

原 著

ヒト慢性根尖性歯周炎の basic fibroblast growth factor とその receptor

村田 雄子<sup>1)</sup> 坂野 美栄<sup>2)</sup> 永山 元彦<sup>2)</sup>  
堀田 正人<sup>1)</sup> 竹内 宏<sup>2)</sup>

Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptor in Chronic Apical Periodontitis

MURATA YUKO<sup>1)</sup>, SAKANO YOSHIE<sup>2)</sup>, NAGAYAMA MOTOHIKO<sup>2)</sup>,  
HOTTA MASATO<sup>1)</sup> and TAKEUCHI HIROSHI<sup>2)</sup>

慢性根尖性歯周炎は、肉芽組織の形成を特徴とする難治性疾患の一つで、病巣の形成に種々の細胞増殖関連因子が関与する。そこで塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF) による肉芽腫の形成とその成熟に着目し、患者から採取した慢性根尖性歯周炎病巣 (慢性化膿性根尖性歯周炎、歯根肉芽腫および歯根嚢胞) の病理組織切片を用いて、HE 染色、マッソン・トリクロム染色による肉芽組織の線維形成とその成熟度を、さらに免疫組織化学的 (免疫染色) ならびに *in situ* hybridization (ISH) による bFGF とそのレセプター (FGFR) の発現細胞とその組織分布についても検索した結果、それぞれの病巣は線維成分が少なく細胞成分の豊富な幼弱肉芽組織 (I 型) と、細胞成分が少なく線維成分の豊富な成熟肉芽組織 (II 型) に大別できた。免疫染色による bFGF と FGFR のタンパク発現と局在では、I 型に分類したいずれの病巣でもマクロファージを中心とした炎症性細胞、線維芽細胞、ならびに血管内皮細胞に bFGF 陽性を示し、II 型では炎症性細胞の陽性が減少し、線維芽細胞や血管内皮細胞に多くなったが、I 型、II 型に共通して FGFR 陽性は炎症性細胞には少なく、II 型の線維芽細胞や血管内皮細胞に発現が限定した。ISH による bFGF の mRNA は炎症性細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞に発現し、I 型ではマクロファージを中心とする炎症性細胞に、II 型では線維芽細胞に多く認められた。CD68抗体による免疫染色では、I 型の炎症性細胞の多くはマクロファージであることも明らかとなり、慢性根尖性歯周炎は I 型、II 型のいずれの病型でも、原因となる根管細菌の持続的侵襲による傷害性変化から増殖性機転が開始し、マクロファージによる bFGF 産生が周囲の線維芽細胞に対してパラクリン的な増殖を示し、時間の経緯とともに線維芽細胞自身によるオートクリン的な活性に移行し、絶えず増殖因子発現と肉芽組織増生がくり返され、長期にわたる肉芽腫形成に繋がる結論を得た。

キーワード：慢性根尖性歯周炎, bFGF, FGFR, *in situ* hybridization, 免疫組織化学

*Chronic apical periodontitis is classified into three types; chronic suppurative, granulomatous and cystic lesion. These lesions are commonly consist of granulation tissue surrounded by scar-like tissue (dense fibrous tissue). Such granulomatous tissue does not spontaneously disappear and thus treatment requires surgical excision. Therefore, chronic apical periodontitis is considered a fatal inflammatory disease. The formation of granulomatous tissue, which is the main component of chronic apical periodontitis, is thought to be due to continuous proliferation of granulation tissue to repair the tissue was affected by bacterial infection. The proliferation of fibroblasts and vascular endothelial cells of the granulation tissue is hypothesized to be promoted cell growth and maturing granulation tissue by growth factors. The present study was investigated this hypothesis by immunohistochemical analysis and in situ hybridization to detect basic fibroblast growth factor (bFGF) and its receptor (FGFR), and macrophages expressing bFGF. Conventional histological observation demonstrated*

脚注：本論文の要旨は第100回朝日大学歯学研究科発表会 (平成21年12月18日、岐阜) において発表した。

<sup>1)</sup>朝日大学歯学部口腔機能修復学講座歯冠修復学分野

<sup>2)</sup>朝日大学歯学部口腔病態医療学講座口腔病理学分野  
501-0296 岐阜県瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup>Department of Operative Dentistry, Division of Oral Functional

Science and Rehabilitation

<sup>2)</sup>Department of Oral Pathology, Division of Oral Pathogenesis and Disease Control

Asahi University School of Dentistry  
Hozumi 1851, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan

(平成22年1月26日受理)

that apical periodontitis was classified into two types (Type I; macrophage-like inflammatory cell-rich lesion and Type II; fibrous tissue-rich lesion) in the degree of maturation of the granulation tissue. bFGF and FGFR of Type I lesion were mainly expressed in three type of cells; macrophage inflammatory cell, fibroblast and vascular endothelium, while those of Type II lesion were shifted into fibroblast and vascular endothelium.

*In situ* hybridization using oligonucleotide DNA probe demonstrated that bFGF mRNA of Type I lesion was distributed in the macrophage and inflammatory cells and in the fibroblasts of Type II lesion.

Immunohistochemically, inflammatory cells that express bFGF were regarded to be CD68-positive macrophage.

These results indicate that the formation of granulation tissue is initiated by bFGF expressed macrophage. The lesion of apical periodontitis is composed of fibrous granulation tissue, and these original cells are suggested to be from exudative inflammatory macrophages and fibrous connective tissue in the periodontal ligament. Subsequently fibroblasts and vascular endothelium, which both was differentiated from the stem cells, express both bFGF and FGFR, suggesting that these cells proliferation to form granulation tissue in the autocrine and/or the paracrine manner. In this study, lining epithelium of radicular cyst also demonstrated bFGF mRNA expression. These findings suggested that epithelium also promotes proliferation of granulation tissue.

