ラットの歯周組織創傷治癒過程に及ぼす 水浸拘束ストレスの影響

森 田 初 穂

九州歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第2専攻 (指導: 横田 誠教授)

九州歯科大学口腔病理学講座 (指導: 福山 宏教授)

平成6年12月25日受理

Wound Healing in the Periodontal Tissue of Rats Associated with Immersion Restraint Stress

Hatsuho Morita

Department of Periodontics and Endodontics (Director: Prof. Makoto Yokota)

Department of Oral Pathology (Director: Prof. Hiroshi Fukuyama)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

Many previous studies have investigated local factors as the causes of periodontal diseases, but there has been few research about general factors. The purpose of this study is to examine the influences of restraint and water immersion stress on wound healing in periodontal tissue and systemic conditions. The rats were divided into four groups.

- I a) G.E. (+) Stress (+) group=After gingivectomy, rats were stressed by being placed in a cage which was immersed in water, then sacrificed.
- b) G.E. (+) Stress (-) group=After gingivectomy, the rats were put back in non-immersed cages, then sacrificed.
- II a) G.E. (-) Stress (+) group=The rats were put under stress condition without gingivectomy, then sacrificed.

- b) G.E. (-) Stress (-) group=The rats were sacrificed without stress and gingivectomy.

The rats of groups I a) and I b) were sacrificed at the interval of 44 hours after gingivectomy. The rats of group of II a) were sacrificed after stress, and the rats of group II b) were sacrificed without stress and gingivectomy. Histopathologically, specimens were examined by hematoxylin-eosin staining and PCNA immunohistochemical staining.

And, to demonstrate stress, views of stomach were examined. The results are as follows.

Bleeding and erosion of the stomach mucous is found in all rats under stress. This confirms that the rats suffered stress.

1) There is no correlation between the stress group and the non-stress group in the length of epithelial migration from the residual epithelium of the wound site.

2) The number of cells in which the nucleus was stained by PCNA immunohistochemical staining is significantly larger in the non-stress group than in the stress

group.

As mentioned above, stress may be a risk factor of periodontal disease.

Key words : Wound healing / Immersion restraint stress / Proliferating cell nuclear antigen / Rat

緒 言

近年、歯周疾患の主たる原因が細菌にあるだろうということは共通認識とされてきている。しかし、その発症過程、増悪因子または、治癒遅延に及ぼす因子などに関してはいまだ不明な点が多い。

創傷治癒遅延、炎症の進行、全身的な感染に及ぼす影響として、従来から考えられている増悪因子 (Risk Factor) には次のようなものが挙げられている。すなわち、エストロゲンやプロゲステロンなどの性ホルモン、蛋白質、ビタミン A, B, C, D などの栄養、Chediak-Higashi syndrome、糖尿病などの好中球異常疾患、フェニトイン系薬剤ダイランチンなどの薬物経口投与、視床下部に存在する自律神経系の最高中枢部の障害、皮膚疾患、周期性好中球減少症、無カタラーゼ症、低ホスファターゼなどの遺伝性疾患、病巣感染、飢餓、甲状腺機能、下垂体機能、上皮小体機能などの内分泌的影響、ストレスなどが挙げられる^{1,2)}。

中でも、最近、生体の免疫能に及ぼす影響としてストレスが注目されている。Bartrop ら (1977)³⁾ は、配偶者が死亡した後、残された方の配偶者のリンパ球の反応性が、8 週間も低下していたことを報告した。また、Steven ら (1983)⁴⁾ は、乳癌患者の配偶者に対する長期的な調査検査でも同様な結果を示している。

このようなストレスの全身的影響をふまえる時、成人性歯周炎における破壊の進行や治癒遅延に及ぼす Risk Factor としての心身に与えるストレスの影響は無視できない。例えば、日常臨床で患者が何らかの強い精神的ストレス下におかれている場合、突然、付着レベルの喪失を生じるような歯周組織の急性的破壊が進行したり、術後の治癒遅延が生じたりする場面にしばしば遭遇する。

以上のようなストレスと歯周組織に及ぼす影響を明らかにすることを目的とし、歯周疾患の増悪因子の 1 つと考えられている身体的、精神的ストレスが歯周組織の創傷治癒にどのような影響を及ぼすかについて、実験動物としてラットを用い、ストレス群、非ストレス群に分けて調べ、同時にストレスと歯周疾患の関係についても考

