

演題 D-1-920

ポビドンヨードによる歯周ポケット内洗浄効果

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

○宮田裕之、伊藤 弘、貞平和彦、永田達也、林 通子、宮本佳枝、鴨井久一

The Effect of Subgingival Povidone-Iodine Irrigation on Periodontal Inflammation.

Dept. of Periodontology, The Nippon Dental Univ. School of Dentistry at Tokyo.

○Hiroyuki Miyata, Hiroshi Ito, Kazuhiko Sadahira, Tatsuya Nagata, Michiko Hayashi, Yoshie Miyamoto, Kyuichi Kamoi

キーワード：ポビドンヨード溶液、歯周ポケット内洗浄

目的

本研究は、歯周疾患患者（Probing depth 4mm未満（Ⅰ）、4mm以上6mm未満（Ⅱ）、6mm以上（Ⅲ）、に分類）に対し、ポビドンヨード溶液を洗浄液としPerio Pik[®]にて歯周ポケット内を洗浄することにより、臨床所見および細菌叢の変化を観察することである。

材料及び方法

被験者は、日本歯科大学附属病院歯周病科に来院した患者10名である。また現在にいたるまで特に専門的な歯周治療を受けたことがなく、全身の疾患の既往歴もなく、さらに初診時より過去6カ月間、抗菌剤を服用していない患者を選択し実験に供した。

被験歯面は、上下顎前歯部で修復物の装着されていない前歯部唇側面とした。

実験の日程は、test側、control側ともに実験開始1～2カ月前より週1回、バス法と歯間ブラシによるブラークコントロールの患者指導を行った。なお実験期間中もブラッシングによるブラークコントロール指導を継続した。test側は、実験開始0日から2週間に1回の割合で4週までポビドンヨード溶液にてポケット内洗浄を行なった。洗浄針は、ポケット底部より約1mm手前に先端が位置するように挿入し、1歯あたり2.0kg/cm² 圧で10秒間洗浄を行なった。control側は実験期間を通じてポケット内洗浄は行なわなかった。test側、control側ともに0日、1週、2週、3週、4週、6週、8週に臨床診査と細菌採取を行なった。臨床診査は、Plaque Index (PLI)、Gingival Index (GI)、ペリオトロンにてGingival Crevicular Fluid (GCF)、Probing depth (PD)、Bleeding on probingの測定を行なった。細菌検査は、#45のペーパーポイントを被検歯に1本挿入し、30秒後に取り出し、6時間以内

に暗視野顕微鏡にて形態別に分類した。

結果

PLI、GI、PDにおいては、test側とcontrol側において有意の差は認められなかった。

GCFは、Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ群においてtest側は、control側に比べ有意な減少を示した。

Bleeding on probingは、Ⅱ、Ⅲ群においてtest側は、control側に比べ有意な減少を示した。

細菌叢の変動は、test側は、control側に比べ4週まで球菌の増加、運動性桿菌の減少傾向がみられた。

考察及び結論

ポビドン溶液にて週1回の割合で歯周ポケット内を洗浄することにより、GCF、Bleeding on probingの改善がみられた。このことは、ポビドン溶液が歯肉縁下ブラークに抗菌的に作用していると思われる。その結果、球菌の増加、運動性桿菌の減少傾向が生じたと考えられ、ポビドンヨード溶液にて歯周ポケット内の洗浄が有効であることが示唆された。

演題 D-2-930

ポケット滲出液中のコラーゲン分解酵素活性について

日本大学歯学部歯周病学教室

○鈴木邦治, 伊野部哲也, 村井正大

Collagenolytic enzyme activities in gingival crevicular fluid

Department of Periodontology, Nihon University School of Dentistry

○Kuniharu SUZUKI, Tetsuya INOBE and Seidai MURAI

キーワード: ポケット滲出液、コラゲノキッド[®]、コラーゲン分解酵素

目的

歯周疾患の活動性を示す臨床的パラメーターとしてポケット滲出液中のコラーゲン分解酵素活性の応用を考え、従来のラジオアイソトープを使用する測定に代わる方法として FITC 標識コラーゲンを基質とするコラゲノキッド CLN-100[®] を用いその臨床応用を検討したので報告する。