Key words: chronic apical periodontitis, bFGF, FGFR, *in situ* hybridization, immunohistochemistry

## 緒 言

慢性根尖性歯周炎は、う蝕病巣から歯髓炎を経て、根尖部の歯周組織に炎症性疾患として広がった病変である。臨床的には、急性化膿性根尖性歯周炎を始めとする滲出性炎を経過して慢性炎症に移行した病変であるため、自覚症状は顕著でないものの、病巣は感染根管処置のみでは治療困難であるに加えて急性転化しやすいという危険性を秘めている。そこで、根尖端を含めた外科的切除によって病巣そのものを摘出する場合が多い。

慢性根尖性歯周炎の病巣は、内部に化膿巣を容れた慢性化膿性根尖性歯周炎、肉芽組織のみからなる歯根肉芽腫、および嚢胞腔を形成した歯根嚢胞に分類されている。しかし、病理組織学的には、いずれの病巣も基本的には肉芽腫からなる増殖性炎症性疾患である<sup>1)</sup>。

肉芽腫は線維芽細胞が血管芽細胞とともに増殖して肉芽組織を形成し、それがさらに腫瘤となったもので、炎症性而非炎症性がある。両者とも、腫瘤形成に至る肉芽組織の増生に種々の細胞増殖因子が関与している点で共通しているが、炎症性の場合には、浸潤した単球-マクロファージ系細胞がこの増殖因子発現の中心的細胞となっている。すなわち、マクロファージは原因物質の貪食、抗原提示、炎症の伝達物質の産生促進の他、エフェクター細胞として、サイトカイン(IL-1やTNF $\alpha$ )や増殖因子(PDGF, EGF, FGF)の発現等の多彩な機能を発揮していることは周知の通りであるが、その中のサイトカインは線維芽細胞の増殖と

膠原線維産生を促し<sup>2)</sup>、増殖因子は血管の増生、線維芽細胞の増殖と遊走に関与している<sup>3,4)</sup>。

慢性根尖性歯周炎においても、マクロファージが多数浸潤し、これらがサイトカインや増殖因子を発現していることは、免疫組織化学的にもすでに証明されているが<sup>5,6)</sup>、これら因子の発現細胞は多彩で、しかも、タンパクレベルでは、その分布がレセプターに結合した状態として捉えられる可能性もあるため、免疫組織化学的検索だけではその実態が正確に把握し切れない。

そこで今回、慢性根尖性歯周炎において、肉芽腫の成熟度によって各病型を2型に大別し、肉芽腫の形成に最も関連性が深いと考えられる線維芽細胞増殖因子(bFGF)を*in situ* hybridization法を用いて検索するとともに、そのレセプター(FGFR)の発現性、およびマクロファージの検出について免疫組織化学的検索法を用いて検索した。

## 材料と方法

### 1. 被験材料

朝日大学附属病院にて外科的に摘出され、病理組織学的検査によって慢性根尖性歯周炎の確定診断後に保存された病巣50例を供試した。その内訳は、慢性化膿性根尖性歯周炎15例、歯根肉芽腫15例、歯根嚢胞20例であった。

すべての病巣は、摘出後の切り出し時に半割した後、10%中性ホルマリンで固定し、通法に準じてパラフィンに包埋し、約5 $\mu$ mの連続パラフィン切片を作製した。なお、本検索に際し、使用する病理組織標本

ならびに患者等の個人情報に関わる詳細については、朝日大学歯学部倫理委員会の承認を得て行った（承認番号27077号）。

## 2. 検索方法

### 1) ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色およびマッソン・トリクロム (MT) 染色による慢性根尖性歯周炎と病型の類別

各症例の連続切片は各染色を施した後、慢性化膿性根尖性歯周炎、歯根肉芽腫ならびに歯根嚢胞の各病巣における肉芽組織の構成細胞の占める割合と線維成分の量を観察し、これらの結果を指標として、各病巣を肉芽組織の成熟度を組織学的な基準によりさらにⅠ型とⅡ型に細分類した。すなわち、各病巣に占めるマクロファージを中心とした炎症性細胞浸潤が多く、線維成分が未熟で幼弱な肉芽組織の多い例をⅠ型とし、逆に、膠原線維が豊富で炎症性細胞浸潤は感染源の刺激の減少と経過過程から減少した病型をⅡ型とした。

なお、MT 染色は次の手順で行った。予めワイゲルト鉄ヘマトキシリンで染色・分別した切片を1%ポンソーキシリジンと酸性フクシンが2:1となるよう1%酢酸下で溶解後に染色し、2.5%リンモリブデン酸-リンタングステン酸水溶液で染色後、2.5%アニリン青酢酸水で染色を行った。

### 2) 免疫組織化学的検索 (免疫染色)

免疫染色は、各慢性根尖性歯周炎の各病型における bFGF と FGFR タンパクの発現性、ならびにマクロファージの検出を目的として行った。

bFGF と FGFR の検出のための1次抗体には、抗 bFGF と抗 FGFR 抗体 (いずれも Millipore, Temecula, USA) を用い、マクロファージの検出には抗 CD 68抗体 (ダコ・サイトメーション株式会社、東京) を用いた。

