

〔原著〕 松本歯学 29: 59~65, 2003

key words : periodontal ligament — dendritic cell — tooth movement — TRAP — immunohistochemistry

歯の移動による歯根膜樹状細胞の分布変化

川原 一郎, 小澤 英浩

松本歯科大学 総合歯科医学研究所 硬組織疾患制御再建学部門

栗原 三郎

松本歯科大学 歯科矯正学講座

井上 勝博

松本歯科大学 口腔解剖学第一講座

Changes in the distribution of the dendritic cells in the periodontal tissue remodeling
by movement of the rat molar

ICHIRO KAWAHARA and HIDEHIRO OZAWA

Division of Hard Tissue Research, Institute for Oral Science, Matsumoto Dental University

SABURO KURIHARA

Department of Orthodontics, Matsumoto Dental University School of Dentistry

KATSUHIRO INOUE

Department of Oral Anatomy I, Matsumoto Dental University School of Dentistry

Summary

This study was done to clarify the spatial distribution of dendritic cells, macrophages, osteoclasts and monocyte–macrophage cells in the periodontal ligament of the rat maxillary molar due to incident tooth movement. Tartrate resistance acid phosphatase (TRAP) enzyme histochemistry and immunohistochemistry with OX6 and ED1 monoclonal antibodies were used. Intense reactions for TRAP were localized in both multinucleated and mononucleated cells in the periodontal ligament located on the periphery of tissues affected during physiological bone resorption due to the physiological migration of the molar teeth. Immunohistochemical staining with OX6–monoclonal antibody, which recognizes antigen–presenting cells such as dendritic cells and macrophages, revealed the localization of immunopositive cells predominantly in the portions of the periodontal ligament that showed only trace reactions to TRAP.

On the other hand, when the rat maxillary first molar tooth of rat was moved mesially by Waldo's method for 3 or 7 days, changes occurred in the distribution of dendritic cells in the periodontal ligament. New dendritic cells appeared in the tension side of the periodontal ligament after 3 days of experimental tooth movement, suggesting that the periodontal dendritic cells of supported remodeling of the periodontal tissues in tooth movement.

はじめに

歯の移動時には、歯根膜の圧迫側の歯槽骨は破骨細胞によって吸収されるとともに牽引側では骨の添加が起こり歯を支持している。歯槽骨の吸収現象については多くの報告がみられるが^{1,2,3,4,5)}、歯の移動に関連した骨添加現象についての報告は少ない⁶⁾。さらに、歯の移動現象と関連する免疫系の動態については歯根膜樹状細胞、マクロファージ系の免疫担当細胞に関して報告がみられるものの^{7,8,9)}、その多くは歯根膜組織の改造現象に伴った廃物処理のための免疫担当細胞について論じているに過ぎない。

我々はラット歯根膜に抗原提示細胞である樹状細胞が多く存在し、しかも破骨細胞との関連性が強いことを報告した¹⁰⁾。さらに、歯根膜知覚神経線維の増殖との関連¹¹⁾や、マクロファージ系細胞が放出する IL-1 との関連についての報告¹²⁾もみられ、歯根膜樹状細胞が従来知られている抗原提示細胞としての機能以外に、歯根膜組織の増殖にも関与し、歯根膜の恒常性維持の働きを持つ可能性が示唆されている。

そこで、本研究では歯根膜の抗原提示細胞、中でも骨吸収系細胞と同様に単球から分化する樹状細胞の動態について、MHC Class II 分子を認識する OX 6 モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学法にて樹状細胞を同定し、力学的負荷による歯の移動と関連付けて検討した。

材料と方法

実験動物として、ヒトと類似した有根歯を持つ Wistar 系雄性ラット（4～6 週齢）の上顎臼歯を用いた。ラットは対照群と実験群（3 日群、7 日群）に分けそれぞれ 5 匹ずつ用いた。

実験群ラットには Waldo の方法¹³⁾を用いて上顎第一、第二臼歯間にエラストリックゴム片（0.5 mm 厚）を挟み、第一臼歯を近心へ、また第二臼歯は遠心へ傾斜移動させた。実験群ラット

