抜歯創の初期治癒過程における血管内皮細胞の電顕的研究

岡田 裕之・釜崎 直人・追川 哲雄

泉 廣次・小澤 幸重*

Electron microscopical study of endothelial cells on early healing process in tooth extraction wounds

Hiroyuki OKADA・Naoto KAMASAKI・Tetsuo OIKAWA

Hirotsugu IZUMI・Yukishige KOZAWA*

Abstract: The vascularization is an important factor along with the wound healing process, and there are some reports on extraction wounds. However, the ultrastructure of newly developed capillaries in the healing process is still argued. It is aimed of clearing the ultrastructural early healing process of endothelial cells in the experimental tooth extraction wound by electron microscopy.

Immediately after the extraction, the diffused basal lamina intermittently surrounded endothelial cells. Three days after the extraction, the basal lamina was not continuous, but had no gap with endothelial cells. Four days after the extraction, the basal lamina almost reconstructed.

On tannic acid injection into blood vessels, it was observed in the narrow lumen of cell masses which continued to capillaries. It is suggested that cell masses are derived from the endothelial cells, and are the precursor of capillaries.

The cell masses were formed by two or three undifferentiated endothelial cells. The narrow lumen was observed in the cell mass and these cells project short folds into the lumen. These cells connected by tight junctions, but the basal lamina was not complete. On tannic acid injection, it does not perfuse into the stroma through the basal lamina. It is concluded that these types of connections between the endothelial cells, were one of the characteristic features of capillaries in the tooth extraction wound.

Key words: extraction wounds (抜歯創), endothelial cells (内皮細胞), ultrastructure (微細構造)

緒 言

抜歯創の治癒・修復に関する研究は、動物実験を用いた開放性抜歯創について基本的な経過が報告されている¹⁻⁴⁾。しかし、抜歯窩における血管新生に関しては、十分に解明されていない^{2,5-9)}。

創傷治癒において重要と考えられる血管内皮細胞は、血流という機械的ストレスを受け、また、血液と組織・細胞との物質交換・分泌の機能とともに、高い分化的多

創傷治癒において重要と考えられる血管内皮細胞は、血流という機械的ストレスを受け、また、血液と組織・細胞との物質交換・分泌の機能とともに、高い分化的多

日本大学松戸歯学部第1口腔外科学教室
(主任: 泉 廣次教授)

* 日本大学松戸歯学部第2解剖学教室
(主任: 小澤幸重教授)

Department of Oral Surgery, Nihon University
School of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof.

Hirotsugu Izumi)

* Department of Anatomy, Nihon University School
of Dentistry at Matsudo (Chief: Prof. Yukishige
Kozawa)

受付日: 平成3年11月21日

Fig. 1 The remained periodontal ligament is recognized between the bone and blood cells. Capillaries are observed near the bone surface of alveolar fossa in the remained periodontal ligament. $\times 600$ (Immediately after the extraction)

能性があるといわれる^{10,11)}。一方では、血管の新生には、内皮細胞を囲む基底膜が重要な働きをなすといわれている^{12,13)}。それゆえ、内皮細胞は多様な機能的特性を反映した形態をとり、その微細構造も血管の種類や部位、器官によって著しく器官特異性があることがあきらかとなりつつある^{14,15)}。血管は種々の刺激を受けて作用する歯根膜中に豊富に存在し、これを養うためさまざまな機能を有すると考えられる。しかし、歯根膜の内皮細胞に関して形態学的に微細構造を扱った研究は少なく¹⁶⁻¹⁸⁾、基本的な姿も十分にあきらかになっていない。

そこで本研究は、抜歯創の治癒過程における血管内皮細胞を、電子顕微鏡を用いて微細構造的に検討を加えた。

材料と方法

実験として、5週齢(体重約 100 g)のウイスター系雄性ラット(日本クレア社)32匹を用いた。飼料はオリエンタル MF(オリエンタル酵母社)を与え、水道水とともに自由摂取させた。ペントバルビタールナトリウム(ネプタール 1 ml/kg ダイナボット社)腹腔内麻酔下、手術野を3%過酸化水素水および0.025%塩化ベンザルコニウムにて消毒の後、歯周組織にできるだけ障害を与えぬように探針、スプーンエキスカベーターおよび乳歯用下顎残根鉗子を用いて上顎左側第1臼歯を抜去した。抜歯創は開放創とし、自然治癒にゆだねた。

1. 観察期間

抜歯直後と抜歯後1, 2, 3, 4, 5および7日目の組織像を観察した。

Fig. 2 The diffused basal lamina is partly observed around the capillary. Connective tissues disordered. However, many vesicles are observed in the cytoplasm of the endothelial cell, same as normal cells. The arrangement and distribution of organelles are more irregular than the normal one. The cell junctions of endothelial cells make loosely. Bar=2 μm (Immediately after the extraction)

2. 標本作製および観察部位

ペントバルビタールナトリウム腹腔内麻酔下で、左心室に留置針を挿入し、ヘパリン添加生理食塩水(10 U/ml)にて十分に駆血洗浄を行った後、2.5%グルタル・アルデヒド溶液(0.1M カコジレート緩衝液 pH7.4)にて灌流固定を行った。試料採取後、2日間同固定液に浸漬させ、10% EDTA 溶液にて4°Cで14日間脱灰を行い、前頭断方向に分割し、2%四酸化オスミウムで後固定およびエポキシ樹脂包埋した。

タンニン酸注入標本は、同固定液に0.4%タンニン酸を加え、同様に固定、包埋した。

包埋試料を薄切(1 μm)し、トリジンブルー染色を施し光学顕微鏡で観察し、オリエンテーションを得た。抜歯直後は残存歯根膜、抜歯後2~4日目は血管新生が盛んと考えられる血餅周囲の肉芽組織、抜歯後5および7日目は抜歯窩中央部を残してトリミングを行った。その後、これを超薄切片とし、酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色を施して透過型電子顕微鏡(日立 HS-9)にて観察した。

結 果

1. 抜歯直後

抜歯窩は赤血球を主体とする血球成分で満たされ、歯槽骨の一部に歯根膜が残存していた。一部に残存する歯

Fig. 3 A leukocyte is passing through the capillary, which is damaged one. The capillary, containing the leukocyte in the lumen, contains vesicles and other organelles. The junction of endothelial cells are separated together. The basal lamina, which becomes diffuse and separates from endothelial cells, is partly observed. Bar=2 μ m (One day after the extraction)

根膜中にのみ、既存の血管が認められた (図1)。

残存歯根膜中の毛細血管の大部分は連続性のものであった。出血部の近くには断裂された毛細血管が認められ、断裂部付近には血小板やリンパ球が毛細血管腔に凝集する像が認められた。内皮細胞は全体的に萎縮した形態を示していた (図2)。

内皮細胞の核領域の細胞質には、遊離リボゾーム、粗面小胞体 (以下 RER)、ミトコンドリアなどが観察された。小胞は多数認められ、その分布は管腔側では不規則に散在するが、基底側の細胞膜の近くでは正常歯根膜の毛細血管と同様に一列に配列していた (図2)。

核領域以外の薄い細胞質の部位では、微細線維の配列やミトコンドリアの分布に規則性が認められるが、小胞は管腔側で分布が乱れ、基底側では規則的に配列していた。細胞の境界、細胞と基底膜の間は開大していた。

内皮細胞の管腔への突起の形態は、単純なものや樹枝状のものなどさまざまであり、赤血球が接着している像も認められた。

血管の断裂部には基底膜が認められず、周囲の基底膜は断裂し、部分的にしか認められなかった (図2)。

2. 抜歯後1日目

抜歯窩中央には血餅が存在しており、その周囲を線維が取り囲んでいた。歯槽骨に近い部分に肉芽組織が認められ、少数の血管が観察された。

抜歯創の血餅の周囲に線維素と破壊されたコラーゲンを認め、空腔変性のある細胞が多数観察された。毛細血管は有窓のものが少なく、全体的に細胞間隙が開大しており、種々の形態変化が起きている無窓性のものを多数認めた (図3)。

核領域の細胞質は、正常毛細血管と比べて著しく乏しく、若干のゴルジ装置、遊離リボゾーム、ミトコンドリア、RER などが存在していた。核領域以外では、少数の遊離リボゾーム、小胞、微小線維などが散在するが、正常に比べて細胞小器官が少なかった。

内皮細胞より伸長する突起は、さまざまな形態をなしていた。すなわち、管腔側の突起の基部に大きな陥凹を形成したり、突起が管腔へあるいは血管外へ著しく伸長することがあった。管腔への突起には、白血球と接するもの、またリンパ球を完全に包む形態が認められた。細胞間隙は開大するが、薄い内皮細胞の間隙から白血球や赤血球が管腔外へ移動しつつある像が多く認められた (図3)。細胞間隙が開大した部では、基底膜が断裂し、分散していた。

3. 抜歯後2日目

抜歯窩中央の血餅周囲を、線維素が網目状構造を形成していた。肉芽組織の分布は抜歯窩全体にわたるが、毛細血管は血餅周囲にはほとんど認められなかった。

抜歯創の凝血部の外側に、毛細血管、線維素、赤血球

Fig. 4 Newly differentiated endothelial cells contain mitochondria, RER and free ribosomes. These cells are smoothly contacted by newly differentiated desmosomes at cell junctions. The basal lamina of new endothelial cell lacks in some parts, and other parts it can be observed. Bar=3 μ m (Two days after the extraction.)

およびコラーゲン線維が散在していた。有窓性の毛細血管はほとんど認められなかった。管腔内への突起は太いものも多く認められ、伸長し管腔壁に大きな陥凹を形成しているものも観察された。

血餅近くの毛細血管の内皮細胞は、核小体が明瞭であり、細胞内合成の機能が盛んであることを示していた(図4)。核領域近くの細胞質は、遊離リボソームが著しく多く、ポリソーム状をなしているものもあり、それに囲まれて RER やミトコンドリアが密に配列していた。その他に、微細線維や微小管が散在して認められるようになったが、小胞はあまり認められなかった。細胞質が少ない領域では、ミトコンドリア、遊離リボソームが散在し、微細線維や微小管が走行していた。内皮細胞間には tight junction や発達の良い desmosome により接合していた。基底膜は非常に薄く、部分的に認められるのみであった(図4)。

一方、このような細胞の一部は、結合組織中に伸長するが、その細胞質中には、遊離リボソーム、RER、ミトコンドリアが少数認められ、微細線維と微小管が密に縦走していた。管腔外へ伸長している部分の基底膜は非常に薄く、部分的に認められるのみであった。

血管にタンニン酸注入を行うと、肉芽組織が分化したと考えられてきた細胞塊のわずかな細胞間隙にタンニン酸を認めた。細胞塊を構成する細胞は、細胞質が多く、RERが発達し、遊離リボソームが密集していた。また、部分的に微細管と微細線維が走行していた。基底膜は不完全に細胞塊を囲んでいるが、ほとんど認められない場合もあった。多くの細胞塊は2,3個の細胞集合であり、

Fig. 5 Many capillaries and cell masses are recognized in granulation tissue near the blood clot. $\times 400$ (Three days after the extraction)

Fig. 6 Cell masses and some degenerated capillaries are observed in granulation tissues near the blood clot. Bar=10 μ m (Three days after the extraction)

わずかな細胞間隙を有し、相互に tight junction や発達の良い desmosome で接合していた。

4. 抜歯後3日目

抜歯窩中央部の血餅は縮小し、血餅周囲には厚い肉芽組織が存在し、抜歯窩を満たしていた。肉芽組織の中、特に歯槽骨周辺に多数の血管が認められるが、血餅周囲にも毛細血管や細胞塊が観察された(図5)。

抜歯創の血餅の周囲には毛細血管、赤血球、コラーゲン線維、線維芽細胞および線維細胞を認め、2日後に比べて細胞塊ないし毛細血管が多数認められるようになった(図6)。

血餅に近い部位の血管のほとんどは無窓性の毛細血管であり、歯槽骨に近づくにつれて筋性の血管が認められた。無窓性の毛細血管は、立方形の内皮細胞2,3個で構成されるもの、やや丈の低い立方～扁平の内皮細胞よ

Fig. 7 The endothelial cell of newly developed capillary has a projection, penetrating into the stroma through basal lamina, and folds other cell in it. These cells may have active function. The basal lamina reconstructs around endothelial cells. Bar=2 μ m (Three days after the extraction)

Fig. 8 The endothelial cell contains some RER, microfilaments, microtubules and so on. The basal lamina is not continuous, but has no gap with endothelial cells. Bar=1 μ m (Three days after the extraction)

りなるもの、丈の高い内皮細胞よりなり、一部の血管壁が薄くなっているものなども認められた。内皮細胞は、核が細胞質に対して大型であり、遊離リボソームやRERなどを核領域に認め、ミトコンドリア、細線維や微小管が多くなり、各種の小胞が細胞質中に認められた。また、管腔へ大小の突起を伸長させていた。一方、内皮細胞の血管外への突起も多く、一部は基底膜を貫いて伸長し、間質にある細胞を包み込む像も認めた(図7)。基底膜は連続的ではないが、内皮細胞とより密着し、厚みを増していた(図8)。

Fig. 9 A mitosis can be recognized in one of the cell masses, in which a small gap is observed, and some folds project into the lumen. These structures are similar to that of undifferentiated capillary in the periodontal ligament. Amorphous structures circle around the cell mass. Bar=2 μ m (Three days after the extraction)

Fig. 10 On tannic acid injection, the tannic acid is recognized in the narrow lumen of the cell mass, which contains many RER and free ribosomes in the cytoplasm. The endothelial cell contacts to a mesenchymal cell with a projection. Bar=3 μ m (Three days after the extraction)

細胞塊は2, 3個の tight junction や desmosome 結合によって接合しているが、細胞間隙に小腔があり、周囲の細胞から突起を出していた(図9)。しかし、辺縁ヒダは認められなかった。塊形成する細胞には核分裂像が多く認められた(図9)。細胞には遊離リボソーム、わずかな RER、円形のミトコンドリアおよび豊富な微細線維を有しており、わずかな細胞間隙に沿う細胞質に

Fig. 11 The basal lamina almost continuously surrounds endothelial cells and pericyte. Free ribosomes, microtubules and tonofilaments are observed in endothelial cells. Stress fiber runs in the cytoplasm near cell membrane of pericyte. Bar = $2\mu\text{m}$ (Four days after the extraction)

Fig. 12 The basal lamina almost continuously encircles the endothelial cell, which contains RER, vesicles, microfilaments and many free ribosomes. Stress fiber is recognized in the cytoplasm near cell membrane. Bar = $1\mu\text{m}$ (Five days after the extraction)

は小胞らしきものも認められた。また、細胞周囲にも突起を伸長させ、肉芽組織の細胞と接着するものも多数認められた(図10)。細胞周囲には依然として、未発達基底膜構造が取り囲んでいた。血管へタンニン酸を注入すると、細胞塊の間隙にはタンニン酸が認められ、細胞塊が毛細血管と連続しており、内皮細胞が伸長したものであることが2日目同様に立証された(図10)。

5. 抜歯後4日目

抜歯窩の血餅にはほぼ認められなくなり、抜歯窩上部にも多数の毛細血管が認められた。少数の新生骨梁も観察された。

抜歯創全体に毛細血管、コラーゲン線維、線維芽細胞および線維細胞を認めた。歯槽骨近くには2、3層の平滑筋が囲む筋性の血管が多く認められた。

毛細血管の多くは無窓性であった。細胞質は遊離リボソームに富み、RERやミトコンドリアをわずかに含み、細胞膜近くには多数の小胞が認められた。その周囲を周皮細胞が覆い、周皮細胞にも小胞が認められた。また、微細線維束が多数認められ、基底側の細胞膜および周皮細胞の内皮細胞側の細胞膜直下の近くには stress fiber も認められた。基底膜は、ほぼ連続的に血管周囲を取り囲んでいた(図11)。

立方形の内皮細胞を伴う部位では、細胞間の結合が良く発達していた。基底膜は均一に発達し、細胞質中には微細線維や微小管が豊富に認められ、Weibel-Palade 小体もわずかではあるが認められた。

筋性の血管では、内皮細胞の周囲に2、3層の平滑筋が取り囲んでいた。内皮細胞と平滑筋は一部で互いに突起を出して結合し、両者に stress fiber が顕著に認めら

れた。

6. 抜歯後5日目

抜歯窩の血餅は消失し、新生骨梁以外は完全に肉芽組織で満たされていた。血管は抜歯窩全体に多く認められた。

線維細胞、線維芽細胞およびコラーゲン線維とともに血管が認められた。

毛細血管の内皮細胞の細胞質は少なく、少数のミトコンドリア、RER、および遊離リボソームが認められた。管腔側および基底側の細胞膜には小胞、基底側には細胞膜に沿うように走行する stress fiber および管腔内外への突起が認められた。血管周囲にはほぼ連続的に、血管周囲を取り囲んでいる基底膜を認めた(図12)。

7. 抜歯後7日目

抜歯窩は、ほぼ新生骨梁で満たされていた。新生骨梁に囲まれた線維性組織中には、骨梁に沿うように血管が分布していた。

新生された歯槽骨に囲まれた結合組織中に観察される径の小さな血管は以下のとおりであった。

全体的に内皮細胞の細胞質は豊かになり、ミトコンドリア、遊離リボソームおよび微細線維が多数認められた。小胞は細胞質全体に散在しており、管腔側の細胞膜に沿って配列している部分もあった。管腔および管腔外への突起は単純であり、少数が認められるのみであった。突起の細胞質には小胞、微細線維が観察されることもあった。内皮細胞間には tight junction および desmosome で接合しており、接合部には辺縁ヒダが認められた。血管周囲には周皮細胞とともに、平滑筋が認められた。基底膜は、ほぼ連続的に血管を取り囲んでいた(図

Fig. 13 The endothelial cells contains vesicles, microtubules and many microfilaments. These cells connect by tight junctions. The basal lamina almost continuously surrounds endothelial cells and pericyte. Bar=1 μ m (Seven days after the extraction)

13).

なお、抜歯直後～抜歯後4日後の血管内皮細胞の微細構造の変化、および血管新生について図14に示す。

考 察

1. 血管の新生

創傷治癒における血管新生に関しては、肉芽組織中に形成される細胞塊が内皮細胞化し血管形成する局所発生説^{19,20)}、血管の内皮細胞が分裂して伸長する芽生説^{21~23)}などが考えられている。

本実験では光顕的に抜歯後2日目以後、細胞塊と内皮細胞の両者に核分裂が認められた。さらに抜歯後2日目以後は、内皮細胞自身が基底膜を貫き間質へ成長する像が多数観察され、その断面は数個の細胞の塊として観察された。光顕的に肉芽組織中に細胞塊が多数認められるのは、抜歯後2～4日目、特に3日目で明瞭であった。このような毛細血管とは無関係のように観察される細胞塊が、今回用いたタンニン酸注入法によれば、細胞塊のわずかな細胞間隙にもタンニン酸が認められ、細胞塊は毛細血管と連続し、新生してきたものであることがあきらかである。

すなわち、抜歯創においては細胞塊が既存の血管内皮細胞由来であり、図14に示したごとく、抜歯により血管が破断され、抜歯後1日目には血管断端が狭くなり、2日目になると血管断端が間質へ伸長し、3日目に断端の内皮細胞が分裂しつつ伸長し、管腔形成して新しい血管が形成されると考える。

毛細血管の核分裂が血餅近くや細胞塊に認められた

Fig. 14 Scheme of angiogenesis of extraction wounds.

- A: Normal
- B: Immediately after the extraction
- C: One day after the extraction
- D: Two days after the extraction
- E: Three days after the extraction
- F: Four days after the extraction

が、斉木²⁰⁾の指摘したごとく先端よりやや手前で核分裂および細胞分裂が行われるのではなく、先端において行われると考えられる。

タンニン酸の注入法は、他の組織の血管の研究にも多く用いられており、内皮細胞から基底膜を貫いて血管外へ拡散する現象も示されている¹⁵⁾。しかし、抜歯創においては脳の血管同様に血管外への漏出は認められない。この点は抜歯創の毛細血管を形成する内皮細胞の特長と考えられる。

2. 基底膜

電顕的には、抜歯直後から抜歯後2日目では基底膜が分断されたままであり、内皮細胞との間に著しい間隙があった。抜歯後3日目以後になると、電子密度の高い層が厚くなり、部分的に内皮細胞へ接着していた。抜歯後3日目以後でも、新生する付近の細胞塊の基底膜は欠如するかまたは断裂していた。

抜歯後2～4日目の内皮細胞の一部が、新生毛細血管形成のために基底膜を貫いて伸長する像が多数認められたが、伸長する内皮細胞の先端には基底膜は認められない。内腔がほとんど未完成の細胞塊の周囲にもほとんど基底膜が認められない。一方では、内皮細胞から間質へ伸びて周囲の細胞と接着する突起も基底膜を欠いていた。

すなわち、基底膜は図14に示したごとく、血管の断裂部では認められず、その周囲のものも断裂しているが、血管の再生とともに基底膜は形成され、電顕的な基底膜が完全に形成されるのは、血管や毛細血管の微細構造お

よび機能が回復した抜歯後4日目以後になると考えられる。

基底膜は内皮細胞などの基底部に存在し間質結合組織との境界を作る特殊な細胞間物質であり、主要な構成成分は基底膜コラーゲンと非コラーゲン性糖蛋白であり器官特異性が高い²⁴⁾。基底膜の分断、断裂が抜歯後1, 2日目に最も多いことは、炎症による物質変性をきたしたのではないかと考えられる。また、血管新生部に基底膜が認められないのは、血管新生には断裂部の内皮細胞の基底部が断裂、融解し、内皮細胞の遊走と血管形成に関与するとの報告^{12,13)}と一致するものと考えられる。

3. 内皮細胞の微細構造

血管の微細構造に関する研究は、輸送に関するものが多い²⁵⁻²⁷⁾。歯根膜の血管の微細構造を研究したものは、有窓性毛細血管の比率などの窓に関してのもの¹⁸⁾、径の大きさなどを計測的に分析しているもの¹⁷⁾などである。まず、一般的な形態としては、歯根膜には有窓性毛細血管が存在し¹⁶⁾、ラットの歯根膜の毛細血管にもとづく少数の窓を有する¹⁸⁾といわれている。しかし、その形態は機能に応じて変化すると考えられ、必ずしも固定したものではなく^{28,29)}、抜歯創における血管新生の微細形態学的な検討はほとんどない。

実験対照群の正常歯根膜の毛細血管は、大部分は連続性のものであったが、一部に径80 nmほどの窓を認めた。これは歯根膜が、腎臓や内分泌腺のように盛んな物質交換¹⁵⁾を行う部位と異なるためではないかと考えられる。抜歯後も連続性毛細血管が多く、新生血管の前駆体である細胞塊から形成される新生血管は、すべてが連続性毛細血管であった。

内皮細胞の辺縁部の接合部は互いに接着しており、主に、tight junction と gap junction からなる³⁰⁾といわれる。正常歯根膜において、内皮細胞間は tight junction またはごく一部に desmosome 様の構造が観察された。内皮細胞間の tight junction による閉鎖状態は、器官や部位により発達に差がある^{31,32)}。抜歯創におけるタンニン酸注入によって、細胞間接合部までタンニン酸を認めるが、基底膜には達していなかった。これは歯根膜の毛細血管の細胞間結合は脳の毛細血管^{15,17)}同様に強くシールされているものと考えられ、歯根膜の特徴であろうと推定される。

抜歯直後および抜歯後1日目では、細胞境界は開大しているが、炎症時や高血圧状態に tight junction が離開するとの報告³³⁾があり、今回の結果とはほぼ同様と考えられる。抜歯後2日目になると細胞間は tight junction や発達の悪い desmosome 様構造により接合するようになったが、タンニン酸の管腔外への浸出は認められず、固い内皮細胞間の結合は回復しているものと考えられる。抜歯後3日目以後は実験対照群と比べ変化はなかった。

