

学 位 論 文 題 名

Light and electron microscopic study
of the initial attachment of principal fibers
to the alveolar bone surface in rat molars

（ラット臼歯歯槽骨表面への主線維の
初期付着に関する光顕および電顕的研究）

学位論文内容の要旨

主線維はセメント質と歯槽骨の間に張るコラゲン線維束で、両端はシャープリー線維として両硬組織に埋め込まれている。主線維の発生、出現時期、機能集団への形成過程については光顕でヒトを含めたいろいろな動物で研究されている。

ラット臼歯では、骨の改造と関連して主線維の付着が電顕で研究されている。生理的にラット臼歯は遠心移動し、移動中に歯槽骨の遠心面に骨沈着が、近心面に骨吸収が起こる。主線維は沈着面ではシャープリー線維として連続して埋め込まれ、このような付着様式は連続性付着と呼ばれる。一方、吸収面では3種の付着様式が認められ、各々が詳細に研究されている。さらに、付着様式をもとにして吸収面に4種のシャープリー線維を分類した研究もある。これらの研究は十分に発達し付着し終わった主線維について扱っているが、いままでに主線維の最初の付着についての報告はない。本研究はラットの発生途上の主線維と歯槽骨を光顕と透過電顕により観察し、主線維の初期付着機構を明らかにするために行われた。

材料として20日齢と25日齢の雄性ウイスターラットを各齢10匹ずつ使った。光顕用として、ネンブタールによる腹腔内麻酔後、10%ホルマリンで灌流固定し上顎を取り外した。これらを同固定液で1週間固定し蟻酸－クエン酸混合液で2週間脱灰、アルコール脱水し通法通りパラフィン包埋した。臼歯に対して近遠心方向の厚さ5ミクロンの切片を作成しヘマトキシリン－エオジン（H－E）、細網鍍銀、PAS、トルイジンブルー染色のいずれかを施した。25日齢ラットの切片のいくつかには消化試験を施した。切片は0.5%辜丸ヒアルロニダーゼを含む0.1モル磷酸緩衝液で37℃、36時間処理された。コントロールとしてヒアルロニダーゼを除いた同緩衝液にて同条件で処理した。両切片とも処理後トルイジンブルー染色した。

透過電顕用として、動物を麻酔後、2.5%グルタルアルデヒドを含む0.06モルのカコジル酸緩衝液で灌流固定し、上顎を取り外し同固定液で1晩固定し5%EDTA

で3週間脱灰した。脱灰後、第2、第3臼歯およびそれらの間の歯槽骨を切り出し、1% 四酸化オスミウムで90分後固定、アルコール脱水し通法通りエポン包埋した。矢状方向の準超薄切片と超薄切片を作成し、準超薄切片はトルイジンブルー—アズールⅡで染色し、超薄切片はウラン、鉛、燐タングステン酸の3重染色、または燐タングステン酸で単染色した。切片を日立H-7000透過型電子顕微鏡により加速電圧75KVで観察した。

主線維が出現し歯槽骨に埋め込まれるまでを調べるため、各々の日齢のラットで第2第3臼歯間の歯槽骨を光顕と電顕で観察した。

20日齢ラットの根尖部、第2臼歯側では、歯根膜細胞と線維とは歯槽骨表面に平行に配列していた。歯頸側へとたどってゆくにつれ、ヘマトキシリンに濃染し、鍍銀染色で染まらず、PASとトルイジンブルー染色陽性の層が認められた。この領域では歯根膜細胞の配列は乱れ多くの突起を有するようになった。線維は細胞間で数を増し、歯槽骨に向って並ぶ主線維が認識できるようになった。それらの一部はヘマトキシリンに濃染する層に付着していた。透過電顕では、歯槽骨表面に電子密度が高く線維に乏しい層が出現し、これらの表面に主線維の一部が付着した。もっとも歯頸部では、歯根膜細胞は細胞長軸を歯槽骨に向け、主線維は太い束として細胞間に配列していた。第3臼歯側では、第3臼歯の歯根がまだ形成されておらず、歯槽骨表面では主線維はまったく認められず、骨芽細胞が隙間なく歯槽骨を覆っていた。

