

[原著] 松本歯学 20 : 43~49, 1994

key words : モデル実験 — 根管充填歯 — 皮下反応 — 多核巨細胞

ラットの皮下に自家移植した根管充填歯に対する組織反応

長谷川博雅, 武井則之, 枝 重夫

松本歯科大学 口腔病理学講座 (主任 枝 重夫 教授)

長谷川貴子

はせがわ歯科医院

Tissue Reactions to Root-Canal-Filled Teeth Autotransplanted Subcutaneously into the Rat

HIROMASA HASEGAWA, NORIYUKI TAKEI and SHIGEO EDA

*Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental College
(Chief : Prof. S. Eda)*

TAKAKO HASEGAWA

Hasegawa Dental Clinic

Summary

The tissue reactions to a root canal filling material and transplanted teeth through the experimental models were studied. Tooth columns were made from lower incisors which were removed from ten-week-old Wistar rats anesthetized. Canals of the columns were enlarged and filled with calcium-hydroxide paste mixed with silicone-oil. These tooth columns and removed teeth for control were autotransplanted into subcutaneous tissues. At 3 to 28 days after the experiment, these materials with surrounding tissues were removed and examined histopathologically. Results are as follows :

Granulation tissue with macrophages and multinuclear giant cells (MGCs) proliferated around the paste after 7 days. MGCs had already appeared close to the cut surfaces of the dentin mimicking the root apices at 7 days, while there were few MGCs in the controls at this stage. After 14 days, MGCs formed resorption lacunae on dentin surfaces both in the experiments and the controls. Furthermore, in the experimental specimens at 28 days, a MGC was observed lying on both the dentin and the paste. In the control specimens at the same days, tooth pieces with resorption lacunae were encapsulated by thin fibrous tissue.

In conclusion, this experimental model is thought to be useful to investigate tissue reactions to filling paste and to clarify the behavior of MGCs, because our experiment seems to be able to bring the same histopathological changes as that of the periapical tissue after root canal filling.

結 言

本邦では乳歯の根管充填に糊剤が広く使用されているが、根管充填後の根端歯周組織の反応に関する研究は意外に少なく、その多くは臨床病理学的な立場から検索されたものである^{6,8)}。また近年、破骨細胞に関する研究は隆盛をきわめているが、破歯細胞に関するものは少ない。しかもその研究対象の多くが、乳歯根の生理的吸収¹⁴⁾や矯正時の歯牙移動¹⁾におけるものである。

これまで著者は、幼犬乳歯の溢出糊剤に対する根端周囲組織の反応について検索してきた。その結果、糊剤の処理反応が歯根吸収に影響を及ぼすことを明らかにした⁷⁾。しかしながら、この実験では根管充填状態や実験開始時期が、必ずしも一定しない。また生理的歯根吸収による破歯細胞の出現や、後継永久歯の萌出にともなう破骨細胞の出現が背景に存在するなどの問題がある。従って、過剰根管充填と破歯細胞の出現との相関関係や多核巨細胞の機能を追究するための実験系としては、適当ではないと考えられた。

そこで歯根吸収と糊剤の処理との関係や充填によって誘導される単核あるいは多核巨細胞の性格をより詳細に検索するために、根端周囲組織の実験モデルを作製し、様々な角度から検討することを計画した。今回は、その実験モデルにおける組織反応を病理組織学的に検索したので報告する。

材料と方法

生後10週のSD系の雌ラット(20匹)を室温約22~25°Cの動物室内の金属性ケージに5匹ずつ入れ、固形飼料(DS:オリエンタル酵母株式会社)と水で1週間飼育観察し、健康状態良好であることを確認後、以下の実験を行った。ペントバルビタールナトリウム(Nembutal[®]:大日本製薬株式会社)を用いて腹腔内麻酔(10 mg/匹)を施し、抜歯鉗子で左右の下顎切歯歯冠部を離断した。左側の歯牙片は手用リーマーとファイル(Zdarsky Ehrler GmbH Co. KG, Germany)を用いて40サ

