マウス実験的歯肉炎におけるラミニンの局在

—共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察—

鴨 井 久 博

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

(指導：鴨井久一)

(平成9年2月10日受付)

Distribution of Laminin on Experimental Periodontitis in Mouse

—Observation by Confocal Scanning Laser Microscopy—

Hisahiro Kamoi

Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo,

The Nippon Dental University

2-3-16 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

(Director : Prof. Kyuichi Kamoi)

Morphological evaluation of the three-dimensional relationship between organ and tissue elements is essential for the study of normal tissue formation and the analysis of periodontal lesions. With conventional methods of observation relying on two-dimensional histological specimens, it has often been difficult to make three-dimensional observations. Laminin, which is found in the extracellular matrix, has a variety of functions, and various studies have described the distribution of laminin in periodontal tissue. The present study was undertaken to observe the three-dimensional distribution of laminin in mouse periodontal tissue with a confocal laser microscope, and to examine the distribution of laminin during the onset of experimental periodontitis.

A confocal laser microscope was used to follow changes in the distribution of laminin in the periodontal tissue of normal mice and mice with experimental periodontitis. Histological observations using hematoxylin-eosin staining and three-dimensional analyses of the distribution of extracellular matrix laminin by the indirect fluorescent antibody method were performed, and the following results were obtained.

1. In normal mouse periodontal tissue, laminin was located in the basal membrane of the gingival epithelium and in the vessels and nerves of the lamina propria of the gingiva. Three dimensional examination of laminin distribution provided three-dimensional pictures of the arrangement of the basal membrane, the morphology and distribution of the papillae in the lamina propria mucosae and the distribution of vessels and nerves.

2. Laminin was also detected in the internal basal lamina of normal mouse periodontal tissue.

3. During the onset of experimental periodontitis in mice, laminin was located in the basal membrane of the gingival epithelium and in the vessels and nerves of the lamina propria of the gingiva. Laminin was also detected in inflamed areas (gingival epithelium and lamina propria of the gingiva).

These findings indicate that three-dimensional examination with a co-focal laser microscope is useful in determining the distribution of extracellular matrix laminin in normal periodontal tissue and in periodontal tissue during the onset of experimental periodontitis. This technique provided three-dimensional images of the arrangement of the

laminin-containing basal memberane, the morphology and distribution of the papillae in the lamina propria mucosae, and the arrangement of vessels and nerves in the periodontal tissue of the normal

mouse. Observations by this technique also revealed the presence of laminin in inflamed gingival epithelium and the lamina propria of the gingiva as the region of periodontitis expanded.

Key words : Cnfocal scanning laser microscopy, Laminin, Experimental periodontitis, Mouse

要旨 : 器官・組織を構成している各種要素の立体的な位置関係を形態学的に観察することは、正常組織の発生や歯周組織の病変を解析するのに重要である。しかしながら、従来の2次元組織標本を用いた観察法では、立体的に観察するのは困難な場合が多い。また、細胞外基質ラミニンの生体に対する機能は多種多様であり、歯周組織におけるラミニンの局在については、様々な見解が報告されている。

本研究は、共焦点レーザ顕微鏡を用いて正常マウス歯周組織におけるラミニンの3次元局在を観察すると共に、実験的歯周炎の発症過程におけるラミニンの局在についても検討を加えたものである。

研究方法は、共焦点レーザ顕微鏡を用いマウスの正常歯周組織および実験的歯周炎の発症過程における推移を歯周組織学的立場から検討を加えた。観察方法は、ヘマトキシリン・エオジン染色による観察とともに、細胞外基質ラミニンの局在を間接蛍光抗体法を用い3次元的に解析し、次の結果を得た。

1) 共焦点レーザ顕微鏡を用い、マウス正常歯周組織におけるラミニンの局在を形態学的に3次元構造から解析した。

2) マウス正常歯周組織においてラミニンは、歯肉上皮の基底膜および歯肉固有層の血管や神経に局在した。ラミニンの局在を立体的に観察し、基底膜の走向、粘膜固有層における乳頭の形態や分布、血管や神経の走行などの3次元的な構築像を得られた。

3) マウス正常歯周組織の内側基底板にもラミニンの局在が見られた。

4) マウス実験的歯周炎の発症過程では、歯肉上皮、歯肉固有層への炎症の波及に沿って基底膜部でラミニンの局在が見られた。

これらの結果は、共焦点レーザ顕微鏡による正常歯周組織、実験的歯周炎の発症過程における細胞外基質ラミニンの局在に対して、3次元観察の有用性を示し、正常マウス歯周組織においては、ラミニンの局在する基底膜の走向、粘膜固有層における乳頭の形態や分布、血管や神経の走行などを構築像により明らかにしている。さらに、歯周炎の進行に伴い歯肉上皮、歯肉固有層への炎症の波及によるラミニンの局在が確認された。

