

平成 22 年 5 月 24 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19791356

研究課題名（和文） 歯根膜上皮細胞-免疫担当細胞間の相互作用と、異質性細胞集合体の解析  
 研究課題名（英文） morphological analysis of the heterogeneous cell population and the interaction between periodontal epithelial cells and immunocompetent cells in periodontal ligament

研究代表者

田所 治 (TADOKORO OSAMU)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：20319106

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、歯根膜中の上皮の分布と構造、および上皮と非上皮性細胞との相互関係を免疫組織化学的に明らかにし、歯根膜中の上皮の機能に対する形態的な根拠を付与することである。Wister 系ラットの上顎大臼歯部とネコの犬歯歯根膜を対象とし、顕微鏡にて観察を行い、機能的な考察を重ねた結果、歯根膜中の上皮は、歯根膜の保護、物質の分泌・吸収、外界刺激の受容能を備えた heterogeneous な細胞集合体と考えられた。

研究成果の概要（英文）：Purpose of this study was to reveal the distribution and the structural analysis of periodontal epithelium and the interrelation between epithelium and non-epithelial cells, and to add the morphological evidences for the physiological functions of the periodontal epithelium. The periodontal epithelium were obtained from Wister strain rats and felines and observed with microscope. In conclusion of the findings with functional considerations, the periodontal epithelium was considered to be a heterogeneous cell population for protection of periodontal ligament, secretion and absorption of substrates, and reception of eccentric stimulations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,700,000	420,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔解剖学（含組織学・発生学）

## 1. 研究開始当初の背景

- (1) 歯の根部と、歯根を支える骨の間には、線維性結合組織が介在しており、その線維性結合組織は歯根膜と呼ばれている。
- (2) 歯根膜は、その幅が 0.15-0.38mm（ヒト

の場合) と、極めて狭小でありながらも他の組織と同様に神経や脈管が分布している。さらには、骨の改造現象に関わる細胞、歯根をつくるセメント芽細胞、皮膚や粘膜の表層にある細胞と類似す

る上皮細胞など、多種多様な細胞が混在している。

- (3) それらの中で、最後にあげた上皮細胞は、歯根を網目状に取り囲むように、主として歯根の表面付近に分布している。
- (4) 網のヒモの部分に相当する部分では、上皮細胞は索状に配列し、網の結び目の部分では、3-8個程度の上皮細胞が集まって円状や楕円状等の細胞塊を形成している。教科書では、発見者の名に因んでマラッセの上皮遺残、または、マラッセの残存上皮と記されている（以下、本報告では歯根膜上皮、上皮細胞塊、上皮細胞索と記す）。
- (5) 歯根膜上皮は、歯根が細菌などによって重篤な感染が生じると、感染物質の侵入を閉じ込めようとして嚢をつくることが知られている。その意義としては、感染の拡大を可及的に防ぐ、すなわち、生体防御の際に反応する上皮組織と考えられている。すなわち、病的な状態に陥った際に、上皮細胞はその潜在的な機能を発揮する。
- (6) その一方において、健常時における歯根膜上皮は休止状態にあり、特別な機能はみられないとされ、僅か数行の記載に留まっている。
- (7) そもそも歯根膜は、咀嚼や常在菌などによって、恒常的に外圧力や外的刺激を受けており、歯根膜の主たる構造体としての歯根膜線維は、代謝活性が非常に高い組織であることが知られている。その中であって、歯根膜上皮が休止状態にあるという記載に対し、疑問を強く抱いたこと、この疑問が本研究の背景にあった。

