

## 破骨細胞分化におけるCyclooxygenase-2 選択的阻害剤投与の影響について

小板橋 勉

### The Effect of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitor in the Osteoclast Differentiation

Tsutomu KOITABASHI

When the lateral row of maxillary molars is extracted, non-traumatic and synchronous remodeling sequence is taken place along the buccal surface of the alveolar bone of mandibular antagonist teeth. 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 role of prostaglandins in the recruitment of osteoclasts using in vivo experimental model and selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor by histochemistry and immunohistochemistry.

Sixty male Wister rats, 7-week-old, were divided into two groups. In the experimental group, rats were fed a standard diet containing 400 ppm Nimesulide beginning a week before tooth extraction. In the control group, rats were fed a standard diet without Nimesulide. All rats were sacrificed and mandible dissected at 0,1,2,3,4,5,6 days after tooth extraction and fixed in a 4% paraformaldehyde. After demineralization in an EDTA solution at room temperature, serial paraffin sections of horizontal plane were cut and stained histochemically using tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) activity and immunohistochemically using monoclonal antibodies against ED-1 and polyclonal antibodies against Factor VIII. Mean numbers of multinucleated osteoclast and nuclei of TRAP and ED-1-positive cells, numbers of Factor VIII-positive vessels, change in percentage of osteoclast nuclei per total numbers of TRAP-positive cell nuclei, area of the resorption pits on the alveolar bone surface were measured.

Osteoclasts on day 4, a peak of bone resorption in this model, were smaller in number in the experimental group than in the control group. The increase of both TRAP and ED-1-positive cells quantified by the number of nuclei was significantly suppressed on day 4 in the experimental group, as well. These data suggested that less active osteoclast recruitment was due to suppressed recruitment of osteoclast precursors from the circulation. To examine the tendency for mononuclear precursors to multinuclear osteoclasts, the percentage of multinucleated cell nuclei per total numbers of TRAP-positive cells nuclei was calculated. Data revealed significantly higher rate of multinuclea-

tion in the experimental group, suggesting enhanced osteoclast differentiation.

The present study suggests that the administration of selective COX-2 inhibitor suppresses the recruitment of osteoclast precursors from the circulation, but promotes osteoclast differentiation and ability of bone resorption.

Key words : selective COX-2 inhibitor, prostaglandins, osteoclast differentiation

## 緒 言

骨吸収は炎症・腫瘍・嚢胞性疾患等口腔内病変においてきわめて重要な現象である。その中心的な役割を演じている破骨細胞は造血幹細胞に由来し、単球・マクロファージ系と近縁関係にあることが現在明らかになっている<sup>1)</sup>。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、互いに接着分子を発現、融合して多核破骨細胞となり骨表面に達するが、この過程は全身的には破骨細胞分化を促進する因子、活性型ビタミンD[1 $\alpha$ ,25(OH) $_2$ D $_3$ ]、副甲状腺ホルモン(PTH)等の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による分化因子の分泌や、細胞間相互接触を通じて進行することが明らかにされている<sup>1-5)</sup>。炎症の媒介因子であるプロスタグランジンはそれらの因子のひとつとされている。しかしながら、プロスタグランジンの破骨細胞分化における作用のメカニズムについては不明な点が多いばかりでなく、分化を促進するのかあるいは阻害するのかについても議論がある。

酵素シクロオキシゲナーゼCyclooxygenase(以下COX)はアラキドン酸からのプロスタグランジンH $_2$ (PGH $_2$ )合成における反応を触媒する。COXには2つのアイソフォームCOX-1およびCOX-2が存在する。COX-1は腎臓、胃、血管平滑筋、あるいは血小板など多くの組織に広く存在し、組織・細胞の恒常性の維持の役割をはたしており、一方、COX-2は種々の刺激に対して、

局所のマクロファージやその他の細胞で一過性に高レベルに発現し、プロスタグランジン生成を行う<sup>6-8)</sup>。

ラット下顎臼歯部頰側では通常破骨細胞の存在は認められない。しかし、対合歯を抜歯し、咬合機能を喪失させると頰側歯槽骨に一過性の骨吸収が生じ、新たに破骨細胞が出現するため、破骨細胞の分化過程を形態学的に検討するには都合が良い<sup>9-11)</sup>。そこで本研究ではこの実験モデルを用いてCOX-2を選択的に阻害することにより、プロスタグランジンが破骨細胞分化にどのような影響を及ぼすのかを組織化学的に検討した。

## 材料と方法

### 1. 実験材料

実験材料として、7～8週齢、体重約230～260gの雄Wistar系ラット(日本クレア社)を用いた。COX-2選択的阻害剤の非ステロイド系消炎鎮痛剤であるNimesulide(ケイマン社、米国)を投与した群を実験群、投与しない群を対照群とし、実験群では、5日前よりラット用配合粉末飼料(オリエンタル酵母社製、MF)にNimesulide 400ppmを混餌投与した。対照群では、ラット用配合粉末飼料のみを投与した。飼育は、奥羽大学歯学部動物実験研究施設(室温23℃、湿度65%)において、自由飲水下に行った。5日後、30mg/kg体重のペントバルビタール(NEMBUTAL®, ABBOTT社、米国)の腹腔投与による全身麻酔下にラットを実験台に固定し開口させ、左側上顎臼歯をすべて抜歯した。なお、Nimesulideは固定を行う日まで投与した。

### 2. 標本作製

標本として、左側上顎臼歯抜歯0, 1, 2, 3, 4,

5, 6日後, 全身麻酔下にて各ラットの心臓を露出させ, 左心室より4%パラホルムアルデヒド100mlを約15分かけて灌流したのち左側下顎骨を採取した。さらに顎骨は同固定液にて浸漬し, 室温にて24時間追加固定を行った。試料はリン酸緩衝生理的食塩水(pH7.4)で洗浄後, 10%EDTA(pH7.02)に3~4週間浸漬し, 常温脱灰を行った。脱灰試料はパラフィン包埋し, 歯軸とは直角に歯槽頂直下で厚さ4 $\mu$ mの連続切片を作製した。

