マウス腹腔マクロファージに及ぼす ホルマリンクレゾールの影響

黒木 賀代子 内山 長司*

大住 伴子 村上 雄次

九州歯科大学歯科薬物学講座 (主任: 吉村泰治教授)

* 九州歯科大学口腔細菌学講座 (主任: 内山長司教授)

[昭和61年8月8日受付]

Effect of formalin-cresol on mouse peritoneal macrophages

Kayoko Kuroki, *Choji Uchiyama, Tomoko Ohsumi
and Yuji Murakami

Department of Dental Pharmacology
(Chief: Prof. Taiji Yoshimura)

* Department of Oral Bacteriology
(Chief: Prof. Choji Uchiyama)

Kyushu Dental College, 2-6-1 Manazuru,
Kokurakita-ku, Kitakyushu, 803

[Accepted for publication: August 8, 1986]

Key words: Mouse peritoneal macrophage / peptone / LPS / formalin-cresol / morphological change

Abstract: When mouse peritoneal macrophages induced by pepton (P-M) and those by lipopolysaccharide (L-M) are cultivated *in vitro*, both P-M and L-M are classified into three cell types: rounded cells (type A), short spindle-like cells (type B) and long spindle-like or spreading cells (type C). The P-M and L-M cells were exposed to formalin-cresol (FC), a mixture containing the same quantity each of formalin and cresol, in the concentrations of 5 to 1000 $\mu\text{g/ml}$ for 5 to 30 minutes. The effect of FC were observed morphologically, and a comparison was also made between P-M and L-M and among types A, B and C. Both P-M and L-M were nearly intact in the concentration of 5 $\mu\text{g/ml}$ of FC, suffered deformation of cell shrinkage in a concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$, and kept a less-changed form and nearly fixed in 100 $\mu\text{g/ml}$. L-M was changed to a lesser extent than P-M by 10 $\mu\text{g/ml}$ of FC. Cells of type C showed a tendency to decrease and those of type A to increase with FC. Continuous observation under a phase contrast microscope made it clear that the response to FC of the type C cell was the most sensitive of the three types. Under the scanning electron microscope, frill-like ruffles were observed in type A and foam-like surface protrusions of various sizes in types B and C cells when the P-M were exposed to FC in 10 $\mu\text{g/ml}$. These results indicate (1) that the mechanism of the effect on the macrophages of FC at 10 $\mu\text{g/ml}$ is different from that at and over 100 $\mu\text{g/ml}$, (2) that L-M showed a higher tolerance for FC than P-M at concentrations of 100 $\mu\text{g/ml}$ and below, and (3) morphological degeneration affected types C, B and A in descending order.

緒 言

ホルマリン・クレゾール製剤 (FC) は、感染根管の消毒薬として、又、歯髄切断法における組織固定剤として重要な 歯科専用薬剤である。その配合成分であるホルマリンとクレゾールは、いずれも蛋白質に対して強い反応性を有し、本製剤は生体組織に対する為害作用が大であるが、歯牙根管という特殊な応用部位では、適切に使用すれば優れた治療効果をもたらすと言われている¹⁻³⁾。FC の薬効をより確実なものにするために、その薬理作用には強い関心が持たれ、古くから実験病理学的研究^{4,5)}、臨床病理学的研究^{6,7)}、並びに殺菌消毒力に関する研究⁸⁻¹⁰⁾が数多く行われてきた。最近では特にその毒性や副作用に関連して、局所刺激性¹⁰⁻¹³⁾や細胞毒性¹⁴⁾についても検討されるようになった。又、免疫学的見地からその副作用を解明しようとする試みもあり¹⁵⁻¹⁷⁾、FC の薬理作用に関する研究はますます多面化している。

言うまでもなく、FC は感染歯髄の慢性経過に伴う根尖部歯周組織の軽度の炎症症例などに応用されている。この際の FC に対する生体防衛反応には、炎症に伴う浸出性細胞と免疫担当細胞及び体性因子が関与し、これらの生体反応因子と FC との関係に検討すべき諸問題が残されている。即ち、本製剤の薬理はこのような条件下にある病態生理との関わりにおいて検討されなければならないと思われる。

生体防御機構の中で異物処理細胞及び免疫担当細胞として、重要な役割を担うものにマクロファージがある。このマクロファージは多彩な生物学的性状を有することから、本研究では、ペプトン又は内毒素で誘導したマウス腹腔マクロファージを *in vitro* で培養し、その形態に及ぼす FC の影響について、染色標本の観察、同一視野における位相差像の経時的変化の観察、走査型電子顕微鏡による細胞表面構造の観察など、形態観察を主体とした実験を行ない、培養細胞に及ぼす FC の影響¹⁴⁾と比較するとともに、ペプトン誘導マクロファージ (P-M) と LPS 誘導マクロファージ (L-M) との比較を行った。その結果、二三、興味ある知見が得られたので報告する。