イズまで根管拡大し、滅菌生理食塩水で洗浄後、水酸化カルシウム系糊剤根管充填剤(ビタベックス[®])を充填した。この際、糊剤を歯牙片の断面に対して過不足なく充填した。右側は未処置のまま対照として用いた。これらの切歯は切端側・根端側ともに長軸にほぼ直角の断面を形成し、約4 mmの円柱形の歯牙片とした。両側の歯牙片は、左右の背部皮下に自家移植し、3, 7, 14および28日間の4群に分けて飼育した。実験終了後、歯牙片と周囲組織を一塊に取り出し、8%蔗糖加2%グルタルアルデヒドで4°C、4時間固定し、10%EDTAで3週間脱灰した。脱灰試料は、通法に従って光顕用樹脂に包埋し、薄片にヘマトキシリン・エオシン染色を施して鏡検した。また非特異的エステラーゼ活性をナフトールASリン酸同時カップリング法で検出した。

結 果

歯牙片の両断端部を根端孔部と仮想し、同部に関する所見を以下に記載する。

1) 3日例

対照群の歯髓腔では、若干の変性あるいは壊死などの退行性変化と円形細胞浸潤を認めたものの、歯髓固有細胞などの細胞成分は残存していた。仮想根端部では、少数の好中球や単核細胞が浸潤していた(図1)。非特異的エステラーゼ活性を検出した結果、これらの単核細胞の細胞質には陽性顆粒が観察され、特に核周囲に粗大顆粒を認めた(図2)。

実験側の円形細胞浸潤は、対照群よりも高度で、仮想根端孔を中心にほぼ同心円状に出現していた。特に仮想根端孔部の糊剤に近接した組織には、単核細胞に加えて多数の好中球が認められた。この実験群では、多核巨細胞は観察できなかった(図3, 4)。

2) 7日例

対照群ではまだ充血が残っていたが、円形細胞の浸潤は減少し、線維芽細胞や膠原線維から成る被膜が歯牙片の周囲を囲繞しはじめていた。多核

巨細胞はほとんど見られなかった(図5)。

実験群でも、特に好中球の著明な減少が観察された。しかし糊剤や歯牙片周囲では、単核細胞が浸潤し、これらの細胞質内には空腔が見られ、大小の印環型の細胞として観察された。また象牙質面には、不整形の大型細胞で、不規則に配列した核を備えた多核巨細胞が出現していた。しかし、吸収窩はほとんど形成されていなかった(図6)。

3) 14日例

対照群では円形細胞がほとんど消失し、線維芽細胞と膠原線維主体の菲薄な肉芽組織が歯牙片を被包していた。仮想根端孔部の象牙質面には多核巨細胞が出現していたが、吸収窩の形成はわずかであった(図7)。

実験群では、仮想根端孔外に露出した糊剤周囲に、大小多数の類円形の空隙が散在していた。その空隙の周囲には異物巨細胞やマクロファージの核が見られ、対照群と同様に円形細胞の浸潤数は減少していた。象牙質面には波状の吸収窩が形成され、吸収窩内には奇怪な形態の核を有した扁平な多核巨細胞が存在していた(図8 a, 8 b)。

4) 28日例

対照群では14日例と同様に、線維芽細胞と膠原線維を主体とした菲薄な肉芽組織が、歯牙片を取り囲んでいた。象牙質面には吸収窩が多数見られるようになり、同部には扁平な多核巨細胞が認められた(図9)。

実験群でも明らかな吸収像があり、象牙質面には単球やマクロファージなどの単核細胞とともに、扁平な多核巨細胞が吸収窩を形成していた。糊剤の周囲には多数のマクロファージや空隙を囲む多核巨細胞が多数観察された。さらにある多核巨細胞は、糊剤と歯質の双方に接していた(図10)。

考 察

シリコーン・オイルを含有する糊剤根管充填材に対する組織反応は、西堀(1959)¹¹⁾によって初めて報告されている。彼の実験では、50,000 cs と 50 cs の二種類の粘度のシリコーン・オイルが用いられており、高粘度のシリコーン・オイルで根充材を調製した場合、マクロファージや巨細胞を伴った肉芽組織が出現すると報告している。本邦で広く使用されている糊剤根管充填材「ビタベックス®」(以下糊剤と略す)の粘度は、 500 ± 25 cs であ

