牛の乳歯々根吸収に関する生化学的研究

I. コラゲナーゼ活性について

森 田 英 夫

東京医科歯科大学歯学部小児歯科学教室 (指導 山下 浩教授)

東京医科歯科大学歯学部生化学教室 (指導 佐々木哲教授)

(昭和 44 年 4 月 15 日受付)

Collagenolytic Activity during Root Resorption of Bovine Deciduous Tooth

Hideo Morita

Department of Pedodontics, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental
University (Director: Prof. Hiroshi Yamashita)

Department of Biochemistry, School of Dentistry, Tokyo Medical and
Dental University (Director: Prof. Satoshi Sasaki)

要旨: 歯根吸収の現象を生化学的に説明する一つの手段として、乳歯々質の有機質の主成分であるコラーゲンの溶解現象に着目し、牛の歯根吸収組織のコラゲナーゼ活性の検出を試み、同時に本組織の組織学的所見も併せて検索した。また、牛の永久前歯の研磨切片にこの吸収組織を直接載せて培養することにより、*in vitro* における本組織の歯質溶解能についても検討を加えた。

実験に用いた材料は、屠殺場で得た牛の下顎で、その吸収組織は肉眼的には乳歯を抜去した後に、永久歯々胚との間に赤い組織として認められ、この時期のものの組織学的所見は、歯根の吸収面に多くの破歯細胞による吸収窩が認められた。乳歯々根からはがした吸収組織の組織学的所見は、乳歯に接していた表層部にはかなり多くの破歯細胞が認められ、その下層は血管に富む結合組織で、さらに深層の部位では線維性組織が認められたが、破歯細胞は全く認められなかった。

酵素活性を調べるために、歯根が約 $\frac{1}{8}$ 程度吸収している乳歯を抜去後、吸収組織を切り取りコラーゲンプレート法により、活性の有無を検討した。この吸収組織を直ちに抗生物質入りのタイロード液に浸して滅菌後、約 $1 \times 1\text{mm}$ に細切し、この組織片をコラーゲンゲルの上に置き、 37°C の恒温器中で静置培養したところ、破歯細胞を含み血管に富む表層の組織はコラーゲンゲルを溶解したが、深層の血管を含まない組織では、コラーゲンゲルの溶解は認められなかった。また、コラーゲンゲルの溶解の起つたものの培養後の組織学的所見では、巨細胞を中心とした広範囲な線維の破壊が見られ、はつきりと組織の構造の維持されていないことが認められたが、培養してもコラーゲンゲルの溶解の見られなかったものでは、巨細胞は認められず、組織の構造が比較的よく維持されていた。

また、永久前歯切片に直接、吸収組織を載せて培養し、*in vitro* における本組織の歯質溶解能を調べたところ、この組織が歯質を溶解する能力をもつような所見が認められた。

結 言

歯根が吸収されて乳歯が脱落し、やがて永久歯

と交換する際に、永久歯々胚の萌出路に相当する部位の組織は、歯胚の発育による刺激を受けて、いわゆる吸収組織¹⁾に変化する。そしてこの吸収組

織中の巨細胞（破歯細胞）が、萌出路に当る乳歯の組織を硬軟に拘らず溶解するものと考えられている。

この吸収組織についての記載は古くからあり、本組織の由来についても、乳歯の歯髄が吸収組織に変化する、乳歯の歯根膜が吸収組織になる、あるいは歯嚢からできる、などの諸説²⁾があり、未だ定説はない。

このように乳歯々根の吸収に関する組織学的研究は古くから多数行なわれており、最近では電子顕微鏡による研究により、乳歯と破歯細胞との関係について詳細に述べられている³⁾。また、骨の吸収と破骨細胞との関係についても多くの電顕による報告⁴⁾⁵⁾がある。組織学的所見はこのように充実したにも拘らず、乳歯々根の吸収を行なう組織に関する生化学的研究は未だない。

歯根吸収に際しては、歯質のミネラルと有機基質の溶解を考えねばならないが、歯根吸収の現象を生化学的に説明する一つ的手段として、まず、乳歯々質の有機質の主成分であるコラーゲンの溶解現象に着目し、牛の歯根吸収組織のコラーゲナーゼ活性の検出を試み、同時に本組織の組織学的所見も併せて検索した。また、永久前歯の研磨切片にこの吸収組織を直接載せて培養することにより、*in vitro* における本組織の歯質溶解能についても検討を加えた。

実験材料と方法

1) 実験材料

屠殺場より氷冷して持ち帰った屠殺直後の生後約1年の牛の下顎骨前端部をアルコールで清拭後、唇側の歯肉と骨壁を除去し、歯根が約 $\frac{1}{3}$ 程度吸収している乳前歯 (A | A か B | B) を抜去して、吸収組織を採取した (図1, 2)。これを直ちに、ペニシリン、ストレプトマイシンおよびマイコスタチンをそれぞれ1000単位/ml 含む培養液に浸して滅菌後、約 1×1 mmの組織片とした。

2) コラーゲンおよび培地の調製

使用したコラーゲンは、Kang らの方法⁶⁾ により、ネズミの皮膚から中性塩可溶性コラーゲンを

図1 歯根の吸収状態と吸収組織との関係

図2 吸収組織の肉眼的所見

乳歯を抜去した後に永久歯々胚との間に認められる。

調製した。このコラーゲンを約 4°C の冷磷酸緩衝液 (pH 7.4) に約0.2%になるように溶解した後、0.4M NaCl に対して2日間透析し、1,500 rpm で1時間遠心し、その上清を用いた。

培地には Tyrode 溶液を Eagle 培地用⁸⁾ のアミノ酸混液、グルタミン酸溶液、ビタミン混液、ペ

ニシリン、ストレプトマイシン混液で補強し、ミリポアフィルターで濾過して滅菌したものを用いた。

3) 培養方法

Gross らの方法⁷⁾に従い、プラスチック製の培養皿に、コラーゲン溶液と培養液を 1 : 3 に混合した溶液を入れてカバーガラスで被い、培地が乾燥しないように水を張ったシャーレの中で 37°C, 12 時間保ち、コラーゲンをゲル化させた後に組織片をこのゲルの上に置き、37°C で培養した(図 3)。

また、in vitro における吸収組織の歯質溶解能を調べるために、培地上に屠殺直後の牛の下顎永久前歯の研磨切片を置き、この上に吸収組織の表

図 3 培養装置

a. 歯根の吸収面に多くの破歯細胞による吸収窩が認められる。ヘマトキシリンエオジン染色 ×80

層部が歯面に接するように載せ、同様に培養した。

4) 組織学的方法

培養前と培養後の吸収組織を 10% 中性ホルマリンで固定し、通法に従い、ヘマトキシリンエオジン染色を行なった。

結 果

1) 培養前の採取した吸収組織の所見

歯根が約 $\frac{1}{3}$ 吸収している時期(図 1, 2)の歯質表面と吸収組織は図 4 の如くで、歯根の吸収面に多くの破歯細胞による吸収窩が認められる。

乳歯々根からはがした吸収組織は三層から成り(図 5)、乳歯に接していた表層部にはかなり多くの破歯細胞が認められ、その下層は血管に富む結合組織で、さらに深層の部位では線維性組織が認められたが、破歯細胞は全く認められなかった。

2) 吸収組織のコラーゲンゲル溶解能

コラーゲンゲル上での培養により、組織のコラーゲナーゼ活性の有無を検討したところ、培養組織周辺に明らかなコラーゲンゲルの溶解が、ゲルの透明化として認められた。図 6 は吸収組織を 37°C で 2 日間培養した例で、左側のリングは血管に富むごく表層の組織で、組織培養周囲のコラーゲンゲルが明らかに溶解しているのが認められる。右側のリングはより深層の血管をあまり含まない組

