

[原著] 松本歯学 33 : 187~199, 2007

key words : ヒト乳歯 — 内部吸収 — 炎症性サイトカイン — 破歯細胞

## 脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収と炎症性サイトカイン

石和田敏貴<sup>1</sup>, 安東 孝治<sup>1</sup>, 森山 敬太<sup>1</sup>,  
影山 康子<sup>1,2</sup>, 影山 徹<sup>1</sup>, 佐原 紀行<sup>1</sup>

<sup>1</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

<sup>2</sup>松本歯科大学 歯科矯正学講座

Inflammatory cytokines and internal resorption of human deciduous teeth prior to shedding

TOSHIKI ISHIWADA<sup>1</sup>, KOJI ANDO<sup>1</sup>, KEITA MORIYAMA<sup>1</sup>,  
YASUKO KAGEYAMA<sup>1,2</sup>, TORU KAGEYAMA<sup>1</sup> and NORIYUKI SAHARA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

<sup>2</sup>*Department of Orthodontic, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

### Summary

Prior to shedding of human deciduous, odontoclastic resorption takes place at the pulpal surface of the coronal dentin. The purpose of the present investigation was to study, immunohistochemically, the effect of inflammatory cytokines on this internal resorption of human deciduous teeth. Fifty-six human deciduous teeth (12 incisors, 18 canines, 26 molars) in the later stage of exfoliation were used in this study. Using anti-human IL-1 $\alpha$ , IL-6, and TNF- $\alpha$  monoclonal antibodies, we elucidated the alteration in the distribution of various inflammatory cytokine-positive cells in the pulp during the process of internal resorption. While the roots were being actively resorbed, there were no inflammatory cytokines positive cells in the pulp. However, when root resorption was nearly complete, numerous IL-1 $\alpha$ - and TNF- $\alpha$ -positive cells started to infiltrate the coronal pulp. Then, odontoclasts were initially found on the surface of the predentin at the bottom areas of the pulp chamber. These gradually spread to the pulpal horn region along the wall of the pulp chamber. The inflammatory cytokines-positive cells in deciduous tooth pulp were increased with the progression of internal resorption, and were frequently found adjacent to odontoclasts.

These findings suggest that various inflammatory cytokines play important roles in the migration, activation, and differentiation of odontoclasts during the internal resorption of human deciduous teeth prior to shedding.

## 緒 言

歯は骨と比較すると吸収されにくい。しかし、乳歯の生理的な歯根吸収時あるいは外傷、腫瘍、矯正歯の移動などにより歯の吸収が起こることがある。歯の吸収には破歯細胞 (Odontoclast) と呼ばれる破骨細胞 (Osteoclast) と同様な多核の巨細胞が関与していることが知られている<sup>1-4)</sup>。しかし、どのような機構で破歯細胞が分化し、歯を吸収するのかについては現在でも明らかではない<sup>5,6)</sup>。

ヒトを含む2生歯性の動物において、歯の交換期に認められる乳歯の生理的歯根吸収は、一定の時期に歯根表面に破歯細胞が多数観察できることから、古くから破歯細胞の形態や機能を解析するために用いられている。しかし、ヒト乳歯の歯根吸収の期間が長く、歯根の吸収程度によっても周囲組織の条件が異なることなどから、破歯細胞の形成や活性化の機構を研究する観察モデルとしては不利な点が多い。脱落前のヒト乳歯の歯髄側からの象牙質吸収現象については、以前より多くの研究者により報告されている<sup>7-13)</sup>。Saharaら<sup>14)</sup>はヒト乳歯の内部吸収がどの歯種でも起こること、上皮付着部からの炎症に起因すること、内部吸収は一定の経時的組織変化を伴って起こることなどを報告している。

本研究では、脱落前のヒト乳歯の内部吸収を観察モデルとし、内部吸収に関与する破歯細胞の分化過程と炎症性サイトカイン産生細胞の動態について免疫組織化学的手法を用い解析し、ヒト乳歯の内部吸収の進行過程と炎症性サイトカインの関連性について検討した。

## 材料および方法

### 1 試料

観察に用いたヒト乳歯は、歯根全体がほぼ吸収されている齶蝕のない健全な乳歯56例 (前歯12例、犬歯18例、臼歯26例) である。なお試料収集にあたっては、本人および保護者に本研究の目的や意義について十分に説明し同意を得た。

### 2 観察方法

乳歯は、抜歯後直ちに4%パラホルムアルデハイドを含む0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH 7.3) を用いて4℃で20時間固定した。0.1 M カコジル

酸緩衝液で洗浄後、4℃の10% EDTA 溶液で約5週間脱灰した。脱灰終了後、乳歯はカミソリで近遠的あるいは頬舌的に2分し、マイクロスライサー (Dosaka EM) を用いて100 μmのスライスを作製した。各スライスは、始めに内部吸収の程度を調べるため破骨細胞や破歯細胞のマーカー酵素として広く用いられている酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (Tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP) 活性染色を行い、破歯細胞の分布状態を観察した。TRAP 活性染色は Burston<sup>15)</sup>の方法に準じて、酵素基質に naphthol AS-BI phosphate (Sigma), を含んだ0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 中で30-60分間37℃で反応した。

TRAP 活性染色後、すべてのスライスは0.01 M リン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) (pH 7.4) で洗浄し、1次抗体としてマウス抗ヒト-Interleukin-1α (IL-1α) (Genzyme), Interleukin-6 (IL-6) (Genzyme), Tumor necrosis factor-α (TNF-α) (Genzyme) モノクローナル抗体を室温で6時間反応させた。次に fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識のヒツジ抗マウス IgG 抗体 (Sigma) を室温で1時間反応させ、蛍光抗体法で免疫染色した。陰性対照としては、各1次抗体の代わりにマウス正常血清 (Tago) を反応させたものを用いた。免疫染色後、試料はスライドグラスにのせ、Glycerol-Gelatine (Kaiser) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM-510, Carl Zeiss) を用いて観察した。

レーザー顕微鏡で観察後、一部のスライスはPBSで洗浄し、3%過酸化水素水で内因性ペルオキシダーゼを除去し、Peroxidase-antiperoxidase complex (PAP, Miles-Yeda) で1時間反応させた。PBSで洗浄後、1%グルタルアルデハイド溶液で1時間固定し、3, 3'-diaminobenzidine (DAB) を用いペルオキシダーゼ活性染色を行った。試料はPBSで洗浄後、1% OsO<sub>4</sub> 溶液で1時間後固定し、アルコール系列で脱水後、エボン包埋した。包埋試料はウルトラミクロトーム (RMC-7000) で1 μmの厚切り切片を作製し、光学顕微鏡下で観察した。さらに厚さ70-80 Åの超薄切片を作製し、酢酸ウラニール-鉛2重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (100 CX, 日本電子) を用い加速電圧80 kVで観察した。

一部の乳歯は、アルコール系列で脱水した後、

Technovit 8100 (Kulzer) に包埋, 5  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製した. 切片は, H・E 染色, トルイジンブルー染色あるいは上記に既に述べた条件で TRAP 活性染色を行った後, 光学顕微鏡で観察した.

## 結 果

### 1 歯冠象牙質の内部吸収進行過程の各段階

本研究では初めに100  $\mu\text{m}$  に薄切したスライスに TRAP 活性染色を行い, 歯冠歯髄内あるいは象牙質表面の TRAP 陽性細胞の分布状態を観察し, 乳歯の内部吸収過程を以下の3段階の時期に分類した (図1).

