歯根嚢胞による骨の直接的吸収に関する実験的研究

角田左武郎・松本英彦・加藤和子
吉村 節・倉地洋一・南雲正男

Experimental studies on direct bone resorption by radicular cyst in vitro

Saburo KAKUTA・Hidehiko MATSUMOTO・Kazuko KATO
Setsu YOSHIMURA・Yoichi KURACHI・Masao NAGUMO

緒 言

歯源性嚢胞は顎骨内に発生し、周囲の顎骨組織を吸収して増大していくと考えられる。その機序として、亢進した嚢胞内圧が骨吸収を促進し、嚢胞が増大すると理解されている^{1,2)}。したがって嚢胞に関する生化学的研究の多くは、嚢胞内容液の分析、あるいは停滞機構などに集中していた³⁻⁵⁾。

最近、鈴木ら⁶⁾は嚢胞内容液を分析した結果、嚢胞壁組織の脂質代謝に注目し、嚢胞壁の過酸化脂質が、嚢胞の増大に関与することを推測した。また、Harrisらは、嚢壁組織を培養すると、培地中に prostaglandins (PGs) 様物質が放出され、この物質が *in vitro* で骨組織を吸収する能力のあることを示した⁷⁻⁹⁾。

一方、Eilonら¹⁰⁾は腫瘍細胞が、Oguchi¹¹⁾は歯根吸収組織が、Mundy¹²⁾、Kahn^{13,14)}、あるいは McArthurら¹⁵⁾は血液単球あるいは腹腔内滲出 macrophage が、直接骨組織を吸収する能力のあることを *in vitro* で証明している。このことは、破骨細胞以外の細胞、あるいは組織が骨組織を吸収する能力のあることを示唆していると思われる。

したがって、顎骨嚢胞の増大機構を考える際、嚢胞組織が破骨細胞を活性化する因子を放出して、間接的に周囲骨組織を吸収する機構のほかに、嚢胞壁組織が直接骨組織を吸収する機構の存在も考慮すべきであると考えられる。そこで、われわれは顎領域で頻繁に遭遇する歯根嚢胞を用い、*in vitro* の系で嚢胞組織に骨吸収能があるかどうかを検討したので報告する。

実 験 方 法

実験材料：採取した歯根嚢胞をPBS (200U/ml: penicillin-G, 1mg/ml: streptomycin を含む) で十分に洗浄し、約 $2 \times 2 \times 1 \text{ mm}^3$ 程度に細片して使用した。嚢胞以外の組織としては、臨床的に発赤の認められる歯肉、智歯周囲炎の既往のある埋伏歯の歯小嚢、炎症を起こした既往のない正中過剰埋伏歯の歯小嚢、および rat の肝臓を同様に細片化して実験に使用し、歯根嚢胞組織と比較検討した。

骨吸収の実験：骨吸収の実験は Oguchi¹¹⁾の方法に準じて行った。すなわち、体重約 50 g 前後の wister 系雄性 rat の腹腔内に ^{45}Ca を $50 \mu\text{Ci}$ (specific activity: 24 Ci/m mole) 注入し、1週間飼育したのち断頭し、頭頂骨を取り出した。この一對の頭頂骨を -20°C で凍結保存し、細胞成分を死滅させ、16等分し実験に使用した。この頭頂骨には、 ^3H -proline を一緒に培養しても取り込みが認められないことを、予備実験によってあらかじめ確認した。このことは、この頭頂骨は蛋白合成能がなく細胞成分が死滅していることを意味している。

骨吸収の実験に先立って、16等分された骨組織を stainless steel mesh の入った直径約 6cm の Falcon plastic dish に入れ、初めは 2ml の PBS (200U/ml: penicillin-G, 1mg/ml: streptomycin を含む) を steel mesh に乗せた骨組織が浸るように加えて24時間放置した。ついで、 Ca^{2+} が終濃度で 1.26 mM になるように調整した Ham F 12 培地 (20 U/ml: penicillin-G, $100 \mu\text{g/ml}$: streptomycin, 10% 仔牛血清: CCS を含む) を加えて、24時間 5% CO_2 , 95% 空気で炭酸ガス培養器にて前培養を行い、結合の弱い ^{45}Ca を除去した。骨吸収の実験は、前培養した頭頂骨を図1のように嚢壁組織ではさみ込み、上述の Ham F 12 培地を 2ml 加えて3日間培養して行った。

培地は毎日交換し、その際得られる古い培地を検体とし、蒸留水 2.5ml および Instagel 5.5ml (Packard社)

