

氏	藪内利憲
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 3113 号
学位授与の日付	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	生理的歯の移動時の歯根膜におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド陽性神経線維と破骨細胞および骨芽細胞との三次元組織学的形態計測

論文審査委員 教授 山本 敏男 助教授 市川 博之 教授 山本 照子

学位論文内容の要旨

【目的】

ラットの歯は生理的に移動する。この動きは生理的歯の移動と呼ばれており遠心に移動する。歯槽骨表面において局在的に骨の添加と吸収が起こり遠心に移動することが可能となっている。近年生理的移動時に神経ペプチドが歯周組織に発現することが報告されている。しかし神経ペプチドが歯の移動時にどのような働きをしているのか解明されていない。そこで本研究においては、歯の生理的移動と最も関連があると思われるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) について詳細に調べた。本研究では、CGRP の局在について共焦点顕微鏡を用いて三次元的に観察を行い、NEURON TRACER を用いて三次元的に定量化した。さらに CGRP と骨の吸収添加との関係を調べるために CGRP と破骨細胞、骨芽細胞を共焦点顕微鏡で観察した。

【材料と方法】

6週令の雄性SDラット(180-250g) 20匹に麻酔を行い4%パラホルムアルデヒドにて還流固定を行った。その後4%EDTAにて脱灰した後、凍結させ、ミクロトームを用いて切片を作成した。CGRPの分布を調べるためにCGRPの抗体を用いて蛍光染色を行った。破骨細胞の分布を調べるためTRAP染色キットを用いて染色を行った。またELF97を用いて蛍光顕微鏡でも観察した。骨芽細胞の分布を調べるためにアルカリフォスファターゼ(ALP)キットを用いて染色を行った。またELF97を用いて蛍光顕微鏡でも観察を行った。さらに、CGRPとTRAP陽性細胞およびALP陽性細胞について共焦点顕微鏡にて観察を行い、得られた画像を三次元構築ソフトを用いて三次元構築を行い観察した。個々のラットから第一大臼歯の近心根が最もよく出ている縦断切片を10枚選び計測に用いた。縦断切片における三次元的構築像におけるCGRPの長さをIMARIS NEURON TRACERを用いて定量化した。全ての結果は、two-way ANOVAとScheffe's F test for post hoc comparison.で検定を行った。

【結果】

CGRP陽性神経線維の長さの合計(平均±SE)は近心側で $162.4 \pm 14.8 \mu\text{m}/\text{mm}^3$ 、根尖部で $401.9 \pm 74.1 \mu\text{m}/\text{mm}^3$ 、遠心側で $57.7 \pm 9.4 \mu\text{m}/\text{mm}^3$ であった。歯槽骨に向かって走行する細い平滑な形態を示す神経線維は歯槽骨表面において分岐しており、この細い平滑なタイプのCGRP陽性神経線維の直径は $1 \mu\text{m}$ 以下であった。歯槽骨表面に近接した直径 $1 \mu\text{m}$ 以下の細いCGRP陽性神経線維の長さの合計(平均±SE)は近心側で $40.5 \pm 3.6 \mu\text{m}/\text{mm}^3$ 、根尖側では $51.4 \pm 6.3 \mu\text{m}/\text{mm}^3$ 、遠心側では

14.5±3.6µm/mm³であった。また、近心側の方が遠心側より多くの CGRP 陽性神経線維を認めた。遠心側において根尖部および近心側より多くの多核型 TRAP 陽性細胞を認めた。近心側における ALP 陽性細胞は他の部位に比べ有意に多く認められた。三次元構築分析により、CGRP 陽性神経線維は近心歯槽骨表面にて多くの ALP 陽性細胞に近接して走行していた。CGRP 陽性神経線維と ALP 陽性細胞との距離は最も近接したもので 300nm であった。遠心部歯槽骨表面において、CGRP 陽性神経線維周囲に多核型 TRAP 陽性細胞の存在もまれに認められたが、最も近接したもので約 10µm であった。

