

〔原著〕 松本歯学 5 : 161~170, 1979

ヨードホルム・水酸化カルシウムペースタ（糊剤根管充填材
ビタペックス）の組織埋入に関する実験的研究

第2報 電子顕微鏡的検索

川上敏行, 中村千仁, 林 俊子, 枝 重夫
松本歯科大学 口腔病理学教室（主任 枝 重夫 教授）

赤 羽 章 司
松本歯科大学 電子顕微鏡室（主任 赤羽章司 学士）

Studies on the Tissue Reactions to the Paste of Calcium Hydroxide
added Iodoform (Root Canal Filling Material : Vitapex®)
Second report. A electron-microscopic study

TOSHIYUKI KAWAKAMI, CHIHIITO NAKAMURA, TOSHIKO HAYASHI and SHIGEO EDA
Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. S. Eda)

SHOJI AKAHANE
Laboratory of Electron-microscope, Matsumoto Dental College
(Chief: B. Sc. S. Akahane)

Summary

Using 21 rats the reactions of subcutaneous tissues to calcium hydroxide added iodoform (Vitapex®: Root canal filling material) were studied by means of electron-microscopy.

Results were as follows:

1. Collagen fibers were gradually formed around the paste. Needle-like calcium crystals were appeared on the collagen fibers.
2. In the area of sparsely distributed collagen fibers and matrix vesicles contained with electron-dense materials, the growth of crystals beyond the calcified matrix vesicles was observed.

3. It was suggested that the matrix vesicles came from the regressive changes of cells.
4. The calcium salts, phagocytized within histiocytes, were demonstrated as electron-dense masses.
5. Silicone oil in the paste was also phagocytized by histiocytes, showing the droplets in the cytoplasm.
6. It was considered that histiocytes had the phagocytotic share, because there were no histiocytes containing both calcium hydroxide and silicone oil.
7. Many lysosomes were observed along the phagocytosis. The lysosomes fused with the phagosomes, and then the cytoplasm of histiocytes was occupied by many phagolysosomes.

緒 言

著者らは先に、糊剤根管充填材ヨードホルム・水酸化カルシウムパスタ（ビタベックス）をラットの生体内に埋入し、その運命と組織反応につきX線像および病理組織像とによって検索し、第1報として報告した（川上、他、1979）⁷⁾。すなわち、組織内に埋入されたパスタ自身は次第に拡散すると同時に組織球などによって貪食されて肉芽組織と置換するが、その間に石灰化物の形成、さらには骨の添加・増生ないし新生をもたらすことが認められた。

今回は、これらの組織反応を電子顕微鏡的に検索したので第2報としてその概要を報告する。

実験方法

実験には Wistar 系のラット 10 頭を使用した。Nenbital (0.2 ml/生体) の腹腔内注射による麻酔と A. C. E. (alcohol chloroform ether = 1 : 2 : 3 容量混合液) による吸入麻酔とを併用し、背部あるいは腹部皮下組織内にヨードホルム・水酸化カルシウムパスタ（糊剤根管充填材ビタベックス；処方は、100 g 中に水酸化カルシウム 30.3 g, ヨードホルム 40.0 g, シリコン・オイル 22.4 g, その他 6.9 g である）を埋入させた。創口は一部縫合したものもあるが、大部分はシアノアクリレート系接着剤アロンアルファ A「三共」[®] で接着した。実験期間は 4・6・8・10・12・14・21・27 および 37 日間で、例数は 6 日例が 2 例の他は全て 1 例で、合計 10 例である。

各実験期間経過後、ラットを屠殺し、電子顕微鏡観察のための標本作製した。すなわちパスタ

埋入部を周囲組織とともに一塊として摘出し、氷冷したカコジル酸緩衝 2.5% グルタルアルデヒド・2% パラホルムアルデヒド混合液に浸漬固定した。カコジル酸緩衝 1% オスミウム酸で後固定した後、アルコール系列で脱水、通法によりエポキシ樹脂（エポソ 812）に包埋した。LKB ウルトラトーム・ガラスナイフにて 1~2 μ の切片を作製し、トルイジン青の加温染色を施して光学顕微鏡により埋入パスタと増殖した肉芽組織が観察されるようにトリミングした。その後ダイヤモンドナイフ（Diatome; Switzerland）にて超薄切片を作製し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色を施して、日本電子 JEM100-B 型電子顕微鏡によって観察した。