一方、抜歯後2～4日目に認められる新生血管の前駆

体である細胞塊において、抜歯後2日目の細胞間は発達の悪い tight junction で接合していたが、抜歯後3日目になると tight junction や若干の desmosome 様の構造が認められた。この細胞塊においても、タンニン酸は基底膜まで達していない。つまり新生する血管の細胞間は強く接合し管腔が形成されると考えられる。

連続性の毛細血管は、物質代謝の盛んな組織で小胞ないし小窩の発達が良い²⁵⁾。内皮細胞は、管腔側と基底側いずれの形質膜直下に直径約60～70 nmの小胞ないし小窩といわれる構造が集積し、多くは形質膜に開口した小窩¹⁵⁾であるとの報告がある。小胞ないし小窩の分布密度や酵素の局在性は管腔側と基底側とは異なり、stress fiber による収縮作用や物質透過性の制御、血小板の付着、物質輸送などの機能が指摘されている³⁴⁾。小胞構造は、すべての血管で一様に認められるものではなく、同じ血管でも部位により数は異なり、脳内毛細血管では極めて小胞や小窩が少なく、筋組織内毛細血管では著しく多い³⁰⁾。

今回の結果では、抜歯直後には各種の小胞の配列や数が著しく乱れ、主に基底側の細胞膜近くに比較的多数、管腔側には少数観察された。抜歯後1日目からは、少量の小胞が散在するのみで、この状態が抜歯後2, 3日目頃までつづいた。抜歯後4日目になると細胞膜近くに多数の小胞が認められるようになり、一部では、基底側の細胞膜に規則的に配列する小胞も観察された。この時期には内皮細胞の外側に集まる周皮細胞や平滑筋の前駆細胞にも同様の構造が認められた。すなわち、抜歯後1～3日目までは新生内皮細胞の輸送や筋の収縮機能が不完全であり、それ以後になって回復されることを示しているものとも考えられる。一方、細胞塊においては、小胞および小窩は若干認められるに過ぎず、輸送に関する機能はまだ不完全なものとなっている。

内皮細胞の管腔および管腔外への突起に関する報告はあまりないが、突起は一般の上皮細胞の自由表面にみられる微絨毛と同様に、内腔の細胞の表面積を著しく増大させ、血流に影響を与え、形質膜を通しての物質代謝および血小板の付着に関連するのではないかと報告がある^{14,35)}。また一方では、突起中に小窩が認められることから、白血球などの接着にも関与していることが指摘されている³⁴⁾。今回の結果でも、赤血球や血小板、白血球と接着する突起が抜歯後1, 2日目に認められ、抜歯後2日目では管腔内外に伸長し完全に細胞を包み込んでおり、中に小窩状構造を有しているため、突起が積極的にこの機能を果たしていることが示された。

内皮細胞の辺縁部の接合部から伸長する辺縁ヒダに関しては、ヒダが反転し基部に空胞を作り、空胞が基底側に移動し内容物を放出する³⁶⁾との機能と関連するものと考えられる。歯根膜の内皮細胞の突起の形はさまざまであり、Fujimura¹⁷⁾の報告のごとく機能の多様性を示して

いるものと考えられる。

本実験の細胞塊においては、形成され始めた管腔に突出する突起を認めたが、非常に少ない。この結果は幼弱内皮細胞には辺縁ヒダの構造は認められないが、表面に微絨毛様突起が存在している³⁵⁾との報告と一致する。

一方、基底膜を貫いて結合組織中に侵入する内皮細胞の突起もあるが、抜歯後2日目以後になると結合組織細胞との接触が多く認められ、一部は細胞を完全に包んでいた。突起には小泡や小窩が多く、細胞接着の機能を果たしていると考えられる。さらに抜歯後3日目以後においては、周囲の平滑筋細胞中へ内皮細胞が突起を伸長し、tight junction を形成しているものが観察された。内皮細胞の前駆体と考えられる細胞塊からも突起の伸長が同様に認められた。これらの細胞塊や内皮細胞からの間質への突起は、結合組織の細胞と接し、周皮細胞や筋細胞への誘導に関与する現象のひとつではないかと考えられる。

