



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	成長期における液状飼料摂取がラット歯根膜およびセメント質に与える影響
Author(s)	中道, 祥之
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第15961号
Issue Date	2024-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15961
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/92432
Type	doctoral thesis
File Information	Yoshiyuki_Nakamichi.pdf



博士論文

成長期における液状飼料摂取が
ラット歯根膜およびセメント質に与える影響

令和6年3月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

中道祥之

緒言

現代の食生活では軟らかい食物を摂取する機会が増えてきており、特に成長期ではその傾向が顕著である。このような食生活は口腔周囲組織の成長に何らかの影響を及ぼすのではないかと懸念され、成長期の動物に液状飼料などの軟食を与える研究が行われてきた¹⁻¹³⁾。その結果、軟食で飼育された動物では固形飼料で飼育された動物と比較し顎骨の縮小¹⁻⁵⁾、咬筋の質量および筋線維数の減少⁶⁻⁸⁾、下顎頭の発育障害^{9,10)}などが引き起こされることが明らかになっている。

歯根膜とセメント質は歯周組織を構成する要素であり、全体として咬合力や回転の力などに耐え、歯の固定を営んでいる組織である¹⁴⁾。それゆえ、歯根膜やセメント質の健全な発育は歯科臨床において大切であり、軟食摂取が歯根膜やセメント質の発育に及ぼす影響を解明することは重要である。Stahl ら¹¹⁾は液状飼料を摂取した若年ラットの臼歯歯根膜を組織計量学的に解析し、歯根膜腔が狭窄すると初めて報告した。粉末飼料で成長期ラットを飼育し、組織計量学的解析を行った Kuroiwa ら¹²⁾も同様の結果を報告している。また、X線的に解析した Bresin ら¹³⁾によると頬側の歯根膜腔で狭小化がみられるという。これらの先行研究から考えると、成長期において軟食摂取は歯根膜に悪影響を及ぼすことで一致しているが、歯根膜内の細胞に及ぼす影響については明らかでない。一方、セメント質に関する先行研究は極めて少なく、Kuroiwa ら¹²⁾の報告があるのみである。それによると、粉末飼料を摂取したラットの有細胞セメント質は固形飼料を摂取したラットより薄いという。いずれにせよ、軟食摂取が歯根膜やセメント質の成長に与える影響に関しては先行研究が少なく不明な点が多く残されている。

そこで本研究では成長期ラットを液状飼料で飼育し、組織学的、組織計量学および免疫組織化学的に検索することで、液状飼料摂取が歯根膜とセメント

質の発育にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。

材料と方法

1. 動物実験

生後 14 日齢の Wistar 系雄性ラット 36 匹を母親と一緒に搬入し、7 日後に離乳させ対照群と実験群に分けた。対照群には固形飼料 (CLEA Rodent Diet CA-1, 日本クレア, Japan) を 1 匹につき 15~25g 与えた。実験群には同量の同飼料を粉末化したものを水道水と 1:2 の質量比で練和した液状飼料を与えた。これらを 0, 1, 2, 4, 8 週間飼育し、各群各期間の動物は 4 匹ずつとした。実験中は毎日動物の体重を測定し、目視で健康状態を観察した。各飼育期間終了後、増殖細胞マーカーである 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) (2.5 mg/体重 100 g) を腹腔内投与し、1 時間後にペントバルビタールナトリウムの腹腔内投与による全身麻酔下に、4 %パラホルムアルデヒド/0.1M リン酸バッファー (pH 7.4) 溶液にて灌流固定を行った。摘出した頭部から下顎骨を除去した上顎複合体を同固定液にて 24 時間浸漬固定し、10%EDTA 溶液を用いて 4~8 週間脱灰を行った。

本実験は北海道大学動物実験委員会による承認 (動物実験計画承認番号第 21-0025 号) を受け、「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規約 (平成 19 年 4 月 1 日 海大達第 61 号)」に基づき行った。

2. 組織学的検索

脱灰終了後、上顎複合体を正中断し、左側を通法に従ってパラフィン包埋した。パラフィンプロックを正中断面から外側方向へ向かって薄切し、上顎左側第一臼歯近心根の 4 μm の矢状断切片を作製した (図 1)。その際には、第一臼

歯のその他の歯根や第二，第三臼歯の位置関係を基準に，切片にずれや傾きがないかを常に確認しながら薄切を行った．作製した切片にはヘマトキシリン・エオジン（HE）染色あるいはアザン染色を施し，組織学的観察を行った．

3. 組織計量学的検索

液状飼料摂取が歯根膜とセメント質に与える影響を定量的に解析するために HE 染色標本を用いて組織計量を行った．

1) 歯根膜

上顎左側第一臼歯近心根周囲の歯根膜を図 2-1 に示すように近心歯冠側，近心根尖側，根尖部，遠心根尖側，遠心歯冠側の 5 つの部位に分け，それぞれの部位において歯根膜の幅と面積を測定した．

2) 有細胞セメント質

同歯根の有細胞セメント質の厚さ，上端から下端までの長さ，面積を近遠心側のそれぞれで測定した（図 2-2）．

4. 免疫組織化学的検索

脱パラフィンした切片に対して，0.3%過酸化水素/メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ処置を 10 分間行った．その後，37°C で 0.1%トリプシン溶液により抗原賦活化処理を行ったのち，3N HCl 処理を 10 分間行った．次に，1 次抗体として，50 倍希釈抗 BrdU マウスモノクローナル抗体（M0744，DaoCytomation，Denmark）を 120 分間，2 次抗体として，200 倍希釈ビオチン標識抗マウス・ウサギポリクローナル抗体（M0413，DakoCytomation）を 60 分間，ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン（ニチレイバイオサイレンス，Japan）を 30 分間順に反応させた．3，3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩にて陽性部位の発色操作を行い，ヘマトキシリンで核染色を行った．BrdU 陽性歯根膜細