結 果

1. 石灰化物形成の所見

埋入パスタは、極めて電子密度の高い塊状の構造物として認められた。その周囲には、6 日例位より肉芽組織が増殖していたが、それと同時にパスタ塊の内方に向かってコラーゲン線維が増生していた。これらの増生したコラーゲン線維にはその表面に電子密度の高い針状結晶が形成されていた（図1）。この部のコラーゲン線維の横断像について詳細に観察すると、針状結晶の発達には各種の段階が認められた。すなわち、線維の周囲のみ結晶がみられるもの、線維の内部にまで電子密度の高い物質が沈着しているもの、さらに線維の内部はもちろん線維の周囲に結晶が伸展してその直径を増しているものなどである（図2）。これを経時的に観察すると、これらの結晶化は次第に進み、14 日から 21 日例ではほぼ全てのコラーゲン線維

にわたってみられるようになった。

一方肉芽組織を形成する細胞の周辺には、コラーゲン線維の間などに単位膜で囲まれた直径 $0.1\sim 2\mu$ 位の多様な小胞構造が観察された(図3)。さらに、ここに観察された小胞の内部には電子密度の高い物質が認められた。また、これらの部位にはまれにミトコンドリアなどの細胞内小器官も存在していた(図4)。これらの部位においては、電子密度の高い構造物の形成は同部にみられるコラーゲン線維よりも、小胞構造から始まっていた(図5)。第1報の光顕所見で報告した如く、皮下埋入例においてはあきらかな骨形成は認められなかったため、今回の電顕所見でも骨組織の新生を検索することができなかった。

2. 組織球などによる貪食の所見

バスタ埋入部には、前述の通りその初期には活発なコラーゲン線維の増生が観察されたが、1週間後位から次第に各種円形細胞が出現して来た。これらの円形細胞のうち、特に組織球が多い部では、貪食が活発に行なわれていた。すなわち、細胞質が細長い突起を出し、または深く陥入して複雑に入り組んでいた。これらの細胞質突起の間には、水酸化カルシウムを思わせる電子密度の高い塊状、あるいは一部針状の構造物を容れていた(図6)。この所見は経時的に増加していたが、同時に細胞質内に同様な電子密度の高い塊状物を容れているもの観察されるようになった(図7)。

別の部位では、その細胞質内に脂質滴を思わせる大小様々な滴状物を多数持つ細胞も増加していた(図8)。これらの滴状物は、電子密度が均一・中程度で周囲が多少明るく縁どりされているものが主体であったが、基質が明るく、その中に細顆粒状ないし細線維状物を容れたものなどもあった(図9)。これらの細胞では、その細胞質のほとんどが滴状物で満たされており、核以外の細胞内小器官はほとんど観察されなかった。

増殖した肉芽組織内には、第1報の光顕所見と同様に多核の異物巨細胞も認められた。核は不正形を呈しておりこの細胞質には、多くのミトコンドリア、粗面小胞体などの細胞内小器官が充満しており、また明るい空胞状の構造も多数認められた(図10)。しかし、脂質滴を思わせる滴状物は観察されず、わずかに明るい空胞状構造の中に電子密度の高い細粒状物が存在していた(図11)。

以上の如く、細胞質内に貪食される物質は、水酸化カルシウムを思わせる電子密度の高い物質が脂質滴と考えられる物質のどちらか一方に限られることが多かったが、少数例において、脂質滴を思わせる滴状物と同時に電子密度の高い構造物を容れた細胞もあった(図12)。これらの細胞の場合、電子密度が均一・中程度で周囲がやや明るい滴状物と、明るい基質内に細線維状物を容れた滴状物が約半数ずつあった。電子密度の高い様々な形態の構造物は明るい基質の空胞内(図13)に、さらに針状の構造は細線維状物を容れた明るい滴状物内に観察された(図13, 14)。

一方、細胞質内に各種の異物を含んだ細胞の増加とともに、ライソゾームも増加していた(図15, 16)。貪食された電子密度の高い物質あるいは各種の滴状物と、一次ライソゾームが融合している像も認められた。さらにライソゾームの変化として、電子密度の高いミエリン様の構造も増加していた。

考 察

1. 石灰化について

骨の石灰化機構に関する電子顕微鏡的な研究については、多くの報告がみられる(Cameron, 1963³⁾; 小沢, 1975¹²⁾, 1976¹³⁾) が、いまだ完全に解き明されていない。しかしながら、生物学的に形成される硬組織は基本的には同一の原則によるものであろうことは多くの研究者によって認められている。すなわち、その初期においては石灰化の結晶核形成を導くものとしてコラーゲン線維がまず注目され、形態学的にもアパタイト結晶とコラーゲン線維の関係が示された(Fitton-Jackson and Randall, 1956⁵⁾; Fitton-Jackson, 1957⁴⁾)。しかし、コラーゲン線維が石灰化における結晶形成を行なうか否かの明確な所見は見い出されていない。

