Osteolathyrism ラットの抜歯創の破骨細胞性 骨吸収に関する形態学的研究

進 藤 正 信

北海道大学歯学部口腔病理学教室（指導：雨宮 璋教授）

〔受付：昭和57年6月20日〕

Morphological studies on osteoclastic bone resorption in extraction wound of lathyric rat

Masanobu Shindoh

*Department of Oral Pathology, School of Dentistry, Hokkaido University,
Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060*
(Director : Prof. Akira Amemiya)

〔Accepted for publication : June 20, 1982〕

Key words : lathyrism / osteoclast / bone resorption / extraction wound

Abstract : The present studies were performed to investigate the process of osteoclastic bone resorption in an extraction wound and to clarify the difference between normal and lathyr condition.

316 Wistar rats of 90-110 g body weight were used. The Experimental rats were intraperitoneally given a 2.5 % aqueous solution of aminoacetonitrile (AAN) in a dosage of 200 mg/kg daily. On the 10th day of AAN administration, the left upper first molar of each rat was extracted and AAN administration was continued. The rats were sacrificed at intervals from 0 day to 5 days after extraction. Control rats were sacrificed at same intervals after extraction. The maxillary bone including the extraction wound was examined histologically, histometrically, histochemically and ultrastructurally.

A large number of osteoclasts appeared in the extraction wound and increased rapidly by 3 days after extraction in the control rats and 2.5 days in the lathyr rats.

In lathyr rats, the osteoclasts were more numerous and increased more rapidly when compared with control rats. Histometrically, there was no significant difference in the amount of bone loss between control and lathyr rats. Histochemical examination revealed that the surrounding tissues in the extraction wound reduced enzymatic activity and was more severe in lathyr rats. Ultrastructurally, the osteoclasts of control rats had abundant mitochondria and a well-developed ruffled border. In the resorbing area, crystalline material and phosphotungstic acid positive layer below it were observed. The cytoplasmic organelles and ruffled border were poorly developed in the osteoclasts of lathyr rats.

The findings suggest that bone resorption is a necessary process for healing on extraction wound to remove the injured tissue, and that in lathyr condition the activity of osteoclast was depressed and numerous osteoclasts were engaged in bone resorption.

緒 言

Lathyrism は *Lathyrus* 属の豆類を長期にわた

札幌市北区北13条西7丁目（〒060）

り摂食するヒトや動物にあらわれる疾患として、Selye(1957)¹⁾によれば、古くはHippocrates により記載されているといわれている。

20世紀にはいり、実験的に Lathyrism をおこ

す試みがなされ、Geiger (1933)²⁾ はラットに *Lathyrus odoratus* (*L. odoratus*) を摂食させることにより、骨格系に病変が生じる事を報告した。その後 *L. odoratus* をラットに摂食させ lathyrism をひきおこす実験が多くの研究者によってなされた。その結果成長速度の減少^{2,3,7,8)}、剝離性大動脈瘤などの血管系病変^{3,4,5)}と共に、骨端軟骨の異常^{6,8)}、脊柱後側彎^{2,3,5,6)}、筋付着部の過骨症^{2,6-9)}、骨多孔症^{7,9)}などの骨格系の病変が生じることが明らかになり、Selye¹⁾ は *L. sativus* などにより生じる神経系の病変を主体とする lathyrism と区別して Osteolathyrism と命名した。

その後、*L. odoratus* より結晶成分が抽出され Osteolathyrism の起因物質は *L. odoratus* に含まれる β -aminopropionitrile (BAPN) であることが明らかにされ^{10,11)}、以後 BAPN のような合成 lathyrigen を用いての lathyrism の研究もなされてきた^{12,13,15)}。

Aminoacetonitrile (AAN) は BAPN に類似した構造をもち、更に強力な lathyrigen として知られており^{12,13)}、AAN を用いた検索も多数報告されている²⁶⁻³⁰⁾。

Osteolathyrism の際、前述のような障害の他に、創傷¹³⁾や骨折^{14,15,16)}の治癒過程も障害される事が知られている。また大橋ら²³⁾は、Osteolathyrism ラットの抜歯創の治癒過程を検索し、肉芽組織の増生や骨芽細胞による骨新生が障害されることを認めた。このような lathyrism の病変は主として、コラーゲンの架橋結合の阻害に基づく膠原線維の形成障害に基づくことが生化学的に明らかにされたが^{17,18)}、糖代謝における変化も報告されており¹⁹⁻²¹⁾、また Amemiya (1966)²²⁾ は Osteolathyrism ラットの過骨症部の骨形成細胞を電顕的に観察し、細胞内小器官、特に粗面小胞体の発達が不良であることを認めており、細胞自体にも種々の変化が生じているものと思われる。

このように Osteolathyrism の場合に間葉系の基質産生型の細胞に障害があらわれることは次第に明らかにされてきたが、同様に骨の代謝に関与する細胞である破骨細胞についてはほとんど検索がなされていない。

一方抜歯創の治癒過程については、多数の検

索がなされているが、そのほとんどは、骨の新生³¹⁻⁴¹⁾、上皮の再生^{31,37)}、血管の新生³²⁾等を組織学的、組織化学的、X線学的に観察したものであり、抜歯創での骨吸収については、抜歯後2～3日目に多数の破骨細胞が出現することは観察されてはいるが、抜歯窩での骨吸収を中心に検索した報告は、著者の渉猟した範囲では認められなかった。

破骨細胞は Hancox (1972)⁴²⁾によれば、Kölliker が最初に骨を吸収する機能をもつ細胞であると考え“Osteoklast”の名称をつけたといわれる。その後各種の検索がなされ、特に近年、電子顕微鏡の応用によりその微細構造が明らかになるに従い、積極的に骨の吸収に関与することは疑いのないところになったが、骨基質の吸収機序については、有機質の吸収が先であるという説⁴³⁻⁴⁵⁾、無機質の吸収が先であるとする説^{46,47)}、有機質、無機質が同時に吸収されるとする説⁴⁸⁾があり意見の一致は得られていない。またその起源についても単一の骨格系前駆細胞の変化したものとする説^{49,50)}、破骨細胞と骨芽細胞とは異なった分化の経路をたどる別種の細胞であるとする説⁵¹⁻⁵⁴⁾などがあり、不明な点の多い細胞である。

本研究は抜歯創の治癒過程の初期にみられる骨の吸収機転とその意義を明らかにし、また AAN の投与により惹起された osteolathyrism の場合に、抜歯創における破骨細胞による骨吸収がどのような影響をうけるかを明らかにする目的でなされた。

実験材料および方法

1. 組織学的検索

実験開始時体重90～110gのWistar系雄ラット123匹を用いた。実験期間中、オルエンタル固型飼料(MF)と十分な水道水を与えて飼育した。2群に分け、実験群には体重1kgあたり200mgの割合でAminoacetonitrile 酸性硫酸塩(AAN)の2.5%水溶液を腹腔内に連続投与し、AAN投与開始後10日目に上顎左側第一臼歯を抜去した。以後もAANを投与し続け、抜歯直後、1日、2日、2.5日、3日、4日、5日後にエーテルの吸入により屠殺した。対照群として正常ラットを用い、

上顎左側第一臼歯を抜去し、同様の間隔で屠殺した。屠殺後直ちに断頭し、抜歯窩を含む上顎、頭蓋を一塊として取り出し10%中性ホルマリンで固定、Plank-Rychlo 法で脱灰後、パラフィンに包埋し、第一臼歯の遠心根長軸を含む前頭断の平面で6 μ の連続切片を作製した。標本はヘマトキシリンエオジン染色(HE)、アザンマロリー染色(AM)、エラスチカワンギーソン染色(EVG)、銀染色、PAM 染色等を施し組織学的に検索した。

2. 組織計量学的検索

抜歯窩の遠心根間隔歯槽骨量の変化を経日的に検索するため画像分析装置 Leitz ASM を用いて2次元的に計測した。連続切片中で右側第1臼歯遠心頰側根、口蓋側根と左側同部抜歯窩を含む標本を36 μ 毎に投影装置 Neovision 104を用いて55倍に投影描画したものを測定した。前頭断した場合、第1臼歯遠心根は口蓋根がやや近心に位置するため、右側非抜歯側で歯根の長軸を通る2線分を設け、抜歯側でもその線分内に残存中隔が存在するもののみを測定の対象とした。骨面積測定にあたり、窩底部は比較的骨の変化の少ない上顎骨外側垂直面移行部をA、頰側根歯槽結節骨頂部をBとし、この2点を基準としAより80°、またABの中点Cより70°の線分を設け、その間に存在する骨を含めて測定した(Fig. 1, 2)。また同部に存在した破骨細胞の数を計測した。

3. 組織化学的検索

実験開始時体重90~110gのWistar系雄ラット85匹を用いた。2群に分け組織学的検索と同様

の過程で屠殺後、抜歯窩を含む左側上顎骨を取り出し、0.1M カコジleit緩衝液(pH 7.4)で調整した2.5%グルタルアルデヒド(4°C, 7%蔗糖を含む)で2時間固定後、0.1M カコジleit緩衝液(4°C, pH 7.4, 7%蔗糖を含む)で洗浄、5% EDTA(4°C, pH 7.3)で96時間脱灰し、0.1M カコジleit緩衝液(4°C, pH 7.4, 7%蔗糖を含む)で洗浄後、凍結切片を作製し次の酵素について検索した。

1) リンゴ酸脱水素酵素

Barka, Anderson の方法⁵⁵⁾により NAD 依存性酵素活性を検出した。

2) 酸フォスファターゼ

Barka, Anderson のアゾ色素法⁵⁶⁾に従い染色した。基質には AS-TR リン酸塩を用いた。

3) アルカリフォスファターゼ

小川らのクエン酸鉛法⁵⁷⁾により染色した。

4. 電顕的検索

実験開始時体重90~110gのWistar系雄ラット108匹を用いた。屠殺までの方法、間隔は組織学的検索と同様である。

屠殺後直ちに抜歯窩を含む上顎骨を取り出し抜歯創中隔部を含むように細切し、0.1M カコジleit緩衝液で pH 7.4に調整した5%グルタルアルデヒド(4°C)で浸漬固定した。OsO₄で後固定した後、未脱灰のままアルコール系列で脱水し、プロピレンオキサイドで置換し、Epon 812に包埋した。超薄切片の作製に先立ち、厚さ1 μ の半超薄切片を作製し、トルイジン青染色、Kossa-トルイジン青染色を施し光顕的に検索した。超薄切片はDiatome社ダイヤモンドナイフを用い、DuPont MT 5000 ultramicrotome を使用して作製した。染色は酢酸ウラニル-クエン酸鉛二重染色(UA & LC)、クエン酸鉛染色(LC)、燐タングステン酸染色(PTA)等を施し、日立 HU-11DS 型電子顕微鏡で観察した。

結 果

1. 組織学的所見

1) 対照群の抜歯創の所見

(1) 抜歯直後

抜歯直後の対照群の抜歯窩は出血により赤血球

Fig. 1 Schematic representation of method of histometry. Frontal section through long axis of distal roots of upper first molar.

