

第134回 岐阜歯科学会例会

と き 平成12年10月21日 (土) 午後1時より
 ところ 朝日大学1号館3階 第1大講義室

一般講演

1. 臨床的および免疫組織化学的検索による unicystic ameloblastoma の生物性状の検討

赤坂 壽彦 (朝日大・歯・口腔病理)

<目的>

ameloblastomaの1つであるunicystic ameloblastoma(UA)は、より若年者に発症し、侵襲性が低く再発はほとんどない等の点において、plexiform typeやfollicular typeのような通常型エナメル上皮腫(CA)と異なっていることはよく知られている。このようなUAとCAの臨床的性状の差異は両腫瘍の実質細胞の生物学的性状の違いに起因するものと考えられる。そこで今回、この点を明らかにすることを目的として、免疫組織化学的検索によって、3種のマーカー発現の対比観察を行った。

<材料と方法>

40例のameloblastomaをUAとCAに類別し、それぞれの臨床的調査を主訴、来院時年齢、性差、発症部位、X線診査および経過の6項目を対象として行うと同時に、PCNA(proliferating cell nuclear antigen)および接着性タンパクであると同時に腫瘍発生にも関係しているE-cadherinと β -cateninの発現を免疫組織化学的に検討した。なお、免疫組織化学的検索の対照として、胎生13日齢から生後2日に至るマウス歯胚の染色性をも併せて観察した。

<結果>

組織型類別では、UAは15例、CAは25例であった。これら各症例の臨床的調査の結果、UAとCA間において、主訴、来院時年齢、経過と予後に違いがみられ、性差、発症部位、X線所見には違いは認められなかった。主訴については、CAでは患部腫大の他に疼痛や口唇麻痺を訴える例(7例)があったのに対し、UAはすべて腫大のみを訴えた。来院時年齢は、例外的高齢者を除くとUAが27.5歳、CAが31.5歳でUAに低く、また、経過と予後では、CAにのみ再発例(7例)があった。

次に、免疫組織化学的検索の対照としたマウス歯胚では、胎生13日齢の蕾状期歯胚上皮にはいずれのマーカーも認められなく、同14日齢の帽状期歯胚上皮にPCNAのみ発現があった。同14.5日齢から生後0日齢の一連のベル状期、生後1日齢の象牙質形成期および生後2日齢のエナメル質形成期の歯胚上皮にPCNAとともに、E-cadherinと β -cateninが発現した。しかし、E-cadherinの発現細胞数はいずれの時期でも少なく、これに対して β -cateninの発現は多数の細胞にわたる

傾向にあった。

さらに、CAとUAにおいては、前者ではPCNAの発現が極めて多く、E-cadherinは極めて少なく、 β -cateninは中等度の細胞数が発現を示し、UAではPCNAとE-cadherin発現は少なかったが、 β -cateninが極めて多いという両腫瘍において相反する所見を呈した。

さらに、マウス歯胚上皮およびCAとUAにおいて、PCNA発現細胞と β -cateninの発現細胞は多くの場合、一致しないという特徴も認めた。

<考察と結論>

β -cateninはE-cadherinと結合することによって細胞接着、およびこれを通じてmorphogenesisに関わっているだけでなく、さらに腫瘍抑制遺伝子の調節物質として腫瘍発生にも関係している。今回のCAとUAに共通してみられたPCNAと β -cateninの拮抗的な結果は、組織侵襲性を中心として種々の違いのある両腫瘍間の生物学的性状の差の1つにPCNAの発現から窺うことのできる細胞増殖性の違いが大いに関係していることが明らかであり、しかも β -catenin発現がPCNA発現を抑制していることが窺え、ひいてはこれら発現物質の有無と程度がCAとUAの生物学的性状の差異につながることを示唆された。

(学位請求論文)

2. ヒト口腔スピロヘータ *Treponema medium* の細菌共凝集能およびPCR法による歯垢内検出

呉城 英俊 (朝日大・歯・口腔細菌)

<目的>

成人性歯周炎患者の口腔から分離培養した中型スピロヘータである *Treponema medium* の病原性の一端を明らかにするために歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* との共凝集現象について各種因子の影響、両菌種の共凝集因子の化学的性状ならびにその局在について形態学および免疫学的手法により調べた。また、*T. medium* の16S rRNA遺伝子の超変異領域と相補結合するプローブを用いて、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法による歯垢中の口腔スピロヘータの検出について検討した。

<材料および方法>

1. 供試細菌として、*T. medium* ATCC 700293, *Treponema denticola* 2菌株, *T. socranskii* 2菌株, *T. phagedenis* 2菌株, *T. pallidum*, *T. vincentii*, *P. gingivalis* 8菌株, *Prevotella intermedia* *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nu-*

cleatum, 口腔レンサ球菌 5 菌種, 大腸菌および *Staphylococcus aureus* を含む 8 属 17 種を用いた。各菌種を所定の液体培地に接種し, 嫌気的あるいは好気性条件下で培養したものをそれぞれ供試した。

