

氏名・(本籍)	沓澤政幸(北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲第37号
学位授与の日付	平成8年3月22日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当(課程博士)
学位論文題目	歯肉溝滲出液による成人性歯周炎の病勢診断
論文審査委員	主査 教授 小鷲悠典 副査 教授 市田篤郎 副査 教授 賀来亨

## 論文内容の要旨

### I. 目的

歯周疾患の診査診断において、組織中の代謝産物や細胞由来の酵素、サイトカインを含有する歯肉溝滲出液(GCF)の分析は、部位特異的に歯周組織の炎症性破壊が生じる歯周疾患の病態を把握するうえで有用な診査法であると考えられている。本研究は、これまで報告されていなかったGCF中の好中球由来のコラゲナーゼであるMatrix Metalloproteinase-8(MMP-8)の定量と、GCF中のタンパク量、interleukin(IL)-1 $\beta$ 量、Granulocyte macrophage colony-Stimulating factor(GM-CSF)量の定量を行い、臨床診査項目と比較検討した。さらに、GCF中のアミノ酸組成の分析を行って、コラーゲン分解産物の検出を試みた。

### II. 材料および方法

#### 1. 被験者および被験歯

被験者は、本学付属病院保存科を受診し、成人性歯周炎と診断された男性9名、女性6名、計15名(平均年齢50.2歳)の患者と歯周組織健常者、男性4名、女性3名、計7名(平均年齢28.2歳)である。被験部位は上顎前歯部で、GCFは患者群から124部位、健常群から33部位より採取した。

#### 2. 歯肉溝滲出液の採取

GCFの採取はpaper stripを用いた歯肉溝内法で行った。GCFは採取後Periotron Economy®で液量を測定し、-80°Cにて直ちに凍結保存した。

#### 3. 臨床診査項目

GCF量、Gingival index(GI)、Probing depth、Gin-

gival bleeding index(GBI)について測定した。

#### 4. GCF試料の調整

Paper stripを20°CにてpH7.4PBS500 $\mu$ lに浸漬し、約20分間溶出後、遠心分離を行い、その上清をGCF試料とした。

#### 5. タンパク定量

Bradford法のDye-Binding assayに基づいたProtein assayキットを用いた。

#### 6. MMP-8定量

MMP-8はone-step sandwich EIAsystemを用い測定した。

#### 7. IL-1 $\beta$ およびGM-CSF定量

IL-1 $\beta$ 量、GM-CSF量はBIOTRAKサイトカインELISAシステムキットを使用して測定を行った。

#### 8. 統計処理

検定はStudent t-testまたはMann-Whitney U testにて行った。

#### 9. アミノ酸分析

アミノ酸分析は日立社製高速自動アミノ酸分析機8500を用い、20種類のアミノ酸について検索した。

## III. 結果

#### 1. GCF量と臨床診査項目の関係

GCF量はGIおよびGBIの値が増えると増加し、有意差が認められた。また、GCF量はProbing depthとの間にも相関( $r=0.46$ ,  $p<0.01$ )が認められた。

#### 2. GCFのタンパク量と臨床診査項目の関係

GCF量とタンパク量の間には正の相関( $r=0.76$ ,  $P<0.01$ )が認められた。また、GCF中のタンパク量はGI

およびGBIの値が増えると増加し、統計的有意差が認められ、ポケット測定値Probing depthとの間にも相関( $r=0.47$ ,  $P<0.01$ )が認められた。

### 3. GCFのMMP-8量と臨床診査項目の関係

GCF量とMMP-8量の間には正の相関( $r=0.58$ ,  $P<0.01$ )が認められ、GIおよびGBIとも有意性を示した。しかし、Probing depthとの間には有意性は認められなかった。