材料ならびに方法

I. 材料

A. 動物

実験には体重約30g の ICR 系雄性マウスを使用した。

B. マクロファージの誘導物質

1) ペプトン

10% Proteose pepton (Difco) を滅菌して、その0.2ml を腹腔内に注射した。

2) 内毒素

Escherichia coli 0111 ; B 4 より抽出した Lipopolysaccharide (LPS, Difco) を滅菌生理食塩液で 5 µg/ml の濃度に調製し、その0.2ml を、2 日間隔で 3 回腹腔内に注射した。

C. 供試薬剤

実験の材料とした FC は、ホルマリン・クレゾール製剤のうち最も基本的な処方である、ホルマリンとクレゾールの等量混合物で、用時調製の新鮮なものをを用いた^{2,3)}。

II. 方法

A. 腹腔マクロファージの誘導並びに分離法

マクロファージの誘導には、ペプトン又は LPS を上記 I-B の用量でマウス腹腔に注射し、ペプトンの場合は 3 日後、内毒素の場合は最終回投与日より 3 日後に屠殺した。

マクロファージの採取は、登根¹⁸⁾の方法に従った。予めプラスチック培養皿 (Falcon) にカバーグラスを敷き、その上にマクロファージの浮遊液を 2 ml ずつ分注した。これを冷室に 30 分間静置した後、PBS で 3 回洗うことによって非付着細胞を除去して得られた付着細胞をマクロファージとして実験に供した。

B. 培養マクロファージに対する FC の適用

分離したマクロファージは炭酸ガス培養器 (5 % CO₂ in air, 37°C) で 3 時間培養した後、FC を適用した。

FC をマクロファージに適用するには、マクロファージの培養液を実験濃度の FC を添加した培養液に交換し、引続き所定の適用時間培養を行った。対照群は FC を加えない培養液に交換し、FC 適用群と同様に培養した。

C. マクロファージの形態的分類

本実験では、培養マクロファージを付着状態や伸展の形状によって次の3種類に分類した¹⁸⁻²⁰⁾。

1) 小円形を呈し、形質の伸展がほとんど認められないものをAタイプとした。

2) 紡錘形を呈し、核の前後方向に形質が伸展しているが、そのサイズがAタイプの2倍程度に留まるものをBタイプとした。

3) 円形または不定形に広く伸展しているもの、あるいは紡錘形であっても先端部が扇状に広がっているもの、および細胞質突起の著しく長いものをCタイプとした。

D. 染色標本の作製

カバーガラスに付着した細胞をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS) で洗い、2.5% グルタルアルデヒドで20分間固定し、ギムザ染色を施した。

E. 位相差顕微鏡による観察

位相差顕微鏡 (IMT 413, オリジナル) を用いて200倍で観察した。

F. 走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察

電子顕微鏡用試料の作製は、FC 適用後、細胞の付着したカバーガラスを0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で洗い、2.5% グルタルアルデヒド液、1% オスミウム酸で各1時間固定した。脱水、臨界点乾燥、コーティングは常法に従って行い、走査型電子顕微鏡 (JSM-25, JEOL) を用いて加速電圧20kV、直接倍率3000~7000倍で観察した。

結 果

I. 染色標本による形態観察

P-M および L-M に対して、培養液中の FC の濃度を、5, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ の3段階とし、適用時間をそれぞれ、5, 10, 20, 30分間とした場合について、ギムザ染色標本作製し、細胞形態の変化を観察した結果は次の通りである。各染色標本で、光顕下10視野におけるマクロファージを前記II-Cの3種類に分類してタイプ別に細胞数を算定し、FCの濃度と適用時間による3タイプの比率の変動を Fig. 1, 2 に示した。

A. P-M

FC 濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ の場合、5分間適用群は対照

Fig. 1 Proportion of three types of macrophages exposed to FC after induction by pepton. The cells stained with Giemsa were observed microscopically and classified according to their types.

Fig. 2 Proportion of three types of macrophages exposed to FC after induction by LPS. The cells stained with Giemsa were observed microscopically and classified according to their types.

群 (Fig. 3, a) と殆ど変わらなかった。10分間適用群は殊にCタイプの核が膨化し、細胞質との境界が鮮明となり、20分間適用群では細胞質の縮小も現われ始めた (Fig. 3, b)。30分間適用群では、核の濃染、縮小並びに細胞質の強い萎縮が見られた。

Fig. 3 Micrographs of peptone-induced macrophages exposed to FC and dyed with Giemsa stain. a: Control b: 5 $\mu\text{g/ml}$, 20min. c: 10 $\mu\text{g/ml}$, 20min. d: 100 $\mu\text{g/ml}$, 20min.