胞数を歯根膜の組織計量学的検索で設定した 5 つの部位に分けてカウントし単位面積 (mm^2) あたりの陽性細胞数の平均値を算出した。

また、陰性コントロールとして 1 次抗体をリン酸緩衝生理食塩水に置き換えて同様に染色した。

5. 統計学的分析

体重、各組織計量項目、単位面積あたりの BrdU 陽性細胞数について対照群と実験群の間において Mann-Whitney U 検定を用いて有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

1. 体重と健康状態

対照群、実験群ともに体重は経時的に増加し、両群間に有意差は認められなかった (図 3)。各飼育期間においてすべてのラットに下痢や嘔吐などの症状はみられず健康状態に問題はなかった。

2. 組織学的・組織計量学的検索

1) 歯根膜

0 週の HE 染色標本においては歯根膜に豊富な線維がみられ、規則的に配列していた (図 4a)。これらの線維は、アザン染色標本では鮮青色を呈していた (図 4d)。歯根膜中には、紡錘形の線維芽細胞が密に分布しており、歯槽骨に近い部位には脈管組織、骨芽細胞および破骨細胞が散見された。対照群 1～8 週においても概ね同様の所見がみられ、歯根膜の幅に経時的な変化はなくほぼ一定であった (図 4b, e)。一方実験群においても 1～8 週で同様の所見が認め

られ、対照群と比較して明らかな組織学的な差異はみられなかった（図 4c, f）. 歯根膜の幅と面積の計測を行ったところ、いずれの部位、期間においても両群間に有意差は認められなかった（図 5, 6）

2) 有細胞セメント質

0 週において有細胞セメント質はみられなかった. 対照群では近心側で 2 週、遠心側で 1 週以降、ともに根尖側約 1/3 の歯根表面に有細胞セメント質が認められた（図 7a）. 有細胞セメント質は近心側、遠心側ともに経時的に増加していき、8 週では根尖側約 1/2 の歯根表面まで増加した（図 7c）. 実験群においても、対照群と同時期に有細胞セメント質の添加が確認できた（図 7b）. 実験群の有細胞セメント質も経時的に増加していったが、対照群と比較して少なかった（図 7d）. 組織計量学的解析では、厚さに関しては両群間に有意差は認められなかった（図 8a, d）. 一方、上端から下端までの長さでは 2 週から 8 週（図 8b, e）、面積では 4 週と 8 週（図 8c, f）において実験群の方が対照群と比較して有意に小さい値を示している部位がみられた.

3. 免疫組織化学的検索

BrdU 陽性を示す歯根膜細胞は 0 週で大変多くみられた（図 9a）. 以後、対照群、実験群ともに経時的に減少していった. 1～2 週では対照群の陽性細胞は実験群の陽性細胞と比較して多く認められた（図 9b, c）が、4～8 週においては染色像にほとんど違いはなかった（図 9d, e）. 単位面積あたりの BrdU 陽性細胞数は、1 週（近心歯冠側・近心根尖側・遠心歯冠側）および 2 週（近心歯冠側・根尖部・遠心根尖側・遠心歯冠側）において対照群と比較して実験群は有意に少なかった（図 10）.

陰性コントロール標本には陽性反応は認められなかった.

考察

軟食摂取が口腔周囲組織に与える影響を調べるために、動物を使用した数多くの研究が行われてきた¹⁻¹³⁾。これらの研究では軟食（粉末飼料と水を練和した液状飼料，ゲル状飼料，あるいは粉末飼料）で飼育された動物と固形飼料で飼育された動物の間に体重差は認められず，実験中の健康状態も問題ないとされており^{1, 3, 4, 10-13)}，軟食摂取は全身状態に影響を及ぼさないと考えられている。本研究でも同様に，体重は両群間で有意差はなく健康状態も問題はなかった。したがって本研究の実験群にみられる変化は全身状態による間接的な影響ではなく，液状飼料摂取による直接的な影響であると考えることができる。

これまでの軟食摂取が歯根膜に与える影響を検索した研究では，組織計量学的に検索した Stahl ら¹¹⁾ や kuroiwa ら¹²⁾ が固形飼料を摂取させたラットに比べて歯根膜腔が狭窄したと述べている。また，X 線的に解析した Bresin ら¹³⁾ によると頬側の歯根膜腔で狭小化がみられるという。一方，本研究では実験群の歯根膜腔の機能的な線維配列が維持され，歯根膜の幅や面積は対照群と違いは認められなかった。このように先行研究と本研究の結果は異なっていると考えられるが，その理由は観察部位の違いによるのかもしれない。なぜならば，先行研究では下顎臼歯を対象としているのに対して本研究では上顎臼歯を対象としているからである。類似の現象は顎骨においても認められている。Shimizu ら³⁾ はゲル状飼料をラットに与えた際の顎骨量を検索し，上顎骨よりも下顎骨の方が有意に減少したと報告している。以上のことを考え合わせると軟食飼料摂取によって引き起こされる影響は上顎よりも下顎で強く起こりやすいのかもしれない。

本研究では液状飼料摂取が歯根膜に及ぼす組織学的影響はみられなかったが，液状飼料開始初期において歯根膜細胞の増殖活性低下が認められた。この

結果は液状飼料摂取による咬合力の減少が発育期間における歯根膜細胞の増殖や更新に悪影響を及ぼすことを示唆している。類似の結果は *in vitro* の実験においても報告されている。木津喜¹⁵⁾ は咬合喪失させたラット上顎第一臼歯から分離した歯根膜細胞を培養し、BrdU 免疫染色を行ったところ陽性細胞率は減少すると述べている。これらを考えあわせると、咬合力が健全な歯根膜の成長や維持に重要な役割を行っていると思われる。

