

## シクロオキシゲナーゼ-2 選択的阻害剤投与による ラット歯根膜内破骨細胞数の変動

伊東博司 櫻井裕子 杉浦淳子  
奥山典子 横手優介 山崎 章

Change of Osteoclast Number in Rat Periodontium after  
Administration of a Selective Cyclooxygenase-2 inhibitor

Hiroshi ITO, Yuuko SAKURAI, Junko SUGIURA  
Noriko OKUYAMA, Yuhsuke YOKOTE and Akira YAMASAKI

Cyclooxygenase-2 (cox-2), which synthesizes precursors of prostaglandins, is principally concerned with prostaglandin synthesis in inflammatory tissue. We evaluated the effects of a selective inhibitor of cox-2 on the number of osteoclasts in rat periodontium in non-inflammatory status. In periodontium of rats which received a selective cox-2 inhibitor for 22 weeks, the number of TRAP positive cells decreased significantly ( $P < 0.01$ ) compared with the cell number in periodontium of rats without the inhibitor. This result suggests that cox-2 may participate in osteoclastogenesis in periodontium of non-inflammatory status.

Key words : cox-2, osteoclast, periodontium

### 緒 言

シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase (COX)) は、各種プロスタグランジン (prostaglandin (PG)) の前駆体である、 $PGH_2$  の生体内合成等に関わる酵素であり、現在までに COX-1, COX-2, COX-3 という3種の COX が知られている<sup>1)</sup>。これら COX の一つである COX-2 はもっぱら炎症時の PG 大量産生に関わることから炎症性 COX とも呼ばれている。COX-2 は炎症時の骨吸収にも関与しているとみなされており、骨吸収過程における COX-2 の作用機序の一つとして、炎症病巣において、COX-2 が関わる合成経路を通じて産生された PG が、破骨細胞分化を促すタンパク質の発現を誘導することが推定されている<sup>2)</sup>。しかし、炎症が生

じてはいない歯根膜組織における、破骨細胞分化過程への COX-2 関与の有無についての解明は未だになされていない。

従来より広く用いられている非ステロイド系消炎鎮痛剤は COX-1, COX-2 のいずれをも阻害して抗炎症作用を発揮するが、COX-1 阻害に起因する消化管障害等の副作用が強い。近年、この副作用を軽減する目的で COX-2 のみを選択的に阻害する薬剤が開発され、すでに臨床応用がなされている<sup>1)</sup>。本研究では、この COX-2 選択的阻害剤を用いて、COX-2 の選択的阻害が、歯根膜組織における破骨細胞出現数にどのような影響を与えるかについてを、ラットを実験動物として用いて検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

16頭の雄性Fisherラット(チャールスリバー, 厚木)を実験動物とした。それらラットのうちの8頭は実験群とし, COX-2選択的阻害剤であるNimesulide (ケイマン社, 米国)を22週間400 ppmの濃度で粉末飼料に混じて投与した。他の8頭はNimesulideを与えない対照群とし, 実験群と同じく22週間, 粉末飼料で飼育した。

### 2. 標本作製

投与開始または飼育開始22週後に, 両群ラットの下顎を摘出し, 10%ホルマリンにて24時間固定した。固定材料は10%EDTA (pH 7.2, 4°C)で3~4週間脱灰し, 脱灰が終了した組織はパラフィン包埋し, 下顎第1臼歯遠心根の長軸に平行な3.5 μm厚の連続切片を作製した。連続切片の1枚には通常のヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施した。

### 3. 酵素組織化学

破骨細胞のマーカーとされる酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) の染色を以下の手順で行った。まず, 切片を, 脱パラフィンおよび親水化し, 次いで, 0.1M酢酸緩衝液 (pH 5.0) で十分に洗浄した。その後に切片は, ナフトールAS-BIリン酸 (シグマ社, 米国) を基質とする酸性ホスファターゼ反応液に0.05M濃度でL-酒石酸を加えた液 (pH 5.0 37°C) で30分間反応させた。反応が終了した切片にはヘマトキシリンによる核染色を行った。

