

[原著] 松本歯学 24 : 262~268, 1998

key words : 貪食細胞 — HRP — 歯根膜 — マクロファージ

歯根膜内の貪食能を有する細胞について

中村康洋, 芦澤雄二, 出口敏雄

松本歯科大学 歯科矯正学講座 (主任 出口敏雄教授)

長谷川 亨, 佐原紀行, 鈴木和夫

松本歯科大学 口腔解剖学第2講座 (主任 鈴木和夫教授)

The Phagocytic Cells in the Periodontal Membrane

KOYO NAKAMURA, YUJI ASHIZAWA and TOSHIO DEGUCHI

*Department of Orthodontics, Matsumoto Dental University School of Dentistry
(Chief: Prof. T. Deguchi)*

TORU HASEGAWA, NORIYUKI SAHARA and KAZUO SUZUKI

*Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University School of Dentistry
(Chief: Prof. K. Suzuki)*

Summary

To evaluate phagocytic cells in periodontal membrane under physiological condition, we used horseradish peroxidase (HRP) as a phagocytic tracer. 10-week-old male rats were injected intravenously with HRP, and sacrificed 1 hour after the injection. Upper jaws were dissected out, decalcified, and prepared for light and electron microscopic observations. Furthermore, immunohistochemical localization of macrophages in periodontal membrane was examined by using anti-rat macrophage monoclonal antibody, ED 2.

The following results were obtained :

1. Most of the phagocytic cells in the periodontal membrane can be found adjacent to the blood capillaries.
2. Electron microscopic observation revealed that most of these phagocytic cells were macrophages which had microvilli, secondary lysosomes with HRP and components of lipid-like drops in cytoplasm.
3. ED2 positive cells were found adjacent to the blood vessels in the periodontal membrane.

The results of this study suggest that phagocytic cells of HRP in the periodontal membrane are macrophages.

緒 言

歯根膜は歯と歯槽骨の間の厚さ50 μ m以下の特殊な線維性結合組織で、主に歯根膜線維と呼ばれている多数のコラーゲン線維束および線維芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞、未分化間葉細胞、種々の遊走細胞などの細胞成分から構成されている。歯根膜線維はそれぞれセメント質と歯槽骨に埋入されており、歯を歯槽窩に固定し、歯に加わった外力を緩衝させる働きをもっている。歯に加わった外力は歯根膜線維を介し、周囲の歯槽骨に伝わり、歯槽骨の改造を誘導させることもよく知られている¹⁾。また、歯根膜線維自体も、成長発育あるいは咬合圧の変化に敏感に対応し、線維束の破壊および再構築が比較的短時間で行われていることが報告されている¹⁻³⁾。

歯根膜線維の改造後、不要になったコラーゲン線維の処理機構について古くから検討がなされ、歯根膜内の線維芽細胞がコラーゲン線維の形成だけではなく、不要なコラーゲン線維の貪食をしている可能性が示唆されている⁴⁻¹³⁾。しかし、線維芽細胞が歯根膜中のコラーゲン線維の turnover のすべてに関与しているかについては疑問視されており、不要なコラーゲン線維の貪食処理に関しては、現在でも明確な結論が得られていない。

そこで本研究では、歯根膜組織内の貪食能を有する細胞を検討する目的で、horseradish peroxidase (HRP) を貪食能のトレーサーとして用い、光顕的、電顕的に観察した。さらにこれらの細胞とマクロファージとの関連性について調べるために、マクロファージに対する特異抗体を用い免疫組織学的に観察し、比較検討した。

材料および方法

実験には10週齢のWistar系雄性ラット(体重250 \pm 15g)10匹を用い、HRP投与群5匹、免疫組織学的観察群5匹に分けた。

1. HRPの取り込み実験

HRP (Type IV Sigma, USA) 90mgを生理食塩水1mlに溶解させ、ラットの尾静脈より静注した。HRP静注1時間後エーテル麻酔を施し、4%パラホルムアルデハイド・0.5%グルタルアルデハイド混合液(10mmol/Lカコジル酸緩衝液, pH 7.3)で左心室より灌流固定を

