咬合機能を中絶したラット臼歯歯根膜に おける電子顕微鏡的变化

及 川 浩 志

鶴見大学歯学部口腔病理学教室（指導：秋吉正豊教授）

〔受付：昭和57年9月20日〕

Experimental study on ultrastructural changes in the rat molar periodontal membrane after discontinuation of occlusal function

Hiroshi Oikawa

Department of Oral Pathology, School of Dental Medicine, Tsurumi University.,

2-1-3, Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230

(Director : Prof. Masatoyo Akiyoshi)

[Accepted for publication : September 20, 1982]

Key words : periodontal membrane / fibroblast / collagen fibril / phagocytosis / degradation

Abstract : The ultrastructural changes in the process of extra and intracellular degradation of collagen fibrils and fibroblasts in the periodontal membrane of rat mandibular molar after discontinuation of occlusal function were investigated with an electronmicroscope and histochemically for demonstration of the activity of acid phosphatase (Barka and Anderson method). In addition, histological changes in the fibrous structure of the salt-insoluble collagen. The following results were obtained. 1) After discontinuation of occlusal function, the salt-insoluble collagen fiber bundles of the periodontal membrane underwent more rapid degradation on the alveolar bone side than on the cementum side. Acid phosphatase activity became much more increased in the fibroblasts on the alveolar bone side than on the cementum side of the periodontal membrane. 2) Electron microscopically, collagen fiber bundles mostly disappeared and became dispersed on the alveolar bone side. However, dispersed individual collagen fibrils usually exhibited banding structures. 3) In these areas, many of the fibroblasts phagocytosed small number of collagen fibrils. Some of collagen containing vesicles showed the activity of acid phosphatase and indicated development of phagolysosomes. 4) Fibroblasts with collagen containing vesicles seemed to be more increased on the alveolar bone side than on the cementum side. 5) The present study revealed that discontinuation of occlusal function results in increased activity of collagen degradation of the periodontal fibroblasts and normal occlusal force may inhibit the activity. 6) Local injection of cathepsin D induced rapid marked degradation of extracellular collagen fibers. At the same time, fibroblasts showed multiple phagocytosis of collagen fibrils in newly developed numerous cytoplasmic process and cytoplasm.

緒 言

咬合機能を営んでいる歯では、歯根膜内に歯根を懸垂するのに適した線維構造が発達している。このような線維構造は、歯根に加わる咬合圧の強さの変化や、作用方向の違いによく適応して、常に線維構造の改造が行われている。

歯根膜の線維芽細胞は、コラーゲンの生合成をする一方で、コラーゲンの分解に大きな役割りを果たしており、咬合機能を営んでいる場合には、歯根膜の線維芽細胞は上述の2つの働きで、調和のとれた状態を維持していると考えられる。

咬合機能を中絶した歯根膜では、コラーゲン線維束の消失が起こり、歯根の支持力に著しい低下をきたす (Chiba et al. 1981)¹⁾。このような場合の歯根膜の組織学的変化については、佐伯 (1959)²⁾、中村 (1979)³⁾らのラット臼歯についての報告があり、電子顕微鏡的には、雨宮ら (1980)⁴⁾の報告がある。しかしながら、対合歯抜去時に起こる歯根膜のコラーゲン線維の分解過程、ならびに線維芽細胞の役割りに関しては、まだ解明を要する点が残されている。これらの問題をさらに検索するためラット臼歯歯根膜について、電子顕微鏡的研究を行い、2, 3の点を明らかにすることができたので、これらの結果を報告したい。

材料および方法

1. 実験動物

実験には Wistar 系雄性ラット (6~8 週齢, 平均体重209g) 58匹を使用し、実験期間中は固型飼料、CE-2 (日本クレア) と水道水を自由に与えて飼育した。

2. 実験方法

1) 対合歯抜去にともなう歯根膜の変化に関する実験

ネンブタール麻酔下 (30mg/kg i.p. 以下同量) でラットの上前顎左側第1, 第2, 第3臼歯を抜去し、同側下顎臼歯の咬合機能を中絶した。

実験動物は対合歯抜去後3日, 7日の各時期に屠殺し、下顎第1臼歯近心側の歯根膜について検索した。

対照には、同一条件で飼育した未処置ラットの

顎第一臼歯近心側歯根膜を用いた。

(検索事項および標準作製方法)

(a) 歯根膜の塩不溶性コラーゲン線維の病理組織学的検索

実験動物は、ネンブタール麻酔下で断頭屠殺後、直ちに臼歯部下顎骨を摘出し、1MのNaClに4°C, 48時間振盪浸漬し、塩可溶性コラーゲンを抽出除去した。その後、10%中性緩衝ホルマリンで5~7日間固定し、Plank-Rychloの迅速脱灰液で脱灰、水洗の後、通法に従いパラフィン包埋を行い、下顎骨を近遠心方向に薄切し (厚さ6μm)、核染色抜きの van Gieson 染色を行った。

(b) 歯根膜の acid phosphatase 活性の酵素組織化学的検索

実験動物は、上記と同様に屠殺後、直ちに臼歯部下顎骨を摘出し、フレオン22ガススプレー (日新EM) で、下顎骨を凍結後、歯科用エンジンにダイヤモンドディスクを用いて近遠心方向に約1mmの厚さに薄切した。

その後、4% formol-calcium で4°C, 24時間浸漬固定し、10% EDTA-formol で4°C, 72時間脱灰、0.05M cacodylate sucrose buffer で4°C, 2時間洗浄後、下顎骨の cryostat 切片 (厚さ6μm) を作製した。acid phosphatase の組織化学的証明法には、Barka, T. and Anderson, P. J.⁵⁾のアゾ色素法を用いた。基質には、sodium α-naphthyl phosphate (BDH, product No. 40025) を使用し、同時に基質抜きの対照反応も行った。

(c) 歯根膜の電子顕微鏡的検索

実験動物は、ネンブタール麻酔下で開胸し、左心室より上行大動脈に灌流装置末端のカニューレを挿入し、落差圧による全身の灌流固定を行った。固定液は2% glutaraldehyde, 1% formaldehyde, 2% tannic acid 混合液、または2.5% glutaraldehyde 溶液 (いずれも、0.1M cacodylate buffer でpH 7.4に調整) を使用し、約30分間灌流した。灌流終了後、下顎左側第1臼歯を歯槽骨と一塊にして剔出し、灌流に用いたものと同種の固定液に4°C, 24時間浸漬し、再固定を行った。その後、4% EDTA-2Na (0.1M cacodylate buffer でpH 7.4に調整) で4°C, 3~4週間脱灰し、脱灰終了後、根尖部、歯槽頂部を除いた部位の歯