材料および方法

試料は日本大学歯科病院歯周病科を来院した患者で probing depth 4mm 以上の部位を有する 27 歯を対照とし、併せて bleeding の有無を記録した。試料採取に先立ち歯肉縁上沈着物に可及的に除去したのち簡易防湿、エアースリンジにて乾燥した。1 分間放置後ペーパーポイントを抵抗が感じられるところまで挿入し再び 1 分間放置しポケット滲出液を採取した。このペーパーポイントを 50mM TRIS-HCl buffer 中に浸漬、攪拌し酵素活性測定用試料とした。酵素活性測定はコラゲノキッド CLN-100[®] (コラーゲン技術研修会) の操作方法に準じて行った。すなわち基質である FITC 標識コラーゲン 100 μ g に対して試料 150 μ l を加え 35 $^{\circ}$ C、2 時間および 22 $^{\circ}$ C、24 時間反応させ、反応停止後分解物の変性を目的として 35 $^{\circ}$ C、1 時間インキュベーションを行った。ついで分解物を抽出液中に抽出させ、攪拌、遠心しその上清の蛍光強度を 520nm (Em)/495nm (Ex) にて測定した。既知のコラーゲナーゼとして Boehringer Mannheim 社製 clostridium histolyticum から抽出された Bacterial collagenase を用い血清の影響について検討を行った。血清は 10% 牛胎児血清 (FBS) を反応溶液中に添加し、その活性の変化を測定した。同濃度の FBS を臨床試料にも添加し血清の有無による酵素活性値の変化も併せて検討した。

結果および考察

試料を 35 $^{\circ}$ C、22 時間インキュベーションしたものは min. 0.69 - max. 2.40 unit/ml の範囲であった。一方 22 $^{\circ}$ C、24 時間インキュベーションしたものは min. 0.04 - max. 0.43 unit/ml の範囲であった。一方 10% FBS を添加した場合活性値は 35 $^{\circ}$ C で活性値が 6.3 - 28.5% に、22 $^{\circ}$ C で 3.0 - 60.7% に減少した。また牛胎児血清の細菌性コラゲナーゼ活性への影響は 10% FBS では影響されなかった。

Bleeding があつた場合 35 $^{\circ}$ C、22 $^{\circ}$ C インキュベーションとも 10% FBS 添加で影響されない活性の割合が増加した。ポケット滲出液中には種々のプロテアーゼが存在しており、今回の条件のように 35 $^{\circ}$ C でインキュベーションした場合コラゲナーゼを含む総酵素活性を示していると思われる。一方 22 $^{\circ}$ C でインキュベーションすることによりプロテアーゼの影響を減少させ active な動物性コラゲナーゼおよび細菌性コラゲナーゼの活性を示していると思われる。10% FBS が動物性コラゲナーゼ活性を 100% 阻害するとの報告から試料中には血清に影響されない細菌性コラゲナーゼの存在が示唆された。今後さらに検討を加える予定である。

結論

コラゲノキッド CLN-100[®] を用い少量のポケット滲出液中の酵素活性が測定でき、臨床応用の可能性が示唆された。

Study on arachidonic acid metabolism in periodontal tissue.

