

を行っているRhoファミリーが関与することが示唆された。

3) すなわち,  $M\phi$ は $O_2^-$ によってその運動性が促進されることが本研究によってはじめて明らかにされた。

したがって, 本研究は歯科医学発展に寄与するところ大であり, 審査の結果, 学位授与に値するものと判定した。

氏名・(本籍)	濱谷 明里 (北海道)
学位の種類	博士 (歯学)
学位記番号	甲 第86号
学位授与の日付	平成12年3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 (課程博士)
学位論文題目	<b>実験的歯の移動に伴うラット歯槽骨骨細胞の細胞死に関する研究</b>
論文審査委員	主査 教授 溝口 到 副査 教授 矢嶋 俊彦 副査 教授 賀来 亨

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

歯に矯正力を加えると, 歯根膜に圧迫力, および牽引力負荷部位を生じる。圧迫側においては, 歯根膜の圧迫による血流の阻害および硝子様変性の出現, マクロファージ系の細胞による変性組織の吸収, そして破骨細胞による歯槽骨の吸収 (穿下性吸収) が起こる。一方, 牽引側では, 歯根膜が牽引されることにより血流が活性化され, 骨芽細胞, 線維芽細胞が増殖し骨形成が行われる。このように, 矯正学的歯の移動は, 外力に対する歯周組織の一連の反応により特徴づけられた生物学的過程である。しかし, 従来の歯の移動に伴う歯周組織の反応メカニズムに関する研究では, 破骨細胞, 骨芽細胞, あるいは線維芽細胞などの歯根膜組織を対象にしたものがほとんどであり, 骨改造過程に重要な役割を担っていると考えられる歯槽骨内の骨細胞の動態に関しては, ほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では, ラットの歯の移動時における圧迫側歯槽骨骨細胞の動態, 特に細胞死についてアクチンおよび核に対する蛍光染色法, TUNEL法, および透過型電子顕微鏡を用いて明らかにすることを目的とした。

### 【材料と方法】

生後8週齢のWistar系雄性ラットを用い, 割田らの方法 (1996年) に準じ, 加工硬化型ニッケルチタン合金ワイヤーを用いて, 初期荷重10gfで上顎左側第一臼歯の近心移動を行った。実験期間は, 歯の移動開始から3, 6, 12時間, 1, 2, 4, 7日とした。なお対照群として, 装置未装着の8週および9週齢のラットを用いた。

実験期間終了後, 4%paraformaldehyde-0.5%glutaraldehyde, 4%paraformaldehyde単独, あるいは2%paraformaldehyde-2%glutaraldehyde固定液で灌流固定を行った。上顎骨を摘出後, 同固定液を用いて4°C下で12時間, 浸漬固定を施した。固定終了後, 10%EDTA溶液で脱灰した後, 通法によりパラフィン, O. C. T. Compound, あるいはEpon-812に包埋し, 水平断のパラフィン切片 (厚さ6 $\mu$ m), 凍結切片 (厚さ30 $\mu$ m), 超薄切片を作製した。パラフィン切片には, Hematoxylin-eosin染色, あるいはTUNEL染色を行った。凍結切片には, Alexa488標識phalloidinによるF-actin染色, ならびに4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI)による核染色を施し, 共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。超薄切片は, 酢酸ウランとクエン酸鉛

にて染色を施した後、透過型電子顕微鏡により観察した。なお、観察部位は歯の移動群において硝子様変性組織が出現する上顎左側第一臼歯遠心頬側根の近心側歯槽骨部とした。

## 【結 果】

### (1) 光学顕微鏡所見

歯に荷重負荷後3時間で、第一臼歯遠心頬側根近心歯根膜の幅の減少が認められ、6時間ではエオジン好性の硝子様変性組織が出現していた。その後、硝子様変性組織の範囲の増加が認められたが、4日後から変性組織周囲に存在するマクロファージ系の細胞による吸収がみられ、7日後には変性組織はほぼ消失していた。変性組織に隣接する骨組織についてみると、荷重負荷後6時間で、歯槽骨骨細胞の一部に核の濃縮の所見が、12時間では核の断片化が認められた。1日では、核、細胞質の変化とともに一部の骨細胞の消失がみられ、2日、4日では、骨細胞の消失範囲がさらに広がっていた。また、6時間以降、変性組織に対応する歯槽骨骨細胞の一部にTUNEL陽性反応が認められた。

### (2) 共焦点レーザー顕微鏡所見

本法における所見としては、荷重負荷後6時間で変性組織に対応する歯槽骨骨細胞の一部に核の濃縮、断片化がみられたが、歯槽骨表面の細胞との突起のコンタクトは存在した。12時間では、骨細胞の突起の消失、および細胞質の染色性の低下がみられた。1日では、核の断片化、細胞質に変化のみられる細胞が多くみられるようになるのに加えて、骨細胞の染色性の消失も認められた。2日では、骨細胞の消失範囲がさらに広がっていた。

### (3) 透過型電子顕微鏡所見

荷重負荷後6時間以降、一部の骨細胞においてクロマチンの凝縮、核の断片化、細胞の断片化などアポトーシスに特徴的な像が観察され、これらの所見は12時間、1日で最も顕著に認められた。また一部には、ミトコンドリアの膨化および細胞質の破壊を示すネクローシス様の形態学的特徴も認められた。特に2日以降の骨細胞においては、アポトーシスを起こしたと思われる細胞の細胞小器官がネクローシスの特徴を示す細胞も観察された。2日以降は、骨細胞の消失した空の骨小腔の増加が認め