根膜を、歯槽骨とセメント質も含めて約1 mm³の大きさに、カミソリ刃で細切し、0.05M cacodylate sucrose buffer で4℃、24時間洗浄後、1% OsO₄ で4℃、1時間、後固定を行い、エタノール系列で脱水、QY-1で置換後、通法に従いEpon 812包埋を行った。超薄切片はDu Pont社製のSovall, MT-5000 ultra microtome にガラスナイフを用いて作製し、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を行い、JEM-100B 透過型電子顕微鏡で観察した。観察は主に、歯槽骨およびセメント質を含む歯根膜領域を、広視野低倍率で分割撮影し、それらを写真上で合成したパノラマ電顕写真を用いた。

(d) 歯根膜の acid phosphatase 活性の電顕酵素組織化学的検索

動物は、上記の電顕試料製作方法に順じ、2% glutaraldehyde, 4% formaldehyde 混合固定液(0.1M cacodylate buffer でpH 7.4に調整)で灌流固定後、下顎第1臼歯を歯槽骨と一塊にして剔出し、10% EDTA-2Na (0.1M cacodylate buffer で、pH 7.4に調整)で4℃、72時間脱灰、0.05M cacodylate sucrose buffer (20% DMSO 含有)で4℃、2時間洗浄後、下顎骨のcryostat切片(厚さ50μm)を作製した。acid phosphatase の組織化学的証明法はBarka, T. and Anderson, P. J.⁶⁾の金属塩法を用い、37℃、30分間反応を行った。基質には、β-glycerophosphoric acid disodium salt (東京化成)を使用し、同時に基質抜きの対照反応も行った。反応終了後、切片を0.05M cacodylate sucrose buffer で4℃、2時間洗浄、1% OsO₄ で4℃、1時間、後固定を行い、エタノール系列で脱水、QY-1で置換後、通法に従いSpurr包埋を行った。試料は超薄切の後未染色あるいは酢酸ウラニールとクエン酸鉛の二重染色を行い、JEM-100B 透過型電子顕微鏡で観察した。

2) 非特異的タンパク分解酵素の歯根膜におよぼす影響に関する実験

cathepsin D (SIGMA No. C-3138) の10 U./ml 水溶液をラットの上顎左側第1臼歯近心側の歯根膜内に1回注射(約0.03ml)したものを実験群とした。

対照には、同一動物の上顎右側第1臼歯近心側

の歯根膜を用いた。

実験動物は、cathepsin D の局所注射後2日目に屠殺し下記の事項について検索した。

(検索事項および標本作製方法)

(a) 電子顕微鏡的検索

実験1)の電顕試料作製方法に順じてEpon 812包埋を行い、上顎第1臼歯近心側の歯根膜を電子顕微鏡的に観察した。

実験結果

1. 歯根膜の塩不溶性コラーゲン線維の病理組織学的変化

1) 咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の塩不溶性コラーゲン線維の組織学的構造

塩可溶性コラーゲンを抽出した下顎第1臼歯近心側の歯根膜では(Fig. 1),すでに中村(1979)³⁾が報告しているように、van Gieson 染色液のフクシン液で赤染する塩不溶性コラーゲン線維が、歯槽骨壁と歯根面を結合する線維構造を形成していた。

これらの塩不溶性コラーゲン線維の多くは歯槽骨壁から根尖方向へ、斜めに走行する太い線維束を形成しており、線維束相互にも比較的細い線維束による連絡がみられた。

歯槽骨壁面とセメント質面では、とくに太い線維束を形成しており、しばしば歯槽骨あるいはセメント質に封入されている状態も観察された。

線維束間には、塩可溶性コラーゲン抽出時に同時に消失した線維芽細胞などの細胞成分の存在部位に相当するものと考えられる紡錘形、あるいは楕円形の空隙が散在性に認められた。

2) 対合歯抜去にともなうラット臼歯歯根膜の塩不溶性コラーゲン線維の変化

対合歯抜去後3日目(Fig. 2)の下顎第1臼歯近心側歯根膜における塩不溶性コラーゲン線維束は、歯槽骨壁側において、広範な消失をきたしていた。とくに歯槽骨壁面では、それまで付着していた多数の太い線維束は、ほとんど消失し、細く不規則な走行を示す少数の線維束のみが付着していた。

セメント質側では、多数の太い線維束が残存し、セメント質に付着している状態が観察された。

対合歯抜去後7日目 (Fig. 3) では、歯根膜の塩不溶性コラーゲン線維の消失はさらに進行し、歯槽骨壁面には、少数の細くなった線維束が散在性に付着しているのみであった。

また、歯槽骨壁とセメント質を結合していた線維束も広範に消失し、歯根にほぼ平行に走行する少数の細い線維束が認められるにすぎなかった。

セメント質面には、多数の比較的太いコラーゲン線維束が付着していた。

2. 歯根膜の acid phosphatase 活性の酵素組織化学的变化

1) 咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性

歯根膜の線維束間に散在している紡錘形の線維芽細胞には赤褐色の顆粒状反応物が細胞質内に限局して沈着していた (Fig. 4)。

これらの反応産物の沈着は歯槽骨壁面の骨芽細胞や破骨巨細胞の細胞質内にも認められ、とくに破骨巨細胞は多量の反応産物を有していた。

セメント質面では、根尖部第2セメント質面のセメント芽細胞に骨芽細胞と同程度の反応産物の沈着が認められたが、原生セメント質面のセメント芽細胞では、反応産物の沈着が一般に良好でなく、細胞質も第2セメント質のそれより萎縮性のものが多くみられた。

2) 対合歯抜去にともなうラット臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性の変化

対合歯抜去後3日目 (Fig. 5) の下顎第1臼歯近心側歯根膜においては、すでに中村 (1979)³⁾ が報告しているように、歯槽骨壁側の線維芽細胞の細胞質内に反応産物の沈着の増加があり、acid phosphatase 活性の増強が示唆された。