2. 共凝集の測定法は, Grenierの方法に準じた。なお, 共凝集におよぼす各種因子の影響を調べるために糖類, アミノ酸あるいはロイペプチンを共凝集測定系に添加した。
3. *P. gingivalis* 線毛は, Londonの方法に準じて調製した。
4. 光学および電子顕微鏡により細菌の形態学的観察を実施した。
5. 菌体表層成分に対するウサギ抗血清を作出した。
6. SDS-PAGEは, Laemmliの方法に準じた。
7. イムノブロット解析は, Towbinらの方法に準じた。
8. 歯肉縁下歯垢は, 成人性歯周炎患者の歯周ポケットから採取した。
9. DNA抽出・精製は, GFX™血液DNA精製キットを用いて実施し, PCR増幅は自動サーマルサイクラーにより行なった。
10. サザンブロット分析は, PCR産物を標識DNAプローブと反応させた後, 発光検出キットで処理し反応物を検出した。
11. PCR法による菌数算定は, NIH画像解析ソフトを用いてDNA染色像の面積や強度に相当する菌数を求めた。

<結果および考察>

1. *T. medium* と *P. gingivalis* との共凝集反応は, *P. gingivalis* 線毛保有株において観察され, 同菌体を熱処理すると反応は消失した。また, 同共凝集反応は, *P. gingivalis* 菌体と同線毛に対するウサギ抗血清, アルギニン, リジンおよびロイペプチンにより阻害された。
2. イムノブロット解析により, *T. medium* 外膜の耐熱性37kDa蛋白質が *P. gingivalis* 線毛と結合することを明らかにした。
3. *T. medium* の16S rRNA遺伝子の塩基配列にもとづくプライマーを用いたPCR法により, 10~100個の細菌数の検出が可能であった。
4. 供試した17菌種のなかで *T. medium* プライマーを用いたPCR法で陽性反応を示したものは *T. medium* と *T. vincentii* であった。

<結論>

T. medium 菌体表層の37kDa蛋白質は, 歯周病原性細菌 *P. gingivalis* 線毛を介して特異的に結合することにより共凝集現象を惹起することが推測され, 細菌の口腔内定着や歯肉縁下歯垢形成に関与していることが考えられる。また, 特異的プライマーを用いた歯肉縁下歯垢中の *T. medium* を高感度に検出するPCR法は, 臨床応用への可能性が示唆される。(学位請求論文)

3. 磁性アタッチメントが生体に及ぼす影響

松木 光洋 (朝日大・歯・大学院・歯科補綴)

近年, 歯科補綴領域において磁性アタッチメントが義歯の維持装置として用いられている。しかし, 磁場の作用は物理学的には定量的に説明できるとしても, 生体に及ぼす影響は今なお不明な点が多いままである。そこで実験1として磁性アタッチメントが義歯の維持装置として用いられた場合, もっとも近接するヒト歯肉上皮細胞に対する磁場の影響について, 細胞の培養および細胞からのサイトカイン産生について検討をおこなった。一方, 磁石は健康機器として用いられ, 生体の血流を増加させるといわれている。そこで血流測定であるが, 従来の機器は組織に測定素子を接触させる必要があった。しかし接触時の圧により血流が変化するなど, 測定値に正確性が期せなかった。最近非接触型血流測定器が発売されたので, 実験2としてその使用方法についての基礎的データを得た。実験3として磁性アタッチメントのヒト口蓋粘膜の血流に及ぼす影響を, 実験2の結果を基に測定し検討をおこなった。

実験1 磁性アタッチメントの歯肉上皮細胞に及ぼす影響

ヒト歯肉上皮細胞に遺伝子を導入した継代培養可能な細胞株を用い, 磁性アタッチメントによるディッシュへの定着および増殖に及ぼす影響, ならびに炎症性サイトカインの一つであるinterleukin-8 (IL-8) の産生量の測定をおこなった。その結果, 磁性アタッチメントの磁場によるヒト歯肉上皮細胞の定着および増殖に及ぼす影響はみられなかった。また炎症性サイトカインであるIL-8の産生誘導活性は磁場を与えないときとほぼ同じ値を示した。

実験2 非接触型レーザー血流計による歯肉組織の血流測定

非接触型レーザー血流計 (ALF21Nb, ADVANCE社製) の操作方法について, 基礎的データを得るために①プローブと組織面との距離, ②組織面に対するプローブの角度, ③測定値の再現性, ④温度変化による影響, のそれぞれについて血流を測定し検討をおこなった。その結果, 測定方法は測定面とプローブの距離を3mmとして角度は90°にするのが最適と思われた。また測定時期が変わってもほとんど測定値に影響がないことから測定値に再現性があること, 組織に温度変化を与えたときの血流量変化を鋭敏に記録できることなどから, 本血流計で組織の血流を正確に測定できることが可能である事がわかった。

実験3 磁性アタッチメントが口蓋粘膜血流に及ぼす影響

磁性アタッチメント単体および磁性アタッチメント複合体を貼付したときの, 口蓋粘膜周囲血流を測定し, 磁場による血流に及ぼす影響を測定し検討をおこなった。その結果磁性アタッチメント単体では, 貼付する