原 著

歯根膜細胞ならびに骨芽細胞の低酸素状態における増殖と機能に関する研究

窪 田 正 宏

東京医科歯科大学歯学部歯科矯正学第1講座（指導：三浦不二夫教授）

（1989年9月25日 受付）

Study on Proliferation and Function of Periodontal Ligament Fibroblasts and Osteoblastic Cells under Hypoxia

Masahiro Kubota

The First Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Director : Prof. Fujio Miura)

There have been many reports recognizing vascular changes on pressure side of periodontal tissues during orthodontic tooth movement. The vascular changes cause local hypoxia which seems to affect the phenotypes of periodontal tissue cells. In order to clarify the effect of hypoxia on proliferation and function of periodontal tissue cells, DNA content, alkaline phosphatase (ALP) activity and prostaglandin E₂ (PGE₂) production under a hypoxic condition in both periodontal ligament fibroblasts (PLF) and osteoblastic cells (MC3T3-E1 cells) were examined *in vitro*. PLF were cultured from human periodontium and identified by both morphologic characterization and presence of ALP.

The results obtained were as follows :

1. Under 10% O₂ condition, the activity of proliferation in PLF did not change but that of osteoblasts was inhibited.
2. ALP activity in PLF was stimulated but that of osteoblasts was inhibited under the hypoxic condition.
3. Production of PGE₂ in osteoblasts increased after 7 days of hypoxia though that in PLF decreased. In addition, the enhancement of PGE₂ production in osteoblasts was due to activation of both phospholipase A₂ and PGE₂-synthesizing enzymes.
4. From the orthodontic point of view, hypoxia on the pressure side may induce bone resorption by inhibiting mineralization activity of osteoblasts and enhancing production of PGE₂ in osteoblasts.

I. 緒 言

歯根膜組織には線維芽細胞, 血管内皮細胞, 骨芽細胞, 破骨細胞など多種類の細胞が存在するが, その大部分は線維芽細胞である(以下, この歯根膜の線維芽細胞を歯根膜細胞と呼ぶことにす

る)。歯根膜細胞は他の組織の線維芽細胞にはない特徴的な酵素であるアルカリフォスファターゼ(以下ALPとする)を有しており^{1,2)}, 山下³⁾やKawaseら⁴⁾の報告から歯根膜のALPは骨芽細胞と同じく骨型であることが知られている。また, 歯根膜細胞は副甲状腺ホルモンや活性型ビタ

ミンD₃に対して骨芽細胞と類似した応答性を示すという報告もなされている⁵⁾。この二つの観点から、歯根膜細胞は骨芽細胞の未分化型細胞あるいは類似細胞であると考えられる。

以上のことから歯根膜細胞と骨芽細胞との関係を明確にし、両細胞の増殖と機能を解明することは歯科領域全体にとって意義深いことである。なかでも歯科矯正学の分野では、最近、歯の移動機構に関して、歯根膜細胞や骨芽細胞など数種の細胞とそれらの細胞間に働く伝達物質の存在が重要視されており、両細胞の機能を明らかにすることは歯の移動機構を解明するうえで重要である。

歯根膜細胞や骨芽細胞の機能を明確にとらえるには、それぞれの細胞培養系で調べる必要がある。Melcher らはマウスの歯根膜細胞を⁶⁾、Brunette らはサル⁷⁾ およびブタ⁸⁾ の歯根膜細胞を、Blomlöf ら⁹⁾ および Ragnarsson ら¹⁰⁾ はヒト歯根膜細胞を培養することに成功している。しかし、歯根膜組織の絶対量が少ないために細胞培養が容易でなく、歯根膜細胞の機能についてまだ不明な点が多い。

先にも述べたように、矯正力による歯の移動には細胞と細胞間に働く伝達物質が重要視され、近年、その物質の一つとしてプロスタグランディン(以下 PG とする)が骨吸収因子として指摘されてきた¹¹⁾。PG は、細胞膜のリン脂質中に存在するアラキドン酸など炭素数20個の不飽和脂肪酸から生合成される生理活性物質で、その構造式の違いによって多種類の PG に分類される¹²⁾。膜に刺激が与えられると、細胞質中に存在するホスホリパーゼA₂によって、PG の前駆体である不飽和脂肪酸がリン脂質から細胞質中に遊離する。この遊離した脂肪酸は、ただちにミクロソームに存在する PG 合成酵素系によって各 PG へと変換される。その中でも PGE₂には骨吸収を促進する作用があることが報告され、歯科矯正学の分野でも歯の移動時の圧迫側歯槽骨の吸収と PG との関係について研究が行われている。Yamasaki ら¹³⁾は、矯正力による歯の移動時に、PGE₂が破骨細胞の出現に重要な役割をしていることを示唆した。

Davidovitch ら¹⁴⁾は、免疫組織化学的手法により矯正力を付与した歯周組織に PGE₂の局在を観察しており、歯の移動初期には圧迫側の骨芽細胞に強く観察されたと報告している。また、田口¹⁵⁾は歯の移動初期の PGE₂陽性細胞を電顕的に観察し、それが内皮細胞と線維芽細胞であったと報告している。これらの報告から、歯に矯正力を加えると、それがなんらかの形の刺激となって歯周組織の細胞に伝達され、細胞はその刺激にตอบสนองして PG を産生し、歯槽骨の改造が行われるものと思われる。

