

学 位 論 文 題 名

セメント象牙境の構造と機能に関する組織学的および
免疫組織化学的研究

学位論文内容の要旨

【緒言】

セメント象牙境の組織学的研究は主としてラットを使って行われてきた。これらの研究によれば、セメント象牙境は線維に乏しくヘマトキシリンに濃染し、トルイジンブルー(TB)染色とPAS染色に反応を示す、幅1-2 μ mの層として観察される。最近の免疫組織化学的研究はこの層の主要基質は酸性糖蛋白質(酸性PGs)である骨シアロ蛋白質(BSP)とオステオポンチン(OPN)であることを明らかにし、さらに両者はセメント質と象牙質の接着に密接に関与していることを示唆している。一方、ヒトのセメント象牙境の構造と機能についての報告は少なく不明確な部分も多いが、以下の二つの所見に大別できる。： 1)ラット同様、セメント象牙境は線維に乏しくプロテオグリカン(PGs)に富み、PGsがセメント質と象牙質の接着に関与する、2)セメント質と象牙質の界面には特殊な介在層は存在せず、両者の線維同士が絡み合っており、これによりセメント質と象牙質は固く接着する。1)は光顕、走査電顕の所見だが、PGsの存在については古典的組織化学染色の観察のみからであり、集積する基質がPGsであるか否かは不確実である。2)は透過電顕による所見をもとにしており、限られた領域のみでの観察であるおそれがある。よって、本研究はヒト永久歯のセメント象牙境を光顕と走査電顕を使って、組織学的および免疫組織化学的に広範囲にわたり検索し、セメント象牙境の構造と機能を解明することを目的とした。

【材料と方法】

ヒト下顎第一大臼歯 20 本、下顎小臼歯 10 本を使用した。これらは抜去後ホルマリン溶液中で保管されていたものである。

光顕による観察では、歯を5%EDTAで脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、近遠心方向に厚さ5 μ mの連続切片を作成した。切片にはH-E, TB, PAS, 細網鍍銀染色を施した。さらに免疫組織化学により、BSP, OPN, およびPGsを検出するために数種のグリコサミノグリカン(GAGs), すなわちコンドロイチン 4 硫酸, デルマタン硫酸, コンドロイチン, コンドロイチン 6 硫酸, およびケラタン硫酸の検出を試みた。一部の切片には1%トリプシンを含むリン酸緩衝液で37 $^{\circ}$ C, 12~24時間処理し、TB染色あるいは免疫染色(BSPとOPN)を施した。

走査電顕による観察では、歯をダイヤモンドディスクで近遠心方向に半切し、切断面を砥石で研磨した後、5%EDTAで脱灰した。一部の試料は光顕で使用したトリプシン溶液にて37 $^{\circ}$ C, 72時間処理した。ついでトリプシン処理したもの、無処理のもの両方に通法通り導電染色を施し、脱水、乾燥、蒸着して検鏡した。

【結果】

光顕による観察

無細胞および有細胞セメント質のいずれにおいても、セメント象牙境は周囲セメント質よりもヘマトキシリンに濃染し、TB, PAS染色に反応を示す幅2-3 μ mの層として観察された。鍍銀染色ではセメント象牙境はほとんど染まらず、周囲セメント質に比べて線維に乏しいことが示された。免疫染色ではセメント象牙境は周囲セメント質よりもBSPとOPNに強い反応を示した。しかしながら、

いずれの GAGs もセメント象牙境とセメント質自体に全く反応を示さなかった。15 時間トリプシン処理を行った切片では、無細胞および有細胞セメント質のいずれにおいてもセメント象牙境は TB 染色に染まらなくなり白い線状の隙間として認められ、24 時間処理するとセメント質と象牙質は完全に剥離した。15 時間トリプシン処理した切片ではセメント象牙境は BSP にも OPN にも反応を示さなくなり、白い線状の隙間として観察された。いずれの切片でもセメント質と象牙質自体の構造の変化や破壊は認められなかった。