### 3. 免疫組織化学

破骨細胞および破骨細胞前駆細胞を含む全マクロファージ系細胞を同定するため抗マクロファージ抗体ED-1を用いて免疫組織化学的に検索をした。その検索にはパラフィン切片を用い, labelled-streptavidin-biotin (以下LSAB) 法により行った。切片は内因性ペルオキシダーゼの除去のために0.3%過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)加メタノールを室温で5分作用させ, 次いで非特異的反応を防止するため, ヤギ正常血清を室温で20分作用させた。100倍希釈したマウス抗ラットモノクローナル抗体ED-1(BMA, スイス)を一次抗体として室温で40分反応させた。次に, ビオチン標識ヤギ抗マウスIgGを二次抗体として室温で30分浸漬したのち, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ニチレイ社, 東京)を室温で30分反応させ, 0.005%過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を添加した0.02%3,3'-ジアミノベンチジン・4HCl/0.05Mトリス塩酸緩衝液pH7.6(DAB基質キット, ニチレイ社, 東京)にて茶色に発色し, ヘマトキシリンにて核染を施し, 光学顕微鏡にて観察を行った。同様に, 微小血管を含む血管を同定するため抗体Factor VIIIを用いて免疫組織化学的に検索をした。その検索にはパラフィン切片を用い, LSAB法により行った。切片は内因性ペルオキシダーゼの除去のために0.3%過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)加メタノールを室温で15分作用させ, 次いで非特異的反応を防止するため, ヤギ正常血清を室温で20分作用させた。400倍希釈した抗ヒトウサギポリクローナル抗体Factor VIII(DAKO, 京都)を一次抗体として室温で30分反応させた。次に, ビオチン標識ヤギ抗ウサギIgGを二次抗体として室温で10分浸漬したのち, ペルオキシダーゼ標識ストレプトア

ビジン(ニチレイ社, 東京)を室温で30分反応させ, 0.005%過酸化水素水(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)を添加した0.02%3,3'-ジアミノベンチジン・4HCl/0.05Mトリス塩酸緩衝液pH7.6(DAB基質キット, ニチレイ社, 東京)にて茶色に発色し, ヘマトキシリンにて核染を施し, 光学顕微鏡にて観察を行った。

### 4. 酵素組織化学

破骨細胞および破骨細胞前駆細胞を同定するために, そのマーカーとされている酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色を行った。パラフィン切片は, 脱パラフィンののち, 0.1M Acetate buffer(pH5.0)で十分に洗浄した。Naphthol AS-BI phosphate(シグマ社, 米国)を基質に用いた酸性ホスファターゼ活性検出反応液に, 50mM濃度でL(+)-sodium tartrateを加えた液(pH5.0)に37℃で30分間浸漬した。反応終了後の切片は, さらにヘマトキシリンにて核染を施し, 光学顕微鏡にて観察を行った。

### 5. 形態計測

各群, 期間あたり5匹のラットを用いた。連続切片上で抗マクロファージ抗体ED-1に陽性反応を示す細胞の核数およびTRAP陽性細胞の核数を顕微鏡下に計測した。計測部位は下顎第1臼歯部頰側歯槽骨表面より約0.15mmの幅(骨膜に相当), 遠心根より近心に長さ約2.3mmの範囲とした(図1)。抗Factor VIII抗体に陽性を示す血管は疎性結合組織部を含めた領域のものを顕微鏡下に計測した。骨に接し2個以上の核を有するものを破骨細胞とした。TRAP染色標本にて歯槽骨表面の吸収窩の面積を計測するため, Image-Pro® PLUS Ver4.0(プラネترون社, 東京)を用いた(図2)。統計学的にはt検定により対照群と各実験群間での有意差を検定した。

## 結 果

### 1. 組織学的所見

H-E染色標本では, 上顎臼歯抜去直後のラット下顎歯槽骨は緻密骨より構成され, 表面は平坦で吸収窩は認められなかった。その表面には数層の紡錘形ないし類円形の細胞からなる密な細胞層(骨膜)が形成されていた。さらにその頰側は疎

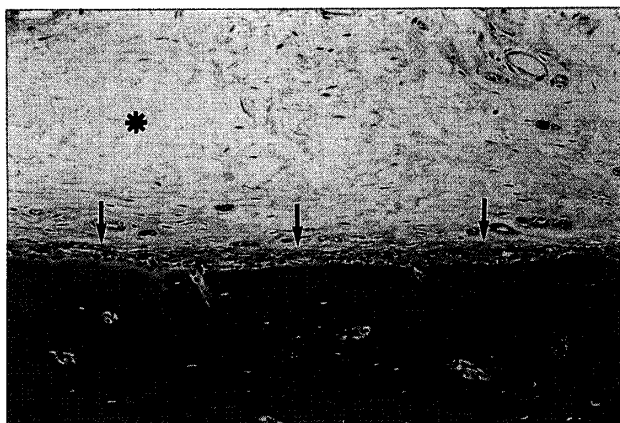


図1 ラット下顎側歯槽骨  
骨膜部を矢印で、歯槽骨を\*で、疎性結合組織を\*で示す。

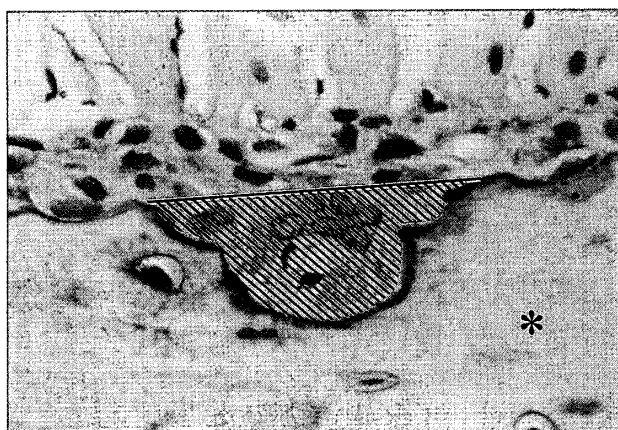


図2 歯槽骨吸収窩(\*; 歯槽骨)  
吸収窩を斜線で示し、その面積を計測した。

性結合組織であった。抜歯後1日目、類円形の単核細胞が骨膜および疎性結合組織の血管周囲にて認められ、時間とともに数を増した。2日目には吸収窩をともなった多核細胞が歯槽骨表面で認められるようになり4日目には数を増した。5日目から6日目にかけては著しい骨吸収が観察された(図3)。実験期間を通して歯槽骨に隣接する骨膜の幅には変化はなかった。

