

〔原 著〕

ヒト乳歯歯根吸収過程の組織細胞学・組織細胞化学的研究

北所 恵, 坂倉 康則, 矢嶋 俊彦

北海道医療大学歯学部口腔解剖学第1講座

(主任: 矢嶋 俊彦)

Histological and histochemical study of the physiological root resorption processes of human deciduous teeth

Megumi KITAJYO, Yasunori SAKAKURA and Toshihiko YAJIMA

The First Department of Oral Anatomy, School of Dentistry,
Health Sciences University of Hokkaido

(Chief: Prof. Toshihiko YAJIMA)

Abstract

Using extracted human deciduous teeth undergoing physiological root resorption, we studied the mechanisms of predentin resorption, deposition of cementum-like tissue in the resorption lacunae, and regulation of odontoclastic activity by light and confocal laser scanning microscopy, and scanning and transmission electron microscopy.

Odontoclasts had ultrastructural and cytochemical characteristics as osteoclasts. These odontoclasts formed resorption lacunae on the nonmineralized predentin layer. The odontoclastic processes demonstrating tartrate-resistant acid phosphatase activity invaded the dentinal tubules deeply. These cell processes may play a role in resorption of predentin and dentin. Some mononuclear fibroblastic cells occupied the resorption lacunae and showing alkaline phosphatase activity, formed cementum-like tissue in the lacunae. Mononuclear fibroblastic cells surrounding odontoclasts may regulate odontoclastic resorptive activity.

These results suggest functional differences between odontoclasts and osteoclasts.

Key words: Root resorption, Odontoclasts, TRAPase, Fibroblastic cells, ALPase

I 緒 言

後続永久歯の萌出に伴う乳歯の生理的歯根吸収・脱落は主に多核の巨細胞である破歯細胞によってもたらされる。また、吸収過程は、吸収が主に進行する吸収期、さらに休止期、そして吸収窩にセメント質様組織の新生・添加が行われている修復期に分けられ、これらが繰り返され、間欠的に進行することが知られている¹⁻⁵⁾。この吸収組織は破歯細胞、その前駆細胞、および多数の単核小型間葉系細胞で構成されている。破歯細胞については光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡および組織細胞化学的な多くの研究により、その構造と機能が解明されてきている。破歯細胞は、細胞質内に多数のミトコンドリア、ライソゾーム、貪食胞と液胞を、吸収面には波状縁と明帯を持ち、破骨細胞と同様な微細構造学的特徴を有している⁶⁻¹⁷⁾。また、破歯細胞のライソゾーム系は破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性を持っている¹⁸⁻²⁵⁾。事実、破歯細胞は、石灰化セメント質・象牙質さらにエナメル質をも吸収し²⁶⁾、歯根吸収と骨吸収は、形態的、機能的に類似していることが報告されている。

一方、破骨細胞は、非石灰化類骨の吸収には関与していないとされているが²⁷⁻²⁸⁾、破歯細胞は非石灰化象牙前質の吸収をしているとの報告がある^{7-8,16,25,29)}。最近、乳歯歯根吸収と活発な改造現象を繰り返す骨とでは、破歯細胞と破骨細胞の機能発現や微細構造、またその動的微小環境が異なり、破歯細胞は固有の機能を発現し、破骨細胞が産生していないコラゲナーゼ産生の可能性が示唆されてきている³⁰⁻³¹⁾。さらに、パラサイロイドホルモン(PTH)・サイトカインなどに対する感受性も両細胞では異なることも報告され、乳歯歯根吸収は骨改造現象とは異なる機構によって調節されているとも考えられてい

る³²⁻³³⁾。また、乳歯歯根吸収における破歯細胞の機能調節・制御には吸収組織とその周囲に存在する小型間葉系細胞の関与が示唆されている^{8,20,34-37)}。

このように破歯細胞と破骨細胞の形態的・機能的相違点については十分にあきらかにされていない点が多い。また、吸収組織における破歯細胞と他の小型間葉系細胞との相互作用やその機能についてはほとんど解明されていない。

そこで、吸収がヒト乳歯歯根長の1/2以上に達し、歯髄側象牙質にまで及び、非石灰化象牙前質から石灰化象牙質への吸収が間欠的に進行している典型的な吸収組織を用い、乳歯歯根吸収過程における非石灰化象牙前質の吸収機序、修復期におけるセメント質様組織の添加機構、破歯細胞の機能調節・制御機構を組織細胞学・組織細胞化学的に明らかにすることを目的に本研究を行った。

II 材料と方法

1. 材料

試料には、6歳から12歳までの小児の乳切歯50本、乳犬歯32本、合計82本を用いた。歯根吸収中期から後期にかけての健全乳歯であることを確認後、浸潤麻酔下において抜歯した乳歯を試料とした。

2. 光学顕微鏡観察・透過型電子顕微鏡観察

抜歯された乳歯は、直ちに4%パラホルムアルデヒド固定液(0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2)、あるいは2%パラホルムアルデヒド-2%グルタルアルデヒド(0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2)混合固定液で4°Cにて1時間から7日浸漬固定を行った。固定後、試料を非脱灰のままカッターを用いて唇舌的に半切し、10%EDTA溶液(0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2)で、4°Cにて1ヵ月脱灰した。その後、0.25M蔗糖液で洗浄し、1%四酸化オスミウム(0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2)で1時間後

固定を行った。その後、試料は上昇エタノール系列で脱水し、通法に従いエポキシ樹脂に包埋した。薄切片は、トルイジンブルー染色を施し、光学顕微鏡にて観察した。また、一部の切片には、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性の検出を試みた。

超薄切片は、酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡 (日本電子JEM-100CX) で観察した。

3. 酵素組織細胞化学的観察

酵素組織細胞学的観察には、4%パラホルムアルデヒド浸漬固定した試料を用いた。10% EDTA溶液 (0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2) で脱灰後、試料をMicroslicer (DTK-3000, 堂阪イーエム) にて70-100 μ mの厚さに薄切し、酵素活性の検出に使用した。

1) 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性検出

試料は、0.1M酢酸緩衝液で、4 $^{\circ}$ C、1時間浸漬処理した後、アゾ色素法を用いTRAPase活性を検出した。基質として0.1mM naphthol AS-MX phosphate (Sigma社)、ジアゾニウム塩として0.5mM fast red violet LB salt (Sigma社)、50mM酒石酸ナトリウム (和光純薬) を含む0.1M酢酸緩衝液 (pH5.2) を反応液として、37 $^{\circ}$ C、10分活性反応を行なった³⁹⁾。

2) アルカリ性ホスファターゼ (ALPase) 活性検出

試料は、酵素活性賦活のため10mM塩化マグネシウムに4 $^{\circ}$ C、24時間浸漬処理した。その後、0.1M Tris塩酸緩衝液 (pH8.5) で4 $^{\circ}$ C、1時間浸漬前処理後、基質として0.2mM naphthol AS-MX phosphate、ジアゾニウム塩として1.2mM fast red violet LB salt、10mM塩化マグネシウムを含む0.1M Tris塩酸緩衝液 (pH8.5) を反応液として、37 $^{\circ}$ C、30分活性反応を行った⁴⁰⁾。

4. 共焦点レーザースキャン顕微鏡 (CLSM) 観察

TRAPase活性を検出した厚さ100 μ mの乳歯脱灰縦断切片をCLSM (Confocal Laser Scanning Microscope, Leica TCS 4D, Leica社) を用いて、励起レーザー波長568nm、蛍光波長590nmにてTRAPase活性の局在を示すアゾ色素の蛍光を観察した^{39,41)}。

5. 走査型電子顕微鏡観察

脱灰した試料を1%四酸化オスミウム (0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2) で2時間固定し、緩衝液で4時間洗浄後、1%タンニン酸水溶液中で2時間処理した。タンニン酸処理試料を緩衝液中で一晩洗浄し、1%四酸化オスミウム (0.1Mカコジル酸緩衝液, pH7.2) で2時間染色した。その後、エチルアルコールで脱水し、t-ブチルアルコール中で凍結乾燥を行なった³⁸⁾。乾燥した試料は、両面テープで試料台に載せて、金をスパッタコーティングし走査型電子顕微鏡 (日本電子JFC-1500) で観察した。