られた。

## 【考 察】

本研究において、硝子様変性組織に隣接した歯槽骨骨細胞にクロマチンの凝縮や核および細胞の断片化(apoptotic body)、TUNEL染色陽性反応などアポトーシスの特徴が観察されたことから、歯の移動初期に認められた細胞形態の変化はアポトーシスの過程であることが示された。

歯の移動後2日において、コラーゲン線維と細胞残渣を含んだ骨小腔の存在や核の断片化とミトコンドリアの膨化、細胞質の破壊が共存する細胞が認められた。これらの所見は、最近報告されている二次的なネクローシス(secondary necrosis)に類似した所見であった。一般的にアポトーシスの生物学的意義として、apoptotic bodyの貪食による細胞内の物質の放出の抑制が指摘されている。しかし、骨細胞はその周囲を石灰化基質に囲まれた状態で存在しており、通常のアポトーシスに認められるようなマクロファージなどの隣接細胞による貪食は起こりにくい環境にある。従って、骨組織における細胞死においても同様の細胞死のシステムが生じている可能性が考えられる。

骨組織の細胞死の原因としては、硝子様変性組織の出現による骨細胞への栄養供給やある種の化学的シグナルの伝達の消失が考えられるが、この点に関しては今後検討していく必要がある。またNobleら(1997年)によると、骨改造が盛んな幼若骨や変形性関節症に関連して骨細胞のアポトーシスがみられることから、骨細胞のアポトーシスは、骨の改造、あるいは骨組織の脆弱性と関連していることが指摘されている。本研究において細胞死が認められた領域は、最終的には変性組織周囲からの穿下性骨吸収によって吸収する運命にある。従って、歯の移動に伴う骨吸収機転と骨細胞の細胞死は、密接な関連性があるものと考えられる。

## 【結 論】

実験的歯の移動に伴い、硝子様変性組織に隣接する歯槽骨骨細胞にアポトーシスとネクローシスを介した細胞死が生じることが明らかとなった。

## 学 位 論 文 審 査 の 要 旨

本論文は、ラットの歯を移動させた際の圧迫側歯槽骨骨細胞の動態、特に細胞死における形態学的変化についてアクチンおよび核に対する蛍光染色法、TUNEL法、および透過型電子顕微鏡を用いて明らかにしたものであ

る。

従来の矯正学的歯の移動に関する基礎的研究では、歯根膜組織に存在する細胞がその観察対象とされており、骨改造には重要な役割を担っていることが指摘されてい

る歯槽骨骨細胞に着目した研究は、皆無であった。この点は、本研究の独創性を示すものであり、本研究で確立した骨細胞の観察方法によって、歯の移動時の圧迫側歯槽骨骨細胞に細胞死が認められることを立証したことは、高く評価できる。

本研究では従来観察が困難であった骨細胞の観察方法として、Alexa 488標識 phalloidin と 4', 6-diamino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) による蛍光染色法を確立した。この方法は、従来のAlexa標識抗体と propidium iodide (PI) による染色法では困難であった細胞突起の染色性に非常に優れており、骨細胞の詳細な観察を容易にした。また、骨細胞の細胞死を証明するために、併せてTUNEL法、電子顕微鏡による観察を行って

おり、その所見は、細胞死が生じていることを裏付けしていると判断される。

以上のことより、本研究で確立した実験方法を用い、ラットの歯の移動時、歯槽骨骨細胞においてアポトーシスとネクローシスを介した細胞死が認められることを立証したことは、矯正学的歯の移動における生物学的メカニズムに大きく寄与するものと考えられる。また、今後の展開として、共焦点レーザー顕微鏡から得たデジタル情報を3次元解析ソフトにより画像処理することによって、骨細胞の短期的形態変化を3次的に詳細に観察することも可能になると考えられる。このことは、歯科医学・医療の発展に寄与するところ大であり、よって博士(歯学)の学位授与に値するものと考えられる。

氏名・(本籍)	金子 寛 (北海道)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	乙 第46号
学位授与の日付	平成12年3月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(論文博士)
学位論文題目	貴金属合金に対する接着性加熱重合型レジンの接着強化法 —内部酸化粒子とSnO酸化皮膜の応用—
論文審査委員	主査 教授 平井 敏 博 副査 教授 大野 弘 機 副査 教授 坂口 邦 彦

## 論文内容の要旨

### I. 緒 言

近年の著しい接着技法の進歩は歯科治療にも多くの変革をもたらしている。義歯補綴治療においては、各種金属表面処理材料や4-META系接着性レジンなどの開発によって、非貴金属合金に対しては十分な接着性が得られるようになった。このため、金属床義歯においては、金属とレジンの境界部での応力集中による破損や剝離、着色汚染による義歯臭の発生などの問題が改善された。さらに、非貴金属合金に比較して適合性および耐食性などに優れ、生体に対する為害性も少ない貴金属合金については、種々の貴金属合金の表面処理法が開発され、常

温重合型レジンに対しては、ほぼ十分な接着性が得られるようになった。しかし、義歯床用材料として広く用いられ、常温重合型レジンよりも理工学的性質に優れた加熱重合型レジンと床用貴金属合金との接着に関する報告は極めて少なく、その臨床応用も未だ十分にはなされていない。

本研究では、高温酸化現象を利用して、貴金属合金と4-META含有接着性加熱重合型レジンとの接着性を強化するための新しい接着法を確立することを目的とした。