### 4. GCFのIL-1 $\beta$ 量と臨床診査項目の関係

GCF量とIL-1 $\beta$ 量の間には正の相関( $r=0.92$ ,  $p<0.01$ )が認められた。また、GIおよびGBIの値が増えるとIL-1 $\beta$ 量は有意に増加した。さらにProbing depthとの間にも相関( $r=0.65$ ,  $p<0.01$ )が認められた。

### 5. GCFのGM-CSF量について

GCF中およびヒト血清中のGM-CSF量は検出限界(7.6pg)以下であった。

### 6. GCFのアミノ酸分析

GCFおよびヒト血清アミノ酸組成をRose-diagramにより解析した結果、炎症所見が強い症例では血清に近いパターンが認められ、症状が安定した部位とは異なるパターンを示した。また、すべての部位でヒドロキシプロリン(Hyp)は検出限界(1,000残基中0.001残基)以下であった。

## IV. 考 察

本研究の結果、GCF中のタンパク量はGCF量、GIといった炎症の程度を表すパラメーターと正の相関あるいは有意差が認められた。GCF中のMMP-8およびIL-1 $\beta$ 量は歯周組織の炎症が強い場合は有意に高い値を示した。一方、歯周組織破壊をとらえるProbing depthとは、いずれも相関性が低いか、または認められなかった。

GM-CSFはGCF、ヒト血清中では測定限界(7.6pg)以下であった。このことからGM-CSFはサイトカイン

ネットワークに含まれているものの、GCF中には微量のため検出がむずかしいことが考えられた。

GCF量とGCF中のタンパク濃度は、GCF量の増加とともにやや減少傾向を示した。これにより、GCF量が増加しても一定濃度のタンパクが増加するのではなく、血管の拡張および血流の亢進の結果、血清や組織液が多くなることが考えられた。

GCF中のIL-1 $\beta$ 濃度は、GCF量が増加してもほぼ一定の濃度であった。IL-1 $\beta$ は、組織破壊や創傷治療でも増加することから、GCF中にはIL-1 $\beta$ が炎症の状態にかかわらず、一定の温度で放出されていることが示唆された。

しかし、GCF中のMMP-8濃度は、IL-1 $\beta$ と異なり、GCF量の増加とともに減少したという結果が得られた。すなわち、直接歯周組織破壊に関わると考えられるMMP-8量は必ずしも炎症性滲出量と同様な消長を示さないと考えられた。

本実験の結果より、歯周組織の破壊に関わると考えられるMMP-8量は総量としては必ずしも炎症性滲出液量と同じ増減を示さず、GCF中のMMP-8濃度はGCF量の増加とともに減少したことから、GCF中のMMP-8量は、好中球の遊出と同様にGCF量と独立して増減を示す可能性が推測された。

GCFのアミノ酸分析の結果、歯周疾患罹患部位では、遊離したコラーゲン構成アミノ酸の増加が予想されたが、Hypは検出限界以下であった。これは、歯周組織破壊が極めて短期間に起こり、またHypのクリアランスが速やかに行われ、GCF中の絶対量が少なく検知されなかったことが考えられる。しかし、アミノ酸組成に炎症の違いによる差が認められたことから歯周疾患の病態を特徴づける可能性が示唆された。

本研究から、GCF中のタンパク量、IL-1 $\beta$ 量、MMP-8量の検出およびアミノ酸分析は新たな歯周疾患の診断法として有用であることが示唆された。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

歯周疾患は、急性の歯周組織破壊が生じる活動期と長期間にわたる組織破壊が認められない静止期とが交互に繰り返される部位特異的な炎症性疾患である。部位特異的な歯周組織破壊を把握する局所的指標として、GCFを生化学的に分析する事は、客観的指標として有用であると考えられる。

歯周疾患の組織中には、好中球が多数浸潤しており、様々な酵素、サイトカインが含まれている。また、歯周疾患の組織中では炎症性破壊の過程でコラーゲンの分解が生じており、生体内で生じている事象の情報源と考え

