①

ラット歯根膜における
カテプシンB，Lの局在に関する
免疫組織化学的研究

竹山　雅規

新潟大学歯学部歯科矯正学講座（主任：花田晃治教授）

新潟大学歯学部口腔解剖学第一講座（指導：小澤英浩教授）

【要約】

矯正治療における歯の移動のメカニズムを理解する上で、歯根膜線維の改変機構を解明することは重要である。歯根膜線維の主体であるコラーゲン線維の改変については、線維芽細胞が合成分泌だけではなく分解も行うこと、さらにその分解にはカテプシンB，Lが関与することが示唆されている。しかし、これまでカテプシンB，Lの歯根膜線維芽細胞内での局在や、それらの酵素と歯根膜の改変との関係について形態学的に示した報告はない。そこで本研究では、歯根膜線維の改変におけるカテプシンB，Lの役割について明らかにする目的で、生理的に遠心移動しているラット臼歯歯根膜のカテプシンB，Lの局在を免疫組織化学的に検索した。さらにWaldo法で実験的に歯の移動を行った時の、カテプシンLを有する線維芽細胞の分布を検索し、矯正力に対する歯根膜線維芽細胞の反応を検討した。生理的移動時の歯根膜ではカテプシンB，Lの局在は、歯槽骨表面の破骨細胞と血管周囲および歯根膜全体に散在する紡錘形の単核細胞に認められた。これらの単核細胞の一部はマクロファージ系細胞のライソゾームを認識するED1と反応したが、多くの細胞はED1と反応しなかった。さらに電子顕微鏡で検索したところ、破骨細胞やマクロファージの他に線維芽細胞のライソゾーム顆粒にもカテプシンB，Lの局在が検出された。線維芽細胞内でのカテプシンB，Lの局在は、取り込まれたコラーゲン細線維と融合したライソゾーム顆粒に検出された。生理的移動時の歯根膜では、カテプシンLを持つ線維芽細胞は近遠心ともに歯根膜全層に均等に分布していたが、破骨細胞の近傍でその細胞数は多くなる傾向が認められた。一方、実験的に歯の移動を行った時の歯根膜では近遠心的な差は認められなかったが、その細胞数は矯正力に反応して増加する傾向があった。以上の結果から、歯根膜では破骨細胞

やマクロファージ系細胞の他に線維芽細胞にカテプシンB、Lが存在すること、またそれらの酵素により線維芽細胞内に取り込まれたコラーゲン細線維が分解されることが形態学的に示された。またカテプシンLを有する線維芽細胞の分布から、歯根膜の改変は歯根膜全層で行われており、さらに矯正力によって歯根膜線維芽細胞による歯根膜の改変が活性化されることも示唆された。

【緒言】

歯根膜はセメント質と歯槽骨の間に存在する特殊な結合組織であり、主にセメント質と歯槽骨を連結するコラーゲン線維と、そのコラーゲン線維の産生や改変を担う線維芽細胞より成る (Freeman 1994)。この歯根膜は歯を維持する機能とともに、咬合力や軟組織から受ける機能圧を緩衝する機能を有する (Freeman 1994; Lekic and McCulloch 1996)。歯は安静時にも頬や舌などの諸組織からの圧力を受けている(Proffit 1986a)が、歯根膜に緩衝作用があるために、歯に加わる圧力に一時的に不均衡が生じた場合でも、歯はすぐには移動せずに安定した位置をとることができる(Proffit 1986b)。また、歯槽骨の改造により歯が移動した後も、歯根膜は線維の改変によって新たな位置に適応する能力を有するために、矯正治療が可能となる (Ten Cate 1994a)。

矯正学的歯牙移動の過程は、理想的には以下のようなものである。まず、加えられた力に対応して、圧迫側では歯根膜が圧縮、牽引側では伸展され歯根膜にひずみが生じる。そのような歯根膜のひずみが歯槽骨に伝わり、破骨細胞と骨芽細胞による歯槽骨の改造が起こり、歯が移動する。そして、移動した位置に適応するように歯根膜線維の改変が起こる。理論的には生理的な歯の移動を起こすような力と同程度の弱い力を用いれば、このような変化が起こると考えられる (Ten Cate 1994a)。しかし、歯根膜に加わる荷重は部位により不均一であり、たとえ弱い力を用いたとしても、歯根膜の損傷と修復を伴う歯の移動も、ある程度は避けられない。すなわち、強い圧迫力がかかっている部位では、圧縮にともなう歯根膜の血管の血行障害のため硝子様変性がおこる。硝子様変性組織はマクロファージ系の多核巨細胞によって吸収され、損傷した歯根膜は線維芽細胞によって修復される。強い牽引力がかかっている部位でも線維が断

裂したり、その間の線維芽細胞が押しつぶされて、退行性の変化を起こすことがある。その場合も最終的には線維芽細胞による歯根膜の修復がおこる(Fukuhara 1995; Ten Cate 1994a; Hiruma 1989; Proffit 1986b)。このような、歯牙移動に伴う歯周組織、特に歯槽骨や歯根膜の改変機構を理解することは効果的な矯正治療を行う上で不可欠である。

歯根膜は、細胞成分と線維、基質などの細胞外成分で構成される。細胞成分としては、骨芽細胞、破骨細胞、線維芽細胞、マラッセの上皮遺残、未分化間葉細胞、セメント芽細胞、マクロファージ(Freeman 1994)、樹状細胞(Kawahara et al. 1992; Kawahara and Takano 1995)などが含まれる。細胞外成分は、線維芽細胞によって合成分泌され、大部分はコラーゲン線維で、I型とIII型の混合からなるが、他にエラウニン線維、オキシタラン線維、線維間基質も存在する (Freeman 1994)。マウス臼歯歯根膜では、構成成分の35%が線維芽細胞を中心とした形成系細胞、51%がコラーゲン線維であり(Freezer and Sims 1987)、両者の占める割合は非常に大きい。

歯根膜線維や歯槽骨は常に改変され、加えられた刺激に対応している(Freeman 1994)。歯根膜におけるコラーゲン線維の改変部位に関しては、以前は歯根膜の中間帯で行われるとされていた (Sicher 1942) が、放射性同位元素を用いた研究(Stahl and Tonna 1977; Perera and Tonge 1981)やI型コラーゲンmRNAのin situ hybridizationによる研究(Nakagawa et al. 1994)により、生理的な状態における歯根膜では、歯根膜の全層にわたって線維の改変が行われることが明らかにされた。ただし、歯槽骨付近では改変活性が高いことも示唆されている(Anderson 1967; Melcher and Correia 1971; Diaz 1978)。また、ラット臼歯歯根膜では、破骨細胞近傍で線維芽細胞内に観察されるコラーゲン細線維の取り込み像が多い傾向を示すが、コラーゲン含有線維芽細胞は

歯根膜全層で認められることも報告されている(Garant 1976; Beertsen et al. 1978)。このようなことから、現在ではコラーゲン線維の改変は、基本的には歯根膜全層にわたって行われると考えられている (Freeman 1994)。

歯根膜のコラーゲン線維の改変速度は、他の結合組織と比較して生理的に非常に速いことが、放射性同位元素を用いた研究(Sodek et al. 1977,1988)、立体微細構造学的研究(Svoboda et al. 1981)により報告されている。また、歯根膜コラーゲン線維の合成速度は、実験的に歯を移動した時でも、生理的移動時に比較してわずかに増加するだけであることから、生理的移動時の歯根膜におけるコラーゲンの改変は、既に限界に近いスピードで行われている可能性が示唆されている(Crumley 1964; Diaz 1978)。このため歯の移動を行ったときに歯根膜線維のひずみは速やかに緩和される。

歯根膜の改変に伴うコラーゲン線維の分解経路としては、歯根膜細胞によって分泌されたmatrix metalloendoproteinase (MMP) による細胞外分解と歯根膜細胞による細胞内分解が考えられている(Ten Cate 1994b)。しかし、Everts et al. (1996) は結合組織一般で、生理的なコラーゲンの合成と分解のバランスが保たれているときは、細胞内分解がコラーゲン分解の主要な経路であると述べている。

細胞内分解については、線維芽細胞がコラーゲン細線維を貪食し、ライソゾーム顆粒によって細胞内で分解することが形態学的に示されている(Ten Cate 1972; Deporter et al. 1973; Ten Cate 1976) 。Deporter et al. (1973) はそのような歯根膜でコラーゲンを貪食している線維芽細胞内のライソゾーム顆粒は、酸性ホスファターゼ(ACPase)活性及び、アルカリホスファターゼ(ALPase)活性を持つことを報告している。さらに、ヒト歯肉由来の培養線維芽細胞のうち、コラーゲンを分泌するものはACPase活性が弱く、貪食するも

のはその活性が強いとの報告(Yajima 1988)もある。線維芽細胞以外では、歯根膜のセメント質寄りで、セメント芽細胞によってもコラーゲン細線維が貪食されることが報告されている(Yajima 1989)。一般的に貪食、分解を行うマクロファージについては、コラーゲン細線維の貪食は、子宮において報告(Parakkal 1969)されてはいるものの、歯根膜ではこれまでのところ報告されていない。破骨細胞についても、病的組織(Everts et al. 1985a)と*in vitro*で細胞内分解を阻害した場合 (Everts et al. 1988)のコラーゲン細線維の貪食が報告されているが、歯根膜での報告はみられない。

コラーゲン分解の調節機構について、すなわち線維芽細胞がどのようにして、貪食すべきコラーゲン細線維あるいはコラーゲン線維束を選択しているのかについてはまだよくわかっていない。現時点では、細胞表面にあるレセプターによってコラーゲン線維を認識し、これによって細胞外環境に生じた変化（線維の構造に変化を及ぼすような伸張力や収縮力など）が細胞に伝わると考えられている(Ten Cate 1994b)。ただし、ある種のサイトカインが線維芽細胞によるコラーゲン細線維の貪食に影響を与えることは報告されている。van der Zee et al. (1995)は骨膜由来培養線維芽細胞によるコラーゲン細線維の貪食能に対する各種サイトカインの効果について検討し、transforming growth factor beta(TGFβ)は促進的に、interleukin 1α(IL-1α)は抑制的に作用し、各々がantagonistとして働いていることを報告した。しかし、IL-1はコラーゲン細線維の貪食能に影響を与えないという報告もあり (Knowles et al. 1991)、不明な点も多い。一方コラーゲン合成は、プロスタグランジンE_2(PGE_2)により抑制されることが報告されており (Goldstein and Polgar 1982)、合成分泌を含めた線維芽細胞によるコラーゲン線維の改変機構全体が、サイトカインによる調節を受けていることも考えられる。Lekic and McCulloch (1996) は線維

芽細胞はメカニカルストレスを含む各種の刺激によって、PGE_2、PAI、IL-6を分泌すると述べている。また、メカニカルストレスによって、培養歯根膜線維芽細胞のIL-1βの分泌が認められることが報告されている (Saito et al. 1991)。これらのことから、矯正学的歯牙移動の際には、サイトカインによって線維芽細胞が活性化され、改変が進むことが考えられる。