これに対して、セメント質側の線維芽細胞には、反応産物の沈着に明らかな増加は認められなかった。

歯槽骨壁面の骨芽細胞の反応産物の沈着は、その付近の線維芽細胞におけるほどの明らかな増加は認められなかった。また、原生セメント質面のセメント芽細胞にも反応産物の明らかな増加は認められなかった。

対合歯抜去後7日目 (Fig. 6) では、歯槽骨壁側の線維芽細胞内における反応産物は3日目のそ

れよりもさらに増加する傾向を示した。

セメント質側の線維芽細胞には、経日的な反応産物の増加傾向は認められなかった。

歯槽骨壁面には、肥大した細胞質内に多量の反応産物を有する骨芽細胞が多数存在しており、これらの細胞間には、歯槽骨壁面に付着する歯根膜線維束はほとんど認められなかった。

セメント質面に接するセメント芽細胞内の反応産物は少なく、増加傾向も認められなかった。

3. 電子顕微鏡による歯根膜の変化

1) 咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の超微構造

臼歯の長軸方向に相当する広視野の切片では (Fig. 7)、歯槽骨とセメント質との間の歯根膜腔には、比較的多数の線維芽細胞が散在性に認められ、歯槽骨壁面には、比較的大きな細胞質をもつ骨芽細胞が配列しており、セメント質面には、セメント芽細胞が認められた。また、血管腔を囲む内皮細胞の存在も認められた。

これらの細胞間には、多数のコラーゲン小線維の集合よりなる緊密で太いコラーゲン線維束が、横断面、縦断面、あるいは斜断面を呈して介在していた。

(a) 歯根膜コラーゲン線維の超微構造

咬合機能を営んでいるラット下顎第1臼歯近心側歯根膜のコラーゲン線維束を形成しているコラーゲン小線維は、縦断面では、コラーゲンに特徴的な周期性横紋構造 (56~66nm 周期) を示しており、横断面では、直径42~67nm のコラーゲン小線維が一定の間隔で規則正しく緊密に配列していた。これらの小線維間には、電子密度の比較的弱い線維間物質の存在がみられた (Fig. 8)。

また、コラーゲン小線維は、同一方向に配列して線維束を形成しているが、一部には多少異った方向に走行するものが混在していることがあり、まれにほとんどのコラーゲン線維束が消失している部位も認められた (Fig. 9)。

歯槽骨壁とセメント質に接する部位のコラーゲン線維束はとくに緊密で、しばしば歯槽骨とセメント質に封入されている状態も観察された。

その他の線維成分には、周期性横紋構造のない

フィラメント様微細線維の集合より成るオキシタン線維と考えられる線維も、まれに観察された (Fig. 10)。

(b) 歯根膜線維芽細胞の超微構造

歯根膜のコラーゲン線維束間に散在している線維芽細胞は、多少の差異はあるが、多くは紡錘形、あるいは星芒形の細胞形態を示し、細長く伸びた多数の細胞質突起を有していた (Fig. 7)。細胞質突起はしばしばコラーゲン線維束を取り囲むような形態のものも認められた (Fig. 8)。また、細胞質突起によって隣接する線維芽細胞相互が接着している所見もみられた (Fig. 7)。

星芒形の外形を示す線維芽細胞周囲のコラーゲン線維束は、横断面を呈していることが多く、これらは線維芽細胞の横断像に相当するものと考えられた。

線維芽細胞の核は、偏在し、比較的大きく、ほぼ楕円形で明調なものも多く、クロマチンは核膜にそって薄く沈着しており、核内には明瞭な核小体が見られることもあった (Fig. 7)。細胞内小器官は、粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、リボゾーム、ライソゾームなど良く発達しており、細胞質辺縁には、しばしば microfilament の発達が認められた (Fig. 11)。

細胞質内には、まれにコラーゲン小線維片を容れた小胞状膜構造 (vesicle) が認められた。このような線維芽細胞周囲のコラーゲン線維束は、限局性に疎開、あるいは消失をきたしていることがあった (Fig. 11)。

(c) 歯根膜の骨芽細胞およびセメント芽細胞の超微構造

歯槽骨壁面に接して認められる骨芽細胞は骨髄腔壁にみられるような肥大した卵円形の細胞質をもち、偏在した核と小器官に富む典型的な骨芽細胞の所見を示すものは少なく、紡錘形で、むしろ線維芽細胞に近い形態を示すものが多かった (Fig. 7)。これらの骨芽細胞の細胞質内には、粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、リボゾームなどの小器官が認められた。

第2セメント質面に接して認められるセメント芽細胞も、紡錘形の細胞質のものが多く、細胞質の肥大したものは、ほとんど認められなかった

(Fig. 7)。セメント芽細胞の細胞質内には、粗面小胞体、ミトコンドリアなどの小器官が認められた。

これらの細胞以外に、きわめてまれに肥満細胞や組織球のみられることがあったが、リンパ球、好中球などの炎症性細胞の出現は認められなかった。

2) 対合歯抜去にともなうラット臼歯歯根膜の超微構造的変化

(a) 対合歯抜去後3日目の歯根膜コラーゲン線維の変化

下顎第1臼歯近心側歯根膜では (Fig. 12)、歯槽骨壁側の骨芽細胞、およびその付近の線維芽細胞の細胞間隙の緊密な太いコラーゲン線維束は、一部を除いてほとんどみられなくなっており、不規則に狭窄した細胞間隙には、コラーゲン線維束の消失、疎開、あるいはコラーゲン小線維の走行の乱れなどが認められた。このような変化は、歯根膜の中央部近くまで波及していたが、中央部の細胞間隙には、比較的太いコラーゲン線維束の残存しているところが多く、セメント質面に近い部位には、かなり多量の太いコラーゲン線維束が残存していた。しかしながら、これらの太いコラーゲン線維束には、多少の疎開や、部分的消失が認められた。

線維束が疎開している部位のコラーゲン小線維は、数本の束をなして、不規則な走行を示していたが、その周期性横紋構造は明瞭であった。

線維束が消失している部位には、無構造な網状構造物などが認められることがあった (Fig. 13)。また、まれに長周期の横紋構造 (88~100nm) をもつ F.L.S. (fibrous long spacing) 様のコラーゲン線維の出現をみることがあった (Fig. 14)。

