

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

藤田 富夫

Immunohistochemical and Immuno-electron Microscopic Characterization of Mononuclear Cells in the Site of Alveolar Bone Remodeling

Tomio FUJITA

Mechanical force applied to a tooth evokes local cellular responses in the periodontal tissue and induces an adaptive remodeling of the alveolar bone. This event is mediated by a variety of mononuclear cells present in and/or recruited de novo from the blood stream. In this study the author examined the kinetics of mononuclear cells in the crest area of the inter-radicular alveolar bone of rat maxillary first molars by immunohistochemistry and electron microscopy.

Orthodontic elastic was inserted between the maxillary first and second molars of 10 to 11-week-old male Wistar rats. At 6 and 12hrs, 1, 2, 3, and 5 days after elastic insertion, the maxillae were fixed and decalcified. Cryostat sections were prepared for immunohistochemistry and vibratome sections for electron microscopic immunohistochemistry.

Consistently observed in the test area of unloading controls, ED1-positive mononuclear cells, indicative of all subtypes of monocyte/macrophage lineage, significantly increased in number 12hrs after elastic insertion, while there was no significant change in the number of tissue macrophage (ED2-positive) and cells expressing Ia antigen (OX6-positive). No infiltration of T cells was observed in the test area throughout the experimental period. The number of capillary loops expressing ICAM-1 was increased 12hrs after elastic insertion. These immunohistochemical results suggest that mononuclear cells increasing in the test area are exudative types of monocyte/macrophage lineage.

The time course of the recruitment of TRAP-positive mononuclear cells was almost parallel to that of ED1-positive mononuclear cells from which ED2-positive cells were subtracted, indicating a possibility that the majority of exudating cells are osteoclast precursors.

Electron microscopically, three types of mononuclear cells were identified ; typical macrophages exhibiting active phagocytosis, cells with cytoplasmic profiles identical to those of osteoclasts, and cells with intermediate cytoplasmic profiles of the above two.

Immuno-electron microscopically, ICAM-1 was expressed mostly in the mononuclear cells of osteoclast type, Mac-1 in osteoclast type and intermediate type, Ia antigen selectively in intermediate type. In the electron microscopic enzyme histochemistry, the reaction product for TRAP activity was detected not only in the mononuclear cells of osteoclast types but also intermediate type.

Key words : immunohistochemistry, mechanical stress, bone remodeling, osteoclast precursor

緒 言

骨改造現象は口腔病変を考えるうえで極めて重要な現象である。この現象の最初の変化は破骨細胞の分化と活性化である。現在破骨細胞は、造血幹細胞から生じた未分化な細胞集団CFU-GMに由来し、様々な成長因子による調整を受けて破骨細胞系に組み込まれ、単核前駆細胞として循環血中へ入っていく。これら単核細胞は血管外へ遊出し、互いに融合して多核破骨細胞となり骨面に達するが、この過程は全身的には内分泌系によって調節され、局所的には骨微小環境に在在する、あるいはそこへ浸潤してきた様々な細胞がサイトカインを分泌し、また細胞間相互接触を通じて関与することが明らかにされている¹⁻⁴⁾。しかしながらこれらの知見の大部分は*in vitro*の研究によるもので、組織内での過程についてはほとんど検討がなされていない。

ラット上顎第一・第二臼歯間にゴム片を挿入し近遠心的に力を加えると、第一臼歯根間中隔歯槽骨において改造現象が活性化し破骨細胞が新たに出現してくる。この現象を破骨細胞分化の実験モデルとして用いたこれまでの研究で、実験開始後3日目に局所での破骨細胞の出現がピークに達すること、この過程において単核細胞の局所浸潤が先行すること、これら単核細胞および破骨細胞が接着分子を発現することが明らかにされてきた^{5,6)}。しかしながらこれら単核細胞の種類や性状、役割および破骨細胞前駆細胞との関連あるいは異同については十分に解明されていない。

本研究では、同じ実験モデルにおいて、各種単核細胞マーカーを用いた免疫組織化学により、また免疫電顕的に単核細胞の動態を解析し、破骨細胞分化の一端を明らかにすることを試みた。

材料と方法

1. 実験材料

実験材料として、10-11週齢、体重250-300gの雄Wistar系ラット（日本クレア社）を用いた。30mg/kg体重のペントバルビタール（ABBOTT社、米国）の腹腔内投与による全身麻酔下、ラットを実験台に固定し開口させ、モスキート鉗子で把持し伸展した矯正用輪ゴム（弛緩時の厚さ約0.5mm、ORMCO社）を上顎第一・第二臼歯間に挿入、装着した。完全に挿入したことを確認したのち、鉗子を離しゴムを弛緩させた。ゴム非装着歯を無処置対照群とした。ゴム装着後、ラットは奥羽大学歯学部動物実験施設で室温25℃、湿度65%の環境下、ラット用配合固形飼料（オリエンタル酵母社製、MF）を与え、自由飲水下で飼育した。

2. 標本作製

1) 凍結切片

ゴム装着6, 12時間, 1, 2, 3, 5日後、麻酔下にて各ラットの心臓を露出させ、左心室よりperiodate-lysin-2%paraformaldehyde (PLP) 固定液 (pH7.4) 100mlを灌流したのち上顎骨を採取し、同じ固定液 (4℃) に浸漬しさらに4時間追加固定を行った。試料はリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS, 4℃) で洗浄後、15%グリセリン含有15%EDTA (pH7.4, -5℃) に3~4週間浸漬し低温脱灰を行った⁷⁾。脱灰試料は、PBS洗浄後OCTコンパウンド (Miller Laboratories, Naperville, 米国) に包埋しドライアイス-イソペンタンで急速凍結し、歯の長軸に沿って近遠心方向厚さ6μmの連続切片を作製した。これらの凍結切片は免疫組織化学に加え、ヘマトキシリン-エオジン (H-E) 染色および酵素 (酒石酸耐性酸性ホスファターゼ, TRAP) 組織化学⁸⁾に用いた。

表 モノクローナル抗体一覧

クローン/抗体名	標識細胞/分子	由来	希釈倍率
ED1	全マクロファージ	BMA	1:400
ED2	組織マクロファージ	BMA	1:400
MRC OX6	Ia抗原	Cedarlane	1:100
MRC OX52	全T細胞	Cedarlane	1:100
1A29	ICAM-1(CD54)	Genzyme	1:1000
Mac-1	マクロファージ(CD11b/CD18)	Chemicon	1:200

2) 電子顕微鏡による超微形態観察用切片

ゴム装着12時間, 1, 2, 3日後, 2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde固定液 (pH7.4) による灌流固定, EDTA (10%, 4°C) 脱灰, オスミウム酸後固定を経て通法に従い Epon812に包埋した。

