

原 著

ラット歯髓組織における実験的外傷の 治癒過程に関する病理学的研究

竹 下 信 義 鈴 木 鍾 美

岩手医科大学歯学部口腔病理学講座*

〔受付：1979年5月11日〕

抄録：著者らは wister 系ラットの下顎切歯歯髓に実験的外傷を加え、歯髓の自然治癒過程を病理形態学的に観察した。

実験的外傷後1～4日目では創傷下に大型多角形歯髓細胞（LPPC）が著明に出現し、LPPC層を形成した。外傷後7日目では、LPPC間にも密な線維基質がみられ、この中にLPPCを埋入した。14日目以後ではこの線維基質は不規則に石灰化し、LPPC層は形態的に骨様象牙質となった。一方、LPPCは石灰化の進行とともに変性壊死に陥った。またLPPCは電顕的に20～30μの大きさを有し、胞体内には発達した粗面小胞体とゴルジ装置が存在し、蛋白性分泌物の形成にあずかる機能を有するものであることを示唆していた。このようにLPPCは骨様象牙質形成細胞と考えられるとともに、形態的には骨芽細胞に類似していた。以上、LPPCは歯髓固有細胞に由来するものであり、また歯髓の自然治癒過程に重要な役割を演ずるものと考えられた。

緒 言

歯髓組織はウ蝕（細菌的）、化学的または物理的（温熱または機械的）刺激などによって種々の程度で障害を受ける。このような侵襲に対して歯髓は第2象牙質を形成し生体防御することはよく知られている。また生活歯髓切断という外科的傷害後、水酸化カルシウムなどの薬剤で歯髓を覆罩すると象牙質底蓋が形成されることは数々の報告で示されている^{1)~8)}。そしてこの象牙質底蓋形成に関しては、その形成機構やこれに関与する細胞の形態、由来などがほぼ明らかにされている。

しかし歯髓切断などによる傷害後の歯髓の自然治癒能力に関する報告^{9)~11)}は少ない。しかも

これらの報告は歯髓の自然治癒過程とこれに関与する歯髓細胞について必ずしも充分な解明がなされていない。そこで著者らは歯髓組織の自然治癒過程を探究する目的で、ラット歯髓組織を実験的に外傷害した後の自然治癒過程について病理形態学的に検討した。

実験材料と実験方法

1. 実験材料

体重 200 g ～ 250 g の wister 系成熟雄ラットを使用し、下顎切歯を実験歯とした。

2. 実験方法

(1) 実験的外傷の作製法

thiopental sodiumの腹腔内注射によって全身麻酔を行い、施術野をヨードチンキと70%ア

Pathological study on healing process of experimental trauma in the dental pulp of rats

Nobuyoshi TAKESHITA and Atsumi SUZUKI

(Department of Oral Pathology, Iwate Medical University School of Dentistry, Morioka 020)

*岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 4 : 70-78, 1979

ルコールで清掃, 消毒した。次に下顎切歯の唇側歯肉を歯頸部より約 3 mm 切開, 剥離して歯槽骨を露出した。露出部歯槽骨を歯科用ラウンドバー (000/1) で穿通し, さらに歯牙硬組織をも穿通して露髄させた。そしてさらに歯科用ラウンドバー (0/1) を歯髄内部まで挿入穿通させ, 歯髄に対して機械的外傷を加えた。その後, 滅菌蒸留水で穿通内部, 歯髄創面を十分に洗滌し, 滅菌ペーパーポイントで乾燥した。止血を確認した後, 穿通部を骨蠟で閉鎖し, 剥離した歯肉を縫合した。

(2) 観察期間および実験動物数

観察期間は実験的外傷作製後 1, 4, 7, 14 日目および 21 日目とし, 各期間ともラットを 8 匹づつ使用した。なお, 各期間とも 8 匹中 5 匹を光顕的, 3 匹を電顕的観察に用いた。なお, 観察期間において実験歯髄に感染など認められたものは実験群より除いた。

(3) 標本作製方法

動物は thiopental sodium を腹腔内に注射し屠殺した。屠殺後, 光顕用標本は摘出した下顎骨を 10% 中性ホルマリンで固定, 5% 硝酸アルコール脱灰液で脱灰し, 通法によりパラフィン包埋した。染色はヘマトキシリン・エオジン染色, マッソン三重染色, ワンギーソン染色および鍍銀染色 (渡辺法) を行った。