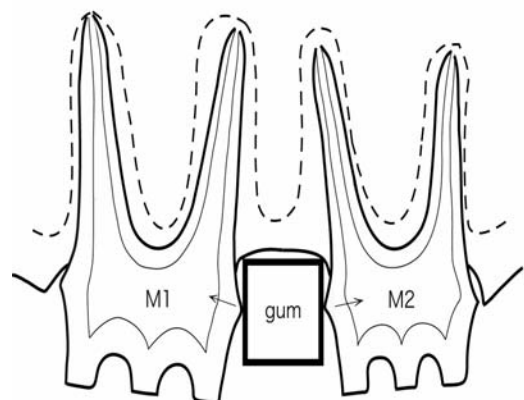
## 2. 研究の目的

- (1) 最初に、実験動物として頻用されているラット、そして、ヒト歯根膜との相同性が指摘されているネコの歯根膜上皮的分布、形態と構造を調べることを目的とした。
- (2) 次に、歯根膜上皮と、その周囲に分布している非上皮性細胞、特に免疫担当細胞とメルケル細胞との相互関係について機能形態的に調べることを目的とした。（非上皮性細胞にも着目したことについては、「研究成果のまとめの項」にて改めて後述）
- (3) 3番目として、ラットの歯根膜に対し、いわゆる歯科矯正的な外力を負荷させることにより、その外力に対する歯根膜上皮的反応を調べることを目的とした。
- (4) 最終的に、健常な歯根膜上皮に想定される生理的な機能に対し、形態的な根拠を付与することが、本研究における最も大きな目的である。

## 3. 研究の方法

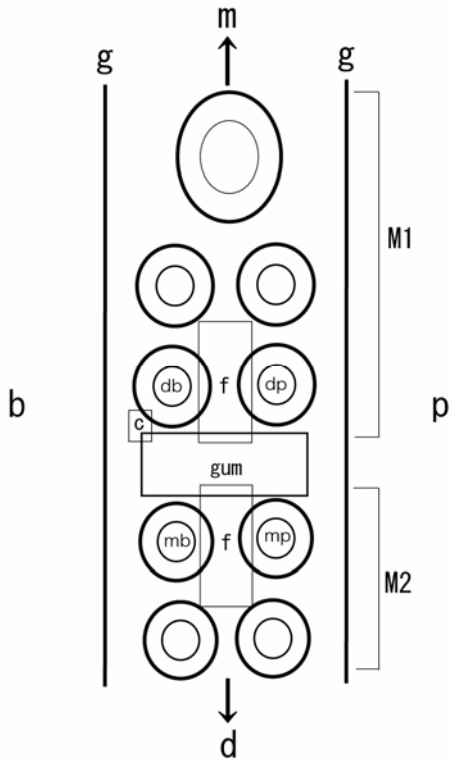
- (1) 本研究を遂行させるにあたり、対象とした実験動物としてラット（Wistar系ラット（6週齢、♂、平均体重約150g、計40頭）、ネコ（18-24ヵ月齢、雌雄、計7頭）を用いた。各動物は、麻酔により鎮静させ、開胸後、心尖部から4%パラホルムアルデヒド緩衝液を灌流させて化学固定を行った。
- (2) ラットの頭部から上顎臼歯部、ネコの頭部からは、犬歯部相当部を顎骨ごと取り出した。その後、Caキレート剤含有水溶液（EDTA）により脱灰を行った。歯と顎骨が柔らかくなったことを確認したのちに、専用の包埋剤を浸透させ、液体窒素により凍結させた。
- (3) ラットの臼歯部は、歯頸部から根分岐部にかけて厚さ約6-8 $\mu$ mの連続組織切片を作製した。組織切片上の歯根膜上皮細胞と免疫担当細胞の局在を顕微鏡下にて可視化させるために、上皮細胞に対してはCK抗体を、免疫担当細胞に対してはED1, OX6抗体を用いて免疫二重組織化学染色を施し、光学顕微鏡、蛍光顕微鏡、および、電子顕微鏡にて観察を行った。
- (4) さらにラットでは、上顎の第1臼歯（M1）と第2臼歯（M2）間の歯肉部に、歯科矯正用のゴムを小さく切った小片を挿入し、力学的な負荷を与えた（下のFig. 1とFig. 2を参照）。この負荷は、同時に実験的炎症を惹起させることが知られているため、歯根膜上皮細胞塊の反応と、炎症に関連する細胞を併せて光学顕微鏡と蛍光顕微鏡、透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