3) 電子顕微鏡による免疫およびTRAP組織化学用切片

ゴム装着12時間, 1, 2, 3日後, 免疫組織化学にはPLPで, TRAP組織化学には4% paraformaldehydeでラットを灌流固定したのち上顎骨を採取, EDTA脱灰 (-5°Cもしくは4°C) を経てビブラトームにより厚さ約40 μ mの切片を作製した。切片は免疫反応もしくはTRAP反応を行ったのち, オスミウム酸固定を経てEpon812に包埋した。

3. 免疫組織化学

免疫組織化学はLabelled-streptavidin-biotin (LSAB) 法により行った。用いた一次抗体とそれらに関する事項は表に示した。内因性ペルオキシダーゼを除去するために切片に0.3%過酸化水素水加PBSを室温で30分, 抗体の非特異的反応を防止するために, ヤギまたはマウス正常血清を室温で20分作用させたのち, 各一次抗体を室温で30分反応させた。次いで二次抗体を室温で30分反応させたのち, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (ニチレイ, 東京) を室温で30分反応させ, 0.005%過酸化水素水を添加した0.02% 3-3'ジアミノベンチジン (DAB基質キット, ニチレイ, 東京) で褐色に発色させた。核染色はヘマトキシリンで行った。

免疫電顕組織化学は, ICAM-1, Mac-1, Ia抗原について, LSAB法により切片を浮遊させた

状態で行った。なお内因性ペルオキシダーゼ除去は行わず, 一次および二次抗体は4°Cでそれぞれ24時間反応させた。

4. 酵素組織化学

1) 光顕用TRAP組織化学

凍結切片は0.1M酢酸緩衝液 (pH5.0, 4°C) で一晚洗浄したのち酵素反応を行った。反応液 (酢酸緩衝, pH5.0) には基質としてNaphthol AS-BI phosphateを, カップラーとしてアゾ色素を用い, 50mM濃度のL (+)-sodium tartrateを添加した。

2) 電顕用TRAP組織化学

ビブラトーム切片を30mM濃度のL (+)-sodium tartrateを含む酸性ホスファターゼ反応液 (酢酸緩衝, pH5.0) に37°Cで30分間浸漬した。反応液には基質としてcytidine-5'-monophosphate, カップラーとして硝酸鉛を用いた。

5. 電顕観察

試料包埋ブロックよりガラスナイフにより1 μ m厚さの切片を作製し, トルイジンブルー染色を施して光顕観察を行い観察部位を決定した。ダイヤモンドナイフで作製した超薄切片を, 超微形態観察の場合はウラン, 鉛の二重染色を施し, 免疫およびTRAP組織化学の場合は無染色で, JEM 1200EX (日本電子, 加速電圧80kv) により観察し, 写真撮影を行った。

6. 形態計測

根間中隔中央歯槽骨頂部での単位面積 (200 \times 500 μ m) 当たりの抗マクロファージ抗体ED1, ED2, MHC class II (Ia) 抗原に対する抗体OX6, TRAPにそれぞれに陽性を示す単核細胞数およびICAM-1を発現する毛細血管の数を算出した。計測は各実験期間毎7試料からの7枚の標本につき, グリッドを印記した接眼レンズ (オリンパス社, 東京) を用い顕微鏡下で行った。結果はStudent t testにより有意差を検定した。

結 果

1. 組織学的所見

H-E染色標本では, ラット上顎歯槽骨は狭小な骨髓腔を伴った緻密骨より構成されていた (図1)。ゴム装着後12時間から1日目にかけて著し

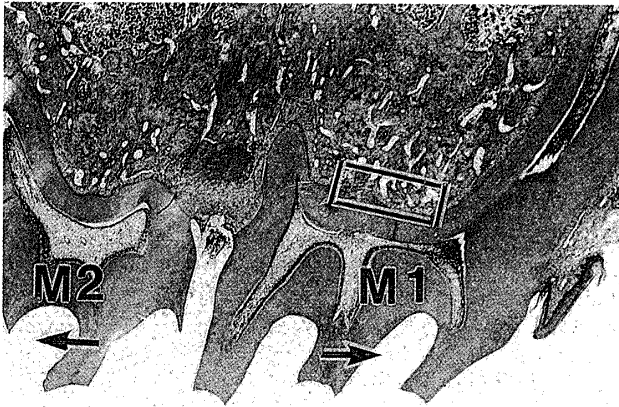


図1 ラット上顎第一(M1)および第二(M2)臼歯
矢頭；ゴム片挿入部位。矢印；力の方向。枠内は観察部位。×98

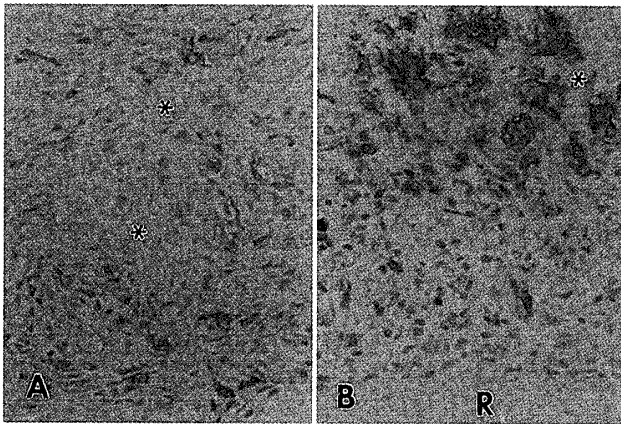


図2 ED1免疫染色
A；無処置対照群。B；ゴム装着後3日。*；骨梁。
R；分岐部歯根。×720

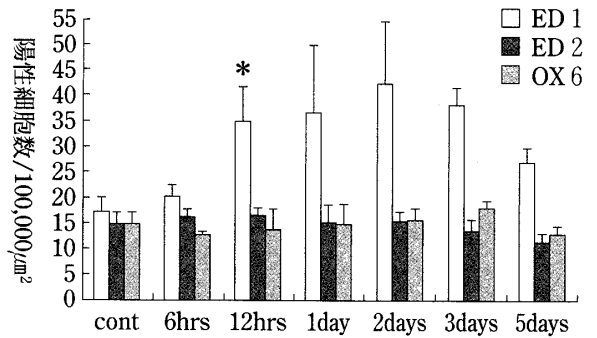
い好中球の浸潤が根間中隔歯槽骨頂部の骨髓腔および歯周靭帯において観察されたが(データ示さず)、これは一過性で2日目以降消退した。破骨細胞の新たな出現が認められたのはゴム装着後1日目で、2日目から3日目にかけて著しい骨吸収が観察された。5日目には吸収された歯槽骨頂部に新たな骨形成が始まった。

