原 著

細菌成分によるラット歯槽骨の吸収について

金子 信雄 松原 潔 弓削 朝子

神奈川歯科大学口腔細菌学教室

梅津 彰 椎木 茂嗣 木本 椿作

神奈川歯科大学予防歯科学教室

渡辺 是久 井口 雅夫 片瀬 秀士

神奈川歯科大学病理学教室

〔受付 昭和59年3月9日〕

The effect on bone resorption in rats by bacterial components

Nobuo Kaneko, Kiyoshi Matsubara, Asako Yuge

Department of Oral Microbiology, Kanagawa Dental College

Akira Umezu, Shigetsugu Shiiki, Shunsaku Kimoto

Department of Preventive Dentistry, Kanagawa Dental College

Yoshihisa Watanabe, Masao Iguchi, Hideshi Katase

Department of Pathology, Kanagawa Dental College

[Accepted for publication March 3, 1984]

Key words: LPS / *Actinomyces viscosus* / bone resorption / Osteoclast

Abstract: Histopathological changes in the periodontal tissue, mainly the effect on the alveolar bone by inoculation of materials extracted from bacteria were investigated. One was LPS from gram negative bacteria (LPS, *E. coli*: W. 0111, B6; Difco). Another was from gram positive bacteria (produce of *Actinomyces viscosus*). Especially, the relationship between osteoclastic bone resorption and inflammatory change in the inoculated region was investigated. The following results were obtained.

In the group treated with four inoculations of LPS at 500 μ g, the number of osteoclasts increased markedly. In addition, wavy findings of resorption were observed in the area ranging from the dento-alveolar margin to the region on the periodontal site. But in the group treated with one or two inoculations of LPS at 500 μ g, and in the group treated with four of LPS at 5 or 50 μ g, a few osteoclasts were observed in the margin of the bone edge ranging from the region on the periodontal side to the intraradicular septum.

However, in the group treated with inoculation of materials extracted from *Actinomyces viscosus*, there was no relation between the number of Osteoclast and the inoculated volume and time. In this group, a few Osteoclasts were observed in the septum of the alveolar bone at the inoculated site. However, the majority of osteocytic osteolyses were observed in the dento-alveolar margin.

In both groups, the histological characteristics of the inflammatory changes were strong exudative mechanism with neutrophilic infiltration and abscess formation.

These results suggested that the osteoclastic bone resorption in inflamed tissue chiefly depends on the role of gram negative bacteria.

緒 言

歯周疾患においてみられる歯周組織の破壊に関与する要因の一つとして歯肉溝やポケット内の細菌が大きな役割を果たしており、細菌成分に対して起こる生体反応（補体の活性化や免疫応答）が重要視されている。とくに、グラム陰性菌の細胞壁外層膜構成成分である lipopolysaccharide（以下、LPS と略す。）と歯周疾患に伴って生ずる骨吸収との関係について強い関心がもたれている。

最近では、グラム陰性菌¹⁻⁴⁾、グラム陽性菌⁵⁻⁸⁾によって、骨吸収像を中心に歯周組織の破壊様式に相違がみられることが次第に明らかになり、Hausmann ら⁹⁾の行った plaque 中のグラム陰性菌より抽出した LPS が *in vitro* で骨吸収を惹起させるという報告以来、LPS が破骨細胞性の骨吸収に大きな役割を果たすことを示唆する報告が蓄積されてきている¹⁰⁻¹⁹⁾。

一方、グラム陽性菌については破骨細胞を伴わない歯槽骨の吸収を示唆する報告が多い^{5-8) 20)}。しかし、近年、グラム陽性菌抽出物の動物歯肉接種で破骨細胞の出現をみた実験成績もあり³¹⁾、グラム陽性菌抽出物の接種によって生ずる骨吸収が歯周組織の直接的破壊の一つであるのか、あるいは菌体成分を抗原とする免疫反応が関与する破壊であるのかについての一致した見解は得られていない。

そこで、著者らは LPS およびグラム陽性菌成分をラット上顎臼歯部歯肉に接種し、それらの歯槽骨に与える影響、とくに、骨吸収と破骨細胞の出現との相関について病理組織学的検索を中心に検討を行った。