—— Contractile actions of the metabolites of lipoxygenase pathways in gingiva on smooth muscles. ——

Department of Endodontology and Periodontology, Department of Pharmacology*

Hiroshima University School of Dentistry

○ Kazuharu TAMAI, Hiroshi YOSHINO, Hiroshi OKAMOTO, Toshihiro DOHI* and Akira TSUJIMOTO*

< キーワード >

リポキシゲナーゼ経路, 歯肉, アラキドン酸代謝

< 目的 >

アラキドン酸の代謝経路はシクロオキシゲナーゼ系とリポキシゲナーゼ系との二つに大別される。前系の産物であるプロスタグランジン(PG)について、当講座では炎症歯肉におけるPG含有量の増加、ラット培養下顎骨に対するPGE₂の骨吸収促進作用(Arch. oral Biol., 28, 963 ~ 965, 1983), 糖尿病ラット歯肉におけるPGI₂産生の異常(J. Periodont. Res., in press)等を明らかにし、歯周病発症におけるその役割の重要性を示唆してきた。一方、リポキシゲナーゼ系の動態や役割についてはほとんど明らかにされていない。そこで我々はこれらの点について明らかにするために一連の研究を行い、結果の一部を第29回および第30回秋季本学会総会において報告した。今回は歯肉におけるリポキシゲナーゼ系代謝産物の平滑筋標本に対する作用を検討した。

< 材料と方法 >

カラゲニン生理食塩水をイヌ歯肉に注射投与し、4時間後に切除して試料とした。これをホモジネートにした後、1200×g, 10分間の遠心上清を取り、酵素標品とした。アラキドン酸と酵素との反応は10 μM indomethacin, 2 mM ATP, 1 mM還元型グルタチオン(GSH), 2 mM Ca²⁺の存在下で37℃, 2分間行い、氷冷エタノールで停止させ、同時に抽出を行った。抽出液は減圧下で濃縮し、Tyrode液またはKrebs-Henseleit液を加えて分析に供した。モルモット回腸およびイヌ大腿動脈を摘出し、平滑筋標本として用いた。抽出物による平滑筋の反応はMagnus法を用いて検討し、オシログラフで記録した。

< 結果 >

I. モルモット回腸標本に対する作用

1) 抽出物は急速で強い収縮作用を示した。特に、投与直後だけでなく、洗浄後にも収縮反応が現れた。洗浄後の収縮反応はインキュベート時に基質としてアラキドン酸が存在した場合にだけ認められた。また、カラゲニン処置歯肉における反応生成

物の方が、無処置歯肉におけるものより強い収縮活性を示した。

2) 生成反応の段階における阻害薬とcofactorの影響を検討した。洗浄後の収縮作用を示す代謝産物の産生は、10 μM indomethacin (特異的シクロオキシゲナーゼ阻害薬) 存在下での合成反応においてはほとんど抑制されなかったが、30 μM AA861 (リポキシゲナーゼ阻害薬) 存在下では著しく抑制された。また同産物はCa²⁺, GSH のみの存在下での合成反応においてはほとんど認めないが、ATP存在下での合成反応において現れた。

3) Magnus管内での段階における受容体拮抗薬前処置の影響を検討した。Histamine 拮抗薬chlorpheniramine (10⁻⁶M) によって抽出物投与直後の収縮が約1/2に抑制されたが、洗浄後の収縮はほとんど抑制されなかった。ペプチドロイコトリエンの受容体拮抗薬であるPPL 55712 は、低濃度ではいずれの収縮にも影響しなかったが、著しい高濃度(10⁻⁵M)では両者を抑制した。

Hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) 標準品の生物活性について検討したところ、15-HETEが比較強い収縮作用を示し、12-HETE も弱いながら収縮活性を示した。この作用は投与直後と洗浄後の双方で認められた。5-HETEには収縮作用は認めなかった。

II. イヌ大腿動脈らせん標本に対する作用

1) 抽出物は持続性の収縮作用を示した。この収縮は抽出液の1容(80 μl)よりも3容でより強く認められた。対照のnoradrenaline (10⁻⁶M) は強い収縮活性を示したが、histamineは10⁻⁴Mでも作用が認められなかった。

2) 上記の収縮作用はαアドレナリン作動性受容体拮抗薬phenoxylbenzamine (10⁻⁶M) 前処置によって影響されなかった。しかし、対照のnoradrenaline (10⁻⁶M) の収縮作用は、phenoxylbenzamineにより完全に抑制された。