最近、石灰化の初期微細構造については、少なくともコラーゲン線維とは無関係に結晶化が生じ得ることが観察されている。これらの部位には膜性の小胞構造が発見され、それが石灰化と密接に関係することが一般に認められ、これを基質小胞(matrix vesicle)と呼んでいる(Anderson, 1967,¹⁾ 1969²⁾)。基質小胞は極めて多様な様相を呈し、明るい内容を有する小胞のほかに、種々の電子密度を

持った小胞群，ライソゾーム類似の構造を呈するもの，さらに細胞内小器官を含む細胞小片なども混在していると言う (Anderson, 1969)²⁾。また，病理学的に異常な石灰化部位にも，基質小胞が認められ石灰化との関係が論じられている (Kim and Huang, 1971)⁸⁾。

さて本実験においては，pasta埋入の初期から活発なコラーゲン線維の増生が認められ，その線維を結晶核として，電子密度の高い針状の結晶が析出していた。またこの部位の基質中には基質小胞と考えられる様な小胞構造は認められなかった。コラーゲン線維に対する結晶化はその組織像から次の様に考察することができる。すなわち，同部位にみられたコラーゲン線維の横断像を詳細に観察すると，石灰化の強いものはその線維の内部にまでも結晶が認められるのに対し，その周囲にのみものは比較的結晶の析出が弱い。また，結晶化はコラーゲン線維の周囲から起こり，決して線維の内部にのみ結晶のみられるものはなかった。従って石灰化はまずコラーゲン線維の周囲から始まり次第に線維の中心部まで進み，最後には外周へと進展していくと考えられた。このことは，病的に異常に多いカルシウム分が存在したため，体液中のリン酸イオンなどと結合し，物理化学的に結晶が析出し，コラーゲン線維を核として石灰塩の沈着が開始したものと思われされる。

一方時間の経過とともに，石灰化基質の中に基質小胞 matrix vesicle と思われる小胞が出現しており，これらの部位ではその部から結晶化，すなわち石灰化が起こっていた。具体的には，同部位ではまず基質小胞と考えられる小胞の中に電子密度の高い物質の沈着が起こり，次第に周囲のコラーゲン線維へと広まっていった。このことは，この小胞が能動的に石灰化，それも同部における初期の石灰化に密接に関与しているものと考えられる。前述の如く，病的部位の石灰化にも基質小胞が関与しており (Kim and Huang, 1971)⁸⁾，今回の実験においても同様な所見が得られたわけである。基質小胞の由来に関して小沢 (1975)¹²⁾ は，細胞膜による microapocrine 様の分泌，開口分泌様式による分泌，さらに細胞の退行性変化に基づくものなどが考えられるとしている。今回の観察結果，すなわち基質小胞の出現部位にミトコンドリアなどの細胞内小器官がみられたことは，

ここに観察された小胞は，細胞の退行性変化によるものであることを裏付けている。しかし一方では，近接部位にみられた細胞が，その細胞膜を複雑に陥入させていた点などから，この細胞膜由来であることも否定できない。

2. 異物貪食について

細胞による異物の貪食についての電子顕微鏡的研究によると (馬屋原・小川, 1970¹⁰⁾; 小川・安部, 1977¹¹⁾), その過程は一般に次の様に要約することができる。まず細胞表面に取り込まれるべき物質が吸着し，その後細胞膜の陥入が起こる。次いで陥入の“neck”部分がくびれて細胞膜との接触を断ち細胞質に移行し，やがてライソゾームと融合・合体し加水分解酵素を受け取り消化が開始される。

今回観察された組織反応も同様なものであった。まず組織球の細胞膜が複雑に陥入し，一見空胞状の構造を多数形成していた。この構造はルテニウムレッド (RR) 染色法 (梶川, 他, 1970⁵⁾; 馬屋原, 1976¹⁰⁾) によって染色すると細胞表面，その陥入部および細胞周辺部の空胞状構造が陽性に反応し，細胞内の真の空胞と区別される。今回は RR 染色を施して鏡検していないため確認はできないが，その間に電子密度の高い埋入 pasta に由来すると考えられる物質を含んでいた点などから，異物貪食における第一段階であると理解される。また，細胞質内にみられた電子密度の高い塊状物は，その状態から判断して貪食されたカルシウム塩であると思われされた。

貪食の過程は観察されなかったが，各種の滴状物を容れた細胞が観察され，中にはそれらの滴状物で細胞質が充満されているものも認められた。この滴状物は第1報で考察した通り，埋入 pasta に含まれているシリコーン・オイルに由来し，光学顕微鏡レベルでは泡沫細胞として観察されたものであろう。なお，これらの滴状物を容れた細胞にはほとんど電子密度の高い構造物，すなわち pasta に由来するカルシウム塩は認められなかった。従って細胞により異物貪食における機能分担がなされていることを示唆している。