(b) 対合歯抜去後3日目の歯根膜線維芽細胞の変化。

歯槽骨壁側の歯根膜において、コラーゲン線維束が消失や疎開している部位に隣接する線維芽細胞は、細長く延長分岐した多数の細胞質突起をもっていた (Fig. 12)。

そのような部位の線維芽細胞は、互いに接近あるいは接着しており、細胞質は縮少し、細胞内器官の発達は乏しいものが多かったが、一部には、

肥大した細胞質をもち、小器官のよく発達しているものも認められた (Fig. 12)。

また、細胞質内には、コラーゲン小線維片の貪食像と考えられる小胞状膜構造が認められた。

線維芽細胞内のコラーゲン小線維片を容れた小胞状膜構造内には、1～3本のコラーゲン小線維片のみられることが多かったが、まれに6～8本容れているものもみられた。今回の観察では、その長さは2～20 μ mであった。その形態は直線状のもの他にヘアピン状に強く屈曲しているもの (Fig. 15)、あるいはコイル状に長いものが巻き込まれているもの (Fig. 16) もみられた。また、それらの周期性横紋構造は、明瞭なものから不明瞭なものまでの移行を示していた (Fig. 17)。周期性横紋構造の不明瞭なコラーゲン小線維片を容れた小胞状膜構造には、電子密度の高い、大小のライゾゾームと考えられる隆起物が付着していることが多かった (Fig. 18, 19)。

セメント質側のコラーゲン線維束間に介在する線維芽細胞の一部には、細胞質の萎縮を示すものも認められたが、多くは粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、リボゾームなどの発達した小器官をもつ比較的大きな線維芽細胞が認められた (Fig. 12)。また、一部の線維芽細胞内にはコラーゲン小線維片の貪食像もみられた (Fig. 20)。

(c) 対合歯抜去後3日目の歯根膜骨芽細胞およびセメント芽細胞の変化

骨芽細胞は、部位によって多少は異なるが細胞質は肥大する傾向を示していた。

このような骨芽細胞は、偏在する明るい核と比較的大きな核小体をもち、肥大した細胞質内には粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、リボゾームなどの発達した小器官が認められ、骨髓腔壁に出現する典型的な骨芽細胞に近い形態を示していた (Fig. 12)。

セメント芽細胞は、原生セメント質と第2セメント質ではかなり異なり、第2セメント質では、肥大した細胞質内に発達した小器官をもつものが認められたが、骨芽細胞のような著明な細胞質の肥大した所見はみられないことが多かった (Fig. 12)。

(c) 対合歯抜去後7日目の歯根膜コラーゲン線

維の変化

歯根膜腔は狭窄し、それにともない細胞間のコラーゲン線維束の多くは太さの減少をきたしていた (Fig. 21)。

歯槽骨壁側におけるコラーゲン線維束の消失や疎開は、歯槽骨面の肥大した骨芽細胞周囲にみられ、その部には多くの無構造物質や細胞内小器官の一部が散在していた (Fig. 21)。

セメント質側では、線維芽細胞およびセメント芽細胞の間隙に少量の疎開したコラーゲン線維束が認められた (Fig. 21)。

この時期のコラーゲン線維束の多くは、疎開し、走行も不規則であったが、周期性横紋構造は保たれていた。また、F.L.S. 様コラーゲン線維の出現は認められなかった。

(d) 対合歯抜去後7日目の歯根膜線維芽細胞の変化

歯根膜腔の狭窄化にともない、線維芽細胞の細胞質は萎縮し、細長い外形を呈してコラーゲン線維束間に介在していた (Fig. 21)。

これらの線維芽細胞は、互いに接近、あるいは接着しており、全体的に電子密度が高く、細胞の変性が疑われた。また、一部の線維芽細胞には、小器官の細胞外への放出像も認められ、細胞の崩壊像と考えられた (Fig. 22)。

細胞質内には、コラーゲン小線維片の貪食像がしばしば認められた (Fig. 23)。

細胞内小器官の発達は一般に乏しかったが、一部には良く発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアなどを有するものも認められた。

(e) 対合歯抜去後7日目の歯根膜骨芽細胞およびセメント芽細胞の変化

骨芽細胞は、肥大した細胞質と、偏在する明るい核、および大きな核小体を有しており、細胞質内には発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリアなどを豊富に有していた (Fig. 21)。

セメント芽細胞は、骨芽細胞に比較すると小さく、紡錘形の細胞質内には発達した粗面小胞体、ゴルジ装置、ミトコンドリア、リボゾームなどの小器官が認められた (Fig. 21)。

4. 対合歯抜去にともなう歯根膜線維芽細胞の電顕酵素組織化学的 acid phosphatase 活性

対合歯抜去後 8 日目の下顎第 1 臼歯近心側歯根膜についてのみ検索を行った。その結果、線維芽細胞ではコラーゲン小線維片を容れた小胞状膜構造内に、電子密度の高い虎斑様の鉛の沈着として、明らかな acid phosphatase 活性が認められ phagolysosome であることが示唆された (Fig. 24)。phagolysosome 内のコラーゲン小線維片の周期性横紋構造は不明瞭なものが多く、ライソゾーム酵素によるコラーゲン小線維片の細胞内消化が進んでいることが示唆された。またゴルジ装置、ライソゾームにも明らかな acid phosphatase 活性が認められた (Fig. 25)。

5. cathepsin D 投与にともなうラット臼歯歯根膜の超微構造的変化

(a) cathepsin D 投与後 2 日目の歯根膜コラーゲン線維の変化

歯根膜コラーゲン線維束は、広範な消失、疎開を示しており、比較的变化の軽い部位では、緊密なコラーゲン線維束の認められることもあったが、多くは疎開したコラーゲン小線維よりなる線維束で、線維の輪郭は比較的良好に保たれていたが、周期性横紋構造は、きわめて不明瞭であった (Fig. 26)。

変化がやや進んだ部位では、輪郭の保たれているコラーゲン小線維は少なく、線維束の消失している部位には、しばしば不規則な網状構造物がみられた。さらに変化の進んだ部位では、コラーゲン線維束の消失部位には不規則な点状構造物が認められるのみであった (Fig. 27)。

(b) cathepsin D 投与後 2 日目の歯根膜線維芽細胞の変化

線維芽細胞は不規則に延長分岐した多数の細胞質突起を有しており、細胞質内には、周期性横紋構造の不明瞭な多数のコラーゲン小線維片の貪食像が認められた (Fig. 26, 27, 28, 29)。しかしながら、細胞内小器官の発達は比較的良好であった。