ところで、歯根膜細胞をはじめとする歯周組織の細胞は豊富な血液循環を受けていることから¹⁶⁾、歯根膜の血管の血流の変化が歯周組織の細胞に与える影響は大きいと思われる。Zaki ら¹⁷⁾はラットの歯に矯正力を加えたときの組織像を観察し、牽引側では血管が拡張し、逆に圧迫側では圧縮されていると述べている。また、犬の歯に矯正力を用いた Gianelly¹⁸⁾らは、圧迫の際の歯根膜内における血流の変化が歯槽骨の吸収に関係があると指摘している。中村¹⁹⁾は圧迫側歯根膜血管の走行の変化を形態学的に研究し、一定以上の力が加わると圧迫側に貧血帯を生じることを、また、近藤²⁰⁾は、インピーダンス・プレチスモグラフを応用し、歯根膜圧迫部における血流量の減少は歯根膜の圧迫される度合いに依存することを報告している。さらに、Gaengler ら²¹⁾は、生体顕微鏡を用いて、ある一定以上の力が加わると歯根膜の血管に不可逆性の血栓が生じることを観察した。矯正力付与後の圧迫側歯根膜における血管透過性亢進反応を組織学的に観察した堀²²⁾は、anoxia な状態の組織から産生される物質がこの反応を惹起している可能性を指摘している。

これらの研究から矯正力を付与したときの圧迫側歯根膜の一部は虚血に伴う低酸素状態にあり、これが刺激となって、その組織の細胞から PG などの化学的伝達物質が産生されて骨系の細胞に作用し、骨の吸収がさかんに行われるものと推定される。しかし、実験環境の設定は容易でないために、歯周組織に対する低酸素状態の影響を *in vivo*

で調べることは困難である。

そこで、本研究では、歯周組織の細胞のうち歯根膜細胞と骨芽細胞をとりあげ、*in vitro* の系で両細胞が低酸素状態でどのような増殖と機能を示すかを調べることにした。それにはまず、研究の基本的課題を解決するために予備実験を行い、その成果をふまえて本実験を計画した。

すなわち、予備実験として、

1. 培養歯根膜細胞の同定
2. 培養歯根膜細胞の性質の検討
3. 低酸素状態の実験条件の設定

本実験として、低酸素状態における歯根膜細胞と骨芽細胞の増殖と機能を調べた。

II. 予 備 実 験

1. 培養歯根膜細胞の同定

ヒトの歯根膜組織から以下に述べるような方法で歯根膜細胞の継代培養を行い、培養した細胞がALP 活性を有するかどうか否かを酵素組織化学的手法により検討することとした。

1) 方 法

(1) 歯根膜細胞の培養法

矯正患者より抜去した第1 小臼歯の 歯根中央 1/3 の歯根表面に付着している 歯根膜組織片をメスでかきとり、無菌的に培養ディッシュ底に置き、その組織片にカバーガラスをのせ、ディッシュに培養液を満たした。培養液には20%牛胎仔血清 (Irvine社製), 100U/ml ペニシリンおよびストレプトマイシン溶液を含む Eagle's minimum essential medium alpha (α -MEM) (GIBCO社製) を用いた。培養条件として温度は37℃, 気相は20% O₂, 5% CO₂ とした。

培養約3日後には、組織片から細胞の outgrowth がみられた。その後は2日ごとに培養液を交換した。培養細胞が confluent stage に達した後、0.05% トリプシン, 0.05% EDTA を含む PBS (-) で継代を行った。実験には5~10代の増殖のさかんな細胞を用いることとした。

(2) ALP の酵素組織化学的検索法

Confluent stage に達してから1週間後の細胞

図1 歯根膜細胞の位相差顕微鏡像

(a) 継代1日後

(b) Confluent Stage

図2 ALP 活性の染色

(a) 一般の線維芽細胞

(b) 歯根膜細胞

を検索に用いた。まず、培養液を捨て、生理的食塩水で洗浄後、99% エタノールで細胞を固定した。固定終了後、エタノールを捨て、蒸留水で洗

浄後、染色液と反応させた。染色液は Watanabe らの方法²³⁾に準じ、基質は Naphthol AS-BI Phosphoric acid, 基質緩衝液は 0.05M AMP (2-amino-2-methyl-1,3-propanediol) 溶液 (pH 9.8), 染色剤は Fast Blue RR salt を用いた。

2) 結 果

培養歯根膜細胞の位相差顕微鏡像を図 1 (a), (b) に示す。図 1 (a) からわかるように細胞は長軸の長い紡錘形をした線維芽細胞様細胞であり、細胞数が増加すると図 1 (b) のように一定方向に配列した。

