

学 位 論 文

歯周組織破壊におけるプロスタグランディン
の役割に関する実験病理学的研究

宮 内 睦 美

学 位 論 文

歯周組織破壊におけるプロスタグランディン
の役割に関する実験病理学的研究

宮内睦美

広島大学歯学部口腔病理学講座

(指導：二階宏昌教授)

1 9 9 3 年

謝辞

本研究に際して、終始後懇篤なるご指導ならびにご校閲を賜りました広島大学歯学部口腔病理学講座二階宏昌教授に心から感謝の意を表します。また、ご教示、ご校閲を賜りました本学歯科保存学第二講座岡本 莫教授ならびに本学歯科薬理学講座土肥敏博教授に深甚なる謝意を表します。

さらに本研究の遂行および論文の作成にあたりご指導、ご助言を賜わった本学口腔病理学講座伊集院直邦助教授に謹んでお礼を申し上げますとともに、多くのご支援を頂きました本学附属病院高田 隆講師、小川郁子先生ならびに伊東博司先生を始めとする本学口腔病理学講座の皆様方に深謝いたします。

最後に、常に心の支えとなってくれた家族に心から感謝します。

目次

I. 緒言	1
II. 材料ならびに方法	3
1. 実験 I ; PGE ₂ 局所投与がラット辺縁歯周組織に及ぼす影響 の検討	3
2. 実験 II ; 実験的歯周炎組織における各種PGの局在部位の免 疫組織化学的検討	6
(1) ラット各種臓器を用いたPGの免疫組織化学的染色方法の 検討	6
(2) 実験的歯周炎組織におけるPGの局在に関する検討	8
III. 結果	10
1. 実験 I ; PGE ₂ 局所投与がラット辺縁歯周組織に及ぼす影響 についての検討結果	10
(1) 実験 I-1 ; PGE ₂ 浸透投与によって辺縁歯周組織に惹起 された経時的変化	10
(2) 実験 I-2 ; 各種濃度のPGE ₂ 浸透投与により12時間後の 辺縁歯周組織に惹起された変化	12
(3) 実験 I-3 ; PGE ₂ および内毒素 (Edx) の連続投与により 辺縁歯周組織に惹起された変化	14
2. 実験 II ; 実験的歯周炎組織における各種PGの局在部位につ いての免疫組織化学的な検討結果	15
(1) ラット各種臓器を用いたPGの免疫組織化学的染色方法の 確立とその局在・分布	15
1) PGの免疫組織化学的染色のための至適条件	15
2) ラット各種臓器におけるPGの局在・分布	16
3) ラット辺縁歯周組織 (歯肉, 歯根膜, 歯槽骨) および	

歯髄におけるPGの局在・分布	17
(2) 実験的歯周炎組織におけるPGの免疫組織化学的染色所見	18
1) 根尖性歯周炎発症群	18
a) 歯髄炎におけるPGの免疫組織化学的局在・分布	18
b) 根尖病巣におけるPGの免疫組織化学的局在・分布	19
2) 辺縁性歯周炎発症群	19
IV. 考察	21
1. PGE ₂ の局所投与によって惹起された辺縁歯周組織の形態学的変化	21
(1) 実験方法について	21
(2) PGE ₂ の惹起する炎症性変化について	23
(3) PGE ₂ の破骨細胞性骨吸収刺激作用について	24
(4) PGE ₂ とEd _x の作用の相互関係について	28
(5) PGE ₂ の歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響について	30
2. 実験的歯周炎組織におけるPGの局在	31
(1) PGの免疫組織化学的染色方法について	31
(2) 正常組織におけるPGの局在分布について	32
(3) 歯髄炎に続発した実験的根尖性歯周炎組織におけるPGの局在・分布について	36
(4) 実験的辺縁歯周炎組織におけるPGの局在・分布について	38
V. 総括	41
参考文献	44
表	59
付図説明	64
図	74

I . 緒 言

ブラク細菌由来内毒素の惹起する組織反応は、歯周炎の発症と進展・増悪に重要な役割を果たしている。近年、内毒素刺激によって宿主の免疫細胞や間質細胞から産生されるプロスタグランディン (PG), ロイコトリエン等のアラキドン酸代謝産物およびインターロイキンを始めとするサイトカイン等の様々な生理活性物質がこの過程に関与することが明らかとなった¹⁻⁴⁾。中でも、種々の刺激により細胞膜から放出されるアラキドン酸から合成されるPGは炎症部位に多量に存在しており、血管の拡張、浮腫、疼痛等を引き起こす炎症の可溶性メディエータとして、その重要性は近年ますます増しつつある。特にPGE₁, PGE₂のEグループのPGは、Klein and Raisz⁵⁾によってその強力な破骨細胞性骨吸収刺激作用が報告されて以来、リウマチ性関節炎や慢性辺縁性歯周炎等の骨に近接した特殊な部位での慢性炎症性疾患における病的な骨吸収に局所的因子として関与することが注目されてきている^{6,7)}。

歯周領域においては、炎症時歯肉組織や歯肉溝液中における各種PGレベルが健常時に比べて上昇することが報告されており⁸⁻¹³⁾、歯肉溝液中のPG (特にPGE₂) 量が歯周組織破壊の程度や進行しやすさと相関する可能性が示唆されている^{12,13)}。また、インドメタシン等のPG合成阻害剤が歯周炎の際の歯槽骨破壊を抑制するとの報告もあり^{14,15)}、PGが炎症性歯周組織破壊に重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。

しかしながら、PGの作用に関する様々な報告は生化学的手法や培養系を用いた実験によるものが主で、in vivoの材料を用い組織形態学的にPGの作用を検討した研究はきわめて少ない。また、PGは、1) 分子量の

小さな物質で、拡散し易く、2)ほとんどの有機溶媒に可溶性で、3)常温で不安定な物質であり、4)多くの固定液の対象となるアミノ基を欠く上、5)正常組織で組織1mgあたりpicogramからnanogramと極少量しか存在しておらず、その免疫組織化学的アプローチが非常に困難である。さらに、歯周組織のように硬組織を含む部位からの標本作製に当って必要とされる脱灰操作はPGの検出をより困難にしていると考えられ、歯周炎組織でのPGの局在・分布を免疫組織化学的に検討した研究はほとんど遂行されていないのが現状である。

そこで、本研究では、炎症性歯周組織破壊におけるPGの関与を明確にすることを目的として、以下の両実験を行った。実験Iでは、ラット辺縁歯周組織にPGE₂を局所投与することにより同部歯周組織に惹起される変化を形態学的ならびに組織計測学的に検討するとともに、PGE₂と内毒素を連続的に投与することにより辺縁歯周組織に惹起される変化を観察し、PGと内毒素の作用の相互関係についても検討を加えた。次に実験IIでは、ラットを用い、PG合成能が高くその生理学的調節機構が注目される各種臓器を用いPGの免疫組織化学的染色のための至適条件の確立を図った後、ラットに実験的に惹起した根尖性歯周炎ならびに辺縁性歯周炎組織における各種PG (PGE₂, PGF_{2α}, 6ケトPGF_{1α}) の局在をその方法を用いることによって検索した。

II. 材料ならびに方法

1. 実験 I ; PGE₂局所投与がラット辺縁歯周組織に及ぼす影響の検討

実験には、8週齢通常飼育ウイスター系雄性ラット（体重約210g）69匹を用いた。実験ならびに観察目的によりこれらを3群に分け、以下の如く各群の実験スケジュール（図1）に従い、それぞれの濃度のPGE₂を投与し、材料を採取した。ラットは通常固形飼料（日本クレア社製）にて飼育し、ラットの匹数は各実験期間群（グループ）当り3匹とした。また、PGE₂の投与は、動物に体重100グラム当り0.5mlとなるように20%ウレタン（片山工業社製）を腹腔内注射することにより全身麻酔を行った後、仰臥位に固定し、以下の方法で行った。すなわち、左右の上顎臼歯部咬合面から口蓋側歯肉にかけて、0.05%の割合でエタノールを含む生食水（大塚社製）に溶解したPGE₂（フナコシ社製）溶液を浸した滅菌綿棒（直径1mm長さ6～8mm）を静置し、20分毎に3回交換することにより1時間にわたって歯肉溝よりPGE₂の浸透投与を図った（図2）。なお、実験期間終了後は、エーテル麻酔下にて左右上顎臼歯部を顎骨每一塊として摘出した。

(1) 実験 I-1 ; PGE₂投与によって辺縁歯周組織に惹起される経時的な組織変化の検討

36匹のラットを3匹ずつ12のグループに分けた。0.05%エタノール/生食水に1mg/mlの割合で溶解したPGE₂を7グループ（21匹）のラットに上記の方法で投与し、投与開始後1, 3, 12時間, 1, 2, 3日, 1週後にエーテル麻酔下で材料を採取した。

アルコール/生食水投与対照群（AL/PS投与群）として、4グループ

(12匹)のラットに0.05%エタノール/生食水を同様の方法で投与し、投与開始後12時間、1、2日、1週後に材料を採取した。また、残りの1グループ(3匹)のラットは未処置対照群とし、同様に材料を採取した。

(2) 実験 I-2 ; 各種濃度PGE₂投与後の辺縁歯周組織に惹起される組織変化の検討

15匹のラットを3匹ずつ5グループに分け、0.001、0.01、0.1、1、2 mg/mlの割合で0.05%アルコール/生食水に溶解したPGE₂溶液をそれぞれのグループの各ラットに実験 I-1と同様の方法で1時間投与し、投与開始12時間後に材料を採取した。ただし、1mg/ml PGE₂投与グループの観察には、実験 I-1で採取した投与開始後12時間の材料を用いた。

(3) 実験 I-3 ; PGE₂と内毒素 (Edx) の連続投与によって辺縁歯周組織に惹起される経時的な組織変化の検討

21匹のラットを3匹ずつ7グループに分け、0.05%アルコール/生食水に1mg/mlの割合で溶解したPGE₂を上述の方法で各ラットに1時間投与した後、生食水に5mg/ml濃度で溶解したE. Coli由来のEdx (シグマ社製)を同様に続いて1時間投与し、PGE₂とEdxの連続投与群とした。Edx投与開始後1、3、12時間、1、2、3日、1週後に材料を採取した。

光顕的ならびに電顕的観察方法 : 各々のラットから左右上顎臼歯部を一塊として摘出した。摘出材料はKarnovsky固定液 (4% パラホルムアルデヒド・5%グルタルアルデヒド混合溶液, PH7.4, 4℃) で4~6時間固定後、0.1Mカコジル酸塩緩衝液 (4℃) で1晩洗浄し、10%EDTA-

4Naリン酸塩緩衝液で約10～14日間脱灰を行った。次に、これらの脱灰材料をできるだけ第1臼歯の近心根ならびに第1，第2臼歯の口蓋近心・遠心根に平行になるようにこれらの歯根を含めて顎骨ごと頬舌的に細切し，0.1Mカコジル酸塩緩衝オスミウム酸にて1時間固定し，2%酢酸ウラニルによるブロック染色を経て，通法に従い，実体顕微鏡下で方向を確認しながらEpok812（応研商事）に包埋した。

エポキシ樹脂包埋材料より，根尖部を含み歯の長軸に平行な thick section（2 μ m厚）を作製，トルイジンブルー染色を施し，光顕観察を行った。また，一部の材料に関しては，超薄切片を作製し，ウラニル・鉛二重染色を施し透過型電子顕微鏡（日立社製H-500または日本電子社製JEOL-100S）にて観察した。

破骨細胞数の組織計測学的算定方法：組織計測学的観察には上述の方法で作製したエポキシ樹脂包埋材料を用いた。上顎第1臼歯の近心根ならびに上顎第1，第2臼歯の口蓋近心・遠心根の各歯根を含むブロックから作製したトルイジンブルー染色切片の中から根尖部が含まれ，それぞれ約20 μ m以上の間隔を置いた切片3枚を選び出し，ocular micrometerを用いて歯槽骨頂部から根尖側に向かって1mmの範囲の歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って出現している破骨細胞（図3）の数を計測し，その平均値をその部位における破骨細胞数として，1匹当たり5部位以上，各条件群3匹当たり計15部位以上における破骨細胞数を算出した。この際，破骨細胞の同定は，吸収されている歯槽骨骨縁に近接して存在する単核ないし多核の巨細胞で，大小様々の空胞を伴う淡明な細胞質を有することを基準として行った。なお，各条件群における計測結果は平均値±標準誤差（M±SE）で表し，有意差の検定には標準“t”検定を用いた。

2. 実験Ⅱ；実験的歯周炎組織における各種PGの局在部位の免疫組織化学的検討

始めに述べたようにPGは分子量が小さく不安定な物質であるため、免疫組織化学的なアプローチがきわめて困難とされ、PGの免疫組織化学的局在に関する研究は非常に少なく、特に辺縁歯周組織の如く脱灰操作を必要とする組織でのPGの局在に関する報告は皆無に等しい。また、現時点ではPGの免疫組織化学的染色手法も確立しているとは言えない。そこで実験Ⅱでは、まず、予備実験として、(1)ラットのPG合成能が高いとされる各種臓器を用いてPGの免疫組織化学的染色手法の確立を図るとともに、脱灰標本におけるその染色方法についても検討した。次に、(2)実験的に惹起したラットの根尖性ならびに辺縁性歯周炎組織におけるPGの局在・分布の検討を同方法により試みた。

(1) ラット各種臓器を用いたPGの免疫組織化学的染色方法の検討

試料には、通常飼育、7週齢ウイスター系雄性ラットの胃、肝、腎、小腸、肺、脾、精囊ならびに上顎臼歯部辺縁歯周組織を用いた。上顎臼歯部辺縁歯周組織以外の各材料は、1～2mm厚に細切した後、4℃の条件下で固定した。固定液としては、10%中性緩衝ホルマリン溶液、4%パラホルムアルデヒド溶液、ブアン液について検討し、材料の一部は未固定のまま処理した。固定後各材料はO.C.T.コンパウンド(Miles Incorporation)に包埋し、4μm厚のクリオスタット切片を作製した。また、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した各臓器の材料については、一部、10%EDTA-4Naリン酸塩緩衝液に10～12日間浸漬(4℃)したものについても同様に検討した。免疫組織化学的検出には、ベクタスティンABCキット(Vector Laboratories)を用いた。各ステップの反応時間と反応

温度、また、内因性ペルオキシダーゼのブロックに関しても至適条件を検討した。一次抗体としては、市販のRIA用のポリクローナル抗体である抗PGE₂家兔血清 (Daiagnostic Pasteur), 抗PGF_{2α}家兔血清 (Diagnostic Pasteur), 抗6ヶトPGF_{1α}家兔血清 (Cayman Chemical Company) を用いた。なお、クリオスタット切片のH₂O₂処理は、ビオチン化二次抗体処理後、室温で1時間行った。図4に染色方法の概略を示した。また、抗体希釈濃度や各PG間の交叉免疫反応を表1に示した。

一方、上顎臼歯部辺縁歯周組織は4℃の冷中性緩衝ホルマリン溶液にて1晩固定後、4℃の条件下で10%EDTA-4Na・リン酸塩緩衝液にて5~12日間低温脱灰した。脱灰後、第1臼歯部を顎骨毎頬舌的方向で3mm厚に細切し、O. C. T. コンパウンドに包埋し、他の軟組織材料と同様に厚さ7μmのクリオスタット切片を作製し、4℃のリン酸塩緩衝食塩水 (phosphate buffered saline; PBS) に浮遊させた。免疫染色方法に関しては、通常の未脱灰標本で検討した方法 (図4) に対して、脱灰標本においても良好な染色性が得られるよう若干の変更を加えた (図5)。すなわち、切片作製後は浮かし法を用い、直ちにヒストファインSAB-POキット (ニチレイ社製) を用いて免疫組織化学染色を行った。非特異的反応のブロックのため正常ヤギ血清を4℃で30分作用させた後、一次抗体として、前述の抗PGE₂家兔血清、抗PGF_{2α}家兔血清および抗6ヶトPGF_{1α}家兔血清を4℃で48時間作用させ、二次抗体としてビオチン化ヤギ抗家兔IgGを4℃で30分作用させた。次いで、室温で2時間0.3% H₂O₂とインキュベートすることにより内因性ペルオキシダーゼ反応をブロックした。更に、ペルオキシダーゼ結合ストレプトアビジンと室温で30分反応させた後、DAB-H₂O₂溶液で発色させた。発色終了後、浮遊切片をスライドガラスに貼布し、マイヤーのヘマトキシリン溶液にて対比染色を行っ

た。

陰性対照試験として、一次抗体の代わりに緩衝液あるいは非免疫正常家兎血清を用い、その他の処理はすべて同様に行うことにより、いずれの免疫染色にも非特異的陽性反応の起こっていないことを確認した。

(2) 実験的歯周炎組織におけるPGの局在に関する検討

実験には7週齢ウイスター系雄性ラット36匹を用い、2群に分け、以下の方法により、1群には根尖性歯周炎を、他群には辺縁性歯周炎を惹起させた。処置に際しては、動物を20%ウレタンの腹腔内注射による全身麻酔下、仰臥位に固定した。

1) A群；根尖性歯周炎発症群

上顎左右第1臼歯の咬合面から電気エンジンを用いて#1/2のラウンドバーにて天蓋を切削・除去することにより露髄させ、開放したまま放置し、歯髄炎の伸展に伴う根尖性歯周炎を惹起させた。

2) B群；辺縁性歯周炎発症群

上顎左右第1，第2臼歯隣接面の接触点部分を中心に、咬合面から電気エンジンに装着した#1/2のラウンドバーを用いて歯質を切削・穿孔し、両歯間に乳頭部に達する小孔を形成後、放置し食片圧入を図ることにより、辺縁性歯周炎を惹起させた。

処置後は、図6に示す実験スケジュールに従い、高蔗糖含有粉末飼料Diet 2000（日本クレア社製）にて飼育した。なお、ラットの匹数は各実験期間毎に1グループ3匹とした。A群、B群ともに、処置後3，5

日、1、2、3週後に上顎臼歯部を顎骨每一塊として採取した。なお、A群、B群それぞれに対して、対照として未処置のラット3匹ずつから同様に材料を採取した。予備実験結果に従って、一塊として取り出した上顎骨は、10%中性緩衝ホルマリン溶液で4℃にて一晩固定し、A群では第1臼歯を含む部分を、B群では第1臼歯遠心根から第2臼歯近心根にかけての歯間乳頭を含む部分を頬舌的方向にそれぞれ3mm厚に細切した後、図5に示した手順に従って各種PG (PGE₂, PGF_{2α}, 6ケトPGF_{1α}) の局在を免疫組織化学的に検討した。

III. 結 果

1. 実験 I ; PGE₂局所投与がラット辺縁歯周組織に及ぼす影響についての検討結果

(1) 実験 I-1 ; PGE₂浸透投与によって辺縁歯周組織に惹起された経時的変化

1) 光顕・電顕的観察による形態学的変化

対照群における所見 : 0.05%アルコール/生食水投与対照群 (AL/PS投与群) では、いずれの実験期間においても未処置群と比べて接合上皮、接合上皮下結合組織、歯根膜、歯槽骨にほとんど変化はみられなかった。すなわち、接合上皮細胞間には少数の好中球浸潤が観察される程度であり、接合上皮直下結合組織の炎症細胞浸潤や水腫等はみられなかった (図7 A)。また、歯根膜側歯槽骨骨縁部に破骨細胞はほとんど認められなかった (図7 B)。時折、観察される破骨細胞には、小型で細胞質突起をほとんど持たない休止状態と思われるものや破骨細胞と同様の細胞質を有する前破骨細胞様の単核細胞が多く、骨縁から離れむしろ血管壁に近接して観察された (図7 C)。電顕的にも、これらの細胞は明らかな刷子縁や明帯の形成を伴わない、小型で円形の休止期とみなされる細胞であった。

実験群における所見 : 1mg/ml PGE₂溶液の浸透投与開始後1時間より既に、歯肉部において、接合上皮直下の血管拡張や浮腫とともに、接合上皮ならびに接合上皮直下結合組織に多数の好中球浸潤が光顕的に観察された (図8 A)。接合上皮内および上皮直下の好中球浸潤は投与開始後3~12時間にかけて顕著となった (図8 B)。歯肉部でのこれらの変

化は経時的に増強し、12時間後ではほぼピークに達した後、減少し、投与後1週間では対照群とほぼ同程度にまで回復していた。電顕的にも、投与開始後1時間から既に、歯肉接合上皮部では、細胞間隙の著明な拡張や細胞間への好中球浸潤(図9)、細胞内空胞構造の増加、歯冠頂側部接合上皮細胞の変性や外側基板の消失等が観察された。なお、これらの電顕的变化も投与開始後12時間でピークに達した後、1週間後には対照群と同程度にまで回復していた。一方、口腔歯肉溝上皮、口腔歯肉上皮および上皮直下結合組織には好中球浸潤の増加、血管拡張、浮腫等の変化は観察されなかった。

