた。さらに興味深いことにTLR2はLPSの刺激により発現が増強した。骨芽細胞がLPSのレセプターであるTLR4を発現していることが明らかになったため、LPS、および合成lipid A(LPSの活性中心)投与によるRANKL発現の変化を調べたところ、図5Bに見られるようにRANKL遺伝子の発現は2時間以内に著明に増加した²⁵⁾。同様に蛋白レベルにおいてもRANKLの発現はLPS刺激4時間以内に増加した。また、若年性歯周炎の原因菌と考えられている*Actinobacillus actinomycetemcomitans*のLPS刺激においても同様の結果を得た。一方、OPGの遺伝子発現はLPS刺激後も変化を認めなかった。さらに、LPSによるRANKL遺伝子発現誘導は蛋白合成阻害剤であるcycloheximideによりむしろ増強され、

この現象が二次的なものでなく、LPSの直接作用によるものであることが示された。加えて、TNFI型受容体に対する中和抗体、プロスタグランジン合成阻害剤であるNS-398の添加もlipid AによるRANKL産生に影響を及ぼさなかった。以上の知見よりLPSは骨芽細胞に作用し直接RANKL遺伝子の発現を増加させることが明らかとなった。

同様の実験を、TLR4に遺伝的欠陥を持つC3H/HeJマウス由来の骨芽細胞を用いて行ったところ、RANKL遺伝子の発現誘導は認められず、また、LPSによるRANKL誘導はTLR4に対する中和抗体の前投与により抑制されたことから、LPSによる骨芽細胞からのRANKL誘導にTLR4が必須であることが示唆された。また、骨芽細胞はTLR2リガンドであるlipoproteinにも反応してRANKL遺伝子の発現を増加させた(図5B)。よって、骨芽細胞からのRANKL誘導はLPS特異的なものではなく、広い範囲のTLRリガンドにも認められる可能性がある。

D. 骨芽細胞からのRANKL誘導のシグナル伝達

TLRからのシグナルは、転写因子のNF- κ BやいくつかのMAPキナーゼを活性化することが知られている。LPSによるRANKL誘導に重要なシグナル伝達分子を決定するため、我々は各種の特異的インヒビターを用いた実験を行い、extracellular signal-regulated kinase(ERK)とprotein kinase C(PKC)のpathwayがLPS刺激による骨芽細胞におけるRANKL遺伝子の発現増加に関与していることを明らかにした²⁵⁾。これらの分子メカニズムは以前報告されたT細胞におけるT細胞レセプター(TCR)からのシグナルによるRANKL遺伝子の活性化機構と異なっていることが興味深い²⁴⁾。面白いことに、マウスRANKLのプロモーター領域にはinverted CAAT-boxesとCbfa1の結合部位がある²⁶⁾。CAAT/enhancer binding protein(C/EBP)とCbfa1の両転写因子はそれぞれERKにより活性化されることが知られ²⁷⁾、またPKCによるERKの活性化は成長ホルモンによるC/EBPの活性化に必須であることが報告されている²⁸⁾。これらの所見は我々の結果を裏付けるものである。また我々は最近、骨芽細胞でのLPSによるERKの活性化に、その上流のCot/Tpl2キナーゼが重要であることを、KOマウスを使った解析で明らかにした²⁹⁾。

V. TLRのシグナル伝達

TLR各メンバーの細胞内領域にはTIR(Toll/IL-1

receptor) という共通ドメインがあり、活性化されると共通の下流シグナルを誘導する。一方、各 TLR で特異的に活性化されるシグナル分子の存在もいくつか報告されており、TLR のシグナル伝達機構は当初思われていたような単純なものでない。ここではおもに LPS/TLR 4 のシグナル伝達について述べたい。

A. NF- κ B 活性化機構

LPS 刺激によって誘導される遺伝子のプロモーター領域の多くの中には NF- κ B 結合配列および AP-1

結合配列が認められる。LPS 刺激を受けた TLR 4 は同じ TIR ドメイン同士の会合を介してアダプター蛋白である MyD88 と結合する。MyD88 は TIR と共に Death domain (DD) を有しており、同じく DD を持ったセリンスレオニンキナーゼである IRAK1 および IRAK 4 と結合することでその活性化を促す。また、MyD88 以外にも TIRAP や TRIF といったアダプター分子も関与することが知られている。こうして活性化された IRAKs は TRAF6-TAB2-TAK1 の複合体形成を促すことで TAK 1 の活性化を誘導する。TAK 1 は下

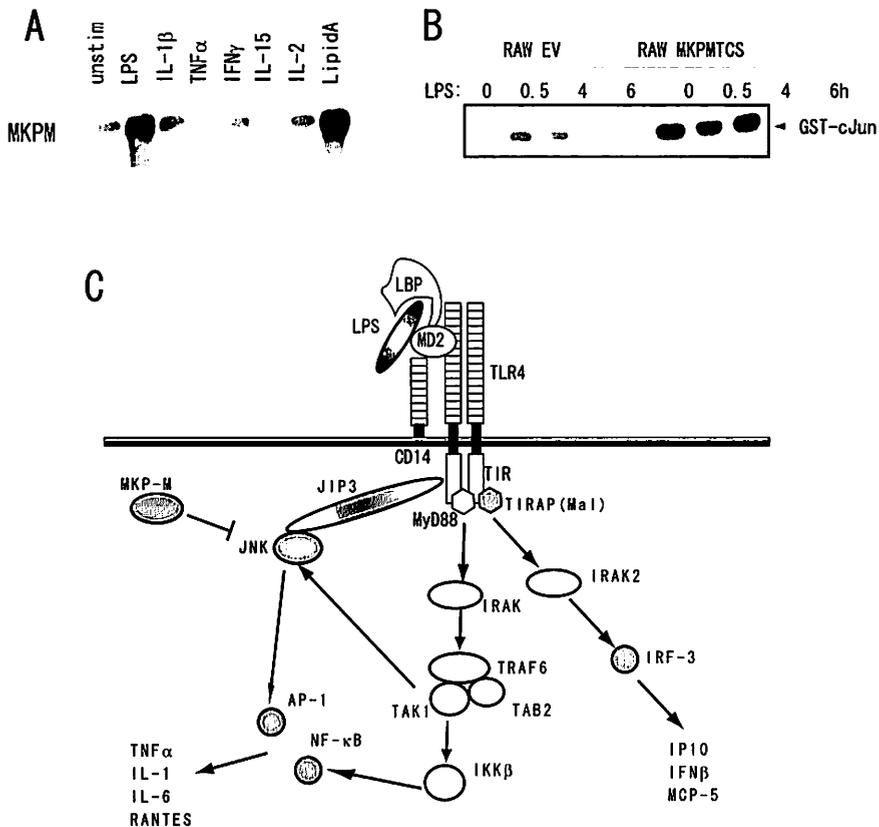


図6 TLR4シグナル伝達機構

- A. マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 をサイトカイン、LPS、lipid A で 2 時間刺激し、ノーザンブロッティングにて MKP-M の mRNA の発現量を比較した。MKP-M mRNA は LPS および lipid A で強く誘導された。
- B. MKPMTCs (フォスファターゼ不活性型) を発現させた RAW264.7 細胞とベクターのみを導入した細胞をそれぞれ LPS で刺激し、JNK 活性の経時変化を GST-cJun を基質に用いたキナーゼアッセイで示した。
- C. LPS 刺激時の TLR4 の下流シグナル伝達の模式図。詳細は本文を参照。

流のNIKを介して(NIKの生理的意義付けに関しては異説もあるが)I κ BのキナーゼであるIKK β を活性化して最終的にNF- κ Bの核移行とそのターゲット遺伝子の転写が誘導される³⁰。

B. MAPキナーゼ活性化機構

LPS等のPAMPsの刺激により3種類のMAPキナーゼ(ERK, JNK, p38)が活性化されることが多くの細胞種で報告されている。JNKはc-Junのリン酸化によるAP-1の活性化を引き起こすことでLPS反応性遺伝子発現誘導に特に重要な働きをもつ。LPSによるJNKの活性化にはTRAF6-TAK1の経路が重要な役割を果たすことが示されているが、その他の経路も存在することが示唆されている。MAPキナーゼの活性化には一般にMAPキナーゼとその上流の活性化キナーゼを結合することでMAPキナーゼ活性化の場を提供するいわゆるscaffold蛋白が重要な役割を果たすが、我々は最近yeast two hybridスクリーニングよりJNKのscaffold蛋白として知られるJIP3(JNK interacting protein-3, 別名JSAP1)がTLR4と結合することを見いだした³¹。このTLR4-JIP3の結合は哺乳細胞内でも恒常的に認められ、JIP3の強発現はLPSによるJNK活性化を著しく促進し、JNK非結合型(ドミナントネガティブ型)JIP3の発現は逆にLPSによるJNK活性化を抑制した。このことはJIP3がLPSによるJNK活性化の促進因子として働くことを示唆している(図6B)。

C. フィードバック機構

LPSによって誘導される炎症反応は病原菌の排除には役立つが、過度な反応が長く持続すると周囲の正常組織の破壊を招くことになる。このため、いったん反応が起こるとこれを鎮静化するフィードバック機構が必要である。LPSの場合にはこのフィードバックによってLPSの再投与による反応が著しく弱まる現象が知られており、LPSトレランスと呼ばれるが、その分子機構については定説が得られていない。LPS刺激後にTLR4の表面発現量が低下するとの報告³²があり、我々はLPS刺激後にマウスTLR4遺伝子のalternative splicingによって細胞外ドメインのN端の一部のみからなる可溶型のTLR4が誘導され、全長型のTLR4からのシグナルを抑制することを報告した³³。また最近、単球・マクロファージ特異的でキナーゼ活性をもたないIRAKの一種であるIRAK-MがLPS刺激によって誘導され、これがIRAK1/4の活性化を競合抑制する

ことがLPSトレランスのメカニズムとして働くことが示された³⁴。このようにLPSトレランスはいくつかのフィードバック機構が共同して働いていることによる可能性が強い。

我々は最近マウスマクロファージから新規のMAPキナーゼフォスファターゼ(MKP)をクローニングし、MKP-M(MKP isolated from macrophages)と命名した。MKP-MのmRNAおよび蛋白発現レベルはマクロファージのLPS刺激により誘導された(図6A)。その基質特異性は3種類のMAPキナーゼのうち、特にJNKに強い特異性を認めた。MKP-Mのフォスファターゼ不活性型変異体をマクロファージに導入すると、LPS刺激後のJNK活性の上昇が著明に延長し(図6B)、TNF α の産生量が著明に増加した。このことはMKP-MがLPS刺激によるJNK活性化のフィードバック機構の一つとして重要な働きをしていることを示す³⁵(図6C)。

VI. おわりに

TLRは自然免疫におけるPRPの1つとして感染免疫において特に重要な働きをしていることをお話してきた。しかしPRRにはTLR以外にもマンノースレセプターやスカベンジャーレセプターなど多種類のものが知られており³⁶、また病原体によって活性化される補体系の働きも感染免疫に極めて重要である。感染防御機構はこれら多数のシステム複雑なインタープレイによって成り立っていることは常に頭に置いておく必要がある。いずれにしても、この小さなレビューが、今後科学研究を志す(もしくはすでに行っている)研究者の一助になれば幸いである。

文 献

- 1) Lorenz, E., Mira, J. P., Frees, K. L., and Schwartz, D. A.: Relevance of mutations in the TLR4 receptor in patients with gram-negative septic shock. *Arch Intern Med*, 162, 1028-1032, 2002.
- 2) Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L., and Aderem, A.: The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13766-13771., 2000.
- 3) Takeuchi, O., Sato, S., Horiuchi, T., Hoshino, K., Takeda, K., Dong, Z., Modlin, R. L., and Akira, S.: Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating

- immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol*, 169, 10-14, 2002.
- 4) Matsuguchi, T., Musikacharoen, T., Ogawa, T., and Yoshikai, Y.: Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol*, 165, 5767-5772., 2000.
 - 5) Musikacharoen, T., Matsuguchi, T., Kikuchi, T., and Yoshikai, Y.: NF-kappaB and stat5 play important roles in the regulation of mouse toll-like receptor 2 gene expression. *J Immunol*, 166, 4516-4524., 2001.
 - 6) Cario, E. and Podolsky, D. K.: Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*, 68, 7010-7017, 2000.
 - 7) Matsuguchi, T., Takagi, A., Matsuzaki, T., Nagaoka, M., Ishikawa, K., Yokokura, T., and Yoshikai, Y.: Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through Toll-like receptor 2. *Clin Diagn Lab Immunol*, 10, 259-266, 2003.
 - 8) Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., and Madara, J. L.: Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *J Immunol*, 167, 1882-1885, 2001.
 - 9) Uehara, A., Sugawara, S., and Takada, H.: Priming of human oral epithelial cells by interferon-gamma to secrete cytokines in response to lipopolysaccharides, lipoteichoic acids and peptidoglycans. *J Med Microbiol*, 51, 626-634, 2002.
 - 10) Tsuboi, N., Yoshikai, Y., Matsuo, S., Kikuchi, T., Iwami, K., Nagai, Y., Takeuchi, O., Akira, S., and Matsuguchi, T.: Roles of toll-like receptors in C-C chemokine production by renal tubular epithelial cells. *J Immunol*, 169, 2026-2033, 2002.
 - 11) Hornung, V., Rothenfusser, S., Britsch, S., Krug, A., Jahrsdorfer, B., Giese, T., Endres, S., and Hartmann, G.: Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*, 168, 4531-4537, 2002.
 - 12) Brightbill, H. D., Libraty, D. H., Krutzik, S. R., Yang, R. B., Belisle, J. T., Blchanski, J. R., Maitland, M., Norgard, M. V., Plevy, S. E., Smale, S. T., Brennan, P. J., Bloom, B. R., Godowski, P. J., and Modlin, R. L.: Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 285, 732-736, 1999.
 - 13) Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Takeuchi, O., Ochoa, M. T., Engele, M., Sieling, P. A., Barnes, P. F., Rollinghoff, M., Bolcskei, P. L., Wagner, M., Akira, S., Norgard, M. V., Belisle, J. T., Godowski, P. J., Bloom, B. R., and Modlin, R. L.: Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*, 291, 1544-1547., 2001.
 - 14) Malaviya, R., Ikeda, T., Ross, E., and Abraham, S. N.: Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature*, 381, 77-80, 1996.
 - 15) Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H.: Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by Toll-like receptor 4. *J Immunol*, 167, 2250-2256, 2001.
 - 16) Masuda, A., Yoshikai, Y., Aiba, K., and Matsuguchi, T.: Th2 cytokine production from mast cells is directly induced by lipopolysaccharide and distinctly regulated by c-Jun N-terminal kinase and p38 pathways. *J Immunol*, 169, 3801-3810, 2002.
 - 17) Supajatura, V., Ushio, H., Nakao, A., Akira, S., Okumura, K., Ra, C., and Ogawa, H.: Differential responses of mast cell Toll-like receptors 2 and 4 in allergy and innate immunity. *J Clin Invest*, 109, 1351-1359, 2002.
 - 18) Gern, J. E.: Viral and bacterial infections in the development and progression of asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 105, S497-502, 2000.
 - 19) Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S., and Liu, Y. J.: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284, 1835-1837, 1999.
 - 20) Boonstra, A., Asselin-Paturel, C., Gilliet, M., Crain, C., Trinchieri, G., Liu, Y. J., and O'Garra, A.: Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med*, 197, 101-109, 2003.

- 21) Amano, S., Kawakami, K., Iwahashi, H., Kitano, S., and Hanazawa, S.: Functional role of endogenous CD 14 in lipopolysaccharide-stimulated bone resorption. *J Cell Physiol*, 173, 301-309, 1997.
- 22) Nair, S. P., Meghji, S., Wilson, M., Reddi, K., White, P., and Henderson, B.: Bacterially induced bone destruction: mechanisms and misconceptions. *Infect Immun*, 64, 2371-2380, 1996.
- 23) Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., Teepe, M. C., DuBose, R. F., Cosman, D., and Galibert, L.: A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390, 175-179, 1997.
- 24) Kong, Y. Y., Feige, U., Sarosi, I., Bolon, B., Tafuri, A., Morony, S., Capparelli, C., Li, J., Elliott, R., McCabe, S., Wong, T., Campagnuolo, G., Moran, E., Bogoch, E. R., Van, G., Nguyen, L. T., Ohashi, P. S., Lacey, D. L., Fish, E., Boyle, W. J., and Penninger, J. M.: Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402, 304-309, 1999.
- 25) Kikuchi, T., Matsuguchi, T., Tsuboi, N., Mitani, A., Tanaka, S., Matsuka, M., Yamamoto, G., Hishikawa, T., Noguchi, T., and Yoshikai, Y.: Gene expression of osteoclast differentiation factor is induced by lipopolysaccharide in mouse osteoblasts via Toll-like receptors. *J Immunol*, 166, 3574-3579, 2001.
- 26) Kitazawa, R., Kitazawa, S., and Maeda, S.: Promoter structure of mouse RANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene. *Biochim Biophys Acta*, 1445, 134-141, 1999.
- 27) Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M. D., Guan, K., Karsenty, G., and Franceschi, R. T.: MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1. *J Biol Chem*, 275, 4453-4459, 2000.
- 28) Clarkson, R. W., Chen, C. M., Harrison, S., Wells, C., Muscat, G. E., and Waters, M. J.: Early responses of trans-activating factors to growth hormone in preadipocytes: differential regulation of CCAAT enhancer-binding protein-beta (C/EBP beta) and C/EBP delta. *Mol Endocrinol*, 9, 108-120, 1995.
- 29) Kikuchi, T., Yoshikai, Y., Miyoshi, J., Katsuki, M., Musikacharoen, T., Mitani, A., Tanaka, S., Noguchi, T., and Matsuguchi, T.: Cot/Tpl 2 is essential for RANKL induction by lipid A in osteoblasts. *J Dent Res*, 82, 546-550, 2003.
- 30) Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., and Matsumoto, K.: The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, 398, 252-256, 1999.
- 31) Matsuguchi, T., Masuda, A., Sugimoto, K., Nagai, Y., and Yoshikai, Y.: JNK-interacting protein 3 associates with Toll-like receptor 4 and is involved in LPS-mediated JNK activation. *Embo J*, 22, 4455-4464, 2003.
- 32) Nomura, F., Akashi, S., Sakao, Y., Sato, S., Kawai, T., Matsumoto, M., Nakanishi, K., Kimoto, M., Miyake, K., Takeda, K., and Akira, S.: Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol*, 164, 3476-3479, 2000.
- 33) Iwami, K. I., Matsuguchi, T., Masuda, A., Kikuchi, T., Musikacharoen, T., and Yoshikai, Y.: Cutting edge: naturally occurring soluble form of mouse Toll-like receptor 4 inhibits lipopolysaccharide signaling. *J Immunol*, 165, 6682-6686, 2000.
- 34) Kobayashi, K., Hernandez, L. D., Galan, J. E., Janeway, C. A., Jr., Medzhitov, R., and Flavell, R. A.: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell*, 110, 191-202, 2002.
- 35) Matsuguchi, T., Musikacharoen, T., Johnson, T. R., Kraft, A. S., and Yoshikai, Y.: A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase is an important negative regulator of lipopolysaccharide-mediated c-Jun N-terminal kinase activation in mouse macrophage cell lines. *Mol Cell Biol*, 21, 6999-7009, 2001.
- 36) Gordon, S.: Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111, 927-930, 2002.