6. 歯根膜コラーゲン線維の変化

対合歯抜去後 3 日目の歯根膜では、すでに述べたように、歯槽骨壁に近い部位の細胞間のコラーゲン線維束に消失が起こっていた。そのようなコラーゲン線維束の消失過程をみると、変化の比較

的軽い部位では、コラーゲン線維束を形成しているコラーゲン小線維はしだいに疎開し、走行の乱れを示すようになり、その後、コラーゲン小線維は消失を起こすが、それらの変化は、とくに線維芽細胞周囲において明らかであるようにみえた。

上記の部位においては、残存しているコラーゲン小線維は、コラーゲンに特徴的な周期性横紋構造を有していることが多かった。

コラーゲン小線維が完全に消失している部位には、しばしば不規則な網状構造物が認められ、ところによっては、比較的均質な基質の現われている部位も認められ、また、まれに F.L.S. 様コラーゲン線維の出現をみることもあった。

対合歯抜去後 7 日目の歯根膜では、コラーゲン線維束の消失部位は、線維芽細胞相互の接近、あるいは接着により細胞間隙の狭窄を起こしているために、線維束の消失部位は、3 日目のものより減少しているようにみえた。

cathepsin D 投与後 2 日目の歯根膜では、コラーゲン線維束の消失は、急速かつ高度であり、比較的線維の輪郭の保たれている部位においても、コラーゲン小線維の周期性横紋構造は認めにくくなっていた。このようなコラーゲン小線維の変化は、対合歯抜去時のコラーゲン線維の消失とは著しく異なるものであった。

7. 歯根膜細胞成分の変化

対合歯抜去後 3 日目の歯根膜では、コラーゲン線維束の消失部位に隣接する線維芽細胞は、萎縮性で細長く、不規則に延長分岐した細胞突起をもつものがかかり認められたが、一部には、肥大した細胞質と豊富な小器官をもつものも存在していた。

線維芽細胞の細胞質内には、しばしばコラーゲン小線維片の貪食像がみられ、acid phosphatase 活性を示す phagolysosome の存在も認められた。線維芽細胞によって貪食されたコラーゲン小線維片の周期性横紋構造は明瞭なものと、周期性横紋構造が不明瞭で、電子密度の高い物質によって被われているものが認められた。

対合歯抜去後 7 日目の歯根膜における著明な変化は、小器官を含む細胞質の薄片が歯根膜内にかなり広範に散在していることであった。しかしな

がら、骨芽細胞や一部の線維芽細胞、あるいはセメント芽細胞には発達した小器官を認めることができたため、固定の不良による人工産物とみなすよりも、細胞の崩壊像と考えられた。

この時期の線維芽細胞にも、コラーゲン小線維片の貪食像が認められ、その周期性横紋構造は明瞭なものと不明瞭なものが認められ、しばしば電子密度の高いものも混在していた。

なお、対合歯抜去後3日目、7日目の両群の骨芽細胞およびセメント芽細胞内には、コラーゲン小線維片の貪食像は認められなかった。

cathepsin D 投与後2日目の歯根膜では、線維芽細胞内にきわめて多量のコラーゲン小線維片の貪食像が認められ、その周期性横紋構造は不明瞭であった。また、線維芽細胞の細胞質突起は不規則に延長分岐、あるいは彎曲した形態のものが増加していた。細胞内小器官には明らかな障害像は認められなかった。

考 察

対合歯を抜去して、咬合機能を中絶した歯の歯根膜におこる主要な変化は、歯根膜内に歯根を懸垂するために発達しているコラーゲン線維の、すみやかな消失と、その部の線維芽細胞との関係であると思われる。

コラーゲン線維の分解、吸収には、破骨細胞、線維芽細胞、異物巨細胞、大喰細胞、血管内皮細胞、上皮細胞、白血球などの細胞が関与することが報告されている (Woessner, 1968)⁷⁾。

線維芽細胞によるコラーゲン線維の分解に関しては、電顕的に Perez-Tamayo (1970)⁸⁾ が、カラギニン肉芽腫のコラーゲン吸収時に線維芽細胞内にコラーゲン小線維の貪食様所見を報告しており、歯根膜においてもコラーゲン線維の分解、吸収には、その部の線維芽細胞が大きな役割りを演ずることが Ten Cate (1972)⁹⁾ 以来、多くの人々によって電顕的に明らかにされている^{10,11,12,13,14,15)}。

今回の実験においても、咬合機能中絶後におこる歯根膜のコラーゲン線維の消失過程には、線維芽細胞の積極的関与が考えられる。そこでコラーゲン線維の分解、細胞内貪食、およびその後の細胞内消化過程、またそれらの調整機構について、

実験結果をもとに考察してみたい。

1. コラーゲン線維の細胞外分解過程

1) 咬合機能の中絶によって、歯根膜コラーゲン線維は部分的に消失をきたすが、完全に消失していない部位のコラーゲン線維は疎開と走行の乱れを示すようになる。このような部位のコラーゲン小線維は native collagen に特徴的な周期性横紋構造を示していることが多い。

一方、数列のラットについて行った、ライソゾームのタンパク分解酵素の1つである、cathepsin D を歯根膜内に局所注射した場合のコラーゲン小線維の周期性横紋構造は消失あるいは不明瞭となっていた。したがって、咬合機能中絶時の歯根膜コラーゲン線維の分解に際しては、周期性横紋構造に消失や乱れをきたすようなタンパク分解酵素の作用は考えにくい。Gross and Nagai (1965)¹⁶⁾ は、オタマジャクシの尾の変態時に分泌されるコラーゲン分解酵素、すなわちコラゲナーゼが、コラーゲン (ATP 添加によって折出した S.L.S. type) の周期性横紋構造を障害することなく分解することを電顕的に明らかにしており、今回のコラーゲン分解に際しても、このような周期性横紋構造を障害しない、コラゲナーゼなどの中性の pH で活性を発揮するタンパク分解酵素が作用した可能性が示唆される。

Werb and Dingle (1976)¹⁷⁾ は、結合組織の線維芽細胞がコラゲナーゼを産生、分泌することを報告しているが、歯根膜の線維芽細胞がコラゲナーゼを分泌するか否かについては現在なお明らかにされていない (Rose et al. 1980)¹⁸⁾。しかしながら、今回、線維芽細胞周囲に、コラーゲン線維の消失像が多く認められる点から、線維芽細胞によるコラゲナーゼなどのタンパク分解酵素の分泌が示唆される。