2. 免疫組織化学的所見

1) 抗マクロファージ抗体ED1による染色結果

ED1は破骨細胞およびその前駆細胞を含む広い範囲の単球・マクロファージ系細胞を認識する⁹⁾。ED1陽性細胞は、紡錘形ないし樹状を呈するものから類円形ないし多角形のものまで多様な形態を示した。無処置対照群では、これら陽性細

ED 1, ED 2, OX 6 (Ia抗原)陽性単核細胞



*p<0.002 vs cont. 実験期間

図3 ED 1, ED 2, OX 6 陽性細胞数の経時的変化

胞は歯周靭帯および歯槽骨骨髓腔の全域にわたり散在性に観察されたが、形態的には紡錘形ないし樹状を呈するものが目立っていた(図2A)。

ゴム装着12時間後、根間中隔歯槽骨頂部において陽性単核細胞の有意な増加が認められた(p<0.002, 図3)。形態的には類円形ないし多角形を呈するものが多く観察されるようになった。1日目から3日目にかけてその数がピークに達し、5日目には減少に転じた。ED1陽性を示す多核の破骨細胞の出現が明らかになったのは1日後で、3日目に最も著明に観察された(図2B)。

2) 抗マクロファージ抗体ED2による染色結果

ED2は組織在住のマクロファージおよび樹状細胞を認識する⁹⁾。ED2陽性単核細胞は根間中隔歯槽骨頂部の骨髓腔や歯周靭帯に散在しており、とくに血管周囲により頻繁に認められた。形態的にはそれらの多くが紡錘形ないし多角形を呈していた(図4)。実験期間を通じこれらの形態および分布状況に明かな変化は見られず、数についても、実験後期に減少傾向を示すものの有意の変動は示さなかった(図3)。

3) Ia抗原に対する抗体OX6¹⁰⁾による染色結果

Ia抗原を発現する単核細胞は、ED2陽性細胞同様、歯周靭帯内に散在性に、あるいは血管周囲性に観察され、多くが紡錘形ないし多角形を呈していた(図5)。数的にもED2陽性単核細胞に近く、2日から3日にかけてやや増加傾向を示すものの有意の変動は示さなかった(図3)。

4) 抗汎T細胞抗体OX52による染色結果

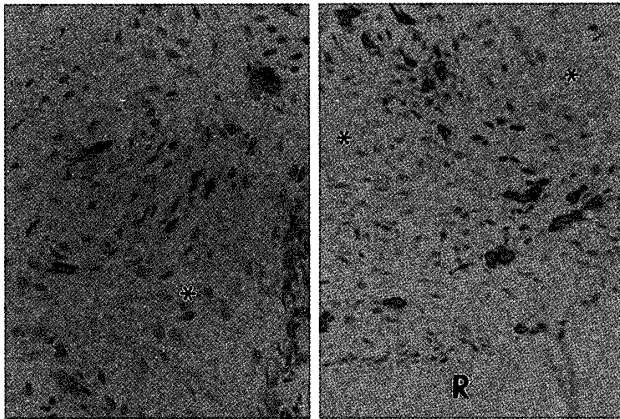


図 4

図 5

図 4 ED 2 免疫染色。無処置対照群。

* ; 骨梁。×720

図 5 OX 6 (Ia 抗原) 免疫染色。無処置対照群。

* ; 骨梁。R ; 分岐部歯根。×720

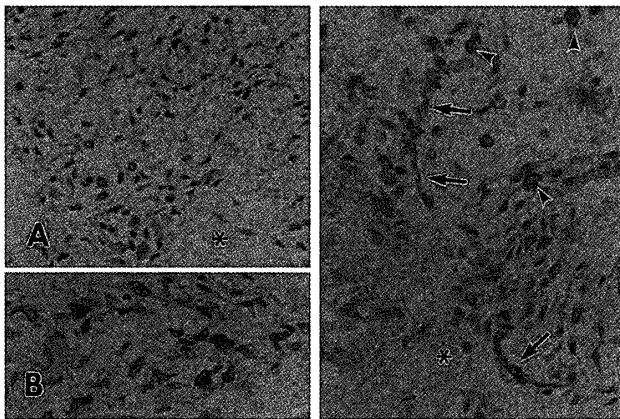


図 6

図 7

図 6 OX52 (pan T cell) 免疫染色。ゴム装着後 3 日。

A ; 根間中隔歯槽骨頂部。B ; ゴム装着部直下歯槽骨周囲組織。* ; 骨梁。×720

図 7 ICAM-1 免疫染色。ゴム装着後 3 日。

矢印 ; 陽性毛細血管。矢頭 ; 陽性単核細胞。

* ; 骨梁。×720

OX52はCD 4 陽性T細胞およびCD 8 陽性T細胞を含むT細胞サブクラスを認識する¹¹⁾。陽性細胞は根間中隔歯槽骨頂周辺では、実験期間を通じほとんど観察されなかったが(図 6 A), ゴム装着部歯槽骨周囲の炎症巣で3日目以降に多数認められた(図 6 B)。