は実験開始後 3 日、7 日で、対照群ラットと同時にネンプター麻酔下にて灌流固定した。試料は、4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝溶液（pH 7.4）を固定液に用いて、左心室から灌流後、上顎大白歯部を歯槽骨と一塊に切り出し、さらに 24 時間の浸漬固定を行った。りん酸緩衝液にて洗浄後、5% EDTA 水溶液（4℃）にて脱灰した。それぞれの試料は、上顎第一臼歯を歯槽骨とともに 20 μ m 厚で水平方向の凍結切片とした。

免疫組織化学法による染色には、以下の各種抗体を用いて、avidin-biotin peroxidase complex (ABC) 法^{14,15)}に従った 0.03% H_2O_2 メタノール溶液にて内因性ペルオキシターゼをブロックし、0.002% H_2O_2 、0.05% DAB Tris 緩衝液にて発色させた。

一次抗体として、MHC Class II 分子を認識する OX 6 モノクローナル抗体¹⁶⁾（5000 倍希釈、室温、2 時間）と単球由来の細胞膜付着分子を認識する ED 1 モノクローナル抗体¹⁷⁾（500 倍希釈、室温、2 時間）をそれぞれ用いた。

10 mM 酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 活性と OX 6 免疫組織化学法の二重染色は、上記の免疫組織化学法による OX 6 モノクローナル抗体の免疫組織化学法を三次抗体まで施した後、TRAP を Azo 色素法¹⁷⁾にて検出し（37℃、30 分間）、その後 OX 6 免疫反応を DAB にて発色させた。

また、実験群 3 日目の試料の一部はパラフィン包埋し、通法に従ってアザン染色標本とした。

結 果

対照群ラット上顎第一臼歯歯根膜においては、OX 6 陽性細胞と TRAP 活性陽性細胞の分布がみられ、遠心領域歯根膜には TRAP 活性陽性の多核大型の細胞が多く認められた（図 1）。これらの TRAP 活性陽性細胞は歯槽骨表面に多く見られるものの、骨表面から少し離れた歯根膜線維中にも比較的小型の TRAP 活性陽性の細胞が認め

られた。一方, TRAP 活性の弱い歯根膜領域では, 黒染色される OX 6 陽性細胞が認められた。これらの OX 6 陽性細胞は TRAP 活性の弱い歯根膜領域で, さらに歯根膜の毛細血管よりも歯根に

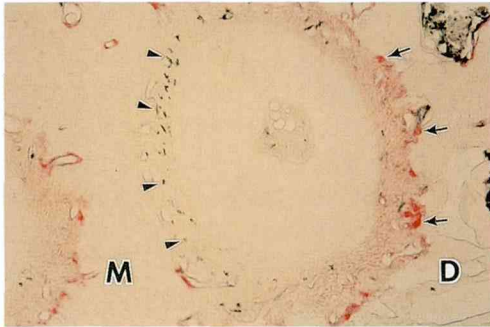


図 1 : 対照群ラット上顎第一臼歯歯根膜の OX 6 免疫組織化学法と TRAP 酵素組織化学法の二重染色像。

赤く染色された TRAP 活性を示す細胞が遠心側歯根膜 (右側) に局限して存在している。強い TRAP 活性を示し破骨細胞と考えられる大型の細胞 (矢印) が歯槽骨に近接して多く認められる。一方, 黒く染色された OX 6 免疫陽性細胞 (矢頭) は, 歯根膜の TRAP 反応の弱い領域の tooth-related zone に分布していることが認められる。M : 近心方向 D : 遠心方向 拡大倍率 X 90

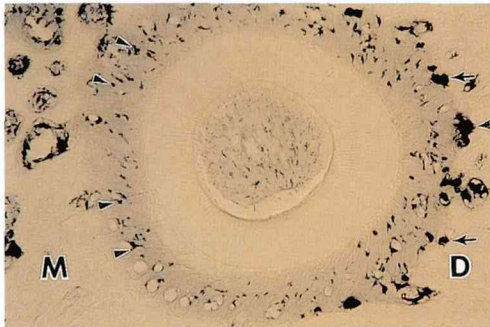


図 2 : 対照群ラット上顎第一臼歯歯根膜の ED 1 免疫染色像。

歯根膜全域に黒く染色された ED 1 免疫陽性細胞が認められる。遠心側歯根膜には ED 1 免疫陽性の大型の細胞 (矢印が歯槽骨に近接して存在している。また, 大型の免疫陽性細胞の周囲には, 小型, 卵円形を呈する ED 1 免疫陽性細胞が多く認められた。近心歯根膜に見られた ED 1 免疫陽性細胞は) (矢頭), 比較的小型で歯根膜の tooth-related zone に多く認められた。M : 近心方向 D : 遠心方向 拡大倍率 X 90