硬組織の病理組織標本作成法

仙波伊知郎・形岡 英子

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科腫瘍学講座口腔病理解析学分野

Technical notes for histopathological preparation of hard tissues

Ichiro Semba and Fusako Kataoka

Department of Oral Pathology, Division of Oncology, Course of Advanced Therapeutics,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan.

Abstract

Technical notes about calcified hard tissues including tooth and bone were described for new comers such as postgraduate students and young researchers. The macroscopic examinations are essential procedures before histological examinations. Especially, the examination by means of soft x-ray might provide useful findings about calcified hard tissue specimens. Decalcified method such as Plank-Rychlo quick decalcified procedure is commonly used for basic histomorphological examination using acids. Although the method might result decrease of Hematoxyline staining and over-staining of Eosin, it would be avoid by the decalcification under lower temperature in a refrigerator. The difficulty of sectioning for decalcified hard tissue specimens might be not due to insufficient decalcification but for the cutting skills for dens fibrous tissue composition of the hard tissue specimen.

The cutting and grinding method of undecalcified preparation is an essential one for hard tissue specimens containing metals and ceramics. The adhesion method of resin embedded undecalcified specimen to slide glasses and/or acrylic plates allows easy handling the specimen during the grinding preparation not only for using a programmed machine but also for a manual preparation. The surface staining with an etching is applied for relatively thick grinding specimen. The surface staining provides as clear staining as that of in the case of thin sectioning preparation.

The technical tips about the histological preparation methods should be precisely hand over by young researchers and it might not be replaced by machinery even in the future. Furthermore, the histological methods might be an essential method for integration of knowledge about human diseases that are depended on specificity of individuals.

Key words: hard tissues, histopathology, decalcified preparation, undecalcified preparation,

I. はじめに

口腔領域の病理組織検索には、歯や顎骨などの硬組織を取り扱う頻度が高いが、硬組織の標本作成は軟組織に比較すると、一般に困難である。一方、硬組織標本作成のための方法論や技術的な問題点についての記載は一般的な学術誌では希であり、特にこれから標本作成を行おうとする者にとって、参考になる文献が乏しいのが現状である¹⁾。今回は硬組織標本作成法について、初めて組織標本を作成しようとしている大学院生などを想定しながら、主に技術的な注意点などを実践的な観点から記しておきたい。

口腔病理解析学講座では、これまで病理組織標本の作成について、教育、研究、診断業務を通して研鑽を積み重ねてきたが、これらの技術は学生、大学院生や若い研究者に継承されてこそ、その成果が結ばれるものと考えている。標本作成に必要な技術教育はこれまでも共同研究を通じて行っており、また、ここで紹介している機器も講座で管理しているが学部共同の資産でもあり、有効な活用によってより一層、教育、研究、臨床に資することが出来ると思われる。この拙校が、標本作成を志す者が講座を訪れる契機になれば幸いである。

II. 硬組織標本の取り扱い

A. 固定

歯や骨などの硬組織は、一般に緻密な組織で、固定液の浸透が困難であり、また、内部に歯髄や骨髄などの軟組織を含むため、固定には充分留意する必要がある。人体例では浸漬固定しか行えないが、ラット、マウスあるいは犬などの実験動物では環流固定法を行う方が良い。いずれの場合にもさらに浸漬固定を行うが、後述するように組織片の厚みを5mm程度に切り出しを行い、充分な固定効果が得られる様にする必要がある。

硬組織の固定には中性緩衝ホルマリンを用いる。未緩衝のホルマリン液ではギ酸が生じるので、特に非脱灰標本を作る際は緩衝ホルマリンが必須である。また、軟組織もこの酸による障害が生じるので、免疫組織化学染色を行う場合も緩衝ホルマリンが良い。一般的にはリン酸緩衝10%ホルマリン液を用いるが、固定効果を促進したい場合や人体剖検例など死後変化が強い場合などは、20%程度までの高濃度のホルマリン液も用いる。浸漬固定を0.5気圧程度の陰圧下で行えばより効果的である。なお、固定後、長時間の水洗は避け、水洗は軽く流水をくぐらせる程度で良く、非脱灰標本

の場合は70%アルコールに浸漬し、脱灰標本の場合は固定後直ちに脱灰液に浸漬する。

B. マクロおよび軟X線写真

1. 肉眼所見

組織観察の入り口は肉眼観察である。全てを組織標本にして観察することは不可能であるので、標本作成部位を決めるための肉眼観察と肉眼診断は組織検索には欠かすことが出来ない。その肉眼観察に基づいて標本にする部分を切り出すことになる。この際に標本の全体像や断面の所見を写真に記録することが大切である。最近ではデジタルカメラの普及と性能向上によって、写真撮影も容易になった。フィルムの現像を待つ必要がないので、様々な条件を試して撮影し、良い条件のものだけを残す事が出来る。

2. 軟X線写真

さらに、硬組織では標本全体および5mm程度の厚みに切り出しをした標本の軟X線写真が肉眼像と共にマクロ観察には有用である。現在、本講座で用いているソフテックス社 CSM-2 では、CMB-M 焦点を用いて、管電流3mA、照射時間60秒、焦点距離38cm、現像(レンドール)20℃、5分の条件を一定にして、管電圧を変化させ、対象標本に適正な条件を求めている。ヒトの顎骨などの緻密な皮質骨や歯などでは35から40kVpの管電圧とし、海面骨やその他の石灰化物では25から30kVp、マウス、ラットなどの小動物の頭部では20から25kVpを目安としている。フィルムは専用のもの(Industrial X-ray Film FR, 富士フィルム)を用いる。

C. 切り出し

この様な全体像や大まかな断面などのマクロの観察が終わると、さらに精密な標本の切り出しを行い、標本作成が可能な大きさに細切する。標本の固定効果をあげる為には、標本の厚みは薄ければ薄い程よいが、切り出し時に生じる組織破壊や極端に薄すぎる標本では標本作製が困難になる事を考慮すると、厚みは5mm程度にする。硬組織の切り出しには、水冷機構を備えたダイヤモンドバンドソー(EXAKT BS3000, 盟和商事)を用いると簡便で良い。最終的な標本の大きさは、一般的にはティッシュテックの標本カセット(28×25×4mm)に入る大きさを標準と考えれば良い。

III. 脱灰標本の作製

A. 脱灰

1. 迅速脱灰法

硬組織の非脱灰標本の作成法については後述するが、一般的に用いられるパラフィン包埋薄切標本作製するためには脱灰操作が必須である。脱灰法には様々なものがあるが、病理組織検査では迅速で確実な脱灰方法が求められるため、酸を用いた迅速脱灰法が汎用されている。ここでは、Plank-Rychlo法(表1)について述べる。なお、マウス、ラットなどの小実験動物の頭蓋骨などではキレート剤であるEDTAを用いた脱灰法が用いられるが、歯を含む顎骨では迅速脱灰法の方が簡便である。

標本体積の約30倍量の脱灰液を用いる。脱灰に伴ってガスが生じるので密閉容器を用いてはならない。標本カセットに入れると、容器や標本同士が密着しないので良い。通常は室温で24から36時間、薄く小さなものでは8から12時間で良く、一方、歯や緻密な皮質骨では48時間程度かける。脱灰不足の標本では、表面の薄切は出来ても、切り込むに従って薄切出来なくなるので、十分な脱灰が出来ているのか否かの判断が確実に出来なければならない。24時間頃を目安に一部分をカミソリで切ったり、針を刺して脱灰の程度を確認し、必要であれば脱灰液を更新して続ける。

表1 迅速脱灰液(Plank-Rychlo⁸⁾)

塩化アルミニウム(結晶)	70g
蒸留水	1000ml
ギ酸	50ml
濃塩酸(37%)	85ml

2. 中和と低温脱灰

過脱灰は後の薄切や染色に大きく影響するので、必要最小限の時間で脱灰する必要がある。対象標本が多数ある場合や動物実験では、軟X線写真を撮影して2から4時間おきに撮影し、脱灰速度を確認し脱灰時間を目安を立てることもある。酸を用いた脱灰なので、ヘマトキシリン・エオジン重染色では、ヘマトキシリンに染まりにくく、エオジンに過染しがちになる。この様に好酸性になりがちな染色性を改善するために、脱灰後、中和液(5%硫酸ナトリウム水溶液)に浸漬する。また、脱灰を冷蔵庫内(4℃)で行うと染色性の低下を回避できる。低温脱灰では1.5から2倍の時間が必要となる。また、週末などで標本作成スケジュール

の調整が必要なおときには、この低温脱灰で時間を調整することも可能である。

B. パラフィン包埋

硬組織は脱灰を行っても、多くの場合、基質が緻密な線維性組織であるため、その後の薬液浸透も容易ではない。最終的にパラフィンが十分に浸透するためには、脱脂と脱水が欠かせない。その為に上昇アルコール系列を用いるが、温度や加圧・減圧の設定が細かく行えるパラフィン含浸装置(ETP120, サクラ精器など)を用いるのが良い。本来は病理組織標本に求められる迅速な標本作成を目的として用いられている機器であるが、条件設定を脱灰標本用にプログラムして用いると良い。脱灰標本では初めの70%アルコールの時間を長くし(2時間以上)、キシレンの時間を長くし過ぎない(合計1時間以内)、パラフィン含浸時間を長くする(2時間以上)等の設定を行う事が肝要である。包埋には比較的高融点(62℃)のパラフィンを用いる方が硬く緻密な硬組織標本には有利である。また、包埋時には切り出し面を良く圧接して、薄切面が平行になるように留意し、薄切時にマイクローム上での面出しが容易になるよう配慮する。

C. 薄切

1. ミクロトームの選択

初心者が最も困難を感じるのが、薄切の工程である。硬組織を薄切する前に、軟組織を用いて、マイクロームの扱いや調節方法に習熟しておくことは必須である。一般的に用いられているユング型の滑走式マイクロトーム

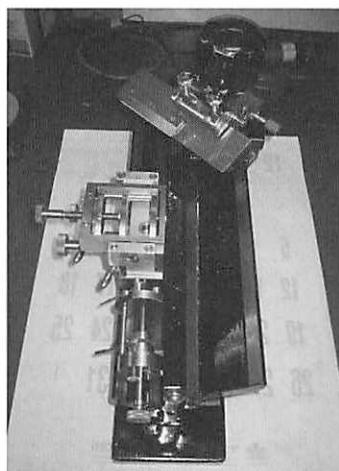


図1 ユング型滑走式マイクロトーム(ヤマト社)

ム(図1)は、引き角(刃が標本となす角)を45度以下に調節できるのに対して、回転式マイクロトームでは引き角は90度に固定されてしまう。硬組織は脱灰後も緻密な線維性組織からなり、薄切抵抗が大きく硬いので引き角を小さく設定できる滑走式が有利である。特に的確な面出し操作の為には標本台の三次元の位置調節操作が肝要であるので、その点でも微調整が容易な滑走式が良い。

また、滑らかな薄切を維持するためには、マイクロトームの滑走面の注油が欠かせない。特に硬組織の場合は、薄切抵抗が大きいのので留意する必要がある。一般に用いられているマシン油は比較的粘稠度が低く油切れを生じやすいので、頻回の注油と普段の整備が肝要である。

2. 面出し

硬組織標本を薄切する際に留意することは、確実な面出しと滑らかな薄切面を得ることである。面出し時から、厚切りはせず、せいぜい10ミクロン程度の送りで面出しを行う。不用意に厚切りを行うと、刃先が標本内に食い込んで、その後の薄切が著しく困難になる。面出し時には、どうしてもチャター(波状の疵)が生じるが、おおよそ標本面が出たら、一度、替え刃を交換、あるいは新しい部分に変え、5ミクロン程度の送りで、チャターが無くなるまで丁寧に面出しを行う。面出しが終わり、滑らかな面が出たら、替え刃を交換、あるいは新しい部分に変えて薄切する。

3. 薄切抵抗

チャターが無くなると却って薄切抵抗が大きくなるので、薄切時に滑らかな刃の動きを維持、コントロールする事が肝要であり、刃先の抵抗を指先で感じながら薄切する。また、薄切抵抗を少なくするためには、引き角を45度以下に調整する。

薄切抵抗に負けて刃の動きが一定で無くなると、刃先が標本に食い込み易くなり大きな疵が出来る。この様な食い込みが生じた場合は、2ミクロン程度の送りで徐々に疵をとる事が肝要である。疵を取らなければ滑らかな薄切は出来ず、当然薄切標本にも疵が入り、薄切片を拾うことも困難になる。替え刃の代わりに、従来のマイクロトーム刀を用いると、刃の食い込みは比較的生じにくいですが、刃の研ぎ出しが困難であり、また、薄い標本を得ることも困難である。なお、替え刃は刃角の小さなもの(S22, フェザー)は刃先が弱いので比較的刃角が大きなもの(S35, フェザー)を用いる。

4. 薄切方向

歯や長管骨の縦断など、基質の線維に走行がある場合には、線維の走行に沿った方向に薄切する方が良い。薄切時の抵抗も少ないが、一般にパラフィン標本は薄切時に30%程度収縮するので、薄切後伸展が必要となり、その際、線維方向に沿った薄切の方が伸展しやすい。

一般に、硬組織脱灰標本ではやや厚めの4から6ミクロンの厚さとするが、10ミクロン以上の厚切り切片を得ることは困難である。薄い標本を得ようとして、すくい角あるいは逃げ角(図2)を小さくし過ぎると、刃が滑って一定の厚みでの薄切が出来なくなり、厚い切片と薄い切片とが交互に出来ることになる。

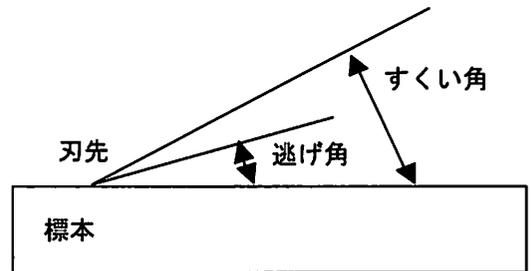


図2 ミクロトームの刃角

5. 加湿

硬組織は脱灰後も緻密な線維組織であり、パラフィン浸透後も組織そのものが薄切面に露出する割合が相対的に大きいため、薄切時のカーリング防止に用いられる自動加湿器あるいは息かけによる加湿の影響を大きく受ける。適度な息かけによって、加湿による標本の僅かな膨潤や軟化が薄切を容易にする。また、息かけによる加湿は、室温との関係もあるが、標本面の冷却の一助となり、パラフィンの硬度を保つ事になる。なお、パラフィンの硬度を保つためにも、室温は25℃より高くないように調節すべきである。夏季にはパラフィンブロックを冷蔵庫に保存し、また、薄切時に氷などで薄切面を冷却することもある。

D. 伸展と貼り付け

1. 伸展と水切り

薄切切片の伸展には、温水に浮かべる方法や、スライドガラス上の水に浮かべる方法がある。この際使用する水は蒸留水を更に沸騰させ、空気を十分に抜いた物を用い、伸展貼り付けの際に、切片とスライドガラ

空間に気泡が生じない様にする。切片の貼り付けを充分に行うためには、伸展が終了した後、スライドガラスと切片間の水を除いて（水切りして）から、乾燥する。切片周囲がスライドガラスに先に付き、切片下に水が溜まっていると、乾燥も進みにくく、貼り付きも悪くなる。通常の伸展器上に傾斜板（パラフィン伸展板TK-10、サンテクノ、図3）を設置すると水切りも行きやすい。

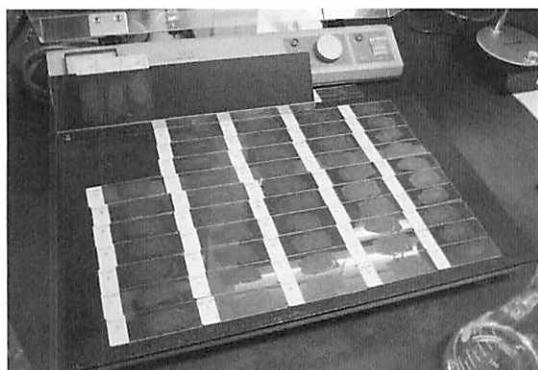


図3 伸展器と傾斜板

2. 乾燥と貼り付け

乾燥は通常1時間以上行うが、37℃で一晩以上行った方がよい。また、緻密な骨組織を多く含む標本は、伸展、貼り付け、乾燥が不十分になりがちなので、それぞれ時間をかける必要がある。免疫組織化学染色や剥がれやすい標本には、シランコートスライドガラス(DAKO)やマスコートスライドガラス(マツナミ)を用いる。さらに、染色直前に、60℃20分間程度、高温で再加熱すると剥がれにくくなり、通常の染色には問題はない。

上記の様な処理を行っても、歯や皮質骨を含む標本、あるいは病変によっては剥がれやすい場合がある。この場合は、脱パラフィン後に5%程度に薄めたセロイジン液を通し、乾燥させ、セロイジン被膜で切片を覆ってから染色するとよい。しかし、セロイジンの小売は中止されており、少量の入手は困難な現状である。