## 2. 免疫組織化学

### 1) 抗マクロファージ抗体ED-1

抗マクロファージ抗体ED-1陽性細胞は、類円形ないし紡錘形を呈する形態を示した。対照群および実験群での陽性細胞は、抜歯後0日目では疎性結合組織部および骨膜部全体で散在性に少数観

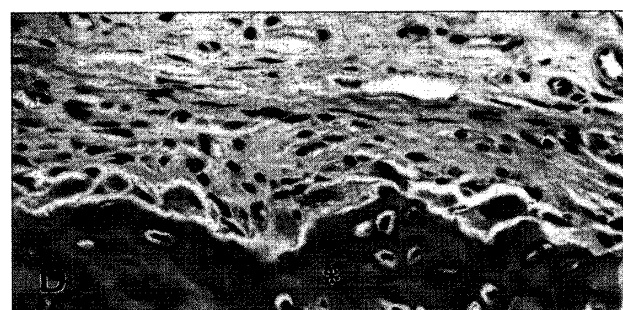
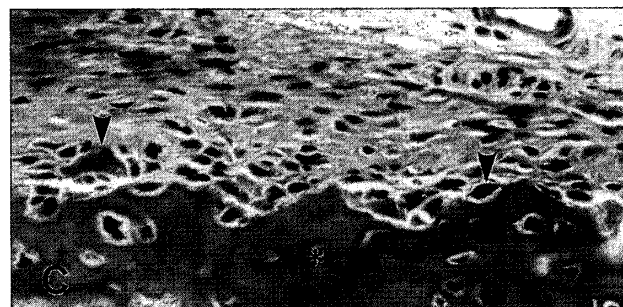
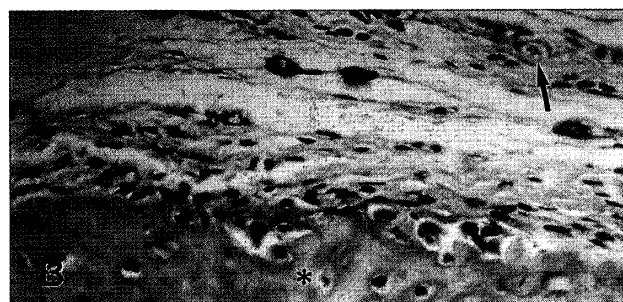
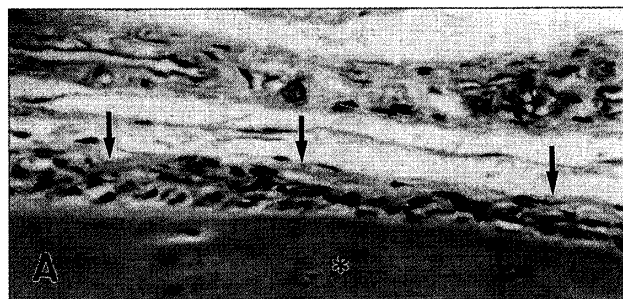


図3 H-E染色写真(\*; 歯槽骨)

- A; 抜歯後0日目(×100)。ラット下顎歯槽骨は緻密骨より構成され、表面は平坦で吸収窩は認められなかった。その表面には紡錘形および類円形の細胞が数層にわたり骨膜(矢印)を形成していた。
- B; 抜歯後2日目(×100)。骨膜部および疎性結合組織部の血管(矢印)周囲に類円形の単核細胞が認められた。
- C; 抜歯後4日目(×100)。吸収窩を伴った多核細胞(矢頭)が多く認められた。
- D; 抜歯後6日目(×100)。著しい歯槽骨の吸収が観察された。