貪食しようとするコラーゲン細線維の切り出しについてはMMPの関与が考えられる(Ten Cate 1994b)。Everts et al. (1989) は、MMP-1を阻害するTIMP-1によっても培養骨膜線維芽細胞のコラーゲン細線維の取り込みは阻害されないことから、コラーゲン細線維の細胞内分解においてはMMP-1の関与は小さいことを示唆している。しかし、MMP-2やMMP-3も阻害する薬剤ではコラーゲン細線維の取り込みは阻害されることから、それらの酵素が線維芽細胞の細胞膜結合型酵素として、コラーゲン細線維の切り出しをおこなっていることが示唆されている (Everts et al. 1996)。

貪食されたコラーゲン細線維は細胞内でカテプシンによって分解されると言われている (Everts et al. 1996)。カテプシンは酸性領域で活性を持つ主要なエンドペプチダーゼであり(Barrett and Kirschke 1980)、一般に外来タンパク質や細胞構成タンパク質の処理、ライソゾーム酵素のプロセシングなどのライソゾームにおけるタンパク質分解に重要な役割を果たす(Barrett and Kirschke 1980; Kominami et al. 1991; Ohshita et al. 1992; Katunuma N 1992; Punnonen et al. 1993)。特に、カテプシンB，L，N，S，Kはコラーゲンの分解が可能であり(Burleigh et al. 1974; Etherington 1976; Evans et al. 1978; Kirschke et al. 1982; Maciewicz et al. 1987,1988; Bossard et al. 1996)、コラーゲン分解性カテプシンと呼ばれる。このうち、カテプシンKは強力なコラーゲン分解性を持つ (Bossard et al. 1996) が、破骨細胞に

特異的な酵素で (Drake et al. 1996) 、破骨細胞による骨基質中のコラーゲンの分解に中心的な役割を果たすと考えられている。Etherington (1976) は脾臓細胞のカテプシンBについて報告し、そのコラーゲン分解性に注目して、線維芽細胞によるコラーゲン細線維の細胞内分解が、カテプシンBによっておこなわれていることを示唆した。Wang(1982)は歯根膜線維芽細胞のライソゾーム分画に、ACPaseなどとともにカテプシンB，D，H，Nが含まれていることを報告した。また、Goseki et al. (1996)は歯根膜由来培養細胞のカテプシンB，L活性について報告している。一方で、Everts et al. (1985b) はカテプシンの阻害剤であるleupeptinとE-64を培養骨膜線維芽細胞に投与すると細胞内のコラーゲン細線維を含むライソゾーム顆粒が増加することを示し、線維芽細胞によって貪食されたコラーゲン線維が、細胞内でコラーゲン分解性カテプシンによって分解されていることを示唆した。さらに、Van Noorden et al. (1991)はカテプシンB，Lの選択的阻害剤であるZ-Phe-AlaCH2Fを投与しても、同様に細胞内のコラーゲン細線維を含むライソゾーム顆粒が増加することを示し、コラーゲン細線維の分解には、特にカテプシンB，Lの関与が大きいことを示唆した。

以上のように、歯根膜線維芽細胞内でコラーゲン細線維を分解している酵素としては、コラーゲン分解性カテプシン、特にカテプシンB，Lが有力であるが、その局在を形態的に示したものは少ない。*in vitro* (Mort et al. 1981; Graf and Strauli 1983; Van Noorden et al. 1987)や*in vivo*(Van Noorden et al. 1986)で線維芽細胞内のライソゾームにカテプシンBが局在することが報告されているが、歯根膜では、カテプシンBについての酵素組織化学的研究(Tanaka et al. 1994)があるのみで、カテプシンLの局在についての報告は見られず、コラーゲン細線維を含むライソゾーム顆粒との関係も不明である。そ

こで、本研究では、歯の移動に伴う歯根膜の改変機構を明らかにする一端として、カテプシンB，Lが線維芽細胞に局在していることを確認し、その細胞内分解への関与を裏付けること、生理的な歯の遠心移動時と実験的に歯の移動を行った時のカテプシンB，Lを有する線維芽細胞の分布を比較し、矯正力に対する歯根膜の反応を検討することを目的とした。

【材料と方法】

生理的移動時の歯根膜における検索

組織調整

生理的移動時の歯根膜における検索には8週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。ジエチルエーテル吸入麻酔およびネンブタール(Dainabot,Osaka,Japan)腹腔内麻酔（30mg/kg）下にて灌流固定後、ただちに上顎骨を摘出し、灌流固定に用いたものと同じ固定液で浸漬固定を行った（4℃、一晩）。固定液は組織化学的観察用には4%パラホルムアルデヒド,0.5%グルタールアルデヒド混合溶液(0.06Mカコジル酸緩衝液,pH7.2)を、微細構造観察用には2%パラホルムアルデヒド,2.5%グルタールアルデヒド混合溶液(0.04Mカコジル酸緩衝液,pH7.2)をそれぞれ用いた。固定終了後、0.1M カコジル酸緩衝液(pH7.2)で洗浄し、4.13%EDTA中、4℃で30日間脱灰した。光学顕微鏡観察のための試料は上昇エタノール系列で脱水を行い、パラフィン包埋した。スライド式ミクロトームを用い、咬合面に平行な水平断および矢状断で厚さ7μmの連続切片を作成した。電子顕微鏡観察のための試料は、マイクロスライサー DKT-1000 (DSK,Kyoto,Japan) を用い、咬合面に平行な厚さ70μmの薄切切片を作成した。

免疫組織化学的検出

免疫組織化学的検出はSABC法で行った。切片は内因性ペルオキシダーゼを阻止するため、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)で希釈した0.3% 過酸化水素で処理(室温、30分)した。 非特異結合の阻止は、PBSで希釈した5%スキムミルク(Yukijirushi,Sapporo,Japan)で行った(室温、30分)。一次抗体として抗ラッ

トカテプシンB,L抗体（順天堂大学 木南英紀教授より御提供いただいた。Ohsawa et al. 1993）およびマクロファージ系細胞のマーカーであるED1(Serotec Canada Ltd,Tronto,Canada,Dijkstra et al. 1985)を用い、陰性対照としては1%ウシ血清アルブミン (BSA,Bayer Co.Kankakee,USA)を用いそれぞれ反応させた（4℃、一晩）。二次抗体には、ビオチン化抗ウサギIgG(Nichirei Inc.,Tokyo,Japan)またはビオチン化抗マウス IgG+ IgA+ IgM (Nichirei Inc.,Tokyo,Japan)を用い(室温、30分)、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Nichirei Inc.,Tokyo,Japan)と反応(室温、30分)後、ジアミノベンチジン(DAB) (Dojin Chemicals,Kumamoto,Japan)・H_2O_2溶液中で発色(室温、3分)させた。各ステップの間はPBSで試料を十分に洗浄した。メチルグリーンで背景染色を行い、光学顕微鏡 MICROPHOT-FXA (Nikon, Tokyo, Japan) で観察した。

酵素組織化学的検出

酸性ホスファターゼ(ACPase)活性の検出は、パラフィン切片を用いアゾ色素法 (Burstone 1958)で行った。基質として naphthol AS-BI phosphate (Sigma Chemical Co.,St. Louis,USA)、ジアゾニウム塩としてfast red violet LB salt(Sigma Chemical Co.,St. Louis,USA)を含有した0.1M酢酸緩衝液 (pH5.0) 中で反応させた (37℃、90分)。それぞれの切片はメチルグリーンで背景染色を行い、光学顕微鏡で観察した。なお、一部の切片では上記の処方に100mM L(+)tartrate (Nacarai Tesque inc.,Kyoto,Japan)を添加し、pH調整を行った (pH5.0) 反応液を用いて、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性の検出も行った。

微細構造の観察

厚さ70μmのマイクロスライサー切片を0.1M カコジル酸 (pH7.4)で緩衝した1%四酸化オスミウムで後固定し(4℃、2時間)、上昇アセトン系列で脱水後、Poly-bed812 レジン(Polysciences,Warrington,Pa.,USA)に包埋した。MT5000 (Du Pont Co.,Conneticut,USA) を用いて超薄切片を作成し、銅製グリッドにマウント後、 タンニン酸、酢酸ウラン、クエン酸鉛による3重染色を行い、H-500型電子顕微鏡(Hitachi,Tokyo,Japan)で観察した。

電子顕微鏡観察のための免疫組織学的検出

カテプシンB、Lについて、ＳＡＢＣ法による電子顕微鏡レベルの検索を行った。厚さ70μmのマイクロスライサー切片を非特異結合を阻止するため0.1% BSAで処理し(4℃、4時間）、一次抗体の抗ラットカテプシンB,L抗体を反応させた(4℃、3日）。さらに、ビオチン化抗ウサギ Ig G(4℃、1日）、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応(4℃、1日）させた後、DAB・H_2O_2溶液中で発色させた(室温、10分)。0.1M カコジル酸で緩衝した1%四酸化オスミウム中で後固定(4℃、2時間)後、上昇アセトン系列で脱水し、Poly-bed812 レジンに包埋した。MT5000を用いて作成した超薄切片を、銅グリッドにマウントし、クエン酸鉛による単染色を行い、 H-500型電子顕微鏡で観察した。

実験的移動時の歯根膜における検索

実験的移動時の歯根膜における検索には7週齢のウィスター系雄性ラットを用いた。Waldo (1953) の方法に準じて、ジエチルエーテル吸入麻酔下にて、上顎第一、第二臼歯間にゴム片(1/4 inch,2 oz.,Unitek/3M,Tokyo,Japan)を挿入した。ゴム片挿入後4、7日後に生理的移動群に準じて組織調整を行い、パ

ラフィンまたはPoly-bed812レジンに包埋した。矢状断パラフィン切片を用いて、カテプシンL、ED1の免疫組織化学的検出、ACPase活性の酵素組織化学的検出を行うとともに、微細構造学的な検索を行った。

カテプシンLを有する単核細胞の分布

矢状断パラフィン切片で、生理的移動時と実験的移動時における第二臼歯根間中隔近遠心の歯根膜のカテプシンLを有する単核細胞、ACPase活性を有する単核細胞、ED1を有する単核細胞の数を比較した。歯根膜の歯根長軸方向の中間部1/3の100 μmX200 μmの領域に認められる細胞数をカウントした。

【結果】

生理的移動時の歯根膜におけるカテプシンB，Lを有する細胞の検索

生理的移動時の歯根膜では、カテプシンBおよびLの局在が歯槽骨表面の大型で多核の破骨細胞、歯根膜中の血管周囲に観察される単核細胞、さらに歯根膜中に散在する多数の紡錘形単核細胞に認められた(図1a,b)。また、ED1による免疫反応は、歯槽骨表面の破骨細胞と血管周囲の単核細胞に観察され (図1c,d) 、これらの局在はカテプシンB，Lを有する細胞の局在の一部と一致していた。さらにED1で認識される単核細胞の一部はTRAPase活性を示したが、一部は活性を示さなかった(図2a,b)。

電子顕微鏡で観察すると、歯根膜中にER-Golgi系の発達した線維芽細胞が多数見られ、一部の線維芽細胞の細胞質では取り込まれたコラーゲン細線維が認められた(図3a)。また歯槽骨近傍では、多数のコラーゲン細線維を取り込んだ線維芽細胞も観察された(図3b)。線維芽細胞内部のコラーゲン細線維は、電子密度の高い紡錘形の構造物として観察され(図3c,d)、その一部はライソゾーム顆粒内に認められ、両者の融合像と考えられた(図3d)。また、カテプシンLの局在を観察すると、紡錘形の線維芽細胞内のライソゾーム顆粒と思われる楕円形の構造物に反応が検出された(図4a)。カテプシンLの局在するライソゾーム顆粒の一部は、細胞内部に取り込まれたコラーゲン細線維の近傍(図4b)やコラーゲン細線維に隣接して観察された(図4c)。また、コラーゲン細線維を含むライソゾーム顆粒でもカテプシンLが検出された(図4d)。線維芽細胞内のこのようなライソゾーム顆粒ではカテプシンBの局在を示す反応も認められ、その一部は細胞内のコラーゲン細線維と隣接していた(図4e)。

歯根膜中の血管周囲の円形または紡錘形のマクロファージ内部には、多数の

ライソゾーム顆粒が観察され、カテプシンLの局在を示す反応が認められた(図5a)。細胞内にコラーゲン細線維を含むマクロファージは認められなかった。

歯槽骨表面の破骨細胞では、細胞内部の楕円形の小胞の一部と歯槽骨表面に面して複雑に細胞膜の陥入した波状縁に、電子密度の高いカテプシンLの局在を示す反応が認められた(図5b)。

実験的移動時におけるカテプシンL、ACPase活性、ED1が検出される細胞の分布の変化

矢状断パラフィン切片で第二臼歯根間中隔の近遠心の歯根膜を観察すると、カテプシンLを有する単核細胞は、生理的移動時では破骨細胞の近傍で密度が高くなる傾向が認められた(図6b)ものの、全体的には近遠心ともに歯根膜中に均等に分布しており(図6a,b)、歯槽骨近傍を除くと、近遠心的な差は明確に認められなかった(図6a,b,8a)。一方、Waldo法で4日間実験的に歯を移動すると、カテプシンLを有する単核細胞は歯根膜中に均等に分布し、近遠心的な差はほとんどみられないが、生理的移動時の歯根膜中に認められたものと比較して増加していた(図6c,d,8a)。生理的移動時では、牽引側に相当する遠心根近心側に、ACPase活性を示す細胞はほとんど認められなかった(図7a,8b)。一方、圧迫側に相当する近心根遠心側には、歯根膜中の多数の単核細胞にACPase活性が認められ(図7b,8b)、同じ部位のカテプシンLを有する細胞の分布と同様であった(図6b,8a)。実験的に歯を移動すると、近心根遠心側だけでなく(図7d)遠心根近心側にも、多数の紡錘形単核細胞にACPase活性が認められた(図7c)。ACPase活性が認められる細胞の数は実験的移動で全体的に増加し、特に遠心根近心側では近心根遠心側と同程度まで増加しており、カテプシンLを有する単核細胞数と近似した値となった(図8a,b)。ED1の局在は、生理的移動

時では血管周囲の細胞にわずかに認められるのみで、実験的に移動を行っても細胞数に明確な変化は認められなかった(図8c)。

コラーゲン細線維を取り込んでいる線維芽細胞数やコラーゲンの取り込み量を電子顕微鏡で検索したが、生理的移動時と実験的移動時との間に差は認められなかった。

【考察】

矯正治療における歯の移動のメカニズムを理解するため、歯根膜の改変機構を解明することは、きわめて重要である。歯根膜コラーゲンの分解について、コラーゲン分解性カテプシン、特にカテプシンB，Lの重要性は指摘されているが、その局在を形態的に示したものは、酵素組織化学的にカテプシンBの局在を示した報告(Tanaka et al. 1994)だけである。そこで、本研究では、代表的なコラーゲン分解性カテプシンであるカテプシンB，Lに対する抗体を用いて、歯根膜における局在を免疫組織学的に検索し、歯根膜線維芽細胞にカテプシンB，Lが局在することを示した。

生理的移動時の歯根膜においてカテプシンB，Lを有する細胞

カテプシンB，Lの局在は、歯槽骨表面の破骨細胞と血管周囲および歯根膜全層に散在する紡錘形の単核細胞に認められた。このうち、血管周囲にみられる紡錘形の単核細胞は、マクロファージ系細胞のライソゾームを認識する(Dijkstra et al. 1985) ED1の局在も認められたため、マクロファージ系細胞と考えられる。さらに、そのうちの一部にTRAPase活性が認められ、破骨細胞の前駆細胞と考えられた。一方、ED1の局在が認められTRAPase活性を示さない単核細胞は、マクロファージや、ACPase活性をほとんど示さない樹状細胞 (Kawahara et al. 1992; Kawahara and Takano 1995)と考えられる。また、歯根膜の細胞の構成は74%が線維芽細胞などの形成系の細胞である(Freezer and Sims 1987) ことを考慮すると、ED1の局在が認められずカテプシンB，Lの局在が認められる単核細胞の多くは、線維芽細胞であると考えられる。したがって、歯根膜でカテプシンB，Lを有する細胞の主なものは、

破骨細胞、マクロファージ系細胞、線維芽細胞であると考えられる。

これまで歯根膜線維芽細胞に、ライソゾームの標識酵素であるACPase活性およびALPase活性を示すコラーゲン細線維を含有する小胞が存在することから、歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン細線維の貪食とライソゾーム顆粒による細胞内分解が示唆されてきた(Ten Cate 1972; Deporter 1973)。今回の研究でも線維芽細胞内へのコラーゲン細線維の取り込みと、ライソゾーム顆粒との融合像が確認された。一方、カテプシンはライソゾームに局在する酵素で(Katunuma 1992)、貪食されたコラーゲン細線維はカテプシンB，Lによって分解されることが示唆されている (Everts et al.1985b; Van Noorden et al. 1991)。しかし、形態学的には、カテプシンLが線維芽細胞に局在していることを示した研究はみられず、カテプシンBの局在についても、歯根膜ではTanaka et al. (1994)による報告があるが、コラーゲン細線維を含むライソゾーム顆粒との関係については明らかではない。今回の研究では、線維芽細胞内のカテプシンB，Lの局在は、取り込まれたコラーゲン細線維と融合したライソゾーム顆粒に検出され、微細形態学的に観察されたものと一致した。これはコラーゲン細線維の細胞内分解過程にカテプシンB，Lが関わっていることを、形態学的に強く示唆するものである。

カテプシンB，L，N，S，Kなどのコラーゲン分解性カテプシンのうち、破骨細胞に特異的な酵素であるカテプシンK (Drake et al. 1996)を除くと、カテプシンLが最も強力なコラーゲン分解性を持つことが報告されている(Maciewicz et al. 1987,1988)。また、Kominami et al. (1991)やOhshita et al. (1992)はエンドサイトーシスでライソゾームに取り込まれたタンパク質の分解開始や完全分解には、カテプシンBは関与していないことを示唆している。以上のことから、歯根膜の線維芽細胞によるコラーゲン細線維の細胞内分解に

は、カテプシンLが最も重要な役割を果たしていることが推察される。

マクロファージの細胞内に多数存在するライソゾーム顆粒にもカテプシンB，Lの局在が認められた。マクロファージは一般的に外来異物を貪食し細胞内分解することが知られているが、コラーゲン線維の貪食については、子宮において報告(Parakkal 1969)されてはいるものの、歯根膜ではこれまでのところ報告されていない。今回の研究でもコラーゲン細線維の取り込み像は認められず、マクロファージのライソゾーム顆粒に局在するカテプシンB，Lの役割はコラーゲンの分解ではなく、その他の役割であると考えられる。特にカテプシンBは、マクロファージ系細胞の一種である樹状細胞のような抗原提示細胞では、抗原のプロセシングに必要であることが報告されている(Matsunaga et al. 1993)。歯根膜にも樹状細胞が常在している (Kawahara et al. 1992; Kawahara and Takano 1995)ことを考えあわせると、カテプシンB陽性のマクロファージ系細胞の一部は樹状細胞と推察され、生体防御機構に関連していることも考えられる。

破骨細胞による骨基質中のコラーゲンの分解は吸収窩でおこなわれ、カテプシンKが最も重要な役割を果たすことが既に報告されている (Drake et al. 1996) 。細胞内分解については、正常組織でのコラーゲン細線維の貪食は報告されていないが、骨代謝疾患の組織(Everts et al. 1985a)や培養細胞にカテプシンの阻害剤を投与した場合(Everts et al. 1988)に、骨吸収の抑制とともに細胞内コラーゲン細線維が多数認められることが報告されている。このことから、破骨細胞によるコラーゲン線維の細胞内分解機構が存在するとともに、カテプシンが骨吸収機構にも重要であると考えられる。今回の結果では、破骨細胞によるコラーゲン細線維の取り込み像は認められなかったが、細胞内に多数存在する空胞の一部と波状縁にカテプシンLの免疫反応の局在が一致していた。こ

のことから、吸収窩でカテプシンKやMMPをプロセシングしたり、細胞内に取り込んだ骨基質分解産物を細胞内のライソゾームでさらに分解するなど、カテプシンLが骨吸収機構の中で補助的な役割を果たすことが示唆される。

生理的移動時の歯根膜におけるカテプシンLを有する線維芽細胞の分布

生理的移動時の歯根膜中のカテプシンを有する単核細胞の分布は、近遠心的に差は認められないものの、破骨細胞近傍で細胞数が増加していた。これらの細胞のほとんどはED1と反応せず、線維芽細胞と考えられた。さらに、電子顕微鏡でもカテプシンLを有する線維芽細胞の一部において、コラーゲン細線維が分解される過程を示唆する像が観察された。コラーゲン線維の改変部位について、Garant (1976)、Beertsen et al. (1978) はラット臼歯歯根膜のコラーゲン含有線維芽細胞は歯根膜全層に認められ、その分布に部位による違いは基本的にないものの、破骨細胞近傍で線維芽細胞のコラーゲン細線維の取り込み像が増加することを示し、コラーゲン線維の改変は歯根膜全層で起こるが、骨吸収などの局所的な環境に影響されることを示唆している。今回のカテプシンLの分布はこれらの報告と一致しており、コラーゲン細線維の細胞内分解にカテプシンLが強く関わっていることが示唆される。しかし、今回の研究ではACPase活性は圧迫側に相当する近心根遠心側では多数の細胞に認められるが、牽引側に相当する遠心根近心側ではほとんど認められず、遠心根近心側の歯根膜の細胞はACPase活性が低いことも示された。Yajima (1988)はヒト歯肉由来の培養線維芽細胞のうち、コラーゲンを分泌するものはACPase活性が弱く、貪食するものは活性が強いことを報告している。それらを考えあわせると、圧迫側に相当する近心根遠心側では、骨吸収とともにコラーゲンの貪食分解が活発であることが強く示唆されるが、牽引側に相当する遠心根近心側では、貪食

分解はあまり活発でない可能性もある。その場合はカテプシンＬを有する線維芽細胞におけるカテプシンＬの役割も、近遠心で少し異なり、遠心根近心側ではコラーゲン合成過程で生じる余分なポリペプチドの分解 (Ten Cate 1994b) などが主体であることも考えられる。

破骨細胞による骨吸収において、吸収窩におけるミネラルの脱却に伴い、骨内部に埋め込まれているコラーゲン線維が露出する。これらのコラーゲン線維は、破骨細胞によって吸収窩で分解(Vaes et al. 1992)、あるいは細胞内に貪食され(Everts et al. 1985a,1988)、分解されることが考えられる。しかし、破骨細胞内部にとりこまれたコラーゲン分解産物が血管側から放出されるとの報告(Nesbitt and Horton 1997; Salo et al. 1997)があり、また、破骨細胞が骨表面から離れた後に、露出したコラーゲン線維を線維芽細胞様細胞あるいはマクロファージ系単核細胞が処理することも示唆されている(Heersche 1978)。そのため、破骨細胞近傍で多数見られる線維芽細胞は、破骨細胞から放出されるコラーゲン分解産物、あるいは骨表面に露出したコラーゲン線維の処理に関与することも考えられる。しかし、カテプシンＬの線維芽細胞における役割としては、コラーゲンの分解の他にもライソゾーム酵素の活性化 (Katunuma 1992) や細胞内小器官の処理 (Punnonen et al. 1993)、コラーゲン合成過程で生じる余分なポリペプチドの処理(Ten Cate 1994b)なども考えられ、それらの要因が、カテプシンＬを有する線維芽細胞の分布に影響を与えている可能性もある。

生理的移動時の歯根膜と実験的移動時の歯根膜の比較

今回の研究では実験的に歯の移動を行った時の歯根膜の改変を検索するため、Waldo法で歯の移動を行った歯根膜と生理的移動時の歯根膜におけるカテプシ

ンL、ACPase活性、ED1の分布を比較検討した。その結果、実験的に歯の移動を行った時の歯根膜のカテプシンLを有する細胞は、基本的には生理的歯根膜と同様、主に線維芽細胞、破骨細胞、その他のマクロファージ系細胞であった。一般にWaldo法による歯の移動は傾斜移動であるために、今回観察した第二臼歯の歯根の移動方向は、歯頚部から歯根中央部にかけては生理的移動と同様に遠心方向であるが、根尖付近では逆転していると考えられる。そこで、4日間歯の移動を行ったときの分布については、生理的移動方向と同様に遠心移動している部位で検討を行った。その結果、歯根膜中のカテプシンLを有する単核細胞の数には近遠心的な差はほとんど認められないが、その数は根間中隔の近遠心ともに、生理的移動時の歯根膜の同一部位と比較すると増加していた。また、ACPase活性を有する単核細胞の数も増加していた。ED1を有する単核細胞の数がほとんど変化していないことから、これはマクロファージ系単核細胞の増加によるものではなく、線維芽細胞の増加によるものと考えられる。カテプシンLを有する細胞数の増加の理由のひとつとして、線維芽細胞によるコラーゲン細線維の貪食の活性化が考えられた。Rygh (1976)は実験的に歯を移動した時の歯根膜牽引側における、線維芽細胞によるコラーゲン細線維の取り込みを報告しているが、その細胞数の変化については明らかにされていない。Yee (1979)は24時間実験的に歯を移動した時の歯根膜牽引側で、細胞内にコラーゲン細線維を含む分裂細胞が増加することを報告している。圧迫側については、Hirashita et al. (1985) は、5、9日間実験的に歯を移動した時の硝子様変性組織周囲の歯根膜では、コラーゲン細線維を貪食している線維芽細胞の数は、生理的歯根膜よりも少数であることを報告している。本研究で実験的に歯を移動した時の歯根中央部の歯根膜では、生理的移動時と比べて、コラーゲン細線維を貪食している線維芽細胞の数にはっきりとした変化は認められなかっ

た。そのため、現時点では、カテプシンＬを有する単核細胞の増加を、コラーゲン細線維を貪食する線維芽細胞の増加あるいはコラーゲン貪食能の活性化によるものと考えるのは困難である。今回、実験的に歯を移動した時は、根間中隔近遠心の歯根膜に、ACPase活性を有する線維芽細胞が多数認められた。特に、生理的移動時にはほとんどACPase活性を示さなかった遠心根近心側（牽引側）の歯根膜にも、ACPase活性を有する線維芽細胞が多数認められ、Lilja (1983) により報告されているようなメカニカルストレスによる歯根膜線維芽細胞のACPaseの活性化が示唆された。ライソゾーム酵素の活性化にもカテプシンＬが重要であることを考えあわせると、カテプシンＬを有する単核細胞の増加は、歯根膜の改変にともなうライソゾーム酵素の活性化に関与することも考えられる。

本研究では、歯根膜では破骨細胞やマクロファージ系細胞の他に、線維芽細胞にカテプシンＢ，Ｌの局在が認められること、そのような線維芽細胞のコラーゲン含有ライソゾーム顆粒に一致してカテプシンＢ，Ｌの局在が認められることから、それらの酵素によるコラーゲンの細胞内分解が強く示唆された。また、カテプシンＬを有する線維芽細胞の分布から、歯根膜線維の改変は歯根膜の全層で行われているものの、破骨細胞周辺では活発であることが示唆された。さらに矯正力に反応して、ライソゾーム酵素の活性化も含めて歯根膜線維芽細胞による歯根膜の改変が活性化されることも示唆された。

今後の展望としては（１）カテプシンＬを有する細胞数の変化を検討するためのサンプル数をさらに増やすこと、（２）電子顕微鏡を用いて、実験的移動時の歯根膜線維芽細胞内におけるカテプシンＬの局在について検索をおこない、実験的移動時のカテプシンＬを有する線維芽細胞の増加について詳細に検討すること、（３）カテプシンＬを有する線維芽細胞と破骨細胞、その前駆細胞と

の関係をより詳細に検討するため、カテプシンKの局在についても併せて検討すること、（4）改変が比較的遅いため矯正治療後の後戻りの原因の一つとなっている歯間水平線維と歯根膜線維の相違について、カテプシンLを有する細胞の分布に注目して検索すること、また、（5）線維芽細胞がコラーゲンを貪食する際のコラーゲン線維の認識機構についても検索していきたいと考えている。

【謝辞】

稿を終えるに当たり、終始ご懇篤なご指導とご校閲を賜りました新潟大学歯学部口腔解剖学第一講座、小澤英浩教授と歯科矯正学講座、花田晃治教授に心より御礼申し上げます。

また、実験遂行、結果のまとめ及び原稿作成に当たり、多大なるご指導、ご鞭撻を賜りました新潟大学歯学部口腔解剖学第一講座、中村浩彰博士および入江一元博士に深謝いたします。

抗ラットカテプシンB，L抗体は、順天堂大学生化学第一講座、木南英紀教授よりご提供いただきました。心より御礼申し上げます。

【参考文献】

Anderson AA (1967) The protein matrixes of the teeth and periodontium in hamsters: A tritiated proline study. J Dent Res 46:67-78

Bando Y, Kominami E and Katunuma N (1986) Purification and tissue distribution of rat cathepsin L. J Biochem 100:35-42

Barrett AJ and Kirschke H (1980) Cathepsin B,cathepsin H,cathepsin L. Methods Enzymol 80:535-561

Beertsen W, Brekelmans M and Everts V (1978) The site of collagen resorption in the periodontal ligament of the rodent molar. Anat Rec 192:305-318

Bossard MJ, Tomaszek TA, Amegadzie BY, Hanning CR,Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH,Gowen M and Levy MA (1996) Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. J Biol Chem 271:12517-12524

Burleigh MC, Barrett AJ and Lazarus GS (1974) Cathepsin B1: A lysosomal enzyme that degrades native collagen. Biochem J 137:387-398

Burstone MS (1958) Histochemical demonstration of acid phosphatases with naphthol AS-phosphates. J Nat Cancer Inst 21:523-539

Crumley PJ (1964) Collagen formation in the normal and stressed periodontium. Periodontics 2:53-61

Deporter DA and Ten Cate AR (1973) Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts. J Anat 114:457-461

Diaz EA (1978) Periodontal ligament collagen response to tooth movement: Histochemical and autoradiographic reactions. Am J Orthod 73:443-458

Dijkstra CD, Dopp EA, Joling P and Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear pagocytes in lymphoid organs:distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1,ED2 and ED3. Immunology 54:589-599

Drake FH, Dodds RA, James IE, Connor JR, Debouck C, Richardson S, Lee-Rykaczewski E, Coleman L, Rieman D, Barthlow R, Hastings G and Gowen M (1996) Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. J Biol Chem 271: 12511-12516

Etherington DJ (1976) Bovine spleen cathepsin B1 and collagenolytic cathepsin. Biochem J 153:199-209

Evans P and Etherington DJ (1978) Characterisation of cathepsin B and collagenolytic cathepsin from human placenta. Eur J Biochem 83:87-97

Everts V, Aronson DC and Beertsen W (1985a) Phagocytosis of bone collagen by osteoclasts in two cases of pycnodysostosis. Calcif Tissue Int 37:25-31

Everts V, Beertsen W and Gutter WT (1985b) The digestion of phagocytosed collagen is inhibited by the proteinase inhibitors leupeptin and E-64. Collagen Rel Res 5 :315-336

Everts V, Beertsen W and Schroder R (1988) Effects of the proteinase inhibitors leupeptin and E-64 on osteoclastic bone resorption. Calcif Tissue Int 43:172-178

Everts V, Hembry RM, Reynolds JJ and Beertsen W (1989) Metalloproteinases are not involved in the phagocytosis of collagen fibrils by fibroblasts. Matrix 9:266-276

Everts V, Van Der Zee E, Creemers L and Beertsen W (1996) Phagocytosis and intracellular digestion of collagen,its role in turnover and remodelling. Histocem J 28:229-245

Fukuhara T (1995) 矯正力と組織変化.In:歯科矯正学入門,医歯薬出版.Inc Tokyo:118-134

Freezer SR and Sims MA (1987) A transmission electron-microscope stereological study of the blood vessels,oxytalan fibres and nerves of the mouse-molar periodontal ligament. Arch Oral Biol 32:407-412

Freeman E (1994) Periodontium. In: Ten Cate 口腔組織学 (edited by Ten Cate AR), 4th, 医歯薬出版. Inc Tokyo: 329-372

Garant PR (1976) Collagen resorption by fibroblasts.A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. J.Periodontl 47:380-390

Goldstein RH and Polgar P (1982) The effect and interaction of bradykinin and prostaglandins on protein and collagen production by lung fibroblasts. J Biol Chem 257:8630-8633

Goseki T, Shimizu N, Iwasawa T, Takiguchi H and Abiko Y (1996) Effects of in vitro cellular aging on alkaline phosphatase,cathepsin activities and collagen secretion of human periodontal ligament derived cells. Mechanisms Aging Development 91: 171-183

Graf FM and Strauli P (1983) Use of the avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) method for the localization of rabbit cathepsin B in cells and tissues. J Histochem Cytochem 31:803-810

Heersche JNM (1978) Mechanism of osteoclastic bone resorption: A new hypothesis. Calcif Tissue Res 26:81-84

Hirashita A, Noda K, Kaida K, Nakamura Y, Kuwabara Y (1985) Phagocytosis of collagen by fibroblasts incident to experimental tooth movement. Arch Histl Jap 48:149-158

Hiruma T (1989) 歯牙移動の生物学的メカニズム. In: 歯牙移動 (edited by Yogosawa F), 医歯薬出版. Inc Tokyo:1-15

Katunuma N (1992) 細胞内タンパク質分解の機構と調節. In: 細胞内タンパク質分解, 東京化学同人.Inc Tokyo:1-34

Kawahara I, Takano Y, Sato O, Maeda T and Kannari K (1992) Histochemical and immunohistochemical demonstration of macrophages and dedritic cells in the lingual periodontal ligament of rat incisors. Arch Histol Cytol 55:211-217

Kawahara I and Takano Y (1995) Segregated localization of immunocompetent cells and osteoclasts in the periodontal ligament of the rat molar. Arch Histol Cytol 58:345-355

Kirschke H, Kembhavi AA, Bohley P and Barrett AJ (1982) Action of rat liver cathepsin L on collagen and other substrates. Biochem J 201:367-372

Knowles GC, McKeown M, Sodek J and McCulloch CAG (1991) Mechanism of collagen phagocytosis by human gingival fibroblasts:importance of collagen structure in cell recognition and internalization. J Cell Science 98:551-558

Kominami E,Tsukahara T,Bando Y and Katunuma N (1985) Distribution of cathepsin B and H in rat tissues and peripheral blood cells. J Biochem 98:87-93

Kominami E, Ueno T, Muno D and Katunuma N (1991) The selective role of cathepsin B and D in the lysosomal degradation of endogenous and exogenous proteins. FEBS Lett 287:189-192

Lekic P and McCulloch CAG (1996) Periodontal ligament cell populations:The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. Anat Rec 245:327-341

Lilja E, Bjornestedt T and Lindskog S (1983) Cellilar enzyme activity associated with tissue degradation following orthodontic tooth movement in man. Scand J Dent Res 91:381-390

Maciewicz RA, Etherington DJ, Kos J and Turk V (1987) Collagenolytic cathepsins of rabbit spleen: A Kinetic analysis of collagen degradation and inhibition by chicken cystatin. Collagen Rel Res 7:295-304

Maciewicz RA and Etherington DJ (1988) A comparison of four cathepsins (B,L,N and S) with collagenolytic activity from rabbit spleen. Biochem J 256:433-440

Matsunaga Y, Saibara T, Kido H and Katunuma N (1993) Participation of cathepsin B in processing of antigen presentation to MHC class II. FEBS Let 324:325-330

Melcher AH and Correia MA (1971) Remodeling of periodontal ligament in erupting molars of mature rats. J Periodont Res 6:118-125

Mort JS, Poole AR and Decker RS (1981) Immunofluorescent localization of cathepsin B and D in human fibroblasts. J Histochem Cytochem 29:649-657

Nakagawa M, Kukita T, Nakasima A and Kurisu K (1994) Expression of the type I collagen gene in rat periodontal ligament during tooth movement as revealed by in situ hybridization. Archs oral Biol 39: 289-294

Nesbitt SA and Horton MA (1997) Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts. Science 276: 266-269

Ohsawa Y, Nitatori T, Higuchi S, Kominami E and Uchiyama Y (1993) Lysosomal cysteine and aspartic proteinases,acid phosphatase,and an endogenous cysteine proteinase inhibitor, cystatin-β, in rat osteoclasts. J Histochem Cytochem 41: 1075-1083

Ohshita T, Nikawa T, Towatari T and Katunuma N (1992) Effects of selective inhibition of cysteine proteinase on lysosomal proteolysis in rat liver in vivo and in vitro. Eur J Biochem 209: 223-231

Parakkal PF (1969) Involvement of macrophage in collagen resorption. J Cell Biol 41: 345-354

Punnonen EL, Autio S, Kaija H and Reunanen H (1993) Autophagic vacuoles fuse with the prelysosomal compartment in cultured rat fibroblasts. Eur J Cell Biol 61: 54-66

Perera KAS and Tonge CH (1981) Metabolic turnover of collagen in the mouse molar periodontal ligament during tooth eruption. J Anat 133: 359-370

Proffit WR (1986a) 歯科矯正学的諸問題の病因. In:プロフィトの現代歯科矯正学, クインテッセンス出版. Inc Tokyo: 94-119

Proffit WR (1986b) 矯正歯科治療の生物学的基礎.In:プロフィトの現代歯科矯正学,クインテッセンス出版. Inc Tokyo: 228-244

Rygh P (1976) Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. Am J Orthod 70: 269-281

Salo J, Lehenkari P, Mulari M, Metsikko K and Vaananen HK (1997) Removal of osteoclast bone resorption products by transcytosis. Science 276: 270-273

Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J and Davidovitch Z (1991) Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. Am J Dentofac Orthop 99: 2 26-40

Sicher H (1942) Tooth eruption:The axial movement of continuously growing teeth. J Dent Res 21: 201-210

Sodek J (1977) A comparision of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. Archs Oral Biol 22: 655-665

Sodek J and Ferrier JM (1988) Collagen remodeling in rat periodontal tissues:compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. Collagen Rel Res 1: 11-21

Stahl SS and Tonna EA (1977) H^3-proline study of aging periodontal ligament matrix formation:Comparision between matrices adjacent to either cemental or bone surfaces. J Periodontal Res 12: 318-322

Svoboda ELA, Shiga A and Deporter DA (1981) A stereologic analysis of collagen phagocytosis by fibroblasts in three soft connective tissues with differing rates of collagen turnover. Anat Rec 199: 473-480

Tanaka T, Tani T, Wakimoto Y, Noda K, Nakamura Y and Kuwahara Y (1994) Localization of cathepsin B activity in the rat's periodontal ligament incident to experimental tooth movement. 53rd. Annual Meeting of Japan Orthodontic Society Abstracts: 152

Ten Cate AR (1972) Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodeling. J Anat 112: 401-414

Ten Cate AR (1976) The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. Am J Orthod 69: 155-167

Ten Cate AR (1994a) Physiologic tooth movement : Eruption and shedding. In: Ten Cate 口腔組織学 (edited by Ten Cate AR), 4th, 医歯薬出版. Inc Tokyo: 373-404

Ten Cate AR (1994b) Fibroblast and its products. In: Ten Cate 口腔組織学(edited by Ten Cate AR), 4th, 医歯薬出版. Inc Tokyo: 93-115

Vaes G, Delaisse JM and Eeckhout Y (1992) Relative roles of collagenase and lysosomal cysteine-proteinases in bone resorption. Matrix Supplement 1: 383-388

Van der Zee E, Everts V, Hoeben K and Beertsen W (1995) Cytokines modulate phagocytosis and intracellular digestion of collagen fibrils by fibroblasts in rabbit periosteal explants.inverse effects on procollagenase production and collagen phagocytosis. J Cell Science 108: 3307-3315

Van Noorden CJF and Vogels IMC (1986) Enzyme histochemical reactions in unfixed and undecalcified cryostat sections of mouse knee joints with special reference to arthritic lesions. Histochem 86: 127-133

Van Noorden CJF, Vogels IMC, Everts V and Beertsen W (1987) Localization of cathepsin B activity in fibroblasts and chondrocytes by continuous monitoring of the formation of a final fluorescent reaction product using 5-nitrosalicylaldehyde. Histochem J 19: 483-487

Van Noorden CJF and Everts V (1991) Selective inhibition of cysteine proteinase by Z-Phe-AlaCH2F surpresses digestion of collagen by fibroblasts and osteoclasts. Biochem Biophys Res Commun 178: 178-184

Waldo CM (1953) Method for the study of response to tooth movement. J Dent Res 32: 690-691

Wang HM (1982) Detection of lysosomal enzymes derived from pig periodontal ligament fibroblasts and their ability to digest collagen fibrils and proteoglycan. Archs Oral Biol 27: 715-720

Yajima (1988) Localization of acid phosphatase activity in collagen-sedreting and collagen-resorbing fibroblasts. Histochem 90: 245-253

Yajima T,Matsuo A and Hirai T (1989) Collagen phagocytosis by cementoblasts at the periodomtal ligament-cementum interface. Arch Histol Cytol 52:521-528

Yee JA (1979) Responce of periodontal ligament cells to orthodontic force:Ultrastructural identification of proliferating.Anat Rec 194:603-614

【図説】

図１　連続切片で生理的に遠心移動している上顎臼歯歯根膜遠心側のカテプシンＢ，Ｌおよびed1の局在を免疫組織化学的に検出して比較した光学顕微鏡写真。

a:カテプシンＬの局在は、歯槽骨表面に認められる大型で多核の破骨細胞（ＯＣ）、歯根膜に多数認められる血管（Ｖ）の周囲に観察される単核細胞（矢印）、さらに歯根膜中に散在する多数の紡錘形単核細胞（矢頭）に認められた。

b:カテプシンＢの局在は、カテプシンＬと同様、歯槽骨表面の破骨細胞（ＯＣ）、血管（Ｖ）周囲の単核細胞（矢印）、歯根膜中に散在する多数の紡錘形単核細胞（矢頭）に認められた。

c,d:それぞれ図１a,bの連続切片。ED1の局在は、歯槽骨表面の破骨細胞（ＯＣ）と血管（Ｖ）周囲の単核細胞（矢印）に認められた。

倍率：X350　B:歯槽骨、R:歯根

図２　連続切片で生理的に遠心移動している上顎臼歯歯根膜遠心側のED1とTRAPase活性の局在を比較した光学顕微鏡写真。

a:ED1の局在は、歯槽骨表面の破骨細胞（ＯＣ）と単核細胞（矢印および矢頭）に認められた。

b:図２aの連続切片で検出したTRAPase活性。歯槽骨表面の破骨細胞（ＯＣ）と血管（Ｖ）周囲でED1と反応する単核細胞の一部（矢印）に活性が認められた。

倍率：X350　B:歯槽骨、R:歯根

図3　生理的に遠心移動している上顎臼歯歯根膜の線維芽細胞のコラーゲン細線維の貪食を示す電子顕微鏡写真。

a:歯根膜中にはER-Golgi系が発達した多数の線維芽細胞（ＦＢ）が認められた。そのなかにはコラーゲン細線維（黒枠）を取り込んでいるものも認められた。

b:歯槽骨近傍の線維芽細胞のなかにはコラーゲン細線維（矢印）を活発に取り込んでいるものも観察された。

c:aの黒枠の拡大。線維芽細胞内部に観察されたコラーゲン細線維（矢印）。

d:コラーゲン細線維（矢印）は細胞内部でライソゾーム顆粒（Ｌｙ）と融合していると思われる。

倍率：a. X5000　b. X20000　c. X18000 d. X28000

図4　生理的に遠心移動している上顎臼歯歯根膜の線維芽細胞におけるカテプシンＬ(a～d)およびＢ(e)の局在を示す電子顕微鏡写真。

a:歯根膜中の線維芽細胞（ＦＢ）のライソゾーム顆粒（矢印）にカテプシンＬの局在が認められる。

b～e:カテプシンＢ，Ｌを有するライソゾーム顆粒（Ｌｙ）とコラーゲン細線維の融合を示唆する電子顕微鏡写真。カテプシンを有するライソゾーム顆粒（Ｌｙ）の一部は線維芽細胞中に取り込まれたコラーゲン細線維（矢印）の近傍で認められるもの(b)、コラーゲン細線維に隣接するもの(c,e)、およびコラーゲン細線維を含むと思われるもの(d、aの黒枠の拡大）が観察された。