ALP 活性については濃青紫色の様なアゾ色素の沈着物として観察された (図 2)。すなわち、予備実験にて培養した細胞は ALP 活性を有することが知られた。

3) 考 察

継代 5 ～ 10 代目の増殖のさかんな歯根膜細胞は、光顕的には均一な線維芽細胞様細胞で、Ragnarsson らが報告しているヒト歯根膜細胞⁴⁰⁾の光顕像と類似していた。加えて、増殖すると一定方向に配列する性質も線維芽細胞の特徴を示していた。これらの 2 点から、培養歯根膜細胞は骨芽細胞²⁴⁾をはじめとするその他の歯周組織の細胞とは、形態学的特徴が異なることが知られた。一方、この細胞は酵素組織化学的検索により ALP 活性を有することを示していた。以上のことから、培養ヒト歯根膜細胞は 5 ～ 10 代目においても歯根膜細胞の性質を有しているので、歯根膜細胞と同定してよいと考えられる。

2. 培養歯根膜細胞の性質の検討

まず、歯根膜細胞の生理的機能を調べるために、アラキドン酸を代謝して産生される PG の種類を分析し、Kodama らが樹立した株化骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1²⁵⁾についても調べ、比較した。ついで、歯根膜細胞と MC3T3-E1 細胞の細胞膜のリン脂質中の脂肪酸組成を分析し、両者を比較、検討することとした。

1) 方 法

(1) PG の分析法

Confluent stage に達した細胞に 1/15M リン酸

緩衝液 (pH 8.2) 0.5m/ を加えて超音波処理を行った後、¹⁴C-アラキドン酸 (0.2 μ Ci/ディッシュ) と 37℃ で 15 分間反応させた。1 N 塩酸を加えて反応を停止させた後、酢酸エチルで抽出を行い、薄層クロマトグラフィーで展開した。展開の溶媒には酢酸エチル/イソオクタン/酢酸/水 (11:5:2:10, V/V) の有機層を用いた²⁶⁾。展開が終了した後、linear analyzer (Berthold Japan 社製) を用いて、薄層クロマトグラフィープレート上で分離された各 PG の放射活性の分析を行った。

(2) リン脂質の脂肪酸組成の分析法

細胞が confluent stage に達した時点で培養液を捨て、生理的食塩水で洗浄後、細胞をかきとった。そして、Bligh と Dyer²⁷⁾ の方法に基づき、細胞の全脂質をクロロホルム/メタノール/水 (1:2:0.8, V/V) で抽出した。これをさらに薄層クロマトグラフィーで展開し、リン脂質を抽出した。展開溶媒にはヘキサン/エタノール/酢酸 (90:10:1, V/V) を用いた。抽出物は 5% 塩酸メタノールでメチル化した後²⁸⁾、ヘキサンで再抽出し、キャピラリーガス クロマトグラフィー (島津製作所製 Shimadzu GC 7AG) で脂肪酸組成を分析した。

2) 結 果

歯根膜細胞は PGE₂ のほかに 6-ケト PGF_{1 α} も産生するのに対し、MC3T3-E1 細胞は PGE₂ のみを産生することが知られた (図 3)。

次に、歯根膜細胞ではアラキドン酸 (20:4, n-6) やリノール酸 (18:2, n-6) といった n-6 系の脂肪酸の割合が多く、一般の線維芽細胞の組成と類似していたのに対し、MC3T3-E1 細胞ではオレイン酸 (18:1, n-9) に代表される n-9 系の脂肪酸の割合が多いことが知られた。さらにその中には一般の細胞には認めにくい 5, 8, 11-エイコサトリエン酸 (20:3, n-9) が認められた (表 1)。

3) 考 察

これまでにも Davidovitch ら¹⁴⁾は免疫組織化学的手法により歯根膜組織に PGE₂ の局在を認めていたが、今回の実験で、歯根膜細胞がアラキドン

図3 細胞のアラキドン酸代謝物の分析

AA : アラキドン酸
E : PGE₂
6KF : 6-ケトPGF_{1α}

表1 細胞膜のリン脂質中の脂肪酸組成

脂肪酸	歯根膜細胞	骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1)
16:0	18.1	14.9
16:1, n-9	2.9	7.0
18:0	15.9	12.9
*18:1, n-9 (オレイン酸)	5.5	28.7
18:2, n-6 (リノール酸)	2.5	1.1
*20:3, n-9	0.4	3.4
20:3, n-6	1.9	0.6
*20:4, n-6 (アラキドン酸)	13.2	5.7
20:5, n-3 (エイコサペンタエン酸)	0.4	0.5
22:6, n-3 (ドコサヘキサエン酸)	6.0	1.8

*特に差の大きいもの

酸を代謝して PGE₂ を産生することが生化学的に証明された。

ところで、歯根膜細胞の脂肪酸組成については、MC3T3-E1 細胞のそれとは n-6 系の脂肪酸が多い点で全く異なることが知られた。近年、アラキドン酸以外の高度不飽和脂肪酸にもさまざまな生体機能調節作用があることが明らかにされており²⁹⁾、脂肪酸組成の差は両細胞の生理的機能に差があることを示唆している。

また、今回の実験結果から、MC3T3-E1 細胞には他種の細胞には認められない 20:3, n-9 という脂肪酸が認められたが、この脂肪酸は骨肉腫細胞である rat osteosarcoma (ROS) 細胞にも認められており、骨代謝になんらかの役割を果たしているのではないかと考えられている^{30,31)}。