行った。灌流固定後上顎骨を摘出し、さらに同液で12時間浸漬固定した。試料はカコジル酸緩衝液でよく洗った後、10% EDTA-2Na (10mmol/Lカコジル酸緩衝液, pH 7.3, 4 $^{\circ}$ C)で約1カ月脱灰した。その後、試料はマイクロスライサー(Dosaka, 京都)で咬合平面に平行に50 μ mの水平断連続薄切片とした。薄切片は、0.002% H₂O₂加0.01% 3, 3'-diamino-benzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma, USA) 溶液中で10~15分間反応し、HRPの局在を可視化した。反応後、一部の試料はグリセロールゼラチン(Merck, Germany)で封入し光学顕微鏡で観察した。さらに、薄切片は1% OsO₄ (10mmol/Lカコジル酸緩衝液, pH 7.3)で1時間後固定し、上昇エタノール系列で脱水後、エポキシレジン(Quetol 812, 日新EM, 東京)に包埋し、ガラスナイフで1 μ mの厚切り切片をRMC 6000ウルトラマイクロトームで作製し、トリジンブルー染色を施し光学顕微鏡で観察した。上記の厚切り切片で観察部位を選定し、トリミング後、ダイヤモンドナイフを用い、同ウルトラマイクロトームにて超薄切片を作製し、ウラン・鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡(JEOL-1200EX)で観察した。

2. 免疫組織化学的観察

実験動物をエーテル麻酔後、4%パラホルムアルデハイド(10mmol/Lリン酸緩衝液, pH 7.3)で左心室より灌流固定した。その後上顎骨を摘出しさらに同液で12時間浸漬固定した。試料は10% EDTA-2Na (10mmol/Lリン酸緩衝液, pH 7.3, 4 $^{\circ}$ C)で約1カ月脱灰した。各試料は30%ショ糖液にて氷結防止処理を行った後、O. C. T. compound (Polyscience, USA)に包埋し、液体窒素で急速に凍結させ、クリオスタット(Microm HM 500)で咬合平面に平行に14 μ mの水平断連続切片とした。免疫染色は以下に述べるように行った。切片はまず0.6% H₂O₂加メタノールを5分間作用させ内因性ペルオキシダーゼを除去し、非特異的反応を防止する目的で10%正常ウサギ血清(Antibodies Incorporated, USA)を20分反応させた。PBSで切片を洗った後、一次抗体としてマウス抗ラットED2モノクローナル抗体(BMA, Switzerland)を1000倍希釈し室温で2時間反応した。PBSで洗った後、二次抗

体として100倍希釈したビオチン標識したウサギ抗マウス IgG 1 (ZYMED, USA) に20分間反応させた。切片は PBS で十分洗った後, Strept AB-Complex/HRP (DAKO, Denmark) で30分反応させた。その後0.002% H₂O₂加 DAB 溶液 (5

