

氏名	山 中 玲 子
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 号
学位授与の日付	平 成 1 6 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	機械的刺激によるラット歯肉の接合上皮基底細胞と線維芽細胞の細胞周期の変化
論文審査委員	教授 高柴 正悟 教授 杉本 朋貞 教授 渡邊 達夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

ブラッシングは、イヌ歯肉において proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性の接合上皮細胞や線維芽細胞などを増加させる。しかし、PCNA は細胞周期の DNA 合成準備期 (G1 期) から DNA 合成期 (S 期) にかけて発現するため、PCNA の検出のみでは細胞が実際に G1 期上に存在する制限点を通過しているかどうかは分からない。そこで本研究では、ブラッシングの機械的刺激による歯肉細胞の増殖能について、PCNA ならびに S 期の細胞を特異的に検出できる bromodeoxyuridine (BrdU) の 2 種の細胞増殖マーカーについて比較検討した。

【材料および方法】

6 週齢 wistar 系雄性ラット 45 匹の上顎左側第一大臼歯口蓋側歯肉に、電動歯ブラシ (Twin pecker[®]) を用いて、0.02N の力で 1 日 1 回、10 秒間の刺激を与えた。電動歯ブラシは、1 分間に 3,000 回、5 mm の振幅でフィラメントの長軸方向に振動する。上顎右側第一大臼歯口蓋側歯肉を対照とした。1, 3, 7 日間の処置後、BrdU (25 mg/kg body weight) を腹腔内に注射し、3 時間後に屠殺した。実験期間中食餌として粉末飼料を与えた。

I. 組織染色

実験終了後、4%パラホルムアルデヒド溶液で還流固定を行い、歯と歯肉を取り出して同溶液で一昼夜浸漬固定した。10%EDTA 緩衝液で 2 週間脱灰した後、パラフィン包埋を行った。各ブロックより頬舌断面が観察できるように厚さ 4 μ m の連続切片を作製した。切片を HE 染色と免疫染色した。一次抗体として、マウス抗 PCNA モノクローナル抗体とマウス抗 BrdU モノクローナル抗体を用い、免疫染色を行った。2 次抗体と反応させ、ジアミノベンチジンで発色後、マイヤーのヘマトキシリンによる後染色を行った。

II. 評価方法

光学顕微鏡下あるいは NIH イメージにより以下の測定を行った。

組織定量分析：

- 1) セメント-エナメル境 (CEJ) から歯肉頂までの歯軸に平行な距離
- 2) CEJ から歯槽骨頂までの歯軸に平行な距離

- 3) CEJ から歯肉頂までを歯軸に垂直に 2 等分した線上の歯肉幅
- 4) 接合上皮の面積
- 5) 接合上皮の長さ
- 6) 接合上皮基底細胞の単位長さ (0.1 mm) あたりの PCNA 陽性基底細胞数, BrdU 陽性基底細胞数および総細胞数
- 7) CEJ から根尖側に向かって, 歯根表面の結合組織における単位面積 (0.1 mm×0.1 mm) あたりの PCNA 陽性線維芽細胞数, BrdU 陽性線維芽細胞数, 総線維芽細胞数

III. 統計処理

1 部位につき 3 枚の切片より, 1 匹あたりの平均値を求めた。刺激群と対照群との比較は Wilcoxon の符号付き順位検定で, 同じ群内での経時的な変化は Mann-Whitney の U-検定で行った。総細胞数に対する陽性細胞数の割合を Labeling Index (LI) とした。PCNA と BrdU の LI の相関関係を Spearman の順位相関係数を用いて検討した。

【結果および考察】

- ① 接合上皮の基底細胞とセメント質近傍の線維芽細胞において, PCNA 及び BrdU 陽性細胞数は機械的刺激によって有意に増加した。BrdU 陽性細胞数が増加したことから, ブラッシングの機械的刺激は, 細胞の DNA 合成を促進することが示された。
- ② 接合上皮の基底細胞とセメント質近傍の線維芽細胞において, PCNA と BrdU の LI の間に有意な相関は認められなかった。BrdU は, S 期のみの特異的に取り込まれる増殖マーカーなので, DNA 合成を行っている細胞を検討するには, PCNA よりも適当であると考えられる。PCNA と BrdU の LI の相関については, ラットの腸粘膜や皮膚, ヒトのブドウ膜や腸粘膜などでは相関が認められず, ラットの腓骨や脛骨では相関がみられたという報告がある。軟組織では相関がみられず, 硬組織では相関がみられるのかもしれない。
- ③ 刺激群の全てにおいて PCNA 陽性細胞数が有意に増加した。また, PCNA 陽性細胞数は, 常に BrdU 陽性細胞数よりも多かった。このことから, 細胞周期にある細胞が増加したと考えることができる。機械的刺激により, G0 期の細胞が細胞周期に進入したためと考えることができる。
- ④ 機械的刺激の有無による形態計測値の有意な差は, 接合上皮の長さ以外は認められなかった。経時的には刺激群と対照群の両群ともに接合上皮の面積は減少する傾向にあった。これは, この週齢のラットの細胞増殖能の低下に起因すると思われる。
- ⑤ 本研究では, 機械的刺激の強度を一定にするために, ラットの頭部と電動歯ブラシの位置を固定したため上顎左側のみに機械的刺激を与えた。歯肉の口腔上皮に刺激による外傷や潰瘍等が認められなかったことは, 本実験での刺激の強さがラットの歯肉に障害を与えず, DNA 合成を促進させる適切な範囲内のものであったと考えられる。

【結論】

機械的刺激が, 歯肉の細胞の DNA 合成を促進することが明らかとなった。また, 細胞増殖を詳細に検討する指標としては PCNA よりも BrdU のほうが適当であることが示された。

論文審査結果の要旨

ブラッシングによる機械的刺激は、歯肉中にproliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性の接合上皮細胞と線維芽細胞を増加させるが、総細胞数が増加しない場合がある。また、PCNAはG1期でアレストされている細胞でも発現することがあるため、PCNA陽性細胞であってもS期に進行してDNA合成を行っているとは限らない。そこで本研究では、ブラッシングの機械的刺激による歯肉の細胞増殖を、これまで用いられてきたPCNAとS期の細胞を特異的に検出できるbromodeoxyuridine (BrdU) の2種類の細胞増殖マーカーを用いて細胞周期内での位置づけを明確にした。

槌打型の小型電動歯ブラシを用いての範囲を限定した振動によってラット歯肉に機械的刺激を与えた条件下で、接合上皮の基底細胞とセメント-エナメル接合部直下の線維芽細胞におけるPCNA陽性細胞とBrdU陽性細胞を免疫組織化学的に検出した。その結果、両種の細胞ともに、PCNA陽性細胞率とBrdU陽性細胞率ともに増加することがわかった。PCNA陽性率はBrdU陽性率よりも多かったが、PCNA陽性率とBrdU陽性率の間には相関がなかった。なお、総細胞数には変化がなかった。

この結果は、歯肉を機械的に刺激することが歯肉の細胞増殖を亢進するという従来の研究結果を支持し、さらに、S期の細胞数が増加したことから刺激下の細胞はDNA合成を促進していることを明白にしたものである。また、総細胞数に変化がなかったことから、ターンオーバーの亢進によってアポトーシスを起こしている細胞が増加する可能性や上皮では細胞の剥落が起こっている可能性が考えられる。これは、歯肉へのブラッシングが歯肉の傷害の回復に寄与する可能性を示唆する。

したがって、本論文は博士（歯学）の学位を授与する価値があるものと認めた。