5) 抗ICAM-1 抗体による染色結果

ED 1 およびED 2 の出現状況から局所で増加する単核細胞は滲出性であることが推測されたので、毛細血管内皮細胞でのICAM-1 の発現について

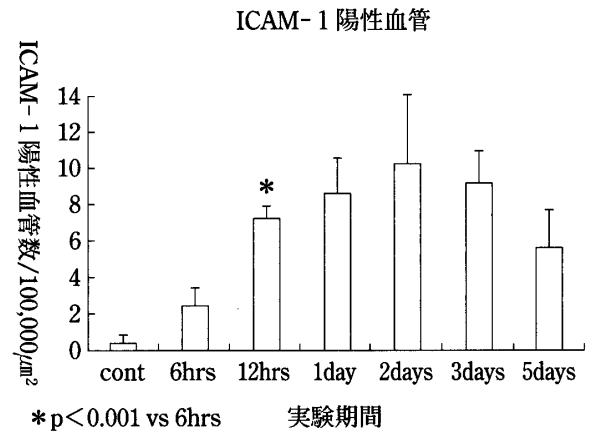


図 8 ICAM-1 陽性毛細血管数の経時的変化

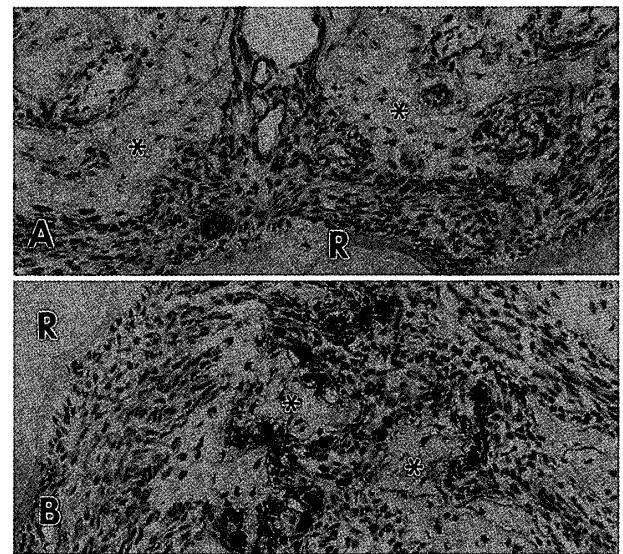


図 9 TRAP染色

A ; 無処置対照群。B ; ゴム装着後 1 日。* ; 骨梁。R ; 分岐部歯根。×360

検討した(図 7)。ICAM-1 陽性血管は、無処置対照群ではきわめて稀にしか認められなかったが、ゴム装着 6 時間後から出現が明らかとなり、12 時間後に急激に数を増した ($p<0.001$, 図 8)。以後 3 日目まではほぼ一定の数を保ったが、5 日目には減少に転じた。

3. TRAP組織化学

無処置対照群の根間中隔歯槽骨頂周辺では、TRAP陽性単核細胞はきわめて少数しか認められなかったが(図 9 A), ゴム装着後 1 日目から急激に増加し ($p<0.005$, 図 9 B), ピークを迎えた 3 日目には12時間後の 6 倍近くに達した(図10)。

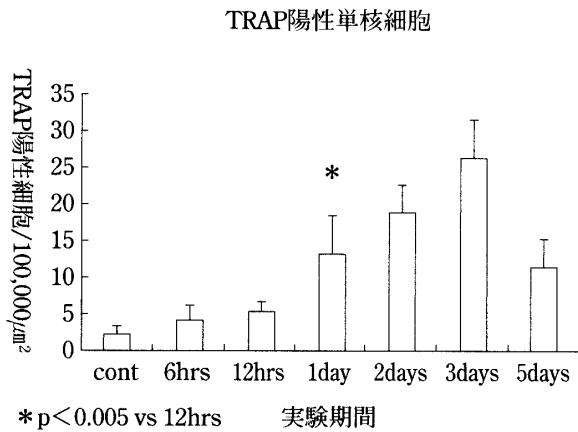


図10 TRAP陽性単核細胞数の経時的変化

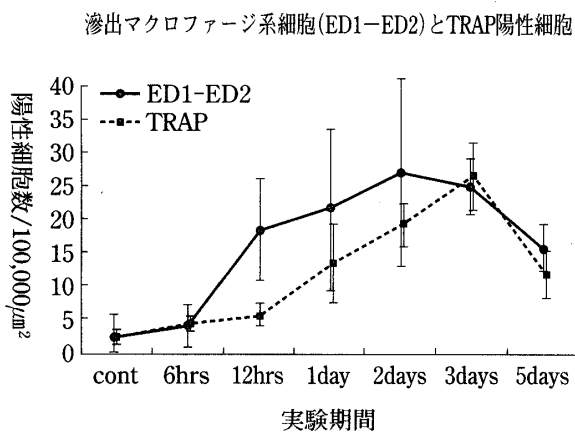


図11 滲出マクロファージ系単核細胞(ED1-ED2)とTRAP陽性単核細胞の経時的変化の比較

5日目には逆に1日目のレベルまで減少した。

TRAP陽性単核細胞と滲出マクロファージ系細胞の関係を検討するために、ED1陽性単核細胞からED2陽性単核細胞を差し引いた数の経時的変化をTRAP陽性単核細胞の変化と比較した(図11)。TRAP陽性単核細胞は遅れて増加を開始し、遅れてピークを迎えたが、ゴム装着後6時間までとピーク時の数及び増加勾配は近似していた。

4. 単核細胞の超微形態

単核細胞は電顕的に多様な超微形態を示した。第一のタイプは活発な食食を示すマクロファージで、発達した微絨毛様の細胞突起を有し、細胞質内には様々な内部構造を示す大小多数の食食空胞やライソゾーム、脂肪小体が充満していた(図12A)。

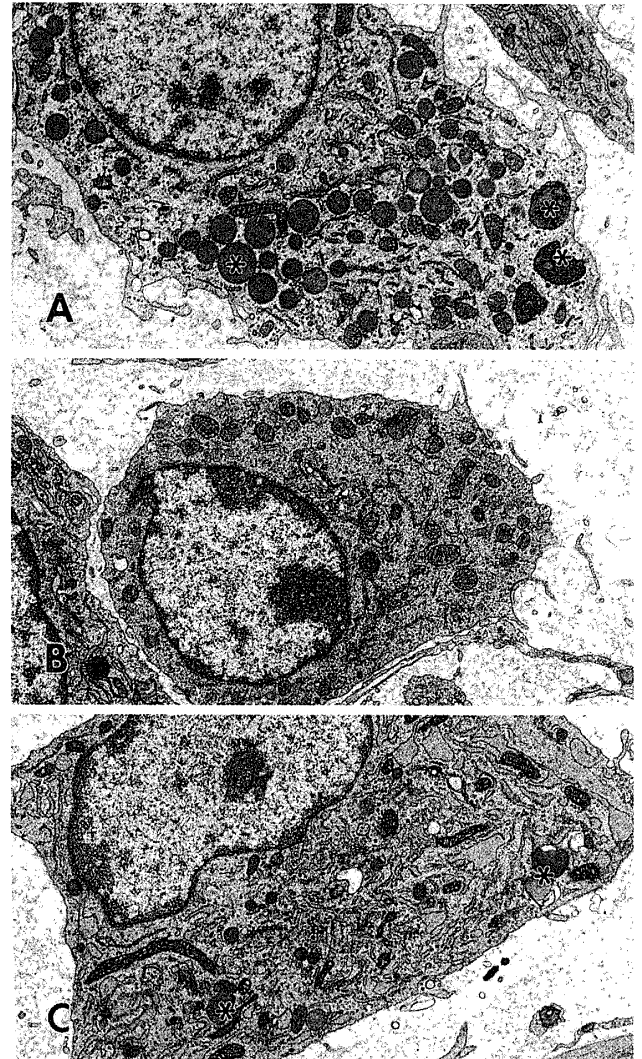


図12 単核細胞の電顕写真。ゴム装着後2日。

A; 食食空胞および脂肪小体(*)に富む成熟マクロファージ。B; ミトコンドリアに富むが膜系小器官に乏しく食食空胞も認められない。破骨細胞に類似した細胞質所見を示す。C; 細胞内で膜系小器官の発達が目立ち、食食空胞(*)の散在を認める。ウラン・鉛二重染色。×5,000