mmol/L トリス塩酸緩衝液, pH 7.6) 中で切片を10~15分反応後, 光学顕微鏡で観察した。

結 果

上顎第一臼歯の遠心舌側根周囲歯根膜では, 歯

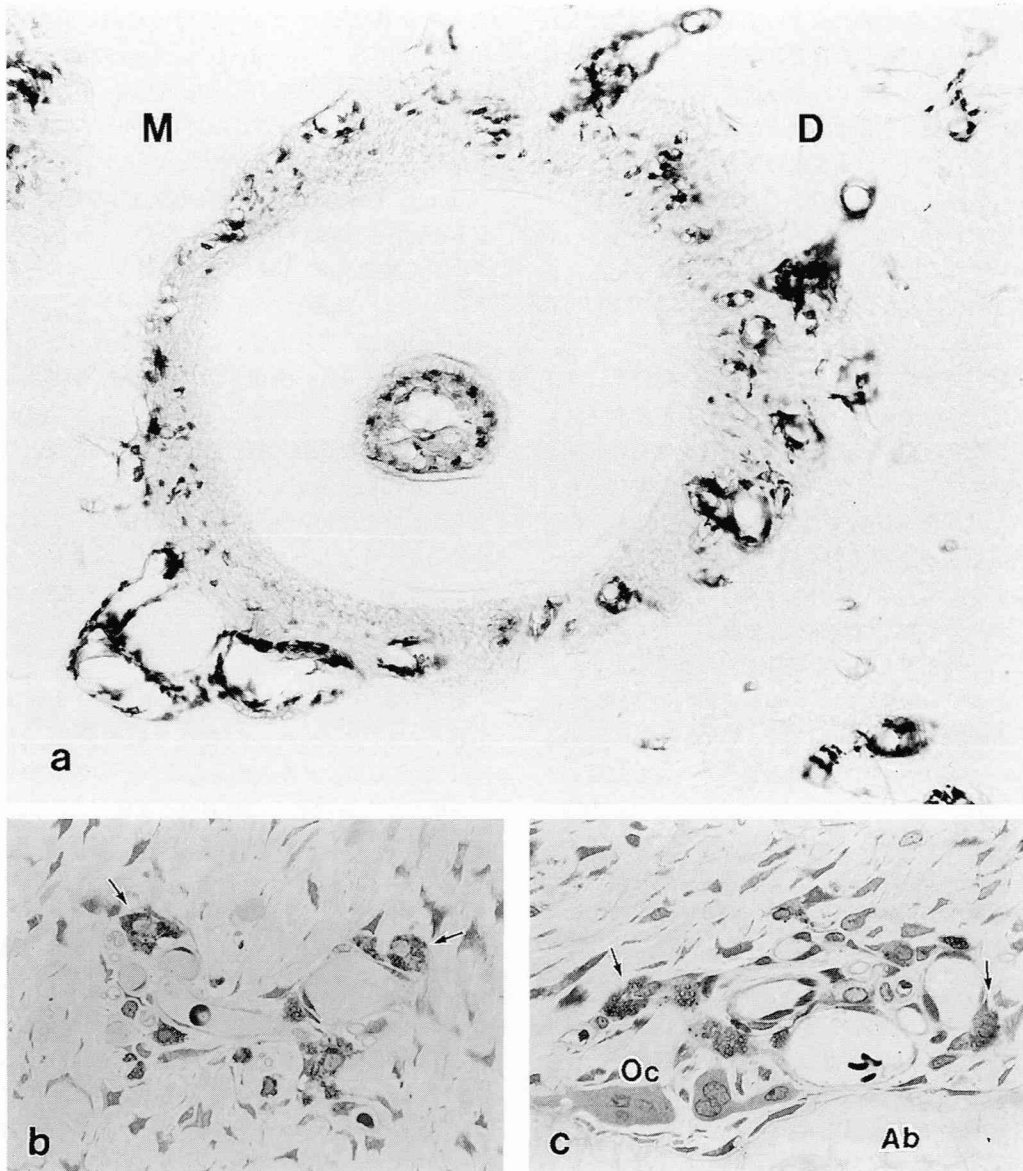


図1：HRPを貪食した細胞（ラット上顎第一臼歯遠心舌側根部）

- a：50 μ m のマイクロスライサー切片, HRP を貪食した細胞は歯根全周の歯根膜に分布していた。また歯髓内にも HRP を貪食した細胞が認められた (M：近心側, D：遠心側)。×115
 b：HRP を貪食した細胞 (矢印) は歯根膜の中央部の血管の周囲に認められた。×480
 c：遠心側の歯槽骨 (Ab) 表面に隣接した血管周囲にも HRP を貪食した細胞が認められた (矢印)。Oc (破骨細胞) ×480