FC 濃度が高くなると上記の変化はより急激に進行した。10 $\mu\text{g/ml}$ の20分間及び30分間適用群は核の膨化とともに細胞質の縮小が著しく (Fig. 3, c), 100 $\mu\text{g/ml}$ の20分間及び30分間適用群では、細胞質も核も縮小、濃染し、さらに、核の亀裂や分割の認められる細胞が多くなった。又、細胞によっては、辺縁部に細長い突起が観察された (Fig. 3, d)。

次に、P-M のタイプ別細胞数の割合は Fig. 1 に示すように、FC 適用直前には、A 30%, B 26%, C 44%であり、対照群ではその後30分間に僅かではあるが、Aタイプが減少し、B, Cタイプが増加する傾向が見られた。

FC 濃度を5 $\mu\text{g/ml}$ とした場合、5~20分間適用群は対照と殆ど差異は認められないが、30分間適用群ではCタイプの減少とAタイプの増加が認められた。このような変化は10, 100 $\mu\text{g/ml}$ の場合には20分間適用群でも見られ、濃度が高いほど顕著となった。

B. L-M

対照群はCタイプが多く、しかもその核の周囲に空胞状の不染色部分が多数認められた (Fig. 4, a)。

FC 5 $\mu\text{g/ml}$ では5, 10, 20分間適用群は一部

の細胞に僅かに萎縮が認められ、30分間適用群では特にCタイプで細胞質の縮小と核の膨化が認められた。10, 100 $\mu\text{g/ml}$ も20分間以下の適用では形態変化は比較的軽度であった (Fig. 4, b)。10 $\mu\text{g/ml}$ は30分間適用群で多くの細胞で核の膨化が顕著となり、細胞質の萎縮が認められたが、殆ど変化を示さない細胞もかなり認められた (Fig. 4, c)。100 $\mu\text{g/ml}$ の30分間適用群では核の濃染、亀裂、分断が認められ、細胞質は著しく萎縮し、辺縁部に細長い突起を生じたが、P-M に比べると細胞質の損傷は少なかった (Fig. 4, d)。

次にL-M のタイプ別細胞数の割合は Fig. 2 に示すように、FC 適用直前には、A 25%, B 15%, C 60%であった。いずれの濃度でも30分間適用群ではAタイプの増加とCタイプの減少が著明となったが、20分間以下ではFCの適用による変動は比較的少なかった。

II. 位相差顕微鏡による形態観察

まず、位相差顕微鏡下で、P-M または L-M に、濃度5, 10, 100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ のFC含有培養液を適用し、その直後より30分間に亘り、同一視野で形態変化を観察した結果と、次に、30分間のFC適用を終えたマイクロファージを、直ちにPBSで洗って新しい培養液に移し、24時間培養

Fig. 4 Micrographs of LPS-induced macrophages exposed to FC and dyed with Giemsa stain. a : Control b : 10 μ g/ml, 20min. c : 10 μ g/ml, 30min. d : 100 μ g/ml, 30min.

を行った時点で再び観察を行った結果は次の通りであった。

A. FC 含有培養液における P-M の経時的形態変化

FC 濃度 5 μ g/ml の場合、B, C タイプの一部は、15分後より細胞質が徐々に萎縮した。A タイプには殆ど変化が認められなかった。

FC 濃度 10 μ g/ml では、A タイプは、その多くが数10秒～数分後に剝離、浮遊し、視野から消失したが、中には30分後も殆ど変化を示さない細胞もあった。B タイプにも1分後より徐々に萎縮し始め、20分後までにほぼ完全な球状となった細胞と、30分後も殆ど変化を示さない細胞とがあり、後者は細胞表面に水泡状のものを生じた。C タイプの多くは、形質が急激に収縮し、30分後までにほぼ完全な球状となった。しかし、C タイプの中でも殊に細胞質の広い細胞は変化が少なかった (Fig. 5)。

FC 濃度 100 μ g/ml では、いずれのタイプも1分後より細胞の萎縮が起こったが、著しい球状化には至らず、剝離、浮遊する細胞も認められなかった。中には殆ど変化せず、固定されたように見える細胞もあった。

FC 濃度 1000 μ g/ml では、適用後数分間、細胞

質突起が萎縮あるいは屈曲するのが認められたが、間もなく全細胞は固定されたようになり、殆ど変化は認められなくなった。

B. FC 含有培養液における L-M の経時的形態変化

L-M では殊に C タイプの細胞が多く、B, C タイプでは核の周囲に大小の空胞状のものが認められた。

これに 5 μ g/ml の FC 含有培養液を与えると、C タイプで僅かに細胞質が萎縮したが、A, B タイプには殆ど変化が見られなかった。

FC 濃度 10 μ g/ml ではいずれのタイプもやや萎縮したが、30分後においても著しい球状化には至らなかった。FC 濃度 100 μ g/ml では、10 μ g/ml の場合と同様であるが、細胞の萎縮や球状化がやや強く現れた。20分後になると、細胞質が著しく萎縮した部位に放射状あるいは束状に細長い突起が見られるようになった (Fig. 6)。

FC 濃度 1000 μ g/ml では、細胞は数分後に固定されたようになった。

C. FC 適用後、正常な培養液に戻して24時間培養したマクロファージの形態変化

対照群は、P-M の場合も、L-M の場合も、24時間に比べると C タイプが増加し、又、崩壊ある

Fig. 5 The morphological changes of macrophages cultured with 10 $\mu\text{g/ml}$ of FC after induction by pepton. a: Just before exposure to FC. b: 5min-exposure. c: 30 min-exposure. a, b and c are in the same field of the phase contrast microscope.

