

第 1 回

唾液腺健康医学コアミーティング

大学院コア科目唾液腺健康医学入門集中講義

平成 23 年 6 月 11 日・12 日

湘南国際村：IPC 生産性国際交流センター

主催 神奈川歯科大学大学院口腔病理学講座

プログラム

1日目 6月11日 16:00 集合

挨拶 槻木恵一 神奈川歯科大学大学院口腔病理学講座 教授

基調講演 唾液腺健康医学から新しい歯科医療を創生する 16:30-17:30

口腔病理学講座における研究の経過と現況を報告すると同時に、これから3年間の研究方針について講演する。 槻木恵一 教授

セミナー 唾液腺の科学 17:45-18:45 座長 近藤

本セミナーでは大学院生諸氏に、相互啓発を目的として「唾液腺の科学」のreviewと最新の研究論文(抄録)の紹介を行う。

藤野和弘 社会人大学院1年

テーマ: 唾液の分析

飯田倫太郎 社会人大学院1年

テーマ: 第2章 唾液分泌量と緩衝能およびpH

山本裕子 社会人大学院1年

テーマ: 第8章 唾液の免疫グロブリン

林隆司 本科大学院1年

テーマ: ヒト唾液の非免疫グロブリン防御因子

夕食・新人歓迎会 19:00-21:00 進行 東

2日目 6月12日

朝セミナー 学位論文紹介 8:00-8:30 座長 猿田

学位論文の内容と学位取得までの経過を紹介し、社会人大学院生・新1年大学院生への情報提供を行う。

近藤裕介 特任助教 大学院指導補助教員

テーマ:急性拘束ストレス時のラット副腎におけるBDNFレセプターTrkBの発現と役割

教育講演1 脳由来神経栄養因子の概要と最新の研究 8:30-9:15

猿田樹理 講師 大学院指導教員

テーマ:ストレス関連唾液腺由来BDNFの機能解析

教育講演2 唾液腺腫瘍の病理診断学 9:30-10:00

堀眞由美 非常勤講師 横須賀共済病院病理部

テーマ:新WHO分類における唾液腺腫瘍の組織分類について

特別講演 唾液タンパク質の抗真菌・抗酸化作用 10:00-10:45 座長 槻木

ESR法とプロテオーム解析により、多様な生理活性物質を含む唾液タンパク質の抗酸化作用と抗真菌作用を評価について最新の研究成果を報告していただく。

小松知子 神奈川歯科大学障害者歯科学 講師

共同研究進捗状況 11:00-11:15

口腔病理学講座が行っている共同研究について、現況を報告すると同時に今後の展開を議論する。

慶応義塾大学耳鼻咽喉科 猿田樹理 講師 大学院指導教員

慶應義塾大学先端生命科学研究所 槻木恵一 教授

鶴見大学歯学部口腔病理学講座 槻木恵一 教授

個人研究テーマ発表 座長 猿田

外部評価者 李昌一 教授

神奈川歯科大学大学院

研究科長

口腔病理学講座で各研究者が行っている研究テーマについて進捗状況を報告し、今後の展開を議論することで、本年度における研究の方向性を確認する。

歯周病解析関係 11:15-11:45

鎌田要平 横浜研修センター 成人歯科 助手

テーマ：ヒト歯周炎歯肉 *in vivo* 再現モデルを用いた IL-1 β 発現についての解析

東 雅啓 本科大学院2年

テーマ：*in vivo*におけるヒト歯肉の歯周病モデルによる免疫学的解析

11:45-12:45 昼休み・記念撮影

BDNF 解析関係 12:45-13:20

猿田樹理 講師 大学院指導教員

テーマ：唾液を用いたメタボリックシンドローム診断法の開発についての基礎的研究

杉山弘起 社会人大学院2年

テーマ：薬剤性肝障害におけるBDNFのマウスの肝臓への保護作用についての検討

松木千沙 社会人大学院2年

テーマ：唾液BDNF・エストロゲン・プロゲステロンの相関と性周期との関連

唾液検査関係 13:20-13:50

佐藤允俊 非常勤講師 神奈川歯科大学口腔病理学講座

テーマ：唾液ラクトフェリンの血中濃度への影響と感染症予防効果

椎木直人 非常勤講師 日本大学歯学部総合診療歯科学講座

テーマ：前立腺癌腫瘍マーカーPSAの唾液検査への応用

森 裕介 非常勤講師 東海大学医学部口腔外科学

テーマ：唾液タンパクの発現量と術後感染発症リスクとの関連性

歯科臨床関係 13:50-14:00

高木 亮 非常勤講師 たかぎ歯科

テーマ：臨床実感からエビデンスは生まれる？

外部評価 李昌一教授

まとめ

閉会の辞 猿田樹理 神奈川歯科大学大学院 大学院指導講師

14:30 解散

基調講演

唾液腺健康医学から新しい歯科医療を創生する

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
口腔病理学講座 教授
槻木 恵一



日本の歯科は、歴史的にもあまり価値観をおかれていない存在である。江戸時代の歯抜師は大道芸人である。入れ歯師は職人。お歯黒も審美的ではない。娼婦に至っては歯を抜く習慣があったという。八重歯は日本では「かわいい」だが、欧米では「ドラキュラ」である。どう考えても日本には歯科を軽んじる風潮があることを理解する必要がある。近代歯科医学を少し調べてみた。興味深いのは日本医師法と日本歯科医師法は明治時代の同じ国会で成立している。この時、当時の歯科医師が非常に努力した歴史がある。この努力の背景にインフェリアルコンプレックがある。アメリカで苦勞して歯科医学を学んだ諸氏が、医師に負けたくないと考えたのは想像に難くない。しかし、興味深いのはこのリーダーであった高山紀齋は、歯科医師でないのである。彼は、実質的には歯科医として開業し、歯科医を養成する高山歯科医学院を設立した人物であり、歯科医の将来を真剣に考えていたはずである。しかし、医術開業試験で彼が選んだ免許は外科であった。このことを日本歯科大学系の先生方は、裏切りとして強い批判をしている。しかし、その批判は違うと私は考えている。高山紀齋が上梓した近代歯科医学における最初の歯科医学書である保齒新論の巻頭には、推薦をしている人物として皇室につながる医師より寄稿を得ている。これは、歯科医が認知されない時代に、皇室につながる医師が推薦することにより歯科医学書としての権威をつけようとしたに違いない。歯科医が歯科の認知を広めるのに無理があると現実的な判断からではと思うのである。高山が外科を選んだ理由も、現実的な判断があったとすれば至極納得できる。繰り返すが、歯科が歯科として価値観が高い社会背景があれば、高山紀齋は歯科医師で初めから登録したであろう。高山紀齋は、歯科医師からの批判を受けながら、医師の権威をうまく利用し、歯科医のプライドを守るために、医師と同等の法的立場の獲得に尽力していたと思われる。その表れとして日本の歯科医師は世界的にも極めて広い業務範囲を獲得した。これは、歯科医の多くには実際にはほとんど使われていなかっただが、どうしても必要であったのである。

