

博 士 (歯 学) アンジュマン アラ ヤスミン カーン

学 位 論 文 題 名

A histological and immunohistochemical study of acellular cementogenesis in rat incisors

(ラット切歯無細胞セメント質形成についての組織学的および
免疫組織化学的研究)

学位論文内容の要旨

「緒言」無細胞セメント質の組織・発生学的研究はもっぱらラット臼歯の無細胞セメント質を対象としており常生歯である切歯の無細胞セメント質についての研究は殆どない。本研究はラット切歯を組織学的および免疫組織化学的に観察し、常生歯の無細胞セメント質形成について、特にセメント質と象牙質がどのようにして固く接着するに至るかについて考察することを目的とした。

「材料と方法」21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 で脱灰した後、パラフィン包埋し切歯の唇舌方向の縦断連続切片を作成した。一部の切片は1%トリプシンで37℃、24時間処理した。

一般染色

H-E 染色、細網鍍銀染色、トルイジンブルー染色を施した。トリプシン処理した切片には H-E 染色を施した。

免疫染色

間接酵素抗体法により骨シアロ蛋白 (BSP : bone sialoprotein)、オステオポンチン (OPN : osteopontin)、およびプロテオグリカン (PGs : proteoglycans) の検出を試みた。なお、PGs の検出にはグリコサミノグリカン (GAGs : glycosaminoglycans) を検出することとし、切片をコンドロイチナーゼ ABC で処理した後、2-B-6、3-B-3、および 5-D-4 抗体を用いた。コンドロイチナーゼ ABC 処理後、2-B-6 抗体はコンドロイチン 4 硫酸 (C4S : chondroitin-4-sulfate) とデルマタン硫酸 (DS : dermatan sulfate) を、3-B-3 抗体はコンドロイチン 6 硫酸 (C6S : chondroitin-6-sulfate) とコンドロイチン (COS : unsulfated chondroitin) を、5-D-4 抗体はケラタン硫酸を検出する。トリプシン処理した切片には BSP と OPN の免疫染色を施した。

「結果」上顎切歯舌側面を便宜上、根尖部、中間部、歯頸部の3つに分けて観察した。
無細胞セメント質の構造

歯頸部の厚さ2-3 μm に達したセメント質を観察した。セメント質はヘマトキシリンとトルイジンブルーに染まり、セメント象牙境は最も濃く染まる厚さ1 μm 以下の層として観察された。セメント前質は確認できなかった。鍍銀染色ではセメント象牙境は殆ど染まらず、大部分のシャーピー線維は象牙質に達していないように見えた。

セメント質はBSPとOPNに免疫反応を示し、セメント象牙境が最も強く反応した。GAGsに関してはセメント質表面が2-B-6抗体と3-B-3抗体に反応したものの、セメント質内部とセメント象牙境はいずれの抗体にも反応しなかった。

トリプシン処理後のセメント質とセメント象牙境はヘマトキシリンに対する染色性とBSPとOPNに対する免疫反応を失った。処理によりセメント象牙境が剥離する部位もあった。

無細胞セメント質の発生

根尖部

歯小囊の細胞と線維は Hertwig 上皮鞘に平行に配列していた。象牙質形成の開始とともに上皮鞘は断裂し、歯小囊細胞が断裂部から歯根表面へと侵入するとともに歯小囊の線維配列は乱れ始めた。象牙質の石灰化開始とほぼ同時に石灰化象牙質表面にヘマトキシリンに濃染するセメント質が出現した。線維の一部はこの初期セメント質表面に付着した。初期セメント質はBSPとOPN、および2-B-6抗体と3-B-3抗体に免疫反応を示したが5-D-4抗体には反応しなかった。

中間部

シャーピー線維を含むセメント質が厚さ1-1.5 μm まで成長し、セメント象牙境はヘマトキシリンに濃染し鍍銀染色で染まらない層として識別できるようになった。セメント質は全体がBSPとOPNに対して強い免疫反応を示し、セメント象牙境が特に強く反応するという所見はまだ認められなかった。GAGsについてはセメント質表面が2-B-6抗体と3-B-3抗体に反応したものの、セメント質内部とセメント象牙境はどの抗体にも反応しなかった。