各免疫染色は、パラフィン包埋連続切片をキシレンで脱パラフィンした後、下降アルコール系列で水和し、0.3%過酸化水素水を含むメタノールで60分間の内因性ペルオキシダーゼ活性阻害を行い、さらに1 mM EDTA を含む10 mM Tris 緩衝液 (pH9.0) を用いて、121°C で2分30秒間の熱処理による抗原賦活を行い、ウシ血清アルブミンでブロッキングを行った。これに上記3種の各1次抗体を室温で2時間にわたって反応させ、PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識2次抗体を30分間反応させた。そして、0.03%過酸化水素水を含むジアミノベンチジン発色基質を用いて、1分間反応させて茶色に発色させ、さらにヘマトキシリンで核対比染色後に可視光下で顕微鏡観察を行った。

### 3) *in situ* hybridization (ISH)

bFGF mRNA の検索に用いたプローブは、Furuta ら<sup>7)</sup>や Yamazaki ら<sup>8)</sup>の bFGF/FGF-2 の検索方法に準じ、これに多少の変更を加えた。すなわち、共通した十数種類の FGF をエンコードするエクソン部を避けるため、ヒト bFGF/FGF-2 の66-79アミノ酸をエンコードする mRNA 配列に対する anti-sense 配列で、3' 末端側に biotin 標識した oligonucleotide probe (5'-GCA GAA GAG AGA GGA GTTGTG TCT ATC AAA GGA GTG TGT GCT-3'-biotin, SIGMA-ALDRICH Japan, 東京) による RNA-DNA hybridization 法を用いた。

検索には、hybridize までのすべての行程中における RNase 活性を避けるために溶液処理に DEPC を用いた。薄切したパラフィン包埋連続切片をキシレンで脱パラフィン後、下降アルコールによる親水処理を行い、10 μg/ml proteinase K で室温下6分間の酵素処理を行い、グリシンによる quenching と無水酢酸による acetylating 処理後、50%脱イオン化 formamide, 2 × SSC, 1 mg/ml salmon sperm DNA, 1 mg/ml tRNA および10% dextran sulfate の混合液で prehybridization (50°C, 1時間) 後、prehybridization 溶液に4 μg/ml となるように oligonucleotide probe を加えた hybridization mixture による ISH (50°C, 18時間) を行った。その後、2 × SSC の low stringency 洗浄液に50% formamide を加えて50°C で1時間洗浄し、続いて0.1 × SSC を含む high stringency 洗浄液で同様に余分なプローブを洗浄した後、PBS で1.05 μg/ml まで希釈した avidin-FITC (FLUORESCCEIN AVIDIN DCS, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA) で FITC 標識を行い、DAPI で核を標識した後、蛍光顕微鏡下で観察を行った。なお、陰性コントロールは probe を除いた場合と sense 配列の oligonucleotide で確認した。

## 結 果

### 1. 病型と組織学的所見

今回の検索に供試した試料を用いて、病巣の HE ならびに MT 染色による炎症性細胞と膠原線維の染色性、肉芽組織の成熟性より、二つの病型に分類した。Ⅰ型に分類したのは、慢性化膿性根尖性歯周炎で7例、歯根肉芽腫で3例、歯根嚢胞で3例であり、Ⅱ型は慢性化膿性根尖性歯周炎で8例、歯根肉芽腫で12例、歯根嚢胞で17例であった。

この結果から分かるように、慢性化膿性根尖性歯周炎はⅠ型が多く、逆に歯根肉芽腫ではⅡ型が多かった (図1)。

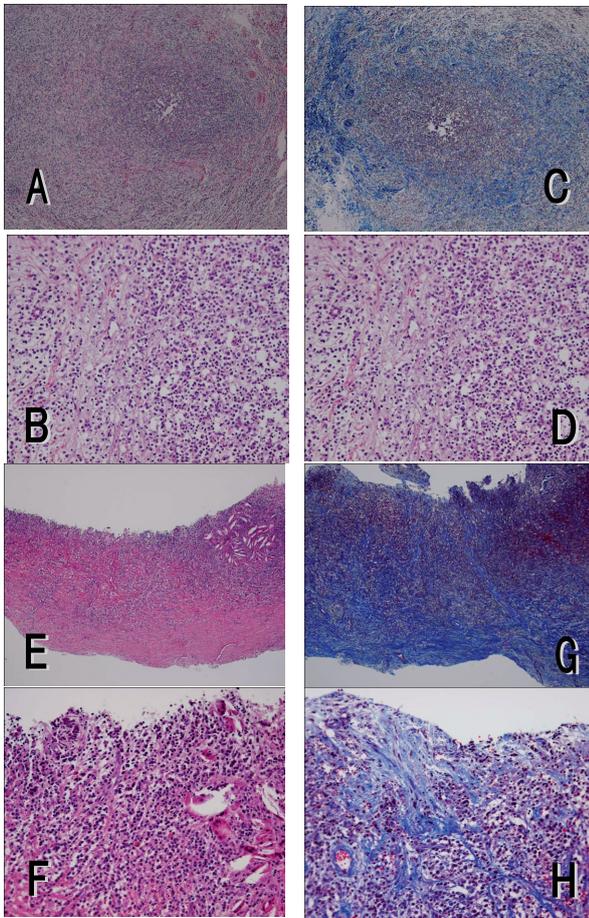


図1 慢性化膿性根尖性歯周炎の病態像（I型：A-D；II型：E-H）

I型では、線維芽細胞と新生毛細血管が豊富で線維成分に乏しく、マクロファージ、リンパ球や形質細胞を主とする炎症性細胞の多数浸潤を認める。

II型では、I型よりも線維成分が多く、肉芽組織中の炎症性細胞浸潤や新生毛細血管の減少や、I型よりも太い膠原線維束の形成を認める。

(A, C, E, G: ×40; B, D, F, H: ×200; A, B, E, F: HE 染色; C, D, G, H: MT 染色)