しかし、時代は大きく進んでおり、医師と歯科医師は大きく差がつけられてしまった。例えば、医学は免疫学の基盤から移植医療が進み大きく飛躍的に進歩した。基礎医学が臨床医学の発展に大きく寄与している。しかし、同じ時を経て、歯科基礎医学が臨床に還元

し新しい歯科医療がどれだけ出来たであろうか。歯科基礎医学者は猛省が必要である。

これからの歯科医は2つの道の選択を迫られると思っている。それは、現行の医学的に広い業務範囲をもつ歯科医師（Stomatologist）を保つか、より歯科に特化した歯科医師（Dentist）を目指すかである。私は歯科に特化した歯科医師の確立がこれから必要と考えている。なぜなら、現行認められている歯科医の広い業務権は、実質的に制限がかけられている方向であり、この流れを止められないのは、歯科医師には無理だからである。歯科医師が医学的に広い業務権を獲得している背景は、歯学部での基礎医学総論を学んでいることに立脚している。しかし、いまの医学総論の教授だけでは、医師と同等の立場は確保できない状況になっている。万が一、歯学部附属病院で口腔外科の大手術で大きなミスがあれば、歯科医師の権能は理不尽に制限がされる可能性が高い。その前に、より歯科に特化した歯科医を目指すのが、現実的であり必要な方向性であると確信している。

そのためには、国民的に歯科への認識が低いという現実に立ち、歯科口腔の大切さを認知させるような研究（全身と口腔）、歯科臨床医学の発展に寄与する歯科的な研究（予防・検査・治療）、無理なく歯科医でも出来る新しい業務の検討（検診、栄養指導）の3つが大切だと考えている。その考えに基づき、槻木病理は腫瘍病理学の研究をやめ、環境病理学（ストレスと唾液腺）に大きく方向転換した。

唾液腺健康医学はこのような考えから生まれた。将来、この考え方が認知されたら唾液腺健康歯学にしたい。それまでは、高山紀齋がやったように医学の名を借りておこうと思っている。

槻木病理がスタートし5年目となった。実は、研究は順調に進んでいるが、大学の騒動に巻き込まれ1年遅れとなっている。今年はこの遅れを強力に取り戻したい。一丸となり新しい歯科医療の創生のために皆さんとともに世界に発信できる研究を積み重ねていきましょう。

「唾液腺の科学」 第1章 唾液の分析

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
社会人大学院1年
藤野 和弘

今回、唾液の科学より分析方法について記述する唾液の分析にはそれ自体困難なことを伴い、唾液を採取することには概して特別な問題はない。

実際に、分析のために唾液を採取することには考慮すべきことがいくつかあり、唾液分析をする前に考慮すべきことは、唾液の必要量と分析すべき特性値の全数、唾液の種類、刺激方法、貯蔵方法、貯蔵前の処置、である。

刺激の種類が変化すると、それぞれの唾液腺からの分泌の比率が変化する。唾液分泌量や構成成分に影響を与える因子として、被験者、唾液腺の種類、血漿の組成、日内変動、刺激方法、採取以前の刺激、刺激期間、ホルモン、運動、急性および慢性疾患、薬物、物理的および化学的採取環境が考えられる。

唾液腺刺激下での全唾液腺の標準化法は、採取 1~2 時間前は水以外の飲食を禁止する、採取前は激しい運動をしない、採取はいつも同一時間帯に行う、採取はいつも同一環境下で行う、前もって刺激することが望ましい、採取時間もしくは採取量を予め決めて採取する、繰り返し採取するときには同一の刺激方法を用いる、すべての慢性および急性疾患及び薬物について考慮する、明らかに血液の混じっているものはすべて除外する事である。唾液の分泌流量およびその成分において、個人間だけでなく個人内でも大きく変動するので、標準化は特に重要である。

これまで公表されている唾液中各成分の通常値は、血液などの通常値と違って、あくまで参考値と考えるべきである。分析方法においても、血清などですでに確立されている方法を、そのまま唾液に応用できない場合もしばしばある。報告されている唾液中成分の通常値に差異が認められる原因の1つには、唾液採取方法が標準化されていないことによるためであると考えられ、たとえ同一の分泌流量で採取したとしても、唾液採取条件の標準化は必要である。

全唾液腺、耳下腺唾液、顎下腺唾液、耳下腺唾液中の採取法は既にほぼ確立されている。小唾液腺は舌腺、頬腺、口蓋腺、舌口蓋腺からなり総分泌量は安静時および刺激時ともに全唾液の 10%以下であり、これらは純粘液腺や混合腺であるこれらの小唾液腺からの唾液採取は技術的に難しく、研究報告は少ないのが現状であり唾液採取方法の標準化は必要である。今後はこれらの分析方法の注意点を参考にして今後の研究実験に生かしていく必要がある。