< 考察および結論 >

歯肉におけるアラキドン酸の代謝産物に回腸並びに大腿動脈の平滑筋標本に対する収縮活性を認めた。この作用はリポキシゲナーゼ系代謝産物、特に12-あるいは15-HETEによるものであることが示唆された。

演題D-4-950

ヒト歯肉溝滲出液及び *B. gingivalis* 培養上清中のコラゲナーゼ活性に対するチキン・オボマクログロブリンの抑制効果

日本抗体研究所, 東京大学理学部生物化学教室*, 新潟大学歯学部歯科保存学第2教室**

○工藤功美子, 須藤和彦, 足立正一, 猪飼篤*, 大藤泰人**, 武内義晴**, 吉江弘正**, 原 耕二**

THE INHIBITORY EFFECTS OF CHICKIN OVOMACROGLOBULIN ON COLLAGENOLYTIC ACTIVITY IN HUMAN GINGIVAL CREVICULAR FLUID AND *B. GINGIVALIS* CULTURE SUPERNATANT

Japan Immunoresearch Laboratories Co., Ltd. Dept. of Biochemistry and Biophysics, Faculty of Science, The Univ. of Tokyo* Dept. of Periodont., Niigata Univ., School of Dentistry**

○Kumiko Kudo, Kazuhiko Sudo, Masakazu Adachi, Atsushi Ikai*, Yasuto Ofuji**, Yoshiharu Takeuchi**, Hiromasa Yoshie**, Kohji Hara**

[キーワード]

歯肉溝滲出液, 歯周病患者, *Bacteroides gingivalis*, Ovomacroglobulin, Collagenolytic activity

[目的]

ヒト血清中の α_2 -マクログロブリン(α_2 -M)は、各種プロテアーゼ及び動物コラゲナーゼ活性に対して広範囲に抑制的に作用することが知られている。爬虫類や鳥類の卵白中にも同様の活性を有するオボマクログロブリン(OMG)が存在し、安定性に優れたOMGを精製する方法も確立された。そこで今回、我々は歯周病患者の歯肉溝滲出液(GCF)及び*Bacteroides gingivalis*(B.g.)の培養上清が示すcollagenolytic activityに対するチキンOMG及び α_2 -Mの抑制効果を検討した。

[材料及び方法]

(1)GCFの採取と調製

1. 被験者: 歯肉炎、成人性歯周炎、重度進行性歯周炎と診断された患者及び臨床的健康歯肉を有する者(各3~6名)を対象とした。
2. 被験部位: 歯周組織の破壊が進行している歯(平均18.3歯)の頰側の近心、遠心部より採取した。
3. 採取方法: 簡易防湿後、縁上プラークを除去し、ペーパーストリップスを用いてGCFを採取し、ペリオトロン600を用いてペリオトロン値測定後、直ちに氷冷中の0.05M-Tris buffer(pH7.5)に投入し-20℃で保存した。
4. 試料の調製法: 測定直前に解凍し、Triton X-100を2%加えてから5分間の超音波処理後、遠心(10分間、10,000×g、4℃)し、上清を得た。

(2)B.g.培養上清の調製

B.g.381株を嫌氣的条件下でTSB培地により大量

培養を行い、超遠心した後 培養上清を得た。

(3)チキンOMG及びヒト α_2 -Mの精製

チキンOMGは卵白から、猪飼の方法に準じて精製し、 α_2 -Mはヒト新鮮血より、Zn キレートクロマトを用いる方法で精製し使用した。

(4)Collagenolytic activityの測定

基質にFITC-標識コラーゲンを用いた「コラゲノキット」を使用し、GCF 或いはB.g.培養上清とOMG、 α_2 -Mを室温で2時間反応させた後に Collagenolytic activityとInhibition作用を測定した。

(5)SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動

B.g.培養上清にOMGを添加し、2~16%グラジエントゲルを用いたSDS-PAGEの蛋白染色法を行った。

[結果と考察]

1. 各種病型の患者から得られた GCFサンプルの Collagenolytic activityは、1.6mg/mlの OMG添加により49~80%抑制し、また 1mg/mlの α_2 -M添加により59~86%の抑制を示した。
2. B.g. 培養上清の示すCollagenolytic activityは、OMG 14µg/ml~224µg/ml添加により 22%から77%に至るdose dependentな抑制を示した。
3. SDS-PAGEによっても、B.g.培養上清のコラーゲン基質分解活性が、OMG添加プレインキュベーションにより抑制される事が認められた。
4. ヒト末梢血顆粒球由来のコラゲナーゼ活性は、OMG 0.8mg/mlで55%抑制を示した。

以上の結果から、チキンOMGは、歯周病患者GCF及びB.g.由来のCollagenolytic activityを α_2 -Mと、ほぼ同程度に抑制することが示された。

演題D-5-1000

ラットの付着上皮とリンパ節の電顕酵素組織学的研究

九州大学歯学部歯科保存学第一教室

安部達也, 原 宜興, 赤峰昭文, 前田勝正, 青野正男

Electron Microscopic Study of Rat Junctional Epithelium and Regional Lymph Nodes after Immunization with Horseradish Peroxidase

Department of Periodontics and Endodontics, Faculty of Dentistry, Kyushu University

Tatsuya ABE, Yoshitaka HARA, Akifumi AKAMINE, Katsumasa MAEDA and Masao AONO

キーワード: 接合上皮, リンパ節, horseradish peroxidase(HRP)

【目的】

辺縁性歯周炎においては、ブランク由来の抗原の重要性について現在多くの研究が試みられている。しかし、歯肉溝ないしポケット上皮を経由した抗原刺激の結果、所属リンパ節に生じる変化についての報告は少ない。そこで、今回はリンパ節で抗体産生が起こっている時に、再度歯肉溝からの抗原の進入がリンパ節にもたらす反応について検討した。

【材料および方法】

1. 実験動物: ウィスター系雄性ラット

2. 免疫方法: 抗原としてhorseradish peroxidase (HRP;シグマ社製 type II)を用い、これをFreundの完全アジュバントと混合して乳化させ、ラットの下顎左側大白歯部の歯肉頰移行部に2mg注射した。その後、21日目に、生理食塩水に溶解したHRPを下顎左側大白歯舌側歯肉溝に間歇的に30分間塗布した。

3. 試料の採取とその処理: HRP塗布後0時間から5日目まで経時的にラットを屠殺し、2.5%グルタルアルデヒド液にて灌流固定した後、下顎の歯肉と頸部リンパ節を採取した。試料は細切し、さらに2時間同固定液で浸漬固定した。洗滌後、O.C.T.compoundに包埋、ドライアイス・エタノールで急速凍結した。

4. 抗原と抗体の局在の観察: 凍結した試料をcryostatで40 μ mに薄切し、以下、渡辺らの方法¹⁾に準じて反応を行った。まず切片をHRP溶液(0.1mg/mlリン酸緩衝液)に3時間浸漬した後、2.5%グルタルアルデヒド液で15分間固定した。さらに、Graham & Karnovskyの反応液(0.05%DAB+0.01%H₂O₂)に20~30分間浸漬し、次いで、1%OsO₄で90分間後固定した。脱水後、エボンに包埋し、以下、超薄切片を作製、未染色、あるいは、酢酸ウラン・クエン酸鉛重染色を施して電子顕微鏡で観察した。

【結果】

1. HRP塗布直後、接合上皮細胞表面に抗原陽性像が観察され、また、上皮直下の結合組織に存在するマクロファージに抗原の貪食像が観察された。上皮表面上の抗原は、塗布後1日目で完全に消失していた。今回の観察を通じて、口腔上皮でのHRPの通過は認められなかった。