第二のタイプは卵円形ないしは楕円形で、細胞質内には遊離リボゾームが充満するなかに大きさや形状の揃ったミトコンドリアを多数含み、空胞を散在させていた。一方、粗面小胞体やゴルジ装置などの細胞内膜系構造の発達は悪く、食食能も目立たなかった。(図12B)。このような細胞質の特徴は破骨細胞のそれと極めて類似していた。

第三のタイプは、卵円形、紡錘形、多角形、星芒状など多様な外形を示し、豊富な細胞質内に中等度に発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコ

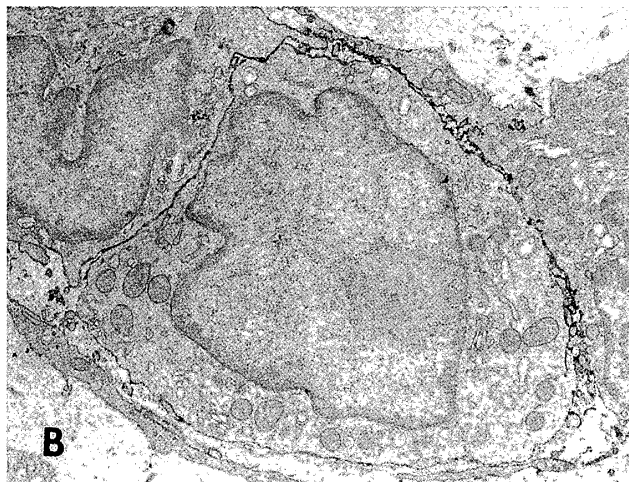
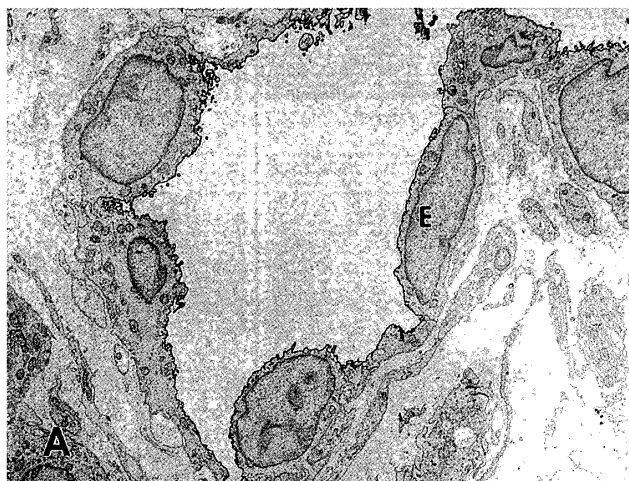


図13 免疫電顕写真。ゴム装着後1日ゴム装着後3日。
A；内皮細胞(E)の血管腔に面する細胞表面にICAM-1の発現が電子密度の高い縁取りとして観察される。×2,500 B；細胞表面にICAM-1の発現を示す単核細胞。破骨細胞に類似した細胞内所見をしめす。×2,500

ンドリアを有していた。破骨細胞タイプの単核細胞に比べ、ライソゾームや小空胞をより豊富に有していたが、これらは成熟マクロファージに比べると劣っており、両者の中間的細胞所見を示していた(図12C)。このタイプの細胞は、粗面小胞体の発達に劣る一方、ライソゾームや小空胞が豊富であることで線維芽細胞と識別された。

以上の特徴を有する細胞の他、細胞内小器官に乏しい未分化な単核細胞が少数観察された。

5. 免疫電顕所見

1) 抗ICAM-1抗体による染色結果

毛細血管内皮細胞の内腔に面する細胞膜上にICAM-1の発現が電子密度の高い免疫反応産物

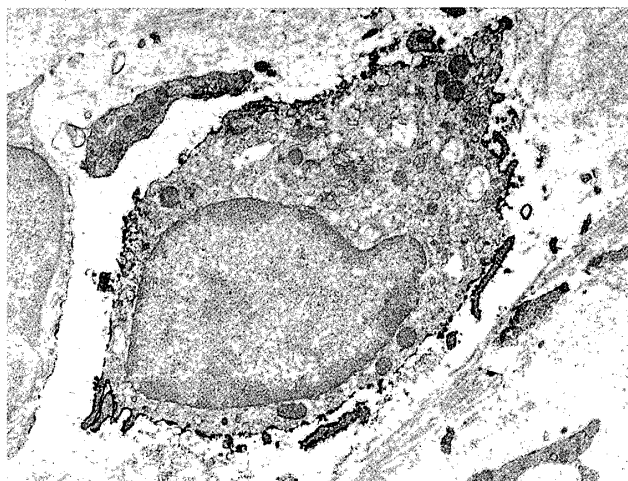


図14 免疫電顕写真。ゴム装着後3日。
細胞膜表面にMac-1の発現を示す単核細胞。細胞質内は破骨細胞に比較的類似する。×5,000

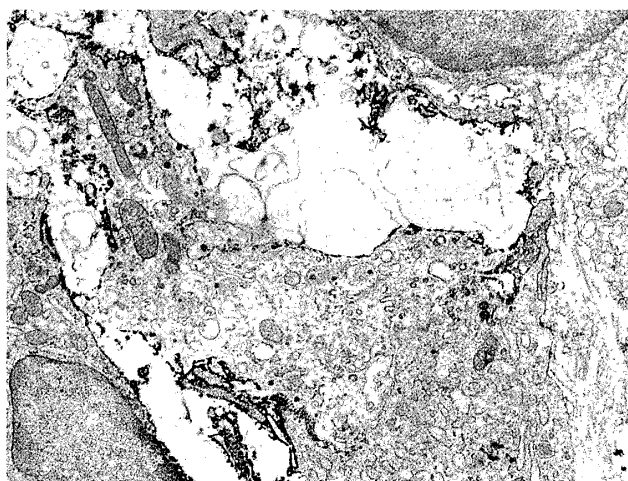


図15 免疫電顕写真。ゴム装着後3日。
細胞表面にIa抗原の発現を示す単核細胞。不規則な外形を示し、細胞質内では膜系小器官の発達が目立つ。×5,000

として観察された(図13A)。単核細胞と多核破骨細胞がともにICAM-1を発現していたが、陽性単核細胞の多くは破骨細胞と同様の細胞質構造を示していた(図13B)。加えて、細胞内小器官に乏しいより未分化な細胞もICAM-1を発現していた。