「唾液腺の科学」 第2章唾液分泌量と緩衝能および pH

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科
社会人大学院1年
飯田倫太郎

【目的】第1回唾液腺コアミーティングにおける大学院生の相互啓発を目的とする。

【方法】「唾液腺の科学」第2章唾液分泌量と緩衝能および pH の review と最新の論文（抄録）の紹介をする。

【結果】唾液の分泌量はさまざまな因子によって影響を受ける。酸味刺激による味覚刺激は、多くの局所刺激物の中で最も適したものである。薬剤については、抗コリン製剤と利尿剤が唾液の分泌量を著しく減少させると思われる。頭部と頸部の放射線療法も同様な作用をもっている。多くの疾患の中でシェーグレン症候群については、唾液流量を低下させる影響を与えるということが最もよく記述されている。成人の年齢と唾液流量の関係については、矛盾したところがあるが、15歳までの小児に関しては、唾液流量は年齢と共に増加する。多くの研究女性に比べて男性の方が流出量は高いことを示しているが、これはおそらく唾液腺の大きさの違いによると思われる。ヒトの栄養状態は、ある程度唾液の分泌量に影響を与える。しかしながら、これらの変化は、長期間栄養不全であったというような食事の欠乏が極めて重度な場合を除けば、比較的小さいものと考えられる。この章で議論された他の要因、性ホルモン、年内および日内変動、ニコチンなどの唾液流量に対する影響はほとんど無視できるか、また僅かな程度と思われる。唾液の緩衝能と pH は、主に炭酸/重炭酸塩システムによって調節されている。重炭酸塩の濃度と pH の両者は分泌量に強く依存している。成人においては安静時と刺激時の両方の全唾液の緩衝能が、男性に比べて女性の方が著しく低い。同様な性差が小児、青少年、および70歳以上の被験者でも観察された。女性においては、唾液緩衝能は年齢と明らかに関連する。pH もまた同様の傾向を示すと思われる。おそらく、食事は緩衝能に影響を与えるかもしれないが、このような変化が現れるまでに比較的長時間を要すると考えられる。疾患それ自体によって生ずるのかは明らかにされていない。しかしながら、低い値であっても必ずしも健康が阻害されているとは言えない。タバコ喫煙もまた、緩衝能と pH に対する影響は明確ではない。これらの変化は分泌量に関連しない事を示している。唾液分泌量、緩衝能および pH の相互関連の面とウ蝕については良く知られている。う蝕活動性の高い患者またはカリエス・リスクの疑われる患者について、カリエス・リスクの良好な予測のために、唾液流出量と緩衝能の測定を主として行われ、推奨される。

【考察】今回の「唾液腺の科学」第2章唾液分泌量と緩衝能および pH の review と最新の

論文（抄録）の紹介は，大学院生の相互啓発を主の目的としているが，日常臨床において多種多様な疾病や年代の患者とかかわる一般開業医にとって，EBMに基づいた診療を行ううえで，唾液の正しい知識を高めることは非常に有益であると考える。

「唾液腺の科学」第8章 唾液の免疫グロブリン

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
社会人大学院1年
山本 裕子

免疫とは、非自己を排除し、生体の正常な営みを守るために発達したシステムである。抗原の侵入により、特異的なB細胞・T細胞が活性化され相互に作用することによって、B細胞は形質細胞となり、血清中に抗原特異的な反応を持つ、 γ -グロブリンというグロブリンに属するタンパクを分泌する。その γ -グロブリンの総称を「免疫グロブリン」という。

免疫グロブリンにはIgG・IgM・IgA・IgE・IgDの5種類が存在する。「全身系免疫システム」の中心を担っているのは血清中のIgGであるが、全身系免疫システムとは異なった誘導・制御機構であり、消化器・呼吸器・生殖器の生体防御システムである「粘膜免疫システム」では、IgA、それも血清中の血清型IgAではなく、唾液・乳汁・涙・腸管分泌液等の外分泌液に存在する「分泌型IgA (SIgA)」が重要な役割を果たしている。また、胸腺外で発達・分化する $\gamma\delta$ -T細胞が機能している。

「粘膜免疫システム」の1つである、口腔内の感染防御システムでは、唾液中の免疫グロブリンが重要な役割を果たしている。歯肉溝浸出液を通じて全唾液に加わるIgGや、分泌型IgM (SIgM) も関係しているが、中心となっているのは、唾液腺の免疫細胞 (B細胞) によって産生されるSIgAである。唾液腺の腺房の形質細胞で産生された単量体のIgA分子は、J鎖というポリペプチドを介して結合し二量体を生成する。その後唾液腺上皮のレセプターと結合し、細胞内に取り込まれる。2量体IgAと結合したレセプターは、上皮細胞内で分泌成分 (SC) に変化し、最終的にSIgAが形成され唾液中に分泌される。SIgAはSCの添加により安定し、口腔内細菌が産生する様々なタンパク分解酵素に対して強い抵抗性を発揮し、分解されて抗体活性が消失することを防いでいる。また、抗原結合基が4個存在する二量体であるため、抗原結合価や凝集能が高い。

SIgAの口腔内での機能として、粘膜面や歯面への細菌やウイルスの付着阻害や粘膜下への侵入阻害、また酵素の活性阻害作用によっても粘膜表面における感染防御が行われている。SIgAが歯を守ることができるかどうかは明白ではないが、唾液IgAがS.mutansの増殖を阻害し、う蝕に対する抵抗性を高めている。

全身系・粘膜免疫のシステムを利用した、経口・非経口う蝕予防ワクチンの開発も行われているが、その効果には疑問も多く副作用が懸念されている。

今回は、分泌型IgAを中心に、口腔内と唾液の免疫システムについて発表させていただく。

「唾液腺の科学」第9章ヒト唾液の非免疫グロブリン防御因子

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
本科大学院1年
林 隆司

唾液は人間の歯および口腔粘膜の健康のためには欠かせない体液成分である。唾液中には、唾液腺由来や歯肉溝滲出液由来の抗微生物物質が含まれており、口腔内の様々な場所に存在するリンパ性組織とともに重要な防御機構としての役割を担っている。その抗微生物物質にはリゾチーム、ペルオキシダーゼ、ラクトフェリンをはじめ多くの非免疫グロブリン防御因子が含まれている。今回はその中でラクトフェリンに着目し、その唾液中濃度、生物学的活性、様々な口腔疾患あるいは全身疾患との関係についてまとめた。

ラクトフェリンは鉄結合性糖タンパク質で、涙、乳汁、唾液を含む外分泌中に多く存在する。また、ラクトフェリンは多核白血球に多く含まれており、これらの細胞が食作用中などで崩壊することにより顆粒ラクトフェリンが唾液中に放出する。それ故、歯肉溝滲出液は口腔ラクトフェリンの重要な源であるといえる。