いは剥離浮遊する細胞や球状化の傾向を示す細胞が多くなった。

FC 適用群のうち、5 $\mu\text{g/ml}$ では、いずれのマクロファージも、対照群に比較的近い像を呈した。

10 $\mu\text{g/ml}$ の場合には、P-M も L-M も剥離浮遊する細胞が最も多く、付着状態を維持している細胞も強い萎縮や球状化を示した。

100, 1000 $\mu\text{g/ml}$ では、細胞の変形は少なく、伸展した状態で器壁に付着している細胞が多かつ

Fig. 6 The morphological changes of macrophages cultured with 100 $\mu\text{g/ml}$ of FC after induction by LPS. a: Just before exposure to FC. b: 20min-exposure. a and b are in the same field of the phase contrast microscope.

たが、その細胞核は著しく膨化し、核の周囲に多数の空胞状のものが見られた。細胞の周囲には大小の胞状物や細長い突起が見られた (Fig. 7)。この濃度では L-M は P-M よりも細胞質の破壊が少なく、付着残存する細胞も多かった。

III. SEM による形態観察

光顕像で、FC に対して最も顕著な形態変化を示した P-M の FC 10 $\mu\text{g/ml}$ 適用群の細胞表面構造を SEM で観察した結果は次の通りであった。

A. 対照群

Fig. 8 に示すように、A, B, いずれのタイプも細胞表面は密生する微絨毛 (Microvilli) を有した。Aタイプでは、サイズに多少、大小があったが、糸状偽足 (Filopodia) は、ほとんど認められなかった (Fig. 8, a)。

Bタイプでは、その前後方向の長さや微絨毛の密度にかなりの差異がみられた。糸状偽足は胞体部では疎生、短小であるが、両端に近い部位に集

Fig. 7 Phase contrast micrographs of LPS-induced macrophages exposed to FC before 24-hour cultivation. a : Control b : 10 μ g/ml, 30min. c : 100 μ g/ml, 30min.

中して長い糸状偽足が発達しており、Aタイプよりも確実な付着状態を示した (Fig. 8, b)。

Cタイプのうち、円形または不定形に広く伸展している細胞は、核の部分がAタイプよりも低くなり、糸状偽足が放射状によく発達するとともに、その間に広がる膜状形質 (Lamelloplasm) も厚みを増し、辺縁部には波打ち膜 (Ruffles) を形成していた。微絨毛は核を内包する部位に限られ、A, B タイプに比べて疎となった (Fig. 8, c)。Cタイプには核の部分がAタイプとほぼ同大の球形をなし、膜状形質が極めて薄いもの

(Fig. 8, d) から核が著しく扁平化し、細胞の壁着面積が殊に広いもので、細胞伸展の段階を示唆する様々な像が観察された。

また、もう一種のCタイプ、即ち、Bタイプがさらに前後方向に長く伸展した紡錘状の細胞も、伸展の度合いは様々で、その一端のみ、あるいは両端が長く伸びて先端が扇形の膜状形質となり、その辺縁部には波打ち膜を形成していた (Fig. 8, e)。

B. FC 適用群

Fig. 9 に示すように、FC を濃度10 μ g/ml で30分間適用した場合は、微絨毛の変化が顕著で、様々な表面構造の変化を呈した。

ほぼ完全な球状を呈し、Aタイプと判定される細胞の中には、微絨毛が融合したように幅広くなり、フリル状あるいは花弁状となった細胞がかなり多かった (Fig. 9, a)。

また、B, C タイプが球状化しつつある状態と判定される細胞には、微絨毛が疎となり、大小の丸い突起物を生じたものが多く認められた。このような細胞では糸状偽足は認められず、膜状形質は剥離、縮小していた。さらに細胞によっては深い裂溝を生じ、FC の影響が深部に及んだことを窺わせる像 (Fig. 9, b) を示した。

また、特に壁着面積の広いCタイプでは、膜状形質が強く縮小し、細胞核を含む中心部は厚みを増す傾向が見られたが、偽足は僅かに短縮したのみで、長いまま放射状に線状の構造物となって残存した (Fig. 9, c)。

考 察

黒木ら¹⁴⁾は HeLa 細胞とL細胞を用いて本実験に供したものと同一処方のFCの細胞毒性を検討したが、器壁に付着し monolayer を形成した細胞にFC含有培養液を与えた場合は500 μ g/ml で全細胞は死滅した。しかし、100 μ g/ml では生存が可能であり、その適用時間が30分間ならば、正常な培養液に戻して培養すると増殖も可能であった。又、トリプシン処理後の浮遊細胞に対してFCを作用させた場合は12.5~13 μ g/ml で約50%、約30 μ g/ml で100%の細胞が器壁への付着を阻止された。そしてこれらの成績において HeLa

Fig. 8 Scanning electron micrographs of mouse peritoneal macrophages induced by pepton and cultured in the normal medium for 3 1/2 hrs. in order to serve as controls. Macrophages showed various sizes and shapes. a: A rounded cell classed type A. b: A spindle-like cell classed type B. c, d and e: Spreading cells classed type C. Marker equals 5 μ m.