b. 図 4 a の一部拡大 H-E 染色 ×350

図 4 吸収組織と歯根の吸収面

a. 乳歯々根からはがした吸収組織の全景。ヘマトキシリンエオジン染色 ×80

b. 図5aの一部拡大 H-E 染色 ×350
乳歯に接していた表層部には多数の破歯細胞が認められる。

図5 吸収組織の詳細

図6 培養3日目、組織培養周囲のコラーゲンゲルの溶解が認められる。

図7 培養4日目、より広範囲なコラーゲンゲルの溶解が認められる。

図8 培養してコラーゲンゲルの溶解の起つた吸収組織像で、破歯細胞が認められ、はつきりと組織の構造が維持されていない。
ヘマトキシリンエオジン染色 ×300

図9 培養してもコラーゲンゲルの溶解の見られなかつた吸収組織像で、破歯細胞は認められない。
ヘマトキシリンエオジン染色 ×300

表 1 吸収組織によるコラーゲングルの溶解の頻度

例 数	組 織 別*	培養 1 日目	2 日 目	3 日 目	4 日 目	5 日 目
1	表層	—	冊	}ホルマリンで 固定, 検鏡	}ホルマリンで 固定, 検鏡	
2	"	—	+			
3	"	—	+	冊		
4	"	—	±	+		
5	"	—	±	+		
6	"	—	—	+	+	冊
7	"	—	—	+	+	冊
8	"	—	±	±	±	±
9	"	—	—	—	—	—
10	"	—	+	+	冊	冊
11	"	—	—	—	—	—
12	"	—	—	—	—	—
13	"	—	—	±	冊	冊
14	"	—	—	—	—	—
15	"	—	—	—	+	冊
16	"	—	—	—	—	—
17	"	—	—	+	+	冊
18	深層	—	—	—	}ホルマリンで 固定, 検鏡	
19	"	—	—	—		
20	"	—	—	—		
21	"	—	—	—		
22	"	—	—	—		
23	"	—	—	—		
24	"	—	—	—		
25	"	—	—	—		
26	"	—	—	—		
27	"	—	—	—		
28	"	—	—	—		
29	"	—	—	—		
30	"	—	—	—		

*: 表層は血管に富む表層の組織, 深層は血管をあまり含まない深層の組織

—: 組織培養周囲のコラーゲングルの溶解の認められないもの

±: 溶解の判然としないもの

+: 組織周囲が約 1 mm 透明になつているもの

++: 組織周囲が約 2 mm 透明になつているもの

+++: 組織周囲が約 3 mm 透明になつているもの

冊: 全体が溶解しているもの

織を培養した例で, コラーゲングルの溶解は全く認められなかった。図 7 は 37°C で 3 日間培養した例で, より広範囲なコラーゲングルの溶解が認められた。

このコラーゲングルの溶解の頻度を, 血管に富むごく表層の組織とあまり血管を含まない深層の

組織とについて比較したところ (表 1), 血管に富む組織 17 例中, その約 65% に当る 11 例にコラーゲングルの溶解が認められたが, 血管をあまり含まない組織では, 1 例もコラーゲングルの溶解は認められなかった。また, このコラーゲングルの溶解は, 培養後 1 日目では全例において認められな

図 10 in vitro における吸収組織の歯質に対する溶解能、破歯細胞が歯質表面に密着している。
ヘマトキシリンエオジン染色 ×350

かったが、2日目に現われはじめ、5日目頃には溶解のあつたゲルは全体が溶解して透明になった。

3) 培養後の吸収組織の所見

37°C で3日間培養してコラーゲンゲルの溶解の起つた組織の所見は図8の如くで、培養前のそれと比較すると巨細胞を中心とした広範囲な線維の破壊が見られ、はっきりと組織の構造の維持されていないことが認められた。

図9は、培養してもコラーゲンゲルの溶解の見られなかつた組織像で、巨細胞は認められず、線維の破壊も見られず、組織の構造が比較的良好に維持されている。

4) in vitro における吸収組織の歯質に対する溶解能

コラーゲンをゲル状にした培地に、牛の永久前歯象牙質の研磨切片（厚さ約100 μ ）を置き、その上に血管に富む吸収組織の表層部を載せて37°Cで4日間培養したところ、吸収組織は歯質に密着し、組織が歯質を溶解している所見が認められた（図10）。しかし、in vivo におけるような著明な吸収窩の形成にまでは至っていない。

考 察

本研究で歯根吸収組織のコラーゲン分解酵素活性の検出に用いたコラーゲンを含む培地による培

養法は、Gross ら⁷⁾の発案によるもので、可溶性コラーゲンをゲル状にした培地にはアミノ酸やビタミンなどの栄養源を含み、この上で組織を培養して培地中のコラーゲンゲルが溶解して透明になれば、組織にコラーゲン分解活性のあることが証明される。このゲルは通常のプロテアーゼ、例えば、トリプシンやカテプシンなどでは溶解されない。