る。この糊剤でも、マクロファージや巨細胞が出現し、Kawakamiら(1987)¹⁰⁾の¹⁴C 標識シリコーン・オイルによる実験結果から、肉芽組織中のマクロファージや多核巨細胞の食胞にシリコーン・オイルの存在が確認されている。幼犬乳歯を用いた著者の実験⁷⁾でも、シリコーン・オイル含有糊剤に対する組織反応は、多数のマクロファージと多核巨細胞の出現によって特徴付けられることが確認され、多核巨細胞が糊剤や細胞残渣を処理する多数のマクロファージの融合によって形成されることを示した。本実験モデルの仮想根端孔部においても、空腔を持つ単核あるいは多核巨細胞が出現していた。このような組織変化は対照群で見られず、糊剤によって誘発された反応であることは明白である。また3日例で見られた急性炎症は仮想根端孔を中心にしたもので、その後の肉芽組織の形成も糊剤周辺に局限していた。本実験では、一定の太さに形成された根管に糊剤を充填しているため、周囲組織と糊剤が接する面積が仮想根端孔の断面積とほぼ同一である。従って、埋入した歯牙片の仮想根端部の肉芽組織の出現量もほぼ一定と考えられる。

また幼犬乳歯に対する糊剤の応用例では、過剰根充された根端部歯根がしばしば吸収される⁷⁾ことも、歯根吸収について研究する上で興味深い反応である。今回の実験では、対照群・実験群ともに、埋入した歯牙片の仮想根端部象牙質面に明らかな呼吸窩が、14日例で観察された。今回、両群の吸収量を定量的に比較検討していないので、糊剤の処理反応にともなう象牙質の吸収促進についての詳細は不明である。しかし、7日例の対照群で多核巨細胞がほとんど観察されなかったのに対し、実験群では既にこの時期に出現していた。巨細胞の出現時期の差と象牙質の吸収量を直に関係付けることはできないが、破骨細胞の誘導や機能が種々のサイトカインに制御されたり^{11,12)}、マクロファージが IL-1 を代表としたサイトカインの産生や調節機構に深く関与している事実がある⁹⁾。また破骨細胞が破骨細胞と同一の特徴を備えていることは古くから知られているので⁶⁾、破骨細胞が破骨細胞と同様な調節因子によって機能していると推察される。これらの事柄を考慮すると、実験群の多数のマクロファージの出現が、多核巨細胞の形成や破骨細胞性の硬組織吸収に少な