E. HE染色

迅速脱灰液などの酸性脱灰液を用いた脱灰標本では、標本が酸性になっているため、ヘマトキシリンの染色が不良になりやすい。中和液を通して、この傾向は大きくは改善できない。長時間の染色はかぶりを生じやすいので、濃い染色液を用い出来るだけ短時間で染

めた方がコントラストは良くなる。マイヤーよりカラッチのヘマトキシリンを用い、さらに二倍、三倍カラッチを用いるとよい。また、エオジンには過染になりやすいので、染色液の濃度を下げる、染色時間を短くする、水洗後の70%アルコールで脱色するなどの調整を行う必要がある。適切な染色条件を得る為には、標本毎の試し染めが必要であり、その為の切片を用意しておくべきである。

F. 過脱灰と脱灰不良

1. 過脱灰

脱灰標本は一般に薄切が困難であるが、その原因として脱灰不足を考えがちであり、返って過脱灰になってしまう傾向がある。薄切が困難であるのは、多くの場合、歯や緻密な皮質骨など、基質の線維成分が緻密であるためであり、他施設から薄切困難であると云うことで、依頼された標本でも、脱灰自体には問題はなく、薄切することが可能であることが多い。

過脱灰標本では、基質の膠原線維やその他の基質成分が酸によって変性し、組織が脆弱になり薄切時に薄く切れなかったり、あるいは伸展時にもろく壊れやすくなったりする。さらに、骨層板間が解離し、骨大理石病時に見られる様な病的変化と見誤る可能性もある。また、染色性が著しく不良になる。

2. 脱灰不良

脱灰が不足している標本では、未脱灰部分による刃こぼれが生じ、メスマークが付き、薄切が出来ない。この場合は、緊急避難的処置として、表面だけを脱灰液に5分間程度漬け、表面だけの脱灰を図る。この際、長く漬けすぎると、標本がふやけ、返って薄切が困難になる。

VI. 非脱灰標本

硬組織を脱灰せずに樹脂などに包埋し、薄切あるいは研磨して非脱灰組織標本を得ることが出来る。しかし、いずれの方法も、特殊なマイクロームや機器が必要となり、時間や労力も多く必要となる。一般的な組織変化を観察するためには、脱灰標本の方がよい。一方、非脱灰標本でなければ見ることが出来ない所見としては、組織の石灰化の状態や脱灰によって溶出してしまう物質、また、金属やセラミックスなど脱灰できない物質の変化やその周囲組織の変化などがある。脱灰標本と非脱灰標本の両者をうまく組み合わせた検索方法を計画する必要がある。

A. 包埋まで

非脱灰標本の目的の一つは、石灰化状態の観察であるので、包埋までに脱灰が生じない様に留意しなければならない。特に固定液は中性に保たなければならない。また、脱灰標本以上に薬液の浸透が不十分になりやすいので、浸漬時間を長くし、さらに、出来るだけ厚みが薄くなる様に切り出しを行う。非脱灰薄切標本で薄切可能なものは、主に海面骨であり、歯や緻密な皮質骨の標本は充分な薄さには薄切できないので、目的に応じた方法を計画することが肝要である。

一方、凍結標本として薄片を得ることも出来るが、特殊なマイクロームが必要である。さらに、技術の習熟の困難さもあるが、目的によっては有用な方法である。

B. 非脱灰薄切標本

非脱灰薄切標本の作成には、高硬度のタングステンカーバイト刃を備えた、電動の、いわゆるヘビーデューティ・マイクローム (Type-K, ユング) を用いる。標本の大きさは10×10mm程度に限られ、また、専用のマイクローム刃が高価である難点はあるが、人体の腸骨生検による骨代謝評価に用いられる。

薄切標本用包埋樹脂にはメチルメタクリレート (MMA), あるいはMMAとグリコールメタクリレート (GMA) の混合樹脂が用いられるが (表2), 硬化時の発熱のコントロールが困難であるので、MMAにポリエチレングリコールを20%程度混合したものを用いると (表3), 硬化時の発熱を押さえ、また薄切や伸展が容易になる。薄切といっても、微小に見れば、弾性に乏しい硬組織には破壊が生じる事は避けがたい。海面骨表面の変化を形態計測したり、石灰化速度を計測するためにラベルしたテトラサイクリンを蛍光顕微鏡で観察したりするなどの目的には良いが、一般的な

表2 硬組織薄切用樹脂 (1)

Methyl methacrylate	18ml
Dianal beads resin (BR-83)	12g
Glycol methacrylate	70ml
Benzoyl peroxide	1g

表3 硬組織薄切用樹脂 (2)

Methyl methacrylate	80ml
Polyethylene glycol (Mono-p-nonylphenyl ether)	20ml
Benzoyl peroxide	1g

組織形態の観察には限界がある。一方、多くの染色法を用いることが可能である。

C. 非脱灰研磨標本

1. 研磨方法

非脱灰研磨標本は、脱灰出来ない金属やセラミックスなどを含む標本の観察には他に代わる手段がない。また、顕微鏡レベルでの石灰化状態を観察する方法としての顕微 X 線写真 (CMR) には欠かせない手法でもある。

CMR の為には、標本そのものを50から100ミクロン程度の薄片に研磨する必要があり、脆弱な硬組織を薄く研磨する技術的困難が大きい。薄く平行な標本を得るための専用機器 (マルトー) もあるが、最終的には用手研磨の工程が必要であり、習熟が必要とされる。一方、組織形態観察のみであれば、アクリル板やスライドガラスに片面を接着したまま、研磨して薄片を得る事が出来るため、標本の取り扱いが格段に容易になる。専用の研磨機器 (EXAKT 4000, 盟和商事) もあるが、用手研磨も比較的容易である。

接着には光重合レジンやアロンアルファなどの瞬間接着剤を用いるが、長時間の研磨や、加温染色などによって、アクリル板と標本との接着が剥がれ易くなる。特に金属やセラミックスなどを含む場合は、充分な接着性が得られない事が多い。研磨時間の短縮や、常温での染色など加えて、接着剤の選択や標本側にもシラン処理を行うなどの工夫が必要とされる。

研磨には耐水研磨紙を用い、#800位から#1200までを荒研磨として、主に厚みを調整し、約100ミクロン程度にする。#2000から#2400までを仕上げ研磨として、疵の消去と厚みの最終調整を行い、50から30ミクロンの厚さにする。#4000を用いて更に鏡面研磨を行うこともある。

研磨標本の作成には、長時間水を用いながらの研磨が必要になるので、非親水性のポリエステル樹脂など (表4) に包埋する必要がある。非親水性である為、組織の包埋には、上昇アルコール系列とアセトンによる脱水、脱脂や樹脂浸透に長時間を要する。

表4 硬組織研磨標本用樹脂

Rigolac 2004	90ml
Rigolac 70F	10ml
Benzoyl peroxide	0.8g

2. 表面染色

研磨標本では薄切標本の様に数ミクロンの厚さにする事は困難であり、数十ミクロン程度の厚みになる。しかし、研磨標本の染色には、表面のエッチング（軽度の脱灰処理，0.1%ギ酸60秒）を行い、表層数ミクロンだけを染色することが可能であるので、薄切標本が標本の厚み全層に渡って染色されるのに比べて、返って染色層が薄く、観察時には厚みが薄い標本として見ることが出来る。しかし、皮質骨や金属など、光が透過し難いものの部分では、標本が厚すぎると、光の屈折や樹脂が浸透していない骨小空などの構造が重複して見えてしまう。さらに、非親水性樹脂であるため免疫染色が行えない事や、染色法にも制限が多い。

V. その他

A. 免疫組織化学染色法

組織標本は細胞、組織成分そのものを含んでいるので、それらの物質を標本上で特異的に検出できれば、機能物質の局在をみる事が出来、大変有用である。特定の蛋白質を検出する方法として免疫組織化学があり、特定の核酸（DNAやRNA）を検出する方法として *in situ hybridization* がある。多数の抗体が市販されているが、これらの抗体が全て、組織標本で使用可能である訳ではない。western blot などメンブレン上では特異的な反応が得られても、標本上でもうまく行くとは限らない。メーカーの添付書や文献上での情報検索と共に、実際に使用し、特異的な反応が得られるか否かを自己検証しなければならないことも多い。自己検証するためには、一定のプロトコルに従って、一次抗体の条件だけを変化させることが肝要である。また、陽性コントロールも必要である。

特に脱灰操作を行った標本に関しては情報が乏しい。一般には迅速脱灰液などの強酸を用いる脱灰液は免疫染色には不適で、EDTA 脱灰（表5）などが用いられるが、組織を出来るだけ薄く小さく切り出すことによって、脱灰時間を短くする事が必要である。また、EDTA 脱灰では脱灰液を頻回に変える事も肝要である。

表5 10%EDTA 脱灰液

EDTA 二ナトリウム	100g
トリスアミノメタン	12.1g
蒸留水	900ml
(1N KOH で pH7.4 に調整)	

B. 凍結標本作成法

硬組織に限らず、凍結標本では固定操作が無いので、生体内の生の状態に近い標本が得られる。一方で、固定していないので形態の保持は悪い。また、凍結することによって、組織が硬くなるので、硬組織も薄切することが可能になる。硬組織の全てが薄切できる訳ではない事は樹脂包埋薄切標本でも同様であるが、小動物の海面骨などは薄切可能である。

様々な凍結技法があるが、簡便な方法としては、O.C.T. コンパウンドに包埋して、 -80°C のディープフリーザ内で、あらかじめ庫内で冷却しておいたイソペンタン液に浸漬し凍結する方法がある。パラフィン標本用のパラフィン包埋皿を用いると、整形する手間も省ける。ただし、表面の水分を可能な限り濾紙などで吸い取ってから O.C.T. コンパウンド包埋する事が肝要である。これを怠ると、氷晶が生じ形態観察が出来なくなる。また、イソペンタン量は300ml 以上の充分量を用意しておく。実験動物など、迅速性が求められない場合は、固定後、20から30%の濃度になるまで順次上昇濃度ショ糖液系列に入れて置換すると氷晶形成が抑制される。

VI. おわりに

今回は、光顕標本作成に関して、特に硬組織の標本作成法について記したが、この他にも、電子顕微鏡、蛍光顕微鏡、*in situ hybridization*, whole-mount *in situ hybridization*, など多数の形態観察に関連した組織標本作成方法がある。また、パラフィン標本でも、HE 染色の他に、様々な物質を染め分ける特殊染色法がある。それらの方法についても、成書には書き表し難い様々な技術的なノウハウがあるが、これらの技術が人から人へと継承され、また、改善工夫されて行く場は、大学という教育の場でしかなかなか行えないものである。大学が果たさなければならない社会的使命の一つでもあると考えられる。

分子生物学的手法の多くはいかに再現性と簡便性を高めるかを求めて、市販のキットを用い、また、その様な標準化キットの開発が求められてもいる。DNA や RNA という物質にまで還元してしまえば、生物の種や個体差は無関係になるので、その様な方法の標準化もある程度可能である。しかし、最終的には特定の個人の疾病にまで還元しなければならない医学の場では、常に、個体差や特異性を考慮した、要素還元とは逆向きの統合性を考えなければならない。その為には、多種類の細胞と組織が構成する生体そのものの構造と

機能を観察するという手法は、古くさくとも、相変わらず新しい発見の場であり続けているといえる。

組織標本作成方法は、人に大きく依存する技術であり、機械に置き換えがたいものであるが、できるだけ標準化し、個人の技術から、誰もが手に出来る技術にして行く努力も必要であろう。

参考文献

- 1) 病理組織標本作成技術(上)(下), 日本病理学会編, 医歯薬出版, 1981
- 2) 骨形態計測, 高橋英明編, 医歯薬出版, 1981
- 3) 骨形態計測ハンドブック, 高橋英明編, 西村書店, 1983
- 4) Methods of calcified tissue preparation, G. R. Dickson ed, Elsevier, 1984
- 5) 骨・歯牙組織の病理検査法と研究技術の実際, 永井教之編, 学際企画, 1991
- 6) 硬組織研究の基礎技術, 日本硬組織研究技術学会編, 学際企画, 1994
- 7) 形態形成・分子メカニズム研究の最新技術, 永井教之編, 口腔保健協会, 1998
- 8) Plank, J. and Rychlo, A.: Eine Schnellentkalkungsmethode. Zbl. Allg. Path. Path. Anat. 89: 252, 1952.

6 自由度下顎運動測定による小児期顎口腔機能の観察

山崎 要一

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 健康科学専攻
発生発達成育学講座 口腔小児発達学分野

The analysis of stomatognathic function in children by the application of six degree of freedom jaw movement tracking devices

Youichi Yamasaki

Department of Pediatric Dentistry, Division of Developmental Medicine, Course of Health Research,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences
8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima, 890-8544, Japan

Abstract:

Pediatric dentistry is comprehensively covering the oral health care through the active period of growth and development in human life cycle. Not only the normal physical growth in the orofacial region, but also the developmental process of stomatognathic function in this period are necessary to clarify, because the functional development of children is always progressing and leads to the maturation of masticatory function in adulthood. Jaw motion provides a lot of important information about oral function because it is performed by the functional integration of teeth, maxillary and mandibular bones, masticatory muscle, nervous system, and other organs. The application of six degree of freedom jaw movement tracking devices must be the most suitable method to evaluate jaw motion, and to detect in detail the dynamic characteristics of the whole mandibular function. In this study, the application of a few measurement systems to children was discussed including two sets of our systems, and some results on jaw motion analyses of children were presented; 1) Characteristics of mandibular excursion of children, 2) Eight year longitudinal changes of jaw tracks of one child, 3) Characteristics of condylar motion during opening-closing movement, 4) Focusing characteristics of the condylar tracks, 5) Design of the curved mesh diagram of mandibular excursion, 6) Mandibular movement of reverse bite children, etc.

In conclusion, jaw movement of children had many different characteristics in comparison with those of adults. Furthermore, children with malocclusion showed many types of abnormal jaw movement. It is thought that the pedodontist must carefully manage oral health of children and perform the early treatment to children with malocclusion for their healthy development of oral function.

Key Words: jaw motion in six degree of freedom, condylar movement, mastication, occlusion, children

I. 緒言

人のライフサイクルにおいて、小児歯科は成長発育の旺盛な期間の包括的な歯科医療を担当している。この時期には萌出したばかりの歯の齶蝕予防、齶蝕治療を行うとともに、乳歯列期、混合歯列期の歯列不正や咬合異常に対して、発育を考慮しながら早期に対処を行ない、齶蝕や歯周疾患のない健全な永久歯列による良好な咬合状態と顎口腔機能の育成を目標としている。

一般的に顎口腔系の機能としては下顎歯列や顎関節部の動態がとくに注目されがちであるが、そのほかにも摂食・嚥下機能、呼吸機能、構音機能、表情・コミュニケーション機能、感覚機能などがあげられる。これらの機能がバランス良く発達することにより、豊かな人生の基礎が形作られると言える。

発達過程における正常な顎顔面部の成長と顎口腔領域の機能的発育の関連性を経時的に観察することは、様々な経緯を経た結果として生じている成人の下顎運動の成立要素を考える上で有用な情報源となる¹⁻³⁾。

また、歯列や咬合に異常を有する小児において、形態異常に関連した顎機能異常の程度を把握するとともに、これらの異常の改善による歯列咬合の形態的変化が顎の運動機能に及ぼす影響を調査することは、小児の顎口腔領域の健康な発育に対する社会認識を高揚し、小児期における良好な咬合状態の育成を通して、その後の成人期、老年期における口腔機能の維持安定にも大いに寄与できるものと考えられる。

発達過程にある小児において、歯、顎骨、筋、靭帯、神経系などの複雑な相互作用の結果として現れる下顎運動を6自由度で測定し評価することは、科学的証拠に基づいた発達期の歯科医療を実践して行く上で有効な手段であると認識される。

本稿では、小児用6自由度下顎運動測定システムの開発、並びにその臨床応用を通して、小児期顎口腔機能の発達状況や、早期の歯列咬合治療が小児期の咬合機能に及ぼす影響について、これまで著者が行ってきた研究成果を中心に概説する。

II. 小児における6自由度下顎運動測定の歴史

低年齢の小児の6自由度下顎運動測定としては、フロリダ大学のリブリケーターシステムが知られており、1980年代初頭に正常咬合を有する乳歯列期や混合歯列期の小児や過蓋咬合児を対象として、咀嚼運動を下顎切歯点または大白歯の1点において観察しているが、複数の下顎任意点についての同時運動解析はまだなされていない⁴⁾。

その後、小児の6自由度下顎運動測定に関しては著者の報告を待つ事になるが、1990年代半ばより少しずつ市販の装置や開発中の測定器を使った報告もなされるようになってきた⁵⁻¹¹⁾。

III. 6自由度下顎運動測定システム開発の経緯

1. 下顎多点運動解析システムの開発

小児の下顎の三次元動態を測定するには、被験者に対する心理的・身体的な負荷を可及的に低減して正確に測定できることが重要である。著者が九州大学で小児用の下顎運動測定システム開発に着手した1983年当時は、現在のように6自由度下顎運動測定器が市販され容易に入手できる時代ではなかった。このため、下顎歯列の複数の解析部位について滑走距離や回転角度などの下顎の三次元動態を解析するためには、それぞれの研究機関において独自に創意工夫した6自由度運動測定システムを開発する必要があった。

まず、発光ダイオードの三次元位置座標を非接触で検出し、身体の運動障害のリハビリテーション評価を行う目的で市販されていたセルスポットシステム(Selcom Inc., Sweden)に着目し、下顎運動測定と解析に必要な線形代数理論を構築して、コンピュータソフトウェアを作製した結果、6自由度下顎運動測定器の開発に成功した。この下顎運動測定器は下顎多点運動解析システムと命名され、1985年より乳歯列期小児の下顎任意点の運動解析を開始した¹²⁾。被験者の上下歯列に装着される各3個の発光ダイオードのフレームはわずか14gと非常に軽量であった。また、歯列に装着される発光ダイオードとセンサーカメラまでの非接触距離は75cmであり、被験者が5歳前後の小児であっても、測定時にあまり大きな心理的・身体的負担を与えることはなかった。