実験材料および方法

1. 動物

動物は Wistar 系雄性ラットを使用し、あらかじめ一週間以上飼育し、充分環境に順応させ、体重が300~400g（11週令）のものを実験に供した。

2. 歯肉接種物の調製

a) LPS : *E. coli* B6 由来の LPS (Difco) を滅菌生食水に溶解して用いた。

b) *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清 : *Ac-*

tinomyces viscosus ATCC 15987株を BHI broth で24時間、嫌気培養（CO₂ 15%、H₂ 15%、N₂ 70%）し、8000×g、20分間遠心して集菌し、M/15 PBS (pH 7.2) で3回、滅菌蒸留水で3回洗浄後、菌体を凍結乾燥した。その後、滅菌生食水に懸濁し、4°C で French Press により3回（1回目 1500kg/cm²、2回目 1700kg/cm²、3回目 1800kg/cm²）菌体を破壊し、13000×g、30分間遠心し、その上清を Millipore filter (0.45μm) で濾過し、この濾液を菌破壊上清とした。なお、蛋白濃度は、Lowry 法¹⁷⁾で測定したところ、5.3 mg/ml の割合の蛋白成分が含まれており、必要な濃度に応じて滅菌生食水で希釈し使用した。

3. 歯肉内接種法

各濃度の接種物 0.05ml を右上顎唇側歯肉粘膜固有層に、48時間毎に接種した。接種にあたっては pentobarbital 25mg/kg を腹腔内投与し、麻酔下で行った。実験群は1回、2回、3回、4回接種の各4群に分け、それぞれ接種後、24時間後に屠殺、右上顎骨を剔出し病理組織学的検索に供した。

対照としては、滅菌生食水を使用して同様な処置を行った。なお、各群とも5匹以上のラットで構成した。

4. 歯周組織の病理組織学的検索

剔出した上顎骨は、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、エチレンジアミン4酢酸による中性脱灰法に準じ、1ヶ月間脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋を行った。薄切切片は上顎第1大臼歯近心側約2mm から第2大臼歯にかけて頬舌的な連続切片を作製、H-E 染色を行って観察した。破骨細胞数の計測にあたっては、第1大臼歯頬側近心根部歯槽骨を歯槽骨外側の歯槽頂から1.8mm²πの円形視野の範囲に出現する破骨細胞数を算定し、根尖部を含む切片を中心に近遠心的に10切片を測定し、その平均値を破骨細胞の出現数とした。

5. 血清抗体価の測定

Actinomyces viscosus 接種群において、屠殺直前に血液を採取し、血清分離後、スライド凝集反応によって *Actinomyces viscosus* に対する抗体価を測定した。

結 果

1. 病理組織学的所見

0.05ml の生食水を接種した対照群では、接種部位に相当する第1大臼歯頬側歯槽骨外側縁に沿って細胞成分を含有する一層の線維性骨膜が付着し、この線維性骨膜と咬筋筋層の間には軽度の浮腫性変化を伴う線維成分の増生が認められた。同歯槽骨外側縁部には破骨細胞の出現や新生骨梁の添加像は認められず、また、周囲線維性組織内に炎症細胞浸潤等の炎症変化も見られなかった。破骨細胞の測定を行った頬側近心根に接する歯根膜部の歯槽骨縁（以下、歯根膜側の骨縁）は不規則な凹凸を示していたが破骨細胞の出現は認められなかった。

i) LPS 接種による病理組織学的変化

500 μ g/0.05ml 1回接種群では、歯槽骨外側縁に沿った骨膜の構造が不明瞭となり、その周囲に線維素性浸出が認められたが、破骨細胞の出現やこれに伴う骨吸収像は認められなかった。

500 μ g/0.05ml 2回接種群では、歯槽骨外縁と

Fig. 1 In the group treated with two times of inoculation of LPS (500 μ g/0.05 ml), osteoclastic bone resorption was not observed in the dento-alveolar margin. Inflammatory cells they consist of neutrophil in the inoculated site. ($\times 25$)

Fig. 2 In the group treated with four times of inoculation of LPS (500 μ g/0.05 ml), the number of osteoclasts has increased markedly. Inflammatory cells mainly consist of neutrophil and microabscess formation in the inoculated site. ($\times 25$)

Fig. 3 In the group treated with four times of inoculation of LPS (500 μ g/0.05 ml), osteoclastic bone resorption was observed in the dento-alveolar margin. ($\times 100$)