歯頸部

セメント質は歯頸部ではほぼ完成した。組織学的特徴は「セメント質の構造」で既述した。

「考察」Yamamoto et al.(2004)はラット臼歯無細胞セメント質形成について“象牙質の石灰化と同時に、ヘマトキシリンに濃染し、C4S、C6S、C0S、BSP、およびOPNに免疫反応を示す初期セメント質が出現する。ついで主線維が付着し、それにより初期セメント質は線維に乏しい層となる。シャーピー線維を含むセメント質が沈着する

につれ、初期セメント質はセメント象牙境となり GAGs に対する免疫反応を失う。一方、BSP と OPN に対する反応は維持する。完成したセメント質ではセメント象牙境はヘマトキシリンに濃染し、線維に乏しく BSP と OPN に反応を示す層となる。”と報告している。これらの所見から彼らは、1) 初期セメント質の BSP、OPN、およびある種の PGs は初期セメント質の石灰化と主線維の付着に関わる、2) PGs はセメント質の石灰化に伴い消失する、3) BSP と OPN はセメント象牙境に残りセメント質と象牙質の接着に関わる、ことを示唆した。

本研究は切歯無細胞セメント質が臼歯無細胞セメント質と組織・発生学的によく似ていることを明らかにした。このことは本研究で検出された基質は臼歯無細胞セメント質で検出されたものと同様な役割を果たすことを示唆している。本研究は BSP と OPN の接着機能を確認めるためにトリプシンを用いた。トリプシンは強力な蛋白分解酵素であるが線維は殆ど消化しない。トリプシン処理後の BSP と OPN の消失と象牙質の剥離は、セメント象牙境に集積する BSP と OPN が接着材として働く、という考えを支持している。

接着以外に BSP と OPN は硬組織の石灰化の開始と調節にも深く関わる。切歯無細胞セメント質形成においても、両者は初期セメント質の石灰化に特に深く関与すると考えられる。すなわち、石灰化の媒体である線維が初期セメント質には乏しい。そこで BSP と OPN が高度に集積し初期セメント質の石灰化を誘導するのであろう。

本研究では初期セメント質とセメント質表面に GAGs(C4S および/あるいは DS、C6S および/あるいは C0S)を検出した。GAGs は通常 PGs に結合して存在し石灰化において必須であるが石灰化の過程で酵素により殆ど消失すると考えられている。切歯無細胞セメント質でも同様なことが起きているのであろう。

Arambawatta et al.(2006)はラット臼歯部で硬組織間にできる4種類の境界面、すなわち、歯槽骨への主線維の初期付着面、吸収された歯槽骨への主線維の再付着面、骨中のセメントライン、およびセメント象牙境を観察し、これらがほぼ共通の構造、すなわち、線維に乏しく BSP と OPN に富んでいることを明らかにした。この構造は切歯のセメント象牙境のものとも酷似する。

結論として、

- 1) ラット切歯の初期セメント質に現れる BSP と OPN は石灰化と主線維の付着に関わる、
 - 2) 完成したセメント質でセメント象牙境に残存する BSP と OPN はセメント質と象牙質の付着に関わる、
 - 3) セメント象牙境はコラーゲン線維を主体とした硬組織同士の界面と共通する構造と機能を有す、
- 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 進 藤 正 信
副 査 准教授 山 本 恒 之

学 位 論 文 題 名

A histological and immunohistochemical study of acellular cementogenesis in rat incisors

(ラット切歯無細胞セメント質形成についての組織学的および
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。初めに申請者が本論分の要旨を以下のように説明した。

無細胞セメント質の組織・発生学的研究はもっぱらラット臼歯の無細胞セメント質を対象としており、常生歯である切歯の無細胞セメント質についての研究は殆どない。本研究はラット切歯を組織学的および免疫組織化学的に観察し、無細胞セメント質形成について、特にセメント質と象牙質がどのようにして固く接着するに至るかについて考察することを目的とした。