測定精度に関しては、出力歪みの空間補正に関する幾何学理論とそのプログラムを開発した結果、測定視野内で1mm以上あった発光ダイオード座標値の三次元歪み量を平均で0.06mmまで低減できた。このため、下顎多点運動解析システムは、当時、成人の下顎運動測定用に開発されていた数件の6自由度下顎運動測定器と比較しても、被験者への負担と精度の点において乳歯列期小児の測定に最も適していたと考えられる¹³⁾。本システムでは延べ100名の小児の下顎運動測定を行った(図1)。

2. 咀嚼機能解析システムの開発

下顎多点運動解析システムは、その後さまざまな改

良を加えながら約10年間使用したが、メインコンピューターの老朽化や運動データ転送方法、ネットワーク化などに問題が生じ、1992年より新システムの開発に乗り出した。このシステムは市販の6自由度下顎運動測定器トライメット（東京歯材社、東京）を測定部として、ネットワーク上でグラフィックワークステーションや接触型三次元形態測定装置、筋電計、レーザー形状測定装置と接続されており、小児や成人の咀嚼機能を総合的にデータ管理して分析できるもので、咀嚼機能解析システムと命名し、現在も種々のソフトウェアを開発しながら6自由度下顎運動解析を行なっている¹⁴⁾。実際に本システムが稼働しはじめた1994年より著者が鹿児島大学に赴任する2003年1月までの被験者数は延べ400名を超えている（図2）。

VI. 小児の下顎運動機能の解析

小児の顎口腔機能の正常な発育過程を解明することは、さまざまな経緯を経た結果と考えられる成人の下顎運動の正常像やその成立要素を考察する上で、有用

な情報を提供できると考えられる。

これらの解析システムを使用して、乳歯列期や混合歯列期の小児、さらには成人の下顎歯列および顎関節顎頭部の三次元動態について調査した。また、下顎運動の一部は同時期の歯列模型の三次元形態と組み合わせ、小児期の口腔機能と歯列形態との関係についても検討した。

1. 小児の下顎滑走運動の特徴

正常な歯列咬合を有する乳歯列期小児と成人女性各9名の前方滑走時の下顎歯列の三次元動態を、下顎切歯点の移動距離が0.5mmから5.0mmまで0.5mmごとの顎位について解析した。解析部位は、乳歯列期小児では下顎切歯点、乳犬歯および第二乳臼歯、成人では下顎切歯点、永久犬歯および第一大臼歯とした。咬合平面を基準として矢状面投影角を比較したところ、乳歯列期小児は成人より有意に角度が小さく、前頭面投影角では、乳歯列期小児は成人より前方運動時の側方偏位が大きかった^{15, 16)}。また、側方滑走運動の所見から

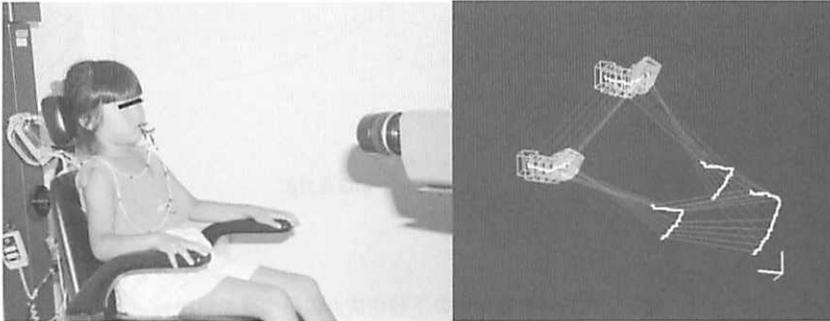


図1 下顎多点運動解析システムと出力例

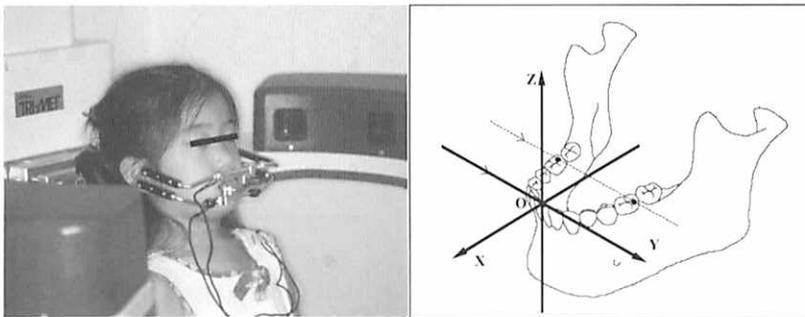


図2 咀嚼機能解析システムと基準座標系

も乳歯列期小児は下顎歯列の下方移動が少なく水平的であり、やや前方よりに運動していた(図3)^{12, 17, 18)}。

2. 下顎運動の経年変化

発達期間中にある小児下顎運動の経年的変化の様相を調査する目的で、1名の健全歯列を有する小児被験者について、永久中切歯萌出期から第二大臼歯萌出完了期までの8年間にわたる経年的な下顎運動測定を行い、各々の計測時期に採得した歯列模型から上顎中切歯の形態を再現して、運動軌跡と重ね合わせて歯牙交換期における個人内下顎運動変化を調査した。

前方滑走運動における下顎切歯点の運動軌跡を矢状方向から観察したところ、上下中切歯が萌出途中で、垂直被蓋がまだ浅い時期には前方へほぼ直線的に運動していたが、上下切歯の被蓋関係ができるに従い下顎切歯は上顎切歯の舌側面に沿うように運動していた。

切歯点の移動距離を基準とした矢状面投影角度の経

年的変化は、上下切歯が咬合する前は角度が小さく、経年的には次第に角度は増加するが、切歯歯軸や水平的垂直的な被蓋変化の大きい側方歯群交換期を境に再び小さくなっていった(図4)。また、前頭方向からの観察でも、上下歯牙の垂直被蓋が浅い時期には下顎切歯点は側方へほぼ水平的に運動していたが、以後は経年的に下方への運動経路をとっていた(図5)¹⁹⁾。

小児期は歯列の発育変化に伴い、下顎運動所見においても経年的に大きな変動が観察され、乳歯列期の水平的な運動から次第に成人の下顎運動域に落ち着いて行くものと推察された。

3. 開閉口運動時の顎頭動態の特徴

小児の開閉口運動中の顎頭動態を調査するために、切歯点に対する顎頭移動の様相を、乳歯列期、混合歯列期小児と成人(永久歯列)の各群10名について、習慣性開閉口運動を開口相と閉口相に分けて、咬頭嵌合

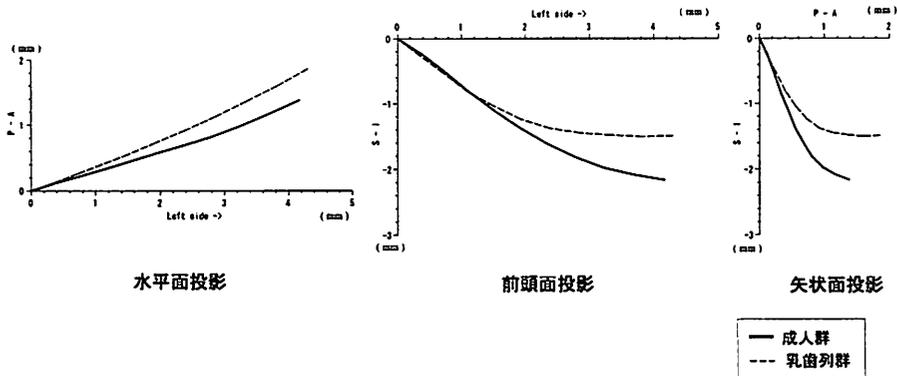


図3 側方滑走運動中の下顎切歯点の平均運動軌跡

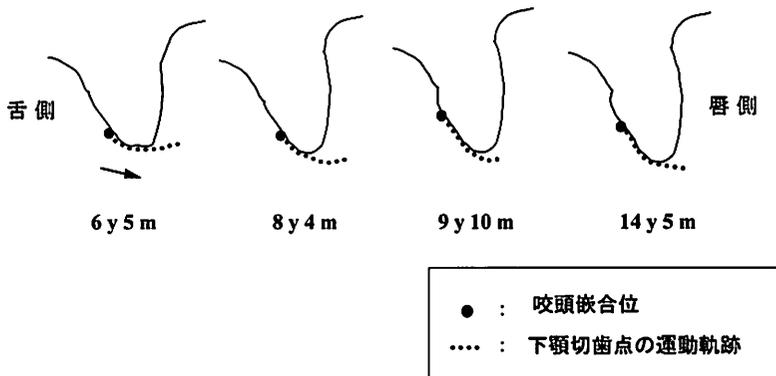


図4 経年的な下顎切歯点の前方滑走運動軌跡と上顎中切歯形態(矢状面観)

位を始点とする切歯点と顎頭中央点の直線移動距離を解析した。切歯点および顎頭点の最大直線移動距離を100%として、切歯点移動率に対する顎頭中央点の垂直移動率を解析したところ、乳歯列群が開閉口相間での顎頭点移動率の違いが最も大きく、閉口相の方が下方を通過しており、切歯点および顎頭点の移動率が100%となる位置はほぼ一致していた。永久歯列群では、開閉口の顎頭点移動パターンに差がみられず、関節結節を越えて再び顎頭位が上昇するほぼ同様な変化を示していた。混合歯列群は開閉口相と閉口相にやや違いがみられ、両群の中間的なパターンをとっていた(図6)。

4. 顎頭運動軌跡の集束性

成人においては、顎頭部の運動集束点である全運動軸の存在が知られているが、小児にもこれに類似した運動特異点が存在するか否かを調査するために、小児の顎頭部周囲において、前方、左右側方滑走運動および習慣性開閉口運動の4つの運動軌跡によって取り囲まれる部分の面積の大きさを評価した。

顎頭部の運動軌跡の面積は、はじめに顎頭中央点における4種類の基本運動軌跡を矢状面、水平面、前頭面の各平面に投影し、各平面ごとに最も外側の軌跡で囲まれた部分の面積を算出した。そして顎頭中央点の座標を中心にして前後軸、左右軸、上下軸方向にそれぞれ±10mmの範囲内で0.5mmごとに同様の面積計

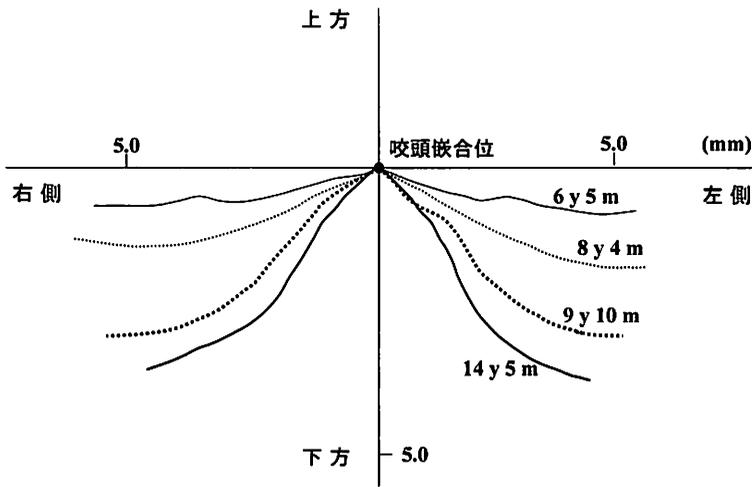


図5 経年的な下顎切歯点の側方滑走運動軌跡(前頭面観)

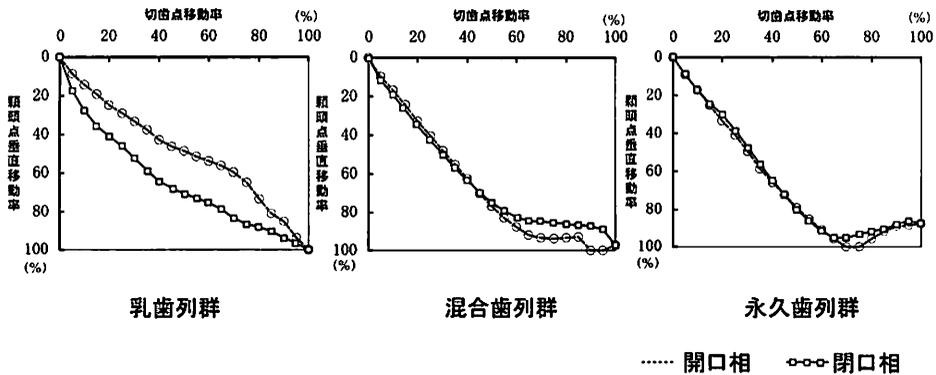


図6 開閉口運動時の下顎切歯点と顎頭動態の関係

算を行い、顎頭中央点周囲の約11,000点分の面積を算出し、その中で最小の面積が得られた部位を顎頭の運動集束点とした^{20, 21)}。この運動集束点における最小運動面積の平均値と標準偏差を乳歯列期、混合歯列期小児と永久歯列の各群10名について比較したところ、各方向の投影面積ならびに合計値のほとんどにおいて乳歯列群が最も大きく、混合歯列群、永久歯列群になるに従い運動は集束性が増していた。

矢状面における顎頭部運動軌跡の面積変化の様相を濃度分布で観察したところ、乳歯列群では集束域が顎頭部より離れた下方に位置し、永久歯列群では顎頭中央部付近に、そして混合歯列群では両者の移行型と考

えられる顎頭中央部付近とその下方に2つの集束域が分布していた。また、面積の大きさを表す濃度は乳歯列群が薄く、混合歯列群、永久歯列群の順で全体に濃くなっており、運動集束点の周囲においても全体として運動軌跡の集束性が高まっていた(図7)。水平面における面積の変化の様相は、3群ともに左右顎頭点を結ぶ線に帯状の集束がみられ、特に永久歯列群では濃度が濃く集束域が狭く明確であった²²⁾。

5. 下顎滑走運動面の作製

咀嚼運動の終末付近において上下歯牙の接触滑走状態を評価する方法として、下顎限界運動の上面である

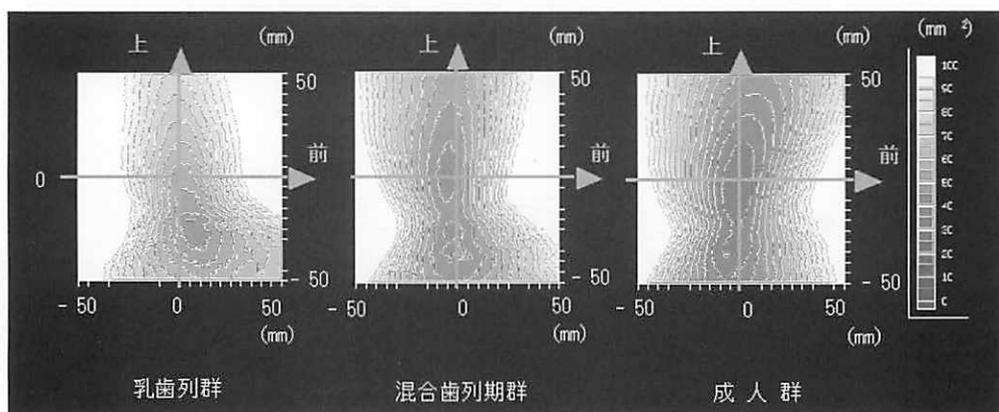


図7 顎頭部運動軌跡の集束状態(矢状面観)

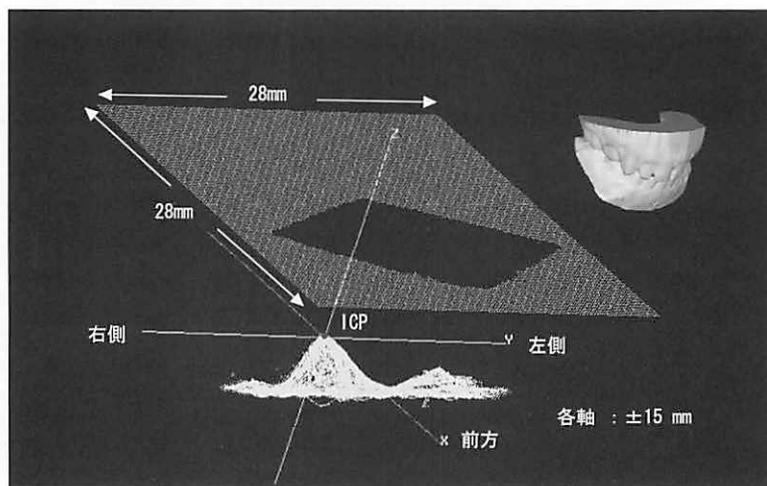


図8 任意下顎滑走運動と滑走運動面の検出格子

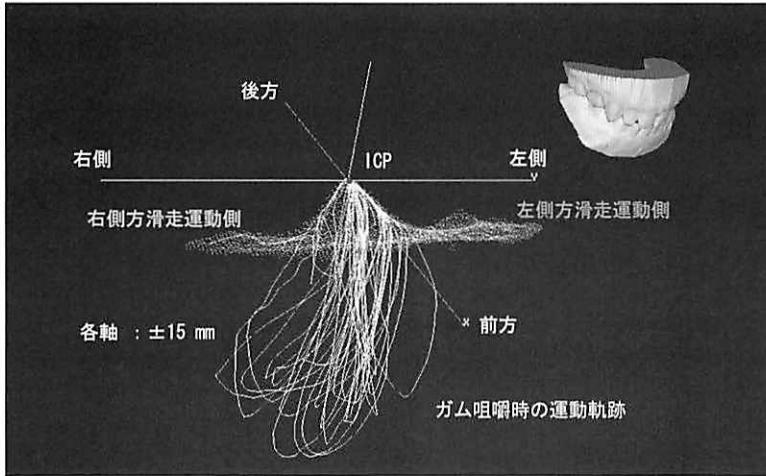


図9 下顎滑走運動面とガム自由咀嚼経路、側方滑走運動経路の関係

下顎滑走運動面の抽出方法を考案し試作した。これは12,000顎位に及ぶ任意の下顎滑走運動の座標値をもとにして、水平面上に設定された0.1mm間隔の格子点にて、水平面上における最近接顎位の上下方向座標値を与え、滑走運動面に関与しない部分を削除することにより得られる(図8)。下顎任意点における滑走運動面が視覚化されることにより、下顎上の位置の違いによる運動面形態の相違を機能的な側面から評価することができ、成長に伴う変化や顎機能異常の評価にも役立つものと考えられ、さらには下顎滑走運動面内での前方や側方滑走運動の様相や、咀嚼運動の終末付近における接触滑走状態を把握することも可能となる(図9)^{23,24)}。