1. 吸収前期 (Preresorption period). 乳歯歯根が盛んに吸収されている時期で, 破歯細胞が歯根表面に観察されるが, 残存歯髄内には TRAP 陽性細胞がまったく認められない時期 (図1. A).
2. 吸収初期 (Early resorption period). 歯髄内に単核の TRAP 陽性細胞が出現し, 象牙質表面には単核, 多核の TRAP 陽性細胞が認められるようになるが, 象牙質表面には依然として象牙芽細胞が認められる部位もある時期 (図1. B).
3. 吸収後期 (Later resorption period). 歯冠の象牙質表面全周に単核, 多核の TRAP 陽性細胞が認められ, 内部吸収が盛んな時期 (図1. C).

上記の指標をもとに分類した結果, それぞれの時期の乳歯の数は, 吸収前期21例, 吸収初期9例, 吸収後期26例であった.

歯冠象牙質の内部吸収の進行過程を3段階に分けたスライスは, それぞれマウス抗ヒト-IL-1 $\alpha$ , IL-6 および TNF- $\alpha$  モノクローナル抗体と

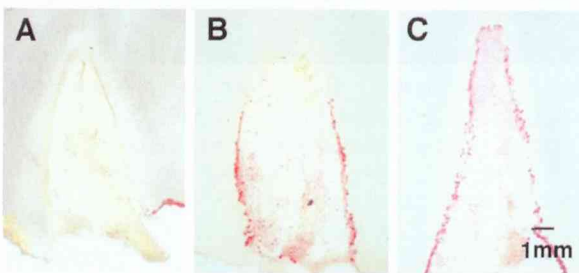


図1: 歯冠象牙質の内部吸収の進行段階 (TRAP 染色).

- A. 吸収前期 (Preresorption period).
- B. 吸収初期 (Early resorption period).
- C. 吸収後期 (Later resorption period).

反応させ, 炎症性サイトカイン陽性細胞の分布変化について蛍光抗体法を用いて観察した. 今回 TRAP 活性染色の発色剤として用いた Fast red violet LB salt は赤色の蛍光を持っており, FITC で標識した2次抗体の緑色の蛍光との2重染色が可能であった. 上記の試料を共焦点レーザー顕微鏡下で観察することにより, 破歯細胞の分化程度と炎症性サイトカイン陽性細胞の分布変化を同一切片で観察することができた.

以下に歯冠象牙質の内部吸収進行過程の各段階について, 破歯細胞と炎症性サイトカイン陽性細胞の分布変化について述べる. なお, 1次抗体の代わりに正常マウス血清を反応させた陰性対照群では, すべての吸収段階の標本で, 歯髄内には免疫反応は認められなかった.

#### 1) 吸収前期 (Preresorption period).

この時期には歯髄には TRAP 陽性の破歯細胞は全く観察されず, 象牙質表層には象牙芽細胞層が観察された. IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  陽性細胞は歯根が活発に吸収されている試料では歯髄内にはほとんど認められなかった (図2). しかし, 歯根全体がほぼ吸収された試料では, 歯冠底部から象牙質面に沿って残存歯髄内に多数の炎症細胞が浸潤しているのが観察された. IL-1 $\alpha$  および TNF- $\alpha$  陽性細胞は炎症細胞の浸潤とほぼ同様な分布状態を示し, 変性傾向を示す象牙芽細胞層に隣接した部位にも観察された (図3. A-C). また, 歯髄中央部でも IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞がわずかに認められた (図3. A-C). この時期の IL-6 陽性細胞は象牙芽細胞層に隣接して出現せず, 歯髄中央部の血管周囲に多く認められる傾向を示した

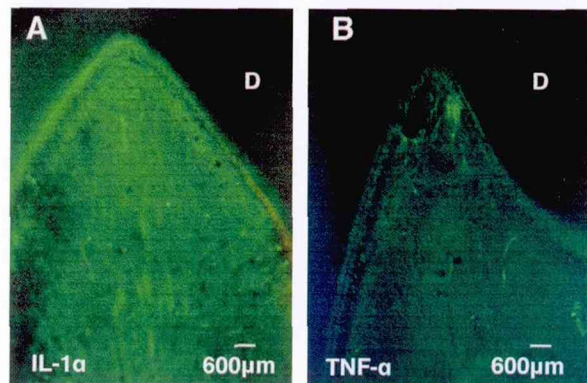


図2: 吸収前期の歯髄内の炎症性サイトカイン陽性細胞.

歯髄内には陽性細胞はほとんど認められない. D: 象牙質.

- A. IL-1 $\alpha$ , B. TNF- $\alpha$ .



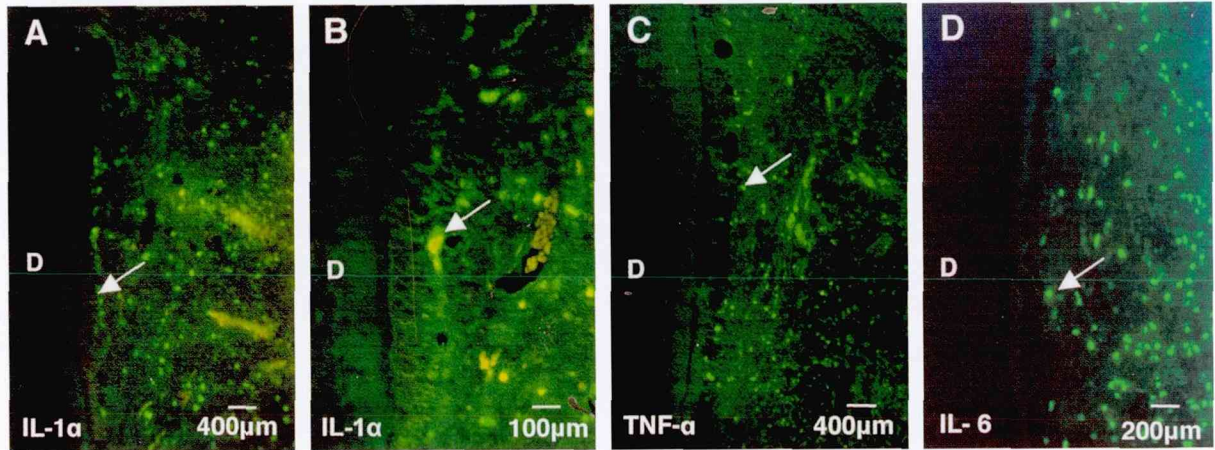


図3: 吸収前期の歯髄底部の炎症性サイトカイン陽性細胞。  
一部の陽性細胞は象牙芽細胞層に隣接して分布している (矢印)。 D: 象牙質。  
A. IL-1 $\alpha$ , B. IL-1 $\alpha$ , C. TNF- $\alpha$ , D. IL-6.

