

学 位 論 文 題 名

Effects of indomethacin on osteoclastic bone
resorption during extraction wound healing in rats

ラット抜歯創治癒過程における破骨細胞性骨吸収に
およぼすインドメサシンの影響について

学位論文内容の要旨

緒 言

破骨細胞は骨の吸収に際し重要な役割を演じており、その誘導や分化には種々の制御因子が関与している。プロスタグランディンはこれらの因子の一つで、局所における破骨細胞性骨吸収に関する主要な促進因子と考えられている。インドメサシンは非ステロイド系の抗炎症剤の一つであり、プロスタグランディンの生合成を阻害する作用を有し、骨の吸収を抑制するものと考えられている。しかしながら、インドメサシンが破骨細胞の構造や機能におよぼす基本的な影響については、ほとんど報告が無く未だ不明な点が少なくない。一方、破骨細胞性骨吸収の検索に際しては、多数の破骨細胞を観察する必要があるが、ラット臼歯抜歯創においては、その治癒過程の比較的初期より多数の破骨細胞が出現し、活発に骨を吸収することが知られており、破骨細胞性骨吸収を検索する場として適当な実験モデルと考えられる。

そこで著者は、破骨細胞性骨吸収におよぼすインドメサシンの基本的な影響を明らかにする目的で、治癒過程の比較的初期より多数の破骨細胞による活発な骨吸収のみられるラット臼歯抜歯創治癒過程に着目し、インドメサシン投与ラットの抜歯創治癒過程における根間中隔の吸収部を中心に病理組織学的、組織計量学的ならびに電顕的に検索した。

材料と方法

1. 実験動物

実験にはウィスター系雄性ラット、体重約130g、116匹を用い、対照群とインドメサシン投与群（以下IM投与群と略す）の2群に分け、左側上顎第一臼歯を抜去した。IM投与群においては、インドメサシン初回

投与6時間後に抜歯した。IM投与群にはインドメサシンを、1%メチルセルロースに溶解し、体重1Kgあたり5mgを腹腔内に12時間おきに屠殺時まで投与した。抜歯後、1~28日まで経時的に屠殺し、抜歯創を含む上顎骨を摘出した。

2.組織学的検索

摘出した上顎骨は10%中性ホルマリンにて固定、10%EDTAにて脱灰後、通法に従いパラフィンに包埋し、4 μ mの連続切片を作成した。標本には、HE染色、アザン・マロリー染色、酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP) などを施し、抜歯創を中心に病理組織学的、組織化学的に検索した。

3.組織計量学的検索

組織学的変化をより客観的に把握するため、抜歯創の根間中隔の骨量、および破骨細胞数の変化について組織計量学的に検索した。破骨細胞およびその前駆細胞の同定にはTRAP染色標本を用い計測した。

4.電顕的検索

電顕的検索には抜歯後1、3、5日の試料を用い、2.5%グルタルアルデヒド-4%パラホルムアルデヒド混合液にて12時間前固定、1%四酸化オスミウムにて2時間後固定した後、未脱灰のまま通法に従いEpon812に包埋し、超薄切片を作成した。超薄切片には酢酸ウラニル・クエン酸鉛染色、リタングステン酸染色などを施し、根間中隔骨表面に密着している破骨細胞を電顕的に検索するとともに、電顕計量学的に細胞全体、核、細胞質、ruffled border、およびclear zoneの面積を計測した。

結果および考察

1.組織学および組織計量学的検索

IM投与群では、体重の増加は対照群に比べ少ないものの経時的に増加する傾向を示し、IM投与による全身的な影響は軽度であると思われた。

病理組織学的に、IM投与群では、対照群に比べ全般に抜歯創治癒過程の遅延が認められた。IM投与群では、抜歯創の比較的初期にみられる根間中隔の骨吸収の障害がみられた。すなわち、破骨細胞の数は対照群に比し有意に少なく、僅かにみられた破骨細胞は対照群に比べ小型のものが多く、細胞膜も不明瞭であった。