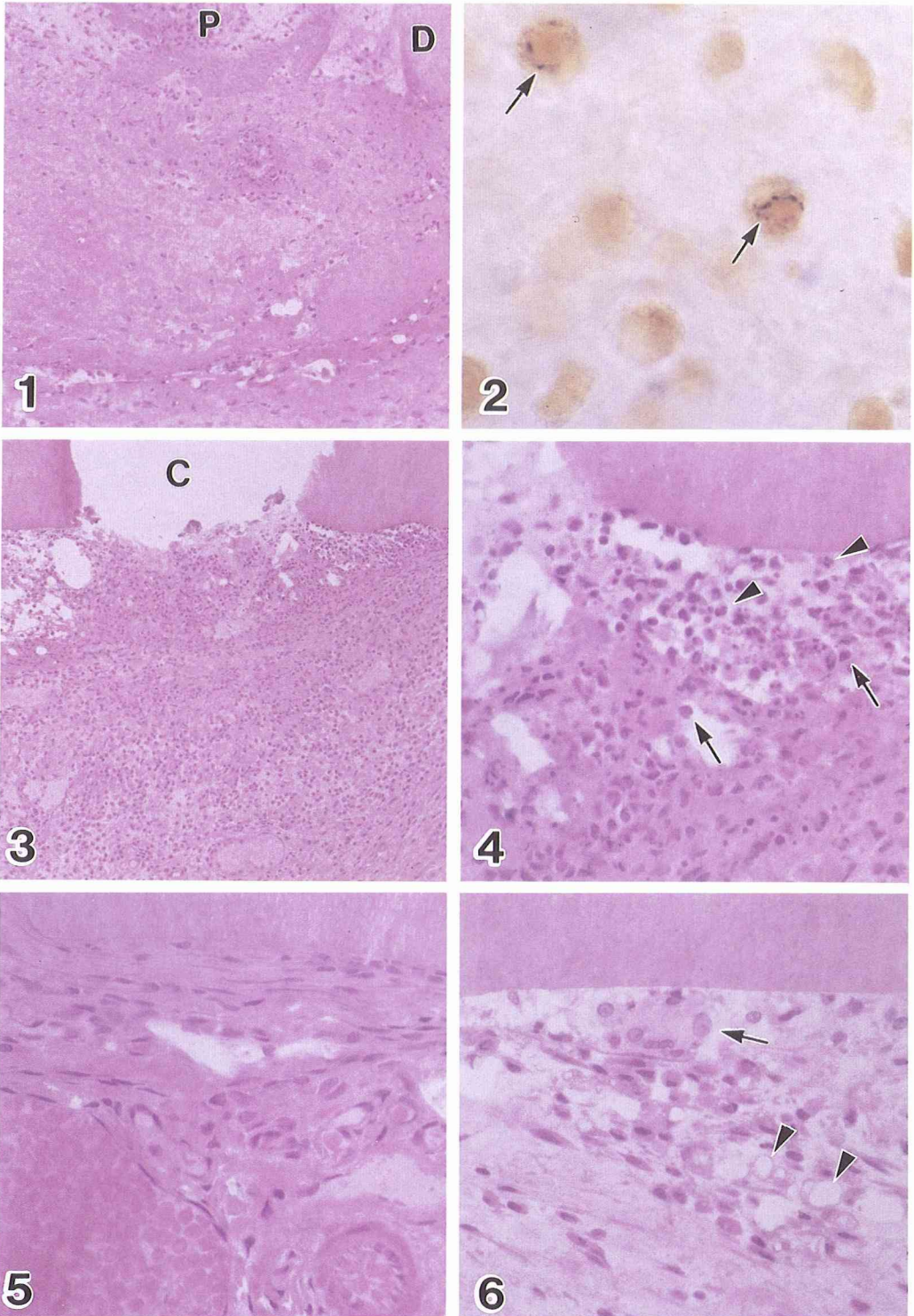


Fig. 1: Slight infiltration of round cells in control specimen at 3 days: D: dentin, P: pulp ($\times 75$).

Fig. 2: Mononuclear cells showing granular-positive reaction (arrows) to non-specific esterase in control at 3 days ($\times 750$).