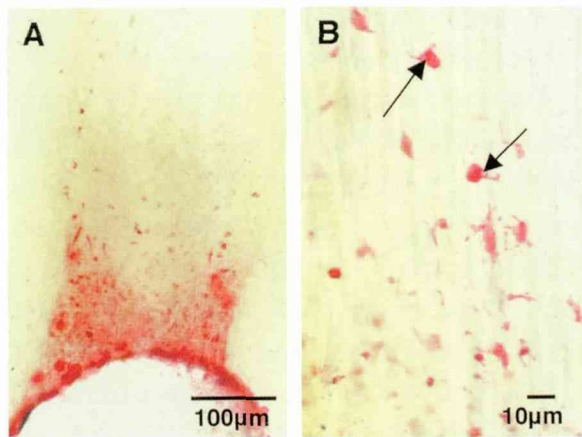


図4: 吸収初期の歯髄底部のTRAP陽性細胞の分布。  
A. 歯髄底部の象牙質上にTRAP陽性細胞が出現する。  
B. 髄角に近い部位では単核のTRAP陽性細胞だけである (矢印)。

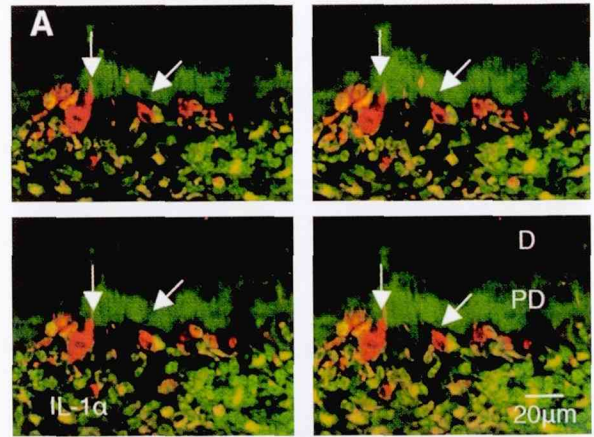


図5: 象牙前質を吸収しているTRAP陽性の単核および多核細胞に隣接した炎症性サイトカイン陽性細胞。  
A. IL-1 $\alpha$ . 共焦点レーザー顕微鏡像連続スライス像。象牙前質に接触しているTRAP細胞がほとんど単核であることがわかる (矢印)。  
B. IL-1 $\alpha$ . 象牙前質を吸収している多核のTRAP陽性細胞 (破歯細胞) の周囲には緑色の蛍光を持ったIL-1 $\alpha$ 陽性細胞が多数観察され (矢印)。 PD: 象牙前質, D: 象牙質。

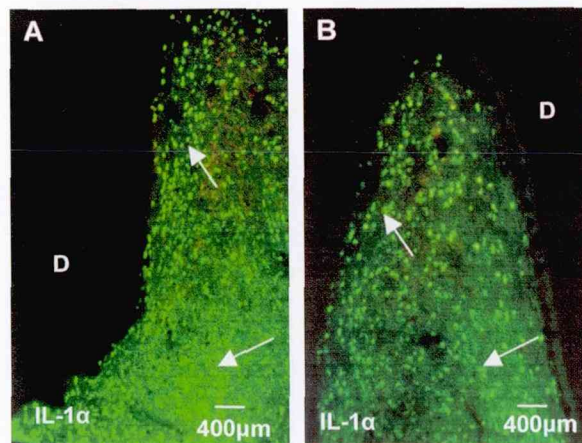


図6: 吸収初期の歯髄におけるIL-1 $\alpha$ 陽性細胞の分布。  
IL-1 $\alpha$ 陽性細胞数は増大し, 歯髄底部だけでなく髄角部まで分布している (矢印)。  
A. 歯髄底部, B. 髄角部。



(図 3.D).

2) 吸収初期 (Early resorption period).

図 4 には吸収初期の TRAP 活性染色したスライスを示した. この試料では, 歯冠底部だけに単核および多核の TRAP 陽性細胞が認められ (図 4.A), 髄角方向に進展していると思われる吸収領域では, ほとんどの TRAP 陽性細胞は単核であった (図 4.B). このような TRAP 陽性細胞の分化および分布変化は, 吸収前期に認められた

IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞の分布状態と密接な関連性を示していた. 吸収初期で最も特徴的なのは, 象牙前質上での TRAP 陽性細胞の分化過程である. 図 5 は象牙前質上に形成された単核および多核の TRAP 陽性細胞と周囲に分布する IL-1 $\alpha$  陽性細胞を示した. 象牙前質に接触している多数の単核の TRAP 陽性細胞に隣接して存在する円形あるいは楕円形の IL-1 $\alpha$  陽性細胞 (図 5.A) や, 象牙前質上で多核化したと考えられる

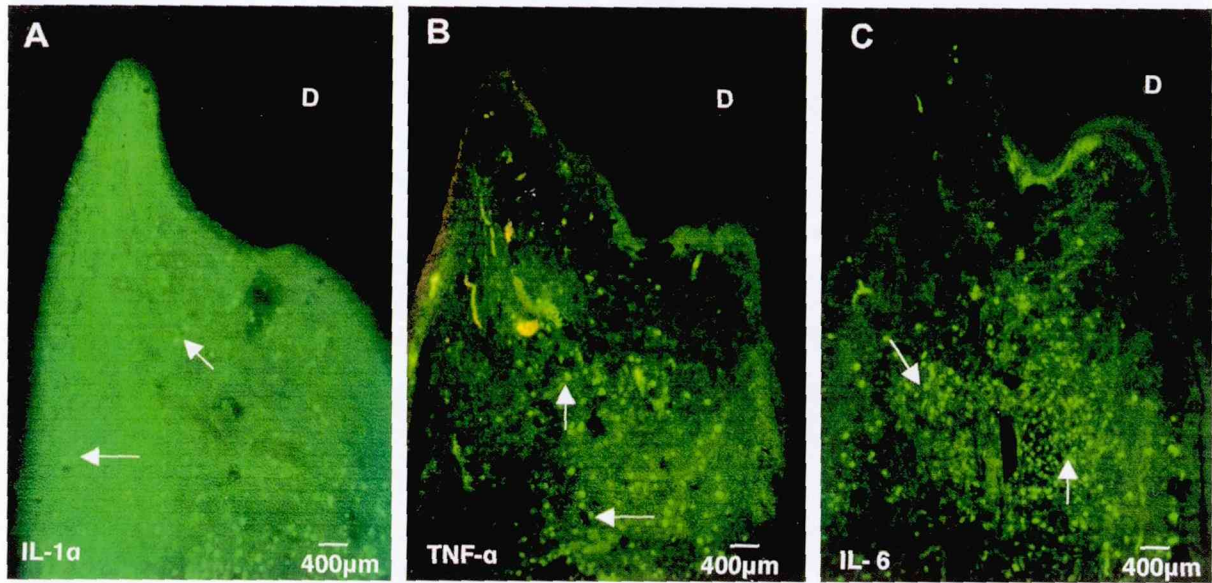


図 7 : 吸収初期の髄角部における各炎症性サイトカイン陽性細胞の分布.  
A. IL-1 $\alpha$ , B. TNF- $\alpha$ , C. IL-6.  
各サイトカイン陽性細胞 (矢印).

