

細胞表面抗体マーカーによる 硬組織形成細胞（セメント 芽細胞、骨芽細胞）の鑑別

研究課題番号： 09671943

平成9年度～平成10年度
科学研究費補助金

基盤研究 (C) (2)

研究成果報告書

平成11年3月

研究代表者 庄司 茂

(東北大学歯学部附属病院 講師)

はしがき

歯周疾患により失われた歯周組織を回復させることは、機能的面だけでなく審美的面からも極めて重要である。これまで歯周組織切開法や歯根面の酸処理法などの方法が試みられてきた。しかし、考えていた以上に良い臨床結果は得られてこなかった。

新しい考え方として、人工膜を用いて歯肉内縁上皮の深行増殖を防ぎ、中胚葉系細胞の分化・増殖促進を目的とする治療法が出てきた。ただ膜を用いたGTR法は単に歯肉上皮細胞の深行増殖を防ぎ、セメント芽細胞や骨芽細胞そして歯根膜などの中胚葉系歯周組織が再生・新生するスペースを確保しているにすぎない。最近、エナメル蛋白質の一つであるアメロジェニンの主成分とする歯周組が市販されている。この組織誘導メカニズムとしては、ヘルトビッチ上皮鞘における内エナメル上皮から分泌される蛋白質がセメント芽細胞を誘導し、ついで歯根膜や歯槽骨が誘導されると考えられている。さらに、ヘルトビッチ上皮鞘が断裂して歯根周囲に残されたマラッセの上皮遺残が未分化間葉系細胞に働きかけて、セメント芽細胞に分化させるという報告も見られてきている。

平成9年度は、セメント芽細胞としての明らかな定義が確定していないため、セメント質の非コラーゲン蛋白質を免疫組織学的に染色し、これに近接する細胞をセメント芽細胞とした。しかし、非コラーゲン蛋白質と離れた細胞が存在し、セメント芽細胞との判定は困難であった。

そこで、平成10年度はマラッセの上皮遺残に着目し、この上皮細胞とラミニンを介して接着し、骨形成に関係の深いビタミンD3レセプターを有する中胚葉系細胞がセメント芽細胞と考え実験を進めた。その結果、上皮細胞と接する細胞を検出し、その細胞から硬組織形成に重要な役割を果たすアルカリフォスファターゼが分泌されていることは、透過型電子顕微鏡で確認できたものの、免疫染色による観察ではビタミンD3レセプターを見いだすことは出来なかった。

研究組織

- 研究代表者 : 庄司 茂 (東北大学歯学部附属病院 講師)
研究分担者 : 堀内 博 (東北大学歯学部 教授)
研究分担者 : 飯山正夫 (東北大学歯学部 助手)
研究分担者 : 根本英二 (東北大学歯学部 助手)

研究経費

平成 9年度	1, 800 千円
平成10年度	1, 100 千円
計	2, 900 千円

研究発表

本研究で行った鑑別方法・基準ではセメント芽細胞の同定は困難で、残念ながら発表しうる程の結果は得られなかったが、今後骨細胞培養法に準じた方法で、セメント細胞を見いだし転写因子などの遺伝学的面からの研究が必要と思われた。

<序>

歯周治療の最終的目的地は、歯周組織の再生・新生である。しかし、これまで多くの研究者が基礎研究や臨床的検討を加えてきたものの、歯周疾患により失われた組織を回復させることは困難であった。そのため、歯肉の退縮による咀嚼時のフード・インパクションや発音障害、さらには審美的問題など多くの問題が生じている。

これらの問題を解決するために人工膜を用いて中胚葉組織が再生しうるスペースを作る方法（GTR法）が広く臨床で行われている。ただ、この方法は3壁性骨欠損のような完全に周囲を歯槽骨で囲まれている場合には、歯槽骨だけでなく歯根膜やセメント質も再生が見られる。

<実験の進め方および結果>

「平成9年度」は、ウイスター系ラットを用いて**実験1**で示した方法で、セメント芽細胞が分泌し形成されたセメント質中に存在する、非コラーゲン蛋白質である osteopontin や bone sialoprotein を免疫組織学的に染色し、検出した。