察した。

実験材料と方法

I. 実験動物

生後 8 週齢の Wistar 系雄性ラット (九動) 26 匹を実験に供した。それらをストレス群 [以下 Str. (+) 群] 13 匹、非ストレス群 [以下 Str. (-) 群] 13 匹に分けた。

実験群は、次のように分類される。

I a) 群: 歯肉切除+ストレス負荷群

[以下, G.E. (+) Str. (+) 群とする]

b) 群: 歯肉切除+非ストレス群

[以下, G.E. (+) Str. (-) 群とする]

II a) 群: 非歯肉切除+ストレス負荷群

[以下, G.E. (-) Str. (+) 群とする]

b) 群: 非歯肉切除+非ストレス群

[以下, G.E. (-) Str. (-) 群とする]

II. 創傷治癒の与え方

G.E. (+) Str. (+) 群と G.E. (+) Str. (-) 群は以下の方法によって創傷を与えた。

pentobarbital sodium (Nembutal, ダイナボット) の腹腔内投与にて全身麻酔後、背位で開口固定した。替え刃式外科用メス (#11) を用い、上顎口蓋歯肉を第三臼歯の中央より第一臼歯近心まで切開し、付着上皮、歯肉溝上皮が残留しないように注意しながら歯肉切除を行った (図 1)。

創面は開放創とし洗浄、止血などは行わなかった。また、実験期間中は、創面の物理的刺激や免疫能への影響を避けるため食餌をさせなかった。

G.E. (+) Str. (+) 群は、歯肉切除を行い 24 時間経過後、水浸拘束ストレスを 20 時間負荷しペントバルビタールの過剰投与で薬殺し上顎を採取した。ストレス負荷の指標として胃粘膜上皮の出血、びらん、潰瘍の所見を評価するため胃も同時に採取した。

G.E. (+) Str. (-) 群は歯肉切除を行い 44 時間後ペントバルビタールの過剰投与で薬殺し上顎と胃を採取した (図 2)。

Ⅲ. 水浸拘束ストレスの負荷方法

ケージ内に通常より多数のラットを入れ動きを不自由にした。水槽に 23℃ の水を入れこの中にラットの入ったケージを入れ、水浸拘束ストレスを負荷した。水深はラットが爪先立ちになり剣状骨付近とした。ストレス負荷時間は、20 時間とした。

Ⅳ. 組織標本の作製

採取した組織を 10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定した。胃は通法に従いアルコールにて脱水しパラフィン包埋を行い厚さ 5 μ m の切片を作成し hematoxylin-eosin 染色 (以下 H. E. 染色と略す) を行った。

図1 歯肉切除の様式

上顎は、固定した後脱灰し、通法に従いアルコール脱水しパラフィン包埋を行った。頬舌的方向に厚さ 7 μ m の切片を作成し H. E. 染色を行い病理組織学的変化を検索した。また、歯肉上皮細胞の増殖能の違いを検討するために PCNA 免疫染色を行った。

Ⅴ. 組織形態計測

G. E. (+) Str. (+) 群, G. E. (+) Str. (-) 群の切片を組織形態計測に用いた。切除断端からの上皮の伸長距離を計測するために切開線から上皮の先端までの長さを計測した。計測に際しては、パーソナルコンピューター (PC-9801, NEC) とデジタイザー OSCON (SQ-3100R2, フォトロン) を利用し組織形態観察を行った。

Ⅵ. PCNA 免疫染色

免疫染色は、G. E. (-) Str. (+) 群, G. E. (-) Str. (-) 群の切片を用いて行った。PCNA 免疫染色は、Dako 社製 LSAB (Labelled Streptavidin Biotin) Kit を用いた。脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼ阻害を行い、正常ウマ血清で非特異反応をブロッキングした後、一次抗体としてモノクローナル抗 PCNA 抗体 (Dako 社, 京都) を作用させた後、DAB 基質 Kit (フナコシ社, 東京) を用いて発色させた。PCNA 陽性率は、400 倍顕微鏡下において、わずかに染色されていたものを含めて陽性とみなし基底層の細胞を 500 個計測し陽性率を求めた。

Ⅶ. 統計学的分析

切除断端からの上皮の伸長距離と基底細胞の PCNA 陽性率について差の検定を行うために、t 検定 (分散が等しくないと仮定した 2 標本による検定) を用いて統計学的に検討した。