異物巨細胞も埋入 pasta に接して観察されたが，この細胞質には組織球の細胞質に認められた様な貪食の所見はなかった。細胞質内には小さな空胞が数多く形成されており，一部ではその中に

電子密度の高い細粒状物が多少認められたにすぎなかった。第1報において報告した通り、この巨細胞にも von Kossa 陽性の顆粒が多数含まれていたのであるから、この細粒状物がカルシウム塩に由来することも考えられるが、その形態は組織球にみられたものとはかなり異なっており、この巨細胞の貪食についてはさらに追究する必要があらう。

なお、肉芽組織を形成する細胞のうちには、滴状物と電子密度の高い物質の両者を容れている細胞もまれにみられた。この細胞の場合には、電子密度の高い物質は先に記した様な塊状を呈しておらず、多くは破骨細胞 (Cameron, 1963³⁾) にみられるような針状を呈していた。この組織像から、単に pasta 由来のカルシウム塩が貪食されたものではなく、肉芽組織内に形成された石灰化物が二次的に貪食されたものと思われた。

最後に、異物貪食における中心的役割を演ずるライソゾームの出現について考えてみたい。各種細胞により pasta 成分の貪食が進み細胞質内に貪食胞が増加するのにもない、ライソゾームが増加していた。ライソゾームは各種の貪食胞と融合し、または合体している所見も観察されたので、このライソゾームによって加水分解酵素が供給され、貪食された異物は分解処理されるものと考えられる。しかし、細胞質内には電子密度の高いミエリン様の構造なども増加していた。この構造は、細胞にとってあくまで異物で、ライソゾームでは消化されない成分が電子密度の高いミエリン様の構造として残存したものと考えられた。

結 論

ラットの皮下組織内にヨードホルム・水酸化カルシウム pasta (ビタベックス) を埋入して、その後の組織反応について電子顕微鏡によって検索し次の結論を得た。

1) 埋入 pasta の周囲には、その初期からコラーゲン線維が増生し、その線維を結晶核として針状の石灰化物が形成されていた。

2) 経時的に各種円形細胞などが出現してくるとともに、周囲の基質内に基質小胞 matrix vesicle が出現し、能動的な石灰化が始まっている所見が得られた。