電顕用標本は下顎骨より実験歯を摘出し, 2.5% グルタルアルデヒドリン酸緩衝液で約 6 時間, 冷蔵庫内で浸漬した。ついで 10% L.D.T.A で脱灰し, 1% オスミック酸液で約 2 時間固定した。通法により脱水後, QY-1 で置換し, エポン 812 に包埋した。試料は厚切り切片を作製し, 0.5% トルイジン青加温染色を行い, 観察部位を確認した後トリミングした。次に硝子ナイフを使用して超薄切片を作製した。切片は酢酸ウラニールおよびクエン酸鉛で染色し, 日立 HU-11A 型電子顕微鏡で観察, 撮影した。

実 験 成 績

1. 光学顕微鏡の所見

第 1 日目: 歯髄創傷面直下より下層におい

て, 出血, うっ血, 軽度に拡張した血管とリンパ球を主体とする軽度のビマン性細胞浸潤などがみられた。また血管周囲に少数の大型多角形歯髄細胞 (large polygonal pulp cell, 以下 LPPC と略) が認められた (図 1)。

第 4 日目: 歯髄創傷面直下には比較的広範に多数の LPPC の増殖がおこり, 層 (LPPC 層) を形成していた。この細胞層下の歯髄組織には血液を充盈して拡張した血管がみられ, これに接して卵円形ないし紡錘形の歯髄細胞が粗に配列していた (図 2)。LPPC は円形ないし卵円形の核を有し, 外形は不正な多角形で大きさも種々であった。 (図 3)。また LPPC 間にはワンギーソン染色で淡紅色に染まる線維が粗に配列していたが, 好銀線維は非常に密に錯走していた (図 4)。

第 7 日目: LPPC 間にはワンギーソン染色で淡紅色に染まり, マッソン三重染色で緑青色に染まる線維がち密に錯走するようになり, この中に LPPC や血管を埋入していた (図 5)。

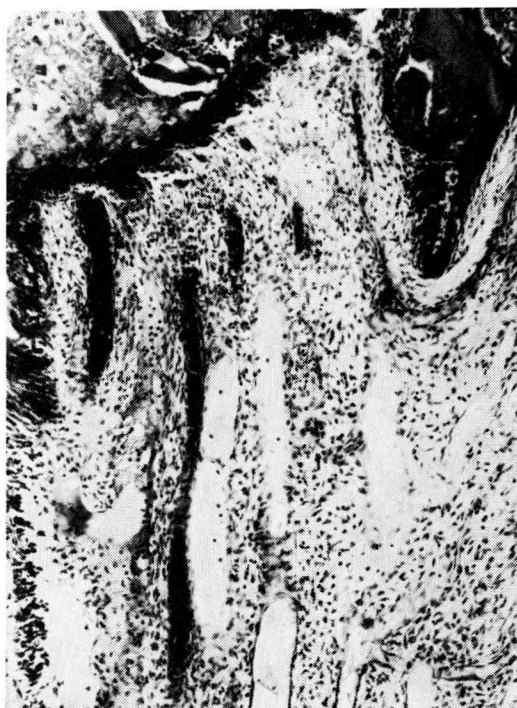


図 1 外傷後 1 日目, 創傷下には出血, 血液充盈と拡張した血管そして炎症性細胞浸潤がみられる。×100ヘマトキシリン・エオジン染色

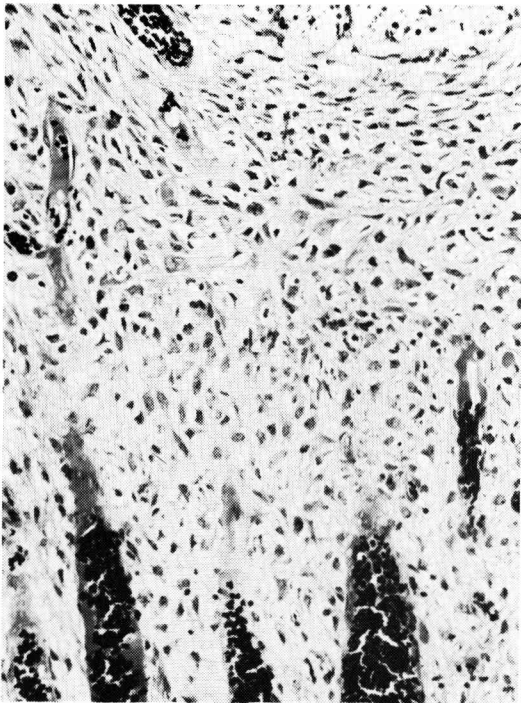


図2 外傷後4日目、創傷下には多数のLPPCが存在し、LPPC層を形成している。×100
ヘマトキシリン・エオジン染色

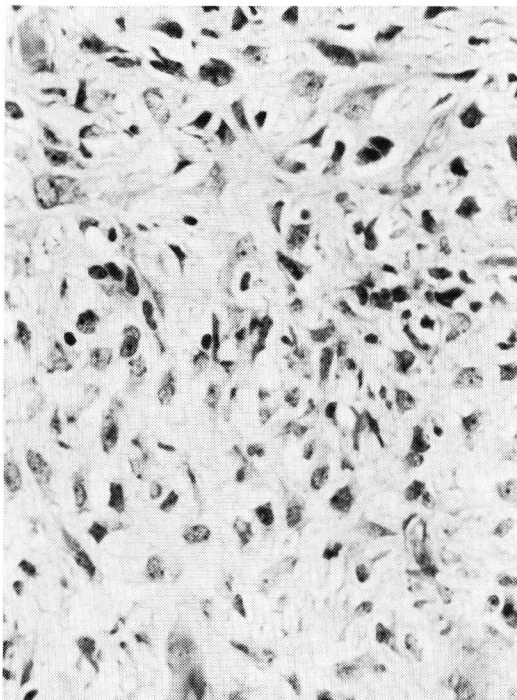


図3 LPPCの強拡大像。外形は不正な多角形で大きさも種々である。×400 ヘマトキシリン・エオジン染色

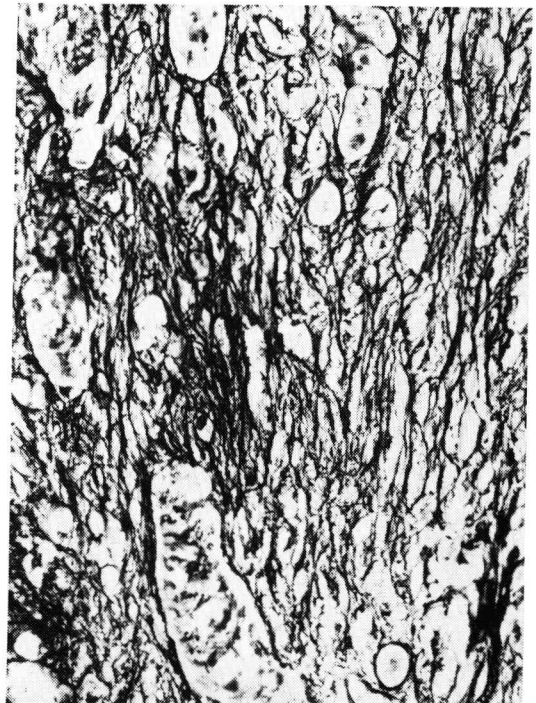


図4 LPPC間に好銀線維がち密に錯走する。
×200 鍍銀染色(渡辺法)



図5 外傷後7日目、LPPC間には緑青色に染まる線維がち密に存在し、LPPC層は直下の歯髄(Pu)とは明らかに区別される。
×100 マッソン三重染色

LPPC層はこのような密な線維の存在により、直下の歯髓組織とは明らかに区別された。

第14日目：LPPC間に存在する線維基質は不規則に石灰化し、形態的には骨様象牙質となっていた。またほとんどのLPPCは変性、壊死に陥り、埋入小窩は空胞化し、一部には萎縮したLPPCを入れていた。またこのような骨様象牙質に接して円形ないし卵円形の歯髓細胞の著明な増殖がみられた（図6，7）。

第21日目：歯髓は厚い不規則に石灰化した骨様象牙質によって底蓋されていた。そしてLPPC埋入小窩はほとんどが空胞状となっていた。また骨様象牙質下には、無構造な象牙質様硬組織が認められた（図8）。