近い領域 (tooth-related zone) に多く分布している様子が認められた。

対照群ラット歯根膜における ED 1 モノクローナル抗体陽性細胞の分布をみると (図 2), ED 1 陽性細胞は歯根膜における分布細胞数としては, ほぼ均一であった。しかし, 近心領域の歯根膜と遠心領域の歯根膜における ED 1 陽性細胞の分布には異なった要素も認められた。つまり, 近心領域の ED 1 陽性細胞は歯根のセメント質と骨表面から少し離れて分布するのに対して, 遠心領域の ED 1 陽性細胞は歯槽骨表面の吸収窩に大型の ED 1 陽性細胞が多くみられる他, 歯根のセメント質に非常に近い領域にも分布していた。

実験群ラットの上顎第一臼歯歯根膜におけるアザン染色標本 (図 3) では歯根は近心方向へ移動されたため, 近心領域歯根膜は圧迫された。また, 牽引側においては tooth-related zone に多く見られる青く染色され歯根膜線維が引き延ばされて歯根膜中央 (shear zone) で途切れていた。

実験群 3 日目の OX 6 免疫組織化学法と TRAP 活性の二重染色像 (図 4) では, TRAP 強陽性を示す細胞が多くみられる遠心領域に茶褐色に染められた OX 6 陽性細胞が分布していた。TRAP 陽性細胞は歯槽骨表面付近 (bone-related zone) に認められるのに対して, OX 6 陽性細胞は歯根のセメント質寄りの領域 (tooth-related

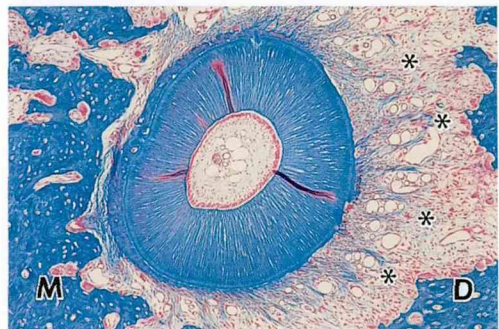


図 3 : Waldo 法による実験群 3 日目のラット上顎第一臼歯歯根膜のアザン染色像。

Waldo 法によって歯根が近心方向へ移動されたため, 近心歯根膜は圧迫され, また遠心歯根膜は牽引されていることがわかる。青く染色された歯根膜線維は, 近心圧迫側では密に集積している一方で, 牽引されている遠心歯根膜線維は shear zone (*) 付近で歯槽骨から離れていた。M : 近心方向 D : 遠心方向 拡大倍率 X 90

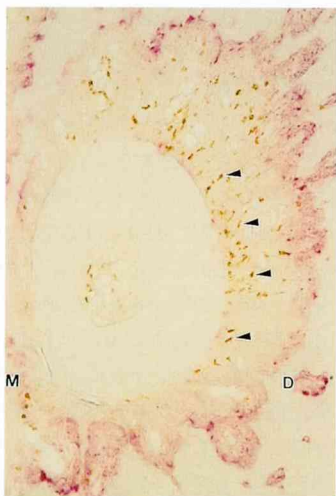


図4：実験群3日目のOX6免疫組織化学法とTRAP酵素組織化学法の二重染色像。茶褐色に染色されたOX6陽性細胞（矢頭）は牽引側歯根膜のtooth-related zoneに多く出現した。また、圧迫側歯根膜にはほとんど確認されなかった。M：近心方向 D：遠心方向 拡大倍率X90