2) 抗マクロファージ抗体Mac-1による染色結果

Mac-1はインテグリンスーパーファミリーに属する接着分子で、ICAM-1のリガンドであるが、以前より単球・マクロファージ系細胞の同定

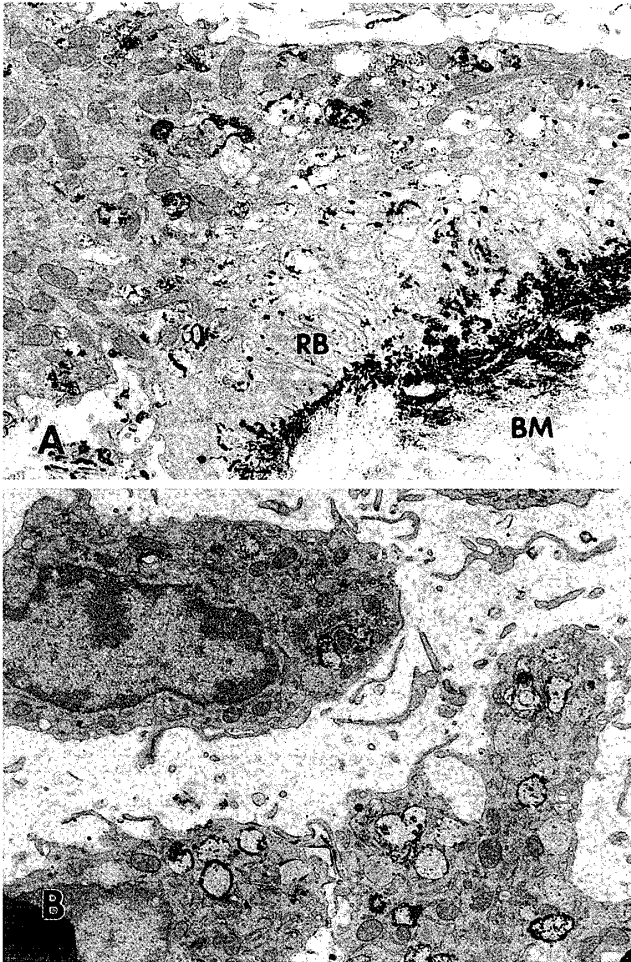


図16 電顕酵素組織化学。ゴム装着後3日。
A；破骨細胞。骨基質(BM)表面、刷子縁(RB)の細胞膜表面および空胞内にTRAP活性による反応産物であるリン酸鉛の沈着が観察される。×5,000 B；単核細胞でのTRAP陽性反応。反応産物は空胞内に観察される。×5,000

に用いられている¹²⁾。破骨細胞型の単核細胞(図14)のほか、上記いずれのタイプの単核細胞にもMac-1の発現が認められた。一方、破骨細胞、リンパ球、線維芽細胞、血管内皮細胞は陰性であった。

3) 抗Ia抗原抗体OX6による染色結果

Ia抗原を発現する細胞は紡錘形ないし星芒状、あるいは多角形を呈していたが、そのほとんどが、ライソゾームを含む細胞内膜系器官が種々の程度に発達した上記中間的タイプの細胞質超微形態を示していた(図15)。

6. 電顕酵素(TRAP)細胞化学

酵素活性による反応産物は電子密度の高い物質

として観察された。破骨細胞では、反応産物は主として空胞内に認められた。細胞外ではruffled borderの細胞質突起表面や骨基質表面に密な反応産物の沈着が観察された(図16A)。単核細胞では、破骨細胞タイプの細胞の空胞構造や小胞体の一部に反応産物が認められたほか、空胞やライソゾームがより豊富な中間的タイプの細胞にも強い酵素活性が観察された(図16B)。

考 察

本研究では、外力作用後、ラット第一臼歯根間中隔歯槽骨頂部に出現する単核細胞の動態をモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。単球・マクロファージ系は炎症時などに血流から組織内へ遊出する滲出マクロファージといわゆる組織球や肺胞マクロファージ、肝Kupffer細胞などの組織在住マクロファージに大別される。抗体ED1は滲出、組織在住両タイプのマクロファージを認識するのに対し、ED2は組織在住マクロファージに限定して認識する¹³⁾。抗体ED1に反応する細胞は、ゴム装着後12時間から有意の増加を示す一方、ED2抗体によって認識される細胞は実験期間を通じて出現数に有意の変動を示さなかった。また、CD4陽性およびCD8陽性の両タイプのT細胞(pan T cells)を認識する抗体OX52で標識される細胞は、少なくとも観察部位には実験期間を通じてほとんど出現しなかった。したがって、観察部位で増加する単核細胞は、ED2陽性の組織在住マクロファージを除いたED1陽性単球・マクロファージ系細胞、すなわち滲出マクロファージ系であると考えられる。

白血球が血管から遊出するに当たっては血管内皮細胞と接着する必要がある。そのために、白血球は専らインテグリンファミリーの接着分子を細胞表面に発現し、これに対して血管内皮細胞はリガンドとして免疫グロブリンスーパーファミリーあるいはセレクトリンファミリーの接着分子を発現する¹⁴⁾。そこで、血管内皮細胞での免疫グロブリンスーパーファミリーのひとつICAM-1の発現を検討した。無処置対照群では、ICAM-1を発現する血管は根間中隔歯槽骨頂部にはほとんど認められなかったが、ゴム装着12時間後に顕著な出

現を見た。この変化は時間的にED 1 陽性マクロファージの増加と一致する。この点からも、局所で滲出機転が亢進していることがうかがわれる。

歯の人為的（矯正）移動に伴う歯周組織での滲出機転の亢進，すなわち血管透過性の亢進については古くから報告がなされている^{15,16)}。飯田¹⁶⁾は、ラットの実験系で二相性の血管透過性反応が歯に矯正力を付与直後から1.5時間および14時間から24時間にかけて観察されるが、一般の炎症反応とはそのタイミングの違いや炎症媒介因子（ブラディキニン）の介在が無いことなどから同一視できないと述べている。本研究において、ICAM-1を発現する血管の数が増加したまま一定期間維持されたにもかかわらず、好中球の浸潤が一過性であり、後続するリンパ球の浸潤も見られなかった。従って、本実験モデルでの滲出機転の亢進は、一般的な炎症，例えば細菌感染の場合などとは異なった機序に基づく可能性が示唆される。なお、歯の矯正移動に伴う好中球の一過性の浸潤についてはすでに報告されているが⁵⁾，その意義については不明である。