索引用語 : レーザ顕微鏡, 実験的歯周炎, ラミニン, マウス

緒 言

器官・組織を構成している各種要素の立体的な位置関係を形態学的に観察することは、正常組織の発生や病的組織の変化を解析する上で重要である。しかしながら、従来の2次元組織標本を用いた観察法では、正確に組織構築を再現することは困難であり、立体的に広がる組織構築を観察するには、組織標本を3次元的に再構築する必要がある。近年実用化された共焦点レーザ顕微鏡 (Confocal Scanning Laser Microscopy)¹⁾ は、立体的な組織構築を観察する目的で開発され、連続光学スライス像より簡便で位置ずれのない鮮明な立体像を再構築することを可能とした。また、免疫組織化学的手法を用いることにより、比較的厚い組織標本からでも、容易に3次元的な構築像を得ることができ、蛍光染色においては、焦点外の不要な蛍光の散乱を取り除くことにより、正確な抗体の局

在を観察することが可能となった。歯周組織における細胞外基質は、一般的に正常歯周組織に含まれている約60%のコラーゲンからなり、歯周組織の破壊と共にコラーゲン合成の質的、量的変化の生じることが報告²⁾されている。また、現在までに歯周組織代謝やその病理においては、歯周組織中に存在するI型、III型、IV型、V型コラーゲンについて研究³⁾が行われている。さらに、近年、他のコラーゲンの研究と同様に基質を構成する高タンパク分子、プロテオグリカンのフィブロネクチン、ラミニン、テネシシンなど、糖タンパク質が注目され、歯周組織の破壊⁴⁾や歯周外科手術後の創傷治癒過程⁵⁻⁸⁾についての研究報告がみられる。その中の一つである細胞外基質のラミニンは、1979年Timplら⁹⁾により、EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) 腫瘍より単離された糖タンパクである。分子量は、400 KDaのA鎖、230 KDaのB1鎖、220 KDaのB2鎖の3種類のポリペプチド鎖からなる巨大分子であり、機能としては、細胞接着、細胞増

殖^{10,11)}, 細胞分化¹²⁾, 細胞走化性¹³⁾, 成長因子¹⁴⁾, 腫瘍細胞転移¹⁵⁾などの多彩な機能を持つことが報告されている。歯科領域においても, 歯周外科手術における根面処置後の再付着などに応用されている¹⁶⁾。生体の観察と同様に, 歯周病や外科手術後の創傷治癒過程における細胞外基質の細胞増殖, 分化, 走化性, 接着, 移動, 形成などの役割を解明するためには, 細胞外基質の局在を3次元的に解析する必要がある。そこで, 本研究は, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて正常歯周組織における細胞外基質の局在を観察した。その方法は, マウス歯周組織のラミニンの3次元的な局在を観察すると共に, 実験的歯周炎の発症過程における細胞外基質の局在について, 検討を加えた。

材料および方法

1. 実験動物

BAL/C系雄性マウス8週齢(体重約30g前後)を使用した。マウス正常歯肉の歯周組織の観察に20匹, 実験的歯周炎の発症過程における歯肉の変化を観察するのに25匹を1週間, 予備飼育後, 実験に供した。

2. 実験的歯周炎の作製

マウスは, ネプタール®(大日本製薬, 大阪) 0.3 ml/kgを腹腔内投与し, 全身麻酔を行った。麻酔後, 背位で開口固定を行い, 開口後, 上顎両側第1大白歯

(M1)と同側第2大白歯(M2)間の歯間隣接面をNo.006, スチールバー(東京歯科産業, 東京)を用いて削除し, 歯間空隙を形成した。その後, 同部位に食片貯溜を目的とし, 絹糸を挿入し, 歯冠部で縫合を行い固定した。術後1日, 3日, 5日, 7日, 14日の各群に5匹ずつ, 経時的に屠殺を行い実験に供した。

3. 組織標本作製

実験材料は, エーテル麻酔下にて, 灌流固定の後, 上顎部を摘出し, さらに浸漬固定を24時間行った。固定液には, 15% (v/v) 飽和ピクリン酸水溶液と0.5%パラホルムアルデヒドを含む0.1 Mリン酸緩衝液(PBS, pH 7.4)を使用した。固定後, 0.1 M EDTA溶液にて7日間脱灰を行った。

4. 観察方法

1) Hematoxyline-eosin (H-E) 染色による観察

実験的歯周炎における病理組織学的変化を経時的に観察した。組織切片は, 脱灰後, 通法に従いパラフィン包埋後, 近遠心方向(図2)に3 μ m厚さの連続切片を作製し, 脱パラフィン後, H-E染色の観察を行った。

2) 共焦点レーザー顕微鏡による間接抗体法の観察

組織切片は, 脱灰後, ゼラチンに包埋した。その後, 正常歯周組織の観察には, 頬舌, 近遠心方向および水平方向(図1)に150 μ mの連続切片を作成した。また, 実験的歯周炎における観察には, 近遠心方

図1 実験に用いたマウス口腔各切断面の模式図

(近遠心切断面)