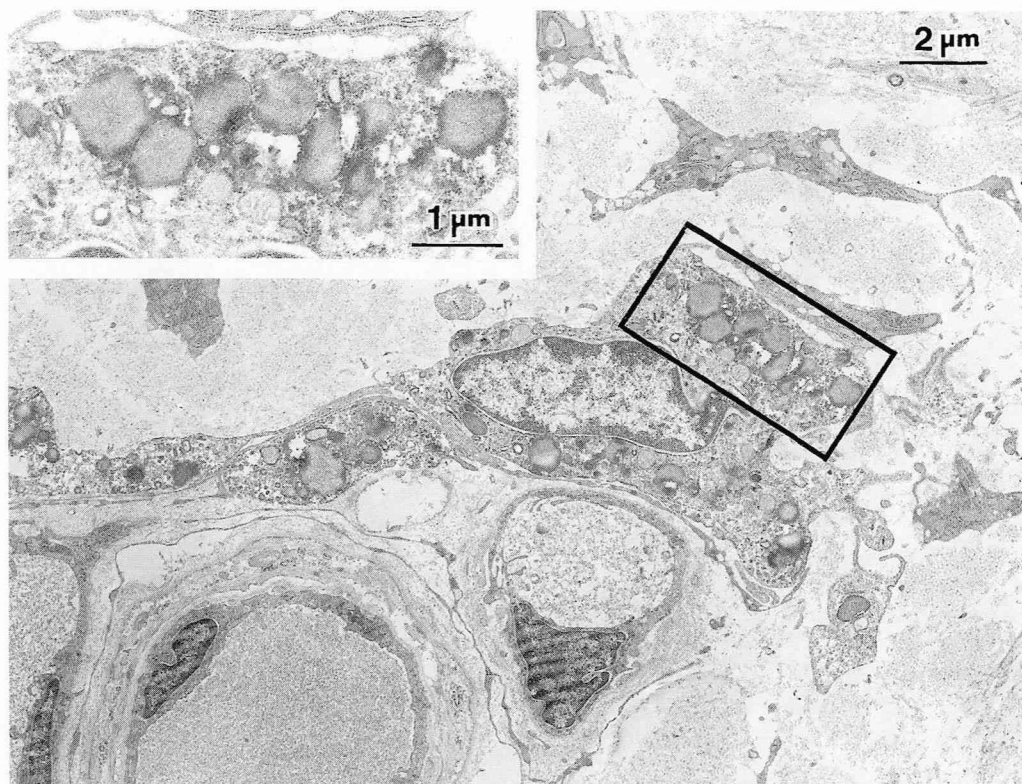


図2：HRPを貪食した細胞の電顕像

歯根膜内の血管に隣接した不定形の細胞の細胞質内に HRP の取り込み像が認められる。×6,000

挿入図：HRP は脂肪滴を含んだ二次ライソゾーム内に集中していた。×12,000

根膜の全周にわたり HRP を貪食した細胞が認められ、貪食細胞は主に歯根膜中央部から歯槽骨側に多く分布していた。また歯髄内にも象牙前質に隣接した部位に多くの HRP を貪食した細胞が観察された (図1 a)。歯根膜中央部を拡大すると、HRP を貪食した細胞は血管周囲に認められた (図1 b)。また遠心側の歯槽窩の血管周囲にも多数の HRP を貪食した細胞が認められた (図1 c)。

これらの HRP を取り込んだ細胞を電顕で観察すると、血管周囲に不定形の細胞の細胞質内に HRP の反応が観察された (図2)。細胞質内の HRP の反応は脂肪滴を含んだ二次ライソゾームと思われる構造物に集中していた (図2挿入図)。これらの HRP を貪食した細胞は、電子顕微鏡的観察による微細構造の特徴からマクロファージと考えられた。なお今回の観察では、歯根膜内の線維芽細胞にはほとんど HRP の取り込

みを示す像は観察されなかった。

これをさらに明確にするために、マクロファージの膜抗原に対するモノクローナル抗体である ED 2 を一次抗体として用いて免疫組織化学的染色し、歯根膜内の HRP を貪食する細胞の分布とマクロファージの分布を比較検討した。図3 a は遠心舌側根周囲の歯根膜内の ED 2 陽性細胞を示したものである。図1 a に示した HRP を貪食した細胞の分布と比較するとほとんど同様で、歯根膜内および歯髄内に ED 2 陽性細胞が観察された。歯根膜では、血管周囲 (図3 b) および遠心歯槽窩に隣接した血管周囲に多数の ED 2 陽性細胞が認められた (図3 c)。