抗体ED 1 に陽性反応を示す細胞のなかには破骨細胞とその前駆細胞が含まれる。そこで局所で増加する細胞の種類を確認する目的で、ED 1 陽性細胞からED 2 陽性細胞を差し引いた細胞数の時間的変化を、TRAP陽性単核細胞数の変化と比較した。後者は前者に遅れて増加を開始し、遅れてピークを迎えたが、両者の実験開始時とピーク時の数および増加の勾配が近似していた。したがって、増加するED 1 陽性細胞の大部分が破骨細胞前駆細胞である可能性がある。TRAP陽性細胞の増加が遅れて開始されたことは、破骨細胞前駆細胞がTRAP活性を獲得するまでには、血管より遊出したのち一定の分化を遂げる必要のあることを示唆している。

Baronのグループ^{17,18)}は、ラット上顎臼歯を抜去すると対合する下顎臼歯部頰側歯槽骨骨膜面に新たに破骨細胞が出現することを見だし、これを破骨細胞の分化について検討するための*in vivo*実験モデルとして用いている。最近Baroukhら¹⁹⁾は、非特異性エステラーゼおよびTRAP活性、抗マクロファージ抗体ED 1 をマーカーとし、抜歯

直後から骨吸収がピークを迎える4日目までの細胞動態を組織計測により検討している。その結果、対照群においてすでに相当数の前駆細胞が歯槽骨表面の一定の領域に存在しており、対合歯の抜去によりこれらの前駆細胞から破骨細胞が分化すると考えている。一方本研究で観察された根間中隔歯槽骨頂部では、TRAP陽性細胞のみならず組織在住マクロファージを除くED 1 陽性細胞も対照群ではごくわずかしき認められなかった。従って、破骨細胞前駆細胞が局所に存在している可能性は考えにくい。部位や実験系の違いに加え、ED 1 陽性細胞集団のなかでのED 2 陽性細胞集団の存在が考慮されていないことが見解が異なる理由の一つかもしれない。少なくとも、組織在住ないし高度に分化したマクロファージが破骨細胞前駆細胞のphenotypeをも併せて有しているとは考えにくい。

数や形態、分布状況の類似性から、Ia抗原を発現する細胞の多くはED 2 陽性を示す組織在住ないし分化したマクロファージであると推定される。Kawaharaら²⁰⁾は、ラット歯周組織においてIa抗原を発現する単核細胞を観察し、これには酸性ホスファターゼ活性を示すタイプと示さないタイプの2種類があり、後者を樹状細胞dendritic cellとみなしている。しかしながらリンパ組織外での樹状細胞に関しては、ランゲルハンス細胞を除き不明な点が多く、歯周組織での存在そのものも明らかではない。Ia抗原発現細胞の骨吸収への関与については、T細胞を活性化させ、T細胞による破骨細胞分化促進因子の産生を誘導する可能性も考えられる²¹⁾。しかしながら本実験系では、T細胞の出現が認められなかったこともあり、Ia抗原発現細胞の役割については明らかに出来なかった。

根間中隔歯槽骨頂部周囲を構成する固有の細胞はいずれも電顕的に識別が容易である。炎症に伴って局所に浸潤してくるリンパ球や形質細胞および顆粒白血球も、その超微形態的特徴によって容易に同定しうる。これらに対して単球・マクロファージ系細胞は、その分化段階と関連して超微形態的多様性を示し、同定は必ずしも容易ではない。本研究でもゴム装着1日から3日にかけて多数出現した単球・マクロファージ系単核細胞は多

様な超微形態を示した。ひとつはスカベンジャーとしての特徴を備えた典型的な成熟マクロファージであり、もうひとつは、破骨細胞と共通した細胞内超微形態を示す単核細胞で、山崎ら²²⁾が前破骨細胞とみなした細胞である。加えて第三のタイプとして、多様な外形と豊富な細胞質が特徴的で、空胞を含む細胞内膜系構造に比較的富んでいるものの成熟マクロファージに比べると貪食能は未発達で、超微形態的には前二者の中間的タイプと目される単核細胞が認められた。免疫電顕による観察でIa抗原の発現が認められたことから、組織在住マクロファージはこのタイプに含まれる可能性がある。

TRAP活性の検出を電顕的に試みたところ、破骨細胞タイプの単核細胞に加え、第三のタイプの細胞にも活性が認められ、その程度は前者よりむしろ高かった。したがって、第三のタイプの単核細胞も破骨細胞前駆細胞の可能性はある。ちなみにスカベンジャータイプの成熟マクロファージはTRAP活性を示さなかった。しかしながら破骨細胞と第三のタイプの細胞との間には、細胞質の超微形態的特徴において明らかな相違がある。後者が、ライソゾーム系を含め比較的発達した細胞内小器官を有しているのに対し、前者ではミトコンドリアおよび空胞構造を除く小器官の発達に乏しかった。この点から、第三のタイプが果たして破骨細胞系に組み込まれた (commitされた) 細胞であるか否かについては疑問が生じる。なお電顕用のTRAP反応液においては、酒石酸の濃度が30mM前後になると沈殿が生じる。破骨細胞およびその前駆細胞のマーカーとしては、反応液での酒石酸の濃度を50mM以上に保つ必要があるとされているので⁸⁾、電顕組織化学については特異性に問題があることも考慮しなければならない。この点については、対照実験を重ねさらに検討していく必要がある。

破骨細胞の単核前駆細胞がICAM-1やLFA-1あるいはMac-1等の接着分子を発現することは*in vitro*ならびに*in vivo*の研究ですでに確認されている^{23,24)}。本実験系でICAM-1を発現した単核細胞は、そのほとんどが破骨細胞タイプであった。一方、Mac-1は破骨細胞タイプのほか、第三の

タイプの単核細胞にも発現していた。渡邊⁶⁾は本研究と同じ実験系において、ICAM-1陽性単核細胞はMac-1陽性細胞より早期に増加するとともに分化した破骨細胞もICAM-1を発現することを観察している。Kurachiら²³⁾も*in vitro*の実験において、ICAM-1の発現がLFA-1より早期にピークを迎えると報告している。これらの報告と免疫電顕の結果を合わせると、破骨細胞は分化の早期から最終段階に至るまでICAM-1を発現する可能性が示唆される。

ま と め

外力の作用による根間中隔歯槽骨頂部での骨改造において新たに出現する単核細胞の特徴を、免疫組織化学的ならびに電顕的に検討した。

1. 破骨細胞系を含むすべての単球・マクロファージ系細胞を認識する抗体ED1に陽性反応を示す単核細胞は、外力作用後12時間目に有意の増加を示し、2日目から3日目にかけて最多となった。これに対し抗体ED2で認識される組織在住マクロファージの数は、実験期間中有意の変動を示さなかった。T細胞はほとんど出現しなかった。これらの結果により、局所で増加する単核細胞の多くは、滲出マクロファージ系細胞と考えられる。