図2 実験スケジュール

結 果

I. ストレスの確認

A. 胃の肉眼的及び病理組織学的観察

1. 肉眼所見

Str. (－) 群の全例に出血所見は認められなかった。Str. (＋) 群は、20 時間の水浸拘束ストレスを負荷したが 1 匹胃粘膜の出血が見られないものがあったのでそれは本実験から除外した (図 3)。

2. 組織所見

粘膜の欠損はいずれも粘膜筋板には及んでおらずストレスの負荷の結果としては、胃粘膜上皮の出血とびらんが観察された。

びらんが観察される部位は Str. (－) 群に較べると薄

くなっていて、胃腺はその配列を乱していた。粘膜表層には、充血と出血が見られ、表層粘膜上皮は変性、剥脱し、好中球の浸潤がみられ、部分的には壊死を生じていた (図 4)。

II. 歯肉切除部の変化

A. 組織形態計測の結果 (切除断端からの上皮の伸長距離)

全例の平均と標準偏差は、G. E. (＋) Str. (＋) 群が $188.8 \pm 83.4 \mu\text{m}$ 、G. E. (＋) Str. (－) 群が $210.2 \pm 95.1 \mu\text{m}$ であった。統計的に有意差は見られなかった (表 1)。

B. 病理組織学的観察

歯肉溝上皮、接合上皮、歯肉結合上皮は除去されていた。角化層の断端から上皮の再生が開始しており、創傷

図 3 胃粘膜上皮の肉眼所見

A. Str. (＋) 群

B. Str. (－) 群

Str. (＋) 群の胃粘膜上皮には出血が認められる。

図 4 胃粘膜上皮の組織学的所見

A. Str. (＋) 群 (H. E. 染色 $\times 16$)

B. Str. (－) 群 (H. E. 染色 $\times 16$)

Str. 群は、腺構造が乱れていて、粘膜上皮には出血、びらんが認められ、固有層には炎症性細胞の浸潤が認められる。

表1 切除断端からの上皮の伸長距離 (μm)

		MEAN	SD	N.S.
G.E. (+)	Str. (+) 群	188.8	83.4	
G.E. (+)	Str. (-) 群	210.2	95.1	

G.E. (+) Str. (+) 群 : N=51
G.E. (+) Str. (-) 群 : N=45

図5 歯肉切除後44時間の組織学的所見

A. G.E. (+) Str. (+) 群 (H.E. 染色×33)

B. G.E. (+) Str. (-) 群 (H.E. 染色×33)

増殖した上皮細胞が、歯根面にむかって伸びている。

G.E. (+) Str. (+) 群, G.E. (+) Str. (-) 群では所見に差は認められない。

表面を覆うように歯牙へ向かって伸展していた。層状を示す被覆上皮細胞が、歯牙表面に達している標本も見られた。しかし、角化までは見られなかった。また、角化層の断端から歯槽骨頂に向かって切除面相当部にフィブリン網の形成が見られた。数層の再生上皮細胞がフィブリン層と結合組織表面の間隙を歯牙側に向かって伸展増殖していた。歯肉粘膜固有層には、毛細血管の拡張そして好中球の浸潤が認められた。線維芽細胞の増殖が著明に認められた (図5)。

C. PCNA 陽性率

核が染まった細胞の数の平均と標準偏差は、G.E. (-) Str. (+) 群が 68 ± 18 個であり、G.E. (-) Str. (-) 群が 143 ± 40 個、PCNA 陽性率は、G.E. (-) Str. (+) 群が $13.6 \pm 3.6\%$ 、G.E. (-) Str. (-) 群が $28.7 \pm 7.9\%$ で、G.E. (-) Str. (+) 群の方が有意に低い値を示した (図6, 表2)。

考 察

歯周疾患の直接的原因はプラークであり、また、その

中に存在する嫌気的グラム陰性桿菌が、その主要な原因因子として探究が続いている。Goodson ら (1982)⁵⁾ によると、歯周疾患は、直線的に進行するのではなく、急性期と停止期をくり返ししながら増悪することが明らかにされ、歯周疾患は、様々な破壊のパターンを継続しながら、長期的には慢性的に進行するように認識されている。臨床において、歯周炎の急発が認められる場合、患者の体調が悪い時や風邪をひいた時と一致していることがある。このように破壊の進行には細菌などの局所原因だけでなく、他に増悪を修飾する全身的な因子が考えられている。そこで、このような歯周疾患への Risk Factor の解明の1つとして、歯周組織の創傷治癒過程に及ぼすストレスの影響について検討を行った。