また、IM投与群では、抜歯窩内の肉芽組織の形成は不良で、抜歯窩内および抜歯窩外側の骨新生の遅延が認められたが、経時的に新生骨の増加がみられ、抜歯後28日では抜歯窩は新生骨で充たされていた。組織計量学的には、IM投与群では、根間中隔の骨吸収率は対照群に比べ有意に低い値を示した。また、TRAP陽性細胞数も対照群に比べ有意に減少していた。

このような所見は、IM投与による抜歯創の治癒過程の遅延には、抜歯創の治癒過程の比較的初期にみられる根間中隔の骨吸収の障害が大きな要因となること、および、骨吸収の障害は破骨細胞の数の減少に基づく

ことを示唆するものと思われた。また、このような破骨細胞の数の減少は、IM投与により破骨細胞の誘導や分化の過程に障害が生じていることを示唆するものと思われた。

2. 電顕的検索

IM投与群では、破骨細胞は対照群に比べ全般に小型で、細胞質内には少数のミトコンドリアやリボゾームなどがみられるにすぎず、細胞内小器官の発達不良であった。IM投与群の破骨細胞では、ruffled borderの発達は不良で、その突起は全般に太く、短く、数も少ない傾向を示していた。さらに、ruffled border直下の骨質の粗鬆化と骨結晶の遊離の傾向は対照群に比べ減少していた。また、IM投与群では、比較的良く発達したruffled borderを有する破骨細胞においては、その突起間や、細胞質内の一部に密集した結晶物が認められたが、リタングステン酸染色標本では、結晶物の脱灰、消失した後に、ruffled borderの突起間および細胞質内の一部に、対照群では観察されないリタングステン酸に染色性を示す物質が集塊状に認められた。また、電顕計量学的には、IM投与群では、破骨細胞の細胞質の大きさおよびruffled borderの占める領域の広さは対照群に比べ小さい値を示していた。

このような所見は、IM投与群の破骨細胞においては、骨吸収機能の障害が生じていること、すなわち、骨の無機質および有機質の分解過程に関与している酵素などの、合成あるいは分泌障害が生じていることを示唆するものと思われた。また、このような骨吸収機能の障害は、破骨細胞の細胞小器官やruffled borderなどの構造的変化に基づくものと思われた。

結 語

破骨細胞性骨吸収におよぼすインドメサシンの影響を明らかにする目的で、インドメサシン投与ラットの抜歯創治癒過程における根間中隔の骨吸収部を中心に病理組織学的、組織計量学的ならびに電顕的に検索したところ以下の結果が得られた。

- 1、インドメサシン投与により抜歯創の治癒過程の遅延が認められた。
- 2、インドメサシン投与により、根間中隔の骨吸収の障害が明らかになったが、このような変化は破骨細胞の数の減少、および個々の破骨細胞の微細構造的変化に基づく、骨吸収機能の障害によるものと思われた。
- 3、このような変化には、インドメサシンによるプロスタグランディンの合成障害に関与しているものと思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 雨 宮 璋
副 査 教 授 脇 田 稔
副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Effects of indomethacin on osteoclastic bone
resorption during extraction wound healing in rats

ラット抜歯創治癒過程における破骨細胞性骨吸収に
およぼすインドメサシンの影響について

破骨細胞は骨の吸収に際し重要な役割を演じており、その誘導や分化には種々の制御因子が関与している。プロスタグランディンはこれらの因子の一つで、局所における破骨細胞性骨吸収に関する主要な促進因子と考えられている。インドメサシンは非ステロイド系の抗炎症剤の一つであり、プロスタグランディンの生合成を阻害する作用を有し、骨の吸収を抑制するものと考えられているが、インドメサシンが破骨細胞の構造や機能におよぼす基本的な影響については、ほとんど報告が無く未だ不明な点が少なくない。本論文提出者は、破骨細胞性骨吸収におよぼすインドメサシンの基本的な影響を明らかにする目的で、治癒過程の比較的初期より多数の破骨細胞による活発な骨吸収のみられるラット臼歯抜歯創治癒過程に着目し、インドメサシン投与ラットの抜歯創治癒過程における中隔歯槽骨の骨吸収部を中心に形態学的に検索した。

実験にはWistar系雄性ラット(体重約100g)を用い、これを対照群とインドメサシン投与群(以下IM投与群と略す)の2群に分け、左側上顎第1臼歯を抜去した。IM投与群においては、インドメサシン初回投

与6時間後に抜歯した。インドメサシンは、1%メチルセルロースに溶解し、体重1kgあたり5mgを腹腔内に12時間おきに屠殺時まで投与した。抜歯後、経時的に屠殺し、抜歯創を含む上顎骨を摘出し、中隔歯槽骨を中心に病理組織学的、組織化学的、組織計量学的ならびに電顕的に検索した。

IM投与群では、全身的な影響は軽度であったが、病理組織学的に、対照群に比べ抜歯創治癒過程の遅延が認められた。とくに、IM投与群では、中隔歯槽骨部にみられた破骨細胞の数は対照群に比し有意に少なく、抜歯創の治癒過程の比較的初期にみられる中隔歯槽骨の骨吸収の障害が認められた。また、IM投与群では、抜歯窩内の肉芽組織の形成は不良で、抜歯窩内および抜歯窩外側の骨新生の遅延が認められた。経時的に新生骨の増加がみられ、抜歯後28日では抜歯窩は新生骨で充たされていたが骨量は少なかった。このような所見より、IM投与による抜歯創の治癒過程の遅延には、抜歯創の治癒過程の比較的初期にみられる中隔歯槽骨の骨吸収の障害が大きな要因となること、および、中隔歯槽骨の骨吸収の障害は破骨細胞の数の減少に基づくものと考察している。さらに組織計量学的検索により、IM投与群では、中隔歯槽骨の骨吸収率は対照群に比べ有意に低く、中隔歯槽骨部にみられたTRAP陽性細胞数も対照群に比べ有意に減少しており、IM投与により破骨細胞の誘導や分化の過程に障害が生じていることが示唆された。

電顕的には、IM投与群では、破骨細胞は対照群に比べ全般に小型で、細胞小器官の発達は不良であった。IM投与群の破骨細胞では、ruffled borderの発達は不良で、その突起は全般に太く、短く、数も少ない傾向を示しており、ruffled border直下の骨質の粗鬆化と骨結晶の遊離の傾向は対照群に比べ減少していた。また、IM投与群では、比較的良く発達したruffled borderを有する破骨細胞においても、その突起間や、細胞質内の一部に密集した結晶物が認められたが、リンタングステン酸染色標本では、結晶物が脱灰、消失した後に、ruffled borderの突起間および細胞質内の一部に、対照群では観察されないリンタングス

テン酸に染色性を示す物質が集塊状に認められた。

このような所見より、IM投与群の破骨細胞においては、骨吸収機能の障害が生じていること、すなわち、骨の無機質および有機質の分解過程に関与している酵素などの合成あるいは分泌障害が生じていること、また、このような骨吸収機能の障害は破骨細胞の細胞小器官や ruffled border などの構造的変化に基づくものと考察している。以上のような観察所見より、インドメサシン投与による抜歯創の治癒過程の遅延には、抜歯創の治癒過程の比較的初期にみられる中隔歯槽骨の骨吸収の障害が大きな要因となること、およびこのような骨吸収の障害は、破骨細胞の数の減少および個々の破骨細胞の微細構造的変化に基づく骨吸収機能の障害によるものと結論しており、さらにこのような変化には、インドメサシンによるプロスタグランディンの合成障害が関与しているものと考察している。

論文の審査は、審査員全員により口頭で行われた。論文提出者による要旨の説明の後、論文の内容および関連事項について質問がなされたが、いずれの質問にも明快な回答が得られた。

本研究は破骨細胞性骨吸収に及ぼすインドメサシンの基本的な影響について、組織学的、組織計量学的検索に加えて微細構造的および電顕計量学的な手法を駆使して詳細に検討し、抜歯創における骨吸収の障害を明らかにし、このような障害が破骨細胞の数の減少および個々の破骨細胞の微細構造的変化に基づく、骨吸収機能の障害によることを明らかにした点が評価された。また本研究は破骨細胞の構造と機能について、その制御因子との関連性のもとに検索しており、その成果は今後の研究にも重要な示唆を与えるものと思われた。

以上のように本研究の業績は、単に口腔病理学の分野のみならず、関連領域にも寄与するところ大であり、博士（歯学）の学位を授与するに価するものと認められた。