25日齢ラットの歯頸部、第2臼歯側では、ヘマトキシリンに濃染し、電子密度の高い層は新生骨により埋め込まれていた。ただし、20日齢で認められた組織学的および組織化学的性質は維持していた。ヒアルロニダーゼ処理により、この層はトルイジンブルーに対する染色性を失った。コントロール切片は無処理の切片と同じ染色性を示した。この領域では主線維は20日齢よりもさらに組織化しており、それらの末端もまた太いシャープピー線維として新生骨に埋め込まれていた。ほとんどのシャープピー線維は電子密度の高い層を貫いてはいなかった。主線維の間で歯根膜細胞は歯槽骨に垂直に配列していた。

光顕所見により、歯槽骨表面にヒアルロニダーゼによって特異的に消化される基質、すなわちプロテオグリカンに富み線維に乏しい層が出現し、その表面に主線維が最初に付着し組織化してゆくことが明らかとなった。透過電顕による電子密度の高い層は、位置、出現時期、形態からプロテオグリカン層と一致することは明らかで、主線維と骨基質線維と緊密な接触は認められなかった。以上の所見は主線維と歯槽骨の最初の接着にはプロテオグリカンが重要な役割を演じることを示唆している。

本研究で観察されたプロテオグリカン層は、ラットのセメント象牙境にも存在することが確認されている。セメント象牙境はプロテオグリカンに富み線維に乏しく、主線維が組織化する前に歯根象牙質表面に現れ、主線維と象牙質基質線維との絡み合いは認められない。さらに、水酸化ナトリウム浸軟法によりセメント質と象牙質は剥離する。水酸化ナトリウム浸軟法はコラゲン線維を残し細胞と線維間基質のみを除去する方法で

ある。これらは主線維の歯根象牙質への最初の付着に対して、プロテオグリカンが中心的な役割を演じることを示唆している。

ラットにおいて、吸収された歯根表面と修復セメント質の間に現れるセメントライン、および主線維再付着の際に吸収された歯槽骨表面に現れる層も本研究で観察された層と組織学的によく似ている。すなわち、線維の再沈着前に電子密度の高い基質が吸収された面に出現し、その後線維はこの基質に付着する。これらの所見は、吸収窩への線維の再付着はこの基質を介してなされることを示唆している。さらにヒトとラットにおいて、新しい骨と古い骨の間にできるセメントラインも線維に乏しくプロテオグリカンに富むことが明らかにされている。最近の研究では骨セメントラインで骨シアロ蛋白とオステオポンチンが見出され、これらの蛋白と石灰化や基質接着との関係が示唆されている。しかしながら、主線維の最初の付着にもこれらの蛋白が関係するののかについてはまだ解明されておらず、今後さらなる研究が必要である。

結論として、本研究は、ラットでは接着力を持つプロテオグリカンが主線維の歯槽骨表面への最初の付着を仲立ちすること、およびプロテオグリカンはコラゲンを主体とした硬組織同士の付着と再付着に中心的な役割を演ずることを示唆する。

電子密度が高く、プロテオグリカンに富む層がどの細胞に由来するのかについてはわからない。この由来を明らかにすることは歯周治療における付着の回復に有効な指針を与えられると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 脇 田 稔

副 査 教 授 加 藤 熙

副 査 教 授 吉 田 重 光

学 位 論 文 題 名

Light and electron microscopic study of the initial attachment of principal fibers to the alveolar bone surface in rat molars

(ラット臼歯歯槽骨表面への主線維の
初期付着に関する光顕および電顕的研究)

審査は、3名の審査員が個別に行った。試験は口頭試問の形式で、学位申請論文の内容とそれに関連する学科目について行われた。提出論文の要旨と審査の概要は以下の通りである。