I. 実験方法について

創傷治癒実験の場にラット臼歯部歯肉を選択したのは、過去の一連の研究により、ラット歯周組織の創傷治癒における正常微細構造はすでに明らかとされているからである。本研究でも、G.E. (-) 群の歯肉の所見は過去の結果と一致していた。また、この部位がヒトの

図6 PCNA免疫染色

A. G.E. (-) Str. (+) 群 (×25)

B. G.E. (-) Str. (-) 群 (×25)

基底層に沿って黒褐色に濃染された核が観察される。G.E. (-) Str. (+) 群の方が濃染された核の数は少ない。

表2 PCNA陽性率

(%)

		MEAN	SD	
G.E. (-)	Str. (+) 群	13.6	3.6	* *p<0.01
G.E. (-)	Str. (-) 群	28.7	7.9	

*p<0.01

G.E. (-) Str. (+) 群 : N=50

G.E. (-) Str. (-) 群 : N=52

DGJ : dento-gingival junction と基本的に対応可能な上皮構築を示す上にその細胞学的特徴から同一切片上で容易に junctional epithelium と oral sulcular epithelium を識別できるという実験モデルとしての利点も備えていることが挙げられる。また、本実験に8週齢ラットを用いた理由は、上皮の再生能力が高く、しかもこれまでの研究成果より同部の基本的な上皮構造が明らかにされており、かつ適当な大きさの手術野が得られるという理由が挙げられる^{6,7)}。

次に、全身的ストレスを負荷する実験系について述べてみる。ストレスの負荷方法には、1) 拘束ストレス 2) 電撃ストレス 3) 心理的ストレス 4) 恐怖条件づけストレス 5) 強制走行ストレス 6) 強制遊泳ストレス 7) 温度ストレス 8) 飼育密度によるストレス 9) 母子分離ストレス 10) 新奇環境ストレス 11) ハンドリングストレスなどが挙げられる。今回、ストレスの負荷方法として水浸拘束ストレスを選択した。この方法は、身体的要因と精神的要因をかねている上、非常に簡便であり、複雑な技術を必要とせず、一度に数多くの動物にストレ

スを負荷することができる⁸⁾。実験期間中、本当にストレスが負荷されているか否かを明らかにするための指標として胃粘膜上皮の出血、びらん、潰瘍を用いた。

実験的潰瘍を作成する方法としては、インドメタシンの腹腔内投与、セロトニンクレアチンニン酸塩の皮下注射、DA-396の経口投与などの方法があるが、本研究では水浸拘束ストレスを用いた^{9,10)}。

II. ストレスについて

A. ストレスとは

ストレスの概念を医学の領域に導入し社会科学の分野にも影響を及ぼした Selye は、生物学的ストレスを“体外から加えられた各種の有害作用に応じて、体内に生じた障害と防衛反応の総和”と定義している。

現代社会はストレスの多い時代であり、精神的ストレスによる慢性的な疾患が医療の大きな問題となっている。身体的精神的ストレスが全身に及ぼす影響としては、消化器系、自律神経系、内分泌系、免疫系などの変化を生じることが明らかにされているが、歯周組織への影響も当然無視できない。

B. ストレスの生体への影響

ストレスが、全身の免疫系に影響を及ぼすことは、最近の精神免疫学的研究の発展により徐々に明らかにされつつある。例えば、睡眠遮断や試験などの精神的ストレスは、好中球の貪食能の抑制、インターフェロン産生能の抑制、細胞分裂増殖能の抑制、NK (natural killer) 細胞の活性化などが抑制され、生体にとって有害な細菌や癌などを早期に監視し排除する役割をもつ免疫担当細胞の働きが弱くなることが知られている^{11,12)}。配偶者が死亡した後、残された配偶者のリンパ球の反応は8週間も低下する³⁾。また、ストレス状態で情動の中枢である大脳辺縁系の興奮が交感神経を介して、アドレナリンやノルアドレナリンを血中に放出する。このホルモンはNK細胞の標的細胞破壊作用を抑制する。このように自律神経系を介して免疫担当細胞機能を修飾することがあると考えられている。

松岡ら (1987)¹³⁾ は、マウスに1日当たり夜間16時間の拘束ストレスを連続2日間にわたって負荷すると、T細胞依存性抗原である羊赤血球 (SRBC) に対する抗体産生能および遅延型足蹠反応が著しく抑制され、マクロファージの貪食活性もストレス負荷終了直後に著明に低下したと報告している。また、Garbuliński ら (1991)¹⁴⁾ は、低体温に至る冷却は、好中球増加症、好中球殺菌機能の低下、貪食細胞数と貪食された細菌数の有意な減少を引き起こしたと報告している。

マウスを騒音ストレスに短期暴露すると、ConA (concanavalin A) および LPS (lipopolysaccharide: リポ多糖類) によるリンパ球幼若化が抑制されるが長期暴露ではこの反応は逆転すると述べており、期間によりストレスに対する生体側の反応は異なっていると思われる。また、ストレスを与える時期によっても免疫反応は異なる。多発性硬化症の動物モデルである実験的アレルギー性脳脊髄膜炎 (EAE) の Lewis ラットでは、抗原を与えた後3日間夜間拘束ストレスを負荷してもEAEの発症に影響しないが、2週間目では影響があることを報告している¹⁵⁾。

このように、単にストレスの種類、量、時間だけが問題になるのではなくストレスを受けたときの脳内状態により免疫系への影響も異なるといわれている。本研究の結果にも、上記の実験系における変化が生じていたことが想定される。

C. ストレスと歯周疾患

過労や睡眠不足が続いたときなどに歯周疾患が増悪したり急性壊死性潰瘍性歯肉炎 (ANUG) が発生するこ

とをよく経験する。これは、Host の免疫機能が低下し感染抵抗力が低下したことによると考えられる。Host の抵抗力の減弱は、好中球の貪食能やリンパ球のインターフェロン産生能、分裂増殖能など生体にとって有害な細菌などを排除する役割をする免疫担当細胞の働きが弱くなることが挙げられる^{5,12)}。例えば、Leslie ら (1986)¹⁶⁾ は、生活していく上で起こる出来事 (life events) により負荷されるストレスについて、ヒトの歯周疾患は、life events に関係しており特に BSI (Brief Symptom Inventory) のサブスケールである SOM (Somatization) に高いスコアをだすヒトは歯周疾患に罹患する可能性が高いと報告している。これも、ストレスが Host の免疫能を低下させたと考えられている。

歯周組織に人工的創傷を与えているのではないが、cold stress 下におかれたラットに関して、Shklar (1966)¹⁷⁾ は、歯周組織の変化について、気温 0-2℃ に6-18か月おかれたラットでは、歯槽骨は骨粗鬆症となっており、上皮付着の根尖方向への深行に特徴づけられる歯周組織の変化そして歯周ポケットの形成を示したと報告している。

しかし、このようなストレスと歯周疾患の関係についてはほとんど研究されていない。本実験で得られた組織変化では、創傷治癒過程における上皮組織の顕著な病理組織学変化は認められなかった。しかし、G. E. (-) Str. (+) 群と G. E. (-) Str. (-) 群を比較した PCNA 免疫染色では、上皮基底細胞層の活性が落ちていた。これにより、水浸拘束ストレスが上皮の増殖能が抑制されていたことが示唆された。これは、ストレスが直接、上皮の増殖に影響したことが考えられたが、これをすでに歯周疾患に罹患している場合に当てはめるならば、患者がストレスを受けることにより、免疫系の抑制が起こり感染が増大し、さらに上皮の増殖の抑制により治癒反応を遅らせ感染の機会をさらに与えることが考えられる。

D. ストレスと胃

胃は、消化の第一段階を行う場所であり、胃体、幽門部 (幽門前庭) からなり、前者の円蓋部を胃底と呼ぶ。胃体は、胃腺という消化酵素と塩酸を分泌する領域であり幽門前庭は幽門腺による粘液の分泌とガストリンというホルモンの分泌とが行われる所である。組織学的に見ると粘膜、粘膜下組織、筋層、漿膜下組織、漿膜から成り、粘膜はさらに、単層円柱上皮、結合組織、粘膜筋板に分けられる。単層円柱上皮は、特殊粘液様物質を分泌