2. 塗布前の頸部リンパ節髄質では、発達したrERに抗HRP抗体陽性を示す形質細胞が多数認められた。また、しばしば、rERと核膜周囲腔に抗体陽性を示す大型のリンパ芽球も観察された。皮質では、発達した胚中心のcap areaに存在する樹枝状細胞の表面上に抗体陽性像が認められた。塗布後3日目から、この樹枝状細胞表面上での抗体陽性像が広範囲にわたる傾向が認められ、また、典型的なtingle body macrophageとは異なる貪食物を有するマクロファージが胚中心へ集積してきていた。

【考察および結論】

これまでHRPをトレーサーとして用いた研究報告などから、接合上皮は、口腔上皮に比べ高い物質透過性を示すことが知られているが、今回、酵素抗原法を利用して、接合上皮を通過した抗原が所属のリンパ節における抗体産生反応に影響を及ぼすことが示唆された。また、リンパ節の髄腔に存在する樹枝状細胞は、特異な細胞突起形態を示し、その細胞質表面に抗原抗体複合体を捕捉・保持することが知られており、胚中心での免疫応答に重要な役割を果たすものと考えられている。

文献

1) 渡辺慶一ら: 酵素免疫細胞化学による抗原および抗体局在の追求. 医学のあゆみ, 77: 287-299, 1971.

骨移植によって生ずる多核巨細胞の組織学的検討

昭和大学歯学部歯周治療学教室、*歯学部口腔病理学教室

○犬井清孝、茂手木義男、長谷川絃司、*立川哲彦、*吉木周作

Histological study of multinucleated cells in bone grafting

Department of Periodontics, *Department of Oral Pathology, Showa University

○Kiyotaka INUI, Yoshio MOTEKI, Kohji HASEGAWA, *Tetuhiko TACHIKAWA,

*Shusaku YOSHIKI

キーワード：破骨細胞、人工骨移植材、組織化学的
検索

目的

骨の出来方には2種類ある。つまり、初期修復の線維性骨、そしてそれら線維性骨を吸収し、その場の生理的環境に適合した形に骨リモデリングされた皮質骨である。歯槽堤形成術や嚢胞摘出術の骨移植と異なり、歯周病変による歯槽骨欠損へのそれは、プラークの影響という面では開放創となるため、より早く生理的な形態を整えた皮質骨の生成が要求される。皮質骨を作るのは骨芽細胞であるが、骨芽細胞とカップリング現象を有する破骨細胞の存在は重要な点である。破骨細胞の組織内での多少は、骨のリモデリングの活発さを物語っている。破骨細胞は、生理的には骨組織に存在するが、Glowackiらが示したように、皮下においても骨粉を移植することによって破骨細胞様細胞を見出すことが出来る。また破骨細胞は、形態的にも生化学的にも特徴的な細胞である。しかし多核巨細胞のうち、異物巨細胞の特徴はきわめて不明確であり、破骨細胞との同定が必要である。我々は先の学会で、各種移植材に接する多核巨細胞の数の比較を行い、Tricalcium Phosphate(TCP)では多く、充実性のHydroxyapatite(HA)では少ないことを骨形態計測法で示した。また移植材に接する多核巨細胞の電顕像の形態的な詳細を示したが、それらの多核巨細胞が異物巨細胞であるのか、それとも破骨細胞であるのかの確証は得られなかった。そこで今回、各種移植材の種類にともなって出現する破骨細胞を種々のマーカーを用いて同定を行った。

材料と方法

A)移植材の調整

(1)Bone Particles(BPs)：SD系雄ラット100gを使用。長骨を取り出し、軟組織を除去後、生理的食塩

水にて洗浄、凍結乾燥後破砕し、80～300μmメッシュのものをを用いた。

(2)TCP:Synthograft®の80～300μmのものを使用した。

(3)絹糸：滅菌済みの外科手術用絹糸を対照として用いた。

B)移植手術

ネンブタール全身麻酔下においてラット背部に切開を行い、皮下に各種移植材をそれぞれ20mgづつ移植を行った。

C)組織化学的検索法

移植後20日目に屠殺を行い、ホルマリンカルシウムにて固定、Gum Sucroseで洗浄後、樹脂包埋を行い4μmで薄切し、Acid PhosphataseおよびTartrate resistant acid phosphatase(TRACP)の組織化学的染色を行い、多核巨細胞の同定を行った。