先行研究において粉末飼料で飼育した成長期ラットの有細胞セメント質の厚さは経時的に増加するものの、その増加度は固形飼料で飼育されたラットよりも弱いと報告されている³⁾。また、咬合喪失させた歯では有細胞セメント質の菲薄化が起こるとされており¹⁶⁻¹⁹⁾、これらのことは本研究において、実験群の有細胞セメント質は対照群に比べてその形成が抑制される傾向が認められたことと一致している。すなわち、有細胞セメント質形成には咬合力が少なからず影響しているということである。そのメカニズムの詳細は本研究の結果だけでは明らかではないが、可能性として2つの要因が考えられる。1つは、セメント芽細胞のセメント質形成能の低下である。Narita ら²⁰⁾ は機械的負荷の減少がセメント芽細胞のセメント質形成を抑制すると報告しており、Hirashima ら²¹⁾ はセメント質－歯根膜－歯槽骨のネットワーク間で機械的負荷に応じて石灰化の調節が行われていると述べている。したがって、本研究でも液状飼料の継続的摂取による機械的負荷の減少がセメント芽細胞の活性に影響を与えたのかもしれない。もう1つはセメント芽細胞の増殖抑制である。本研究では実験群において歯根膜細胞の増殖活性低下が認められた。歯根膜細胞にはセメント芽細胞の前駆細胞である未分化間葉細胞が含まれている²²⁻²⁴⁾ ことから、成長期における有細胞セメント質形成に必要なセメント芽細胞の供給が数的に不足したのかもしれない。

本研究では、成長期における液状飼料摂取が及ぼす影響を歯根膜とセメント

質を対象として解析した。これらの組織と密接に関連すると考えられるのが歯槽骨である。これまでの先行研究では、成長期における軟食摂取によって歯槽骨の成長は阻害されることが明らかとなっている¹⁻⁵⁾。これには、歯根膜中のALP活性の上昇やオステオポンチン等の骨基質タンパクが歯槽骨の石灰化を調節することが関連していると考えられているが²⁵⁾、先行研究が少なく詳細については不明な点が多く残されている。そこで、我々は液状飼料摂取が歯槽骨に及ぼす成長阻害のメカニズムについて、今後解明していきたいと考える。

結論

本研究の結論として成長期ラットにおける液状飼料摂取は歯根膜細胞の増殖活性を低下させることに加えて、有細胞セメント質の形成を抑制することが明らかとなった。このことは成長期に軟らかい食事を好んで摂ることは歯周組織の発育に好ましくない影響を与えることを示唆しており、子供たちによく噛んで食べることの重要性を提唱する科学的な根拠の1つになり得ると考えられる。

参考文献

- 1) 首藤洋治：顎骨の成長に関するX線的, 光顕的ならびに走査電顕的研究—食物の硬軟による歯槽骨の変化. 九州歯会誌, 46 : 574-595, 1992.
- 2) 酒井秀彰：成長期ラットにおける各種硬度の飼料摂取による咀嚼筋の組織学的変化および下顎骨の形態計測学的変化. 日矯歯誌, 51 : 126-141, 1992.
- 3) Shimizu Y, Ishida T, Hosomichi J, Kaneko S, Hatano K, Ono T : Soft diet causes greater alveolar osteopenia in the mandible than in the maxilla. Arch Oral Biol 58 : 907-911, 2013.
- 4) Abed S G, Buschan H P, R, Taylor R, Hinton J R : Maturational and functional related differences in rat craniofacial growth. Arch Oral Biol 52 : 1018-1025, 2007
- 5) Kingsmill J. Boyde1A, Davis R, Howell T, Rawlinson S : Changes in Bone Mineral and Matrix in Response to a Soft Diet. J Dent Res 89 : 510-514, 2010.
- 6) Kiliaridis S, Engstrom C, Thilander B: Histochemical analysis of masticatory muscle in the growing rat after prolonged alteration in the consistency of the diet. Arch Oral Biol 33 : 187-193, 1988.
- 7) Miehle B, Fanghanel J, Kubein-Meesenburg D, Nagerl H, Schwestka-Polly R: Masticatory musculature under altered occlusal relationships-a model study with experimental animals. Ann Anat 181 : 37-40, 1999.
- 8) Kitagawa Y, Mitera K, Ogasawara T, Nojyo Y, Miyauchi K, Sano K: Alterations in enzyme histochemical characteristics of the masseter muscle caused by long-term

- soft-diet in growing rabbits. *Oral Dis* 10 : 271-276, 2004.
- 9) Kiliaridis S, Thilander B, Kjellberg H, Topouzelis N, Zafiriadis A: Effect of low masticatory function on condylar growth: A morphometric study in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 116 : 121-125, 1999.
- 10) Kato T, Takahashi S, Domon T : Effects of a liquid diet on the temporomandibular joint of growing rats. *Med Princ Pract* 24 : 257-262, 2015.
- 11) Stahl S S, Dreizen S : The adaptation of the rat periodontium to prolonged feeding of pellet, powder and liquid diets. *J Periodontol* 35 : 312–319, 1964.
- 12) Kuroiwa M, Higashi S : Effect of dietary consistency on body weight and the periodontium in rats. *Showa Univ J Med Sci* 7 : 201-205, 1995.
- 13) Bresin A, Kiliaridis S. Effects of occlusal strain on the development of the dentoalveolar process in the growing rat: A morphometric study. *Eur J Exp Musculoskelet Res* 3 : 112–122, 1994.
- 14) Yamamoto T, Hasegawa T, Yamamoto T, Hongo H, Amizuka N : Histology of human cementum: Its structure, function, and development. *Jpn Dent Sci Rev* 52 : 63–74, 2016.
- 15) 木津喜裕子 : 咬合機能喪失が歯根膜の組織構造と細胞活性に及ぼす影響. *口病誌*, 76 : 91-99, 2009.
- 16) 高木勇蔵, 赤川安正, 浜田重光, 玉川博, 佐藤隆志, 津留宏道 : 咬合接触の喪失に伴う歯の支持組織の変化に関する実験的研究. *補綴誌*, 22 : 71-78, 1978.

- 17) 秋吉正豊：歯周組織の支持構造の生物学的特徴。鶴見歯学，9：1-9，1983.
- 18) 胡繼民：ヒト永久歯セメント質内 Sharpey 線維の微細構造的な研究－咬合と加齢に伴う変化について－。口科誌，42：1-15，1993.
- 19) 安東孝治，石和田敏貴，森山敬太，影山康子，影山徹，佐原紀行：咬合圧除去による歯周組織の変化－特に加齢による比較－。松本歯学，33：172-186，2007.
- 20) Narita L L, Hurng M J, Djomehri I S, Gansky A S, Ryder I M, Ho P S：Age-Related Adaptation of Bone-PDL-Tooth Complex：Rattus-Norvegicus as a Model System. PLoS One 7 e35980，2012.
- 21) Hirashima S, Ohta K, Togo A, Nakamura K：3D mesoscopic architecture of a heterogeneous cellular network in the cementum-periodontal ligament-alveolar bone complex. Microscopy 71：22-33，2022.
- 22) Lekic P, McCulloch C：Periodontal ligament cell populations: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. Anat Rec 245：327-341，1996.
- 23) Beertsen W, McCulloch C, Jaroslav Sodek：The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. Periodontol 2000 13：20-40，1997.
- 24) Seo B, Miura M, Gronthos S, Bartold M T, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey P, Wang C, Shi S：Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. THE LAMCET 364：149-155，2004.
- 25) Foster B L, Ao M, Salmon R C, Chavez B M, Kolli N T, Tran B A, Chu Y A,

Kantovitz R K, Yadav M, Narisawa S, Millán L J, Nociti Jr H F, Somerman J M :

Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization.

Bone 107 : 196-207, 2018.

付図説明

図 1 標本作製法

正中断面から外側方向へ向かって平行に薄切し，切片を作製した．

図 2 組織計量

1. 歯根膜に関する組織計量

上顎左側第一臼歯の中央咬頭頂と根尖孔を結ぶ線（L1）に向かって，近心歯槽骨頂から垂線（L2）を引いた．また，その垂線と平行で，歯冠側と根尖側とを 2 等分する線（L3）を引き，歯根膜腔を近心歯冠側（①），近心根尖側（②），根尖部（③），遠心根尖側（④），遠心歯冠側（⑤）の 5 つの部位に分けた．そしてそれぞれの部位において歯根膜の幅と面積を測定した．

2. 有細胞セメント質に関する組織計量

有細胞セメント質外表面からセメント質-象牙境へ引いた垂線の最大値を厚さ（W）とした．また有細胞セメント質の上端から下端までの距離をセメント質-象牙境に沿って距離を測定し，これを長さ（L）とした．

B: 歯槽骨，D: 象牙質，P: 歯髄，PL: 歯根膜，C: 有細胞セメント質

図 3 実験動物の体重の推移

両群ともに経時的に体重は増加した．対照群（——）と実験群（・・・）の間に有意差は認められなかった．

図 4 歯根膜（近心歯冠側）の組織像

a-c: HE 染色，d-f: アザン染色，a,d: 0 週，b,e: 1 週対照群，c,f: 1 週実験群．各標本とも歯根膜には豊富な線維がみられ，規則的に配列していた．対照群と実験群の間に組織学的な差異はみられなかった．

P: 歯髄, D: 象牙質, PL: 歯根膜, B: 歯槽骨, スケールバー=50 μm

図5 歯根膜の幅

a: 近心歯冠側, b: 近心根尖側, c: 根尖部, d: 遠心根尖側, e: 遠心歯冠側, 対照群: , 実験群: . いずれの部位に関しても各飼育期間において両群間に有意差は認められなかった. ($p < 0.05$)

図6 歯根膜の面積

a: 近心歯冠側, b: 近心根尖側, c: 根尖部, d: 遠心根尖側, e: 遠心歯冠側, 対照群: , 実験群: . いずれの部位に関しても各飼育期間において両群間に有意差は認められなかった. ($p < 0.05$)

図7 有細胞セメント質の組織像 (図中左側が遠心側, 右側が近心側)

a: 2週対照群, b: 2週実験群, c: 8週対照群, d: 8週実験群. 両群とも有細胞セメント質は経時的に増加した. 対照群と比較して実験群では有細胞セメント質の増生が乏しかった.

B: 歯槽骨, PL: 歯根膜, C: 有細胞セメント質, D: 象牙質, P: 歯髄, スケールバー=100 μm

図8 有細胞セメント質の厚さ, 上端から下端までの長さおよび面積

a-c: 近心側, d-f: 遠心側, a, d: 厚さ, b, e: 上端から下端までの長さ, c, f: 面積, 対照群: , 実験群: . 厚さは両群間の間に有意差は認められなかった. 上端から下端までの長さは近心側において4週で, 遠心側において2週と8週で実験群は対照群より有意に短かった. また, 面積は近心側において4週で, 遠心側において8週で実験群は対照群よりも有意に少なかった. ($p < 0.05$)

図 9 歯根膜（遠心根尖側）の BrdU 免疫染色像

a: 0 週, b: 2 週対照群, c: 2 週実験群, d: 8 週対照群, e: 8 週実験群. 0 週では陽性細胞（→）が多数みられた. 2 週では, 対照群と比較して実験群の陽性歯根膜細胞は少なかったが, 8 週では対照群, 実験群ともに陽性細胞は少なかった. B: 歯槽骨, PL: 歯根膜, D: 象牙質, C: 有細胞セメント質, P: 歯髄, スケールバー=50 μ m

図 10 単位面積当たりの BrdU 陽性歯根膜細胞数

a: 近心歯冠側, b: 近心根尖側, c: 根尖部, d: 遠心根尖側, e: 遠心歯冠側, 対照群:  実験群:  単位面積当たりの BrdU 陽性細胞数は, 1 週の近心歯冠側・近心根尖側・遠心歯冠側および 2 週の近心歯冠側・根尖部・遠心根尖側・遠心歯冠側において実験群は対照群より有意に少なかった. ($p < 0.05$)