を主とする血球成分で完全に満たされていた。頰側歯槽骨側壁部、中隔歯槽骨部などに、一部、歯根膜が残存し、その部の小血管には拡張がみられた。中隔歯槽骨の骨質は緻密であり、破骨細胞はほとんど認められなかった。

(2) 拔牙後1日目

拔牙窩は線維素が網目状構造をつくりその間に赤血球が混在した凝血で満たされていた (Fig. 3)。拔牙窩表層は食物残渣と細菌叢で覆われ、その直下の凝血内には好中球、リンパ球を中心とした著しい炎症性細胞浸潤がみられた。拔牙窩周囲の上皮は、特に頰側で内下方に翔転する傾向を示していた。残存歯根膜はその形態が比較的保持されていたが、その部の血管は拡張していた。その他に骨髓中の血管や拔牙窩に隣接する部位の血管は程度の差はあるが拡張していた。中隔歯槽骨の骨質は緻密であるが、骨髓腔に面した骨内膜に小数の破骨細胞が認められ、骨髓腔自体もやや拡大していた。破骨細胞は好酸性で顆粒状～空胞状の細胞質をもち骨に接していた。単核～2核の破骨細胞が一般的で、時に扁平であったが (Fig. 4)、中には5核以上の大きな破骨細胞も認められた。破骨細胞の存在する部位に近接して血管も認められた。窩底部では線維芽細胞の密度が増し、血管も多数認められた。拔牙窩外壁の外骨膜は頰側および窩底部の一部で間葉系細胞の増殖による肥厚が認められた。

(3) 拔牙後2日目

拔牙窩表層には著明な炎症性細胞浸潤が認められた。拔牙窩辺縁の上皮は拔牙窩内下方に向かって細く突出していた。拔牙窩の表層に近い部位は線維素が太い網目状構造を作っていたが、赤血球は形態も不明瞭となり、あまり認められなくなってきた。残存歯根膜は一部では認められるが、全体に不明瞭となってきた。主として窩底部の肉芽組織から線維芽細胞が凝血中にはいり込んでいた。中隔歯槽骨は骨髓側から吸収されて骨髓腔が拡大していた。骨髓は線維化の傾向を示し、破骨細胞も比較的多数認められるようになった。骨内膜に沿って、扁平で単核～2核の破骨細胞様の細胞も認められたが、3～4核の大型の破骨細胞が多数を占めていた。時に10核以上の大きな破骨

細胞が認められることもあった。また破骨細胞の細胞質中に濃縮した核を思わせる封入体もみられる事があった。中隔歯槽骨の骨細胞の中には濃縮性の核をもつものや、核の染色性を失ったものもみられた。拔牙窩外壁の外骨膜は肥厚し、特に窩底部では骨芽細胞による骨新生も認められた。

(4) 拔牙後2.5日目

拔牙窩表層は線維素で覆われているが、血球成分は減少した。残存歯根膜は頰側歯槽骨壁、中隔歯槽骨壁上端部に認められたが、線維は方向性を示さず絮状で、細胞成分も萎縮し、数も少なかった。主に窩底部に小血管、線維芽細胞の増生した肉芽組織が認められた。またその部には骨芽細胞による梁状の新生骨の形成がみられることもあった。上皮は拔牙窩周囲より内下方、或は、拔牙窩表層を横切するような方向に伸展していた。このような上皮の下方では炎症性細胞の浸潤の程度は減じていた。

この時期には破骨細胞は骨髓側のみでなく窩底部に近い部位では拔牙窩側の骨表面にも認められた。骨髓腔は拡大し、骨髓の線維化の傾向も認められた (Fig. 5)。破骨細胞は類円形で大きく、3～4個以上の核をもつものが多く認められた。

拔牙窩外側の骨膜は広い範囲で肥厚し、特に窩底部外側の骨膜では梁状骨の新生が認められた。

(5) 拔牙後3日目

拔牙窩は表層を除いてほとんど肉芽組織で置換されていた。窩底部あるいは側壁部からの線維芽細胞の増殖は著しく、細胞密度も増し、多数の小血管が認められた。上皮は拔牙窩を覆うように伸展していたが、とくに頰側からのそれが著しかった。中隔歯槽骨の吸収は著明で、骨髓腔は拡大し、多数の破骨細胞が認められた (Fig. 6)。この時期には骨髓面からだけではなく拔牙窩に面する骨表面にも大型で多核の破骨細胞が多数存在し、活発に骨を吸収している像がみられた (Fig. 7)。拔牙窩底部では類円形～多角形の骨芽細胞が梁状の新生骨を作っている像もみられた。拔牙窩外側の骨膜は著しく肥厚し、一部で骨芽細胞による骨新生もみられた。

(6) 拔牙後4日目

拔牙窩内での骨新生は更に著明に認められた

(Fig. 8)。骨芽細胞は類円形～多角形で新生類骨組織にとり囲まれて幼若骨細胞となったものも認められた。このような骨新生像は窩底部で著明であったが、抜歯窩外側の外骨膜でも窩底部、頰側壁部で認められた。この他に既存の中隔歯槽骨表面にも扁平ないし類円形の骨芽細胞が配列していた。破骨細胞はその数が急速に減少してくるが、中隔歯槽骨頂部や新生骨梁部にも認められた。上皮も両側から伸展してくるが、まだ抜歯窩を完全に覆うまでには至らなかった。

(7) 抜歯後5日目

抜歯窩の凝血は完全に肉芽組織で置換された。上皮は伸展し、厚みを増し基底細胞層、有棘細胞層、角化層が区別され得ようになるが、完全に抜歯窩を覆うには至らず、一部に欠損がみられた。抜歯窩内の肉芽組織は小血管に富み、細胞密度も高く、紡錘形の線維芽細胞がいろいろな方向に錯綜していた。窩底部より $\frac{1}{2}$ 位までの抜歯窩内では骨芽細胞が梁状の新生骨を作っていた。中隔歯槽骨は比較的多量に残存しているが、骨髓腔は拡大し、抜歯窩に面した骨壁の表層にも破骨細胞による吸収窩がみられた。骨髓は線維化の傾向を示していた。破骨細胞は散在性に認められたが、形態は大型であった。残存歯根膜はごく一部にみられたが、周囲肉芽組織と移行しており不明瞭であった。抜歯窩外側の骨膜には新生骨が多量に認められた。

(8) 未脱灰の半超薄切片での所見

超薄切片の製作に先立ち作製した半超薄切片をトルイジン青染色、Kossa-トルイジン青染色等を施して観察すると、抜歯後2日目から3日目にかけ大型の破骨細胞が多数出現し活発に骨を吸収している像がみられた(Fig. 9)。径 40μ を超える大きな破骨細胞も多数認められた。破骨細胞の骨に面した部位は ruffled border 構造を示し、その部の細胞質には多数の空胞が認められた。濃縮した核をもった骨細胞と思われる細胞を貪食している像もみられた。破骨細胞に面した骨表層はトルイジン青に濃染する層として認められた(Fig. 10)。

2) Osteolathyrisms 群の抜歯創の所見

(1) 抜歯直後

抜歯窩は出血により主として赤血球で満たされ

ていた。歯根膜は抜歯窩のかなり広い部分にわたり残存していた。中隔歯槽骨頂部と窩底部を除く残存歯根膜には均質無構造の好酸性物質を囲む線維芽細胞の棚状配列がみられた。残存歯根膜部の血管は拡張していた。中隔歯槽骨は骨髓腔が拡大し骨多孔症を呈し、骨質には疎鬆化の傾向がみられた。骨髓腔の骨壁に面して少数の破骨細胞が認められた。

(2) 抜歯後1日目

抜歯窩は凝血で満たされていた。線維素は微細な網目状構造をつくっていたが、対照群に比し、その形成は若干少なかった。歯根膜はかなり広い範囲に残存していたが、osteolathyrisms に特有の線維芽細胞の棚状配列は認められず、細長い線維芽細胞が様々な方向に伸展していた。一部には均質無構造な好酸性物質が残存していた。抜歯窩表層には食物残渣や細菌叢がみられ、その下層には著明な炎症性細胞浸潤がみられた。抜歯窩辺縁の上皮は、一部で、細く索状に内下方に伸展していた。残存歯根膜および骨髓内の血管は拡張していた。中隔歯槽骨の骨質は鬆疎で、骨髓腔は拡大し、骨髓側の骨表面には破骨細胞が配列していた(Fig. 11)。その数は対照群の同時期に比して多く、時に数個の破骨細胞が並んで骨を吸収している部位もみられた。破骨細胞は好酸性の細胞質をもち、核は淡明で1～2個の核小体をもっていた。Howship 窩内に存在するが単核のものから、8個以上の核をもつ大きなものまで種々の大きさの破骨細胞がみられた。骨細胞と思われる細胞の貪食像も認められたが、骨に接する細胞質の空胞は明瞭ではなく、ruffled border 構造も対照群に比し不明瞭であった(Fig. 12)。抜歯窩外壁の外骨膜には肥厚は認められなかった。

(3) 抜歯後2日目

抜歯窩表層には細菌叢と炎症性の細胞浸潤が認められた。抜歯窩辺縁の上皮は内下方に細く索状に伸展していた。抜歯窩内の凝血には周囲組織から線維芽細胞がはいりこんでいた。中隔歯槽骨の骨髓内の血管や、抜歯窩外側の血管は拡張していた。中隔歯槽骨の骨髓腔は著しく拡大し、骨多孔症を呈していた。中隔歯槽骨頂部の骨細胞には濃縮性の核をもつものもみられ、一部の骨小腔は空

虚であった。破骨細胞は主に骨髄側の骨梁に面して多数配列していた。4～5核以上の多核の比較的大型の破骨細胞が多く認められた。時には破骨細胞が隣接して細胞間隙が不明瞭になっているものも認められた。濃縮性の核をもった骨細胞と思われる細胞の破骨細胞による食食像も認められた。このような破骨細胞が多数配列している像は線維化した骨髄に多く、時に同部の血管壁と破骨細胞が密に接触している像も認められた。残存歯根膜は不明瞭となってきたが、一部には均質無構造な好酸性物質が認められた。抜歯窩外側の外骨膜は窩底部でやや肥厚していたが、その傾向は軽度であった。

(4) 抜歯後2.5日目

抜歯窩表層では上皮が内下方へ伸展する傾向を示していたが炎症性細胞浸潤の著明な肉芽組織が露出していた。抜歯窩内では主に窩底部からの肉芽組織の新生が認められたが、線維芽細胞の分布はやや疎であった。残存歯根膜は一部に均質無構造な好酸性物質が痕跡的に認められるのみで、全般に不明瞭であった。中隔歯槽骨は骨髄腔が更に一層拡大し鬆疎であった(Fig. 13)。抜歯窩外側の歯槽骨も吸収され菲薄化していた。血管は拡張しているものが多く、また多数の比較的大型の破骨細胞が認められた(Fig. 14, 15)。抜歯窩外側の外骨膜は窩底部で一部肥厚しているにすぎなかった。

(5) 抜歯後3日目

抜歯窩表層には炎症性細胞浸潤が認められた。上皮は内下方に索状に伸展し、その先端は抜歯窩を覆うように増殖していた。抜歯窩内の凝血はほとんど線維芽細胞と血管の増生による肉芽組織により置き換えられているが、一部に無構造な好酸性物質が認められた。主として窩底部より線維芽細胞の増生がみられたが、その細胞密度は対照群に比しやや少なかった。窩底部の一部では骨の新生も認められたが、骨梁は細く量的にも少なかった。中隔歯槽骨の吸収は著明で、骨髄腔は更に大きく拡大していた。骨質の減少に伴い、破骨細胞の数も相対的に少なくなってきたが、残存骨表面にはまだ多数の破骨細胞が認められた。

(6) 抜歯後4日目

抜歯窩内には肉芽組織が認められたが、細胞密

度は対照群に比し低く、血管は拡張していた。一部では骨の新生像も認められたが、一般にその傾向は対照群に比し軽度で、新生骨梁も微細であった(Fig. 16)。中隔歯槽骨の吸収は著しく、骨が僅かにしか残っていないものもみられたが、そのような骨の表面にも破骨細胞が認められた。破骨細胞の数は残存骨質の減少に伴い、少なくなっていた。

(7) 抜歯後5日目

抜歯窩は拡張した多数の血管を含む肉芽組織で満たされていた。対照群に比して肉芽組織の線維芽細胞の数は少なく、骨の新生も軽度であった。ほとんど中隔歯槽骨が吸収されているものもみられ、破骨細胞の数は減少していた。残存骨質の表面に骨芽細胞が認められる部分もみられた。窩底部や頰側歯槽骨壁部の外骨膜は肥厚し新生骨が認められた。

(8) 半超薄切片での所見

実験群では破骨細胞は一般に対照群に比しやや小型であった。骨に面した細胞質は ruffled border 構造を示し、同部の細胞質には空胞が認められた(Fig. 17)。このような破骨細胞に面した骨の表層部はトルイジン青に濃染していた。

2. 組織計量学的所見

1) 骨量の測定結果

画像分析装置 Leitz ASM を用いて測定した中隔歯槽骨の面積は Fig. 18に示すとおりである。測定値は連続切片で右側第1臼歯遠心根と左側抜歯窩を含む36 μ 毎の5～7枚を用い、その平均値

Fig. 18 Absolute amount of bone in histometrical study.

Fig. 19 Number of osteoclast seen in interdental area of alveolar bone.