昭和大学歯学部第2口腔外科学教室（主任：南雲正男教授）

The Second Department of Oral Surgery, School of Dentistry, Showa University (Chief: Prof. Masao Nagumo)

受付日：昭和56年7月24日

図 1 実験方法

Ham F 12

- (20U/ml: penicillin G
- 100μg/ml: streptomycin
- 10%: CCS
- 1.26mM: Ca²⁺

培養条件

5% CO₂ 95% 空気 37°C

を加えて liquid scintillation counter で培地に放出された ⁴⁵Ca を測定し、骨吸収能を検討した。骨吸収能は cpm 値、または何の組織も加えない対照群の cpm 値との比であらわした。培養期間中の培地の pH の変動は 7.1 から 7.4 の間であり、極端に acidosis になることはなかった。

組織への ³H-proline 取り込み 培養中に嚢壁組織が生きていれば、蛋白合成が行われると考え、³H-proline の組織への取り込み能を検討した。⁴⁵Ca を取り込ませていない頭頂骨とともに組織を培養し、培養 1 日目、2 日目、3 日目、4 日目に ³H-proline 20 μCi (specific activity: 5Ci/m mole) とそれぞれの dish に入れ 24 時間培養して ³H-proline の取り込みを検討した。培地は 10% CCS を含む Eagle's MEM 培地 2 ml を用い、培養は 5% CO₂、95% 空気炭酸ガス培養器で行った。培養後、嚢胞組織片を取り出して PBS で洗浄し 0.5 N 酢酸 1 ml を加えて十分にホモジナイズした。ついで、培養液とホモジネートを一緒にして約 1,000 倍の 0.5 N 酢酸で透析した。透析外液の ³H-proline のレベルがほとんど消失するまで透析液を頻回に交換したのち、内液の ³H-proline 量を liquid scintillation counter で測定して蛋白合成能を検討した。

結 果

歯根嚢胞による骨吸収について：嚢胞壁組織片で骨組織をはさみ込み、3 日間培養し骨吸収能を検討したのが図 2 である。何の組織も乗せていない対照群と比較し、骨吸収が促進していることが確かめられた。

図 3 は 1 日量の変化を実験群と対照群で比較したものである。培養期間中、その比は 1.24、1.21、1.25 と大きな変動は認められなかった。この現象の原因として、骨組織をはさみ込んだという物理的刺激により骨組織が吸収されたという可能性が考えられる。そこで嚢胞壁組織を 100°C で 1 分間熱処理し、新鮮な組織と比較検討

図 2 歯根嚢壁組織による骨吸収。実験は triplicate 行い平均値 ±SD で示した。

図 3 嚢壁組織群および対照群の 1 日量の変化。下段はその比を示す。

図 4 熱処理嚢壁組織の骨組織に対する効果。熱処理群のみ triplicate 行っている。他の群は duplicate。

表 1 嚢胞と骨組織の接触関係

接触関係	実験群 / 対照群
両面接触群	1.25±0.06 (12)
非接触群	1.11±0.06 (3)

平均値 ISD (n)

図 5 嚢壁組織による ^3H -proline の取り込み。対照は組織に熱処理を加えて 24 時間培養し、 ^3H -proline の取り込みを測定。

表 2 各種組織片による骨吸収

組 織	炎症	実験群 / 対照群
歯 肉	+	1.28±0.04 (3)
歯小囊		
下 顎 智 歯	+	1.29
正中過剰歯	—	1.10
ラット肝臓	—	0.88
歯根嚢胞	+	1.25±0.06 (11)

平均値±SD (n)

したのが図 4 である。図より明かなように、熱処理を加えた群は対照群と大差なく、逆に低下傾向が認められた。

表 1 は、嚢胞壁組織と骨組織の接触の有無による骨吸収の差異を検討したものである。接触群では対照群の 1.26 倍なのに対して、骨組織と嚢壁組織を遠くに離して置いた非接触群では 1.11 倍であり、接触群に骨吸収の促進が認められた。

^3H -proline の取り込みについて：培養期間中に組織

が死滅する可能性が考えられるので ^3H -proline の取り込みについて検討を加えた (図 5)。1 日目、2 日目と同程度の ^3H -proline の取り込みが認められたのに対して、3 日目より低下傾向を示し、4 日目で急激な低下が認められた。このことは組織の viability が培養日数の増加とともに低下することを意味しているものと思われる。また、熱処理を加えた組織では全く取り込みが認められなかった。

各種組織片の骨吸収能について：各種組織片と歯根嚢胞組織片の骨吸収能を比較したものが表 2 である。臨床的に発赤の認められた歯肉および、炎症を起こした既往のある埋伏歯の歯小囊では、歯根嚢胞組織片と同様に骨吸収の促進が認められたが、炎症の既往のない正中過剰埋伏歯の歯小囊および、rat の肝臓では対照群と比較して骨吸収の促進は認められなかった。

