

機械的刺激の加わった毛細血管後細静脈における 単球・多形核白血球の動態変化に関する研究

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯科矯正治療においては歯に矯正力を加えることで歯周組織に機械的な刺激を負荷し、骨の吸収・添加を引き起こす。これまでに機械的刺激負荷時の歯根膜における圧力分布と歯槽骨吸収部位との間に強い関連性があると報告されているが、機械的刺激が加わった際の破骨細胞の発現機序は未だ不明な点が多い。前破骨細胞は骨髄から血管を介して単球・マクロファージ系細胞として局所の骨吸収部位に誘導され、破骨細胞へ分化すると考えられており、微小血管からのこれら細胞成分の遊走が、骨の改造を誘導する端緒であるものと考えられる。

本研究では、機械的刺激の負荷により生じる血管内皮と白血球との相互作用は、特に単球・マクロファージ系細胞において強く惹起されるとの仮説の下で、単一の毛細血管後細静脈に持続力と間歇力の2種類の機械的刺激を加え、血管内皮細胞と接触・接着する白血球を多形核白血球と単球とに分けて検索・検討した。

【材料と方法】

実験動物として生後約7週齢のシリアン・ゴールデン・ハムスター20匹を用いた。麻酔下で頬袋をアクリル板上に反転した後、直径約30 μ mで長さ600 μ mにわたり分枝が認められない単一の毛細血管後細静脈(以下、PCV)を選択し、60分間の静置後マイクロマニピュレーターにて微細に操作された直径30 μ mのガラス棒にて刺激を負荷した。すなわち持続的に血管径を約1/2まで60分間圧縮した刺激と、10分毎の血管の完全な閉塞と再灌流を計60分間繰り返し行った刺激の2種を用い、それらの刺激を用いた実験群をそれぞれ、LCC群、IC群とした。刺激除去後に実験部位を樹脂包埋し、血管の走行軸に対して垂直に厚さ2 μ mの連続切片を作成した。これら連続切片上で同じ細胞を重複して数えることがないように、刺激部位上流100 μ m区間(以下、E-1)、刺激部位下流100 μ m区間

(以下, E-2), 下流 100~200 μ m 区間 (以下, E-3) に存在する多形核白血球 (以下 PMN) 数, 単球数を, それぞれ血管内皮と接触 (以下, 接触・接着) している白血球, および接触・接着していない (以下, 非接触・非接着) 白血球に分けて検索した. なお対照部位として刺激負荷部位上流 300~400 μ m を用いた. PMN, 単球に関してそれぞれ対照部位との比較, 区間比較 (E-1, E-2 および E-3 間), 実験群間の比較 (LCC, IC 群間) を行い, t 検定, および χ^2 検定にて有意差検定を行った.

【結果】

PCV はガラス棒による刺激により楕円形を呈していたが, 血管が閉塞する部位は認められず, 頬袋上皮の破壊も認められなかった. PCV 内には白血球が円形を呈したまま血管内皮と接触している像, および白血球と血管内皮との強固な接着を示唆する像が認められた. また血管内皮細胞と接触せずに管腔に存在する白血球も認められたが, 血管外への遊走を示唆する像は認められなかった. LCC 群, IC 群との組織像の比較では, 頬袋上皮, PCV および PCV 周囲組織像に大きな違いはなかった.

統計分析により, LCC 群では, E-2 区間において接触・接着する PMN 数, 単球の両方に有意な増加が認められ, 区間間の比較においても E-2 区間での有意な増加が見られた. 一方, 非接触・非接着 PMN・単球の有意な増加は認められなかった. IC 群では接触・接着する PMN 数のみが E-2 区間において有意な増加を示し, 区間間の比較においても有意な増加が認められた. しかし接触・接着単球, および非接触・非接着の PMN 数・単球における有意な差は認められなかった. 実験群間比較では E-2 区間において LCC 群の接触・接着 PMN 数, および単球は IC 群よりも有意に多かったが, 非接触・非接着白血球数に有意差は認められなかった.

【考察】

ハムスター頬袋は血球の動態を観察しながら, 単一の微小血管に機械的刺激を容易に負荷することが可能な部位であり, 外科的浸襲や複雑な操作を施すことなく刺激を加えることが可能であるため, 本研究では頬袋に存在する PCV を用いた.