考 察

歯根膜は、歯を支持するためには適当な張力が必要で、咀嚼・咬合などの機能を営んでいる生理的状态、あるいは萌出、生理的歯の移動、顎の成

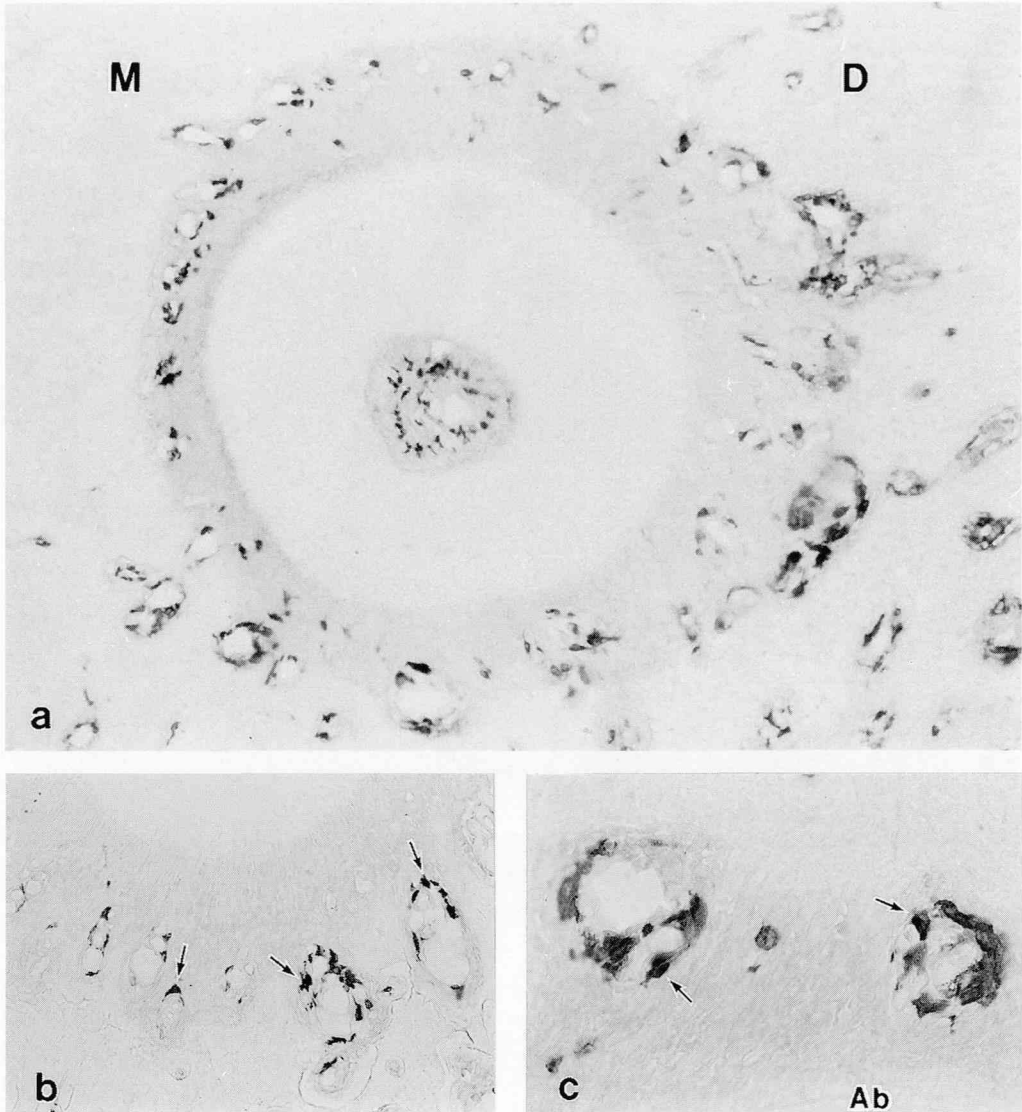


図3：ED 2 陽性細胞（ラット上顎第一臼歯遠心舌側根部）

- a：ED 2 陽性細胞は歯根全周の歯根膜内に分布していた。歯髄内にも ED 2 陽性細胞が認められた（M：近心側，D：遠心側）。×115
 b：ED 2 陽性細胞（矢印）はほとんどが歯根膜内の血管周囲に認められた。×100
 c：一部では歯槽骨（Ab）に隣接した血管周囲にも多数の ED 2 陽性細胞（矢印）が観察された。×480

長に伴い、常に破壊、形成、再構築などの改造が行われている。歯根膜内のコラーゲン線維の turnover は速く、ラットではハーフライフは24時間以内で、歯肉や皮膚の turnover に比較し5から15倍と言われている^{1,2)}。このため、歯根膜内の改造後、不要になったコラーゲン線維の除去機構に関しては、古くから興味を持たれ、線維芽細胞

によって貪食消化されるという報告⁶⁻¹⁰⁾、あるいは、破骨細胞、線維芽細胞、異物巨細胞、マクロファージ、血管内皮細胞など種々の細胞により貪食消化されるという報告がある^{14,15)}。また、実験的歯の移動により生じた歯根膜の変性組織の除去には多核巨細胞や単核のマクロファージ様細胞の関与を示唆している報告もある^{16,17)}。しかし、

歯根膜内の不要なコラーゲン線維の処理機構に関しては現在でも不明な点が多い。そこで、本研究では歯根膜内の貪食能を持った細胞を調べるためのトレーサーとして広く用いられている HRP を実験動物に静注し、貪食細胞を可視化させ光顕的、電顕的に観察した¹⁸⁻²⁰⁾。