6. 小児歯科臨床への応用

その他の6自由度下顎運動測定の小児への適用としては、歯列発育段階別にみた、咀嚼運動終末位と咬頭嵌合位との位置関係²⁵⁾や、歯列全体の三次元座標と6自由度下顎運動との組合せによる滑走運動時の咬合接触状態の変化パターン²⁶⁻²⁸⁾の相違(図10, 図11)²⁶⁻²⁸⁾、歯列咬合異常を有する乳歯列期小児の下顎運動の特徴(図12, 図13)^{29,30)}などがある。また、乳歯列期に反対咬合の被蓋を改善し、その後に混合歯列期を迎えた小児の開閉口運動路は、同時期の反対咬合児の運動所見とは明らかに異なり、正常咬合児に近い動態であることも確認している³¹⁾。

さらに口腔の機能発達の研究と同様に、歯列咬合異

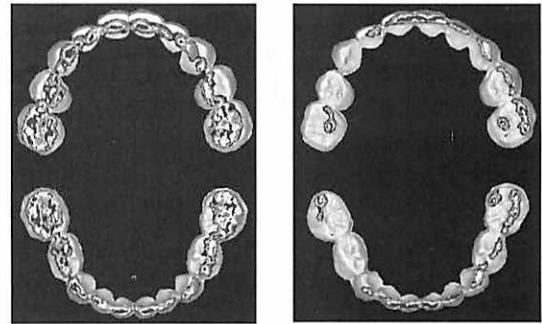


図10 乳歯列児の左側方滑走運動時における咬合接触状態の一例(6歳1か月女児)

常を有する乳歯列期や混合歯列前期の小児に対する新しい治療方法の開発(図14)³²⁾や、それらの効果についての臨床研究³³⁻³⁶⁾を行っており、これまでの数多くの治療経験と治療後の長期間の機能観察から、低年齢児の早期咬合治療はその形態的な改善に留まらず、その後の口腔機能の発達にも良好な影響を及ぼしているという強い感触を得ている。

V. 今後の展望

小児において6自由度下顎運動測定器を使用して顎機能を調査することは、口腔機能情報を目に見える形

で認識することであり、増齢による顎顔面部の形態的発育に伴う機能的な発達状況を把握する有力な手段である。すでに正常小児の下顎運動についてはいくつかの知見を得ているが、さらに咬合異常や顎関節異常を有する小児の下顎運動所見から機能的な問題を指摘し、歯列咬合の育成を通してこれらの問題を早期に改善して行くことは、小児の口腔領域の形態と機能の健全な

発育を促進し、成人期、老年期へと続くライフステージの中で口腔機能の維持安定に寄与できるものと思われる。

小児期の顎口腔機能の観察は、小児を対象とした歯科医療に対する社会的認識を向上させ、低年齢児の早期咬合治療と言う新しい歯科医療の需要を開拓するための説得力のある証拠を呈示できるものと考えている。

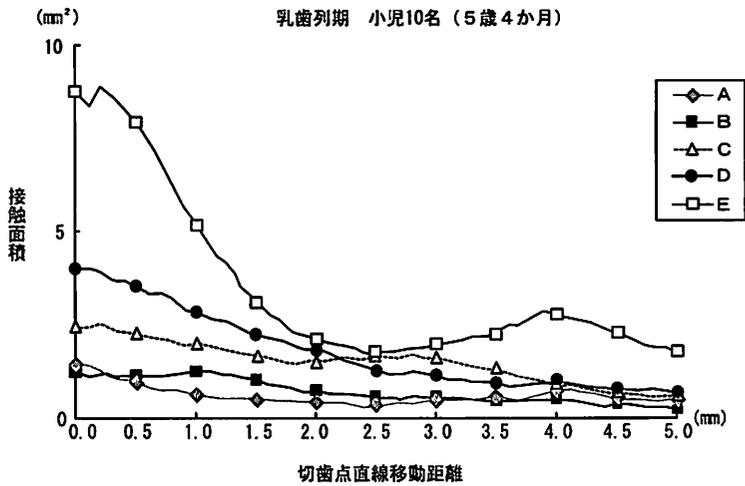


図11 乳歯列群作業側の下顎歯種別接触面積
(解析結果：0.1mm 毎， マーカー：0.5mm 毎)

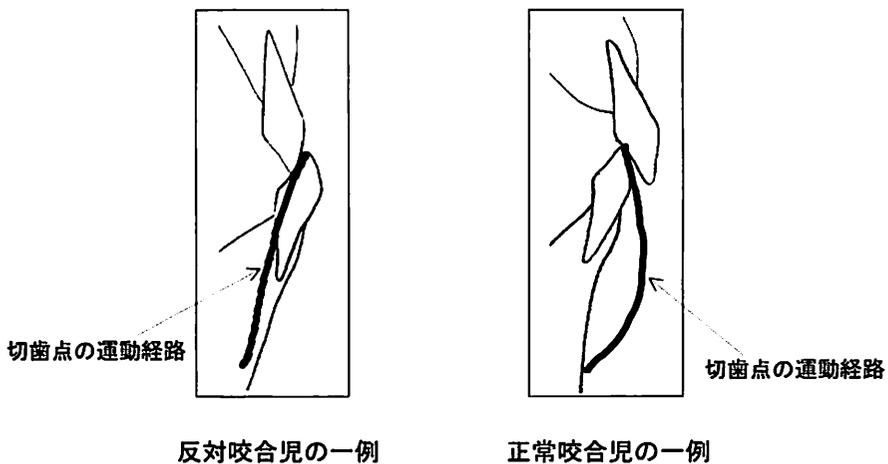


図12 乳歯列児の習慣性開口運動における切歯点運動経路

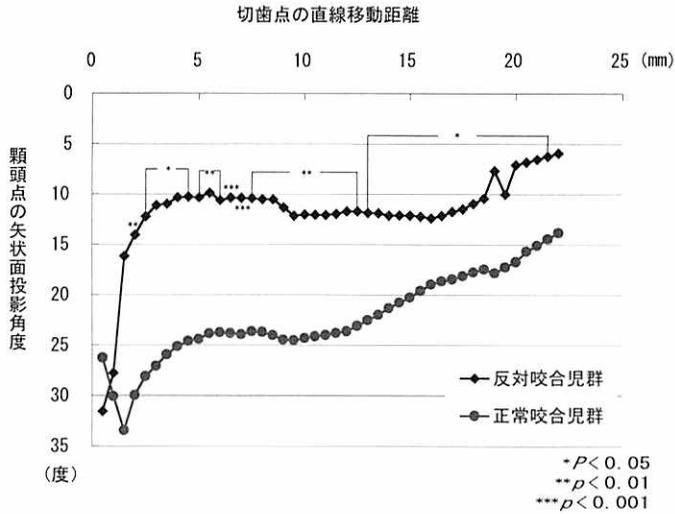


図13 乳歯列児の習慣性開口運動における顎頭点の矢状面投影角度

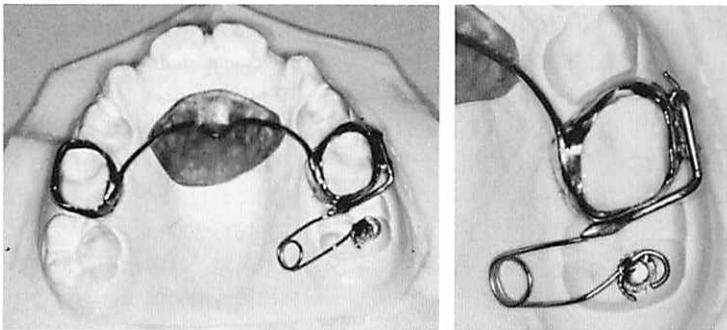


図14 上顎左側第一大臼歯の異所萌出への対応法

文 献

- 1) 中田 稔：小児の咬合機能の発育変化に関する研究. 歯医学誌, 11: 58-64, 1992.
- 2) 中田 稔：生理的咬合へのアプローチ 小児歯科学から生理的咬合を考える. 歯界展望別冊, 183-192, 東京：医歯薬出版, 1992.
- 3) 中田 稔, 山崎要一, 緒方哲朗：顎口腔機能分析の基礎とその応用 -ME 機器をいかに臨床に活かすか (編集 石岡 靖, 小林義典, 長谷川成男, 河野正司, 林 豊彦) -第4章- 5 小児における下顎運動と咬合の発達, デンタルダイヤモンド, 東京, pp.300-307, 1991.
- 4) Wickwire NA, Gibbs CA, Jacobson AP and Lundeen HC: Chewing pattern in normal children. Angle Orthod, 51: 48-60, 1981.
- 5) Gibbs CA, Wickwire NA, Jacobson AP, Lundeen HC, Mahan PE and Lupkiewicz SM: Comparison of typical chewing patterns in normal children and adult. JADA, 105: 33-42, 1982.
- 6) Alexander TA, Gibbs CA and Thompson WJ: Investigation of chewing pattern in deep-bite Malocclusions before and after orthodontic treatment. Am J Orthod, 85: 21-27, 1984.
- 7) 大久保由紀子, 郡 元治, 坂東永一：小児の咀嚼

- 運動と咬合接触の観察 (抄). 小児歯誌, 31:302, 1993.
- 8) 菊池元宏:咬合発育段階における下顎運動範囲の6自由度的検討. 日大歯学, 69:704-716, 1995.
 - 9) 藤村哲也, 坂東永一, 山内英嗣:小児の顎運動測定 (抄). 日本顎口腔機能学会, 第13回学術大会抄録集:14-15, 1997.
 - 10) 鶴山賢太郎, 倉田康弘, 谷 博司, 前田隆秀:小児顎運動の3次元解析 第2報 動的計測点に対する再現性について (抄). 小児歯誌, 36:263, 1998.
 - 11) 井上吉登, 大山 洋, 葉山淑人, 熊坂純雄, 進士久明, 内村 登:小児の咬合推移と顎関節の発達に関する研究 1. 光学式3次元6自由度顎運動測定装置の基礎的検討 (抄). 小児歯誌, 36:335, 1998.
 - 12) 山崎要一:セルスポットを応用した下顎多点運動解析システムの開発と乳歯列期小児の側方滑走運動に関する研究, 小児歯誌, 27:395-414, 1989.
 - 13) 長谷川成男, 坂東永一, 監修:臨床咬合学事典, 263-267, 東京:医歯薬出版, 1997.
 - 14) 中田 稔, 早崎治明, 西嶋憲博, 峰松清仁, 山崎要一:コンピュータ・シミュレーションの歯科への応用の現在と未来 7. 小児の咬合誘導におけるコンピュータ・シミュレーションの応用. クイntenテッセンス, 14:1695-1702, 1995.
 - 15) 早崎治明, 山崎要一, 中田 稔:小児の下顎前方滑走運動に関する研究. 小児歯誌, 29:379-388, 1991.
 - 16) Hayasaki H, Yamasaki Y, Nishijima N, Naruse K and Nakata M: Characteristics of protrusion and lateral excursion of the mandible in children with primary dentition. *J Oral Rehab*, 25: 311-320, 1998.
 - 17) Yamasaki Y, Hayasaki H, Ogata T, Arima K, Ishii M and Nakata M: The relationship between incisal overlap and direction of mandibular excursions in children with primary dentition. *Pediat Dent J*, 2: 15-21, 1992.
 - 18) Yamasaki Y, Hayasaki H, Nishi M, Nakata S and Nakata M: Condylar Motion in Children with Primary Dentition during Lateral Excursion, *Journal of Cranio Mandibular Practice*, 20(3): 172-180, 2002.
 - 19) Hayasaki H, Okamoto A, Nakata S, Yamasaki Y and Nakata M: Longitudinal observation of basic mandibular movements: report of a case, *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 27(4): 333-337, 2003
 - 20) 西嶋憲博, 早崎治明, 山崎要一, 中田 稔:小児の顎頭部三次元動態に関する研究-前方滑走運動時について-. 小児歯誌, 33:985-994, 1995.
 - 21) Nishijima N, Hayasaki H, Okamoto A, Nakata S, Yamasaki Y and Nakata M: Difference in tracks between habitual open and close mandibular movements at the condyle in children, *Journal of Oral Rehabilitation*, 27(11): 999-1003, 2000.
 - 22) 西嶋憲博, 早崎治明, 岡本篤剛, 中田 稔:小児における顎頭部運動軌跡の集束性に関する研究 第2報 (抄). 日本顎口腔機能学会 第10回学術大会 抄録集:18-19, 1996.
 - 23) 早崎治明, 中田志保, 山崎要一, 西嶋憲博, 岡本篤剛, 峰松清仁, 中田 稔:下顎滑走運動面と咀嚼運動終末路の関連性に関する研究. 顎機能誌, 3(2): 147-152, 1997.
 - 24) Hayasaki H, Nakata S, Nishijima N, Okamoto A, Minematsu K, Yamasaki Y and Nakata M: CMDME (curved mesh diagram of mandibular excursion) method for visualization and diagnosis of mandibular movement, *Journal of Oral Rehabilitation*, 25: 672-676, 1998.
 - 25) 早崎治明, 齊藤一誠, 中田志保, 岩瀬陽子, 岡本篤剛, 山崎要一, 中田 稔:乳歯列期小児の咀嚼運動における終末位付近の動態, 顎機能誌, 6: 153-161, 2000.
 - 26) 岡本篤剛, 早崎治明, 山崎要一, 中田 稔:乳歯列の側方滑走運動における咬合接触解析システムの開発, 小児歯誌, 37(3): 580-589, 1999.
 - 27) Okamoto A, Hayasaki H, Nishijima N, Iwase Y, Yamasaki Y and Nakata M: Occlusal contacts during lateral excursions in children with primary dentition, *J. Dent. Res.*, 79(11): 1890-1895, 2000.
 - 28) Hayasaki H, Okamoto A, Iwase Y, Yamasaki Y and Nakata M: Occlusal Contact Area of Mandibular Teeth during Lateral Excursion, *The International Journal of Prosthodontics*, 17(1): 72-76, 2004.
 - 29) Nagata M, Yamasaki Y, Hayasaki H and Nakata M: Translation and rotation of the mandible during habitual mouth opening movement in children with anterior reverse bite in the primary dentition, *Journal of Cranio Mandibular Practice*, 19(2): 96-105, 2001.
 - 30) Nagata M, Yamasaki Y, Hayasaki H and Nakata M: Incisal and condylar paths during habitual mouth

- opening movement of children with anterior reverse bite in the primary dentition, *Journal of Oral Rehabilitation*, 29: 64-71, 2002.
- 31) 佐藤恭子：乳歯列期反対咬合改善例との比較による混合歯列前期反対咬合の習慣性開閉口運動に関する研究，九州大学大学院歯学研究科博士論文，2003.
- 32) 山崎要一，徳富順子，櫻江玲史，岡 暁子，野中和明，中田 稔：上顎第一大臼歯の異所萌出への早期対応法の検討，*小児歯誌*，40(3)：549-556，2002.
- 33) 山崎要一，中田 稔：乳幼児歯科診療の実際（編集 木村光孝，祖父江鎮雄，下岡正八）第5章 乳幼児の歯科治療，クインテッセンス出版，東京，pp.150-158，1998.
- 34) 山崎要一，渡辺里香，永田めぐみ，黒田國康，佐藤恭子，早崎治明，中田 稔：ファンクショナル・アプライアンスを使用した咬合誘導，*咬合誘導研究会会誌*，4(1)：21-24，2000.
- 35) 中田 稔，山崎要一：新小児歯科学（編集 祖父江鎮雄，長坂信夫，中田 稔）第9章 咬合誘導 1～4，*医歯薬出版*，東京，pp.557-595，2001.
- 36) 山崎要一：臨床家のための矯正 Year Book '03，（編集 花田晃治，伊藤学而，中島榮一郎），*小児歯科における咬合誘導の位置付け*，クインテッセンス出版，東京，pp.119-127，2003.

外胚葉異形成症の原因遺伝子群： 歯の発生におけるその役割と最近のトピック

田畑 純

鹿児島大学 大学院医歯学総合研究科 神経病学講座 歯科機能形態学分野

The causal genes of ectodermal dysplasia and the role in tooth development

Makoto J. Tabata

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

Abstract:

Ectodermal dysplasia syndromes are human inheritance syndrome showing the affect of hairs, teeth, and glands, being classified to three types for the heredity pattern and the different gene loci, such as ectodermal dysplasia, anhidrotic (EDA/XL-HED), and hypohidrotic ectodermal dysplasia (HED). The recent cloning of the causal genes for the EDA and HED has let to know that the syndrome is caused by the abnormality or the disfunction of the ligand gene (*Eda/Ta*), receptor gene (*Edar/dl*), and adopter gene (*Edaradd*). Furthermore, Ectodysplasin A, the main product of *Eda/Ta*, is the new member of tumor necrosis factor family showing high specificity of binding to the receptor. The role of EDA and the receptor was considered to be involved in normal tooth development, i.e. (1) regulation of the tooth germ size during cap-early bell stage, and (2) determination of the location of tooth development as same as the case of the development of hair and fish scale.