をとった。また両群各時期についてそれぞれ5～9匹のラットを用いた。

対照群の非拔牙側の骨面積は経日的にわずかに増加した。拔牙直後ではその面積は平均値で0.220 mm²であり、以後拔牙後5日目には0.262 mm²にまで達した。拔牙側では骨面積は4日目まで経日的に減少したが特に拔牙後2日目から3日目にかけて急激な減少を示した。3日目の時点で拔牙側の骨量は非拔牙側の52%であり、拔牙直後との比較でも拔牙直後の骨量の55%まで減少していた。拔牙後4日目以後は骨の吸収はほとんどみられなかった。

Osteolathyrisism 群での非拔牙側の骨面積は経日的に漸減した。拔牙直後でも対照群に比しその平均値で92%の値であったが、次第にその差は広がり拔牙後5日目では対照群の68%の骨量しかなかった。有意差検定をしたところ個体差があるため拔牙直後から3日目までは差は認められなかったが、拔牙後4日目以降では $P < 0.05$ で有意差が認められた。拔牙側での骨面積も対照群と同様に拔牙後3日目までに急激な減少がみられた。非拔牙側の骨面積と比較した拔牙後3日目の骨面積は約40%であり、対照群の同日の比較値52%と比べるとその比率では差が認められたが、減少した骨面積の値では対照群の0.112 mm² に対し、実験群では0.120 mm² と大差はなかった。また有意差検

定でも差は認められなかった。

2) 破骨細胞の数

骨面積測定部位に出現した破骨細胞の数を計測した (Fig. 19)。

対照群では拔牙直後にはほとんど認められないが、拔牙後3日目まで経日的に比較的緩徐に増加した。拔牙後3日目にそのピークがあり、以後は急速に減少した。最も多くみられた拔牙後3日目では破骨細胞の数は平均して16.3個であった。これは拔牙直後の値と比べると約15.5倍の値を示していた。

Osteolathyrisism 群では拔牙直後より対照群に比し有意差 ($P < 0.05$) をもって多数の破骨細胞が認められた。この後拔牙後2.5日目まで対照群に比し有意に多く、また急速に増加した。拔牙後3日目以降は対照群との有意差は認められなくなった。

3. 組織化学的所見

1) 対照群の所見

(1) リンゴ酸脱水素酵素

i) 拔牙直後～1日目

拔牙窩内の凝血中には活性は認められなかった。中隔歯槽骨部の骨細胞には軽度の活性がみられたが、非拔牙部位に比して低下していた。骨内膜の細胞には中等度の活性がみられ、破骨細胞は高度の活性を有していた。非拔牙部位の歯根膜の細胞には中等度～高度の活性が認められた。象牙芽細胞にも高い活性が認められた。

ii) 拔牙後2～3日目

拔牙窩の骨内膜の細胞および破骨細胞に活性が認められた。残存歯根膜にはほとんど活性が認められなかったが (Fig. 20)、窩底部の一部では新生肉芽組織に活性が認められた。拔牙後3日目頃には拔牙窩に面した歯槽骨壁にも活性をもつ破骨細胞が認められた (Fig. 21)。非拔牙部位では歯根膜や、歯根膜に面する骨表面、骨内膜の細胞は、また象牙芽細胞に強い活性が認められた。

iii) 拔牙後4～5日目

拔牙窩内の肉芽組織に中等度の活性がみられ、窩底部では新生骨梁周囲の骨芽細胞が強い活性を示していた。破骨細胞は量的に減少するが、存在する破骨細胞は強い活性を有していた。

(2) 酸フォスファターゼ

i) 抜歯直後～1日目

抜歯窩内の血餅には活性はみられなかったが、抜歯窩内の残存歯根膜にはごく僅かに活性が認められた。骨細胞には軽度の活性が認められたが、歯槽骨頂部の骨細胞には活性はほとんどみられなかった。抜歯窩中隔歯槽骨の骨髓中には中等度の活性をもった細胞が認められた。骨内膜には扁平な細胞で比較的高い活性をもつものも認められた。非抜歯部位の歯根膜線維芽細胞は活性を示していたが、象牙芽細胞には活性はほとんど認められなかった。

ii) 抜歯後2～3日目

抜歯窩内の凝血中に向かって増殖してきている線維芽細胞様細胞にも酸フォスファターゼ活性が認められた。窩底部では著明だったが、窩壁部でもその傾向がみられた。骨細胞の活性は歯槽骨頂部で減弱していた。残存歯根膜にはほとんど活性は認められなかった。抜歯窩中隔部の骨髓側では活性の高い細胞がみられ、破骨細胞は最も高い活性を有していた(Fig. 22)。非抜歯部位では歯根膜にも比較的高い活性が認められた。骨細胞も軽度ながら活性を有しており、骨内膜の細胞には著明な活性をもつ細胞も認められた。

iii) 抜歯後4～5日目

抜歯後2～3日目に比して窩底部、側壁部でより広範に、線維芽細胞や血管壁の細胞で酸フォスファターゼ活性を示すものが認められた。骨髓側の骨内膜および骨髓内細胞には中等度の酸フォスファターゼ活性が認められ、高度の酸フォスファターゼ活性を有する破骨細胞も一部でみられた。

(3) アルカリフォスファターゼ

i) 抜歯直後～1日目

抜歯窩内には活性はほとんど認められなかったが、中隔歯槽骨の骨内膜に中等度の活性が認められた(Fig. 23)。非抜歯部位の歯牙の象牙芽細胞、歯根膜、歯根膜に面した骨表面、および骨内膜の細胞には強い活性が認められた(Fig. 24)。

ii) 抜歯後2～3日目

抜歯後2～3日目では抜歯窩に面する部位のアルカリフォスファターゼ活性はほとんど認められず、骨髓側に面した骨内膜の細胞に中等度の活性

が認められ、破骨細胞にも軽度の活性がみられた。非抜歯部位では歯根膜に軽度の活性がみられ、歯根膜に面する骨表面や骨内膜の細胞には中等度～高度の、そして象牙芽細胞には高度の活性が認められた。

iii) 抜歯後4～5日目

抜歯後4～5日目になると抜歯窩に面する骨表面および新生骨梁表面の細胞にも軽度の活性が認められた。非抜歯部位では象牙芽細胞、歯根膜に面する骨表層の細胞、骨内膜細胞に強度の活性がみられ、歯根膜線維芽細胞に中等度の活性が認められた。

一般に有歯部歯槽骨の骨芽細胞層には比較的に強い反応が認められたが、抜歯創付近では活性は著るしく低下していた。

2) Osteolathyrism 群での所見

(1) リンゴ酸脱水素酵素

i) 抜歯直後～1日目

凝血中には活性は認められず、残存歯根膜や抜歯窩に面した骨表層には活性はほとんどみられなかったが、中隔歯槽骨の骨髓側には中等度の活性がみられ(Fig. 25)、中でも破骨細胞には高度の活性が認められた。非抜歯部位の歯根膜線維芽細胞には中等度の活性がみられ、象牙芽細胞には高度の活性が認められた。

ii) 抜歯後2～3日目

抜歯窩中隔歯槽骨の骨内膜の細胞には中等度の活性が認められ、破骨細胞には高い活性が認められた(Fig. 26)。抜歯後2.5～3日目頃になると抜歯窩に面した骨表面にも中等度～高度の活性をもつ破骨細胞が認められるようになった。新生された肉芽組織にも軽度～中等度の活性がみられた。

iii) 抜歯後4～5日目

肉芽組織には軽度～中等度の活性がみられた。破骨細胞の数は減少したが、存在する場合には高い活性が認められた。

(2) 酸フォスファターゼ

i) 抜歯直後～1日目

抜歯窩中の凝血には活性は認められず、残存歯根膜にもほとんど活性は認められなかった。抜歯窩に面した骨表面には活性はみられなかったが、中隔歯槽骨の骨内膜や骨髓には中等度の活性が認

められ、破骨細胞は高い活性を示していた。中隔歯槽骨頂部の骨細胞はほとんど活性を示さなかった。

ii) 抜歯後2～3日目

抜歯窩内の新生肉芽組織には活性が認められるが、窩底部、窩壁部に近接した部位に局限していた。抜歯窩に面した骨質表面にも活性をもった破骨細胞がみられた(Fig. 27)。骨内膜や骨髄の細胞には中等度の活性がみられ、破骨細胞には高度の活性が認められた。非抜歯部位では酸フォスファターゼ活性は歯根膜線維芽細胞にも認められたが、象牙芽細胞にはほとんど活性がみられなかった。

iii) 抜歯後4～5日目

窩底部、側壁部の肉芽組織で酸フォスファターゼ活性を示すものがみられたが、対照群に比しその傾向は軽度であった。骨内膜および、骨髄内の細胞には中等度の活性がみられ、抜歯窩に面した骨壁にも活性をもった細胞が認められた。破骨細胞の数は減少するが、活性は高度に認められた。

(3) アルカリフォスファターゼ

i) 抜歯直後～1日目

抜歯窩内にはアルカリフォスファターゼ活性は認められなかったが、中隔歯槽骨の骨内膜には中等度の活性が認められた。非抜歯部の象牙芽細胞には著明な活性がみられ、歯根膜に面した骨表層や骨内膜の細胞にも中等度～高度の活性がみられた。また歯根膜にも中等度の活性がみられたが、抜歯創付近では一般に染色性が減弱していた。

ii) 抜歯後2～3日目

抜歯窩内にはほとんど活性は認められなかった。抜歯窩中隔歯槽骨の骨内膜には中等度の活性がみられ、破骨細胞にも軽度の活性が認められた。非抜歯部位の歯根膜には活性がみられ、歯根膜に面する骨表面の細胞にも中等度の活性が認められた。

iii) 抜歯後4～5日目

抜歯窩の歯槽中隔に近接して一部の肉芽組織に弱い活性が認められたが、対照群に比し軽度であった。破骨細胞には軽度の活性がみられた。

4. 電子顕微鏡的所見

組織学的観察によると、抜歯後経時的に破骨細胞

の数は増加し、その形態も次第に大型になる傾向を示してはいたが、大型で活発な吸収をしていると思われる破骨細胞は、抜歯後早期にも認められ、全般的にみた破骨細胞の成熟度は抜歯後の時間的経過とはあまり関連がなく、骨吸収量の経日的変化は破骨細胞の数に対応しているものと思われた。

電顕的にも、抜歯後1日目でも大型の成熟した破骨細胞がみられることもあり、抜歯後3日目でも比較的小型で幼若な破骨細胞がみられることもあった。細胞学的に破骨細胞を観察した場合、このように各時期においてさまざまな成熟段階の破骨細胞が観察されるので、電子顕微鏡的所見については、個々の破骨細胞についての観察所見を述べることにする。

1) 対照群の骨吸収

(1) 破骨細胞の微細構造

骨表面に近接して単核の小型の細胞がみられることがあった。細胞内小器官では、定型的な破骨細胞に比べるとミトコンドリアが少なく、遊離リボゾームが多い傾向を示していたが、基質産生型の細胞に比べるとミトコンドリアは豊富で、さまざまな形態の電子密度の高い顆粒が認められ粗面小胞体は少なかった。一般に細胞表面には小突起がみられ、凹凸不整の外形を示していた(Fig. 28)。これらの細胞の多くは小血管に近接した骨表面近くに存在していた。

骨に接して単核～多核の小型の細胞がみられることがあった。細胞表面には小突起がみられ、特に骨に接した面には多数の指状突起がみられることが多かった。細胞内小器官は、定型的な破骨細胞に比べると少なく未発達であった(Fig. 29)。

中等度に発達した破骨細胞では ruffled border は明らかでありその細胞に占める領域も大きくなり、ruffled border 部の幅も広くなってくるが、平坦で骨に密着する傾向を示す部もまだかなり認められた。細胞内小器官は定型的な破骨細胞に類似し、ミトコンドリアが豊富に認められた。Ruffled border 部以外の部位や骨と反対側の細胞膜にも突起状の構造が認められることが多く、表面は平滑ではなかった(Fig. 30)。Ruffled border の突起内細胞質、および骨に密着し細胞内小器官

の欠如する部の細胞質は類似しており、全般的に微細な粒子状～細線維様構造が認められた (Fig. 31)。

定型的な破骨細胞は大きく、径 50μ を超えるものもみられた。骨に面した細胞質は複雑に入り組んだ ruffled border を示していた。Ruffled border の形態は細胞の大きさや骨吸収の活性の大小によっても、また同一の細胞でも部位によって異なることがあったが、一般に、大きく活発に骨吸収を営んでいると思われる破骨細胞では、ruffled border は細胞の広い部分に分布し、その幅も広く、突起が複雑に入り組んだ特徴的な形態を示していた (Fig. 32)。Ruffled border に隣接して細胞小器官が欠如し、骨に密着する部分もみられた。この部分の細胞膜は骨表面の形態に一致し平坦であるが、ruffled border に近づくに従って細胞膜が陥入を示し、ruffled border への移行を思わせた。

破骨細胞の核は類円型のもの、扁平なもの、あるいは切れこみのみられるものなど多様であった。クロマチンは核辺縁部に偏在し、一般に淡明であった。核小体は1個であるものが多かったが時に2個認められるものもあった。破骨細胞は多核の細胞であり、5～6個の核が認められることもあったが細胞質全体に占める核の比率は大きくはなかった。特に活発に吸収を営んでいると思われる細胞ほど核の占める比率は小さい傾向が認められた。

ミトコンドリアは破骨細胞の細胞質中で最も顕著な小器官であった。細胞質内の広い部分に分布していたが、ruffled border 部とこれに隣接し骨に密着した部位の細胞質中には認められず、破骨細胞の辺縁部の細胞質など一部ではミトコンドリアの分布密度の減じている部位も認められた。ミトコンドリアの量は活発に骨を吸収していると思われる大型で ruffled border の良く発達した破骨細胞ほど多く (Fig. 30, 32)、ruffled border の発達があまりみられない小型の破骨細胞では少なかった (Fig. 29)。ミトコンドリア中に電子密度の高いいわゆるミトコンドリア顆粒のみられることもあった。

粗面小胞体は破骨細胞の細胞内小器官としては目立つ存在ではなかった。その多くは豊富なミト

コンドリアの間に圧平された状態で認められた。しかし骨とは反対側の細胞辺縁部でミトコンドリアの少ない部分などでは、粗面小胞体が比較的密に存在している部位もみられた。粗面小胞体の拡張はほとんどみられなかった (Fig. 33)。