3. 低酸素状態の実験条件の設定

歯根膜細胞と MC3T3-E1 細胞を低酸素状態で培養するために、*in vitro* における低酸素状態の実験条件を検討した。

1) 方法

従来の CO₂ インキュベーターは炭酸ガスと大気で気相を調節する仕組みであるため、酸素濃度を低下させるために大気の濃度を低下させると、相対的に炭酸ガスの濃度が高くなり、培養液の pH に大きく影響することが予想された。この点を解決するために、大気中の酸素を窒素に置換することによって、酸素濃度を調節することができる N₂-O₂-CO₂ インキュベーター (タバイエスベック社製 BNP110) を用いれば、炭酸ガスの濃度は一定に保ちつつ酸素濃度の調節が可能であり、pH への影響は少ないであろう。これを確かめるため、N₂-O₂-CO₂ インキュベーター内の酸素濃度を 20% から 10% に減じて設定し、このときの培養液 (10% 牛胎仔血清を含む α-MEM) 中の pH の経時的変化を調べた。

2) 結果

N₂-O₂-CO₂ インキュベーター内の酸素濃度を 10% に設定したときの培養液の pH は、数十分で急激に上昇した後すぐに減少し、3 時間後には最初より 0.1 高い値で安定となった (図 4)。また、

図4 低酸素状態での培養液のpHの変化

3時間後の培養液中の溶存酸素量を測定したところ、実験開始後のほぼ半分であった。

3) 考察

以上の結果から、 $N_2-O_2-CO_2$ インキュベーター内で3時間以上酸素を窒素に置換することにより、酸素濃度10%の低酸素状態を設定すれば、酸素濃度20%と比較して培養液中の溶存酸素量は半分であるが、pHはほとんど変わらないことが知られた。

4. 予備実験の小括

以上の成果を小括すると次のとおりである。

すなわち、1)培養歯根膜細胞は光顕的に線維芽細胞の形態学的特徴を示すのに加え、ALP活性を有するという2点から歯根膜細胞と同定した。2)アラキドン酸代謝については、培養歯根膜細胞は PGE_2 と6-ケト $PGF_{1\alpha}$ を産生するのに対し、MC3T3-E1細胞は PGE_2 のみを産生する点で異なっていた。また、歯根膜細胞の脂肪酸組成については、n-6系の脂肪酸が多い点でMC3T3-E1細胞と異なることが知られた。3) $N_2-O_2-CO_2$ インキュベーター内で3時間以上低酸素状態の設定を行えば、培養液中のpHの変化は認められなかった。

Ⅲ. 本 実 験

予備実験の成果をふまえて、本実験では、低酸素状態における歯根膜細胞と骨芽細胞の増殖と機

能を調べた。

1)両細胞の増殖については、DNA量の経時的変化の観点から増殖能を調べた。ついで、2)機能については、ALP活性の経時変化および実験開始7日目の細胞の PGE_2 産生量の変化という観点から調べた。なお、3)MC3T3-E1細胞について、 PGE_2 の産生量が増加する結果が得られたので、この増加機序を(1)ホスホリパーゼ A_2 活性の変化と(2) PGE_2 合成酵素系の活性の変化の点から調べた。

1. 方法

実験は細胞がconfluent stageに達したときから開始し、低酸素群の酸素濃度を10%、対照群の酸素濃度を20%、どちらも炭酸ガス濃度を5%、温度を37℃に設定した。培養液は10%牛胎仔血清を含む α -MEMを用い、培養液交換時にはあらかじめ3時間以上インキュベーター内で調整した培養液を用いた。

1) DNA量の測定法

培養ディッシュから培養液を捨て、生理的食塩水で洗浄後、細胞をかきとり、一定量の生理的食塩水を加えて超音波で細胞膜を粉碎したものを試料とした。Downsらの方法³²⁾に従い、これに100mM塩化ナトリウムおよび10mMEDTAを含む10mMトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)と蛍光試薬Hoechst H33258を加えて37℃で10分間反応させた。反応後、分光蛍光光度計(島津製作所製RF-540)で蛍光波長455nm、励起波長350nmでの蛍光を測定し、標準試料の値から細胞のDNA量を求めた。

2) ALP活性の測定法

試料はDNA量の測定に用いたものと同じものを用い、ALP活性の測定方法はLowryらの方法³³⁾に基づいた。基質はp-ニトロフェニルリン酸2ナトリウム、緩衝液は0.1M炭酸緩衝液(pH10.0)を用いた。試料と基質とを37℃で15分間反応させた後、405nmの波長の光の吸光度を分光光度計(島津製作所製UV-160)で測定し、標準試料の値から活性を求めた。単位は測定材料1mlが25℃において毎分 $1\mu M$ の基質を変化させる酵

素量を1Uとした。

3) PGE₂ 産生量の測定法

実験開始7日目の細胞の培養液を採取し、培養液中に含まれるPGE₂量を、¹²⁵I-PGE₂ RIA Kit (NEN社)を用いて放射免疫活性測定法にて測定した。

4) ホスホリパーゼA₂活性の測定法

まず、実験開始6日目の細胞を、¹⁴C-アラキドン酸(0.05 μ Ci/ディッシュ)を含む10%牛胎仔血清含有 α -MEMで24時間培養した。ついで、培養液を捨て、無血清 α -MEMで洗浄後、10%牛胎仔血清を含む α -MEMを加えてさらに1時間培養した。培養終了後、培養液を採取し、液体シンチレーションカウンターで放射活性を測定した。単位DNA当たりの放射活性を求め、これをホスホリパーゼA₂の活性とした。