実験には21日齢の雄性ウイスターラットの上顎切歯を用いた。同動物を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、EDTA脱灰後、切歯の唇舌方向のパラフィン連続切片を作成した。一般染色としてH-E染色、細網鍍銀染色、トルイジンブルー染色を施した。骨シアロ蛋白(BSP: bone sialoprotein)、オステオポンチン(OPN: osteopontin)、およびプロテオグリカン(PGs: proteoglycans)を検出するための免疫染色も行った。PGsについてはグリコサミノグリカン(GAGs: glycosaminoglycans)を検出することとし、2-B-6、3-B-3、および5-D-4抗体を用いた。一部の切片には1%トリプシンで処理した後、H-E染色とBSPとOPNの免疫染色を施した。

観察から次の所見が得られた。

セメント質の構造について

- 1) 歯頸部の完成したセメント質は厚さ2-3 μm である。
- 2) セメント象牙境は厚さ1 μm 程度で、ヘマトキシリンとトルイジンブルーに濃染しシャーピー線維を殆ど含まない。
- 3) セメント質にはBSPとOPNが含まれ、特にセメント象牙境に両者は高密度に集積する。
- 4) ある種のPGs(コンドロイチン4硫酸および/あるいはデルマタン硫酸、ならびにコンドロイチン6硫酸および/あるいはコンドロイチンをGAGsとして含む)はセメント質表面にのみ存在する。

5) トリプシン処理により BSP と OPN はセメント象牙境から消失し、セメント質ははがれる。
セメント質の発生について

- 1) 最初のセメント質（初期セメント質）は象牙質の石灰化とほぼ同時に石灰化象牙質表面に出現する。
- 2) 初期セメント質は BSP、OPN、および上述の PGs を含む。
- 3) 主線維は象牙質に直接付着するのではなく、初期セメント質に付着し始める。
- 4) BSP と OPN はセメント象牙境に残存するが PGs は消失する。
- 5) 3) と 4) の結果、初期セメント質は線維に乏しく高密度の BSP と OPN を含むセメント象牙境となる。

ラット臼歯無細胞セメント質においても、セメント象牙境は線維に乏しく BSP と OPN が特に高密度に集積することが確かめられている。本研究は切歯無細胞セメント質の構造、特にセメント象牙境については、臼歯無細胞セメント質のものと組織学的に酷似していることを明らかにした。

BSP と OPN は石灰化の調節、細胞分化、基質同士および細胞同士の接着、細胞と基質の接着等に関わるとされる。本研究は BSP と OPN の基質接着能を確認するために、線維以外の基質は消化するが線維は殆ど消化しないトリプシンで切片を処理した。処理後に BSP と OPN が消失しセメント質が剥離したことから、BSP と OPN がセメント象牙境で接着材として働くことが示唆された。また初期セメント質とセメント質表面にのみ、ある種の PGs が検出された。一般に組織の石灰化過程において、PGs は石灰化に寄与した後に酵素により分解され消失すると考えられている。切歯無細胞セメント質でも同様なことが起きているのであろう。

以上より、結論として、

ラット切歯無細胞セメント質形成において

- 1) BSP と OPN が初期セメント質の基質として出現し、セメント質の石灰化と主線維の歯根への付着に関わる、
 - 2) 完成したセメント質では BSP と OPN はセメント象牙境に残存し、セメント質と象牙質の接着に関わる、
- ことが示唆された。

引き続き審査担当者と申請者の間で質疑応答がなされた。主な質問事項は、

- 1) BSP と OPN のみを接着材とした理由
- 2) セメント象牙境と初期セメント質の組織学的差異
- 3) セメント象牙境の石灰化の程度
- 4) 本研究結果と修復セメント質形成との関連性
- 5) 臨床研究への応用の可能性

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。本研究はセメント質と象牙質の接着機構についての組織学的所見を示し、今後のセメント質再生の研究に重要な指針を与えるものと評価された。

以上により、本研究は歯科医学の発展に十分貢献するものであり、審査担当者全員が学位申請者は博士（歯学）の学位を授与するに値すると認めた。