遊離リボゾームは細胞質内に広く分布し、所により集合していた。骨と反対側の細胞質辺縁に集合しているのがみられることが多いが、時に骨に密着する部位の細胞質中にみられることがあった。Golgi 装置は核の周囲や近接した細胞質中に多数認められ、所により密集している部位もみられた。Golgi 装置は数層の明瞭な Golgi 層板よりなり、辺縁部には多数の Golgi 小胞が認められた。

Ruffled border に隣接する細胞質中には大小の空胞が認められた。空胞の内部は空虚なものや、骨結晶様構造物を含むもの、不定型の物質を含むものなど多彩であったが線維様構造物は全く認められなかった (Fig. 34)。

電子密度の高い小体は、破骨細胞の細胞質中で主に核と ruffled border との間に認められた。形態は多様で、小さく電子密度の高いものや、やや大きく顆粒状の淡明な小体などがみられた。これらの小体が空胞と融合する像はしばしばみられた。

(2) 骨基質の変化

Ruffled border に面する骨質表層には遊離した骨結晶様構造が散在しており、これらの骨結晶様構造は ruffled border の突起間や隣接する細胞質内の空胞にも認められた (Fig. 34, 35)。骨結晶の遊離の傾向は ruffled border の発達に比例しており、細胞内小器官を欠き骨に密着した細胞質の下では遊離化の傾向はほとんどなく、幅が狭くあまり発達していない ruffled border 部では骨質表層の変化は軽度で、突起間にも遊離した骨結晶様構造はあまりみられなかった (Fig. 31)。Ruffled border が発達するに従い、ruffled border の下の骨の疎鬆化の傾向が強くなり、突起間にも微細な骨結晶が多数認められるようになった。

良く発達した ruffled border 直下の骨の表層は、クエン酸鉛で染色した標本では $1\sim 2\mu$ の幅の遊離した骨結晶が集合した層よりなっていた。

その下層の骨質は $1\sim 1.5\mu$ にわたり層状に疎鬆化し、更に下方には正常と思われる緻密な骨質が認められた(Fig. 35)。

同様の良く発達した ruffled border をもつ破骨細胞下の骨質を燐タングステン酸 (PTA) で染色してみると、ruffled border の間や骨表層の遊離した骨結晶は脱灰され認められないが、それに相当する部位に crystal ghost 様の構造物がみられた。その下方のクエン酸鉛染色標本で鬆疎な骨層として認められた層には、PTA に濃染する不定型の線維様物質が $1\sim 1.5\mu$ の幅にわたって認められた。その下方の骨質は膠原線維が方向性をもって配列したほぼ正常な構造を示していた(Fig. 36)。

(3) 破骨細胞による骨細胞の食食

破骨細胞による骨細胞の食食像はしばしば認められた。破骨細胞が骨を吸収し骨小腔が開拡したところへ破骨細胞の細胞質が突起状に入り込み、骨細胞をかかえこむようにして食食してゆく像がみられた(Fig. 37a, b)。また破骨細胞の細胞質中には、しばしば、このようにしてとりこまれたと思われる種々の程度に変性した細胞を含んだ大きな空胞が認められた(Fig. 37a)。

2) Osteolathyrism 群の骨吸収

(1) 破骨細胞の微細構造

Osteolathyrism の場合の破骨細胞も多核で大型の細胞であったが、対照群に比すと、やや小型の細胞が多くみられた。破骨細胞の骨に面した細胞質は ruffled border を形成していたが、その形態は対照群に比し著しい差異を示していた。

比較的小型であり骨吸収の活性が認められない破骨細胞では、細胞膜は一般に骨に密着しており、細胞膜が陥入を示し ruffled border への移行を示している部位もみられたが、ruffled border の占める領域は狭く、ruffled border 部の幅も 1μ 程度であった(Fig. 38)。このような ruffled border の突起は棍棒状で、太さは 1μ に達するものもあり、突胞間は狭く、突起の先端は骨に接していた(Fig. 39)。

Osteolathyrism の場合にも、比較的大型で ruffled border が比較的良く発達した破骨細胞もみられたが、そのような細胞でも ruffled border

部の幅は対照群に比して小さく、ruffled border 間の空隙も狭く、突起は太いものが多かった(Fig. 40, 41)。Ruffled border に隣接する部は骨に密着していたが、細胞内小器官はほとんどみられず、時に遊離リボゾームがみられるのみであった(Fig. 40)。

Osteolathyrism の場合の破骨細胞の核も類円型のもの、扁平なもの、あるいは多角形で切れこみのあるものなど多様であった。クロマチンは核辺縁部に多く、一般に淡明で、 $1\sim 2$ 個の核小体をもっていた(Fig. 40, 42)。多核であり時に多くの核を有する破骨細胞もみられたが、核の細胞質全体に占める比率は小さかった。

ミトコンドリアは osteolathyrism ラットの破骨細胞でも最も目立つ細胞内小器官であり、細胞質の広い部分に分布していた。しかしその密度は対照群に比して低く、特に細胞辺縁部ではほとんどミトコンドリアのみられない破骨細胞も認められた。ミトコンドリアの形態も対照群に比し小型のものが多かった。

粗面小胞体は部位により多数認められる所もあったが概して少なく、対照群でみられた細胞辺縁部での発達も著明ではなく、そのような部位にはむしろ遊離リボゾームが多かった。粗面小胞体の一部が拡張しているものも認められた。

遊離リボゾームは豊富で、前述のように細胞の辺縁部ではミトコンドリアよりも目立つ部位もあった。Ruffled border に隣接して多数の遊離リボゾームが認められる部位もあり、このような部には ruffled border は認められなかった。

Golgi 装置は核の周囲に多数みられたが、時に核と核の間の細胞質にも密集していることがあった。Golgi 装置は数層の Golgi 層板よりなっていたが、その内層板は拡張しているものが多かった。その辺縁部に比較的多数の Golgi 小胞が認められた(Fig. 42)。

Ruffled border に隣接する細胞質中には大小の空胞が認められたが、その数は対照群に比しやや少なく、形状はむしろ大きなものが多かった。空胞には空虚なものや、内部に不定型物質、顆粒状物質、あるいは骨結晶様構造などを含んだものがあり、その構造は多彩であったが、骨結晶様構造

物は対照群のものに比し密に集塊状を呈しているものが多かった(Fig. 39, 40)。

電子密度の高い小体は主として核と ruffled border 間の細胞質中に認められた。その形態は多様で、小さく Golgi 小胞と類似したものから比較的大きく顆粒状の内容をもつものまでさまざまであり、空胞との融合像も認められた。

(2) 骨基質の変化

Ruffled border に面する骨質の表層には対照群と同様に変化がみられたが、その程度と形態は異なっていた。

Ruffled border は骨表層に近接しており、クエン酸鉛染色を施した標本で観察すると、吸収面の骨表層では骨結晶様構造は遊離の傾向が少なく、集塊状を呈し、その下層の骨質の疎鬆化の程度も軽度であった。Ruffled border 間にみられる骨結晶様構造も集塊状をなしていた(Fig. 44)。

燐タングステン酸染色を施した標本では、ruffled border は骨表層の濃染層の近くに認められた。濃染層の幅は狭く、その下層の骨質も若干不規則であった(Fig. 45)。

対照群とは異なり、osteolathyrism の場合には、時々 ruffled border の下に横紋構造は不明瞭であったが線維様構造が認められた(Fig. 43)。

(3) 破骨細胞による骨細胞の貪食

Osteolathyrism の場合にも破骨細胞による骨細胞の貪食像が認められた。開拡した骨小腔に破骨細胞が突起を伸ばし、骨細胞をかかえこむような形態を示していた。

考 察

1. 組織学的所見について

抜歯創の治癒過程についてはヒト^{29, 34, 37)}、イヌ^{29, 30, 36, 38)}、サル³⁹⁾、ラット^{31-33, 35)}等で多くの検索がなされているが、骨の新生の面からの検索が主で、抜歯創における破骨細胞による骨吸収については、Pietrokovski ら(1967)³³⁾がラットの臼歯を抜去したのち歯槽骨頂部の吸収がみられることを報告した以外には、ラットの臼歯抜去後3～4日目に歯槽骨壁に破骨細胞がみられるという報告^{34, 37)}や、サルの臼歯抜去後3日目に多数の破骨細胞が周囲の歯槽骨壁にみられたとの報告⁴¹⁾があ

るにすぎない。今回のラットを用いた検索では、正常群と osteolathyrism 群の間で差はみられたが、両群とも抜歯後2～3日目に抜歯窩の歯槽骨部に多数の破骨細胞が出現した。

Pietrokovski ら³³⁾はラットの上下顎臼歯を抜去したのち8週にわたり組織学的に観察し、抜歯後1週目に、上下顎とも筋の付着のない歯槽骨頂部が吸収されること、特に上顎の抜歯窩では頬筋付着部より下方の歯槽骨頂部に多数の破骨細胞が出現し、抜歯窩に面する歯槽骨のみではなく、その外側も吸収されることを観察している。これに対して頬筋付着部より上方の上顎骨窩底部から中間部の上顎骨には骨の添加がみられ、頬筋付着部に吸収と添加の明瞭な境界がみられたと報告している。彼らは頬筋の付着部より下方の歯槽骨頂は歯牙の機能と関連している部位であり、歯牙の抜去後は吸収されると述べている。これは一般に抜歯後にみられる歯槽骨頂部の吸収による平坦化に対応する所見であるが、彼らの観察は抜歯後1週目からなされており、それ以前に起こる骨吸収については検索されていない。

一方、Johanson(1970)³⁷⁾はラットの左側上顎第1臼歯を抜去した後の治癒過程を検索して、抜歯後2日目から3日目にかけて歯槽骨壁に破骨細胞がみられたと記載しているが、抜歯後の骨吸収については特に注目してはいない。

今回の検索では、破骨細胞による骨の吸収は骨芽細胞による骨の新生に先だって起こり、その際出現する破骨細胞の数は抜歯直後の十数倍もあり、骨の吸収量も抜歯後3日目で抜歯前の50%に及んでいた。一方、抜歯後、歯槽骨表層の細胞は、ほとんど変性の傾向を示し、破骨細胞による骨細胞の貪食像が認められたが、このような所見は抜歯による歯槽骨の損傷と、損傷された骨質の吸収除去を示すものであり、抜歯創の治癒過程において、破骨細胞による骨吸収は重要な一つの過程であることを示唆するものと思われる。

Osteolathyrism ラットでも抜歯創の治癒過程は基本的に正常対照群と異なるところはないが、一般にその治癒が遅延する傾向がみられた。Osteolathyrism の場合に、骨芽細胞の障害にもとづく骨の形成障害と、筋付着部の過骨症骨の新生の

ために必要な無機質を供給するために系統的な骨多孔症が起こり、歯槽骨も多孔性になる。一方、臼歯歯根膜でも線維芽細胞の機能の障害による歯根膜線維の消失が起こり、歯牙との線維性結合は著しく脆弱化する。このため今回の実験でも抜歯は比較的容易であった。このような点を考慮にいと、osteolathyrism の場合、抜歯により加わる外力は正常群に比し少ないと思われるが、骨芽細胞や骨細胞等の細胞は障害されており、小さな外力によっても受ける損傷は大きいものと思われる。Osteolathyrism ラットでは、中隔歯槽骨の骨細胞の変性がみられるが、抜歯後はその数も増加し、空虚な骨小腔がみられ、さらに破骨細胞による骨細胞の貪食像も認められた。Osteolathyrism の場合にもこのように損傷された骨組織が吸収除去されるものと思われる。

2. 組織計量学的所見について

組織学的にみられた抜歯創の骨吸収を定量的に把握するために画像分析装置 Leitz ASM を用いて歯槽骨量を経日的に測定した。

画像分析装置 Leitz ASM は、描画ペンで写真やスライド等をトレースし、ペン軸先よりの電磁線をセンシフィールドで感応させ、コンピューター処理するもので、55倍に投影した組織標本をトレースしたものの変異係数は0.4%であり、従来のプランメーターによる面積測定や、写真切りぬき法による面積測定などに比し、正確かつ迅速に測定のできる装置である。

Barrington and Meyer (1966)²⁴⁾は BAPN を28日間投与したラットと正常ラット上顎第1臼歯の矢状断による近心根と遠心根との間の根管中隔歯槽骨を歯根の長軸に沿って8 μ の連続切片を作製し、中央からの5~6枚を骨面積の計測に用いている。

今回の検索では抜歯側と非抜歯側の骨量を同時に測定するため前頭断とし、測定部位も第1臼歯遠心口蓋側根と頰側根の間の中隔歯槽骨とした。ラットの第1臼歯は5根あり、近心根は1番大きい1根であり、中間部の歯根2根は小さい。遠心2根は比較的大きく根間中隔を明らかにしやすい。またその長軸方向は第2臼歯の近心根の長軸とほぼ同一の傾きをもち、連続切片の作製も容易

