ラット骨膜血管の加齢変化 —その微細構築と透過性について—

李 繁 良

大阪歯科大学歯周病学講座

(指導：山岡 昭教授)

(平成3年9月20日受付)

Age-related Changes in the Periosteal Vasculature —Microvascular Architecture and Endothelial Permeability—

Shigeyoshi RI

Department of Periodontology, Osaka Dental University

5-31, Otemae 1-chome, Chuo-ku, Osaka 540 Japan

(Director : Prof. Akira YAMAOKA)

In order to investigate age-related changes in the periosteal microvasculature, the alveolar periosteum of the lingual side of the lower first molar region of the rat was examined in detail. Male Wistar rats aged 1, 3, 6, 12 and 24 months, whose microvascular architectures were successively studied by scanning electron microscopy, were used for this study. In addition, the ultrastructure of blood vessel endothelium, as it involved permeation, was observed by means of a tracer under transmission electron microscopy. The results indicate that, as the periosteum ages, changes in the morphology of the osteoblasts are accompanied by changes in the

distribution of the microvasculature in addition to reduce the endothelial permeability. In fact, active transformation of osteoblasts in the bone matrix during the first 3 months of life was accompanied by formation of dense networks of fenestrated capillaries around the osteoblasts. This was verified by permeation of a tracer, mainly through the fenestrations. By 6 months of age, during a resting stage in the process of osteogenesis, with almost no observable activity, the microvasculature tended to be sparse with capillaries being of the continuous type. During this period, the tracer was clearly observed to permeate the capillary wall via vesicles.

Key words : Aging, Periosteal vasculature, Microvascular architecture, Endothelial permeability, Rats

要旨 : ラット歯槽部骨膜血管の加齢変化を検索する目的で, Wistar 系雄性ラット生後1, 3, 6, 12 および24ヵ月の下顎第一臼歯部の舌側歯槽部骨膜を詳細に観察した。すなわち, その部の微細血管鑄型を走査電顕で, また血管内皮の透過に関する超微構造と tracer による透過性との関係を透過電顕で比較検討を行った。その結果, 加齢に伴う骨膜, とくに骨芽細胞の形態変化に対応して骨膜毛細血管の分布密度および内皮細胞の透過性が加齢的に低下していた。つまり, 骨芽細胞が活発な骨基質産生を行っていた生後3ヵ月までは, 毛細血管は骨芽細胞の外側面に密に分布し有窓型を呈し, 窓から tracer が透過していたが, 生後6ヵ月以降, 骨芽細胞の骨基質産生がほとんど認められない休止期には毛細血管は減少傾向を示し, 連続型を呈していた。その時期, tracer は主に形質膜小胞から透過して, 透過経路が変化していることが明らかになった。

索引用語：加齢，骨膜血管，微細血管構築，血管透過性，ラット

緒 言

歯周疾患は疫学的に，その有病率や程度が加齢と共に増加することが多くの研究者によって報告されており¹⁻⁵⁾，特に Marshall-Day と Shourie⁶⁾ は X線写真をパラメータとして歯槽骨の吸収状態を調査し，加齢に伴う骨喪失の進行を明らかにした。しかし，その原因についてはなお不明な点が多く，加齢に伴う歯周組織の抵抗性減弱に，なんらかの関係があると考えられる。

近年，骨膜の加齢変化については多くの研究者によって組織学的⁷⁻⁹⁾ならびに組織化学的¹⁰⁻¹²⁾に報告されている。それらによると，加齢的に骨膜はその厚さを減じ，分布する細胞は萎縮・変性し，細胞密度は低下する。さらに細胞内小器官の減少に伴う呼吸酵素活性，ATPase 活性の低下など，種々の酵素活性の変化が報告されている。これらの組織学および組織化学的变化は，血管の分布密度ならびに血管内皮の透過性の低下による細胞の代謝機能の低下が，一要因であると考えられる。

また，歯周外科治療を進めていくうえで，歯周外科処置の多くが骨膜結合組織（以下，骨膜）の再生能力に依存しており，したがって骨膜の加齢現象を認識することは予後判定に重要である。Finley ら¹³⁾が，良好な骨膜移植の施行には，骨膜の脈管再生が必要条件であると報告して以来，骨膜の血液供給に関する関心が高まった。しかし，骨膜血管の研究は，主に大腿骨や脛骨等の長管骨^{14,15)}に止まっていた。また，骨膜に分布する微細血管構築を三次元的観察によって詳細に報告したものは少なく，さらに歯槽骨に関したものは僅かに Nobuto ら¹⁶⁾が，健全な歯周組織を有する雑種成犬の歯周領域における骨膜の微細血管構築を血管鋳型と走査電子顕微鏡（以下，SEM）を用いて観察したものや，歯肉を部分層で剝離除去した後の創傷治癒にかかわる骨膜血管網の役割を観察した岩井¹⁷⁾の報告が有るにすぎない。しかしながら，これらの報告は組織特性の相違による骨膜血管網形態の解剖学的な比較や，創傷治癒に伴う骨膜血管の動態を述べたものであり，歯槽部骨膜血管の加齢的变化を詳細に観察した報告は皆無である。

本研究は，Wistar 系雄性ラット生後 1, 3, 6, 12, および 24 ヶ月の下顎第一臼歯部の舌側歯槽部骨膜血

管に Ohta ら¹⁸⁾の脈管注入法に従って作製された微細血管鋳型を SEM を用いて観察し，また血管内皮の透過に関する超微構造と tracer による透過性との関係を透過電子顕微鏡（以下，TEM）を用いて比較検討を行ったものである。

材料と方法

1. 実験材料

実験動物には，50 匹の Wistar 系雄性ラットを使用し，固形飼料（オリエンタル酵母，東京）と水道水を自由に与え，1 週間に上予備飼育を行った。ただし，生後 1 ヶ月のラットは離乳時期との関係から購入後直ちに実験に用いた。動物は健康状態良好のもので，歯周組織が健全なもの（GI=0, PI=0）を選択し，実験に用いた。

2. 観察方法

観察期間は生後 1 ヶ月，3 ヶ月，6 ヶ月，12 ヶ月および 24 ヶ月とし，観察部位は下顎第 1 臼歯部 ($\overline{M}_1$) の舌側歯槽部骨膜とした。

実験動物は光学顕微鏡（以下，光顕）用および TEM 用の組織標本に 2 匹，SEM 用の血管鋳型標本に 2 匹，血管透過性を調べるために tracer を注入した TEM 用組織標本に 6 匹をそれぞれ用いた。

1) 血管鋳型標本の作製：実験動物は pentobarbital sodium (Nembutal®, Abbott Laboratorie, USA) (30 mg/kg) による腹腔内麻酔下で開胸し，Ohta ら¹⁸⁾の脈管注入法に従って上行大動脈から手圧にて 20 ml/min の速度でアクリル樹脂を注入した。樹脂硬化後，凍結させて下顎骨を採取し，バンドソーで実験領域のトリミングを行った。その後 20% NaOH 溶液で軟組織を，20% HCl 溶液で硬組織を除去し，作製された血管鋳型標本を実体顕微鏡下でピンセットを用いて，歯根膜血管網と骨髄の血管網を剝離除去し，骨膜血管網を剖出した。これらの試料を凍結乾燥¹⁹⁾，金蒸着を施して HITACHI-S 430 走査電子顕微鏡（日立製作所，東京）にて骨側から観察した。

2) 組織標本の作製：上記のように麻酔下において上行大動脈から heparin sodium (ノボ・ヘパリン注 1000®, ノボインダストリー A/S, デンマーク) (1,000 単位/100 ml) を加えた生理食塩水にて灌流・脱血を行い，0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝 1% グルタル

アルデヒド・2% パラホルムアルデヒド混合固定液 (pH 7.6, 4°C) を 20 ml/min の速度で手圧にて注入し、灌流固定を行った。検索部位を 10% EDTA・4 Na 溶液 (pH 7.6) に 4°C で 2~3 週間浸漬し、脱灰を行った。脱灰完了後、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.6, 4°C) に 1 時間浸漬洗浄し、さらに 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝 1% 四酸化オスミウム溶液 (pH 7.6, 4°C) にて 1 時間後固定を行った。次いで上昇エタノール系列で脱水後、通法に従って Quetol-653 に包埋を行った。その後、MT-6000 超ミクロトーム (Du Pont Company Bioresearch Systems Sorvall® Products, Del, USA) で、厚さ 1 μ m の準超薄切片を作製し、トルイジンブルー染色を施して光顕的に観察した。さらにダイヤモンドナイフを用いて超薄切片を作製し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を施して HITACHI-H 800 透過電子顕微鏡 (日立製作所、東京) で観察した。

3) tracer 注入組織標本の作製：上記のように heparin sodium を加えた生理食塩水にて灌流、脱血後、tracer として horseradish peroxidase (Sigma Type II, MW: 40,000) (以下, HRP) とタンニン酸 (Wako Pure Chemical Industries, LTD, MW: 1,700) をそれぞれ生理食塩水に溶解して (HRP: 20 units/ml, タンニン酸: 20 μ g/ml) 注入した。tracer を注入して一定時間後、すなわち注入 30 秒後、注入 1 分後、注入 2 分後に、それぞれ上記固定液で灌流固定を行った。EDTA 脱灰後、HRP 注入組織標本は、Microslicer-DTK-1000® (堂坂イーエム、京都) で厚さ 40 μ m の切片を作製し、Graham and Karnovsky の方法²⁰⁾に従って DAB 反応を室温で 1 時間行った。また、tracer に対するコントロールは上記 2) の組織標本の一部を使用し、同様に DAB 反応を行った。反応後、タンニン酸注入組織標本と同様に通法に従って Quetol-653 に包埋を行った。超薄切片の観察に際して tracer を明確にするため、無染色で観察を行った。

実験結果

A. コントロール群

tracer に対するコントロールとして heparin sodium を加えた生理食塩水で灌流したものと、tracer を注入したものを比較したところ、光顕および電顕レベルにおいて何ら形態的な差異は認められなかった。

B. 実験群

1) 生後 1 ヶ月

[組織所見]：骨の表面形状は凹凸不整で、最表層には未石灰化骨基質である類骨層が比較的厚い層をなして存在していた。また、陥凹部には類骨が形成され、血管が骨内に封入されている像が認められた (図 1 A)。

骨膜は骨表面から単層立方上皮様配列の骨芽細胞層、その粘膜側に楕円形の細胞が 1~2 層に配列した未分化間葉系細胞である骨原性細胞層、さらに骨膜最表部に位置する線維芽細胞層により構成されていた。骨芽細胞は円形または楕円形の核を有し、粘膜側に遍在していた。豊富な細胞質内には、核近傍によく発達したゴルジ体と、それを取り囲むように粗面小胞体が存在し、大きな卵円形もしくは円形のミトコンドリアが多数認められ、活発な骨基質産生像を呈していた。また、骨芽細胞は相互に gap junction で結合していた。骨芽細胞層に接する骨原性細胞は、比較的豊かな細胞質中に未発達ながらもゴルジ体や粗面小胞体を有していた。また線維芽細胞層は骨膜最表部に位置し、1~2 層に配列する線維芽細胞間は膠原線維によって充されていた。

骨膜に分布する血管としては、骨原性細胞層には毛細血管が分布し、骨膜線維層と歯肉固有層の境界部には細動静脈が分布していた。毛細血管は 1~2 個の内皮細胞から成り、比較的厚い細胞質内に多くの細胞質内小器官を有し、内皮細胞間は tight junction で結合していた (図 1B)。内皮細胞間の結合形態は、単純な end-to-end type (図 1C) と simple overlap type (図 1D) のものが多く、mortice type (図 1E) のものも認められた。これらの毛細血管は連続型のものが多く、また内皮細胞の管腔側には短い microvilli 様突起も存在し、少数ながら隔膜を有する窓も認められた。また、毛細血管の内皮細胞および pericyte の基底膜 (厚さ 30~40 nm) は、スムーズな血管壁に沿って連続的な走行を示していた。

[血管鋳型所見]：骨膜に分布する血管を骨側から観察すると、毛細血管 (太さ 10~15 μ m) が、密で不規則な網目を形成し、歯肉の血管網や Volkmann 管を経て骨中の血管網さらに歯根膜血管網とも交通していた。またこれらの血管は、歯槽頂付近で骨面に向けて不規則な毛細血管ループを形成しているのが所々観察された (図 1F)。

[tracer 注入組織所見]：HRP 分子は、注入 30 秒後

では内皮細胞の管腔側表面や管腔側に近い形質膜小胞(直径 60~70 nm)内に高密度に認められた。内皮細胞間の接合部も同様に管腔側より認められたが、tight junction によって透過が阻止されていた(図 1 G)。注入 1 分後では、HRP 分子は血管周囲の広範囲にわたって細胞や膠原線維の表面に高密度に認められ(図 1 H)、骨芽細胞間にまで達していた(図 1 I)。

それに対してタンニン酸分子は、注入 30 秒後に血管周囲の広範囲にわたって高密度に認められ、すでに骨芽細胞間にまで達していた(図 1 J)。またタンニン酸分子は内皮細胞間の接合部に連続的に観察され、その直下にもタンニン酸分子が存在し、透過していた。

2) 生後 3 ヶ月

[組織所見]: 骨の表面形状は、生後 1 ヶ月よりも凹凸不整の程度が緩徐になっていたが、依然として厚い類骨層が認められ、骨面上に単層配列する骨芽細胞は活発な骨基質産生像を呈していた(図 2 A)。骨膜毛細血管は、連続型と有窓型のものが混在していたが、有窓型の占める割合が観察期間中ピークに達し、また広い有窓野を持つものが数多く認められた(図 2 B)。毛細血管の有窓野の位置は一致していないが、骨芽細胞に面するような位置をとる傾向が認められた。また、基底膜は広い有窓野の部分では断続的で不明瞭になっていた(図 2 C)。

[血管鑄型所見]: 骨膜の血管構築は、生後 1 ヶ月のものよりよく整理されていた。つまり毛細血管(太さ 15~25 μm)は相互の間隔が広くなり、平坦な亀甲状の網目の血管網を形成していた(図 2 D)。

[tracer 注入組織所見]: HRP 分子およびタンニン酸分子は共に注入 30 秒後には毛細血管から多量に透過し、骨芽細胞間に明瞭に観察された(図 2 E, 2 F)。つまり HRP 分子は、内皮細胞の管腔側表面や有窓野に認められる多数の窓の隔膜に付着し、その直下にはすでに透過した HRP 分子が高密度に認められた(図 2 G)。内皮細胞間接合部において HRP 分子は tight junction によって透過が阻止されていたが、タンニン酸分子は透過していた。

3) 生後 6 ヶ月

[組織所見]: 骨表面の凹凸不整はもはや認められず、骨表面に存在していた類骨層はほとんど消失し、平坦な表面形状を呈していた(図 3 A)。

骨膜全体の厚さは減少し、骨面上に配列する骨芽細胞は楕円形に変化していた。細胞質は減少し、核と細胞質との比は小さくなって、核の偏在性は不明瞭に

なっており、細胞質の減少に伴い、細胞質内小器官も減少していた。骨膜毛細血管は、生後 3 ヶ月では有窓型が多数を占めていたが、生後 6 ヶ月になると連続型の占める割合ははるかに増加していた(図 3 B)。しかし、有窓型においても少数の窓が認められるだけで、広い有窓野は存在していなかった。

毛細血管の内皮細胞内には形質膜小胞(直径 60~120 nm)が多数含まれ、ときには 2~3 の形質膜小胞が連続して channel を形成していた(図 3 C)。また管腔側には 0.5~1 μm と比較的長い microvilli 様突起を多数有していた。内皮細胞間の結合形態は、生後 3 ヶ月までの単純なものだけでなく、marginal fold を形成した complex type のものが認められるようになった(図 3 D)。

[血管鑄型所見]: 骨膜に分布する毛細血管は整理され、分布密度は減少していた。すなわち、毛細血管相互の間隔がさらに広くなり、生後 3 ヶ月に認められた亀甲状の血管網がやや不明瞭になっていた(図 3 E)。

[tracer 注入組織所見]: HRP 分子は、注入 30 秒後から 1 分後では管腔側近く、多数の形質膜小胞内に高密度に認められたが、まだ管腔内に限局していた(図 3 F)。しかし注入 2 分後には管腔外に開放している形質膜小胞内に HRP 分子が認められ、隣接の細胞表面にも観察され透過していることが確認されたが、骨芽細胞までは達していなかった(図 3 G)。

それに対してタンニン酸分子は、注入 30 秒後には形質膜小胞内、内皮細胞間接合部および隣接の細胞表面に観察された(図 3 H)。またこの時期に認められる complex type の内皮細胞間接合部においてさえも、これまでと同様タンニン酸分子が連続的に観察され、管腔外にタンニン酸分子が透過していた(図 3 I)。さらに注入 2 分後には骨芽細胞間に不明瞭ではあるが一部タンニン酸分子が認められた(図 3 J)。

4) 生後 12 ヶ月

[組織所見]: 骨芽細胞は細胞質がさらに減少し、紡錘形の線維芽細胞様を呈し、核の偏在性も不明瞭であった。また、骨芽細胞間に膠原線維が入り込み、細胞間の連続性が一部消失していた。また、骨表面には類骨層は認められず、高電子密度の lamina limitans が認められるようになり、骨芽細胞の骨基質産生の停止が伺われた(図 4 A, 4 B)。

骨膜毛細血管は全て連続型で扁平化し、管腔の狭窄が認められた。内皮細胞内に認められる形質膜小胞は、生後 6 ヶ月のものと比較して明らかに減少傾向にあっ

た(図4B)。また、細胞質の萎縮に伴い、管腔外にも細胞質突起を形成し、不規則な外観を呈するものもまれに認められた。内皮細胞の基底膜は連続的ではあるが、その厚さは不均一になり、一部走行の乱れが認められた(図4C)。

[血管鑄型所見]: 骨膜の血管網はさらに整理されることにより、生後3ヵ月に認められた亀甲状の血管網は消失し、それに代って、骨体部から歯槽縁へ直線的走行を示す毛細血管が、垂直的な交通枝を派出し、明瞭な階段状の血管網が形成されていた。しかし、すでにこの時期の毛細血管には一部に消失傾向が認められた(図4D)。

[tracer 注入組織所見]: HRP 分子は注入1分後まで管腔内に局限していたが、注入2分後には少数の形質膜小胞内や管腔外に不明瞭ではあるが認められた(図4E)。

タンニン酸分子も HRP 分子と同様、注入2分後に形質膜小胞内、内皮細胞間接合部および管腔外に認められた。しかし、管腔外に透過した両分子は、血管周囲を取り巻く pericyte や密な膠原線維によって、隣接の細胞表面に局限していた(図4F)。

5) 生後24ヵ月

[組織所見]: 骨芽細胞はさらに細胞質が減少し、細胞質内小器官はほとんど認められず、細胞間の結合状態も断続的になっていた。骨表面の lamina limitans の電子密度は高くなり、一層明瞭になっていた。

残存する毛細血管は不規則な外観を呈し、管腔は狭窄されたものが多く認められた(図5A, 5B)。

内皮細胞の基底膜は120~170 nm と肥厚し、一部走行の乱れた部分が観察された(図5C)。

[血管鑄型所見]: 骨膜血管は萎縮し、その配列は直線的で並走する細動脈だけとなり、ほとんど毛細血管は認められなかった。さらに細動脈にも一部、萎縮・消失傾向が観察された(図5D)。

[tracer 注入組織所見]: HRP 分子は生後12ヵ月と同様、注入1分後まで管腔内に局限し、注入2分後には形質膜小胞内や管腔外に不明瞭ではあるが認められた(図5E)。タンニン酸分子も HRP 分子と同様、注入2分後には形質膜小胞内、内皮細胞間接合部および管腔外に認められた。しかし、形質膜小胞の減少に伴って透過量も減少していた(図5F)。また管腔外に透過した両分子は、生後12ヵ月と同様、血管周囲を取り巻く pericyte や密な膠原線維によって、隣接の細胞表面に局限していた(図5E, 5F)。

考 察

1. 実験動物と実験部位について

加齢の研究にはこれまで、マウス^{8,9,12,21)}、ラット^{7,11,22,23)}、ゴールデンハムスター^{24,25)}、ヒト^{26~30)}等が用いられている。特にマウスでは、近交系繁殖によって寿命が1年以下のBNL (Brookhaven National Laboratory Swiss albino) マウス³¹⁾や老化促進モデルマウス (Senescence Accelerated Mouse; SAM)³²⁾が開発され、研究の短縮化と遺伝的統御が確立されている点から加齢の研究に最近脚光をあびている。しかしながら、近交系マウスは何らかの寿命を短くする遺伝的要因を持っていることから、欠陥を持った変化であり、マウス本来の加齢の研究には不相当であると考えられる。一方、藤村³³⁾は、ゴールデンハムスターとラット、マウスの付着上皮下毛細血管の形態を比較検討している中で、ゴールデンハムスターの第一臼歯部の頰側歯肉は、歯肉・頰移行部が歯槽頂よりも歯根側に位置し、ヒトと同様にいわゆる付着歯肉が形成されていた。ラット、マウスの第一臼歯部の頰側歯肉は歯肉・頰移行部が歯槽頂、またはそれより歯冠側に位置し、口腔前庭が浅く、いわゆる付着歯肉は観察されなかったことから、ヒトを想定した動物実験モデルとしては、ゴールデンハムスターの第一臼歯部が適切であると述べている。しかし、ゴールデンハムスターはラットやマウスと比較して容易に歯肉炎を起こすことから、炎症的要因を加齢的变化から削除する必要があると考えた。さらに、本研究の目的の一つである歯槽部骨膜血管構築を3次元的に詳細に観察するためには、血管鑄型標本の作製が必要不可欠であるが、個体の小さいマウスやゴールデンハムスターでは、試料作製時の実験手技が困難である。以上の諸点を考慮して、寿命が3年と比較的短く、実験操作が容易なラットを用いた。

実験部位については、ヒト大臼歯と同様、一生歯性の臼歯部を選択し、生涯萌出を続ける前歯部は、その機能的な面が特異であるため避けた。また、第二、第三臼歯部は顎舌骨筋の付着部位となっているので、筋に分布する血管と骨膜血管との混同が生じない第一臼歯部を選択した。さらに、血管鑄型標本の作製は頰側および舌側の両方について行ったが、軟組織腐蝕の際、頰側の血管鑄型は筋組織と共に骨から剝離し、骨膜血管が破壊されることが多いため、骨膜血管の形態的差

異のない舌側を観察の対象とした。

2. 歯槽部骨膜の血管構築について

歯周領域における骨膜の微細血管構築を、Nobutoら¹⁶⁾は血管鋳型とSEMを用いて詳細に観察した結果、付着歯肉領域と歯槽粘膜領域の骨膜血管構築は、歯肉・歯槽粘膜境において明らかに異なっていたと報告し、骨膜血管網は組織特性の相違を反映して血管網形態が異なると述べている。また、藤村³³⁾はラットの第一臼歯部の頬側歯肉には、いわゆる付着歯肉は観察されなかったと報告している。本実験においては、ラット下顎第一臼歯部舌側の歯槽頂から根尖相当部までの骨膜血管を、血管鋳型とSEMを用いて詳細に観察したが、その部の骨膜血管構築には形態差は認められず、また頬側における骨膜血管構築と同様の形態をとっていたことから、ラット第一臼歯部舌側には、骨膜血管網の形態からみて頬側と同様、付着歯肉様形態は存在しないと考えられる。

3. 歯槽部骨膜血管の加齢変化について

骨のremodelingに血管が関与していることは、歯の移動に伴う骨改造現象を検索した多くの研究³⁴⁻³⁷⁾によって明らかである。すなわち、このような機序の進行には新陳代謝が活発になるため、一層多量の血液供給が必要となり、血管の分布密度が増加する。つまり、血管の分布状態の変遷は分布する組織の代謝状態をよく反映していると考えられる。細山³⁸⁾や小林³⁹⁾は、歯の移動に伴う歯根膜血管網を血管鋳型とSEMを用いて観察し、牽引側の骨の添加の激しいときは、比較的大い細動脈レベルの血管までが添加骨の中に埋没されていたと報告している。岩久と小澤¹⁵⁾はラット脛骨骨膜血管網を観察し、骨膜血管網の形状の変化は、骨の形成、吸収または休止などの各時期に呼応して機能していると報告し、平坦な骨表面に密接して存在する毛細血管は密な網工を形成し、骨質に埋め込まれつつある毛細血管像は骨形成と深い係わり合いを有すると述べていた。本実験において、生後1~3ヵ月の骨芽細胞は、Tonna⁶⁾がBNLマウスについて、大腿骨骨膜の生後5週齢の骨芽細胞を観察した組織所見と同様、骨芽細胞は細胞内によく発達したゴルジ体とそれを取り囲むように粗面小胞体が存在し、多数のミトコンドリアが散在し、活発な骨基質産生像を呈していた。また、この時期の毛細血管の形態と透過性を観察すると、生後1ヵ月では毛細血管は連続型のものが多く、比較的厚い細胞質内に多くの細胞質内小器官を有する幼若な形態を呈していたが、生後3ヵ月になると広い有窓

野を持った有窓型に変化し、分化程度の高い形態を呈していた。透過性については、HRP分子は生後1ヵ月では注入1分後に、生後3ヵ月では注入30秒後に骨芽細胞間に達し、タンニン酸分子は、共に注入30秒後に骨芽細胞間に達し、高い透過性を示していた。これらの所見からも、骨芽細胞が活発な代謝を行っていることが裏付けられるとともに、骨面上に密接して存在する毛細血管の一部は骨質内に埋め込まれることが十分考えられる。一方、岩井¹⁷⁾は、歯肉の部分層剝離除去後の創傷治癒にかかわる骨膜血管網の形態変化の観察で、骨吸収窩に対応して毛細血管ループが形成されたと報告している。同様に、本実験においても少数であるが生後1ヵ月に骨面に向けての不規則な毛細血管ループが観察された。しかし、炎症性細胞および破骨細胞は認められなかったことから、単に、骨陷凹部に存在する骨芽細胞へ血液を供給するための毛細血管ループであり、その部の骨芽細胞は特に骨基質の産生が活発であると考えられる。これらのことから、骨の急速な添加に伴う陷凹部の消失および毛細血管ループの骨への封入によって血管網が整理させ、生後3ヵ月には平坦で明瞭な亀甲状の血管網が形成されたと考えられる。また、このように骨芽細胞が活発に機能している時期において、その代謝を担っている毛細血管は亀甲状の血管網形態をとり、単位面積当たりの分布密度を高めるための有効な形態を呈していた。

生後6ヵ月になると、骨芽細胞は楕円形に変化し、核の偏在性が不明瞭になり、細胞質内小器官も減少し、さらに類骨層が不明瞭になっていることから、骨芽細胞の骨基質産生が減少したと考えられる。それに伴って毛細血管も減少して亀甲状が不明瞭になり、また毛細血管の形態もほとんどが連続型であった。吉田ら⁴⁰⁾は、ラット臼歯の歯髓血管の加齢変化をTEMを用いて観察した結果、生後1日で毛細血管が象牙芽細胞層に進入を開始し、生後60日を過ぎると、次第に象牙芽細胞層から後退を始めることを明らかにし、さらに、発生の初期には全て連続型によって構成されていた毛細血管は、生後15日から有窓型が多数観察されるようになり、生後30日を過ぎるとほとんど連続型に変化していたと報告している。これらのことから、毛細血管と象牙芽細胞の相対的位置関係は象牙芽細胞の活性と密接に関連していると述べ、形態に関しては、有窓型毛細血管はすでに象牙質形成が減少し始めた頃に出現し、まだ象牙質形成が行われている間に消失してしまうことから、象牙質形成との関係を認めながら、エナ

メル質の成熟にも何らかの役割を果たしている可能性を示唆した。本実験において、生後1ヵ月から生後24ヵ月の全期間を通じて、骨膜毛細血管は主に骨原性細胞層に存在し、骨芽細胞の活性と毛細血管の位置関係に変化はなく、吉田らの報告とは異なっていた。しかし毛細血管内皮の形態的推移に関しては骨芽細胞と象牙芽細胞間には相違があるがほぼ同様の所見が得られた。しかしながら吉田らは内皮細胞の窓についての述べ、他の透過に関する諸構造については言及していなかった。本研究において生後6ヵ月の骨膜毛細血管の内皮細胞内には多数の形質膜小胞が認められ、2~3個の形質膜小胞が連続してchannelが形成されていた。血管透過性についてはHRP分子は、注入2分後に管腔外に認められ、タンニン酸分子は注入30秒後で管腔外に、注入2分後で骨芽細胞間に認められた。これらのことから骨膜毛細血管は連続型であったが依然高い透過性を示し、骨芽細胞の骨基質産生に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

生後12ヵ月になると、骨芽細胞は線維芽細胞様を呈していた。また、骨芽細胞間には膠原線維が入り込み、細胞間の連続性が一部消失し、さらに骨表面には類骨層は認められず、高分子密度のlamina limitansが観察されることから、骨芽細胞の骨基質産生の停止が同われた。この時期、毛細血管はさらに減少し、特徴的な階段状の網工が形成されていた。生後24ヵ月になると、骨芽細胞の萎縮に伴って毛細血管はほとんど消失していた。小林⁴¹⁾はイヌの歯髓血管網の加齢変化を血管鋳型とSEMを用いて観察した結果、歯髓血管構築は表層から終末毛細血管網、毛細血管網、細静脈網の3層が区別され、これらは加齢による歯髓腔の狭窄に伴って改築されて毛細血管網と細静脈網が消失し、一層の粗な血管網に変化していたと報告している。同様に骨膜毛細血管も、加齢による骨芽細胞の機能的変化に伴って血管構築が変化し、分布密度が減少していた。

一般に、歯周外科処置は血管新生や肉芽組織形成などの骨膜の旺盛な再生能力を基盤として行われており、骨膜への対応がその予後を左右する重要な要因であると考えられている。このことは、信藤⁴²⁾が行った実験手技に基づいて、遊離歯肉自家移植術後の受容床における骨膜の有無による修復過程を比較するために、柳原⁴³⁾は骨膜を除去した裸出骨床への遊離歯肉自家移植術後の微細血管構築をSEMを用いて詳細に観察した。その結果、裸出骨床への遊離歯肉自家移植は、骨膜上への遊離歯肉自家移植に比べ、7日以上治癒が遅

延すると報告している。また、歯肉を部分層で除去した際、歯肉骨膜血管網は歯肉の再生ならびに骨の吸収、添加に伴う旺盛な血管新生の基盤として働くという報告¹⁷⁾からも明らかである。このように、加齢変化を受けた骨膜血管網では、特に炎症の防御機構や創傷治癒の主役をなす微小循環系のほとんどが消失し、細動静脈を残すのみとなったことや、生後12ヵ月、生後24ヵ月に観察された残存する毛細血管の透過性が減少したことから、炎症に対する抵抗性減弱や治癒遅延が引き起こされることが示唆された。

また、Urago⁴⁴⁾はヒト全身諸骨に認められた骨吸収を病理組織学的に検討し、破骨細胞性吸収(骨破壊 osteoclastosis)と無破骨細胞性吸収(骨融解 osteolysis)とに分類しうることを提唱し、全身諸骨に起こる組織学的老化現象は骨融解形式であると述べた。破骨細胞による骨吸収の場合、血管新生が関与することは明らかであるが、Uragoのいう骨融解の場合は、加齢に伴う骨芽細胞の減少によって骨代謝が低下し、石灰脱出などの吸収が優位を占めるために起こると考えられ、加齢に伴う毛細血管の減少もその要因の一つと考えられた。

4. 透過経路の加齢変化について

血管の物質透過に関して古くから形態学的、生理学的^{45,46)}に議論されている。特に形態学的には内皮細胞間接合部⁴⁷⁻⁵⁰⁾、内皮細胞内の形質膜小胞⁵¹⁾、窓⁵²⁾が透過に寄与する主な構造であることは過去の報告からも明らかである。また近年、物質の透過性は腫瘍^{53,54)}や炎症⁵⁵⁾など血管周囲の環境によっても左右され、透過性が亢進することが報告されている。しかし毛細血管の加齢変化に伴う透過性の変化についての報告は見られない。そこで今回、骨膜毛細血管を対象に骨芽細胞の加齢変化によって透過性がどの様に変化するかをHRPとタンニン酸を用いて検索した。

Bennettら⁵⁶⁾は内皮細胞の形態的特徴から全身各所の毛細血管を3型に分類した。第1型は無窓性で接合部にtight junctionが存在するもの、第2型は有窓性で接合部にtight junctionが存在するもの、第3型は内皮細胞間に数 μm の間隙があるものである。しかしこれらの形態も臓器によって必ずしも決っておらず、また時期や環境によっても割合が変化する。本実験では生後1ヵ月では主に連続型、生後3ヵ月には有窓型の占める割合がピークに達し、生後6ヵ月には再び連続型が増加し、生後12ヵ月、生後24ヵ月ではほとんど連続型であった。つまり骨芽細胞の代謝活性の状態を

反映して毛細血管形態も変化していた。

また、毛細血管の内皮細胞間の透過性に関して Reese and Karnovsky⁴⁹⁾, Karnovsky⁵⁰⁾ は脳の毛細血管では HRP 分子 (MW: 40,000) は通過できないが、筋毛細血管では通過できると述べ、Simionescu ら⁴⁸⁾ はヘムペプチド分子 (MW: 1550), 藤村⁶¹⁾ はタンニン酸分子 (MW: 1700) でも通過できないと報告するなど、議論が分かれ統一見解は得られていない。本実験結果においても、HRP 分子は観察期間を通じて tight junction によって透過が阻止されていたが、タンニン酸分子に関しては透過していた。この結果もまた上の記述と矛盾している。一方、Schwarz and Benditt⁵⁷⁾ はラット大動脈の内皮細胞間結合の形態を 4 型に分類した。第 1 型は end-to-end type, 第 2 型は simple overlap type, 第 3 型は mortice type, 第 4 型は complex type で、さらに透過性を調べて細胞間の結合形態によって透過性が左右されると報告した。また Hüttner ら⁵⁸⁾ は細胞間結合を 4 型に分類した。すなわち第 1 型は complete, impermeable tight junction, 第 2 型は zonular occludence, 第 3 型は incomplete, permeable tight junction, 第 4 型は gap junction で、大動脈の部位により透過性に差が生じるのは incomplete, permeable tight junction に起因すると述べた。さらに Simionescu ら⁴⁸⁾ や Bundgaard^{59,60)} によって、内皮細胞間の tight junction の連続性は血管の種類によって異なり、毛細血管の内皮細胞間の tight junction は不連続であると報告されている。これらのことから本実験の観察部位が骨膜血管で、他の脳、筋肉および歯肉の血管とは内皮細胞間の tight junction の状態が異なるために透過性に差が出たと考えられる。つまり骨膜毛細血管の細胞間接合部には HRP 分子は透過しないが、タンニン酸分子は透過できる間隙があると考えられる。

生後 6 ヶ月の毛細血管はほとんどが連続型で、多数の形質膜小胞を含み時には 2~3 個の形質膜小胞が連続して channel 形成が認められた。生後 3 ヶ月と透過性を比較すると、透過に要する時間と透過量に明らかな差が認められたことから、形質膜小胞による物質輸送は窓に比べて遅く、その量も少ないと考えられた。しかし channel 形成が認められない生後 12 ヶ月と比較しても透過に要する時間に変化が認められなかった。この原因としては、単に channel 形成部位が少ないために、初期には確認できないほど透過量が少なかったためか、あるいは channel 部の透過には形質膜小胞による透過と同じ時間を要するなどの 2 つが考え

られる。山本⁶²⁾ は血管に灌流固定後タンニン酸を注入すると、内皮細胞内に遊離している形質膜小胞もラベルされることから、形質膜小胞は断面的な観察のために小胞形態であるが、実際は管腔を形成している可能性があると報告している。従って形質膜小胞が管腔の一断面であるなら、本実験結果と一致すると考えられる。

結 論

ラット歯槽部骨膜血管の加齢変化を検索する目的で、その部の微細血管鋳型を走査電顕で、血管内皮の透過に関する超微構造と tracer による透過性との関係を透過電顕を用いて比較検討を行った結果、以下の結論を得た。

1. ラット下顎第一臼歯部においては、歯槽頂から根尖相当部までの骨膜血管の微細血管構築に差異が認められないことから、付着歯肉としての形態は存在していなかった。
2. 生後 1 ヶ月の骨表面は凹凸不整で、単層立方上皮様に骨芽細胞が配列していた。骨膜の血管構築は毛細血管が密で不規則な網目を形成していた。毛細血管は比較的厚い細胞質を有し、ほとんどが連続型で、内皮細胞間は全て tight junction で結合していた。HRP 分子は注入 30 秒後で形質膜小胞内に認められたが、接合部では tight junction によって透過が阻止されていた。しかしタンニン酸分子は接合部で連続的に観察され透過していた。また、HRP 分子は注入 1 分後には多量に透過し、骨芽細胞間にまで達していた。
3. 生後 3 ヶ月の骨表面の凹凸不整の程度は緩徐になっていたが、骨芽細胞は依然、活発な骨基質産生像を呈していた。骨膜血管網は整理され、毛細血管は相互間隔が広くなり、平坦な亀甲状の血管網を形成していた。毛細血管は有窓型が観察期間中最も多く認められた。HRP 分子とタンニン酸分子はともに注入 30 秒後に骨芽細胞間にまで達していた。
4. 生後 6 ヶ月になると、骨芽細胞は楕円形に変化していた。骨膜血管網は整理され、毛細血管相互の間隔がさらに広くなり、亀甲状の血管網がやや不明瞭になっていた。毛細血管は連続型が増加し、多数の形質膜小胞を含み、channel 形成も認められた。HRP 分子は注入 2 分後に管腔外に認められたが、骨芽細胞までは達していなかった。タンニン酸分子は注入 30 秒後で管腔外に認められ、注入 2 分後に骨芽細胞表面に認め

られた。

5. 生後 12ヵ月では、骨芽細胞は線維芽細胞様を呈して細胞間の連続性が一部消失し、さらに骨表面には高電子密度の lamina limitans が認められ、骨基質産生の停止が伺われた。骨膜血管網はさらに整理され、階段状の網工に変化していた。毛細血管は全て連続型で、形質膜小胞は減少し、管腔の狭窄が認められた。HRP 分子とタンニン酸分子は注入 2 分後に管腔外に認められたが、隣接している細胞表面に局限していた。

6. 生後 24ヵ月になると、骨表面の lamina limitans はさらに明瞭になっていた。骨膜血管網は萎縮して直線的で、並走する細動静脈だけとなり、ほとんど毛細血管は認められなかった。残存する毛細血管は不規則な外観を呈し、管腔の狭窄されたものが多かった。HRP 分子とタンニン酸分子は注入 2 分後に管腔外に透過していたが、その量は生後 12ヵ月に比べ減少していた。

以上の結果より、加齢に伴う骨膜、特に骨芽細胞の形態変化に対応して骨膜毛細血管の分布密度および内皮細胞の透過性が加齢的に低下することが明らかになった。さらに、加齢変化が進むと骨膜血管は特に炎症の防御機構や創傷治癒の主役を成す微小循環系のほとんどが消失して太い細動静脈を残すのみとなったことや残存する毛細血管の透過性が減少していることから、炎症に対する抵抗性の減弱や治癒の遅延が惹き起こされることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました大阪歯科大学歯周病学講座 山岡 昭教授に謹んで感謝の意を表します。さらに貴重な御教示と御校閲を頂きました大阪歯科大学解剖学講座 太田義邦教授に心より深謝致します。また本研究の遂行に際し、直接御指導を賜りました歯周病学講座 信藤孝博博士ならびに御教示、御助言を賜りました歯周病学講座 今井久夫助教授に深謝申し上げます。

本研究の一部は、平成 3 年度大阪歯科大学学術研究奨励助成金の交付によって行われたので併せて謝意を表します。

文 献

- 1) Schour, I. and Massler, M.: Gingival disease in postwar Italy (1945): 1. Prevalence of gingivitis

- in various age groups. J. Amer. Dent. Ass., 35: 475-482, 1947.
- 2) Massler, M., Schour, I. and Chopra, B.: Occurrence of gingivitis in suburban Chicago school children. J. Periodontol., 21: 146-164, 1952.
- 3) Russell, A.L.: Some epidemiological characteristics of periodontal disease in a series of urban populations. J. Periodontol., 28: 186-193, 1957.
- 4) Scherp, H.W.: Current concepts in periodontal disease research. —Epidemiological contributions. — J. Amer. Dent. Ass., 68: 667-675, 1964.
- 5) Holm-Pedersen, P., Agerbaek, N. and Theilade, E.: Experimental gingivitis in young and elderly individuals. J. Clin. Periodontol., 2: 14-24, 1975.
- 6) Marchall-Day, C.D. and Shourie, K.L.: A roentgenographic survey of periodontal disease in India. J. Amer. Dent. Ass., 39: 572-588, 1949.
- 7) Cameron, D.A.: The fine structure of osteoblasts in the metaphysis of the tibia of the young rat. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9: 583-595, 1961.
- 8) Tonna, E.A.: Electron microscopy of aging skeletal cells. —III. The periosteum.— Lab. Invest., 31: 609-632, 1974.
- 9) Tonna, E.A. and Pillsbury, N.: Mitochondrial changes associated with aging of periosteal osteoblasts. Anat. Rec., 134: 739-759, 1959.
- 10) Bevelander, G. and Johnson, P.L.: A histochemical study of the development of membrane bone. Anat. Rec., 108: 1-21, 1950.
- 11) Tonna, E.A.: Histologic and histochemical studies on the periosteum of male and female rats at different ages. J. Gerontol., 13: 14-19, 1958.
- 12) Tonna, E.A. and Severson, A.R.: Changes in localization and distribution of adenosine triphosphatase activity in skeletal tissues of the mouse concomitant with aging. J. Gerontol., 26: 186-193, 1971.
- 13) Finley, J.M., Acland, R.D. and Wood, M.B.: Revascularized periosteal grafts. —A new method to produce functional new bone without bone grafting.— Plast. Reconstr. Surg., 61: 1-6, 1978.
- 14) Simpson, A.H.R.W.: The blood supply of the periosteum. J. Anat., 140: 697-704, 1985.
- 15) 岩久文彦, 小澤英浩: 骨の微小血管構築—第一報 鋳型標本からみた長骨骨幹骨膜の立体血管網工の形態—. 新潟歯学会誌, 15: 11-18, 1985.
- 16) Nobuto, T., Yanagihara, K., Teranishi, Y., Minamibayashi, S., Imai, H. and Yamaoka, A.: Periosteal microvasculature in the dog alveolar process. J. Periodontol., 60: 709-715, 1989.
- 17) 岩井勝美: 歯肉骨膜血管網の再認識と創傷治癒にかかわる形態変化の観察. 日歯周誌, 31: 343-359, 1989.
- 18) Ohta, Y., Okuda, h., Suwa, F., Okada, S. and Toda, I.: Plastic injection method for preparing microvascular corrosion casts for SEM and its prac-

- tical application. *Okajimas Folia Anat. Jpn.*, 66 : 301-312, 1990.
- 19) Katoh, M. : Freon-TF freeze drying method for SEM sample. *J. Electron. Microsc.*, 27 : 329-330, 1978.
 - 20) Graham, R.C. and Karnovsky, M.J. : The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney — Ultrastructural cytochemistry by a new technique. — *J. Histochem. Cytochem.*, 14 : 291-302, 1966.
 - 21) Baer, P.N. and Bernick, S. : Age changes in the periodontium of the mouse. *Oral Surg.*, 10 : 430-436, 1957.
 - 22) Belting, C.M., Schour, I., Weinmann, J.P. and Shepro, M.J. : Age changes in the periodontal tissues of the rat molar. *J. Dent. Res.*, 32 : 332-353, 1953.
 - 23) Toto, P.D., Rubinstein, A.S. and Gargiulo, A.W. : Labelling index and cell density of aging rat oral tissues. *J. Dent. Res.*, 54 : 553-556, 1975.
 - 24) Rushton, M.A. : The epithelial downgrowth on the molar roots of golden hamsters. *Br. Dent. J.*, 90 : 87-93, 1951.
 - 25) Klingsberg, J. and Butcher, E.O. : Comparative histology of age changes in oral tissues of rat, hamster and monkey. *J. Dent. Res.*, 39 : 158-169, 1960.
 - 26) Wentz, F.M., Maier, A.W. and Orban, B. : Age changes and sex differences in the clinically "normal" gingiva. *J. Periodontol.*, 23 : 13-24, 1952.
 - 27) Bennett, C.G., Kelln, E.E. and Biddington, W.R. : Age changes of the vascular pattern of the human dental pulp. *Arch. Oral Biol.*, 10 : 995-998, 1965.
 - 28) Grant, D. and Bernick, S. : The periodontium of aging humans. *J. Periodontol.*, 43 : 660-667, 1972.
 - 29) 浦郷篤史, 大家 清, 李 載二, 徳富敏信, 末森多賀生, Aurora Matsuzaki : 成人歯根膜の加齢的変化に関する病理組織学的研究. *歯基礎誌*, 22 : 227-237, 1980.
 - 30) 北村昌三, 瀬川和之, 小口幸司 : 幼若骨と老齢骨の骨細胞の走査電子顕微鏡的研究. *昭歯誌*, 6 : 114-120, 1986.
 - 31) Tonna, E.A. : Parodontal inflammation and aging in the laboratory mouse. *J. Periodontol.*, 43 : 403-410, 1972.
 - 32) Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., Ishii, M. and Yamamuro, T. : A new murine model of accelerated senescence. *Mech. Ageing Dev.*, 17 : 183-194, 1981.
 - 33) 藤村 朗 : ゴールデンハムスターの付着上皮下毛細血管に関する研究—第1編 ゴールデンハムスターとラット, マウスとの比較—. *歯科学報*, 87 : 463-483, 1987.
 - 34) 中村進治 : 歯根膜血管走向の矯正学的研究—第2報 矯正装置の圧力に対する圧迫側歯根膜血管の反応—. *口腔病学会雑誌*, 34 : 342-358, 1967.
 - 35) 藍原繁樹 : 歯牙移動時における歯周組織の血管の動向に関する実験的研究. *歯科学報*, 69 : 1283-1320, 1969.
 - 36) Gianelly, A.A. : Force-induced changes in the vascularity of the periodontal ligament. *Am. J. Orthod.*, 55 : 5-11, 1969.
 - 37) 松尾雅斗 : 歯の移動時における歯根膜血管網および歯槽骨の変化について. *神奈川歯学*, 21 : 21-48, 1986.
 - 38) Hosoyama, M. : Changes in the microvascular pattern of the periodontium in an experimental tooth movement. *日矯歯誌*, 48 : 425-442, 1989.
 - 39) 小林和弘 : 歯の挺出時における歯根膜微細血管構築の変化に関する実験的研究. *日矯歯誌*, 48 : 411-424, 1989.
 - 40) 吉田重光, 大島勇人, 須藤弘幸, 小林茂夫 : ラット白歯歯髓終末毛細血管の加齢変化. *歯基礎誌*, 32 : 151-158, 1990.
 - 41) 小林正美 : 走査電顕と血管鋳型法によるイヌ歯髓の血管構築. *神奈川歯学*, 18 : 173-199, 1983.
 - 42) 信藤孝博 : 遊離歯肉自家移植後の微細血管構築の形態変化に関する実験的研究. *日歯周誌*, 29 : 352-364, 1987.
 - 43) 柳原一晃 : 裸出骨床への遊離歯肉自家移植後の微細血管構築の変化に関する実験的研究. *日歯周誌*, 32 : 45-70, 1990.
 - 44) Urugo, A. : Histological classification of resorbed bone. *Acta. Pathol. Jpn.*, 32 : 759-770, 1982.
 - 45) Pappenheimer, J.R., Renkin, E.M. and Borrero, L. M. : Filtration, diffusion and molecular sieving through peripheral capillary membranes. — A contribution to the pore theory of capillary permeability. — *Am. J. Physiol.*, 167 : 13-46, 1951.
 - 46) Pappenheimer, J.R. : Passage of molecules through capillary walls. *Physiol. Rev.*, 33 : 387-423, 1957.
 - 47) Simionescu, N., Simionescu, M. and Palade, G.E. : Permeability of muscle capillaries to small hemepeptides. — Evidence for the existence of patent transendothelial channels. — *J. Cell Biol.*, 64 : 586-607, 1975.
 - 48) Simionescu, M., Simionescu, N. and Palade, G.E. : Segmental differentiations of cell junctions in the vascular endothelium. — The microvasculature. — *J. Cell Biol.*, 67 : 863-885, 1975.
 - 49) Reese, T.S. and Karnovsky, M.J. : Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol.*, 34 : 207-217, 1967.
 - 50) Karnovsky, M.J. : The ultrastructural basis of capillary permeability studied with peroxidase as a tracer. *J. Cell Biol.*, 35 : 213-236, 1967.
 - 51) Palade, G.E. : Fine structure of blood capillaries. *J. appl. Physics.*, 24 : 1424-1448, 1953.
 - 52) Rhodin, J.A. : The diaphragm of capillary endoth-

- elial fenestrations. *J. Ultrastruct. Res.*, 6 : 171-185, 1962.
- 53) Peterson, H.I. : Capillary permeability of two transplantable rat tumours as compared with various normal organs of the rat. *Bibl. Anat.*, 12 : 511-518, 1973.
 - 54) Peterson, H.I. and Appelgren, L. : Tumour vessel permeability and transcapillary exchange of large molecules of different size. *Bibl. Anat.*, 15 : 262-265, 1977.
 - 55) Majino, G.P. and Palade, G.E. : Studies of inflammation. —I. The effect of histamin and serotonin on vascular permeability ; An electron microscopic study.— *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11 : 571-605, 1961.
 - 56) Bennett, H.S., Luft, J.H. and Hampton, J.C. : Morphological classification of vertebrate blood capillaries. *Am. J. Physiol.*, 196 : 381-390, 1959.
 - 57) Schwartz, S.M. and Benditt, E.P. : Studies on aortic intima. —I. Structure and permeability of rat thoracic aortic intima.— *Am. J. Path.*, 66 : 241-264, 1972.
 - 58) Hüttner, I., Boutet, M. and More, R.H. : Studies on protein passage through arterial endothelium. —I. Structural correlates of permeability in rat arterial endothelium.— *Lab. Invest.*, 28 : 672-677, 1973.
 - 59) Bundgaard, M. : The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. *J. Ultrastruct. Res.*, 88 : 1-17, 1984.
 - 60) Bundgaard, M., Hagman, P. and Crone, C. : The three-dimensional organization of plasmalemmal vesicular profiles in the endothelium of rat heart capillaries. *Microvasc. Res.*, 25 : 358-368, 1983.
 - 61) 藤村 朗 : ゴールデンハムスターの付着上皮下毛細血管に関する研究—第2編 歯齦炎と毛細血管構築の関連性について—. *歯科学報*, 87 : 485-506, 1987.
 - 62) 山本寅男 : 毛細血管透過の形態学. *日本臨床*, 41・秋季臨時増刊号 : 184-195, 1983.

連絡先 :

大阪歯科大学歯周病学講座

〒540 大阪市中央区大手前 1-5-31

付 図 説 明

図 1 生後 1 ヶ月

1A 骨の表面は凹凸不整で、厚い類骨層が存在している。陥凹部に血管を残したまま類骨が形成され、血管が骨内に封入されている (★)。(トルイジンブルー染色, ×25)

1B 骨面上には単層立方上皮様に骨芽細胞 (Ob) が配列し、活発な骨基質産生像を呈している。毛細血管は 1~2 個の内皮細胞から成り、連続型のものが多く、比較的厚い細胞質内にはミトコンドリアのほか多くの細胞質内小器官を有している。(ウラン-鉛二重染色)

1C End-to-end type の内皮細胞間結合。内皮細胞間接合部には通常 1~2 ヶ所に tight junction (→) が認められる。(ウラン-鉛二重染色)

1D Simple overlap type の内皮細胞間結合。内皮細胞間接合部には通常 2~3 ヶ所に tight junction (↑) が認められる。(ウラン-鉛二重染色)

1E Mortice type の内皮細胞間結合。内皮細胞間接合部には通常 2~3 ヶ所に tight junction (↑) が認められる。(ウラン-鉛二重染色)

1F 骨膜に分布する血管を骨側から観察すると、毛細血管が密で不規則な網目を形成し、歯槽頂付近では骨面に向けて所々不規則な毛細血管ループを形成している (★)。

1G HRP 注入 30 秒後の組織。HRP 分子は内皮細胞の管腔側表面や管腔側に近い形質膜小胞内 (←) に高密度に認められる。内皮細胞間接合部も同様に、管腔側よりに認められるが、tight junction によって透過が阻止されている (→)。(無染色)

1H HRP 注入 1 分後の組織。HRP 分子は血管周囲の広範囲にわたって細胞や膠原線維の表面に高密度に認められる。(無染色)

1I 1H の枠内の拡大像。HRP 分子は骨芽細胞表面 (*) や骨芽細胞同士の gap junction (→) を通過して、骨芽細胞間 (*) に達している。(無染色)

1J タンニン酸注入 30 秒後の組織。タンニン酸分子は血管周囲の広範囲にわたって高密度に認められ、すでに骨芽細胞間にまで達している (←)。(無染色)

図 2 生後 3 ヶ月

2A 骨の表面は生後 1 ヶ月よりも凹凸不整の程度が緩徐になっているが、依然として厚い類骨層が認められる。(トルイジンブルー染色, ×25)

2B 骨面上に単層に配列する骨芽細胞 (Ob) は、依然活発な骨基質産生像を呈している。毛細血管は有窓型の占める割合が観察期間中最高となり、また広い有窓野を持つものが数多く認められる。(ウラン-鉛二重染色)

2C 2B の枠内の拡大像。広い有窓野の部分では基底膜は断続的で不明瞭になっている。(ウラン-鉛二重染色)

2D 骨膜の血管構築は生後 1 ヶ月のものよりよく整理されている。つまり毛細血管は相互の間隔が広い平坦な亀甲状網目の血管網を形成している。

2E HRP 注入 30 秒後の組織。HRP 分子は毛細血管から多量に透過し、骨芽細胞表面に明瞭に観察される (▼)。(無染色)

2F タンニン酸注入 30 秒後の組織。タンニン酸分子は HRP 分子と同様、血管周囲の広範囲にわたって高密度に認められ、すでに骨芽細胞間にまで達している (←)。(無染色)

2G 2E の枠内の拡大像。HRP 分子は有窓野に認められる多数の窓の隔膜に付着し、その直下には透過した HRP 分子が高密度に認められる (▼)。(無染色)

図 3 生後 6 ヶ月

3A 骨表面の凹凸不整はもはや認められず、骨表面に存在していた類骨層はほとんど消失し、平坦な表面形状を呈している。(トルイジンブルー染色, ×25)

3B 骨芽細胞 (Ob) は楕円形に変化し、細胞質の減少に伴い、核 (N) の偏在性は不明瞭になっている。毛細血管は連続型が増加し、管腔側には長い microvilli 様突起 (←) を多数有している。(ウラン-鉛二重染色)

3C 毛細血管の内皮細胞内には形質膜小胞を多数含み、ときには2~3の形質膜小胞が連続し channel (➤) を形成している。(ウラン-鉛二重染色)

3D 内皮細胞間の結合形態は生後3ヵ月までの単純なものだけでなく、complex type のものが認められるようになる。(ウラン-鉛二重染色)

3E 骨膜の毛細血管は整理されて、分布密度が減少することにより、毛細血管相互の間隔が広くなり、亀甲状血管網がやや不明瞭になっている。

3F HRP 注入1分後の組織。HRP 分子は管腔側に近い多数の形質膜小胞内に高密度に認められる (▲)。しかし、まだ管腔内に局限している。(無染色)

3G HRP 注入2分後の組織。HRP 分子は管腔外に開放している形質膜小胞内に認められ (◄)，隣接の細胞表面にも観察される。(無染色)

3H タンニン酸注入30秒後の組織。タンニン酸分子は形質膜小胞内、内皮細胞間接合部および隣接している細胞表面に観察される。(無染色)

3I 3Hの枠内の拡大像。内皮細胞間結合は complex type の形態で、接合部にタンニン酸分子が連続的に観察され (▲)，管腔外に透過したタンニン酸分子が認められる。(無染色)

3J タンニン酸注入2分後の組織。タンニン酸分子は骨芽細胞間に一部認められる (◄)。(無染色)

図4 生後12ヵ月

4A 骨表面の類骨層は消失し認められない。(トルイジンブルー染色，×25)

4B 骨芽細胞は、さらに細胞質が減少し紡錘状の線維芽細胞様を呈している。また、骨芽細胞間に膠原線維が入り込み、細胞間の連続性が一部消失し (➤)，さらに、骨表面に高電子密度の lamina limitans (◆) が始めて認められるようになる。毛細血管は全て連続型で、扁平化し、管腔狭窄が認められ、内皮細胞内の形質膜小胞は生後6ヵ月に比べ明らかに減少している。(ウラン-鉛二重染色)

4C まれに認められる毛細血管で、細胞質の萎縮に伴い管腔外にも細胞質突起 (◄) を形成し不規則な外観を呈している。内皮細胞の基底膜は連続的ではあるが、厚さは不均一になり、一部走行の乱れが認められる。(ウラン-鉛二重染色)

4D 骨膜の血管網はさらに整理されることにより、亀甲状網目は消失し、それに代わって骨体部から歯槽縁へ直線的に走行する毛細血管が、垂直的な交通枝を出すことによって明瞭な階段状の網目が形成されている。

4E HRP 注入2分後の組織。HRP 分子は少数の形質膜小胞内 (◄) や管腔外に不明瞭ではあるが認められる。(無染色)

4F タンニン酸注入2分後の組織。タンニン酸分子は形質膜小胞内、内皮細胞間接合部および管腔外に認められる (▼)。しかし管腔外に透過した分子は血管周囲を取り巻く pericyte や密な膠原線維によって、隣接している細胞表面に局限している。(無染色)

図5 生後24ヵ月

5A 骨芽細胞は線維芽細胞様を呈し、骨芽細胞間の結合状態も断続的になっている。(トルイジンブルー染色，×25)

5B 骨芽細胞はさらに細胞質が減少し、細胞質内小器官はほとんど認められない。骨表面の lamina limitans (◆) の電子密度が高くなり、さらに明瞭になっている。残存する毛細血管は不規則な外観を呈し、管腔の狭窄されたものが多く認められる。(ウラン-鉛二重染色)

5C 5Bの枠内の拡大像。内皮細胞の基底膜は肥厚し、一部走行の乱れた部分が観察される (➤)。(ウラン-鉛二重染色)

5D 骨膜血管は萎縮し、直線的な走行を示す細動静脈だけとなり、ほとんど毛細血管は認められない。さらに細動静脈にも一部、萎縮・消失の傾向が観察される。

5E HRP 注入2分後の組織。HRP 分子は少数の形質膜小胞内 (↓) や管腔外 (▼) に不明瞭ではあるが認められる。しかし、形質膜小胞の減少に伴って透過量も減少している。(無染色)

5F タンニン酸注入2分後の組織。タンニン酸分子は形質膜小胞内、内皮細胞間接合部 (→) および管腔外に認められる。(無染色)