

鎖DNAを抽出し、さらにPCRにて増幅後、塩基配列を決定した。RNA抽出時にホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動を行いDNAのコンタミのないことを確認した。また、RT-PCRに用いたプライマーの設計にあたり、H-rasの変異の部位としてexon1codon12, 13およびexon 2 codon61が知られているが、exon1codon 12, 13を含む領域を特異的に増幅するように設計した。

<結果>

対照群ではスポンジ周囲に上皮は認めず一層の結合組織が存在し、その周囲は正常組織であった。DMBA埋入後3週ではスポンジ周囲の組織が破壊され、周囲結合組織中に上皮細胞が散在性に認められた。4週後ではスポンジ周囲に単層の扁平上皮の形成を認め、5週後では重層扁平上皮となったが異形成は認めなかった。6週後では重層扁平上皮が肥厚し、口腔粘膜の白板症と類似した。9週後では重層扁平上皮はさらに肥厚、角化し、異形成がみられ、上皮内癌および初期癌を認めた。12週後ではすべての症例において扁平上皮癌を認めた。

H-rasの変異はDMBA埋入後3および4週では認めなかった。5週後では7%、6週後では33%、9週後では87%および12週後では100%に変異を認めた。解析の結果、H-rasのexon1, codon12のGGAがGAAに変化していた。

<考察>

多段階発癌過程として、DNAの不完全な修復により損傷が固定化するイニシエーション期、この変化を受けた細胞が前癌病変となるプロモーション期およびそれらが増殖し癌を形成するプログレッション期がある。本実験ではDMBA埋入後3週でスポンジ周囲の結合組織中に上皮細胞の散在を認めた時期をイニシエーション期、6週後のスポンジ周囲に上皮の肥厚を認めるが異形成のみられない時期をプロモーション期および9週以降の癌が認められる時期をプログレッション期であると考えた。DMBA埋入後3週のイニシエーション期では対照群でみられなかった散在性の上皮細胞を認めたが、H-rasの変異は確認できなかったことより、同時期にはH-rasの変異の関与はないものと考えられた。6週後のプロモーション期で異形成のみられない上皮の肥厚を認めたが、形態的变化に先行してH-rasが変異することにより悪性化に関与することが示唆された。9週後のプログレッション期にH-rasの変異が高頻度で認められたことより、癌の増殖に関与していると考えられた。遺伝子の変異が段階的に増加していく結果となったが、これは組織学的変化によりH-rasの変異が発現するためと考えた。この結果より、DMBA埋入後6週で白板症類似の組織像が認められ、その組織学的変化に先行してH-rasの変異が認められることに注目した。白板症はWHOにより「摩擦によって除去できない白斑で、他の診断可能な疾患に分類で

きないもの。」と定義されている。広義の意味で白板症といわれるものの悪性転化率は3~6%という報告があり、また組織学的に白板症と診断される狭義の意味では36%であるという報告があった。それを本実験における5週および6週で認めた組織像とそれぞれ対比させると、臨床における白板症の悪性転化率と本実験H-rasの変異の発現率との近似を認めた。このことより白板症を前癌病変として発癌過程における重要な指標と考えた。また、全ての白板症が悪性化するわけではないので、そこに他の癌遺伝子抑制遺伝子が関与するものと考えた。H-rasの変異が週ごとに段階的に増加していく結果となったが、これはH-rasが発癌過程において先に述べたようにイニシエーション期には関与せず、同時期における組織学的変化により変異が発現してくる遺伝子であると考えた。

<結論>

H-rasの変異はラット顎下腺DMBA誘発癌において悪性化および増殖に関与することが示唆された。

(学位請求論文)

3. *Porphyromonas gingivalis* 線毛に対するヒト歯肉上皮細胞の認識・活性化機構の解析

大山 吉徳 (朝日大・歯・歯周病)

<目的>

歯周組織の構成細胞の一つである上皮細胞は、歯肉縁下プラーク中の病原細菌による歯周病の発症や進行に対して、防御的機能を発揮しているものと考えられる。また、歯肉上皮細胞は外来刺激に対するセンサーとして働き、その情報を上皮下の細胞へ伝達することが知られている。近年、宿主の自然免疫における微生物の認識に関わる受容体として、Toll-like receptor (TLR)の存在が注目されている。現在までに哺乳類において12種類のTLRが同定され、これらTLRファミリーはそれぞれ異なる菌体成分を認識することが明らかにされている。すなわち、TLR2は細菌細胞壁ペプチドグリカンやリポタンパク質、TLR4はグラム陰性菌外膜のリポ多糖体(lipopolysaccharide; LPS)、TLR5は鞭毛、TLR9は細菌由来非メチル化CpG DNAの認識にそれぞれ関与することが報告されている。本研究では、主たる歯周病原細菌の一つと目される*Porphyromonas gingivalis*の菌体周囲に分布する線維状構造体で、細菌の初期感染において宿主細胞への付着に関与する病原因子の一つと考えられる線毛および同部分活性ペプチドに対するヒト歯肉上皮細胞の認識ならびにその活性化機構について検討した。

<材料および方法>

1. ヒト歯肉組織は、本研究の主旨を理解し実験参加に同意した本学附属病院歯周病科外来を来院した患者より得た。得られた歯肉組織を酵素処理し、単離した上皮細胞にPapillomavirus 16 E6/E7 geneをリ