するため表層粘液細胞とよばれる。その分泌物は塩酸に溶けないから、塩酸から粘膜を守るのに好都合である¹⁸⁾。

胃液の分泌が迷走神経の作用によって促されることは広く知られていることで、ヒトや実験動物で過剰のストレスが迷走神経を介して胃酸の分泌亢進を起こし胃粘膜の消化性潰瘍を招くことはよく知られている。

Selye は、汎適応症候群とよんで、ストレスの大きな 3 つの徴候を、副腎の肥大、胸腺リンパ組織の萎縮、胃、十二指腸の潰瘍性変化を挙げており、本実験のストレス群の全例に胃粘膜上皮の出血、びらんが認められたことは、Selye の 3 つのストレスの徴候の 1 つを明らかに満足していた¹¹⁾。本研究では、消化器の 1 つである口腔粘膜と対応させるためストレスの消化器の徴候である胃粘膜上皮の出血、びらんを証左として用いた。並木 (1988)¹⁹⁾ は、急激なストレス状況下で発症した胃、十二指腸の急性の潰瘍性変化、いわゆるストレス潰瘍について、1) 出血性びらんが多発する例 44.4%、浅い潰瘍性変化が多発する例 29.7%、これらの変化が混在する例 8.9% と報告している。また、胃潰瘍の 50% 前後にストレスが関与していることを明らかにした。これは、年齢によっても差が見られ、10 代では 68% と高く若年者ではストレスの影響がダイレクトに関与することを示唆している。

胃潰瘍の発生は 3 つのルートをとる。1 つめは交感神経中枢によるものである。交感神経の興奮によって細動脈の収縮や動静脈吻合の開口が起こり、胃粘膜は虚血状態となる。そして、静脈側の収縮により鬱血がおこり、粘膜先端に血栓形成がみられ、いっそう血流障害が強まり胃粘膜は脆弱となる。2 つめは副交感神経中枢によるものである。副交感神経は迷走神経を介して胃に働き、塩酸、ペプシン、ガストリンの分泌を促し、胃の運動、緊張の亢進をおこす。これにより胃壁の筋層が痙攣性に収縮し、このためにこれを貫く血管が圧迫を受けると、粘膜の血流障害が起こり、虚血が助長される結果、表層上皮細胞、腺窩上皮細胞への乏血、酸欠状態を引き起こし、結局は、粘膜抵抗力を弱める。こうして抵抗力の減じた粘膜に胃液の作用が加わり傷害された胃粘膜からは、ヒスタミンやセロトニンなどの血管作動物質が遊離され、これがさらに虚血を助長し悪循環がくり返される。3 つめのルートである下垂体副腎系については、視床下部の興奮により下垂体前葉から ACTH (副腎皮質刺激ホルモン) の分泌が促され、その刺激によって副腎皮質ホルモンの分泌が高まり、それが壁細胞や主細胞

に働いて塩酸及びペプシンの分泌を促進する。他方、粘液細胞に働いて粘液の分泌を抑制する。つまり、ACTH により muscos barrier の不利な量的質的变化がおこる。これらのことがからみあって防御因子の減弱と攻撃因子の増強がもたらされ潰瘍性変化が発生する^{19,20)}。

本研究で負荷した水浸拘束ストレスによりラットの胃粘膜上皮に出血、びらんが観察されたのでストレスが負荷されていたことは明らかである。

Ⅲ. 歯肉組織創傷治癒過程について

過去の歯肉創傷治癒過程に関する研究によると、非ストレスラットの歯周組織の治癒における組織学的検索では、歯肉切除後、創面は線維素性の滲出物に被覆されており、多形核白血球の集積、血管の拡張や透過性亢進による浮腫性変化が認められ、術後 3 日目で不規則な形態を呈しているものの再生した上皮は歯根面に達し歯肉溝の形態を呈すると報告されている²¹⁻²⁶⁾。

本研究で、実験期間を 44 時間に設定した理由は、歯肉切除 24 時間後では組織は壊死した状態で、上皮の再生が起きていることが観察できないことがわかり、また、歯肉切除を行い、3 日後の組織所見では、上皮が歯根面に達するため、上皮の伸長を比較するには 3 日目以前が適当と考えたからである。

切除断端からの上皮の伸長距離に、有意差が見られなかったことに関して、本研究で負荷した 20 時間の水浸拘束ストレスが G. E. を行った歯肉の増殖にはストレスサーとして創傷の治癒遅延を起こすには不適當であったことが考えられる。粘膜上皮のターンオーバーに要する期間に匹敵するような長期のストレスを負荷すれば切除断端からの上皮の伸長距離に有意差を生じたかもしれない。これに対して、胃粘膜上皮の変化は明らかであり、出血、びらんが観察されたのは、支配神経である迷走神経の興奮により分泌される塩酸、ガストリン、ペプシンの増加が関与しているためである。このように、同様のストレスを負荷しても臓器、組織の神経支配や組織構造の違いが大きく関わっていることがわかる。

Ⅳ. PCNA 免疫染色について

PCNA は、cell cycle に関連した核タンパクであり、DNA polymerase- δ の補助的タンパクであり、cell cycle において G1 期を通して増加し、ピークは G1/S 細胞分裂間期で G2 期を通して減少する²⁷⁻³¹⁾。一般的には細胞の複写のマーカーと考えられているが、PCNA 表出は、DNA 修復過程と関連している。あるいは、成長因子による刺激であるかもしれないと示している研究もある。佐藤ら (1994)³²⁾ は、喫煙をさせたラットに歯

肉剥離手術を行い、歯周組織再生過程における免疫組織科学的検索を行い、タバコの影響が術後早期の再生上皮に影響を及ぼし創傷部と外界である口腔との閉鎖を遅延させたと考えられると報告し、タバコが歯肉創傷治癒を遅延させることをPCNA免疫染色で明らかにしている。

以上の結果より、ラットにおいて、ストレスが創傷治癒遅延や歯周疾患のRisk Factorになる可能性があると考えられる。今後、ストレスが歯周疾患に及ぼす影響をさらに探究するとともに、免疫能および細胞レベルの研究が必要とされる。

結 論

ストレスが歯周組織創傷治癒過程にどのような影響を及ぼすかを明らかにするために、ラットを用いて、病理組織学的、免疫学的に観察、計測を行い、以下の結論を得た。

1. 切除断端からの上皮の伸長距離は、ストレス群の方が小さい値を示す傾向があったが、統計的な有意差は見られなかった。

2. PCNA陽性率は、ストレス群の方が、有意に低い値を示した。

また、ストレス群の全例に、胃粘膜上皮の出血、びらんが認められた。

謝 辞

稿を終わるに臨み、指導を賜りました横田 誠教授と口腔病理学講座福山 宏教授に深く感謝いたします。また、本研究に対して御助言、御指導を頂きました歯科保存学第2講座、口腔病理学講座の皆様には感謝いたします。