細胞とL細胞の間に殆ど差異は見られなかった。

これに対して P・M の場合は、10 μ g/ml, 20分間で細胞質や核に著しい異常が認められるようになった。このように FC は HeLa 細胞やL細胞ならば生存も増殖も可能な濃度を用いても、マクロファージに対しては著しい細胞障害を惹起することが明らかとなった。

その一因として、今回実験に供したマクロファージは、いわゆる primary culture であり、株化した細胞に比べると、*in vitro* の培養条件への適応性が劣ることを考慮すべきであろう。しかし、マクロファージが FC に対して強い感受性を示したのは、これが異物の認識と endocytosis をその重要な機能とする細胞であることと、分裂能力を欠く細胞であることによるものと考えられる。

次に、マクロファージの形態的分類と FC の影響の関係について検討した。ギムザ染色標本では、FC の適用時間が長いほど C タイプの減少は著しく、A タイプは逆に増加する傾向が認められた。この結果から著者らは C タイプとそれに次いで B タイプの中に FC によって球状化する細胞が多く現れ、それらもギムザ染色標本では A タイプとして算定されたものと推定した。そして、このことは、次に位相差顕微鏡下、同一視野において

各タイプのマクロファージが、FC によって刻々と形態変化する様子を観察した結果、実際に確認することができた。

小島²¹⁾は、マクロファージの最も特徴的な所見は ruffie 状の細胞膜で、顕著な ruffling は活発な機能状態を意味する、と述べているように、FC に対してもその所見を備えた C タイプが、最も強い感受性を示したものと思われる。

ただし、この経時的形態観察では、A タイプにも速やかに剥離浮遊する細胞があり、B, C タイプにも極めて安定な細胞と速やかに球状化する細胞が認められるなど、光顕的に同一タイプに分類されたマクロファージのすべてが FC に対して同程度の感受性を示すとは限らないことも明らかとなった。

培養細胞の場合には、細胞周期の各時期に応じて細胞は、特有の形、運動、表面構造を示し、しかもそれらは互いに不連続ではないことが確かめられている²²⁻²⁵⁾。腹腔マクロファージの場合も、未熟細胞からの分裂、増殖後、その成熟、老化、細胞死に至るプロセスの中で機能変化の連続的な進行に伴ってその形態もまた連続的に変化し、培養時間とともに A $\rightarrow$ B $\rightarrow$ C、あるいは A $\rightarrow$ C の方向で漸次別のタイプへ移行するものと思われる。

Fig. 9 Scanning electron micrographs of macrophages exposed to $10\mu\text{g/ml}$ of FC for 30 mins. Marker equals $5\mu\text{m}$.

る。

従って、光顕的に同一タイプと判定される細胞も SEM により詳細に観察すれば、核を内包する部分のサイズや形状、細胞伸展の程度、あるいは表面構造上に様々な差異が認められたのも当然で、それぞれ少しずつ機能が異なるために、FC による形態変化や、細胞障害の程度にも差異を生

じたものと思われる。例えば、Cタイプの中でも変化の乏しかった細胞は十分に波打ち膜を形成するに至っていないか、既に老化して機能低下した細胞であると考えられる。また A タイプの中で FC により瞬時に剝離した細胞は、糸状偽足が未発達で壁着性の劣る細胞であったと考えられる。

次に、FC $10\mu\text{g/ml}$ によって球状化した C タイプや B タイプの SEM 像を観察したところ、微絨毛の疎生化あるいは消失とともに大小の丸い突起の出現が認められた。

Yamada ら^{26,27)} は密度勾配遠心法で生細胞から死細胞を分離して SEM 観察を行った結果、死細胞はサイズが小さくなること、細胞表面は微絨毛が完全に消失して平滑化することを認めた。しかも、このような表面構造の変化は、致死の原因によらず、死細胞にほぼ共通したものであることが明らかにされた²⁸⁾。周²⁹⁾および中川³⁰⁾は HeLa 細胞に、また、牛村³¹⁾は L 細胞にフェノールを適用した場合の SEM 像で、著者らと同様に微絨毛の消失と、細胞表面の丸い突起の出現を認めた。

細胞表面の丸い突起物の出現は apoptosis の過程で詳察されており³²⁾、Yamada ら³³⁾ 及び大山³⁴⁾ はそれを細胞の死の過程の初期に細胞の縮小に続いて現れる形態変化であり、やがて細胞は分割、断片化に至ると述べた。本実験でも、この突起物の形成のみならず、細胞体部に深い裂溝を生じた細胞がかなり認められており、それらは明らかに死の転帰を示すものであると考えられる。

