

学位研究紹介

ラット歯根膜におけるカテプシン B, L の局在に関する免疫組織化学的研究 Immunohistochemical demonstration of cathepsin B and L in periodontal ligament (PDL) of rat molar

新潟大学歯学部歯科矯正学講座

竹山 雅規

Department of Orthodontics,

Niigata University Faculty of Dentistry

Masaki Takeyama

緒 言

矯正治療における歯の移動のメカニズムを理解する上で、歯根膜線維の改変機構を解明することは重要である。歯根膜線維の主体であるコラーゲン線維の改変については、線維芽細胞が合成分泌だけではなく分解も行うこと、さらにその分解にはカテプシン B, L が関与することが示唆されている。しかし、これまでカテプシン B, L の歯根膜線維芽細胞内での局在や、それらの酵素と歯根膜の改変との関係について形態学的に示したものはない。そこで本研究では、歯根膜線維の改変におけるカテプシン B, L の役割について形態学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。

材料と方法

生理的移動時の歯根膜における検索には 8 週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。固定後、上顎骨を摘出し、脱灰後、通常に従いパラフィンに包埋した。咬合面に平行な水平断および矢状断連続切片を作成後、SABC 法によるラットカテプシン B, L, およびマクロファージ系細胞のマーカーである ED1 の免疫組織化学的検出、さらにアゾ色素法による酸性ホスファターゼ (ACPase) 活性、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性の検出を行った。一部の試料はエポン切片を作成し、電子顕微鏡で微細構造の観察とカテプシン B, L の局在の検出を行った。

実験的移動時の歯根膜における検索には 7 週齢の動物を用いた。Waldo の方法に準じて上顎第一、第二臼歯間にゴム片を挿入、4、7 日後に固定し、生理的移動群に準じて、パラフィンまたはエポンに包埋した。矢状断パラフィン切片でカテプシン L, ED1 の免疫組織化学的検出、ACPase 活性の酵素組織化学的検出を行うとともに、エポン切片で微細構造学的な検索を行った。

結 果

生理的移動時の歯根膜におけるカテプシン B, L を有する細胞の検索

生理的移動時の歯根膜では、カテプシン B および L の局在が歯槽骨表面の大型で多核の破骨細胞、歯根膜中の血管周囲に観察される単核細胞、さらに歯根膜中に散在する多数の紡錘形単核細胞に認められた。また、ED1 による免疫反応は、歯槽骨表面の破骨細胞と血管周囲の単核細胞に観察され、これらの局在はカテプシン B, L を有する細胞の局在の一部と一致していた。さらに ED1 で認識される単核細胞の一部は TRAPase 活性を示したが、一部は活性を示さなかった。

電子顕微鏡で観察すると、歯根膜中に ER-Golgi 系の発達した線維芽細胞が多数見られ、一部の線維芽細胞の細胞質では取り込まれたコラーゲン細線維が認められた。また歯槽骨近傍では、多数のコラーゲン細線維を取り込んだ線維芽細胞も観察された。線維芽細胞内部のコラーゲン細線維は、電子密度の高い紡錘形の構造物として観察され、その一部はライソゾーム顆粒内に認められ、両者の融合像と考えられた。また、カテプシン L の局在を観察すると、紡錘形の線維芽細胞内のライソゾーム顆粒と思われる楕円形の構造物に反応が検出された。カテプシン L の局在するライソゾーム顆粒の一部は、細胞内部に取り込まれたコラーゲン細線維の近傍やコラーゲン細線維に隣接して観察された。また、コラーゲン細線維を含むライソゾーム顆粒でもカテプシン L が検出された。線維芽細胞内のこのようなライソゾーム顆粒ではカテプシン B の局在を示す反応も認められ、その一部は細胞内のコラーゲン細線維と隣接していた。

歯根膜中の血管周囲の円形または紡錘形のマクロファージ内部には、多数のライソゾーム顆粒が観察され、カテプシン L の局在を示す反応が認められた。細胞内にコラーゲン細線維を含むマクロファージは認められなかった。

歯槽骨表面の破骨細胞では、細胞内部の楕円形の小胞の一部と歯槽骨表面に面して複雑に細胞膜の陥入した波状縁に、電子密度の高いカテプシン L の局在を示す反応が認められた。

実験的移動時におけるカテプシン L, ACPase 活性, ED1 が検出される細胞の分布の変化

矢状断パラフィン切片で第二臼歯根間中隔の近遠心の歯根膜を観察すると、カテプシン L を有する単核細胞は、生理的移動時では破骨細胞の近傍で密度が高くなる

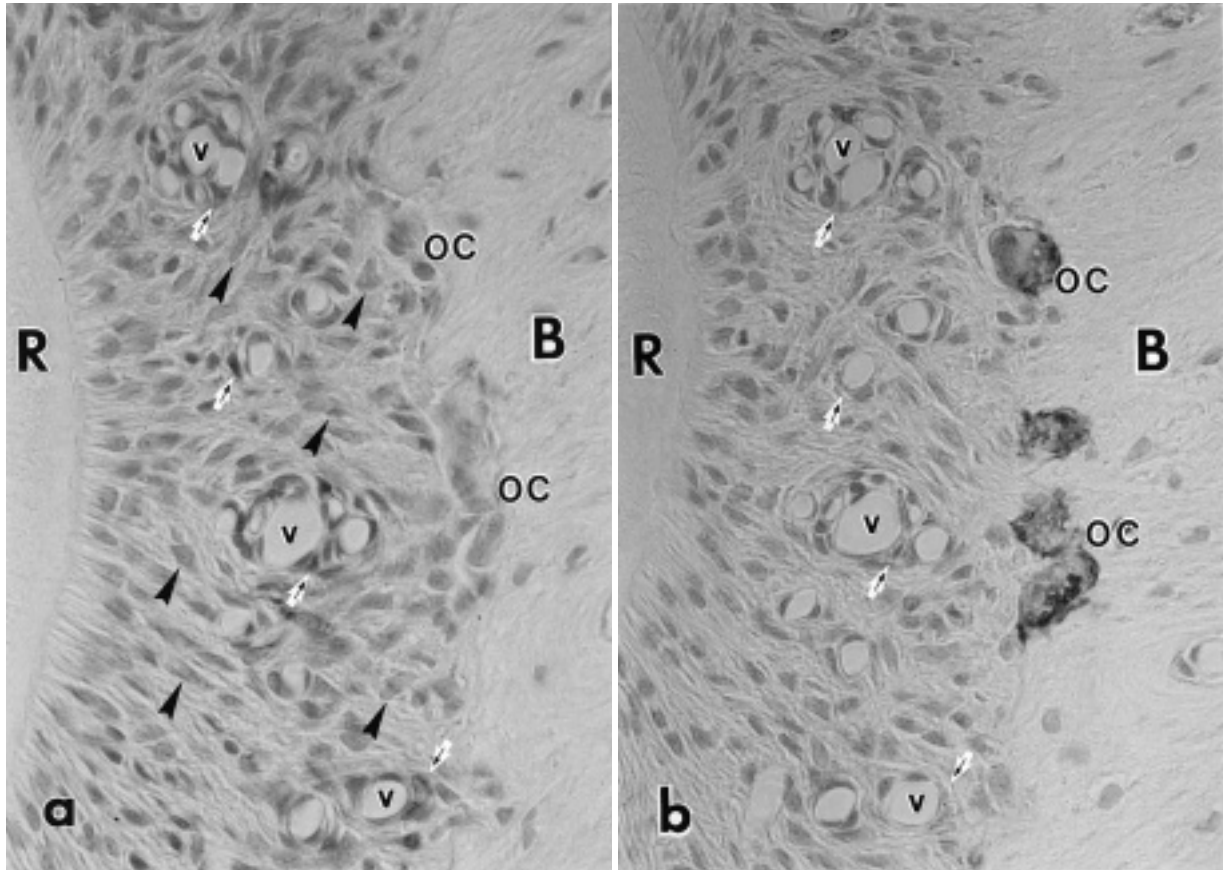


図 連続切片で生理的に遠心移動している上顎白歯歯根膜遠心側のカテプシン L および ED1 の局在を免疫組織化学的に検出して比較した光学顕微鏡写真。

a: カテプシン L の局在は、歯槽骨 (B) 表面に認められる大型で多核の破骨細胞 (OC)、歯根膜に多数認められる血管 (V) の周囲に観察される単核細胞 (矢印)、さらに歯根膜中に散在する多数の紡錘形単核細胞 (矢頭) に認められた。

b: a の連続切片。ED1 の局在は、歯槽骨表面の破骨細胞 (OC) と血管 (V) 周囲の単核細胞 (矢印) に認められた。

B: 歯槽骨, R: 歯根

傾向が認められたものの、全体的には近遠心ともに歯根膜中に均等に分布しており、歯槽骨近傍を除くと、近遠心的な差は明確に認められなかった。一方、Waldo 法で 4 日間実験的に歯を移動すると、カテプシン L を有する単核細胞は歯根膜中に均等に分布し、近遠心的な差はほとんどみられないが、生理的移動時の歯根膜中に認められたものと比較して増加していた。生理的移動時では、牽引側に相当する遠心根近心側に、ACPase 活性を示す細胞はほとんど認められなかった。一方、圧迫側に相当する近心根遠心側には、歯根膜中の多数の単核細胞に ACPase 活性が認められ、同じ部位のカテプシン L を有する細胞の分布と同様であった。実験的に歯を移動すると、近心根遠心側だけでなく遠心根近心側にも、多数の紡錘形単核細胞に ACPase 活性が認められた。ACPase 活性が認められる細胞の数は実験的移動で全体的に増加し、特に遠心根近心側では近心根遠心側と同程度まで増加しており、カテプシン L を有する単核細胞数と近似した値となった。ED1 の局在は、生理的移動時では血管周囲

の細胞にわずかに認められるのみで、実験的に移動を行っても細胞数に明確な変化は認められなかった。

コラーゲン細線維を取り込んでいる線維芽細胞数やコラーゲンの取り込み量を電子顕微鏡で検索したが、生理的移動時と実験的移動時との間に差は認められなかった。

考 察

本研究結果から、歯根膜では破骨細胞やマクロファージ系細胞の他に、線維芽細胞にカテプシン B, L の局在が認められること、そのような線維芽細胞のコラーゲン含有ライソゾーム顆粒に一致してカテプシン B, L の局在が認められることから、それらの酵素によるコラーゲンの細胞内分解が強く示唆された。また、カテプシン L を有する線維芽細胞の分布から、歯根膜線維の改変は歯根膜の全層で行われているものの、破骨細胞周辺では活発であることが示唆された。さらに矯正力に反応して、ライソゾーム酵素の活性化も含めて歯根膜線維芽細胞による歯根膜の改変が活性化されることも示唆された。