2) コラーゲン線維の消失部位に、まれに出現した F.L.S. 様コラーゲンについての発生機序についてはまだ不明であるが、Schmitt^{19,20)} の生化学的研究によれば、F.L.S. や S.L.S. (Segmet long spacing) コラーゲンの形成は、可溶化したコラーゲン分子にコンドロイチン硫酸や ATP を添加した場合に起こるコラーゲン分子を単位とした再構成によるものであり、その場合のコラーゲン分子

の構造そのものは障害されていない。歯根膜における F.L.S. 様コラーゲンの出現にも、コラーゲン分子の構造を障害しない酵素などの影響が考えられるが、この点については今後の検索が必要である。

2. 歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン小線維の食食および細胞内消化過程

1) 咬合機能の中絶によって、コラーゲン線維の消失した歯槽骨壁側の線維芽細胞内には、しばしばコラーゲン小線維片の食食像が認められた。

咬合機能中絶後3日目について、歯槽骨壁側とセメント質側の線維芽細胞、各々195個の細胞質内に食食像のみられる頻度を求めた結果、歯槽骨壁側：38.3%，セメント質側：25.4%であった。このことはコラーゲン線維の分解はセメント質側よりも歯槽骨壁側において活発であることを示しており、Listgarten (1973)¹⁰⁾、Garant (1976)¹³⁾ からも歯根膜線維芽細胞の電顕的観察により、歯槽骨壁側の線維芽細胞により多くのコラーゲン小線維の食食像が認められたことを報告している。また、コラーゲン線維の消失部に隣接している骨芽細胞や、セメント質のセメント芽細胞には、コラーゲン小線維片の食食像は認められず、Deporter and Ten Cate (1980)²¹⁾ もマウス下顎臼歯歯根膜の電顕的観察より、これらの細胞にはコラーゲン小線維片の食食様所見は認められなかったことを報告している。

一方、cathepsin D 投与の場合の歯根膜では、細胞外における著しいコラーゲン線維の消失に際して、その部の線維芽細胞内に多数のコラーゲン小線維片の食食像が認められた。

このような所見から、細胞外におけるコラーゲン線維の分解の程度が強い場合には、細胞内食食も増加する可能性が示唆された。

2) 歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン小線維の食食、およびそれに続いて起こるライソゾーム酵素による細胞内消化の過程のうちで、コラーゲン小線維の食食の機序については、まだ十分に明らかにされていないが、コラーゲン小線維の細胞内消化過程については、かなり解明されている。

今回の検索では、細長く伸びた細胞質突起先端の陥入部に、しばしば一層の限界膜で被れた周期

性横紋構造の明瞭なコラーゲン小線維の一部分が細胞外と連絡していることがあったが、このような所見は、細胞外におけるコラーゲン線維の分解に続く初期の食食像とみなすことができるであろう。

線維芽細胞によって食食されたコラーゲン小線維片は、細胞内での消化過程において、コラーゲン小線維片を容れた小胞状膜構造いわゆる phagosome にしばしばライソゾームとの膜融合を示唆する所見や、acid phosphatase 活性を示すものが認められた。このようなコラーゲン小線維片はしだいに電子密度を増し、その周期性横紋構造も不明瞭となる傾向を示していた。このような所見は、すでに Deporter and Ten Cate (1973)¹¹⁾、Garant (1976)¹³⁾、Beertsen and Everts (1977)¹⁴⁾、Yajima and Rose (1977, 1980)^{18, 22, 23)}、Yamasaki et al. (1981)²⁴⁾、Melcher (1981)²⁵⁾ らによって報告されているコラーゲン小線維の細胞内消化像とみなすことができる。

咬合機能中絶時のコラーゲン線維の消失部に隣接する線維芽細胞、および cathepsin D 投与時のコラーゲン線維の細胞外分解が進展している部の線維芽細胞には、多数の細長く延長した細胞質突起の発達がみられ、その細長い突起内には、しばしばコラーゲン小線維の食食像が認められた。Yajima and Rose (1977)²²⁾ のヒト歯肉由来の線維芽細胞の培養実験では、コラーゲン小線維の活発な食食部位に細長い細胞質突起の発達を示唆する所見が認められている。

このような所見から、コラーゲン線維の分解、および消失部位における線維芽細胞の細胞質突起の発達は、コラーゲン小線維の活発な食食に関連した反応性変化と考えられるが、この点についてはさらに研究をすすめたい。

3. 歯根膜線維芽細胞によるコラーゲンの生合成と分解の調整機構

Ten Cate ら (1975, 1976)^{12), 26)} は、歯根膜の線維芽細胞がコラーゲンの生合成と細胞外コラーゲン線維の分解に積極的に大きな役割りを演ずることを明らかにしている。

今回の実験では、すでに述べたように、咬合機能を営んでいる歯根膜では、塩不溶性コラーゲン

線維束が発達しており、線維芽細胞の acid phosphatase 活性に著しい部位別の差は認められないが、咬合機能を中絶した歯根膜では、歯槽骨壁側の塩不溶性コラーゲン線維束は消失し、同時にその部の線維芽細胞に acid phosphatase 活性の著しい増強が認められている。電顕的には、コラーゲン線維束の消失部の線維芽細胞内にコラーゲン小線維片を容れた phagosome あるいは phagolysosome が認められ、線維芽細胞による、歯根膜コラーゲン線維の分解、および消化の亢進が示唆された。これらの線維芽細胞は、豊富な粗面小胞体を有しており、コラーゲンの生合成を著しく障害しているような所見はみられなかった。

このような所見から、咬合機能の中絶は歯根膜線維芽細胞によるコラーゲン線維の分解能を著しく強める可能性が考えられる。すなわち、咬合圧が作用している歯根膜においては、この部の線維芽細胞の分解能の増強をおさえて、歯根膜の線維構造の維持に必要なコラーゲンの生合成が行われていることが考えられる。

結 論

今回の研究では、咬合機能中絶時に、歯根膜に発現する変化を、主にコラーゲン線維の線維構造と、線維芽細胞について、光顕的、ならびに電顕的に検索して次の点を明らかにした。

1. 咬合機能中絶時の歯根膜では、歯槽骨壁面に付着していた太い塩不溶性コラーゲン線維束は、急速に融解消失したが、セメント質面に付着していた塩不溶性コラーゲン線維束には、このような変化は遅れて発現した。塩不溶性コラーゲン線維束消失部では、線維芽細胞内に acid phosphatase

活性の増強がみられた。

2. 電顕的には、このようなコラーゲン線維束の融解消失に関連して、その部の線維芽細胞内には、コラーゲン小線維片の食食像の増加がみられ、acid phosphatase 活性を示す phagolysosome の存在も認められた。

3. 細胞外のコラーゲン線維の分解には、コラーゲン小線維の周期性横紋構造に著しい障害を与えないコラゲナーゼなどの、中性のタンパク分解酵素や、コラーゲン小線維間物質の分解酵素などの作用が考えられた。

4. 線維芽細胞によるコラーゲン小線維の食食には、細胞外におけるコラーゲン線維の分解が大きな影響を与える可能性が考えられた。

5. 歯根膜におけるコラーゲン線維の消失に大きな役割りを果たす線維芽細胞の分解能の増強には、機能的要請の中絶が関係していることが明らかにされた。

6. cathepsin D 投与時の歯根膜では、コラーゲン線維束の広範な融解消失に際して、その部の線維芽細胞内に多数のコラーゲン小線維片の食食像が認められた。

謝辞：稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜った、本学口腔病理学教室、秋吉正豊教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本学口腔病理学教室、菅原信一教授、ならびに教室員各位の御理解と御協力に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第24回春季日本歯周病学会総会(1981年5月)、第24回秋季日本歯周病学会総会(1981年10月)、第60回 IADR 総会(1982年3月)において発表した。

抄録：実験的に咬合機能を中絶させたラット臼歯の歯根膜について、光顕的、ならびに電顕的に検索し、歯根膜コラーゲン線維の消失過程、およびその場合の線維芽細胞の役割りと変化について考察した。

咬合機能の中絶により歯槽骨壁面に付着していた塩不溶性コラーゲン線維は急速に消失し、同時にその部の線維芽細胞には、acid phosphatase 活性の増強が認められた。電顕的には、コラーゲン線維の消失、および疎開が認められ、その部の線維芽細胞内には、コラーゲン小線維片の食食像と、acid phosphatase 活性を示す phagolysosome の存在が観察された。このようなコラーゲン線維の消失には、コラーゲンの周期性横紋構造を障害しないコラゲナーゼなどの中性のタンパク分解酵素の影響が示唆された。歯根膜のコラーゲン線維の消失に、大きな役割りを果たす線維芽細胞の分解能の増強には機能的要請の中絶が関係していることが明らかになった。また、cathepsin D 投与時の歯根膜では、コラーゲン線維束の広範な融解消失に際して、その部の線維芽細胞内に多数のコラーゲン小線維片の食食像が認められた。

文 献

- 1) M. Chiba, S. Ohsima, T. Kuroda, S. Ohkawa: Effects of repeated shortenings and of artificial restraint on the tensile strength of the periodontium of the rat mandibular incisor. *Arch. Orad. Biol.* **26**: 135-141, 1981.
- 2) 佐伯 誠：ラット大白歯の歯周組織における実験的廃性萎縮の発生過程およびその修復過程について。口病誌 **26**: 317-347, 1959.
- 3) 中村 享：歯根膜における不溶性コラーゲン線維の変化と線維芽細胞の lysosome 酵素との関係に関する組織化学的研究。日歯周誌 **21**: 284-305, 1979.
- 4) 雨宮 璋, 阿部 智：ラットの歯根膜に及ぼす対合歯抜去の影響に関する電子顕微鏡的研究。歯基礎誌 **22**: 72-83, 1980.
- 5) Barka, T. and Anderson, P. J.: Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* **10**: 741-753, 1962.
- 6) Barka, T. and Anderson, P. J.: *Histochemistry Theory, Practice and Bibliography*. 239, Hoeber Med. Div. Harper & Row, Pub., New York 1965.
- 7) Woessner, J. F. Jr.: Biological mechanisms of collagen resorption. In *Treatise on Collagen*. Vol. 2, Part, B, ed. by Gould, B. S. 309 Academic Press, New York, 1968.
- 8) Perez-Tamayo, R.: Collagen resorption in carrageenin granulomas, II Ultrastructure of collagen resorption. *Lab. Invest.* **22**: 142-159, 1970.
- 9) Ten Cate, A. R.: Morphological studies of fibroblast in connective tissue undergoing rapid remodeling. *J. Anat.* **112**: 401-414, 1972.
- 10) Listgarten, M. A.: Intracellular collagen fibrils in the periodontal ligament of the mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit. *J. Periodont. Res.* **8**: 335-342, 1973.
- 11) Deporter, D. A., Ten Cate, A. R.: Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen-containing vesicles of fibroblasts. *J. Anat.* **114**: 453-461, 1973.
- 12) Ten Cate, A. R., Deporter, D. A.: The degradative role of the fibroblast in the remodelling and turnover of collagen in soft connective tissue. *Anat. Rec.* **182**: 1-14, 1975.
- 13) Garant, P. R.: Collagen resorption by fibroblasts. A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal Ligament. *J. Periodontol.* **47**: 380-390, 1976.
- 14) Beertsen, W., Everts, V.: The site of remodelling of collagen in the periodontal ligament of the mouse incisor. *Anat. Rec.* **189**: 479-498, 1977.
- 15) Svoboda, E. L. A., Brunette, D. M., Melcher, A. H.: In vitro phagocytosis of exogenous collagen by fibroblasts from periodontal ligament: an electron microscopic study. *J. Anat.* **128**: 301-314, 1979.
- 16) Gross, J., Nagai, Y.: Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. N. A. S.* **54**: 1197-1204, 1965.
- 17) Werb, Z., Dingle, J. T.: Lysosomes as modulators of cellular functions. 3. Secretion of neutral proteinase from fibroblasts. In *Lysosomes in Biology and Pathology*. ed. Dingle, J. T. and Dean, R. T., 5, North Holland Publishing. Amsterdam. 1976.
- 18) Rose, G. G., Yajima, T., Mahan, C. J.: Human gingival fibroblast cell lines in vitro. *J. Periodont. Res.* **15**: 53-70, 1980.
- 19) *International review of connective tissue research*, 2. ed. Hall, D. A. 9-11, Academic Press, New York, 1964.
- 20) Schmitt, F. O., Gross, J., Highberger, J. H.: States of aggregation of collagen. *Symp. Soc. Exp. Biol.* **9**: 148-162, 1955.
- 21) Deporter, D. A., Ten Cate, A. R.: Collagen resorption by periodontal ligament fibroblasts at the hard tissue-ligament interfaces of the mouse periodontium. *J. Periodontol.* **51**: 429-432, 1980.
- 22) Yajima, T., Rose, G. G.: Phagocytosis of collagen by human gingival fibroblast in vitro. *J. Dent. Res.* **56**: 1271-1277, 1977.
- 23) Yajima, T., Rose, G. G., Mahan, C. J.: Human gingival fibroblast cell lines in vitro. *J. Periodont. Res.* **15**: 267-287, 1980.
- 24) Yamasaki, A., Rose, G. G., Mahan, C. J.: Collagen degradation by human gingival fibroblasts. *J. Periodontol. Res.* **16**: 309-322, 1981.
- 25) Melcher, A. H., Chan, J.: Phagocytosis and digestion of collagen by gingival fibroblasts in vivo: A study of serial sections. *J. Ultrastruct. Res.* **77**: 1-36, 1981.
- 26) Ten Cate, A. R., Deporter, D. A., Freeman, E.: The role of the fibroblasts in the remodelling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am. J. Orthod.* **69**: 155-168, 1976.

Fig. 1 Well developed salt-insoluble collagen fiber bundles in the periodontal membrane of the functioning rat mandibular molar.

Fig. 2 Marked reduction in number and thickness of the salt-insoluble collagen fiber bundles on the alveolar bone side of the periodontal membrane. Three days after discontinuation of occlusal function.

Fig. 3 Advanced disappearance of the salt-insoluble collagen fiber bundles on the alveolar bone side of the periodontal membrane. Seven days after discontinuation of occlusal function.

van Gieson stain without counter stain of nuclei. C : cementum, A : alveolar bone,

Fig. 4 Non-remarkable difference in acid phosphatase activity of the fibroblasts in the periodontal membrane of the functioning mandibular molar.

Fig. 5 Remarkable increase in acid phosphatase activity of the fibroblasts on the alveolar bone side of the periodontal membrane. Three days after discontinuation of occlusal function.

Fig. 6 Remarkable increase in acid phosphatase activity of the fibroblasts on the alveolar bone side of the periodontal membrane. Seven days after discontinuation of occlusal function.

localization of acid phosphatase
C : cementum, A : alveolar bone,

Fig. 7 Panorama electron micrograph of the periodontal membrane of the functioning mandibular molar. CB: cementoblasts, OB: osteoblasts, BV: blood vessel, C: cementum, A: alveolar bone (Original Mag. $\times 6400$)

Fig. 8 Fibroblasts on the cementum side of the periodontal membrane of the functioning molar. (Original Mag. $\times 85000$)

Fig. 9 Rare occurrence of the extracellular space without collagen fiber bundles. (asterisk). (Original Mag. $\times 6800$)

Fig. 10 Oxytalan fiber like fibrillar bundles without banding structure (asterisk) in the periodontal membrane of the functioning molar. (Original Mag. $\times 8500$)

Fig. 11 Collagen containing fibroblast in the periodontal membrane of the functioning molar. Dispersed extracellular collagen fibrils. (Original Mag. $\times 6000$)

Fig. 12 Panorama electron micrograph of the periodontal membrane of the non-functioning molar. Three days after discontinuation of occlusal function. Disappearance of the extracellular collagen fiber bundles on the alveolar bone side (asterisk). (Original Mag. $\times 1700$)

Fig. 13 Increased amorphous electron dense materials in the extracellular space without collagen fibers. Three days after discontinuation of occlusal function. (Original Mag. $\times 10000$)

Fig. 14 Collagen fibril showing FLS like long periodistiy in the extracellular space without collagen fibers. (Original Mag. $\times 27000$)

Fig. 15 Membrane bounded vesicle containing hairpin-like collagen fibril. (Original Mag. $\times 39600$)

Fig. 16 Coiled collagen fibrils in membrane bounded vesicle. (Original Mag. $\times 90000$)

Fig. 17 Collagen containing vesicles within the fibroblast. Some intercellular collagen fibrils dose not exhibit banding structure. (Original Mag. $\times 9900$)

Fig. 18 Collagen fibrils with indistinct banding stucture within phagolysosome. Fusion of lysosomes (arrow) with collagen containing vesicle. (Original Mag. $\times 15000$)

Fig. 19 Phagocytosed collagen fibrils are undergoing digestion and loss of banding structure in phagolysosome (asterisk) of the fibroblast. Other vesicle containing some collagen fibrils with banding structure (arrow). (Original Mag. $\times 10000$)

Fig. 20 Fibroblast with collagen containing vesicles in the periodontal membrane near the cementum. (Original Mag. $\times 8500$)

Fig. 21 Panorama electron micrograph of the atrophic periodontal membrane. Seven days after discontinuation of occlusal function. (Original Mag. $\times 2000$)

Fig. 22 Some of the organella like structures (arrow) in the extracellular apace with decreased amount of collagen fibrils. Seven days after discontinuation of occlusal function. (Original Mag. $\times 6800$)

Fig. 23 Phagocytosis of collagen fibrils within the fibroblast. Some of the organellas in the extracellular space (arrow)

Fig. 24 Acid phosphatase activity within collagen containing phagolysosome (arrow) of the fibroblast. Eight days after discontinuation of occlusal function. (Original Mag. $\times 10000$)

Fig. 25 Acid phosphatase activity in Golgi apparatus within the fibroblast (Original Mag. $\times 8500$)

Fig. 26 Increased phagocytosis of collagen fibrils in cytoplasm of fibroblast. Disappearance and loosening of extracellular collagen fiber bundles. Two days after treatment with cathepsin D. (Original Mag. $\times 11900$)

Fig. 27 Prominent development of elongated cytoplasmic processes of fibroblast in the periodontal membrane undergoing degradation of collagen fibers. Multiple phagocytosis of collagen fibrils in cytoplasmic processes. (OriginalMag. $\times 6800$)

Fig. 28 Multiple phagocytosis of collagen fibrils in cytoplasm or cytoplasmic processes of fibroblast
Fig. 29 in cathepsin D treated periodontal membrane. (Original Mag. $\times 20000/\times 10000$)