られる酵素、サイトカイン、アミノ酸を分析することは、病態解析を行ううえで非常に興味深い。

以上の点に着目し、本研究はGCFを試料とした歯周疾患の病勢診断が可能であるかどうかを追求するために、MMP-8の定量、IL-1 $\beta$ の定量、GM-CSFの定量を行い、臨床診査データと比較して病態の解析を行った。さらに、歯周組織破壊の中でも大きな位置を占める組織コラーゲンを構成する特有のアミノ酸であるHypの検索とアミノ酸組成についてのRose-diagramによる分析を行った。

研究結果、微量定量が可能であり、歯周疾患の客観的な炎症指標として有用であることが示唆された。しかし、GM-CSF量は測定限界値(7.6pg)以下であった。また、アミノ酸分析を行った結果、コラーゲン構成成分であるHypは検出限界(0.001/1,000残基)以下であったが、アミノ酸をRose-diagram解析したところ、歯周疾患の炎症状態によって特徴がみられた。

本研究から、GCF中のタンパク量、IL-1 $\beta$ 量、MMP-8量の測定およびアミノ酸分析は部位特異性の歯周疾患を把握する歯周疾患診断法として有用であることが示唆された。

以上より、本論文は、歯周治療学の進歩発展に寄与するところが大きく、審査の結果、学位授与に値すると判定した。

氏名・(本籍)	佐藤 恭代 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	甲 第38号
学位授与の日付	平成8年3月22日
学位授与の要旨	学位規則第5条1項該当(課程博士)
学位論文題目	<b>ヒト歯周組織由来線維芽細胞の樹立と歯根面への結合組織性初期付着に関する研究</b>
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 小鷲 悠典

## 論文内容の要旨

### I. 緒言

歯は、歯根膜および歯肉の結合組織性付着により、歯槽窩に連結されている。このような歯周組織の構造は歯周疾患により破壊され、歯根面は歯周ポケットに露出し、歯は支持・固定を失う。歯周治療の目的は、こうした疾患により失われた歯根膜および歯肉の結合組織性付着の代わりとなる新たな組織を露出根面に形成することにある。そこで、この失われた結合組織性付着を得るために、歯根面の適切な処理と同時に、結合組織細胞、特に歯肉由来線維芽細胞の遊走およびその細胞が形成するコラーゲン線維の歯根面への新たな付着・結合が重要なポイントとなる。結合組織性付着は、歯根セメント質のコラーゲン線維と歯根膜のコラーゲン線維が結合し、連続移行している状態を意味する。この結合組織性付着をより積極的に誘導させるために、近年、ルートプレーニングの後にクエン酸処理を行い、歯根面を脱灰する方法が行われている。この処理による歯根面の清浄化とコラーゲン線維の露出は、結合組織性付着の形成、すなわち線維芽

細胞が形成するコラーゲン線維と、歯根面のコラーゲン線維の連続移行に有効であると報告されている。これらの報告は、ヒトあるいは動物を用いた生体での観察と、歯根横断切片と線維芽細胞を用いたin vitroの実験・観察に基づいているが、ほとんどの報告は、長期間の実験結果であり、結合組織性付着の成否に関わるその初期付着については十分理解されていない。そこで、今回の研究は、その結合組織性付着の初期形成過程を解き明かすことを目的とした。そこで、歯周治療の治癒過程において主体をなす線維芽細胞に注目し、コラーゲン線維形成の盛んなヒト歯肉組織由来線維芽細胞の樹立を試み、その性状について検討した。次にこの細胞を用いて、細胞シート上に歯根横断切片を静置させ、線維芽細胞、コラーゲンの配列・走行を検討する実験系を用いて、結合組織性付着、特にその初期付着の形成を経時的に観察した。

### II. 材料と方法

#### 1. ヒト歯肉由来線維芽細胞の樹立と細胞の性状

線維芽細胞の樹立：ヒト歯肉片からoutgrowth法によ