なため、第1臼歯遠心根部中隔歯槽骨を測定部位とした。

骨量測定の結果は図18に示すとおりである。非抜歯側での骨量は経日的に漸増の傾向を示した。これはラットの成長により生じた骨質の増加を示すものと考えられる。実験群では抜歯直後よりその骨量は対照群に比し少なく、AAN による osteoporotic な変化を示していると思われた。平均値で比較してみると、10日間 AAN を投与したラットの抜歯直後の非抜歯側の骨量は対照群の92%であり、以後も骨量の増加はほとんどみられず、むしろ減少の傾向を示し AAN 投与15日目の抜歯後5日目では実験群の骨量は対照群の68%であり有意差 ($P<0.05$) を示した。

Barrington and Meyer (1966)²⁴⁾は BAPN を28日間投与したラットの上顎第1臼歯の近心根と遠心根の間の中隔歯槽骨は正常ラットの48%しかなかったと記載しており、経日的に屠殺した標本の結果から、osteoporotic な変化は投与後7日目から生じると述べている。

今回の検索結果は Barrington らの結果に比し osteoporotic な変化は少ないが、これは、投与期間が短いことと、osteolathyrism ラットは体重の減少がみられるため、抜歯時体重をほぼ同一にするため実験群ラットは対照群ラットに比し10日齢年長であることなどが要因として考えられる。

抜歯側での骨量は対照群、実験群ともにほぼ同様の傾向で減少した。骨量の減少は抜歯後3日目までが著しく、抜歯後の破骨細胞による骨吸収は、抜歯後早期のこの時期に大部分が完了するものと思われた。抜歯後の治癒過程について観察した論文でも、この時期に破骨細胞の記載がみられる^{34, 37, 41)}。抜歯後4日目以降では骨の吸収はほとんどみられなくなり、特に対照群では骨の増生が主体となってきた。

骨量測定部位にみられた破骨細胞の数は、骨量測定に用いた連続切片で上顎第1臼歯遠心根の歯根長軸を含む標本で36 μ 毎に5~7枚の標本を用いて、左側抜歯窩の骨量測定部位に存在した破骨細胞の数の平均値をとった。Saffer ら(1977)⁵⁸⁾は歯周疾患を起こさせたゴールデンハムスターの破骨細胞性骨吸収を定量的に把握することを目的と

して下顎臼歯部の水平的連続切片を厚さ 7μ で作製し検索した。彼らは同一の破骨細胞を重複して数えないために3枚おきに切片を選びだし 21μ 毎に計測している。今回の検索では厚さ 6μ の切片を6枚おき、 36μ 毎に計測した。破骨細胞は大きなものでは径 50μ を超えるものもあるが、測定にあたり多核であること、好酸性の細胞質を有すること、骨に直接接触し Howship 窩を認めることなどを基準として計測したので、Saffer らの測定方法よりも重複の度合いは少ないものと思われる。

破骨細胞の数は osteolathyrism の場合に抜歯後2.5日目まで、対照群では抜歯後3日目まで増加した。しかしその数は抜歯後2.5日目までは実験群の方が有意に多く ($P<0.05$) 骨の吸収がほぼ完了した抜歯後3日目以降では有意差は認められなくなった。骨量測定の結果から、骨の吸収は抜歯後3日目までにほとんど完了すると思われるので、それまでの破骨細胞の数から推定すると実験群の方がはるかに多数の破骨細胞が骨吸収に参加したものと思われる。

以上の所見は抜歯創での骨量は osteolathyrism 群の方が少なく骨質の疎鬆化も著しいが、osteolathyrism ラットでは抜歯時既に osteoporotic な変化がみられ、以後もその傾向が増強してゆくことが非抜歯側での骨量測定の結果から明らかであり、抜歯側での残存骨量を抜歯直後の平均値と比較した値で有意差検定をした結果でも有意差は認められなかったことから、骨の吸収量については両群間に差がないものと思われた。これに対して、破骨細胞の数は osteolathyrism の場合の方が骨の吸収時には顕著に多く、同量の骨を吸収するのに多数の破骨細胞の参加が必要であり、osteolathyrism の場合、個々の破骨細胞の骨吸収機転に何らかの障害があるものと推測された。

3. 組織化学的所見について

Todo (1968)³⁵⁾ は抜歯創の治癒過程を組織化学的に観察し、抜歯後1～5日目を早期、抜歯後10～20日目を骨形成期、抜歯後30～90日目を後期の3期に分け、各々の時期について、酸フォスファターゼ、アルカリフォスファターゼ、および各種脱水素酵素について検索を行っている。彼

は抜歯後早期には、リンゴ酸脱水素酵素のような NAD 依存性酵素の活性は、血餅では欠け、残存歯根膜や窩底部より増殖する線維芽細胞では通常の歯根膜細胞より弱い活性を示すと述べている。また吸収されている歯槽骨表面には高い酸フォスファターゼとアルカリフォスファターゼ活性が認められたと報告している。

今回の検索では対照群・osteolathyrism 群の両群ともに、抜歯後早期には抜歯窩に面した部位で各酵素活性の著しい減少がみられ、抜歯直後～1日目では抜歯窩の中隔歯槽骨の骨髄側にのみ活性が認められた。抜歯創での早期の骨吸収は骨髄側に起こることが組織学的検索により明らかになったが、組織化学的にもこの時期には骨髄側に高い酸フォスファターゼ活性とリンゴ酸脱水素酵素活性をもつ破骨細胞が認められたが、とくに osteolathyrism 群では対照群より早い時期からみられた。抜歯後3日目頃になると抜歯窩に面した骨壁にも高い酸フォスファターゼ活性、リンゴ酸脱水素酵素活性、軽度～中等度のアルカリフォスファターゼ活性をもつ細胞が観察されるようになり、この頃には抜歯窩内にも酵素活性をもつ肉芽組織の増生もみられるようになった。抜歯創はもちろん、その周辺の組織にも非抜歯部位の組織と比較して酵素活性、とくに脱水素酵素の著しい減少がみられたが、これは抜歯時の外力により抜歯窩周囲組織に障害がおよんだためと思われた。組織学的所見と照らしあわせて考えると、このような損傷された骨組織が抜歯創の修復時に骨の新生に先立ち、破骨細胞により吸収されるものと思われた。破骨細胞は早期には骨髄側に限局して認められるが、これも抜歯窩に面した部位では組織が損傷されていることを示唆する所見と思われる。

破骨細胞は高い酸フォスファターゼ活性をもつことが知られている⁵⁹⁾。電顕組織化学的に破骨細胞の細胞質中の電子密度の高い小体の中に酸フォスファターゼ活性が証明され、形態的にみてもライソゾームであろうといわれている⁶⁰⁻⁶³⁾。またこの酵素が細胞外の ruffled border の間や、吸収される骨質表層にもみられたという報告があり^{60,63)} ライソゾーム酵素が細胞外へも放出されているものと思われる。今回の検索は光顕レベルであり酵

素の微小局在については明らかではないが、破骨細胞の胞体内にみられる酸フォスファターゼの高い活性は破骨細胞の吸収機能の一端を示しているものと思われた。

脱水素酵素は細胞のエネルギー産生に関与し、その活性は細胞の代謝活性を示している。破骨細胞はコハク酸脱水素酵素やリンゴ酸脱水素酵素のような脱水素酵素の活性が高いことが知られている^{35,59)}。今回の検索でも破骨細胞にはリンゴ酸脱水素酵素の強い活性が認められ、電顕的に多数のミトコンドリアがみられたことから高い細胞活性を有しているものと思われた。

アルカリフォスファターゼは骨芽細胞や象牙芽細胞に著明に認められるため石灰化機構と何らかの関連があるものと考えられている^{64,65)}。また最近の Horn(1981)⁶⁶⁾らの電顕組織化学的観察によれば、吸収されつつある骨の表層にもアルカリフォスファターゼ活性が見出され、骨吸収にも重要な酵素であることが示唆されている。また、コラゲナーゼは膠原線維を特異的に分解する酵素であるが、骨吸収時にその活性が上昇することは生化学的に認められており⁶⁷⁻⁶⁹⁾、コラゲナーゼのなかにはアルカリ領域で活性をもつものがあることから骨の有機成分の分解に何らかの関係をもつものと思われる。今回の検索では破骨細胞に軽度～中等度の活性が認められたが、このような所見も骨吸収に関係したものと考えられる。

Yoshikawa²⁵⁾は osteolathyrism ラットの骨格系組織および歯周組織を組織化学的に観察し、骨芽細胞や骨細胞にアルカリフォスファターゼ活性の低下を観察し、また、破骨細胞には高い脱水素酵素活性がみられたと報告している。

今回の検索では、osteolathyrism 群と対照群との間の酵素活性の差は顕著ではなかったが、中隔歯槽骨細胞ではリンゴ酸脱水素酵素とアルカリフォスファターゼの若干の低下がみられ、また、肉芽組織の酵素活性にもやや低下が認められた。このような所見は osteolathyrism ラットにおける骨の代謝障害と抜歯創の治癒の障害を示すものと思われる。

4. 電顕的所見について

1) 対照群の所見について

(1) 破骨細胞の微細構造について

今回検索した正常ラットでは抜歯後2～3日目には抜歯窩中隔部に多数の破骨細胞がみられた。一般的には経日的に大型の活動的な破骨細胞が増加する傾向を示してはいたが、各時期において微細構造的に種々の発育段階にある破骨細胞が認められた。定型的な破骨細胞は多核でミトコンドリアに富む大型の胞体を持ち、骨の吸収部に面して良く発達した ruffled border を有していた。

ミトコンドリアは破骨細胞の細胞内小器官のうちで最も顕著なものであり^{44,48)}、今回の検索でも特に良く発達した破骨細胞では無数のミトコンドリアが認められた。ミトコンドリアの量は細胞の発育の段階とその活性を示すものと思われ、今回の検索でも単核あるいは、多核でも小型の破骨細胞ではその密度は低かった。Rifkin ら(1980)⁷⁰⁾は胎生ラットの頭蓋骨の前破骨細胞と思われる細胞を観察し、ミトコンドリアの量は破骨細胞の分化の程度により差があると述べている。また、Scott⁵¹⁾はオートラジオグラフィーの手法を用いて胎生期のラット脛骨を観察し、他の間葉系細胞に比しミトコンドリアやその他の小器官が破骨細胞のそれに類似した特徴を有する細胞を前破骨細胞として記載している。このようにミトコンドリアは破骨細胞にとって重要な小器官であり、その量と分布は前述した如く破骨細胞の発育の程度と骨吸収の活性の大小を示すものと思われる。

Dudley ら⁴⁴⁾はミトコンドリアの分布について骨に近い部分に特に多いと述べているが、今回の検索では他の研究者の報告と同様に、ruffled border の部や骨に密着する部分の細胞質には認められなかったが、その他はほぼ一様に分布していた。

粗面小胞体は一般に少ないといわれているが⁴⁸⁾、今回の検索では破骨細胞全体における粗面小胞体の比率は少ないが、部位によっては非常に良く発達した粗面小胞体が認められた。また破骨細胞は大型の細胞であることから、細胞自体の粗面小胞体の量は決して少ないものではないと思われる。

遊離リボゾームに関して Dudley ら⁴⁴⁾は破骨細胞の細胞質中には多く、また一部で集合することがあると述べており、Hancox⁴⁶⁾も同様の観察をし

ている。今回の観察でも破骨細胞の細胞質中に比較的多くの遊離リボゾームがみられ、所により密集している部位も認められた。一般にミトコンドリア等の小器官が少なく骨吸収の活性が低いと思われる細胞ほど遊離リボゾームが密集する部分が多い傾向がみられた。

破骨細胞では Golgi 装置が発達し、核の周囲に存在していることが多いと述べられている^{45,71)}。今回の検索でも核をとり囲んで、あるいは核に近接した細胞質中に比較的良好に発達した Golgi 装置が認められた。Golgi 装置は明瞭な数層の層板構造より成り、その周辺部に Golgi 小胞が認められた。また Golgi 小胞の一部は Golgi 嚢の budding によると思われる像も認められた。Scott (1967)⁷²⁾や Cameron ら⁷³⁾はこの小胞と破骨細胞の細胞質内の電子密度の高い小体との関連を示唆している。また Lucht⁷⁴⁾は細胞質内の小体を4型に分類し、Golgi 装置と小さな細胞質小体との関連を示している。Golgi 装置の一部と Golgi 装置に関連した小体や空胞には酸フォスファターゼ活性が認められている⁶⁰⁾。

破骨細胞の Golgi 装置の発達は粗面小胞体の存在とも関連して細胞内でのタンパク合成、とくに各種酵素の産生と分泌とへの関与を示唆しているものと思われる。

破骨細胞の骨の吸収部に面する部分には ruffled border が認められた。Ruffled border は細胞小器官の発達の程度と関係し、一般に良く発達した小器官を有する大型の破骨細胞では非常に良く発達した ruffled border を有しており、その指状突起の長さは 5μ に達するものもみられた。Ruffled border については細胞膜の陥入によると考える者^{44,45,72)}、細胞質の突起であるとする者⁴⁴⁾、あるいは両者の混合であるとする者^{46,73)}等があるが、今回の検索では両方の構成要素が認められたが、中等度に発達した破骨細胞では骨に密着して細胞内小器官の欠如した部位が比較的に広い範囲に認められ、この部と ruffled border との移行部には主として細胞膜が陥入してゆく像がみられ、大型で良く発達した破骨細胞では骨に密着する部分が少なく全体が突起状の ruffled border を持つことから、破骨細胞の成熟の程度によりそのよう