しかし、検出した非コラーゲン蛋白質に恒にセメント芽細胞と思われる細胞が近接しているわけではなかった。GTR法では結果として歯周組織が形成されただけであって、骨芽細胞、繊維芽細胞そしてセメント芽細胞を選択的に誘導したのではないため、細胞の存在する部位のみでの鑑別は困難であった。

「平成10年度」は、最近市販されているブタ・エナメル蛋白質を主成分とするエムドゲインが、臨床的にセメント質を再生させているという、スエーデンを中心とした報告から、ヘルトビッチ上皮鞘の残存上皮であるマラッセの上皮遺残と未分化間葉系細胞の情報の伝達に着目し、実験を行った。すなわち、透過型電子顕微鏡を用いたミクロ組織でのセメント芽細胞の動態を**実験2**で示した方法で観察し、一方、セメント芽細胞の表面マーカーと考えられるビタミンD3レセプターを**実験3**に示した方法で観察した。

その結果、上皮細胞と接する細胞を検出し、その細胞から硬組織形成に重要な役割を果たすアルカリフォスファターゼが分泌されていることは、透過型電子顕微鏡を組織化学染色で確認できたものの、免疫染色による観察ではビタミンD3レセプターを見いだすことは出来なかった。

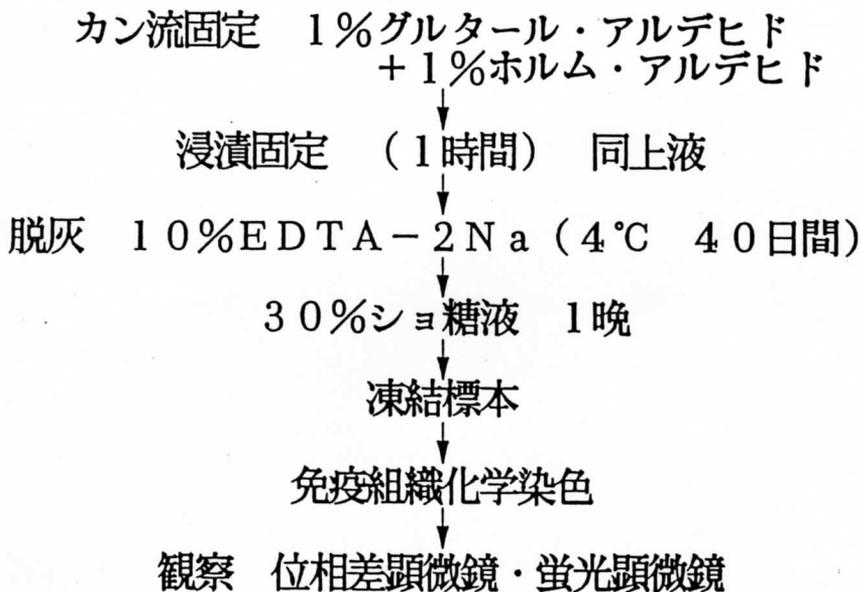
「実験1」

セメント質中の非コラーゲン蛋白質 の (osteopontin, bone sialoprotein) 免疫染色

< 実験方法 >

- 1、ネンブタール腹腔麻酔による全身麻酔・体重測定
- 2、生後3、6、9ヶ月目に心尖からの灌流固定による屠殺
(1%グルタルアルデヒド+1%ホルムアルデヒド)
- 3、下顎骨離断
- 4、脱灰(10%EDTA-2Na、4°C、40日間)
- 5、浸透圧調整(30%蔗糖液一晩浸漬)
- 6、凍結標本作成(クライオ・フォーム)
- 7、薄切(8-10 μ m)
- 8、風乾後PBS洗浄
- 9、ヒアルロニダーゼ処理
- 10、PBS洗浄
- 11、一次抗体反応(ウサギ抗ラット非コラーゲン蛋白質)
(osteopontin, bone sialoprotein)
- 12、二次抗体反応(FITC標識ヤギ抗ウサギIgG血清)
- 13、PBS/蒸留水洗浄
- 14、PVL封入
- 15、観察(位相差、落射蛍光顕微鏡)