咬筋筋層との間に著しい多核白血球浸潤、線維素性浸出をみる炎症巣が拡大し、微小膿瘍の形成も数ヶ所に認められたが破骨細胞の出現はほとんど

Fig. 4

Fig. 4, 5 In the group treated with four times of inoculations of LPS (500 $\mu\text{g}/0.05\text{ ml}$), the number of osteoclasts has increased markedly in the periodontal site. (Fig. 4 $\times 50$, Fig. 5 $\times 100$)

認められなかった (Fig. 1)。

500 $\mu\text{g}/0.05\text{ ml}$ 4回接種群では、歯槽骨外縁に沿った炎症巣はさらに拡大し、歯槽頂部におよぶ著しい多核白血球浸潤が認められた。この炎症巣は線維素性浸出はほとんど見られず、線維芽細胞による豊富な線維成分の増加をみるが、壊死傾向を伴う微小膿瘍形成が数ヶ所に見られた。歯槽頂から根尖部にかけての歯槽骨外側縁には吸収窩を伴う破骨細胞の出現が認められ (Fig. 2, 3)、また、歯槽骨骨髓に相当する部は線維性結合組織によって置換され、骨梁辺縁部に吸収窩を伴う破骨細胞の著しい増加が認められた (Fig. 4, 5)。これ

らの破骨細胞と骨梁辺縁との境界には明らかな線状構造を示す所見が多数認められた。

一方、5 $\mu\text{g}/0.05\text{ ml}$ 接種群では接種部位に相当する歯槽骨外側縁に沿ってリンパ球を主体とした炎症細胞浸潤を伴う肉芽組織の増生が認められた。この歯槽骨外側縁は不規則な凹凸を示すが、破骨細胞の出現は極めて少数で、明らかな吸収窩やその境界に線状構造は認められなかった (Fig. 6)。

Fig. 6 In the group treated with four times of inoculation of LPS (5 $\mu\text{g}/0.05\text{ ml}$), a few osteoclasts were observed in the dento-alveolar margin. Inflammatory cells they consist of neutrophils and lymphocytes in the inoculated site. ($\times 25$)

ii) *Actinomyces viscosus* 菌破壊土清接種による病理組織学的変化

250 $\mu\text{g}/0.05\text{ ml}$ 2回接種群では、接種部位に相当する歯槽骨外側縁と咬筋筋群との間に多核白血球浸潤や線維素性浸出の著しい炎症巣が拡大し、この部の歯槽骨外側は狭小化が見られた。炎症巣内には eosin に淡染し、骨細胞核の染色性を失い腐骨化した骨梁の小片がわずかに認められた。同部に残存した歯槽骨には外側縁を含め、破骨細胞の出現はほとんど認められなかった。

250 $\mu\text{g}/0.05\text{ ml}$ 4回接種群でも、同2回接種群と同様残存する狭小化した歯槽骨外側縁に沿

Fig. 7

Fig. 9

Fig. 7, 8 In the group treated with four times of inoculation of exudates of *Actinomyces viscosus* (250 μ g/0.05 ml), osteocytic osteolysis with sequester was observed in the deno-alveolar margin. (Fig. 7 $\times$ 25, Fig. 8 $\times$ 100)

Fig. 9, 10 In the group treated with four times of inoculation of exudates of *Actinomyces viscosus* (250 μ g/0.05 ml), inflammatory cells they consist of neutrophils in the inoculated site. But osteoclasts were not observed in the deno-alveolar margin. (Fig. 9 $\times$ 25, Fig. 10 $\times$ 50)

て、多核白血球やリンパ球浸潤を伴う炎症巣が慢性に認められ、この炎症巣内に腐骨化した骨小片をみる osteocytic osteolysis と思われる骨吸収像を認めた (Fig. 7, 8)。また、一部の例では LPS 4 回接種群同様、歯槽骨外側縁に沿った炎症巣内に微小膿瘍の形成を伴う著しい多核白血球浸潤や線維素性浸出が見られるが、破骨細胞性吸収像はほとんど認められなかった (Fig. 9, 10)。この所見と同様の炎症像を示す LPS 4 回接種群に比較すると明らかに破骨細胞の少ないのが特徴的であった。

一方、25 μ g/0.05ml 2 回接種群では、歯槽骨外側縁に沿った接種部位に一致して線維素性浸出と比較的軽度の多核白血球、リンパ球浸潤が認められ、この炎症巣の咬筋筋層側には肉芽組織の増生