このように、FC $10\mu\text{g/ml}$ による P-M の表面構造の変化を観察した結果、B、C タイプでは強い細胞障害を起こし死細胞化しつつあることが確認された。前述の通り、対照群の SEM 像では殊に C タイプは活発な機能状態にあることが示唆され、B タイプも C タイプへの移行型であれば A タイプよりも機能亢進がある筈で、それ故に FC の影響を強く受け、速やかに necrosis の過程に移行したものであると考えられる。

一方、A タイプの SEM 像では、FC $10\mu\text{g/ml}$ により微絨毛に代わりフリル状の膜が現れたが、微絨毛が広がってラッフルを形成する現象はモルモット腹腔マクロファージをリンホカインで処理した場合³⁵⁾や、低濃度のフッ素含有培養液で培養

した場合⁸⁰⁾に認められ、これはマクロファージが活性化した兆候であるとされている。このことから今回観察された像がAタイプの活性化を示す可能性はあるが、尚詳細な検討を要する。

以上は P-M に FC を作用させた場合について述べたが、次にそれと L-M の場合とを比較検討した。

先ず、FC 適用前の形態では、L-M の方は C タイプが多く、A タイプは少なかった。岩永ら²⁰⁾もペプトン又は LPS で誘導したマクロファージについて3タイプの経時的変動を調べ、L-M では分離直後より C タイプの割合が大であることを報告した。マクロファージの spreading 能の亢進は、その活性化に伴う形態変化の一つであると言われている²¹⁾。

この L-M も FC により、C タイプの減少と A タイプの増加を示したが、このようなタイプ別細胞数の変動は P-M ほど顕著ではなく、FC による細胞の損傷も、L-M の方が明らかに軽度であった。

又、FC 含有培養液を与えた L-M の位相像の経時的観察では、100 μ g/ml 以上では P-M 同様に固定が起こるようになったが、10 μ g/ml でも変化が極めて軽度で、どちらかと言えば100 μ g/ml による変化の方が明瞭であった。即ち、最も著しい形態変化を起こすのに FC は、P-M よりも L-M に対して高濃度を要するという結果になった。しかし、FC 適用後、正常な培養液に戻して24時間培養した時点では、両者とも10 μ g/ml の方が形態変化は著しく、100 μ g/ml 適用群では球状化が軽度で、剝離した細胞も少なかった。特に L-M の100 μ g/ml 適用群では FC 適用後の形態変化が少なかった。

以上述べた両マクロファージの FC による形態変化の差異を分析すると、FC 濃度100 μ g/ml 以上では両マクロファージともその細胞膜を低分子である FC 成分のホルムアルデヒドやクレゾールが急激に浸透するため、細胞表層より内部へ進行する蛋白凝固反応の方が細胞の収縮運動に伴う形態変化よりも先行するようになる。この場合は表面積の広い L-M の方が影響を受け易く、速やかに強く固定された細胞が多かったものと考えられ

る。これに対して FC 濃度が100 μ g/ml 以下の場合は、浸透した FC 成分が細胞の代謝、機能に変化を与えることにより惹起される収縮運動の方が主体をなすものと考えられる。この場合も L-M の方が形態変化が少なかったが、その理由として、低濃度の FC はその大部分が培養液中の蛋白質と結合して高分子化し、それを L-M の方がより速やかに処理したこと、又、L-M の方が FC に対する感受性が低いとも考えられる。いずれにしても、FC 濃度が100 μ g/ml より低濃度となると、L-M は P-M よりも、FC の細胞障害作用に対して強い抵抗性を示したことは確かである。

臨床実際に使用される FC の量は10 μ l 前後ないし多くても100 μ l 以下である。このような少量でも FC は接触した組織の壊死を起こすが、その腐蝕作用は FC が浸出液と結合することによって自ら限局化し⁵⁾、また、浸出液の影響で速やかに樹脂化することにより消耗する場合もある¹⁰⁾。さらに生活組織まで浸透した FC もその部位から吸収され速やかに希釈されるものと考えられる。ここに至っては、FC の濃度は極めて低いものとなり、FC による細胞障害作用は培養細胞で観察されたものほど強くはないと思われる。又、組織細胞よりも強い障害を蒙る可能性が示唆されるマクロファージも、LPS などによって活性化された状態になれば抵抗性はかなり増強しており、FC と蛋白の結合物は異物として速やかに処理され得るものと考えられる。

結 論

P-M と L-M を *in vitro* で培養し、これに FC を 5 ~ 1000 μ g/ml の濃度で 5 ~ 30 分間接触させ、FC の影響を形態的に調べて P-M と L-M の比較、及び A, B, C タイプ間の比較を行った結果は次のとおりであった。