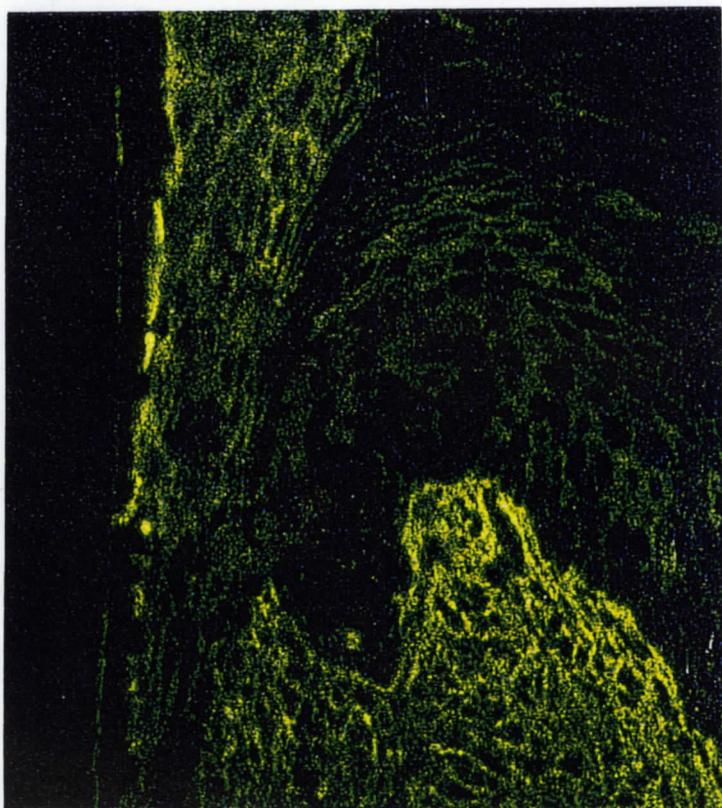
< 免疫染色・観察法 >



FITC 蛍光染色による抗 osteopontin 染色像



FITC 蛍光染色による抗 bone sialoprotein 染色像



「実験2」

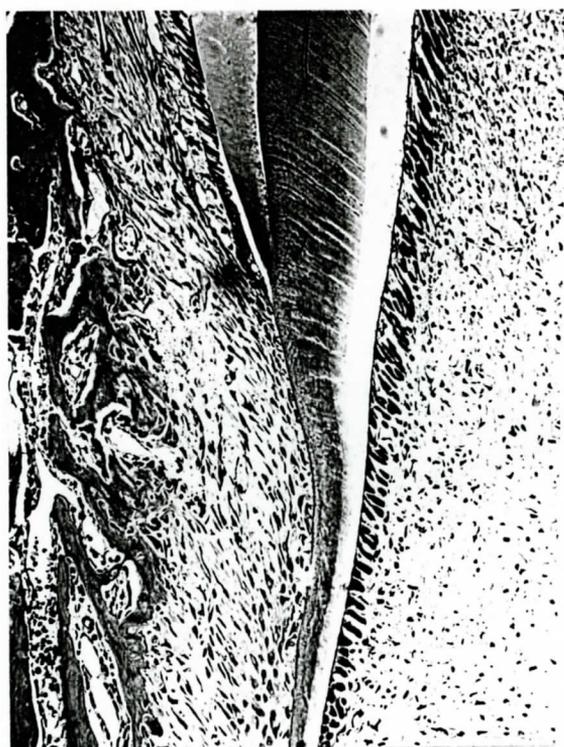
透過型電子顕微鏡を用いた組織

化学染色による根尖部周囲細胞観察

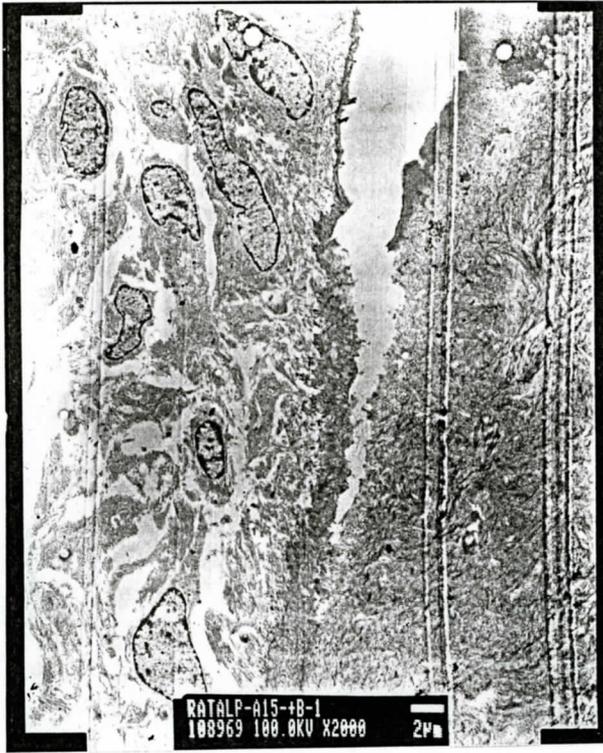
〈実験方法〉

- 1、6週例ウイスター系ラットを全身麻醉下に環流固定
- 2、下顎骨を取り出し、第一大臼歯根尖周囲組織を小ブロックで切り出す
- 3、10% EDTA-Naで脱灰
- 4、前染色後エポキシ樹脂に包埋
- 5、ダイヤモンド・ナイフで薄切
- 6、後染色
- 7、透過型電子顕微鏡で観察

ヘルトビッチ上皮鞘周囲組織の低倍像