考 察

一般に顎骨内嚢胞の骨吸収機構としては、炎症等の刺激により、嚢胞の内圧が亢進し、その結果周囲の骨組織が吸収するといわれている^{1,2)}。しかし、今回の報告により、嚢胞組織片が直接破骨細胞の関与なく、骨組織を吸収する能力のあることが、*in vitro* の実験により確認された。この吸収は組織と骨組織を接触させたという物理的な刺激によるものでないことは図 4 より明らかである。さらに、培養期間中の培地の pH を調べたところ、7.1 から 7.4 の間であることより、培地が acidosis になり、そのため骨組織が吸収されたという可能性も考えられない。しかも、骨組織を凍結保存して、骨組織の細胞成分を死滅させているため、破骨細胞の関与も考えにくいことから、直接嚢胞壁組織が骨組織を吸収したものと考えた。

破骨細胞による骨吸収機構を考えてみると破骨細胞は骨表面に密着し、その間に特殊な環境を形成するといわれている。これを電子顕微鏡的に検索すると、ruffled border が骨表面に接し、この周囲に clear zone が形成されている。破骨細胞は ruffled border より骨吸収促進因子を放出して骨吸収を促進するといわれている¹⁶⁾。骨吸収を促進する parathyroid hormone や PGs は破骨細胞を活性化し、ruffled border で接する細胞を増加させる。逆に骨吸収を抑制する calcitonin は細胞を減少させ、ruffled border を平坦化するといわれている¹⁹⁾。嚢胞組織片による骨吸収においても、骨組織と組織片は接触していることが重要であると思われる。Oguchi¹¹⁾ もまた、歯根吸収組織を用いた実験で、吸収組織が骨表面に接することが重要であると報告している。しかし、嚢壁組織片がどのような形式で骨組織に接しているのか、いかなる機構で骨組織を吸収するのかは、現在のところ明らかでない。

では、この嚢壁組織による骨吸収にどのような細胞が関与しているのだろうか。

Eilon ら¹⁰⁾は腫瘍細胞を用いて、骨吸収能を検討し、骨転移を起こした腫瘍より分離された腫瘍細胞が骨組織を吸収する能力のあることを報告している。また、Mundy ら¹²⁾は plastic dish に付着した血中単核細胞（単球）が骨組織を吸収する能力があること、付着しない単核細胞（大部分リンパ球）は吸収する能力のないことを報告している。単球あるいは macrophage が骨組織を吸収する能力のあることは、その他 Kahn^{13,14)}, McArthur¹⁵⁾のグループも報告している。歯根嚢胞を組織学的に調べると、炎症性の細胞浸潤が認められる。このことから、嚢壁組織による骨吸収に macrophage などの炎症性細胞が関与する可能性が十分に考えられる。さらに、表2より検討例は少ないが、炎症を起こした組織が炎症のない組織より骨吸収能があることからこのことは推察される。しかし、この点に関しては、組織学的所見と照らしあわせてさらに検討する必要があるものと思われる。

一般に、骨組織は破骨細胞により吸収されるといわれている。特に炎症における骨吸収機構としては、局所に PGs や lymphokine の一種である osteoclast activating factor が出現し、これらの特質が破骨細胞を活性化し、骨組織を吸収するものと考えられている²⁰⁾。嚢胞における骨吸収においても、嚢胞内圧が上昇し嚢胞が周囲の骨組織を圧して、その刺激により骨組織内に PGs が産生され、破骨細胞が活性化されて骨組織が吸収される可能性が考えられる。さらに、感染等により嚢胞壁組織自身が PGs を産生して周囲骨組織を吸収する可能性もある。Yamazaki ら^{21,22)}は歯牙移動による実験で、矯正力を歯牙に加えると、周囲の骨組織に PGs 様の物質が出現し、局所の破骨細胞数が増加することを報告している。さらに、Harris ら⁷⁻⁹⁾は嚢壁組織を培養すると、PGs 様の物質が培地に放出され、この物質が *in vitro* で骨組織を吸収することを報告している。osteoclast activating factor に関しては、今のところ明らかではない。

したがって、われわれの実験結果、および Yamazaki,

Harris らの報告を考え合わせると、歯根嚢胞による骨吸収機構としては、今のところ図6のように2つの機構が考えられる。しかし、これらの結果は *in vitro* の実験結果および動物実験からの推定であるので、ヒトの場合においても同じ骨吸収の機構が存在すると結論するにはさらにデータの集積が必要であろう。