### 4. 組織観察・形態計測

染色された標本はいずれも光学顕微鏡にて観察した。さらに, TRAP染色標本では, 20倍対物レンズを用いて, 歯根膜に面する歯槽骨表面, またはその表面近傍に見いだされたTRAP染色陽性細胞の個数を計測した。また, TRAP染色標本の歯根部を4倍対物レンズで写真撮影し, その写真画像上において, 歯根膜に面する歯槽骨表面の長さを, 画像計測ソフトウェアImage-Pro PLUS日本語版 (プラネトロン社, 東京) を使用して測定した。それら測定値より, 各ラットごとに, 歯槽骨表面1 mmあたりのTRAP陽性細胞数を算出し,

さらに, 各ラットの数値から, 実験群・対照群それぞれにおける陽性細胞数の平均値を算定し, 両群の平均値の差を *t* 検定にて検討した。なお, *t* 検定では  $P < 0.05$  の場合に統計的に有意差があると見なした。

## 結 果

### 1. 組織学的ならびに酵素組織化学的所見

HE染色標本では, 両群の歯根膜の組織像はほぼ同様であり, 両群ともに, 歯根膜内に炎症性変化は見いだされなかった (図1A, B)。また, いずれの群でも, 歯根膜に面する歯槽骨表面には時おり, 破骨細胞と見なされる多核大型細胞が認められた。そのような多核巨細胞はTRAP染色標本では細胞質が赤紫色に染色されていた (図2A, B)。TRAP染色陽性の細胞は歯槽骨表面やその近傍領域において観察された。それらTRAP陽性細胞は類円形・多角形・短紡錘形など種々の形態をとっており, 複数核を有する陽性細胞のみならず, 単核の陽性細胞も見られた。

### 2. 形態計測および統計解析

歯槽骨表面1 mmあたりのTRAP染色陽性細胞の個数は実験群において  $1.4 \pm 0.9$  個, 対照群では  $3.0 \pm 0.9$  個と, 実験群で有意に減少していた ( $P < 0.01$ , 図3)。

## 考 察

本研究ではCOX-2選択的阻害剤の投与が, 炎症に陥っていない歯根膜内の破骨細胞数に, いかなる影響を及ぼすかを検討した。その結果, COX-2選択的阻害剤投与が, 炎症のないラット歯根膜組織における破骨細胞数を減少させることが明らかとなった。

COX-2はもっぱら炎症時のPG合成に関わっているといわれており, ラットの実験的歯周炎病巣における骨吸収をCOX-2選択的阻害剤が妨げたという報告<sup>3)</sup>がある。しかしながら, 正常状態の腎臓の機能維持<sup>1)</sup>や腎臓の発育<sup>2)</sup>にCOX-2が関与していることが確認されており, 骨や軟骨などの非炎症組織でもCOX-2発現が見られるといわれている<sup>1)</sup>。また, 炎症刺激を受けてはいない正常歯根膜組織における骨芽細胞に, 弱いCOX-2発



図1 H-E染色  
実験群(A), 対照群(B)ともに, 歯根膜内に炎症性変化は見いだされない。(A, Bとも原倍率6.6倍)

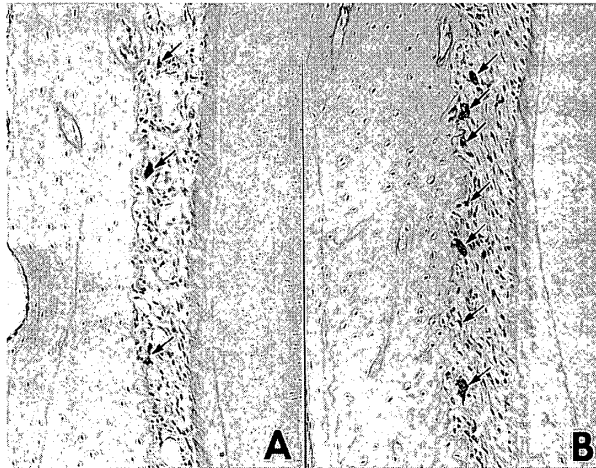


図2 TRAP染色  
TRAP染色陽性細胞を矢印で示す。  
(A: 実験群, B: 対照群いずれも原倍率50倍)

