歯周組織の再生 —クリティカルに考える—

下野正基

Regeneration of Periodontal Tissues — Critical Thinking —

Masaki Shimono

これまで報告された結果をクリティカルに考える（疑ってみる）ことによって、歯周組織再生のメカニズムを検証した。治癒過程を中・長期的に考えると、Melcherの仮説は必ずしも正しくないと考えられた。歯周治療後に生じる長い付着上皮は、その増殖能の経時的变化によって、down growthから結合組織付着に変わることが示唆された。

Mechanisms of the periodontal tissue regeneration were verified by critical thinking (suspecting) the previously reported results. It is surmised that Melcher's hypothesis is not entirely right when the processes of wound healing were considered in the long term. It is suggested that long junctional epithelium, which are created following periodontal surgery, is replaced from down growth to connective tissue attachment by changing of the epithelial proliferation.

Key words : 歯周組織 periodontal tissue, 再生 Regeneration, クリティカルに考える Critical Thinking, Melcherの仮説 Melcher's hypothesis, 長い付着上皮 long junctional epithelium

はじめにー「クリティカルに考える」とは？

カナダ British Columbia 大学の D.M.Brunette 教授は歯科研究の評価について、歯学部学生および大学院学生に教え、10 数年におよぶその教育内容を Critical Thinking という本にまとめた¹⁾。これは、アメリカ歯科医師会認定委員会およびカナダ歯科医師国家試験委員会が要求している critical thinking と情報管理に應えるためである。両委員会は、学生が自ら歯科文献を見つけ出し、理解し、批判的に評価できる能力を求めている、critical thinking は EBM および EBD と密接に関連し、その根幹ともなりうる作業と位置づけられる。

Critical の意味を研究社新英和辞典で調べてみると、「批評の、評論の、批判的な、評論的な」といった訳語が出てくる。すなわち、critical thinking とは、「批判的に考えること」を意味する。

Brunette 教授は同書の「科学的手法と科学者の態度」の中で、そのステップについて記載している。科学的手法のステップは、

- (1) 疑ってみる（疑問をもつ）
- (2) 解決する価値のある疑問かどうかを決定する
- (3) 疑問に関する情報を集めて整理する
- (4) 仮説を立てる（疑問を解決する可能性のある）
- (5) 実験（観察）する
- (6) 結果が仮説と矛盾したら仮説を変更する
- (7) 結果が仮説と一致したら、仮説の間違いを立証する実験を立案する
- (8) その結果が仮説を支持したら、再現性のある論文を発表する
- (9) 他の科学者によって再現性が確認され、同意を得たら、新知見となる。

科学的手法の第一歩は、「疑ってみる」ことである。これにしたがって、通説となっている理論が本当に正しいのかどうか、また発表された論文に書かれている内容が本当に正しいのか、疑問の余地はないのか、を歯周組織の再生との関連から考えてみた。

Melcher の仮説は正しいか？

1976 年に発表された歯周組織再生に関する Melcher の仮説はあまりにも有名である。「歯周外科手術後に歯根表面に増殖・再生してくる細胞がその後の治癒形態（付着の形態）を決定する。上皮細胞、歯肉結合組織由来の細胞、骨由来の細胞および歯根膜由来の細胞の 4 つの異なるタイプの細胞が増殖・再生してくる」というものである²⁾。この

図1 Melcherの仮説を示す模式図。左から上皮性付着、被包、骨性癒着、結合組織性付着。上皮細胞が根面に増殖すれば上皮性付着、歯肉結合組織由来の細胞が増殖すれば被包、骨組織由来の細胞が増殖すれば骨性癒着、歯根膜由来の細胞が増殖すれば結合組織性付着が起きる。

ことから、

- (1) 上皮細胞が増殖すれば上皮性付着
- (2) 歯肉結合組織細胞が増殖すれば被包
- (3) 骨細胞が増殖すれば骨性癒着
- (4) 歯根膜の細胞が増殖すれば結合組織性付着が引き起こされる

と考えられている。

この仮説にしたがって、1984 年 Lindhe らのグループは上皮細胞の増殖侵入を阻止するために膜（はじめはミリポアフィルター、後にゴアテックス膜の非吸収性膜）を応用した Guided Tissue Regeneration (GTR) 法を開発した³⁾。GTR 法は、適応症の問題はあるものの、歯周外科治療法の中で広く受け入れられてきた。この方法はその後、2 回の手術を必要としない吸収性膜（コラーゲン膜や GC メンブレンなどの合成高分子膜）の応用およびインプラントの前処理などに用いられる GBR (Guided Bone Regeneration) へとさらに発展している。

歯根膜由来の細胞が結合組織性付着にとって重要な役割を演ずることは、Lindhe らのグループおよびわれわれの実験結果から明らかにされている。われわれはイヌを用いて粘膜骨膜弁を剥離し、歯根中央部に歯槽骨から歯根膜、セメント質、象牙質に至る直径約 3mm の窩洞を形成し、粘膜骨膜弁をもとに戻して歯周組織の再生（治癒過程）を観察した。3 日後、窩洞内は血餅、フィブリン、滲出液で満たされ、既存の歯根膜から未分化な細胞が増殖していた。7 日後、窩洞内は肉芽組織で占められ、14 日後には欠損部を橋渡しするように歯槽骨が新生していた。時間経過に伴い、セメント質が象牙質表面に形成され、新生骨は象牙質に向かって増殖し、両者の間には歯根膜が新生していた（結合組織性付着の形成）。興味深いことに、この新生歯根膜の幅は既存の歯根膜の幅とほぼ同じであった。われわれ

はオートラジオグラムによって、新生した歯槽骨、セメント質および歯根膜はいずれも歯根膜由来の細胞が増殖、遊走、分化して形成されたことを確認した。このように、歯周組織の再生過程において、歯根膜由来の細胞の増殖、遊走、分化によって結合組織性付着が形成されることが明らかにされた⁴⁾。

さらに順を追って、Melcherの仮説に対する検証を試みることとする。

本当に上皮細胞の侵入は 歯根膜細胞より早いのか？

GTR法開発の基礎となった理論的背景は、「歯周外科後に再生してくる上皮細胞の侵入のスピードが歯根膜由来細胞よりも早いので、上皮細胞の侵入を阻止する膜を応用」というものである。このGTR法に対する疑問はいくつかあげることができる。すなわち、

- (1) 上皮の侵入を阻止するために膜を使用するGTR法は生体にとって無害なのか？
- (2) 上皮細胞の侵入を阻止しているが、上皮細胞そのものがもっとも優れたシール機能を有するのではないのか？
- (3) 歯根膜細胞より上皮細胞の侵入は本当に早いのか？
- (4) 歯周外科後の治癒形態としてなぜ上皮性付着ではなく結合組織性付着なのか？

などである。

このうち、「上皮細胞と線維芽細胞は遊走のスピードが違うのか？」に関しては、「上皮細胞が早い」とするLindheらの見解がある。これに対して、Brunetteらは、チタン表面に細胞を培養し、その遊走能を検索した。その結果、「表面の条件によって異なる。培養細胞は溝を付与した部分では上皮細胞よりも線維芽細胞のほうが早い」と述べている。

フラップ、ルートプレーニングの処置後、上皮細胞の侵入が他の細胞より早ければ、全例に長い付着上皮が形成されるはずである。われわれは、ビーグル犬にフラップ手術後、セメント・エナメル境部をラウンドバーで削除し、フラップを元に戻して3週後の上皮の進入を観察したところ、削除部まで上皮が侵入していたものは約30%しかなかった⁵⁾。

さらに、長野(1986)は感染歯髄が歯周組織の治癒に及ぼす影響について検索した⁶⁾。実験群は露髄により感染根管を作製し、当該歯にフラップ手術、ルートプレーニング実施後、上皮の進入位置に注目した。対照群は未処置歯髄を有する歯に同様の処置を施した。その結果、術後4週および10週ともに対照群では上皮の侵入はほとんどみられ

なかったのに対し、実験群ではルートプレーニングを行った歯根の長さの約2分の1の部位まで上皮が侵入していた。このことから、歯周外科後に根面が上皮によって被覆されるのは、上皮の侵入のスピードではなく根面の汚染状態によるものと考えられた。

一度形成された長い付着上皮は短くならないのか？ (上皮が短くなって上皮性付着が結合組織性付着に変わることはないのか？)

上皮性付着の担い手となっている長い付着上皮とはどんな上皮なのであろうか？われわれは、実験的に歯根表面に長い付着上皮を形成させ、電子顕微鏡を用いてこの上皮とセメント質表面との接着機構を観察したところ、長い付着上皮は半接着斑および基底板を介してセメント質と接着していた。上皮細胞の特性から、長い付着上皮は基底板を介して、セメント質の表面を移動する可能性が考えられた。

そこでわれわれは、ラット第1、2臼歯間にゴムを挿入することによって、当該部の歯周組織破壊を実験的に引き起こした。1週後にゴム除去し、その際ゴムが存在した部位のもっとも根端側の歯根表面にナイフでノッチをつけ、組織切片上のマークとした。ゴム除去後の組織変化を経時的に観察した結果、直後および1週後ではノッチ部は口腔に露出しており、4週および8週後になるとノッチ部は長い付着上皮に覆われていた。時間経過に伴い、上皮は次第にその長さを減じ、16週後ノッチ部にはセメント質が形成され、その外側には明らかな歯根膜細胞が規則正しく配列していた。24週後、再生上皮の先端部はセメント・エナメル境に位置し、歯槽骨の再生も観察された。要約すると、

- (1) 歯周組織再生の過程で、根面に長い付着上皮が形成される
- (2) 一旦形成された長い付着上皮は時間の経過に伴い短小化する

ことから、実験的には上皮性付着が結合組織性付着に変わる可能性が示唆された^{5,7,8)}。したがって、Melcherの仮説は、歯周組織再生の初期における治癒形態を考慮する上では正しいといえるが、中長期的な治癒形態においてはこの仮説はあてはまらないことになる。

再生過程でなぜ長い付着上皮が 形成されるのか？

上皮性付着が結合組織性付着に変わるという実験結果から、「再生過程でなぜ長い付着上皮が形成されるのか？」という疑問が生まれた。この疑問を解決するために、核小

体形成体を標識する AgNOR を用いて、ラット第 1, 2 臼歯間にゴムを挿入することによって実験的に形成した長い付着上皮の増殖能を検索した。4～12 週の核小体形成体の核に占める比率は、結合組織に面した長い付着上皮の基底細胞では対照群の約 2 倍と高値を示した。セメント質に面した上皮細胞の増殖能は 4 週後にわずかに増加したにすぎなかった。このことから、高い増殖能を有する基底細胞から細胞が供給され、これらの細胞が根尖側を経由して直接歯根表面を移動し、最終的には剥離脱落するものと考えられた。このことが再生の過程で長い付着上皮が形成される理由であることが示唆された⁹⁾。

なぜ一旦形成された長い付着上皮が短くなるのか？

再生の過程で形成された長い付着上皮がなぜ短くなるのかを、上記の実験方法と同様の方法を用い、上皮細胞と結合組織細胞の増殖能を比較して検索した。その結果、ゴム除去後 4 週までは上皮細胞はきわめて高い増殖能を示したが、12 週後以降は増殖能が低下した。一方、結合組織細胞の増殖能は治癒過程の初期から 28 週後までは一定の増殖活性を示した。したがって、12 週後は上皮細胞も結合組織細胞も増殖能はほぼ同じであった。すなわち、創傷治癒過程の初期には上皮細胞が増殖し、長い付着上皮を形成するが、12 週以降は増殖能が低下し、長い付着上皮に細胞を供給できないので短小化が起こることが明らかにされた¹⁰⁾。

長い付着上皮はどのようにして歯の表面を移動するのか？

付着上皮が根尖側へ移動する際、上皮細胞内に発達したアクチンフィラメントが発現することは、従来から指摘されている。アクチンフィラメントが上皮細胞の移動と何らかの関わりがあると推測されているが、長い付着上皮が歯根表面を移動するその詳細な機序はいまだわかっていない。

生理的な条件下で、エナメル質と直接接着している付着上皮は DAT 細胞 (Cells Directly Attached to the Tooth) と呼ばれている。この歯と上皮との接着はきわめて特異的であり、integrin $\alpha_6\beta_4$ と laminin-5 がその担い手であることが明らかにされている¹²⁾ (図 2)。DAT 細胞は歯と強く接着するために、歯の表面を移動する遊走細胞ではなく、したがって、付着上皮全体のターンオーバーには関与しないのではないかと考える研究者がいる。この考えは、「基板板には選択的な石灰化がみられ、精巧な基底膜と石灰化と

図2 付着上皮のエナメル質との接着を示す模式図。上皮細胞はヘミデスモゾームの部位で、integrin $\alpha_6\beta_4$ および laminin-5 を介して内側基板の細胞外マトリックスと接着している。Laminin-5 は α , β , γ の3つの鎖から成っており、integrin の分子と結合している。BP230 : 水疱性類天疱瘡抗原 (230kDa), BP180 : 水疱性類天疱瘡抗原 (180kDa)。

の相互関係を形成している」という研究によって支持されている。一方、DAT 細胞が増殖能を有することから、これらの細胞は歯の表面を移動する遊走細胞であるとも報告されている。

そこでわれわれは、DAT 細胞が遊走細胞であるかどうかを検索するために、共焦点レーザー顕微鏡とオスミウム浸漬法を用いて DAT 細胞の細胞骨格を構成するアクチンフィラメントの分布と細胞の表面構造を観察した。DAT 細胞の細胞骨格は細胞の根尖側に集積し、セメント・エナメル境と平行に配列していた。また、一部の線維は細胞内の歯冠側で垂直方向に配列していた。この垂直方向に配列するアクチンフィラメントの分布から、DAT 細胞は遊走細胞として機能することができると可能性が示唆された。しかし、歯の表面との接着機構を考慮すると、turn over は他の付着上皮細胞のように早くはないであろう。オスミウム浸漬法では、内側基板、ペリクル、プラークなどが除去され、DAT 細胞の表面構造を観察することができる。DAT 細胞の表面には、微絨毛様構造が多数存在し、これらの構造物を駆使して、DAT 細胞はエナメル質の表面を移動するのであろうと考察した¹³⁾ (図3)。

歯を矯正学的に移動しても、歯根膜の幅が一定に維持されているのは、なぜ？

歯周組織再生に関する仮説を提唱した Melcher (1980) はまた歯根膜の機能について、

図3 歯と直接接着する付着上皮細胞(DAT細胞)の遊走機序を示す模式図。DAT細胞はエナメル質の表層(ES)をセメント・エナメル境(CEJ)から歯肉溝(GS)に向かって移動する[太い矢印]。JE:付着上皮, Leu:好中球, SE:歯肉溝上皮, OE:歯肉口腔上皮。

- (1) 支持
- (2) 感覚
- (3) 栄養
- (4) 恒常性
- (5) 再生

の5つがその機能であると、名著「Orbanの組織学、発生学」の中で記載している¹⁴⁾。このうち、恒常性機能の維持機構はきわめて興味深い変化である。つまり、矯正学的に歯牙を移動すると歯根膜には圧迫側と牽引側が生じる。時間の経過と矯正力の減衰に伴って、歯根膜の再生が起これ、最終的には歯根膜の幅は、歯を移動する前の状態になることはよく知られている。これは、歯根膜に恒常性の機能が備わっているためと説明されているが、その機序については明らかにされていない。

この点を明らかにするために、われわれは実験的に歯牙を移動させ、歯根膜の圧迫側と牽引側における細胞増殖とプログラムされた細胞死の視点から検討した。その結果、細胞増殖は牽引側では3日後、圧迫側では10日後にピークとなっていた。細胞死は3日目から認められ、28日後まで圧迫、牽引側共に増加する傾向が認められた。すなわち、牽引側では圧迫側よりも早く矯正力に応答し、3日後から拡大した間隙を埋めるため骨芽細胞の増殖がはじまり新生骨を形成する。一方、圧迫側ではまず骨組織および壊死歯根膜の吸収が起これ、続いて再生のための細胞増殖が10日後からみられた。細胞死は、圧迫、牽引側で機能を終えた細胞(破骨細胞、骨芽細胞など)が処理される過程で発生したものと考えられ、矯正力によって引き起こされた歯

図4 歯根膜の幅を一定に保つ再生と恒常性維持の機序を示す模式図(文献¹⁶⁾より引用)。

根膜のリモデリングにはこの細胞増殖とプログラムされた細胞死が密接に関与していると考えられた¹⁵⁾。

なぜ上顎智歯を下顎大臼歯部に移植することができるのか？

近年、歯の自家移植は臨床においてしばしば行われている。移植する歯に歯根膜が残存していれば、歯根膜は人工的に作成した大きなソケット内に歯槽骨を再生し、移植歯は生理的な歯と同様、セメント質・歯根膜・歯槽骨によって結合され、通常の機能を営むことができる。このように、自家移植を可能にしているのは、歯根膜の再生能力と恒常性維持機能によるものである。すなわち、歯根膜には(a)歯槽骨を作るメカニズムと、(b)歯槽骨を作らないで歯根膜の幅を一定に保つメカニズムが存在し、両者の機能が制御されているからである。「歯根膜における再生と恒常性維持の機序に関する模式図(仮説)」を図4に示す⁸⁾。

おわりに

歯周組織の再生機序について、クリティカルに考えることによって論証を試みた。「歯周外科手術後に歯根表面に増殖・再生してくる細胞によってその後の治癒形態(付着の形態)が決定される」とするMelcherの仮説は治癒過程を中・長期的に捉えた場合は正しいとはいえない、と考えられた。また、細胞の侵入のスピードは条件によって異なり、特に根面の汚染の程度が重要であることが示唆された。治癒の過程で形成される長い付着上皮は時間の経過に伴って短くなり、上皮性付着が結合組織性付着に置き変わる可

能性のあることが実験的に明らかにされた。その理由は、治癒の初期の段階では上皮細胞が著しい増殖を示し長い付着上皮を形成するものの、時間の経過に伴い増殖能が低下するために、長い付着上皮は結合組織細胞によって置き変わると考えられた。歯と接着する付着上皮は、細胞内アクチンフィラメントと微絨毛様構造によって、歯との接着を

保ちながら、その表面を移動していることが示唆された。一方、歯を矯正学的に移動しても、自家歯牙移植によっても、歯根膜の幅が一定に維持されているのは、歯根膜に (a) 歯槽骨を作るメカニズムと、(b) 歯槽骨を作らないで歯根膜の幅を一定に保つメカニズムが存在し、両者の機能が制御されているためと考えられた。

参考文献

- 1) Brunette DM : Critical Thinking, 1st ed. Quintessence Publishing (Chicago), 1996. (日本語版「クリティカルに考える」, 石川達也, 下野正基監訳, クインテッセンス出版(東京), 2001.
- 2) Melcher AH : On the repair potential of periodontal tissues. J Periodontol, 47 : 256-260, 1976.
- 3) Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. J Clin Periodontol, 9 : 290-296, 1982.
- 4) 下野正基, 山村武夫 : 歯周組織の再生, 治癒の病理, 下野正基, 飯島国好(編) : 69-86, 医歯薬出版(東京), 1988.
- 5) 橋本貞充, 下野正基 : 上皮性付着と結合組織性付着. 治癒の病理, 臨床編, 第2巻歯周治療, 下野正基, 飯島国好(編) : 150-164, 医歯薬出版(東京), 1994.
- 6) 長野恭輔 : 感染根管が歯齦被弁手術後の創傷治癒に及ぼす影響に関する実験病理学的研究. 日歯周誌, 28 : 546-577, 1986
- 7) 片柳匡司 : ラットにおける実験的歯周ポケット形成後の治癒過程に関する病理組織学的研究―特に上皮性付着と結合組織性付着の相関について―. 歯科学報, 92 : 1627-1650, 1992.
- 8) Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. : Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. Microsc Res Tech. 60 : 491-502, 2003.
- 9) Uno T, Hashimoto S, Shimono M. A study of the proliferative activity of the long junctional epithelium using argyrophilic nuclear organizer region (AgNORs) staining. J Periodont Res, 33 : 298-309, 1998.
- 10) Usuda J, Hashimoto S, Enokiya Y, Inoue T, Shimono M. : Proliferative activities of epithelial and connective tissue cells in the rat periodontal regeneration. J Periodont Res, 39 : 175-187, 2004.
- 11) Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka K, Inoue T, Abiko Y, Yamaza T, Kido MA, Tanaka T, Hashimoto S. Biological characteristics of the junctional epithelium. J Electron Microsc, 52 : 627-639, 2003.
- 12) Hormia M, Ylanne J, Virtanen I : Expression of integrins in human gingival. J Dent Res, 69 : 1817-1823, 1990.
- 13) Ishikawa H, Hashimoto S, Tanno M, Ishikawa T, Tanaka T, Shimono M. Cytoskeleton and inner surface of cells directly attached to the tooth in the rat junctional epithelium. J Periodont Res (in press)
- 14) Melcher AH : Periodontal ligament. Orban's Oral Histology and Embryology, 10th ed., SN Bhaskar ed. : 198-231, Mosby (St Louis), 1986.
- 15) Mabuchi R, Matsuzaka K, Shimono M : Cell proliferation and cell death in periodontal ligaments during orthodontic tooth movement. J Periodont Res, 37 : 118-124, 2002.
- 16) 下野正基 : 健康な歯周組織, 歯周病と全身の健康を考える. ライオン歯科衛生研究所編, 12-19, 医歯薬出版(東京), 2004.