

## 1) ラット片側臼歯の喪失に対する下顎頭軟骨の組織化学的検索

○高橋 一人

(奥羽大・大学院・保存修復)

【目的】咬合, 咀嚼の機能不全, 臼歯の喪失, 片側性の咀嚼様式のような生体力学的な要因は, 顎関節への過剰な負荷を通して顎関節症を引き起こすといわれている。片側咀嚼は顎関節に異常な機械的負荷を与えることが考えられるので, 咬合が片側のみ喪失した際に顎関節への機械的刺激が軟骨代謝へどのような影響をあたえるかを調べることが本研究の目的である。

【材料と方法】本研究の実験動物には生後10週齢のメスSDラットを用い, 上顎右側第1, 第2および第3臼歯を抜歯した群(実験群)と正常群(対照群)とに分けた。抜歯を行ってから3日, 5日, 7日, 14日後に, 抜歯した側の下顎頭(非機能側), 抜歯を行っていない側の下顎頭(機能側)と対照群の下顎頭を摘出し, 10%中性緩衝ホルマリンにて固定して試料とした。EDTAにて1週間脱灰し, パラフィン包埋した後, 切片を作成した。作成した切片にアルシアンブルー染色を行った。免疫組織化学染色としてPCNA抗体, BrdU抗体, Sox9抗体, Ihh抗体, PTHrP抗体, Type II collagen抗体, Type X collagen抗体を用いた。

【結果および考察】H-E染色では, 対照群と比較して非機能側群において全ての実験期間において軟骨層の厚さに減少が観られたが, 14日後では回復傾向が観られた。また機能側では7日後, 14日後に軟骨層の厚さに増加が観られた。軟骨基質でのアルシアンブルー染色は対照群と比較して, 非機能側では7日後まで染色性が減少していた。また機能側では7日後において染色性が増加していた。軟骨細胞でのPCNA抗体を用いた免疫組織化学染色では, 増殖層および成熟層の細胞の核が染色され, 対照群と比較して非機能側では陽性細胞は減少していた。また機能側では7日後, 14日後に陽性細胞が増加していた。軟骨細胞でのBrdU抗体, Sox9抗体, Ihh抗体, PTHrP抗体は, 増殖層および成熟層の細胞が染色され, PCNA抗体と同様の時間的推移を示したが, Ihh抗体, PTHrP抗体は14日後には変化が観られなかった。

Type II collagen抗体では, 成熟層および肥大層の軟骨基質が染色され, 対照群と比較して非機能側群では3日後, 7日後, 14日後において染色性が減少した。また機能側では14日後に染色性が増加した。Type X collagen抗体では, 肥大層の軟骨基質が染色され, 対照群と比較して非機能側群では全ての実験期間において染色性が減少した。また機能側では, 14日後に染色性が増加した。臼歯を喪失した下顎頭軟骨では, 軟骨層の厚さの変化とともに, 軟骨細胞の分化, 増殖に変化が認められることが示唆された。

【結論】臼歯の喪失は, 下顎頭軟骨の軟骨代謝に変化を及ぼすことが明らかになった。

## 2) 光電変換色素膜による電気的刺激の研究

○松浦 芳久

(奥羽大・大学院・保存修復)

【目的】能動的な骨増生的手段として, 光電変換色素NK-5958, 最大吸収波長556nm(林原生化学研究所)をポリエチレンフィルム(PE)に結合させ, 光エネルギーを電気的刺激に変換することで骨形成をコントロールできるか検討した。

【材料と方法】①PEを発煙硝酸(97%, 和光純薬)で78°C, 18分間, 処理して表面にカルボキシル基を導入。②PEにアゾ基を, クロロベンゼン(和光純薬)にエチレンジアミン(和光純薬), 触媒:dicyclohexylcarbodiimide(DCC, 和光純薬)を加えた反応液を35°C, 48時間, 反応させて導入。③PEに光電変換色素, 触媒:DCCを含むクロロベンゼンに, 35°C, 24時間, 遮光ビン内にて結合させ光電変換色素メンブレンを製作。カルボキシル基, アゾ基の導入および色素の結合状態は, 赤外分光分析装置(NIRS6500)および紫外可視分光分析装置(V-570DS)を使用し, 化合物の構造分析を行った。光電変換色素メンブレン上にラット頭蓋骨より採取し培養した骨芽細胞様細胞を播種し, 24時間培養後, レーザー照射を1日10分, 5日間行った。対照群として光電変換色素を結合していないPEを用いた。照射開始3, 5日後に, ヘマトキシリン染色を行い光学顕微鏡下にて細胞数を測定した。SDラット(8週齢)の左側脛骨骨膜下に光電変換色素メンブレンを埋入し,