結 論

顎骨内に発生する嚢胞は周囲の骨組織を吸収して増大するが、局所での骨吸収機構は不明である。そこでこの機構を解明することを目的として、まず嚢壁組織が直接骨組織を吸収する能力があるかどうか *in vitro* の系にて検討した。その結果、

1. 嚢壁組織は明らかに骨吸収能を持つことが確かめられた。
2. 熱処理をした嚢壁組織では骨吸収能は認められなかった。
3. 嚢壁組織による骨吸収は、組織片が直接骨組織に接することが必要に思われた。
4. 培養による組織の生死を ³H-proline の取り込みにより検討したところ、3日目より減少が認められた。
5. 嚢壁組織以外に歯小囊、歯肉、肝臓の骨吸収能を検討したところ、炎症を起こしている組織の方に骨吸収能が高い傾向にあった。

以上のことから、歯根嚢胞組織は直接骨組織を吸収する能力があることが確かめられた。

引 用 文 献

- 1) Toller, P.A.: The osmolality of fluids from cysts of the jaws. Br Dent J 129 : 275 1970.
- 2) Skaug, N.: Intracystic fluid pressure in non-keratinizing jaw cysts. Int J Oral Surg 5: 59 1976.
- 3) 金子勲夫：顎骨嚢胞内容液に関する生化学的研究。日口外誌 18:2 1972.
- 4) Skaug, N.: Soluble proteins in fluid from non-keratinizing jaw cysts in man. Int J Oral Surg 6: 107 1977.
- 5) 北 進一、他：顎骨嚢胞の病態に関する臨床生化学的研究。日口外誌 23: 21 1977.
- 6) 鈴木 貢：顎口腔疾患の臨床的考察（終報）、顎骨嚢胞の臨床生化学的考察（その6）、一特に顎嚢胞増大因子に関する臨床生化学的検討。口科誌 29: 460 1980.
- 7) Harris, M.: The production of a bone resorbing factor by dental cyst in vitro. Br J Oral Surg 10: 334 1973.
- 8) Harris, M., et al.: Prostaglandin production and bone resorption by dental cysts. Nature

図6 歯根嚢胞による骨吸収機構（仮説）

- 245: 213 1973.
- 9) Harris, M. : Odontogenic cyst growth and prostaglandin-induced bone resorption. *Annals of the Royal College of Surgeons of England* 60: 85 1978.
 - 10) Eilon, G., Mundy, G.R. : Direct resorption of bone by human breast cancer cells in vitro. *Nature* 276:726 1978.
 - 11) Oguchi, H. : In vitro studies of bone resorption by the root-resorbing tissue from the bovine deciduous tissues. *Bulletin of Tokyo Medical and Dental University* 22: 175 1975.
 - 12) Mundy, G.R., et al. : Direct resorption of bone by human monocytes. *Science* 196:1109 1977.
 - 13) Kahn, A.T., et al. : Contact mediated bone resorption by human monocytes. *Science* 199: 988 1978.
 - 14) Teitelbaum, S.L., et al. : Rodent peritoneal macrophages as bone resorbing cells. *Calcif Tiss Intl* 27: 255 1979.
 - 15) McArthur, W., et al. : Bone solubilization by mononuclear cells. *Lab Invest* 42: 450 1980.
 - 16) 小沢英浩 : 硬組織の超微細構造と石灰化. *骨代謝* 8: 227 1975.
 - 17) Wezman, F.H., et al. : Morphology of osteoclasts in resorbing fetal rat bone explants: Effects of PTH and AIF in vitro. *Anat Rec* 194: 311 1979.
 - 18) Schelling, S.H., et al. : Role of osteoclast in prostaglandin E_2 -stimulated bone resorption. A correlative morphometric and biochemical analysis. *Lab Invest* 42: 290 1980.
 - 19) Kallio, D.M., et al. : Ultrastructural effects of calcitonin on osteoclasts in tissue culture. *J Ultrastructure Res* 39: 205 1972.
 - 20) Raisz, G., et al. : Immunologic factors influencing bone resorption : Role of osteoclast activating factor from human lymphocytes and complement mediated prostaglandin synthesis. In calcium regulating hormones, eds. Talmage, R.V., et al., p145, 1975. *Excerpta Medica*. Amsterdam.
 - 21) Yamazaki, K., et al. : Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *J Dent Res* 59: 1635 1980.
 - 22) 山崎健一, 他 : 歯科矯正刺激によって誘導された内因性プロスタグランディンの骨吸収機序について. *骨代謝* 13: 329 1980.