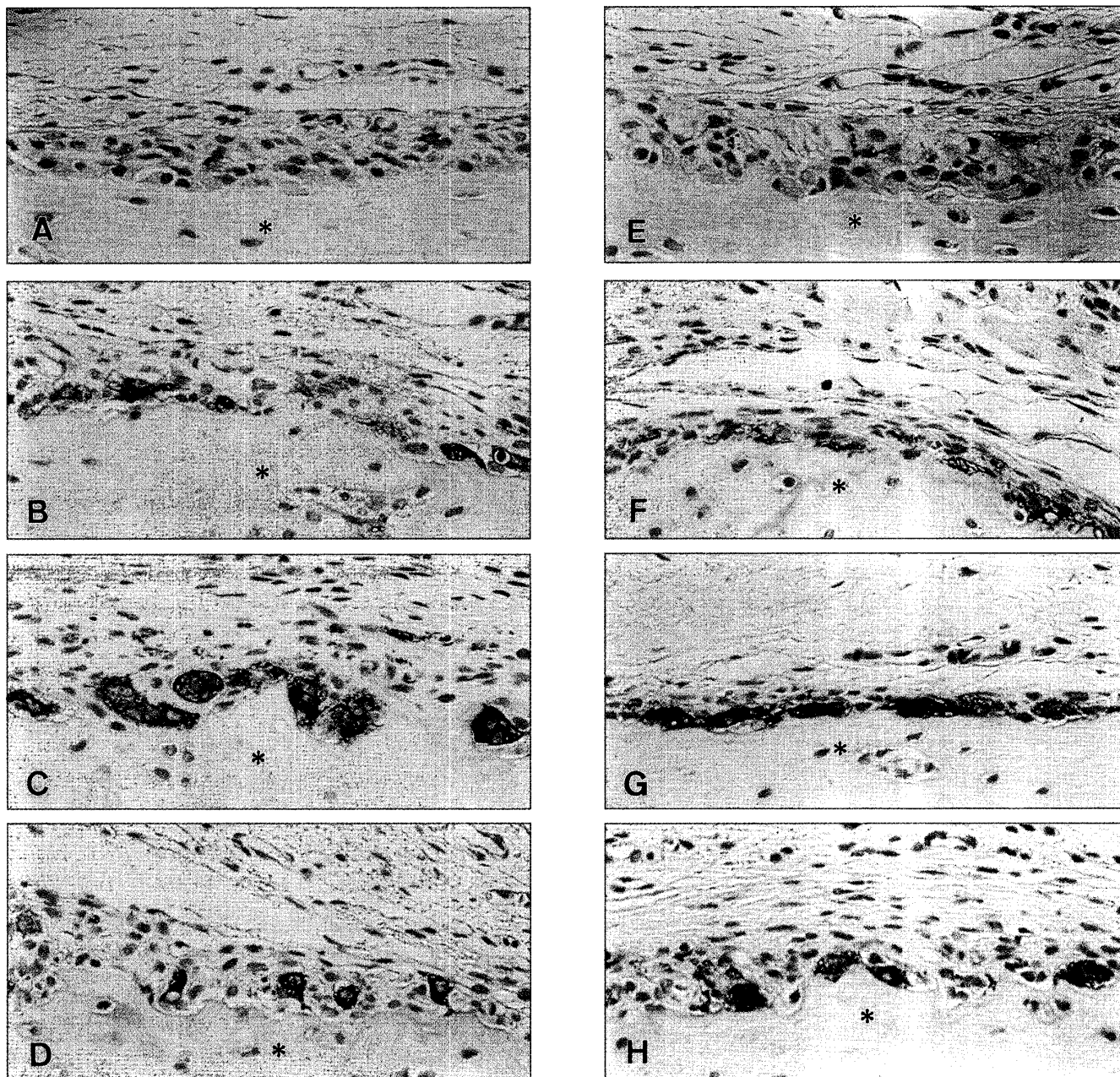


図4 ED-1免疫染色写真 (\* ; 歯槽骨)

- A ; 抜歯後0日目 (実験群×100)。陽性細胞が少数観察された。  
 B ; 抜歯後2日目 (実験群×100)。陽性細胞は骨膜部において骨の近傍に偏在性に観察された。  
 C ; 抜歯後4日目 (実験群×100)。陽性細胞は骨膜部において骨の近傍に偏在性に多数観察された。  
 D ; 抜歯後6日目 (実験群×100)。陽性細胞は骨膜部において骨の近傍に偏在性に観察されるが、数を減じていた。  
 E ; 抜歯後0日目 (対照群×100)。陽性細胞が少数観察された。  
 F ; 抜歯後2日目 (対照群×100)。陽性細胞は骨膜部において骨の近傍に偏在性に観察された。  
 G ; 抜歯後4日目 (対照群×100)。陽性細胞は骨膜部において骨の近傍に偏在性に多数観察された。  
 H ; 抜歯後6日目 (対照群×100)。陽性細胞は骨膜部において骨の近傍に偏在性に観察されるが、数を減じていた。



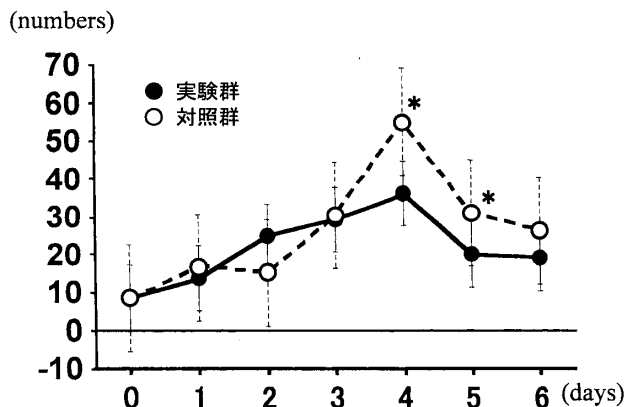


図5 ED-1陽性細胞核数の経時的変化 (\* ;  $p < 0.05$ )

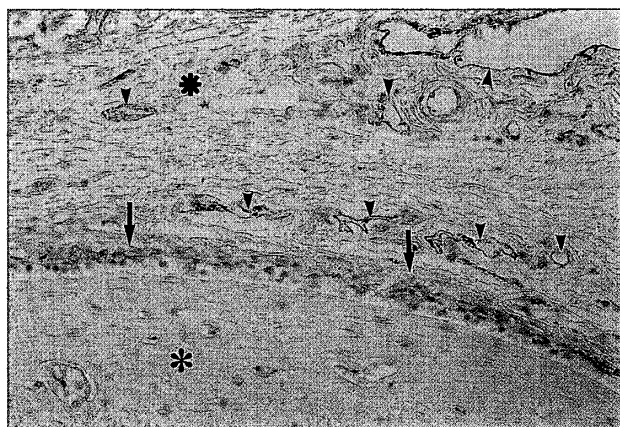


図6 Factor VIII免疫染色写真 (×100)

陽性血管を矢頭, 歯槽骨を\*, 骨膜部を矢印, 疎性結合組織部を\*で示す。

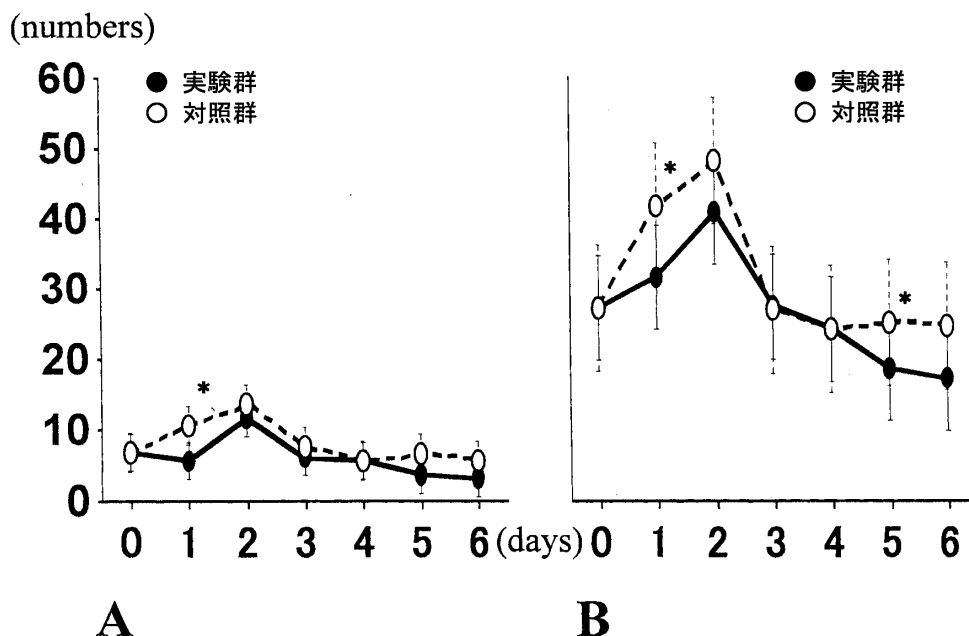


図7 Factor VIII陽性血管の経時的変化 (\* ;  $p < 0.05$ )