Keywords: EDA/Tabby, HED/downless, ectodysplasin, edaradd, tooth development

I. はじめに

ヒトの外胚葉異形成症(Ectodermal dysplasia)には多くの種類と症状があるが、Christが先天性の外胚葉形成不全に基づくものと考え、kongenitale ektodermale Defekteとして報告して以来(1913)、表皮またはその付属器(毛髪、皮脂腺、粘膜、爪、歯)に、先天的な

発育不全、もしくは部分的欠損が見られる疾患を言う。遺伝様式や形質から便宜的に無汗性、減汗性、有汗性の3つに大別されてきたが(表1)、いずれも、歯に欠損や形態異常が生じるため、歯科領域でもその病因説明が待たれていた疾患である。近年、これらの原因遺伝子が相次いで判明し、違う遺伝子の障害でありな

表1. 外胚葉異形成症のヒト疾患と疾患モデルマウス

ヒト疾患	疾患名	無汗性 外胚葉異形成症 (EDA)	減汗性 外胚葉異形成 (HED)		有汗性 外胚葉異形成症	
	遺伝様式	伴性 (XL-HED)	常染色体性優性 (AD-HED)	常染色体性劣性 (AR-HED)	常染色体性	
原因 遺伝子	遺伝子座	Xq12.2-q13.1 ⁷⁾	2q11-q13 ^{1,25)}		1q42.2-q43 ¹⁴⁾	
	遺伝子名	<i>EDA (Ta)</i> ¹⁵⁾	<i>EDAR (DL)</i>		<i>EDARADD</i>	
	MIM No	*305100 ¹¹⁾	*604095 ¹¹⁾		*606603 ¹¹⁾	
菌の異常	数菌から全菌における欠如や矮小歯化 ^{33,37)}				数菌の欠損や円錐歯化	
疾患モデルマウス	系統名	Tabby ⁷⁾	Sleek	downless	crinkled	Naked
	遺伝様式	伴性	常染色体性優性	常染色体性劣性		常染色体性
	原因遺伝子	遺伝子座	X染色体 37.0cM 付近 ^{10,11)}	不明		13番染色体 6.0cM 付近
	遺伝子名	<i>Ta (Eda)</i> ^{8,37)}	<i>dl (edar)</i> ³⁹⁾		<i>cr (edaradd)</i> ¹⁴⁾	不明
翻訳産物 (ヒト)	名称	Ectodysplasin A-1 ²⁾ (他に Ectodysplasin A-2, B, C, D, E, F, O)	Ectodysplasin A receptor (Edar) ³⁹⁾		Edaradd ¹⁴⁾	ケラチン(?)
	構造	391aa, 膜1回貫通型 ²⁾	447aa, DDあり, 膜1回貫通型 ³⁹⁾		208aa, DDあり ¹⁴⁾	
	種類	TNFリガンド	TNFレセプター		DDアダプター	

から同様の病状を示す理由が明らかになり、外胚葉異形成症の整理ができるようになってきた。本稿では、こうした研究の流れと最近のトピックなどについて紹介し、歯の発生における原因遺伝子群の本来の働きを考察したい。

II. 無汗性外胚葉異形成症 (EDA) と Tabby マウス

ヒトの無汗性外胚葉異形成症 (Ectodermal dysplasia, anhidrotic; EDA) は、外胚葉異形成症の中では古典的かつ最も症例の多い疾患であり、わが国でも48例以上の報告がある⁴³⁾。後述の減汗性外胚葉異形成症 (HED) の国内症例報告は無いためか、わが国では単に外胚葉異形成症というこの EDA を指すことが多いようである。EDA は150以上の臨床症状が知られるが、主にまばらな頭髪、汗腺の欠失による発汗不能、および歯の欠如の3症状によって特徴づけられる^{34,36)}。歯の欠如では、数歯より全歯まで程度に差があり、歯があっても形やサイズの異常を伴うことが多い³⁷⁾。別名 XL-HED (X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia)

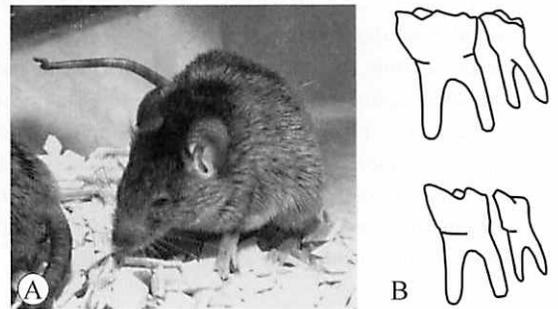


図1. Tabby マウスの表現型。

A. ♀個体。眼がいつも少し閉じ加減で、体毛は黒に近い茶色で、光の加減で虎縞模様の濃淡が現れる。尾にも特徴があり、体毛が無く、末端付近で屈曲することが多い。B. 下顎左側第1臼歯と第2臼歯の類側観。上段は野生型マウスで下段が Tabby マウス。矮小化と咬頭数の減少が見られる。

としても知られている伴性遺伝の疾患であり、男性に症状が現れるが、女性の保因者（＝ヘテロ個体）でも汗腺の低形成部と正常部がモザイク状にあらわれる（注：Lyonization によるキメラ現象）。原因遺伝子は Xq12-q13.1 にあり⁷⁾、1996年に EDA としてクローニングされ、9人の患者で点突然変異のあることが認められた¹⁵⁾。また、EDA 遺伝子の発現部位は、ケラチノサイト、毛囊、汗腺などで EDA 患者の症状発現部位と一致した¹⁵⁾。

疾患モデル動物は Tabby マウスといい、1952年に分離された自然発生系統のマウスである（図1）。①毛色がぶち模様になる（Tabby とはぶち猫・メス猫の意）、②汗腺の減少もしくは欠失、③歯の矮小化または欠失、という3形質を主な表現型として持つ⁷⁾。遺伝子座は X 染色体上にあり、伴性遺伝の研究対象としても研究された¹⁰⁻¹¹⁾。研究が進むに連れ、その形質と遺伝様式が EDA と一致することがわかり、EDA のモデル動物として見なされるようになった³⁾。1997年にはその原因遺伝子 *Ta* がついにクローニングされ、EDA の原因遺伝子 *EDA* と相同であることが示され^{8, 37)}、ヒト疾患 EDA と Tabby マウスは相同の形質異常であることが証明された。マウス歯胚においては胎生13.5日の外エナメル上皮部分で顕著に発現することや、膜貫通型の分子であるが遊離する可能性があることなども明らかにされた^{8, 37)}。

Eda は当初は遺伝子は2つのエクソンから成り、翻訳物は135アミノ酸の長さの細胞膜貫通領域を持つ分子として報告されたが¹⁵⁾、後に16のエクソンから成りオルタナティブ・スプライシングで8種の翻訳物が出るということが明らかになり、それぞれが器官や組織ごとに発現することも示された²⁾。主要な翻訳物であり、最も長い翻訳物は Ectodysplasin A と命名され²⁾、細胞内ドメインに (Gly-X-Y) の繰り返しであるコラーゲン様ヘリックスがあり²⁾、TNF (tumor necrosis factor, 腫瘍壊死因子) に似た分子であるが²⁾、これまでに報告されていない分子であることがわかった。

Ⅲ. 減汗性外胚葉異形成症 (HED) と 3 系統のマウス

減汗性外胚葉異形成症 (hypohidrotic ectodermal dysplasia; HED) は、臨床症状では前述の EDA とよく似ているが²³⁾、メンデル遺伝（＝常染色体性遺伝）をすることから区別される遺伝性疾患である。わが国での症例報告はない。優性遺伝と劣性遺伝があり、Autosomal dominant HED (AD-HED)、Autosomal recessive HED (AR-HED) と疾患を呼びわけている。また、

原因遺伝子座は 2q11-q13^{1, 25)} と 1q42.2-q43 にあり¹⁴⁾、前項の EDA とは明らかに違う遺伝子の変異による疾患でありながら、症状が EDA ときわめて似る点が興味深くまた大きな謎でもあった。

HED のモデル動物はいずれも自然発生的に得られた系統で、劣性遺伝をする downless マウス、crinkled マウス、優性遺伝をする Sleek マウスの計3系統である^{5, 45)}。これらの形質は Tabby マウスと似ているが、いずれも遺伝様式が常染色体性であることから HED のモデル動物とみなされていた³⁶⁾。このうち、downless マウスの表現型の原因遺伝子 *dl* が1999年にクローニングされ、*dl* の劣性変異個体が downless、優性変異個体が Sleek であることがわかった。あわせて、ヒトの相同遺伝子 *DL*（注：ヒトの遺伝子名は大文字表記される）もクローニングされ、遺伝子座が 2q11-q13 に位置することが示された²⁵⁾。さらに AR-HED 患者にも AD-HED 患者にも *DL* の部分的欠損や異常が起こっていることが確認され、*DL* が HED の原因遺伝子であることも立証された²⁵⁾。*DL/dl* 翻訳物は TNFR (TNF レセプター) ファミリー分子であり、Ectodysplasin A と特異的に結合することも示されて、Ectodysplasin A レセプター（遺伝子名は *EDAR/DL*）と命名された³⁹⁾。

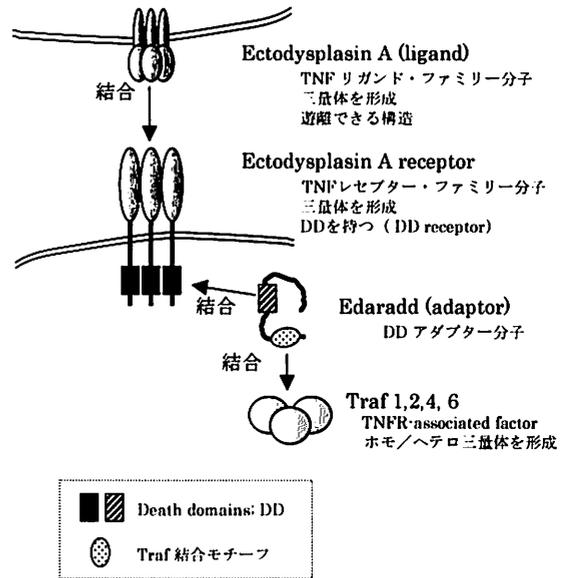


図2. Ectodysplasin A, Ectodysplasin A receptor, Edaradd の関係の模式図。
説明の中の DD はデスドメイン。

一方、crinkled マウスの表現型の原因遺伝子 *cr* も 2001年についてクローニングされ、ヒトの 1q42.2-q43 に位置する遺伝子と相同であることが示された¹⁴。*cr* の翻訳物は TNFR に結合するアダプター分子 (TNFR の細胞内領域にある death domain とシグナル因子 Traf の二つに結合できる分子) であることがわかり、Edaradd (Ectodysplasin A receptor associated death domain) と命名された¹⁴。こうして、ついに EDA と HED の原因遺伝子がすべて明らかになり、それぞれの翻訳物の素性と関連も明らかになった (図 2)。すなわち、EDA/Ta がリガンド、EDAR/dl がレセプター、Edaradd/cr がアダプターをコードしていたのであった。リガンド、レセプター、アダプターのいずれかの異常が、EDA と HED の発症原因であり、これらの違う遺伝子の変異が同じ臨床症状を示す理由であった。

VI. 有汗性外胚葉異形成症

有汗性外胚葉異形成症 (hidrotic ectodermal dysplasia) は、汗腺、唾液腺などはほぼ正常であり、無毛または貧毛、爪の形成不良を主徴とする。精神遅滞や、やもり指 (指の先端が棍棒状に腫脹する)、角化症などが見られる場合もある¹⁵。原因遺伝子は 13q12 に位置している *GJB6* (Gap junction β 6) であり、これにコードされるタンパクは Connexin 30 である。歯の異常は、数歯の欠如と円錐歯などが認められるが、現在のところ Ectodysplasin A や同レセプター、同アダプターとの関係は報告されていない。またモデル動物は自然発生系統では該当が無く、ノックアウト動物作成の報告もないようである¹⁶。外胚葉異形成症のひとつとして分類されているが、その病態発生のメカニズムに無汗性や減汗性との関連は少ないようである。

V. TNF ファミリー分子としての特徴

TNF ファミリー分子は特定の腫瘍細胞に *in vitro* で細胞死を誘導するサイトカインとして発見された TNF の近縁分子群で、多様な生物活性を持ち、インターフェロン・ファミリー分子とスーパーファミリーを形成する。リガンドとレセプターそれぞれに多くの近縁分子が見つかっており、TNF ファミリーのリガンド・レセプターとしては、TNF-TNFR, FasL-Fas (Fas ligand-Fas), LT-LTR (Lymphotoxin-Lymphotoxin receptor) などが知られている。また、破骨細胞の分化制御に関わる RANKL-RANK (Receptor activator for NF κ B ligand- Receptor activator for NF κ B) も TNF ファミリー分子と TNFR ファミリー分子である。構造的

な特徴は、リガンドもレセプターも三量体の膜タンパクであること、レセプターの細胞内ドメインには Death domain と呼ばれる構造があり、ここに Traf (TNF receptor-associated factor) という細胞内シグナル分子が付くことである。Traf は 1 から 6 まであり、さまざまな組合せでホモまたはヘテロ三量体を形成し、Death domain に結合するが、直接付く場合とアダプター分子を介して付く場合があり、Fas や TNFR には FADD や TRADD といったアダプター分子の付くことが知られている。

TNF ファミリーでは、複数のリガンドと複数のレセプターの間で結合できることが多く、リガンド・レセプター間の結合特異性は低いのが普通であるが、破骨細胞分化に関わる RANKL-RANK では特異性の高いことが知られている¹⁷。そして、Ectodysplasin A でも TACI, 4-1BB, TRAILR2, Fas など他の TNF レセプター・ファミリー分子とは結合しないこと、Ectodysplasin A レセプターも BAFF, 4-1BBL, TRAIL, FasL など他の TNF リガンド・ファミリー分子とは結合しないことが示され、リガンド・レセプター間の結合特異性の高いことが示された¹⁸。EDAR に付く Traf としては、1, 2, 4, 6 が報告されており、Edaradd を介して結合する¹⁴ (図 3)。

ところで、EDA 遺伝子の翻訳物のうち、最長のものを Ectodysplasin-A と呼ぶが、この分子には 2 型あり、EDA-A1 と EDA-A2 と命名されている¹⁹。この 2 つは同じエクソンの組合せでできるため、全く同じアミノ酸配列を持つが、エクソン 8 の切れ方に違いがあつて、EDA-A2 は A1 よりも 2 アミノ酸だけ短い²⁰。わずかに 2 アミノ酸しか違わないことにどのような意味があるのかは不明であったが、XEDAR (X-linked ectodysplasin-A2 receptor) が新たに見つかり、EDA-A1 は EDAR に、EDA-A2 は XEDAR に特異的に結合することが判明した²¹。オルタナティブに作られた 2 つのリガンドがそれぞれ違うレセプターに結合することが明らかになったのは大きな発見である。また、TROY (別名 TAJ, TAJ- α , TRADE, TNFRSF19) という EDAR と 33.3%, XEDAR と 53.9% 相同のレセプターも発見されている¹⁶。TROY のリガンドはまだ不明のため、現時点では orphan receptor であるが、この TROY の機能やリガンドの解明も今後の興味のひとつである。

なお、レセプター以降のシグナル伝達についても研究が精力的に進められており、TRAF の中でも TRAF6 が重要であろうこと²²、その伝達経路にある IKK 複合体の中では IKK γ (別名 NEMO) が重要であろうこ

とが示されている^{6, 23}。また, *Traf6* 遺伝子欠損マウスも HED 症状を示すこと^{24, 27}, *IKK γ* 遺伝子欠損マウスも HED 症状を示すことが報告されており, ヒトでは *IKK γ* 遺伝子の変異による遺伝疾患が明らかになり, 減汗型外胚葉異形成と免疫系不全を示すことが報告されている (HED-ID, HED and immune deficiency)¹²。このように EDA のシグナル研究は, 今や RANKL-RNAK や NF κ B などの研究の流れと合流し, 大きな範囲で展開しつつある。EDA-EDAR の関連分子とその細胞内シグナル経路を図 4 にまとめる。なお, EDA-A1 の過剰発現や, 組み換え EDA タンパクの投与によって, *Tabby* マウスの形質が改善されることが示された^{9, 26}。 *Tabby* の形質が EDA-A1 の障害によるものであることを強く示唆する結果であり, EDA 患者の持つ変異箇所と形質のデータ蓄積とあわせて^{2, 12, 40}, 将来の臨床応用につながる成果と考えられる。

VI. 歯胚発生における *Ta*, *dl*, *cr* のはたらき

歯の発生過程は, 口腔の上皮が間葉へと陥入することから始まり, 歯冠形成, 石灰化, 歯の萌出, 歯根形成というイベントが続く。野生型マウスの歯胚における *Ta* (マウスの EDA 遺伝子) の発現は, 歯胚発生開始期においては口腔上皮の歯胚発生領域のすぐ外側に認められ, その後, 蕾状期では歯堤の外側付近に, 帽状期, 鐘状期では, 歯堤と外エナメル上皮に発現が認められる (図 4)。一方, *dl* (マウスの EDAR 遺伝子) の発現は, 開始期においては口腔上皮の歯胚発生領域に認められるが, *Ta* の発現部位と相補的な発現を示し, 蕾状期以降は内エナメル上皮, 特にエナメル結節など歯胚の中央部に発現が見られる。そして, 鐘状期後期には発現が見られなくなる。なお, *cr* (マウスの EDARADD 遺伝子) の発現パターンは帽状期でしか報告されていないが, エナメル結節 (= *dl* の発現部位) を含む, やや広い範囲での発現が知られている¹⁴。

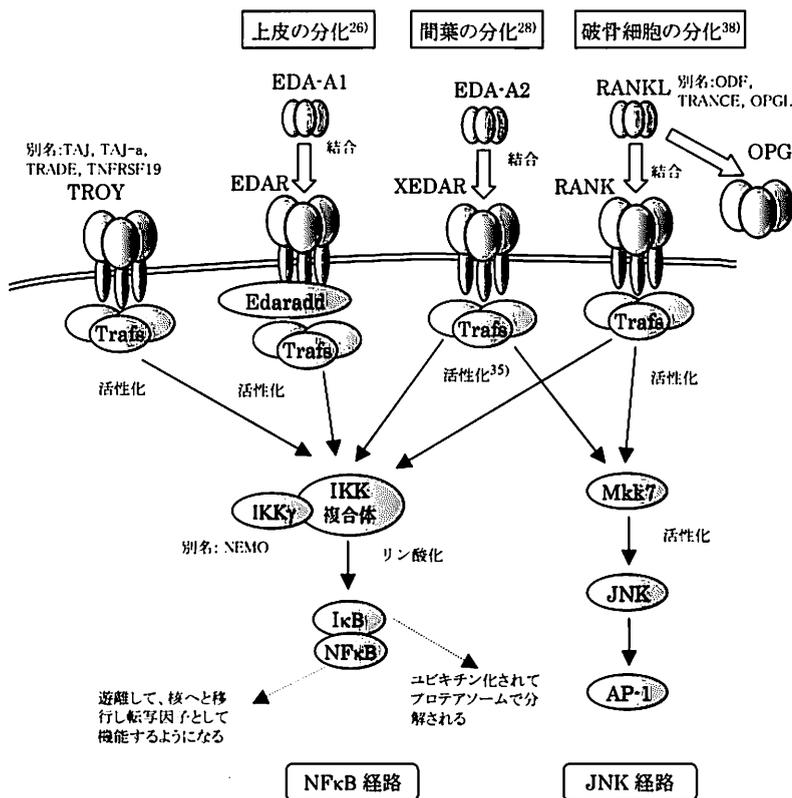


図 3. EDA-EDAR の関連分子とその細胞内シグナル経路の概略図。

RANKL-RANK は分化に関与する TNF-TNFR ファミリー分子の例として加えた。

Tabby マウスで見られる歯の異常としては、切歯の欠失、第一臼歯の矮小化と咬頭数減少、第二臼歯の矮小化と咬頭数減少、第三臼歯の欠失が挙げられる (図 1B)^{10, 11, 36}。Tabby マウスの第一臼歯と第二臼歯で見られる矮小化は、頬側咬頭同士と舌側咬頭同士の融合による咬頭数の減少としてとらえることができ、この咬頭数の減少は蕾状期の臼歯歯胚から見られる形態の異常に起因するものと思われる³⁰。また、帽状期においては一次エナメル結節が小さく、二次エナメル結節の数も減少しており、帽状期から鐘状期初期にかけて十分な歯胚の成長がないことが、咬頭癒合や矮小化の原因であることも示唆されている³¹。器官培養下におけるレスキュー実験では、汗腺の発生でレスキュー

効果のあった表皮増殖因子(EGF)¹では効果が得られず、線維芽細胞増殖因子(FGF)-10で効果が得られた³⁰。なお、TROY は歯胚発生においても発現しているが、EDAR の発現領域と重なっていることや³²、EDA-A2 の過剰発現では Tabby マウスの形質改善が見られないことなどから²⁶、TROY や XEDAR の機能は未だ不明である。しかし、Traf や IKK α などの発現部位などが明らかにされつつあり²⁹⁻³⁰、今後、関連分子も含めた詳細な機能が判明していくものと思われる。

一方、歯胚発生の開始期においては、Ectodysplasin A とそのレセプターは表皮同士で交換されるシグナルであること、Lef1 欠損マウスでは EDATa の発現量が低いことなどが示されており、Wnt-Lef のシグナル経

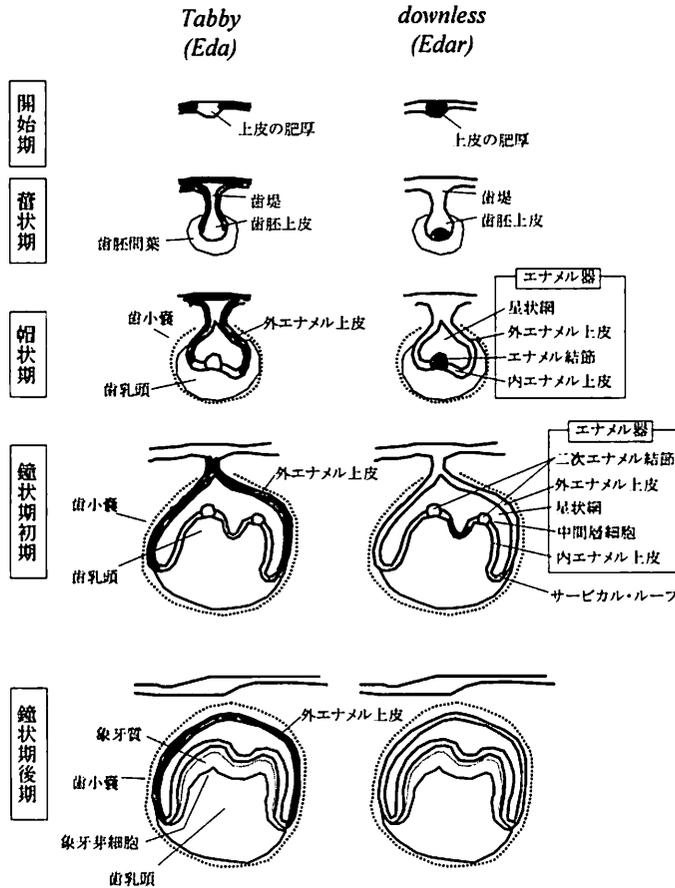


図 4. 歯胚発生期における Tabby/Eda と downless/Edar の発現パターンの模式図。

各歯胚の部位の名称は、歯胚の左側に間葉系の組織名称、右側に上皮系の組織名称を入れている。

路の一部に EDA が位置することが示されている¹⁹⁾。Lef-1 欠損のマウスは帽状期歯胚で発生を停止するので¹⁸⁾、EDA の欠損による歯の欠失は Wnt-Lef 経路の異常によるものかもしれない。なお、*Ta* と *dl* は毛の発生初期と歯胚の開始期で似た発現パターンを示すことや^{13, 20)}、メダカの鱗欠損系統でクローニングされた原因遺伝子 *rs-3* (= reduced scale 3) が *edar* のホモログ遺伝子であったことなどから¹⁷⁾、上皮の付属器官に共通して必要な因子であることがわかってきた。魚鱗、歯、毛という違う形態の上皮付属器官に共通の発生制御因子があることは興味深く、進化を分子レベルで知る上でも面白い。今後の展開が楽しみである。

VII. おわりに

1996-97年、筆者はフィンランドのヘルシンキ大学・生物工学研究所の Irma Thesleff 教授のもとに留学し、Tabby マウスを用いた歯胚発生の研究を行った³¹⁾。当時は、EDA の原因遺伝子 *EDA* がクローニングされたばかりで¹⁵⁾、Tabby マウスの遺伝子 *Ta* は研究室の Johanna Pispá がクローニングをしている最中であった³⁷⁾。しかし、不明の点があまにも多く、HED のモデル動物 *downless*, *crinkled*, *Sleek* のことやヒト疾患のことを知れば知るほど Tabby の歯の異常の仕組みがわからなくなることがしばしばであった。こうした時期に、Thesleff 教授は EDA 遺伝子のクローニングに成功した Kere 教授（ヘルシンキ大学・ハルトマン研究所）と合同で Tabby チームを作り、統合されたばかりの EC（ヨーロッパ共同体）から研究費も獲得してきて研究を本格化した。最初は私も含めて5人の小さなチームであったが、Thesleff 教授はポストドクを次々と投入して大きなチームにし、他の研究グループとも時には協力しあいながら、新しい知見を次々と出して、この分野に大きな貢献を行ってきた^{2, 19-20, 24, 26, 30-31, 37)}。研究に関わっていた当時のいろいろな疑問が今ではかなり解明されてきたことを思うと感慨深いものがある。帰国後はこの分野については研究の進展を見守るだけとなったが、外胚葉異形成症の研究を通じて、歯の発生の分子メカニズムがより一層解明され、臨床へのフィードバックができる日も近いのではないかと感じている。

謝 辞

The author thanks Prof. Irma Thesleff (Helsinki University, Finland) and Johanna Pispá (*ibid.*) for their kindly and friendly discussion about study of Tabby mouse.

文 献

- 1) Baala, L., Hadj Rabia, S., Zlotogora, J., Kabbaj, K., Chhoul, H., Munnich, A., Lyonnet, S. & Sefiani, A.: Both recessive and dominant forms of anhidrotic/hypohidrotic ectodermal dysplasia (EDA3) map to chromosome 2q11-q13. *Am. J. Hum. Genet.*, 64, 651-653, 1999
- 2) Bayes, M., Hartung, A. J., Ezer, S., Pispá, J., Thesleff, I., Srivastava, A. K. & Kere, J.: The anhidrotic ectodermal dysplasia gene (EDA) undergoes alternative splicing and encodes ectodysplasin-A with deletion mutations in collagenous repeats. *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1661-1669, 1998
- 3) Blecher, S. R.: Anhidrosis and absence of sweat glands in mice hemizygous for the Tabby gene: supportive evidence for the hypothesis of homology between Tabby and human anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia (Christ-Siemens-Touraine syndrome). *J. Invest. Dermatol.*, 87, 720-722, 1986
- 4) Blecher, S. R., Kapalanga, J. & Lalonde, D.: Induction of sweat glands by epidermal growth factor in murine X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. *Nature*, 345, 542-544, 1990
- 5) Crocker, M. & Cattanaach, B. M.: The genetics of Sleek: a possible regulatory mutation of the tabby-crinkled-downless syndrome. *Genet. Res.*, 34, 231-238, 1979
- 6) Doffinger, R., Smahi, A., Bessia, C., Geissmann, F., Feinberg, J., Durandy, A., Bodemer, C., Kenwrick, S., Dupus-Girod, S., Blanche, S., Wood, P., Rabia, S. H., Headon, D. J., Overbeek, P. A., Le Deist, F., Holland, S. M., Belani, K., & Kumaratne, D. S.: X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-kappaB signaling. *Nature Genet.*, 27, 277-285, 2001
- 7) Falconer, D. S.: A totally sex-linked gene in the house mouse. *Nature*, 169, 664-665, 1952
- 8) Ferguson, B. M., Brockdorff, N., Formstone, E., Ngyuen, T., Kronmiller, J. E. & Zonana, J.: Cloning of Tabby, the murine homolog of the human EDA gene: evidence for a membrane-associated protein with a short collagenous domain. *Hum. Mol. Genet.*, 6, 1589-1594, 1997
- 9) Gaide, O., Schneider, P.: Permanent correction of an inherited ectodermal dysplasia with recombinant

- EDA. *Nature Med.*, 9, 614-618, 2003
- 10) Gruneberg, H.: Genes and genotypes affecting the teeth of the mouse. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 14, 137-159, 1965
 - 11) Gruneberg, H.: The molars of the tabby mouse, and a test of the 'single-active X-chromosome' hypothesis. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 15, 223-244, 1996
 - 12) Hashiguchi, T., Yotsumoto, S., & Kanzaki, T.: Mutations in the *EDI* gene in Japanese families with X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Exp. Dermatol.*, 12, 518-522, 2003
 - 13) Headon, D. J. & Overbeek, P. A.: Involvement of a novel Tnf receptor homologue in hair follicle induction. *Nat. Genet.*, 22, 370-374, 1999
 - 14) Headon, D. J., Emmal, S. A., Ferguson, B. M., Tucker, A. S., Justice, M. J., Sharpe, P. T., Zonana, J. & Overbeek, P. A.: Gene defect in ectodermal dysplasia implicates a death domain adapter in development. *Nature*, 414, 913-916, 2001
 - 15) Kere, J., Srivastava, A. K., Montonen, O., Zonana, J., Thomas, N., Ferguson, B., Munoz, F., Morgan, D., Clarke, A., Baybayan, P., Chen, E. Y., Ezer, S., Saarialho-Kere, U., de la Chapelle, A. & Schlessinger, D.: X-linked anhidrotic (hypohidrotic) ectodermal dysplasia is caused by mutation in a novel transmembrane protein. *Nature Genet.*, 13, 409-416, 1996
 - 16) Kojima, T., Morikawa, Y., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, A.N., Senba, E., & Kitamura, T.: TROY, a newly identified member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, exhibits a homology with Edar and is expressed in embryonic skin and hair follicles. *J. Biol. Chem.*, 275, 20742-20747, 2000
 - 17) Kondo, S., Kuwahara, Y., Kondo, M., Naruse, K., Mitani, H., Wakamatsu, Y., Ozato, K., Asakawa, S., Shimizu, N. & Shima, A.: The medaka *rs-3* locus required for scale development encodes ectodysplasin-A receptor. *Current Biol.*, 11, 1202-1206, 2001
 - 18) Kratochwil, K., Dull, M., Farinas, I., Galceran, J., & Grosschedl, R.: *Lefl* expression is activated by BMP-4 and regulates inductive tissue interactions in tooth and hair development. *Genes Develop.* 10, 1382-1394, 1996
 - 19) Laurikkala, J., Mikkola, M., Mustonen, T., Aberg, T., Koppinen, P., Pispá, J., Nieminen, P., Galceran, J., Grosschedl, R. & Thesleff, I.: TNF signaling via the ligand-receptor pair ectodysplasin and edar controls the function of epithelial signaling centers and is regulated by Wnt and activin during tooth organogenesis. *Develop. Biol.*, 229, 443-455, 2001
 - 20) Laurikkala, J., Pispá, J., Jung, H.-S., Nieminen, P., Mikkola, M., Wang, X., Saarialho-Kere, U., Galceran, J., Grosschedl, R. & Thesleff, I.: Regulation of hair follicle development by the TNF signal ectodysplasin and its receptor Edar. *Development*, 129, 2541-2553, 2002
 - 21) Lomaga, M. A., Henderson, J. T., Elia, A. J., Robertoson, J., Noyce, R. S., Yeh, W. -C., & Mak, T. W.: Tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) deficiency results in exencephaly and is required for apoptosis within the developing CNS. *J. Neurosci.*, 20, 7384-7393, 2000
 - 22) Lomaga, M. A., Yeh, W. -C., Sarosi, I., Duncan, G. S., Furlonger, C., Ho, A., Morony, S., Capparelli, C., Van, G., Kaufman, S., van der Heiden, A., Itie, A., Wakeham, A., Khoo, W., Sasaki, T., Cao, Z., Penninger, J. M., Paige, C. J., & Lacey, D. L.: TRAF6 deficiency reluts in osteopetrosis and defective interleukin- α , CD40, and LPS signaling. *Genes Develop.*, 13, 1015-1024, 1999
 - 23) Makris, C., Godfrey, V. L., Krahn-Senftleben, G., Takahashi, T., Roberts, J. L., Schwarz, T., Feng, L., Johnson, R. S., & Karin, M.: Female mice heterozygous for IKKg/NEMO deficiencies develop a dermatopathysimila to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol. Cell*, 5, 969-979, 2000
 - 24) Mikkola, M. L., Pispá, J., Pekkanen, M., Paulin, L., Nieminen, P., Kere, J. & Thesleff, I.: Ectodysplasin, a protein required for epithelial morphogenesis, is a novel TNF homologue and promotes cell-matrix adhesion. *Mech. Develop.*, 88, 133-146, 1999
 - 25) Monreal, A. W., Ferguson, B. M., Headon, D. J., Street, S. L., Overbeek, P. A. & Zonana, J.: Mutations in the human homologue of mouse dl cause autosomal recessive and dominant hypohidrotic ectodermal dysplasia. *Nat. Genet.*, 22, 366-369, 1999
 - 26) Mustonen, T., Pispá, J., Mikkola, M. L., Pummila, M., Kangas, A. T., Pakkasjarvi, L., Jaatinen, R., & Thesleff, I.: Stimulation of ectodermal organ development by Ectodysplasin-A1. *Develop. Biol.*, 259, 123

- 136, 2003
- 27) Naito, A., Yoshida, H., Nishioka, E., Satoh, M., SAzuma, Yamamoto, T., Nishikawa, S. -i., & Inoue, J. -i.: *TRAF6*-deficient mice display hypohidrotic ectodermal dysplasia. *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, 99, 8766-8771, 2002
- 28) Newton, K., French, D. M., Yan, M., Frantz, G. D., & Dixit, V. M.: Myodegeneration in *EDA-A2* transgenic mice is prevented by *XEDAR* deficiency. *Mol. Cell. Biol.*, 24, 1608-1613, 2004
- 29) Ohazama, A., Courtney, J. -M., & Sharpe, P. T.: Expression of TNF-receptor-associated factor genes in murine tooth development. *Gene Exp. Pat.*, 3, 127-129, 2003
- 30) Ohazama, A., Hu, Y., Schmidt-Ullrich, R., Cao, Y., Scheidereit, C., Karin, M., & Sharpe, P. T.: A dual role for *Ikk α* in tooth development. *Develop. Cell*, 6, 619-1227, 2004
- 31) Pispá, J., Jung, H.-S., Jernvall, J., Kettunen, P., Mustonen, T., Tabata, M. J., Kere, J. & Thesleff, I.: Cusp patterning defect in Tabby mouse teeth and its partial rescue by FGF. *Develop. Biol.*, 216, 521-534, 1999
- 32) Pispá, J., Mikkola, M. L., Mustonen, T., & Thesleff, I.: *Ectodysplasin*, *Edar* and *TNFRSF19* are expressed in complementary and overlapping patterns during mouse embryogenesis. *Gene Exp. Pat.*, 3, 675-679, 2003
- 33) Pinheiro, M. & Freire-Maia, N.: Ectodermal dysplasia: a clinical classification and a causal review. *Am. J. Med. Genet.*, 53, 153-162, 1994
- 34) Rosselli, D. & Gulienetti, R.: Ectodermal dysplasia. *Brit. J. Plast. Surg.*, 14, 190-204, 1961
- 35) Sinha, S. K., Zachariah, S., Quinones, H. I., Shindo, M., & Chaydhary, P. M.: Role of TRAF3 and -6 in the activation of the NF-κB and JNK pathways by X-linked ectodermal dysplasia receptor. *J. Biol. Chem.*, 277, 44953-44961, 2002
- 36) Sofaer, J. A.: Aspects of the tabby-crinkled-downless syndrome. I. The development of tabby teeth. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 22, 181-205, 1969
- 37) Srivastava, A. K., Pispá, J., Hartung, A. J., Du, Y., Ezer, S., Jenks, T., Shimada, T., Pekkanen, M., Mikkola, M. L., Ko, M. S., Thesleff, I., Kere, J. & Schlessinger, D.: The Tabby phenotype is caused by mutation in a mouse homologue of the *EDA* gene that reveals novel mouse and human exons and encodes a protein (ectodysplasin-A) with collagenous domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13069-13074, 1997
- 38) Takahashi, N., Udagawa, N., & Suda, T.: A new member of tumor necrosis factor ligand family, *ODF/OPGL/TRANCE/RANKL*, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 256, 449-455, 1999
- 39) Tucker, A. S., Headon, D. J., Schneider, P., Ferguson, B. M., Overbeek, P., Tschopp, J. & Sharpe, P. T.: *Edar/Eda* interactions regulate enamel knot formation in tooth morphogenesis. *Development*, 127, 4691-4700, 2000
- 40) Visinoni, A. F., de Souza, R. L. R., Freire-Maia, N., Gollop, T. R., & Chautard-Freire-Maia, E. A.: X-linked hypohidrotic ectodermal dysplasia mutations in Brasillian families. *Am. J. Med. Genet.*, 122A, 51-55, 2003
- 41) Yan, M., Wang, L-C., Hymowitz, S. G., Schilbach, S., Lee, J., Goddard, A., de Vos, A. M., Gao, W. -Q., & Dixit, V. M.: Two-amino acid molecular switch in an epithelial morphogene that regulates binding to two distinct receptors. *Science*, 290, 523-527, 2000
- 42) Zonana, J., Elder, M. E., Schneider, L. C., Orlow, S. J., oss, C., Golabi, M., Shapira, S. K., Farndon, P. A., Wara, D. W., Emmal, S. A., & Ferguson, B. M.: A novel X-linked disorder of immune deficiency and hypohidrotic ectodermal dysplasia is allelic to incontinentia pigmenti and due to mutations in *IKK-gamma (NEMO)*. *Am. J. Hum. Genet.*, 67, 1555-1562, 2000
- 43) 石切山敏：減汗性外胚葉異形成症；新先天奇形症候群アトラス。梶井正・黒木良和・新川詔夫・福嶋義光編，326-327，南江堂，東京，1998
- 44) OMIM, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>
- 45) toothbase, <http://bite-it.helsinki.fi/>