内皮細胞の細胞骨格を形成する線維性蛋白質は微細線維、中間径フィラメントおよび微小管である³⁷⁾。微細線維は束をなし、通常、基底側の形質膜近くを細胞長軸と平行に直線状に走る³⁸⁾。そして微細線維束は大動脈の内皮細胞で発達が良く、細胞の長軸方向に配列する stress fiber を形成し、血流によるずり応力に対抗する線維構造として重要であり、stress fiber は血流速度の高い部分、特に左心室、大動脈弁、大動脈の内皮細胞に発達が良い³⁹⁾。中間径フィラメントは内皮細胞にも存在し⁴⁰⁾、核などの細胞内小器官の細胞内における立体的な位置関係の保持、細胞外形の維持や細胞分裂に関係している⁴¹⁾。微小管はチューブリンからなり、細胞長軸方向に配列し細胞質全体に散在し、細胞の非対称的な外形を形成、維持している。また、内皮細胞が遊走する場合は、微細線維によって細胞運動を起こし⁴²⁾、細胞分裂時の紡錘体の骨格をなし、染色体が移動する際に重要な役割を果たす。対照の正常歯根膜の毛細血管の内皮細胞には多くの微細線維が観察されとともに、基底側の細胞膜近くに錯走する微細線維束が認められたことは、歯の機能に応じた収縮や弛緩が行われるものと考えられるが、抜歯直後では乱れて錯走する微細線維束が認められ、抜歯後2、3日目になると細胞質に乏しい部分および基底側の細胞質に微細線維束や微小管が認められるようになった。抜歯後4日目になると、基底膜近くに stress fiber が認められるようになった。以上より、抜歯後2、3日目に stress fiber の形成が行われ、抜歯後4日目には平滑筋細胞にも出現し、かつ小管および小窩が双方の相対する細胞膜に沿って出現することから、収縮運動が他の機能とともに確立され、行われつつあることを示していると考えられる。

結 語

ラットの上顎第1臼歯を抜歯し、抜歯創の初期治癒過程における血管内皮細胞について電子顕微鏡を用いて、微細構造的に検討を加え、次のような結論を得た。

1. 血管新生の経時的変化

抜歯直後は、残存歯根膜中のみ血管が認められた。抜歯後1日目には、歯槽骨近くに少数の血管を有する肉芽組織が観察された。抜歯後2日目は、肉芽組織の分布は抜歯窩全体にわたり、多数の血管を含んでいたが、血餅周囲にはほとんど血管が認められなかった。抜歯後3日目になると、血餅周囲の肉芽組織中に多数の毛細血管や細胞塊が観察され、血管新生が著明であった。抜歯後4日目は、血餅はほぼ消失し、抜歯窩全体に多くの毛細血管が認められた。抜歯後5日目、血餅は消失し、新生骨梁以外は多数の血管を含む肉芽組織で完全に満たされていた。抜歯後7日目には、抜歯窩はほぼ新生骨梁で満たされ、骨梁に沿うように血管が分布していた。

2. 基底膜の変化

正常歯根膜中の毛細血管周囲には、厚さ約50 nm の基底膜が連続しているが、抜歯により血管の断裂部には基底膜は認められず、周囲の基底膜は断裂し、部分的にしか認められなかった。抜歯後3日目では、基底膜は連続的ではないが、内皮細胞との隔たりはなくなり、厚みを増していた。抜歯後4日目になると比較的正常な基底膜に分化していた。

3. 細胞塊と血管新生

タンニン酸の注入を行うと、創傷治癒における局所発生説の根拠のひとつとなっている細胞塊において、微小な内腔にもタンニン酸が認められ、既存血管との連続性が確認された。つまり、細胞塊が内皮細胞から由来し、分化して、血管を形成する前駆体であることが示唆された。

細胞塊は電顕的に、2、3個の未分化な内皮細胞からなり、微小な管腔に突起を出し、細胞間は tight junction で接合していたが基底膜は不完全であった。タンニン酸が基底膜より漏出していないことより、既存血管はもちろんのこと、新生血管の内皮細胞間の結合が強いことがあきらかとなった。