機械的刺激が負荷された状態での単一の PCV において接触・接着する白血球が増加した原因としては, シアストレス (以下 SS) の変化が考えられる. SS が低下した状態では接触・接着が生じやすいという報告がある. 本実験における E-2 区間はガラス棒により狭くなった部位直後の下流であり, 流れの剥離による SS が低下する部位が存在するものと考えられる. そこで, 長さ 100 μ m の E-2 区間における接触・接着 PMN 数を更に 20 μ m ごとに分けて詳細に検討したところ, 下流に向うにつれ接触・接着 PMN 数の漸減が認めら

れた。この事実は上記の考察の妥当性を支持するものと考えられる。一方、SSの増加が接着分子の発現を増加させるとの報告もある。これら接着分子の発現はmRNAの増加を介したものであり、本実験のように短時間において接触・接着が増加した要因とは考えにくい。

一方、E-1、E-3区間において接触・接着白血球数が有意に増加しなかった原因としては、E-1区間では刺激部位における血管の狭小に伴い血流速度が上昇し、SSが増大したため、E-3区間では血流速度が定常状態に戻ったためと考えるのが妥当と思われる。またIC群において接触・接着白血球の増加が小さかった要因としては、再灌流時に血流が回復することでSSが定常状態に戻ることで、また血管の完全な閉塞に伴い、LCC群と比較して血管内を流れる絶対的な白血球数が少なかったことも原因の一つと考えられる。

さらに、単球においてはLCC群のE-2区間において接触・接着がするものが有意に増加した。本実験は非感染性の非特異的炎症反応であると考えられるが、このような機械的刺激においては、単球を誘導する特異的な接着分子が発現する可能性も否定できず、今後の検討の課題になったものと考えられる。

LCC群で用いた刺激は現在の矯正歯科臨床において最適と考えられている血流を止めない程度の弱い持続的な矯正力を、一方IC群は従来から矯正治療で用いられている間歇的な力を想定して実験を行った。LCC群では群間の比較により内皮細胞に接触・接着するPMN数のみでなく、単球の増加も認められたことから、骨の改造を担う細胞群は単球・マクロファージ系細胞由来である点を考慮すると、従来述べられてきたように弱い持続的な力は、初期の血管の応答反応においても骨吸収の誘導と言う観点から、より効果的であると考えられた。

【結論】

1. 機械的刺激を加えることにより、白血球と毛細血管後細静脈内皮細胞とに相互作用が生じ、血管内皮細胞表面への白血球の接触・接着が認められた。
2. 接触・接着する白血球は刺激負荷部位下流100 μ m区間において多く観察された。
3. 刺激負荷部位下流100 μ mにおいて、持続的な弱い力を加えた群では、間歇的な刺激を加えた群よりも接触・接着する多形核白血球が多く、さらに単球の接触・接着も多く認められた。
4. 以上より、弱い機械的な刺激は、間歇的な刺激に比べ、血管内皮細胞と白血球との相互作用をより強く誘導し、歯の移動を考える上で血管に対する初期反応刺激として有効である可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 吉 田 重 光
副 査 教 授 向 後 隆 男

学 位 論 文 題 名

機械的刺激の加わった毛細血管後細静脈における 単球・多形核白血球の動態変化に関する研究

審査は飯田、向後審査委員は一同に、また吉田委員は個別に、口頭試問の形式によって行われた。まず論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問した。

申請者から、まず以下のような説明がなされた。

生後約7週齢のシリアンハムスターを実験動物として使用し、異なる機械的刺激に対する微小血管と白血球との相互作用、および白血球の種類を調べた。

【材料と方法】麻酔下で反転した頬袋中に存在する直径約30 μm で単一の毛細血管後細静脈(以下、PCV)に対し、マイクロマニピュレーターにて微細に操作された直径30 μm のガラス棒にて機械的刺激を負荷した。この際、持続的に血管径を約1/2まで60分間圧縮した刺激と、10分毎の血管の完全な閉塞と再灌流を計60分間繰り返した刺激を用い、それらの刺激を用いた実験群をそれぞれ、LCC群、IC群とした。実験部位を樹脂包埋後、血管の走行軸に対して垂直に厚さ2 μm の連続切片を作成し、切片上で刺激部位上流100 μm 区間(以下、E-1)、下流100 μm 区間(以下、E-2)、下流100~200 μm 区間(以下、E-3)に存在した多形核白血球(以下PMN)数・単球を、それぞれ血管内皮細胞と接触しているもの(以下、接触・接着)、および接触していないもの(以下、非接触・非接着)に分けて検索した。なお対照部位を刺激負荷部位上流300~400 μm とし、PMN、単球に関してそれぞれ対照部位との比較、区間間比較、実験群間比較を行った。