平成15年度鹿児島大学歯学部公開講座 「歯周治療への Interdisciplinary Approach」

会 場：鹿児島県歯科医師会館
日 時：平成15年 7月27日 9：00～13：30

プログラム

1. 「歯周治療への Interdisciplinary Approach」概説
和泉雄一 教授（顎顔面機能再建学講座 歯周病態制御学分野）
2. 歯周病の薬物療法
西川殷維 教授（生体機能制御学講座 歯科応用薬理学分野）
3. 歯周治療の一環としての矯正治療
伊藤學而 教授（発生発達成育学講座 顎顔面育成学分野）
4. 補綴が作る歯周組織の健康
田中卓男 教授（顎顔面機能再建学講座 咬合機能補綴学分野）
5. Interdisciplinary Approach による歯周治療
古市保志 助教授（顎顔面機能再建学講座 歯周病態制御学分野）
6. 歯周病治療における歯科衛生士の役割と方向性
下田平貴子（医学部・歯学部付属病院 成人系歯科センター 保存科, 歯周科）

実施報告

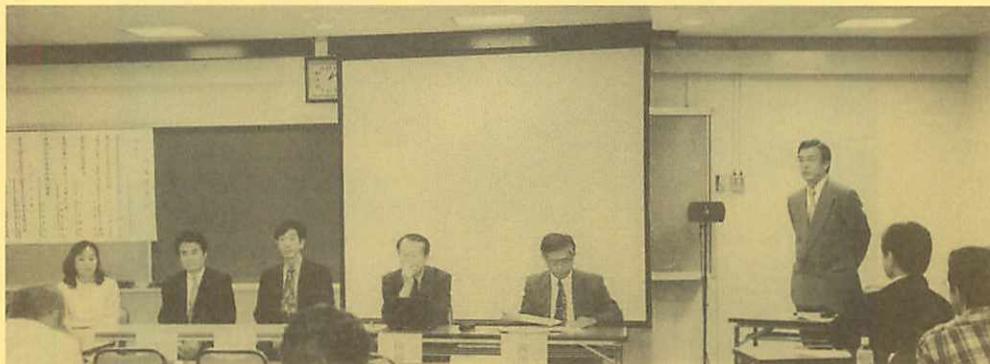
世話人 和泉 雄一

本年度第1回目の歯学部公開講座は、鹿児島県歯科医師会との共催のもとに、鹿児島市において開催された。

歯周病の罹患率が国民の70%を超える現在、歯科治療を進める上で、歯周病への対応は避けて通れない。そこで、今回の鹿児島大学歯学部公開講座では、日常の臨床に役立つ実践的な内容として、「歯周治療へ Interdisciplinary Approach」を取り上げた。歯周治療は、口腔衛生指導、Scaling & Root planing、咬合調整、歯周外科手術などの処置を効果的に行う事による歯周病の進行抑制と、健康な歯周組織の獲得および咀嚼機能の回復を目標とする。高度に進行した歯周炎患者ではこの目標を達成するために、歯列の機能的な再建と保全を長期的な展望に立って考慮することが重要となる。そのためには、矯正治療や補綴処置などの他分野からの知識と技術に基づいたアプローチが必要である。また、機械的なブラークコントロールだけでは限界があり、薬物療法を踏まえた薬理学的な観点からの考察、そして、歯周治療の開始からメンテナンスに至るまで、歯科衛生士の積極的な治療への参加も欠かせない。本公開講座では、歯周治療を成功に導くだけでなく、口腔機能の回復を目指すために様々な観点から多角的な考察を行うことを目的とし、各分野の専門家から問題提示および臨床上の注意点について解説をお願いした。

日常臨床に直結した内容であったためか、当日の参加者は30名を超え、コ・デンタルスタッフと一緒に参加された先生も散見された。

今回の公開講座に際しては、四元会長のご出席を頂き、鹿児島県歯科医師会ならびに鹿児島市歯科医師会の暖かいご支援を賜った。また、公開講座の準備・実施に、ご尽力頂いた学内の関係各位に感謝申し上げます。



平成15年度鹿児島大学歯学部公開講座 「歯性感染症（う蝕と歯周疾患を含む）の最新治療法」

会 場：始良郡歯科医師会館

日 時：平成16年2月15日（日） 13：00～18：00

プログラム

1. 充填・歯内療法の最新治療法
鳥居光男 教授（顎顔面機能再建学講座 歯系組織保存学分野）
2. 歯周治療の最新治療法
和泉雄一 教授（顎顔面機能再建学講座 歯周病態制御学分野）
3. 歯性感染症の最新治療法
杉原一正 教授（顎顔面機能再建学講座 顎顔面疾患制御学分野）
4. 抗菌薬の正しい使い方と注意点
西川殷維 教授（生体機能制御学講座 歯科応用薬理学分野）

実施報告

世話人 杉原 一正

本年度第2回目の歯学部公開講座は、鹿児島県歯科医師会、始良郡歯科医師会、大口市歯科医師会との共催のもとに始良郡溝辺町の始良郡歯科医師会館において開催された。

歯科の二大疾患であるう蝕と歯周疾患も口腔内細菌による感染症と捉えることができる。さらに、う蝕や歯周疾患からの炎症が周囲の軟組織や顎骨に波及すると歯性感染症（顎炎や蜂窩織炎など）を生じる。本講座は、歯科保存学、歯周病学、口腔外科学、歯科薬理学が専門の4名の講師により、う蝕、歯髄炎、根尖性歯周炎、歯周疾患、歯性感染症の診断と治療における最新の知見を提示してもらい、参加者が日常の歯科臨床に役立ててもらうことを目的として開設された。

今回の公開講座の実施にあたっては、森原和久会長、山中富士夫専務、米坂 勉学術担当理事をはじめ、始良郡歯科医師会の先生方には、打ち合わせ、会場設営など多大なご支援を賜った。これらの始良郡歯科医師会役員の方の先生方のご努力により当日の参加者は、鹿児島市、曾於郡、大口市からの出席者も含めて70名を超え、熱心に講演を聴いて頂いた上に活発な質疑応答も行われ、非常に有意義な公開講座となったことは、主催者としてうれしい限りであった。最後に、本公開講座の準備と実施にご尽力いただきました庶務係の若松辰也係長と福留昌子主任に感謝申し上げます。



鹿児島大学歯学部発表論文〔2002年 SCI（または JCR）リスト雑誌で公表された業績〕

1. 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, S., 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. **Head & Neck**, 24(6), 582-590, 2002.
2. Nagata, M., Yamasaki, Y., Hayasaki, H. & Nakata, M.: Incisal and condylar paths during habitual mouth opening movement of children with anterior reverse bite in the primary dentition. **J. Oral Rehabil.**, 29, 1120-1125, 2002.
3. Hayasaki, H., Sawami, T., Saitoh, I., Nakata, S., Yamasaki, Y. & Nakata, M.: Length of the occlusal glide at the lower incisal point during chewing. **J. Oral Rehabil.**, 29, 1120-1125, 2002.
4. Kanemaru, N., Harada, S. & Kasahara, Y.: Enhancement of sucrose sweetness with soluble starch in humans. **Chem. Senses**, 27, 67-72, 2002.
5. Kawamoto, S., Ejiri, S., Hoshi, K., Nagaoka, E. & Ozawa, H.: Immunolocalization of osteoclast differentiation factor in rat periodontium. **Arch. Oral Biol.**, 47, 55-58, 2002.
6. Kawamoto, S., Ejiri, S., Nagaoka, E. & Ozawa, H.: Effects of oestrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. **Arch. Oral Biol.**, 47, 67-73, 2002.
7. Tokuda, M., Nagaoka, S. & Torii, M.: Interleukin-10 inhibits expression of interleukin-6 and -8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor- κ B deactivation. **J. Endodon.**, 28, 177-180, 2002.
8. Tamai, R., Sakuta, K., Matsushita, K., Torii, M., Takeuchi, O. & Akira, S., Akashi, S., Espevik, T., Sugawara, S. & Takada, H.: Human gingival CD14⁺ fibroblasts primed with gamma interferon increase production of interleukin-8 in response to lipopolysaccharide through up-regulation of membrane CD14⁺ and MyD88 mRNA expression. **Infect. Immun.**, 70, 1272-1278, 2002.
9. Sugiyama, A., Uehara, A., Iki, K., Matsushita, K., Nakamura, T., Ogawa, T., Sugawara, S. & Takeda, H.: Activation of human gingival epithelial cells by cell-surface 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. **J. Med. Microbiol.**, 51, 27-33, 2002.
10. Kakimoto, K., Machigashira, M., Ohnishi, T., Kajihara, T., Semba, I., Setoguchi, T., Tamura, M. & Daikuhara, Y.: Hepatocyte growth factor in gingival cervicular fluid and the distribution of hepatocyte growth factor-activator in gingival tissue from adult periodontitis. **Arch. Oral Biol.**, 47, 655-663, 2002.
11. Tamura, J., Hiai, H., Shisa, H., Hirano, M., Semba, I., Nagaoka, S. & Kitano, M.: Carcinogenesis modifier loci in rat tongue are subject to frequent loss of heterozygosity. **Int. J. Cancer**, 102(6), 638-642, 2002.
12. Suzuki, S., Nagai, E., Taira, Y. & Minesaki, Y.: In vitro wear of indirect composite restoratives. **J. Prosthet Dent**, 88, 431-436, 2002.
13. Kurashige, H., Suzuki, S., Minesaki, Y., Kajihara, H. & Tanaka, T.: Effect of pH on resin bonding to metal alloys. **J. Dental Res.**, 81, 70, 2002.
14. Suzuki, S., Tanaka, T., Kurashige, H., Kimura, T. & Minesaki, Y.: Evaluation of dentin coating for prevention of microleakage. **J. Dental Res.**, 81, 418, 2002.
15. Minesaki, Y., Suzuki, S., Kajihara, H., Kurashige, H. & Tanaka, T.: Positional effects on bi-axial flexural strengths of fiber-reinforced composites. **J. Dental Res.**, 81, 471, 2002.
16. Diniz, P., Shomura, K., Soejima, K. & Ito, G.: Effects of pulsed electromagnetic field (PEMF) stimulation on bone tissue like formation are dependent on the maturation stages of the osteoblasts. **Bioelectromagnetics**, 23(5), 398-405, 2002.
17. Rosales, V. P., Ikeda, K., Hizaki, K., Naruo, T., Nozoe, S. & Ito, G.: Emotional stress and brux-like activity of the masseter muscle in rats. **Eur. J. Orthod.**, 24(1), 107-117, 2002.
18. Diniz, P., Soejima, K. & Ito, G.: Nitric oxide mediates the effects of pulsed electromagnetic field stimulation on

- the osteoblast proliferation and differentiation. *Nitric Oxide*, 7(1), 18–23, 2002.
19. Setoguchi, T., Machigashira, M., Yamamoto, M., Yotsumoto, Y., Yoshimori, M., Yaegaki, K. & Izumi, Y.: The effects of methyl mercaptan on epithelial cell growth and proliferation. *Int. Dent. J.*, 52, 241–246, 2002.
 20. Ito, T., Suzuki, A., Imari, E., Horimoto, N., Ohnishi, T., Daikuhara, Y. & Hori, M.: Tornado extraction: a method to enrich and purify RNA from the nephrogenic zone of the neonatal rat kidney. *Kidney Int*, 62(3), 763–769, 2002.
 21. Tsuboi, Y., Kakimoto, K., Akatsu, H., Daikuhara, Y. & Yamada, T.: Hepatocyte growth factor in cerebrospinal fluid in neurologic disease. *Acta Neurol Scand*, 106(2), 99–103, 2002.
 22. Matsumori, A., Takano, H., Obata, J. E., Takeda, S., Tsuyuguchi, N., Ono, K., Okada, M., Miyamoto, T., Ohnishi, T., Daikuhara, Y. & Sasayama, S.: Circulating hepatocyte growth factor as a diagnostic marker of thrombus formation in patients with cerebral infarction. *Circ. J.*, 66(2), 216–218, 2002.
 23. Yokoyama, K., Sugiyama, K.: Hemodynamis effects of satellite ganglion block:analysis using a model of aortic input impedance. *Canad. J. Anesth.*, 49(8), 887–888, 2002.
 24. Koike, S., Ando, K., Oohira, C., Fukawa, T., Lee, R., Takai, N., Monobe, M., Furusawa, Y., Aoki, M., Yamada, S., Shimizu, W., Nojima, K. & Majima, H.: Relative biological effectiveness of 290 MeV/u carbon ions for the growth delay of a radioresistant murine fibrosarcoma. *J. Radiat. Res.*, 43(3), 247–255, 2002.
 25. Yuyama, N., Davis, D. E., Akiwa, M., Matsui, K., Hamasaki, Y., Suminamai, Y., Lu Yoshida, N., Maeda, M., Pandi, A., Lordan, J. L., Kamogawa, Y., Arima, K., Nagumo, F., Sugimachi, M. Berger, A., Richards, I. Roberds, S. L., Yamashita, T., Kishi, F., Kato, H., Ariai, K., Ohshima, K., Tadano, J., Hamasaki, N., Miyatake, S., Sugita, Y., Holgate, S. T. & Izuhara, K.: Analysis of Novel Disease-related genes in bronchial asthma. *Cytokine*, 19(6), 287–296, 2002.
 26. Tabuchi, M., Tanaka, N., Nishida-Kitayama, J., Ohno, H. & Kishi, F.: Alternative splicing regulates the subcellular localizaion of divalent metal transporter 1 isoforms. *Mol. Biol. Cell*, 13(12), 4371–4387, 2002.
 27. Ban, S. & Hasegawa, J.: Morphological regulation and crystal growth of hydrothermal-electrochemically deposited apatite. *Biomaterials*, 23(14), 2965–2972, 2002.
 28. Ban, S., Kamiyama, A. & Sonoda, T.: Calcium-ion incorporation into titanium accompanied by electrochemical apatite-deposition. *Dent. Mater. J.*, 21(4), 306–313, 2002.
 29. Inoue, K., Song, Y. X., Kamiunten, O., Oku, J., Terao, T. & Fujii, K.: Effect of mixing method on rheological properties of alginate impression materials. *J. Oral Rehabil.*, 29, 615–619, 2002.
 30. Fujii, K., Arikawa, H., Kanie, T., Shinohara, N. & Inoue, K.: Effect of photo-irradiation on hardness of soft lining materials for denture base. *J. Oral Rehabil.*, 29, 744–748, 2002.
 31. Fujii, K., Arikawa, H., Kanie, T., Kamiunten, O. & Miura, K.: Effect of ethanol on the hardness and relaxation modulus of experimental photo-activated soft lining materials stored in aqueous soltions. *J. Oral Rehabil.*, 29, 770–776, 2002.
 32. Fujii, K., Arikawa, H., Kanie, T., Hamano, T., Nishi, Y. & Nagaoka, E.: Dynamic viscoelastic properties of commercial glass-fiber reinforced resin used for crowns and bridges. *J. Oral Rehabil.*, 29, 827–834, 2002.
 33. Kanie, T., Arikawa, H., Fujii, K.: Relaxation modulus of denture base resin reinforced with woven glass fibers. *Dent. Mater. J.*, 21(1), 1–8, 2002.
 34. Kanie, T., Arikawa, H., Fujii, K. & Ban S.: Mechanical properties of reinforced denture base resin: The effect of position and the number of woven glass fibers. *Dent. Mater. J.*, 21(3), 261–269, 2002.
 35. Akikawa, H., Kanie, T., Fujii, K., & Homma, T.: Mechanical properties of light-cured composite resins cured through filters that simulate enamel. *Dent. Mater. J.*, 21(2), 147–155, 2002.

編 集 後 記

鹿児島大学歯学部紀要第24巻をお届けいたします。鹿児島大学歯学部も変革の時代を迎え、ここ数年で機構的には大きく変わりました。平成15年4月には大学院の部局化が行われ、大学院歯学研究科は医学研究科と統合され、医歯学総合研究科となり、私達の所属も歯学部から大学院へ配置換えされ歯学部は併任となり、従来の歯学部の講座名はなくなり、新しい大講座名と分野名がつきました。さらに平成15年10月には医学部附属病院と歯学部附属病院が統合され鹿児島大学医学部歯学部附属病院となりました。そして平成16年4月から鹿児島大学は法人化され、国立大学法人鹿児島大学となりました。このような激動の時代のなか、今年、歯学部創設期から教育、研究、臨床に努力された伊藤学而教授が定年退官を迎えられました。また、前年度に定年退官された教授の後任に山崎要一教授、松口徹也教授、仙波伊知郎教授、原田秀逸教授が着任されました。本歯学部紀要には、これらの先生方に原稿の執筆をお願いいたしました。ご多忙のなか立派な原稿をお寄せ頂き感謝申し上げます。歯学部公開講座も今年度も2回行われ、多くの参加者を得ることができました。大学院医歯学総合研究科となりましたが、歯学部は学生とともに存在しますので、旧歯学部の所属であった私達は、これからも歯学部の発展のためにがんばっていききたいものです。最後に本誌の発行にご協力いただきました関係各位に感謝申し上げます。

(編集委員 杉原一正)

平成 16 年 3 月 15 日 印刷
平成 16 年 3 月 25 日 発行

発行所

鹿児島大学歯学部 代表 西川 殷雄
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