Fig.1



図説:M1:上顎第1臼歯、M2:上顎第2臼歯、  
gum:歯科矯正用ゴムの小片(約0.5mm厚)。

Fig.2



図説：ゴム片は第1臼歯(M1)と第2臼歯(M2)の間に挿入した。両歯は近心側(m)と遠心側(d)へ、それぞれ傾斜移動する。本実験で観察を行った部位は、第1臼歯の遠心頬側根(db)の頬側歯頸部の歯根膜(c)、遠心頬側根(db)と遠心口蓋根(dp)間の歯根分岐部歯根膜(f)である。b:頬側、p:口蓋側。

(5) ネコの犬歯部では、主として歯頸部に近い歯根膜の領域を、厚さ約 10-20  $\mu\text{m}$  に薄切し、連続組織切片を作製した。組織切片上の歯根膜上皮細胞の局在を顕微鏡下で可視化させるために、CK と PGP9.5 抗体を用いて免疫組織化学染色を施し、光学顕微鏡と電子顕微鏡にて観察を行った。

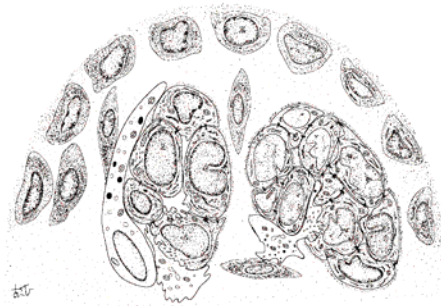
(6) 次に、各動物の歯根膜上皮細胞塊と細胞塊周囲の細胞との関係について、光学顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。

#### 4. 研究成果

(1) 異質性細胞集合体としての歯根膜上皮細胞塊の解析：ラット歯根膜における上皮分布と免疫担当細胞との相互関係について。成果の概要を以下に箇条書きにて記す。

- ① CK 抗体に免疫陽性を示した上皮細胞は、類円形の細胞集塊を呈し、主として歯頸部や歯根分岐部のセメント質表面近くに分布していた。

- ② 上皮細胞は脈管の周囲、歯根象牙質とセメント質の間、歯槽骨の近傍や骨の中にも分布していた
- ③ ED1 免疫陽性の細胞は、主に歯根膜中央付近から歯槽骨側にかけて認められ、上皮細胞との接触はほとんど認められなかった。
- ④ OX6 免疫陽性の細胞は、歯根膜内に広く分布し、CK 免疫陽性の歯根膜上皮細胞にもしばしば接触していた。
- ⑤ 電子顕微鏡による観察では、OX6 免疫陽性細胞は、細胞集塊を取り囲むだけでなく、集塊中へ細胞質突起を伸長していた。その接触部位では、上皮細胞と OX6 免疫陽性細胞が、互いに噛み合うような像がしばしば観察された。本研究の結果より、ラットの歯根膜上皮細胞は、(特に OX6 免疫陽性の)免疫担当細胞と密接な関係にあることが明らかとなった。観察結果を模式図として表す。
- ⑥ 以上より、上皮細胞は、免疫担当細胞との相互作用を通じ、上皮細胞の機能の維持、セメント質形成への関与、および健全な歯根膜の恒常性の維持に関与する可能性が考えられた。



図説：OX6 免疫陽性細胞が、上皮細胞塊の中に細胞質突起を伸長、または細胞塊を取り囲みながら、上皮細胞塊と間葉系細胞との間に介在していたことを表す模式図。

(2) ラットの上顎臼歯部に力学的負荷、および実験的に炎症を惹起させた際の歯根膜上皮細胞塊と免疫担当細胞の反応：成果の概要を以下に箇条書きにて記す。

- ① ゴム挿入部近くの歯根膜では、大きな上皮細胞塊の出現がみられた。
- ② 同時に、上皮細胞塊どうしの近接がみられた。
- ③ 上皮細胞塊の周囲を、樹状の OX6 免疫陽性細胞が取り囲んでいた。各日を通じて OX6 免疫陽性細胞による上皮細胞塊への貪食所見は得られなかった。
- ④ ゴム挿入部から離れた歯根膜では、小さな上皮細胞塊と小さな突起を伸ばし