5) PGE₂ 合成酵素系の活性の測定法

細胞は実験開始7日目のものを用いた。予備実験2.1)(1)の方法を用いて、一定量のアラキドン酸から作られる単位DNAあたりのPGE₂の量を求め、この値をPGE₂合成酵素系の活性とした。

2. 結果

1) 増殖について

実験開始後のDNA量の経日的変化を調べたところ(図5)、歯根膜細胞もMC3T3-E1細胞も対照群のDNA量は経的に増加し、実験開始後7日目ごろに最大値に達した。歯根膜細胞のDNA量をみてみると、低酸素群と対照群とで差はみられなかったが、MC3T3-E1細胞のそれはきわめて顕著に抑制された。

2) 機能について

実験開始後のALP活性の経日的変化を調べたところ(図6)、歯根膜細胞もMC3T3-E1細胞も経的に増加したが、前者では低酸素群の活性が対照群より増加したのに対し、後者では低酸素群の活性は対照群より低下した。なお、歯根膜細胞では7日目以後、MC3T3-E1細胞では5日目以後に有意差がみられた($p<0.05$)。

次に、実験開始7日目の細胞についてPGE₂の産生量を測定したところ(図7)、歯根膜細胞では低酸素群は有意差はみられないが、対照群より低下する傾向を示したのに対し、MC3T3-E1細胞では、明らかに低酸素群が増加した。

3) MC3T3-E1細胞のPGE₂産生量の増加機序について

MC3T3-E1細胞について、実験開始7日目の

図5 細胞のDNA量の経日的変化 (○-○: 対照群, ●-●: 低酸素群)
** $p<0.01$

図6 細胞のALP活性の経日的変化 (○-○: 対照群, ●-●: 低酸素群)
* $p < 0.05$

図7 培養液中へのPGE₂の放出に対する低酸素状態の影響
** $p < 0.01$

図8 MC3T3-E1細胞のホスホリパーゼA₂(a)とPGE₂合成酵素系(b)の活性に対する低酸素状態の影響
* $p < 0.05$

ホスホリパーゼ A₂ 活性と PGE₂ 合成酵素系の活性を調べたところ、どちらも低酸素群で有意に上昇していた (図8) ($p < 0.05$)。

3. 考 察

1) 増殖について

DNA 量の経日的変化の点から増殖能を調べたところ、歯根膜細胞は酸素濃度が10%の低酸素状態においても増殖は変わらなかったが、MC3T3-E1 細胞では増殖が抑制された。Bradley ら³⁴⁾は、

マウス由来の線維芽細胞の増殖が低酸素状態で促進することを報告し、Pentland ら³⁵⁾は上皮のケラチノサイトの増殖が低酸素状態により抑制されると述べており、低酸素という刺激が細胞の増殖に対する影響は細胞種によって異なると考えられる。Basset³⁶⁾は、未分化間葉系細胞の分化の振り分けに及ぼす環境因子の影響を調べる実験を行い、高酸素状態で圧力が加わった場合には骨形成が、低酸素状態で張力が加わった場合には結合組

織形成が起こると報告している。この報告と本実験で得られた結果を考え合わせると、酸素濃度などの環境因子が間葉細胞系の分化および増殖に変化を与える可能性があるかと推察される。

2) 機能について

低酸素状態における細胞の機能をとらえるために ALP 活性について調べたが、歯根膜細胞では、活性が増加するのに対し、MC3T3-E1 細胞では活性が減少した。ALP の役割に関して、Robinson ら³⁷⁾は有機リン酸エステルをアルカリ性の環境下で加水分解し、局所的にリン酸イオン濃度を高めることによって石灰化を促進するという説をたてたが、Fleisch ら³⁸⁾は石灰化を阻害するピロリン酸エステルを破壊することにより石灰化を促進すると考えた。しかし近年になって、Low³⁹⁾や Howard ら⁴⁰⁾は ALP はホスファチジルイノシトールと結合した形で細胞膜に存在するが、ホスホリパーゼ C の活性化によって結合が切断され、膜から放出されると報告した。ホスファチジルイノシトールは細胞の機能発現の重要な基質として知られていることから、ALP はそれ自体の石灰化促進作用よりもむしろ細胞の機能発現のマーカーとしての役割をもつものと考えられる。ALP 活性の経時的变化と増殖能の結果から、低酸素状態では歯根膜の機能は抑制されないが、骨芽細胞の主たる機能である骨形成能は抑制されることが予想される。

他方、低酸素状態での PGE₂ の産生量は、歯根膜細胞では減少したが、MC3T3-E1 細胞では増加した。

単位 DNA あたりの PGE₂ の放出量を比較すると、歯根膜細胞より MC3T3-E1 細胞の方が高かったが、これについて森田ら⁴¹⁾は、骨芽細胞の PGE₂ 合成活性は平滑筋細胞や線維芽細胞のそれよりも高く、生成された PGE₂ は骨芽細胞みずからの増殖を促進し、石灰化時期にはその合成低下によりさらに石灰化を促進すると報告している。本実験における増殖と PGE₂ 産生に関する結果とこの森田らの報告を考え合わせると、骨芽細胞では低酸素状態によって抑制された増殖に対してな

