

研究助成成果報告

1. 液状検体を用いた顎関節疾患、腫瘍、嚢胞の病理診断システムの構築

○三上 俊成

病理学講座病態解析学分野

緒言：細胞材料からの cell block 標本は細胞形態の観察だけでなく、連続切片による免疫染色や in situ hybridization が行える方法として有用である。医科領域では特に穿刺吸引細胞診などの推定組織診断が要求される場合に、セルブロック標本が望まれる。そのため擦過細胞診だけでなく、腹水、胸水、腹腔洗浄液、尿などの液状検体でも多用されている。歯科領域では顎関節症に対する顎関節洗浄や嚢胞性疾患に対する嚢胞内容液の採取が行われているが、細胞診断はほとんど行われていない。Cell block 標本の作製には種々の方法があるが、アルギン酸ナトリウムを用いる方法は簡便で標本作製に優れる。Cell block tissue array (CBTA) 標本は同一パラフィンブロック内に多検体を包埋した cell block 標本である。

歯科臨床において顎関節症の診断は、主に臨床所見と画像検査によって行われている。しかし、診療ガイドラインに沿って診断された場合でも治療効果は患者ごとに異なることが少なくない。臨床所見は似ていても、関節局所における組織、細胞レベルの病態は症例ごとに異なっているためと考えられる。また、初期の結晶性関節炎や滑膜軟骨腫症は顎関節症と誤診されることが多い。顎関節洗浄液を検体として CBTA 標本を作製して関節腔内の病理所見を観察すれば、顎関節腔内の病態把握が可能になると考えられた。

一般的に顎骨内に生じた嚢胞性病変の確定診断には組織生検が行われる。しかし菌原性の嚢胞や嚢胞形成性腫瘍の多くは顎骨内に生じるため、生検時に骨削除など外科的侵襲の大きな処置が行われる。特に小児と高齢者では検査入院や全身麻酔が必要となる場合が多い。もし骨吸引により菲薄化した部位から穿刺吸引を行い、嚢胞内容液を採取して CBTA 標本を作製すれば、外科的侵襲の少ない病理検査が可能になる

と考えられた。

本研究では、顎関節症の治療に用いられた顎関節洗浄液から CBCT 標本を作製して細胞成分を病理学的に分析することで、顎関節局所の細胞レベルで病態把握が可能か否か、同様に嚢胞内容液の場合は嚢胞の診断がどの程度まで可能かを検討した。

方法：2008 年 10 月～2010 年 5 月に岩手医科大学歯科医療センターを受診して顎関節症の臨床診断で顎関節洗浄を行った 39 例（18～72 歳の男性 7 例、女性 7 例、平均 48.5 歳）から得た洗浄液 44 検体と、2014 年 1 月～7 月に同センターを受診して嚢胞または嚢胞性腫瘍の臨床診断により生検を行った患者 17 例（8～70 歳の男性 10 例、女性 7 例、平均 48.2 歳）から得た嚢胞内容液 17 検体を対象とした。各検体をホルマリン固定後に遠心し、沈査に 1% アルギン酸ナトリウムを加えて遠心し、上清のアルギン酸を除いた後に 1M 塩化カルシウムを添加してゲル化させた。凝固物を包埋カセットに入れ、自動包埋装置でパラフィン浸透を行った後、薄切切片を作製して HE 染色、および必要に応じて免疫染色を行った。それらの病理所見を患者の臨床情報および X 線写真と比較した。

結果：顎関節洗浄液では 44 例中 22 例で好中球、リンパ球、多核巨細胞（CD68 陽性）、形質細胞、好酸球、単球系巨細胞（マクロファージあるいは破骨細胞）、石灰化を伴った軟骨組織といった診断に有用な細胞がみられた。病理診断としては、16 例が急性炎症、3 例が慢性炎症、2 例が急性炎症から慢性炎症への移行期、1 例が変形性関節症の疑い、1 例が顎関節のリモデリングの疑い、1 例が滑膜軟骨腫症と考えられた。臨床所見と病理所見の比較では、臨床所見が同様であっても病理所見は多様であることが分かった。また、同一患者に複数回洗浄を行った場合、症状変化と病理所見との間に相関が見られ、本法に再現性のあることが確認された。洗浄液中に含まれていた軟骨組織からは、電子顕微鏡の SEM および EPMA 解析でリンとカルシウムを検出して石灰化物の同定および詳細な解析が可能であった。

嚢胞内容液では 17 例中 17 例から好中球、リンパ球、形質細胞、好酸球などの炎症性細胞が検出された。嚢胞上皮と考えられる上皮成分が検出されたのは 2 例で、角化の有無と臨床所見

から角化嚢胞性菌原性腫瘍および含菌性嚢胞の病理診断が可能であった。歯根嚢胞では摘出材料の病理組織診断で嚢胞壁に慢性炎症を伴っていても、内容液中には好中球が目立つなど所見が異なる場合があった。

結論：顎関節洗浄液の CBTA 標本を用いた病理検査は、顎関節症患者に対するより詳細な診断や関節内部の病態把握に有用であることが示唆された。また、嚢胞内容液では全ての嚢胞性疾患の診断に有効ではないものの、症例によっては生検時の外科的侵襲を軽減する病理診断法となることが示唆された。

本研究の内容は、第 31 回日本顎咬合学会学術大会（特別講演，2013 年 6 月）、第 24 回日本臨床口腔病理学会学術大会（一般演題，2013 年 8 月）、第 25 回日本臨床口腔病理学会学術大会（一般演題，2014 年 8 月）、第 40 回岩手医科大学歯学会（一般演題，2014 年 12 月）、Diag Cytopathol.（原著論文，42 巻，2014 年）で報告した。

2. ファイブロサイト（線維細胞 fibrocytes） に注目した顎関節病変発症機構の解明

○衣斐 美歩

分子細胞薬理学講座

顎関節部の疼痛や顎運動異常は食事や会話など日常生活にも大きく支障をきたす。顎関節・咀嚼筋の疾患あるいは障害の程度は症例によってさまざまであるが、重症症例では外科的処置の適応となることもある。従って早期に行うことのできる患者に大きな負担のかからない新規治療方法を探索していくことは重要である。

本研究では炎症に関与する細胞を治療標的の対象とし、そのなかで線維細胞（fibrocytes）と呼ばれる細胞に着目した。fibrocytes は CD45 陽性、CD34 陽性かつ I 型コラーゲン陽性の骨髄由来白血球系細胞であり（Bucala et al, 1994）、そのため線維芽細胞とマクロファージの両方の性質をもつことが報告されている（Reilkoff et al, Nature. Rev. Immunol, 2011）。これまでに肺や腎臓など比較的大きな組織において疾患の原因細胞のひとつとして報告されている（Phillips et al, 2004, and Sakai et al,

2006）が、顎関節では報告がない。そこで我々は fibrocytes が血行性に顎関節に到達した際の顎関節周囲組織と fibrocytes の相互作用について検討を行った。

まず初めに、fibrocytes の単離・培養をこれまで報告されている方法（骨髄、末梢血または脾臓から採取する方法）を参考として試みた。成体マウス（8 週齢から 12 週齢）より心採血、脾臓摘出または骨髄を採取し Ficoll-Paque PREMIUM (GEヘルスケア・ジャパン株式会社) を加えて遠心力により密度勾配媒体中を沈降させる方法で単核細胞を分離した。その後培養を行い fibrocytes の単離に努めたが、本研究期間中に必要十分量の純度の高い fibrocytes を単離・培養することができなかったため、代替としてマウス単球/マクロファージ系細胞 (RAW264.7 cells) を使用し以後実験を行った。in vitro 系での解析を行うためマウス顎関節周囲組織を採取し outgrowth 法にて顎関節周囲組織由来細胞 (TMJSCs) を獲得した。TMJSCs は他の報告と同様に I 型コラーゲンやビメンチンの発現量が高く細胞形態からも線維芽細胞様の性質を有していた。この細胞に代表的な炎症性サイトカインである IL-1beta を添加し顎関節に炎症が起こった場合の TMJSCs と RAW264.7 cells との関係について観察した。その結果、IL-1beta 刺激を行った TMJSCs 培養上清中への RAW264.7 cells の遊走能が促進された。また単球/マクロファージ系細胞が炎症部位に到達してからの相互作用に着目したところ、TMJSCs に炎症性刺激を加えると TMJSCs に接着する RAW264.7 cells の数が増えることもわかった。さらに TMJSCs と RAW264.7 cells を一定期間直接共培養すると培養上清中の monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) の産生量が間接的共培養の場合と比較して増加することが明らかとなった。従って顎関節での炎症時、顎関節周囲組織細胞は単球/マクロファージを患部に遊走し、MCP-1 の産生を増大させるためさらに同細胞の浸潤を助長することでその後の慢性炎症への移行に関与していることが考えられた。本研究結果では、炎症性刺激から非常に初期の段階 (IL-1beta 添加から 4 時間後) に MCP-1 の mRNA 発現量が大きく増加しており 24 時間後では培養上清中のタンパク量も増加していた。