倍率：a. X5000　b. X26000　c. X23000　d. 25000　e. X24000　　V:血管

図5　生理的に遠心移動している上顎臼歯歯根膜のマクロファージと破骨細胞のカテプシンLの局在を示す電子顕微鏡写真。

a:歯根膜中の血管（V）周囲のマクロファージ（＊）内部にはカテプシンLを有する多数のライソゾーム顆粒（矢印）が認められた。細胞内にコラーゲン細線維を含むマクロファージは認められなかった。

b:歯槽骨表面の破骨細胞では細胞内部の小胞の一部（矢印）および骨表面に面した波状縁（ＲＢ）にカテプシンLの局在を示す反応が認められた。

倍率：a. X4000　b. X6000　B:歯槽骨

図6　生理的遠心移動時とWaldo法により4日間実験的に歯を移動した時の上顎第二臼歯根間中隔の歯根膜におけるカテプシンLの局在を示す光学顕微鏡写真。

a:生理的移動時の遠心根近心側（牽引側）のカテプシンLの局在。カテプシンLを有する単核細胞（矢印）は遠心根近心側（牽引側）歯根膜中に均等に分布していた。

b:生理的移動時の近心根遠心側（圧迫側）のカテプシンLの局在。カテプシンLを有する単核細胞（矢印）は歯根膜中に均等に分布していたが、歯槽骨の破骨細胞（ＯＣ）の近傍で密度が高くなる傾向が認められた。歯槽骨近傍を除くと、カテプシンLを有する単核細胞の分布に近遠心的な差は明確に認められなかった。

c:実験的移動時の遠心根近心側（牽引側）のカテプシンLの局在。カテプシンLの局在は歯根膜中にみられる多くの紡錘形単核細胞（矢印）の細胞質に認められた。

d:実験的移動時の近心根遠心側（圧迫側）のカテプシンLの局在。近心根遠心側（圧迫側）でも遠心根近心側（牽引側）同様多数の単核細胞（矢印）にカテプシンLが認められた。

倍率：X400　　B:歯槽骨、R:歯根

図7　生理的遠心移動時とWaldo法により4日間実験的に歯を移動した時の上顎第二臼歯根間中隔の歯根膜におけるACPase活性の局在を示す光学顕微鏡写真。

a:生理的移動時の遠心根近心側（牽引側）のACPase活性の局在。遠心根近心側（牽引側）では、ACPase活性を示す細胞はほとんど認められなかった。

b:生理的移動時の近心根遠心側（圧迫側）のACPase活性の局在。歯槽骨表面と破骨細胞（ＯＣ）に強いACPase活性が認められた。歯根膜中の多数の単核細胞（矢印）にもACPase活性が認められ、その分布は図6bで示す生理的移動時の近心根遠心側（圧迫側）のカテプシンＬの分布と同様であった。

c:実験的移動時の遠心根近心側（牽引側）のACPase活性の局在。近心根遠心側（圧迫側）同様、多数の紡錘形単核細胞（矢印）に点状のACPase活性が認められた。

d:実験的移動時の近心根遠心側（圧迫側）のACPase活性の局在。多数の紡錘形単核細胞（矢印）の細胞質では点状に、また一部の単核細胞（矢頭）では細胞質全体に強くACPase活性が認められた。

倍率：X400　　B:歯槽骨、R:歯根

図8　生理的移動時（Ｃ）及び実験的移動時（Ｅ）の歯根膜における各種単核細胞数の比較。歯根膜の歯根長軸方向の中間部1/3の100μmX200μmの領域に認められる細胞数をカウントした。

a:カテプシンＬを有する単核細胞の数。カテプシンＬを有する単核細胞の数は、生理的移動時、実験的移動時ともに近心根遠心側（圧迫側）と遠心根近心側（牽引側）の差はほとんど認められないが、生理的移動時と比較して、実験的移動時では増加する傾向にあった。

b:ACPase活性を有する単核細胞の数。ACPase活性を有する単核細胞の数は、生理的移動時では近心根遠心側（圧迫側）において多数で、図8aに示すカテプシンＬを有

する単核細胞の数と同程度であったが、遠心根近心側（牽引側）では少数であった。実験的移動時では根間中隔の両側ともにACPase活性を有する細胞の数は増加し、遠心根近心側（牽引側）も近心根遠心側（圧迫側）と同程度であった。

c:ED1陽性単核細胞の数。ED1陽性単核細胞の数は生理的移動時では根間中隔の両側ともに少数で、生理的移動時と実験的移動時の比較でも明確な変化は認められなかった。

