

氏名	松尾智江
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博乙第 3044 号
学位授与の日付	平成8年9月30日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者 (学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	<u>Intracellular calcium response to hydraulic pressure in human periodontal ligament fibroblasts</u> (水圧に対するヒト歯根膜線維芽細胞の細胞内カルシウムイオンの上昇と反応閾値)
論文審査委員	教授 渡邊達夫 教授 足立 明 教授 滝川正春

### 学位論文内容の要旨

#### [緒言]

矯正治療による歯の移動の際、移動歯周辺の細胞は伸展や圧迫を受ける。このような物理的な刺激が周囲の細胞に作用し、歯槽骨の再構築を誘導し、その結果歯の移動が起こると考えられる。構造上、この物理的刺激を最初に感受するのが歯根膜線維芽細胞であり、過去の研究においても、線維芽細胞が物理的刺激に対してプロスタグランディンやサイトカイン等を産生することが明らかにされてきた。しかしながら従来の実験では、培養した歯根膜線維芽細胞に対して周期的伸展力を加えたり、重りを乗せたり、培養液面に気圧をかけたりする方法が用いられており、実際にどのくらいの圧が細胞にかかっているかは不明であるし、非生理的な圧力を一定期間かけた後の細胞の産生物の増減を測っているにすぎない。本研究では、培養細胞にかかる水圧を圧トランスデューサで経時的に記録する新たな方法を開発するとともに、細胞内第二次伝達系の1つであるカルシウムイオンの変動に着目し、歯根膜線維芽細胞がどの程度の圧に対して反応するかを初めて検討した。

#### [対象および方法]

##### 1. ヒト歯根膜線維芽細胞の培養

矯正治療上の目的で抜去した小臼歯の歯根中央部 1/3 から組織を剥離し、10%牛胎児血清を含むアルファ最少必須培地( $\alpha$  MEM)中でカバーガラス下に培養した。増殖してきた線維芽細胞を、0.25% Trypsin および 0.02% EDTA を含む磷酸緩衝生理食塩水にて単離し継代した。

##### 2. 加圧方法

培養細胞をフラスコ型培養瓶(スミロン社製)に継代して4、5日培養した後、培養瓶の口にゴム栓を介した三方活栓を装着し、一方に10ccのガラス注射器を接続、他方には血圧測定用の圧トランスデューサ(日本光電社製)をつないだ。注射筒の移動は注射器自動注入装置にて行った。

##### 3. 細胞内カルシウムイオンの観察

フラスコにて培養した細胞に、カルシウム結合蛍光指示薬である $10\mu\text{M}$  Fluo-3 (Molecular Probe社製)を $\alpha$  MEM中で30分間取り込ませた。この指示薬により、細胞内カルシウムイオンの変動が蛍光強度の変動として観察される。フラスコを $1\text{mM}$  塩化カルシウムを含むHEPES緩衝液で満たした後、蛍光顕微鏡(ACAS570、

Meridian社製)の観察台に固定した。フラスコ内の圧を0mmHgから連続的に上昇させながら、20秒毎に細胞の蛍光画像をコンピュータに記録した。

[結 果]

1. 圧に対する細胞内カルシウムイオンの変動

フラスコ内の水圧を0mmHgから次第に上昇させると、観察した細胞の約10% (20/198)に細胞内カルシウムイオンの一過性上昇が見られた。その閾値は20から50mmHgと細胞によって異なっていた。細胞内カルシウムイオンの一過性上昇は、50秒から60秒続いて元の値に戻った。またその一過性上昇の蛍光強度は、初期値の2倍以上あった。

圧に反応した細胞と反応しない細胞とでは、細胞内カルシウムイオンの初期値に差がみられなかった。形態的には、反応した細胞は三角形や星型を呈することが多く、反応しない細胞は紡錘形を示す傾向にあった。圧をかけずに経時的に観察しても細胞内カルシウムイオンの変動はみられなかった。

2. 細胞外カルシウムイオンの影響

同様の実験を塩化カルシウムを含まない緩衝液中で行うと、加圧による細胞内カルシウムイオンの一過性上昇はみられなかった。

[考察および結論]

1. ヒト歯根膜線維芽細胞は水圧に反応して細胞内カルシウムイオンの一過性上昇をきたす。細胞外カルシウムイオンが存在しないとこの一過性上昇はみられないことから、細胞内カルシウムイオンの変動は、細胞外カルシウムイオンが細胞膜のカルシウムチャンネルを通して細胞内に流入することによって起こると考えられる。

2. 約10%の歯根膜線維芽細胞しか圧に反応しなかったことから、線維芽細胞中に subpopulation が存在する可能性がある。

3. 水圧に対するヒト歯根膜線維芽細胞の細胞内カルシウムイオン上昇の閾値は20から50mmHg、即ち27から68g/cm<sup>2</sup>であった。この反応閾値は臨床で用いている矯正力の妥当性を側面的に支持するものであり、本研究は従来より科学的な研究方法の採用が困難であった矯正力の optimum force について、新しい視点から解明する端緒を与えるという重要な意義を有する。

## 論文審査結果の要旨

提出された論文は、ヒト歯根膜線維芽細胞を水圧により連続加圧すると、 $28-68\text{g/cm}^2$ の範囲において細胞内カルシウムイオンが一過性に上昇することを観察したものである。

連続加圧システムを開発したことにより、歯根膜線維芽細胞にかかる圧力を連続変数として観察することができたこと、細胞内カルシウムイオンの一過性の上昇は細胞外カルシウムがカルシウムチャネルを介して起こること、カルシウムの消長を惹起する圧力は、日常臨床における至適矯正力とよく近似していることが新知見として認められた。これらは、経験的に決定されていた矯正力の強さを、今後科学的に解明するためには有用な知見であると考えられる。

以上のことから、本論文は矯正学的観点において重要な知見を得たものであり、博士（歯学）の学位を与える価値があることを認めた。

なお、矯正臨床における適正な矯正力に関しては中川皓文教授（川崎医科大学・歯科矯正学）、連続加圧システムと適正な矯正力に関しては山本照子教授（徳島大学・歯科矯正学）のご教示をいただいた。