【結果】両実験群共に、PCVはガラス棒による刺激により楕円形を呈していたが、血管の閉塞、頬袋上皮の破壊は認められなかった。PCV内には白血球が血管内皮と接触している像、および強固な接着を示唆する像、血管内皮細胞と接触せずに管腔に存在する白血球が認められたが、血管外への遊走を示唆する像は認められなかった。また両実験群間の組織像に大きな相違は見られなかった。

統計分析により、LCC群のE-2区間における接触・接着PMN数、同単球数に有意な増加が認められ、区間間の比較においても同区間での有意な増加が見られた。一方、非接触・非接着PMN数・単球の有意な増加は認められなかった。IC群では接触・接着PMN数のみがE-2区間におい

て有意な増加を示し、区間間の比較においても有意な増加が認められた。しかし接触・接着単球、非接触・非接着の PMN 数・単球における有意な差は認められなかった。実験群間比較では E-2 区間において LCC 群の接触・接着 PMN 数、および単球は IC 群よりも有意に多かったが、非接触・非接着白血球数に有意差は認められなかった。

【考察】実験部位において接触・接着白血球が増加した原因の一つとして、シアストレス（以下、SS）の変化が考えられる。刺激負荷部位直後では、流れの剥離により SS が低下する部位が存在すると考えられ、E-2 区間における接触・接着 PMN 数を更に 20 μ m ごとに分けて詳細に検討したところ下流に向うにつれ接触・接着 PMN 数の漸減が認められたことから上記の考察が妥当であると考えられる。一方、SS の増加は接着分子の発現を高めるともされているが、その場合の発現は mRNA の増加を介したものであり、本実験の実験時間における原因とは考えにくい。また LCC 群の E-2 区間のみ接触・接着単球が有意に増加したことから、機械的刺激により単球を誘導する何らかの特異的な接着分子が発現する可能性も否定できず、今後の検討の課題になったものとする。

LCC 群で用いた刺激は矯正歯科臨床において最適とされている矯正力を想定しており、群間の比較により PMN・単球両方の接触・接着の増加も認められたことから、骨の改造を担う細胞群は単球・マクロファージ系細胞由来である点を考慮すると、従来述べられてきたように弱い持続的な力は、初期の血管の応答反応においても骨吸収の誘導と言う観点からもより効果的であることが示唆されたと考えられる。

以上の論述に引き続き以下の項目を中心に口頭試問を行った。

1. 実験手技、特に加圧方法、計測部位の設定根拠について
2. 歯根膜血管のモデルとしての本実験系の適切さについて
3. 単球系細胞の破骨細胞への分化に関する最近の知見
4. 圧迫による単球の増加傾向が多形核白血球に比べて高いことの理由
5. 白血球接着因子の発現と shear stress の関連性
6. 今後の研究の展開
7. 組織学的研究に関する一般的事項

これらの試問に対して申請者は明快な回答、説明を行った。

本研究は歯科矯正学における歯の移動の機構を明らかにすることを目的としている。特に矯正力が加わった歯根膜において破骨細胞が誘導される機構の中で、毛細血管後細静脈から単球として破骨細胞前駆細胞が血管外に供給されることに着目している。機械的な毛細血管後細静脈の変形が白血球の動態に変化を生じさせていることはこれまでに知られていたが、その白血球の種類を同定した研究はこれまでにない。本結果から、機械的な血管の変形は、多形核白血球の血管内被細胞への接触・接着を増加させるものの、単球においてその増加が著しいことが明らかにされた。さらにこの反応は変形された部位の直後の下流で顕著に生じ、また血流を停止させない持続的な変形において有意に上昇することが明らかにされた。本研究から得られた結果は、機械的刺激による組織の改造現象を解明していく上に重要な情報を与えたものと高く評価できる。更に、試問の内容から、学位申請者は、本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野、組織学全般に亘って幅広い学識を有していると認められた。また研究の将来展望に関しても、本研究を基にして今後益々発展して行く可能性が高いものと評価された。よって審査担当者全員は、申請者は

博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。