な差がでてくるのではないかと考えられた。このような ruffled border は骨基質の破壊と吸収に際して重要な役割を営んでいるものと考えられているが、今回の検索でも ruffled border の突起間には、遊離した骨結晶様の微細な構造がみられ、このような結晶様構造は次第に胞体内の空胞中に移行する像を示していた。

破骨細胞の骨に面した細胞質中には大小の空胞が認められ、内部に ruffled border 間にみられるものと同様の遊離した骨結晶様物と不定型物質を容れていた。またこれと融合する電子密度の高い小体もみられたが、このような所見は Lucht^{60,74)}も述べているように、細胞内での骨結晶の分解吸収の過程を示しているものと思われる。

(2) 骨基質の変化について

Ruffled border に面する骨質表層の吸収面が他の部位と染色性を異にすることは組織学的にも観察されている⁷⁵⁾。今回の検索でも破骨細胞の ruffled border に面した骨表面にトルイジン青濃染層が認められ、この部の骨質に何らかの変化があるものと考えられた。この部の電顕的検索でも ruffled border に面する骨質は著しい特徴を示していた。Ruffled border 直下の骨質の表層には $1\sim 2\mu$ の幅で、遊離した骨結晶が帯状に存在し、その下層の骨質は $1\sim 1.5\mu$ にわたり疎鬆化し、燐タングステン酸に好染する特有な構造を示していた。Ruffled border に面する骨の吸収面における骨の吸収機序に関しては多くの観察がなされているが、無機質が先に吸収されると考える者^{46,47)}、有機基質が先に吸収されるとする者⁴³⁻⁴⁵⁾、および無機質、有機基質の両者が同時に吸収されると考える者⁴⁸⁾などがあり、一致した見解は得られていない。

Hancox (1961)⁴⁶⁾は破骨細胞の吸収面に遊離した骨結晶と膠原線維が認められることから、骨の吸収は無機質の吸収が先であり、次いで露出した膠原線維を破骨細胞が吸収するものと考えた。

これに対して Scott ら (1956)⁴³⁾は ruffled border 下の吸収面に遊離した骨結晶は存在するが線維様構造物は認められないという所見から、有機基質が先に消失すると考えている。

一方、Cameron (1963)⁴⁸⁾は吸収面に線維様構造

物もみられるが、表層の遊離した骨結晶様の構造は単に酸による脱灰のために除去されたとは考えにくく、無機質と有機基質の双方が同時に吸収されるのであろうと述べている。

今回の正常ラットの検索では、活発な吸収をしている破骨細胞の ruffled border 下の骨表層には遊離した骨結晶様の構造がみられるのみで、線維様構造物は認められなかった。疎鬆化していた骨の表層部は燐タングステン酸染色では濃染していたが、このような所見はこの部の有機基質の性状の変化を示唆するものと思われた。しかし遊離した骨結晶様構造物も種々の変化を示しており、無機相も何等かの変化をうけているものと思われる。このような所見は、ruffled border に面する骨の吸収面では有機基質の破壊と無機質の脱灰が、非常に微小な段階でダイナミックに行なわれていることを示唆するものと思われる。

(3) 破骨細胞の骨細胞貪食像について

光顕的にもしばしば観察された抜歯窩での破骨細胞による骨細胞の貪食像は電顕的にも確認された。

Cameron (1963)⁴⁸⁾は骨小腔から開放された骨細胞は再び骨芽細胞になり骨の形成に参加すると考えた。また Rasmussen (1974)⁷⁶⁾は骨細胞が破骨細胞になる可能性を述べている。これに対して Soskolne (1978)⁷⁷⁾は破骨細胞が骨細胞を貪食することを電顕的に観察し、破骨細胞による骨吸収が起こっている時、少なくとも一部の骨細胞は破骨細胞に貪食されると述べている。

今回の検索でも破骨細胞による骨細胞の貪食像が認められた。破骨細胞は吸収により露出した骨小腔へ突起を伸ばしかかえこむように貪食していた。組織学的・組織化学的に明らかにされたように抜歯窩周辺の骨組織は障害をうけており、電顕的にも貪食される骨細胞は変性の傾向を示していた。

抜歯創における骨吸収は、抜歯時の外科的侵襲による骨の損傷を伴うため生理的な骨の代謝過程の一環として行なわれている骨吸収とは様相を若干異にするとと思われるが、以上のような所見は破骨細胞は、障害を受けて活性が低下し変性した骨細胞を貪食し処理することを示すものと思われる。

る。

2) Osteolathyrism 群の所見について

(1) 破骨細胞の微細構造について

Osteolathyrism ラットでは対照群に比し、より多数の破骨細胞がみられたが、一般にやや小型のものが多かった。Osteolathyrism 群でも各時期において種々の破骨細胞が認められたが、対照群にみられた破骨細胞に比し ruffled border を中心として微細構造に変化がみられた。

ミトコンドリアは顕著な細胞内小器官であったが、対照群に比し、その量は少なく、形状もやや小型のものが多くみられた。粗面小胞体の一部は拡張を示し、また細胞辺縁で遊離リボゾームの多い部分では粗面小胞体はほとんど認められなかった。遊離リボゾームが密集する傾向は対照群より頻繁に認められた。比較的大型の破骨細胞でも、一部でリボゾームが集団をなし細胞質の比較的広い領域を占めている像も認められた。Golgi 装置では、Golgi 嚢の一部が拡張する傾向がみられた。これは粗面小胞体の拡張とも併せて考えると細胞の合成・分泌機能の異常を示唆する所見と考えられる。

Osteolathyrism 群での破骨細胞は骨に密着する傾向がみられた。とくに小型で吸収の活性も弱いと思える破骨細胞では、骨に面して細胞内小器官を欠く細胞質が広い範囲を占めていた。Ruffled border への移行を示す部位もみられたが、ruffled border の幅は 2μ 程と狭く、微細な陥入がみられるのみで、突起間の空隙も狭かった。比較的大型の破骨細胞でも ruffled border の発達は対照群に比べて不良であり、幅も 3μ 程度であった。対照群では ruffled border は破骨細胞の成熟度と関連していて、活発な吸収を示す大型の細胞ほど ruffled border 部の幅も広く、細胞の広い領域に分布していたが、osteolathyrism 群では ruffled border の発達は一般に不良で、細胞小器官の発達不良とも関連して破骨細胞の機能的幼若さを示しているものと思われた。Ruffled border の突起の間には正常の場合と同様、骨結晶様構造がみられたが、遊離の傾向が少なく、大きな集塊をなしている場合が多かった。細胞質中の空隙は量的には対照群より少ないが形態はむしろ大きなもの

が多く、内部の骨結晶様構造は一般に集塊状を呈していた。これは吸収される骨質の状態にも若干関連するものと思われるが、骨質の疎鬆化と骨結晶の遊離の傾向が少ないため、正常の場合の吸収とは異なり、集塊状の骨結晶様物質を食食、処理するため大きな空胞を形成したものと思われる。

(2) 骨基質の変化について

Osteolathyrism ラットでは、吸収される骨表面の構造も対照群とは異なっていた。

破骨細胞の ruffled border の下の骨質の疎鬆化の程度は軽度であり、骨結晶様構造の遊離の傾向は少なかった。骨質表層には対照群ではみられなかった無機質が分離した線維様構造も認められたが、線維の微細構造は変化しており、膠原線維に特有な横紋構造は認められなかった。また隣タングステン酸に濃染する層は ruffled border に近接し幅も狭かった。

このように osteolathyrism ラットの抜歯窩における骨の吸収機転は異常であり、吸収過程の阻害を示していた。

Schofield⁶³⁾は切歯萌出不全系ラット (ia ラット) の破骨細胞を電顕組織化学的に観察し、酸フォスファターゼのようなライソゾーム酵素は正常ラットの破骨細胞よりむしろ多量に存在するにも関わらず、ia ラットの破骨細胞には ruffled border が欠如するために、骨の吸収不全が生じると報告している。

Osteolathyrism の場合の破骨細胞は前述したように、細胞小器官と ruffled border に発達の障害がみられ、機能的に幼若な形態を示していた。特に ruffled border の変化は著しく、このような破骨細胞の構造の異常によりその機能が障害され、骨吸収の阻害が起こるものと思われる。

(3) 破骨細胞による骨細胞の食食像について

Osteolathyrism 群でも対照群と同様に破骨細胞の食食像が認められた。これは osteolathyrism の場合でも、破骨細胞は抜歯により障害を受けた骨細胞のように活性が低下し、変性した細胞を食食し得ることを示す所見と思われる。

5. 破骨細胞の起源について

破骨細胞の起源については間葉系未分化細胞が骨原性細胞に分化し、ここから更に骨芽細胞や破

骨細胞に分化すると考えている者^{49,50)}と骨芽細胞に分化する細胞と破骨細胞に分化する細胞とはそれぞれ別の経路をたどる細胞であるとする説があり、後者は更に破骨細胞の起源を同じ間葉系細胞の中でも血管周囲などの固定間葉系細胞に求める者⁵¹⁾と単球由来の単核食細胞系 (mononuclear phagocyte system) の細胞であるとする者⁵²⁻⁵⁴⁾に分かれている。それぞれについて種々の検索がなされているが、パラビオーゼラットを用いた研究などの結果⁵⁴⁾、単球由来の説をとるものが多い。単球が大食細胞を経て巨細胞になるという説は異物肉芽腫などの研究⁷⁸⁾から受け入れられるようになってきているが、破骨細胞もその系列の細胞であるかどうかについてはまだ異論も多い⁷⁹⁾。

今回の検索から直ちに破骨細胞の起源について考察を加えることは困難だが、その出現と分布が血管と密接な関係を示していたことはその由来について一つの示唆を与えるものと思われる。

6. 破骨細胞性骨吸収とそれによぼす AAN の影響について

抜歯創の治癒過程については多くの検索がなされており、抜歯後間もなく多数の破骨細胞が出現することも2, 3の研究者によって観察されているが^{34,37,41)}、抜歯創の治癒過程に関する研究は骨の新生面からの検索が主で、抜歯創の骨吸収についての検索はほとんどなされていなかった。

今回のラットを用いた実験では、正常群および osteolathyrism 群の両方で、出現の時期と数に相異はみられたが、抜歯後間もなく多数の破骨細胞が出現し、活発に骨を吸収している像が認められた。

正常ラットでは、光顕的にも電顕的にも大型のよく発達した破骨細胞が認められた。電顕的には、従来報告されている破骨細胞のそれと同様な微細構造を示し、吸収されている骨基質も他の部位における骨吸収の場合と基本的には類似の所見を示していた。

組織学および組織化学的な検索で、抜歯窩付近の骨に変性の傾向が認められ、電顕的にも破骨細胞の食食像がみられたことは、抜歯窩においては主として抜歯時の外力の侵襲により損傷された骨組織が吸収されることを示すものであり、この

ような所見は、破骨細胞による吸収過程は抜歯創の治癒に必要な過程であることを示唆するものと思われた。

一方、osteolathyrisism の場合に、創傷や骨折の治癒過程が障害されることはよく知られており、大橋ら²³⁾はラットを用いた実験で、osteolathyrisism の際、抜歯創の治癒過程も障害されることを観察している。

このような障害は主としてコラーゲンの架橋結合の障害に基づく膠原線維の形成障害によるものであり、lathyrogen は骨や軟骨等の間葉組織にかなり特異的に作用するものと考えられている。しかしながら、osteolathyrisism の場合の破骨細胞についてはほとんど検索されていない。

今回の検索の結果、osteolathyrisism の場合には正常群に比し有意に多数の破骨細胞が出現すること、および電顕的検索によりこれらの破骨細胞には ruffled border を中心にして微細構造的変化が起っていることが明らかになった。また、破骨細胞の微細構造の変化に伴う骨の吸収機構における変化も観察された。

Osteolathyrisism の場合に線維芽細胞等の基質産生細胞に変化がみられることは Krikos ら²⁰⁾も指摘しており、Amemiya²²⁾は osteolathyrisism ラットの大腿骨の過骨症部を電顕的に検索し、骨芽細胞の細胞小器官、特に粗面小胞体の発達障害を認め、基質の形成障害との関連性を示唆しているが、このような所見は、今回観察された破骨細胞の微細構造的変化と基本的には共通する所見であり、AAN の破骨細胞に対する障害作用を示唆するものと考えられる。このように osteolathyrisism ラットでは個々の破骨細胞の骨吸収機能が障害されるため、代償的に多数の破骨細胞が出現し、骨を吸収するものと思われる。