乳歯々根が肉芽様の absorbent organ によつて吸収されることを、1859年に Tomes, J. が最初に報告して以来、Hopewell-Smith¹⁾は乳歯々根吸収時の人およびネコの肉芽組織について詳述しており、Sognnaes⁹⁾も歯の吸収には、血管に富む肉芽組織の存在が必須であると述べている。

牛でも乳歯々根の活発に起つている時期（図1, 2）の吸収組織は肉眼的に、乳歯々根の吸収面に対応した歯導帯 gubernacular cord¹⁰⁾上に常に赤い組織として認められた。この組織は三層から成り（図5）、血管に富む組織は乳歯々根の吸収面に接した吸収組織の表層部に存在し、破歯細胞もこの部位にのみ認められる。そして、この組織の表層の血管に富む部位からのみ活性が検出された（図6, 7）。

さらに、このコラーゲンゲルの溶解の起つた組織像（図8）を、培養してもコラーゲンゲルの溶解の見られなかつたもの（図9）と比較すると、破歯細胞を中心とした広範囲な線維の破壊が見られ、はっきりと組織の構造の維持されていないことから、歯質のコラーゲン線維を溶解する酵素は、破歯細胞を含む吸収組織から放出されていて、これがコラーゲンを分解しているものと考えられる。

動物の組織を構成するコラーゲンは、生理的改造の起る際に消失することが知られており、特にオタマジャクシの変態時の尾⁷⁾¹¹⁾、分娩後の子宮¹²⁾、実験的肝硬変症の治癒期の肝臓¹³⁾、人の皮膚¹⁴⁾や歯肉¹⁵⁾などにコラーゲン分解活性のあることが認められており、部分的にはその酵素の性質も知られてきている¹⁶⁾。

今のところ、歯根吸収組織からこのような組

織のコラーゲン分解酵素が作られ、乳歯のコラーゲンを分解しているとは、組織からコラーゲン分解酵素が分離精製されていないので断言はできない。しかし、このコラーゲン分解酵素が分離精製されて、その性質が明らかになれば、乳歯々根吸収時のコラーゲンの分解消失についての問題も明らかにされるに違いない。

吸収組織を永久前歯の研磨切片上に直接載せて培養し、この組織の *in vitro* における歯質溶解能を追究したところ、この組織が歯質を溶解する能力をもつように見えた(図10)。*in vivo* で見られるような明らかな吸収窩はこの所見で認められなかったが、これは培養期間の短いこと(4日間)や環境の変化(*in vitro*)などが原因しているものと思われる。

そこで、この *in vitro* の所見を基に生理的な歯質の吸収過程を類推してみると、まず吸収組織に血管が密に分布して破歯細胞が現れる。吸収組織の表面に血管が密に分布しているのは、これらの血管が栄養血管として付近にある破歯細胞に物質代謝に必要な物質や酸素を供給して、細胞内の代謝活動を活発にするためと思われる。Furseth³⁾ も電子顕微鏡による所見から、破歯細胞中に細胞のエネルギー産生に必須であるミトコンドリアが多く存在し、この細胞の代謝活性が盛んであることを推論している。本所見でも、このような細胞がコラーゲン分解酵素や歯質のミネラルを溶解する物質を分泌して、歯質を溶解しやがて著明な吸収窩を形成しつつ、歯質を溶解して行くのではないと思われる。

このように破歯細胞が歯質を溶解吸収するという考えは古くから多くの人達に支持されてきた。しかし、形成細胞、多核白血球、形質球などが役割を演ずる *osteolysis* によつても吸収の起る¹⁾ことが知られているので、歯根吸収の問題をさらに究明するためには、生化学的ならびに組織化学的所見の集積が望ましい。今後は本組織から破歯細胞のみを集めて、この細胞から直接コラーゲン分解酵素を証明すると共に、細胞の歯のミネラルに対する溶解能も明らかにされれば、生理的歯根吸

収の機構を解明する上の重要なデータが得られるものと思われる。

総 括

1. 歯根吸収の現象を生化学的に説明する一つの手段として、乳歯々質のコラーゲンの溶解に着目し、生後約1年の牛の吸収組織のコラゲナーゼ活性の検出を試みた。

2. コラーゲングル平板法により吸収組織のコラゲナーゼ活性を測定したところ、歯質の吸収面に対応した血管に富み破歯細胞を含むごく表層の組織からのみ、コラーゲングルの溶解能が認められた。