結果および考察

いずれの移植材においても、移植粒子に密着するように不定形の多核巨細胞が認められた。TRACP陽性細胞もまた移植粒子に接して現われた。同一粒子において、TRACP陽性細胞および陰性細胞がともに認められる部位が存在した。TRACP陽性細胞は、BPs移植において最も多く見られ、TCP移植ではBPsに比較してTRACP陽性細胞は少なく、コントロールとしての絹糸の移植では、ほとんど見られなかった。以上の結果より、骨が周囲にない皮下において、人工骨移植材に対し異物巨細胞および破骨細胞がともに関与する可能性が示唆された。これらのことより移植材を含めた骨のリモデリングの可能性もあると考えられる。

演題D-7-1020

Actinomyces viscosus T14V株の示す多クローン性B細胞活性化

—ヒト末梢血リンパ球の応答性—

大阪大学歯学部口腔治療学講座

○岡田年以、原田 泰、岡田 宏

Responsiveness of human peripheral blood lymphocyte to Actinomyces viscosus T14V

Department of Periodontology and Endodontology, Osaka University, Faculty of Dentistry

○Toshiyuki OKADA, Yasushi HARADA, Hiroshi OKADA

キーワード:多クローン性B細胞活性化、ヒト末梢血リンパ球、Actinomyces viscosus T14V株

目的

辺縁性歯周炎の歯肉組織には形質細胞の著しい浸潤増殖が特徴的であり、その病態発現に、口腔細菌由来の多クローン性B細胞活性化(PBA)が関与することが考えられる。我々はこれまでに、Actinomyces viscosus T14V株の超音波破砕上清(Av.sup)がマウスB細胞を非特異的に活性化して、T細胞の関与なく抗体産生細胞にまで分化させること、この時T細胞が存在すればIgG産生が増加することを報告してきた。今回、歯周炎のB細胞性病変の形成機構解明の一助として、ヒト末梢血リンパ球に対するAv.supの作用を検討した。

材料および方法

1) リンパ球の調製:健常ヒト末梢血より比重遠心法にて単核球を分画した。T、Bリンパ球はG-10カラムを通過させて可及的にマクロファージを除去した後、抗ヒトIgA,G,M抗体を用いたパンニング法を行い、非附着性のT細胞画分と附着性のB細胞画分とに分画した。B細胞画分はOKT3+補体処理による細胞障害法により、残存するT細胞を除去し、一方T細胞画分はナイロンウールカラムを用いて、それぞれT細胞及びB細胞を可及的に分離、精製した。

2) 細胞培養法と活性の測定:5x10⁴/wellのPBL、B細胞、T細胞を一定濃度のPBA物質と共に培養し、増殖能は3日間培養の培養終了前20時間における³H-TdR取り込みを測定し、また抗体産生能は、7日間培養後の上清中のIg量をELISA法にて測定し、それぞれ評価した。PBA作用におけるT細胞の関与については、可及的に精製した、B細胞に同量のT細胞を混合し活性の測定を行った。

結果

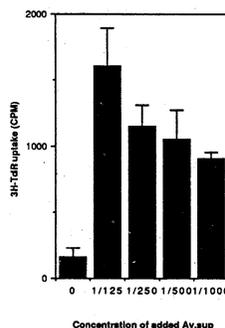
1) Av.supはヒト末梢血リンパ球に、濃度依存性に分裂を誘導し(図1)、IgG産生細胞を誘導した。

2) T、B細胞を分画した群についてAv.supのPBA作用を検討したところマウスの系と同様にB細胞画分にT細胞非依存性にIgG産生を誘導する可能性が示唆された。更に、T細胞が共存するとIgG産生が増強される結果が得られた(図2)。