マラッセの残存上皮細胞周囲に存在するセメント芽細胞と思われる細胞



アルカリフォスファターゼを分泌しているセメント芽細胞



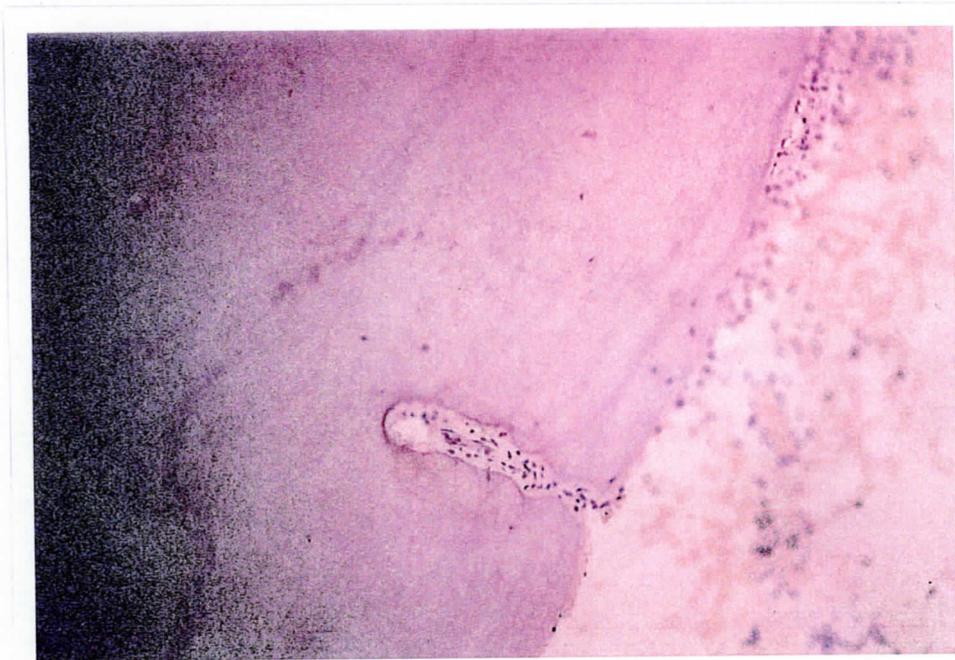
「実験3」

ヒトセメント質周囲細胞における ビタミンD₃レセプターの検出

〈実験方法〉

- 1、ヒト下顎第3大白歯を2%キシロカイン局所麻酔下に抜歯
- 2、根尖部歯周組織に損傷を与えないように、根尖部切断
- 3、4%パラホルム・アルデヒドで固定(4度C)
- 5、10%EDTA-4Naで脱灰
- 6、30%蔗糖に浸漬
- 7、凍結標本薄切
- 8、免疫組織化学染色
(グリーン染色)

用いた抗体：抗ラットビタミンD₃レセプター(MSR S社製)



V D₃レセプター免疫染色を行ったヒト根尖部の光学顕微鏡像。
V D₃レセプターを見いだすことが困難であった。

本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。