A ; 骨膜部 B ; 疎性結合組織部

察された。1日目になると疎性結合組織全体特に血管周囲でより多く観察された。骨膜でも全体に散在性に観察されたが少数であった。2日目になると疎性結合組織部では全体で散在性に観察されるが数は少なくなる傾向にあった。骨膜部では骨の近傍に局在性に観察されるようになり数も増加傾向を示した。3日目より6日目までも疎性結合組織部では全体に散在性に観察されるが2日目と比較しても数に変化は認められなかった。骨膜部では骨の近傍に局在性に観察され、3日目から4

日目にかけて数を増し5,6日目と減少傾向にあった(図4)。骨膜部における対照群での陽性細胞の核数を測定した。抜歯後1日目より3日目にかけて緩やかに増加し4日目でピークを迎え5日目より減少に転じた。これに対し実験群では3日目まで同様な増加傾向を示したが対照群に比較し少ない傾向にあり、4,5日目では有意に少なかった(図5)。

## 2) 抗Factor VIII抗体

抗Factor VIII抗体陽性血管数は、骨膜部と疎性

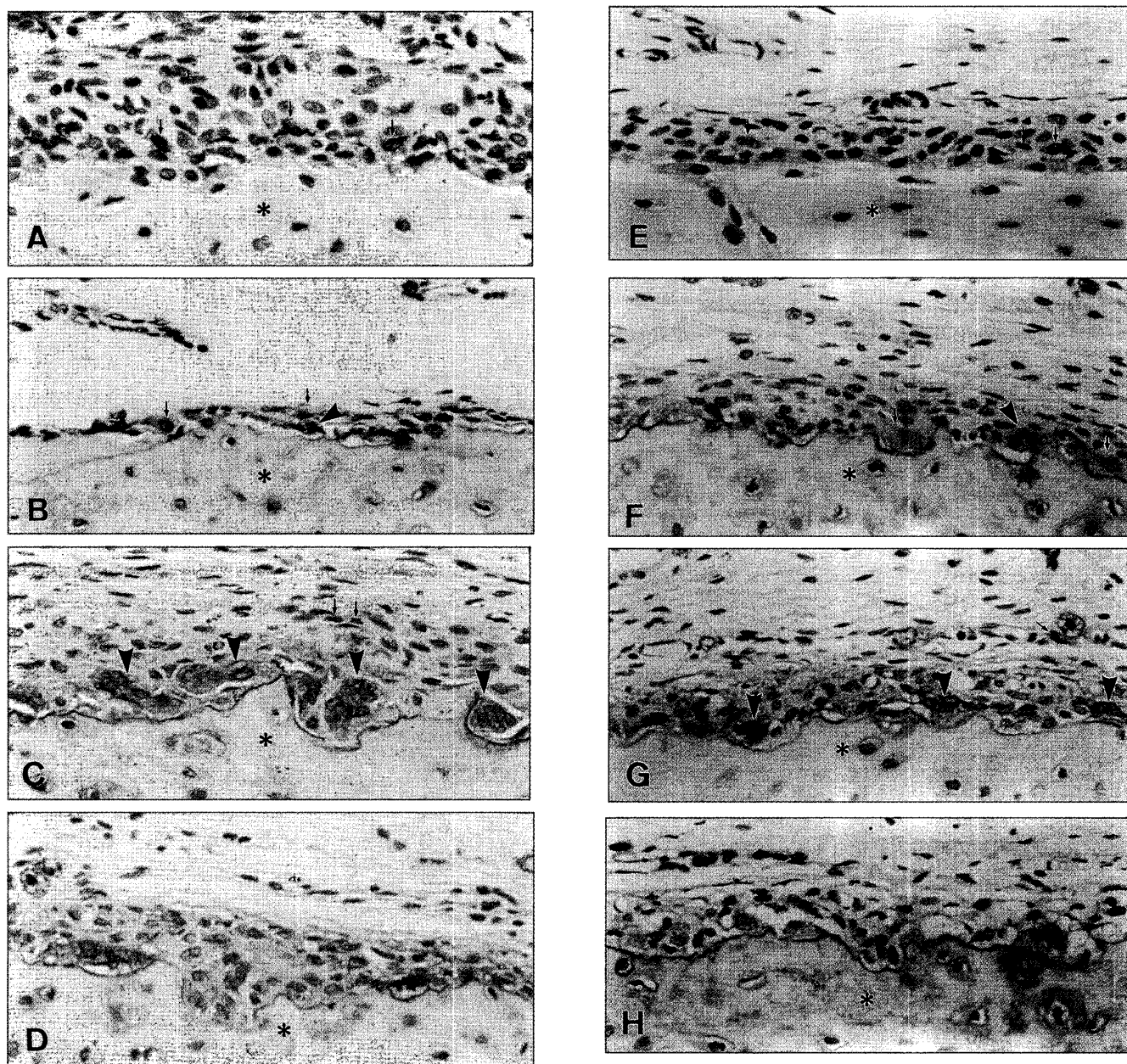
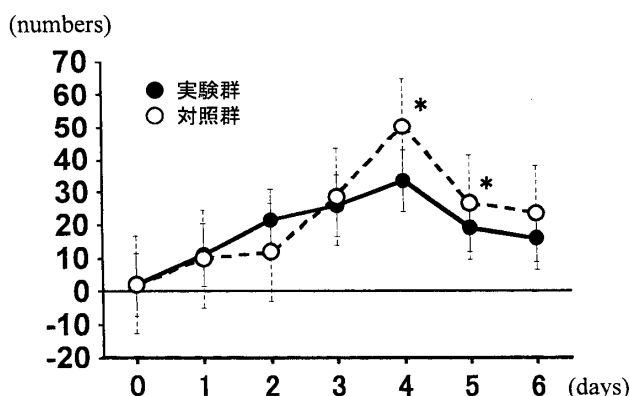
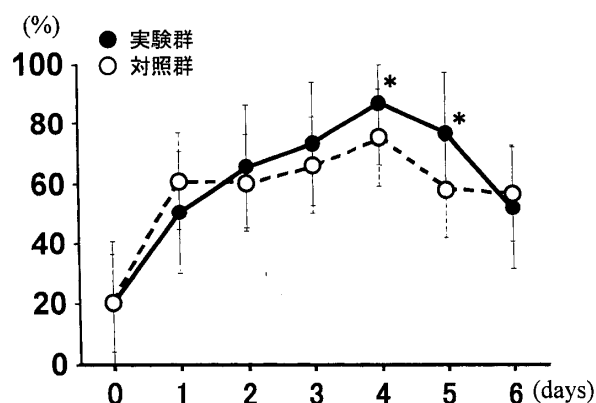
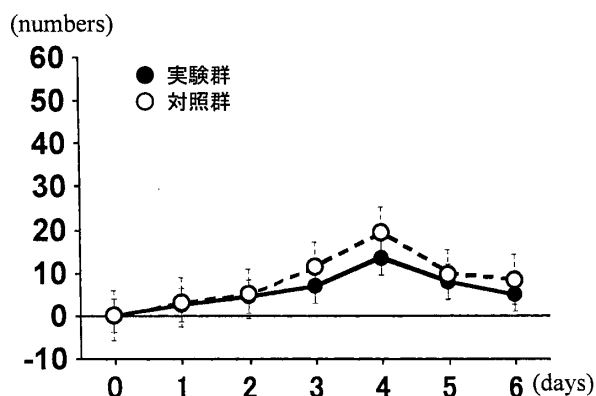
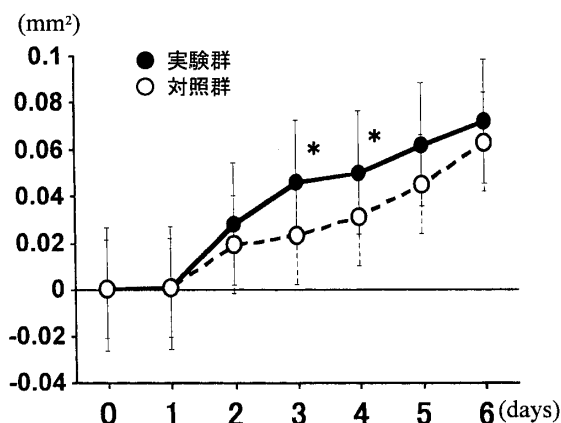


