

*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. イムノプロット解析は, 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. サザンプロット分析は, 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. イムノプロット解析により, *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

前と比べ血流の増加がわずかに見られたが、磁性アタッチメント複合体では血流に変化は認められなかった。

以上の結果を要約して次の結論を得た。

1. 磁性アタッチメントの磁場によるヒト歯肉上皮細胞の増殖に及ぼす影響はないものと考えられた。
2. ヒト歯肉上皮細胞のIL-8産生についても、磁性アタッチメントによる影響はないと考えられた。
3. 非接触型レーザー血流計で組織の血流を測定できることがわかった。
4. 磁性アタッチメントの磁場による影響では血流が若干増加すると考えられた。
5. 磁性アタッチメント複合体の場合は血流に変化が認められなかった。
6. 以上の結果より、現在市販されている磁性アタッチメント程度の強さの磁場では、生体に影響はないものと考えられた。(学位請求論文)

#### 4. ラットエナメル質形成におけるアポトーシスとその調節因子の局在性

近藤 俊 (朝日大・歯・大学院・小児歯科)

##### <目的>

アポトーシスは遺伝子により制御された細胞死であり、組織形成、生体の恒常性を維持するために重要な機能を果たしている。歯の形成過程におけるアポトーシスは、上皮肥厚部、歯堤、エナメル結節部、分泌期エナメル芽細胞から成熟期への移行期エナメル芽細胞と、成熟期エナメル芽細胞、さらに萌出中の縮合エナメル上皮に認められている。しかし、その調節機構については明らかではない。Bcl-2ファミリータンパクには、促進因子としてのBaxと制御因子としてのBcl-2があり、それらの量比がアポトーシス調節に関わることが報告されてきている。また、アポトーシス誘導シグナルとしてFasが注目され、他の細胞組織において多くの報告がある。Fasのアポトーシスシグナルは、Fasリガンド(L)がFasレセプター(R)に結合後、FADD(Fas death domain)が活性化され、Caspase-8を活性化する経路と、さらにBidを活性化する経路とがあり、それらがアポトーシスを誘導する。また、それらをBcl-2が制御すると報告されている。

そこで、本研究では、エナメル質形成におけるアポトーシスとその制御機構を知るため、各発育段階の中でも、エナメル芽細胞の未分化期・分化期・分泌期・移行期・成熟期に焦点を絞り、アポトーシスの検出と、BaxとBcl-2の局在性、Fasからのアポトーシスシグナルの局在性を免疫組織化学的に検討を行った。

##### <材料および方法>

実験には、生後5, 7, 10日齢のS.D.系ラットを使用した。アポトーシス検出には、頭部矢状断のパラフィン切片を作製し、プロテナーゼKにて処理後、TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end label-

ing)法により3,3'-ジアミノベンチジン(DAB)染色とメチルグリーン染色を行い観察した。免疫組織化学法は、頭部矢状断の凍結切片(厚さ約18 $\mu$ m)を使用しABC法により行った。一次抗体にはBax, Bcl-2, Fas-L, Fas-R, FADD, Caspase-8, Bidの各ポリクロナール抗体を反応後、それぞれの二次抗体を反応させ、DAB染色を行い観察した。

##### <結果および考察>

TUNEL法によりアポトーシス検出は、7, 10日齢臼歯の分泌後期・移行期エナメル芽細胞と隣接する中間層細胞に見られ、成熟期エナメル芽細胞にも若干認められた。Baxは7, 10日齢臼歯の分泌後期・移行期エナメル芽細胞および隣接する中間層細胞に最も強い局在を示した。それに対しBcl-2は未分化期、分化期および成熟期初期エナメル芽細胞に強い局在を示し、7, 10日齢の移行期での局在は最も弱くダウンレギュレーションを示した。FasからのアポトーシスシグナルはCaspase-8までが、7日齢臼歯の分泌後期・移行期エナメル芽細胞近心端と隣接する中間層細胞に最も強い局在を示した。10日齢臼歯では、FADDの局在は弱く、Bidが移行期エナメル芽細胞に最も強い局在を認めた。エナメル芽細胞の増殖期(未分化期)、分化期、さらに成熟期ではBcl-2の発現が強く、アポトーシスの認められた分泌後期・移行期エナメル芽細胞ではBaxとBcl-2の発現の強さは逆転していたことから、これらのタンパクはアポトーシスの調節とエナメル質形成過程における重要な働きを持つことが示唆された。Fasのアポトーシスシグナルはcaspase-8までが7日齢臼歯の発育段階に著明に働くことが推察された。また、Bidは10日齢臼歯の移行期に最も強い局在を示したことから、この時期に著明に働くことが推察された。

##### <結論>

- 1) アポトーシスはエナメル質形成において重要な役割をすることが明らかとなった。
- 2) BaxとBcl-2それぞれの発現の変化が、エナメル芽細胞の増殖・分化期、機能を持つ時期、アポトーシスの起こる時期に関連して認められたことから、これらのタンパクはエナメル質形成において重要な役割を持つことが示唆された。
- 3) エナメル質形成におけるアポトーシスは、Fasを介するアポトーシス誘導シグナルに関わることが示唆された。(学位請求論文)

#### 5. Polyacid Resin Composite(Compomer)の色彩安定性の検討

李 月 (朝日大・歯・大学院・歯科保存)

##### <目的>

注目を集めている新素材コンポマーはフッ素を徐放し、機械的強度、操作性、審美性等がガラスアイオノマーより優れており、コンポジットレジン同様、歯冠