Fig. 11 In the group treated with four times of inoculation of exudates of *Actinomyces viscosus* (250 μ g/0.05ml), osteoclastic bone resorption was not observed. However, osteocytic osteolysis was observed in the dento-alveolar margin. ($\times 50$)

Fig. 12 In the group treated with two times of inoculation of exudates of *Actinomyces viscosus* (2.5 μ g/0.05ml), osteoclastic bone resorption was not observed in the dento-allveolar margin. Fibrinous exudate and inflammatory cells consist of neutrophil and lymphocyte in the inoculated site. ($\times 50$)

が見られた。歯槽骨外側縁は細胞成分の豊富な骨膜の反応性肥厚が見られたが、この外側縁を含めて破骨細胞の出現はほとんど認められなかった。また、25 μ g/0.05ml 4回接種群では、その炎症巣内に線維成分の増加が見られ、歯槽骨外側縁には不規則な陥凹が生じ、一部の骨細胞が染色性を失った状態の骨梁が炎症巣内に残り残された状態で認められた (Fig. 11)。しかし、破骨細胞の出現は、ほとんど認められなかった。

さらに、2.5 μ g/0.05ml 2回接種群では、同部炎症巣内に線維素性浸出が認められたほか、多核白血球、リンパ球浸潤を伴う肉芽組織の増生を認めた (Fig. 12)。2.5 μ g/0.05ml 4回接種でも、軽度のリンパ球浸潤を伴う線維成分を主体とした組織が接種部位に一致して見られ、不規則な歯槽骨外側縁に沿って、この線維性組織内に突出した骨梁の残存が見られたが、破骨細胞の出現はほとんど認められなかった。

2. LPS 接種による破骨細胞数の推移

生食水0.05ml を48時間毎に1回、2回、4回と接種回数を増加しても、破骨細胞数の変化は認められなかった。

これに対し、LPS 500 μ g/0.05ml 接種群では、接種回数を増加するに従い破骨細胞の出現数も増加した。LPS 500 μ g/0.05ml 1回接種では、生食水1回接種と有意な差は認められなかったが、2

Fig. 13 Effect of LPS inoculation time on appearance of Osteoclasts. Each column represents the mean and the error bar ± 1 SEM.

Fig. 14 Dose-response effect of LPS on the appearance of Osteoclasts. Each column represents the mean and the error bar ± 1 SEM.

回接種では有意な増加 ($P<0.01$) がみられ、4回接種では著しい破骨細胞出現数の増加 ($P<0.001$) を示した (Fig. 13)。

次いで、LPS の用量と破骨細胞の出現数の関連性を検討するため、LPS 4回接種群における各濃度別の破骨細胞出現数を検索した結果、5 μ g では生食水接種群と比較して有意な増加はみられないが、50 μ g では有意な増加 ($P<0.01$) が認められるようになり、500 μ g では著しい増加を示

し、LPS の用量に依存して破骨細胞が増加した (Fig. 14)。

3. *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清接種による破骨細胞数の推移

菌破壊上清250 μ g/0.05ml 1回接種群の破骨細胞出現数の平均値は0.37、2回接種群は0.67、3回接種群は0.50と3回接種群までは接種回数に伴う破骨細胞の増加は全く認められず、生食水接種 (対照) 群との差も認められなかった。また、4回接種群においても、破骨細胞数は2.45とLPS接種群 (Fig. 13) に比較して、破骨細胞数は明らかに少なかった (Table 1)。

次に、LPS の場合と同様、2.5 μ g、25 μ g および250 μ g 濃度の菌破壊上清をそれぞれ4回接種した場合における破骨細胞出現数を検索した結果、菌破壊上清2.5 μ g では0.67 (破骨細胞出現数の平均値)、25 μ g では0.32そして、250 μ g では2.45と菌破壊上清の用量と破骨細胞出現数に顕著な相関性は認められなかった (Table 2)。

4. *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清接種に伴う抗体価の変動

Actinomyces viscosus 菌破壊上清接種による抗体価の測定では、接種回数1回から3回までの間、初回接種後6日まで2.5 μ g、25 μ g、250 μ g 接種群ともに全例 (各群6匹) に抗体価の上昇は全く認められなかった。しかし、4回接種群すな

Table 1 Effect of material inoculation time extracted from *Actinomyces viscosus* on appearance of Osteoclasts

Material	Inoculation time			
	1	2	3	4
Extract of <i>Actinomyces viscosus</i> (250 μ g)	0.37 $\pm$ 0.12*	0.67 $\pm$ 0.09	0.50 $\pm$ 0.14	2.45 $\pm$ 0.50
Saline	0.34 $\pm$ 0.10	0.50 $\pm$ 0.13	0.48 $\pm$ 0.16	0.42 $\pm$ 0.10

* Mean $\pm$ S. E.