図8 TRAP染色写真 (\*；歯槽骨)

- A；抜歯後0日目（実験群×100）。陽性単核細胞（矢印）が骨膜部において散在性に観察された。
- B；抜歯後2日目（実験群×100）。陽性単核細胞（矢印）が骨膜部において骨の近傍で少数観察され、破骨細胞（矢頭）も少数観察された。
- C；抜歯後4日目（実験群×100）。陽性単核細胞（矢印）が多数観察されるようになり、破骨細胞（矢頭）も骨吸収窩にて多数観察された。
- D；抜歯後6日目（実験群×100）。陽性単核細胞、破骨細胞とも数を減じていた。
- E；抜歯後0日目（対照群×100）。陽性単核細胞（矢印）が骨膜部において散在性に観察された。
- F；抜歯後2日目（対照群×100）。陽性単核細胞（矢印）が骨膜部において骨の近傍で少数観察され、破骨細胞（矢頭）も少数観察された。
- G；抜歯後4日目（対照群×100）。陽性単核細胞（矢印）が多数観察されるようになり、破骨細胞（矢頭）も骨吸収窩にて多数観察された。
- H；抜歯後6日目（対照群×100）。陽性単核細胞、破骨細胞とも数を減じていた。

図9 TRAP陽性単核細胞核数の経時的変化 (\* ;  $p<0.05$ )図11 TRAP陽性破骨細胞核数/TRAP陽性細胞総核数の経時的変化 (\* ;  $p<0.05$ )図10 破骨細胞数の経時的変化 (\* ;  $p<0.05$ )図12 歯槽骨吸収窩面積の経時的変化 (\* ;  $p<0.05$ )

結合組織部に分けて血管数の計測を行った(図6)。骨膜部での陽性血管は非常に少なかった。対照群では抜歯後増加し2日目でピークに達したのち、以後は減少する傾向を示したが統計学的には日数による有意差はなかった。また、実験群でも同様な出現傾向を示したが、対照群に比較し少ない傾向にあった。なお抜歯後1日目のみに有意差が認められた。疎性結合組織部の血管についても同様のパターンがみられたが、実験群は対照群に比較し少ない傾向にあり、抜歯後1日目と5日目では有意差がみられた(図7)。

### 3. 酵素組織化学的

#### 1) TRAP染色

抜歯直後、1日目、TRAP陽性単核細胞は、対照群、実験群とも骨膜部においては散在性に少数認められたが、疎性結合組織部ではみられなかつ

た。2日目になっても疎性結合組織部ではほとんどみられないが、骨膜部では骨の近傍にて局在性に少数認められた。3日目より6日目までも疎性結合組織部では全体に散在性に観察されるが2日目と比較しても数に変化は認められなかった。骨膜部では骨の近傍に局在性に観察され、3日目から4日目にかけて数を増し5、6日目と減少傾向にあった(図8)。骨膜部における陽性単核細胞の核数を測定した。実験群では対照群よりも少ない傾向にあり、0、1、2、3日目と経時的に増加し4日目でピークに達し5日目より減少に転じた。4、5日目では有意に少なかった。また、出現パターンに関してもほぼ同様な傾向を示した(図9)。TRAP陽性単核細胞の出現パターンおよび出現数