走査電顕による観察

トリプシン処理していない無細胞および有細胞セメント質のいずれにおいても、セメント象牙境は周囲組織よりもやや滑沢にみえるものの形態的特殊性はほとんど認められなかった。しかし、トリプシン処理で線維間基質が除去されると、セメント象牙境はセメント質と象牙質の線維同士の交織は少なく、線維に乏しい溝として現れた。セメント質と象牙質自体の構造の変化は認められなかった。

【考察】

Yamamoto らは、ヒト歯のセメント象牙境を組織学的、および PAS 染色と TB 染色により組織化学的に観察し、セメント象牙境に含まれる酸性多糖体は PGs に結合している GAGs であり、セメント象牙境でのセメント質と象牙質の接着は線維同士の交織ではなく PGs が接着因子として関わると報告した。本研究結果はこの所見を概ね支持するものであるが、“PGs が接着因子として関わる”という部分は再検討する必要があることを示した。なぜなら PAS 染色と TB 染色は GAGs に特異的ではなく、酸性 GP にも反応するからである。そこで本研究では数種の GAGs、および酸性 GP である BSP と OPN を検索した。結果、セメント象牙境はいずれの GAGs にも反応せず、少なくともこれらと結合した PGs は含んでいないことが示唆された。PGs はコラーゲン線維の石灰化に重要であるが、石灰化の途中で大部分が分解・消失すると考えられている。ラット無細胞セメント質形成でも、GAGs は形成直後のセメント質表面に存在するが、その後消失することが確認されている。ゆえに、ヒトセメント質でも PGs は石灰化過程で分解され、セメント象牙境にもセメント質にも残らなくなると思われる。

一方、BSP と OPN に対してセメント象牙境は強い反応を示した。この反応はトリプシン処理で消失し、さらに長時間の処理でセメント質と象牙質は剥離した。トリプシンは強力な蛋白分解酵素であり、線維間基質は消化するもののコラーゲン線維はほとんど消化しない。このことは、セメント象牙境の接着に関与する酸性多糖体を含む基質は PGs ではなく BSP と OPN であることを示唆している。BSP と OPN は基質同士を接着させる働きがあり、吸収された骨と新生骨との界面(セメントライン)や、シャーピー線維を含む歯槽骨と含まない歯槽骨との界面にも集積することが明らかにされている。これらのことも BSP と OPN がセメント質と象牙質の接着に関与することを支持している。

【結論】

1. 無細胞セメント質と有細胞セメント質の両方で、セメント象牙境は線維に乏しく、酸性多糖体に富む幅 2-3 μm の層として観察された。
2. セメント象牙境は抗 BSP および抗 OPN 抗体に反応を示したが、抗 GAGs 抗体には全く反応を示さなかった。
3. トリプシン処理するとセメント象牙境は抗 BSP および抗 OPN 抗体に対する反応を示さなくなり、さらに長時間処理すると象牙質とセメント質は剥離した。

これらの観察所見から、セメント質と象牙質の接着にはセメント象牙境に高密度に集積する BSP と OPN が接着因子として関与することが示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	川	浪	雅	光
副査	教授	脇	田		稔
副査	教授	吉	田	重	光
副査	助教授	山	本	恒	之

学位論文題名

セメント象牙境の構造と機能に関する組織学的および 免疫組織化学的研究

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

ラットのセメント象牙境の組織学的研究において、セメント象牙境は線維に乏しくヘマトキシリンに濃染し、トリイズンブルー染色とPAS染色に反応を示す、幅1-2 μ mの層として観察されると報告されている。最近の免疫組織化学的研究では、この層の主要基質は酸性糖蛋白質(酸性GPs)である骨シアロ蛋白質(BSP)とオステオポンチン(OPN)であり、さらに両者はセメント質と象牙質の接着に密接に関与していることを示唆している。一方、ヒトのセメント象牙境の構造と機能についての報告は少なく、不明確な部分も多いが、以下の二つの所見に大別できる。すなわち、1) ラット同様、セメント象牙境は線維に乏しくプロテオグリカン(PGs)に富み、PGsがセメント質と象牙質の接着に関与する、2) セメント質と象牙質の界面には特殊な介在層は存在せず、両者の線維同士が絡み合うことによりセメント質と象牙質は固く接着する。1) は光顕、走査電顕の所見だが、PGsの存在については古典的組織化学染色の観察のみで、集積する基質がPGsであるか否かは不確実である。2) は透過電顕による所見をもとにしており、限られた領域のみでの観察であるおそれがある。よって、本研究はヒト永久歯のセメント象牙境を光顕と走査電顕を使って、組織学的及び免疫組織化学的に広範囲にわたり検索し、セメント象牙境の構造と機能を解明することを目的とした。