唾液ラクトフェリンの分析は、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)をはじめ、様々な種類があり、標準として広く使用されているものはヒト初乳のラクトフェリンである。

ラクトフェリンの唾液中濃度は唾液腺により異なるが、基本的に刺激を与えると低下する。また、乳児は成人よりその濃度が低く年齢を重ねるとともに上昇する。

ラクトフェリンの生物学的機能は、その鉄との高い関連性から病原性微生物から必要な金属物質を奪うことによるものである。特に *Streptococcus*、*Staphylococcus*、*Candida*、他の腸内細菌といった広い微生物に対して静菌作用を及ぼす。

ラクトフェリンと全身疾患との関連性に関しては、特に Sjögren 症候群でラクトフェリン濃度が上昇する。また耳下腺炎の急性期や放射線治療中の粘膜の炎症においてもラクトフェリン濃度の上昇がみられることから、ラクトフェリン濃度は炎症の程度を反映している可能性がある。しかし、ラクトフェリンと *Streptococcus mutans* などの病原性微生物に対する抗微生物作用が知られているにも関わらず、唾液ラクトフェリンと齲蝕との関連性を示した研究は出ていない。炎症との関連も含め、今後様々な口腔疾患において診断可能なラクトフェリン量が研究されるべきである。

急性拘束ストレス時のラット副腎における

BDNF レセプターTrkB の発現と役割

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔病理学講座 特別研究員

近藤裕介

当研究室では以前、急性拘束ストレス時に唾液腺で BDNF が増加することや (J Dent Res. 2006 85:844-8)、唾液腺由来 BDNF が血中に移行し遠隔臓器に影響を及ぼすことを示唆してきた (J Dent Res. 2007 86:260-4)。一方、急性拘束ストレス時における BDNF のレセプターTrkB の発現パターンに関して報告なされてない。そこで演者は「急性拘束ストレス時における唾液腺由来 BDNF と全身諸臓器における TrkB 発現の解析と BDNF-TrkB 相互作用によるストレスホルモン放出についての検討」をテーマに研究を行いその成果を「Expression and Role of the BDNF Receptor-TrkB in Rat Adrenal Gland under Acute Immobilization Stress」(Acta Histochemica et Cytochemica. 43(6):139-47, 2010) と題して論文を発表した。これを学位論文として博士号を取得した。【方法】ラットに急性拘束ストレス 60 分負荷を行い諸臓器における TrkB mRNA の発現レベルを real-time PCR にて解析を行った。さらにラット副腎における TrkB の局在を *in situ hybridization* と免疫組織化学で解析した。ストレスホルモン放出の検討のためラット副腎髄質由来培養細胞 PC12 を用いて BDNF の添加実験を行いカテコールアミン量の測定、カテコールアミンに対する免疫細胞化学を行った。さらに放出メカニズム検討のため TrkB のサブタイプに対して RT-PCR 解析を行った。【結果】諸臓器における TrkB mRNA 発現レベルの解析の結果、主に副腎のみ増加する結果が得られた。副腎における TrkB の局在を解析したところ TrkB はストレス下の状況で副腎髄質クロマフィン細胞に局在していることが観察された。さらに PC12 に対する BDNF 添加実験、免疫細胞化学の結果、PC12 からカテコールアミンが放出されたことが確認され、RT-PCR 解析から TrkB-T1 が発現していることが観察された。【考察】急性拘束ストレス状況下では唾液腺由来血漿 BDNF が副腎髄質に発現する TrkB-T1 と結合することでシグナル伝達が起こりストレスホルモンを放出することが示唆された。これらの BDNF-TrkB 相互作用によりストレス応答などの生体内の恒常性維持などの役割を果たしていることが考えられる。

「脳由来神経栄養因子の概要と最新の研究」

ストレス関連唾液腺由来 BDNF の機能解析

Key words: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Saliva, Salivary gland, Stress, Tyrosine receptor kinase B (trkB)

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科
口腔病理学講座 講師
猿田 樹理

マウスの唾液腺組織には nerve growth factor (NGF) が高レベルで発現していることが知られており、この NGF に続き brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3, 4 などが発見され neurotrophin family を形成している。このうち、NGF と同様に機能解析が進んでいるのが BDNF で、中枢・末梢神経系において神経細胞の生存・分化（成熟）・機能維持に重要な役割を果たしている。特に海馬では記憶力に関与する物質として注目を集めた。

我々は BDNF がストレスで変動する点に注目し、拘束ストレスを負荷したラットの顎下腺において BDNF の発現を検討した。その結果、急性ストレスによってラット顎下腺に BDNF mRNA および蛋白が増加することが明らかになった。さらに BDNF レセプターである TrkB は口腔粘膜および唾液腺にストレス負荷後も発現していないことから、唾液腺 BDNF は遠隔臓器に影響を与えている可能性が示唆された。

そこで、血漿 BDNF 量がストレスによって変動するかどうかを検討した。その結果、ストレス負荷 1 時間後に血漿 BDNF は著明に増加し、その増加は三大唾液腺摘出により抑制された。すなわち、急性ストレス時、唾液腺は血中 BDNF 量に影響を与える主な臓器であることが明らかになった。さらに、慢性ストレス負荷でも唾液腺 BDNF は増加する。これらの研究結果から、唾液腺はストレスに反応して BDNF を産生する臓器であり、その唾液腺由来 BDNF は血中に移行することから、全身に影響を及ぼす可能性が示唆された。現在、唾液腺由来 BDNF の機能的意義を検討する目的で、target organ の探索を行っている。また、BDNF には神経保護作用があることから、ストレス性病変に対して何らかの保護作用があるのではないかと考え preliminary な実験を行ったところ、急性胃粘膜病変や肝障害の抑制傾向を示した。

さらに、将来の臨床応用との関連では、嘔む行為を強制的に行わすと唾液腺での BDNF の発現が高まり、血中 BDNF も増加する。ヒトにおける血中 BDNF の研究は、臨床的な研究が