2. ICAM-1陽性血管の増加と滲出マクロファージ系細胞の増加が同時期に見られたことから、局所での滲出機転の亢進が裏付けられる。

3. TRAP陽性単核細胞と滲出マクロファージ系細胞の出現パターンの近似から、後者の多くが破骨細胞前駆細胞である可能性が示唆される。

4. Ia抗原を発現する単核細胞は、数、形態、分布の類似性から、その多くが組織在住マクロファージであると考えられる。

5. 電顕的に単核細胞は、活発な貪食作用を示す成熟マクロファージ、細胞質の超微形態が破骨細胞に近似した破骨細胞タイプおよび両者の中間的超微形態を示す第三のタイプに分けられた。

6. 電顕組織化学的に破骨細胞タイプの単核細胞はICAM-1及びMac-1を発現し、TRAP活性を示した。Ia抗原を発現するのはもっぱら第三のタイプであった。なおTRAP活性は第三のタイプ

にも認められた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、終始ご懇篤なご指導を賜りました奥羽大学歯学部口腔病理学講座主任山崎 章教授に謹んで感謝の意を表します。また、種々ご協力頂きました同口腔病理学講座教室員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は、第32回奥羽大学歯学会（平成13年11月郡山）において発表した。

文 献

- 1) Roodman, G. D., Ibbotson, K. J., MacDonald, B. R., Kuehl, T. J. *et al.* : 1.25 vitamin D 3 causes formation of multinucleated cell with osteoclast characteristics in culture of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci* **82** ; 8213-8217 1985.
- 2) Marks, S. C. Jr. and Popoff, S. T. : Bone cell biology : The regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat* **183** ; 1-44 1988.
- 3) Kurihara, N., Suda, T., Miura, Y. and Nakauchi, H. : Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. *Blood* **44** ; 1295-1302 1989.
- 4) Alvarez, J. I., Ross, F. P., Athanasau, N. A., Blair, H.C. *et al.* : Osteoclast precursors circulate in the avian blood. *Calcif Tissue Int* **51** ; 48-53 1992.
- 5) 田辺俊昭：歯の移動に伴うラット歯周組織の初期変化に関する組織化学的研究—特に破骨細胞の動態について。奥羽大歯学誌 **20** ; 373-385 1993.
- 6) 渡邊 俊：破骨細胞分化における接着分子の発現について。奥羽大歯学誌 **27** ; 99-109 2000.
- 7) Mori, S., Sawai, T., Teshima, T. *et al.* : A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *J Histochem Cytochem* **56** ; 111-114 1988.
- 8) Minkin, C. : Bone acid phosphatase : Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int* **34** ; 285-290 1982.
- 9) Dijkstra, C. D., Dopp, E. A. and Joling, P. : The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs : distinct macrophage subpopulation in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* **54** ; 589-599 1985.
- 10) van Goor, H., Harms, G., Gerrits, P. O., Kroese, G.M. *et al.* : Immunohistochemical antigen demonstration in plastic embedded lymphoid tissue. *J Histochem Cytochem* **36** ; 115-120 1988.
- 11) Robinson, A. P., Puklavec, M. and Mason, D. W. : MRC OX52 : A rat T cell antigen. *Immunology* **57** ; 527-531 1986.
- 12) Damoiseaux, J. G. M. C., Dopp, E. A., Neefjes, J. J., Beelen, R. H. J. *et al.* : Heterogeneity of macrophages in the rat evidenced by variability in determinant : Two new anti rat macrophage antibodies against a heterodimer of 160kd and 95kd (CD11/CD18) . *J Leukocyte Biol* **46** ; 556-564 1989.
- 13) Beelen, R. H., Estermans, I. L., Dopp, E. A. and Dijkstra, C. D. : Monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3 against rat macrophages : expression of recognized antigens in different stages of differentiation. *Transplant Proc* **19** ; 3166-3170 1987.
- 14) 白井俊一：炎症。新病理学総論（菊池浩吉，吉木 敬編）；296-298 南山堂 東京 1994.
- 15) 堀 啓子：歯を移動する際の歯根膜の血管透過性に関する研究。口病誌 **48** ; 52-63 1981.
- 16) 飯田順一郎：実験的歯の移動時の歯根膜における血管透過性亢進反応の経時的变化について。口病誌 **49** ; 43-154 1982.
- 17) Tran Van, P., Vignery, A. and Baron, R. : Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. *Anat Rec* **202** ; 445-451 1982.
- 18) Baron, R., Tran Van, P., Nefussi, J. R. and Vignery, A. : Kinetic and cytochemical identification of osteoclast precursors and their differentiation into multinucleated osteoclasts. *Am J Pathol* **122** ; 363-378 1986.
- 19) Baroukh, B., Cherruau, M., Dobigny, C., Guez, D. *et al.* : Osteoclasts differentiate from resident precursors in an in vivo model of synchronized resorption : A temporal and spatial study in rats. *Bone* **27** ; 627-634 2000.
- 20) Kawahara, I., Takano, Y., Sato, O., Maeda, T. *et al.* : Histochemical and immunohistochemical demonstration of macrophages and dendritic cells in the lingual periodontal ligament of rat incisors. *Arch Histol Cytol* **55** ; 211-217 1992.
- 21) Tamai, M., Sagawa, K., Kawabata, R., Inoue A. *et al.* : Production of IL-6 by T cells from the femoral head of patients with rapidly destructive coxopathy (RDC). *Clin Exp Immunol* **103** ; 506-513 1996.
- 22) 山崎 章，菅野恵美，田辺俊昭，廣澤英夫ほか：歯槽骨における破骨細胞の出現過程に関する電子顕微鏡的研究。奥羽大歯学誌 **20** ; 140-146 1993.

- 23) Kurachi, T., Morita, I. and Murota, S. : Involvement of adhesion molecules LFA-1 and ICAM-1 in osteoclast developement. *Biochim Biophys Acta* **1178** ; 259-266 1993.
- 24) Harada, H., Kukita, T., Iwamoto, Y., Iijima, T. *et al.* : Involvement of lymphocyte function-associated antigen-1 and intercellular adhesion molecule-1 in osteoclastogenesis : A possible role in direct interaction between osteoclast

precursors. *Endocrinology* **139** ; 3967-3975 1998.

著者への連絡先：藤田富夫，(〒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 : Tomio FUJITA, Department of Oral Pathology, Ohu University School of Dentistry 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan