

学位研究紹介
--------

## ラット切歯歯根膜ルフィニ神経終末におけるカルレチニンの生後発現。Protein gene product 9.5(PGP9.5)免疫染色結果との比較

### Postnatal expression of calretinin-immunoreactivity in the periodontal Ruffini endings in the rat incisor.

### A comparison with protein gene product 9.5(PGP9.5)-immunoreactivity.

新潟大学歯学部歯科矯正学講座

朝日藤 寿一

Department of Orthodontics,

Faculty of Dentistry, Niigata University

Toshikazu Asahito

歯根膜には咀嚼運動の感覚入力系として機能する機械受容器が豊富に存在している。歯根膜機械受容器としては低域値遅順応性伸展受容器であるルフィニ神経終末が重要である。歯根膜ルフィニ神経終末の発達過程は不明な点が多く残されていたが、我々の研究グループは神経特異タンパクの一つであるprotein gene product 9.5 (PGP9.5)の免疫染色を用いて歯根膜ルフィニ神経終末の生後発達過程を明らかにしている。

近年、機械受容機構にCa<sup>2+</sup>が重要な役割を果たしていることが示され、さらにCa<sup>2+</sup>と高い親和性で結合するカルシウム結合タンパクの一つであるカルレチニン(calretinin, CR)が成熟ラット歯根膜ルフィニ神経終末の軸索終末に豊富に含まれていることが明らかにされた。また、我々の下歯槽神経切断実験の結果からもCRの免疫組織化学は機械受容能の回復過程を検討するのに有用なマーカーであることが明らかにされている。

本研究ではCRとすべての神経要素のマーカーであるPGP9.5の免疫組織化学的手法を用い、ラット舌側歯根膜ルフィニ神経終末の生後発達過程を検討した。さらに画像解析法を用いて生後発達過程における両免疫陽性神経の量的変化を検討した。

材料として生後1日、4日、7-11日(切歯萌出開始期)、15-18日(切歯咬合開始期)、24-26日(第一臼歯咬合開始期)、60-80日(機能的咬合期)のWistar系ラットを用いた。アルデヒド系固定液にて灌流固定後、上顎を取り出し10%EDTA溶液にて脱灰後、40 μmの凍結切片を

作成した。免疫染色はABC法にて、浮遊切片の状態で行った。一次抗体として抗CRポリクロナール抗体(5000倍希釈)、抗PGP9.5ポリクロナール抗体(10000倍希釈)を用い、メチレンブルーにて対比染色を行った。免疫染色した切片の画像をコンピューターに取り込み、画像処理後、特定部位の歯根膜の面積に対する免疫陽性神経の面積比を測定した。各日齢におけるPGP9.5とCR免疫陽性面積の差の検定にStudent's t検定を、各陽性面積の生後変化についてはFisherのPLSD testを用いた。

ラット上顎切歯歯根膜には生後1日目にすでにPGP9.5, CR陽性神経ともに認められたが、それらはいずれも細く、数珠状を呈していた。生後4日目ではPGP9.5陽性ルフィニ神経終末が観察され始めたが、CR陽性を示す樹枝状の神経終末は認められなかった。切歯が萌出を開始する生後7-11日目になると、成熟ラットで観察される成熟PGP 9.5陽性ルフィニ神経終末が認められ始めたが、CR陽性神経は少なく、ルフィニ神経終末を形成しておらず細い樹枝状終末のままであった。切歯咬合期の生後15-18日目になるとPGP9.5陽性ルフィニ神経終末数はさらに増加し、また軸索終末も太くなり成熟化が進行していたのに対し、この時期でもCR陽性を示すルフィニ神経終末は認められなかった。第一臼歯が咬合を開始する24-26日目になるとルフィニ神経終末はCR陽性を示すようになり、機能的咬合を営む60-80日目になるとCR陽性ルフィニ神経終末はその数、密度ともに増加していた。しかしながら、PGP9.5陽性ルフィニ神経終末の数より少なかった。結果は定量的画像解析法の結果からも確認された。(Fig 1)

各日齢でPGP9.5陽性面積はCR陽性面積よりも有意に大きかった。このことはCRの免疫染色ではtype 1のルフィニ神経終末が描出されるのに対し、PGP9.5抗体はtype1, type2のルフィニ神経終末を含め、すべての神経線維を認識することから生ずると考えられた。また生後7-11日目のPGP9.5陽性神経が占める面積は4日目のものよりも有意に大きく、萌出力や咬合力の付加がルフィニ神経終末の増加に関与していることが示された。さらに生後60-80日目のCR陽性神経の面積は24-26日目のものよりも有意に大きく、機能咬合の確立とルフィニ神経終末の成熟化には密接な関係があることが示された。これらPGP9.5およびCR免疫反応の出現の相違は歯根膜ルフィニ神経終末機能成熟が形態形成の終了後におこることを示唆している。