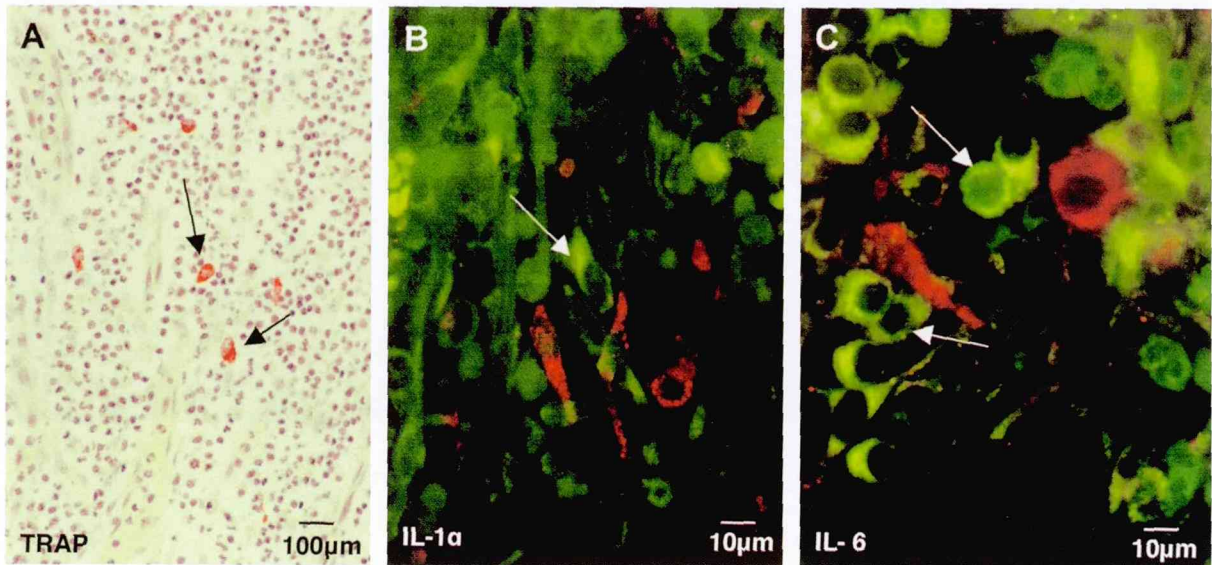


図 8 : 吸収後期. 歯髄中央部の TRAP 陽性細胞と炎症性サイトカイン陽性細胞の分布.  
A. 多数の TRAP 陽性単核細胞が認められる (矢印). TRAP 染色.  
B. IL-1 $\alpha$ . 歯髄内の TRAP 陽性細胞に隣接して, 陽性細胞が認められる (矢印).  
C. IL-6. TRAP 陽性細胞に隣接した陽性細胞 (矢印).



TRAP 陽性細胞 (破歯細胞) の周囲にはマクロファージ, 単球あるいは好中球と思われる多数の円形, 楕円形の IL-1 $\alpha$  陽性細胞が分布していた (図 5.B). しかし, この部位には IL-6 陽性細胞はほとんど観察されなかった. 内部吸収の進行に伴い, TRAP 陽性細胞は髓角方向に向かって

その数を増やしており, IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞も数が増大すると共に菌冠底部より菌髓壁面に沿うように髓角方向に広がっていた (図 6). また, 髓角部の菌髓でも IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  陽性細胞が散在的に分布していた (図 7).

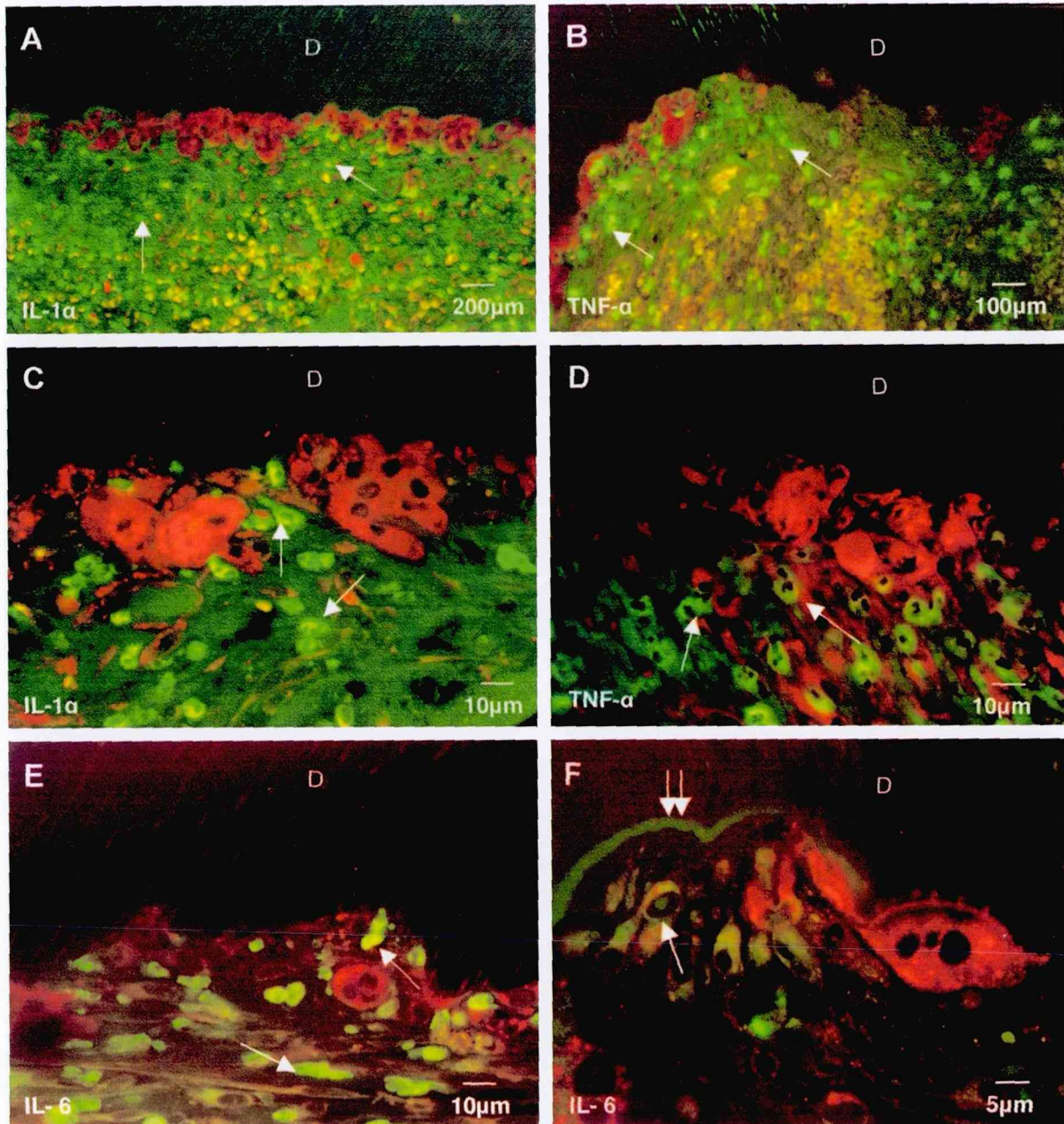


図 9 : 象牙質吸収部位の炎症性サイトカインの分布. 緑色の蛍光は各サイトカイン陽性細胞 (矢印), 赤色の蛍光は TRAP 陽性細胞を示す. なお, 黄色の蛍光は肥満細胞あるいは形質細胞の自家蛍光と思われる. D : 象牙質.

