

〔学位論文〕

矯正学的歯の移動に伴うセメント質関連細胞の細胞死と歯根吸収の組織学的観察

松沢 史宏

北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系 歯科矯正学分野

Histological observation of the cell death of cementum-related cell and the root resorption of the during experimental tooth movement

Fumihiko MATSUZAWA

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, School of Dentistry, Health Science University of Hokkaido.

緒 言

矯正歯科治療における歯の移動は、圧迫・牽引というメカニカルストレスに起因し、圧迫側では骨吸収を、牽引側では骨形成を生じる。矯正歯科の臨床で認められる歯根吸収の多くは、歯根表層あるいは歯根の根尖に限局した小さなものであり、最終的にはセメント芽細胞による吸収窩の修復機転が起き、臨床で大きな問題とはならない。しかし、根尖が広範囲に吸収され、歯に著しい動揺をきたし、歯の機能と安定性に大きな影響を及ぼすことは臨床において稀に見られる。この正力、治療期間の長期化、歯根形態の異常、歯の外傷の既往、舌や口唇の習癖、全身的な代謝障害、ホルモンバランスの異常などのさまざまな要因が歯根吸収に関する危険因子として指摘されている。従来の歯根吸収に関する研究は、吸収の主役を担う吸収系細胞およびそれに関連する硝子様変性組織を対象としたものがほとんどであり、吸収される側のセメント質やセメント質関連細胞（セメント芽細胞とセメント細胞）に着目した研究は行われていない。本研究では、歯根吸収の機序に関して、セメント関連細胞のアポトーシスに伴うセメント関連細胞質の露出および器質的变化がおき、破歯細胞の誘導と歯根吸収がおきるといふ仮説をたて、矯正学的歯の移動に伴う歯根吸収のメカニズムを解析することを目的とした。

材料および方法

生後8週齢のWistar系雄性ラットを用いた。すべての実験動物は、本学動物実験センターにて飼育し、通常の

ラット用固形飼料と水道水を十分に与え、自由摂食させた。

実験装置は8週齢のラットの上顎を印象し、歯科用超硬石こうでラット上顎歯列を再現し、Igarashiら(1994)のを基に新しく作製した。筒状の金属にニッケルチタンワイヤー（直径0.012inch, Rocky Mountain Morita, 東京）を挿入し、筒を圧接しニッケルチタンワイヤーを固定した。その後、切歯の側面に合うように筒状の金属を屈曲し、右側第一臼歯の舌側の遠心部に爪がかかるようにニッケルチタンワイヤーを屈曲し、口蓋側から頬側方向に初期荷重10gの矯正力が発現するように調整した。

ソムノベンチル（共立製薬株式会社）による麻酔下にて、ラット口腔内の上顎前歯近遠心面の歯頸部をダイヤモンドポイントにて切削し溝を形成した。エッチング・ボンディング処理を行った後、ニッケルチタンワイヤーをコンポジットレジンで固定した。初期荷重10gの矯正力が負荷されるように装着した後、12時間、1日、2日、4日、7日、14日間、各5匹ずつ、ラット上顎右側第一臼歯に矯正力を負荷した。

実験的歯の移動終了後、ラットはソムノベンチル（共立製薬株式会社）による麻酔下にて8% paraformaldehyde/0.2M phosphate buffer用いて、上行大動脈より灌流固定を約30分間行った。その後、上顎骨を摘出し同固定液に12時間浸漬した。固定後に10% EDTA脱灰液で4週間の脱灰後、通法に従い脱水処置をした後にパラフィンに包埋した。組織片は、臼歯部咬合平面に平行に厚さ7μmに薄切し連続切片を作製した。

受付：平成24年10月1日

Hematoxilin-Eosin 染色 (H-E 染色), TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色, 酸性ホスファターゼ染色 (TRAP 染色), Single-standard DNA および cleaved caspase 3 抗体による 2 重免疫染色を行い光学顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて組織の観察を行った。

結 果

1. H-E 染色による歯根膜と歯根吸収の経時的変化の観察

歯の移動を行っていない対照群の H-E 染色像では、歯根膜は全周にわたってほぼ一定の幅を示していた。一方、実験群では装置による矯正力の付荷によって、歯根膜が圧迫され狭窄しているのが確認された。荷重付荷 6 時間目で第一臼歯近心根歯根膜に一部圧迫像がみられたが、組織の変性は確認されなかった。荷重付荷 12 時間目には、血流障害により歯根膜細胞が死に至り部分的に細胞成分が消失し、歯根膜がエオジンに好染し、硝子様を呈している。1 日目には硝子様変性組織の範囲が拡大し、歯槽骨の吸収も認められた。その後の 2 日目、4 日目では、硝子様変性組織の範囲の拡大が認められ、セメント質内のセメント細胞の核の消失がみられた。また、硝子様変性組織周囲において歯槽骨の吸収が認められた。さらに 7 日目には硝子様変性組織は吸収され小さくなっており、歯槽骨表面において破骨細胞による骨吸収が、硝子様変性部周囲において破歯細胞によるセメント質の吸収が認められた。14 日目では歯の移動が終了し、血流が回復し硝子様変性は吸収され、全てのラットの歯根膜細胞が再生し歯根膜の幅は対照群と同程度までに回復しているのがみられた。

2. TUNEL 法によるアポトーシスの観察

矯正力が付荷された部位は対照群と比較して、セメント質や歯根膜において 6 時間目から全てのラットで TUNEL 陽性細胞が認められた。その後、全てのラットで TUNEL 陽性細胞は経時的に増加傾向を示し、2 日後まで陽性細胞は増加傾向が続いた。また、2 日目では陽性細胞はセメント質表層に多くみられ、セメント質の表層で TUNEL 陽性細胞が多く認められた。4 日目以降は経時的に TUNEL 陽性細胞は減少傾向を示し、14 日目では歯根膜およびセメント質表層において TUNEL 陽性細胞は認められなかった。

3. single-stranded DNA と activated caspase 3 との免疫二重染色によるアポトーシスの観察

歯の移動を行っていない対照群では single-stranded DNA と activated caspase 3 の反応はみられなかった。し

かし、実験群では、荷重付荷 12 時間目から変性部位の直下のセメント質の表層と歯根膜で赤色蛍光の ssDNA と緑色蛍光の activated caspase 3 の反応がわずかに認められた。また、ssDNA のみに反応している細胞がみられる。

1 日目では、変性部位の直下のセメント質の表層・歯根膜で多くのアポトーシスの反応 (赤色蛍光と緑色蛍光の反応) が認められ、その範囲も拡大していた。2 日目にはセメント質や歯根膜でのアポトーシスの反応が減少していた。また、activated caspase 3 だけに反応している細胞がみられた。その後、4 日目以降はアポトーシスの反応はみられず、セメント質、歯根膜で、圧迫されていた部位での核の回復が認められた。

これらの染色像からアポトーシスの反応は 1 日目がピークであり、その後は経時的に減少することが確認された。

4. TRAP 染色による破歯細胞と破骨細胞の観察

荷重付荷 6 時間・12 時間目では、セメント質や歯根膜、歯槽骨において TRAP 陽性細胞は認められなかった。1 日・2 日・4 日目から変性部位に隣接した歯槽骨表層において褐色に染まった TRAP 陽性細胞の出現が確認された。7 日目から硝子様変性組織の周囲においてセメント質表層に破歯細胞の出現が認められた。さらに 14 日目には破歯細胞の数が増加し、その出現部位は硝子様変性が強く出ていると思われる部位の直下において顕著であり、セメント質の広範な吸収が認められた。

考 察

本研究においては、歯に加重付荷 6 時間目から 2 日目にかけて、硝子様変性組織に隣接したセメント質表層のセメント細胞に核の濃縮、TUNEL 陽性反応細胞の出現、および ssDNA と activated caspase 3 抗体に陽性反応などのアポトーシスの特徴を示す細胞が硝子様変性組織周囲に観察された。虚血により細胞がアポトーシスに陥ることは広く知られていることから、これは本研究で使用した装置によりラット右側第一臼歯に持続的に力が付与され、根尖側は口蓋側に傾斜し歯根膜が圧迫され血流の流れがなくなり、酸素や栄養が細胞に行きわたらなかつたことによるものだと考えられる。これらのことより、歯の移動初期に認められたセメント質細胞の細胞形態の変化は、アポトーシスであると考えられた。また、セメント細胞にアポトーシス反応がみられた後に、セメント質表層に TRAP 陽性細胞が出現しセメント質の吸収がみられた。これは歯を移動させた際の骨吸収の反応とよく類似しており、アポトーシスを起こした部位の近くに破歯細胞が出現していることを考えると、セメント細胞のア

ポトーシスが歯根吸収に関係していることを示唆している。

結 論

実験的歯の移動時の圧迫側におけるセメント細胞の細胞死（アポトーシス）を認めることが出来た。12時間より陽性反応がみられ、1日後にアポトーシス反応を認めた。また、歯槽骨同様にセメント細胞のアポトーシスが生じた後にセメント質の器質的変化が生じセメント質に吸収を引起こされることが示唆された。



松沢 史宏

平成12年3月 北海道医療大学歯学部 卒業

平成24年3月 北海道医療大学大学院歯学研究科博士課程 修了

平成24年4月 北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系 歯科矯正学分野
任期制助手