図2 実験に用いた観察部位の拡大像

向(図2) 150 μm 連続切片を作成した。切片標本の作製後、切片は 0.01 M の PBS にて洗浄後、前処理として、3% デオキシコール酸ナトリウム水溶液を室温にて 4 時間反応させた。その後、0.01 M の PBS にて洗浄し、非特異染色のブロッキングを 10% 正常ヤギ血清を室温、1 時間反応させた。第 1 抗体は、ウサギ抗マウス・ラミニン抗体⁵⁾ 500 倍希釈 4°C にて 24 時間反応させた。その後、0.1 M の PBS にて洗浄、第 2 抗体には、FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (MBL 社製, U.S.A.) の 100 倍希釈を 4°C にて 24 時間反応させた。その後、0.1 M の PBS にて洗浄、切片を 10 mg/ml の DABCO (1,4-Diazabicyclo-[2,2,2] octane) と無蛍光グリセリンを含む 0.05 M のトリス塩酸緩衝食塩液にて封入した。観察方法としては、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-GB 200, OLYMPUS) を使用し、480 nm の波長で得られた連続光学スライス像より交差法による立体再構築を行った。染色方法の概略については、(図3) に示す。

結 果

1. マウス正常歯周組織におけるラミニンの局在

光学的断層像を用いたラミニンの局在では、ラミニンが歯肉上皮下の基底膜の血管および神経の基底膜に陽性反応として見られた(図4)。

1) 頬舌断面の観察

頬舌断面の観察では、歯肉上皮と歯肉結合組織との間の基底膜に沿って陽性反応を示し、結合組織内における毛細血管の周囲壁や神経は基底膜の走行に沿って陽性反応が見られた。また、毛細血管は不規則な網目状を呈しているのが見られた(図5-a, b)。また、拡大像では、内側基底版におけるラミニンの局在が見ら

図3 実験概要

れた(図5-c)。

2) 近遠断面の観察

近遠断面の観察では、付着上皮、歯肉溝上皮直下では、密度の高い毛細血管が不規則な網目状を呈しており、基底膜に沿って陽性反応が見られた。また、結合組織内では、毛細血管の周囲壁や神経の基底膜の走行に沿って陽性反応が見られた。歯肉固有組織においても同様に毛細血管の周囲壁や神経の基底膜の走行に沿って陽性反応が見られた(図6-a, b, c)。

3) 水平断面の観察

水平断面の観察においても、歯根膜に存在する毛細血管の周囲壁、神経の基底膜に沿って陽性反応が見られた(図7-a, b, c)。

各断面とも立体構築により、歯肉上皮基底膜、歯間乳頭、粘膜固有層、歯根膜の毛細血管や神経には、ラミニンが均一に局在するのが見られた。この方法で、線維走向を立体的に捉え、基底膜の位置とその血管の走向状態が明らかになった。

図 4 3 μm 毎に取り込んだ連続光学的断層像 (I-VIII)

ラミニンを染色した，歯周組織前頭断切片により得られた光学的断層像。ラミニンは，基底膜および血管および神経の基底膜に認められた。

(a)

(b)

(c)

図 5-a, b, c 図 4 と同一の位置においての光学的断層像およびステレオ画像
a-ステレオ画像, b-交叉法によるステレオ画像, $3\mu\text{m}\times 8$
c-同部位拡大ステレオ画像, $1.2\mu\text{m}\times 8$

(a)

(b)

(c)

図 6-a, b, c ラミニンを染色した, 矢状断切片より作製したステレオ画像
a-光学スライス像, b-ステレオ画像, c-交叉法によるステレオ画, $3\mu\text{m}\times 8$

(a)

(b)

(c)

図 7-a, b, c ラミニンを染色した, 水平断切片より作製したステレオ画像

a-光学スライス像, b-ステレオ画像, c-交叉法によるステレオ画, 1.5 μmX 8

ラミニンの局在は, 歯根膜に存在する毛細血管や神経に沿って見られた。

(a)

(b)

図 8-a 実験的歯肉炎, 1日経過後の H-E 染色所見

図 8-b 実験的歯肉炎, 1日経過後のラミニン染色所見

M1とM2の歯間空隙に食片残渣物が停滞し, 歯間乳頭部の部分的な破壊が認められるが, 著しい変化は見られなかった。ラミニンの局在では, 上皮下の基底膜および血管壁, 神経壁に沿って観察され, 炎症に伴う部分的な血管の拡張により, 陽性反応を示した。

2. マウス実験的歯周炎の過程におけるラミニンの局在

1) 術後1日目の観察

H-E染色の観察では, M1とM2の歯間空隙に食片残渣物が停滞し, 歯間乳頭部は部分的な破壊が見られ, 上皮層の消失が観察された。上皮下の結合組織内には, 部分的な血管の拡張, 充血および好中球を主体とした炎症性細胞浸潤が認められ, 歯間水平線維の走向における不規則性が観察された。歯根膜および歯槽骨には, 著しい変化は見られなかった (図 8-a)。

ラミニンの局在は, 上皮下の基底膜および血管, 神経に沿ってラミニンの局在が観察され, 炎症に伴う部分的な血管の拡張が見られる同部位に一致して陽性反応が見られた (図 8-b)。

2) 術後3日目の観察

H-E染色の観察では, M1とM2の歯間空隙には, 食片残渣物が停滞し, 歯間乳頭を破壊し, 上皮下の結合組織内では, 著しい血管の拡張, 充血および多型核白血球様およびリンパ球様による炎症性の細胞浸潤が見られた。歯肉固有層では, 潰瘍の形成が認めら