III 結 果

1. 光学顕微鏡観察

吸収中期にある乳歯縦断切片像では、象牙質の吸収は歯根部から歯冠部にまで波及し、歯髓腔内面からの吸収も観察された (図1a-b)。歯髓側象牙質には、一次象牙質より濃染した二次象牙質が見られ、さらにその歯冠側では二次象牙質の歯髓側に象牙前質が認められた。歯根から歯冠側の一次象牙質、二次象牙質、象牙前質を含む象牙質吸収面には種々の深さ形状の吸収窩が波状に観察された。それらの吸収窩には多核巨細胞である破歯細胞、あるいは単核小型細胞の小集団が認められ、時には、両者が隣接しているのが観察された。破歯細胞の認められない歯冠側の象牙前質には萎縮・変性した象牙芽細胞が不規則に配列しており、それらの細胞間に割り込むように単核小型細胞と、破歯細胞の単核または多核の中型前駆細胞が認められた (図1b)。吸収最前線にある象牙前質にも、多

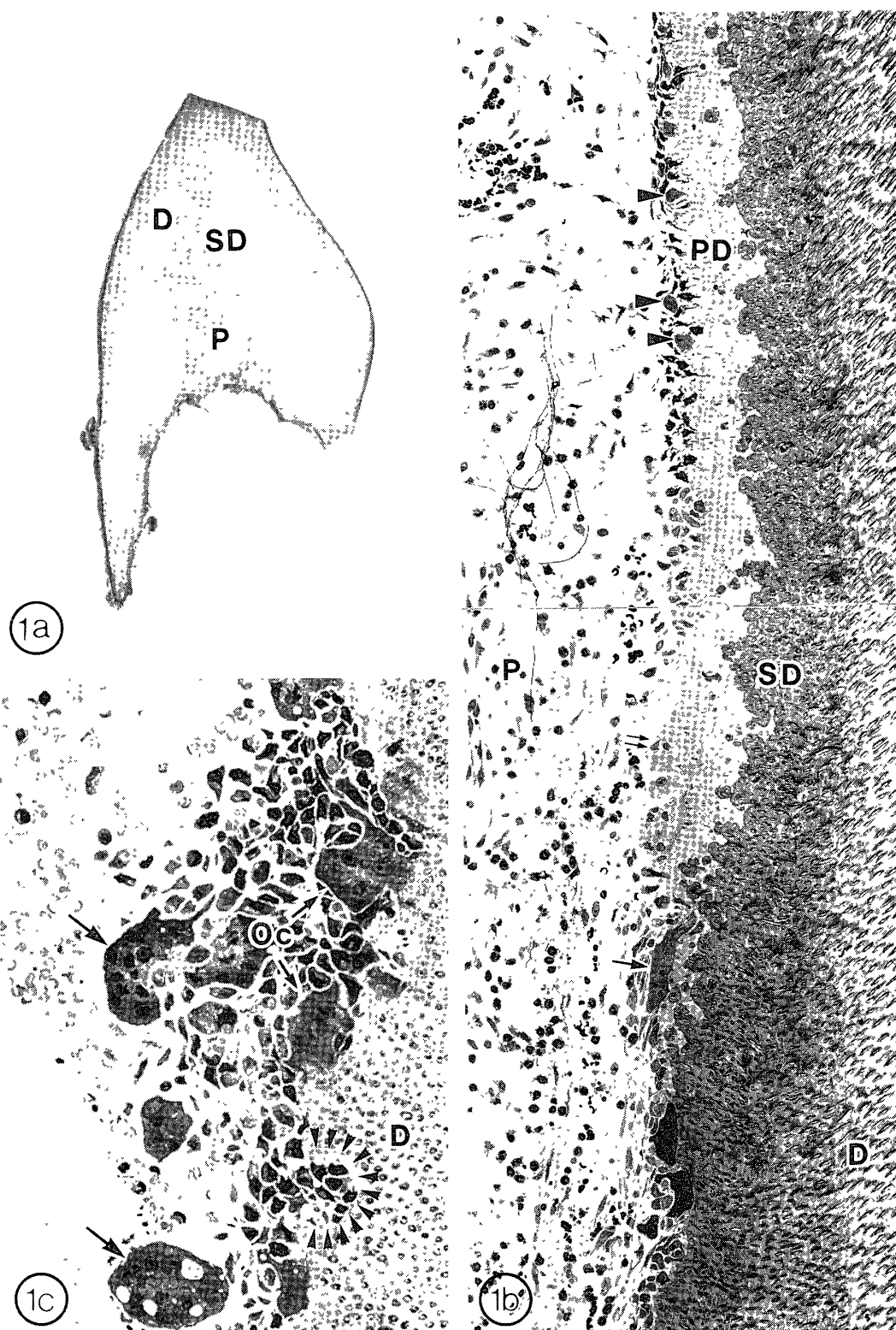


図1. 吸収中期の乳中切歯の光学顕微鏡像。

a: 低倍縦断切片像。吸収が進行し、歯髓腔内面まで達している。メチレンブルー染色。×7.0。

b: 歯髓側象牙質吸収面。象牙前質 (PD) に接して萎縮・変性した象牙芽細胞が不規則に配列し、破歯細胞の単核または多核の中型前駆細胞 (矢頭) がそれらの細胞間にみられる。吸収窩を形成している破歯細胞 (矢印) と、吸収窩を形成していない破歯細胞 (二重矢印)。トルイジンブルー染色。×55。

c: 象牙質吸収窩。吸収窩形成中の破歯細胞 (Oc) と象牙質から遊離し、変性した破歯細胞 (矢印)。単核小型細胞で占められた吸収窩 (矢頭)。トルイジンブルー染色。×130。

D: 一次象牙質; P: 歯髓; SD: 二次象牙質。

核の破歯細胞が認められた。吸収窩を形成している破歯細胞の周囲には、単核小型細胞が観察された。しかし、周囲に単核小型細胞の観察されない象牙前質の破歯細胞には、吸収窩形成が認められなかった(図1b)。象牙質に密着した破歯細胞は発達した波状縁を象牙質側に持っていたが、象牙質面から遊離あるいは歯髓結合組織中に存在する多核巨細胞では波状縁は消失し、細胞は球形化していた。また象牙質から離れ、変性した多核巨細胞も観察された(図1c)。破歯細胞の存在しない吸収窩の多くは、単核小型細胞で占められ、トルイジンブルー染色で淡染される線維性組織が観察される部位もあった。吸収期にある吸収窩においては、これらの単核小型細胞は紡錘形ないし立方形をなし、破歯細胞の周囲を取り囲み、一部の細胞は象牙質に接していた。また、破歯細胞が吸収面より遊離しつつある部位では、単核小型細胞は破歯細胞と象牙質の間に侵入していた。吸収部位の歯髓組織中の毛細血管と細静脈はやや拡張し、その周囲に好中球の浸潤と多数の赤血球が認められた。しかし、吸収が波及していない髓角部では正常歯髓組織が観察された。

2. 酵素組織細胞化学的観察

1) 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性

破骨細胞、破歯細胞のマーカー酵素であるTRAPase活性反応を利用して、吸収中期にある乳歯の象牙質吸収部位における破歯細胞の同定とその局在を調べた。実体顕微鏡下で半切乳歯を観察すると、赤色のTRAPase活性陽性反応を示す領域が、歯髓側象牙質面に沿って点状に認められた。陽性反応は、舌側象牙質面よりも唇側象牙質面に多数認められた(図2a)。陽性反応部位を薄切し観察すると、これらの多くは細胞質中に赤色陽性反応を有する多核の破歯細胞であった(図2b)。象牙質吸収面に密着した破歯細胞は強陽性反応を示し、反応は顆粒状

を呈していた。象牙質面から遊離あるいは歯髓結合組織中に存在する多核巨細胞、吸収組織中の2-4核の中型細胞と単核大型細胞にも陽性反応が認められた。

象牙質吸収窩表面でのTRAPase陽性反応は観察されなかったが、象牙細管内に微弱陽性反応を認めた。そこで、この陽性反応構造物を同定するために、TRAPase活性反応を検出した切片(約100 μ m)をCLSMで観察した。

TRAPase活性陽性反応を示す赤い蛍光は、破歯細胞の核を除く細胞体とその波状縁・細胞突起に認められた。さらに、いくつかの破歯細胞からは長い細胞突起が象牙細管内奥深くまで侵入しているのが観察された。光学顕微鏡で観察された象牙細管内の微弱陽性反応構造物は破歯細胞の細胞突起であることが確認された(図2c)。

2) アルカリ性ホスファターゼ (ALPase) 活性

象牙質吸収面で、破歯細胞に隣接あるいは吸収窩に小集団化して存在する単核小型細胞の機能を同定するためにALPase活性の検出を試みた。ALPase陽性反応は、破歯細胞に隣接する小型細胞と、破歯細胞の存在しない吸収窩の一部の小型細胞の細胞膜に認められた。(図3)。

3. 走査型電子顕微鏡観察

吸収窩は破歯細胞が占め、これらの破歯細胞周囲には小型ないし中型細胞が存在、線維様構造物がそれらの細胞間を埋めていた。また、破歯細胞の背側面には多数の血球が認められた。破歯細胞は、象牙質吸収面に向かって発達した微絨毛からなる波状縁を持ち、背側にも多数の微絨毛を持っていた。(図4a-b)。

4. 透過型電子顕微鏡観察

象牙質吸収面に存在する破歯細胞は、多核で象牙質面に向かって発達した微絨毛からなる波状縁と明帯を持ち、波状縁の微絨毛間には吸収されつつある象牙質コラーゲン細線維の断片が

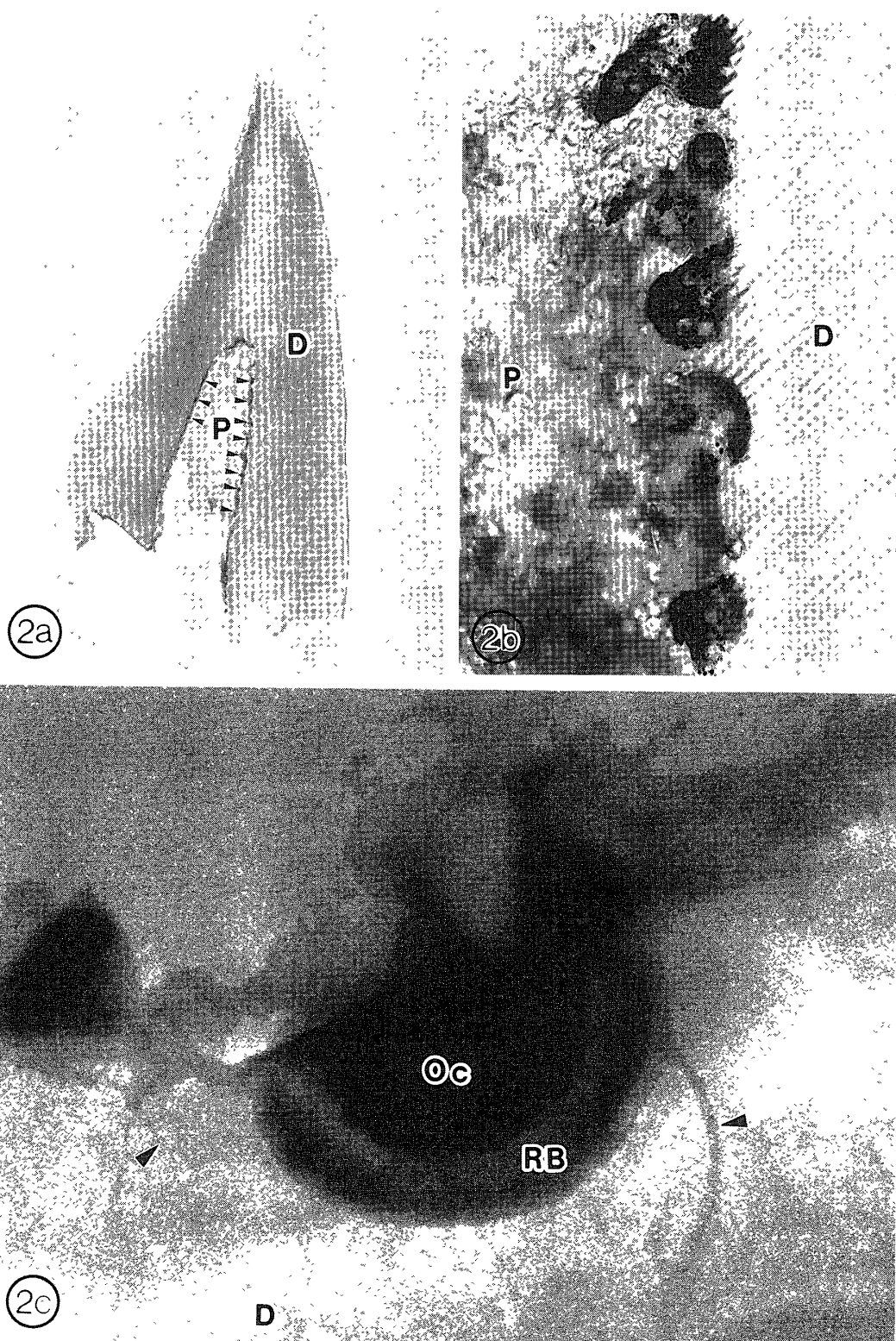


図 2. 破歯細胞の酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性。
 a: 低倍実体顕微鏡像。歯髓腔内壁に沿ってTRAPase活性陽性を示す細胞 (矢頭) がみられ, 陽性細胞は唇側象牙質面 (右側) に多い。×7.0。
 b: 高倍光学顕微鏡像。破歯細胞は細胞質に顆粒状のTRAPase活性陽性反応を示し, 陽性反応は破歯細胞に直接した象牙細管にもみられる。×110。
 c: 共焦点レーザースキャン顕微鏡像。活性を示す強い蛍光が破歯細胞 (Oc) の細胞体と波状縁 (RB) にみられる。また, 破歯細胞からの突起 (矢頭) の象牙細管内への侵入もみられる。×4,000。
 D: 象牙質; P: 歯髓。

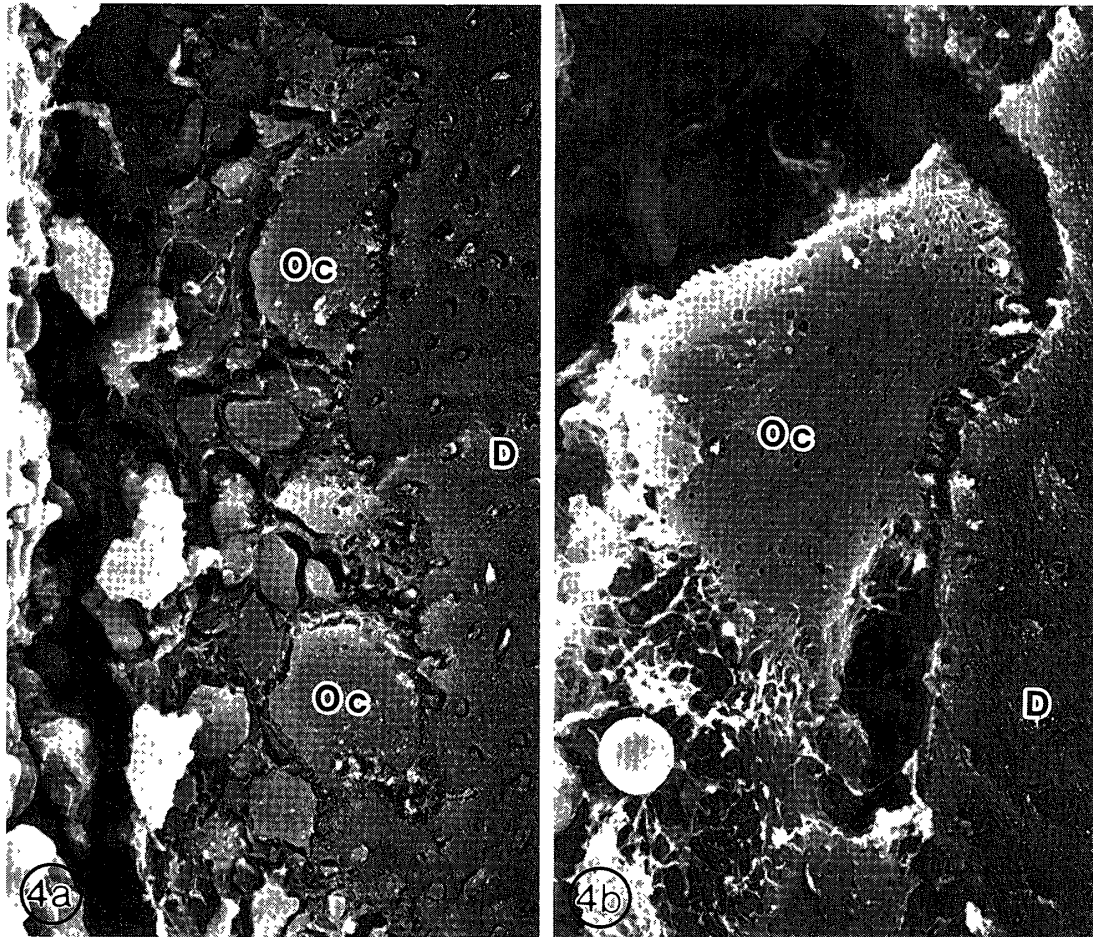
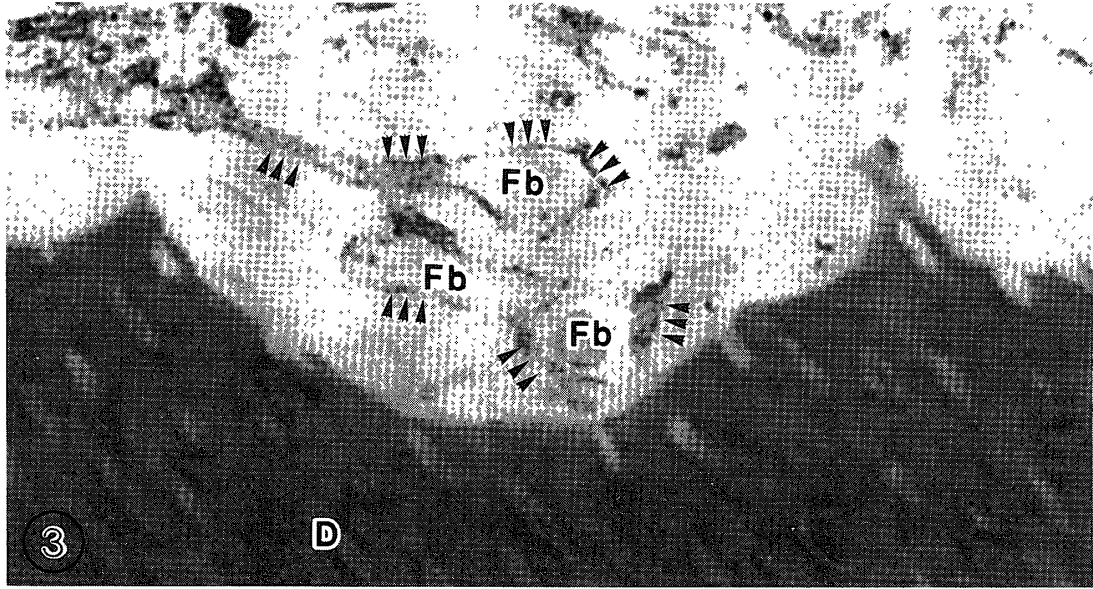


図 3. 吸収窩の小型単核細胞のアルカリ性ホスファターゼ (ALPase) 活性。
 単核小型細胞 (Fb) の細胞膜に沿ってALPase活性 (矢頭) が認められる。×250。
 D: 象牙質。

図 4. 吸収組織の走査型電子顕微鏡像。
 a: 低倍像, 吸収窩を形成している破歯細胞 (Oc) の周囲に小型・中型の細胞が多数存在し, 線維様構造物がこれらの細胞間を占めている。×1,300。
 b: 破歯細胞。象牙質面に波状縁と背側面にも長い微絨毛がみられる。×5,300。
 D: 象牙質。

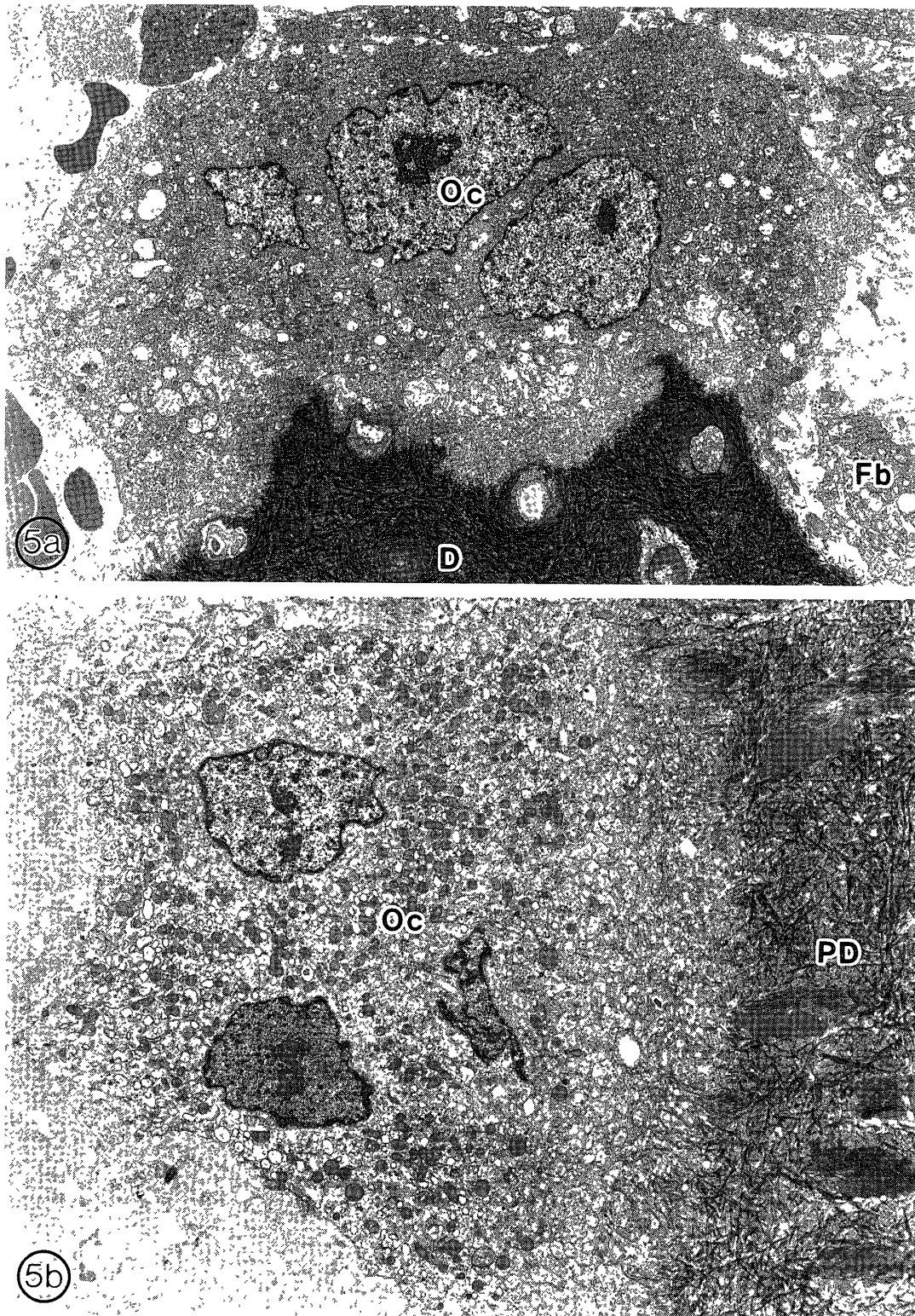


図5. 破歯細胞の透過型電子顕微鏡像.

- a: 象牙質 (D) に接している破歯細胞 (Oc). 破歯細胞周囲に, 小型間葉系細胞 (Fb) がみられる. $\times 5,300$.
 b: 象牙前質 (PD) に接している破歯細胞 (Oc). 象牙前質に対して発達した波状縁と明帯を形成している. $\times 5,300$.

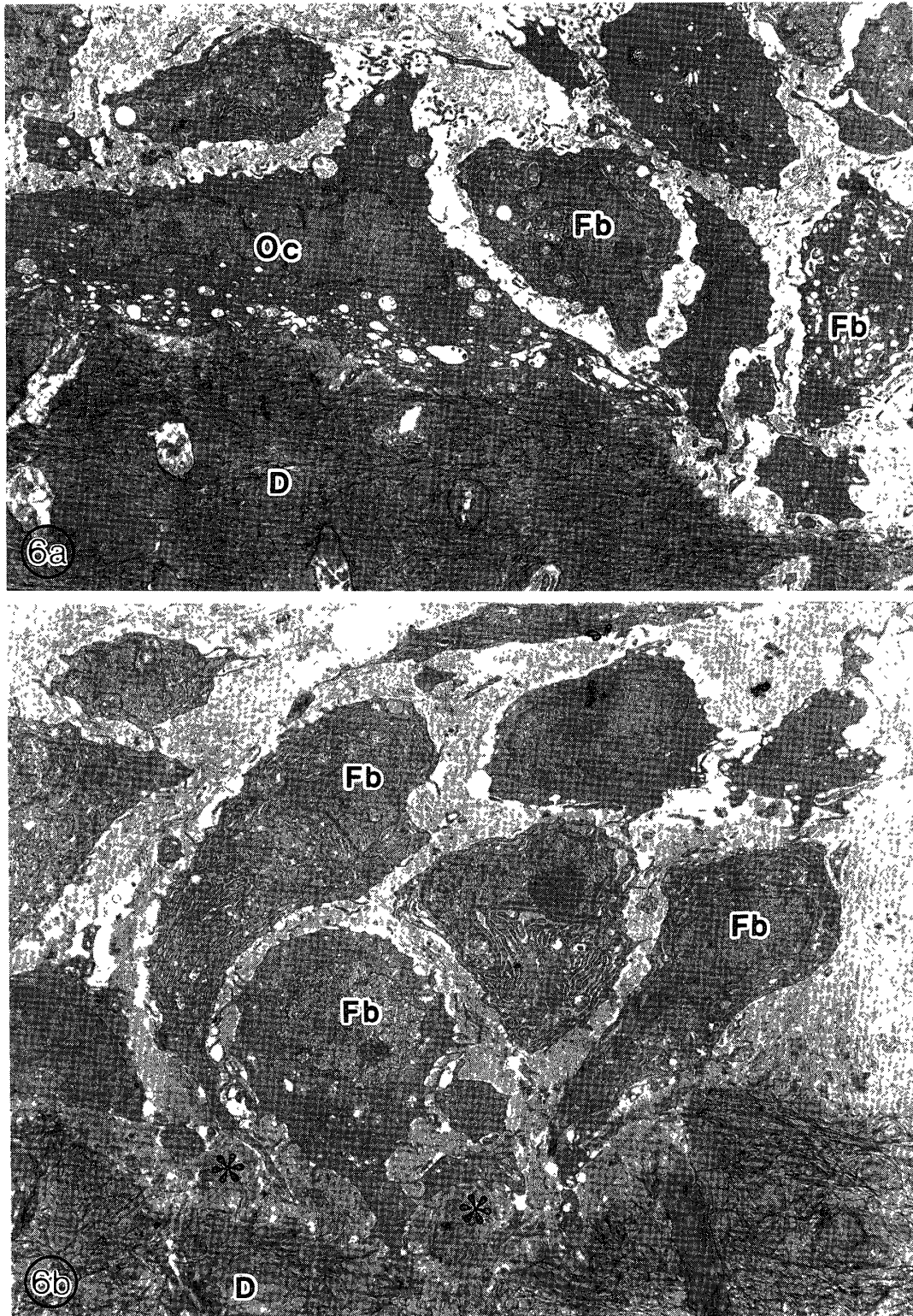


図6. 象牙質吸収面の単核小型細胞の透過型電子顕微鏡像.

a: 破歯細胞 (Oc) 周囲の単核小型間葉系細胞 (Fb), $\times 5,300$.

b: 吸収窩を占めている単核小型間葉系細胞 (Fb). 発達した粗面小胞体, ゴルジ装置を持ち, 細胞突起を吸収窩表面に延ばしている. 微細なコラーゲン細線維 (*) が突起周囲にみられる. $\times 5,300$.

D: 象牙質.

観察された。細胞質中には多数のミトコンドリア, ライソゾーム, 貪食胞と液胞が, また, 核周囲にはゴルジ装置が観察された (図 5 a)。これらの破歯細胞の歯髓側背側面にも多数の長い微絨毛が認められ, その周囲に横紋構造の不明瞭なコラーゲン細線維がみられた。多くの破歯細胞隣接側面, 背側面には, 単核小型細胞が存在し, 破歯細胞との接触も観察された。これらの単核小型細胞は細胞小器官などの微細構造から, すでに報告されている間葉系細胞であると思われる。

象牙質吸収面から遊離した破歯細胞では, 波状縁は不明瞭となり, 細胞は球形化し, 細胞の局性は消失した。しかし, 細胞質中には多数のミトコンドリア, ライソゾーム, 貪食胞が認められた。また, 歯根象牙質吸収面から遠く離れた部位には, 変性し電子密度の高い破歯細胞が時に存在していた。

象牙前質に存在する破歯細胞は, 象牙質の破歯細胞と同様に多核で, 象牙前質に向かって発達した波状縁と明帯を持ち, 細胞質中には多数のミトコンドリア, ライソゾーム, 貪食胞と液胞が観察された (図 5 b)。波状縁の微絨毛の間には, 象牙前質基質コラーゲン細線維と連続する細線維や微細な線維状物質が認められた。

破歯細胞の周囲に存在する小型間葉系細胞の多くは, 細胞内小器官の状態から比較的未分化な細胞と考えられた (図 6 a)。これに対し, 破歯細胞の存在しない吸収窩を占めている単核小型間葉系細胞は, 発達した粗面小胞体とゴルジ装置を持ち, 蛋白質分泌細胞の特徴を示した。これらの細胞は吸収面に突起を延ばし, 突起周囲に微細な横紋構造不明瞭なコラーゲン細線維を分泌し, 細胞突起が埋め込まれているものもあった (図 6 b)。これらの新生・添加されたコラーゲン細線維は, 吸収されつつある太く明瞭な横紋構造を有する象牙質コラーゲン細線維とは明らかに区別された。

IV 考 察

破骨細胞は骨の組織発生・成長, 改造現象に関わり, 生涯出現し, 機能しているのに対し, 破歯細胞は病的な吸収を除けば, その出現は生理的乳歯歯根吸収過程にのみ限定される。そのため, 破歯細胞に比較すると, 破歯細胞の研究は制限されることが多く, すでに述べたように破歯細胞との形態的・機能的相違についても不明な点が多い。しかし, 破歯細胞の基本的形態と機能は破骨細胞に類似しており, 破歯細胞研究においても, 破骨細胞における研究手法は有効である。その一つが破骨細胞のマーカー酵素である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAPase) 活性の検出である。

1. 破歯細胞とその前駆細胞のTRAPase活性

酸性ホスファターゼ (ACPase) は, 広く組織に分布する酵素で, 前立腺, 赤血球, 肝臓などに多く含まれている。細胞内では, ライソゾーム, 貪食胞, 多胞体, ゴルジ装置などにその活性が局在している。前立腺, 肝臓など多くの組織に存在するACPaseはL(+)-酒石酸によって活性が阻害される酒石酸感受性酸性ホスファターゼである⁴²⁾。骨組織では, 骨芽細胞・骨細胞に存在するACPaseは酒石酸感受性酸性ホスファターゼであるが, 破骨細胞細胞に存在するACPaseはL(+)-酒石酸によっても阻害されないTRAPaseである¹⁶⁾。Minkin(1982)¹⁹⁾により, TRAPaseが破骨細胞の有効な酵素組織細胞学的指標であることが報告されて以来, TRAPaseは破骨細胞の有効な同定法とされ, 破歯細胞の研究においても用いられてきている¹⁸⁻²⁵⁾。本研究においても, 光学顕微鏡で観察される多核の巨細胞の同定と, 破歯細胞の局在とその分布を調べる目的でアゾ色素法によるTRAPase活性検出を行なった。その結果, 乳歯歯根吸収組織で観察される多核巨細胞は破歯細胞であることが確認された。象牙質吸収面に密

着した破歯細胞は強陽性反応を示した。また、象牙質面から遊離した破歯細胞、吸収組織中に観察される2-4核の中型細胞・単核大型細胞にも陽性反応が認められた。単核大型細胞は単球由来の破歯細胞の前駆細胞であり、多核中型細胞はそれらの融合過程と考えられ、波状縁は認められなかった。吸収組織中ないしその付近には出血に伴う赤血球も存在した。赤血球のACPaseはTRAPaseであるが、アルデヒド系固定液でその活性は阻害される⁴³⁾。そのため、赤血球での陽性反応は認められなかった。これらの破歯細胞とその前駆細胞でのTRAPase活性の所見は、破骨細胞とその前駆細胞骨での報告とほぼ一致するものであった。破歯細胞の局在とその分布は、舌側よりも唇側象牙質面に多く観察された。これは、乳前歯の歯根吸収が主として舌側から唇側に向かって進行することによる破歯細胞の出現の時間的・部位的差異によるものと考えられる。

ヒト乳歯歯根吸収過程において、組織細胞化学的TRAPase活性の局在は、破歯細胞の粗面小胞体、ゴルジ装置、ライソゾーム、貪食胞、波状縁と波状縁に接する吸収象牙質面、象牙細管に報告されている²³⁻²⁵⁾。また同様に、ライソゾーム酵素の一つであるトリメタホスファターゼ(TMPase)活性は、破歯細胞の、ゴルジ装置、ライソゾーム、貪食胞とともに、波状縁に接している吸収象牙質面と象牙細管に報告されている^{11-12,16,29)}。吸収象牙質面でのTRAPase・TMPase活性は吸収作用に伴って破歯細胞から分泌された酵素による一時的なものと考えられ、破歯細胞の存在していない吸収窩表面では報告されていないし、本研究でも観察されなかった。象牙細管内の活性は破歯細胞が組織を吸収するために分泌し、そこに吸着された酵素、あるいは象牙細管内に伸張している破歯細胞の突起による可能性が考えられた²⁴⁾。そこで、TRAPase活性を示すアゾ色素の微弱蛍光の観

察に優れた機能を発揮するCLSMを用いて観察した^{39,41)}。その結果、破歯細胞の波状縁の一部から延びた長い突起が象牙細管内奥深く侵入し、TRAPase活性陽性反応を呈していることが観察された。このことから、これらの象牙細管内に侵入した突起は象牙質・象牙前質吸収過程において重要な働きをしていることが示唆された。

骨吸収過程では、吸収窩表面にTRAPase活性陽性を示す薄い層が認められ、それらは新旧の骨基質を境するセメント線に連続しており、この層に局所因子(カップリング因子)の存在が考えられる⁴⁴⁻⁴⁶⁾。骨芽細胞はこれらの因子に誘導され、その層の上に配列し新たな骨基質を形成する。しかし、吸収象牙質表面ではTRAPase活性反応は認められず、骨吸収過程と異なっていた。これは乳歯歯根吸収は吸収期・休止期・修復期が繰り返されて間欠的進行するにしても、最終的には吸収現象であり、骨改造現象とは異なるためと考えられる。

2. 象牙前質の吸収

骨吸収過程においては、破歯細胞は露出した石灰化組織のみに付着し、作用すると考えられている²⁷⁻²⁸⁾。そのため、破骨細胞の骨吸収に先行して、骨芽細胞がコラゲナーゼなどの酵素を分泌し、未石灰化類骨のコラーゲンを分解する⁴⁷⁾。また、その分解産物が破骨細胞の分化・誘導の一因となる可能性も示唆されている⁴⁶⁾。さらに骨組織では、コラゲナーゼ産生能は骨芽細胞と骨細胞にあり、破骨細胞にはないとされてきた。これに対し、近年の研究において、歯硬組織吸収時に出現する破歯細胞の未石灰化組織吸収能が示唆されている。鈴木(1974)⁸⁾は波状縁を持つ破歯細胞と単核星状の細胞の象牙前質吸収への関与を報告し、特に破歯細胞の小突起が象牙前質に侵入しており、突起からの蛋白質分解酵素の分泌による吸収への関与を示唆している。Saharaら(1994)²³⁾は、象牙前質に接し

ている象牙芽細胞間に存在する多核の巨細胞が、波状縁・明帯を持ち、TRAPase活性陽性の反応を示す破歯細胞であり、石灰化組織と同様に未石灰化象牙前質の吸収機能を持つことを報告している。さらに、これらの破歯細胞からの突起が象牙細管に侵入していることも明らかにしている。本研究においても、象牙前質に接している破歯細胞は、象牙前質に向かって明帯と発達した波状縁を持ち、象牙前質に明らかな吸収窩の形成が観察され、破歯細胞の象牙前質の吸収能が確認された。一方、岡村 (1992)³⁰⁾、Okamuraら (1993)³¹⁾は仔ウシ歯根吸収組織を用いたin situハイブリダイゼーション法により、大食細胞、線維芽細胞、象牙芽細胞、セメント芽細胞に加えて破歯細胞にコラゲナーゼmRNAの発現を報告している。象牙前質吸収期には、象牙芽細胞は変性・消失しており、さらに、大食細胞、線維芽細胞、セメント芽細胞の象牙前質吸収への関与を示す報告は見あたらず、本研究でもこれらの細胞の関与は観察されなかった。これらの結果より、破歯細胞は未石灰化象牙前質の吸収能を持つ細胞であり、破骨細胞とは異なった機能を持つことが示唆された。

3. 吸収組織の単核小型間葉系細胞の機能

吸収組織には、TRAPase活性陽性を呈する破歯細胞とその前駆細胞の他に、TRAPase活性を示さない多数の単核小型葉系細胞が存在している。これらの小型間葉系細胞は大食細胞、線維芽細胞、好中球、未分化間葉系細胞などからなることが知られている。しかし、これらの間葉系細胞の機能については十分に解明されていない。線維芽細胞と大食細胞のコラーゲン貪食能は明らかにされているが、乳歯歯根吸収過程でのこれらの細胞の積極的関与の報告は少ない^{10,17,35,48)}。単核小型細胞が破骨細胞の観察されない吸収窩を占め、吸収窩へのコラーゲン細線維の集積とセメント質様組織の形成が観察され

ており^{2,16,20,34,36-37,49-50)}、本研究でも確認している。そこで、これらの細胞が吸収窩にセメント質様組織を新生・添加している細胞ではないかと考え、基質形成系細胞のマーカー酵素の一つであるアルカリ性ホスファターゼ (ALPase) 活性の検出を試みた。ALPase活性陽性反応は、破歯細胞の存在しない吸収窩や破歯細胞に隣接する単核間葉系細胞の一部に観察された。これらの細胞は発達した粗面小胞体、ゴルジ装置とミトコンドリアなどの細胞小器官を持ち、典型的蛋白質分泌細胞の特徴を示していた。さらに細胞突起を吸収窩表面に伸ばし、その周囲に微細なコラーゲン細線維が存在していた。これらの細線維は吸収途中の線維との推測もあるが、詳細な観察より新生・添加されたコラーゲンであることが報告されており⁵¹⁻⁵²⁾、本研究でも微細構造などからこれを確認した。すなわちこのALPase陽性単核小型間葉系細胞が吸収窩にセメント質様組織を新生・添加している細胞であることが初めて示された。セメント質様組織を新生・添加することから、セメント芽細胞様細胞と考えられるが^{16,20,36,49-52)}、この細胞の由来と分化過程については不明であり、今後の研究が必要である。

本研究では、セメント質様組織への細胞の埋入や組織の石灰化像は観察されなかった。しかし、セメント質様組織は種々の変化を示し、セメント細胞様細胞の埋入や石灰化像が報告されている⁵²⁾。このセメント質様組織形成への意義は不明であるが、ヒト乳歯のみで観察されている¹⁾。動物では乳歯から代生歯への交換が比較的短期間に行われるのに対し、ヒトでは吸収期間が長いこと、その間の乳歯の保存・維持に関与しているものと考えられる。

4. 破歯細胞と間葉系細胞の相互作用

骨組織では、骨吸収系細胞と骨形成系細胞が緊密な細胞関連を保ちながら代謝されており、骨改造はこれらの細胞連鎖機構によるとされて

いる⁴⁴⁻⁴⁶)。露出した石灰化骨基質に誘導された破骨細胞の前駆細胞が定着し骨芽細胞系細胞との接触などの直接作用、ないし骨芽細胞系細胞から分泌される液性因子による作用が不可欠であることが示唆されている⁵³⁻⁵⁴)。また、PTH、プロスタグランチン、 $1.25(\text{OH})_2\text{D}_3$ などの骨吸収促進物質に対する受容体の多くが骨芽細胞系細胞に局在する^{27,55})。一方、骨吸収抑制因子であるカルシトニンの受容体は破骨細胞系細胞にあり、カルシトニンは破骨細胞に直接作用してその分化と活性化を抑制する⁵⁶)。破骨細胞の活性化の結果、吸収窩が形成され、吸収窩表面には酸とプロテアーゼによって修飾された骨基質成分と破骨細胞によって分泌されたグリコサミノグリカンが吸着される。この吸収窩表面が骨芽細胞の誘導作用をしていると考えられている。骨芽細胞の誘導作用をする物質は骨芽細胞により分泌され、不活性の状態では骨基質中に存在し、破骨細胞による骨吸収過程で骨基質から掘り出され、酸やプロテアーゼによって活性化されて作用する可能性が示唆されている⁴⁶)。

一方、乳歯歯根吸収過程では、破歯細胞の前駆細胞を象牙前質・象牙質に誘導し分化させる機構については全く明らかにされていない。本研究でも観察されたように、破歯細胞ないし破歯細胞の前駆細胞は象牙前質に直接誘導され、付着し、未石灰化象牙前質を吸収する。吸収最前線のよりさらに歯冠側の象牙前質に萎縮象牙芽細胞が観察され始める部位で、単核小型細胞が象牙芽細胞間に最初に観察され、続いてTRAPase陽性の破歯細胞の前駆細胞が出現してきた。これらの小型単核間葉系細胞の由来とその機能は明らかではないが、その一部の細胞は破歯細胞の誘導・分化に作用している可能性が示唆される。また、これらの単核細胞の一部は、ALPase活性を持つ形成系細胞であることが明らかになったが、どのような受容器を有するかについては今後の詳細な解析が必要であ

る。隣接ないし周囲に単核小型細胞の観察されない象牙前質の破歯細胞は、吸収窩を形成していないという興味ある所見も観察された。さらに、破歯細胞の定着には、露出した石灰化基質(石灰化象牙質)は必要ないことが示された。

修復期における形成系細胞の誘導機構・分化機構も不明である。しかしながら、骨組織と同様に、破歯細胞の遊離した吸収窩表面構造ないし基質が誘導作用をしている可能性が高い^{16,52})。

5. 破歯細胞による乳歯歯根吸収

骨は活発な吸収と形成を営むことにより、骨改造現象を繰り返している。この両過程間の動的平衡関係により、骨の形態と機能が維持されている。さらに骨はカルシウムとリンの貯蔵庫としての機能を果たし、体内カルシウム濃度調節に関与している。この平衡関係は、骨形成に携わっている骨芽細胞と骨吸収に携わっている破骨細胞との間の機能的供役(カップリング)で成り立っていることが知られている。骨表面は骨芽細胞系細胞に被われており、これらの細胞には多くの骨吸収因子の受容体が存在し、その作用により破骨細胞の前駆細胞との接触下での破骨細胞の形成と骨表面への付着・活性化が起り、骨吸収が進行する。骨芽細胞系細胞間、また骨芽細胞系細胞と骨細胞間にはギャップ結合があり、互いにネットワークを形成している。

一方、乳歯歯根吸収過程では、吸収が優位の現象であり、吸収と形成との動的平衡関係は成立しておらず、さらに体内カルシウム代謝調節機構に基づくものでもない。また、吸収面全体は間葉系細胞あるいは破歯細胞で被われていないし、間葉系細胞間にネットワーク形成も観察されていない。既に、破歯細胞はカルシウム代謝因子として重要なPTH抽出物により影響を受けなかったとの報告がある³²)。これは破歯細胞周囲の間葉系細胞にこれらの受容器が存在しないためなのか、両細胞間のカップリング機構

が異なるためなのか不明であるが、破歯細胞の破骨細胞との機能的差異が示唆される。

このように、破歯細胞は多核巨細胞であり、細胞内に多数のミトコンドリア、ライソゾーム、貪食胞と液胞を、吸収面に波状縁と明帯を持ち、破骨細胞と類似の基本微細構造を持つ。また、石灰化組織を溶解し、吸収機能を果たしている点では、破歯細胞と破骨細胞とは同じ基本機能を担っている。しかし、乳歯歯根吸収現象は、骨改造現象とは生理的に異なるものであり、破歯細胞と破骨細胞の詳細な形態的・機能的差異については分子生物学的検索が必要と思われる。

V 結 論

ヒト乳歯の歯根吸収過程における、非石灰化象牙前質の吸収機序、修復期におけるセメント質様組織の添加機構、破歯細胞の機能調節・制御機能を組織細胞学・組織細胞化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. 破歯細胞は吸収面に発達した波状縁と明帯、細胞質中には多数のミトコンドリア、ライソゾーム、貪食胞、液胞を持ち、TRAPase活性陽性を示す多核巨細胞であり、破骨細胞と形態学的・組織細胞化学的に類似した細胞であった。
2. TRAPase活性陽性を示す破歯細胞突起は象牙細管の奥深くまで侵入しており、象牙質・象牙前質吸収において重要な働きをしていることが示唆された。
3. 破歯細胞は象牙前質に直接誘導され、付着し、未石灰化象牙前での吸収窩形成が観察された。破歯細胞は破骨細胞とは異なり、未石灰化基質吸収能を持つ細胞であることが示された。
4. 吸収窩へのセメント質様組織の添加・新生は、ALPase活性陽性で発達した粗面小胞体、ゴルジ装置を持つ単核小型間葉系細胞が関与

していると考えられ、修復機構の一部が明らかとなった。

5. 破歯細胞の周囲には多数の単核小型間葉系細胞が存在しており、破骨細胞の誘導・分化・機能活性に関与している可能性が示唆された。

このように、破歯細胞は破骨細胞と形態学的・機能的に類似する細胞であるが、石灰化組織の他に未石灰化象牙前質にも作用して吸収窩を形成する破歯細胞固有の機能を有していることが明らかになった。また、破歯細胞の機能調節・制御は破歯細胞の周囲に共存している単核小型間葉系細胞との相互作用による可能性が示唆された。

本稿を終えるに当たり、乳歯試料提供にご協力頂きました、あらい歯科・小児歯科医院 新井 桂先生、本学歯学部小児歯科学講座の諸先生方に感謝いたします。

文 献

1. Kronfeld R: The resorption of the roots of deciduous teeth Dent Cosmos 74 103-120, 1932.
2. Furseth R: The resorption process of human deciduous teeth studied by light microscopy, microradiography and electron microscopy. Archs Oral Biol 13: 417-431, 1968
3. Ten Cate AR: Shedding of deciduous teeth. In: Bhaskar SN, editor. Oral histology and embryology. 9th ed. C V. Mosby Co., St Louis pp. 386-403, 1980.
4. EINesr NM, Avery JA: Tooth eruption and shedding In: Avery JA editor. Oral development and histology. 2nd ed. Thieme Medical Pub. Inc., New York pp 110-129, 1994.
5. Ten Cate AR: Physiology tooth movement. Eruption and shedding In: Ten Cate AR ed. Oral histology. Development, structure, and function. 4th ed. Mosby Co., St. Louis. pp. 313-341, 1994.
6. 須賀昭一: 歯牙交換の組織化学. 歯界展望 38: 9-20, 1971.

7. 大野紘八郎：ヒト乳歯歯根吸収時に出現する Odontoclast の電子顕微鏡的研究。口病誌 39 : 113-158, 1972.
8. 鈴木駿介：ヒト乳歯象牙質吸収に関する電子顕微鏡的研究。歯基礎誌 16 : 186-244, 1974.
9. Rygh P : Orthodontic root resorption studied by electron microscopy. Angle Orthod 47 : 1-16, 1977.
10. 茂木伸夫, 鈴木 浩, 渡辺千秋, 佐々木崇寿, 東昇平：ヒト乳歯の生理的象牙質吸収に関する微細構造学的研究。歯基礎誌 27 : 1101-1114, 1985.
11. 茂木伸夫：ヒト乳歯の生理的歯根吸収における破歯細胞による象牙質の吸収機構に関する分析電子顕微鏡ならびに細胞化学的研究。歯基礎誌 30 : 460-480, 1988.
12. Sasaki T, Motegi N, Suzuki H, Watanabe C, Tadokoro K, Yanagisawa T, Higashi S : Dentin resorption mediated by odontoclasts in physiological root resorption of human deciduous teeth. Am J Anat 183 : 303-315, 1988.
13. 清水照雄, 鈴木 浩, 渡辺千秋：乳歯の生理的歯根吸収に関する微細構造学的研究(第1報)。破歯細胞の分化, 成熟, 退化過程について。昭歯誌 8 : 413-426, 1988.
14. 森岡尚：破歯細胞および破骨細胞とその関連細胞に関する microperoxidase を用いた細胞化学的研究。日矯歯誌 49 : 22-36, 1990.
15. Matsuda E : Ultrastructural and cytochemical study of the odontoclasts in physiologic root resorption of human deciduous teeth. J Electron Microsc 41 : 131-140, 1992.
16. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Suzuki I, Deguchi T, Suzuki K : Odontoclastic resorption at the pulpal surface of coronal dentin prior to the shedding of human deciduous teeth. Arch Histol Cytol 55 : 273-285, 1992.
17. Sasaki T, Shimizu T, Watanabe C, Higashi Y : Cellular roles in physiological root resorption of deciduous teeth in the cat. J Dent Res 69 : 67-74, 1990.
18. Hammarstrom LE, Hanker JS, Toverud SU : Cellular differences in acid phosphatase isoenzymes in bone and teeth. Clin Orthop Res 78 : 151-167, 1971.
19. Minkin C : Bone acid phosphatase : Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. Calcif Tissue Int 34 : 285-290, 1982.
20. 八若保孝：酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性反応を利用したヒト乳歯における破歯細胞の観察法。歯基礎誌 35-409-430, 1993.
21. Domon T, Sugaya K, Yawaka Y, Osanai M, Hanaizumi Y, Takahashi S, Wakita M : Electron microscopic and histochemical studies of the mononuclear odontoclast of the human. Anat Rec 240 : 42-51, 1994.
22. 松本芳郎：破歯細胞の硬組織吸収能に対する形態的ならびに機能的検討。口病誌 61 : 123-143, 1994.
23. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K : Odontoclastic resorption of the superficial nonmineralized layer of predeciduous teeth in the shedding of human deciduous teeth. Cell Tissue Res 277 : 19-26, 1994.
24. 渡辺知帆子, 入江一元, 小澤英浩, 野田 忠：ヒト乳歯歯根吸収組織における酒石酸耐性酸性フォスファターゼ活性の局在変化に関する研究。小児歯誌 33 : 565-571, 1995.
25. Sahara N, Toyoki A, Ashizawa Y, Suzuki K : cytodifferentiation of the odontoclast prior to the shedding of human deciduous teeth : An ultrastructural and cytochemical study. Anat Rec 244 : 33-49, 1996.
26. 松田恵理子：ヒト乳歯歯根吸収機構の微細形態学的解析(第1報)。走査電顕, 反射電子検出器ならびに電顕的酵素組織化学による解析。昭歯誌 10 : 298-312, 1990.
27. Rodan GA, Martin TJ : Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. A hypothesis. Calcif Tissue Int 33 : 349-351, 1981.
28. Chambers TJ : Regulation of osteoclast development and function. In: Rifkin BR, Gay CV, editors. Biology and physiology of the osteoclast CRC Press, Boca Raton, pp. 105-128, 1992.
29. 鈴木浩：ヒト破歯細胞の分化過程における酸性フォスファターゼ活性の局在変化に関する細胞化学的研究。昭歯誌 8 : 260-273, 1988.
30. 岡村毅：ウシ乳歯歯根吸収組織におけるコラーゲンナーゼ mRNA の in situ hybridization による検出。歯基礎誌 3 : 95-111, 1992.
31. Okamura T, Shimokawa H, Takagi Y, Ono H, Sasaki S : Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by in

- situ hybridization *Calcif Tissue Int* 52 : 325-330, 1993.
32. Freilich LS: Ultrastructure and acid phosphatase cytochemistry of odontoclasts: Effects of parathyroid extract *J Dent Res* 50 : 1047-1055, 1971
33. 松田恵理子: ヒト乳歯歯根吸収機構の微細形態学的解析(第2報). 破歯細胞の酵素細胞化学及び定量的光顕オートラジオグラフィによる解析. *昭歯誌* 11 : 311-321, 1991.
34. 大野和江: 生理的歯根吸収に伴う乳歯歯髓の変化に関する組織学的研究. *口病誌* 33 : 408-421, 1966.
35. 清水照雄, 日吉祥江: 乳歯の生理的歯根吸収に関する微細構造学的研究(第2報). 乳歯根ならびに歯根膜の吸収における線維芽細胞, セメント芽細胞および単核マクロファージの関与について. *昭歯誌* 9 : 320-329, 1989.
36. Sasaki T, Watanabe C, Shimizu T, Debari K, Segawa K: Possible role of cementoblasts in the resorption organ of human deciduous teeth during root resorption. *J Periodont Res* 25 : 143-151, 1990.
37. 後藤哲哉, 田中輝雄, 中田稔: ラット臼歯の生理的遠心移動による歯根吸収増齢的变化ならびに破歯細胞の成熟に関する形態学的研究. *小児歯誌* 29 : 665-675, 1991.
38. 松尾朗, 矢嶋俊彦: セメント層板と成長線の光学顕微鏡, 走査型電子顕微鏡とマイクロラジオグラフィによる観察. *歯基礎誌* 34 : 171-180, 1992.
39. Sakakura Y, Matsuo A, Yajima T: Demonstration of mononuclear tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells in mouse embryonic mandibles using the simultaneous azo dye technique and a confocal laser scanning microscope *Jap J Oral Biol* 38 : 605-609, 1996.
40. Burstone MS, Keyes PH: Studies on calcification. The effect of inhibition of enzyme activity on developing bone and dentin. *Ame J Pathol* 33 : 1229-1235, 1957.
41. Tsuchiya T, Matsumoto Y, Kurihara S: The fluorescent simultaneous azo dye technique for demonstration of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) activity in osteoclast-like multinucleate cells *J Bone Miner Metab* 13 : 71-76, 1995.
42. Show LM, Yang N, Neat M, Croop W: Immunological and clinical specificity of the immuno-chemical determination of prostatic acid phosphatase *Ann NY Acad Sci* 390 : 73-88, 1982.
43. Pearse AGE: Acid phosphatases. In: Pearse AGE editor. *Histochemistry, theoretical and applied*. Vol. 1, 3rd ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp. 545-575, 1968.
44. Oguro I, Ozawa H: The histochemical localization of acid phosphatase activity in BMU *J Bone Mineral Metab* 6 : 45-49, 1988.
45. Oguro I, Ozawa H: Cytochemical studies of the cellular events sequence in bone remodeling. Cytological evidence for a coupling mechanism *J Bone Mineral Metab* 7 : 30-36, 1989.
46. Puzas JE, Ishibe M: Osteoblasts/osteoclast coupling. In: Rifkin BR, Gay CV, editors. *Biology and physiology of the osteoclast*. CRC Press, Boca Raton pp 337-356, 1992.
47. Sakamoto S, Sakamoto M: Degradative processes of connective tissue proteins with special emphasis on collagenolysis and bone resorption *Molec Asp Med* 10 : 299-428, 1988.
48. Tanaka T, Morioka T, Ayasaka N, Iijima T, Kondo T: Endocytosis in odontoclasts and osteoclasts using microperoxidase as a tracer *J Dent Res* 69 : 883-889, 1990.
49. 永谷 敏: ヒト乳歯歯根吸収に関する知見補遺. *歯科医学* 51 : 859-881, 1988.
50. 渡辺千秋: ヒト乳歯の生理的歯根吸収におけるセメント芽細胞ならびにマクロファージの微細構造学的研究. *昭歯誌* 10 : 1-13, 1990.
51. Sahara N, Suzuki K: Resorption and repair of human deciduous teeth. Mononuclear phagocytic cells on the resorbed dentin surface in the transitional phase between resorption and repair. *Dentistry in Japan* 30 : 14-21, 1993.
52. Sahara N, Okafuji N, Toyoki A, Ashizawa Y, Deguchi T, Suzuki K: Cementum-like tissue deposition on the resorbed pulp chamber wall of human deciduous teeth prior to shedding. *Acta Anat* 147 : 24-34, 1993.
53. Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Mosely JM, Martin TJ, Suda T: Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation *Endocrinology* 123 : 2600-2602, 1988.
54. Irie K, Ozawa H: Relationships between tooth

- eruption, occlusion and alveolar bone resorption. Histochemical and cytological studies of bone remodeling on rat incisor alveolar bone facing the enamel after root resection. *Arch Histol Cytol* 53:511-1990.
55. McSheehy PMJ, Chambers TJ: Osteoblastic cell mediat osteoclastic responsiveness to parathyroid hormone. *Endocrinology* 118:824-838, 1986.
56. Stern PH, Lakatos P: Effects of pharmacological agents on osteoclasts. In: Rifkin BR, Gay CV, editors. *Biology and physiology of the osteoclast*. CRC Press, Boca Raton. pp. 357-395, 1992.