んらかのフィードバック的機構が働いて、増殖を促進させるように PGE₂ が多く産生されるものと考えられよう。

PGE₂ の骨吸収作用について、Klein らはラット胎仔長管骨の培養実験で、その作用を指摘した¹¹⁾。近年、Takahashi ら⁴²⁾はマウスの骨髄細胞に活性型ビタミン D あるいは副甲状腺ホルモンを投与して培養することにより、容易に多核破骨細胞を得ることが可能な実験系を開発した。Akatsu ら⁴³⁾はこの系を用いて、PGE₂ が骨髄細胞のサイクリック AMP を増加することによって、多核破骨細胞の形成を促進すると報告している。

矯正力を加えたときの歯の移動機構を解明するにあたり、考えなければならないことに物理的外力の歯根膜および歯槽骨への直接作用がある。Somjen ら⁴⁴⁾は底が拡大できる培養ディッシュでラットのカルバリア由来の骨系の細胞を培養し、拡大力を加えたときに細胞の PGE₂ 産生量が増加することを示した。また、須田ら⁴⁵⁾は、あらかじめ酸素および炭酸ガスの分圧が 1 気圧のときと同じになるように調節した高压の混合ガスを吹き込むことにより、内部を加圧できるインキュベーターを用いて、加圧刺激により骨芽細胞の PGE₂ 産生量が増加することを報告した。これらの研究は、局所の酸素濃度を低下させずに物理的外力を骨芽細胞に加えたときにも、PGE₂ 産生量が増加することを示している。

ゆえに、本研究にみられた低酸素状態における骨芽細胞の PGE₂ 産生量の増加は、外力によるその増加とともに、歯の移動に伴う骨吸収機構の一役をなしていると考えられる。

3) MC3T3-E1 細胞の PGE₂ 産生量の増加機序について

緒言にも述べたように、細胞における PGE₂ の生合成過程は次の三つからなることが知られている。(1) ホスホリパーゼ A₂ によりアラキドン酸が細胞膜リン脂質から遊離する。(2) 遊離したアラキドン酸がシクロオキシゲナーゼによって PGG₂ を経て PGH₂ に変換される。(3) PGH₂ が PGE₂

イソメラーゼによって PGE_2 に変換される。

MC3T3-E1 細胞では、図 8 (a) よりホスホリパーゼ A_2 の活性が、図 8 (b) よりシクロオキシゲナーゼまたは PGE_2 イソメラーゼの活性が増加していることが知られた。しかし、 PGH_2 から各 PG へ変換する酵素は構成酵素であることが知られている一方、シクロオキシゲナーゼは誘導酵素であると考えられている⁴⁶⁾。それゆえ、ある種のホルモンや薬物による PG 合成の変動は、シクロオキシゲナーゼの変化による影響が大きいと考えられている⁴⁶⁾。また、シクロオキシゲナーゼの活性の上昇は、cofactor の増加や細胞内 pH の至適化などによる酵素活性の増加とも考えられるが、図 8 (b) の実験のように、至適 pH と十分な cofactor のもとで ^{14}C -アラキドン酸との反応を行った際の PGE_2 合成活性の増加は、mRNA レベルでシクロオキシゲナーゼが誘導された結果であると考えられる。この誘導を確かめるためには、今後、シクロオキシゲナーゼの抗体を用いた免疫学的手法（ウェスタンブロット法など）による検出が必要と考えられる。

4) 矯正学的考察

以上の1)から3)までの考察を歯科矯正学的に解釈すると、歯に矯正力を加えたときの一部の圧迫側では、虚血に伴う低酸素状態により骨芽細胞の骨形成能が抑制されるのに加え、 PGE_2 産生量が増加することにより、骨吸収は促進される方向に傾く。そして、この骨吸収の上昇は、物理的外力の直接的作用も加わり、さらに促進されるのであろう。これに対して歯根膜細胞は骨芽細胞と逆の挙動を示すことから、この骨吸収の促進には関与せず、むしろ歯根膜細胞は骨芽細胞の機能の変化を補い、ホメオスタシスを維持する働きをしていると考えられる。

IV. 結 論

歯の移動時の圧迫側における骨吸収機構を細胞レベルで解明するために、歯根膜細胞と骨芽細胞が低酸素状態でどのような増殖と機能を示すかを *in vitro* の系で調べた。予備実験の成果は次の

とおりである。

1. 培養歯根膜細胞は光顕的に線維芽細胞様の形態をしており、また、ALP 活性を有することから、歯根膜細胞と同定した。

2. アラキドン酸代謝について、歯根膜細胞は PGE_2 と 6-ケト $\text{PGF}_{1\alpha}$ を産生するのに対し、骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 は PGE_2 のみを産生した。また、歯根膜細胞の細胞膜のリン脂質中の脂肪酸組成については、一般の線維芽細胞と同様に n-6 系の脂肪酸の割合が多い点で骨芽細胞と異なっていた。

3. $\text{N}_2\text{-O}_2\text{-CO}_2$ インキュベーター内で3時間以上低酸素状態の設定を行えば、培養液中の pH の変化は認められなかった。