图 1

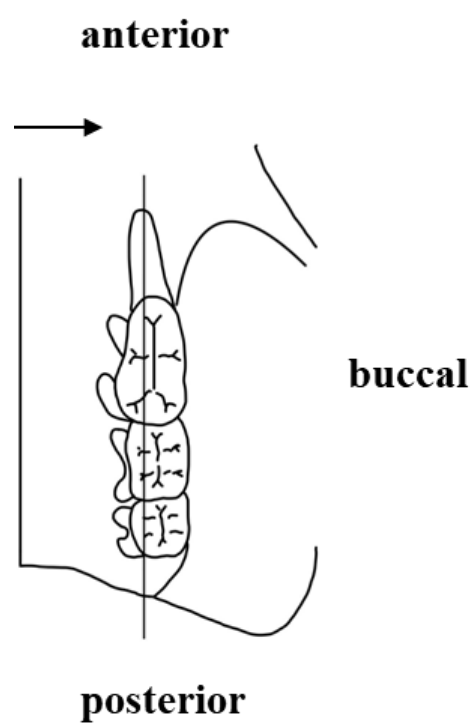


图 2

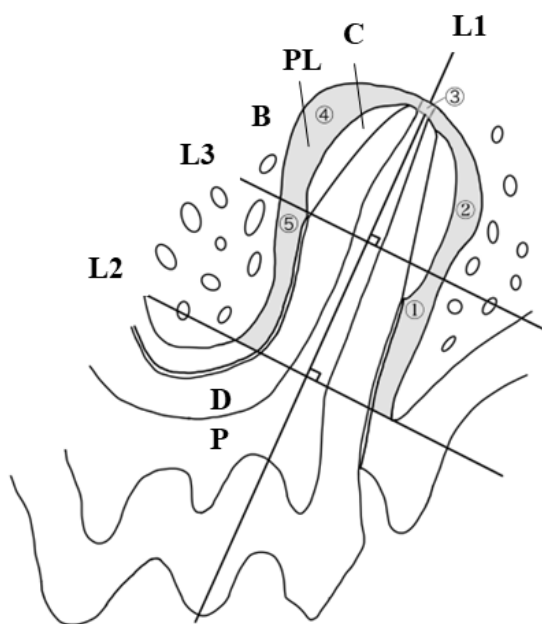


图2-1

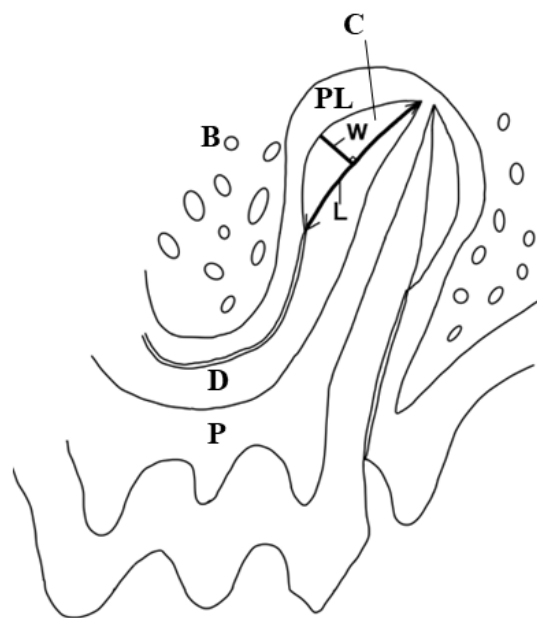