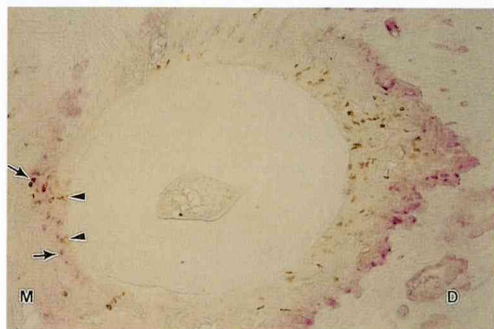


図5：実験群7日目のOX6免疫組織化学法とTRAP酵素組織化学法の二重染色像。近心の圧迫側に赤いTRAP活性を示す小型の細胞（矢印）が認められ、茶褐色のOX6陽性細胞（矢頭）と近接して認められた。M：近心方向 D：遠心方向 拡大倍率X90

zone)に多く認められ、歯根膜毛細血管を挟んでTRAP活性強陽性細胞と対峙していた。実験群7日目(図5)になると、近心領域の圧迫された歯根膜に赤いTRAP強陽性を示す細胞が認められた。また、この領域ではTRAP活性強陽性細胞とOX6陽性細胞は混在して認められた。しかし、遠心領域のTRAP活性強陽性細胞とOX6陽性細胞の対峙関係は実験群3日目と同様に認

められた。

考 察

強力な抗原提示能力を持つことで知られる樹状細胞と考えられるOX6陽性細胞が感染、炎症などが無い生理的な環境である歯根膜に多く存在していることについてはこれまでも報告^{8,9,10)}がある。その存在意義として、免疫担当細胞として歯根膜の感染に備えた役割¹⁰⁾の他、マクロファージ系の細胞が歯根膜でIL-1などの因子を放出することで、歯根膜線維芽細胞の分化発達を促す可能性を示唆している^{8,12)}。しかし、菌の移動とOX6陽性細胞の関係は不明な点が多く、未だ説得力のある報告はみられない。

今回実験に用いたラット臼歯歯根膜において、OX6モノクローナル抗体による免疫組織化学法とTRAP活性陽性の酵素組織化学法による二重染色で認められたそれぞれの細胞は、TRAP活性陽性を示す細胞が破骨細胞もしくはその前駆細胞と考えられ、またOX6免疫陽性細胞はSteinman¹⁸⁾らの定義による樹状細胞もしくはマクロファージ系¹⁹⁾の細胞と推察される。ED1陽性細胞は単球由来の細胞を広く認識するが、OX6陽性細胞よりも細胞数が多く、ED1陽性細胞のうち、OX6免疫陰性かつTRAP活性陰性の細胞が相当数存在することが推察される。ラット歯根膜のED1陽性細胞とTRAP陽性細胞との関連については、我々が既に報告しており¹⁰⁾、歯根膜においてはED1陽性細胞の多くはTRAP陽性の破骨細胞もしくはその前駆細胞であることは明らかである。しかし、今回の結果では、近心側歯根膜でED1陽性細胞とOX6陽性細胞には細胞数および分布領域に違いが認められ、ED1陽性細胞とOX6陽性細胞の関係は、今後さらに検討が必要である。

対照群として用いたラット上顎臼歯は、ラットの生涯を通して遠心方向へ移動しているといわれる⁶⁾。今回のTRAP活性の検出標本においても、歯根膜の遠心領域の歯槽骨表面には骨吸収系の細胞と考えられるTRAP強陽性を示す細胞が多くみられ、歯槽骨表面には吸収窩も多く認められた。一方、近心領域の歯根膜にはTRAP強陽性を示す細胞はほとんど認められないことから、遠心歯槽骨の活発な吸収による歯根の遠心移動が同

われた。

今回の実験では菌に力学的な負荷を与え、歯根を生理的な移動とは反対の方向へ移動させた。アザン染色像からは、Waldo 法による歯の移動によって、牽引側の歯根膜線維は歯根膜毛細血管領域 (shear zone) 付近で切断され、tooth-related zone に残存することが認められた。この実験系における OX 6 陽性細胞の分布変化は、実験開始前では非吸収領域歯根膜の tooth-related zone に分布するが、Waldo 法実験により歯根膜に圧迫の負荷が加えられると、吸収領域から非吸収領域 (歯根膜線維の牽引) へと変化した歯根膜に出現した。ここでも、OX 6 陽性細胞は tooth-related zone に多く分布し、bone-related zone に多く残存している TRAP 陽性細胞とは毛細血管を挟んで向かい合う分布をしていた。しかし、Waldo 法 7 日目では圧迫領域に出現した TRAP 強活性細胞と OX 6 陽性細胞は近接して分布している場面も認められた。これらの OX 6 陽性細胞が存在する領域は、歯根膜線維が増殖している領域と推察されることから、OX 6 陽性細胞は歯根膜増殖に関与した働きを担っている可能性が考えられる。一方、吸収領域に TRAP 陽性細胞と近

接あるいは混在して認められる OX 6 陽性細胞は、免疫担当細胞として圧迫により破壊された歯根膜組織の処理に当たっていることが推察できる。

OX 6 陽性の樹状細胞は骨髓由来といわれ²⁰⁾、単球系を介して歯根膜で樹状細胞に分化すると考えられる。この発達経路は破骨細胞の分化¹⁾とよく似ており、両細胞は特殊な関係があるかもしれない。歯根膜において、破骨細胞が骨吸収領域に分布し、樹状細胞が歯根膜および歯槽骨増殖の領域に特異的に分布することは、歯の移動に伴う歯根膜改造現象にこれらの細胞がそれぞれ重要な働きを担っている可能性が示唆された。

ま と め (図 6)

対照群歯根膜では歯根の遠心方向への生理的移動に伴い、遠心歯根膜 (吸収領域) TRAP 陽性の破骨細胞が認められ、非吸収領域には OX 6 免疫陽性の樹状細胞が分布していた。Waldo 法により第一臼歯の移動方向を変化させた実験群においては、遠心歯根膜 (牽引領域) に OX 6 陽性樹状細胞が出現した。また、圧迫領域の歯根膜には TRAP 陽性の破骨細胞と OX 6 陽性樹状細胞が共

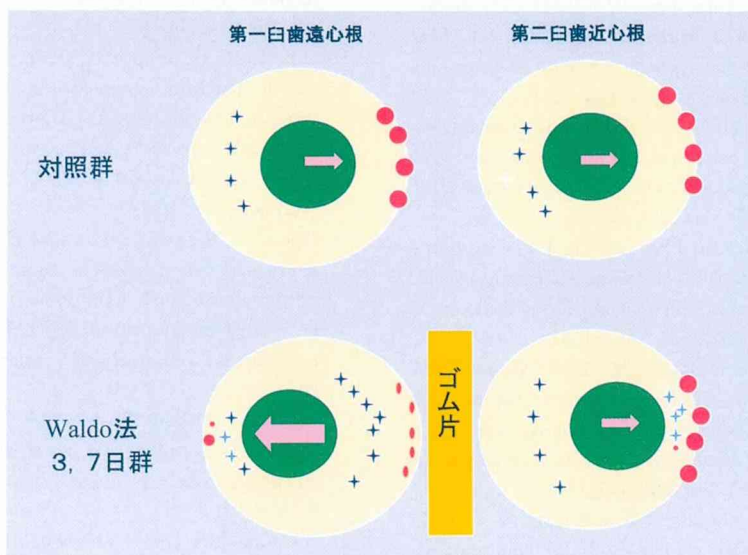


図 6 : Waldo 法による歯の移動と歯根膜樹状細胞と破骨細胞の変化を示す。

実験群歯根膜では TRAP 活性 (赤丸) を持つ破骨細胞と棲み分け的な分布を示す OX 6 陽性樹状細胞 (濃紺星印) と破骨細胞と共に混在する樹状細胞 (空色星印) の 2 つのタイプが確認された。また、第二臼歯近心根遠心側歯根膜には、Waldo 法による圧迫に対する炎症反応と考えられる OX 6 陽性細胞 (空色星印) の出現が見られた。

に認められた。また、第二臼歯近心根遠心側歯根膜には、Waldo 法による圧迫に対する炎症反応と考えられる OX 6 陽性細胞の出現が見られた。

以上のことから、樹状細胞は歯根膜の増殖する領域に出現して、破骨細胞とは対峙した分布を示すグループと歯根膜圧迫領域で破骨細胞と混在するグループが認められた。これら 2 つのグループの樹状細胞は歯根膜において異なった働きをもつ可能性が示唆された。