図 9-a 実験的歯肉炎, 3 日経過後の H-E 染色所見

図 9-b 実験的歯肉炎, 3 日経過後のラミニン染色所見

M1 と M2 の歯間乳頭を破壊させ、上皮下の結合組織内では、血管の拡張、充血および炎症性細胞浸潤が見られ、炎症性細胞浸潤が著明であった。ラミニンの観察では、一日目と同様に上皮下の基底膜および血管壁、神経壁に沿って陽性反応を示した。

図 10-a 実験的歯肉炎, 5 日経過後の H-E 染色所見

図 10-b 実験的歯肉炎, 5 日経過後のラミニン染色所見

M1 と M2 歯間乳頭は破壊し、上皮性付着喪失に伴う歯周ポケットの形成が見られた。ラミニンの局在では、上皮下の基底膜および血管壁、神経壁に沿って観察され、M1 遠心部において、歯周ポケット形成に伴ない付着上皮下の基底膜層において強陽性反応を示した。

れた。また、歯間水平線維は変性および消失が観察され、走向配列の乱れが見られた (図 9-a)。

ラミニンの局在は、1 日目と同様に上皮下の基底膜および血管、神経に沿ってラミニンの局在が観察され、炎症に伴う著しい血管の拡張により同部位に対して強陽性の所見が見られた (図 9-b)。

3) 術後 5 日目の観察

H-E 染色の観察では、M1 と M2 歯間空隙には、食片停滞に伴い、歯間乳頭は破壊し、上皮性付着の喪失に伴う歯周ポケットの形成が認められた。また、3 日目と同様に歯肉固有層では潰瘍形成が見られ、1 日目と比較し、多型核白血球様およびリンパ球様による炎症性細胞浸潤が著明となった。また、歯間水平線維の変性および消失が観察された。歯槽骨では、破骨細胞

様の出現に伴う吸収窩が認められた (図 10-a)。

ラミニンの局在は、3 日目と同様に上皮下の基底膜および血管、神経に沿って観察され、炎症に伴う著しい血管の拡張と同部位に対して強陽性の所見が見られ、歯周ポケット形成に伴ない付着上皮下の基底膜層において強陽性反応が見られた (図 10-b)。

4) 術後 7 日目の観察

H-E 染色の観察では、M1 と M2 の歯間空隙には、食片が停滞しており、歯間乳頭の組織破壊が見られた。上皮性付着の喪失とその進行に伴い、ポケット底の根尖側方向への移動による深いポケットの形成が見られた。歯肉固有層では、多型核白血球様およびリンパ球様による炎症性細胞浸潤が著明となり、炎症症状も強く歯間水平線維はほとんど消失していた。歯根

図 11-a 実験的歯肉炎, 7日経過後の H-E 染色所見

図 11-b 実験的歯肉炎, 7日経過後のラミニン染色所見

M1とM2歯間乳頭は破壊し, M1遠心部で, 上皮性付着の喪失の進行に伴い, ポケット底の根尖側方向へ移動による深いポケットの形成が見られた。ラミニンの局在では, 歯肉炎進行により, 歯肉固有層における炎症浸潤に伴い血管壁の陽性所見が見られ, M1遠心部で, 5日目と比較し, ポケット底の根尖側方向へ移動による深いポケットの形成に伴い, 根尖側方向への陽性所見を示した。

図 12-a 実験的歯肉炎, 14日経過後の H-E 染色所見

図 12-b 実験的歯肉炎, 14日経過後のラミニン染色所見

M1とM2の歯間乳頭部の組織破壊が根尖方向に広がり, 上皮性付着の喪失の進行に伴い, ポケット底の根尖側方向への移動により深いポケットの形成が見られ, 進行増殖や側方増殖が見られた。

ラミニンの局在では, 前期との比較し歯肉固有層において, 歯肉固有層において, 歯間乳頭部全体に強陽性所見が見られ, 歯周ポケット進行に伴う付着上皮下の基底膜層において, びまん性の陽性所見を示した。

膜では, 炎症性細胞浸潤による充血およびうっ血が見られた。歯槽骨では, 破骨細胞様による骨吸収が認められた (図 11-a)。

ラミニンの局在は, 歯周炎の進行により, 歯肉固有層における炎症浸潤に伴い血管にラミニンの陽性所見が観察された。また, 5日目と比較し, ポケット底が根尖側方向への移動により深いポケットの形成が見られ, 根尖側方向にラミニンの強度な陽性所見が見られた (図 11-b)。

5) 術後 14 日目の所見

H-E 染色の観察では, M1とM2の歯間空隙には, 食片が停滞し, 歯間乳頭部の組織破壊が根尖方向

に広がり, 潰瘍の形成が認められた。上皮性付着の喪失の進行に伴い, ポケット底の根尖側方向への移動により深化し, 深いポケットの形成が認められた。また, 7日目と比較し, 歯周ポケットの進行増殖や側方増殖が見られた。歯肉固有層は, 充血およびうっ血が強く, 壊死組織や好中球主体の炎症性細胞浸潤が見られた。歯間水平線維では, 線維走向の変性および消失が見られた。歯根膜では, 破壊が見られ, 歯槽骨では, 7日目に比較し骨吸収の進行が見られた。(図 12-a)。