ラットに対して HRP を投与した実験報告は、現在まで、100から120 g のラットに120 mg/kg 投与した実験¹⁹⁾、5 週齢のラットに50 mg で行ったもの²⁰⁾がある。本実験では、使用したラットの体重や前記の実験結果^{19,20)}を考慮にいれ、HRP 90 mg を静脈注射にて投与した。

ラット上顎歯槽骨は生理的条件下で、遠心側では骨吸収が、近心側では骨添加が行われていることは知られている。しかし、Ashizawa et al.²¹⁾は、上顎第一臼歯の5 根の周囲の歯槽骨の生理的改造を鉛ラベリング法を用いて観察し、5 根周囲の歯槽骨の改造には差異が認められ、特に遠心舌側根周囲歯槽骨で近心側の骨形成、遠心側の骨吸収という骨改造パターンが最も顕著であると報告している。そこで今回の観察では、歯根周囲歯槽骨の骨改造パターンの明確である遠心舌側根周囲の歯根膜組織について検討した。

本実験の結果、HRP を取り込んだ細胞は歯根膜内の血管周囲に特異的に多く認められた。電顕的にはこれらの細胞はほとんど不定形で、細胞質内には多くの二次ライソゾームが認められた。貪食された HRP の反応は二次ライソゾーム内に常に観察された。これらの HRP を貪食した細胞は微細構造学的にマクロファージと考えられた。しかし、今回の実験では歯根膜内の線維芽細胞などに HRP の貪食像は認められなかった。

Tanaka et al.²²⁾、森岡²³⁾は HRP よりさらに分子量の小さい microperoxidase (MP) をトレーサーとして用い、歯の移動時の歯周組織の貪食細胞を観察し、破歯細胞と破骨細胞の ruffled border から MP が吸収されているのを報告している。しかし、歯根膜内の貪食能をもった細胞については言及していない。また、永井ら²⁴⁾は投与したフェリチンが線維芽細胞に取り込まれていたと報告している。このような貪食能を持つ細胞の差異は、トレーサーとして用いた物質の差によるものか、あるいは投与量、投与後の経過時間によるものか明らかではなく、この点についてはさらに

検討が必要であると思われた。

歯根膜内の貪食能を示す細胞がマクロファージであることを確認するため、本研究ではマクロファージのモノクローナル抗体である ED 2 により²⁵⁻²⁷⁾、歯根膜内のマクロファージの分布を免疫組織化学的に観察した。その結果、ED 2 陽性細胞が HRP を貪食した細胞とほぼ同じ分布を示すことが明らかになった。これらの結果から、歯根膜の改造時に不要になったコラーゲンなどは主にマクロファージにより貪食消化処理が行われることが示唆された。また今回の観察では、骨改造が盛んに行われている歯根膜遠心側の歯槽骨表面に隣接した血管周囲にも HRP を貪食しているマクロファージが多数観察され、これらのマクロファージは歯根膜線維の改造だけでなく、歯槽骨の改造にもなんらかの関与をしている可能性が示唆された。今後、歯根膜の改造が盛んに行われる実験的歯の移動後における歯根膜内の貪食細胞の動態について、さらに検討するつもりである。

結 論

歯根膜内の貪食能を持つ細胞を検索する目的で、HRP を貪食能のトレーサーとして用い、光顕的、電顕的に観察した。またマクロファージに対する特異抗体を用い、歯根膜内のマクロファージの分布についても検討した。

1. 歯根膜内の HRP を貪食する細胞は、歯根膜内の全周に分布し、特に血管周囲に観察された。
2. HRP の反応は、貪食細胞の二次ライソゾーム様の構造物に認められた。
3. マクロファージの特異的抗体 ED 2 を用いた免疫組織化学的観察を行った結果、歯根膜内の ED 2 陽性細胞の分布は HRP を貪食した細胞の分布とほぼ同様であった。

参 考 文 献

- 1) Bhaskar SN (1986) Orban's oral histology and embryology, 10th ed, 198-231, Mosby, St. Louis.
- 2) 下野正基, 山村武夫, 井上 孝 (1986) 歯根膜の構造と機能. 日本歯科医師会雑誌 39: 809-18.
- 3) Carneiro J and Fava de Moraes F (1965) Radioautographic visualization of collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. Arch oral Biol 10: 833-48.