縦軸:細胞数（個）、D:近心根遠心側（圧迫側）、M:遠心根近心側（牽引側）、C:生理的移動時、E:実験的移動時

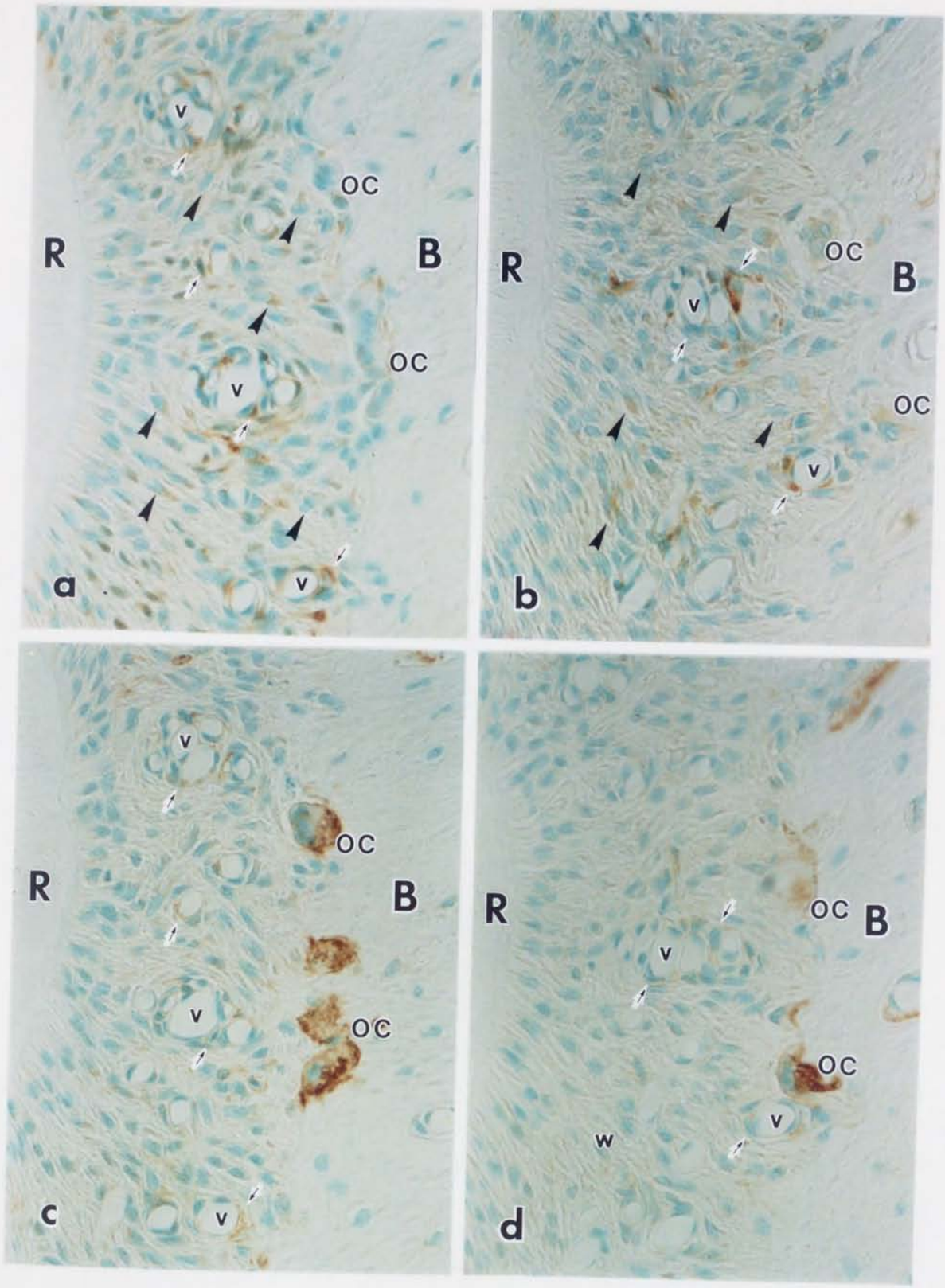


図 1

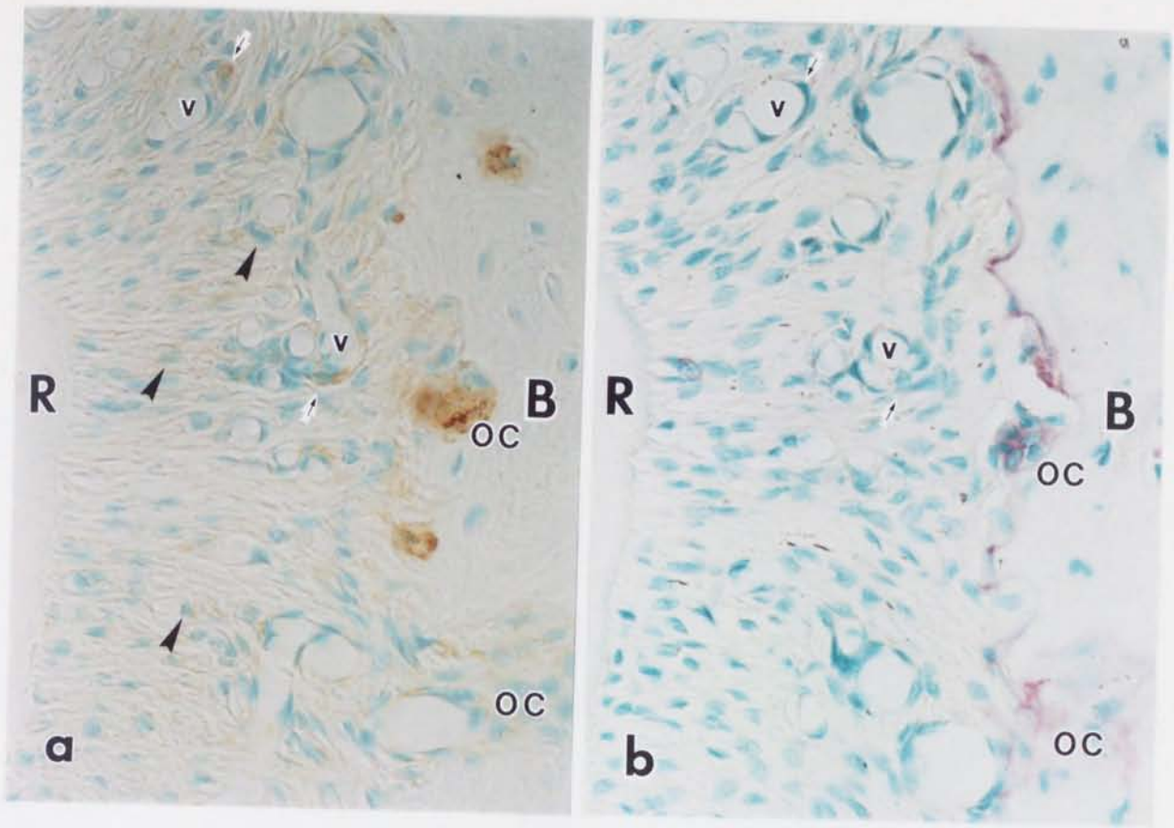


図 2

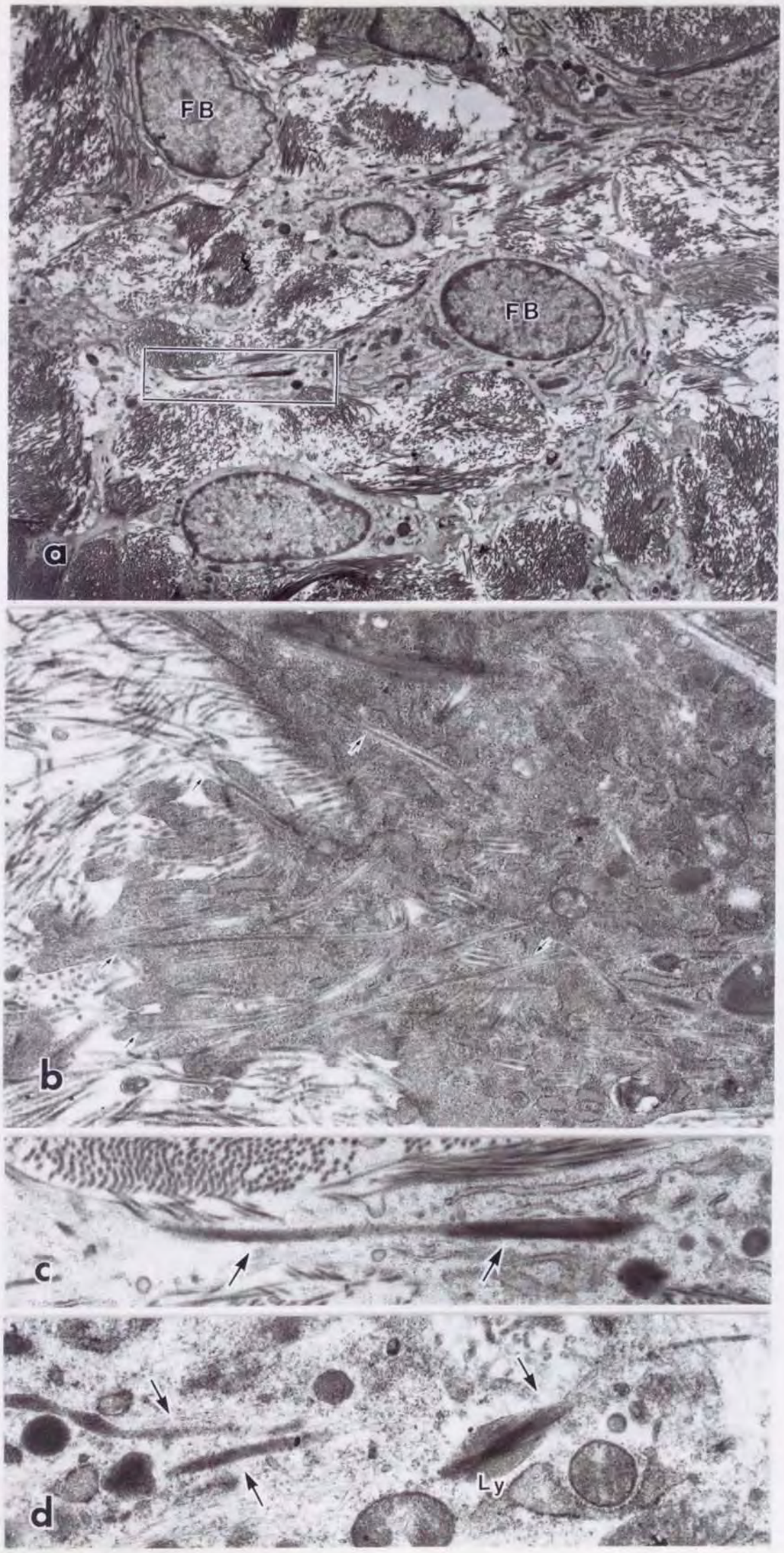


図 3

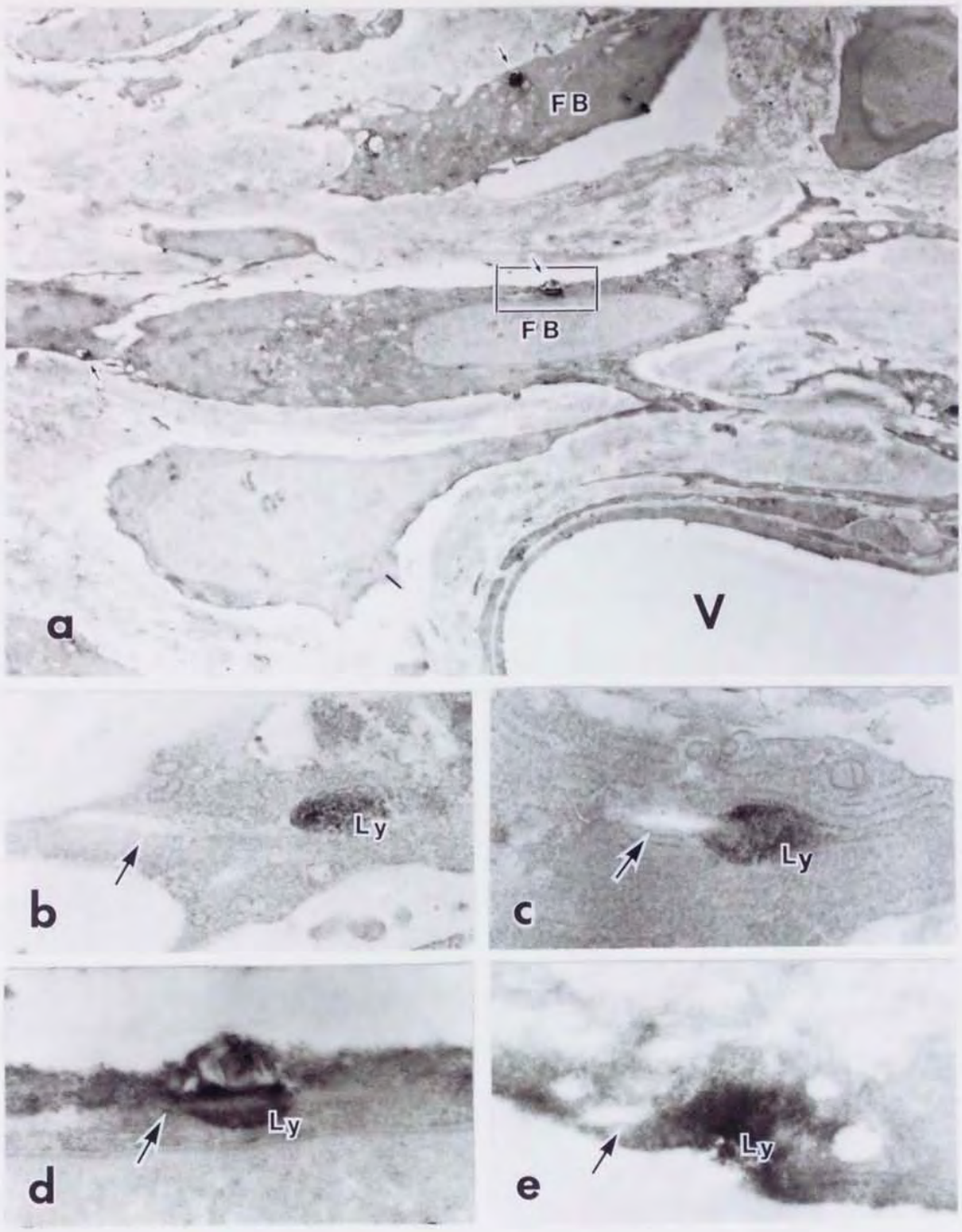


図 4

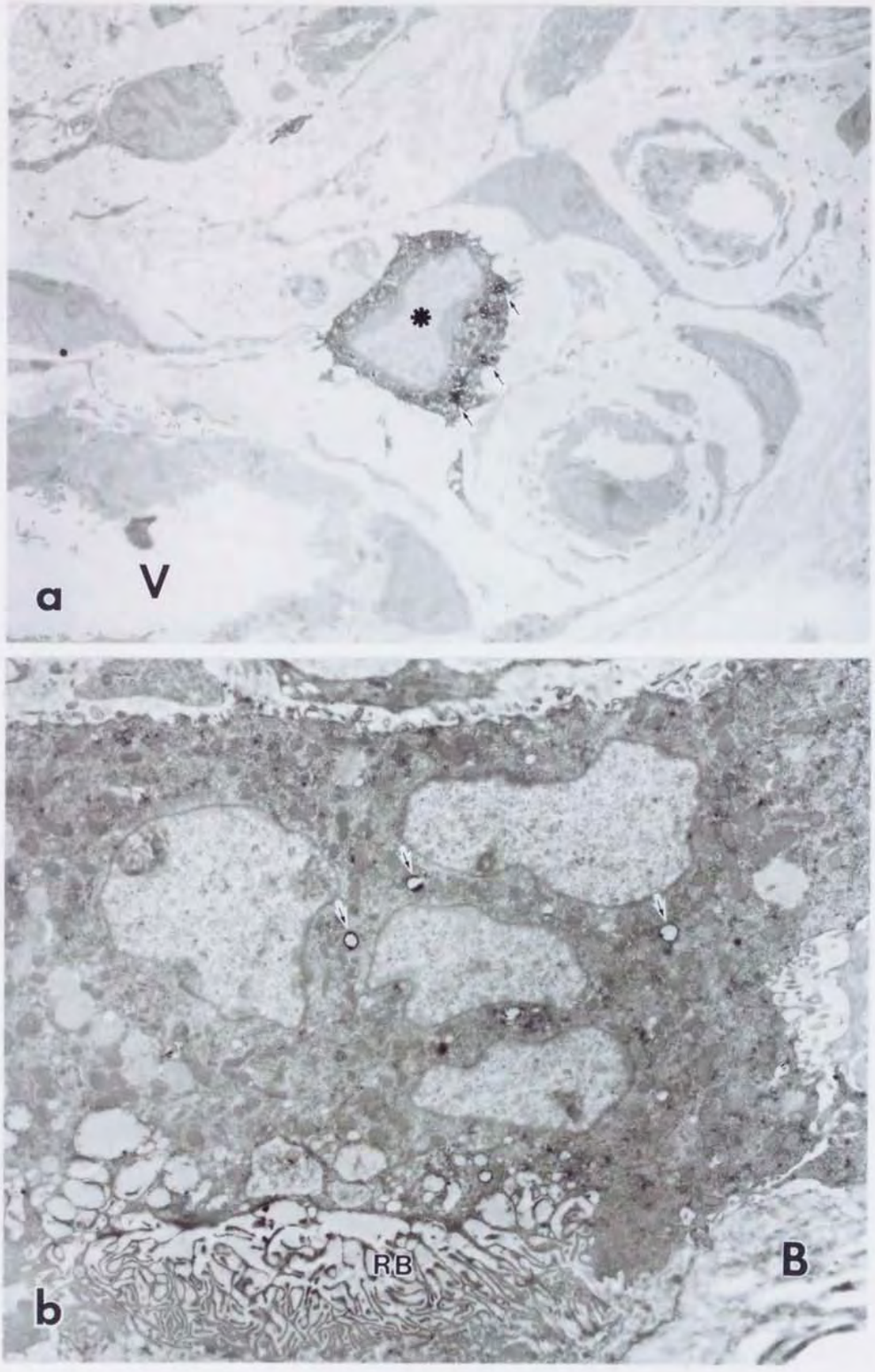