3) 基質小胞の由来について、細胞の退行性変

化に基づくものであることが示唆された。

4) 組織球により貪食された pasta 中のカルシウム塩は、電子密度の高い塊状の構造として認められた。

5) pasta 成分であるシリコン・オイルは組織球内に多くの脂質滴を思わせる滴状物として貪食されていた。

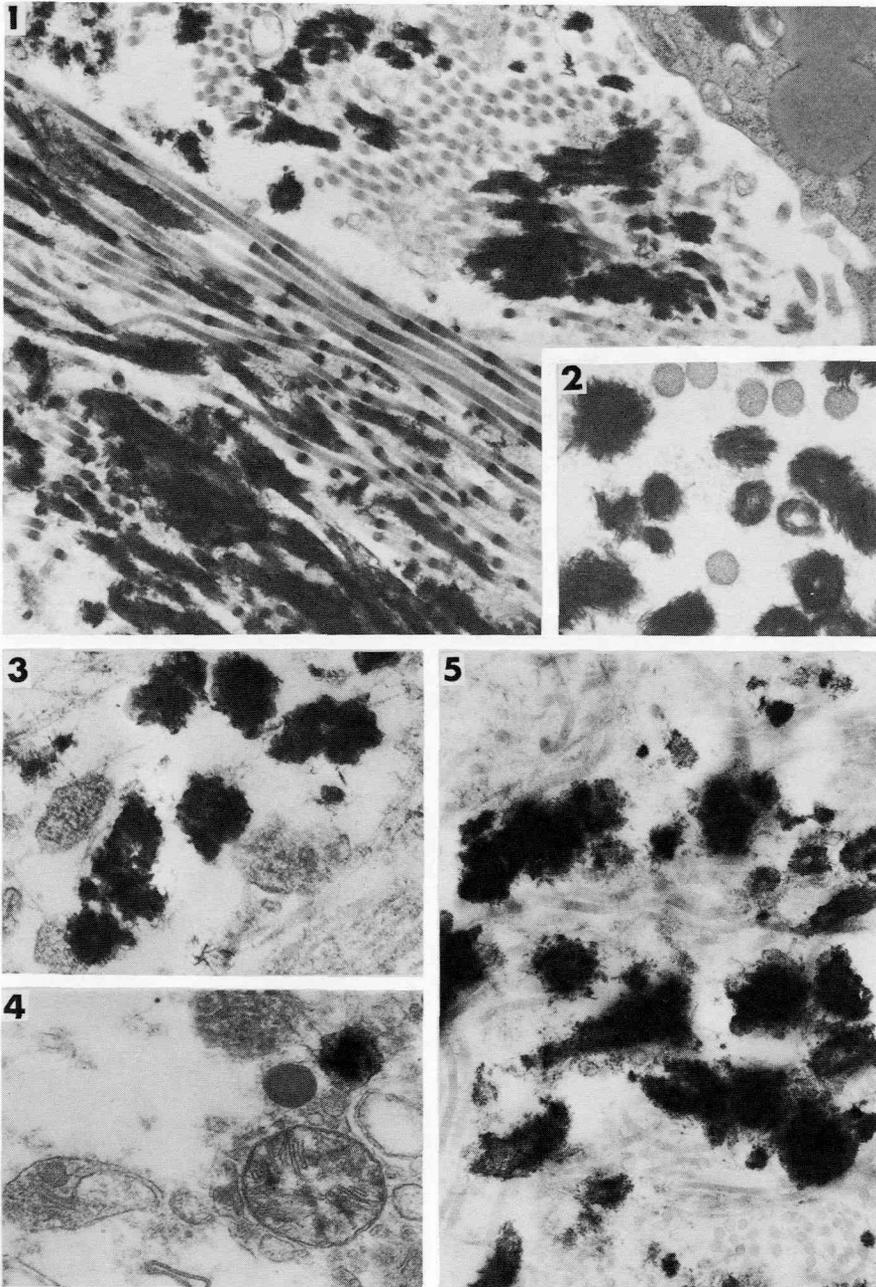
6) 同一の貪食細胞の胞体内に水酸化カルシウムとシリコン・オイルの両者は同時に認められなかったので、細胞により異物貪食における機能分担のあることが示唆された。

7) pasta 成分の貪食にともない、ライソゾームが増加し、貪食胞と融合・合体し活発な細胞内消化が行なわれていた。

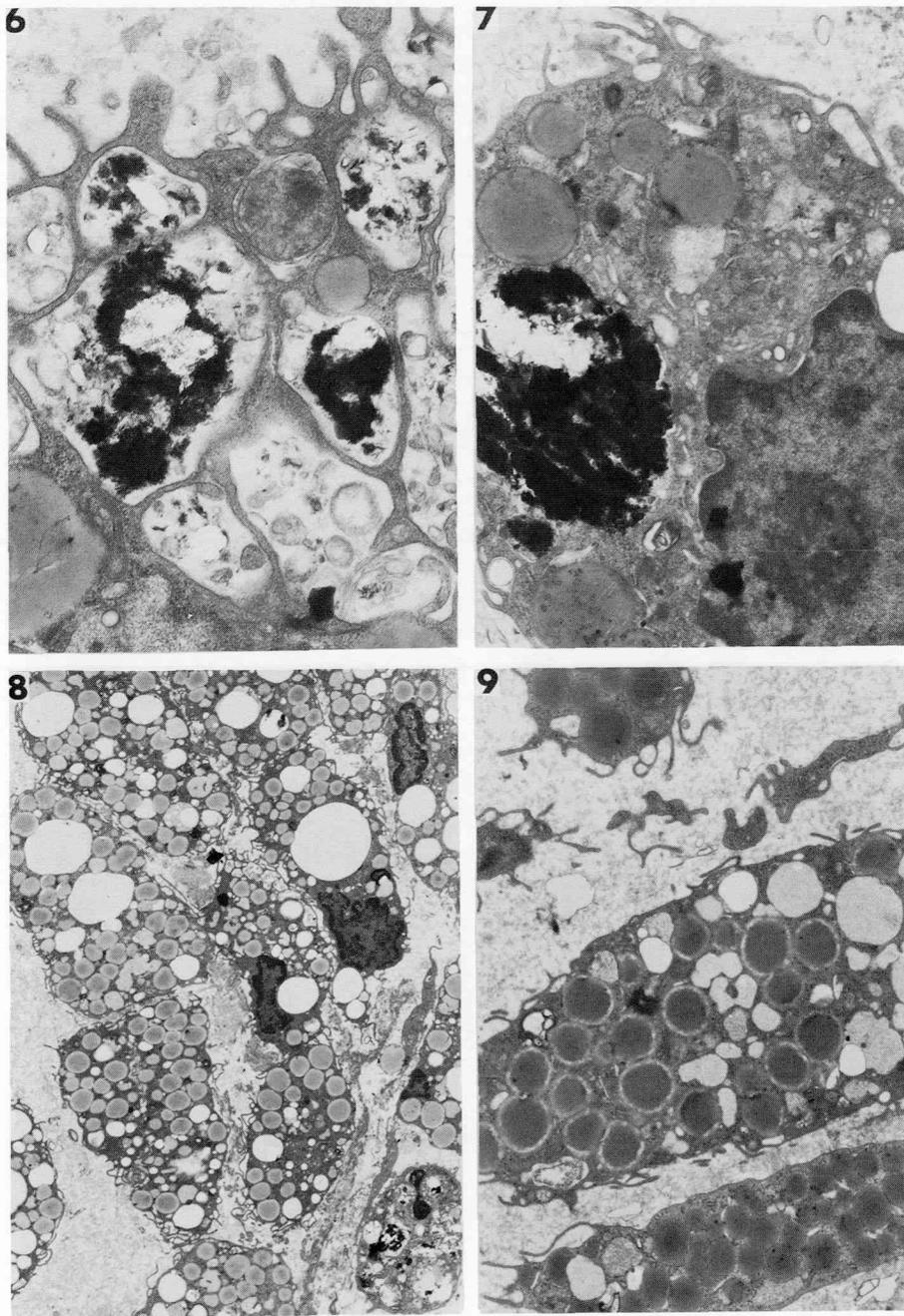
文 献

- 1) Anderson, H. C. (1967) Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* 35: 81-101.
- 2) Anderson, H. C. (1969) Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.* 41: 59-72.
- 3) Cameron, D. A. (1963) The fine structure of bone and cartilage. A critical review of the contribution of electron microscopy to the understanding of osteogenesis. *Clin. Orthop.* 26: 199-228.
- 4) Fitton-Jackson, S (1957) The fine structure of developing bone in the embryonic fowl. *Proc. Roy. Soc. Ser. Biol.* 146: 270-280.
- 5) Fitton-Jackson, S. and Randall, J. T. (1956) The fine structure of bone. *Nature* 178: 798.
- 6) 梶川欽一郎, 中西功夫, 堀 功, 松田芳郎, 近藤勝彦 (1970) ルテニウムレッド染色による結合組織の電子顕微鏡の所見. *J. Electron Microsc.* 19: 347-354.
- 7) 川上敏行, 中村千仁, 林 俊子, 枝 重夫, 赤羽章司 (1979) ヨードホルム・水酸化カルシウム pasta (糊剤根管充填材ビタベックス) の組織埋入に関する実験的研究 第1報 病理組織学的検索. *松本歯学.* 5: 35-44.
- 8) Kim, K. M. and Huang, S. H. (1971) Ultrastructural study of calcification on human aortic valve. *Lab. Invest.* 25: 357-366.
- 9) 馬屋原宏 (1976) 動物細胞における空胞の構造と機能. *細胞.* 8: 2-15.
- 10) 馬屋原宏, 小川和朗 (1970) マウス皮下組織球のタンパク取り込み過程にみられる coated vesicle の機能. *細胞生物学シンポジウム.* 21: 293-301.
- 11) 小川和朗, 安部省吾 (1977) 細胞内消化. 代謝.

- 14 : 1819—1829.
- 12) 小沢英浩 (1975) 硬組織の超微構造と石灰化. 骨代謝. 8 : 227—265.
- 13) 小沢英浩 (1976) 硬組織の石灰化機構と基質小胞. 国際歯科ジャーナル. 4 : 215—238.



- 図1：増生したコラーゲン線維にはその表面に電子密度の高い針状結晶が形成されている(埋入8日例； $\times 14,850$)
- 図2：図1と同様な部位のコラーゲン線維の横断像，線維を核として各段階の石灰化像が認められる(埋入8日例； $\times 58,690$)。
- 図3：コラーゲン線維の間に多様な小胞構造が観察され，あるものはその内部に電子密度の高い物質を容れている(埋入14日例； $\times 33,040$)。
- 図4：図3と同様な部位には，まれにミトコンドリアなどが観察される(埋入14日例； $\times 21,080$)
- 図5：小胞構造の部位にまず電子密度の高い物質が沈着し，コラーゲン線維より先に石灰化している(埋入14日例； $\times 19,230$)。



- 図6：細胞質が細長く突起を出し複雑に陥入しており、その間に電子密度の高い塊状、あるいは一部針状の物質を容れている（埋入14日例； $\times 56,050$ ）。
- 図7：細胞質内には電子密度の高い塊状物が認められる（埋入14日例； $\times 63,900$ ）。
- 図8：細胞質内に脂質滴を思わせる滴状物を多数持つ細胞が増加している（埋入14日例； $\times 2,020$ ）。
- 図9：滴状物は、均一・中程度の電子密度で周囲が多少明るく縁どりされているものと、明るい基質の中に細顆粒状ないし線維状物を容れたものなどがみられる（埋入14日例； $\times 6,080$ ）。

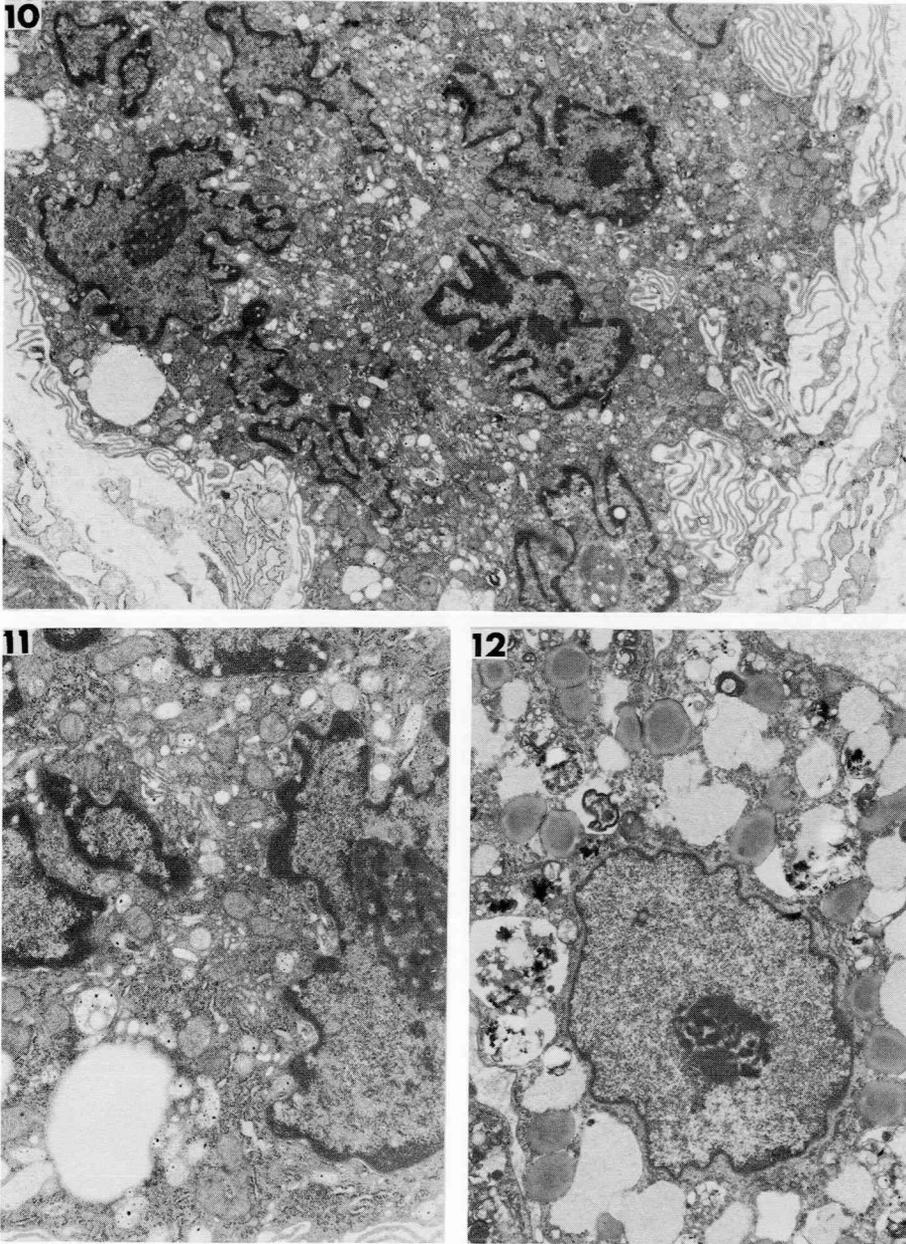
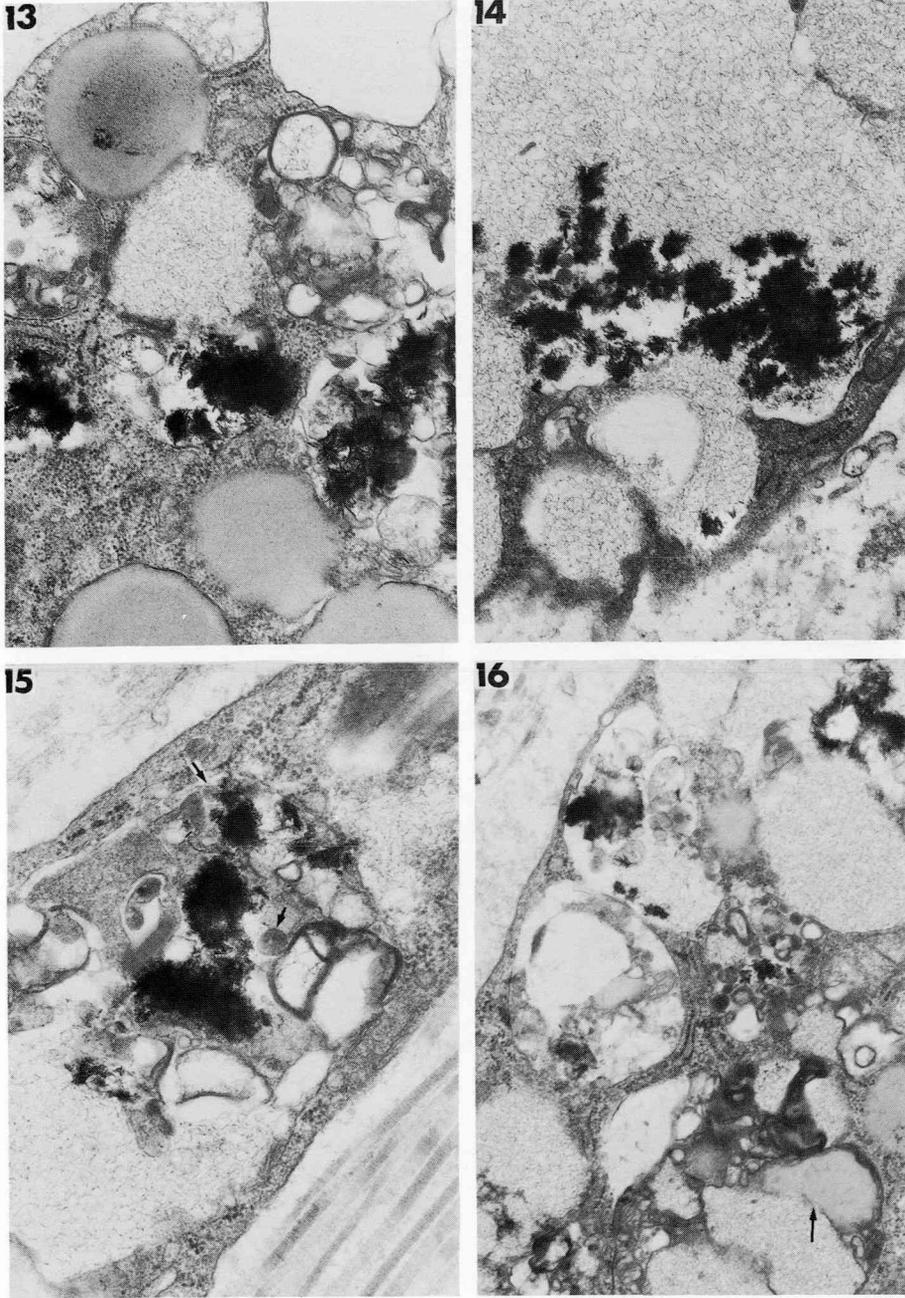


図10: 肉芽組織内に観察された異物巨細胞. その核は不正形で, 細胞質には多くのミトコンドリア, 粗面小胞体などの細胞内小器官が充満しており, また内部に電子密度の高い細粒状物を容れた空胞状構造が多数観察される (埋入14日例; $\times 4,990$).

図11: 異物巨細胞の部分拡大像. 大小の空胞状構造内に電子密度の高い細粒状物がよく認められる (埋入14日例; $\times 10,980$).

図12: 脂質滴を思わせる滴状物と, 電子密度の高い構造物を同時に容れた細胞もまれに観察された (埋入14日例; $\times 6,530$).



- 図13：明るい基質の空隙内には、種々な形態をした電子密度の高い構造物がみられる（埋入14日例； $\times 21,710$ ）。
- 図14：細線維状物を容れた明るい滴状物の中に、電子密度の高い針状構造物が観察される（埋入14日例； $\times 21,920$ ）。
- 図15：電子密度の高い物質に接して一次ライソゾーム（矢印）や、二次ライソゾームが認められる（埋入14日例； $\times 30,430$ ）。
- 図16：二次ライソゾームが多数観察され、一次ライソゾームと細線維状物を容れた滴状物との融合像（矢印）、さらに電子密度の高いミエリン様構造も認められる（埋入14日例； $\times 14,870$ ）。