(Archives of Histology and Cytology 62:57-69,1999. T.Aashito et al)

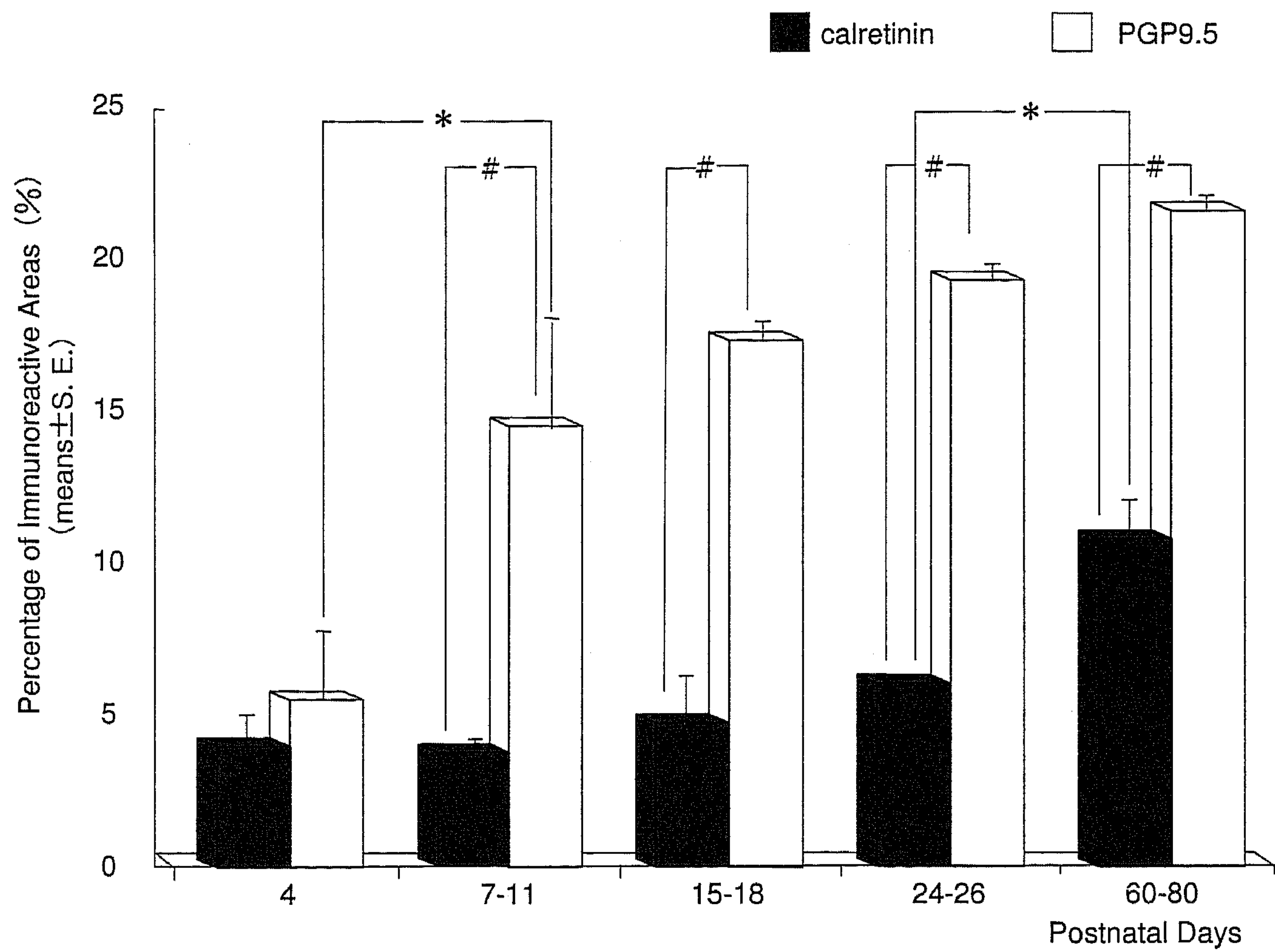


Fig 1

CRおよびPGP9.5陽性神経の生後発達過程における量的変化。

生後4日齢をのぞきPGP9.5陽性神経の割合はCR陽性神経に比べ有意に大きかった (# $p < 0.05$ ; unpaired Student's t-test) PGP9.5陽性神経は生後4日齢と7-11日齢間で、CR陽性神経は24-26日齢と60-80日齢間で量的変化に有意差が認められた (\* $p < 0.05$ ; Fisher's PLSDtest)