

# ヒト乳歯の生理的歯根吸収下における 破歯細胞のアポトーシスに関する免疫組織化学的研究

## 学位論文内容の要旨

【緒言】 生理的条件下においてヒト乳歯を吸収する細胞は破歯細胞であり、その特徴として多核、刷子縁の存在、組織化学的には酒石酸耐性酸フォスファターゼ(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)活性の存在が報告されている。これら破歯細胞の特徴は骨を吸収する破骨細胞と同じであることから、破歯細胞と破骨細胞は形態的・機能的に同じ細胞であると考えられている。それゆえ破歯細胞は破骨細胞と同じ起源の多能性造血幹細胞から分化すると考えられており、それらの細胞分化過程は詳細に報告されているに関わらず、生理的条件下におけるこれら細胞の細胞死については不明である。破歯細胞は生理的に乳歯の交換時にのみ出現する細胞であるため、試料作製上の制約から破歯細胞のアポトーシスについての報告はきわめて少なく、Watanabe らが bisphosphonate のウサギへの投与で乳歯を吸収する破歯細胞は免疫組織化学的に TUNEL 陽性の核を示し、TEM にてアポトーシスに特徴的な偏在する核クロマチンが観察されると報告しているのみで、生理的条件下における破歯細胞のアポトーシスの特徴については不明である。生理的交換期にあるヒト乳歯の歯根吸収面は様々な吸収活性状態にある破歯細胞が観察される部位である。この部位の詳細な検索によりアポトーシスを起こしている破歯細胞を観察できるものと考え、生理的交換期にあるヒト乳歯の歯根吸収面を観察部位として用いた。本研究はヒト乳歯歯根表面上にみられる破歯細胞を免疫組織化学的に TUNEL 法と組織化学的に TRAP 染色の二重染色法を行い、生理的条件下における破歯細胞のアポトーシスの特徴について明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】 生理的歯根吸収期に達した乳歯 17 本を試料とした。乳歯は浸潤麻醉下にて抜去後直ちに 4%PA(0.1M リン酸緩衝液, pH 7.4, 4℃)で 24 時間浸漬固定を行い、5%EDTA(4℃)にて1ヵ月間脱灰後、脱水しパラフィン包埋した。試料は歯根吸収面に対して垂直・水平方向から薄切し、5  $\mu$ m 厚の連続切片を作製した。連続切片の中から 25  $\mu$ m 間隔で抽出した切片を HE 染色し、光学顕微鏡で破歯細胞が多数観察された切片の前後の連続切片において、免疫組織化学的に ApopTag®ペルオキシダーゼ *In Situ* アポトーシス検出キットを用いて TUNEL 法を行った後、同一切片上にて組織化学的に基質として Naphthol AS-MX, ジアゾニウム塩として Fast red violet LB salt または Fast blue BB salt を用いたアゾ色素法による TRAP 活性の検出を行った。

### 【結果】

1. 光学顕微鏡観察 交換期の乳歯では破歯細胞は円形の細胞外形をもつ多核の巨細胞として観察され、刷子縁により象牙質上に吸収窩を形成し、核は円形で明るく、核小体を有しているものが大多数であったが、破歯細胞の中には細胞体が括れるような状態を示す複雑かつ不規則な細胞外形を持つものがしばしば観察された。このような破歯細胞の核の中には濃縮像を示すものも観察された。さらに象牙質表面から離れて存在する破歯細胞もしばしば観察された。これらの破歯細胞は円形・楕円形の細胞外形を示し、エオ

ジンに好染する細胞質中には多数の空胞が観察されたが、刷子縁は観察されなかった。細胞体中には 1 個から 3 個の核が観察され、核を含まないものも観察された。破歯細胞の周囲には線維芽細胞や歯髓細胞の他にマクロファージ、好中球、リンパ球など円形細胞浸潤も特徴的に観察された。マクロファージの細胞体中の空胞には、しばしば大小の断片化した核様構造物が含まれている像が観察された。また好中球の細胞体中にも断片化した小さな核様構造物がしばしば観察された。

## 2. 免疫組織化学

### 1) TUNEL+TRAP (Fast red violet LB)

吸収窩上の破歯細胞はジアゾニウム塩の Fast red violet LB 塩により赤色の TRAP 陽性反応を示した。TRAP 陽性反応は破歯細胞の細胞質、刷子縁、刷子縁直下の吸収窩表面に強く観察されたが、破歯細胞の核は通常 TUNEL 陰性を示した。これら破歯細胞の周囲には、しばしば茶褐色の TUNEL 陽性の構造物を含む TRAP 陽性の破歯細胞の断片構造が観察されたが、TRAP 活性反応の赤色と TUNEL 反応の茶褐色との明瞭な識別は困難であった。

### 2) TUNEL+TRAP (Fast blue BB)

吸収窩上の破歯細胞は Fast Blue BB 塩により青色の TRAP 陽性反応を示した。吸収窩上の破歯細胞の核は通常 TUNEL 陰性を示したが、複数の核のうち 1 個の核が TUNEL 陽性を示し他の核が TUNEL 陰性を示す破歯細胞が 1 例ではあるが観察された。

これら TRAP 陽性を示す破歯細胞の周囲には、しばしば茶褐色の TUNEL 陽性の構造物を含む TRAP 陽性の破歯細胞の断片構造が観察され、TRAP 活性反応の青色と TUNEL 反応の茶褐色は明瞭に識別された。これら TRAP・TUNEL 共に陽性を示す構造物は円形・楕円形の外形を有しており、1 個から 3 個までの核を含んでいた。これら構造物には TUNEL 陽性の核 1 個と陰性の核を含まないもの、TUNEL 陽性の核 1 個と陰性の核 2 個のものが観察された。破歯細胞周囲には核を含まない TRAP 活性陽性の断片構造物も幾つか観察された。このような特徴をもつ破歯細胞は今回観察した約 1000 枚の連続切片において観察された約 450 個の破歯細胞の中で 2% の頻度で観察された。さらに TRAP・TUNEL 共に陽性を示す構造物がしばしばマクロファージに貪食されている像が観察された。

【考察】 TRAP・TUNEL 共に陽性反応を示す構造物の存在は生理的条件下において破歯細胞がアポトーシスを起こしていることを示す所見である。生理的条件下における破歯細胞のアポトーシスについてはこれまでに報告がなく、本研究が最初の報告となった。

本研究で観察された象牙質上から離れて観察された TUNEL 陽性と陰性の核を含めても 3 個までの核を持つ TRAP 陽性の構造物と核を含まない TRAP 陽性の構造物の意義について考察する。ヒト破歯細胞の大部分は 10 個以下の核をもつ細胞であると報告している Domon らの破歯細胞の核数の報告に従うと、本研究で観察された 3 個までの核を含む破歯細胞のみがアポトーシスするとは考えにくい。次に核を含まない TRAP 陽性構造物の核を含んでいないことの説明として、これらすべてが破歯細胞の核を含まない細胞体部分の一断面が観察されていると説明することは無理がある。それゆえ TUNEL 陽性の核を含む・含まない TRAP 陽性の構造物は多核の巨細胞である破歯細胞がアポトーシスにより断片化する場合、3 個までの核を含むような大きさのアポトーシス小体を形成することが示唆された。

本研究では HE 染色切片上で様々に異なった変性像を示す核をもつ破歯細胞と TRAP 陽性の構造物中に TUNEL 陽性と陰性の核が混在することを示した。この結果はアポトーシス小体の中でも DNA 変性が生じている核と生じていない核が混在していることを示している。また、一例ではあるが、象牙質上の多核の破歯細胞の核の中で 1 個の核だけが TUNEL 陽性を示す細胞も本研究では観察されたことから、多核の破歯細胞がアポトーシスする場合、核の DNA 変性は個々の核で独立していることが示唆された。

多核細胞である破歯細胞のアポトーシス小体の運命について、本研究ではマクロファージが TRAP・

TUNEL 活性共に陽性の構造物を細胞体内に貪食している像や HE 染色切片で好中球が小さな核様構造物を貪食している像が観察されたことから、多核細胞である破歯細胞の断片化したアポトーシス小体は、その後さらに細かく断片化しマクロファージ以外にも好中球などの単核の食細胞系の細胞に貪食され処理されている可能性があることが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝

副 査 教 授 吉 田 重 光

副 査 教 授 脇 田 稔

## 学 位 論 文 題 名

### ヒト乳歯の生理的歯根吸収下における

### 破歯細胞のアポトーシスに関する免疫組織化学的研究

審査は、審査担当者全員の出席の下に行われた。最初に申請者に提出論文の概要の説明を求め、次いでその内容および関連分野について試問を行った。

審査論文の概要は以下のとおりである。

生理的条件下においてヒト乳歯を吸収する細胞は破歯細胞であり、その特徴として多核、刷子縁の存在、組織化学的には酒石酸耐性酸フォスファターゼ (tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 活性の存在が報告されている。これら破歯細胞の特徴は骨を吸収する破骨細胞と同じであることから、破歯細胞と破骨細胞は形態的・機能的に同じ細胞であると考えられている。それゆえ破歯細胞は破骨細胞と同じ起源の多能性造血幹細胞から分化すると考えられており、それらの細胞分化過程は詳細に報告されているにも関わらず、生理的条件下におけるこれら細胞の細胞死については不明である。破歯細胞は生理的に乳歯の交換時にのみ出現する細胞であるため、試料作製上の制約から破歯細胞のアポトーシスについての報告はきわめて少なく、生理的条件下における破歯細胞のアポトーシスの特徴については不明である。本研究では様々な吸収活性状態にある破歯細胞が観察される生理的交換期にあるヒト乳歯の歯根吸収面を観察部位として用いて、破歯細胞を免疫組織化学的に TUNEL 法と組織化学的に TRAP 染色の二重染色法を行い、生理的条件下における破歯細胞のアポトーシスの特徴について明らかにすることを目的とした。

生理的交換期に達したヒト乳歯 17 本を試料とし、浸潤麻醉下にて抜去後、固定脱灰し、パラフィン包埋後、厚さ 5  $\mu$ m の連続切片を製作した。得られた切片において、ヒト乳歯歯根吸収面上の破歯細胞を組織化学的にアゾ色素法を用いて TRAP 活性反応、免疫組織化学的に TUNEL 法の二重染色法を用いて検出し、光学顕微鏡で観察した。歯根象牙質上で吸収窩を形成している破歯細胞は TRAP 陽性を示したが、これら細胞の大多数は TUNEL 陰性を示した。破歯細胞の周囲には、円形・楕円形の外形を有する TRAP・TUNEL 共に陽性の破歯細胞の断片と思われる構造物がしばしば観察され、その細胞体中には 1 個から 3 個の核が存在していた。さらに TRAP 強陽性で核を含まない構造が観察された。破歯細胞周囲には円形細胞浸潤が特徴的に観察され、マクロファージの空胞内

や好中球の細胞体内に断片化した核様構造物が観察された。以上の結果から、乳歯歯根吸収面のような生理的条件下における破歯細胞のアポトーシスの過程として、多核の破歯細胞がアポトーシスにより断片化する場合、細胞体中の複数の核の DNA 変性は個々の核において独立して起こり、3 個までの核を含む大きさのアポトーシス小体を形成することが明らかとなった。また破歯細胞がアポトーシスにより断片化した構造物はその後さらに細かく断片化し、単核食細胞系の細胞により食食・処理されることが示された。

口頭試問では、本論文の内容とそれに関連した学問分野について質疑応答がなされた。

主な質問事項は、

- ①破歯細胞の多核化について
- ②歯質に接していない破歯細胞について
- ③TUNEL 法について
  - 1)利点・欠点について
  - 2)今回の TUNEL 法の標準手技の設定について
- ④多核細胞のアポトーシスについて
  - 1)多核細胞の 1 核のみが TUNEL 法陽性という現象の意味について
  - 2)多核細胞のアポトーシスのバリエーションについて
- ⑤破歯細胞におけるアポトーシスはいつ起こるのかについて
- ⑥アポトーシス小体と考えられる構造物の出現部位とその意義について
- ⑦破歯細胞の核数と観察された TUNEL 法陽性構造物から導き出される断片化について
- ⑧破歯細胞・破骨細胞の硬組織吸収サイクル（吸収→移動→吸収→移動→・・・）の制御と意義について
- ⑨この 4 年間の研究における失敗について
- ⑩「吸収組織」の一生について
- ⑪今後の展望について

などであり、これらの質問に対し申請者から適切かつ明快な回答が得られた。実験手技についても詳細を熟知しているおり、申請者が関連する分野について幅広い知識を有していることが明らかになった。さらに本研究の発展を見据えた今後の展望について、ならびに発展に必要な研究についての具体的な提示が申請者から示された。

以上のことから、審査担当者全員が、本研究が学位論文に十分に値し、申請者は博士（歯学）の学位を授与するのに十分な学識・資質を有しているものと認めた。