本研究の一部は、第45回日本口腔科学会総会(1991年、京都)において発表した。

引 用 文 献

- 1) 藤田訓也: 抜歯創の治癒について、歯界展望 61: 857-865 1983.
- 2) 飯塚 正: 放射線照射ラットの抜歯創治癒過程

- に関する形態学的研究. 歯基礎誌 26: 745-785 1984.
- 3) 織間正亘: 拔牙創治癒機転の実験的, 臨床的研究. 口科誌 21: 94-130 1972.
 - 4) 斉藤俊夫: 拔牙創治癒過程に及ぼす活性型ビタミン D₃ ならびにタンパク同化ステロイドの影響—Microradiogram, ⁴⁵Ca autoradiogram による観察. 歯学 69: 864-897 1982.
 - 5) 阿比留信: 正常開放性拔牙創における血管の新生および変遷に関する実験的研究. 久留米医学会誌 30: 801-826 1967.
 - 6) 真木亮二: 拔牙創の血管新生に関する実験的研究. 岡山医学会誌 72: 153-174 1960.
 - 7) 野間康弘: 拔牙創の血管新生およびその経過に関する実験的研究. 歯科学報 66: 288-365 1966.
 - 8) 島田純治: 拔牙創の骨性治癒における血管構築の変化について. 歯基礎誌 31: 19-34 1989.
 - 9) 王 敦正: 拔牙創の治癒と血管像—実験的正常拔牙創の治癒. 神奈川歯学 21: 232-259 1986.
 - 10) 室田誠逸: 培養血管内皮細胞の特性と機能分化. 代謝 25: 877-884 1988.
 - 11) 吉田洋二: 血管内皮細胞の形態と機能. 呼吸と循環 37: 819-833 1989.
 - 12) Form, D.M., Pratt, B.M., et al.: Endothelial cell proliferation during angiogenesis—*in vitro* modulation by basement membrane components. Lab Invest 55: 521-530 1986.
 - 13) Furcht, L.T.: Critical factors controlling angiogenesis—Cell products, cell matrix, and growth factors. Lab Invest 55: 505-509 1986.
 - 14) 山田英智: 血管内皮の構造と機能. 血液と脈管 3: 511-521 1972.
 - 15) 山元寅男: 毛細血管透過の形態学. 日臨 45(夏季増刊号): 208-217 1987.
 - 16) Corpron, R.E., Avery, J.K., et al.: Ultrastructure of capillaries in mouse periodontium. J Dent Res 55: 551 1976.
 - 17) Fujimura, A., Itoh, I., et al.: Morphometric analysis of the capillary loop endothelium underlying sulcular epithelium. Bull Tokyo Dent Coll 28: 23-33 1987.
 - 18) Moxham, B.J., Shore, R.C., et al.: Fenestrated capillaries in the connective tissues of the periodontal ligament. Microvasc Res 30: 116-124 1985.
 - 19) 日下邦夫: 創傷治癒に関する組織学的研究—第3報, 肉芽組織に於ける血管新生. 臨外科 6: 171-173 1951.
 - 20) 斉木秀彦: 実験的創傷治癒における血管新生機序. 久留米医学会誌 41: 185-206 1978.
 - 21) Clark, E.R., and Clark, E.L.: Microscopic observations on the growth of blood capillaries in the living mammal. Am J Anat 64: 251-301 1939.
 - 22) Mikata, H., Watanabe, S., et al.: Pericyte in granulation tissue. Recent Advance in RES Res 15: 19-34 1975.
 - 23) Torikata, C., Takeuchi, H., et al.: Studies on the biological background of the sprouting of the vessels—Its relations to the plasma exudation. Keio J Med 20: 161-168 1971.
 - 24) 梶川欽一郎: 基底膜. 梶川欽一郎著; 結合組織, 第1版, 金原出版, 東京, 1984, 367-392頁.
 - 25) 猪口哲夫, 村上正浩: 毛細血管の微細構造—特に, 血管透過性に関わる諸構造について. 細胞 13: 429-436 1981.
 - 26) 小林 繁: 毛細血管内皮層における物質の通路. 医学のあゆみ 75: 469-474 1970.
 - 27) 山元寅男, 奥田隆司: 血管透過性の超微形態学. 脈管学 21: 99-102 1981.
 - 28) Palade, G.E.: Fine structure of blood capillaries. J Appl Physics 24: 1424 1953.
 - 29) Palade, G.E., and Bruns, R.R.: Structural modulations of plasmalemmal vesicles. J Cell Biol 37: 633-649 1968.
 - 30) Simionescu, M., Simionescu, N., et al.: Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium—Arteries and veins. J Cell Biol 68: 705-723 1976.
 - 31) Karnovsky, M.J.: The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. J Cell Biol 35: 213-236 1967.
 - 32) Simionescu, M., Simionescu, N., et al.: Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium—The microvasculature. J Cell Biol 67: 863-885 1975.
 - 33) Hüttner, I., Costabella, P.M., et al.: Volume, surface, and junctions of rat aortic endothelium during experimental hypertension—A morphometric and freeze fracture study. Lab Invest 46: 489-504 1982.
 - 34) 小川和重, 小川和朗: 血管の酵素組織化学. 室田誠逸編; 血管細胞の培養とその応用. 東京化学同人, 東京, 1989, 27-36頁.
 - 35) 竹重順夫, 毛利 純, 他: 血管新生機序に関する電顕的研究. 脈管学 15: 271-275 1975.
 - 36) Fawcett, D.W.: Surface specializations of absorbing cells. J Histochem Cytochem 13: 75-91 1965.
 - 37) 石川春律: 細胞骨格の微細構造. 蛋・核・酵 28: 624-635 1983.
 - 38) Yohro, T. and Burnstock, G.: Filament bundles and contractility of endothelial cells in coronary arteries. Z Zellforsch 138: 85-95 1973.
 - 39) White, G.E., Gimbrone, M.A., et al.: Factors influencing the expression of stress fibers in vascular endothelial cells in situ. J Cell Biol 97: 416-424 1983.
 - 40) Uehara, Y., Campbell, G.R., et al.: Cytoplasmic filaments in developing and adult

- vertebrate smooth muscle. J Cell Biol 50: 484-497 1971.
- 41) Savion, N., Vlodavsky, I., et al : Synthesis and distribution of cytoskeletal elements in endothelial cells as a function of cell growth and organization. J Cell Physiol 110: 129-141 1982.
- 42) Gotlieb, A.I., May, L.M., et al.: Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells. J Cell Biol 91:589-594 1981.
-