- 4) Rippin JW (1976) Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. I. Young rat molars. *J Period Res* **11** : 101—7.
- 5) Sodek J and Ferrier JM (1988) Collagen remodelling in rat periodontal tissues : Compensation for precursor reutilization confirms rapid turnover of collagen. *Collagen Rel Res* **8** : 11—21.
- 6) Ten Cate AR (1972) Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodelling. *J Anat* **112** : 401—14.
- 7) Ten Cate AR and Deporter DA (1974) The role of the fibroblast in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse. *Archs oral Biol* **19** : 339—40.
- 8) Ten Cate AR, Deporter DA and Freeman E (1976) The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am J Orthod* **69** : 155—68.
- 9) Garant PR (1976) Collagen resorption by fibroblast : A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. *J Periodontol* **47** : 380—90.
- 10) 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—18.
- 11) Sodek J, Brunette DM, Feng J, Heersche JNM, Limeback HF, Melcher AH and Ng B (1977) Collagen synthesis is a major component of protein synthesis in the periodontal ligament in various species. *Archs oral Biol* **22** : 647—53.
- 12) Rygh P, Bowling K, Hovlandsdal L and Williams S (1986) Activation of the vascular system : A main mediator of periodontal fiber remodeling in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* **89** : 453—68.
- 13) Lekic P and McCulloch CAG (1996) Periodontal ligament cell populations : The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec* **245** : 327—41.
- 14) Gould GS (1968) *Collagen*, 309, Academic Press Inc, New York.
- 15) Parakkal PF (1969) Involvement of macrophages in collagen resorption. *J Cell Biol* **41** : 345—54.
- 16) Brudvik P and Rygh P (1994) Multi-nucleated cells remove the main hyalinized tissue and start resorption of adjacent root surfaces. *Eur J Orthod* **16** : 265—73.
- 17) Kvam E (1970) A study of the cell-free zone following experimental tooth movement in the rat. *Europ Orthodont Soc Trans* **45** : 419—34.
- 18) Straus W (1967) Methods for the study of small phagosomes and their relationship to lysosomes with horseradish peroxidase as a “marker protein”. *J Histochem Cytochem* **15** : 375—80.
- 19) McDougall WA (1970) Pathways of Penetration and effects of horseradish peroxidase in rat molar gingiva. *Archs oral Biol* **15** : 621—33.
- 20) Yokoyama J and Sasaki T (1986) Peroxidase penetration in the crevicular epithelium of rat molar gingiva. *Archs oral Biol* **31** : 5—15.
- 21) Ashizawa Y, Matsuda Y, Okafuji N, Toyoki A, Nishimoto M, Sahara N, Suzuki K and Deguchi T (1995) Use of a chronological lead-labeling technique for the quantitative study of bone formation in the alveolar wall of the rat molar. *Jpn J Oral Biol* **37** : 306—13.
- 22) Tanaka T, Morioka T, Ayasaka N, Iijima T and Kondo T (1990) Endocytosis in odontoclasts and osteoclasts using microperoxidase as a tracer. *J Dent Res* **69** : 883—9.
- 23) 森岡 尚 (1990) 破歯細胞および破骨細胞とその関連細胞に関する microperoxidase を用いた細胞化学的研究. *日矯歯誌* **49** : 22—36.
- 24) 永井教之, 竹下信義, 寺尾導子, 小西輝昌, 松井一成, 見明康雄, 沢田隆 (1982) ラット歯根膜細胞のコラーゲン貪食能に関する電顕的研究. *岡山歯誌* **1** : 11—8.
- 25) Dijkstra CD, Döpp EA, Joling P and Kraal G (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED 2 and ED3. *Immunology* **54** : 589—99.
- 26) Jäger A, Radlanski RJ and Götz W (1993) Demonstration of cells of the mononuclear phagocyte lineage in the periodontium following experimental tooth movement in the rat. *Histochemistry* **100** : 161—6.
- 27) Okiji T, Kawashima N, Kosaka T, Matsumoto A, Kobayashi C and Suda H (1992) An immunohistochemical study of the distribution of immunocompetent cells, especially macrophages and Ia antigen-expressing cells of heterogeneous populations, in normal rat molar pulp. *J Dent Res* **71** : 1196—202.