先行して認められ、うつ病や統合失調症で血中 BDNF の低下が観察され病勢を反映することが明らかとなっている。もし、ヒトでも噛むという行為や咬み合わせが血中 BDNF 量に関与するとすれば、これら精神疾患に対する予防的効果があるかもしれない。

本講演では、唾液腺が与える全身への影響について BDNF に注目した現在までの研究内容を紹介する。

教育講演 2

新 WHO 分類における唾液腺腫瘍の組織分類について

神奈川県立歯科大学口腔病理学講座

横須賀共済病院病理科

堀 眞由美

唾液腺腫瘍は他臓器に比較すると発生頻度が低いものの、組織像が多彩で、腫瘍型は極めて多く、種々の亜型が存在しており、病理診断に難渋することが少なくない。しかしながら、唾液腺腫瘍では、類似性のある腫瘍型間で悪性度、予後そして治療方針が大きく異なるため、腫瘍の組織分類を理解することが極めて重要である。

唾液腺の組織診断におけるアトラスは、多臓器のそれに比べると、極めて数が少ないが、2005年に頭頸部腫瘍のWHO国際分類第3版目となる改訂版がPathology and Genetics of Head and Neck Tumours として刊行された。この新WHO 分類では第2版の内容を踏襲しつつも、発生頻度の低い腫瘍、そして第2版以降に報告された亜型や非常にまれな腫瘍型が記載され、さらにいくつかの腫瘍型では名称の変更が行われたなどの改訂がなされている。本講習会では、唾液腺腫瘍新WHO 分類の紹介を含めた病理組織学的分類の解説に加えて、実際に病理診断を行う際のアプローチの仕方と注意点についても述べる。

キーワード：唾液腺・新 WHO 分類・病理診断

特別講演

唾液タンパク質の抗酸化作用と抗真菌作用

神奈川歯科大学

生体管理医学講座障害者歯科学分野 講師

小松 知子

1. ヒスタチン，スタセリン，PRP の抗酸化能評価

唾液は抗菌作用を示すヒスタチン，歯面ペリクルの形成やエナメル質の再石灰化作用を示すスタセリン，プロリンリッチタンパク（PRP）など様々な生理活性物質を含んでおり，口腔組織のみならず他の臓器，組織に影響を及ぼすことが徐々に明らかにされてきている。また活性酸素種(Reactive Oxygen Species; ROS) が生活習慣病の主たる原因であることが解明されている一方で，唾液成分の ROS に対する直接的な作用を検討した報告は少なく，十分なエビデンスが得られていない。そこで我々は，ヒト唾液タンパク質成分であるヒスタチン 1, 3, 5, スタセリン, PRP1, 2, 3, 4 および PRP1 の N 末端 30 残基 (30r-PRP1) の ROS に対する抗酸化能を電子スピン共鳴 (ESR) 法により比較検討した。非常に興味深い結果として，スタセリンは抗酸化能を示さなかったが，ヒスタチン 1, 3, 5 および PRP1, 2, 3, 4 および 30r-PRP は ROS であるヒドロキシルラジカルに対して抗酸化能を有することが明らかにされた。

2. ヒスタチン 5 の抗真菌作用

ヒスタチンは，抗真菌作用を示す唾液タンパク質の 1 つであり，そのメカニズムとして *C. albicans* 表面に存在する SSa2 タンパク質レセプターに結合し，細胞内に運搬され，その後ミトコンドリアで作用することが報告されている。未だ明らかにされていないミトコンドリア内での作用機序を解明するために，定量的プロテオーム解析を用いてヒスタチン処理時の *C. albicans* ミトコンドリアタンパク質の発現の違いを検討した。その結果，*C. albicans* に 30 分間および 60 分間，ヒスタチンを作用させた細胞から抽出したサンプルでは elongation factor 1-alpha などの細胞合成に関連するタンパク質の発現が上昇した。一方で malate dehydrogenase , F1F0-ATPase などの呼吸鎖，ATP 産生におけるエネルギー代謝に関連するタンパク質の発現が低下することが明らかになった。以上の結果から，ヒスタチンの抗真菌作用はミトコンドリアにおける ATP 産生の減少によるミトコンドリアの機能低下と関連していることが示唆された。

これらの研究成果から今後，カンジダ症などの口腔粘膜疾患，う蝕，歯周疾患に対する唾液タンパク質の抗酸化能の役割をより明確にすることにより，疾患予防あるいは抗酸化療法の発展に寄与するものと期待している。

ヒト歯周炎歯肉 in vivo 再現モデルを用いた

IL-1 β 発現についての解析

神奈川県立歯科大学口腔病理学講座
横浜研修センター成人歯科 助手
鎌田要平

歯周炎は40歳以上の成人に発症、進行しやすい疾患であり、生活習慣病として位置づけられている。歯周治療は診査、処置、手術、予後などに関し、長期間必要なことが多く、従来にも増して病態メカニズム解明が求められている。歯周炎は歯周病原性細菌により発症するが、細菌の存在だけでは病変は成立せず生体側の要因とのバランスが重要である。また、歯周治療の反応性や病態の重症度、罹患のしやすさなどに個体差があることが知られており、この個体差がどのような機序に依存しているかはほとんど解明されていない。

一方、歯周炎の研究において極めて重要な研究阻害因子は、ヒトの歯周炎を再現する動物モデルがないことである。すなわち、多くの研究はヒト歯肉から培養を行い *in vitro* の研究にとどまっている。この培養系による研究で多くの知見が得られたことは論を待たないが、動物モデルが無い事からも3次元構築が保たれた状態での検討が望まれていた。

Tsukinoki らは、ヒト歯肉組織を免疫不全マウスに移植し、嫌気性状態における3次元構築を維持できるヒト歯肉組織再現モデルを開発している。従来、免疫不全マウスに歯肉組織を移植する実験系の報告があるが、移植組織内で嚢胞状になるため3次元構築の維持が困難であったことから、世界的に注目されている実験系である。そこで本研究では、このヒト歯肉組織再現モデルを歯周炎患者歯肉で構築し、*P. gingivalis* 刺激を行い歯肉組織がどのような変化をするか明らかにした。特に、歯周病の発症進展に重要なIL-1 β の発現レベルと病態との関連を検討した。