実験にはヒト下顎第一大臼歯 20 本、下顎小臼歯 10 本を使用した。まず歯を5%EDTAで脱灰後、通法通りパラフィン包埋し、近遠心方向に厚さ5 μ mの連続切片を作成した。切片にはH-E、トリイズンブルー、PAS、細網鍍銀染色を施した。さらにBSP、OPN、およびPGsを検出するために数種のグリコサミノグリカン(GAGs)、すなわちコンドロイチン 4 硫酸、デルマタン硫酸、コンドロイチン、コンドロイチン 6 硫酸、およびケラタン硫酸の検出を試みた。一部の切片には1%トリプシンを含むリン酸緩衝液で37℃、12~24時間処理し、トリイズンブルー染色あるいは免疫染色(BSPとOPN)を施した。走査電顕による観察では、歯をダイヤモンドディスクで近遠心方向に半切し、切削面を砥石で研磨した後、5%EDTAで脱灰した。一部の

試料は光顕で使用したトリプシン溶液にて 37℃、72 時間処理した。ついでトリプシン処理したもの、無処理のもの両方に通法通り導電染色を施し、脱水、乾燥、蒸着して検鏡した。

無細胞および有細胞セメント質の両方で、セメント象牙境は周囲セメント質よりもヘマトキシリンに濃染し、トルイジンブルー、PAS 染色に反応を示す幅 2-3 μm の層として観察された。鍍銀染色ではセメント象牙境はほとんど染まらず、線維に乏しいことが示された。免疫染色ではセメント象牙境は BSP と OPN に強い反応を示したが、GAGs には全く反応を示さなかった。15 時間トリプシン処理を行った切片では、セメント象牙境はトルイジンブルー染色に染まらなくなり白い線状の隙間として認められ、24 時間処理するとセメント質と象牙質は完全に剥離した。また、免疫染色では 15 時間トリプシン処理した切片のセメント象牙境は BSP にも OPN にも反応を示さなくなり、白い線状の隙間として観察された。電顕による観察では、トリプシン処理していないセメント象牙境は形態的特殊性がほとんど認められなかった。しかし、トリプシン処理し線維間基質が除去されると、セメント象牙境はセメント質と象牙質の線維同士の交織は少なく、線維に乏しい溝として現れた。以上より、

- 1) 無細胞セメント質と有細胞セメント質で、セメント象牙境は線維に乏しく、酸性多糖体に富む幅 2-3 μm の層として観察された。
- 2) セメント象牙境は抗 BSP、抗 OPN 抗体に反応を示したが、抗 GAGs 抗体には全く反応を示さなかった。
- 3) トリプシン処理するとセメント象牙境は抗 BSP、抗 OPN 抗体に反応を示さなくなり、さらに長時間処理すると象牙質とセメント質は剥離した。

これらの観察所見から、セメント質と象牙質の接着にはセメント象牙境に高密度に集積する BSP と OPN が接着因子として関与することが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で、論文内容及び関連事項について質疑応答がなされた。主な質問事項として、

- 1) GAGs に対する抗体を 3 種類に限定した理由について
- 2) トリプシン処理がコラーゲン線維に及ぼす影響について
- 3) 臨界点乾燥が標本に及ぼす影響について
- 4) 有細胞セメント質と無細胞セメント質をどのようにして厳密に区別したかについて
- 5) 今後の展望について

などであった。

これらの質問に対し、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究はヒトのセメント質と象牙質の接着には BSP と OPN を含む基質が接着因子として関与することを示し、今後の臨床研究へもつながる重要な指針を与えたことが評価された。

以上のことから本研究の内容は、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するのに値するものと認めた。