歯根肉芽腫のI型では、線維成分が腫瘤の外側に多く、内部は幼弱な肉芽組織で構成され、そこにリンパ球、形質細胞ならびにマクロファージが浸潤し、好中球の浸潤を伴うものもあった。このような例は慢性化膿性根尖性歯周炎からの移行型、あるいは逆に歯根肉芽腫からの慢性化膿性根尖性歯周炎への増悪型であった(図2)。

歯根嚢胞は裏装上皮と上皮下組織が裏装組織であったが、その多くは線維成分が豊富なII型であり、これらの症例では、上皮直下の炎症性細胞浸潤を伴って若干幼弱な肉芽組織の形成を認めたが、大部分は束状を成した線維成分よりなっていた。これに対して、少数

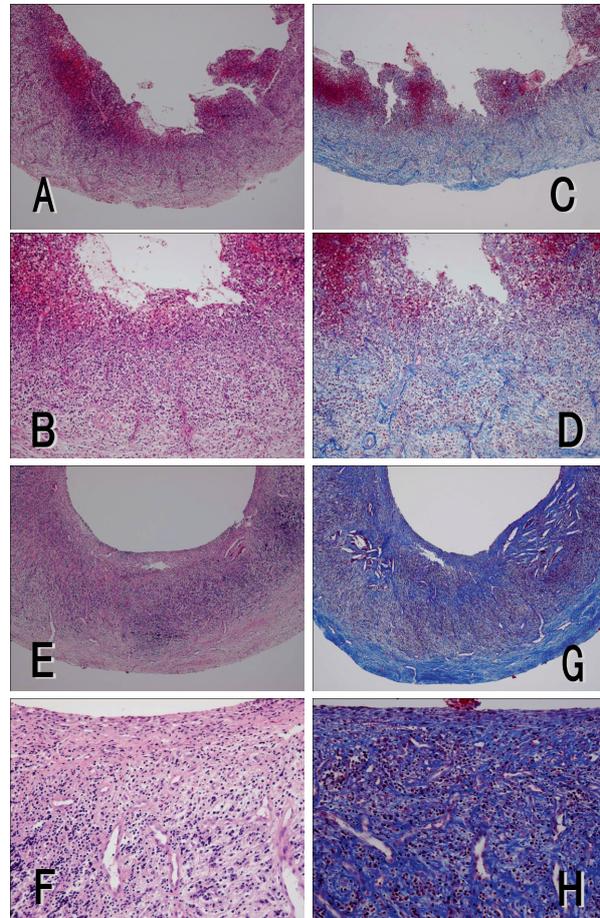


図2 歯根肉芽腫の病態像（I型：A-D；II型：E-H）

I型では、増生肉芽組織中の炎症性細胞浸潤の増加を認め、膠原線維が細いながらも層状に肉芽組織を取り囲む様子を示す。

II型では、炎症性細胞浸潤の減少と、毛細血管や線維の束状形成の増加を示す。

(A, C, E, G: ×40; B, D: ×100, F, H: ×200; A, B, E, F: HE 染色; C, D, G, H: MT 染色)

例のI型では、裏装上皮は破壊されて嚢胞腔内に裏装上皮直下の組織が嚢胞腔内に露出したために、多くの炎症性細胞を伴う肉芽組織が形成されていた。

また、化膿性歯周炎、歯根肉芽腫、歯根嚢胞のいずれの病巣にも、マクロファージが変化した泡沫細胞の集簇を認める例があった(図3)。

## 2. 免疫染色所見

### 1) bFGF と FGFR の局在

bFGF は、すべての慢性根尖性歯周炎のI型の病巣において、マクロファージと思われる大型で単核の炎症性細胞を中心に、線維芽細胞ならびに血管内皮細胞に陽性染色性を認め、II型では炎症性細胞における陽性染色性が減少し、多くの線維芽細胞や血管内皮細胞に陽性を認めた(図4)。しかし、病巣中にみられる

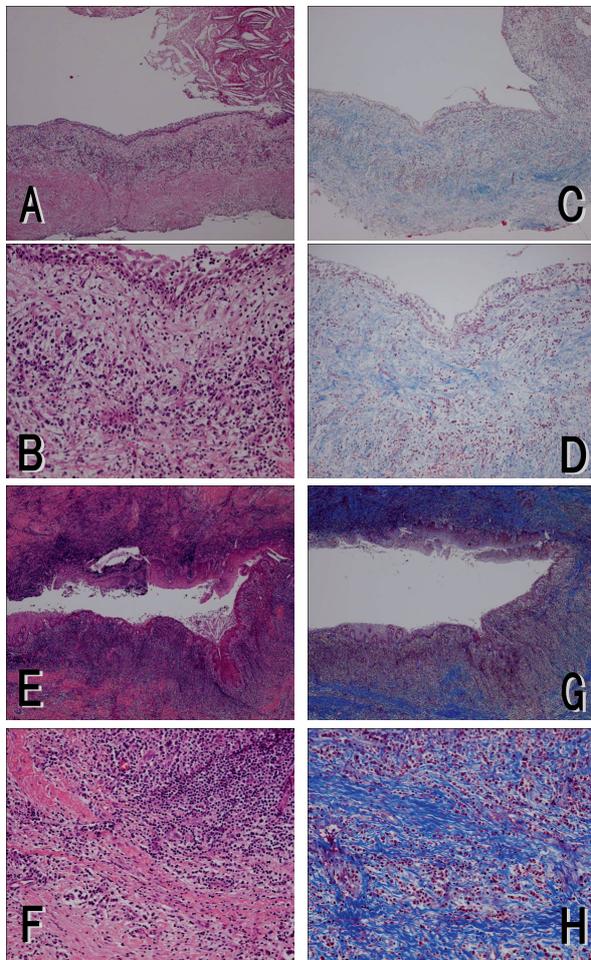


図3 歯根嚢胞の病態像（I型：A-D；II型：E-H）

I型では、裏装上皮直下の肉芽組織中に炎症性細胞浸潤と細い線維束形成を認める。

II型では、裏装上皮直下の肉芽組織中に多数の炎症性細胞浸潤と、その外層で活発な波状の線維束形成を認め炎症性細胞の浸潤巣を分離しながら病巣の最外層を構成する。（A, C, E, G：×40；D：×200, B, F, H：×400；A, B, E, F：HE染色；C, D, G, H：MT染色）

泡沫細胞には認めなかった。

一方 FGFR は、上記の炎症性細胞には染色性がほとんどなく、線維芽細胞や血管内皮細胞に発現する傾向を示した。したがって、I型に発現細胞が少なく、II型に多く見られる傾向を示した（図5）。

## 2) CD68の局在

抗 CD68抗体で検索した結果、いずれの慢性根尖性歯周炎病巣においても、多数の浸潤した炎症性細胞は、CD68陽性のマクロファージで、病巣中に散在性や集簇性に認めた。

とくに、I型では CD68の陽性マクロファージを顕著に認め、他のリンパ球や形質細胞よりも多く浸潤を認めた。また、II型においても、CD68陽性のマク

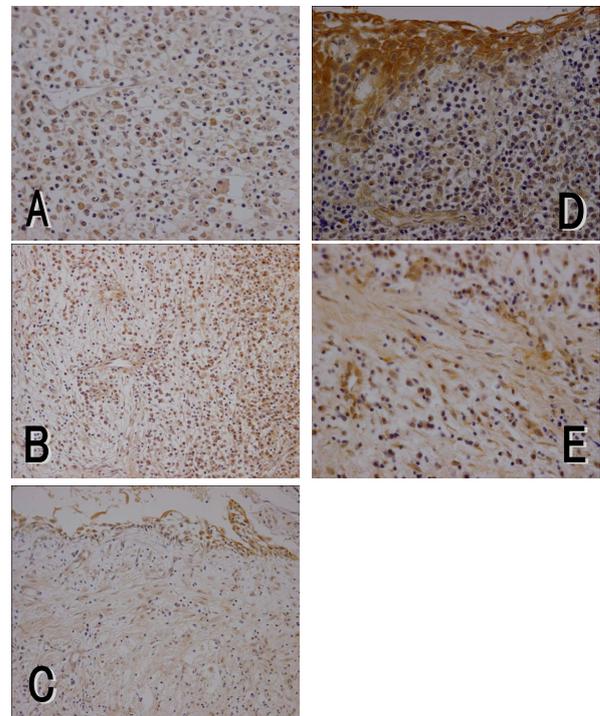


図4 bFGF タンパクの局在

A：慢性化膿性根尖性歯周炎 I 型（×400）

B：歯根肉芽腫 I 型（×200）

C：歯根嚢胞 I 型（×200）

D, E：歯根嚢胞 II 型（×400）

ファージは他の炎症性細胞よりも多く認めた（図6）。

## 3. ISH 所見

bFGF の mRNA 発現から *bFGF* の発現細胞を特定するために ISH を行った結果、発現細胞はマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞の3種類であった。

ただし、これらの発現細胞の比率は病型によって若干の違いがあった。

I型について見ると、慢性化膿性根尖性歯周炎ではマクロファージが主な発現細胞で、歯根肉芽腫では、マクロファージに加えて、線維芽細胞、血管内皮細胞も *bFGF* の発現性を示した。

また、II型について見ると、慢性化膿性根尖性歯周炎や歯根肉芽腫では、いずれも線維芽細胞と血管内皮細胞が主な発現細胞であった。

なお、歯根嚢胞ではこれらとは異なる発現性を示し、I型ではマクロファージ、線維芽細胞や血管内皮細胞に加えて裏装上皮にも認め、II型では線維芽細胞が主な *bFGF* の発現細胞であった（図7）。

## 考 察

結核症、梅毒、癩病、サルコイドーシスならびに慢

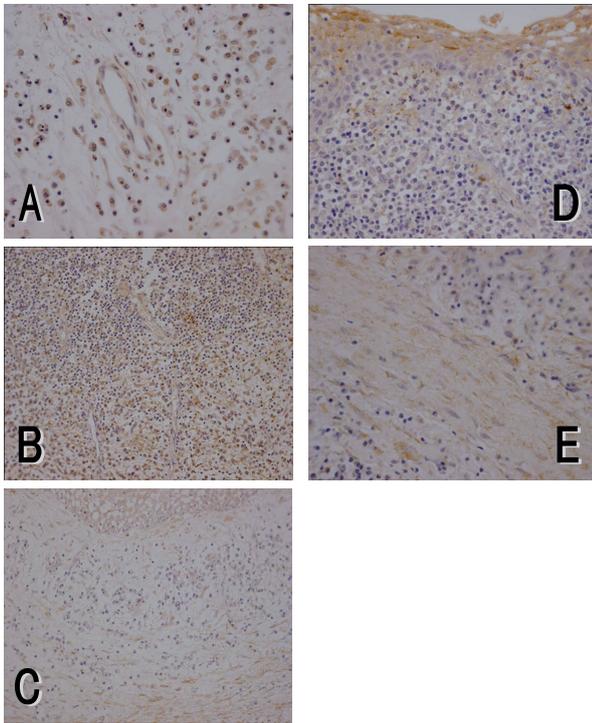


図5 FGFR タンパクの局在  
 A：慢性化膿性根尖性歯周炎 I 型（×400）  
 B：歯根肉芽腫 I 型（×200）  
 C：歯根嚢胞 I 型（×200）  
 D, E：歯根嚢胞 II 型（×400）