図 5

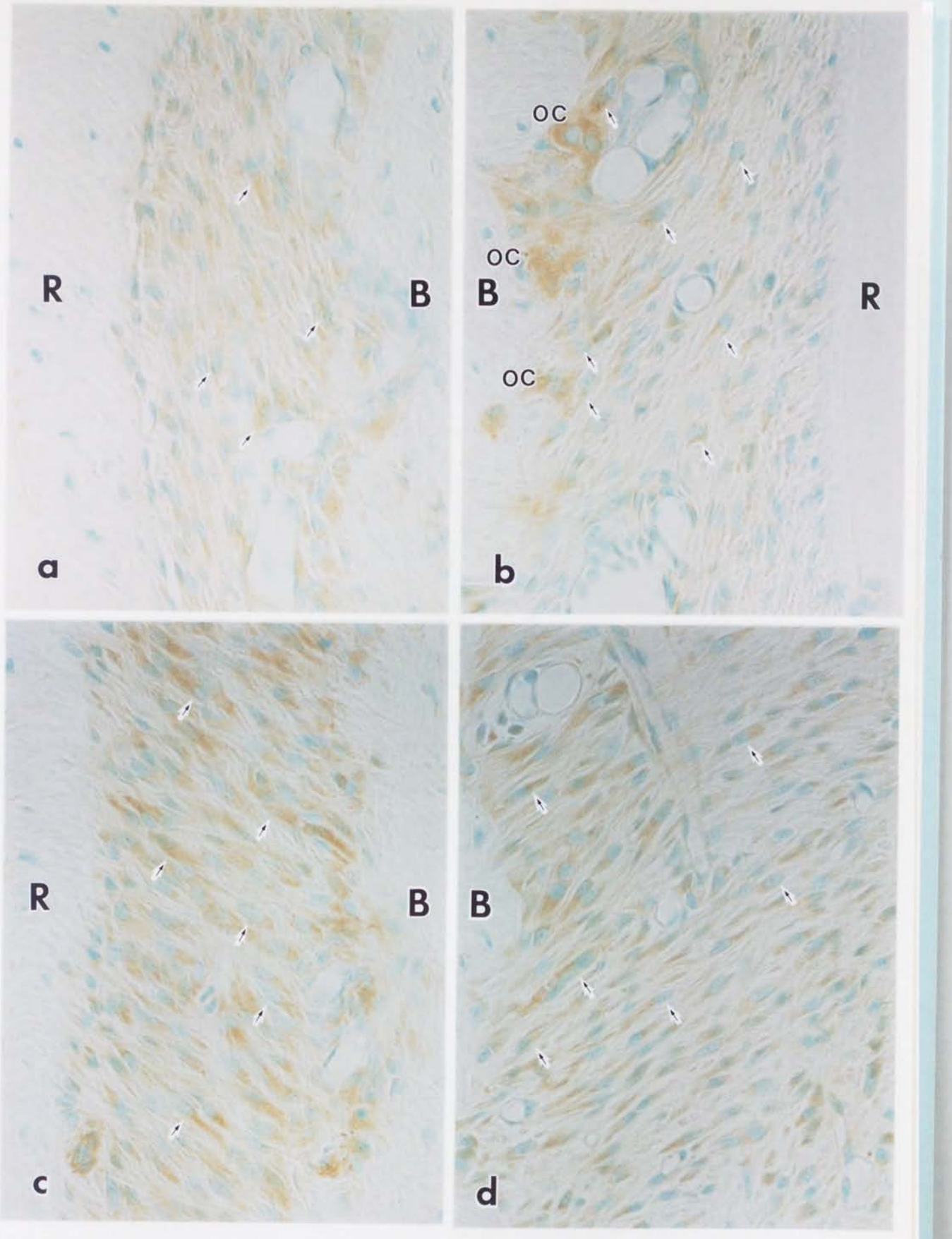


図 6

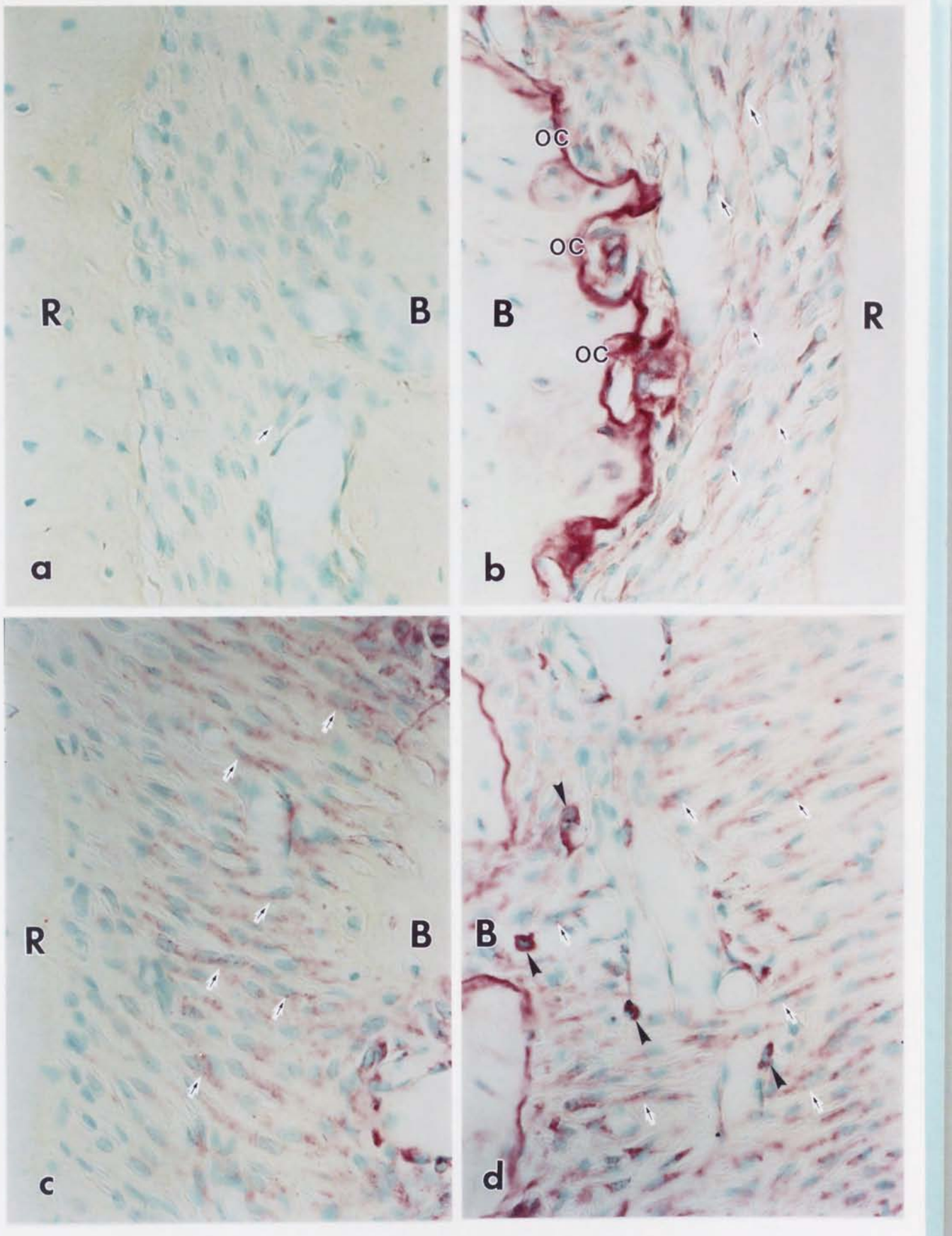


図 7

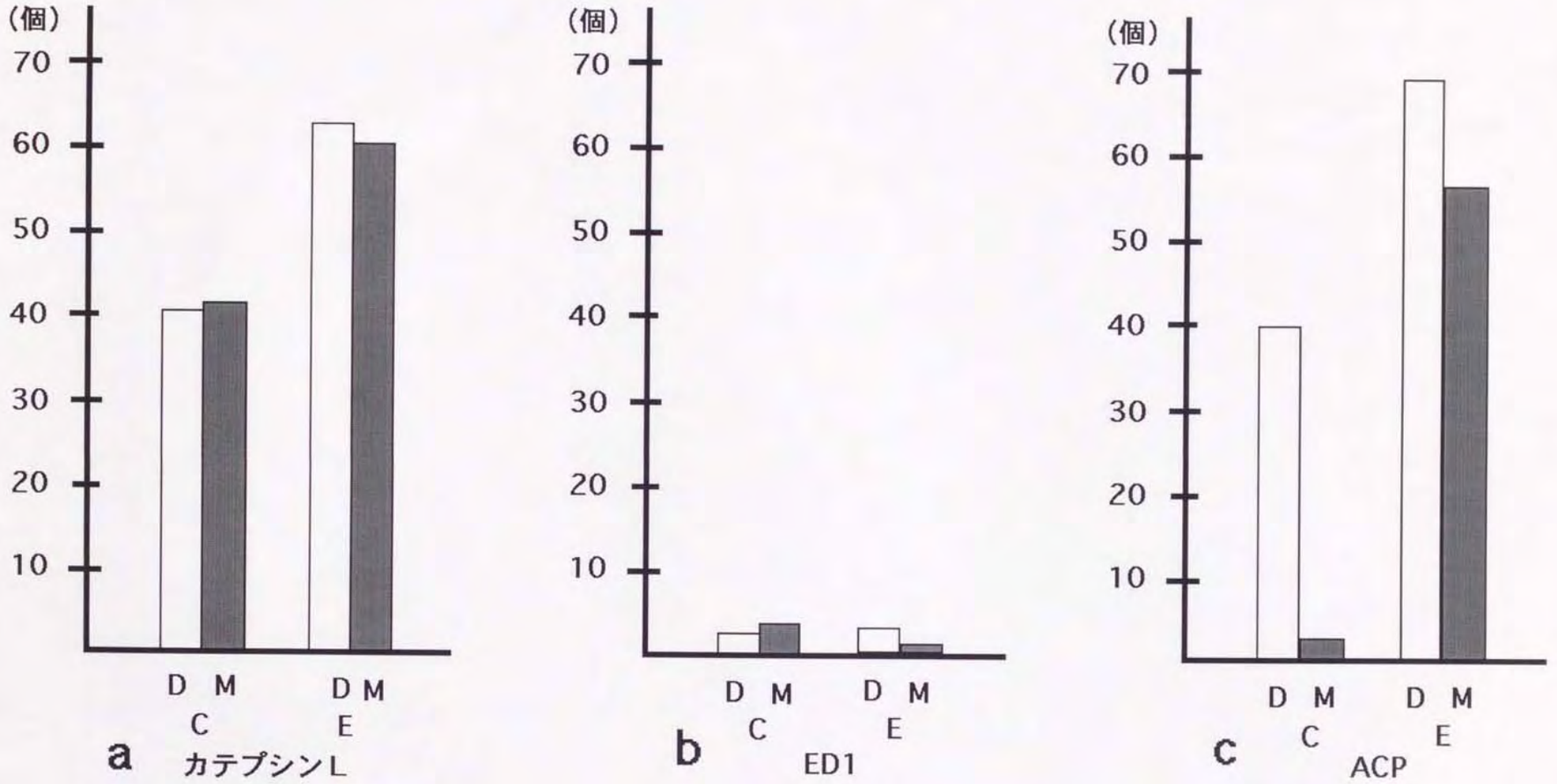

(個)
70
60
50
40
30
20
10
D M
C
D M
E
a
カテプシンL
(個)
70
60
50
40
30
20
10
D M
C
D M
E
b
ED1
(個)
70
60
50
40
30
20
10
D M
C
D M
E
c
ACP

図 8