レーザー光を1日30分、1週間照射した。また対照群として右側脛骨に光電変換色素を結合していないPEを埋入した。1週間照射後、屠殺し、10%中性緩衝ホルマリンにて固定後、EDTAにて脱灰、パラフィン包埋後、切片を作成した。骨増生の状態を確認するため、ヘマトキシリン・エオジン(H.E)染色、免疫組織化学染色(ラビットポリクローナル抗オステオポンチン抗体)を行った。

【結果および考察】赤外分光分析にてカルボキシル基の消息を追跡した結果、アゾ基結合後においてカルボキシル基の特性スペクトルの減弱が認められ、硝酸処理後PEのカルボキシル基が消費されたことが確認された。またアゾ基導入後PEにアゾ基を示す特性スペクトルの増強が確認され、光電変換色素の足場が生成されたことが示された。紫外可視分光分析により光電変換色素メンブレンの吸収スペクトルの特性ピークは380nmで確認された。特性曲線は、青から紫色の波長での吸収増強が見られ、PE表面は色素により修飾されたことを示した。照射3日目後の培養細胞で、対照群に比較し細胞増殖が確認された。照射群のH.E染色ではメンブレン下に新生骨の形成があり、免疫化学染色ではオステオポンチンの発現があった。

今回製作した光電変換色素メンブレンは物理化学的性状が安定しており骨組織の増殖方法として十分使用できると思われた。光電変換色素メンブレンによってレーザー光が電氣的刺激に変換され、メカニカルフォースとして骨組織に感知され、骨増生に影響を与えたと考えられた。

【結論】光電変換色素メンブレンの歯科における臨床応用への可能性が示唆された。

### 3) ラット脛骨における炭酸ガスレーザー骨誘導初期変化について

○大河内瑠夏, 横瀬 敏志  
(奥羽大・大学院・保存修復)

【研究目的】炭酸ガスレーザーは高出力レーザーに分類され、現在歯科治療においてその多様性は注目を集めている。その生物学的な作用は、レーザー照射時に起こる表面組織の蒸散などのhigh level laser treatment (HLLT) 作用と、照射部

周囲におこる細胞増殖、創傷治癒促進などのlow level laser treatment (LLLTT) 作用に分けられ、最近ではレーザー照射などのメカニカルフォースを骨細胞が認識し、骨誘導を促進することも明らかになっている。そこで骨誘導時、骨細胞や骨芽細胞でどのような初期変化が起こっているのか調べるため、ラット脛骨を用いて形態学的ならびに分子生物学的に解析を行ったので報告する。

【材料と方法】8週齢のラット脛骨に観血的な処置を行い、骨表面に直接炭酸ガスレーザー(OPERASER Lite YOSHIDA)を照射した。右側脛骨に歯科用ラウンドバーにて骨欠損をつくり、左側脛骨には出力3.0W、照射距離は約5.0cmでSP1、照射時間900sにて4shot照射した。照射後3, 6hours, 3d, 5d, 10d, 15d, および20d後にエーテルにて屠殺後、それぞれ左右脛骨を摘出し、4℃、10%中性緩衝ホルマリン液で20時間固定後、脱灰液(EDTA method)にて約20日間脱灰し、エタノール脱水処理後、パラフィンに包埋した。解析法として吉木法、DEXA、免疫組織化学染色(Lef-1), in situ hybridization (Osteopontin, Type1 collagen, Osteocalcin)を行った。さらに骨髄細胞の培養によりALP陽性CFU-F数を調べた。

【結果】H-E染色では炭酸ガスレーザー照射後、5日目には炭化層を伴った皮質骨の骨髄側に新生骨を認めた。新生骨形成中骨髄側の幼弱な骨芽細胞にはOsteopontinの発現が認められた。また10日目から新生骨が既存の骨に取り込まれる20日目までにはBGPの発現が見られた。さらに培養1日目の骨髄細胞では、レーザー照射群の方がALP陽性CFU-F数が多く見られた。骨細胞に注目してみると、5日目でレーザー照射直下HLLT作用部位の骨細胞には空砲化がみられ、それより少し離れたLLLTT作用部位では骨細胞はactiveな状態であった。また骨髄側に形成された新生骨量はLLLTT作用部位の方が明らかに多かった。免疫組織化学染色では3時間後から6時間後までレーザー照射部位の骨細胞にLef-1が強く発現し、5日目から新生骨形成が起き始めるとLef-1の発現は弱まった。

【考察】今回の実験で、炭酸ガスレーザー照射