3. 組織学的には、破歯細胞はこの血管に富む表層の組織にのみ存在し、また培養してコラーゲングルの溶解の起つた組織像では、破歯細胞を中心とした広範囲な線維の破壊が見られ、はつきりと組織の構造の維持されていないことが認められた。

4. これらのことから、歯質のコラーゲン線維を溶解する酵素は、破歯細胞を含む組織から放出されていて、これが乳歯のコラーゲンを分解しているものと考えられる。

5. また、永久前歯切片に直接、吸収組織を載せ4日間培養して、*in vitro* における本組織の歯質溶解能を調べたところ、この組織が歯質を溶解する能力をもつような所見が認められた。

稿を終るにあたり、終始懇切な御指導と御校閲をいただいた山下浩教授ならびに佐々木哲教授に心から感謝致します。また、組織培養法を御教示、御指導下さいました本学歯学部生化学教室清水正春助教授、組織学的技術を提供していただいた本学歯学部口腔病理学教室小守昭助教授および東京歯科大学病理学教室吉木周作講師に厚くお礼申し上げます。最後に、御協力をいただきました生化学教室および小児歯科学教室の皆様へ感謝致します。

文 献

- 1) Hopewell-Smith, A. : The process of osteolysis and odontolysis, or so-called "absorption" of calcified tissues: A new and original investigation, Dental Cosmos, 72 : 462, 912,

- 1036, 1151, 1930.
- 2) Treuenfels, P. : Mikroskopische Untersuchungen über die Resorption der Milchzähne, Dtsch. Mschr. Zahnheilk., 19 : 193, 1901.
- 3) Furseth, R. : The resorption processes of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography, and electron microscopy, Archs oral Biol., 13 : 417, 1968.
- 4) Hancox, N. M. and Boothroyd, B. : Structure-function relationships in the osteoclast, from "Mechanisms of hard tissue destruction", edited by Sognnaes, R. F., Washington, 1963, Am. Ass. Advanc. Sci., p. 497.
- 5) Greulich, R. C. : Organic mass distribution in bone matrix undergoing osteoclastic resorption, Archs oral Biol., 3 : 137, 1961.
- 6) Kang, A. H., Nagai, Y., Piez, K. A. and Gross, J. : Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole, Biochemistry, 5 : 509, 1966.
- 7) Gross, J. and Lapiere, C. M. : Collagenolytic activity in amphibian tissues : A tissue culture assay, Proc. N. A. S., 48 : 1014, 1962.
- 8) Merchant, D. J., Kahn, R. H. and Murphy, W. H. : Handbook of cell and organ culture, Minneapolis, 1967, Burgess Publishing Company, p. 227.
- 9) Sognnaes, R. F. : Microstructure and histochemical characteristics of the mineralized tissues, Ann. N. Y. Acad. Sci., 60 : 5, 545, 1955.
- 10) Scott, J. H. : The development and form of the human dentition in "Dento-facial development and growth" Pergamon, 1967, Pergamon Press, p. 7.
- 11) Lapiere, C. M. and Gross, J. : Animal collagenase and collagen metabolism, from "Mechanisms of hard tissue destruction", edited by Sognnaes, R. F., Washington, 1963, Am. Ass. Advanc. Sci., p. 663.
- 12) Morriane, T. G. and Seifter, S. : Alteration in the collagen content of the human uterus during pregnancy and post partum involution, J. Exptl. Med., 115 : 357, 1962.
- 13) Morriane, T. G. and Levine, J. : Collagenolytic activity and collagen resorption in experimental cirrhosis, Arch Path, 84 : 59, 1967.
- 14) Eisen, A. Z., Jeffrey, J. J. and Gross, J. : Human skin collagenase. Isolation and mechanism of attack on the collagen molecule, Biochim. Biophys. Acta, 151 : 637, 1968.
- 15) Bennick, A. and Hunt, A. M. : Collagenolytic activity in oral tissues, Archs oral Biol., 12 : 1, 1967.
- 16) Gross, J. and Nagai, Y. : Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme, Proc. N. A. S. 54 : 1197, 1965.