予備実験の成果をふまえて、本実験では、低酸素状態における歯根膜細胞と骨芽細胞の増殖と機能を調べ、次の結論を得た。

1. 増殖について、歯根膜細胞では DNA 量の経日的変化の点から増殖能に差はみられなかったが、骨芽細胞では抑制された。

2. ALP 活性について、歯根膜細胞では増加したのに対し、骨芽細胞では減少した。

3. 歯根膜細胞の PGE_2 産生は減少傾向にあるのに対し、骨芽細胞では増加した。

4. 1. から 3. の結果を歯科矯正学的に考察すると、圧迫側歯槽骨の一部では、酸素濃度の低下によって骨芽細胞の骨形成能が低下するのに加えて、 PGE_2 産生量が増加することにより、骨吸収が促進するものと推察された。この骨吸収促進に歯根膜細胞は関与しないと考えられた。

5. 骨芽細胞の PGE_2 産生量の増加機序は、ホスホリパーゼ A_2 活性と PGE_2 合成酵素系の活性がともに増加したことによることが示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導、ご校閲を賜りました三浦不二夫教授、ならびに顎口腔機能研究部門、室田誠逸教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始、ご指導、ご校閲をいただきました顎口腔機能研究部門、森田育男助教授に心から感謝いたしま

す。また、懇切なるご教示を賜りました相馬邦道助教授に感謝の意を表すとともに、種々のご教示、ご助言をいただきました栗原三郎講師に深謝いたします。さらに、本研究に種々のご協力をいただきました第1、第2矯正学教室ならびに顎口腔機能研究部門の皆様に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Wlodarski, K. H. and Reddi, A. H. : Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif. Tissue Int.* 39 : 382-385, 1986.
- 2) Lilja, E., Lindskog, S. and Hammarström : Alkaline phosphatase activity and tetracycline incorporation during initial orthodontic tooth movement in rats. *Acta Odontol. Scand.* 42 : 1-11, 1984.
- 3) 山下喜久 : 歯根膜のアルカリフォスファターゼに関する研究—精製, 性質, 同定および他組織のアルカリフォスファターゼとの比較—. 九州歯会誌 40(1) : 229-246, 1986.
- 4) Kawase, T., Nakajima, M., Matsumo, T., Kishi, H., Nagase, T., Tamada, V., Akagi, K., Ukiya, M. and Saito, S. : Characterization of alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells *in vitro*. *Bull. of Kanagawa dent. Col.* 15 : 65-69, 1987.
- 5) 野嶋直美, 小林 誠, 高橋直之, 須田立雄, 長谷川紘司 : 歯根膜細胞は硬組織形成細胞 (セメント芽細胞, 骨芽細胞) に分化する可能性があるか? 日本骨代謝学会雑誌 6 : 92, 1988.
- 6) Melcher, A. H., Turnbull, R. S. and Hiddleston, W. J. : *In-vitro* culture of periodontium of young adult mouse. *Archs oral Biol.* 18 : 933-939, 1973.
- 7) Brunette, D. M., Kanoza, R. J., Marmary, Y., Chan, J. and Melcher, A. H. : Interaction between epithelial and fibroblast-like cells in cultures derived from monkey periodontal ligament. *J. Cell Sci.* 27 : 127-140, 1977.
- 8) Brunette, D. M., Melcher, A. H. and Moe, H. K. : Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions. *Archs. oral Biol.* 21 : 393-400, 1976.
- 9) Blomlöf, L. and Otteskog, P. : Composition of human periodontal ligament cells in tissue culture. *Scand. J. Dent. Res.* 89 : 43-47, 1981.
- 10) Ragnarsson, B., Carr, G. and Daniel, J. C. : Isolation and growth of human periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Dent. Res.* 64 : 1026-1030, 1985.
- 11) Klein, D. C. and Raisz, L. G. : Prostaglandins : Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86 : 1436-1440, 1970.
- 12) 室田誠逸 : プロスタグランジンの生化学—基礎と実験—. 東京, 1982, 東京化学同人, 3-26.
- 13) Yamasaki, K., Miura, F. and Suda, T. : Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J. Dent. Res.* 59 : 1635-1642, 1980.
- 14) Davidovitch, Z., Shanfeld, J. L., Montgomery, P. C., Lally, E., Laster, L., Furst, L. and Korostoff, E. : Biochemical mediators of the effects of mechanical forces and electric currents on mineralized tissues. *Calcif. Tissue Int.* 36 : S86-S97, 1984.
- 15) 田口元康 : 歯の移動に関与するプロスタグランディンEの研究—免疫組織化学的手法による観察—. 口病誌 54 : 106-128, 1987.
- 16) 石川梧朗, 秋吉正豊 : 口腔病理学 I. 東京, 1978, 永末書店, 322-324.
- 17) Zaki, A. E. and Huysen, G. V. : Histology of the periodontium following tooth movement. *J. Dent. Res.* 42 : 1373-1379, 1963.
- 18) Gianelly, A. A. : Force-induced changes in the vascularity of the periodontal ligament. *Am. J. Orthodontics* 55 : 5-11, 1969.
- 19) 中村進治 : 歯根膜血管走向の矯正学的研究, 第2報, 矯正装置の圧力に対する圧迫側歯根膜血管の反応. 口病誌 34 : 342-358, 1967.
- 20) 近藤勝義 : インピーダンス・プレチスモグラフィによる歯根膜循環動態の研究. 口病誌 36 : 20-42, 1969.
- 21) Gaengler, P. and Merte, K. : Effect of force application on periodontal blood circulation. A vital microscopic study in rats. *J. Periodontal Res.* 18 : 86-92, 1983.
- 22) 堀 啓子 : 歯を移動する際の歯根膜の血管透過性に関する研究. 口病誌 48 : 52-66, 1981.
- 23) Watanabe, K. and Fishman, W. H. : Application of the stereospecific inhibitor L-phenylalanine to the enzymorphology of intestinal alkaline phosphatase. *J. Histochem. Cytochem.* 12 : 252-260, 1964.
- 24) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, R. : *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.* 96 : 191-198, 1983.
- 25) Kodama, H., Amagai, Y., Sudo, H., Kasai, S. and Yamamoto, S. : Establishment of a clonal osteogenic cell line from newborn mouse calvaria.

- Jpn. J. Oral. Biol. 23 : 899-901, 1981.
- 26) 室田誠逸 : プロスタグランジンの生化学—基礎と実験—. 東京, 1982, 東京化学同人, 151-159.
 - 27) Bligh, E. G. and Dyer, W. J. : A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol. 37 : 911-917, 1959.
 - 28) Stoffel, W., Chu, F. and Ahrens, Jr. E. H. : Analysis of long-chain fatty acid by gas liquid chromatography. Micromethod for preparation of methyl esters. Anal. Chem. 31 : 307-308, 1959.
 - 29) 室田誠逸 : プロスタグランジンの医学. 東京, 1986, 中外医学社, 222-240.
 - 30) 森田育男, 窪田正宏, 室田誠逸 : 骨芽細胞(MC 3T3-E1) の石灰化とアラキドン酸代謝 (第3報). 生化学 60 : 767, 1988.
 - 31) Kubota, M., Morita, I., Hibino, H., Hirano, J., Miura, F. and Murota, S. : The detection of eicosatrienoic acid (20 : 3, n-9) in osteoblast-like cells. : to be submitted.
 - 32) Downs, T. R. and Wilfinger, W. W. : Fluorometric quantification of DNA in cells and tissue. Anal. Biochem. 131 : 538-547, 1983.
 - 33) Lowry, O. H., Roberts, N. R., Wu, M., Hixon, W. S. and Crawford, E. J. : The quantitative histochemistry of brain. Enzyme measurements. J. Biol. Chem. 207 : 19-37, 1954.
 - 34) Bradley, T. R., Hodgson, G. S. and Rosendaal, M. : The effect of oxygen tension on haemopoietic and fibroblast cell proliferation *in vitro*. J. Cell. Physiol. 97 : 517-522, 1978.
 - 35) Pentland, A. P. and Marcelo, C. L. : Modulation of proliferation in epidermal keratinocyte cultures by lowered oxygen tension. Exp. Cell Res. 145 : 31-43, 1983.
 - 36) Basset, C. A. L. : Current concepts of bone formation. J. Bone & Joint Surg. 44A : 1217-1244, 1962.
 - 37) 須田立雄, 小沢英浩, 高橋栄明 : 骨の科学. 東京, 1985, 医歯薬出版, 131-133.
 - 38) Fleisch, H. and Neuman, W. F. : Mechanism of calcification : role of collagen, polyphosphates, and phosphatase. Am. J. Physiol. 200(6) : 1296-1300, 1961.
 - 39) Low, M. G. : Biochemistry of the glycosylphosphatidylinositol membrane protein anchors. Biochem. J. 244 : 1-13, 1987.
 - 40) Howard, A. D., Berger, J., Gerbert, L., Famill-etti, P. and Udenfriend, S. : Characterization of the phosphatidylinositolglycan membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. Pro. Natl. Acad. Sci. 84 : 6055-6059, 1987.
 - 41) 森田育男, 立川敬子, 室田正宏, 鈴木良治, 鳥山和宏, 室田誠逸 : 骨芽細胞とアラキドン酸代謝. 日本骨代謝学会雑誌 7 : 26-30, 1989.
 - 42) Takahashi, N., Yamana, H., Yoshiki, S., Roodman, G. D., Mundy, G. R., Jones, S. J., Boyde, A. and Suda, T. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology 122 : 1373-1382, 1988.
 - 43) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., Murota, S., Nagata, N., Takatani, O. and Suda, T. : Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. J. Bone. Min. Res. 4 : 29-35, 1989.
 - 44) Somjen, D., Binderman, I., Berger, E. and Harell, A. : Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E₂ mediated. Biochem. Biophys. Acta. 627 : 91-100, 1980.
 - 45) 須田立雄, 小沢浩之, 今村一信, 高橋直之, 阿部悦子 : 骨形成と骨吸収に及ぼす持続的加圧刺激の影響. 特定研究 (1) 咀嚼システムの基礎的研究・報告書 (3) : 150-153, 1988.
 - 46) 室田誠逸 : プロスタグランジンと病態. 東京, 1984, 東京化学同人, 50-51.