1. P-M も L-M も、FC 濃度が 5 μ g/ml の場合は僅かに収縮したのみで、正常な培養液に戻すと回復可能であった。

2. P-M も L-M も、FC 濃度が10 μ g/ml の場合は細胞の収縮運動による変形が見られた。

3. P-M も L-M も、100 μ g/ml 以上では形態

変化は少なくなり、FCにより細胞は固定された像を呈するようになった。

4. 10 $\mu\text{g/ml}$ の場合に見られる細胞の変形はP-MよりもL-Mの方が軽度であった。

5. P-MもL-MもFCによってCタイプの割合が減少し、Aタイプの割合が増加する傾向が認められた。

6. FCによる形態的变化が著しいのはCタイプで、Bタイプはこれに次ぎ、Aタイプは比較的安定であった。ただし、同一タイプでも変化の程度にはかなり差異が認められた。

7. P-Mに10 $\mu\text{g/ml}$ のFCを適用した場合のSEM像で、Aタイプは微絨毛がフリル状の膜となり、B、Cタイプは微絨毛が消失して細胞表面は平滑化し大小様々な胞状突起を多数生じた。

以上の結果から、FCのP-M、及びL-Mに対する作用は濃度100 $\mu\text{g/ml}$ 以上と100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の場合とはその機序が異なること、100 $\mu\text{g/ml}$ 以下の場合、L-MはFCに対してP-Mよりも抵抗性が強いこと、また、P-MもL-Mもタイプ別に見ると、形態的变化を蒙る程度はC、B、Aタイプの順位であることが明らかとなった。

抄録：ペプトンで誘導したマウス腹腔マクロファージ(P-M)とlipopolysaccharideで誘導したマウス腹腔マクロファージ(L-M)を、*in vitro*で培養すると、いずれのマクロファージも、球状の細胞(Aタイプ)、短い紡錘状の細胞(Bタイプ)、長い紡錘状または伸展した細胞(Cタイプ)の3タイプに分けられる。

本研究では、P-MとL-Mをホルマリンとクレゾールの等量混合物であるホルマリンクレゾール(FC)に、5~1000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で5~30分間接触させ、FCの影響を形態的に調べてP-MとL-Mの比較、およびA、B、Cタイプ間の比較を行なった。

P-MもL-MもFC濃度が5 $\mu\text{g/ml}$ の場合は殆ど変化せず、10 $\mu\text{g/ml}$ の場合は細胞の収縮による変形を起こし、100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の場合には細胞の変形は少なく、殆ど固定された状態となった。10 $\mu\text{g/ml}$ の場合に見られる細胞の変形はP-MよりもL-Mの方が軽度であった。P-MもL-MもFCによってCタイプが減少し、Aタイプが増加する傾向が認められた。位相差顕微鏡下で経時的に観察すると、CタイプがFCに最も強く反応した。走査型電子顕微鏡でP-Mを観察すると、10 $\mu\text{g/ml}$ のFCにより、Aタイプでは細胞表面にフリル状のラッフルが見られ、B、Cタイプでは細胞表面に大小さまざまな丸い突起物が見られた。

以上により、(1) 10 $\mu\text{g/ml}$ と100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の場合ではFCのマクロファージに対する作用の機序が異なること、(2) 100 $\mu\text{g/ml}$ より低い濃度では、L-MはFCに対してP-Mよりも強い抵抗性を示すこと、(3) 形態的变化を蒙る程度はP-MもL-MもCタイプ、Bタイプ、Aタイプの順に大であること、が明らかとなった。

文 献

- 1) 日本公定書協会：第十一改正日本薬局方解説書 D248-D252, D899-D902, 廣川書店, 東京, 1986.
- 2) Buckley, J. P.: The rational treatment of putrescent pulps and their sequelae. Dent. Cosmos 48: 537-544, 1905.
- 3) 真泉平治：新臨床歯科薬理学. pp. 149-163, 永末書店, 京都, 1981.
- 4) Coolidge, E. D.: Reaction of dog tissue to drug used in root canal treatment. J. Am. Dent. Assoc. 19: 747-759, 1932.
- 5) 師岡道夫：根管消毒剤の根尖創傷治癒に及ぼす影響に関する実験的研究. 口病誌 34: 225-238, 1967.
- 6) 前川成男：ホルムアルデヒド合剤に関する臨床病理学的研究(第1報)露出損傷歯髄に及ぼす影響について. 歯科学報 80: 1531-1576, 1980.
- 7) 前川成男：ホルムアルデヒド合剤に関する臨床病理学的研究(第2報)麻酔抜髄創に及ぼす影響について. 歯科学報 80: 1577-1589, 1980.
- 8) 三木 洋：根管感染症のホルマリントリクレゾール療法に関する臨床的および細菌学的知見補遺. 歯界展望 12: 842-858, 1955.
- 9) Wesley, E. D., Marshal, F. J. and Rosen. S.: The quantitation of formocresol as a root canal medicament. Oral Surg. 29: 603-612, 1970.
- 10) 黒木賀代子：Formalin-cresol 配合剤の消毒作用ならびに副作用、毒力について. 歯基礎誌 22: 513-535, 1980.
- 11) 三条大助, 山本蒔子, 米沢範子, 引地恵夫：FCの組織反応に関する実験的研究—組織の血管透過性について—. 日歯保誌 17: 168-173, 1974.
- 12) 三条大助, 米沢範子, 山本蒔子, 引地恵夫：