主線維はセメント質と歯槽骨の間に張るコラーゲン線維束で、両端はシャープリー線維として両硬組織に埋め込まれている。主線維の発生、出現時期、機能集団への形成過程については光顕でヒトを含めたいろいろな動物で研究されている。

ラット臼歯では、骨の改造と関連して主線維の付着が電顕で研究されている。生理的にラット臼歯は遠心移動し、移動中に歯槽骨の遠心面に骨沈着が、近心面に骨吸収が起こる。主線維は沈着面ではシャープリー線維として連続して埋め込まれ、このような付着様式は連続性付着と呼ばれる。一方、吸収面では3種の付着様式が認められ、各々が詳細に研究されている。さらに、付着様式をもとにして吸収面に4種のシャープリー線維を分類した研究もある。これらの研究は十分に発達し付着し終わった主線維について扱っているが、いままでに主線維の最初の付着についての報告はない。本研究はラットの発生途上の主線維と歯槽骨を光顕と透過電顕により観察し、主線維の初期付着機構を明らかにするために行われた。

材料として20日齢と25日齢の雄性ウイスターラットを各齢10匹ずつ使った。光顕用として、ネンブタールによる腹腔内麻酔後、10%ホルマリンで灌流固定し上顎を取り外した。これらを同固定液で1週間固定し蟻酸-クエン酸混合液で2週間脱灰、アルコール脱水し通法通りパラフィン包埋した。臼歯に対して近遠心方向の厚さ5ミクロンの切片を作成しヘマトキシリン-エオジン(H-E)、細網鍍銀、PAS、トルイジンブルー染色のいずれかを施した。25日齢ラットの切片のいくつかには消化試験を施した。切片は0.5%鞣丸ヒアルロニダーゼを含む0.1モル磷酸緩衝液で37℃、36時間処理された。コントロールとしてヒアルロニダーゼを除いた同緩衝液にて同条件で処理した。両切片とも処理後トルイジンブルー染色した。

透過電顕用として、動物を麻酔後、2.5%グルタルアルデヒドを含む0.06モルのカコジル酸緩衝液で灌流固定し、上顎を取り外し同固定液で1晩固定し5%EDTAで3週間脱灰した。脱灰後、第2、第

3臼歯およびそれらの間の歯槽骨を切り出し、1%四酸化オスミウムで90分後固定、アルコール脱水し通法通りエポン包埋した。矢状方向の準超薄切片と超薄切片を作成し、準超薄切片はトルイジンブルー—アズール藍で染色し、超薄切片はウラン、鉛、燐タングステン酸の3重染色、または燐タングステン酸で単染色した。切片を日立H-7000透過型電子顕微鏡により加速電圧75KVで観察した。

主線維が出現し歯槽骨に埋め込まれるまでを調べるため、各々の日齢のラットで第2第3臼歯間の歯槽骨を光顕と電顕で観察した。

20日齢ラットの根尖部、第2臼歯側では、歯根膜細胞と線維とは歯槽骨表面に平行に配列していた。歯頸側へとたどってゆくに連れ、ヘマトキシリンに濃染し、鍍銀染色で染まらず、PASとトルイジンブルー染色陽性の層が認められた。この領域では歯根膜細胞の配列は乱れ多くの突起を有するようになった。線維は細胞間で数を増し、歯槽骨に向って並ぶ主線維が認識できるようになった。それらの一部はヘマトキシリンに濃染する層に付着していた。透過電顕では、歯槽骨表面に電子密度が高く線維に乏しい層が出現し、これらの表面に主線維の一部が付着した。もっとも歯頸部では、歯根膜細胞は細胞長軸を歯槽骨に向け、主線維は太い束として細胞間に配列していた。第3臼歯側では、第3臼歯の歯根がまだ形成されておらず、歯槽骨表面では主線維はまったく認められず、骨芽細胞が隙間なく歯槽骨を覆っていた。