歯周炎患者から採取した歯肉組織（移植前）は、免疫不全マウスに移植した歯肉組織（移植後）と形態的に差はなく、移植前の歯肉形態は維持されていた。軽、中、重度慢性歯周炎症例において、免疫不全マウスに歯周病原性菌（*P. gingivalis*）を接種させた歯肉組織（実験群）は、小血管の拡張、好中球などの炎症性細胞浸潤が認められた。免疫不全マウスに培養液のみを接種させた歯肉組織（対照群）は、小血管の拡張などもなく、好中球などは少量であった。

リアルタイムPCRを用いた遺伝子発現量の検索では、軽・中等度慢性歯周炎におけるIL-1 β 発現量は、実験群で0.013、対照群で0.003と有意差を認めた（ $P < 0.05$ ）。重度慢性歯周炎におけるIL-1 β 発現量は、実験群で0.002、対照では0.008と有意差を認めなかった。

次いで軽・中等度慢性歯周炎における実験群と重度慢性歯周炎における実験群の IL-1 β 発現量を比較すると有意差を認めた ($P<0.05$)。軽・中等度慢性歯周炎における対照群と重度慢性歯周炎における対照群では有意差を認めなかった。また、これらの群間で移植歯肉の増殖活性に有意差が認められなかった。さらに、免疫化学組織染色において IL-1 β は、上皮組織と結合組織部分に局在したが、主として上皮の棘細胞に強い発現が観察された。

これらの実験より、歯周炎患者のヒト歯肉組織を免疫不全マウス皮下に移植してヒト歯周炎歯肉組織を再現する事が可能であることが示された。軽・中等度慢性歯周炎の実験群では、従来から報告されているように、*P. gingivalis* を感染させ炎症を惹起することで IL-1 β の発現量は増加した。しかし、重度慢性歯周炎の実験群では有意に増加しなかった。このことから、実際の歯周炎状態の歯肉粘膜は、病態の違いにより IL-1 β の産生量が異なることが示唆された。

*in vivo*におけるヒト歯肉の歯周病モデルによる免疫学的解析

神奈川県立歯科大学大学院歯学研究科
本科大学院2年
東雅啓

[目的]歯周病は主に、特異的な病原細菌の感染により惹起される。その細菌は、それぞれの分子構造や反応性の違いから多様な病原性を示す。またそれらに対応する宿主の免疫機構も複雑で、その中でもまず病原細菌を感知するのが **Toll-like receptor(TLR)**である。TLRは微生物構造を特異的に認識することで、免疫応答において重要な役割を担っている。さらにその病原細菌の排除に不可欠なのが抗菌ペプチドであり、その代表的なものとして **defensin** がある。特に **human- β -defensin2(hBD2)**は、上皮性抗菌ペプチドとして宿主の初期防御に関与することが知られている。

しかしながらこれら免疫応答に関して、細胞レベルでの研究報告はあるものの、生体における検討が未だ十分に行われていないのが現状である。

そこで本演題では、*in vivo*においてヒト歯肉上皮細胞が、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis(P.gingivalis)*に対しどのような免疫応答を示すか、TLR および hBD2 の発現量および局在の比較検討を行った。

[方法]免疫不全モデルマウス(BALB/c nu/nu)、♂、6~8週令に対して、ヒト歯肉を皮下に移植する。移植に関しては Tsukinoki.K ら(J Periodontal Res. 2007)の方法に従う。移植後2週間でヒト歯肉に対して *P.gingivalis* の嫌氣的感染を起こし、2時間後歯肉サンプルを採取する。対照群として培養液のみの投与を行う。そして TLR-2,4 と hBD2 について、定量 PCR および免疫組織化学的解析を行う予定である。

[結果・考察]TLR-2,4 および hBD2 の遺伝子発現量は炎症刺激により有意な増加を示すとの報告がある。また免疫染色では、炎症刺激で上皮における hBD2 の強い発現がみられるとの報告もある。よって *P.gingivalis* による刺激が、*in vivo*においてもヒト歯肉上皮細胞の活発な免疫応答を起こすものと考えられる。

Keywords : *Porphyromonas gingivalis*, Toll-like receptor, human- β -defensin

唾液を用いたメタボリックシンドローム診断法の開発についての

基礎的研究

Key words: Brain-derived neurotrophic factor (BDNF), Metabolic syndrome, Saliva, Salivary gland,

神奈川歯科大学大学院歯学研究科

口腔病理学講座 講師

猿田 樹理

「目的」近年、栄養バランスの偏った食事や不規則な食事の増加・肥満や生活習慣病の増加という背景から食育に関心が集まっている。演者らは、日常生活や生活習慣が唾液腺に与える影響を調べるために、長期間ラットに高カロリー食を食べさせることにより、人工的にメタボリックシンドロームを作成し、通常食を与えたコントロールラットと比較して全身状態の変化が唾液に影響を及ぼすかどうかについて検討した。さらに、肥満に関連があると報告されている脳由来神経栄養因子 brain-derived neurotrophic factor (BDNF) の変化についても同様に検討を行った。

「方法」実験には Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、生後 3 週齢のラットに普通食を与え、生後 13 週齢まで飼育したラットをコントロール(C)群とし、生後 3 週齢のラットに高カロリー食を与え、生後 13 週齢まで飼育したラットをメタボリックモデル(M)群として実験を行った。ラットはコントロール群もメタボリックモデル群も生後 3 週齢より毎週 6 匹ずつサンプリングを行った。サンプリングは血液・尿・唾液・唾液腺・肝臓・腎臓・心臓を採取し、多角的な解析を行った。さらに、各種血液・唾液生化学検査も行った。

「結果および考察」血液生化学検査の総蛋白、HDL コレステロール、LDL コレステロール・総コレステロール、中性脂肪、レプチン、BDNF が C 群と比較して M 群で有意に増加した。また、唾液生化学検査においては、中性脂肪、BDNF が C 群と比較して M 群が有意に増加した。今回の結果から、肥満という全身状態の変化が唾液に影響をおよぼすことが示唆された。また、肥満に関連のある BDNF が M 群で有意に上昇していることから、血糖値や体重の制御に関与しているものと考えられた。