結 語

抜歯創の治癒過程の初期にみられる骨吸収の機転とその意義を明らかにし、また AAN の投与により惹起された Osteolathyrisism の場合に、破骨細胞による骨吸収がどのような影響をうけるかを明らかにする目的で、ラットを用い臼歯の抜歯創における骨の吸収過程を、組織学的、組織化学

的、組織計量学的、および電顕的に検索した。その結果を要約すると次の如くである。

1. ラット臼歯の抜歯窩においては、抜歯後 2～3 日目に多数の破骨細胞による活発な骨吸収がみられた。

2. Osteolathyrisism ラットでは破骨細胞の出現時期は早く、その数も正常ラットに比し有意に多かったが、骨の吸収量には両群の間で有意差は認められなかった。

3. 組織化学的に、抜歯窩周囲組織では、リンゴ酸脱水素酵素およびアルカリフォスファターゼの活性の低下がみられた。Osteolathyrisism 群では、この傾向は特に著明であった。

4. 正常群および osteolathyrisism 群の両者で破骨細胞による骨細胞の貪食像がみられた。

5. 正常ラットの抜歯窩に出現する破骨細胞は電顕的に、種々の发育段階を示していた。

6. 大型の破骨細胞は多数のミトコンドリアと良く発達した ruffled border を有しており、活発に骨を吸収していた。

7. Ruffled border に面する骨の吸収面は疎鬆化し、その表層には無数の遊離した微細な骨結晶様構造がみられた。骨結晶の遊離の傾向は ruffled border の発達の程度に比例していた。

8. Osteolathyrisism ラットの抜歯窩にみられる破骨細胞は正常ラットのそれに比しやや小型で電顕的には細胞小器官と ruffled border の发育障害がみられ、特に ruffled border は著しい変化を示していた。

9. Osteolathyrisism ラットでは骨質の疎鬆化と骨結晶の遊離の傾向は少なく細胞突起間および空胞内に集塊状の骨結晶様構造がみられた。

このような所見は、抜歯創における初期の骨吸収は損傷された骨組織にのみ限られ、治癒過程にとって重要な一つの過程であることを示唆するものと思われた。Osteolathyrisism ラットの破骨細胞にみられた ruffled border を中心にした发育障害と骨吸収面における異常は、破骨細胞の機能的幼若さを示唆するものであり、多数の破骨細胞の出現はそれに対する代償性反応と思われた。また今回の検索結果に基づいて破骨細胞による骨の吸収機転について若干の考察を加えた。

謝辞 : 本稿を終えるにあたり、研究に際し終始かわらぬ御指導、御鞭達、ならびに御校閲を賜りました北海道大学歯学部口腔病理学講座雨宮 璋教授に深甚なる謝意を表します。

また適切な御助言を頂きました向後隆男助教授ほか口

腔病理学教室員各位に深く感謝致します。

本論文の要旨は、第28回 IADR 日本部会総会 (1980年12月)、第23回歯科基礎医学学会総会 (1981年10月)、第3回北海道歯学会 (1981年12月) において発表した。

抄録 : 抜歯創の治癒過程の初期にみられる骨吸収の機転と意義、及び Osteolathyrism (O. L.) の場合に破骨細胞性骨吸収のうける影響を明らかにする目的で、形態学的に検索した。

抜歯後2~3日目まで多数の破骨細胞による活発な骨吸収がみられた。O. L. 群では対照群に比し有意に多数の破骨細胞が出現したが、骨の吸収量には有意差は認められなかった。組織化学的に抜歯窩周囲組織では酵素活性の低下がみられ、O. L. 群ではこの傾向が著明であった。電顕的には対照群の定型的な破骨細胞は良く発達した細胞小器官と ruffled border を有し、吸収面の骨質は疎鬆化していたが、O. L. 群の破骨細胞は ruffled border を中心に著明な変化を示し、骨質の疎鬆化の傾向は少なかった。

今回の検索結果は、初期の骨吸収は抜歯創の治癒過程にとって重要な過程であることを示唆するものであり、O. L. 群では個々の破骨細胞の機能障害を代償するために多数の破骨細胞が出現したものと思われる。

文 献

- 1) Selye, H. : Lathyrism. Rev. Can. Biol., **16** : 1-82, 1957.
- 2) Geiger, B. J., Steenbock, H. and Parsons, H. T. : Lathyrism in the rat. J. Nutrition, **6** : 427-442, 1933.
- 3) Ponseti, I. V. and Baird, W. D. : Scoliosis and dissecting aneurysm of the aorta in rats fed with lathyrus odoratus seeds. Am. J. Pathol., **28** : 1057-1077, 1952.
- 4) Bachhuber, T. E. and Lalich, J. J. : Production of dissecting aneurysms in rat fed Lathyrus odoratus. Science, **120** : 712-713, 1954.
- 5) Ponseti, I. V. and Shepard, R. S. : Lesions of the skeleton and of other mesodermal tissues in rats fed sweet-pea (lathyrus odoratus) seeds. J. Bone Joint Surg., **36A** : 1031-1058, 1954.
- 6) Lewis, H. B., Fajans, R. S., Estere, M. B., Chao-wen Shen and Oliphant, M. : The nutritive value of some legumes. Lathyrism in the rat. The sweet pea (Lathyrus odoratus), Lathyrus sativus, Lathyrus cicera and some other species of Lathyrus. J. Nutrition, **36A** : 537-559, 1948.
- 7) Robinson, J. J. and Bast, T. H. : Bone changes due to lathyrism in rats. Anat. Rec., **59** : 283-295, 1934.
- 8) Amato, V. P., Malta, S., and Bombelli, R. : Early skeletal and vascular changes in rats fed on sweet pea (Lathyrus odoratus) seeds. J. Bone Joint Surg., **41B** : 600-610, 1959.
- 9) Gardner, A. F., Basler, W. and Weinman, J. P. : Masticatory apparatus of albino rats in experimental lathyrism. J. Dent Res., **37** : 492-515, 1958.
- 10) Schilling, E. D. and Strong, F. M. : Isolation, Structure and synthesis of a lathyrus factor from L. odoratus. J. Am. Chem. Soc., **76** : 2848, 1954.
- 11) McKay, G. F., Lalich, J. J., Schilling, E. D. and Strong, F. M. : A crystalline "Lathyrus factor" from lathyrus odoratus. Arch. Biochem. Biophys., **52** : 313-322, 1954.
- 12) Wawzonek, S., Ponseti, I. V., Shepard, R. S. and Wiedenmann, L. G. : Epiphyseal plate lesions, degenerative arthritis, and dissecting aneurysm of the aorta produced by aminonitriles. Science, **121** : 63-65, 1955.
- 13) Enzinger, F. M. and Warner, E. D. : Wound healing in experimental lathyrism. Lab. Invest., **6** : 251-258, 1957.
- 14) Onoki, M., Oohashi, K., Kohgo, T. and Amemiya, A. : Effects of aminoacetonitrile on repair of experimental fracture in rats. J. Dent. Res., **58** : 1287, 1979.
- 15) Kennedy, J. S. and Kennedy, G. D. C. : Autoradiographic studies in experimental lathyrism. J. Pathol. Bact., **84** : 123-135, 1962.
- 16) Ponseti, I. V. and Aleu, F. : Fracture healing in rats treated with aminoacetonitrile. J. Bone Joint Surg., **40A** : 1093-1102, 1958.
- 17) Bornstein, P., Kang, A. H. and Piez, K. A. : The nature and location of intramolecular cross-links in collagen. Proc. Natl. Acad. Sci., **55** : 417-424, 1966.
- 18) Martin, G. R., Piez, K. A. and Lewis, M.

- S.: The incorporation of [^{14}C] glycine into the subunits of collagens from normal and lathyritic animals. *Biochem. Biophys. Acta*, **69** : 472-479, 1963.
- 19) Page, R. C. and Benditt, E. P.: A molecular defect in lathyritic collagen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **124** : 459-465, 1967.
- 20) Elders, M. J., Smith, J. D., Smith, W. G. and Hughes, E. R.: Alterations in glycosaminoglycan metabolism in β -aminopropionitrile-treated chick embryos. *Biochem J.*, **136** : 985-992, 1973.
- 21) DelBalso, A. M. and Kauffman, F. C.: The effect of β -aminopropionitrile on acid hydrolases and selected metabolites in oro-facial structures of foetal rats. *Arch. Oral Biol.*, **20** : 251-255, 1975.
- 22) Amemiya, A.: Electron microscopic study of periosteal hyperostosis in rats with lathyrism induced by aminoacetoneitrile. *Bull. Tokyo Med. Dent. Univ.*, **13** : 319-348, 1966.
- 23) 大橋勝彦, 雨宮 璋: 実験的 lathyrism における抜歯創治癒過程に関する研究 I. 病理組織学的所見について. 歯基礎誌, **14** : 404, 1972.
- 24) Barrington, E. P. and Meyer, J.: Recovery of the rat dental organ from experimental lathyrism. *J. Periodontol.*, **37** : 453-467, 1966.
- 25) Yoshikawa, K.: Histochemical and autoradiographic study of osteolathyrism in skeletal and periodontal tissues. *Acta Histochem. Cytochem.*, **4** : 11-32, 1971.
- 26) 伊藤正通: 実験的 Osteolathyrism の病理組織学的研究, とくに歯牙および支持組織に見られる変化について. 歯科学報, **66** : 115-151, 1966.
- 27) 雨宮 璋, 黒田節雄, 石木哲夫: 実験的 Osteolathyrism の病理組織学的研究—特に軟骨内仮骨の障害と回復について—. 歯基礎誌, **10** : 26, 1968.
- 28) 中村 亨: 歯根膜における不溶性コラーゲン線維の変化と線維芽細胞の lysosome 酵素活性との関係に関する組織化学的研究. 日歯周誌, **21** : 284-305, 1979.
- 29) 雨宮 璋, 小野木正章, 大橋勝彦: Osteolathyrism におけるラット下顎骨の病理学的研究—形態計量学的所見を中心に—. 歯基礎誌, **22** : 366-387, 1980.
- 30) Enzinger, F. M. and Warner, E. D.: Experimental lathyrism. Effect of aminoacetoneitrile on connective tissue formation in adult rats. *A. M. A. Arch. Path.*, **69** : 333-341, 1960.
- 31) Huebsch, R. F., Coleman, R. D., Frandsen, A. M. and Becks, H.: The healing process following molar extraction. I. Normal male rats (Long-Evans strain). *Oral Surg.*, **5** : 864-876, 1952.
- 32) 野間弘康: 抜歯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.
- 33) Pietrokovski, J. and Massler, M.: Ridge remodeling after tooth extraction in rats. *J. Dent. Res.*, **46** : 22-231, 1967.
- 34) Todo, H.: Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats. I. Initial cellular response to tooth extraction in rats studied with ^3H -thymidine. *Arch. Oral Biol.*, **13** : 1421-1427, 1968.
- 35) Todo, H.: Healing mechanism of tooth extraction wounds in rats. II. Histochemical observations on hydrolytic and oxydative enzymes in tooth extraction wounds in rat. *Arch. Oral Biol.*, **13** : 1429-1443, 1968.
- 36) Amler, M. H.: The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds. *Oral Surg.*, **27** : 309-318, 1969.
- 37) Johansen, J. R.: Repair of the post-extraction alveolus in the Wistar rat. A Histologic and autoradiographic study. *Acta Odontol. Scand.*, **28** : 441-461, 1970.
- 38) 茂木健司: 抜歯創の治癒に関するX線学的ならびに組織学的研究. 口病誌, **38** : 33-57, 1971.
- 39) 池田恒彦: ヒト抜歯創の治癒機転に関する病理組織学的ならびに組織化学的研究. 歯科学報, **71** : 1051-1071, 1971.
- 40) 大野康亮: 抜歯窩骨性治癒過程の microradiography ならびにラベリング法による研究. 歯学, **60** : 839-868, 1973.
- 41) 蒲原仁子, 須藤博子, 木原 俊, 永井 廣: ニホンザル抜歯創の治癒過程における組織学的研究 (第1報). 東北歯大誌, **5** : 48-55, 1978.
- 42) Hancox, N. M.: The osteoclast, in "The biochemistry and physiology of bone", G. H. Bourne 2nd, ed., p. 45-67, Academic Press, New York, 1972.
- 43) Scott, B. L. and Pease, D. C.: Electron microscopy of the epiphyseal apparatus. *Anat. Rec.*, **126** : 465-495, 1956.
- 44) Dudley, H. R. and Spiro, D.: The fine structure of bone cells. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11** : 627-649, 1961.
- 45) Gonzales, F. and Karnovsky, M. J.: Electron microscopy of osteoclast in healing fractures of rat bone. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9** : 299-316, 1961.
- 46) Hancox, N. M. and Boothroyd, B.: Motion picture and electron microscope studies on the embryonic avian osteoclast. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **11** : 651-661, 1961.
- 47) Neuman, W. F., Mulryan, B. J. and Martin, G. R.: A chemical view of osteoclasts based on studies with Yttrium. *Clin. Orthop.*,