ラミニン局在は, 歯肉固有層では, 7日目と比較し, 歯肉結合組織全体にわたりラミニンの強陽性所見

が見られた。とくに歯周ポケット進行に伴う付着上皮下の基底膜層では、強度で広範囲なラミニンの陽性所見が見られた (図 12-b)。

考 察

1. 共焦点レーザー顕微鏡について

共焦点レーザー顕微鏡は、1957 年 Mirvin Minsky が基本的原理の開発以来¹⁷⁾、光源にレーザーを使用¹⁸⁾、共焦点型¹⁹⁾、走査型反射による振動式鏡の開発²⁰⁾などが行われている。生物学的分野の応用では、1987 年 White ら¹⁾の研究により、現在に至るまで、細胞内カルシウムイオンの動態分析²¹⁾、組織標本への応用²²⁾、in situ hybridization²³⁾、生細胞の観察²⁴⁾、全載標本の応用¹⁾など様々な報告がされてきた。また、近年、歯科領域においては、硬組織におけるエナメル質や骨の観察など、各種応用が報告されている^{22,25)}。共焦点レーザー顕微鏡の画像は、従来の光学顕微鏡と比較して、光軸方向の分解能が高く、得られた画像は、Abbe の顕微鏡光学理論²⁶⁾で規定された 2 倍近くの解像度を得ることができる。

今回のラミニンの観察では、従来の蛍光顕微鏡による観察と比較し、焦点外の不要な蛍光の散乱を取り除き、鮮明な局在のみの蛍光を観察することが可能である。組織内の 3 次元的に走行性をもつ基底膜、血管などの観察では、従来の 2 次元観察の所見では得ることのできない深度のある観察所見が見られ、立体的な位置関係の観察には有用である。

立体画像再構築の表示方法としては、コンピュータに記録された光学切片画像をずらし重ね合わせ、製作する立体写真 (Stereo Photography) (図 5-a, 6-b, 7-b) がある。観察方法は、右目で左の画像を、左目で右の画像を直視することにより立体観察を行う方法である。他の方法として、立体構築する画像の点 (ピクセル) をずらして重ね合わせ、左右の画像を約 9 度ずらして並列し製作するステレオ画像がある (図 5-b, 6-c, 7-c)。観察方法は、左目に赤色、右目に青色のステレオ眼鏡による方法である。

今回、これらの方法により、ラミニンの局在が基底膜および血管に存在が見られ、立体構造や走向性の観察が行える。共焦点レーザー顕微鏡における立体構築は、物体内部の構造細部にわたり再現され、位置のずれの生じない画像を得ることができ、3 次元的な観察においては、有用であることが認められている¹⁾。今回行った歯周組織における立体構築においては、従来の光学顕微鏡における 2 次元観察に断片的であった組織中の血管、神経等の 3 次元的な走向性にあるも

のについて有用な観察が見られた。

2. 標本作製について

共焦点レーザー顕微鏡における間接蛍光抗体法の観察は、橋本らの方法²⁷⁾に準じて行った。今回使用した固定液、15% (v/v) 飽和ピクリン酸水溶液と 0.5% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液は、酵素活性および抗原性の変性が認められず、観察に影響の少ないものを使用した。また、今回、前処理に使用した界面活性剤のデオキコール酸は、抗原を可溶化や減弱化することなく、他の不要な成分をできる限り除去する目的で選択を行った。今回使用した 2 次抗体の選択は、共焦点レーザー顕微鏡を用いた立体構築を行う上で障害因子である、非特異蛍光によるバックグラウンドの少ないものを実験に供与した。また、抗体の浸透度は、予備実験において確認後、観察を行った。

3. 歯周炎の惹起方法について

器官、組織を構成している各種要素を観察する場合、どの実験動物を選択するかは研究結果に大きく影響を与えている。

今回行った実験的歯周炎の発症過程における歯周組織の観察は、Löe ら²⁸⁾のヒトによる臨床研究があり、口腔内プラークの蓄積と歯肉炎症との間には、正の相関関係が認められている。また、多くの *in vivo* の実験では、ラット^{4,29-33)}、ハムスター³⁴⁾、マウス³⁵⁾、サル³⁶⁾、イヌ³⁷⁾など実験モデルによる検索が報告されている。今回、実験動物として使用したマウスは、実験操作の面で、個体自体が小さく困難な面が多いため報告が少ない。しかし、現在、300 種以上の近交系が確立されており³⁸⁾、今後、遺伝学的、*in vitro* の研究との関連性においては、非常に有用であると思われる。また、実験個体が小さいことは、脱灰時間の短縮ができ、免疫組織化学的観察では、組織切片に対して為害作用が少なく脱灰の影響による組織像の変性を少なくすることが可能である。また、抗体の浸透度により共焦点レーザー顕微鏡に観察できる組織切片の厚さが規定してしまうため、組織を構成している各種要素の立体的な位置関係や 3 次元的形態学的に観察する過程では、個体の組織が小さいほど 3 次元的組織の広がりを検索する点で有利である。