はED-1陽性細胞での結果ときわめて近いものであった。また、TRAP陽性単核細胞でのTRAP獲得に関しては実験群の方がより早かった。破骨細胞は対照群、実験群とも骨吸収窩で認められた(図8)。計測の結果、対照群での出現数は抜歯後0日目では認められなかったが、1、2、3日目と増加し、4日目でピークに達し5日目より減少に転じた。それに対し実験群では同様の出現パターンを示したが、出現数は対照群に比較し少ない傾向にあった(図10)。

## 2) 破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化

単核細胞すなわち破骨細胞前駆細胞どうしが互いに融合し破骨細胞へと分化するとされるため、出現した破骨細胞前駆細胞から破骨細胞へどの程度分化しているのか検討した。そのためにTRAP陽性細胞の総核数に占めるTRAP陽性破骨細胞の核数の比率を求めた。対照群、実験群とも経時的な比率の変動は同様な傾向を示し、抜歯後0日目より比率の増加を認め、4日目でピークに達し、5日目より減少に転じた。また実験群での比率が高く、抜歯後4、5日目では有意に高かった(図11)。

## 3) 歯槽骨吸収窩面積

対照群での抜歯後0、1日目では歯槽骨の吸収は認められなかった。2日目になり歯槽骨表面に吸収窩がみられるようになり、以後吸収が進行した(図8)。実験群においても同様の吸収パターンがみられたが、対照群に比較しより著しい傾向にあった。切片上での吸収窩面積を計測した結果、対照群、実験群とも同様のパターンを示した。抜歯後3、4日目では実験群での吸収窩面積が有意に広がった(図12)。

## 考 察

本実験において出現する細胞は、出現のピーク時には単核細胞、多核細胞が混在する。そこで、破骨細胞系にcommitされた細胞の動態を把握するために核数を計測した。TRAP染色の結果陽性単核細胞および破骨細胞は、対照群、実験群とも抜歯後4日目でピークに達した。これはBaronら<sup>9)</sup>、Tran VanVら<sup>10)</sup>、およびBaroukhら<sup>11)</sup>の結果と一致する。また、ラットの歯に外力を加え破骨

細胞の出現をみた渡邊<sup>5)</sup>および藤田<sup>12)</sup>の結果ともほぼ同様であった。誘導刺激が加わって実際に破骨細胞が機能を開始するのに3～4日要することを示している。

藤田<sup>12)</sup>は歯に外力を加えたのち新たに出てくる単核細胞について2種類の抗マクロファージ抗体ED-1、ED-2を用い検討している。その結果、組織在住マクロファージを認識するED-2陽性細胞に変動がみられないところから、新たに出てくるマクロファージは滲出性であることを明らかにした。さらに、これら滲出マクロファージの出現パターン、数がTRAP陽性細胞とほぼ一致することから、破骨細胞前駆細胞はそのすべてが刺激によって新たに局所に滲出してくると結論づけている。本研究結果でのED-1陽性細胞とTRAP陽性細胞の出現パターンの比較からもこのことが裏づけられた。一方、同じ実験モデルを用いたBaroukhら<sup>11)</sup>は、対合歯抜去により新たに出てくる破骨細胞のすべてが新たに滲出してきた破骨細胞前駆細胞の分化によるものではなく、少なくとも一定時期までに出現する破骨細胞は骨膜領域にもともと在住する破骨細胞前駆細胞が分化したものと考えている。しかしながら、彼らは全マクロファージを同定する酵素非特異性エステラーゼおよび抗体ED-1を用いており、在住マクロファージの識別は行っていない。したがって、在住マクロファージを破骨細胞前駆細胞とみなした可能性がある。プロスタグランジンの作用のひとつに血管透過性亢進がある。実験群と対照群を比較すると、実験群では単核細胞と多核破骨細胞の双方において数が少なく、特に単核細胞では抜歯後4、5日目に有意差が認められた。したがって、この結果はCOX-2の阻害によるプロスタグランジン生成抑制が破骨細胞前駆細胞の局所誘導を量的に減少させることを表している。

滲出を左右する要因として血管形成を考える必要があるかもしれない。そこで抗Factor VIII抗体陽性血管数の計測を行ったところ、実験群においては対照群と比較すると少ない傾向にあり、抜歯後1日目と5日目では有意に少なかった。この結果からはCOX-2を阻害することで血管形成が抑制された可能性が考えられる。このことも破骨細

胞前駆細胞および破骨細胞の全体量の少ない理由なのかもしれない。プロスタグランジンが血管形成に関与することについては、Tsujiら<sup>13)</sup>が、COX-2にはVEGF, b-FGF, TGF- $\beta$ , PDGFなどの血管新生因子の誘導能があり、COX-2の選択的阻害剤は用量依存性に血管新生因子の産生を抑制するとともに、COX-2選択的阻害剤自体プロスタグランジン依存性・非依存性にMAPキナーゼ (ERK2) 阻害を介し血管内皮細胞に直接作用して血管新生を抑制する可能性を報告している。

最終的に破骨細胞系にcommitした単核前駆細胞は互いに融合し多核の破骨細胞へと分化する。したがって出現した破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化の度合を検討するためにTRAP陽性細胞の総核数に占めるTRAP陽性破骨細胞の核数の比率を求めた。実験群での比率は対照群よりも高く、抜歯後4, 5日目では有意に高かった。この比率が高ければ高いほど破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が促進されているものと解釈される。したがって、本研究結果からは、COX-2を選択的に阻害しプロスタグランジン生成を抑制することはむしろ破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を促進している可能性が示唆される。さらに、出現した破骨細胞の分化を機能面から確かめるため、歯槽骨表面の吸収窩面積を計測した。実験群においては、観察期間を通じ対照群に比較して骨吸収が著しい傾向にあり、抜歯後3, 4日目では有意に吸収窩面積が広がった。この結果より機能面からも分化が促進していることがうかがえる。

プロスタグランジンの破骨細胞分化への役割については未だ意見の一致をみていないものの、少なくとも*in vitro*の研究においては、その多くが分化を促進すると報告している。最近Okadaら<sup>14)</sup>はCOX-2遺伝子欠損マウスの骨髓細胞培養において、正常マウスに比べ破骨細胞形成が抑制され、さらに、COX-2阻害剤添加培地での骨髓細胞培養でも同様の結果が得られたことを報告している。また、Kotakeら<sup>15)</sup>はIL-17を介しての破骨細胞分化がCOX-2を阻害することにより完全に阻害されることを明らかにしている。本研究の結果はこれらの報告と相反することとなった。その理由については現段階で説明することは困難だが、生体