A. IL-1 $\alpha$ .

B. TNF- $\alpha$ .

C. IL-1 $\alpha$ .

D. TNF- $\alpha$ .

E. IL-6.

F. IL-6. 象牙質吸収窩表面 (二重矢印) とそれに隣接した単核細胞にも反応が認められた (矢印).



3) 吸収後期 (Later resorption period).

吸収後期になると、歯冠歯髄に面した象牙質全周に TRAP 陽性の多核の破歯細胞が認められる。残存歯髄の中央部は多数の炎症性細胞が分布し、正常な歯髄組織は観察されなかった。この時期には歯髄中央部に多数の TRAP 陽性の単核細胞が観察される (図8.A) と共に、TRAP 陽性細胞に隣接して多数の IL-1 $\alpha$ 、IL-6 陽性細胞が観察された (図8.B, C)。また象牙質の吸収面でも、TRAP 陽性の破歯細胞の周囲には多数の IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞が認められた (図9.A-D)。この時期には、IL-6 陽性細胞は歯髄中央部に分布しているだけでなく、吸収面の破歯細胞周辺にも多く分布していた (図9.E)。さらに、IL-6 抗体は象牙質の吸収窩表面のセメントラインや吸収窩表面の単核細胞にも反応を示した

(図9.F)。

2 電顕レベルでの炎症性サイトカイン陽性細胞の同定

歯冠象牙質の内部吸収過程における破歯細胞の分化と炎症性サイトカイン陽性細胞との関連性を検討するため、内部吸収の各段階における TRAP 陽性細胞の周囲に認められる IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  陽性細胞の同定を試みた。図10は、吸収後期の吸収面付近の IL-1 $\alpha$  陽性細胞の同定についての1例を示した。共焦点レーザー顕微鏡下では、多数の IL-1 $\alpha$  陽性細胞が認められた試料 (図10.A) を PAP 法で染色したものが図10.B である。同様な IL-1 $\alpha$  陽性細胞はペルオキシダーゼ活性染色により褐色に染まっている。この試料をエポン包埋後、1 $\mu$ m の厚さに厚切りしたものが図10.C で、OsO<sub>4</sub>固定により黒色に変化した免疫

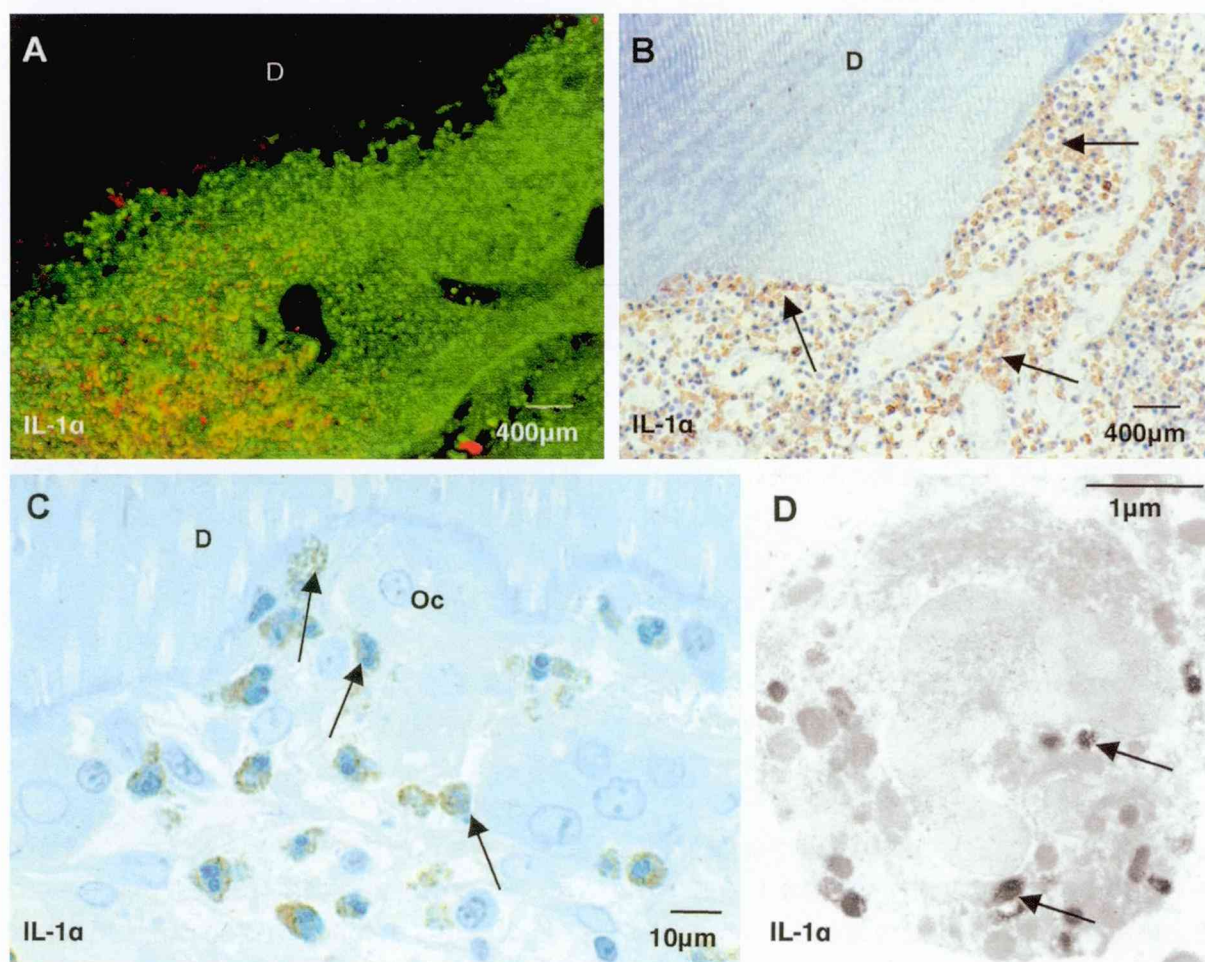


図10: 吸収後期. 象牙質吸収部位の IL-1 $\alpha$  陽性細胞.

- A. 共焦点レーザー顕微鏡像. 黄色は自家蛍光によるものと考えられる. D: 象牙質.
- B. PAP 法の免疫組織化学による光顕像. 多数の細胞が免疫反応を示している (矢印). D: 象牙質.
- C. 樹脂包埋の 1  $\mu$ m 厚切り切片. 陽性細胞 (矢印) が破歯細胞 (Oc) の周囲に多く観察される. D: 象牙質.
- D. 電顕像. 単球の細胞質内に免疫反応が認められる (矢印).

反応を持った多数の円形の細胞が, 多核の破歯細胞の周囲に散在している. 部位をさらに選定後, 超薄切片を透過電顕で観察したものが図10.Dである. 免疫反応産物を細胞質に持つやや大型の細胞は, 馬蹄形をした核などから単球であると同定できた. 同様な手順で各吸収段階での IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  陽性細胞の同定を行った結果, IL-1 $\alpha$  陽性細胞の大部分は, 単球やマクロファージであったが, 一部では好中球, 線維芽細胞あるいはリンパ球に免疫反応が認められた. IL-6 陽性細胞は単球やリンパ球が多かったが, その他には血管内皮細胞や線維芽細胞にも反応があった. TNF- $\alpha$  陽性細胞は主にマクロファージや好中球であり, 少数のリンパ球や線維芽細胞も反応を持っていた. しかし, 今回の観察では吸収段階での IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  陽性細胞の種類については顕著な差は認められなかった.

## 考 察

### 1 歯の吸収モデルとしてのヒト乳歯の内部吸収

脱落前に認められる乳歯周囲の歯肉の炎症と内部吸収の関連性については, 多くの研究者により報告されている<sup>16-19</sup>. 乳歯は生理的歯根吸収の進行に伴い, 次第に動揺を示し, 付着上皮は歯根方向へ深部増殖する. この深部増殖のため深くなった歯肉溝に, 口腔内細菌が常に歯肉組織を刺激し炎症を引き起こす. 歯根がほとんど吸収された脱落前のヒト乳歯では, この炎症は歯肉組織にとどまらず歯髄にも波及し, 乳歯の内部吸収を誘発するのではないかと考えられている. 我々もヒト乳歯の歯根長が1 mm 以下になると, 付着上皮周囲に認められた炎症性細胞が, 次第に歯冠歯髄内に侵入し, 乳歯の内部吸収が開始することを確認している<sup>4,6,14</sup>. このことから, ヒト乳歯の脱落前に認められる内部吸収は, いわゆる生理的歯根吸収とは異なり, 付着歯肉部の炎症に起因する現象で, 炎症に伴う歯の吸収と考えられる<sup>19</sup>.

脱落前のヒト乳歯の内部吸収過程を破歯細胞とその前駆細胞の TRAP 活性を指標とし検討すると, 破歯細胞による吸収は歯髄底部から始まり髄角部に向かって進行すること<sup>6,14</sup>, 破歯細胞による吸収は象牙前質から開始すること<sup>20</sup>など, 明確な経時的組織変化を伴って起こっていた<sup>6,14</sup>. 事実, 脱落前のヒト乳歯の内部吸収を観察モデルと

して, 破歯細胞の分化過程を *in vivo* で観察することも可能であった<sup>9</sup>. その後もこの観察モデルを用いて, 歯髄内の抗原提示細胞や免疫担当細胞の分布変化などについても報告されている<sup>21,22</sup>.

今回の観察でも明らかになったように, 脱落前に起こるヒト乳歯の内部吸収は炎症に伴う歯の吸収機構の解析には優れた *in vivo* の観察モデルと思われる. しかし, この内部吸収はあくまでも生理的歯根吸収の最終段階に認められる現象なので, 炎症だけでなく他のさまざまな要因(後続永久歯の萌出力や歯小囊の働き)の関与も考えなくてはいけないだろう. さらに, 歯髄側からの破歯細胞による吸収は, 通常は稀にしかみられない特異的な現象であることも理解しておく必要があるだろう. 上記の事柄を十分に考慮し, ヒト乳歯の内部吸収における破歯細胞の形成分化過程と歯髄内の細胞および組織変化についてさらに詳細に検討していきたいと考えている.

### 2 内部吸収過程における炎症性サイトカインの動態

口腔内細菌の感染により起こされる炎症に伴った骨吸収では, 形成された炎症巣には共に高い IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  活性が認められ, これらの炎症性サイトカインが炎症による骨吸収に重要な役割を果たしていることが予想された<sup>23,24</sup>. その後, IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  のそれぞれの炎症性サイトカインの可溶性受容体<sup>25</sup>の投与により, 炎症は抑えられ骨吸収も認められなくなったという報告から, 特に口腔内細菌の感染により誘発される炎症に伴う骨吸収には, IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインが重要な役割を果たしていることが示唆されている.

炎症性サイトカインと歯の吸収に関してはほとんど研究報告はないが, Zhang ら<sup>26</sup>が機械的刺激に伴う歯根吸収を観察モデルにし, IL-1 の可溶性受容体 (sIL-1RII) と TNF- $\alpha$  の可溶性受容体 (sTNF- $\alpha$ RI) を投与すると, 歯根吸収が有意に減少することを報告している. また, sTNF- $\alpha$ RI 投与群ではほぼ完全に歯根吸収が抑えられたことから, IL-1 よりも TNF- $\alpha$  が歯根吸収に関与していることを示唆している. しかし, 破歯細胞の分化とサイトカイン産生細胞の関連性について *in vivo* で検討した報告はない. そこで本研究では, 炎症性サイトカイン産生細胞が局所的に分



泌するサイトカインは、隣接した周囲の受容体を持つ細胞などに作用し、生理活性を及ぼしていると考え、ヒト乳歯の内部吸収過程における炎症性サイトカイン産生細胞の動態について検討した。今回は炎症性サイトカインの中でも特に骨吸収に関与していると考えられている IL-1 $\alpha$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  の3種類のサイトカインについて<sup>27)</sup>、内部吸収進行過程におけるサイトカイン産生細胞の動態について免疫組織化学的手法を用いて観察した。

今回の観察では、内部吸収が開始される前に、IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞が歯髄底部より歯髄腔壁に沿うように歯髄内に侵入していた。この時期の乳歯の象牙質表面にはまだ象牙芽細胞層が観察され、象牙芽細胞層に隣接して IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞が分布していた。一方、IL-6 陽性細胞も同時期に歯髄内に出現したが、そのほとんどは歯髄中央部の血管周囲に分布する傾向を示し、象牙芽細胞層に隣接した IL-6 陽性細胞はわずかであった。この炎症性サイトカイン間の歯髄内の分布の違いは、今回の観察でも明らかになったように、IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞のほとんどが単球やマクロファージであり、IL-6 陽性細胞のほとんどがリンパ球であるという細胞種の違いによるかもしれない。また、IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  は炎症の早期に産生され、その後 IL-6 が産生されるという炎症性サイトカインの産生時間の相違かもしれない。内部吸収が開始される直前の象牙芽細胞は、著しく扁平化したり、あるいは萎縮、消失したりすることはすでに顕微鏡や電顕レベルの観察から報告されている<sup>6,8,9)</sup>。象牙芽細胞層に隣接して分布している IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞がこのような象牙芽細胞の形態の変化と関連しているかについては明らかでない。しかし、それらの部位で続いて起こる象牙前質への破歯細胞の前駆細胞の接着現象などから、IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞が象牙芽細胞に何らかの影響を及ぼしている可能性も考えられる。

内部吸収の進行に伴い、IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞の分布は歯髄底から髄角部に向かって広がり歯髄内の陽性細胞数は増大した。また歯髄中央部でも毛細血管周囲に IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞が多数認められるようになり、一部の IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞は歯髄内の単核 TRAP 陽性細胞

と隣接して存在していた。歯髄内の IL-6 陽性細胞の細胞数も内部吸収の進行とともに増大し、その分布は歯髄中央部から辺縁部に広がっていた。しかし、IL-6 陽性細胞は象牙質表面より歯髄中央部の血管周囲に常に多く分布していたことは、IL-6 の主な役割である B 細胞の分化刺激に関連したものかもしれない。この時期になると歯髄組織のほとんどが様々な円形細胞により構成され、その中には TRAP 陽性の単核細胞も多数観察された。一部の IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞はこのように TRAP 陽性の単核細胞に隣接して存在していた。破歯細胞により象牙質が盛んに吸収されている吸収部位では、破歯細胞の周囲に常に IL-1 $\alpha$  と TNF- $\alpha$  陽性細胞が多数観察されたが、IL-6 陽性細胞はほとんど観察されなかった。Sahara ら<sup>6)</sup>は、ヒト乳歯の内部吸収での破歯細胞の分化過程を顕微鏡、電顕的に観察し、破歯細胞と同様に破歯細胞は血管から遊走した血液幹細胞である前駆細胞が石灰化基質に接着、多核化し歯の硬組織を吸収する破歯細胞に分化することを明らかにしている。今回の観察で、歯髄中央部に分布していた多数の単核 TRAP 陽性細胞は歯髄内の毛細血管から遊走した破歯細胞の前駆細胞と考えられる。これらの前駆細胞に隣接して存在した IL-1 $\alpha$ 、TNF- $\alpha$  あるいは IL-6 陽性細胞は、血管から歯髄組織内に遊走してきた前駆細胞に対して様々な影響を及ぼしていることが予想される。さらに、象牙質表面で観察された様々な分化段階を示す破歯細胞の周囲に常に IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞が隣接して認められたことは、この2つの炎症性サイトカインが破歯細胞の分化あるいは活性に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

内部吸収が終了する頃になると、象牙質表面には吸収能が低下した破歯細胞あるいは吸収が終了したと思われる破歯細胞が多くなる。このような破歯細胞の周辺では IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞数は減少し、代わりに IL-6 陽性細胞が頻りに認められるようになった。一部であるが、象牙質吸収窩表面のセメントライン様の構造物に IL-6 抗体に反応を示すものも認められた。また、歯の吸収窩のセメント質様硬組織による修復機構に重要な役割を果たしていると考えられている吸収窩表面の単核貪食細胞 (Mononuclear phagocytic

cell)<sup>28)</sup>も IL-6 抗体に反応を示した. このような IL-6 陽性細胞の分布変化や IL-6 抗体に反応する部位は, IL-6 は歯の吸収に関与するだけでなく, 吸収終了後に起こる修復機構に何らかの関与をしている事が考えられた. 従来 IL-6 は *in vivo* や *in vitro* で破骨細胞の分化, 機能を刺激する強力な骨吸収因子と考えられていたが, 最近になり骨芽細胞を活性化し骨形成に関与していることがわかってきた<sup>29)</sup>. また, IL-6 は IL-2, IL-4, IL-10 と同様に Th2 の T 細胞から分泌され, anti-inflammatory 活性や antiresorptive な活性をもっていることも報告されている<sup>30,31)</sup>. 炎症に伴う歯の吸収における IL-6 の役割についてはさらに検討が必要であろう.

### 3 内部吸収における炎症性サイトカイン以外の関与について

最近になり, 破骨細胞の分化, 活性化を調節していると考えられる多数の局所的あるいは全身の因子のネットワークが次第に明らかにされている<sup>32,33)</sup>. その中でも特に, TNF superfamily のタンパク質はこの過程の中心的な役割を果たしていると考えられている. Receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) は破骨細胞やその前駆細胞に発現している. 一方, Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL) は, 骨芽細胞や間質細胞に局在し, 破骨細胞と骨芽細胞あるいは間質細胞と細胞間の接触により, 破骨細胞形成に影響を与えている<sup>34)</sup>. また, RANKL のおとりの (decoy) 受容体である osteoprotegerin (OPG) は RANKL と結合することにより RANK の結合を競争阻害し, 破骨細胞の形成と分化を抑制している<sup>35)</sup>.

破骨細胞の形成分化に関係した RANK/RANKL-system の発現がヒト乳歯歯髄や歯根膜の細胞にも存在していることが報告され, 破骨細胞の形成, 分化も同様に RANK/RANKL-system で調節されている可能性も考えられている<sup>36-38)</sup>. Lossdorfer ら<sup>37)</sup>は, 歯根吸収されているヒト乳歯を用い RANK と RANKL の局在について免疫組織化学的に検索し, 象牙芽細胞, 歯髄内の線維芽細胞, 歯根膜の線維芽細胞及び破骨細胞に RANKL-immunoreactivity が認められ, RANK-immunoreactivity は象牙質の吸収窩周囲の多核の破骨細胞や単核の前駆細胞に認められること

を報告している. この結果から, ヒトの歯の組織では硬組織の吸収因子が発現しており, RANK/RANKL-system だけが歯の吸収の調節機構でないかもしれないが, これらの因子は少なくとも関与しているだろうと述べている. しかし最近になり, *in vitro* や *in vivo* で RANK/RANKL-system とは無関係に, IL-1 と TNF- $\alpha$  は破骨細胞に存在するそれぞれの受容体を介して破骨細胞の分化形成を刺激していることも報告されている<sup>39)</sup>. Vargas ら<sup>40)</sup>は生理的骨改造における IL-1 と TNF- $\alpha$  の役割について, これらのサイトカインの受容体である IL-1-R と TNF- $\alpha$ RI の knock out マウスを用いて検討し, 骨組織には異常は認められず骨吸収にも障害はなかったと報告し, これらのサイトカインは非生理的条件下での骨改造にだけ関与しているだろうと結論した. このことから, 生理的な骨吸収と炎症による骨吸収では破骨細胞の分化, 機能に関与している因子の違いも考えられている<sup>41)</sup>. また, IL-1 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインは骨芽細胞や間質細胞の RANKL の発現を刺激し, 骨周囲の微細環境や隣接する間葉細胞の RANKL と OPG のバランスを調節することにより, RANK/RANKL-system を調節しているのではないかと考えている研究者もいる<sup>42)</sup>.

今回の観察では, IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞の歯髄内の分布変化が, 歯髄底部より髄角方向に向かって次第に進行する破骨細胞の分化過程と密接に関係していることが明らかになった. このことから脱落前のヒト乳歯の内部吸収では, 歯肉上皮の深部増殖に伴った口腔内細菌により単球やマクロファージが刺激され分泌される炎症性サイトカインが関与している可能性が考えられる. 今後, ヒト乳歯の内部吸収を観察モデルとして用い, ヒト乳歯の内部吸収における破骨細胞の分化, 機能に RANK/RANKL-system がどのような関与をしているかについてもさらに詳細な検討をしていきたい.

## 結 論

脱落前のヒト乳歯の内部吸収を観察し, 内部吸収に関与する破骨細胞の分化過程と炎症性サイトカイン産生細胞の動態について免疫組織化学的手法を用い検討し以下のような結果を得た.



1. 内部吸収が開始されていない乳歯の歯髄内には炎症性サイトカイン陽性細胞はほとんど観察されなかった。
  2. 破歯細胞による吸収が最初に認められる歯冠底部の象牙質表面付近には、吸収前に IL-1 $\alpha$  や TNF- $\alpha$  陽性細胞が多数観察された。しかし、IL-6 陽性細胞は歯髄中央部に多かった。
  3. 内部吸収の進行に伴い吸収部位に隣接した IL-1 $\alpha$ , IL-6 や TNF- $\alpha$  陽性細胞が観察された。また、歯髄中央部でも炎症性サイトカイン陽性細胞が増加し、一部では TRAP 陽性の単核細胞と隣接して密接な関係をもっていた。
  4. 一部の吸収窩表面とそれに隣接した単核細胞は IL-6 抗体で反応を示し、IL-6 は破歯細胞の分化形成に関与するだけでなく、吸収窩表面の硬組織による修復過程にも関与している可能性もある。
- 以上の結果から、IL-1 $\alpha$ , IL-6, TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインは脱落前に認められるヒト乳歯の内部吸収過程において、破歯細胞やその前駆細胞の分化、誘導あるいは活性化に密接に関与している可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Furseth R (1968) The resorption of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography, and electron microscopy. *Arch Oral Biol* **13** : 417-31.
- 2) Ten Cate AR and Anderson RD (1986) An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. *J Dent Res* **65** : 1087-93.
- 3) Sasaki T, Shimizu T, Watanabe C and Hiyoshi Y (1990) Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. *J Dent Res* **69** : 67-74.
- 4) 佐原紀行 (2005) ヒト乳歯の吸収と脱落. *松本歯学* **31** : 213-29.
- 5) Sasaki T (2003) Differentiation and functions of osteoclasts and odontoclasts in mineralized tissue resorption. *Microsc Res Tech* **61** : 483-95.
- 6) Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T and Suzuki K (1996) Cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of Human deciduous teeth : An ultrastructural and cytochemical study. *Anat Rec* **244** : 33-49.
- 7) 大野紘八郎 (1972) ヒト乳歯歯根吸収時に出現する Odontoclast の電子顕微鏡的研究. *口病誌* **38** : 113-58.
- 8) 鈴木俊介 (1974) ヒトの乳歯象牙質吸収に関する電子顕微鏡的研究. *歯基礎誌* **16** : 186-224.
- 9) 大野和江 (1969) 生理的歯根吸収に伴う乳歯歯髄の変化に関する組織学的研究. *小児歯誌* **4** : 7-12.
- 10) Soskolne WA and Bimstein E (1977) A histomorphological study of the shedding process of human deciduous teeth at various chronological stages. *Arch Oral Biol* **22** : 331-5.
- 11) Rolling I (1981) Histomorphometric analysis of primary teeth during the process of resorption and shedding. *Scand J Dent Res* **89** : 132-42.
- 12) Francini E, Mancini G, Vichi M, Tollaro I and Romagnoli P (1992) Microscopical aspects of root resorption of human deciduous teeth. *Arch Ital Anat Embriol* **97** : 189-90.
- 13) 八若保孝 (1993) 酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性反応を利用したヒト乳歯に於ける破歯細胞の観察法. *歯基礎誌* **35** : 409-30.
- 14) Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Suzuki I, Deguchi T and Suzuki K (1992) Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentine prior to shedding of human deciduous teeth. *Arch Histol Cytol* **55** : 273-85.
- 15) Burstone MS (1958) Histochemical demonstration of acid phosphatase using AS phosphate. *J Nat Cancer Inst* **21** : 523-48.
- 16) Johnson H (1961) Epithelial activity in the exfoliation of the deciduous tooth and emerging permanent tooth. *J Dent Res* **40** : 1231-41.
- 17) Soskolne A and Bimstein E (1989) Apical migration of the junctional epithelium in the human primary dentition as a multifactorial phenomenon. *J Periodontics* **13** : 239-42.
- 18) Bernick S, Rutherford RL and Rabibowitch RZ (1951) Role of the epithelial attachment in tooth resorption of primary teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **4** : 144-50.
- 19) Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Yagasaki H, Deguchi T and Suzuki K (1993) Histological study of the exfoliation of human deciduous teeth. *J Dent Res* **72** : 634-40.
- 20) Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T and Suzuki K (1996) Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predentin in the shedding of human deciduous teeth. *Cell Tissue Res* **277** : 19-26.
- 21) Kannari N, Ohshima H, Maeda T, Noda T and Takano Y (1998) Class II MHC antigen-ex-

- pressing cells in the pulp tissue of human deciduous teeth prior to shedding. *Arch Histol Cytol* **61** : 1-15.
- 22) Angelova A, Takagi Y, Okiji T, Kaneko T and Yamashita Y (2004) Immunocomponent cells in the pulp of human deciduous teeth. *Arch Oral Biol* **49** : 29-36.
  - 23) Tani-Ishii N, Wang CY and Stashenko P (1995) Immunolocalization of bone resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol* **10** : 213-9.
  - 24) Wang CY, Tani-Ishii N and Stashenko P (1997) Bone-resorptive cytokine gene expression in apical lesions in the rat. *Oral Microbiol Immunol* **12** : 65-71.
  - 25) Azuma R, Oates T, Cochran D, Amar S and Graves DT (1998) IL-1 and TNF antagonists inhibit the inflammatory response and bone loss in experimental periodontitis. *J Immunol* **160** : 403-9.
  - 26) Zhang D, Goetz W, Braumann B, Bourauel C and Jaeger A (2003) Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. *J Periodontal Res* **38** : 324-32.
  - 27) Martin TJ, Romas E, Gillespie MT (1998) Interleukins in the control of osteoclast differentiation. *Crit Rev in Eukaryot Gene Expr* **8** : 107-23.
  - 28) Sahara N and Suzuki K (1993) Resorption and repair of human deciduous teeth: mononuclear phagocytic cells on the resorbed dentin surface in the transitional phase between resorption and repair. *Dentistry in Japan* **30** : 14-21.
  - 29) Franchimont N, Wertz S and Malaise M (2005) Interleukin-6: An osteotropic factor influencing bone formation? *Bone* **37** : 601-6.
  - 30) Balto H, Sasaki H and Stashenko P (2001) Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone distraction. *J Immunol* **69** : 744-50.
  - 31) Kawashima N and Stashenko P (1998) Expression of Bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* **44** : 55-66.
  - 32) Suda T, Takahashi N and Martin JT (1992) Regulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* **13** : 66-80.
  - 33) Katagiri T and Takahashi N (2002) Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Disease* **8** : 147-59.
  - 34) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinoshita M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Mornaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T (1998) Osteoclast differentiation factor and is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 3697-702.
  - 35) Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, Derose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R and Boyle WJ (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* **89** : 309-19.
  - 36) Oshiro T, Shibasaki Y, Martin J and Sasaki T (2001) Immunolocalization of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase, cathepsin K, matrix metalloproteinase-9, and receptor activator of NFkB ligand in odontoclasts during physiological root resorption of human deciduous teeth. *Anat Rec* **264** : 305-11.
  - 37) Lossdorfer S, Gotz W and Jager A (2002) Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappa B (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tiss Int* **71** : 45-52.
  - 38) Fukushima H, Kajiya H, Takada K, Okamoto F and Okabe K (2003) Expression and role of RANKL in periodontal ligament cells during physiological root-resorption in human deciduous teeth. *Eur J Oral Sci* **111** : 346-52.
  - 39) Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Tamaki M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita M, Yamaguchi K, Shima N, Yasuda H, Morinaga T, Higashio K, Martin J and Suda T (2000) Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* **191** : 275-85.
  - 40) Vargas SJ, Naprta A, Glaccum M, Lee SK, Kalinowski J and Lorenzo JA (1996) Interleukin-6 expression and histomorphometry of bones from mice deficient in receptors for interleukin-1 or tumor necrosis factor. *J Bone Mineral Res* **11** : 1736-44.
  - 41) Kudo O, Fujikawa Y, Itonaga I, Sabokbar A, Torisu T and Athanasou NA (2002) Proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ /IL-1 $\alpha$ ) induction of



- human osteoclast formation. *J Pathol* **198** : 220-7.
- 42) Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL and Khosla S (1999) Interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin and gene expression in human osteoblastic cells. *Bone* **25** : 255-9.