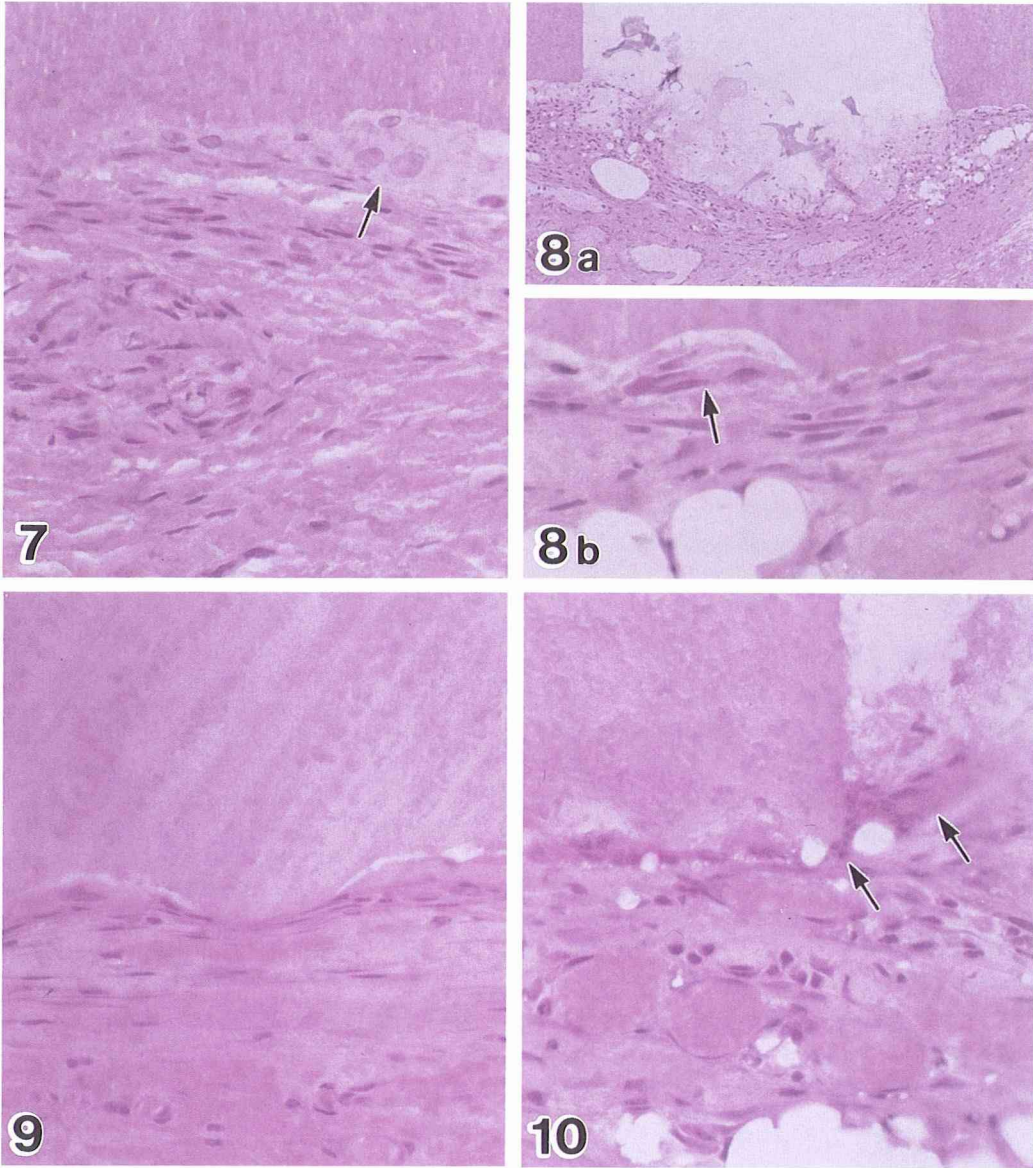


Fig. 3 : Numerous inflammatory cells around a filled canal at 3 days : C : canal ($\times 75$).

Fig. 4 : Higher magnification of fig.3 showing neutrophili (arrowheads) and mononuclear cells (arrows) ($\times 300$).

Fig. 5 : Decreased infiltrating cells in the granulation tissue encapsulating untreated tooth at 7 days ($\times 300$).

Fig. 6 : Multinuclear giant cell (arrow) appeared close to dentin in filled case at 7 days : Arrowheads indicate vacuolated macrophages ($\times 300$).

Fig. 7 : Multinuclear giant cell (arrow) forms resorption lacuna in the control at 14 days ($\times 300$).

Fig. 8 : Granulation tissue with round spaces varied in size in the experimental specimen at 14 days ($\times 75$) (a) and giant cell (arrow) in resorption lacuna ($\times 480$) (b).

Fig. 9 : Giant cell absorbing untreated tooth at 28 days ($\times 300$).

Fig. 10 : A multinuclear giant cell (arrows) lying on both the dentin and the paste ($\times 300$).

からずとも関与していて、対照群よりも活発な吸収窩の形成を招来したとしても不思議ではない。今後、この肉芽組織中の細胞動態や象牙質の吸収量についても定量的に検索する予定である。

さらに今回の実験群では、象牙質の吸収窩と糊剤の双方にまたがって存在した多核巨細胞が認められたことは、多核巨細胞の性格を検討する上で大変に興味ある所見であると思われる。この巨細胞が単に糊剤に接してただけで、糊剤の処理とは無関係であるとも考えられるが、巨細胞が糊剤と硬組織の両者を処理できる能力を備えている可能性も否定できない。我々は、破骨細胞が特殊な機能を持った異物巨細胞の一群であると考えている。これは、破骨細胞が異物巨細胞と共通の膜抗原を持つことから¹³⁾その可能性が推測される。また破骨細胞は、異物巨細胞のみならずマクロファージ関連の多くの共通抗原を有している²⁾。M-CSFの欠如によるマクロファージの著明な減少と破骨細胞の消失を見るOP/OPマウスの例からも、マクロファージと破骨細胞がきわめて密接な関係を持っていると理解される¹⁵⁾。また、胸部の癌腫の間質に出現した波状縁のない多核巨細胞が、*in vitro*で硬組織を吸収し、しかもPTHの直接刺激で吸収が促進されたという報告なども³⁾、多核巨細胞の多様性を示唆する知見であると思われる。特に、糊剤の処理と歯質の吸収が共存する今回の実験群のような状況下では、破骨細胞と異物巨細胞とマクロファージの三者の関係が問題になる。今後例数を増し、仮想根端部の巨細胞の超微構造や膜抗原などについても検討を加え、異物処理における多核巨細胞の機能を明らかにして行く必要があると思われる。

