

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- $\kappa$ 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- $\kappa$ 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 $24.1 \pm 1.9$ 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 $21.6 \pm 1.6$ 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 $69.6 \pm 10.8$ 歳), 変形性関節症の患者11名(女性のみ,  $67.8 \pm 8.7$ 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 $23.7 \pm 2.8$ 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 $53.6 \pm 9.1$ 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 $55.2 \pm 6.6$ 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,

0.25% Triton X-100を含むpH1.5に調整した0.2%アルシアンブルー溶液)に10分間浸した後、洗浄液(染色液からアルシアンブルーを除いた溶液)に1時間浸し、自然乾燥させたあと、島津2波長フライングスポットスキヤニングデンストメーターCS9300を走査させ、デンストグラムのピーク面積値を算出し、スキヤナー値をもとに標準曲線からS-GAG値に換算した。

骨密度測定：再現性をもたせるため規格X線写真撮影用ホルダーを作製した。ステント製作し、アルミニウムステップ、1mm正方のグリッドを使用して撮影を行った。現像後、画像入力機器にてコンピューターに読み込み、画像解析ソフトにて初回のX線写真をもとに相互のずれを修正した後、X線写真に写し込んだアルミニウムステップをもとに画像の濃度を補正し、測定エリアを設定しグレースケール値を求めた。経時的に濃度変動値を算出し、歯槽骨頂の吸収の有無を調べた。

ピリジノリン測定：採取部位を簡易防湿後、Micro Capillary Tubeにて滲出液を採取した後、ELISA法を用いたキットにて吸光度を測定し、標準曲線よりピリジノリン値を算出した。

#### <結果>

実験1. S-GAG値は健常部位では低値を示し、ベースライン時にGI2を示す部位のS-GAG値は著明に高値を示した。期間において同一人でS-GAG測定を計6回行ったが、GIに変化はあったものの同部位で大差は認められなかった。

実験2. 歯肉炎においてS-GAG値とX線写真による骨密度との関連を経時的に検討した結果、S-GAGと関連づけることは出来なかった。

実験3. 骨吸収マーカーとして認知されているピリジノリンを滲出液で測定した結果、急性歯周膿瘍>歯周炎>歯肉炎の順で高値を示した。同時に採取した滲出液のS-GAG値はピリジノリン値と有意の相関を示した。ピリジノリン4.0n mol/L, S-GAG40ngをカットオフ値に設定した際のS-GAGの骨吸収活性としての信頼性は鋭敏度78.9%, 特異度77.8%の高い数値が得られた。

#### <考察とまとめ>

本研究において滲出液S-GAGが高い確率で歯槽骨吸収活性を示す指標になる事が判明した。簡易微量測定法は分析精度、特異性が高く、安価で簡便であるという利点をもっており、臨床応用には有益であると思われる。歯肉炎においてX線写真で判定できない歯槽骨吸収活性が認められたことは、歯肉炎から歯周炎への移行を判断する有力な材料となるものと考えられる。

(学位請求論文)

## 5. ニフェジピン投与ラットの歯肉増殖への細胞外マトリックスの関与

中條 葉子 (朝日大・歯・大学院・歯周病)

### <目的>

本態性高血圧症の治療薬であるニフェジピン(NF)の服用によって歯肉増殖症が発現することは知られている。その発症メカニズムについては多くの研究が行われ、種々の仮説が提唱されている。グリコサミノグリカン(GAG)がコラーゲン増殖に関与するという説もその一つであるが、十分に解明されるまでには至っていない。そこで本研究は増殖歯肉中の細胞外マトリックス成分であるGAGとコラーゲンに着目して、両者を分析・比較し、歯肉増殖の実態を明らかにすることを目的に行った。

### <材料および方法>

実験動物として生後20日齢のフィッシャー系雄性ラットを用いた。対照群は粉末飼料を自由摂取させ、実験NF250群(NF250群)は粉末飼料1kgあたりニフェジピン粉末250mgを、実験群(NF500群)は粉末飼料1kgあたりニフェジピン粉末500mgを添加し、自由摂取させ歯肉増殖を惹起させた。

GAGの定性・定量：飼育期間終了後、各群の歯肉を採取し、常法によりGAGを抽出した。抽出したGAGはセルロースアセテート膜一次元電気泳動法(0.3M酢酸カドミウム pH4.1)と2波長クロマトスキヤナーを用いて定性、定量を行った。

GAGならびにコラーゲンを含むタンパクの代謝実験： $^3\text{H}$ -グルコサミン及び $^3\text{H}$ -プロリンをGAG及びコラーゲンを含むタンパクの指標として、*in vitro*と*in vivo*の2種類の取り込み実験を行った。*in vitro*：飼育終了後、各群の歯肉を採取し、各アイソトープを添加した培養液中にて4時間培養し、歯肉に取り込まれた放射能を測定した。*in vivo*：飼育終了後、各群のラットに各アイソトープを腹腔内投与し、6時間後各群の歯肉を採取し、歯肉に取り込まれた放射能を測定した。

同時に、一部歯肉試料を用い、常法に従い、グリコールメタクリレート(GMA)樹脂包埋し、切片を作製した。dipping法により乳剤を密着させ、露出後、現像、定着、染色しオートラジオグラフィによる検索を行った。

また、歯肉組織中のI型コラーゲン線維の増生を検討するため、一次抗体として抗Type Iコラーゲン抗体を、二次抗体からはヒストファイブキットを用いビオチン-ストレプトアビジン法により免疫組織染色を行った。

### <結果>

GAGの定性・定量：ヒアルロン酸(HA)、ヘパラン硫酸(HS)、デルマタン硫酸(DS)、コンドロイチン硫酸(CS)に相当する画分を認めた。各GAG画分量及び総