内におけるプロスタグランジンの作用の特異性ということが考えられるかもしれない。しかしながら単純化された*in vitro*の環境下での結果が直ちに複雑な*in vivo*の環境での現象に当てはまるか否かについては疑問があり、さらに種々の実験系で検討する必要がある。

本研究の結果を考察するにあたり、実験系の特殊性を考慮する必要があるかもしれない。破骨細胞分化へのプロスタグランジンの役割については多くの研究が炎症性骨吸収を想定している。炎症性骨吸収においてはプロスタグランジンに加えIL-1, IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ など多様なサイトカインが複雑なネットワークを構成し、複合的に破骨細胞分化に関与すると考えられる<sup>16~20)</sup>。一方、本実験モデルでは細菌感染等による一般的な意味での炎症は生じていないと思われる。破骨細胞分化に関わるネットワークも炎症時のものとは大きく異なることが考えられる。したがって、ネットワークの一員としてのプロスタグランジンの役割もおのずから異なってくる可能性がある。

## ま と め

プロスタグランジンを生成する酵素COX-2を選択的に阻害することで組織化学的に以下の結果を得た。

1. 抗マクロファージ抗体ED-1陽性細胞核数およびTRAP陽性細胞核数において実験群では対照群と比較して出現数は少なかった。

2. 抗Factor VIII抗体陽性血管数において実験群では対照群に比較し、減少傾向にあり、抜歯後1, 5日目では有意に少なかった。

3. 単核細胞すなわち破骨細胞前駆細胞どうしが互いに融合し破骨細胞へと分化する程度では、TRAP陽性細胞の総核数に占めるTRAP陽性破骨細胞の核数の比率を求めた。実験群での比率が高い傾向にあり抜歯後4, 5日目では有意に高かった。

4. 歯槽骨吸収窩面積では、実験群では対照群に比較し、吸収程度が高い傾向にあり抜歯後3, 4日目では有意に吸収窩面積が広がった。

以上の結果より、プロスタグランジンを生成する酵素COX-2を選択的に阻害することで破骨細

胞およびその前駆細胞を含む広範囲の単球・マクロファージ系細胞の滲出は阻害されるが、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化が促進され、破骨細胞の骨吸収能も亢進することが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました本学口腔病理学講座、山崎 章教授ならびに同口腔外科学講座、大野 敬教授に謹んで感謝の意を表しますとともに、種々御援助頂きました口腔病理学講座ならびに口腔外科学講座の教室員の皆様方に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第47回日本口腔外科学会総会（平成14年10月 札幌）および第35回奥羽大学歯学会（平成15年6月 郡山）において発表した。

## 文 献

- 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.
- Fais, S., Burgio, L. V., Silvestri, M., Capobianchi, M. R. *et al.* : Multinucleated giant cells generation induced by interferon- $\gamma$ . Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated giant cell formation. *Lab Invest* **71** ; 737-743 1994.
- Roodman, G. D., Ibbotson, K. J., MacDonald, B. R., Kuehl, T. J. *et al.* : 1, 25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> causes formation of multinucleated cells with several osteoclast characteristics in cultures of primate marrow. *Proc Natl Acad Sci* **82** ; 8213-8217 1985.
- Alvarez, J. I., Ross, F. P., Athanasou, N. A., Blair, H. C. *et al.* : Osteoclast precursors circulate in avian blood. *Calcif Tissue Int* **51** ; 48-53 1992.
- 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.
- Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H. *et al.* : Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Research* **58** ; 3761-3764 1998.
- Achiwa, H., Yatabe, Y., Hida, T., Kuroishi, T. *et al.* : Prognostic significance of elevated cyclooxygenase 2 expression in primary, resected lung adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research* **5** ; 1001-1005 1999.
- Okami, J., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Tsujie, M. *et al.* : Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clinical Cancer Research* **5** ; 2018-2024 1999.
- 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.
- Tran Van, P., Vignery, A. and Baron, R. : Cellular kinetics of the bone remodeling sequence in the rat. *Anat Rec* **202** ; 445-451 1982.
- 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.
- 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.
- Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H. *et al.* : Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **93** ; 705-716 1998.
- Okada, Y., Lorenzo, J. A., Freeman, A. M., Tomita, M. *et al.* : Prostaglandin G/H synthase-2 is required for maximal formation of osteoclast-like cells in culture. *J Clin Invest* **105** ; 823-832 2000.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K. *et al.* : IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest* **103** ; 1345-1352 1999.
- Fujikawa, Y., Sabokbar, A., Neale, S. D., Itonaga, I. *et al.* : The effect of macrophage-colony stimulating factor and other humoral factors (interleukin-1, -3, -6, and -11, tumor necrosis factor- $\alpha$ , and granulocyte macrophage-colony stimulating factor) on human osteoclast formation from circulating cells. *Bone* **28** ; 261-267 2001.
- Azuma, Y., Kaji, K., Katogi, R., Takeshita, S. *et al.* : Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem* **275** ; 4858-4864 2000.
- Kobayashi, K., Takahashi, N., Jimi, E., Udagawa, N. *et al.* : Tumor necrosis factor- $\alpha$  stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med* **191** ; 275-285 2000.
- Scopes, J., Massey, H. M., Ebrahim, H., Horton, M. A. *et al.* : Interleukin-4 and Interleukin-13 : bidirectional effects on human osteoclast formation. *Bone* **29** ; 203-208 2001.

- 20) Massey, H. M., Scopes, J., Horton, M. A. and Flanagan, A. M. : Transforming growth factor- $\beta$  1 (TGF- $\beta$ ) stimulates the osteoclast-forming potential of peripheral blood hematopoietic precursors in a lymphocyte-rich microenvironment. *Bone* **28** ; 577-582 2001.

著者への連絡先：小板橋 勉, (〒963-8611)郡山市富田町  
字三角堂31-1 奥羽大学歯学部口腔外科学講座

Reprint requests : Tsutomu KOITABASHI, Department  
of Oral Surgery, Ohu University School of Dentistry  
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan