内毒素の歯周組織に対する *in vivo* での作用

内田 武志 白根 忠 穴村 紳一

中西 恵治 岡本 莫

広島大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：岡本 莫教授)

(昭和54年12月20日受付)

A Study of the Effects of Bacterial Endotoxin on Periodontal Tissue *in vivo*

Takeshi UCHIDA, Tadashi SHIRANE, Shin'ichi ANAMURA,
Keiji NAKANISHI and Hiroshi OKAMOTO

Department of Endodontology and Periodontology,
Hiroshima University School of Dentistry
(Chief: Prof. Hiroshi OKAMOTO)

The purpose of this study was to investigate the effects of bacterial endotoxin on bone resorption *in vivo*.

1. Endotoxin (lipopolysaccharide *E. coli*) mixed with penicillin and streptomycin was inserted into the root canals of dogs 7 days after pulpectomy. The animals were sacrificed 3 and 7 days after the application of endotoxin and the periapical tissues were examined histologically.

The experimental group showed marked cellular infiltration and bone resorption with numerous osteoclasts, but the control group showed little cellular infiltration or bone resorption. There were significantly more osteoclasts in the experimental group than in the control group ($p < 0.001$).

2. Human peripheral blood lymphocytes were cultured in 2 media, one with endotoxin ($100 \mu\text{g/ml}$), and one without endotoxin at 37°C in 5% CO_2 and 100% humidity for 6 days. The lyophilized culture supernatants were inserted into the root canals of 2 groups of dogs. In a 3rd group, only lyophilized culture medium with endotoxin was used.

The pathological changes of the periapical tissues in response to the 3 different culture supernatants were similar in all 3 groups.

I. 緒 言

歯周病の諸症状のうち、最大の問題である歯槽骨の吸収に、グラム陰性菌ないし、その細胞壁構成成分である内毒素がかかわっていることを示唆する報告が蓄積しつつある¹⁾。

無菌動物に、口腔内より分離した細菌を接種して起こした実験的歯周病の報告をまとめてみると、例外はある

ものの、グラム陽性菌とグラム陰性菌とでは、際立った対照をなしている。すなわち、グラム陽性菌である *Actinomyces viscosus*, *A. naeslundii* および *Streptococcus mutans* を感染させた実験では、一般に osteoclast に関する記述がないか、あるいはその出現は見られないとされ、一方、グラム陰性菌である Y 4, *Eikenella corrodens*, *Capnocytophaga*, *Fusobacterium nucleatum*, および *Bacteroides* を接種した場合には、多数の osteoclast の出現が報告されている²⁻⁷⁾。組織学的に詳細な記

述がなされているにもかかわらず、osteoclast については触れていない報告では、osteoclast の出現がみられないものと解釈できる。例外として、Garant⁹⁾ はグラム陽性菌の *A. naeslundii* 接種により、osteoclast の出現を報告している。

in vitro の実験では、グラム陰性菌の細胞壁構成成分、内毒素が培養骨に骨吸収作用を示すことが Hausmann ら⁹⁻¹¹⁾ によって明らかにされている。しかし、この骨吸収作用は *in vitro* で確認されたものであり、*in vivo* での実験は未だ報告が見られない。

そこで、本研究では、*in vivo* でも、内毒素添加により骨吸収が起こるか、また osteoclast が出現するかどうかを調べることを目的とした。

II. 材料と方法

1. 内毒素の歯槽骨に対する作用

レントゲンの根端の閉鎖した小臼歯を持つ雑種成犬を実験材料とした。歯槽骨を内毒素で刺激する方法としては、外科的侵襲を最少限にし、かつ、持続的に内毒素が骨表面に作用するように、小臼歯の歯髄を、ソムノベンチル腹腔内麻酔下で、抜髄し、根管内に内毒素を封入し、根端孔から根端周囲に内毒素が広がることを期待する方法を実施した。抜髄後、上顎はそのまま、下顎はさらにエンジンリーマーで根端まで穿孔し、ペニシリン (20万単位/ml) とストレプトマイシン (500 mg/ml) 含有の生理的食塩水を含んだペーパーポイントを挿入、テンボラリーストッピングとユージノールセメントで二重仮封した。1週間後に、仮封とペーパーポイントを除去し、実験群は 120°C、20分間オートクレープ処理した内毒素 (lipopolysaccharide B, *E. coli*, 026 : B 6, Difco, USA) を抗生剤含有生理的食塩水で混和してペーストとし、ペーパーポイントを用いて1根管におよそ 0.9 mg を填塞後、抜髄時と同様に二重仮封した。なお、抗生剤含有生理的食塩水のみをペーパーポイントとともに封入したものを対照とした。

3日ないし7日後にと殺、10%ホルマリンで固定、Plank-Rychlo 迅速脱灰液で10日間脱灰、5%硫酸ナトリウム溶液で中和した後、通法に従いパラフィン包埋、切片標本を作成し、組織学的検索および osteoclast の計数を行った。

炎症の強さは、炎症細胞の密度を規準として、++ : 高濃度の炎症細胞の浸潤、+ : わずかの炎症細胞の浸潤、- : 炎症細胞浸潤を認めない、に分類、判定した。

osteoclast 数は、接眼レンズに $\frac{1}{10}$ mm の方眼マイクロメーターを装着し、培率 100 倍で根端周囲歯槽骨表面を細切れに撮影し、その写真を合成、根端周囲歯槽骨表面の総延長を、骨表面を含む方眼の数で表わし、方眼 100 当り骨表面に見られる osteoclast 数を osteoclast 出現率とした。

動物をと殺後直ちに、根管内のペーパーポイントを除去し、通法に従い Pladia (昭和薬品化工、東京) 中で 72 時間培養し、根管内の細菌の生息の有無を判定した。

2. リンパ球内毒素添加培養上清の作用

内毒素の骨吸収作用がリンパ球を介し作用する可能性を知るため次の実験を行った。

ヘパリン処理したヒト末梢血から、リンホブレップ (Nyegaard, Oslo, Norway) を用い、リンパ球リッチ層を分離、pH 7.4 の Tris-balanced salt solution で洗い、homologous serum 10% を加えた RPMI 1640 培地に、ペニシリン (100 単位/ml) ストレプトマイシン (100 μ g/ml) を添加し、 10^6 /ml オーダの細胞を、37°C、5% CO₂、95% 空気、湿度 100% の条件下で 6 日間培養した。実験群の培地には 100 μ g/ml の内毒素を加え、リンパ球を培養した。6 日間培養後、2,000×g、20 分間遠沈し、遠沈上清を凍結乾燥し、このリンホカイン、内毒素、および培地を含む試料を、前述の方法で、イヌの根管内に封入し、根端周囲の組織変化を調べた。

III. 結 果

1. 内毒素の歯槽骨に対する作用

内毒素を根管内封入 3 日後の代表的組織像を図 1 の上段左に、右に対照群の組織像を示した。実験群では主として、好中球、形質細胞の強い広範な浸潤があり、根端直下、あるいはさらに骨髄側に多くの osteoclast を伴った吸収、および osteoclast の見られない Howship's lacunae が観察された。対照群では、炎症細胞浸潤、膿瘍形成はほとんど見られず、細胞成分がかなり減少している例も見られた。

7 日後になると、図 1 の下段に示すように、実験群では依然として強い炎症が続き、著明な膿瘍形成が見られた。骨表面には、3 日後と同様に、osteoclast を伴った骨吸収が見られ、歯根表面には cementclast と思われる多核巨細胞による歯根吸収も観察された。対照群では、炎症所見は見られなかった。

これらの炎症性変化を表 1 にまとめた。歯根単位で観察した各群の百分率で比較すると、全期間を通じて、明

図 1 Photomicrographs of 3-day specimens (top) and 7-day specimens (bottom) in experimental group (left) and control group (right).
Note marked cellular infiltration and bone resorption with numerous osteoclasts (arrows) in experimental group but little cellular infiltration or bone resorption in control group. original magnification $\times 20$.

表 1 Pathological changes of periapical tissues after endotoxin application through root canals

		Experimental group			Control group		
After application		3 days	7 days	total	3 days	7 days	total
No of cases (%)		16	9	25	14	10	24
Inflammation	+	13 (81)	5 (56)	18 (72)	1 (7)	0 (0)	1 (4)
	+	3 (19)	3 (33)	6 (24)	4 (29)	1 (10)	5 (21)
	-	0 (0)	1 (11)	1 (4)	9 (64)	9 (90)	18 (75)
Abscess	+	14 (88)	7 (78)	21 (84)	1 (7)	0 (0)	1 (4)
	-	2 (12)	2 (22)	4 (16)	13 (93)	10 (100)	23 (96)
Bone resorption	+	16 (100)	8 (89)	24 (96)	4 (29)	0 (0)	4 (17)
	-	0 (0)	1 (11)	1 (4)	10 (71)	10 (100)	20 (83)

らかに実験群に強い炎症が見られ、3日後の対照群では、炎症の強い+が7%であるのに対して、実験群では+は81%を占め、対照群の64%は、炎症所見なし

であった。経日的には、3日後より、7日後の方が炎症の程度が軽く、炎症はやや消退する傾向が見られた。実験群の3日後で88%、7日後で78%に膿瘍形成が見ら

表 2 Number of osteoclasts on bone surface in 100 squares (1×100 μm²)

Group		3 days	7 days	total
Experimental	Pulpectomy	76.0 ± 45.7	72.5 ± 23.4	74.5 ± 38.1
	Pulpectomy and apical perforation	54.4 ± 32.8	34.5 ± 20.7	48.9 ± 31.3
	mean	64.4 ± 40.8 *	58.3 ± 29.0 **	62.3 ± 37.3***
Control	Pulpectomy	23.1 ± 19.5	18.9 ± 11.1	21.4 ± 16.8
	Pulpectomy and apical perforation	17.0 ± 12.0	9.4 ± 4.7	15.0 ± 11.1
	mean	20.5 ± 16.7	15.7 ± 10.4	18.8 ± 14.5

* p<0.01 ** p<0.02 *** p<0.001 Mean ± standard deviation

表 3 Relation between bacterial culture tests in root canals and number of osteoclasts

Culture test	+		-	
	control	experimental	control	experimental
Na of samples	0	1	17	25
Na of osteoclasts	—	77.6	18.8 ± 14.5	61.6 ± 37.9

Mean ± standard deviation

れた一方、対照群の3日後で7%に膿瘍形成が見られ、7日後では全く見られなかった。

歯槽骨の吸収像は実験群の3日後では全てに見られたが、対照群ではわずか29%に見られたに過ぎず、7日後には、吸収像がやや少なくなり、吸収部分に修復像も見られた。

方眼マイクロメーターの100方眼当りの osteoclast 数で表した osteoclast の出現率を表2に示した。3日後の実験群で64.4、対照群で20.5であり、7日後の実験群で58.3、対照群15.7、全期間を通じると実験群62.3、対照群18.8の osteoclast 出現率であった。両者とも炎症所見と同様3日から7日へと減少する傾向が見られるが、実験群に多数の osteoclast が出現し、対照群との間に有意の差を認めた (P<0.001)。上顎の抜髄のみと下顎の抜髄後根端を穿孔したものとの比較では、実験群、対照群いずれも上下顎間に有意の差はなく、上顎の osteoclast 数がやや高い値を示した。一方、根管内細菌培養成績は、表3に示すごとく、43例中陽性だったのは実験群の1例のみであった。この細菌培養陽性例の osteoclast 出現頻度は、陰性例より多かったものの、実験群の平均値よりやや高い程度に過ぎなかった。

2. リンパ球内毒素添加培養上清の作用

ヒトリンパ球の培養上清を根管内封入した根端周囲の組織反応は表4に示すように、内毒素添加培養リンパ球は、リンパ球のみ、および内毒素を含む培養液の対照群との間に特に差は見られなかった。

osteoclast の出現率も、表4に示すように3群の間に有意の差はなく、実験1の対照群の値に近い20~35であった。

IV. 考 察

歯周病罹患歯周組織は、内毒素の豊富な環境にさらされており、その内毒素の源は歯垢や歯石とみなされ、それらを取り除くと、歯周病の症状は著しく改善する¹²⁾、内毒素の歯槽骨吸収作用は、胎児骨の組織培養実験によって明らかにされているが^{9~11)}、中高年齢層に好発する歯周病の実験モデルとしては、胎児骨を使う *in vitro* 実験には限界があると考え、*in vivo* でその作用の確認を試みた。

被験物質の歯周組織に対する作用を調べる方法としては、被験物質を歯肉粘膜下に注射する方法が行われてい

表 4 Pathological changes of periapical tissues after application of cultured lymphocytes including endotoxin

		Cultured Lymphocytes with Endotoxin (4 cases)	without Endotoxin (2 cases)	Culture Medium + Endotoxin (4 cases)
Inflammation	++	0	0	2
	+	4	2	2
	—	0	0	0
Abscess	+	0	2	2
	—	4	0	2
Bone Resorption	+	4	2	3
	—	0	0	1
No. of osteoclasts		22.7 ± 16.8	22.4 ± 11.9	17.7 ± 7.1

る¹³⁾が、この方法は、被験物質の代謝が早く、歯周組織が内毒素に持続的にさらされている歯周病の実験モデルには不適當である。そこで著者らは、抜髄した根管を利用し、根管内に内毒素を填塞、仮封し、内毒素が根端孔から持続的に歯周組織に拡がる方法を実施した。

その結果、周囲組織に炎症性細胞浸潤が生じ、osteoclast の出現を伴う歯槽骨の吸収が起きた。実験は可及的に無菌操作で行ったので、細菌感染でなく、内毒素の作用と考えてよい。本研究では、グラム陽性菌の細胞壁成分については調べていないので、グラム陽性菌と陰性菌の比較はできないが、Irving ら¹³⁾は、*A. naeslundii* の脂質を歯肉に注射し、組織反応を調べたところ、osteoblast が消失し、osteoclast は出現しなかったと報告している。無菌動物に細菌を接種して起こした歯槽骨吸収の実験において、osteoclast はグラム陽性菌では出現しないで、グラム陰性菌で出現するという報告^{2~7)}と本研究の結果、および前述の Irving ら¹³⁾の結果とを考えると、グラム陽性菌と陰性菌とでは、骨吸収作用の機作に違いがあることが示唆される。

著者らは、内毒素がリンパ球を刺激して、非特異的に、あるいは感作リンパ球が免疫応答として、リンホカインの一種、osteoclast activating factor (OAF) を遊離し、歯槽骨に作用する経路^{14,15)}を想定した。しかし、本実験では OAF の作用を認めることができなかった。*in vitro* の系での OAF 産生を検定しなかったので、内毒素あるいはリンパ球が十分量でなくて、OAF が産生されなかったのか、OAF は産生されたものの、*in vivo* の系でその作用を確認できなかったのか不明である。

根管内に封入した内毒素の濃度は、歯垢、あるいは歯

石の内毒素含量よりはるかに高濃度である¹²⁾。しかし、根端孔周辺での内毒素の濃度は不明であり、歯周組織に直接接触している歯石、歯垢の内毒素濃度に相当するものかどうか、比較は難しい。また、感染根管内の内毒素量についての報告もなく、グラム陰性菌の生息、増殖している感染根管と内毒素量を比較することもできない。しかし、Schein ら¹⁶⁾の根端周囲歯槽骨の破壊像が見られる歯根の根管洗浄液中の内毒素濃度は骨破壊の見られない歯根のそれに比較して高いという報告も、また、内毒素が歯槽骨破壊に関わっていることを示唆する証拠と言える。

犬の根管の根端部は単純な形態ではなく、多数の分岐根管に分かれている。そこで、下顎歯については、人為的に根端部を穿孔し、内毒素の根端周囲への浸出を容易にする方法を採用した。しかし、結果は、上下顎の間に差はなく、むしろ上顎の方が osteoclast がやや多く出現した。これは、対照群にも見られた傾向であり、上下顎の間の根管、歯槽骨の解剖学的形態の差に基づくものかも知れない。

V. 結 論

内毒素 (lipopolysaccharide, *E. coli*) の骨吸収作用を *in vivo* で検討した。

雑種成犬の小白歯を抜髄、1週間後に滅菌内毒素 (0.9 mg) をペニシリン、ストレプトマイシン、生理的食塩水とともに、根管内に封入、3日および7日後に動物をと殺、根端部歯周組織の組織学的検索を行った。

また、ヒト末梢血リンパ球を分離、内毒素添加 (100

μg/ml) 培地中で, 37°C, 5% CO₂, 100% 湿度の条件で, 6日間培養, 培養上清を凍結乾燥, 上述の方法で, イヌ抜髄根管内に封入した。

その結果, 内毒素は *in vivo* において, osteoclast の出現を伴う骨吸収を起こすことを確認した。すなわち, 内毒素封入群は, 広範な炎症細胞の浸潤, 歯槽骨の破壊が起こり, 多数の osteoclast が出現し, 抗生剤添加生食水封入の対照群との間に有意の差が認められた ($P < 0.001$)。

一方, リンパ球培養上清封入例では, 特に目立った骨吸収は認められず, 対照群と差がなかった。

本研究の一部は 1978 年度文部省科学研究費一般研究 C 課題番号 357560 の補助で行われたことを付記する。

文 献

- 1) 内田武志, 岡本 莫: 歯周病における細菌内毒素の役割, 広大歯誌, 9: 1~11, 1977.
- 2) Socransky, S.S., Hubersak, C. and Propas, D.: Induction of periodontal destruction in gnotobiotic rats by a human oral strain of *Actinomyces naeslundii*. Archs oral Biol. 15: 993~995, 1970.
- 3) Jordan, H.V., Keyes, P.H. and Bellack, S.: Periodontal lesion in hamsters and gnotobiotic rats infected with actinomyces of human origin. J. Periodont. Res. 7: 21~28, 1972.
- 4) Gibbons, R.J., Berman, K.S., Knoetter, P. and Kapsimalis, B.: Dental caries and alveolar bone loss in gnotobiotic rats infected with capsule forming Streptococci of human origin. Archs oral Biol. 19: 549~560, 1966.
- 5) Irving, J.T., Newman, M.G., Socransky, S.S. and Heeley, J.D.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats mono-infected with a gram-negative organism. Archs oral Biol. 20: 219~220, 1975.
- 6) Irving, J.T., Socransky, S.S. and Tanner, A. C.R.: Histological changes in experimental periodontal disease in rats mono-infected with gram-negative organisms. J. Periodontal Res. 13: 362~332, 1978.
- 7) Irving, J.T., Socransky, S.S. and Heeley, S.S. and Heeley, J.D.: Histological changes in experimental periodontal disease in gnotobiotic rats and conventional hamsters. J. Periodontal Res. 9: 73~80, 1974.
- 8) Garant, P.R.: Light and electron microscopic observations of osteoclastic alveolar bone resorption in rats mono-infected with *Actinomyces naeslundii*. J. Periodontol., 47: 717~723, 1976.
- 9) Hausmann, E., Raisz, L.G. and Miller, W.A.: Endotoxin; stimulation of bone resorption in tissue culture. Science 168: 862~864, 1970.
- 10) Hausmann, E., Weinfeld, N. and Miller, W. A.: Effects of lipopolysaccharide on bone resorption in tissue culture. Calc. Tiss. Res. 9: 272~282, 1972.
- 11) Hausmann, E., Luderitz, O., Knox, K. and Weinfeld, N.: Structural requirements for bone resorption by endotoxin and lipoteichoic acid. J. Dent. Res. 54: B 94~B 99, 1975.
- 12) 内田武志, 秀衡泰子, 穴村紳一, 白根 忠, 久保田みどり, 岡本 莫: 歯石および歯垢の内毒素量, 広大歯誌, 11: 74~80, 1979.
- 13) Irving, J.T., Heeley, J.D., Amdur, B.H. and Socransky, S.S.: 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.
- 14) Horton, J.E., Raisz, L.G., Simmons, H.A., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E.: Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leukocytes. Science 177: 739~795, 1972.
- 15) Luben, R.A., Mundy, G.R., Trummel, C.L. and Raisz, L.G.: Partial purification of osteoclast-activating factor from phytohemagglutinin-stimulated human leukocytes. J. Clin. Invest. 53: 1473~1480, 1974.
- 16) Schein, B. and Schilder, H.: Endotoxin content in endodontically involved teeth. J. Endod. 1: 19~21, 1975.