图2-2

図 3

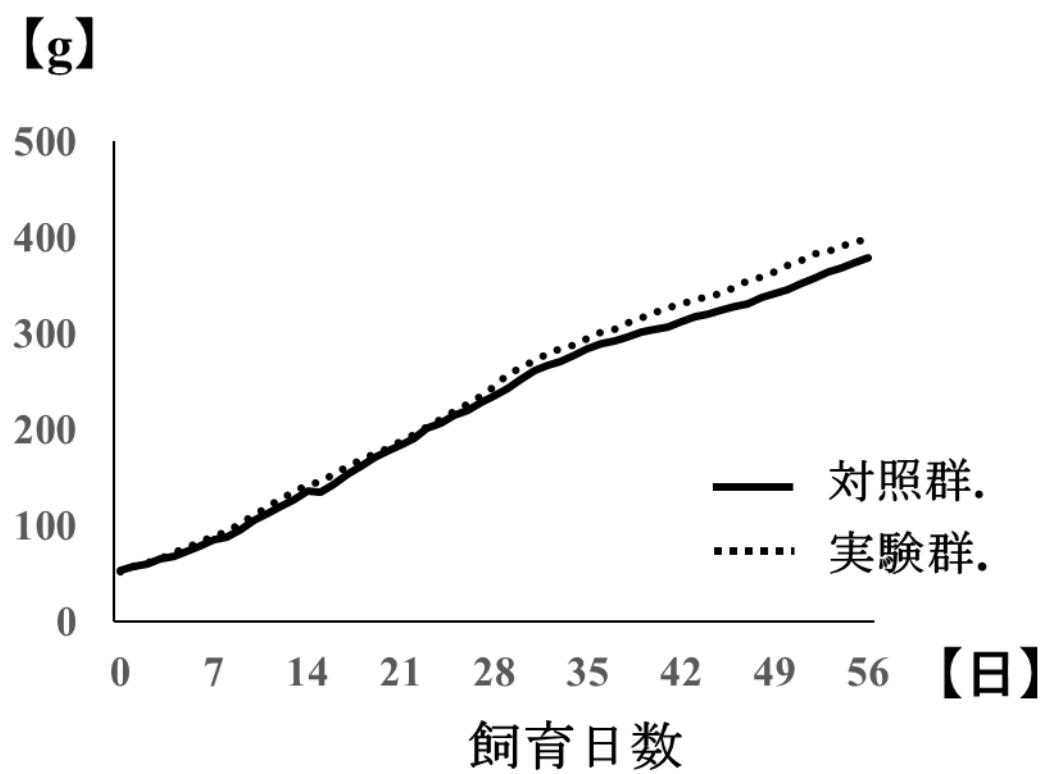


図 4

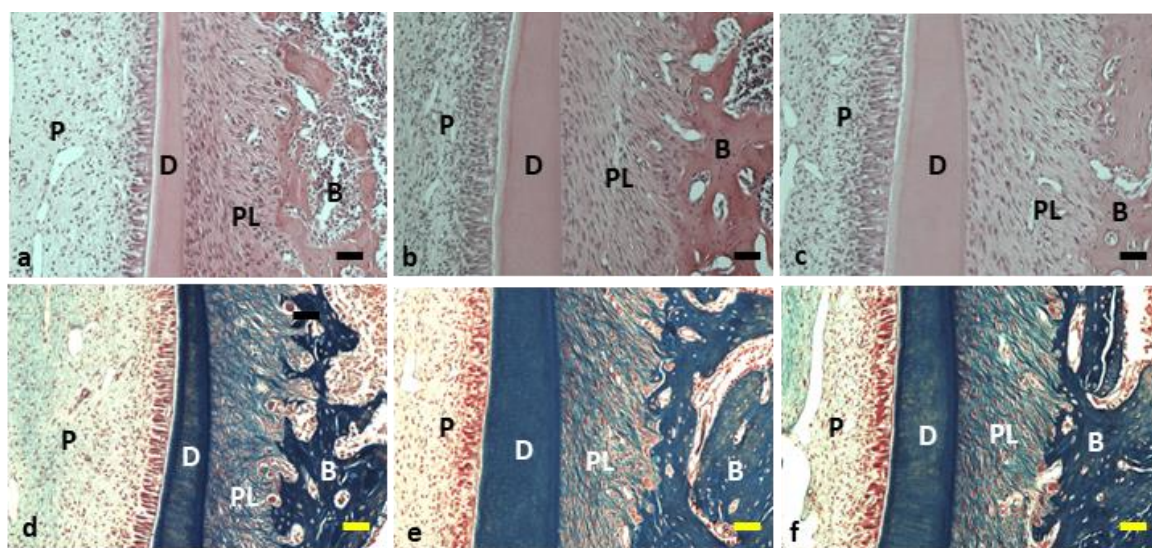


図 5

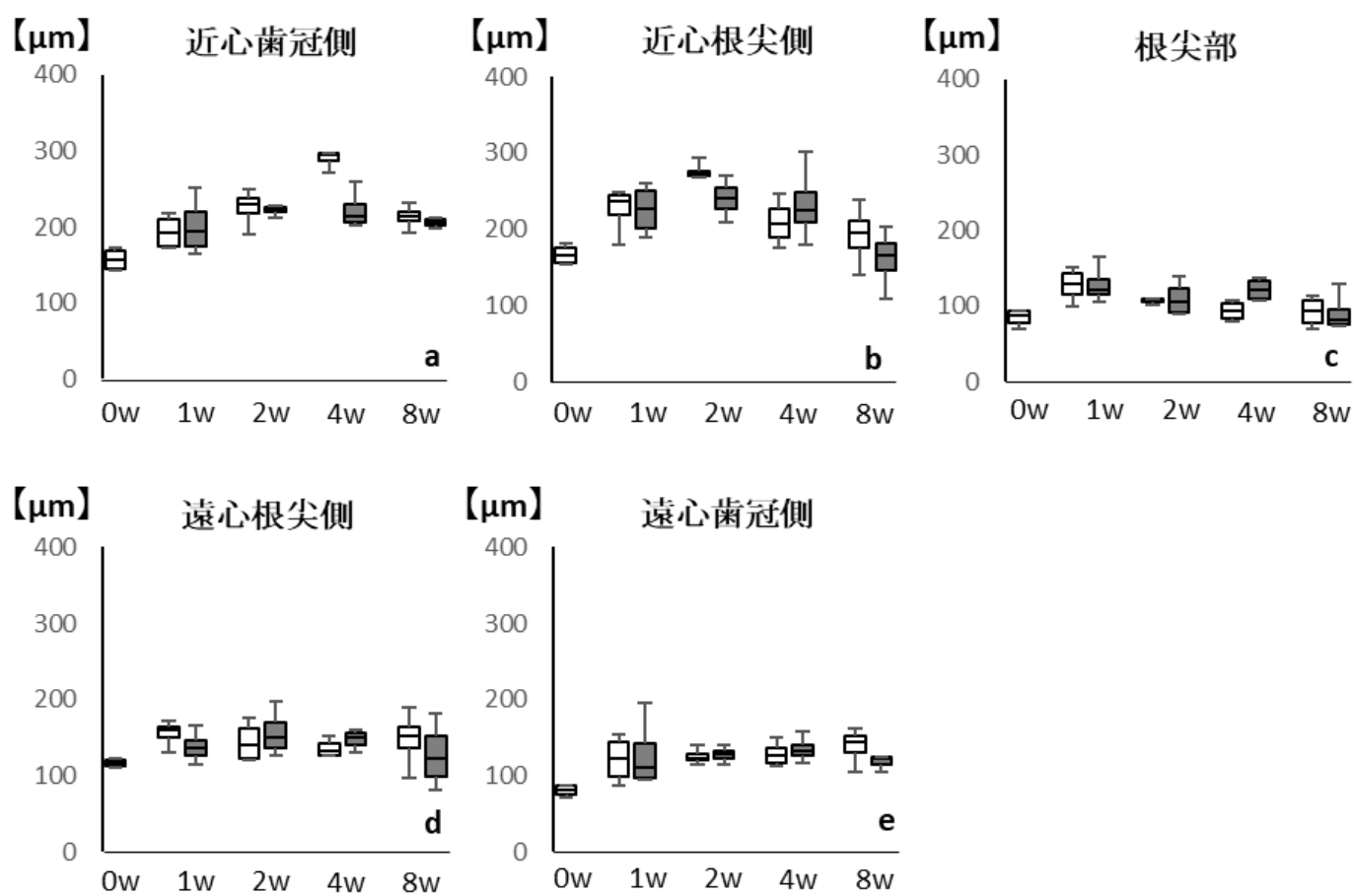


図 6

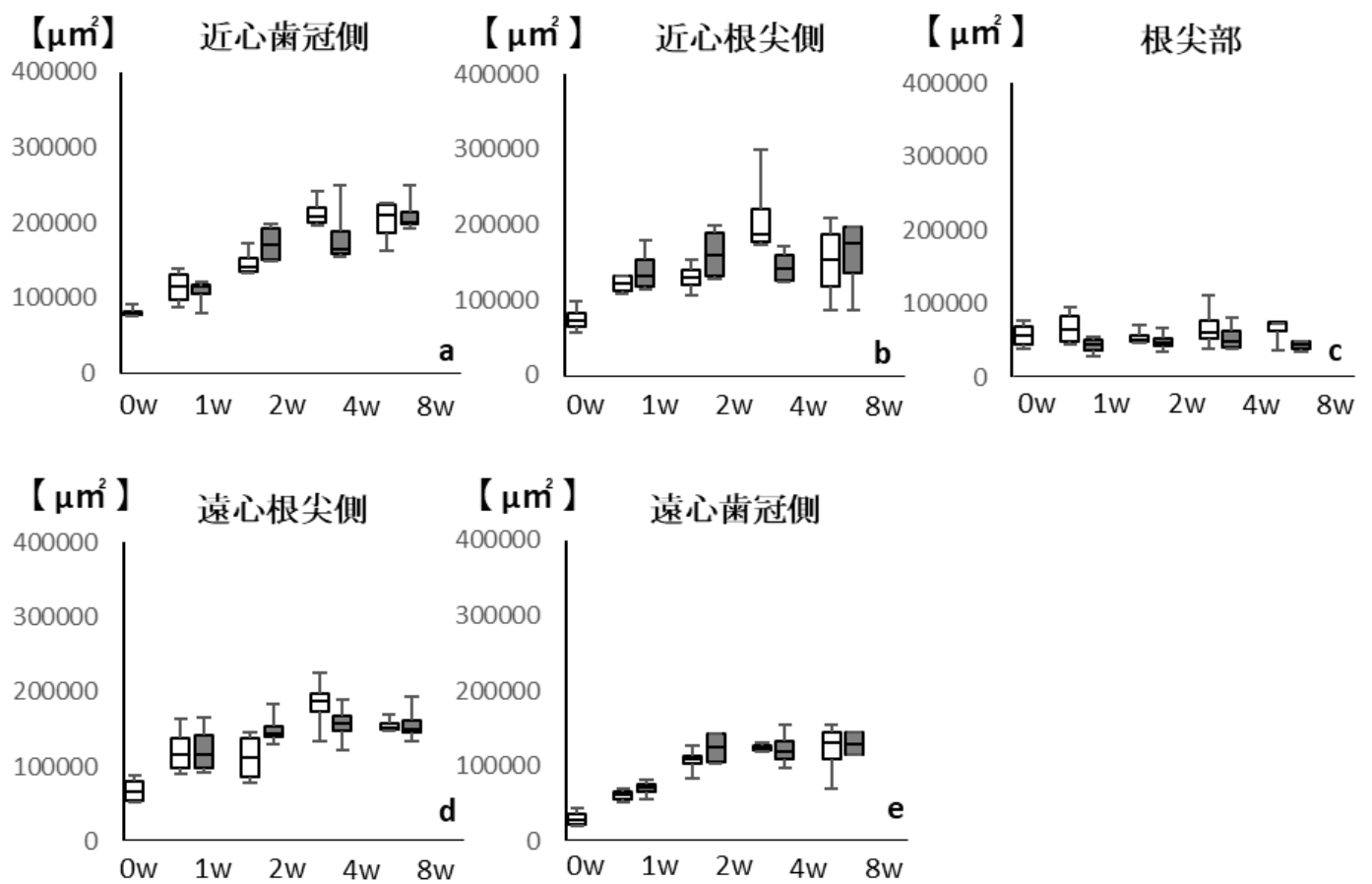


図 7

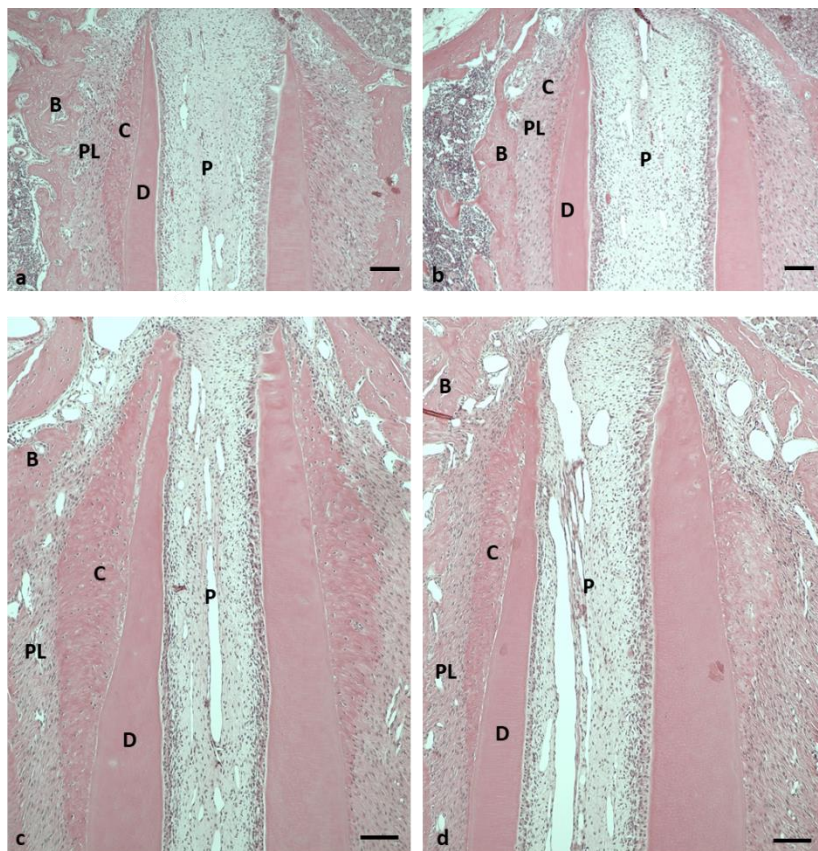