た OX6 免疫陽性細胞がときおり観察された。両細胞の近接関係はほとんどみられなかった。

- ⑤ ゴム挿入後 14 日目では、ゴム挿入部直下の歯肉上皮が肥厚し、上皮の脚部が大きな上皮細胞塊に近接していた。上皮細胞塊の周囲は、樹枝状の OX6 免疫陽性細胞によって取り囲まれていた。以上の結果、すなわち、ゴム挿入前 (Fig. 7A の ●) とゴム挿入後 (Fig. 7B の ●) における、上皮細胞塊の分布と大きさの変化を、模式図に表す。

Fig.7A

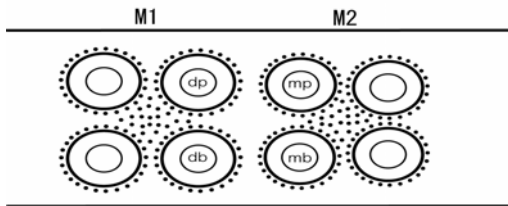
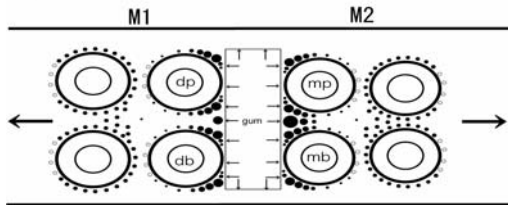


Fig.7B



図説 Fig. 7A: 正常な歯根膜における歯根膜上皮の分布を表す模式図。歯根膜上皮は、各臼歯 (M1 と M2) の各歯根の周囲に、塊状をなしてほぼ等間隔に分布している (●の部分)。また、全体的にみて、それぞれの細胞塊の大きさはおおよそ均一である。

Fig. 7B: M1 と M2 の間に、ゴム (gum) を挿入した後の、歯根膜上皮の分布の変化を表す模式図。ゴムを挿入すると、各歯は相反する方向へ傾斜しつつ移動する。と同時に、歯根膜中の上皮細胞塊は、ゴムの挿入部に近い側の歯根膜で、非常に大きな細胞塊として観察されるようになる。また、細胞塊どうしの間隔は狭くなる。その一方、ゴム挿入部から離れた側の歯根膜では、上皮細胞塊の分布はまばらであり、細胞塊の大きさも小さく、細胞塊どうしの広い間隔がみとめられた。

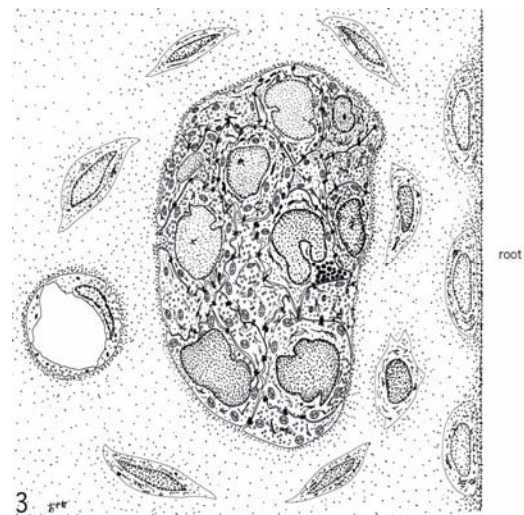
以上の観察結果から、力学的負荷および炎症性の刺激に対し、歯根膜上皮は、OX6 免疫担当細胞とともに、互いに協調しながら反応することが明らかとなった。上皮の基本機能 (生体の保護、物質の分泌・吸収、外界刺激の受容) から考慮すると、歯根膜上皮細胞の一連の反応は、歯周組織の保護、ならびに外界刺激の受容に対する反応の結果である可能性が強く示唆され

た。

- (3) 異質性細胞集合体としてのネコ犬歯歯根膜上皮細胞塊の解析: 成果の概要を以下に記す。

- ① 上皮細胞塊は、歯頸部近くの歯根膜にしばしば観察され、4-8 個程度の上皮細胞によって塊をつくっていた。
- ② 電子顕微鏡による観察では、上皮細胞の辺縁部、すなわち、外周の細胞膜上に多数の凹みと小胞体、いくつかの細胞質突起が観察された。突起の先には、血管がみられた。
- ③ 上皮細胞塊中には、PGP9.5 免疫陽性細胞が認められ、細胞質にはケラチンフィラメントと豊富な有芯小胞を含み、細胞質突起を歯根膜線維に向かって伸長していた。