薬剤性肝障害におけるBDNFのマウスの肝臓への

保護作用についての検討

神奈川県立大学大学院歯学研究科

社会人大学院2年

杉山弘起

脳由来神経栄養因子 Brain-derived neurotrophic factor(BDNF)は成長や機能の維持や神経機構に深く関与しており、脳の虚血に対する抵抗性を高めることが近年明らかになってきた。しかし、肝臓においてもこのような作用が起こるかどうかは明らかになってはいない。そこで、BDNFの肝臓における働きに注目し、薬剤性肝障害における肝臓の保護作用の検討を行った。

今回の実験では薬剤性肝障害の形態的变化を比較した。メスのマウスをジエチルエーテルで麻酔し、ゾンデを用いて四塩化炭素CCl₄（オリーブ油混合）を濃度 2400ml/kg 3300ml/kg の2群に分けて経口投与した。また、メスのマウス3匹にCCl₄を飼育ゲージ中の飲料水に 500mg/kg/day となるように混入し、8日間飲水させたのち、同様にHE染色組織像にて肝障害の程度を検討した。

CCl₄を 2400ml/kg 投与した場合と 3300ml/kg 投与した場合では両者に明確な違いはなかった。飲料水においてCCl₄を8日間飲水させた場合では前者より肝障害の形態的变化の程度が大きく、組織像で肝細胞の壊死や空胞変性が血管周囲に認められた。

濃度 2400ml/kg と 3300ml/kg の2群間では明確な違いがなく、短時間ではCCl₄は肝臓に作用しない事が確認できた。また、CCl₄を8日間飲水させた方が短時間飲水させた場合よりも肝障害が重症であった事から、長期的に薬物を投与した場合の方が肝障害を起こしやすいと考えられ、TGマウスとコントロールを比較した場合により差異を明確にしやすいと示唆される。今後は長期間CCl₄をマウスに投与して、BDNFと肝臓の関係について形態的变化について検討する予定である。

唾液 BDNF・エストロゲン・プロゲステロンの相関と性周期との関連

神奈川歯科大学大学院歯学研究科
社会人大学院 2 年
松木千沙

健康な女性には毎月決まった周期で生理が訪れるが、この月経周期に基づいた周期を性周期と呼び、これは 2 種類のホルモン、すなわちエストロゲンとプロゲステロンの変化によってもたらされる。

2009 年に *Endocrine Journal*₁₎ で Peter らの研究グループが月経中の唾液性ホルモンに関する研究を発表した。17 名の女性の唾液を試料とし、radioimmunoassay を用いた研究では、唾液性プロゲステロン、エストラジオールは、血漿のプロゲステロン、エストロゲンと相関し、プロゲステロンが黄体期に最大濃度に達する事が報告された。

また、2007 年に *Human Reproduction*₂₎ で Begliuomini ら研究グループが brain-derived neurotrophic factor (BDNF) における性ホルモンの影響に関する研究を発表した。60 名の女性の血液を試料とし、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) を用いた研究では、血漿 BDNF の黄体期レベルが卵胞期レベルより有意に高く、BDNF はエストラジオールと同様に排卵期前期にピークに達し、次に中央黄体期で上昇することが報告された。

これらのことから、血中 BDNF が上昇すると、プロゲステロンが上昇し、血漿 BDNF は唾液性 BDNF に由来しているのではないかと考え、検討することとした。

これまでに、144 名の女性に対し、アンケートによる基礎調査を行い、唾液を採取した。それらの平均としては、年齢 22.3 歳、BMI 20.4、体温 36.1 度、月経周期 28.6 日であった。

また、月経周期が安定している者は 89 名、安定していない者は 55 名で、月経周期が前期の者は 51 名、後期の者は 76 名であった。

今後は、BDNF、エストロゲンおよびプロゲステロンの ELISA を用いて解析していく予定である。

参考文献

- 1) Peter Celec, Daniela Ostatnikova, Martina Skosnova, Julius Hodosy, Zdenek Putz, Matus Kudela 「Salivary Sex Hormones during the Menstrual Cycle」 *Endocrine Journal* 2009, 56(3), 521-523
- 2) S. Begliuomini, E. Casarosa, N. Pluchino, E. Lenzi, M. Centofanti, L. Freschi, M. Pieri, A. D. Genazzani, S. Luisi, Andrea R. Genazzani 「Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor」 *Human Reproduction* 2007, Vol. 22, No. 4 pp. 995-1002

ラクトフェリンの作用と全身への投与について

神奈川歯科大学口腔病理学講座非常勤講師

佐藤允俊

ラクトフェリンは、1939年に「牛乳の赤いタンパク質」として発見され1961年に「ラクトフェリン」と名付けられたタンパク質です。ヒトを含む哺乳類の乳、分泌液、成熟好中球の顆粒に含まれる分子量約8万ダルトンのタンパク質で、生体内で多くの作用に関わっていることが示されています。特に知られている点としてはヒトの母乳、中でも初乳中には多く含まれていることがわかっています。その割合は母乳中の主タンパク質であるカゼインに次いで高い割合になり、乳児の摂取量は一日で7~10gに達します。作用としてはトランスフェリンの300倍と言われる鉄への結合性でもって病原性の微生物の発育に必要な鉄と結合し、その増殖を阻害するという作用が主であると言われていています。出生直後の乳児は自己の免疫系が不十分であり、生まれた直後に機能する免疫系として母乳中のラクトフェリンが果たしている役割が多いということがこれまでの研究で示されています。またその受容器は全身に分布し、腸管吸収を経て血中に入ることにより抗ストレス効果、抗アレルギー効果があるとされます。

この作用は成人の場合でも同様ですが、乳児と成人では消化器系の様式が大きく異なります。ラクトフェリンは熱とともに胃の中の消化酵素のペプシンにも弱く、成人の場合経口摂取した場合、胃内のペプシンによってほとんどが代謝されてしまい、腸内へ届きません、そのため成人での経口投与にはそれほど効果が無いとされてきました。そこでこれまでの研究は腸へ代謝を受けずにラクトフェリンを届ける事がメインとなってきました。

今回これに対し口腔からの全身への投与の可能性と言うことで舌下からの投与を試み、その全身への波及を調べるとともに、ラクトフェリンの持つ可能性について、これまでに分かっている内容を併せて報告していきます。