- 17 : 124-134, 1960.
- 48) Cameron, D. A. : The fine structure of bone and calcified cartilage. A critical review of the contribution of electron microscopy to the understanding of osteogenesis. *Clin. Orthop.*, **26** : 199-288, 1963.
- 49) Young, R. W. : Cell proliferation and specialization during endochondral osteogenesis in young rats. *J. Cell Biol.*, **14** : 357-370, 1962.
- 50) Frost : Bone biodynamics. p. 117-139, Little, Brown & Co., Boston, 1964.
- 51) Scott, B. L. : Thymidine-³H electron microscope radioautography of osteogenic cells in the fetal rat. *J. Cell Biol.*, **35** : 115-126, 1967.
- 52) Fischman, D. A. and Hay, E. D. : Origin of osteoclasts from mononuclear leucocytes in regenerating newt limbs. *Anat. Rec.*, **143** : 329-337, 1962.
- 53) Göthlin, G. and Ericsson, J. L. E. : On the histogenesis of the cells in fracture callus. Electron microscopic autoradiographic observations in parabiotic rats and studies on labeled monocytes. *Virchows Arth. Cell Pathol.*, **12** : 318-329, 1973.
- 54) Buring, K. : On the origin of cells in heterotopic bone formation. *Clin. Orthop.*, **110** : 293-302, 1975.
- 55) 須賀昭一, 田熊庄三郎, 佐々木哲 : 歯の研究法, p. 112-115, 医歯薬出版, 東京, 1973.
- 56) Barka, T. and Anderson, P. J. : Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, **10** : 741-753, 1962.
- 57) 小川和朗, 斎藤多久馬, 平野 寛, 馬屋原宏 : 高アルカリ性 pH 領域における 諸種フォスファターゼ活性検出のためのクエン酸鉛法. 解剖誌, **42** : 40, 1967.
- 58) Saffer, J. L. and Baron, R. : A quantitative study of osteoclastic bone resorption during experimental periodontal disease in the golden hamster. *J. Periodont. Res.*, **12** : 387-394, 1977.
- 59) Handelman, G. S., Morse, A. and Irving, J. T. : The enzyme histochemistry of the osteoclasts of normal and "ia" rats. *Am. J. Anat.*, **115** : 363-376, 1964.
- 60) Lucht, U. : Acid phosphatase of osteoclasts demonstrated by electron microscopic histochemistry. *Histochemie*, **28** : 103-117, 1971.
- 61) Doty, S. B. and Schofield, B. H. : Electron microscopic localization of hydrolytic enzymes in osteoclasts. *Histochem. J.*, **4** : 245-258, 1972.
- 62) Doty, S. B. and Schofield, B. H. : Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells. *Prog. Histochem. Cytochem.*, **8** : 1-38, 1976.
- 63) Schofield, B. H., Levin, L. S. and Doty, S. B. : Ultrastructure and lysosomal histochemistry of ia rat osteoclasts. *Calc. Tiss. Res.*, **14** : 153-160, 1974.
- 64) Kroom, D. B. : Phosphatase and the formation of protein-carbohydrate complexes. *Acta Anat.*, **15** : 317-328, 1952.
- 65) Pritchard, J. J. : The osteoblast in "The biochemistry and physiology of bone", G. H. Bourne 2nd, ed., p. 21-43, Academic Press, New York, 1972.
- 66) Horn, V., Dvořák, M., Papoušek, F. and Hloušková, A. : The significance of the ultrahistochemical demonstration of phosphatases for the interpretation of the function of bone cells. *Z. Mikrosk. Anat. Forsch.*, **94** : 511-520, 1980.
- 67) Woods, J. F. and Nichols, G. : Collagenolytic activity in rat bone cells. *J. Cell Biol.*, **26** : 747-757, 1965.
- 68) Fullmer, H. M. and Lazarus, G. S. : Collagenase in bone of man. *J. Histochem. Cytochem.*, **17** : 793-798, 1969.
- 69) Walker, D. G. : Elevated bone collagenolytic activity and hyperplasia of parafollicular light cells of the thyroid gland in parathormone-treated grey-lethal mice. *Z. Zellforsch.*, **72** : 100-124, 1966.
- 70) Rifkin, B. R., Brand, J. S., Cushing, J. E., Coleman, S. J. and Sanavi, F. : Fine structure of fetal rat calvarium; provisional identification of preosteoclasts. *Calcif Tissue Int.*, **31** : 21-28, 1980.
- 71) Cameron, D. A. : The Golgi apparatus in bone and cartilage cells. *Clin. Orthop.*, **58** : 191-211, 1968.
- 72) Scott, B. L. : The occurrence of specific cytoplasmic granules in the osteoclast. *J. Ultrastruct. Res.*, **19** : 417-431, 1967.
- 73) Kallio, D. M., Garant, P. R. and Minkin, C. : Evidence of coated membranes in the ruffled border of the osteoclast. *J. Ultrastruct. Res.*, **37** : 169-177, 1971.
- 74) Lucht, U. : Cytoplasmic vacuoles and bodies of the osteoclast. *Z. Zellforsch.*, **135** : 229-244, 1972.
- 75) Greulich, R. C. : Organic mass distribution in bone matrix undergoing osteoclastic bone resorption. *Arch. Oral Biol.*, **3** : 137-142, 1961.
- 76) Rasmussen, J. and Bordier, O. : The physiological and cellular basis of metabolic bone disease. p. 48-51, The Williams and Wilkins Co., Baltimore, 1974.
- 77) Soskolne, W. A. : Phagocytosis of osteo-

- cytes by osteoclasts in femora of two week-old rabbits. *Cell Tiss. Res.*, **195** : 557-564, 1978.
- 78) Van der Rhee, H. J., van der Burgh-de Winter, C. P. M. and Deams, W. Th. : The differentiation of monocytes into macrophages, epithelioid cells, and multinucleated giant cells in subcutaneous granulomas. *Cell Tiss. Res.*, **197** : 355-378, 1979.
- 79) Shapiro, I. M., Jones, S. J., Hogg, N. M., Slusarenko, M. and Boyde, A. : Use of SEM for the study of the surface receptors of osteoclasts in situ. *Scan. Electron Microsc.*, **2** : 539-545, 1979.
- 80) Krikos, G. A. and Orbison, D. C. : Effect of beta-aminopropionitrile upon wound healing. *Arch. Path.*, **65** : 312-322, 1958.

Fig. 2 Photomicrograph of histological section used for histometry.

Fig. 3 Extraction wound of control rat (Control rat), 1 day after extraction (P. E. 1d): Blood clot and remaining periodontal ligament (arrow) are observed in socket. Interradicular alveolar bone showing compact structure. EVG $\times 50$

Fig. 4 Control rat, P. E. 1d.: Osteoclast (arrow) adjacent to blood vessel in marrow space. HE $\times 350$

Fig. 5 Control rat, P. E. 2.5d. : Production of granulation tissue in socket. Resorption of interradicular bone observed at the bottom. HE $\times 50$

Fig. 6 Control rat, P. E. 3d. : Granulation tissue replacing blood clot. Partly recognizable new bone (NB) formation. Bone resorption occurring mainly from marrow side. EVG $\times 50$

Fig. 7 Control rat, P. E. 3d. : Numerous osteoclasts are seen on bone surface. HE $\times 250$

Fig. 8 Control rat, P. E. 4d. : Granulation tissue occupying socket entirely. Marked new bone (NB) formation from the bottom. AM $\times 50$

Fig. 9 Control rat, P. E. 3d. : Numerous osteoclasts are seen on bone surface. Bone matrix contact with osteoclast stained deeply with toluidine blue. Undecalcified, Kossa-toluidine blue $\times 500$

Fig. 10 Control rat, P. E. 3d. : Cytoplasm of a osteoclast opposed to bone showing ruffled border. Vacuoles and phagocytosed osteocyte (arrow) are seen. Undecalcified, Kossa-toluidine blue $\times 1200$

Fig. 11 Osteolathyrus rat (O. L.), P. E. 1d. : Blood clot and remaining periodontal ligament (arrow) are wide spread in socket. Interradicular alveolar bone is osteoporotic. EVG $\times 50$

Fig. 12 O. L., P. E. 1d. : Numerous osteoclasts are seen on bone surface. AM $\times 500$

Fig. 13 O. L., P. E. 2.5d. : Production of granulation tissue in socket. Marked osteoclastic bone resorption and coarse bone matrix. AM $\times 50$

- Fig. 14 O. L., P. E. 2.5d. : Numerous osteoclasts with granular cytoplasm are seen on bone surface. HE $\times 500$
- Fig. 15 O. L., P. E. 2.5d. : Cytoplasm of a osteoclast containing large vacuoles and inclusion body with pyknotic nucleus. HE $\times 500$
- Fig. 16 O. L., P. E. 4d. : Granulation tissue occupying socket ; fibroblasts are less numerous than control and new bone formation is not yet recognizable. AM $\times 50$
- Fig. 17 O. L., P. E. 3d. : Osteoclast of smaller size than control one near blood vessel. Undecalcified, Kossa-toluidineblue $\times 1200$

- Fig. 20 Control rat, P. E. 2.5d.: Malate dehydrogenase (MDH). Enzymatic activity is seen in endosteal cells. Little enzymatic activity in remaining periodontal ligament. $\times 75$
- Fig. 21 Control rat, P. E. 2.5d.: MDH. A few cells showing positive enzymatic activity in the surface of alveolar bone opposed to socket. $\times 75$
- Fig. 22 Control rat, P. E. 2.5d.: Acid phosphatase. Osteoclast with highly positive enzymatic activity is seen on bone surface. $\times 300$
- Fig. 23 Control rat, P. E. 1d.: Alkaline phosphatase. Moderate activity in endosteal cells, but no enzymatic activity on alveolar bone surface opposed to socket. $\times 75$
- Fig. 24 Control rat, unextracted site: Alkaline phosphatase. Enzymatic activity is seen in fibroblasts of periodontal ligament, periodontal osteoblasts and endosteal cells. $\times 75$
- Fig. 25 O. L., immediately after extraction: MDH. Little enzymatic activity in the area opposed to socket. Moderate activity is seen in endosteal cells. $\times 75$
- Fig. 26 O. L., P. E. 2.5d.: MDH. Osteoclast with high enzymatic activity. $\times 300$
- Fig. 27 O. L., P. E. 3d.: Acid phosphatase. Cells with enzymatic activity are seen on the bone surface opposed to socket. $\times 150$

Fig. 28 Control rat : Osteoclastic cell with abundant mitochondria but without ruffled border situated near bone surface. UA & LC

Fig. 29 Control rat : Small multi-nucleated osteoclast with relatively abundant mitochondria and poorly developed ruffled border. UA & LC

Fig. 30 Control rat : Moderately developed osteoclast with abundant mitochondria and developing ruffled border. Clear zone (CZ) without organella is also observed. UA & LC

Fig. 31 Control rat : Intermediate region of ruffled border and clear zone (CZ). Bone matrix under clear zone shows little change. UA & LC

Fig. 32 Control rat: Active osteoclast with well-developed ruffled border, abundant mitochondria and intracytoplasmic vacuoles. UA & LC

Fig. 33 Control rat: A part of an osteoclast performing active resorption containing mitochondria, RER, vacuoles and dense bodies. UA & LC

Fig. 34 Control rat : A Rarge intracytoplasmic vacuole containing bone crystalline like material. UA & LC

Fig 35 Control rat : Well-developed ruffled border and underlying bone matrix. Freed bone crystalline like material and loosened bone matrix in resorbing area. LC

Fig. 36 Control rat : Bone matrix underlying well-developed ruffled border showing phosphotungstic acid (PTA) positive fibrillar structure. PTA

Fig. 37 Control rat : a) Phagocytosis of osteocyte by osteoclast.
b) Osteoclast encircling osteocyte. UA & LC

Fig. 38 O. L. : Relatively small osteoclast with undeveloped ruffled border. UA & LC

Fig. 39 O. L. : Ruffled border showing thick and short projection. Aggregated crystalline like material in vacuoles. UA & LC

Fig. 40 O. L.: Relatively large osteoclast with poorly developed ruffled border and fewer mitochondria than control. Aggregated free ribosomes (arrow). UA & LC

Fig. 41 O. L.: Narrow space between ruffled border. Aggregated crystalline like materials seen between ruffled border projections and within vacuoles. UA & LC

Fig. 42 O. L. : A part of an osteoclast. Golgi complex surrounding nucleus. Golgi saccules are partly dilated. UA & LC

Fig. 43 O. L. : Fibrillar structure under ruffled border. Freed crystalline like material also seen between projections. UA & LC

Fig. 44 O. L. : Bone matrix under irregular ruffled border showing less loose structure, and aggregating crystalline like material. LC

Fig. 45 O. L. : Narrow PTA positive layer present under ruffled border. Fibrillar structure (arrow) also seen under ruffled border. PTA