

Mo含有量の増加とともに、孔食発生の臨界電位である孔食電位の値は直線的に高くなり、自然浸漬状態における金属イオンの溶出量は減少した。これらの基礎データに基づいて、磁性アタッチメント用フェライト系ステンレス鋼のCr・Mo含有量は、磁気特性力を優先させる場合においても最低24%は必要であり、高い耐食性が要求される場合には、30%以上あることが望ましいという結論を得た。また、Cr・Mo含有量が30%以上のステンレス鋼では、800°C以上に加熱されると鋭敏化して粒界腐食を起こしやすくなるため、鋳接時の温度管理を精密に行う必要があることを明らかにした。さらに、ステンレス鋼製のキーパーと貴金属合金製の根面板との間で生じる異種金属接触腐食は、ガルバニック電流の測定から、使用

上大きな問題とならないことが分かった。ヨークのシールドリングに使用するオーステナイト系ステンレス鋼に関しては、アレルギー性の高いNiを含まず、耐局部腐食性の高い高窒素ステンレス鋼が優れていることを見出した。

以上、ステンレス鋼の成分・組成と磁気特性ならびに耐食性の関係を定量的に解析し、機能性と耐久性の優れたステンレス鋼の組成を提案した。本研究によって新たな磁性アタッチメントを開発する際の成分・組成の基準が明確になり、歯科医学および補綴学に寄与するところが大であり、歯学博士の学位の授与に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	河合 治 (愛知県)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	乙 第43号
学位授与の日付	平成11年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当 (論文博士)
学位論文題目	加齢に伴う歯肉線維芽細胞応答性の変化 —特にIL-6 およびPGE <sub>2</sub> 産生への影響—
論文審査委員	主査 教授 小鷲 悠典 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 賀来 亨

## 論文内容の要旨

### 【緒 言】

歯周炎は、歯を支持する歯周組織。特に歯槽骨の破壊を特徴とする炎症性疾患である。最も一般的な歯周炎である成人性歯周炎は加齢と共にその罹患率が増加することから、加齢による生体機能の何らかの変化がその発症に関連していると考えられている。

歯周組織に存在する細胞の中でも、歯肉線維芽細胞は歯周細胞の主要な構成成分であるコラーゲン線維を產生し歯周組織の修復・再生に深く関与している。この細胞はリポ多糖(LPS)、サイトカインなどの刺激により、感染に対する生体防御反応において重要な役割を果たすインターロイキン6 (IL-6) を产生すると報告されてい

る。また、このIL-6 产生は細胞自身が产生するPGE<sub>2</sub>を介して調節を受けていることが明らかになっている。Abikoらは、若年者から分離した歯肉線維芽細胞を継代培養して、継代培養による反応性の変化を調べた。彼らは、LPS刺激によるPGE<sub>2</sub>产生は継代培養を重ねると増加することから、*in vitro*での加齢によって歯肉線維芽細胞は一定の刺激に対して過剰にPGE<sub>2</sub>を产生するようになると考察している。しかし、内因性のPGE<sub>2</sub>を介して調節を受けているIL-6 产生が加齢によってどのように変化するかは不明である。そこで本研究では、*in vitro*と*in vivo*での加齢による歯肉線維芽細胞反応性の変化を同時に評価するため、若年者、高年者から分離、継代培養した細胞の反応性の変化を、PGE<sub>2</sub>产生およびIL-6 产生

指標として検討した。

### 【材料および方法】

#### 1. リポ多糖の調製

*A. actinomycetemcomitans* Y4株, *P. gingivalis* 381株を培養し、その凍結乾燥菌体から温フェノール・水法によりリポ多糖を調製した。また *E. coli* 由来のリポ多糖は、市販品を用いた。

#### 2. 齧肉線維芽細胞の調製

北海道医療大学歯学部附属病院を受診した患者の中から若年者11名(16歳から26歳)、高年者12名(53歳から69歳)を被験者として選択した。インフォームドコンセントを得た後、抜歯時に歯肉片を採取し洗浄後、シャーレに静置して歯肉片の周囲に増殖した細胞を分離した(out-growth法)。

分離した細胞をシャーレにて単層を形成するまで培養しそれを初代の細胞とした。実験には、7代継代培養した細胞(7代継代細胞)および14代継代培養した細胞(14代継代細胞)を使用した。

#### 3. 細胞増殖の測定

96穴培養用プレートに50個/ウェルの細胞を播種し10%仔牛血清添加 $\alpha$ -MEM培地にて24時間培養した。その後、無血清培地であるASF301培地に置換し、刺激剤としてリポ多糖(1 $\mu$ g/ml)あるいはIL-1 $\beta$ (100pg/ml)を加えた。これに、10 $\mu$ l/ウェルのAlamar Blue<sup>®</sup>を添加して培養し、570nmにおける吸光度を測定した。

#### 4. PGE<sub>2</sub>量, IL-6量の測定

24穴培養用プレートに $1 \times 10^5$ 個/ウェルの細胞を播種し $\alpha$ -MEM培地にて24時間培養した。その後、ASF301培地に置換し、リポ多糖(1 $\mu$ g/ml)あるいはIL-1 $\beta$ (100pg/ml)を加えて24時間培養した。培養後、培養上清を採取し800×gで15分間遠心した後、その上清について市販の測定キットを用いてPGE<sub>2</sub>量、IL-6量を測定した。

### 【結果】

#### 1. 細胞増殖およびIL-6産生量

若年者群および高年者群の7代継代細胞から、各々4つの細胞を選択した。培養開始3時間後では、いずれの細胞も0.2程度の吸光度を示した。その後、若年者群のコントロール細胞は72時間後には約0.7で、高年者群のコントロール細胞は96時間後には約0.6でプラトーに達した。各群の細胞をLPSあるいはIL-1 $\beta$ で刺激した細胞でも、コントロール細胞と有意な差は認められなかった。

24時間培養後のIL-6産生量は、若年者群、高年者群のコントロール細胞で若年者群; 107pg/ml、高年者群; 70pg/mlで有意ではないが減少した。LPSで刺激した細胞における産生量は、若年者群では有意ではないが減少し、

高年者では有意ではないが増加した。

一方、IL-1 $\beta$ で刺激した細胞における産生量は、若年者群で12ng/ml、高年者群で10ng/mlとLPSで刺激した細胞における産生量の約100倍で、コントロール細胞に比べ有意に高かった。この結果より、以降の実験ではIL-1 $\beta$ で刺激した細胞でのPGE<sub>2</sub>産生量、IL-6産生量を測定した。

#### 2. IL-1 $\beta$ 刺激によるPGE<sub>2</sub>およびIL-6産生量の加齢による変化

##### 1) コントロール細胞によるPGE<sub>2</sub>産生量およびIL-6産生量

若年者群、高年者群ともコントロール細胞では、継代によりPGE<sub>2</sub>産生量は有意ではないが増加傾向が認められた。IL-6産生量は、有意ではないが減少する傾向が認められた。

##### 2) IL-1 $\beta$ 刺激細胞によるPGE<sub>2</sub>産生量およびIL-6産生量

若年者群、高年者群ともPGE<sub>2</sub>量は、継代により有意に減少した。一方、IL-6量は若年者群(44ng/mlから16ng/ml)、高年者群(19ng/mlから16ng/ml)とも継代により有意ではないが減少する傾向が認められた。

##### 3) インドメタシンによるPGE<sub>2</sub>およびIL-6産生量

IL-1 $\beta$ 刺激時に1 $\mu$ Mのインドメタシンを加えてPGE<sub>2</sub>産生量およびIL-6産生量を測定した。PGE<sub>2</sub>量は、若年者群、高年者群とも継代数に関わらず有意に抑制された。また、IL-6量も若年者の細胞では継代数に関わらず有意に抑制された。高年者群の7代継代細胞では有意ではないが減少傾向が認められた。一方、高年者群の14代継代細胞では有意に抑制された。