以上、上皮細胞の細胞膜上の凹みの所見からは物質の分泌や取り込み能が、PGP9.5 免疫陽性細胞の形態および構造からは、メルケル細胞と相同な感覚受容や、内分泌能が推察された。上皮細胞塊内で、異質性の細胞どうしが相互に作用し合い、細胞塊全体として多彩な機能 (Review を参照。Rincon et al., Journal of Periodontal research 2006, 41:245-52.) を示すと考えられる。つまり、本研究から、歯根膜上皮に想定されている様々な生理機能に対し、形態的な根拠を得ることが出来た。(3) の観察結果を下の模式図に表す。



図説: ネコの歯根膜上皮細胞塊は、細胞膜に多数の凹みを持つ上皮細胞と、PGP9.5 に免疫陽性を示し、有芯小胞を含む細胞の 2 つの細胞から構成され、歯根 (root) 表面付近の歯頸部歯根膜に分布している。

研究成果のまとめ

- (1)-(3) の研究結果より、歯根膜上皮は、

歯根膜の保護、物質の分泌・吸収、外界刺激の受容の機能を備えた heterogeneous な細胞集合体と考えられた。

また、歯根膜上皮は、皮膚や粘膜と同様に上皮細胞だけでなく、免疫担当細胞やメルケル細胞、感覚受容装置などの非上皮性細胞も関与した組織とも考えられた。

今後は、皮膚や粘膜の表層を構成している上皮細胞と歯根膜上皮間の機能形態的差異についても検討し、健全な歯根膜における歯根膜上皮の機能的意義を明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Osamu Tadokoro, Epithelial and PGP9.5 immunoreactive cells of Malassez epithelium in the periodontal ligament of cats: a transmission electron microscopic study. Acta Odontologica Scandinavica, 査読有, 67 巻, 2009, 388-392.
- ② Osamu Tadokoro, Ichiro Kawahara, Vaska Vandevska-Radunovic, Katsuhiko Inoue. Distribution of epithelial cells and their relationship to immunocompetent cells in rat molars: a confocal and transmission electron microscope study. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 査読有, 57 巻, 2009, 315-325.
- ③ Osamu Tadokoro, Radunovic Vaska, Katsuhiko Inoue. Epithelial cell rests of Malassez and OX6-immunopositive cells in the periodontal ligament of rat molars: A light and transmission electron microscope study. The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology, 査読有, 291 巻, 2008, 242-253.

[学会発表] (計 5 件)

- ① 田所 治、ラット臼歯歯根膜における上皮細胞および免疫担当細胞の力学的負荷への反応、第 51 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2009 年 9 月 11 日、新潟 (朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター)。
- ② 田所 治、ラット歯周組織における上皮細胞と免疫担当細胞の相互関係、第 114 回日本解剖学会総会・全国学術集会、

2009 年 3 月 29 日、岡山 (岡山大学)。

- ③ Osamu Tadokoro, Epithelial and ED1 immunopositive cells in rat PDL, IADR/AADR/CADR 86th General Session and Exhibition, 2008 年 7 月 2 日, Toronto, Canada (Convention center).
- ④ 田所 治、歯根膜上皮細胞と免疫担当細胞の相互関係、第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2008 年 3 月 29 日、大分 (大分大学)。
- ⑤ 田所 治、ラット歯根膜における OX6 免疫陽性細胞とマラッセの残存上皮、第 49 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、2007 年 8 月 30 日、札幌 (北海道大学)。

[その他]

ホームページ等

下記 3 つのアドレスに、本研究の詳細について発表した論文が掲載されている。

発表論文①

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/117902054/PDFSTART>

発表論文②

<http://www.jhc.org/cgi/content/full/57/4/315>

発表論文③

<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/00016350903150002>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

田所 治 (TADOKORO OSAMU)  
松本歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：20319106