実験的歯肉炎、歯周炎のモデルは、歯頸部に金属、綿糸などを巻き付け持続的な刺激と共にプラーク停滞を起こさせる方法^{29,34)}、歯のコンタクトポイントを削合し食片圧入を起こさせる方法^{32,36)}、歯周組織に対し細菌成分や酵素の局所投与を行う方法^{30,35)}、唾液腺摘出による方法^{31,34)}など数多くの方法が報告されている。また、飼料の性状と歯肉炎、歯周炎の発症との関係については、飼料の成分、性状、採取の方法の選択

は、重要な要素と考えられている。飼料の成分および性状は、粉末飼料は固形飼料に対して歯面へのプラーク停滞および付着が容易であり、歯肉炎の惹起をさせやすくする報告³⁷⁾、自家糞食および蔗糖により、歯面に対するプラークの付着を増加させることで、歯肉炎の発症の助長するとの報告⁴⁾も見られる。一方、固形飼料採取は、歯冠部隣接面への食片圧入を誘発し、歯肉炎の発症をさせるとの報告^{31,32)}も見られる。

今回は、当教室で確立した保母³²⁾の方法を応用し、綿糸を歯頸部周囲に結紮することで比較的急速に病変の進行を惹起させる方法を用い、歯間隣接面を削合することで固形飼料による、プラーク停滞および食片圧入を考慮し実験に供与した。この方法では、持続的な刺激による口腔上皮層への破壊とプラーク停滞による歯肉固有層への炎症の波及の両面で効果が得られた。

4. 正常歯周組織について

生体内においては、細胞外基質の細胞増殖、分化、走化性、接着、移動、形成等の役割などを解明するには、炎症および創傷治癒過程における組織病変を観察する上で、細胞外基質の3次元的な局在を解析する必要がある。歯周組織中におけるラミニンは、口腔上皮と歯肉結合組織との間に存在する基底膜および毛細血管、神経などに分布しており、今回の観察では、それらの部位でラミニンの局在が見られた。また、付着上皮とエナメル質の接着様式に関して、付着上皮細胞とエナメル質とは、半接着斑ならびに基底板を介しての結合であり、ラミニンが重要な役割を果たしていることが確認されている。今回の観察でも、上皮と結合組織との間に存在する外側基底板、エナメル質と接合上皮との間に存在する内側基底板の陽性所見が認められた。接合上皮内における内側基底板のラミニンの局在については、局在を認めるもの³⁹⁾と局在を認められないもの⁵⁾との報告があるが、今回の観察においては、外側基底板と同様にラミニンの局在が内側基底板に観察され、電子顕微鏡による検索³³⁾と一致する結果が得られた。その原因としては、今回の観察方法では、固定法で抗体の浸透性の向上、実験動物マウス使用による脱灰時間の短縮による実験標本の為害作用の減少が挙げられる。さらに、共焦点レーザー顕微鏡で得られた画像は、抗体によるバックグランドが低く、立体構築の結果、僅かな局在の反応も見られたと考えられる。

歯周組織における毛細血管網については、立体的観察法として墨汁注入切片⁴⁰⁾また、血管鋳型法⁴¹⁾など血管の3次元的方向の観察が報告されている。今回の観察でも、血管に存在するラミニンの陽性反応により、各断面において、歯肉溝上皮および付着上皮における密度の高い毛細血管網が見られた。また、歯肉結合

組織内では、歯軸に沿って上行する毛細血管網の観察が見られ、立体構築で3次元的な走行性が見られた。

5. 歯周炎病変の歯周組織について

歯肉炎から歯周炎の発症過程はPageとScher-oederより⁴²⁾開始期病変、早期病変、確立期病変、発展期病変の4段階に分類されている。

開始期病変における組織像では、接合上皮下の結合組織中の毛細血管の拡張、血管への好中球の付着など、いくつかの急性炎症の像を呈する。歯周ポケット形成の初期変化としては、歯面から2~3層面での細胞性変性の脱落により、歯とセメント質との間隙が深化増加しポケット形成がこの時期に生じることが確認されている³³⁾。

今回の観察は、同様な病理組織学的組織像を認め、さらに毛細血管の拡張に一致して強いラミニンの反応が見られた。早期から確立期病変におけるポケットの深化は、細菌性プラークの刺激により走化性反応が、血管より多形核白血球を分離させ上皮下へと移動する。さらに移動した多形核白血球は、基底膜を通過してポケット内に滲出してくる2次的反応として、歯周ポケットの根尖側移動を形成していると述べられている⁴³⁾。

今回の観察では、上皮下の炎症反応による付着上皮の歯面からの上皮性付着の喪失による、歯周ポケットの深化の病理組織学的組織像が見られた。また、ラミニンの局在は、歯周ポケットの根尖側方向の深化と共に、歯肉溝底部に相当する接合上皮の基底膜部でラミニンの陽性反応の所見を得た。