深部歯根膜組織においては、PGE₂投与開始後3時間より、歯槽骨骨頂部(図10A)から中央部(図10B)にかけての歯槽骨骨縁部に破骨細胞の出現を伴う多数の骨吸収窩が観察されたが、歯槽骨外縁側での骨吸収像は認められなかった。電顕的には、歯根膜側歯槽骨骨縁部にみられる破骨細胞は、投与開始後1時間より既に細胞容積を増すとともに、骨縁に向かって細胞質突起を伸長し始め(図11)、骨吸収窩に対して刷子縁の形成を示すactiveな破骨細胞へと変化していた(図12)。Activeな破骨細胞は投与開始後3時間から1日にかけて多数観察されたが、それ以降は骨縁から離れ、あるいは他の骨細胞や線維芽細胞を介して位置する、活動後と思われる破骨細胞が増加していた(図13)。その他、PGE₂投与によりコラーゲン原線維を含んだ空胞を有する歯根膜線維芽細胞がしばしば観察され、時間の経過に伴って貪食空胞数が増加するとともに個々の空胞内のコラーゲン原線維が増加する傾向にあった(図14)。このような歯根膜線維芽細胞の貪食像は、activeな破骨細胞周辺部で特に目立っていた。また、骨縁に近接した毛細血管周囲には、核小体の明瞭な胞状核と破骨細胞と同様の細胞質を有する、破骨細胞前駆細胞とみなさ

れる単核細胞や多数の細胞内空胞やリソソームを有し、不規則なmicrovilliの形成を示すマクロファージ様細胞の増加もみられた(図15)。また、活発な破骨細胞性骨吸収のみられる歯槽骨骨縁に対向するセメント質の一部では、破セメント細胞によるセメント質吸収像が認められた(図16)。なお、歯根膜部におけるこれらの変化も投与後1週間で対照群とほぼ同様の状態に戻っていた。

2) 組織計測による破骨細胞数の測定結果

未処置群、AL/PS投与群ならびにPGE₂投与群での歯根膜側歯槽骨骨縁における破骨細胞数の測定結果を表2の一部と図17のグラフで表した。アルコール/生食水投与開始後12時間、1、2日、1週における破骨細胞数は、それぞれ 4.40 ± 0.81 、 2.50 ± 0.97 、 3.00 ± 1.04 、 3.91 ± 1.18 で、いずれの観察期間においても未処置群の値 3.47 ± 0.68 とほぼ同様であった。

PGE₂投与群における破骨細胞数は投与開始後3時間から有意に増加し、12時間後で最大値(9.20 ± 1.23)に達した後、徐々に減少した。なお、投与開始後3、12時間および1日においては未処置群と、また12時間および1日においてはAL/PS投与群との間に有意差($P < 0.01$)が認められた(表2、図17)。

(2) 実験 I - 2 ; 各種濃度のPGE₂浸透投与により12時間後の辺縁歯周組織に惹起された変化

1) 顕微鏡・電顕的観察による形態学的変化

いずれの濃度の場合にも基本的には実験 I - 1 と同様の組織変化が観察され、濃度の上昇に伴い増強する傾向を示した。接合上皮内および上皮直下の好中球浸潤は、0.001mg/ml濃度群から既にみられ(図18A)、

0.1mg/ml濃度で最も顕著であった(図18B)が、2mg/ml濃度ではほとんど観察されなかった(図18C)。破骨細胞の出現は、0.01~1mg/ml投与群で顕著に認められた(図19)。しかしながら2mg/mlの高濃度投与では破骨細胞は明らかに減少し、観察される少数の破骨細胞には骨吸収窩からやや離れて位置する小型のものが多かった(図20)。また、濃度の上昇に伴って歯冠頂側端部の接合上皮細胞に変性所見が観察された。すなわち、変性に陥った接合上皮細胞は、細胞膨化とともにトルイジンブルーによる染色性が著しく低下し、中にはセメント・エナメル境近くまで広範囲にわたって変性所見の広がっている例もあった(図21A)。電顕的には、これらの細胞に、電子密度の低下、細胞内小器官の膨化、細胞膜の破壊等が観察された(図21B)。さらに、接合上皮直下の線維芽細胞(図22)、歯槽骨頂部の骨芽細胞(図23)やその近くの線維芽細胞にもrERの拡張、ミトコンドリアの膨化、細胞膜の破壊等の変性像がしばしば認められたが、破骨細胞や前破骨細胞には明瞭な変性像が観察されなかった。一方、歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食像は、0.01~1mg/mlでその数や分布を増す傾向にあった。

2) 組織計測による破骨細胞数の測定結果

各種濃度のPGE₂投与開始後12時間の破骨細胞数の計測結果を表2の一部と図24のグラフで表した。投与開始後12時間における破骨細胞数は、0.001mg/ml濃度では 3.48 ± 0.55 で、未処置群やAL/PS投与群の値とほぼ同様であったが、0.01, 0.1, 1mg/ml濃度ではこれらの群と比べ有意($P < 0.01$)に増加した。破骨細胞数は0.1mg/mlで最大値(10.04 ± 0.98)を示したが、高濃度投与群では減少していた。2mg/mlPGE₂投与開始後12時間での破骨細胞数は 5.48 ± 0.72 で、未処置群やAL/PS投与群におけるよりもやや高い値であったが、有意差はなかった(表2, 図24)。

(3) 実験 I-3 ; PGE₂およびEdxの連続投与により辺縁歯周組織に惹起された変化

1) 光顕・電顕的観察による形態学的変化

1mg/ml PGE₂と5mg/ml Edxの連続投与群 (PGE₂+Edx投与群) においても基本的にはPGE₂単独投与群 (PGE₂投与群) とほぼ同様の変化がみられたが、その変化は増強される傾向にあった。中でも好中球浸潤やactiveな破骨細胞数の増加が特に目立った。PGE₂+Edx投与群における接合上皮内への好中球浸潤はEdx投与開始後1時間から既に観察され、3時間で著明となり、上皮内に好中球を貯溜した裂隙の形成を示す標本も観察された (図25)。PGE₂投与群では投与開始後1週間で好中球の上皮内浸潤が未処置群とほぼ同程度にまで減少していたのに対して、PGE₂+Edx投与群では、1週間後においても依然として著明な接合上皮内への好中球浸潤の存続が認められた (図26)。一方、歯根膜部歯槽骨骨縁には、Edx投与開始後1時間で既に多数のactiveな破骨細胞や前破骨細胞様細胞が認められた (図27)。PGE₂投与群と比較した場合、PGE₂+Edx投与群は、破骨細胞の出現時間を早めるとともに、いずれの観察期間においてもその出現数を増加させる傾向にあった。線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食像もPGE₂投与群に比べ増加しており、12時間後にはかなり著明であった。また、接合上皮直下結合組織や歯根膜組織の血管周囲に、マクロファージと思われる細胞の増加が観察された。

2) 組織計測による破骨細胞数の測定結果

PGE₂とEdxの連続投与により破骨細胞数の増加はより著明化していた。表3はPGE₂+Edx投与群における破骨細胞数の経時的变化を示し、図28はその測定結果をグラフに表したものである。連続投与後の破骨細胞数の経時的な出現パターンは、PGE₂投与群のそれとほぼ同様であった。すな

わち、破骨細胞数は1時間で既に増加しており、3時間で最大値に達し、3時間から1日にかけてほぼ同様の値を継続した後、徐々に減少した。未処置群に対し投与開始後3、12時間および1日では危険率1%で、2および3日では5%で有意差が観察された(表3, 図28)。また、AL/PS投与群と比べても12時間と1日では危険率1%で、2日では5%で有意差が認められた(図28)。図29は、PGE₂+Edx投与群の計測値をPGE₂投与群(実験I-1)の値と比較したグラフである。PGE₂+Edx投与群は、実験期間を通して常にPGE₂投与群より高値を示した。なお、投与後3時間と3日において、PGE₂+Edx投与群とPGE₂投与群の間にそれぞれ危険率5%と1%で有意差が認められた。

2. 実験II ; 実験的歯周炎組織における各種PGの局在部位についての免疫組織化学的な検討結果

(1) ラット各種臓器を用いたPGの免疫組織化学的染色方法の確立とその局在・分布

1) PGの免疫組織化学的染色のための至適条件

脱灰材料を含む10%中性緩衝ホルマリン固定あるいは未固定-クリオスタット切片に対して、ABC法を用いることによりPG保有細胞の免疫組織化学的局在の検討が可能であった。未固定材料を用いた場合、PG陽性反応は染色条件による影響を受け易く、その染色性は不安定で、染色毎に異なる強度を示した。一方、10%中性緩衝ホルマリン固定材料では比較的安定した染色性が得られた。また、両固定条件の間でPGの分布パターンに違いはみられなかった。ブアンないし4%パラホルムアルデヒド溶液による固定材料では明らかな陽性反応を得ることができなかった。

以上の結果より、新鮮材料を10%中性緩衝ホルマリン溶液で20分間前固定した後、O.C.T.コンパウンドに包埋した材料のクリオスタット切片を同固定液で20分間さらに後固定し、4℃の条件下でABC法による染色を施すことにより比較的良好で安定した染色性が得られることを明らかにすることができた。

免疫組織化学的染色によるPGの局在は、一般に細胞質内にびまん性に分布する褐色顆粒状の、あるいは細胞膜と関連した線条のDAB反応産物として観察され、その反応性は細胞質周辺部で強い傾向にあった。細胞外領域における陽性反応は観察されなかった。ラット各種正常臓器における3種のPG (PGE₂, PGF_{2α}, 6ケトPGF_{1α})の免疫組織化学的染色は、6ケトPGF_{1α}が血管内皮細胞に若干強く検出された以外、一般に類似の染色強度と分布パターンを呈した。なお、10%中性緩衝ホルマリン固定による10%EDTAリン酸塩緩衝溶液脱灰材料のクリオスタット切片でも類似の分布パターンを観察できたが、その染色性は著しく低下しており、脱灰標本を用いてPGの免疫組織化学的局在を検討するためには、標本作製方法、染色方法や条件等をさらに検討する必要があることが示唆された。そこで、図5に示す如く、材料を3mm厚に細切した後、脱灰することによって脱灰処理時間を短縮するとともに、浮かし法やSAB法を用いることによって反応性を高めるなどの改良を加えた結果、辺縁歯周組織の脱灰標本においても良好な染色結果を得ることが可能となった。

2) ラット各種臓器におけるPGの局在・分布

著者の確立した上述の方法で染色した結果、ラットの胃、小腸、肝、腎、肺、脾の各組織において明らかな陽性反応を得ることができた。ラット各種臓器におけるPGの免疫組織化学的染色結果を表4にまとめた。胃粘膜組織では、検討した3種のPGはいずれも胃底腺腺体部および基底

部の細胞に観察された。図30 AはPGE₂、図30 BはPGF_{2α}、図30 Cは6ketPGF_{1α}の染色結果を示す組織写真である。PGの局在は、主に胃底腺の腺底部および腺体部の壁細胞に、胃粘膜固有層および筋層においてはマクロファージや血管内皮細胞に種々の程度に観察されたが、被蓋粘膜上皮細胞や筋層の平滑筋細胞には陰性であった。PG陽性反応は、壁細胞やマクロファージの細胞質全体にびまん性に分布する褐色顆粒として観察されるほか、主細胞の膜上にも検出された(図31)。小腸においては粘膜固有層内のマクロファージが強い陽性所見を呈したが、粘膜上皮細胞には陰性であった。肝臓では、ほとんどの肝細胞がPG陽性を呈したほか、一部のクッパー細胞や類洞内皮細胞にも陽性所見が観察された(図32)。腎臓では、尿細管上皮細胞がPG陽性であったが、糸球体の細胞には陰性であった。また、時折内皮細胞が弱い陽性反応を呈した(図33)。肺においては肺胞マクロファージに、脾臓においてもマクロファージに陽性反応が認められた。

3) ラット辺縁歯周組織(歯肉、歯根膜、歯槽骨)および歯髄におけるPGの局在・分布

歯肉では、検討した3種のPGはいずれも接合上皮直下結合組織内に散在するマクロファージや樹状細胞に時折観察された(図34)。また、歯槽骨骨髄においては単核細胞の細胞質が強陽性を示すとともに、巨核球の細胞膜が弱陽性を呈した(図35)。なお、歯髄組織にはPG陽性反応が観察されなかった。一方、歯槽骨や歯根膜組織(図36 A)では、骨細胞や少数のbone lining cell(図36 B)に、セメント質ではセメント細胞やセメント芽細胞に6ketPGF_{1α}陽性反応が認められたが、PGE₂、PGF_{2α}の反応は観察されなかった。これらの部位における6ketPGF_{1α}陽性反応は、実験群においても常に観察された。

(2) 実験的歯周炎組織におけるPGの免疫組織化学的染色所見

1) 根尖性歯周炎発症群

実験群では、天蓋を除去することにより歯髓組織に咬合面開放後3日目より好中球の密な浸潤を伴う化膿性炎が惹起された。炎症性変化は根尖方向へと次第に移動し、処置後約2週間で根尖部に波及して、急性根尖性化膿性炎や歯根肉芽腫等の種々の根尖病巣を形成した。中には根分岐部病変の形成を示す標本もあった。根尖病巣周囲歯槽骨には破骨細胞性骨吸収が観察された。以下、PGの染色結果を歯髓炎組織と根尖病巣に分けて述べる(表5)。

a) 歯髓炎におけるPGの免疫組織化学的局在・分布

初期歯冠部歯髓炎組織では、多数の好中球浸潤を伴う炎症巣(図37A)内に少数のPGE₂陽性マクロファージ様細胞や毛細血管内皮細胞が観察された(図37B)。なお、6ktPGF_{1α}についてもPGE₂とほぼ同様の染色結果を示した。一方、PGF_{2α}染色では、マクロファージ様細胞や血管内皮細胞が陽性を呈したのに加え、炎症巣より根尖部にかけて多数の象牙芽細胞や歯髓細胞が強陽性を示した(図38)。歯髓の炎症巣の根尖側への移動とともに、PGF_{2α}陽性領域も根尖側へと移動した(図39A, B, C)。図39Cおよび図40は、歯髓炎がほぼ根尖部まで波及した症例を示すもので、図40は図39Cの拡大像である。散在するマクロファージ様細胞に加え、根尖部セメント質にコラーゲン線維を挿入する線維芽細胞群がPGF_{2α}強陽性を呈している。

b) 根尖病巣におけるPGの免疫組織化学的局在・分布

根尖部歯根膜にびまん性の好中球浸潤を伴う急性化膿性病巣(図41A)が形成されていた場合、好中球浸潤巣およびその周辺部歯根膜にPGE₂,

PGF_{2a}, 6ヶトPGF_{1a}陽性のマクロファージ様単核細胞が観察された(図41 B)が, 歯根膜線維芽細胞はPGF_{2a}を含む3種のPGに陰性であった。さらに, 初期の根尖膿瘍が形成された場合(図42 A), 多数の好中球や foam cellsからなる中心部の小膿瘍周囲肉芽組織内の大型マクロファージ様細胞の多くがPGE₂(図42 B), PGF_{2a}(図42 C), 6ヶトPGF_{1a}に陽性を呈していたが, 膿瘍周囲の歯根膜線維芽細胞には陽性反応は観察されなかった。これらの細胞におけるPG陽性反応は, いずれも細胞質内にびまん性に分布する褐色顆粒状のDAB反応産物として観察された(図43)。なお, PG陽性細胞は, 好中球浸潤や血管拡張の著明な膿瘍周辺部肉芽組織において目立ち(図43), 一方, 活発な破骨細胞性骨吸収の観察される歯槽骨骨縁付近では少数のPG保有細胞が観察される程度であった(図44)。また, 検討した3種のPG間で保有細胞の分布に違いは認められなかった。しかしながら, 膿瘍周囲に明らかな膿瘍膜の形成や炎症細胞浸潤に乏しい線維性結合組織の増生がみられた場合(図45 A), 膿瘍膜や周辺部の線維性結合組織内のPG陽性マクロファージ様細胞に加え, 歯根膜線維芽細胞も時折6ヶトPGF_{1a}に陽性を呈していた(図45 B)。また, 根分岐部に形成された大きな慢性膿瘍(図46 A)においても, その膿瘍膜内に散在するPG陽性のマクロファージ様細胞に加えて, 膿瘍膜の線維芽細胞が6ヶトPGF_{1a}陽性を呈することがあった(図46 B)。これらの症例においても, やはり活発な破骨細胞性骨吸収のみられる歯槽骨骨縁との間には, PG保有細胞に乏しい結合組織が介在していた(図45 B, 46 B)。なお, 破骨細胞自体は, いずれのPGに関しても明らかな陽性所見を示さなかった。

2) 辺縁性歯周炎発症群

第1, 第2臼歯間に小孔を形成することにより, 処置後3日目より辺

縁部歯周組織に種々の程度にびまん性の好中球浸潤が生じ、時間の経過とともに歯槽骨吸収を伴いながら深部へ波及する傾向を示した。しかしながら、中には処置後短期間の内に炎症が根尖部に及び、歯間部歯槽骨の完全な消失や根分岐部膿瘍の形成を示すものもあった。また、処置後3週間経過後でも、歯肉部の小膿瘍に留まっている例が観察された。

PG陽性反応は炎症巣内の一部の内皮細胞やマクロファージに観察され、検討した3種のPG間で陽性反応に違いは認められなかった(表5)。多数の好中球のびまん性浸潤を示す初期の歯間乳頭部歯肉炎組織(図47A)では、その浸潤巣内にマクロファージと思われる多数のPG陽性細胞が散在性に出現していた(図47B)。PG陽性反応産物は細胞質内にびまん性に分布しており、各々の細胞におけるその分布状態や反応強度は様々であった(図47C)。また、歯間乳頭部に形成された小さな歯肉膿瘍(図48A)の周辺部結合組織内にもPG陽性の内皮細胞やマクロファージが少数観察された(図48B)。しかしながら、これらの細胞におけるその反応性は極めて弱いものであった(図48C)。また、根分岐部領域に大きな膿瘍を形成した場合(図49A)、膿瘍壁の著明な好中球浸潤を伴う肉芽組織内に、PG強陽性を呈する大型マクロファージ様細胞や内皮細胞が多数認められた。図49BはPGE₂、図49CはPGF_{2α}の局在を示している。PG陽性反応は、細胞質内にびまん性に分布する茶褐色顆粒状の沈着物として観察された(図49D)。多数のPG保有細胞を有する膿瘍壁肉芽組織と活発な破骨細胞性骨吸収を示す根間中隔との間には、PG保有細胞に乏しい結合組織が介在していた(図49B, C)。

IV. 考 察

1. PGE₂の局所投与によって惹起された辺縁歯周組織の形態学的変化

(1) 実験方法について

辺縁性歯周炎において、ポケット上皮直下に炎症が局限し炎症巣と歯槽骨との間に炎症細胞浸潤を伴わない結合組織が介在しているにもかかわらず、下在の歯槽骨に破骨細胞性骨吸収が生じている症例にしばしば遭遇する。その際、観察される歯槽骨吸収は、炎症巣局所で産生・放出されたPGを始めとする骨吸収刺激物質が血流を介し、あるいは組織間隙を浸透して歯槽骨に作用した結果であると推察される。そこで、本実験ではこのような状況を想定し、PGE₂溶液を浸した綿棒をラット上顎臼歯部咬合面から口蓋側歯肉にかけて1時間静置することにより、歯肉溝から辺縁歯周組織への浸透・到達を図るという方法でPGE₂を投与した。従来、*in vivo*辺縁歯周組織においてPGE₂の作用をみるための局所投与方法としては、歯肉粘膜下結合組織内に注射する方法が一般的である^{16,17)}。しかしながら、ラット辺縁歯周組織のように組織容積の小さい部位では注射に伴う組織変化が大きく、局所投与されたPGE₂による変化を正しく評価できない可能性が高い。このような組織傷害を可及的に避けるためには、本研究で用いた投与方法がより適していると考えられる。また、PGE₂は、様々な炎症巣において生化学的に多量に検出されるPGの1つで、炎症巣における血管透過性の亢進に先駆けて局所で増加する^{18,19)}とともに、強力な骨吸収刺激作用を有すること⁵⁾、さらに歯肉溝液中のPGE₂量と歯周組織の破壊程度や進行しやすさとの間に相関関係があ