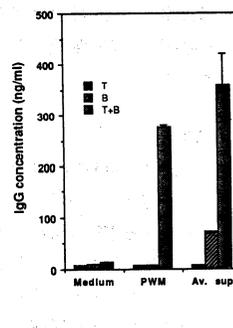
考察および結論

T細胞依存性のPBA物質として知られているPokeweed mitogen(PWM)は、B細胞画分にはIgG産生を誘導しなかった。この事は、我々の精製したB細胞画分には機能的に有効なT細胞が混在していない事を示している。同じB細胞画分をAv.supで刺激した場合には無刺激群に比べて有意なIgG産生が認められた事よりAv.supは、T細胞非依存性にB細胞を活性化できるPBA物質である事が示された。更に、Av.supがT、B細胞の共存下においてIgG産生を増強したが、Av.supがT細胞画分に対して直接作用を有しないことは、その増殖を誘導しないという予備実験の結果から推察される事より、マウスの系と同様に何らかのT、B細胞間の相互作用が存在する可能性が考えられる。

(図1)



(図2)



演題D-8-1030

局所麻酔剤のヒトリンパ球増殖反応に及ぼす影響

東北歯科大学 歯科保存学第1講座

○鎌形有祐, 飯田正人

The effect of local anesthetics on human lymphocyte proliferative response

Department of Periodontics and Restorative Dentistry, Tohoku Dental University

○Yusuke KAMAGATA, Masato IIDA

キーワード: 局所麻酔剤, B細胞

目的

歯周疾患の発症には宿主の免疫応答が関与し, 歯周病巣には活性化されたリンパ球が多数存在することが明らかにされている。我々はリンパ球活性化の機構を解明することを目的として局所麻酔剤のリンパ球活性化に及ぼす影響に関する実験をおこなったところ, 局所麻酔剤がB細胞マイトジェンに対するヒト末梢単核球の増殖反応をT細胞マイトジェンの場合に比較してより強く抑制することを認めたので報告する。

材料および方法

1. 局所麻酔剤: 2%塩酸リドカイン(リドカイン), 2%塩酸メピバカイン(メピバカイン)を用いた。

2. 局所麻酔剤のヒトリンパ球増殖反応に及ぼす影響の測定

健康成人の末梢血液からFico11比重遠心法によって得られた単核球分画をRPMI 1640培養液に浮遊し, T細胞マイトジェンであるPHA, ConA, 又はB細胞マイトジェンであるSACを加えた。さらに各種濃度の局所麻酔剤を加えて5%CO₂, 37℃条件下で72時間培養し, 局所麻酔剤を加えない場合と増殖反応を比較した。

結果

1. 局所麻酔剤のリンパ球増殖反応に及ぼす影響

1) リドカインは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でマイトジェンに対する末梢単核球の増殖反応をPHAでは15%, ConAでは0%, SACでは86%抑制した。

2) メピバカインは100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でマイトジェンに対する末梢単核球の増殖反応をPHAでは46%, ConAでは45%, SACでは83%抑制した。

3) リドカインおよびメピバカインの添加時期は

培養開始時, 12時間後, 24時間後, 48時間後のいずれの場合でも, SACに対する末梢単核球の増殖反応を同程度に抑制した。

4) 末梢単核球にリドカイン100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて24時間培養後, 培養液を新たにしてリドカインを除去し, SACを加えて培養した場合には対照と比較して殆ど抑制を認めなかった。

考察

今回の実験から, リドカインはPHAおよびConAに比較してSACに対する末梢単核球増殖反応を強く抑制することが示された。このことはリドカインがB細胞マイトジェンに対する増殖反応を選択的に抑制したことを意味している。今後, 本薬剤を使って, B細胞の活性化機構を解明する予定である。

結論

局所麻酔剤であるリドカイン, メピバカインにより, マイトジェンに対するヒト末梢単核球の増殖反応が抑制されることを認めた。特にリドカインはB細胞マイトジェンに対する増殖反応を強く抑制した。