歯肉炎の過程におけるラミニンの変化として、炎症性細胞浸潤の認められる部分の歯肉溝上皮、接合上皮形成細胞層における細胞分裂活性の高さ³¹⁾や歯周ポケットの根尖側移動に伴う基底膜の移動による再形成が見られる⁴⁴⁾ことから、早期病変から確立期病変では、ラミニンの機能の1つである上皮細胞に対して正の走化性を示す結果が見られたと思われる。一方、ラミニンの機能は、多種多様であり、発展期以降の慢性炎症の細胞浸潤が主体である歯周炎の場合、ラミニンの局在は、び慢性の変化が起こることが考えられる。これらのことは、共焦点レーザー顕微鏡使用による歯周組織の細胞外基質ラミニンの局在が3次元的に観察できることにより、歯科領域における根面処理後の再付着様式などが機能の解明できるものと予測させることからその有用性を示している。

今後、共焦点レーザー顕微鏡使用によるラミニン観察では、ラミニンには多くの活動部位があると共に細胞表面上の多くのレセプターとの特異的な結合をしている。その中のインテグリンなど⁴⁵⁾の細胞外基質レセプ

ターとの基質細胞中の分布, 組織内での細胞間や細胞基質間の接着, 細胞骨格への観察応用が期待できる。また, 反射像, 干渉反射像を観察により, 同一試料による光学顕微鏡像と電子顕微鏡像との相関像による, 細胞-基質接着の全体像, 動態, 微細構造を明らかにすることで, 器官・組織構造への3次元的に高い分解能を持つ観察および測定が応用されると考えられる。さらに, 時間的要素を含めた4次元的な観察の可能性が考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究の遂行に際し, 様々な御指導, 御協力を頂きました東京慈恵医科大学第二解剖学教室 石川 博教授, 橋本尚詞講師, ならびに本学歯周病学教室 教室員各位に心から御礼申し上げます。

文 献

- White, J.G., Aoms W.B. and Fordham, M. : An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell. Biol.*, 105 : 41-48, 1987.
- Narayanan, A.S. and Page, R.C. : Connective tissues of the periodontium : a summary of current work. *Collagen. Rel. Res.*, 3 : 33-64, 1983.
- Narayanan, A.S., Clagett, J.A. and Page, R.C. : Effect of inflammation on the distribution of collagen types, I, III, IV, and V and type trimer and fibronectin in human gingivae. *J. Dent. Res.*, 64 : 1111-1116, 1985.
- 鎌田真理子, 鴨井久一 : ラット辺縁性歯周炎に関する歯肉コラーゲン線維の動態に関する実験病理学的研究. *日歯周誌*, 31 : 491-520, 1989.
- 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学的研究—歯肉剥離搔爬術後のFibronectinとLamininの局在—. *日歯周誌*, 31 : 462-490, 1989.
- 佐藤 聡, 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学的研究—I型コラーゲン, III型コラーゲン, フィブロネクチンの局在—. *日歯周誌*, 33 : 541-576, 1991.
- 浅木信安, 鴨井久一 : 生物学的根面処理法に関する研究—血液凝固第 XIII 因子がフィブロネクチン吸着にあたえる影響—. *日歯周誌*, 36 : 366-387, 1994.
- 宮里明子, 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化学的研究—実験的フラップ手術後のテネシシンの局在—. *日歯周誌*, 35 : 17-33, 1992.
- Timpl, R., Rohde, H., Robey, P.G., Rennard, S.I., Foidart, J.M. and Martin, G.R. : Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J. Biol. Chem.*, 254 : 9933-9937, 1979.
- Timpl, R., Engel, J. and Martin, G.B. : Laminin—a multifunctional protein of basement membranes. *Trends. Biochem. Sci.*, 8 : 207-209, 1983.
- Kao, R.T., Hall, J., Enngel, L. and Stern, R. : The matrix of human breast tumor cells is mitogenic for fibroblasts. *Am J. Pathol.*, 115 : 109-116, 1984.
- Strickland, S., Smith, K.K. and Marotti, K.R. : Hormonal induction of differentiation in teratocarcinoma stem cells : Generation of parietal endoderm by retinoic acid and dibutyryl cAMP. *Cell*, 21 : 347-355, 1980.
- Terranova, V.P. and Lyall, R.M. : Chemotaxis of human gingival epithelial cells to laminin. A mechanism for epithelial cell apical migration. *J. Periodontol.*, 57 : 311-317, 1986.
- Hammarback, J.A., Palm S.L., Furch L.T. and Letourneau P.C. : Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-absorbed laminin. *J. Neuro. Res.*, 13 : 213-220, 1985.
- Iwamoto, Y., Robey, F.A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H.K., Yamada, Y. and Martin, G.R. : YIGSR, a synthetice laminin pentapeptide, Inhibits experimental metastasis formation. *Science*, 238 : 1132-1134, 1987.
- Smith, B., Caffesse, R., Nasjleti, C., Kon, S. and Castelli, W. : Effects of citric acid and fibronectin and laminin application in treating periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 14 : 396-402, 1987.
- Minsky, M. : U.S. Patent No. 3013467.1961.
- Davidovitis, P. and Egger, M.D. : Scanning laser microscope. *Nature*, 223 : 831, 1969.
- Hamilton, D.K., Wilson, T. and Sheppard, C.J. R. : Experimental observations of the depth-discrimination properties scanning microscopes. *Opt. Lett.*, 6:625-626, 1981.
- Wilson, T. and Hamilton, D.K. : Dynamic focusing in the confocal scanning microscope. *J. Microsc.*, 128:139-143, 1982.
- Hernandes-cruez, A., Sala, F. and Adamms, P. R. : Subcelluar calcium transients visualized by confocal microscopy in a voltageclamped vertebrate neuron. *Science* 247 : 858-862, 1990.
- 大谷啓一, 安井みちよ, 小田敏広, 青木和宏, 小椋秀亮 : 共焦点レーザー走査顕微鏡を用いた硬組織の形態学的観察. *歯科基礎*, 34 : 339-349.1992.
- Matsuta, M., Sasaki, K., Hariu, H., Nishiya, I., Katou, M. and Kallioniemi, A. Application of confocal laser scanning microscope on fluorescence in situ hybridization (FISH). *Acta Histochem Cytochem*, 26 : 415-421, 1993.