Table 2 Dose-response effect of material extracted from *Actinomyces viscosus* on appearance of Osteoclasts

	Saline	Extract of <i>Actinomyces viscosus</i>		
		2.5 μ g	25 μ g	250 μ g
The number of Osteoclasts	0.42 $\pm$ 0.10*	0.67 $\pm$ 0.12	0.32 $\pm$ 0.90	2.45 $\pm$ 0.50

* Mean $\pm$ S. E.

Table 3 Serum antibody titres to *Actinomyces viscosus*

Inoculation time	soluble antigen (protein concentration)			
	0 (saline)	2.5 μ g	25 μ g	250 μ g
1	<1	<1	<1	<1
2	<1	<1	<1	<1
3	<1	<1	<1	<1
4	<1	<1	4	16
		<1	8	16
		<1	8	32
		4	16	32
		8	32	32
		16	64	64

わち、初回接種後8日を経過すると各群共、抗体価の上昇が軽度に認められるようになり、その抗体価レベルも菌破壊上清接種濃度に依存して上昇する傾向を示した (Table 3)。

考 察

実験的歯周疾患において、*Actinomyces viscosus* をはじめとしたグラム陽性菌の接種に伴って生ずる骨吸収において破骨細胞の出現を報告しているものは数少ない^{5-8, 20)}。一方、グラム陰性桿菌を無菌ラットに接種した場合に認められる骨吸収においては、多数の破骨細胞が出現するという報告、また、LPS によって生ずる骨吸収において直接的、あるいは、歯肉炎症組織から遊離する mediator を介して破骨細胞が活性化するという Hausmann ら⁹⁾の報告がある。さらに、LPS による骨吸収に破骨細胞が関与していることを支持する報告も多数ある¹⁰⁻¹⁹⁾。しかし、*Fusobacterium nucleatum* より分離した LPS のラット口蓋歯槽粘膜下への接種や *E. coli* 0111 B₄ 由来 LPS (Difco) のラット歯肉への接種による *in vivo* での骨組織の変化を検索した結果、破骨細胞による窩状吸収像を認めなかった報告^{22, 23)}もある。また、ヒトの場合でも生理的近心移動を含めた圧迫歯根膜側の歯槽壁面にみられる吸収窩を伴う破骨細胞の出現や新生された歯槽骨の内部性改造部位にみられる破骨細胞性骨吸収像、咬合機能中絶に伴う歯槽骨の廃用性萎縮の際、骨髓腔内壁に出現する破骨細胞、さらには根尖膿瘍に接する歯槽骨面に多数出現する破骨細胞、顎骨内あるいは歯槽

骨近傍に発生した腫瘍や転移性悪性腫瘍の増殖の際に生ずる破骨細胞性骨吸収像等、生理的にも種々の病的状態においても破骨細胞を伴う骨吸収は認められる²⁴⁾。このように、ある特定の原因や物質によって破骨細胞性骨吸収が惹起されるものではないという研究者も病理学者を中心に多い。

そこで、著者らは単に非特異的な炎症によって破骨細胞が誘導されるのかについて検討するために、LPS と *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清をラット歯肉に接種した。その際、両接種群の歯槽骨周辺 (接種部位) に生ずる炎症像の相違、あるいは炎症の程度の差異と破骨細胞の出現数との関連性を連続切片を用いて検索した。また、*Actinomyces viscosus* 菌破壊上清接種群については、1回、2回、3回、および4回接種群、各濃度別に抗体価を測定し、抗体産生に基づく免疫反応の関与についても検討を加えた。