### 【考察】

IL-6産生を指標として齧肉線維芽細胞の反応性を調べたところ、LPS刺激による作用よりも、LPS刺激によってマクロファージが産生するIL-1 $\beta$ による作用の方がはあるかに大きかった。若年者群の細胞では、継代によってPGE<sub>2</sub>およびIL-6産生が減少し、インドメタシンの添加によってPGE<sub>2</sub>およびIL-6産生が阻害された。この結果より、若年者群の細胞では、IL-1 $\beta$ 刺激によるIL-6産生は細胞自身が産生するPGE<sub>2</sub>によりUp-regulateされている可能性が示唆された。しかし、高年者の7代培養細胞では、インドメタシンの添加によってPGE<sub>2</sub>産生が阻害されたにもかかわらず、そのIL-6産生量が変化しない細胞が一部に認められた。今回の研究の結果から、若年者群の細胞、高年者群の細胞とも、継代によりPGE<sub>2</sub>産生が減少することが明らかになった。IL-1 $\beta$ 刺激によるPGE<sub>2</sub>産生量の継代による低下は、加齢に伴う歯周炎の発症と進行に関連しているかもしれない。

## 学位論文審査の要旨

河合治は本研究において11名の若年者、12名の高年者から採取した歯肉より分離・培養した歯肉線維芽細胞(HGF)を用いて、加齢による細胞応答性の変化をインターロイキン6(IL-6)産生およびプロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)産生を指標として検討した。まず、被験者の歯肉から分離したHGFを7代継代培養した。7代継代細胞をリポ多糖(LPS)あるいはインターロイキン1β(IL-1β)で刺激して細胞増殖の変化およびIL-6産生量の変化を測定した。LPSあるいはIL-1βで刺激しても若年者および高年者とも細胞増殖の速度に大きな変化は認められなかった。また、若年者の方が、細胞数がプラトーに達するまでの時間は短かった。高年者については、LPS刺激群IL-1β刺激群いずれの細胞においても、IL-6産生量は増加したが、IL-1β刺激群の細胞では有意に高い産生量を示した。この結果を踏まえて、刺激剤として細胞応答性の良いIL-1βのみを選択し継代培養によるIL-6およびPGE<sub>2</sub>産生量の変化を検討した。若年者の細胞では継代培養によりPGE<sub>2</sub>、IL-6産生量が減少し、PGE<sub>2</sub>産生阻害剤であるインドメタシン添加によりPGE<sub>2</sub>、IL-6産

生は阻害された。この結果から、若年者の細胞においては細胞自身が産生するPGE<sub>2</sub>によりIL-6産生がUp-regulateされている可能性が示唆された。一方、高年者の細胞ではIL-6産生に関するPGE<sub>2</sub>の関与は、明瞭ではなかった。これは、高年者群の7代継代細胞では、インドメタシン添加によってPGE<sub>2</sub>産生が阻害されたにも関わらずIL-6産生が阻害されない細胞が一部に認められたことによると考えられる。本研究では、IL-1β刺激後のHGFからのPGE<sub>2</sub>産生は継代培養により減少し、高年者では若年者に比べて低い産生量を示したことから、加齢によりPGE<sub>2</sub>産生は低下することが示唆された。しかし、IL-1β刺激後のHGFからのIL-6産生に関しては、細胞毎で調節機構が異なるため、加齢により一定の変化が認められない可能性も考えられた。また、歯周炎の発症と進行における加齢の関係の一端を明らかにすることはできたと考えられた。本研究によって得られた結果は歯周病学や関連諸学科の進歩発展に寄与するところが大であり、審査の結果、本論文は学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	志 手 典 之 (大阪府)
学位の種類	博 士 (歯学)
学位記番号	乙 第44号
学位授与の日付	平成11年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当 (論文博士)
学位論文題目	卵巢摘出成熟ラットにおける下頸骨および胫骨に及ぼす走行運動の影響
論文審査委員	主 査 教 授 矢 嶋 俊 彦 副 査 教 授 武 田 正 子 副 査 教 授 平 井 敏 博

## 論 文 内 容 の 要 旨

### I. 緒 言

閉経後骨粗鬆症は、骨形成・骨吸収とともに亢進する高回転型骨代謝を示すことが知られている。これは閉経に

ともなうエストロゲン欠乏が引き金となり、骨吸収が骨形成を上回り、結果として骨量減少を引き起こす。それに対し、運動による加重負荷や筋収縮は、骨量・骨密度の減少を抑制し、骨粗鬆症を予防する効果があると報告