前立腺癌腫瘍マーカー P S A の唾液検査への応用

神奈川歯科大学口腔病理学講座非常勤講師
椎木直人

[目的]

Prostate Specific Antigen (PSA) は前立腺特異抗原であり、分子量 34,000 の糖蛋白である。生体内において前立腺上皮細胞で産生され血中に微量に漏出しているが、前立腺癌では前立腺組織の破壊が生じ多量に血中に漏出することにより血中濃度の上昇をきたす。この現象により PSA は前立腺癌に特異性の高い腫瘍マーカーとされ、癌検診などで広く用いられている。一方、唾液は血液から産生されることから血液成分を反映することが知られており、唾液を用いた検査に注目が集まっている。そこで、本研究では、従来行なわれてきた PSA の血液検査について、簡便かつ侵襲性の少ない唾液検査へと代替可能であるかについて検討した。

[方法]

PSA 産生前立腺癌培養細胞株 LNCap を免疫不全マウス (SCID マウス) 7 匹に移植した。この際、移植細胞数は 10^6 (n=2)、 10^7 (n=3)、 10^8 (n=3) の 3 種類行った。次に、血清濃度、顎下腺組織内濃度、唾液 PSA 濃度について ELISA を用いて測定し、統計学的に比較検討を行った。

次にヒトにおいて前立腺癌と診断され、ホルモン療法中およびホルモン療法後のフォロー中の患者 30 人の唾液と血液採取を行い、ELISA を用いて PSA 濃度の測定を行った。さらに、PSA 血清濃度が 2.5ng/mL 以上を高 PSA 値群とし、この患者群において血清 PSA 濃度と唾液 PSA 濃度の相関について統計的に比較検討を行った。PSA 血清濃度が 2.5ng/mL 未満を低 PSA 値群とした。

さらに、ヒト 3 大唾液腺における PSA mRNA の発現を RT-PCR 法で検討した。

[結果]

マウスは PSA 遺伝子を持たないことから、コントロールマウスにおける PSA は全ての実験において検出されなかった。一方、担癌マウスの血中 PSA 濃度は腫瘍の大きさと相関関係が認められた。また血中 PSA 濃度に依存して顎下腺組織内の PSA 濃度も上昇した。唾液中 PSA についても明らかな濃度の増加が認められた。

ヒト前立腺癌患者では、血中 PSA 高値群と低値群の唾液 PSA 濃度に有意差が認められた。また、血中 PSA 高値群では、血中 PSA 濃度と唾液 PSA 濃度には相関関係が認められた。

さらに、ヒト 3 大唾液腺には PSA mRNA は検出されなかった。

[まとめ]

マウスによる実験において、腫瘍産生性の PSA は血液から唾液腺に移行し、最終的に唾液中にも分泌されることが明らかになった。また、血中濃度の増加に依存して唾液腺 PSA 濃度が増加することが明らかになった。

ヒト唾液腺では PSA は mRNA レベルで産生が認めない事から、唾液中に検出された PSA は血液からの移行である事が考えられた。また、転移や再燃の指標である PSA 値 2.5ng/mL 以上の患者群で、血中 PSA 濃度と唾液 PSA 濃度の統計学的に相関が得られた。

唾液採取は血液より採取がしやすく、がん検診に唾液検査を応用することは検診受診率の向上に貢献することが考えられる。

本研究では、唾液 PSA 検査が前立腺癌のスクリーニングとして有用である可能性が示唆された。

唾液タンパクの発現量と術後感染発症リスクとの関連性

神奈川歯科大学口腔病理学非常勤講師

東海大学医学部口腔外科学

森 裕介

口腔感染症のリスクファクターを病態生理的に解析するという観点から、宿主要因としての唾液腺機能に着目した。唾液中には40～50種類の唾液タンパクが含まれているが、これらの内のいくつかの唾液タンパク群は抗菌作用を有し、細菌叢の形成や病原体の進入を阻止する機能をもっている。したがって、唾液腺機能の低下は唾液分泌量の低下を招き、口腔感染症のリスクファクターとなる可能性がある。今回われわれは、唾液腺機能を病理組織学的に解析し、唾液腺機能の低下が口腔癌手術における術後感染（術後肺炎および手術部位感染）のリスクファクターになるかを検討した。対象症例は口腔癌で腫瘍切除術、頸部郭清術、再建術を施行された18症例で、内訳は術後肺炎を起こした6症例、手術部位感染を起こした6症例、感染を起こさなかった6症例である。唾液腺機能は頸部郭清術によって切除された顎下腺組織のHE所見（線維化や脂肪変性の程度）と、免疫染色における唾液タンパクの発現量で評価した。調査した唾液タンパクは3種類で、ラクトフェリン、リゾチーム、アミラーゼである。ラクトフェリンとリゾチームは抗菌作用を有する代表的な唾液タンパクであり、消化酵素として知られるアミラーゼも、ある種の口腔細菌と特異的に作用し、細菌が歯や体表面に接着する性質を調節する働きを有している可能性が報告されている。これらの唾液タンパクの発現量と術後感染の発症リスクにどのような関連性があるかを中心に報告する。

「臨床実感からエビデンスは生まれる？」

神奈川歯科大学口腔病理学非常勤講師

たかぎ歯科医院 院長

高木亮

我々は常に一つとして同じ口腔内はありません。口腔内の環境も唾液の性質においてもかなり違いがあります。そういった環境の中で生体と調和のとれた材料を選択し治療することでも口腔内環境を変化させ予防的段階へもっていけるのではないかと日々考えています。そういった「なぜだろう？ 不思議だ もっと知りたい」という好奇心からエビデンスは生まれるのではないかと思います。そのロマンを是非一緒に研究室の先生方に協力していただき研究したいと思います。このようなテーマで簡単に写真二枚程でお話したいと思います。

参加者

槻木恵一
猿田樹理
近藤裕介
東雅啓
林隆司
杉山弘起
松木千沙
飯田倫太郎
藤野和弘
山本裕子
鎌田要平
佐藤允俊
椎木直人
堀真由美
森裕介
高木亮
前谷崇志
福間健史
浜野弘規
本橋宏美
小松知子
李昌一

(敬称略順不同)