現が観察されている<sup>5)</sup>。このような非炎症状態の組織内におけるCOX-2発現が, COX-2選択的阻害剤によって阻害されることにより, 本研究で見いだされた歯根膜内破骨細胞出現数の減少が生じたのかもしれない。

COX-2選択的阻害剤投与によって生じた, 歯根膜内破骨細胞数減少の機序の一つとして推察されるのは, 破骨細胞分化を促す膜結合タンパク質の発現抑制である。このタンパク質はRANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)と呼ばれ, 骨芽細胞や骨髄ストローマ細胞, pre-B細胞などが発現しており, それら細胞におけるRANKL

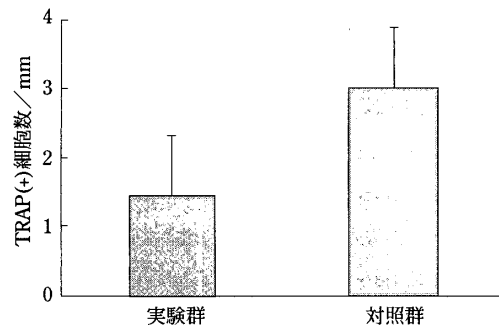


図3 実験群・対照群それぞれにおける歯槽骨表面1mmあたりのTRAP染色陽性細胞数の平均値

mRNAの発現は, PGE<sub>2</sub>により促進される<sup>6)</sup>一方, COX-2選択的阻害剤によっては抑制されることが示されている<sup>1)</sup>。

PGの産生にCOX-2が関与しているが, そのPGの作用の一つとして, 血管透過性亢進がある。また, 血管から滲出した前駆細胞のみが, 外力を受けた歯の周囲の歯根膜に出現する破骨細胞に分化しうる細胞であると述べた報告<sup>7)</sup>があることから, 本研究で観察されたCOX-2選択的阻害剤投与による歯根膜内破骨細胞数の減少には, PG産生抑制による血管透過性亢進の阻害が関与した可能性も考えられる。ただし, いかなる機序により, COX-2選択的阻害剤投与が歯根膜内破骨細胞数の減少を引き起こすかについては, 今後の研究によって明らかにすべき事項である。

### 結 論

COX-2選択的阻害剤の投与は, 正常ラット歯根膜内における, 破骨細胞の出現個数を有意に減少させた。このことは, もっぱら炎症時のPG産生に関わるとされるCOX-2が, 正常歯根膜においても破骨細胞の分化に関与していることを示唆する。

### 文 献

- 1) 佐野 統：炎症とCOX-2. 臨床免疫 **39** : 678-679 2003.
- 2) 宇田川信之, 高橋直之：破骨細胞の分化と機能を制御するサイトカインネットワーク. 実験医学 **18** : 2153-2160 2000.

- 3) Bezerra, M. M., De Lima, V., Alencar, V. B. M., Vieira, I. B. *et. al* : Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. *J Periodontol* **71** ; 1009-1014 2000.
- 4) Morham, S. C., Langenbach, R., Liftin C. D., Tian H. F., *et. al* : Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* **83** ; 473-482 1995.
- 5) 宮内睦美, 北川尚嗣, 佐藤 淳, 小川郁子ほか : LPS投与後ラット辺縁歯周組織におけるCOX-1およびCOX-2発現に関する免疫組織化学的検討. *日歯周誌* **43** (春期特別号) ; 130 2001.
- 6) Kanematsu, M., Sato, T., Takai, H., Watanabe K. *et al.* : Prostaglandin E<sub>2</sub> induces expression of receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells : implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. *J Bone Miner Res.* **15** ; 1321-1329 2000.
- 7) 藤田富夫 : 歯槽骨改造時に出現する単核細胞の免疫組織化学的ならびに免疫電子顕微鏡的特徴について. *奥羽大歯学誌* **30** ; 1-12 2003.

著者への連絡先 : 伊東博司, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔病理学講座  
Reprint requests : Hiroshi ITO, Department of Oral Pathology, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan