

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical characterization of noncollagenous matrix molecules on the alveolar bone surface at the initial principal fiber attachment in rat molars

（ラット臼歯主線維の初期付着における歯槽骨表面の
非コラゲン性基質の特性についての免疫組織化学的研究）

学位論文内容の要旨

「緒言」Islam ら(2000)は、主線維が歯槽骨に付着する際に、歯槽骨表面に酸性基質に富み線維に乏しい薄層（接着層）が出現することを見出し、接着層が主線維の歯槽骨への付着を仲介すると示唆した。彼らは組織化学染色により酸性基質はプロテオグリカン（PG）であろうと結論付けた。しかしながらプロテオグリカンの種類、すなわちグリコサミノグリカン（GAG）の種類を決定するまでには至らなかった。近年、免疫組織化学により、非コラゲン性基質、なかでも骨関連酸性糖蛋白質である骨シアロ蛋白（BSP）とオステオポンチン（OPN）が、硬組織形成において基質の石灰化や基質と基質の接着等に密接に関わると示唆されるようになった。これらの酸性糖蛋白質は主線維とセメント質の界面、および再付着した主線維とセメント質あるいは象牙質との界面にしばしば認められている。したがって、BSP と OPN が主線維の歯槽骨への付着にも関与する可能性はあるものの、まだほとんど調べられていない。

本研究は、発生途上のラット臼歯を用いて、非コラゲン性基質のうち、数種の GAG、BSP および OPN の歯槽骨表面での免疫組織化学的局在を調べ、主線維が歯槽骨に付着する際のこれらの役割について考察することを目的とした。

「材料と方法」20 および 25 日齢の雄性ウイスターラットを 4 %パラフォルムアルデヒドで灌流固定し上顎を切り出した。エタノール EDTA (Scott and Kyffin 1978) で脱灰した後、パラフィン包埋した。臼歯の近遠心方向の切片を作成し H-E 染色、細網鍍銀染色を施した。その他の切片は免疫組織化学染色に用いた。コンドロイチン 4 硫酸 (C4S)、コンドロイチン 6 硫酸とコンドロイチン (C6S /C0S)、コンドロイチン、デルマタン硫酸 (DS)、ケラタン硫酸 (KS) のそれぞれに対する抗体（生化学工業）、および BSP と OPN に対する抗体 (LSL 社) を一次抗体として使用し酵素抗体法により免疫染色した。コントロールとして一次抗体の代わりにマウスあるいはウサギ血清を用いた。

「結果」20および25日齢ラットの上顎第二臼歯遠心根に面する歯槽骨表面を観察した。歯槽骨表面を便宜上 Stage I（接着層がまだ形成されていない時期；20日齢ラットの歯槽骨根尖部）、Stage II（接着層が形成されはじめる時期；20日齢ラットの歯槽骨中間部から歯頸部）、および Stage III（接着層が新生骨に埋め込まれた時期；25日齢ラットの歯槽骨歯頸部）の3つの段階に分けた。

組織学的所見

Stage I：歯根膜のコラゲン線維は不規則に配列するのみでまだ主線維として組織化されていなかった。歯槽骨表面には特別な層状構造は認められなかった。

Stage II：歯槽骨表面にヘマトキシリンで濃染し鍍銀染色で染まらない、すなわち線維に乏しい接着層が出現した。歯根膜のコラゲン線維は歯槽骨に向かって規則的に配列し主線維となり一部は接着層に付着した。接着層上にさらに骨が添加しているところもあった。

Stage III：新生骨に埋め込まれた後でも接着層はヘマトキシリンで濃染し線維に乏しい層として観察された。主線維は新生骨に埋め込まれシャープな線維となった。

免疫組織化学的所見

Stage I：歯槽骨は全ての抗 GAG 抗体にほとんど反応を示さなかった。しかし抗 BSP 抗体と抗 OPN 抗体には弱い反応を示した。歯根膜の線維は全ての抗 GAG 抗体、抗 BSP 抗体、および抗 OPN 抗体に中程度の反応を示した。

Stage II：接着層は C4S、C0S、C6S/C0S に対する抗体に反応を示したが、それ以外の抗 GAG 抗体には全く反応せず、抗 BSP 抗体と抗 OPN 抗体には周囲の骨組織よりも強い反応を示した。

Stage III：新生骨に埋め込まれた接着層は抗 BSP 抗体と抗 OPN 抗体に対しては反応を示したが、どの種の抗 GAG 抗体に対しても反応は示さなくなった。

なおコントロール切片では免疫反応は全く認められなかった。

「考察」Islam et al.(2000)は、トルイジンブルー染色と PAS 染色、さらにヒアルロニダーゼによる消化試験の結果から接着層の酸性基質は酸性基をもつ GAG を結合した PG であろうと結論付けた。さらに PG は糊のように働いて主線維を歯槽骨に付着させるとともに、新生骨に埋め込まれた後でも新生骨と古い骨との間に残り両者を接着させると示唆した。

本研究は PG の種類と局在をより詳細に調べるために数種の GAG を免疫組織化学により調べた。基質成分の流出をできるだけ避けるために脱灰液にはエタノール EDTA を使った。その結果、形成初期の接着層にはある種の GAG が含まれるものの、形成が進むにつれて減少し、新生骨に埋め込まれた後では全く消失することが明らかになった。一方、BSP と OPN は形成初期から一貫して接着層に高密度に検出された。これらの所見は基質の接着にはむしろ BSP と OPN が関与し、PG は接

着以外に関わることを示唆している。

硬組織の PG はコラゲン線維の石灰化と関連して詳しく研究されており、PG のなかでも C4S を結合した小さな PG (C4S-PG ; デコリン、ピグリカンなど) が注目されている (Limeback 1991; Goldberg et al. 1995)。C4S-PG はコラゲン線維の gap zone にはまりこみ、C4S は Ca イオンを結合する。石灰化が開始し PG 分解酵素が働くと GAG 鎖が分解されてコア蛋白から離れると同時に Ca イオンが放出される。残ったコア蛋白質はリン蛋白質と結合し、これらのリン蛋白質は遊離した Ca イオンと結合する。周囲のリン酸化基質が酵素で分解されリン酸イオンの濃度が高まると、リン酸と Ca の結合体が gap zone に析出しハイドロキシアパタイトの結晶ができる。これが連続しておこりコラゲン線維が石灰化してゆく。結晶核形成に関与するリン蛋白質が BSP であり、OPN は結晶核形成と結晶の過成長を抑制的に調節する。

しかしながら、接着層はコラゲン線維に乏しいため上述の石灰化様式を適応させるのは難しい。我々は、接着層はコラゲン線維に依存しない様式で石灰化するものと考える。Bosshardt と Nanci(2003)はコラゲン線維を全く含まないセメント粒様構造物に高密度の BSP と OPN を検出し、線維を欠いた条件下でも高密度に集積した BSP と OPN により石灰化は誘導されると示唆した。我々も、コラゲン線維に乏しい条件下で石灰化を進行させるために、初期の接着層にはとりわけ高密度の PG、BSP、および OPN が集積するのではないかと考える。石灰化した組織内では GAG は分解され消失しているために免疫反応は認められなくなるのだろう。

BSP と OPN はそれぞれ石灰化の開始と抑制に関与するが、加えて両者ともコラゲン線維と接着力を持つことが知られている。接着層が形成初期から新生骨に埋め込まれた後までも一貫して両糖蛋白質を含むということは、これらが主線維の初期付着、および新生骨と古い骨の接着に関与することを強く示唆している。このことはセメントラインおよびセメント象牙境のような硬組織同士の接着界面に BSP と OPN が高度に集積するという事実からも支持されるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 脇 田 稔

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 田 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Immunohistochemical characterization of noncollagenous matrix molecules on the alveolar bone surface at the initial principal fiber attachment in rat molars

(ラット臼歯主線維の初期付着における歯槽骨表面の
非コラゲン性基質の特性についての免疫組織化学的研究)

本概要は、主査、副査それぞれが、単独で口頭試問による審査を行い、提出された報告を主査がまとめたものである。審査の方法は、いずれも同じ形式で行った。

1 まず、学位申請論文の内容についての概略の説明を求めた。

本研究は、主線維が歯槽骨に付着する際に、歯槽骨表面に酸性基質に富み線維に乏しい薄層（接着層）が出現し、この接着層が主線維の歯槽骨への付着を仲介する物質が組織化学的に酸性基質はプロテオグリカン（PG）であろうとした研究に着目したことから始まっている。近年、硬組織形成において基質の石灰化や基質と基質の接着等に密接に関わると示唆されている骨関連酸性糖蛋白質である骨シアロ蛋白（BSP）とオステオポンチン（OPN）が主線維とセメント質の界面、および再付着した主線維とセメント質あるいは象牙質との界面にしばしば認められている。このことから、本研究はこれらの付着に関する関与を、発生途上のラット臼歯を用いて、非コラゲン性基質のうち、数種の GAG、BSP および OPN の歯槽骨表面での免疫組織化学的局在を検索し、主線維が歯槽骨に付着する際のこれらの役割について考察することを目的としたものである。