図 8

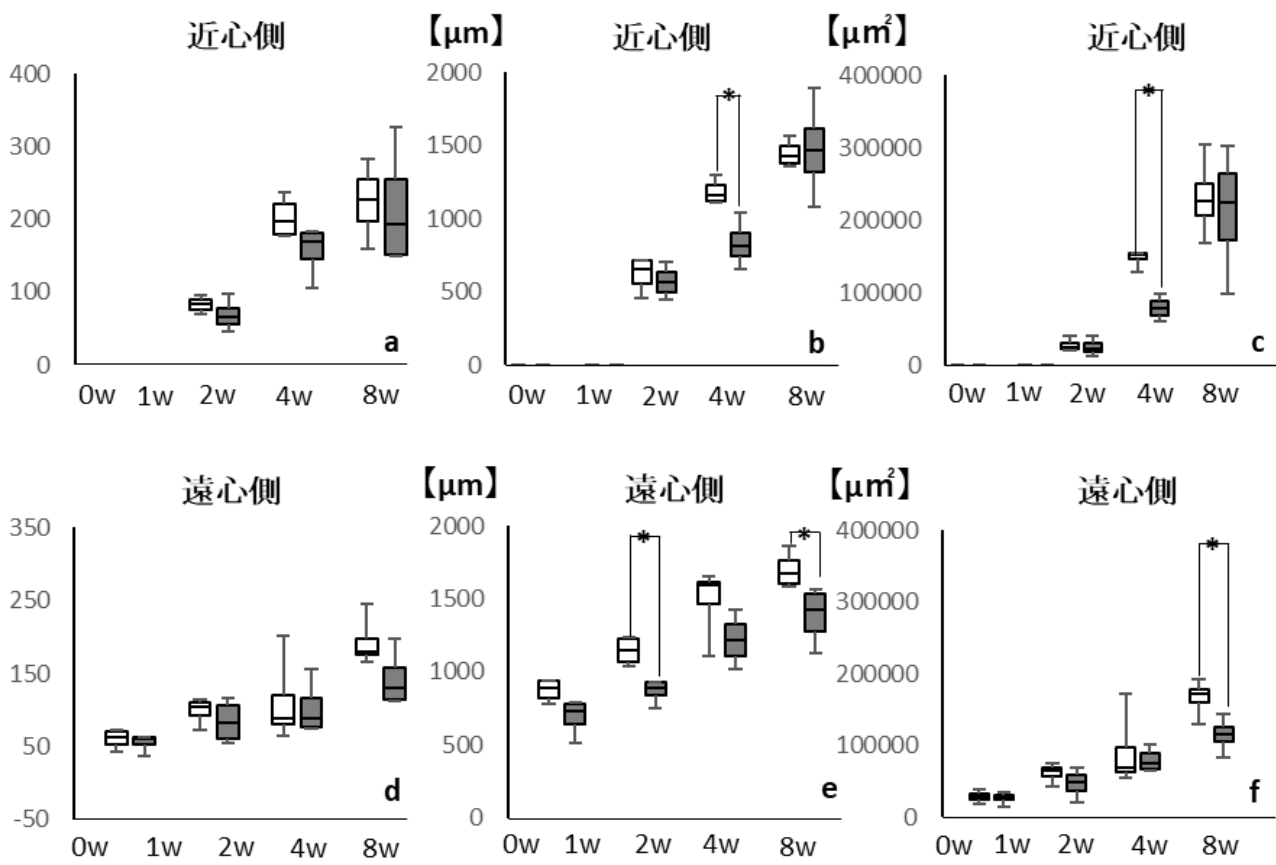


図 9

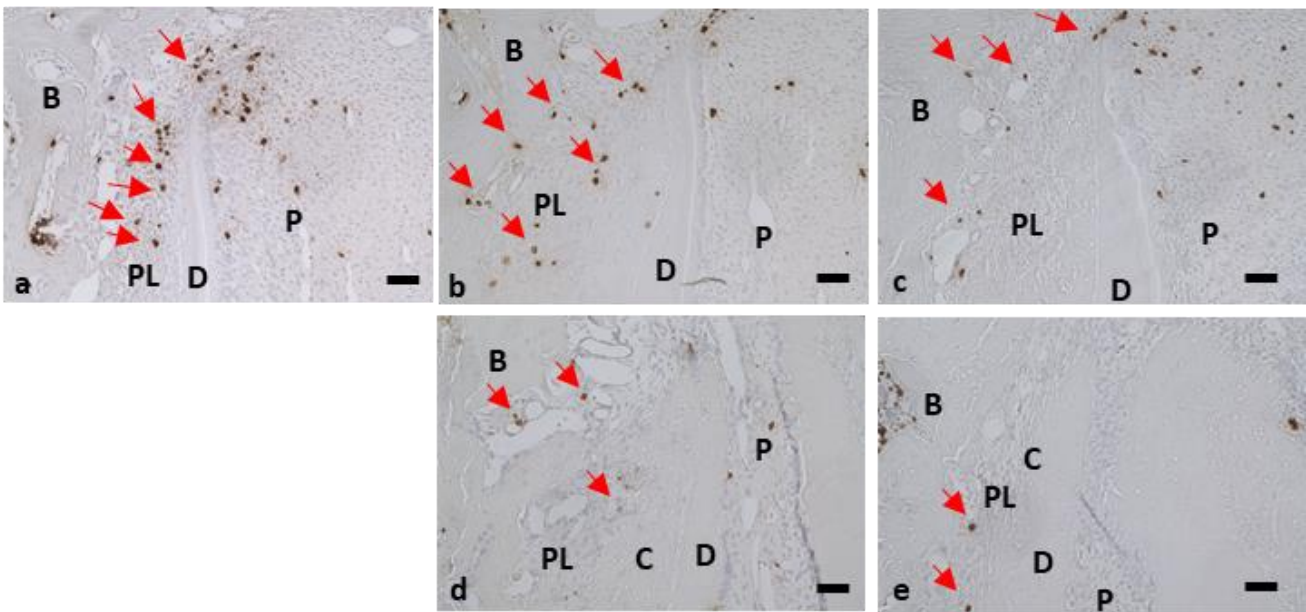


図 10