ること^{12,13)}など、歯周炎の発症と進展・増悪に最も重要な役割を果たすと考えられ、本研究においてはPGE₂を選択した。

実験群（PGE₂投与群，PGE₂+Edx投与群）ならびに対照群（AL/PS投与群）ともに処置後1日目で約10g，2日目で約20gの一過性の体重減少をきたしたが，3日以降は順調な体重増加を示し，処置後1週間で実験開始時よりも体重は約10g増加していた。実験期間を通して実験群および対照群の体重変化に有意差のみられなかったことから，処置後に観察された一過性の体重減少は全身麻酔による影響であり，PGE₂局所投与による全身状態への影響はほとんどなかったものと判断した。

歯肉接合上皮は，口腔歯肉上皮・口腔歯肉溝上皮に比べ細胞間隙が広く，細胞間接着装置の発達が悪いこと，外来有害物質の機械的barrierとなる表層での明らかな角化や細胞間隙へのmembrane coating granuleの放出を伴わないことなどの点で，他部位の口腔粘膜上皮に比べ著しく物質透過性が高いとされている²⁰⁾。文献的にも，種々のtracer物質の接合上皮部での通過が報告されている^{21,22)}。McDougallら²¹⁾は，本研究と同様の方法で投与したhorse radish peroxidase (HRPO) が接合上皮細胞間隙の拡張や上皮直下結合組織の血管の拡張を惹起すること，また，HRPO投与後の接合上皮細胞や結合組織のマクロファージのリソソーム顆粒内にHRPOが存在することから，HRPOは接合上皮部を通過し，上皮直下結合組織に到達したと報告している。本研究においても，PGE₂投与後，接合上皮部には細胞間隙の拡張や著明な好中球浸潤がみられ，接合上皮部の物質透過性が亢進していることが示唆された。また，接合上皮直下の結合組織にはPGE₂の薬理作用として知られる血管拡張，浮腫，好中球遊走等が観察されるとともに，深部の歯根膜側歯槽骨骨縁には活発な破骨細胞性骨吸収が惹起された。一方，接合上皮と同様にPGE₂溶液に

さらされていた口腔歯肉溝上皮および口腔歯肉上皮部の物質透過性の亢進を示唆する所見や上皮下結合組織における炎症性変化，歯槽骨の外側面における破骨細胞性骨吸収等のPGE₂の到達・作用を示唆する像は，実験期間を通じて認められなかった。以上の所見より，本研究で用いた投与方法で投与したPGE₂は，主に歯肉溝から物質透過性の高い接合上皮部を通過し，接合上皮直下歯肉結合組織に種々の変化を惹起しつつ同部を浸透し，下在の歯根膜組織に到達・作用したと考えられる。

(2) PGE₂の惹起する炎症性変化について

1mg/ml PGE₂溶液の浸透投与開始後1時間より既に接合上皮細胞間隙の拡張や接合上皮内への好中球浸潤，上皮下歯肉結合組織における血管拡張や好中球浸潤等の血管透過性亢進を示す所見が観察され，投与開始後12時間でピークに達した後，1週間後には対照群とほぼ同程度にまで回復していた。また，これらの所見は0.001mg/ml濃度のPGE₂投与で既に観察され，投与濃度の上昇に伴い著明となったが，2.0mg/mlの高濃度投与では明らかに減少していた。In vivo炎症巣におけるPGE₂と血管透過性亢進との関連については様々の報告があり，カラゲニンで実験的に誘導した炎症部位におけるPGE₂の濃度は，血管透過性の亢進に先立って増加する^{18,19)}。また，インドメタシン等のPG合成阻害剤の投与は，カラゲニンの誘導する炎症巣におけるPGE₂量の増加を減じる¹⁸⁾とともに，血管透過性の亢進をも抑制する²³⁾。さらに，皮下組織へのPGE₂の局所注射は，血管拡張，浮腫，白血球集積等を惹起することが知られている^{24,25)}。しかしながら，PGE₂自体の血管透過性亢進作用はきわめて弱く，他の血管透過性亢進作用を有する物質と同時投与するとその作用を増強するという報告もある^{25,26)}。また，ロイコトリエン等の他のアラキド

ン酸代謝産物と比較すると、PGの好中球に対する走化性作用はきわめて弱いとされ、PGE₂投与後の炎症巣での血管透過性亢進と好中球に対する走化性作用がPGE₂の直接的作用とはみなし難い。一方、血管の拡張は明らかにPGE₂の直接作用によるとされている²⁷⁾。それ故、本研究でPGE₂投与後観察されたin vivo歯周組織における血管透過性亢進は、血管拡張により惹起された局所血流量の増加や、充血の結果ブラジキニン等の他の血管透過性亢進作用を有する物質の影響を受けやすくなったために起こったものと考えられる²⁸⁾。また、歯肉部でのこれらの変化は、PGE₂単独投与群においては投与開始後1週間で対照群とほぼ同様の状態にまで回復していたのに対し、PGE₂+Edx投与群ではその後も存続しており、歯周炎炎症巣における血管透過性の亢進に関してPGE₂とEdxが相乗的に作用する可能性が示唆された。Edx刺激時、生体内では種々のPGばかりでなく、血管透過性亢進作用を有する様々な物質が産生される可能性がある。PGE₂の血管拡張作用による局所血流量の増加にこれら血管透過性亢進物質の作用が加わった結果、長期にわたり浮腫や好中球遊走が持続したと考えられる。

(3) PGE₂の破骨細胞性骨吸収刺激作用について

PGE₂投与により辺縁歯周組織に惹起される変化の中で特に目立ったのは、歯根膜部において歯槽骨骨頂部から中央部にかけての歯槽骨骨縁に沿ってみられた多数の破骨細胞の出現であった。投与後1時間より歯槽骨骨縁に対し明らかな刷子縁を形成するactiveな破骨細胞が観察され、その数は処置後3時間から2日にかけて有意に増加し、12時間で最大値に達した。なお、その値は、未処置群やAL/PS投与群の約2倍から3倍であり、Ijuhin²⁹⁾による実験結果と同様の傾向を示した。また、培養

骨組織に対するPGの作用を経時的に観察し、本研究と同様の結果を示したin vitroでの研究報告がある³⁰⁻³²⁾。すなわち、Rifkinら³⁰⁾は、ラット胎児の長管骨の器官培養系を用いて、 10^{-5} MのPGE₂が投与後12時間までに破骨細胞数を2倍に増加させたばかりでなく、成熟破骨細胞の刷子縁と明帯の領域を急速に増加させることを電顕的に観察し、PGE₂が破骨細胞系細胞の増生と既存の破骨細胞の活性化を惹起すると考察した。本研究における電顕観察でも、PGE₂投与直後より破骨細胞はその細胞容積を増すとともに、対照群にみられる破骨細胞と比べ発達した刷子縁や明帯を有するように変化したことから、PGE₂はin vivo辺縁歯周組織においても破骨細胞機能を活性化することが明らかとなった。Schellingら³¹⁾も、器官培養したマウス頭蓋冠を用いた実験系において、 10^2 ng/ml濃度のPGE₂投与後48と72時間目に著明な⁴⁵Ca放出と破骨細胞数の2から3倍の増加を観察している。その際、⁴⁵Ca放出と破骨細胞数との間に高い正の相関があることから、PGE₂による骨吸収反応は破骨細胞系の増生によるものと結論している。あらゆる因子を可能な限り排除した条件下で行うことができるin vitroの実験に対して、in vivoでの実験では生体内で生じうる因子が複雑に作用した結果を観察するため、in vitroで明らかにされた結果を捉えることができなかつたり、逆の結果が得られる可能性さえある。また、PGE₂自体の作用も複雑で、その濃度や実験動物の種類によって異なる結果がしばしば報告されている。本研究においては、骨の溶出量を直接検討できなかったが、in vitroで報告されているようなPGE₂による骨吸収機序がラットのin vivo辺縁歯周組織においても発現されうること、また、その作用が破骨細胞の活性化と数の増加によることが示唆された。

実験 I - 2 において、0.01~1mg/ml濃度のPGE₂は破骨細胞数の有意

な増加を惹起し、その値は0.1mg/mlで最大値を示したが、高濃度(2mg/ml)の投与は明らかに破骨細胞数の減少をもたらした。⁴⁵C aでラベルしたラット胎児長管骨の器官培養系を用い、Dietrichら³³⁾は、PGE₂が⁴⁵C aの放出に同様な効果を及ぼすことを報告した。すなわち10⁻⁵M (3.5×10⁻³mg/ml)から10⁻⁹M (3.5×10⁻⁷mg/ml)培地濃度のPGE₂は濃度の上昇に伴って⁴⁵C aの放出量を増加させたが、高濃度領域(10⁻⁴~10⁻³M; 3.5×10⁻²~3.5×10⁻¹mg/ml)ではPG刺激による⁴⁵C a放出量が減少した。Santoroら³⁴⁾の実験でも、PGE₂は濃度依存性の⁴⁵C a放出の増加を惹起し、その値は10⁻³mg/mlで最大となったが、高濃度のPGE₂(10⁻²mg/ml)による⁴⁵C a放出量は低下した。彼らは、この高濃度領域における抑制効果がPGE₂の破骨細胞に及ぼす非特異的な毒性効果によるものと考えた。本研究でも、2mg/ml PGE₂投与群では接合上皮細胞、線維芽細胞および骨芽細胞等の様々な細胞に変性所見が電顕的に認められており、高濃度のPGE₂がこれらの細胞に非特異的な変性を惹起することが明らかとなった。一方、出現しているほとんどの破骨細胞や前破骨細胞様細胞に明らかな変性所見は観察されなかったが、骨縁部から離れて位置する細胞が目立ち、形態学的には把握できない機能的障害を受けている可能性が推察された。

PGE₂による破骨細胞性骨吸収刺激作用は、骨芽細胞を介する間接的な作用であるという意見がある³⁵⁾。PGE₂で活性化された骨芽細胞は、破骨細胞活性に対して促進的に作用する可溶性の因子、osteoclastic resorption stimulatory activity (ORSA)を産生することによって破骨細胞の機能を促進するという³⁵⁻³⁸⁾。本研究で2mg/ml PGE₂処理後に骨芽細胞の変性が目立つようになったことから、高濃度投与群ではこれら変性骨芽細胞のORSA産生能が低下しており、この放出量の減少によって

破骨細胞の活性化が抑制された可能性もあろう。なお、本研究において PGE₂投与後に観察される破骨細胞数は0.1mg/ml濃度で最大値に達した。その際、in vivo歯根膜に実際に到達したPGE₂の量は明らかでないが、少なくとも前述の⁴⁵C a放出量をパラメーターとした器官培養実験において最大値が得られたのと同量のPGE₂、すなわちSantoroら³⁴⁾によるマウス頭蓋冠での10⁻³mg/ml、Dietrichら³³⁾によるラット長管骨での3.5 × 10⁻³mg/ml (10⁻⁵M) に相当する量が歯根膜の上部に到達し、破骨細胞数の増加を引き起こしたものと考えられる。したがって、歯肉溝より投与したPGE₂の1~3.5%が歯根膜へ浸透・到達したと推測される。

PGの成熟破骨細胞に対する作用機序は複雑で、直接的作用と前述の骨芽細胞を介する間接的作用とが考えられている。単離破骨細胞を用いた実験系では、PGは破骨細胞に直接的に作用し、その動きを止めることによって骨吸収を抑制するという。しかしながら、この直接的抑制効果は一過性であり、炎症巣に近接する骨組織では、炎症巣で持続的に産生されるPGにさらされている破骨細胞がこの抑制効果から開放され、骨吸収を営むようになると考えられている^{35, 39-41)}。また、生体内での破骨細胞の機能は骨芽細胞により調節されているともいわれている³⁵⁻³⁸⁾。すなわち、前述のごとく、PGで刺激・活性化された骨芽細胞から産生される未知の因子、ORSAの破骨細胞への間接的な活性化作用による調節である^{35-38, 40)}。器官培養系を用いた実験やin vivo生体内では、骨芽細胞が共存しているためPGの直接的抑制効果がマスクされ、PGによる骨芽細胞を介した間接的な活性化が破骨細胞性骨吸収刺激作用で主たる役割を果たしていると考えられる。本研究の電顕観察でも、PGE₂投与直後より破骨細胞は細胞容積を増しつつ発達した刷子縁や明帯を有するactiveな破骨細胞へと変化しており、PGE₂投与後の一過性の直接的抑制

効果を示唆する所見は観察されなかった。また、PGは破骨細胞の形成・誘導にも関与するといわれている。破骨細胞は未熟な造血系細胞由来の細胞と考えられており^{7, 42, 43)}、マウスの骨髄細胞を用いた実験で、PGE₂が破骨細胞の形成を促進することが報告されている^{44, 45)}。本研究においても、PGE₂投与後の早い時期から歯根膜における血管周囲の領域に小型円形の前破骨細胞様細胞が増加する傾向にあった。それ故、PGE₂は既存の破骨細胞を活性化するばかりでなく、その前駆細胞を増殖・分化させ、破骨細胞の形成を誘導することによって破骨細胞性骨吸収を増大する可能性もあると考えられた。なお、観察した範囲では破骨細胞の核分裂像を捉えることはできず、破骨細胞の多核化が破骨細胞前駆細胞の癒合によって生じる可能性がうかがわれた。骨髄細胞の長期培養実験においても、破骨細胞様多核細胞が単核の前駆細胞の癒合によって形成されることが認められている⁴³⁾。

(4) PGE₂とEdxの作用の相互関係について

Hausmannら⁴⁶⁾により、グラム陰性菌の細胞壁成分であるEdxが組織培養において骨吸収を促進することが報告されて以来、プラーク内細菌から遊離したEdxが慢性辺縁性歯周炎における歯槽骨吸収に重要な役割を果たすと考えられている⁴⁶⁻⁴⁹⁾。一般に、Edxは単球やマクロファージを刺激してPGE₂を産生させる⁵⁰⁻⁵²⁾ことが知られるとともに、*in vitro*の実験ではあるが、PG合成阻害剤であるインドメタシンがEdxによって惹起される骨吸収の促進を有意に抑制するとの報告もあり、Edxによる骨吸収のメカニズムに内因性PGの関与する可能性が示唆されている^{53, 54)}。

近年、Raiszら⁵⁵⁾は、⁴⁵C aでラベルされたラット長管骨を用いて、

Edxがsubmaximalな濃度のPGE₂, PTH, OAFによって惹起される⁴⁵Caの放出を相乗的に高めると報告し、この相乗効果が慢性辺縁性歯周炎において重要な役割を演じると推察した。本研究における実験I-3の結果は、破骨細胞数の増加におけるPGE₂とEdxの相乗的効果を示すものではなかったが、PGE₂+Edx投与群における破骨細胞数はいずれの実験期間においてもPGE₂単独投与群におけるよりも多い傾向にあった。PGE₂+Edx投与群においては、Edx刺激によって単球やマクロファージ等の宿主細胞から産生されるPGE₂が破骨細胞数の増加を引き起こしたのかも知れない。また、連続投与後3時間と3日目の破骨細胞数は、PGE₂投与群での値に対して有意に高いものであった。Ijuhin²⁹⁾は、5mg/ml濃度のEdxを本実験と同様の方法で投与(Edx投与群)した後の破骨細胞数の経時的变化を観察している。その際、5mg/ml濃度のEdxは投与開始後3時間と3日目にピークを示す破骨細胞数の二相性増加を惹起した。PGE₂+Edx投与群でみられた3時間後と3日後の有意な増加は、Edx投与群にみられたこの二相性の増加を反映しているのかも知れない。なお、PGE₂+Edx投与群における破骨細胞数は、いずれの期間においてもEdx投与群より高値を示した。

一方、連続投与後12時間、1、2日における破骨細胞の増加がPGE₂(1mg/ml)投与群におけるそれぞれの値に対し有意差を示さなかったが、最大値の破骨細胞増加を引き起こすよりもっと低濃度(例えば本研究において有意な破骨細胞増加の観察されなかった0.001mg/ml濃度)のPGE₂の惹起する破骨細胞性骨吸収は、Edxの添加によって宿主からのPG産生を介して相乗的に高められる可能性がある。このことは、歯槽骨吸収を惹起し得ない程度の微量のPG産生が生じている状態に新たにEdx刺激が加わった場合、著明な歯槽骨吸収が惹起され、それによって歯周炎の安

定期から活動期への急性増悪が起こる可能性を示唆しているかも知れない。

In vivoの歯周組織においてE dxがPGE₂による破骨細胞性骨吸収刺激作用を増強するメカニズムとしては、上述の宿主細胞からの内因性PG産生の他に、①E dx自体の破骨細胞性骨吸収刺激作用⁴⁶⁻⁴⁸⁾、②インターロイキン-1 (IL-1) や腫瘍壊死因子 (TNF) 等の骨吸収刺激能を有する⁵⁶⁻⁵⁸⁾種々のサイトカイン産生^{59, 60)}、③補体系の活性化⁶¹⁾等、様々な経路を介することが報告されている。生体内ではこれらの経路が複雑に作用しあっていると推察され、今後これらの機序をさらに解析する必要がある。

(5) PGE₂の歯根膜線維芽細胞に及ぼす影響について

PGE₂投与後の歯根膜部では、コラーゲン原線維を含む空胞を有する線維芽細胞が目立つようになった。歯根膜線維芽細胞における空胞構造ならびに空胞内のコラーゲン原線維数は経時的に増加する傾向を示し、投与開始後1週間で対照群と同様の状態にまで回復していた。生理的ならびに病的条件下で線維芽細胞はコラーゲン原線維を貪食・消化することによって結合組織のturnoverと関わっているとされる。電顕的に、歯肉や歯根膜の線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食像を観察した多くの報告がなされている^{62, 63)}。さらに、in vitro, in vivoの実験において、E dxやPGE₂が歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食を亢進することも確認されている^{29, 64, 65)}。最近、Ijuhinら⁶⁵⁾は、本研究と同様の方法でE dxを投与した後の歯肉、歯根膜組織を電顕的ならびに組織計測学的に観察し、E dx投与によって線維芽細胞の細胞質中にコラーゲン原線維を入れた空胞構造が増加すること、その貪食能は歯肉線

維芽細胞に比べて歯根膜線維芽細胞で有意に高いことを報告した。本研究においても、歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食はPGE₂投与後に増加する傾向を示したが、PGE₂による他の作用が消失していた投与開始1週間後にはやはり元の程度に戻っていたことから、PGE₂の直接的ないしは間接的な作用の1つであると考えられた。PGE₂はマクロファージ^{66, 67)}や骨芽細胞^{68, 69)}からコラゲナーゼを産生させることによって間接的に線維芽細胞によるコラーゲン原線維の分解・消化を促進する可能性がある⁷⁰⁾。しかしながら、歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食像が①破骨細胞性骨吸収の惹起される時期に一致して観察されたこと、②活発な骨吸収を営んでいる破骨細胞の周辺部で特に目立っていたこと等を考え合わせると、これが破骨細胞性骨吸収に関連した二次的な事象である可能性も高い。この作用がいかなる機序で生じるかは明らかでないが、*in vivo*歯根膜組織においてPGE₂は歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食を直接的あるいは間接的に活性化することによって、歯根膜線維の破壊にも重要な役割を演じていることがわかれた。

2. 実験的歯周炎組織におけるPGの局在

(1) PGの免疫組織化学的染色方法について

PGは一般に細胞膜近くの細胞質内で作られ速やかに細胞外へ放出された後、その産生細胞や周囲の細胞にautocrine, paracrine作用を及ぼす局所ホルモンと考えられている。In vitroの実験において、様々な細胞が種々のPGを産生することが報告されているが、既に述べた如くPGは分子量が小さく、有機溶媒に溶け易く、常温で不安定な物質であり、また、

固定液の対象となるアミノ基を有さないため、in vivoの組織においてその局在部位を免疫組織化学的に証明した報告はきわめて少ない。本研究では、まず、ラットの各種臓器を利用し、ABC法を用いて、固定方法、固定時間や染色条件等を検討した。その結果、10%中性緩衝ホルマリン溶液にて20分間固定した材料のクリオスタット切片をさらに20分間後固定した後、4℃の条件下で染色を行うことにより、最も良好で安定した染色結果を得ることがわかった。なお、脱灰処理を行った材料でも著しい染色性の低下はみられたものの、非脱灰材料におけると同様の細胞に陽性染色結果を得ることができた。その際、未固定材料よりもホルマリン固定材料においてより安定した染色性が得られたが、その理由としては、①ホルマリン固定によるPG分解酵素蛋白の失活、②PG-受容体複合物の受容体蛋白部分の固定に伴う受容体に結合したPGの安定化等が考えられた。また、処理時間を可及的に短縮し拡散によるPG抗原の流出を最小限にとどめ、処理温度を4℃に保ちPGの分解を阻止するように留意した点も有効であったと考えられる。

(2) 正常組織におけるPGの局在・分布について

本方法を用いラット各種臓器におけるPGの局在を免疫組織化学的に検討したところ、PGの陽性反応は、細胞膜に一致した線條の反応産物としてばかりでなく、細胞質におけるびまん性の褐色顆粒として観察された。これは、①細胞膜の産生部位から中心部に向かったの拡散、ないしは②PG-受容体複合物のinternalizationを反映している可能性がある。あるいは③産生部位そのものを示しているのかも知れない。Higuchiら⁷¹⁾は、免疫電顕的手法を用い、PGE₂が胃粘膜壁細胞のfreeおよびbound ribosomeに局在し、その分布パターンがPG合成酵素の分布と一致してい

ると報告し、細胞質における陽性反応がPGの産生部位を示している可能性を示唆した。

種々の生化学的手法を用いた *in vitro* の実験により、ヒトの末梢血単球⁵⁰⁻⁵²⁾、マウスの腹腔マクロファージ⁴⁹⁾ やヒトやウシの血管内皮細胞⁷²⁾ によるPG産生が報告されている。本研究でも、肺泡マクロファージや肝臓のKupffer細胞を始めとする組織マクロファージおよび血管内皮細胞の細胞質に各種PGが局在することを免疫組織化学的に証明するとともに、胃の壁細胞や主細胞、肝実質細胞、腎尿細管上皮細胞等にもPGが局在することを確認できた。胃粘膜において産生されるPGは主にPGE₂とPGI₂であり、胃酸分泌の抑制あるいは細胞保護作用 (cytoprotection) を通して胃粘膜の維持ないし防御と関係していると考えられている^{71, 73-75)}。Higuchiら⁷¹⁾ は、ヒトおよびラット胃粘膜の被蓋粘膜上皮細胞の管腔側表面と壁細胞の細胞質に免疫組織化学的にPGE₂陽性反応を観察した。一方、Chenら⁷⁶⁾ は、radioimmuno-assay法を用い、イヌの胃粘膜における主なPG産生細胞はマクロファージと内皮細胞であると報告している。本研究でも、胃粘膜壁細胞の細胞質と主細胞の細胞膜に陽性反応を検出するとともに、粘膜固有層および筋層内のマクロファージや内皮細胞に強い陽性反応を認めた。肝におけるPG産生の場合としては、生化学的手法により肝細胞 (ミクロソーム分画) やKupffer細胞、類洞の内皮細胞等が報告されており^{77, 78)}、本研究においても免疫組織化学的にこれらの細胞に明らかにPGの局在が認められた。腎臓では、*in vitro* の実験系を用い腎組織が様々なPGを産生していることが生化学的に明らかにされ⁷⁹⁾、免疫組織化学的にも、Perezら⁸⁰⁾ が腎尿細管上皮細胞の細胞膜と関係したPGA₂の局在を報告している。本研究でも同様に腎尿細管上皮細胞にPGの局在を認めた。その際、D A B陽性反応は細胞周辺部に

いて強い傾向を示したほか、尿細管上皮細胞の細胞質にもびまん性に観察された。

正常辺縁歯周組織におけるPGの局在に関する報告はきわめて少なく、今回の研究では、接合上皮直下の樹状細胞や歯槽骨骨髓中の単核細胞ならびに巨核球に種々の陽性反応が認められるとともに、骨細胞や一部の骨芽細胞ならびにセメント細胞やセメント芽細胞が6ヶトPGF_{1α}の局在を示すことが観察された。この6ヶトPGF_{1α}陽性反応は、未処置対照群ばかりでなく実験群においても一貫して観察され、炎症巣周辺でやや増強する傾向を示した。また、この陽性所見は、陰性コントロール（一次抗体の代わりにPBSを使用）や他種のPGに対する抗体を用いた染色では観察されず、6ヶトPGF_{1α}抗体に対する特異的反応であると考えられた。近年、Chambersら^{35, 39, 41)}の単離破骨細胞を用いた培養実験によって、PGの直接的な破骨細胞機能抑制作用が報告されて以来、生理的骨代謝調節機構におけるPGの重要性が注目されている。すなわち、彼らは、正常骨芽細胞や骨細胞によって産生される微量のPGが局所に存在する成熟破骨細胞に直接的に作用し、破骨細胞のcAMPの上昇を介してその動きを止め、正常時骨組織における破骨細胞の無秩序な骨吸収を抑制すると考えた^{38, 40)}。破骨細胞に対するPGの抑制効果は、PGI₂で最も強く、PGE₂と続くが、PGF_{2α}では認められていない⁴¹⁾。また、破骨細胞はPGI₂に対する感受性が最も高いともいわれる³⁵⁾。本研究においてPGI₂の安定な代謝産物である6ヶトPGF_{1α}が骨細胞や骨芽細胞に免疫組織化学的に局在していたことは、PGI₂の生理的骨代謝機構における重要性を支持する所見として興味深い。Davidvichiら³¹⁾は、ネコの上顎歯根膜線維芽細胞の細胞膜周辺部と骨芽細胞及び破骨細胞の細胞質にPGF_{2α}陽性反応を観察し、PGF_{2α}が歯根膜線維芽細胞によって産生され、歯槽骨の骨芽細胞や破骨細

胞に作用し、それらの生理的な機能に重要な役割を演じていると推察した。しかし本研究では、これらの細胞にPGF_{2α}の局在を観察できなかった。これらの細胞におけるPGF_{2α}陰性所見は、固定脱灰操作に伴う著しい抗原性の低下や使用した抗体の違い等に起因する可能性も考えられる。しかしながら、radioimmunoassay法を用いた研究では、器官培養骨組織や培養骨芽細胞が産生するPGとして主にPGE₂やPGI₂の産生が報告されており⁸²⁻⁸⁵⁾、骨組織におけるPGF_{2α}の存在を示した報告はない。

他臓器の細胞の培養系を用いた研究結果より推察すると、歯髄組織の構成成分の中で線維芽細胞⁸⁶⁾、血管内皮細胞⁷²⁾、神経細胞⁸⁷⁾が種々のPGを合成する可能性がある。しかしながら、歯髄組織におけるPG合成能が低いこともあって、歯髄組織でのPG合成に関する免疫組織化学的研究は少なく、その機能についても不明な点が多い。本研究では、検討したいずれのPGの局在も正常歯髄組織には観察されなかった。一方、生化学的にはPGE₂、PGF_{2α}、6ケトPGF_{1α}の存在が正常歯髄組織で報告されている^{87,88)}。Hirafujiら⁸⁹⁾によれば、歯髄組織での主なPGは6ケトPGF_{1α}であり、歯髄組織における血流の維持に関係しているという。

以上、生化学的にPGの存在が報告され、その生理的機能の調節機構にPGの関与することが注目されている種々の臓器において、免疫組織学的にPGの局在を明らかにすることができ、今回用いた染色方法がPG局在の検討に有用であることが明らかとなった。また、脱灰操作によりPGの反応性は減弱するものの、その免疫組織化学的検出は可能であることがわかり、歯および骨組織を含む辺縁歯周組織の脱灰標本を用いてPGの局在を検討する手技の有用性が示された。

(3) 歯髄炎に続発した実験的根尖性歯周炎組織におけるPGの局在・分

布について

実験Ⅱ - A群では、天蓋を除去後3日目より歯冠部歯髓組織には好中球の密な浸潤を伴う化膿性歯髓炎が惹起され、炎症性変化は処置後2週間目には根尖部に波及していた。

実験的に惹起したラットの炎症性歯髓組織においてPGが有意に増加することが報告されている^{89,90)}。Okijiら⁹⁰⁾は、歯髓組織の内毒素刺激後の歯髓局所におけるPG量の経時的変動を観察し、PGE₂とPGI₂の有意な増加が歯髓組織における血管透過性の亢進に先立って起こることを確認した。一方、Choenら⁹¹⁾は、ヒトの歯髓組織におけるPGE₂、PGF_{2α}量を非炎症群、慢性炎症群（無症状）、急性炎症群（有痛）に分けて検討し、炎症性歯髓では非炎症性歯髓と比較してPGE₂の値が有意に高く、疼痛症状を呈する歯髓ではPGE₂、PGF_{2α}両者の値が有意に高いと報告した。本研究においては、PGE₂、PGF_{2α}、6ケトPGF_{1α}がいずれも炎症巣内に散在するマクロファージ様細胞や血管内皮細胞の一部に局在することが示され、炎症時、PGが主にこれらの細胞から産生される可能性が強く示唆された。

さらに興味深いことに、正常歯髓組織では観察されなかったPGF_{2α}の局在が、炎症時には上記の細胞に加え、炎症巣内ならびに炎症巣より根尖部領域の歯髓細胞や象牙芽細胞に観察された。炎症性歯髓組織におけるPGF_{2α}の作用は明らかでないが、歯髓炎の波及に先だって出現し、炎症の進行に伴って陽性領域がより根尖側へと広がる傾向を示したことから、炎症性刺激に対する生体側の防御的機構に関与する可能性が考えられる。PGはそれぞれの受容体に作用し、それと共役する細胞内情報伝達系を介してその作用を発現する⁹¹⁻⁹⁴⁾。例えば、PGE₂やPGI₂はcyclic adenosine monophosphate (cAMP)の細胞内濃度の上昇を介して種々の生理活性を発現する^{91,92)}。一方、PGF_{2α}の作用はホスファチジルイノ

シトール代謝回転を促進し、その結果として細胞内遊離カルシウム濃度の上昇を介して⁹³⁾、また、cyclic guanosine monophosphate (cGMP)の上昇を介して起こるとの考えもある⁹⁴⁾。従って、PGE₂は骨吸収を、PGF_{2α}は骨形成を促進する等、受容体の種類、共役する情報伝達路の違いによって種々の異なった生理活性が発現される⁹¹⁻⁹⁴⁾。PGF_{2α}は、炎症巣内で多量に合成されるPGE₂やPGI₂に対する組織反応を緩和し、PGE₂やPGI₂の炎症のメディエータとしての作用と拮抗するため、炎症巣周辺部の歯髄細胞から盛んに産生されるのかも知れない^{91, 94)}。しかしながら、PGF_{2α}の過剰産生は組織細胞の変性・壊死を引き起こし、組織破壊へとつながる可能性も考えられる。Santoroら⁹⁴⁾は、高濃度のPGが細胞に非特異的な毒性効果を及ぼす可能性を示唆している。また、本研究においても、歯肉溝から投与された高濃度(2mg/ml)のPGE₂が様々な辺縁歯周組織細胞に変性・壊死を惹起することが電顕的に確認された。炎症性歯髄組織におけるPGF_{2α}の役割に関しては、今後さらに検討する必要がある。

天蓋除去後2週間目で歯根嚢胞以外の様々な根尖病巣が形成されたが、歯髄炎病巣におけると同様、形成された急性化膿性炎病巣や根尖膿瘍周囲の肉芽組織内に存在しているマクロファージ様細胞と拡張した毛細血管の内皮細胞にPG(PGE₂, PGF_{2α}, 6ケトPGF_{1α})の局在を免疫組織化学的に証明することができた。なお、これらの細胞において3種のPG間でその分布パターンに違いはみられなかったが、膿瘍周辺部に明らかな膿瘍膜が形成され膿瘍周辺部の炎症が鎮まった状態では、膿瘍膜やその周辺部の線維芽細胞が6ケトPGF_{1α}陽性を呈するようになった。根尖部炎症巣では常に周囲骨組織の破骨細胞性骨吸収が観察されるが、根尖部の化膿性炎に際しての骨組織破壊におけるPGの関与を検討した報告はない。しか

しながら、歯根嚢胞においては、嚢胞内容液中にPGE₂、PGF_{2α}活性が報告される⁹⁵⁾とともに、嚢胞壁の組織培養においてPGE₂、PGF_{2α}や6ケトPGF_{1α} (PGI₂の安定代謝産物)の産生が報告されており^{96,97)}、歯根嚢胞の拡大・成長に伴う破骨細胞性骨吸収の活性化に嚢胞壁内で産生されるこれらのPGが関与することが示唆されている。これらのPGの産生に関与する細胞として、Harveyら⁹⁶⁾は、ヒトの歯根嚢胞壁から得た培養線維芽細胞の培養液中にPGE₂、PGF_{2α}や6ケトPGF_{1α}が証明されることから、嚢胞壁の線維芽細胞を挙げている。Matejikaら⁹⁸⁾は、免疫組織化学的にヒト歯根嚢胞壁におけるPGE₂と6ケトPGF_{1α}の局在を検討し、肉芽組織内の組織球を含む炎症細胞と線維芽細胞にその局在を観察した。その際、PGE₂は炎症細胞に、6ケトPGF_{1α}は線維芽細胞や内皮細胞に強く染まる傾向が示された。本研究でも、上述の如く肉芽組織内に存在するマクロファージや血管内皮細胞にPGE₂、PGF_{2α}や6ケトPGF_{1α}陽性反応が、慢性膿瘍の膿瘍膜線維芽細胞に6ケトPGF_{1α}陽性所見がみられ、同時に周囲歯槽骨に多数の破骨細胞の出現が観察されたことより、顎骨内での根尖部病巣の拡大に病巣局所で産生されるPGの関与する可能性が強く示唆された。

(4) 実験的辺縁歯周炎組織におけるPGの局在・分布について

実験Ⅱ - B群では、処置後3日目より辺縁歯周組織に種々の程度の好中球浸潤が観察され、経時的に深部へと波及する傾向を示したが、その組織変化の進行度は必ずしも時間経過と平行しておらず、処置後短期間で化膿性炎が根尖側へと波及し歯間部歯槽骨の完全な消失をきたすものや、処置後数週間後でも歯肉部の小膿瘍に留まっている例もあった。その理由としては、小孔形成位置やその大きさ、また小孔形成に伴う歯間乳頭部組織の傷害が動物毎に微妙に相違すること、歯周組織の抵抗性に

関する個体差等、種々の要因が考えられた。

辺縁性歯周炎は歯肉・歯根膜組織の破壊と歯槽骨破壊を伴う慢性炎症性疾患であり、その病理発生には局所でのPGの産生と放出が関与するといわれている¹⁻³⁾。炎症時、歯肉溝液ならびに歯肉炎組織におけるPGのレベルは健常時に比べ有意な増加を示し⁸⁻¹³⁾、特に歯肉溝液中のPGE₂のレベルは歯槽骨破壊の程度と正の相関を示すとされる¹³⁾。また、インドメタシン等のアラキドン酸代謝経路阻害剤が歯周炎における炎症症状を改善するという報告もある^{14,15)}。近年、培養細胞を用いマクロファージや肥満細胞等の炎症細胞^{50,51)}、内皮細胞⁷²⁾や線維芽細胞⁸⁶⁾が内毒素刺激によってその培養上清中に種々のPGを合成することが報告されている。しかしながら、免疫組織化学的染色手法を用い歯周炎病巣局所でのPGの局在を調べた研究は、Wato⁹⁹⁾やLöningら¹⁰⁰⁾によるPGE₂に関する報告をみるのみである。Wato⁹⁹⁾は、免疫蛍光法を用いヒト辺縁性歯周炎病巣内のマクロファージにおけるPGE₂の局在を観察した。また、Löningら¹⁰⁰⁾は、間接法を用いヒトの歯周炎病巣内のマクロファージ様単核細胞、内皮細胞および基底膜近くに存在する肥満細胞にPGE₂の局在を証明し、炎症巣内でこれらの細胞によって産生されるPGE₂が歯周炎病巣局所での炎症性変化と免疫反応に重要な役割を果たしていると考えた。

本実験では、ラット歯間乳頭部に形成された炎症巣はいずれも好中球浸潤を主体とするもので、ヒトでみられる形質細胞浸潤を主体とする確立期病変のような病態を惹起できなかったが、好中球浸潤巣内におけるPGE₂、PGF_{2α}、6-ktPGF_{1α}の局在を免疫組織化学的に示すことができた。その際、主なPG陽性細胞は、Wato⁹⁹⁾やLöningら¹⁰⁰⁾がヒト確立期病変で観察したと同様、マクロファージ様単核細胞と血管内皮細胞であった。したがって、実験的辺縁性歯周炎組織においても主にマクロファージや

内皮細胞等の宿主細胞が各種PGを産生することが強く示唆され、炎症巣からのPGの産生・放出が局所の炎症性変化を増強するばかりでなく、歯根膜や歯槽骨の破壊を惹起し、歯周炎の進展・増悪に深く関与していることが示唆された。

一方、本研究で実験的に惹起した辺縁歯周組織の炎症巣においては、PG陽性細胞の多数存在する炎症性肉芽組織と活発な破骨細胞性骨吸収を営む歯槽骨骨縁との間に、PG陽性細胞のほとんど存在しない線維性結合組織が介在する所見がしばしば認められた。この現象は根尖病巣や根分岐部病変においても観察されたことであり、辺縁性歯周炎においても、接合上皮直下の主炎症巣から離れた歯槽骨での破骨細胞性骨吸収は一般に認められる所見である。実験 I においても、歯肉溝から投与したPGE₂は深部の歯肉結合組織に炎症性変化を生じることなく、歯槽骨表面に破骨細胞性骨吸収刺激作用を及ぼしていた。これらの事実は、骨組織が直接炎症細胞浸潤巣にさらされていない場合でも、主炎症巣から産生・放出されたPGが組織内を浸透・移動することによって、離れた部位に破骨細胞性骨吸収を誘導する可能性を示唆している。

V. 総 括

歯周組織の炎症性破壊へのPGの関与をin vivo歯周組織で形態学的に証明することを目的として、(1) PGE₂のラット歯肉溝からの局所投与によって歯周組織に惹起される経時的变化、および投与量を変えることによる変化を形態学的ならびに組織計測学的に検討するとともに、PGE₂と内毒素(Edx)の連続投与後の歯周組織の変化についても観察し、それらの相互作用を検討した。さらに、予備実験によってラット各種臓器に対するPGの免疫組織化学的染色手法を確立した後、同方法を用いて(2)ラットに実験的に形成した根尖性ならびに辺縁性歯周炎病巣における各種PG(PGE₂, PGF_{2α}, 6-ktPGF_{1α})の局在を検討した。その結果、以下の知見を得た。

1. 歯肉溝より1mg/ml PGE₂溶液を浸透投与することにより、接合上皮細胞間隙の拡張、接合上皮や上皮直下結合組織への好中球浸潤、血管拡張、浮腫等の変化が生じるとともに、深部歯根膜部には線維芽細胞によるコラーゲン原線維の貪食や歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って活発に骨吸収を営む多数の破骨細胞の出現が観察された。すなわち、歯肉溝より投与されたPGE₂は、物質透過性の高い接合上皮部を速やかに通過し、上皮直下の歯肉結合組織に炎症性変化を惹起するとともに、歯根膜部にも浸透・到達して破骨細胞性骨吸収を誘導したものと推察された。なお、辺縁歯周組織に生じたこれらの変化は一過性で、投与開始後1週間ではほぼ回復していた。
2. 1mg/ml PGE₂局所投与後、歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って出現する破骨細胞は投与開始3時間から2日後にかけて有意に増加し、その数値は12時間後に最大値に達した後、徐々に減少した。電顕的には、投

与開始1時間後より破骨細胞は骨縁に向かって刷子縁の形成を示す activeな細胞へと変化し，歯根膜の血管周辺部に破骨細胞前駆細胞様細胞が増加する傾向を示した。したがって，PGE₂による破骨細胞性骨吸収刺激作用は，破骨細胞の活性化と破骨細胞系細胞分化の誘導によることが示唆された。

3. 濃度の異なるPGE₂は基本的には1mg/mlの場合と同様の組織変化を惹起したが，高濃度PGE₂投与により電顕的に各種歯周組織細胞の変性像が観察され，非特異的傷害作用を及ぼすことが明らかとなった。
4. PGE₂投与開始12時間後の破骨細胞数は，0.01~1mg/ml濃度で有意に増加し，0.1mg/mlで最大値を示した。しかし2mg/mlでは減少しており，高濃度PGE₂が破骨細胞，破骨細胞前駆細胞や骨芽細胞に機能的障害を及ぼすことによって直接的あるいは間接的に破骨細胞性骨吸収を抑制する可能性がうかがわれた。
5. PGE₂とE d x連続投与によってもPGE₂単独投与と基本的に同様の形態学的な変化がみられ，それらは増強される傾向にあった。PGE₂単独投与群では明らかに回復を示した投与1週後においても好中球浸潤は存続していた。また，破骨細胞数の増加に相乗効果は明らかでなかったが，いずれの実験期間においても各単独投与時より高値を示した。なお，連続投与の場合，E d x投与開始3時間および3日後に有意差が観察された。以上の結果より，歯周炎病巣においてPGE₂とE d xが複雑な相互作用を及ぼしあうことが推察された。
6. 正常辺縁歯周組織では歯槽骨骨髓中の単核細胞，巨核球ならびに接合上皮直下の樹状細胞にPG陽性所見が観察された。骨芽細胞や骨細胞は常に6ヶトPGF_{1α}陽性を呈し，骨組織代謝の生理的調節機構に6ヶトPGF_{1α}が重要な役割を果たす可能性が示唆された。

7. 実験的根尖病巣の形成過程における歯髄炎組織では、マクロファージと血管内皮細胞に各種PG陽性所見が観察され、炎症のメディエータとして重要な役割を担うことが示された。また、炎症巣より根尖部にかけての歯髄細胞や象牙芽細胞も特異的なPGF_{2α}陽性を呈した。PGF_{2α}はPGE₂やPGI₂による組織反応を緩和するとされており、その陽性領域が炎症の波及とともに根尖側へ移動する傾向を示したことは、PGE₂やPGI₂の作用を緩和するための宿主細胞によるPGF_{2α}の産生領域が炎症反応の進展に伴って根尖側へと移動したことを示す所見と解せられた。
8. 根尖性歯周炎組織での主なPG陽性細胞は肉芽組織内の内皮細胞とマクロファージ系細胞であり、これらの細胞によって産生されたPGが病巣周囲骨組織に破骨細胞性骨吸収を惹起して病巣を拡大するものと考えられた。なお、検討した3種のPGの分布に違いは認められなかった。
9. 辺縁性歯周炎組織においても内皮細胞とマクロファージ系細胞がPG陽性を呈し、病巣局所でPG産生の営まれていることが示された。
10. 炎症巣と骨吸収面との間にPG保有細胞に乏しい線維性結合組織が介在する所見より、炎症巣が骨組織に直接していない場合でも炎症巣で産生されたPGが浸透・到達して破骨細胞性骨吸収を誘導することが示唆された。

以上の結果から、辺縁歯周組織において産生されるPGが、炎症のメディエータならびに破骨細胞性骨吸収刺激因子として歯周炎の進展・増悪に重要な役割を果たしていることをin vivo実験系において示すことができた。

文 献

- 1) Meikle, M.C., Heath, J.K. and Reynolds, J.J.: Advances in understanding cell interactions in tissue resorption. Relevance to the pathogenesis of periodontal diseases and a new hypothesis. *J. Oral Pathol.* 15, 239-250, 1986.
- 2) Ranney, R.R.: Immunologic mechanisms of pathogenesis in periodontal diseases: An assessment. *J. Periodont. Res.* 26, 243-254, 1991.
- 3) Page, R.C.: The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* 26, 230-242, 1991.
- 4) Mundy, G.R.: Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J. Periodont. Res.* 26, 213-217, 1991.
- 5) Klein, D.C. and Raisz, L.G.: Prostaglandins: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86, 1436-1440, 1970.
- 6) Hayward, M. and Fiedler-Nagy, Ch.: Mechanisms of bone loss: rheumatoid arthritis, periodontal disease and osteoporosis. *Agents and actions* 22, 251-254, 1987.
- 7) Sterrett, J.D.: The osteoclast and periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 13, 258-269, 1986.
- 8) Offenbacher, S., Farr, D.H. and Goodson, J.M.: Measurement of prostaglandin E in crevicular fluid. *J. Clin. Peri-*

- odontol. 8, 359-367, 1981.
- 9) ElAttar, T.M.A. and Lin, H.S. : Prostaglandins in gingiva of patients with periodontal disease. J. Periodontol. 52, 16-19, 1981.
 - 10) Hirata, H., Dohi, T., Terada, H., Tanaka, S., Okamoto, H. and Tsujimoto, A. : Prostaglandin levels in human and dog oral tissues healthy and diseased. Jpn. J. Oral Biol. 25, 839-841, 1983.
 - 11) Dewhirst, F.E., Moss, D.E., Offenbacher, S. and Goodson, J.M. : Levels of prostaglandin E₂, thromboxane, and prostacyclin in periodontal tissues. J. Periodont. Res. 18, 156-163, 1983.
 - 12) Offenbacher, S., Odle, B.M., Gray, R.C. and Van Dyke, T.E. : Crevicular fluid prostaglandin E levels as a measure of the periodontal disease status of adult and juvenile periodontitis patients. J. Periodont. Res. 19, 1-13, 1984.
 - 13) Offenbacher, S., Odle, B.M. and Van Dyke, T.E. : The use of crevicular fluid prostaglandin E₂ levels as a predictor of periodontal attachment loss. J. Periodont. Res. 21, 101-112, 1986.
 - 14) Weaks-Dybvig, M., Sanavi, F., Zander, H. and Rifkin, B.R. : The effect of indomethacin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. J. Periodont. Res. 17, 90-100, 1982.
 - 15) Lasfargues, J.-J. and Saffar, J.-L. : Effect of indomethacin on bone destruction during experimental periodontal disease

- in the hamster. J. Periodont. Res. 18, 110-117, 1983.
- 16) Yamasaki, K., Miura, F. and Suda, T.: Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. J. Dent. Res. 59, 1635-1642, 1980.
 - 17) Yamasaki, K., Shibata, Y. and Fukuhara, T.: The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). J. Dent. Res. 61, 1444-1446, 1982.
 - 18) Higgs, G.A. and Salmon, J.A.: Cyclo-oxygenase products in carrageenin-induced inflammation. Prostaglandins 17, 737-746, 1979.
 - 19) Harada, Y., Tanaka, K., Uchida, Y., Ueno, A., Oh-ishi, S., Yamashita, K., Ishibashi, M., Miyazaki, H. and Katori, M.: Changes in the levels of prostaglandins and thromboxane and their roles in the accumulation of exudate in rat carrageenin-induced pleurisy. - A profile analysis using GAS chromatography-mass spectrometry. Prostaglandins 23, 881-895, 1982.
 - 20) Saito, I., Watanabe, O., Kawahara, H., Igarashi, Y., Yamamura, T. and Shimono, M.: Intercellular junctions and the permeability barrier in the junctional epithelium. A study with freeze-fracture and thin sectioning. J. Periodont. Res. 16, 467-480, 1981.
 - 21) McDougall, W.A.: Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. J. Periodont. Res. 6, 89-99, 1971.

- 22) Tanaka, T. : Transport pathway and uptake of microperoxidase in the junctional epithelium of healthy rat gingiva. J. Periodont. Res. 19, 26-39, 1984.
- 23) Johnston, M.G., Hay, J.B. and Movat, H.Z. : The modulation of enhanced vascular permeability by prostaglandins through alterations in blood flow (hyperemia). Agents and Actions 6, 705-711, 1976.
- 24) Tsurufuji, S., Sato, H., Min, K.R. and Ohuchi, K. : Difference in the anti-inflammatory effect of indomethacin between acute and chronic stage of carrageenin-induced inflammation. J. Pharmac. Dyn. 1, 8-14, 1978.
- 25) Komoriya, K., Ohmori, H., Azuma, A., Kurozumi, S. and Hashimoto Y. : Prostaglandin I₂ as a potentiator of acute inflammation in rats. Prostaglandins 15, 557-564, 1978.
- 26) Williams T.J. : Prostaglandin E₂, prostaglandin I₂ and the vascular change of inflammation. Br. J. Pharmac. 65, 517-524, 1979.
- 27) Moncada, S., Ferreira, S.H. and Vane, J.R. : Prostaglandins, aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. Nature 246, 217-218, 1973.
- 28) Collier, J.G., Karim, S.M.M., Robinson, B. and Somers, K. : Effect of prostaglandins A₁, A₂, B₁, E₂ and F_{2a} on the forearm arterial bed of man. Brit. J. Pharmacol. 46, 551-552, 1971.
- 29) Ijuhin, N. : Light and electron microscopic studies of ex-

- perimentally-induced pathologic changes in the rat peri-
odontal tissue. *Adv. Dent. Res.* 2, 209-214, 1988.
- 30) Rifkin, B.R., Baker, R.L. and Coleman, S.J.: Effects of
prostaglandin E₂ on macrophages and osteoclasts in cultured
fetal long bones. *Cell Tissue Res.* 207, 341-346, 1980.
- 31) Schelling, S.H., Wolfe, H.J. and Tashjian, A.H.: Role of the
osteoclast in prostaglandin E₂-stimulated bone resorption.
A correlative morphometric and biochemical analysis.
Lab. Invest. 42, 290-295, 1980.
- 32) Hirata, H., Dohi, H., Terada, S., Tanaka, H., Okamoto, H.
and Tsujimoto, A.: labelled-calcium release from rat
mandibles exposed to prostaglandins in vitro. *Arch. Oral
Biol.* 28, 963-965, 1983.
- 33) Dietrich, J.W., Goodson, J.M. and Raisz, L.G.: Stimulation
of bone resorption by various prostaglandins in organ
culture. *Prostaglandins* 10, 231-240, 1975.
- 34) Santoro, M.G., Jaffe, B.M. and Simmons, D.J.: Bone resorp-
tion in vitro and in vivo in PGE-treated mice (39939). *Proc.
Soc. Exp. Biol. Med.* 156, 373-377, 1977.
- 35) Chambers, T.J. and Ali, N.N.: Inhibition of osteoclastic
motility by prostaglandins I₂, E₁, E₂ and 6-oxo-E₁.
J. Pathol. 139, 383-397, 1983.
- 36) McSheehy, P.M.J. and Chambers, T.J.: Osteoblastic-like cells
in the presence of parathyroid hormone release soluble
factor that stimulates osteoclastic bone resorption.

- Endocrinology 119, 1654-1695, 1986.
- 37) McSheehy, P.M.J. and Chambers, T.J.: 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ stimulates rat osteoblastic cells to release a soluble factor that increases osteoclastic bone resorption. J. Clin. Invest. 80, 425-429, 1987.
 - 38) Chambers, T.J.: The regulation of osteoclastic development and function. Ciba Found. Symp. 136, 92-107, 1988.
 - 39) Chambers, T.J., Fuller, K. and Athanasou, N.A.: The effect of prostaglandins I₂, E₁, E₂ and dibutyryl cyclic AMP on the cytoplasmic spreading of rat osteoclasts. Br. J. Exp. Path. 65, 557-566, 1984.
 - 40) Chambers, T.J.: The pathobiology of the osteoclast. J. Clin. Pathol. 38, 241-252, 1985.
 - 41) Fuller, K. and Chambers, T.J.: Effect of arachidonic acid metabolites on bone resorption by isolated rat osteoclasts. J. Bone Mineral Res. 4, 209-215, 1989.
 - 42) Burger, E.H., Van Der Meer, J.W.M., Van De Gevel, J.S., Gribnau, J.C., Wil Thesingh C. and Van Furth, R.: In vitro formation of osteoclasts from long-term cultures of bone marrow mononuclear phagocytes. J. Exp. Med. 156, 1604-1614, 1982.
 - 43) Ibbotson, K.J., Roodman, G.D., McManus, L.M. and Mundy, G.R.: Identification and characterization of osteoclast-like cells and their progenitors in cultures of feline marrow mononuclear cells. J. Cell Biol. 99, 471-480, 1984.

- 44) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., Murota, S., Nagata, N., Takatani, O. and Suda, T.: Prostaglandins promote osteoclastlike cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cell cultures. *J. Bone Mineral Res.* 4, 29-35, 1989.
- 45) Collins, D.A. and Chambers T.J.: Effect of prostaglandins E₁, E₂, and F_{2a} on osteoclast formation in Mouse bone marrow cultures. *J. Bone Mineral Res.* 6, 157-164, 1991.
- 46) Hausmann, E., Raisz, L.G. and Miller, W.A.: Endotoxin: Stimulation of bone resorption in tissue culture. *Science* 168, 862-864, 1970.
- 47) Hausmann, E., Weinfeld, N. and Miller, W.A.: Effects of lipopolysaccharides on bone resorption in tissue culture. *Calc. Tiss. Res.* 9, 272-282, 1972.
- 48) Iino, Y. and Hopps, R. M.: The bone-resorbing activities in tissue culture of lipopolysaccharides from the bacteria Actinobacillus actinomycetemcomitans, Bacteroides gingivalis and Capnocytophaga ochracea isolated from human mouths. *Arch. Oral Biol.* 29, 59-63, 1984.
- 49) Umezu, A., Kaneko, N., Toyama, Y., Watanabe, Y. and Itoh, H.: Appearance of osteoclasts by injections of lipopolysaccharides in rat periodontal tissue. *J. Periodont. Res.* 24, 378-383, 1989.
- 50) Kurland, J.I. and Bockman, R.: Prostaglandin E production by human blood monocytes and mouse peritoneal macrophages.

- J. Exp. Med. 147, 952-957, 1978.
- 51) Garrison, S.W., Holt, S.C. and Nichols, F.C.: Lopopoly-saccharide-stimulated PGE₂ release from human monocytes. Comparison of lipopolysaccharides prepared from suspected periodontal Pathogens. J. Periodontol. 59, 684-687, 1988.
- 52) Garrison, S.W. and Nichols, F.C.: LPS-elicited secretory responses in monocytes: Altered release of PGE₂ but not IL-1 β in patients with adult periodontitis. J. Periodont. Res. 24, 88-95, 1989.
- 53) Shiina, Y., Yamaguchi, A., Yamana, H., Abe, E., Yoshiki, S. and Suda, T.: Comparison of the Mechanisms of bone resorption induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and lipopolysaccharides. Calcif. Tissue Int. 39, 28-34, 1986.
- 54) Ishihara, Y., Nishihara, T., Maki, E., Noguchi, T. and Koga, T.: Role of interleukin-1 and prostaglandin in in vitro bone resorption induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans lipopolysaccharide. J. Periodont. Res. 26,155-160, 1991.
- 55) Raisz, L.G., Nuki, K., Alander, C.B. and Craig, R.G.: Interactions between bacterial endotoxin and other stimulators of bone resorption in organ culture. J. Periodont. Res. 16, 1-7, 1981.
- 56) Heath, J.K., Saklatvala, J., Meikle, M.C., Atkinson, S.J. and Reynolds J.J.: Pig interleukin 1 (Catabolin) is a potent stimulator of bone resorption in vitro. Calcif. Tissue Int. 37, 95-97, 1985.

- 57) Jandinski, J.J.: Osteoclast activating factor is now interleukin-1 beta: historical perspective and biological implications. *J. Oral Pathol.* 17, 145-152, 1988.
- 58) Pfeilschifter, J., Chenu, C., Bird, A., Mundy, G.R. and Roodman, G.D.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclastlike cells in vitro. *J. Bone Mineral Res.* 4, 113-118, 1989.
- 59) Hanazawa, S., Nakada, K., Ohmori, Y., Miyoshi, T., Amano, S. and Kitano, S.: Functional role of interleukin 1 in periodontal disease: Induction of interleukin 1 production by Bacteroides gingivalis lipopolysaccharide in peritoneal macrophages from C3H/HeN and C3H/HeJ mice. *Infect. Immun.* 50, 262-270, 1985.
- 60) Lindemann, R.A., Economou, J.S. and Rothermel, H.: Production of interleukin-1 and tumor necrosis factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J. Dent. Res.* 67, 1131-1135, 1988.
- 61) Raisz, L.G., Sandberg, A.L., Goodson, J.M., Simmons, H.A. and Mergenhagen, S.E.: Complement-dependent stimulation of prostaglandin synthesis and bone resorption. *Science* 185, 789-791, 1974.
- 62) Ten Cate, A.R. and Deporter, D.A.: The role of the fibroblast in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse. *Arch. Oral Biol.* 19, 339-340, 1974.

- 63) Garant, P.R. : Collagen resorption by fibroblasts. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. J. Periodontol. 47, 380-390, 1976.
- 64) Rose, G.G., Yajima, T. and Mahan, C.J. : Microscopic assay for the phagocytotic-collagenolytic performance (PCP Index) of human gingival fibroblasts in vitro. J. Dent. Res. 57, 1003-1015, 1978.
- 65) Ijuhin, N., Miyauchi, M., Ito, H., Takata, T., Ogawa, I. and Nikai, H. : Enhanced collagen phagocytosis by rat molar periodontal fibroblasts after topical application of lipopolysaccharide - ultrastructural observations and morphometric analysis. J. Periodont. Res. 27, 167-175, 1992.
- 66) Wahl, L.M., Olsen, C.E., Sandberg, A.L. and Mergenhagen, S.E. : Prostaglandin regulation of macrophage collagenase production. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 4955-4958, 1977.
- 67) Wahl, L.M. and Mergenhagen, S.E. : Regulation of monocyte/macrophage collagenase. J. Oral Pathol. 17, 452-455, 1988.
- 68) Heath, J.K., Atkinson, S.J., Meikle, M.C. and Reynolds, J.J. : Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. Biochim. Biophys. Acta 802, 151-154, 1984.
- 69) Shen, V., Kohler, G., Jeffrey, J.J. and Peck, W.A. : Bone-resorbing agents promote and interferon- γ inhibits bone cell collagenase production. J. Bone Mineral Res. 3, 657-666, 1988.

- 70) Reynolds, J.J. : Inhibition of production and action of tissue metalloproteinase. *Ann. Biol. Clin.* 44, 188-194, 1986.
- 71) Higuchi, K., Matsumoto, T., Arakawa, T., Kitano, A., Nagura, H. and Kobayashi, K. : Immunohistochemical characterization of cells bearing prostaglandins (PGs) in rat gastric mucosa. *Gastroenterology* 94, A186, 1988.
- 72) Weksler, B.B., Marcus, A.J. and Jaffe, E.A. : Synthesis of prostaglandin I₂ (prostacyclin) by cultured human and bovine endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74, 3922-3926, 1977.
- 73) Nakamura, H., Arakawa, T. and Kobayashi, K. : Difference in activity of prostaglandin and thromboxane biosynthesis between in mucosal and muscular tissues in rat stomach. *Gastroenterology* 88, 1514, 1985.
- 74) Preclik, G., Stange, E.F., Arnold, D., Kraft, O., Schneider, A. and Ditschuneit, H. : Prostaglandin synthesis along the gastrointestinal tract of the rabbit: Differences in total synthesis and profile. *Prostaglandins* 33, 459-477, 1987.
- 75) Ota, S., Razandi, M., Krause, W., Terano, A., Hiraishi, H. and Ivey, K.J. : Prostaglandin E₂ output by isolated rat gastric parietal cells and non-parietal epithelial cells. *Prostaglandins* 36, 589-600, 1988.
- 76) Chen, M.C., Sanders, M.J., Amirian, D.A., Thomas, L.P., Kauffman, G. and Soll, A.H. : Prostaglandin E₂ production by

- dispersed canine fundic mucosal cells. Contribution of macrophages and endothelial cells as major sources. *J. Clin. Invest.* 84, 1536-1549, 1989.
- 77) Spolarics, Z., Tanacs, B., Garzo, T., Mandl, J., Mucha, I., Antoni, F., Machovich, R. and Horvath, I.: Prostaglandin and thromboxane synthesizing activity in isolated murine hepatocytes and nonparenchymal liver cells. *Prostaglandins Leukotriens Med.* 379-388, 1984.
- 78) Kuiper, J., Zijlstra, F.J., Kamps, J.A.A.M. and Van Berkel, T.J.C.: Identification of prostaglandin D₂ as the major eicosanoid from liver endothelial and Kupffer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 959, 143-152, 1988.
- 79) Cinotti G.A. and Pugliese, F.: Prostaglandins in blood pressure regulation. *Kidney Int.* 34, S.57-S.60, 1988.
- 80) Perez, G. and McGuckin, J.: Cellular localization of prostaglandin A₂ in the rat kidney. *Prostaglandins* 2, 393-398, 1972.
- 81) Davidovich, Z., Shanfeld, J.L. and Lally, E.: Prostaglandin F_{2a} is associated with alveolar bone cells: Immunohistochemical evidence utilizing monoclonal antibodies; Factors and mechanisms influencing bone growth (Dixon, A.D. and Sarnat, B.G., editors). Alan R. Liss, Inc., New York, 125-134, 1982.
- 82) Somjen, D., Binderman, I., Berger, E. and Harell, A.: Bone remodelling induced by physical stress is prostaglandin E₂

- mediated. *Biochim. Biophys. Acta* 627, 91-100, 1980
- 83) Feyen, J.H.M., van der Wilt, G., Moonen, P., Di Bon, A. and Nijweide, P.J.: Stimulation of arachidonic acid metabolism in primary cultures of osteoblast-like cells by hormones and drugs. *Prostaglandins* 28, 769-781, 1984
- 84) Partridge, N.C., Hillyard, C.J., Nolan, R.D. and Martin, T.J.: Regulation of prostaglandin production by osteoblast-rich calvarial cells. *Prostaglandins* 30, 527-539, 1985.
- 85) Yokoto, K., Kusaka, M., Ohshima, T., Yamamoto, S., Kurihara, N., Yashimo, T. and Kumegawa, M.: Stimulation of prostaglandin E₂ synthesis in cloned osteoblastic cells of mouse (MC3T3-E1) by epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 261, 15410-15415, 1986.
- 86) Yaron, M., Yaron, I., Smetana, O., Eylan, E. and Zor, U.: Stimulation of prostaglandin E production by bacterial endotoxins in cultured human synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 23, 921-925, 1980.
- 87) Ogawa, H., Kassell, N.F., Sasaki, T., Hongo, K., Tsukahara, T., Hudson, S.B., Asban, G.I., Tuan, H.L. and Torner, J.C.: Immunohistochemically demonstrated increase of prostaglandin F₂-alpha in neurons after reoxygenation in anoxic rats. *Prostaglandins* 36, 891-900, 1988.
- 88) Hirafuji, M. and Ogura, Y.: Endogenous biosynthesis of prostaglandin I₂ and thromboxane A₂ by isolated rat dental pulp. *Biochem. Pharmacol.* 32, 2983-2985, 1983.

- 89) Okiji, T., Morita, I., Kobayashi, C., Sunada, I. and Murota, S.: Arachidonic-acid metabolism in normal and experimentally-inflamed rat dental pulp. Arch. Oral Biol. 32, 723-727, 1987.
- 90) Okiji, T., Morita, I., Sunada, I. and Murota, S.: Involvement of arachidonic acid metabolites in increases in vascular permeability in experimental dental pulpal inflammation in the rat. Arch. Oral Biol. 34, 523-528, 1989.
- 91) Cohen, J.S., Reader, A., Fertel, R., Beck, F.M. and Meyers, W.J.: A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E₂ and F_{2α} in painful and asymptomatic human dental pulps. J. Endodont. 11, 330-335, 1985.
- 91) 渡辺 毅: プロスタグランジンE₂受容体研究の現状. 現代医療 21, 3175-3180, 1989.
- 92) 渡辺 毅: プロスタグランジンI₂受容体研究の現状. 現代医療 21, 3181-3186.
- 93) 中村元直, 清水孝雄: エイコサノイド受容体と情報伝達. 日本臨床 48, 1129-1123, 1990.
- 94) Dunn, C.J., Willoughby, D.A., Giroud, J.P. and Yamamoto, S.: An appraisal of the interrelationships between prostaglandins and cyclic nucleotides in inflammation. Biomed. 24, 214-220, 1976.
- 95) Harris, M., Jenkins, M.V., Bennett, A. and Wills, M.R.: Prostaglandin production and bone resorption by dental cyst. Nature 245, 213-215, 1973.

- 96) Harvey, W., Guat-Chen, F., Gordon, D., Meghji, S., Evans, A. and Harris M.: Evidence for fibroblasts as the major source of prostacyclin and prostaglandin synthesis in dental cyst in man. *Arch. Oral Biol.* 29, 223-229, 1984.
- 97) Matejika, M., Porteder, H., Ulrich, W., Watzek, G. and Sinzinger, H.: Prostaglandin synthesis in dental cysts. *Brit. J. Oral Max.-fac. Surg.* 23, 190-194, 1985.
- 98) Matejika, M., Ulrich, W., Porteder, H., Sinzinger, H. and Peskar, B.A.: Immunohistochemical detection of 6-oxo-PGF_{1α} and PGE₂ in radicular cysts. *J. Max.-fac. Surg.* 14, 108-112, 1986.
- 99) Wato, M.: A histochemical study of periodontal disease. - A fundamental study on the localization of prostaglandin (PG). *Jpn. J. Oral Biol.* 27, 1132-1145, 1985.
- 100) Löning, Th., Albers, H.-K., Lisboa, B.P., Burkhardt, A. and Caselitz, J.: Prostaglandin E and the local immune response in chronic periodontal disease. Immunohistochemical and radioimmunological observations. *J. Periodont. Res.* 15, 525-535, 1980.

表1：免疫染色に用いた抗体一覧

抗体	PGE ₂ 抗体	PGF _{2a} 抗体	6ヶ卜PGF _{1a} 抗体
メーカー	CAYMAN	PASTEUR	CAYMAN
希釈	1/10原液	原液	1/10原液
PGE ₁	3.2%	0.03%	
PGE ₂	100.0%	0.03%	1.7%
PGF _{1a}	0.2%	12.0%	1.3%
PGF _{2a}	0.2%	100.0%	4.3%
6ヶ卜PGF _{1a}	0.2%	0.04%	100.0%

表2：プロスタグランジンE₂ (PGE₂) ならびにアルコール生食水投与群
および未処置群の破骨細胞数測定結果

グループ		N	M ± SE	
未処置		19	3.47±0.68	
0.005% AL/PS	12H	25	4.40±0.81	**
	1D	10	2.50±0.97	**
	2D	11	3.00±1.04	**
	7D	11	3.91±1.18	**
1mg/ml PGE ₂	1H	9	6.11±1.27	
	3H	12	8.08±1.28	
	12H	10	9.20±1.23	
	1D	10	8.70±1.21	
	2D	10	6.10±1.05	
	3D	6	3.00±0.36	
	7D	12	4.50±1.61	
0.001mg/ml PGE ₂	12H	31	3.48±0.55	
0.01mg/ml PGE ₂	12H	21	9.81±1.29	**
0.1mg/ml PGE ₂	12H	27	10.04±0.98	**
1mg/ml PGE ₂	12H	10	9.20±1.23	**
2mg/ml PGE ₂	12H	30	5.48±0.72	**

** は2グループ間の有意差 (P<0.01) を示す。

表3：プロスタグランジン E₂ (PGE₂) と内毒素 (Edx) 連続投与後の破骨細胞数の測定結果

グループ	N	M ± SE	
未処置	19	3.47±0.68	
1mg/mlPGE ₂ +5mg/mlEdx	1H	6.60±0.94	
	3H	11.80±1.40	
	12H	10.53±0.87	
	1D	11.00±1.40	
	2D	7.20±1.19	
	3D	7.00±0.82	
	7D	5.00±0.68	

*, ** は2グループ間のそれぞれ危険率 P<0.05, P<0.01 での有意差を示す。

表4：ラット各種臓器におけるPGの免疫染色結果

臓器	陽性部位
胃	壁細胞(++) 主細胞(+)
小腸	粘膜固有層内マクロファージ(+++)
肝	粘膜固有層内マクロファージ(+++)
腎	肝実質細胞(++)
肺	Kupffer細胞(±)
脾	類洞内皮細胞(±)
腎	尿細管上皮細胞
肺	肺胞マクロファージ(+++)
脾	気管支粘膜上皮細胞(+)
脾	脾洞内皮細胞(±)

±：一部陽性，+：弱陽性，++：陽性，+++：強陽性

表5：正常ならびに炎症時歯髄・歯周組織におけるPGの免疫染色結果

	正常	歯髄炎	歯周炎	
			根尖性歯周炎	辺縁性歯周炎
PGE ₂		マクロファージ 内皮細胞	マクロファージ 内皮細胞	マクロファージ 内皮細胞
PGF _{2a}		マクロファージ 内皮細胞 象牙芽細胞 ¹ 歯髄細胞 ¹	マクロファージ 内皮細胞	マクロファージ 内皮細胞
6ケトPGF _{1a}	骨細胞 骨芽細胞 セメント細胞 セメント芽細胞	マクロファージ 内皮細胞	マクロファージ 内皮細胞 線維芽細胞 ² 骨細胞 骨芽細胞 セメント細胞 セメント芽細胞	マクロファージ 内皮細胞 線維芽細胞 ² 骨細胞 骨芽細胞

1：歯髄炎病巣より根尖部の領域の細胞が強陽性反応を示す

2：炎症巣やその周辺部歯根膜線維芽細胞が陽性を呈することがある。

付 図 説 明

図 1 実験 I スケジュール

図 2 PGE₂局所投与法

図 3 組織計測部位

歯槽骨頂部から根尖側 1 mm の範囲内（枠内）の歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って出現している破骨細胞数を測定した。JE；接合上皮，AB；歯槽骨，AC；歯槽骨骨頂，PR；口蓋根

図 4 免疫組織化学的染色方法（1）

図 5 免疫組織化学的染色方法（2）

図 6 実験 II スケジュール

図 7 アルコール／生食水投与開始 12 時間後の光顕像

A 接合上皮内および直下にわずかに好中球浸潤が観察される。トルイジンブルー染色（以下，TBと略） × 150

B 歯槽骨骨縁部に破骨細胞はほとんど観察されない。TB，× 100

C 小型円形の休止期破骨細胞（OC）や前破骨細胞（POC）は，骨縁から離れた血管周囲に位置している。TB，× 400

図 8 1mg/ml PGE₂投与後にみられる歯肉接合上皮部の光顕像

A 投与開始 1 時間後，接合上皮細胞間には既に多数の好中球浸潤が観察される。TB，× 300

B 投与開始 3 時間後，著明に拡張した接合上皮細胞間隙ならびに上皮直下結合組織に著しい好中球浸潤が観察される。TB，× 300

図 9 1mg/ml PGE₂投与開始 1 時間後の接合上皮部の電顕像

著明に拡張した接合上皮細胞間に多数の好中球が観察される。上皮直下結合組織の基質は浮腫により疎になっている。× 2,400

- 図10 1mg/ml PGE₂投与開始3時間後の歯槽骨骨頂部歯根膜（A）なら
びに中央部歯根膜（B）の光顕像
不規則に吸収された歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って活発な骨吸収
を営む多数の破骨細胞（OC）が出現している。TB, ×200
- 図11 1mg/ml PGE₂投与開始1日後，骨縁に向かって細胞質突起を伸展し
始めた活動前の破骨細胞。×2,400
- 図12 1mg/ml PGE₂投与開始3時間後，吸収骨縁に向かって刷子縁を形成
する活発な破骨細胞。×2,400
- 図13 1mg/ml PGE₂投与開始12時間後，骨縁との間に線維芽細胞を介して
位置する，活動後と思われる破骨細胞。×2,400
- 図14 1mg/ml PGE₂投与開始12時間後の歯根膜線維芽細胞の電顕像
細胞内にコラーゲン原線維を含有した多数の貪食空胞が観察さ
れる。×3,000
- 図15 1mg/ml PGE₂投与開始12時間後の歯槽骨側歯根膜部の電顕像
歯槽骨骨縁部近傍の毛細血管周囲に破骨細胞前駆細胞と思われ
る単核細胞が認められる。×2,400
- 図16 1mg/ml PGE₂投与開始12時間後のセメント質側歯根膜部の電顕像
セメント質表面に活発にセメント質を吸収する破セメント細胞
が観察される。×2,400
- 図17 1mg/ml PGE₂単独投与群（PGE₂投与群），未処置群ならびに0.05%
アルコール／生食水投与群（AL/PS投与群）における破骨細胞数
†はPGE₂投与群と未処置群との間にP<0.01で有意差のあることを
示す。
*はPGE₂投与群とAL/PS投与群との間にP<0.01で有意差のあるこ
とを示す。

- 図18 各種濃度のPGE₂投与開始12時間後の歯肉接合上皮部の光顕像
- A 0.001mg/ml PGE₂投与群；接合上皮ならびに上皮直下結合組織には好中球浸潤が観察される。TB, ×300
 - B 0.1mg/ml PGE₂投与群；接合上皮細胞間には密な好中球浸潤が観察される。TB, ×300
 - C 2mg/ml PGE₂投与群；同部の好中球浸潤は減少している。
TB, ×300
- 図19 0.01mg/ml PGE₂投与開始12時間後の歯根膜部の光顕像
- 歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って活発な骨吸収を営む多数の破骨細胞(OC)が出現している。骨縁部近くには前破骨細胞様細胞(POC)も豊富に観察される。TB, ×150
- 図20 2mg/ml PGE₂投与開始12時間後の歯根膜部の光顕像
- 骨縁部からやや離れて位置する小型の破骨細胞(OC)が目立つ。
TB, ×200
- 図21 2mg/ml PGE₂投与開始12時間後にみられた接合上皮細胞の変性像
- A 光顕的に変性細胞は膨化し、トルイジンブルー染色性が低下している。TB, ×150
 - B 電顕的に変性細胞の電子密度は低下し、細胞内小器官の著明な膨化が観察される。×8,000
- 図22 2mg/ml PGE₂投与開始12時間後にみられた接合上皮直下歯肉線維芽細胞の変性を示す電顕像
- 変性細胞に著明なrERの拡張(→)や細胞膜の崩壊が観察される。×4,800
- 図23 2mg/ml PGE₂投与開始12時間後にみられた歯槽骨骨頂部骨芽細胞の変性を示す電顕像

細胞内小器官の膨化や拡張，細胞膜の崩壊が観察される。

AB；歯槽骨 ×4,200

図24 各種濃度のPGE₂投与開始12時間後の破骨細胞数の変動

未処置群ならびにアルコール／生食水投与開始12時間後
(AL/PS投与群)の破骨細胞数も示してある。

† はPGE₂投与群と未処置群との間，§ はPGE₂投与群とAL/PS
投与群との間にP<0.01で有意差のあることを示している。

図25 PGE₂・Edx連続投与12時間後の歯肉接合上皮部の光顕像

接合上皮とエナメル質の間に剝離した変性上皮細胞や好中球を
貯溜したポケット状裂隙の形成(▶)が観察される。

TB, ×300

図26 PGE₂・Edx連続投与1週後の歯肉接合上皮部の光顕像

接合上皮ならびに接合上皮直下結合組織に依然として多数の好
中球浸潤が観察される。TB, ×300

図27 PGE₂・Edx連続投与3時間後の歯根膜部の光顕像

歯根膜側歯槽骨骨縁に沿って多数の破骨細胞(OC)が出現して
いる。TB, ×200

図28 PGE₂・Edx連続投与(PGE₂+Edx投与群)後の破骨細胞数の経時的
変化

未処置群ならびにアルコール／生食水投与群(AL/PS投与群)
における破骨細胞数も示してある。

†, †† はPGE₂+Edx投与群と未処置群との間にそれぞれP<0.05,
P<0.01で有意差のあることを示す。

*, ** はPGE₂+Edx投与群とAL/PS投与群との間にそれぞれ
P<0.05, P<0.01で有意差のあることを示す。

図29 PGE₂単独投与 (PGE₂投与群) および PGE₂・Edx連続投与 (PGE₂+Edx投与群) 後の破骨細胞数の経時的变化

*, ** はPGE₂投与群とPGE₂+Edx投与群との間にそれぞれ
P<0.05, P<0.01で有意差のあることを示している。

図30 胃壁におけるPGE₂ (A), PGF_{2α} (B), 6ketPGF_{1α} (C) の免疫組織化学的染色所見

陽性細胞が胃底腺部に観察されるが, 被蓋上皮細胞や筋層の平滑筋細胞 (*) はいずれも陰性. ABC法, ×100

図31 胃壁におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見 (図30 Bの拡大像)

ラット壁細胞の細胞質にびまん性顆粒状の, また主細胞の細胞膜に沿った線条の (→) 陽性反応が観察される. 粘膜固有層内のマクロファージ (▶) も強陽性を呈する. ABC法, ×600

図32 ラット肝臓における6ketPGF_{1α}の免疫組織化学的染色所見

強陽性を呈する多数の肝細胞間にやはり陽性を呈するKupffer細胞 (▶) や内皮細胞 (→) が散見される. ABC法, ×400

図33 ラット腎臓におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見

腎尿細管上皮細胞が強陽性, 一部の内皮細胞 (→) が弱陽性を呈したが, 糸球体の細胞 (*) は陰性である. ABC法, ×400

図34 歯肉組織におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見

上皮直下の樹状細胞が陽性反応を呈する. JE; 接合上皮, CT; 上皮下結合組織, D; 象牙質, ES; 脱灰エナメル質空隙
SAB法, ×400

図35 歯槽骨骨髓組織におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見

強陽性を呈する単核細胞に加え巨核球の細胞膜も弱陽性 (▶) を呈する. SAB法, ×400

- 図36 ラット正常歯根膜および歯槽骨組織
- A 第1臼歯口蓋遠心根の遠心側歯根膜ならびに歯間乳頭部歯槽骨組織の光顕像 HE, ×200
- B 同部位における6ktPGF_{1α}の免疫組織化学的染色所見
骨小窩内の骨細胞および骨縁部に位置する一部のbone lining cell (▶) が陽性を呈する. R; 歯根 SAB法, ×200
- 図37 処置3日後に形成された歯冠部歯髓組織の急性化膿性炎症巣
- A 微小膿瘍 (*)
周辺部の歯髓組織内に毛細血管の拡張や好中球のびまん性浸潤が観察される. HE, ×200
- B 同部のPGE₂の免疫組織化学的染色所見
陽性を呈する内皮細胞 (→) やマクロファージ (▶) が散見される. *; 微小膿瘍 SAB法, ×200
- 図38 歯冠部歯髓内の急性化膿性炎症巣 (図37と同一症例) におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見
歯髓炎組織ならびに周囲歯髓組織において多数の歯髓細胞 (→) および象牙芽細胞 (▶) にPGF_{2α}の局在が観察される.
*; 微小膿瘍, D; 象牙質 SAB法, ×200
- 図39 歯髓炎病巣におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見
陽性領域は炎症の進行に伴い根尖側へと波及する傾向にある.
R; 歯根 SAB法, ×75
- A; 髓室から歯根上部歯髓にかけてみられる陽性所見 (処置1週後), B; 歯根中央部歯髓にみられる陽性所見 (処置1週後), C; 根尖孔近くの歯髓にみられる陽性所見 (処置2週後)
- 図40 39Cの拡大像

単核マクロファージ様細胞に加え、根尖部セメント質にコラーゲン線維を挿入する多数の線維芽細胞が強陽性を呈する。

R ; 歯根 SAB法, × 200

図41 処置2週後に形成された根尖部初期急性化膿性炎病巣

A 根尖部にはびまん性の好中球浸潤が観察される。R ; 歯根 HE, × 200

B 同部のPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見

陽性を呈するマクロファージ様細胞が散見される。R ; 歯根 SAB法, × 200

図42 処置2週後に形成された根尖部膿瘍

A 多数の好中球とfoam cellsの集積から成る膿瘍周囲には好中球浸潤の著明な肉芽組織形成が観察される。R ; 歯根 HE, × 100

B 同部におけるPGE₂の免疫組織化学的染色所見

膿瘍周囲肉芽組織内に多数の陽性細胞が観察される。

* ; 小膿瘍, R ; 歯根 SAB法, × 100

C 同部におけるPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見

膿瘍周囲肉芽組織内に多数の陽性細胞が観察される。

* ; 小膿瘍, R ; 歯根 SAB法, × 100

図43 図42 C の拡大像

PGF_{2α}の局在が大型マクロファージ様細胞の細胞質におけるびまん性、褐色顆粒状のDAB反応産物として観察される。

SAB法, × 400

図44 根尖部膿瘍周囲歯槽骨骨縁部のPGE₂の免疫組織化学的染色所見

(図42Bと同一症例)

骨吸収面 (→) と多数の陽性細胞を有する肉芽組織 (*)

間に陽性細胞に乏しい結合組織が介在する。 SAB法, ×200

図45 処置2週後に形成された根尖部膿瘍

- A 膿瘍膜の形成を伴う膿瘍（*）周囲の歯槽骨に破骨細胞（→）による活発な骨吸収が観察される。 R；歯根 HE, ×200
- B 同部の6ktPGF_{1α}の免疫組織化学的染色所見

小膿瘍（*）を被包する膿瘍膜およびその周囲肉芽組織内に陽性を呈するマクロファージおよび線維芽細胞が観察される。 周囲歯槽骨の骨細胞も強陽性を呈する。 R；歯根 SAB法, ×200

図46 処置2週後に形成された根分岐部膿瘍

- A 根分岐部に形成された大きな膿瘍（*）下方の歯槽中隔骨組織表層に破骨細胞（→）による活発な骨吸収が観察される。 R；歯根, AB；歯槽骨 HE, ×150
- B 同部の6ktPGF_{1α}の免疫組織化学的染色所見

膿瘍膜内のマクロファージや線維芽細胞および歯槽中隔の骨細胞に陽性所見が観察される。 膿瘍（*）と骨組織間にはPG保有細胞に乏しい結合組織が介在する。 R；歯根, AB；歯槽骨 SAB法, ×150

図47 処置1週後に形成された初期の辺縁歯周炎組織

- A 歯間乳頭部の上皮下歯肉結合組織内に好中球のびまん性浸潤が観察される。 R；歯根, E；上皮 HE, ×264
- B 同部の6ktPGF_{1α}の免疫組織化学的染色所見
- 多数の陽性細胞が散在している。 R；歯根 E；上皮 SAB法, ×264
- C 図47Bの拡大像

6ktPGF_{1α}陽性反応は円形ないし多角形のマクロファージ様単核

細胞細胞質内のびまん性、褐色顆粒状DAB反応産物として観察される。SAB法，×528

図48 処置2週後に形成された初期歯周膿瘍

A 好中球集簇巢（*）と下方の歯槽骨頂部骨面との間に炎症細胞に乏しい結合組織が観察される。R；歯根，AB；歯槽骨 HE，×132

B 同部の6ヶトPGF_{1α}の免疫組織化学的染色所見

膿瘍（*）周囲に陽性細胞が散見される。歯槽骨の骨細胞も陽性を呈する。R；歯根，AB；歯槽骨 SAB法，×132

C 図48Bの拡大像

マクロファージ様単核細胞（→）と内皮細胞（▶）が種々の程度に陽性反応を呈する。SAB法，×528

図49 処置3週後に形成された根分岐部膿瘍

A 膿瘍（*）壁肉芽組織に多数の好中球やマクロファージ様細胞が浸潤している。R；歯根，AB；歯槽骨 HE，×132

B 同部のPGE₂の免疫組織化学的染色所見

膿瘍（*）周囲の肉芽組織内に多数の陽性細胞が観察される。陽性細胞に富む肉芽組織と歯槽中隔の骨組織との間には陽性細胞に乏しい結合組織が介在している。R；歯根，AB；歯槽骨 SAB法，×132

C 同部のPGF_{2α}の免疫組織化学的染色所見

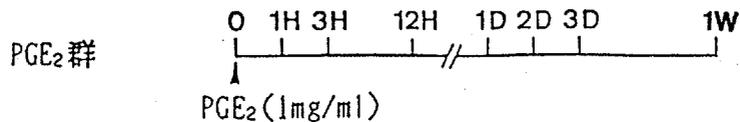
膿瘍（*）周囲の肉芽組織内に多数の陽性細胞が観察される。陽性細胞に富む肉芽組織と歯槽中隔の骨組織との間には陽性細胞に乏しい結合組織が介在している。R；歯根，AB；歯槽骨 SAB法，×132

D 図49Bの拡大像

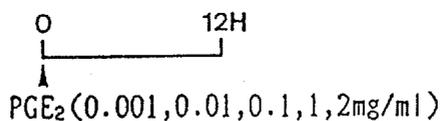
PGE₂陽性反応は内皮細胞および大型マクロファージ様細胞の細胞質内にびまん性に分布している。SAB法，×528

図1：実験Iスケジュール

I-1：PGE₂の辺縁歯周組織に及ぼす経時的変化の検討



I-2：各種濃度のPGE₂の歯周組織に及ぼす変化の検討



I-3：PGE₂・Edx連続投与の歯周組織に及ぼす変化の検討

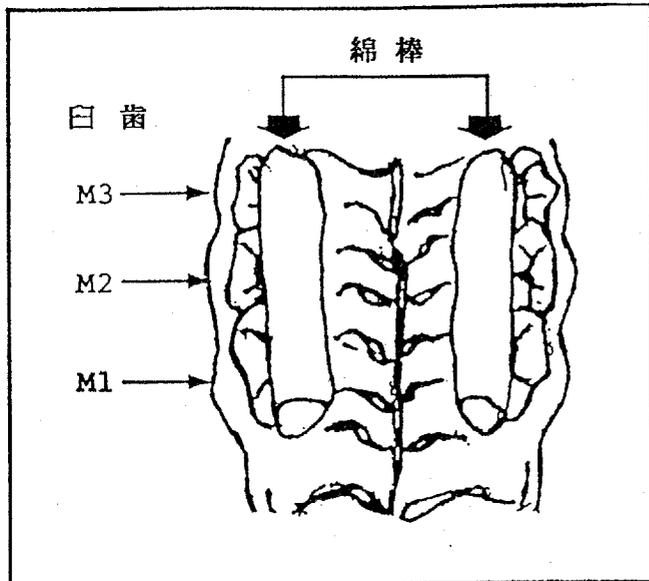
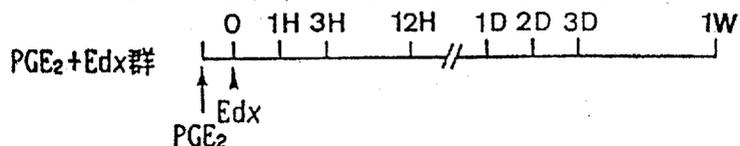


図2：PGE₂局所投与方法

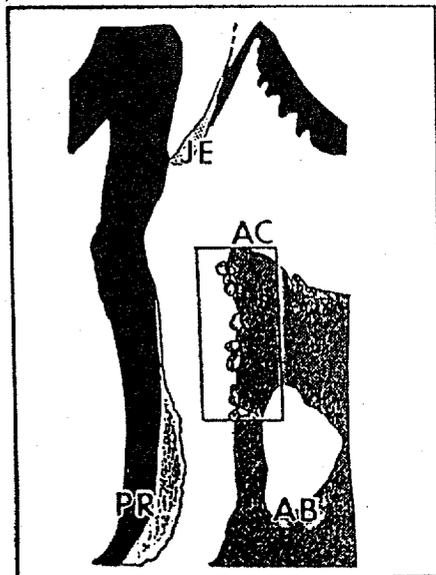
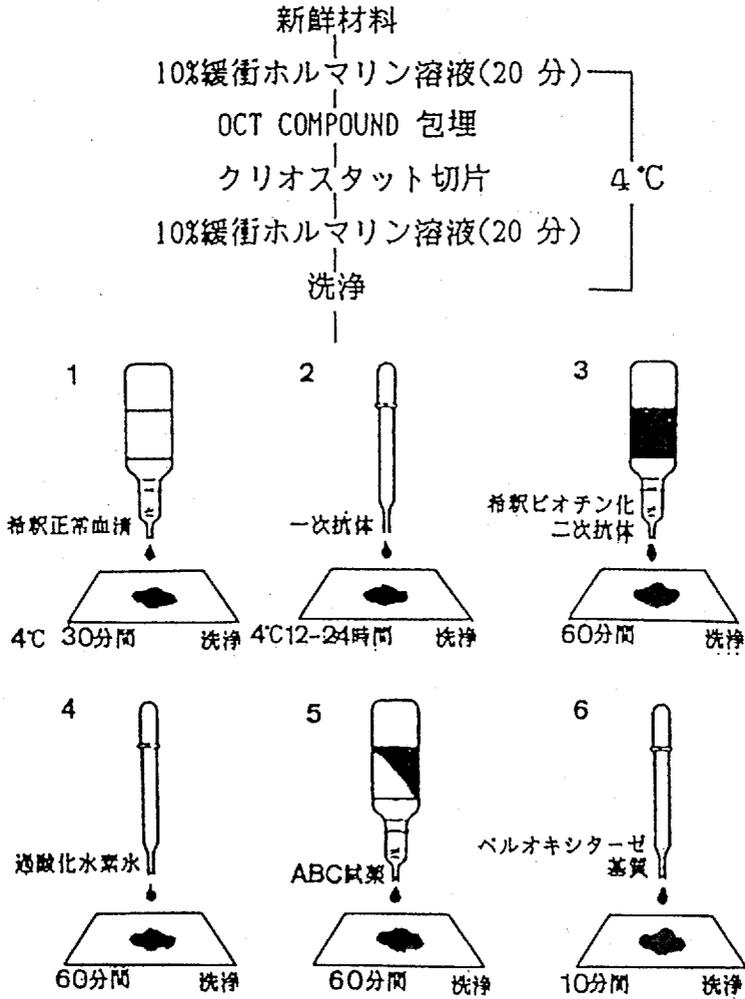


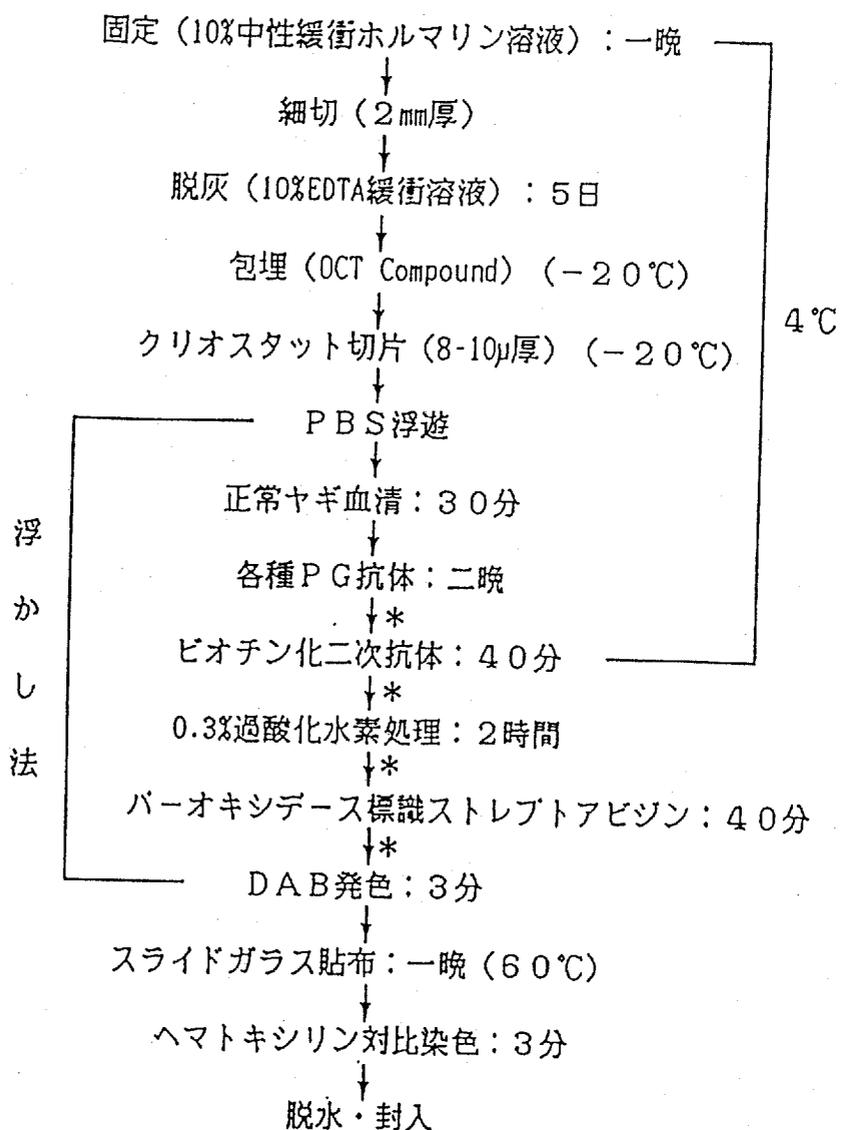
図3：組織計測部位

図4：免疫組織化学的染色方法（1）



フナコシ技術レポート19より改変

図 5 : 免疫組織化学的染色方法 (2)



(* : PBS洗淨 5分 X 3回)

図6：実験Ⅱスケジュール

実験的歯周炎組織における各種PGの局在・分布
に関する検討

A：根尖性歯周炎における検討

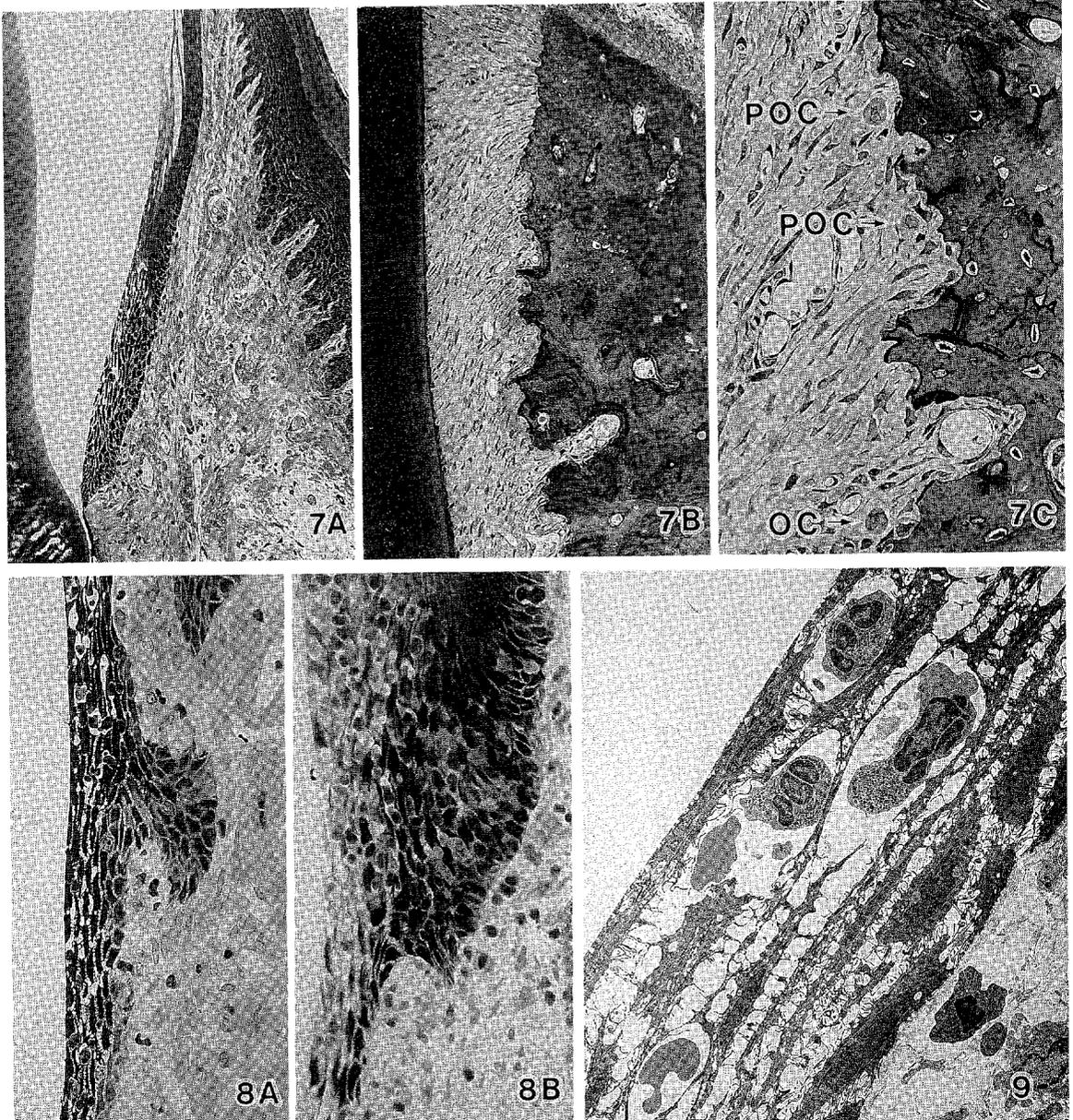
0 3D 5D 1W 2W 3W

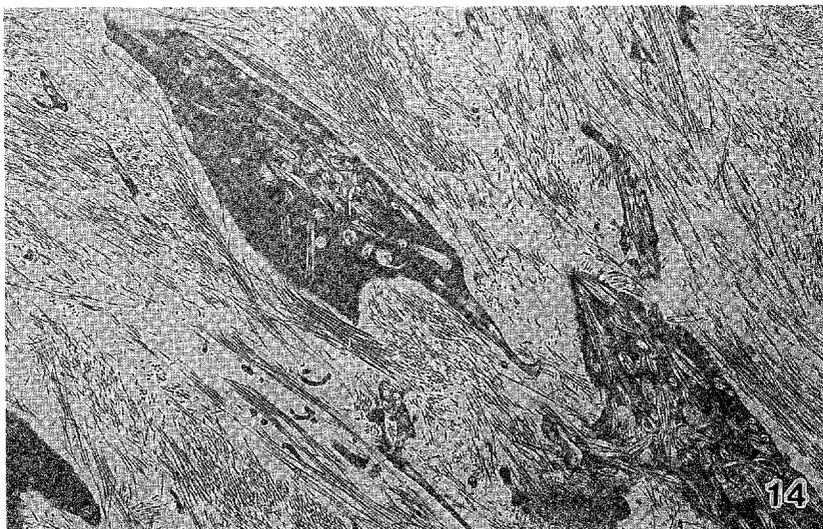
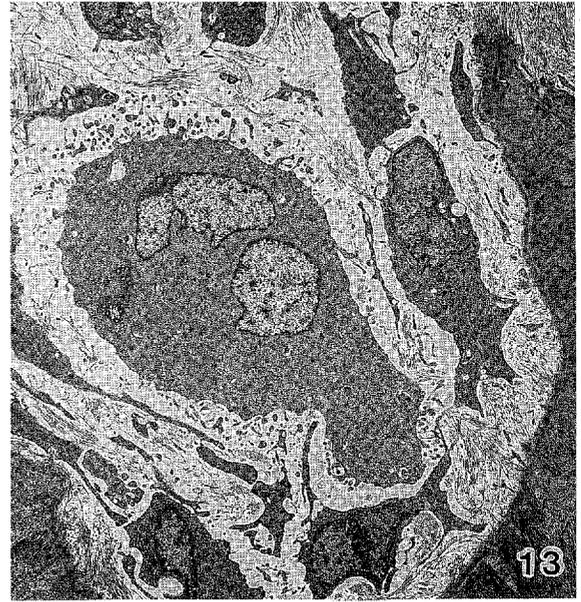
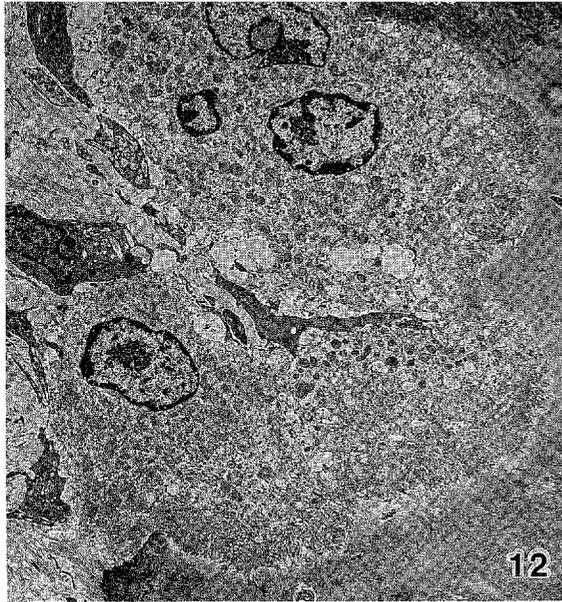
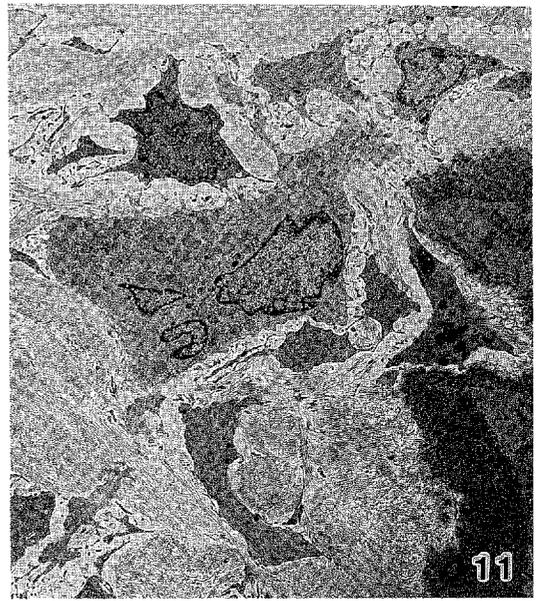
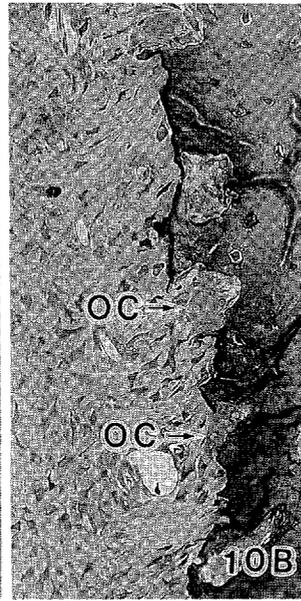
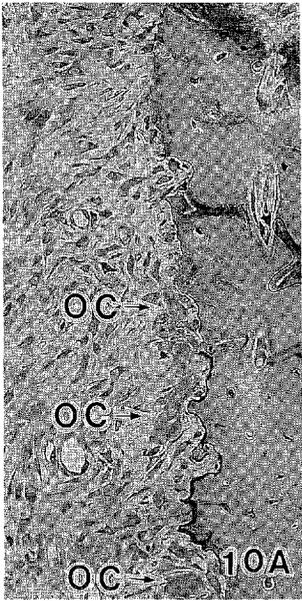
▲
小孔形成（咬合面）

B：辺縁性歯周炎における検討

0 3D 5D 1W 2W 3W

▲
小孔形成（歯間部）





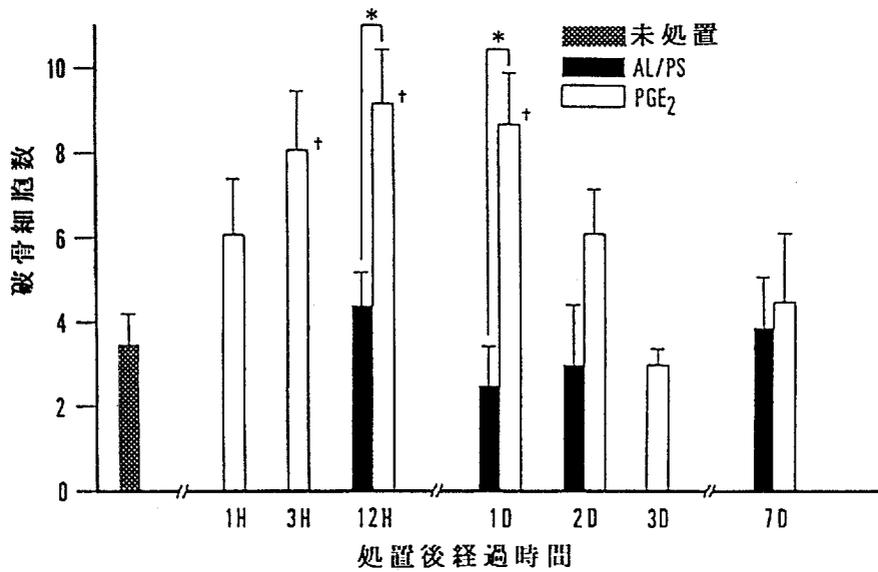
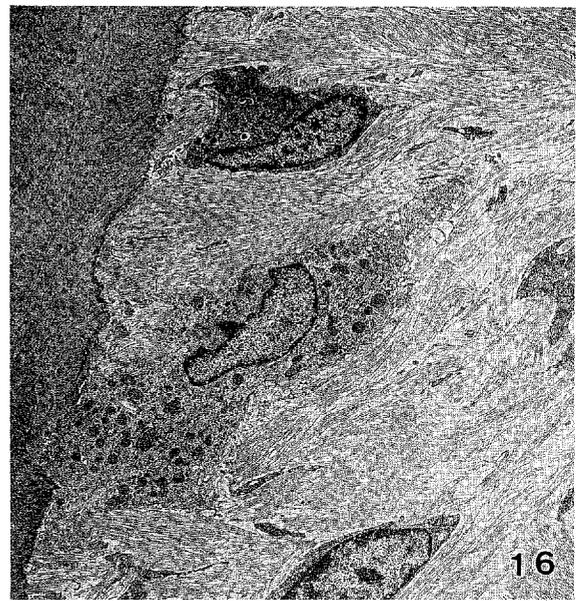
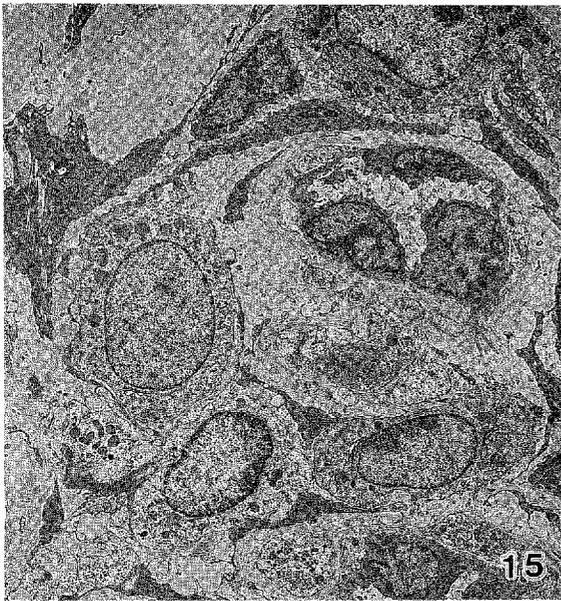
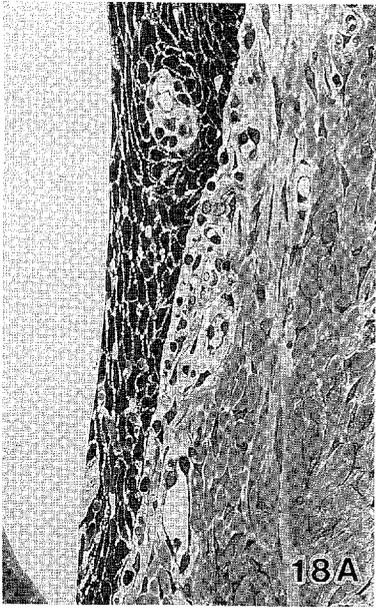
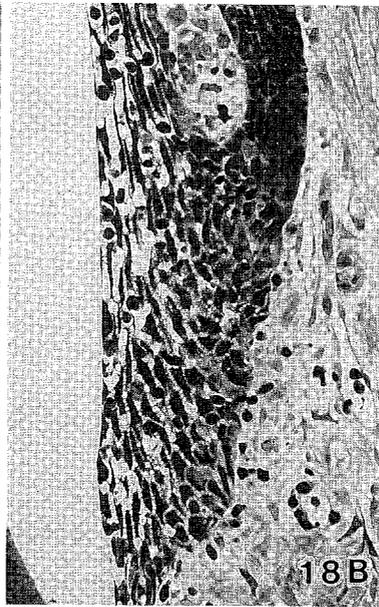


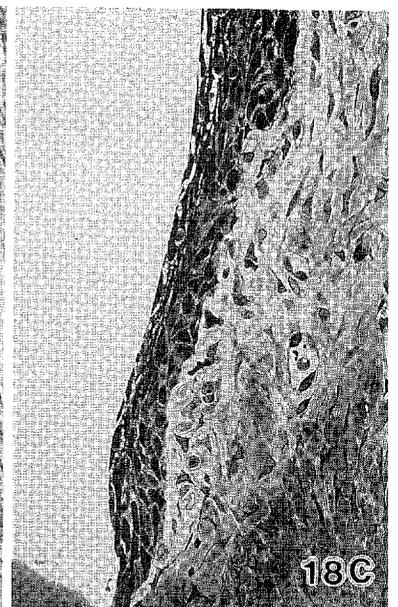
図17: 1mg/ml PGE₂単独投与群 (PGE₂投与群), 未処置群
ならびに0.05%アルコール/生食水投与群 (AL/PS
投与群) における破骨細胞数



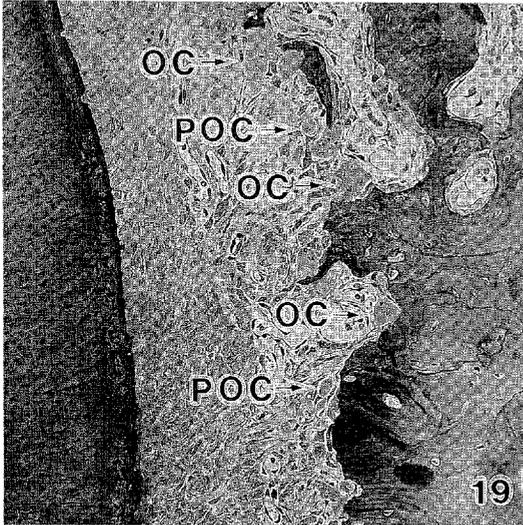
18A



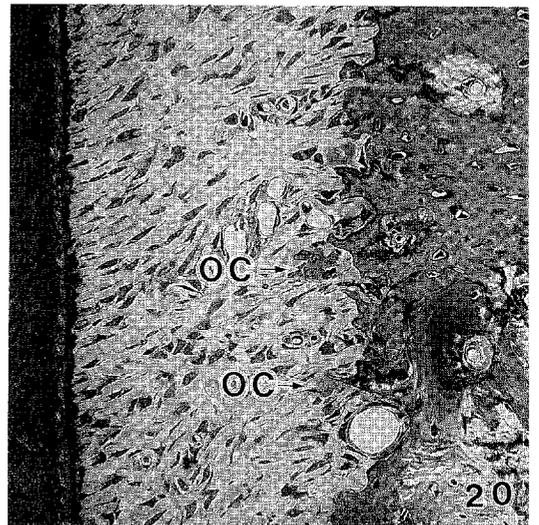
18B



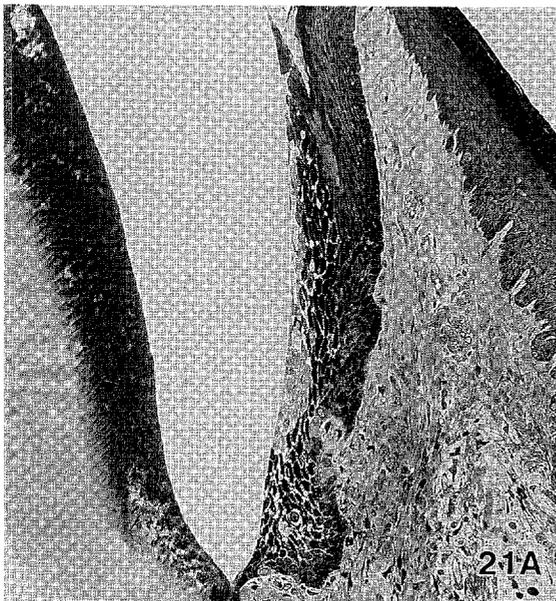
18C



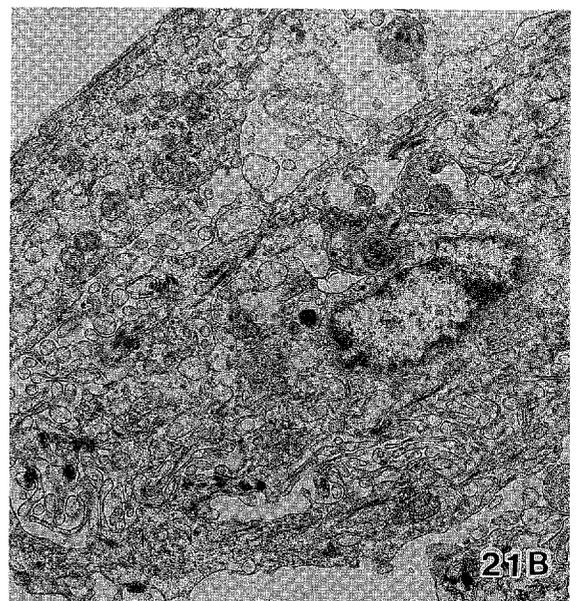
19



20



21A



21B

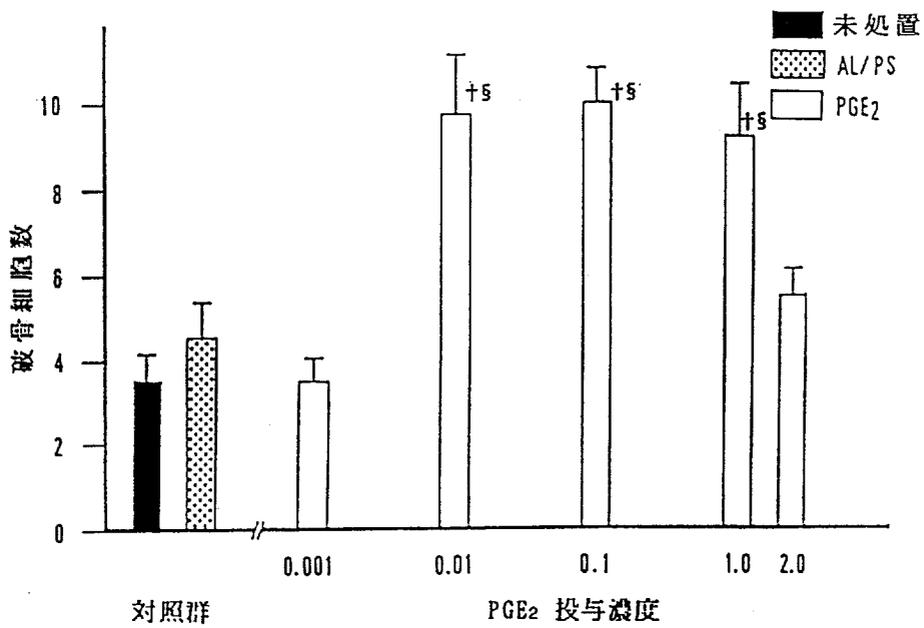
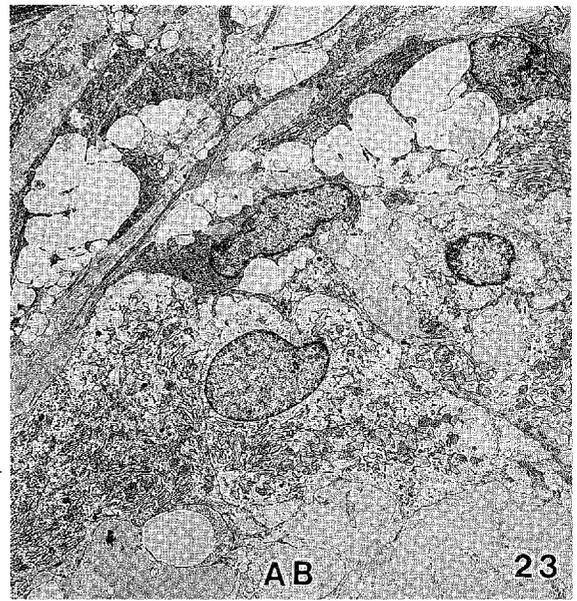
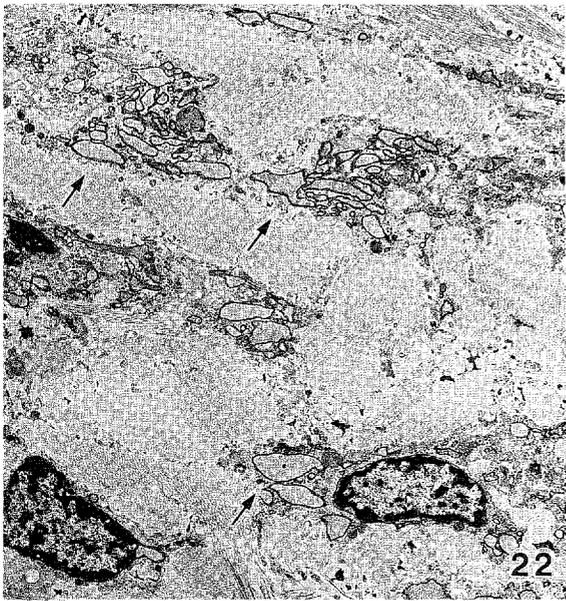


図 24: 各種濃度の PGE₂ 投与開始 12 時間後の破骨細胞数の変動

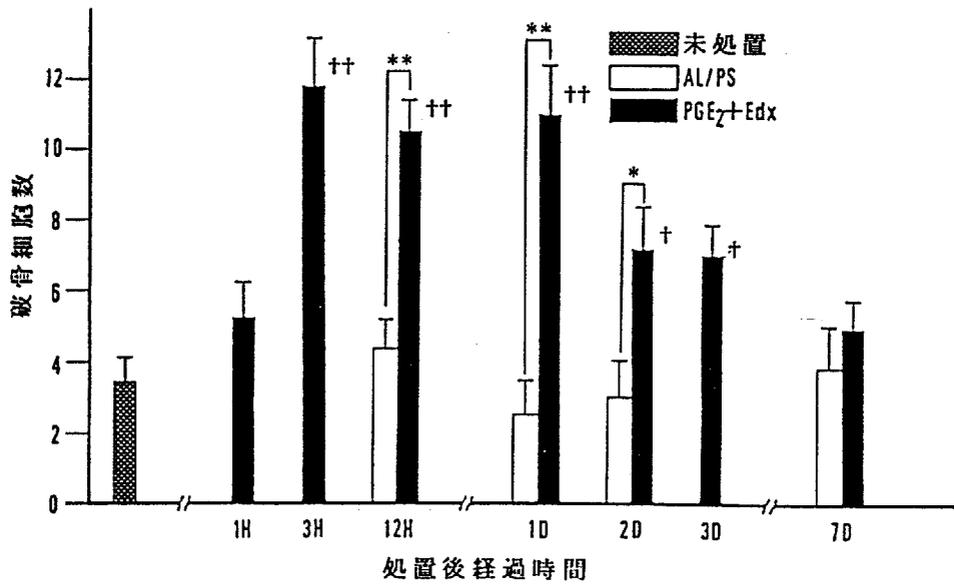
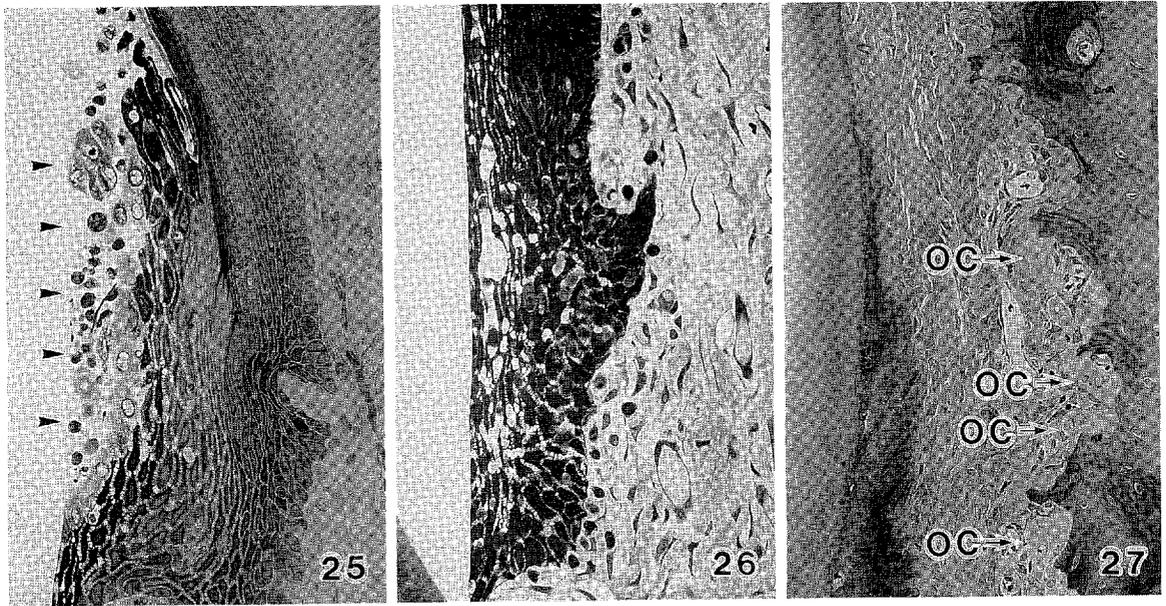


図28: PGE₂・Edx連続投与 (PGE₂+Edx投与群) 後の破骨細胞数の経時的変化

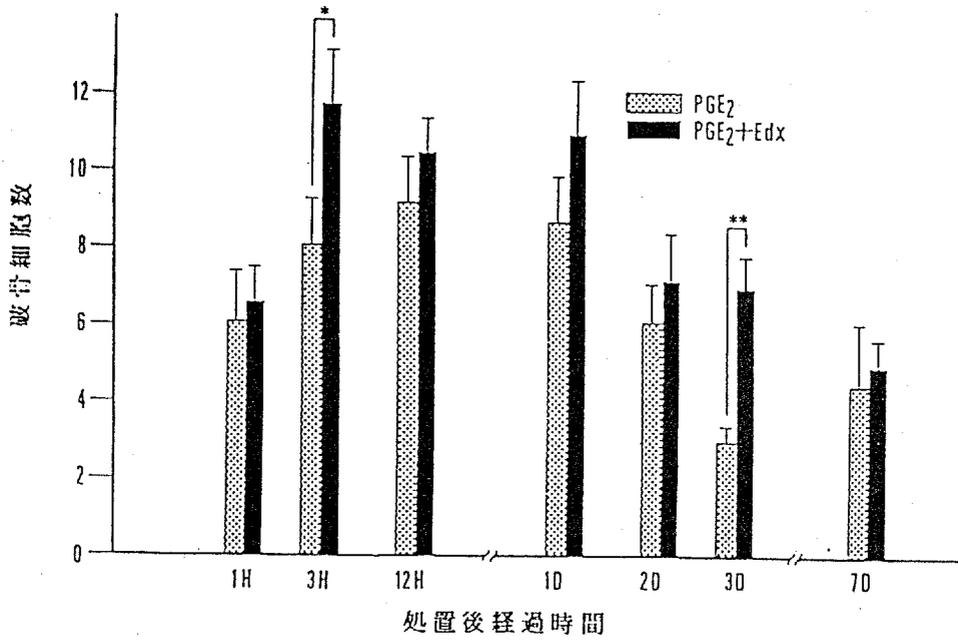


図29: PGE₂単独投与 (PGE₂投与群) および PGE₂・Edx連続投与 (PGE₂+Edx投与群) 後の破骨細胞数の経時的変化