25日齢ラットの歯頸部、第2臼歯側では、ヘマトキシリンに濃染し、電子密度の高い層は新生骨により埋め込まれていた。ただし、20日齢で認められた組織学および組織化学的性質は維持していた。ヒアルロニダーゼ処理により、この層はトルイジンブルーに対する染色性を失った。コントロール切片は無処理の切片と同じ染色性を示した。この領域では主線維は20日齢よりもさらに組織化しており、それらの末端もまた太いシャープピー線維として新生骨に埋め込まれていた。ほとんどのシャープピー線維は電子密度の高い層を貫いてはいなかった。主線維の間で歯根膜細胞は歯槽骨に垂直に配列していた。

光顕所見により、歯槽骨表面にヒアルロニダーゼによって特異的に消化される基質、すなわちプロテオグリカンに富み線維に乏しい層が出現し、その表面に主線維が最初に付着し組織化してゆくことが明らかとなった。透過電顕による電子密度の高い層は、位置、出現時期、形態からプロテオグリカン層と一致することは明らかで、主線維と骨基質線維と緊密な接触は認められなかった。以上の所見は主線維と歯槽骨の最初の接着にはプロテオグリカンが重要な役割を演じることを示唆している。

本研究で観察されたプロテオグリカン層は、ラットのセメント象牙境にも存在することが確認されている。セメント象牙境はプロテオグリカンに富み線維に乏しく、主線維が組織化する前に歯根象牙質表面に現れ、主線維と象牙質基質線維との絡み合いは認められない。さらに、水酸化ナトリウム浸軟法によりセメント質と象牙質は剥離する。水酸化ナトリウム浸軟法はコラーゲン線維を残し細胞と線維間基質のみを除去する方法である。これらは主線維の歯根象牙質への最初の付着に対して、プロテオグリカンが中心的な役割を演じることを示唆している。

ラットにおいて、吸収された歯根表面と修復セメント質の間に現れるセメントライン、および主線維再付着の際に吸収された歯槽骨表面に現れる層も本研究で観察された層と組織学的によく似ている。すなわち、線維の再沈着前に電子密度の高い基質が吸収された面に出現し、その後線維はこの基質に付着する。これらの所見は、吸収窩への線維の再付着はこの基質を介してなされることを示唆している。さらにヒトとラットにおいて、新しい骨と古い骨の間にできるセメントラインも線維に乏しくプロテオグリカンに富むことが明らかにされている。最近の研究では骨セメントラインで骨シアロ蛋白とオステオポンチンが見出され、これらの蛋白と石灰化や基質接着との関係が示唆されている。しかしながら、主線維の最初の付着にもこれらの蛋白が関係するののかについてはまだ解明されておらず、今後さらなる研究が必要である。

結論として、本研究は、ラットでは接着力を持つプロテオグリカンが主線維の歯槽骨表面への最初の付着を仲立ちすること、およびプロテオグリカンはコラーゲンを主体とした硬組織同士の付着と再付着に中心的な役割を演ずることを示唆する。

電子密度が高く、プロテオグリカンに富む層がどの細胞に由来するのかについてはわからない。この由来を明らかにすることは歯周治療における付着の回復に有効な指針を与えると思われる。

学位申請者に対して行われた口頭試問においては、設問は本論文の主題であるシャーピー線維の骨面への付着について、その発生に伴う変化と、特にこの時に出現するヘマトキシリン濃染層の意義と形態等について詳細にわたって行われた。申請者はこれらの質問に対しそれぞれ適切な回答を行った。本研究は歯周組織の発生の知見について基礎歯科学の関連領域の進歩に大いに貢献するものと評価された。本研究は硬組織接着機構についての基礎研究の領域の進歩に大いに貢献するのみならず、歯周治療における付着の回復に有効な指針を与えるものと考えられた。したがって、本論文提出者は歯学博士に値すると認められた。