E. coli 由来およびその他の LPS 接種による *in vivo* での歯槽骨吸収実験ではそれぞれ実験において種々の濃度の LPS が用いられており、また、その接種回数も異っている。従ってこれらの実験においてみられる破骨細胞の出現数、あるいは破骨細胞による窩状吸収像の程度の差異はそれらの条件の相違に基づくものと推察される。著者らの500 μ g/0.05mlの接種実験でも1回および2回接種群ではいずれも破骨細胞の出現は極めて少数であった。とくに2回接種群では4回接種群に比較して歯槽骨外縁に沿った炎症巣が小範囲に止るものの、その炎症像は著しい多核白血球浸潤や微小膿瘍の形成がみられ、基本的に4回接種群と

その炎症所見に差が認められないにもかかわらず破骨細胞による窩状吸収像はみられなかった。この事実は、破骨細胞の出現が単に種々の刺激によって生ずる炎症の結果として出現するだけではなく、LPSの影響に基づくものと推察される。また、明らかに有意の差をもって破骨細胞の増加が認められた4回接種群でもその濃度に相関して増加し、LPSによる破骨細胞の動員、あるいはその活性化は一過性に吸収消失しないで局所に残存するLPSの濃度とそれらによる継続的な刺激が必要と考えられる。すなわち、そのような状態で認められる破骨細胞の出現は、一定の濃度でLPSを作用させることができる *in vitro* での実験結果にみられる破骨細胞の活性化と同様の変化が現われたものと解釈できる。しかし、LPSはグラム陰性菌全部にわたってほぼ共通の基本的構造と共通の生物活性をもっているものの、菌種、抽出方法によっていろいろな分子構成の形のLPSが得られ、化学組成にも生物活性にも非常に大きな差がある。例えば、ヒト歯周炎の病巣局所より分離される *Bacteroides gingivalis* のLPSの生物活性は *E. coli* のそれに比べ非常に低いものの、骨吸収を起こす活性だけは低くない¹¹⁾。それに対し、*Fusobacterium nucleatum* のLPSは強い発熱性、シュワルツマン反応惹起能などの生物活性を有する^{25, 26)}が、骨吸収を起こす活性はそれほど強くない。また、*Capnocytophaga* のLPS活性は、著明に低い²⁷⁾。このように、歯周疾患患者より分離されるグラム陰性菌すべてのLPSが破骨細胞性骨吸収に関与しているとはかぎらない。したがって、口腔内常在菌のLPSについても検討を加える必要性がある。

一方、*Actinomyces viscosus* の菌破壊上清の接種においては濃度差、および接種回数と破骨細胞の増加との間に著しい相関は認められなかった。接種部位に相当する歯槽骨外側縁に沿った炎症巣も2回接種群、4回接種群ともに著しい多核白血球浸潤と線維素性浸出を主体とした急性化膿性炎の所見を呈し、LPS接種群と同様の炎症性変化を呈した。歯槽骨もその外側の狭小化をみるものの破骨細胞による波状吸収像はほとんど認められ

ず、炎症巣に接した骨梁は染色性の低下、不規則な陥凹さらには骨細胞の染色性を失った腐骨形成等、Belangerの報告している²⁸⁾ osteocytic osteolysis 様の吸収像を示した。これらの所見は破骨細胞を伴うLPS接種群の骨吸収像とは明らかに異なるものと考えられる。さらに、今回の実験ではLPS接種群においても、*Actinomyces viscosus* 菌破壊上清接種群においても病理組織学的な炎症病態に差は認められず、炎症の程度やその時期的な相違によって生じた骨吸収パターンの違いではないことが十分に推察された。また、*Actinomyces viscosus* 菌破壊上清接種群における経時的な抗体の消長を調べた結果、3回目接種までは抗体価の上昇がみとめられなく、4回目接種後すなわち初回から7日を経て抗体価の上昇がみられた。したがって、*Actinomyces viscosus* 菌破壊上清による歯周組織の炎症は、特異的な免疫反応の関与は考えにくく、菌破壊上清の直接的組織傷害によるものと思われる。

そして、破骨細胞の出現数は菌破壊上清1回、2回、3回接種した場合、生食水接種の場合とほとんど差が認められないが、4回接種では、破骨細胞数が増加した。これは、抗体の上昇に伴う免疫複合体による補体の活性などの免疫反応が破骨細胞の誘導に関与している可能性が考えられる。