【考察および結論】

本研究では CGRP 陽性の神経線維を共焦点顕微鏡を用いて三次元構築を行った後観察を行い、NEURON TRACER を用いることにより三次元的に計測する事が可能となった。ラット臼歯の歯根膜には、細い神経線維からなり樹枝状を呈する自由神経終末と比較的太い神経線維からなる Ruffini 神経終末が混在していることが知られている。自由神経終末は痛覚を感じる受容器であると言われている。生理的状態においても CGRP 陽性神経線維の分布に近遠心側で違いが存在することから痛みの受容以外の働きをしていると考えられる。CGRP は骨芽細胞の活性を増加させ破骨細胞の活性を抑制することが報告されている。生理的歯の移動時において近心根遠心側では破骨細胞が多く認められ活発な骨の吸収が認められるが CGRP 陽性神経線維が少ないことにより CGRP は破骨細胞との関与は低いことが示唆された。生理的歯の移動時においての近心根近心側では活性化した骨芽細胞が多く認められ活発な骨の添加が認められ、また CGRP 陽性神経線維が多く認められることから CGRP は骨芽細胞の活性化に関与していることが示唆された。

本研究により生理的歯の移動時に骨の改造現象が生じており、CGRP 陽性の神経線維は歯根膜と接する歯槽骨表面において骨芽細胞による骨の形成を促進していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

過去の様々な研究において歯周組織における CGRP 陽性の神経線維の存在が報告されている。しかし、CGRP 陽性の神経線維について顕微鏡下で分布が観察されるのみで定量的な分析は行われていない。これは CGRP 陽性の神経線維が三次元的に分岐するため、二次元では正確な計測が不可能なことによる。従って、本研究では共焦点顕微鏡にて観察を行い、NEURON TRACER を用いることにより CGRP 陽性の神経線維を三次元的に計測した。さらに CGRP と骨の吸収、添加との関係を調べるために CGRP 陽性神経線維と破骨細胞および骨芽細胞を共焦点顕微鏡を用いて観察した。

本研究では、歯根膜において CGRP 陽性の神経線維は根尖部に最も多く、近心側は遠心側より有意に多かった。これは CGRP を含むほとんどの神経は根尖から分枝し歯髄や歯根膜に分布していることと一致した結果であった。CGRP 陽性の神経線維は、血管周囲に見られる太くて直進するものと、骨の表面付近で枝分かれして細くなっているものが観察された。歯槽骨の表層付近で枝分かれしている CGRP 陽性神経線維は、従来から報告されている自由神経終末であると考えられる。自由神経終末は痛覚を感受する受容器であると言われている。しかし生理的状态においても CGRP 陽性神経線維の分布が近心根近心側と近心根遠心側で異なることから、CGRP 陽性神経線維は痛みの受容以外の働きをしていることが示唆される。本研究では多核の破骨細胞が多くみられた遠心側では CGRP 陽性神経線維は少なかった。また共焦点顕微鏡で三次元的に観察すると、CGRP 陽性神経線維は破骨細胞と $10\mu\text{m}$ 以上離れていた。本研究では生理的歯の移動時の第一臼歯近心根遠心側において破骨細胞が多く認められ活発な骨の吸収が行われていると考えられる。さらに CGRP 陽性神経線維も少ないことより、CGRP による破骨細胞に対する影響が小さいことが示唆された。本研究では生理的歯の移動時に活性化した骨芽細胞と CGRP 陽性神経線維は第一臼歯近心根近心側において多く認められた。さらに従来から自由神経終末であると考えられた歯槽骨付近の CGRP 陽性神経線維の多くが骨芽細胞に近接していた。

以上の結果は生理的歯の移動時において CGRP が骨芽細胞による骨の形成に関与することを示唆するもので骨代謝と CGRP 陽性神経線維の関連を示した有用な研究である。

したがって、本論文は博士（歯学）の学位論文に値するものと認めた。