

Histological evaluation of periodontal ligament in
response to orthodontic mechanical stress in mice
(歯科矯正学的メカニカルストレスによる
マウス歯周組織改造における細胞動態)

金子 圭子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員：川上 敏行 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士（歯学）学位申請論文

Histological evaluation of periodontal ligament in response
to orthodontic mechanical stress in mice

KEIKO KANEKO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Toshiyuki Kawakami)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph. D. (in Dentistry)

【目的】

歯周組織改造時の細胞の動態を包括的に明らかにするため、歯科矯正学的メカニカルストレスを負荷し、歯周組織の細胞数の経時的変化を測定し、細胞の供給源を特定と骨髄由来細胞が歯周組織構成細胞に分化するのかを追究した。

【方法】

8週齢のddY系雄性マウス10匹を用い、Waldo法によって上顎第一、第二臼歯間にラバーダムを挿入、ストレスを3時間負荷した。負荷を解除して1週間まで病理組織学的に検討し、当該部歯周組織の圧迫側と牽引側における歯周組織内の細胞数を計測した。7週齢のGFPトランスジェニックマウスから骨髄移植を受けたGFPマ

ウス10匹を用い、同様の方法でストレスを3時間負荷した直後から6か月経過した標本に各種免疫染色を施し、GFP陽性の移植骨髄由来の細胞の発現の様相を観察し、細胞分化の様相を明らかにした。なお、GFPマウス由来骨髄由来細胞の調整は、GFPトランスジェニック動物をエーテル麻酔化にて屠殺し大腿骨を摘出し、骨髄細胞を採取した骨髄細胞を抗生剤を含む培地で洗浄後、HBBSに置換、GFPマウスと同系の7週齢雄マウスにX線照射を行った後、尾静脈から骨髄細胞を移植した。対照は、無処置の同種歯根膜部を使用した。免疫染色は、抗GFP抗体にAnti-GFP antibody-ChIP Grade ab 290を用い、5,000倍に希釈し、4℃でovernight反応させた。二次

抗体として、抗ウサギポリクローナル抗体と反応させ、PBSで洗浄後、発色はDABにより行った。GFPに関しては病理組織学的検討と同様の方法で、陽性細胞占有率で計測した。

蛍光二重染色には、抗GFP抗体はヤギポリクローナル抗体を用い、抗CD31抗体、抗CD68抗体、およびRunx2抗体を用いて、GFPと組み合わせで行った。一次抗体を4℃でovernight反応させた。二次抗体としてAlexa Fluor[®]568 Labeled Donkey Anti-Goat IgG Antibodies およびAlexa Fluor[®]488 Labeled Donkey Anti-Rat IgG Antibodies[®]をCan Get Signal[®]で200倍に希釈して室温で60分間反応させ、DAPI 1 µg/ml 3分間反応させた。PBSで洗浄後に封入した。

【結果】

負荷を解除し3日経過した組織像は、牽引側で著明に細胞が増加していた。1週間経過したものでも、紡錘形の細胞が目立つ対照群と比べ、円形の細胞が新たに出現し、圧迫側と牽引側ともに確認できた。圧迫側では、対照群に比べ、継続して細胞数が増加していた。牽引側では、対照群との比較では大きく増加していた。GFP骨髄移植マウスを用いた実験系では、経時的にGFP陽性細胞数は、負荷直後から6か月まで緩やかに増加していた。免疫染色を行ったGFPマウスにおけるGFP陽性骨髄由来の細胞は、円形、紡錘形など多様な形態を呈していた。本来、GFP陽性細胞

は、未分化間葉系の細胞であるため、形態は円形をしているが、今回の実験では紡錘形、多角形の細胞もあった。また、血管腔を形成するように染色された細胞があった。これらのGFP陽性細胞は、CD31、CD68、Runx2などとの蛍光二重染色により、マクロファージ、破骨細胞、血管内皮細胞、歯根膜線維芽細胞等に分化していることが明らかになった。

【考察】

今回の実験で、歯科矯正学的メカニカルストレスは、圧迫側、牽引側ともに歯周組織における細胞数の増加を促すことが示唆された。細胞増加が短期間で起きている点から、細胞が歯周組織で増殖し、構成細胞へ分化しているとは考えにくい。GFP陽性細胞は、ストレス負荷直後では緩やかな発現であったが、数週間で上昇し、6か月には著明に増加したことから、骨髄由来細胞が長期間にわたり歯周組織へ供給されたと考えられる。蛍光免疫二重染色は、CD31陽性細胞の一部はGFP陽性を呈し、骨髄由来細胞が血管内皮細胞に移動、分化したことが明らかになった。さらに、CD68の結果も同様であった。歯根膜線維芽細胞に特異的に発現しているRunx2に着目した実験では、GFP陽性細胞とRunx2を重ね合わせた二重陽性細胞が認められ、その形態が長紡錘形をしていることから、GFP陽性の骨髄由来の歯根膜線維芽細胞だと判明した。