2. 大型多角形歯髓細胞（LPPC）の電子顕微鏡的所見

LPPCは直径20～30 μ の大きな胞体で大小の細胞質突起を持ち、不規則な外形を呈し、やや不正な円形ないし楕円形の核が胞体内に偏在し



図6 外傷後14日目、線維基質は不規則に石灰化し、LPPC層は形態的に骨様象牙質(OsD)となっている。×100 ヘマトキシリン・エオジン染色



図7 骨様象牙質強拡大像、埋入したLPPCは変性、壊死に陥り、骨様象牙質に接する歯髓細胞は円形または卵円形を示す。×400 ヘマトキシリン・エオジン染色

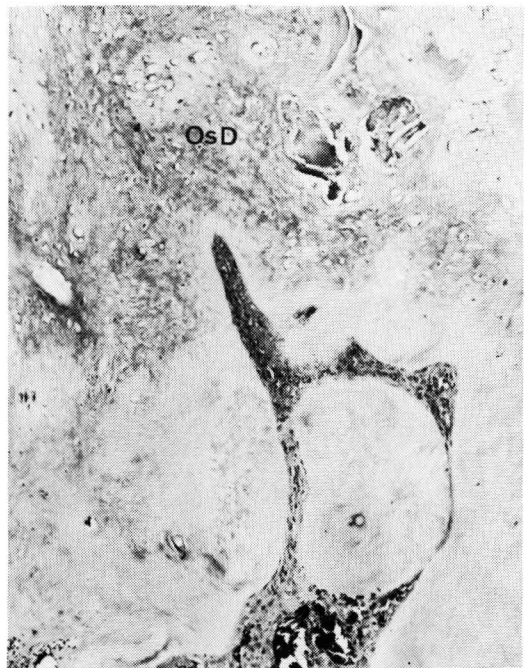


図8 外傷後21日目、厚い骨様象牙質が形成されLPPC埋入小窩はほとんど空胞化している。また骨様象牙質下には無構造象牙質様硬組織がみられる。×40 ヘマトキシリン・エオジン染色

ていた。核の辺縁では核質が不規則、密に分布し、通常明瞭な核小体が1個認められた。胞体内には非常に多くの粗面小胞体が存在し、しばしば不規則、著明な拡張をみた。また発達したゴルジ装置や円形または卵円形のミトコンドリアが散在し、多数の細線維や少数の dense body など存在していた(図9, 10)。なおLPPCの胞体周囲にはやや密に膠原細線維が錯走していた。

LPPC胞体周囲に膠原細線維あるいは膠原細線維束がち密にみられる外傷後第7日目頃になると、LPPC胞体内にはよく発達した長桿状の粗面小胞体が著明にみられた。またよく発達した多くのゴルジ装置や円形、桿状の中等度量のミトコンドリアなども散在していた(図11)。

考 察

1. 創傷歯髓組織の自然治癒について

犬の歯髓を露髄した後、無菌的に放置することによって osteoid-like tissue が形成され⁹⁾, 人歯のう蝕によって露髄した部位では osteoblast-like cells によって calcified scar tissue が形成された¹⁰⁾。ラット切歯は無根歯で絶えず歯牙形成を続けることから、ラット切歯歯髓細胞が高い硬組織形成能を有することは十分に考えられた。しかし、ラット切歯歯髓は水酸化カルシウムなどに対する治癒過程が人、犬などとはほぼ同様である¹²⁾ことから著者らもラット切歯を実験歯とした。そして、著者らもラット切歯の外傷による歯髓創傷面直下に骨様象牙質が形