最近では、今回の実験で認められた様なLPSによる破骨細胞性骨吸収が一連の炎症反応の過程で局所に浸潤するmacrophageに由来するProstaglandin Eやリンパ球より分泌されるlymphokinの一種である破骨細胞活性化因子(Osteoclast activating factor)によって誘起されることが報告されている。しかし、本実験ではLPS接種群の炎症巣の組織学的所見からはこれを肯定あるいは否定する積極的証拠は掴みがたいが、LPSが特異的に破骨細胞を動員活性化させる作用を有することを否定することはできない。

現在、破骨細胞の起源については、骨芽細胞、顆粒球系細胞、マクロファージ等種々の細胞の癒合が考えられている²⁹⁾。とくに、骨芽細胞を基にして、顆粒球系細胞の癒合による破骨細胞の形成過程については、花岡²⁹⁾による詳細な電顕的検討が加えられている。本実験では、LPS 4回接種で

線維成分の増加した歯槽骨骨髓腔に一致して、その骨梁辺縁に多数の破骨細胞の出現をみた。しかし、光顕的検索で破骨細胞の形成過程を明らかにすることは困難であり、LPS および *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清いずれの接種群でも、とくに骨芽細胞の増加を特徴的に認めることはなく、LPS で誘導される破骨細胞形成において、骨芽細胞、あるいはその他の細胞各々の関与を明らかにすることはできなかった。今後の検討が必要と考えられる。

結 論

LPS (*E. coli* : W. 0111, B6 ; Difco) およびグラム陽性菌である *Actinomyces viscosus* 菌破壊上清のラット上顎臼歯部頰側歯肉粘膜下への接種が歯槽骨に与える影響、とくに骨吸収と破骨細胞の相関について病理組織学的に検索した。

その結果、LPS を直接歯槽骨近傍へ接種することによって破骨細胞性骨吸収が惹起され、その場

合出現してくる破骨細胞の数は LPS の接種量、接種回数にしたがって増加した。一方、*Actinomyces viscosus* 菌破壊上清の接種では腐骨形成を伴う骨融解像は認められたものの破骨細胞性骨吸収は惹起し得ず、また、その接種量、接種回数の増加による破骨細胞数の変動はほとんど認められなかった。しかし、両接種群共に接種部位に相当する炎症巣は高度の多核白血球浸潤と線維素性浸出を主体とした炎症像を呈し、接種量、接種回数に相関してその程度は高度となった。

以上の結果から、破骨細胞の誘導が単に炎症の増悪によって生ずるものではなく、LPS の直接的な作用による可能性が強く示唆された。

本論文の要旨は、第25回歯科基礎医学会総会(1983年)において発表した。また、本研究は昭和58年度文部省科学研究費補助金(奨励研究A)によるものである。

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました神奈川歯科大学病理学教室久田太郎教授に深謝致します。

抄録：ラット上顎右側頰側臼歯部歯肉粘膜下に LPS (*E. coli*, B6, Difco) および *Actinomyces viscosus* 菌破壊液を接種し、病理組織学的に検索した結果、LPS の直接歯槽骨近傍への接種によって破骨細胞性骨吸収が惹起され、また、破骨細胞数は LPS の接種量、接種回数にしたがって増加した。一方、*Actinomyces viscosus* 菌破壊液の接種では腐骨形成を伴う骨融解像は認められたものの破骨細胞性骨吸収は惹起し得ず、また、その接種量、接種回数の増加による破骨細胞数の変動はほとんど認められなかった。しかし、両接種群共に接種部位に相当する炎症巣は高度の多核白血球浸潤と線維素性浸出を主体とした炎症像を呈し、接種量、接種回数に相関してその程度は高度となった。

以上の結果より、破骨細胞の誘導が単に炎症の増悪によって生ずるものではなく、LPS の直接的な作用による可能性が強く示唆された。

文 献

- 1) Crawford, A. et al.: Pathogenicity testing of oral isolates in gnotobiotic rats. J. Dent. Res., 56 : B275, 1977.
- 2) Irving, J. T. et al.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with gram-negative organisms. J. Periodontal Res., 13 : 326-332, 1978.
- 3) Listgarten, M. A. et al.: Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. J. Periodontal Res., 13 : 134-148, 1978.
- 4) Irving, J. T. et al.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with a gram-negative organism. Arch. Oral Biol., 20 : 219-220, 1975.
- 5) Jordan, H. V. et al.: Periodontal lesions in hamsters and gnotobiotic rats infected with *actinomyces* of human origin. J. Periodontal Res., 7 : 21-28, 1972.
- 6) Irving, J. T. et al.: Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. J. Periodontal Res., 9 : 73-80, 1974.
- 7) Socransky, S. S. et al.: Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. Arch. Oral Biol., 15 : 993-996, 1970.
- 8) Gibbons, R. T. et al.: Dental caries and

- alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming streptococci of human origin. Arch. Oral Biol., 19 : 549-560, 1966.
- 9) Hausmann, E. et al.: Endotoxin: stimulation of bone resorption in tissue culture. Science, 168 : 862-864, 1972.
- 10) Rowe, D., Hausmann, E.: Quantitative and qualitative analyses of osteoclast changes in endotoxin treated bone. J. Dent. Res., 54, Special Issue A. Abstract 416, 1975.
- 11) Hausmann, E. et al.: Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture. Calcif. Tiss. Res., 9 : 272-282, 1972.
- 12) Hausmann, E.: Potential pathways for bone resorption in human periodontal disease. J. Periodontol., 45 : 338-348, 1974.
- 13) Hausmann, E. et al.: Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. J. DENT. RES., 54 Special Issue, B : 94-99, 1975.
- 14) Hausmann, E., Weinfeld, N.: Human dental plaque: stimulation of bone resorption in tissue culture. Arch. Oral Biol., 18 : 1509-1515, 1973.
- 15) Hausmann, E. et al.: Lipopolysaccharides-diphosphonate interactions on bone in tissue culture. Arch. Oral. Biol., 17 : 1381-1389, 1972.
- 16) 内田武志, 白根 忠, 穴村純一, 中西恵治, 岡本 莫: 内毒素の歯周組織に対する *in vivo* での作用. 日歯周誌. 22 : 18-89, 1979.
- 17) 梅津 彰: LPS による実験的歯周疾患の基礎的研究 (1) 実験モデルの作製およびその形態的变化. 神奈川歯学. 18 : 45-53, 1983.
- 18) 渡辺是久, 小園 知, 清水洋子: 歯周疾患における歯肉炎症の病理, 歯科ジャーナル 17 : 7-16, 1983.
- 19) 清水洋子: LPS 接種による Rat 歯周組織の変化についての実験病理学的研究, 特に歯槽骨吸収に与える Heparin の影響について. 神奈川歯学 18 : 149-172, 1983.
- 20) Irving, J. T. et al.: Pathological changes caused by the injection of lipids isolated from gram-positive organisms into the gingiva of rats. J. Periodontal Res., 14 : 160-166, 1979.
- 21) 竹内 宏, 堀 泰典, 金久純也, 谷 明, 橋本政明, 佐川寛典: 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究, 第5報その (4) Actinomyces 抽出物接種による歯周組織の傷害性. 歯基礎誌, 25 : 31-36, 1983.
- 22) 白石悦郎, 内山長司: 内毒素の歯肉内接種時における生体反応に関する研究, 1報 *E. coli* の内毒素について. 九州歯会誌 31 : 401-441, 1978.
- 23) 金久純也, 堀 泰典, 竹内 宏, 谷 明, 佐川寛典: 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究, 第4報その (2) endotoxin 接種によるラット骨組織の反応. 歯基礎誌, 24 : 738-745, 1982.
- 24) 秋吉正豊: 歯槽骨の吸収の病理, 歯界展望46 : 717-728, 1975.
- 25) Mergenhagen, S. E., Hampp, E. G. and Scherp, H.: Preparation of biological activities of endotoxins from oral bacteria. J. Infect. Dis., 108 : 304-310, 1961.
- 26) Sveen, K.: The capacity of lipopolysaccharides from bactroides, fusobacterium and veillonella to produce skin inflammation and the local and generalized Schwartzman reaction in rabbits. J. Periodontal Res. 12 : 340-350, 1977.
- 27) Stevens, R. H., Sale, M. N., McArthur, W. P., Nowotny, A. and Hammond, B. F.: Biological and chemical characterization of endotoxin from Capnocytophaga sputigena. Infect. Immun., 27 : 246-254, 1980.
- 28) Belanger, L. F.: Osteocytic osteolysis. Calc. Tiss. Res. 4 : 1-12, 1969.
- 29) 花岡英弥: 破骨細胞の起源に関する考察の問題点, 骨代謝 11 : 270-274, 1978.