引用文献

- 1) 松江一郎訳：オルバンの最新歯周治療学。技報堂、東京、1975、141-151。
- 2) 木下四郎、末田 武監訳：グリックマン臨床歯周病学。医学書院、東京、1976、365-415。
- 3) Bartrop, R. W., Lazarus, L., Luckhurst, E., Kiloh, L. G. and Penny, R.: Depressed lymphocyte function after bereavement. *Lancet* 16: 834-836, 1977.
- 4) Schleifer, S. J., Keller, S. E., Camerino, M., Thornton, J. C. and Stein, M.: Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *JAMA* 250 (3): 374-377, 1983.
- 5) Goodson, J. M., Tanner, A. C. R., Haffajee, A. D., Sornberger, G. C. and Socransky, S. S.: Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 9: 472-481, 1982.
- 6) 高田 隆：ラット臼歯部付着上皮の再生過程に関する超微形態学的研究。日歯周誌 24: 225-248, 1982。
- 7) 杵淵孝雄：ラット前口蓋ヒダ部粘膜上皮の組織学的観察—上皮-結合組織境界部の形態ならびに基底・有棘層の構造的特徴—。口病誌 57 (4): 464-519, 1990。
- 8) 田中正敏：動物実験におけるストレス負荷法。日薬理誌 102: 69-76, 1993。
- 9) 三好秋馬、城所 功、長尾房大、松尾 裕、岡部 進：実験潰瘍。医学図書出版、東京、1987、16-54。
- 10) 佐藤徳光：動物実験の基本。西村書店、新潟、1986、152。
- 11) 長谷川浩、宗像恒次：行動科学と医療。弘文堂、東京、1991、80-112。
- 12) 星 恵子：ストレスと免疫。講談社、東京、1994。
- 13) 松岡隆夫、吉井春夫、末廣誠之：Neurotrophinの免疫薬理学的作用(第5報)—ストレス負荷による免疫機能の低下に対する作用—。日薬理誌 90: 67-71, 1987。
- 14) Garbaliński, T., Obminska-Domoradzka, B., Świątała, M. and Dębowy, J.: Responses of neutrophils and lymphocytes in the cold stress: Effects of nonsteroid anti-inflammatory drugs. *J. Pharmacol. Pharm.* 43: 353-359, 1991。
- 15) 堀 哲郎：脳による免疫系の制御。福岡医誌 80 (12): 503-509, 1989。
- 16) Green, L. W., Tryon, W. W., Marks, B. and Huryn, J.: Periodontal disease as a function of life events stress. *J. Human Stress Spring*: 32-36, 1986。
- 17) Shklar, G.: Periodontal disease in experimental animals subjected to chronic cold stress. *J. Periodontol.* 37: 377-383, 1966。
- 18) 藤田恒夫、藤田尚夫：標準組織学各論。医学書院、東京、1986、112-120。
- 19) 並木正義：特集—ストレスと病気—ストレスによる病気の診療の実際 ストレス潰瘍。臨床と研究 65 (5): 1447-1451, 1988。
- 20) 星 猛、入来正躬、松尾 裕、竹口紀晃：臨床生理学シリーズ③胃。南江堂、東京、1991、205-210。
- 21) 笠井俊一：歯齦切除後の付着上皮再生に関する超微形態学的研究。日歯周誌 23: 273-289, 1981。
- 22) 西澤和利、仲谷 寛、鴨井久一：ラット歯周組織の創傷治癒過程に関する免疫組織科学的研究—高周波電気メス及び外科用メスによる歯肉切除後のフィブロネクチンの局在。日歯周誌 33: 751-766, 1991。
- 23) 仲谷 寛、佐藤 聡、宮里明子、北島裕子、青木威仁、鴨井久一：ラット歯周組織の創傷治癒におけるIV型コラーゲンとラミニンの局在。日歯周誌 34: 179-186, 1992。
- 24) 本多隆保：ラット歯肉の創傷治癒に及ぼす細菌性プロテアーゼとアロキサン糖尿病の影響。日歯周誌 28: 39-55, 1986。
- 25) Shimono, M., Inoue, T. and Yamamura, T.: Regeneration of periodontal tissues. *Adv. Dent. Res.* 2 (2): 223-227, 1988。

- 26) Wikesjö, U. M. E., Nilvéus, R. E. and Selvig, K. A. :
Significance of early healing events on periodontal
repair : A review. J. Periodontol. 63 : 159-168, 1992.
- 27) 辻 龍男, 佐々木功典, 木村由香, 前田寛治, 金川昭啓,
井上 敬, 早津良和, 篠崎文彦 : 増殖細胞核抗原
(PCNA) の免疫組織染色における問題点. 日口外誌 38
(7) : 21-24, 1992.
- 28) 村井正彦, 泉 廣次, 山本浩嗣 : 歯源性嚢胞における上皮
増殖能の比較研究. 日口外誌 39 (6) : 652-657, 1993.
- 29) 鈴木孝夫, 岸本浩次, 家泉桂一, 岩沢篤郎, 中野 浩, 磯
山恵一, 今井 満, 中川信廣, 近藤峰子, 光谷俊幸 : 増殖
細胞核抗原 (PCNA) の基礎的検討. 臨床検査 36
(1) : 81-84, 1992.
- 30) 玉井克之 : DNA 複製装置と増殖関連抗原. 病理と臨床
9 (7) : 855-861, 1991.
- 31) Li, T.-J., Browne, R. M. and Matthews, J. B. :
Quantification of PCNA⁺ cells within odontogenic jaw
cyst epithelium. J. Oral. Pathol. Med. 23 : 184-189,
1994.
- 32) 佐藤 聡, 鴨井久博, 稲田全規, 小川智久, 鴨井久一 : 喫
煙モデルラットにおける実験的歯周外科処置後の創傷治癒
過程に関する研究—ラミニンの局在と細胞活性について
— . 日歯周誌 36 (秋期特別号) : 134, 1994.