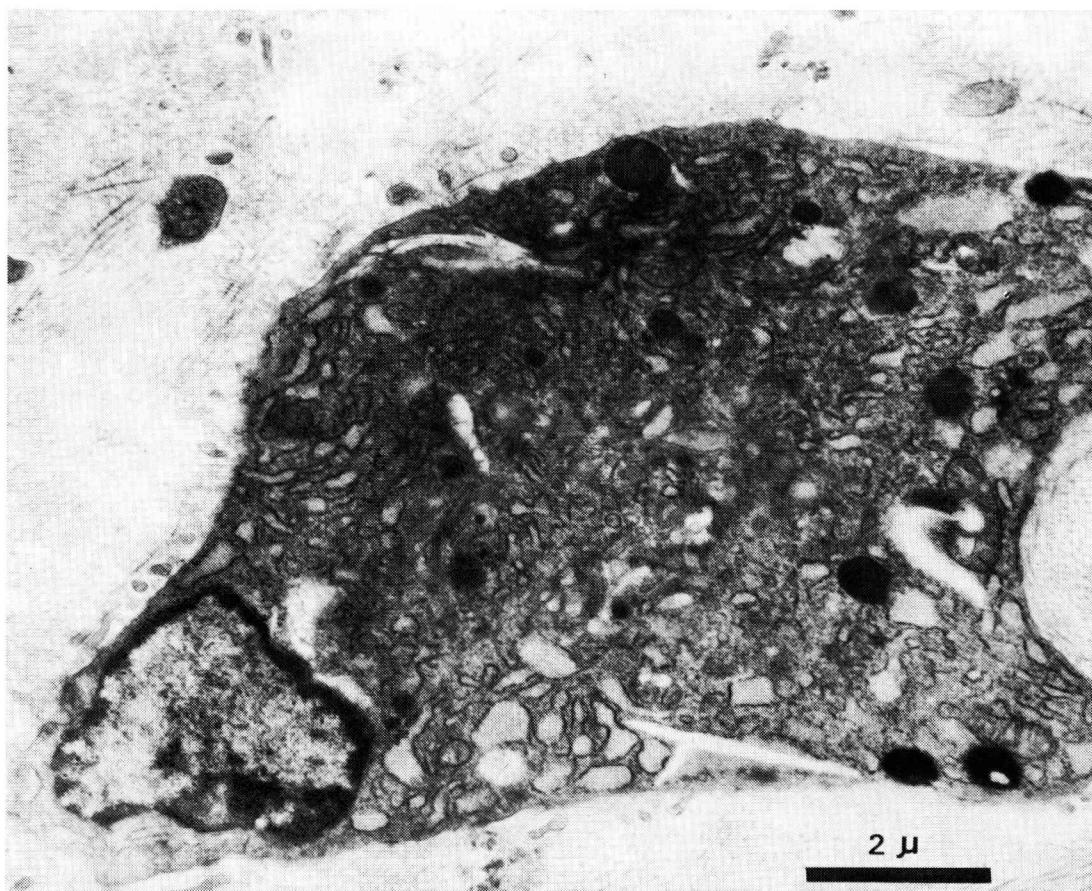


図9 LPPCの電顕像, LPPC胞体は多角形であり, また細胞内小器官が豊富で周囲にやや密な膠原細線維が存在する。

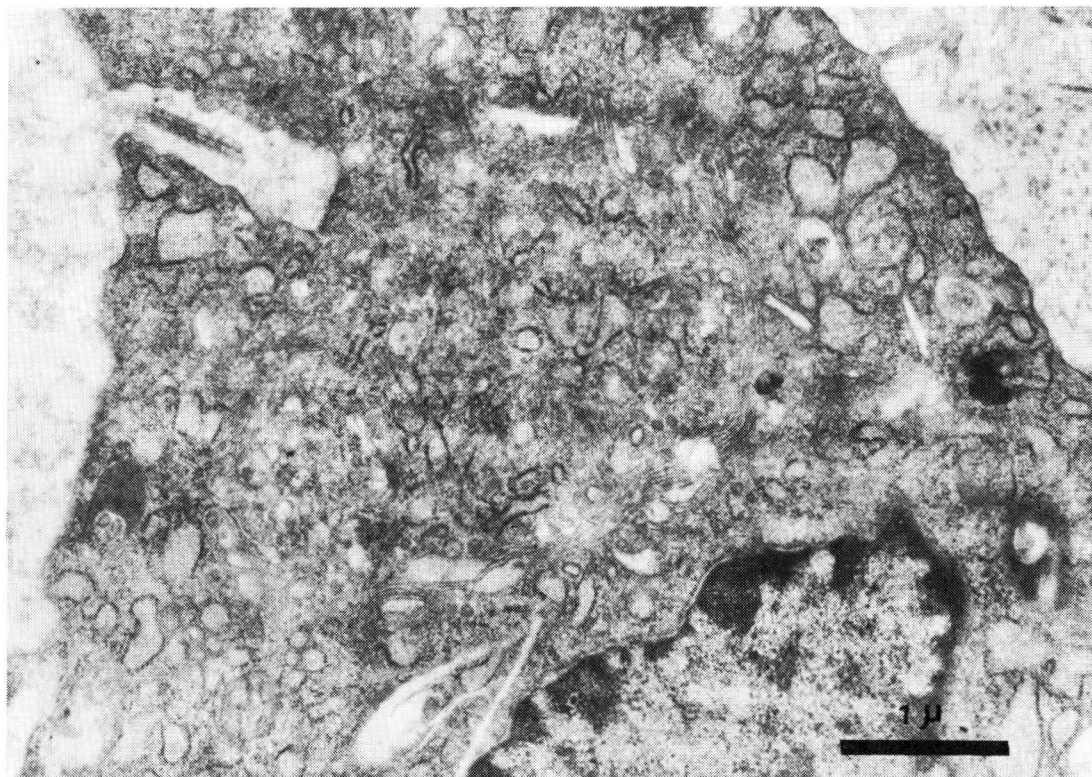


図10 LPPCの電顕像，胞体内には特に粗面小胞体とゴルジ装置の発達が著明である。

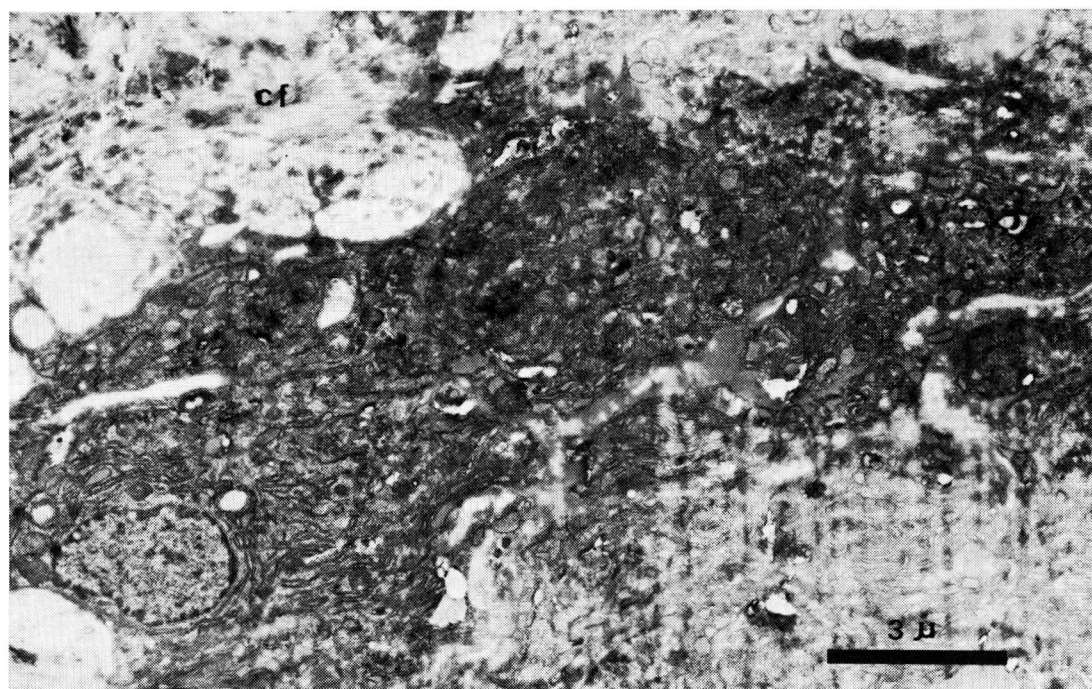


図11 LPPCの電顕像，LPPC周囲には膠原線維基質（cf）がち密に存在する。LPPC胞体内にはよく発達した長桿状の粗面小胞体が豊富である。

成されることを確認した。この骨様象牙質は不規則に石灰化した膠原線維基質とLPPCから成り、前述の osteoid-like tissue⁹⁾, calcified scar tissue¹⁰⁾ とほぼ同様の組織的構造を呈していた。このような歯髄創傷面直下における骨様象牙質底蓋の形成は歯髄の自然治癒的反応とみなすことができた。そしてLPPCの著明な出現と増殖によって骨様象牙質の形成が始まることから、LPPCは創傷歯髄の自然治癒に重要な役割を演じていると考えられた。

歯髄創傷面下の骨様象牙質の形成はLPPCの出現によって始まり、それらを埋入する膠原線維基質の形成とこの線維基質の不規則な石灰化によって終了した。このような骨様象牙質の形成過程は形態的に結合組織性骨化¹³⁾ないし膜内骨化¹⁴⁾に類似するものであった。しかし骨様象牙質の形成においては、その石灰化の進行とともに基質に埋入したLPPCが変性、壊死に陥ることが骨形成における組織学的形成機構と異っていた。このことは、骨様象牙質が骨組織と異なり、Haversian canalのような整形的組織構築性に欠けるためと考えられた。また、Obersztryn¹²⁾、枝¹⁾、市川⁷⁾らは生活歯髄切断後、水酸化カルシウムを応用した場合でも骨様象牙質のみの底蓋形成が認められたと述べている。このような事実から創傷歯髄の自然治癒過程においてみられる骨様象牙質の形成はその治癒形態における特異的な組織反応でないと考えられた。また著者らの実験群において象牙質底蓋の形成が全く認められなかったことを考え合わせると、象牙質底蓋と骨様象牙質底蓋の形成機構について今後さらにその本質性を追求しなければならないと考えた。

2. 大型多角形歯髄細胞 (LPPC) について

電顕的にLPPCは不正な多角形を示す20~30 μ の大きな細胞であり、胞体内にはよく発達した豊富な粗面小胞体、ゴルジ装置、中等度量のミトコンドリアの散在、および多数の細線維などがみられた。そしてLPPCの周囲にはち密に錯走する膠原線維または膠原細線維束が存在していた。このようにLPPCは粗面小胞体とゴ

ルジ装置の著明な発達によって特徴づけられ、活発な蛋白性分泌物の形成を示唆していた。著者らはこのような特徴を持つLPPCは明らかに骨様象牙質形成の主体をなす細胞であると考えた。

このようなLPPCの電顕的形態的特徴は活性の高い線維芽細胞^{15)・18)}や骨形成時の骨芽細胞^{19)・22)}と類似していた。また田熊ら^{23)・25)}はラット胎児あるいは幼若ラットの切歯先端に認められる骨様象牙質形成細胞が基質形成のみならず石灰化にも関与することを指摘している。このことから、LPPCが骨様象牙質基質の石灰化の機構に関与する細胞であるということは十分に推測された。したがって著者らが示したLPPCは機能的および形態的に骨芽細胞にきわめて類似する細胞であると考えられた。生活歯髄切断後、水酸化カルシウムを応用することによって出現する新生象牙芽細胞は歯髄固有細胞に由来するものといわれている^{17)・31)・77)・81)}。また市川⁷⁾、陳⁸⁾、山村²⁶⁾らは歯髄切断という侵襲によって歯髄固有細胞は脱分化し、多潜能性の未分化間葉細胞となり、これが再び象牙芽細胞などに分化すると述べている。著者らは新生象牙芽細胞と同様にLPPCも歯髄固有細胞に由来すると考えた。

ま と め

著者らは歯髄の自然治癒過程を検索する目的で、wister系ラットの下顎切歯歯髄に実験的外傷を加え、歯髄創傷部の治癒過程およびこれに関与する歯髄細胞について、病理形態学的に観察し以下の成績を得た。

1. 実験的外傷後1~4日で創傷面直下に大型多角形歯髄細胞(LPPC)が著明に出現し、これらによって骨様象牙質底蓋の形成が行われた。
2. 骨様象牙質形成の過程でその石灰化の進行とともにLPPCが変性、壊死に陥った。
3. LPPCは大型の細胞で、胞体内に発達した粗面小胞体とゴルジ装置が存在し、蛋白性分泌物の形成にあずかる細胞を示唆していた。

4. LPPCは歯髓の自然治癒過程に重要な役割を演じ、形態的には骨芽細胞に類似していた。
5. LPPCは歯髓固有細胞に由来すると考えら

れた。

本論文の要旨は、第20回歯科基礎医学会総会(昭和53年9月)一岐阜一において発表した。

Abstract : The purpose of this investigation was to study the natural healing process of pulp in the lower incisor of rats after experimental amputation.

Large polygonal pulp cells (LPPC) were more noticeable just under the wound from the 4th to the 7th post operative day. Observation through the electron microscope showed the LPPC contained a number of rough-ER and Golgi complex, and the LPPC were morphologically similar to the osteoblast. An extensive network of argyrophil fibers in the space between the LPPC was noticed on the 4th day and irregularly arranged collagen fibers on the 7th day. By the 14th day the area of the LPPC has developed into osteodentin followed the irregular calcification of the fibrous matrix. By the 21st day, a dentin like structure without dentinal tubules was deposited under the osteodentin. Spindle shaped cells were arranged under the dentin like structure. Degeneration and/or necrosis of the LPPC appeared as calcification in the fibrous matrix progressed. The formation of the osteodentin might represent the protective reaction of the injured pulp. These results expressed that the LPPC were the osteodentin-forming cells in the process of the natural healing of the injured pulp, and these derived from incisal pulp cells.

文 献

- 1) 枝 重夫 : 歯髓内における実験的硬組織形成に関する組織化学的研究, 歯科学報, 61 : 339-382, 1961.
- 2) 桑名泰彦 : 実験的象牙質形成の組織化学的研究, 歯科学報, 66 : 87-112, 1966.
- 3) Harrop, T. J. and Mackay, B. : Electron microscopic observations on healing in dental pulp in the rat. Archs. oral Biol. 13 : 365-385, 1968.
- 4) 西村 弘 : 生活歯髓処置における歯髓の生物学的態度に関する実験的研究, 歯科医学, 33 : 783-798, 1970.
- 5) 大野彰彦 : 象牙質形成に関する実験的研究, 九州歯会誌, 27 : 720-739, 1974.
- 6) 小林 正 : 生物学的歯髓保存に関する研究 とくに薬剤からみた歯髓の態度についての実験的研究, 歯科医学, 38 : 599-614, 1975.
- 7) 市川 徹 : 犬における生活歯髓切断後のDentin Bridge形成に関する光顕的ならびに電顕的研究, 歯科学報, 76 : 391-439, 1976.
- 8) 陳 肇華 : 生活歯髓切断後, 歯髓の創傷治癒に関する実験的研究 特に ^3H -thymidine autoradiography による検索, 歯科学報, 78 : 287-309, 1978.
- 9) Kreshover, S. J. and Bevelander, G. : Histopathology of the dental pulp of dogs following exposure. J. dent Res. 27 : 467-479, 1948.
- 10) Frank, R. S. : The healing powers of the dental pulp. Oral Surg. 12 : 1249-1256, 1959.
- 11) Kakehashi, S., Stanley, H. R. and Fitzgerald, R. J. : The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surg. 20 : 340-349, 1965.
- 12) Obersztyn, A. : Healing of Pin-point Exposure of Rat Incisor Pulp under Various Capping Agents. J. dent. Res. 45 : 1130-1143 1966.
- 13) 山本敏行 : 基準組織学, 南江堂, 東京, 62-63 1971.
- 14) 藤田尚男, 藤田恒夫 : 標準組織学, 医学書院, 東京, 127, 1978.
- 15) Han, S. S., Avery, J. K. and Hale, L. E. : The fine structure of differentiating fibroblasts in the incisor pulp of the guinea pig. Anat. Rec. 153 : 187-210, 1965.
- 16) Griffin, C. J. and Harris, R. : Ultrastructure of collagen fibrils and fibroblasts of the developing human dental pulp. Archs. oral Biol. 11 : 659-666, 1966.
- 17) 翁 玉香 : ヒトの歯髓の電子顕微鏡的研究, 久留米医学会誌, 30 : 331-353, 1967.
- 18) Beertsen, W., Everts, V. and van den Hooff, A. : Fine structure of fibroblasts in the periodontal ligament of the rat incisor and their possible role in tooth eruption. Archs. oral Biol. 19 : 1087-1098, 1974.

- 19) Scott, B. L. and Glimcher, M. J. : Distribution of Glycogen in Osteoblasts of the Fetal Rat. *J. Utra. Res.* 36 : 565-586, 1971.
- 20) 倉橋和啓 : 骨の細胞の微細構造, *細胞*, 4 : 25-36, 1972.
- 21) 小沢英浩 : 石灰化における細胞の役割—その微細構造的展望—, *歯界展望*, 39 : 801-810, 1972.
- 22) Gay, C. and Schraer, H. : Frozen Thin-Sections of Rapidly Forming Bone : Bone cell Ultrastructure. *Calcif. Tiss. Res.* 19 : 39-49, 1975.
- 23) Takuma, S., Kurahashi, Y. and Tsuboi, Y. : Dentine and pulp their structure and reactions edited by Symons, N. B. B., E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London, 169-195, 1968.
- 24) 田熊庄三郎, 林 文隆, 柳沢孝彰 : ラット切歯の osteodentine 形成時にみられる細胞内石灰化について, *歯科学報*, 75 : 1087, 1975.
- 25) 田熊庄三郎, 柳沢孝彰, 林 文隆 : ラット切歯骨様象牙質の構造と形成機序, *骨代謝*, 10 : 202-203, 1977.
- 26) 山村武夫 : 未分化間葉細胞の増殖と分化そして誘導, *歯科学報*, 77 : 583-591, 1977.