- FC の組織反応に関する実験的研究 (2) 病理組織変化について. 日歯保誌 18: 264-267, 1975.
- 13) 竹中栄子, 黒木賀代子, 大住伴子, 村上雄次, 吉村泰治: Formocresol (FC) の経日変化に関する研究 11 起炎性の変化. 九州歯会誌 35: 39-45, 1981.
 - 14) 黒木賀代子, 大住伴子, 村上雄次: 培養L細胞に対するホルマリンクレゾールの増殖抑制作用. 日歯保誌 29: 1757-1764, 1986.
 - 15) Block, R. M., Lewis, R. D., Sheats, J. B. and Burke, S. G.: Antibody formation to dog pulp tissue altered by formocresol within the root canal. Oral Surg. 45: 282-292, 1978.
 - 16) 好川正孝, 至田宗泰, 木村喜彦, 今西裕美, 戸田忠夫: 異種蛋白質の抗原性に及ぼすホルマリンの影響に関する研究. 日歯保誌 26: 977-982, 1981.
 - 17) 好川正孝, 土井昭勝, 新井 徹, 戸田忠夫: Formalin による蛋白質の hapten 修飾阻止効果に関する実験的研究. 歯基礎誌 27: 942-948, 1985.
 - 18) 登根邦彦: 誘導マクロファージの形態変化と Fc-receptors に関する研究. 九州歯会誌 38: 698-711, 1984.
 - 19) 吉川和宏, 大園修身, 横平 毅, 野村邦弘: マウス培養マクロファージ (CAMU-3): 細胞特性と非特異的リンパ球の分裂刺激因子について [会], 日細菌誌 37: 136, 1982.
 - 20) 岩永伸子, 野村直宏, 井上庸三, 何 達人, 内山長司: 誘導マクロファージの培養中の形態学的分類とその機能について. 九州歯会誌 38: 435-442, 1984.
 - 21) 小島 端, 小野崎菊夫: 新免疫学叢書 (畔柳武雄, 大高裕一, 松橋 直) 11 マクロファージ, pp. 6-8, 79-98, 医学書院, 東京, 1983.
 - 22) Nawa, T., Terauchi, A., and Nagata, T.: Scanning electron microscopic study of the mitotic figures in cultivated cells. Arch. Histol. Jpn. 34: 253-260, 1972.
 - 23) Porter, K., Fonte, V. and Weiss, G.: A scanning electron microscopic study of the topography of HeLa cells. Cancer Res. 34: 1385-1394, 1974.
 - 24) Lundgren, E. and Roos, G.: Cell surface changes in HeLa cells as an indication of cell cycle events. Cancer Res. 36: 4044-4051, 1976.
 - 25) 大西礼子: 細胞周期と細胞表面形態—L細胞の場合—, 組織培養 4: 442-453, 1978.
 - 26) Yamada, T. and Ohyama, H.: Separation of the dead cell fraction from X-ray irradiated rat thymocyte suspensions by density gradient centrifugation. Int. J. Radiat. Biol. 37: 695-699, 1980.
 - 27) Yamada, T. and Ohyama, H.: Disappearance of microvilli accompanying interphase death of rat thymocytes. Scan. Electron Microsc. 4: 55-60, 1981.
 - 28) Wyllie, A. H. and Morris, R. G.: Hormone-induced cell death. Purification and properties of thymocytes undergoing apoptosis after glucocorticoid treatment. Am. J. Pathol. 109: 78-87, 1982.
 - 29) 周 張不: 培養 HeLa 細胞に対するフェノールの作用の走査型電子顕微鏡による観察. 歯学 68: 230-234, 1980.
 - 30) 中川美美子: 培養細胞に対するフェノールの作用について—HeLa 細胞に対する作用—. 歯学 71: 721-734, 1984.
 - 31) 牛村幸子: フェノールの作用に関する知見補遺. 歯学 72: 21-35, 1984.
 - 32) Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R. and Currie, A. R.: Cell death. The significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol. 68: 251-306, 1980.
 - 33) Yamada, T. and Ohyama, H.: Changes in surface morphology of rat thymocytes accompanying interphase death. J. Radiat. Res. 21: 190-196, 1980.
 - 34) 大山ハルミ: 生体調節機構としての細胞死—自爆死. 細胞 16: 231-235, 1984.
 - 35) Onozaki, K., Homma, Y., Miura, K. and Hashimoto, T.: Scanning electron microscopic study of changes in the surface of limphokine-treated guinea pig macrophages. Reticuloendothel. J. Soc. 30: 471-481, 1981.
 - 36) 清野精文: モルモット腹腔マクロファージに及ぼすフッ素の影響. 歯学 71: 790-800, 1984.