結 語

我々は切断したラット切歯に根管充填を施し、背部皮下に自家移植する方法を用いて糊剤の組織反応を検討した。その結果、以下のような結論を得た。

- 1) 仮想根端部では、マクロファージや多核巨細胞の出現をともない、歯根端における組織反応と同質の反応を惹起させることができた。
- 2) 各実験群の組織反応は、仮想根端部に限局しており、糊剤の生体反応を検索する上で有用なモデルであると思評価できた。

3) 象牙質面の多核巨細胞の出現時期は、実験群の方が対照群よりも早く、糊剤の処理と硬組織の吸収との関連性を検索するためにも有用と考えられた。

4) また糊剤に接し、かつ吸収窩も形成する多核巨細胞が観察されたことから、この実験モデルを用いて多核巨細胞の多様性を検討することも可能であると思された。

なお、本研究の一部は松本歯科大学特別研究補助金で行われた。

文 献

- 1) Abe, E., Ishimi, Y., Takahashi, N., Akatsu, T., Ozawa, H., Yamana, H., Yoshiki, S., and Suda, T. (1988) A differentiation-inducing factor produced by the osteoblastic cell line MC3T3-E1 stimulates bone resorption by promoting osteoclast formation, *J. Bone Miner. Res.* **3**: 635—645.
- 2) Athanasou, N. A. and Quinn, J. (1990) Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophages: Immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function. *J. Clin. Pathol.* **43**: 997—1003.
- 3) Athanasou, N. A., Wells, C. A., Quinn, J., Ferguson, D. P., Heryet, A. and McGee, J. O'D (1989) The origin and nature of stromal osteoclast-like multinucleated giant cells in breast carcinoma: implications for tumour osteolysis and macrophage biology. *Br. J. Cancer*, **59**: 491—498.
- 4) Brudvik, P. and Rygh, P. (1993) The initial phase of orthodontic root resorption of the periodontal ligament. *Eur. J. Orthod.* **15**: 249—263.
- 5) Freilich, L. S. (1971) Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoclasts: effects of parathyroid extract. *J. Dent. Res.* **50**: 1047—1055.
- 6) 瀧野智弘 (1980) 乳歯抜髄法に関する臨床並びに病理組織学的研究. *歯科学報*, **80**: 971—1017.
- 7) 長谷川博雅 (1994) 乳歯の意図的過剰根管充填による歯根周囲の組織反応. *歯科学報*, **94**: 283—304.
- 8) 井出口 蓋 (1986) 乳歯根管充填材料が歯根膜および後継永久歯歯胚に及ぼす影響に関する実験的研究. *九州歯会誌*, **40**: 1269—1296.
- 9) 笠倉新平 (1990) サイトカインによるサイトカインの誘導. *臨床免疫*, **22**: 335—344.
- 10) Kawakami, T., Nakamura, C., Hasegawa, H.

- and Eda, S. (1987) Fate of ^{14}C -labelled dimethylpolysiloxane (silicone oil) in a root canal filling material embedded in rat subcutaneous tissues. *Dent. Mater.* **3**: 256—260.
- 11) 西堀雅夫 (1959) 保存領域における珪素樹脂の応用の研究 (第2報) 珪素樹脂を基剤とする根管充填剤の犬の根尖歯周組織の創傷治癒に及ぼす影響について. *日歯保誌*, **2**: 97—109.
 - 12) Owens, J. and Chamber, T. J. (1993) Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) induces migration in osteoclasts in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**: 1401—1407.
 - 13) Quinn, J. M., Athanasou, N. A. and McGee, J. O'D (1991) Extracellular matrix receptor and platelet antigens on osteoclasts and foreign body giant cells. *Histochemistry*, **96**: 169—176.
 - 14) Sasaki, T. and Matsuda, U. (1993) Immunocytochemical localization of cathepsin B and G in odontoclasts of human deciduous teeth. *J. Dent. Res.* **71**: 1881—1884.
 - 15) Wiktor, J. W. (1993) In vivo role of macrophage growth factors as delineated using CSF-1 deficient op/op mouse. *Leukemia*, **7**: S117—121.