組織学的検索のために、パラフィン包埋した臼歯の切片に、H-E 染色、細網鍍銀染色、ならびに免疫組織化学染色を行って発生に伴う変化を検索した。免疫染色における一次抗体は、コンドロイチン 4 硫酸（C4S）、コンドロイチン 6 硫酸とコンドロイチン（C6S /COS）、コンドロイチン、デルマタン硫酸（DS）、ケラタン硫酸（KS）、および BSP と OPN である。

検索部位は、20 日齢ラットの上顎第二臼歯遠心根に面する歯槽骨表面で、一般組織染色標本と免疫組織標本はともに、接着層の発生段階で 3 つの段階に分けて観察した。すなわち、接着層がまだ形成されていない時期 Stage I、接着層が形成されはじめる時期 Stage II、接着層が新生骨に埋め込まれた時期 Stage III である。

一般組織学的検索では、Stage が進むにしたがって、骨表面でヘマトキシリンに濃染し、線維に乏しい接着層が出現する所見が得られた。また、免疫組織化学的検索では、stage の進行とともに、形成初期の接着層には数種の GAG が含まれるものの、形成が進むにつれて減少し、新生骨に埋め込まれた後では全く消失することが明らかになった。一方、BSP と OPN は形成初期から接着層に一貫してみられ、特に stage III では高密度に検出された。これらの所見から、基質の接着にはむしろ BSP と OPN が関与し、PG は接着以外に関わることを示唆していると考えた。

一方、硬組織のコラゲン線維の石灰化と関連する PG である C4S-PG は、石灰化が開始し PG 分解酵素が働くと GAG 鎖が分解され、Ca が遊離されるとともにコア蛋白が残り、複雑な数段階の反応を経て、リン酸と Ca の結合体が gap zone に析出しハイドロキシアパタイトの結晶ができると言われている。この結晶核形成に関与するリン蛋白質が BSP であり、OPN は結晶核形成と結晶の過成長を抑制的に調節するとされているが、接着層はコラゲン線維に乏しいため上述の石灰化様式を適応させるのは難しい。この点を解決するために、文献的考察を行った結果、接着層はコラゲン線維に依存しない様式で石灰化するものと考えられ、ここからコラゲン線維に乏しい条件下で石灰化を進行させるために、初期の接着層にはとりわけ高密度の PG、BSP、および OPN が集積するのではないかと考えた。石灰化した組織内に免疫反応は認められなくなるのは GAG が分解され消失しているためと推測した。

BSP と OPN はそれぞれ石灰化の開始と抑制に関与するが、加えて両者ともコラゲン線維と接着力を持つことが知られていることから、接着層が形成初期から新生骨に埋め込まれた後までも一貫して両糖蛋白質を含むということが、これらが主線維の初期付着、および新生骨と古い骨の接着に関与することを強く示唆していると結論した、このことは、セメントラインおよびセメント象牙境のような硬組織同士の接着界面に BSP と OPN が高度に集積するという事実も説明すると考える。

以上のように、申請者は、論文記載の図版ならびに関連データを示しつつ、明快に説明した。

2 続いて、論文の内容に基づき記載事項を中心として、研究の全般ならびに関連事項等について口頭で試問を行った。

質問の事項は、下記の通りである。

1. 象牙質—セメント質接着に関する、これまでの問題点。
2. 免疫染色の前処理で用いたコンドロイチナーゼについて。
3. セメント質との界面における BSP、OPN の局在について。
4. GAG、BSP、OPN の産生細胞もしくは由来について。
5. 各ステージにおける石灰化について。
6. コラゲン線維と BSP、OPN の接着について。
7. 接着層にみられる GAGs と、BSP ならびに OPN の役割の違いについて。
8. 象牙質とセメント質の間に接着力が生じる本態について。
9. 骨改造に伴うシャーピー線維の運命について。
10. 今後の研究の発展性ならびに展望あるいは計画。

いずれの質問に対しても、申請者から、文献あるいは資料を示して明快な回答が得られた。特に、今後の研究の展望に関しては、スリランカに帰国後の研究計画等を明確に説明した。

以上から、申請者は博士の学位（歯学）を授与するのにふさわしい能力を有すると判定した。

以上