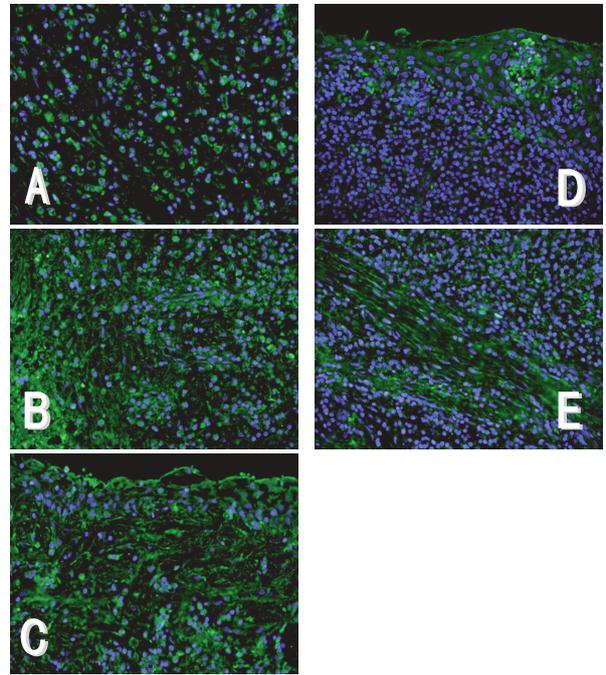


図7 bFGF mRNA の局在  
 A：慢性化膿性根尖性歯周炎 I 型  
 B：歯根肉芽腫 I 型  
 C：歯根嚢胞 I 型  
 D, E：歯根嚢胞 II 型  
 (A-E：×400)

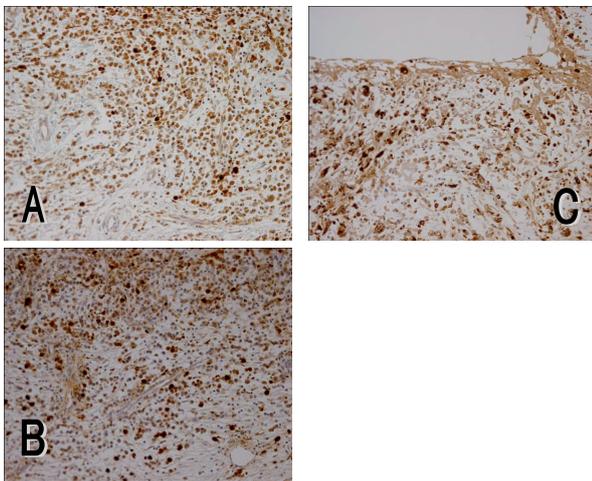


図6 CD68陽性マクロファージの局在  
 A：慢性化膿性根尖性歯周炎 I 型  
 B：歯根肉芽腫 I 型  
 C：歯根嚢胞 I 型  
 (A-C：×200)

性関節リウマチなどによくみられる結節では、類上皮細胞や巨細胞といった特異的なマクロファージの出現を特徴とする限局性の増殖性炎がみられるため、類上

皮性（巨細胞性）肉芽腫性炎，あるいは特異性肉芽腫性炎と呼び，特異性炎として通常の増殖性炎と区別している．これら病巣では，CD4陽性ヘルパーT細胞が産生するリンホカインがマクロファージの浸潤と活性化を促し，活性化した多くのマクロファージが増殖因子をも発現し，これが線維芽細胞や血管内皮細胞の増殖に関わっている<sup>9-12)</sup>．

口腔領域における代表的な増殖性の慢性根尖性歯周炎やエプーリスを病理組織学的に検討すると，代表的な炎症性肉芽腫性病変の一つであり，類上皮細胞を除けば，本細胞のオリジンであるマクロファージ系の細胞が他の炎症性細胞よりはるかに多く浸潤する点においては，特異性炎と近縁の疾患であるとみなすことができる．すでに，中川ら<sup>9)</sup>が報告しているように，本検索でもCD68をマーカーとした免疫組織化学的検索で，通常の如何なる染色でも認められないほどの多くの陽性細胞が浸潤しているのが観察できた．これらのマクロファージ系細胞が細胞質を膨化させつつ密に配列すると，類上皮細胞となり，狭義の特異性肉芽腫と判定することが出来る．このように，慢性根尖性歯周炎が特異性肉芽腫にならないのは貪食物の違いにあると考えられる．代表的な特異性肉芽腫性炎の結核や梅

毒では、その原因菌はマクロファージによって貪食されても、原因菌が細胞内寄生細菌としてマクロファージ内で生息を続け、これが類上皮細胞出現の成因になるが、慢性根尖性歯周炎にみられる原因菌の根管細菌にはこのような性状を示す細菌は存在しない。しかし、マクロファージの浸潤が細胞性免疫によるとみなし得る点では、狭義の特異性肉芽腫と根尖性肉芽腫との間に類似点があると考えられる。すなわち、特異性肉芽腫と根尖性肉芽腫の病巣には、T細胞とマクロファージの浸潤が認められることである<sup>13)</sup>。マクロファージとT細胞が特異性肉芽腫や根尖性肉芽腫の病巣に共通してみられることより、慢性根尖性歯周炎の肉芽腫は特異性肉芽腫性炎の一型と解釈できる。因みに、Shaferら<sup>14)</sup>は、慢性根尖性歯周炎の肉芽腫中に多数のマクロファージ、リンパ球および形質細胞の浸潤を伴っていることから、肉芽腫は immune granuloma と解釈している。慢性根尖性歯周炎における肉芽腫形成の起源となる細胞は、いわゆる歯根膜線維芽細胞と呼ばれる歯根膜中の線維芽細胞や血管内皮細胞であるが、Lekic and McCulloh<sup>15)</sup>は、このような歯根膜線維芽細胞は、機械力、細菌のLPS、マクロファージのサイトカインの刺激を受けて活性化し、細胞外基質の分解酵素として知られている matrix metalloproteinase (MMP)、あるいはその阻害物質となる tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)、ならびに、コラーゲン、エラスチン、グリコサミノグリカン、PGE-2・IL-6・プラスミノゲン活性化阻害物質などのサイトカインを産生し、歯根膜の恒常性維持に関与していると説いている。線維芽細胞は、通常、間葉系幹細胞に由来するが、歯根膜においても、血管周囲に分布する特有の小細胞があり、これらの細胞は種々の刺激因子に反応し、サイクルが遅いという幹細胞としての性状を備え、この細胞が歯根膜の線維芽細胞の幹細胞であると考えられている<sup>16)</sup>。すなわち、実験的に歯根膜を除去した後に生じる血管周囲の細胞の再増殖の比率は、通常の5倍程度にまで達し<sup>17)</sup>、これは他の実験系で生じる幹細胞の動態とほとんど同じであるとみることができる。Lekic and McCulloh<sup>15)</sup>も、血管周囲の小型の幹細胞とみなし得る細胞が歯根膜線維芽細胞の先祖細胞の可能性が高いとしている。このような幹細胞が、正常な状態の歯根膜において、歯根膜細胞群の形成に関与しているかどうかは不明であるが、Gouldら<sup>18)</sup>は、損傷された歯根膜を再構築し得る細胞とみなしている。

以上の先人達の知見から、慢性根尖性歯周炎における肉芽腫の由来となる細胞は歯根膜幹細胞と、すでに分布する歯根膜線維芽細胞あるいは血管内皮細胞が増

殖したものであることが示唆される。すなわち、根管細菌成分の侵襲によって傷害された歯根膜の修復のために、幹細胞あるいはすでに分化した線維芽細胞や血管内皮細胞が増殖を反復して最外層が線維化した結果、腫瘤となったと考えられる。そして、肉芽腫の細胞増殖には、多種類の細胞増殖因子が関与していると考えられる。渡邊ら<sup>19)</sup>は、慢性根尖性歯周炎の中の歯根肉芽腫を好中球の浸潤状況と肉芽組織の成熟度を指標として5種類の病型に類別し、これら病巣において、細胞増殖因子である IL-1 $\alpha$ 、TGF $\alpha$ 、TGF $\beta$ 、HGF $\alpha$ 、bFGF、PDGF とこれらのレセプターを免疫組織化学的に検出している。その主な発現細胞、あるいは免疫染色における陽性細胞はマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞であった。今回の検索では、さらに慢性化膿性根尖性歯周炎や歯根嚢胞をも検索対象とし、肉芽組織の成熟度を中心的な指標としてそれぞれを2種類の病型に分けた。これらの bFGF と FGFR の免疫組織化学的な検出の様相は渡邊ら<sup>6)</sup>の結果と本質的に同じであった。

しかし、これまでの免疫組織化学的所見による報告では bFGF の発現細胞が正確に特定できないために、細胞増殖が増殖因子の産生細胞自身によるオートクリンによるものか、他の細胞が産生する作用によるパラクリンによるものかが明らかではなかった。今回、この点を明らかにするために検索を行った bFGF mRNA の ISH による結果では、bFGF はマクロファージ、線維芽細胞、血管芽細胞の3種の細胞質内に発現を認め、根尖性歯周炎の病型によって、主となる発現細胞の種類も異なり、いずれの病型も、I型ではマクロファージが主な bFGF 発現細胞であり、II型になると、線維芽細胞や血管内皮細胞にも bFGF を発現することが明らかになった。この所見は、歯根膜内における肉芽組織の形成が、細菌侵襲に対する異物処理機転として、マクロファージの浸潤と、これに伴って発現された一連の増殖因子や分化因子が、パラクリン的に幹細胞である線維芽細胞や血管内皮細胞に増殖と線維細胞や血管への分化を刺激するように作用すると同時に、これら細胞も bFGF を発現することによるオートクリン性の増殖をもつという二面性の増殖性を持っていることが明らかであった<sup>3,4)</sup>。これら一連の所見は、慢性化した根尖性歯周炎では、原因菌によって傷害された組織修復が、その経過中にパラクリンだけでなく、オートクリンによる増殖性を獲得し、これが長期にわたって肉芽組織形成による病巣が存続する要因となり、ひいては難治性疾患に繋がってゆくと考えられた。

さらに今回、歯根嚢胞では、裏装上皮の bFGF の

発現をも証明された。上皮細胞が *bFGF* や結合組織線維芽細胞増殖因子を発現することはすでに Kanemoto ら<sup>19)</sup> の結合組織線維芽細胞増殖因子の発現に類似した結果として捉えることができる。歯根嚢胞の裏装上皮は本来、永続性の強い性格を有することから、この上皮の *bFGF* の発現もまた永続性があり、これが歯根嚢胞における肉芽組織の永続的な形成に関係していると考えられた。

## 結 論

1. 慢性根尖性歯周炎の化膿性歯周炎、歯根肉芽腫、歯根嚢胞の3型は、肉芽組織の成熟度によって2種類の病型に細分できた。
2. それぞれの病型のマクロファージ、線維芽細胞、血管内皮細胞は *bFGF* タンパクが局在し、そのレセプターの *FGFR* タンパクは線維芽細胞と血管内皮細胞に局在を示した。
3. この結果から、病巣における肉芽腫の形成には、線維芽細胞と血管内皮細胞がオートクリン的な *bFGF* 産生による増殖と、マクロファージの *bFGF* 産生によるパラクリン的な増殖の両方があることを示唆した。
4. これら3種類の根尖性歯周炎の病巣が、ほとんど自然治癒しない背景には、原因である根管内細菌の持続性の侵襲だけでなく、病巣の傷害に対するオートクリン的な *bFGF* タンパクの産生とそれによる増殖も加えて、絶えず肉芽組織の増生による修復が反復することが存在すると考えられた。
5. 歯根嚢胞の裏装上皮が *bFGF* タンパクや mRNA を発現することも明らかで、これはマラッセの遺残上皮が嚢胞の裏装上皮として増殖性を獲得した際に、*bFGF* の発現性も獲得したものと考えられた。
6. その上皮は長期にわたって存在することから、*bFGF* タンパクの発現も永続性であり、ひいては、これも嚢胞壁が消滅しない一つの要因をなしていると考えられた。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、終始研究において指導して下さった、朝日大学口腔病態医療学講座口腔病理学主任 竹内 宏教授ならびに口腔病理学研究室の皆様へ深謝致します。この研究は宮田奨励金の一部により遂行されたことを追記致します。

## 文 献

- 1) 石川悟朗, 秋吉正豊. 口腔病理学 I. 2版. 京都: 永末書店; 1989: 363-391.

- 2) Sato N, Matsumoto H, Akimoto Y and Fujii A. The effect of IL-1 alpha and nifedipine on cell proliferation and DNA synthesis in cultured human gingival fibroblasts. *J Oral Sci.* 2005; 47: 105-110.
- 3) Henke C, Marineili W, Jessurun J, Fox J, Harms D, Peterson M, Chiang L, and Doran P. Macrophage production of basic fibroblast growth factor in the fibroproliferative disorder of alveolar fibrosis after lung injury. *Am J Pathol.* 1993; 143: 1189-1199.
- 4) Trackman PC and Kantarci A. Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 165-175.
- 5) 中川豪晴, 永山元彦, 竹内 宏, 山本宏治. 慢性根尖性歯周炎病巣の生物学的性状. 日本歯科保存学雑誌. 2006; 49: 669-682.
- 6) 渡邊隆史, 伊藤範明, 永山元彦, 竹内 宏. 慢性根尖性歯周炎における肉芽腫形成機転. 岐阜歯科学会雑誌. 2009; 36: 85-99.
- 7) Furuta Y, Shinohara T, Sano K, Meguro M and Nagashima K. *In situ* hybridization with digoxigenin-labelled DNA probes for detection of viral genomes. *J Clin Pathol.* 1990; 43: 806-809.
- 8) Yamazaki K, Nagao T, Yamaguchi T, Saisho H and Kondo Y. Expression of basic fibroblast growth factor (FGF-2)-associated with tumour proliferation in human pancreatic carcinoma. *Virchows Arch.* 1997; 431: 95-101.
- 9) McAdam AJ and Sharpe AH, Infectious Diseases; Kumar V, Abbas A, Fausto N and Aster JC, ed. Robbins and Kotran Pathologic Basis of disease. 8th ed. Philadelphia: Saunders; 2008: 331-398.
- 10) Flynn JL and Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 2001; 19: 93-129.
- 11) Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA and van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis.* 2005; 85: 53-64.
- 12) Leader BT, Godornes C, van Voorhis WC and Lukehart SA. CD4+lymphocytes and gamma interferon predominate in local immune responses in early experimental syphilis. *Infect Immun.* 2007; 75: 3021-3026.
- 13) Stashenko P, Teles R and D' Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9: 408-521.
- 14) Shafer WG, Hine MK, and Levy BM. A Textbook of Oral Pathology. Disease of the pulp and periapical tissues. 4th ed. Philadelphia; Saunders; 1983, 479-510.
- 15) Lekic P and McCulloch CA. Periodontal ligament cell population: The central role of fibroblasts in creating a unique tissue. *Anat Rec.* 1996; 245: 327-341.
- 16) Rimondini L and Mele S. Stem cell technologies for tissue regeneration in dentistry. *Minerva Stomatol.* 2009; 58: 483-500.

- 17) Huang GT, Gronthos S and Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009; 88: 792-806.
  - 18) Gould TR, Melcher AH and Brunette DM. Location of progenitor cells in periodontal ligament of mouse molar stimulated by wounding. *Anat Rec.* 1977;188: 133-141.
  - 19) Kanemoto K, Usui J, Tomari S, Yokoi H, Mukoyama M, Aten J, Weening J, and Nagata M. Connective tissue growth factor participates in scar formation of crescentic glomerulonephritis. *Lab Invest.* 2003; 83: 1615-1625.
-