- 24) 瀬川彰久：共焦点レーザー顕微鏡による生きた細胞の観察。細胞, 23 : 81-84, 1991.
- 25) Watson, T.F. : Applications of confocal scanning optical microscopy to dentistry. J. Dent. Beit., 9 : 287-291, 1991.
- 26) Abee, E. : Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. Arch f Mikr Anat, 9 : 413-46, 1873.
- 27) 橋本尚詞, 日下部守昭：新しい顕微鏡をどう使うか—間質分子の立体観察—。織細胞化学 1993, 179-192, 1993.
- 28) Loe, H., Theilade, E. and Jensen, S.B. : Experimental gingivitis in man. J periodontol, 36 : 177-187, 1965.
- 29) Rovin, S., Costich, E.R. and Gordon, H.A. : The influence of bacteria and irritation of periodontal disease in germfree and conventional rats. J. Periodont. Res., 1 : 193-203, 1966.
- 30) Irving, J.T., Neman, M.G., Socransky, S.S. and Heeley, J.D. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a gram-negative organism. Arch. Oral. Biol., 20 : 219-220, 1975.
- 31) 沼部幸博, 鴨井久一：ラット歯肉炎の病理学的研究—初期歯肉炎における歯肉上皮の反応について—。日歯周誌, 29 : 25-57, 1987.
- 32) 保母良基, 鴨井久一：実験的食片圧入による歯周組織の変化について。日歯周誌, 26 : 201-222, 1984.
- 33) 伊東博司：プラーク付着による実験的ポケット形成に関する病理学的研究。広歯誌, 18 : 99-119, 1986.
- 34) Gupta, O.P., Blechman, H. and Stahl, S. S. : The effects of desalivation on periodontal tissue of the syrian hamster. Oral Surg., 13 : 470-481, 1960.
- 35) 新井 聡：無菌マウスにおける歯周疾患の発症機構に関する研究。日歯周誌, 36 : 776-793, 1994.
- 36) Kennedy, J.E. and Polson, A : Experimental marginal periodontitis in squirrel monkeys. J. Periodont., 44 : 140-144, 1973.
- 37) Burwasser, P., Hill, T.J. : The effect of hard and soft diets on the gingival tissue of dogs. J. Det. Res., 18 : 389-392, 1939.
- 38) Bailey, D.W., 森脇和郎：マウス免疫遺伝学—技法と展開—。ソフトサイエンス社, 東京, 1988, p 249-300.
- 39) Sawada, T., Yamonoto, T., Yanagisawa, T., Takuma, S., Hasegawa, H. and Watanabe, K. : Electron-immunocytochemistry of laminin and type IV collagen in the junctional epithelium of rat molar gingiva. J Periodont. Res., 25 : 372-376, 1990.
- 40) Egerberg, J. : The blood vessels of the dento-gingival junction. J. Periodont. Res., 1 : 163-179, 1966.
- 41) 岸 好人, 高橋和人：口腔粘膜における毛細血管の立体的観察III。歯科礎医学会誌, 19 : 192-207, 1977.
- 42) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease, A summary of current work. Lab. Invest., 34 : 235-249, 1976.
- 43) Schroeder, H.E. and Listgarten, M.A. : Fine structure of the developing epithelial attachment of human teeth. Monographs in Developmental Biology, Vol. 2, Ed. 2, S. Karger, Basel, 1977, p. 102-104.
- 44) Tkarada, H., Cattoni, M., Sugimoto, A. and Rose, G.G. : Ultrastructural studies of human gingiva III. Changes of the basal lamina in chronic periodontitis. J. Periodontol, 45 : 288-302, 1974.
- 45) Steffensen, B., Duong, A.H., Milam, S.B., Potempa, C.L., Winborn, W.B., Magnuson, V.L., Chen, D., Zardeneta, G. and Klebe, R.J. : Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. J. Periodontol, 63 : 584-592, 1992.

連絡先：

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

〒102 千代田区富士見 2-3-16