ン酸カルシウム法により導入し、ヒト歯肉上皮細胞株(HGEC)を樹立した。

2. HGECにおける全ケラチンおよびインボルクリンの発現は、免疫組織化学染色法により検討した。また、TLR2, TLR4およびCD14の発現は、RT-PCRならびにフローサイトメトリーにより解析した。
3. 嫌気的条件下で培養した*P. gingivalis* 381株菌体から機械的に線毛を剥離し、硫安塩析およびHPLCにより精製した。線毛のサブユニット蛋白であるフィンプリリンのアミノ酸配列を模して合成した部分ペプチドのなかで、生物活性の機能領域の一つとして報告されているAla-Leu-Thr-Thr-Glu(ALTTE)を合成した。
4. *Staphylococcus aureus* ペプチドグリカン(PG), ムラミルジペプチド(MDP), 大腸菌型合成リピドA(化合物506), 遊離型CD14およびリポ多糖体結合蛋白(LBP)を供試した。
5. IL-8産生は、ELISA法により測定した。
6. NF- κ B活性は、ルシフェラーゼアッセイにより検討した。

<結果および考察>

1. HGECは明確な全ケラチンの発現を示し、培地中のカルシウム濃度を上昇させることにより細胞形態が不明瞭となり、増殖が停止するとともにインボルクリンの発現が誘導された。
2. HGECは、TLR2陽性、TLR4およびCD14陰性であった。
3. HGECは、*P. gingivalis* 線毛、同部分活性ペプチドALTTE, *S. aureus* PGおよびMDPにより明確なIL-8産生ならびにNF- κ B誘導活性を示したが、化合物506ではこれら活性はみられなかった。
4. 供試した標品によるHGECからのIL-8産生は、ウシ胎児血清(FBS)添加により増強した。また、CD14およびLBP添加においても同産生は増強した。
5. マウス抗ヒトTLR2モノクローナル抗体の添加により、供試した標品によるHGECからのIL-8産生は抑制された。以上の結果から、*P. gingivalis* の病原因子である線毛のHGECにおける認識ならびに活性化機構の一端を明らかにした。

<結論>

P. gingivalis 線毛やその部分活性ペプチドは、*S. aureus* PGやその最小有効構造単位であるMDPと同様にTLR2を介して歯肉上皮細胞を活性化し、炎症性サイトカインであるIL-8の産出を誘導した。また、同活性は血清中に含まれるCD14-LBP複合体により増強されることが示唆された。なお、内毒素性LPSの活性中心であるリピドAによる歯肉上皮細胞の不応答性は、TLR4発現を欠いているためと考えられる。細菌やその病原因子の宿主細胞における認識機構やその活性化について明らかにすることは、歯周病の発症やその進

行における作用機序の解明の一助になるものと考えられる。
(学位請求論文)

4. 歯肉溝滲出液硫酸化グリコサミノグリカンによる歯槽骨吸収活性の評価

加藤 牧子 (朝日大・歯・大学院・歯周病)

<目的>

歯肉溝滲出液(滲出液)の硫酸化グリコサミノグリカン(S-GAG)は深部歯周組織、特に歯槽骨の代謝の状態を示すマーカーとしての可能性が示唆されている。S-GAGを特異的に染色し測定する簡便な方法が開発され、これを滲出液に応用して、S-GAGと骨代謝との関連について検討されているが、骨代謝マーカーとして確立されるまでには至っていない。

近年、骨コラーゲンに特有の架橋物質であるピリジノリン、デオキシピリジノリンのELISA法による微量測定が可能になり、骨吸収マーカーとして骨粗鬆症などの骨疾患の診断に用いられている。

本研究は同時期に同部位から滲出液サンプルを採取してピリジノリンとS-GAGを測定し、S-GAGの歯槽骨吸収活性マーカーとしての評価を行うことを目的とした。

<被験対象>

実験1. 無作為に選んだ学生17名(男性12名, 女性5名, 平均年齢 24.1 ± 1.9 歳), 前歯あるいは小臼歯部頰側(健常5部位, 歯肉炎29部位)の滲出液。

実験2. 歯肉炎と診断された学生10名(男性6名, 女性4名, 平均年齢 21.6 ± 1.6 歳, 歯肉炎10部位)の滲出液。

実験3. 村上記念病院整形外科を受診した慢性関節リウマチ患者5名(男性2名, 女性3名, 平均年齢 69.6 ± 10.8 歳), 変形性関節症の患者11名(女性のみ, 67.8 ± 8.7 歳)の関節液。

1) 歯肉炎と診断された本学学生12名(男性10名, 女性2名, 平均年齢 23.7 ± 2.8 歳)の滲出液。

2) 本学附属病院歯周病科を受診した成人性歯周炎患者11名(男性5名, 女性6名, 平均年齢 53.6 ± 9.1 歳), 急性歯周膿瘍と診断された5名(男性2名, 女性3名, 平均年齢 55.2 ± 6.6 歳)の滲出液。

歯肉炎の判定はGI \geq 1, PD \leq 3mm, 歯周炎の判定はGI \geq 1, PD \geq 4mmでアタッチメントロスがあり, X線写真上にて明らかな骨吸収の認められる部位とし, 急性症状を呈している部位を急性歯周膿瘍とした。

<方法>

S-GAG測定方法: 簡易微量測定法に従い, 簡易防湿された採取部位のポケット内にセルロースアセテート膜ストリップスを静かに挿入して, 30秒間静置し, 採取した滲出液をサンプルとした。染色液(0.4M グアニジン塩酸, 0.05M 塩化マグネシウム, 0.02M 硫酸,