文 献

- 1) Ejiri S (1983) The preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast : ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. *Arch Histol Cytol Jap* **46** : 533-57.
- 2) Ejiri S and Ozawa H (1984) Identification and characterization of the preosteoclast and its cytodifferentiation into the osteoclast : Ultrastructural and histochemical studies of rat fetal parietal bone. In : (ed. By) Cohn D V, Fujita T, Potts J T Jr. and Talmage R V : *Endocrine control of bone and calcium metabolism*. Elsevier, Amsterdam : 90-3.
- 3) Horton J E, Rimmer E F, Lewis D, Pringle J A S, Fuller K and Chambers T J (1984) Cell surface characterization of the human osteoclast : Phenotypic relationship to other bone marrow-derived cell types. *J Pathol* **144** : 281-94.
- 4) Kurihara S (1997) An electron microscopic observation on cells found in bone resorption area incident to experimental tooth movement. *Bull Tokyo Med Dental Univ* **24** : 103-23.
- 5) Rifkin B R, Brand J S, Cushing J E, Coleman J J and Sanavi F (1980) Fine structural of fetal rat calvarium : Provision identification of preosteoclasts. *Calcif Tiss Int* **31** : 21-8.
- 6) Ashizawa Y and Sahara N (1998) Quantitative evolution of newly formed bone in the alveolar wall surrounding the root during the initial stage of experimental tooth movement in the rat. *Arch Oral Biol* **43** : 473-84.
- 7) Jager A, Radlanski R J and Gotz W (1994) Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. An immunohistochemical study using monoclonal antibodies ED 1 and ED 2 on paraffin-embedded tissue. *Histochemistry* **100** : 161-6.
- 8) Nakamura K, Sahara N and Deguchi T (2000) Temporal changes in the distribution and number of macrophage-Lineage cells in the periodontal membrane of the rat molar in response to experimental tooth movement. *Arch Oral Biol* **46** : 593-607.
- 9) VandeVska-Radunovic V, Hals Kvinnsland I, Kvinnsland S and Jonsson R (1997) Immunocompetent cells in the rat periodontal ligament and their recruitment incident to experimental orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* **105** : 36-44.
- 10) Kawahara I and Takano Y (1995) Segregated Localization of Immunocompetent Cells and Osteoclasts in the Periodontal Ligament of Rat Molar. *Arch Histol Cytol* **58** : 345-55.
- 11) VandeVska-Radunovic V, Hals Kvinnsland I and Kvinnsland S (1998) Effect of inferior alveolar nerve axotomy on periodontal and pulpal blood flow subsequent to experimental tooth movement in rats. *Acta Odontol Scand* **56** : 57-64.
- 12) Shmidt J A, Mizel S B, Cohen D and Green I (1982) Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol* **128** : 2177-82.
- 13) Waldo C M and Rothblatt J M (1954) Histologic response to tooth movement in the laboratory rat. *J Dental Res* **33** : 481-6.
- 14) Dijkstra C D, Jopp E A, Joling and Karaal G (1985) The heterogeneity of monoclinal phagocytes in lymphoid organs : Distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2, and ED3. *Immunology* **54** : 598-9.
- 15) Hue S-M, Raine L and Fanger H (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques : A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* **29** : 577-80.
- 16) McMaster E R and Williams A F (1979) Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Europ J Immunol* **9** : 426-33.
- 17) Burstone M S (1961) Histochemical demonstration of acid phosphatases in frozen with naphthol AS-phosphates. *J Histochem Cytochem* **9** : 146-53.
- 18) Steinman R M, Van Voorhis W C and Spalding D M (1986) Dendritic cells. In : (ed. By) Weir D M and Frey M D : *Handbook of experimental*

- immunology, Vol. 2, Cellular immunology, 4 th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, (Chap. 49) : 1-9.
- 19) Van Furth R (1986) Overview : the mononuclear phagocyte system. In : (ed. By) Weir D M and Frey M D : Handbook of experimental immunology, Vol. 2, Cellular immunology, 4 th ed. Blackwell Scientific Publications, Oxford, (Chap. 42) : 1-5.
- 20) Naito M (1993) Macrophage heterogeneity in development and differentiation. Arch Histol Cytol **56** : 331-51.