原 著

創傷の治癒後の歯根膜の恒常性維持に関する研究

—特にマラッセの上皮遺残の影響—

井 上 孝 榎 谷 保 信 橋 本 貞 充

福 増 一 浩 下 野 正 基

東京歯科大学病理学講座（主任：下野正基教授）

〔受付：平成6年9月8日，受理：平成6年11月15日〕

Homeostatic factors in periodontal ligament after wound healing

—Effect of Malassez's epithelial rest—

Takashi Inoue, Yasunobu Enokiya, Sadamitsu Hashimoto,

Kazuhiro Fukumashi and Masaki Shimono

Department of Pathology, Tokyo Dental College

(Chief : Prof. Masaki Shimono)

1-2-2 Masago, Mihama, Chiba 261, Japan

[Received on September 8, 1994, Accepted on November 15, 1994]

Key words : Periodontal ligament/PCNA/Malassez's epithelial rest/wound healing/Keratin

Abstract : Cell density and distribution, vascular area and Malassez's epithelial rest in wounded periodontal ligament were examined in three different areas of the beagle dog. Complete regeneration was observed in the wounded periodontal ligament. However, ankylosis between the wounded tooth and regenerated bone was sometimes seen 2 months after the operation. The blood vessels occupied approximately 17% of the middle area and 15% of the alveolar area, but only 4% of the cementum area. Significantly higher numbers of cells were observed in the cementum area than in both the alveolar and middle areas. The number of cells in the middle area that were positive for PCNA was significantly higher than that in both the alveolar and cementum areas. The percentage of PCNA-positive cells associated with blood vessels was approximately 64% in the middle area, 59% in the alveolar area and 30% in the cementum area. These results are extremely similar to those in normal periodontal ligament, except for the absence of Malassez's epithelial rests. These results suggest that the width of the periodontal ligament is most probably regulated by some effect of Malassez's epithelial rest.

抄録：ビーグル成犬に歯槽骨—歯根窩洞を形成した後に再生する歯根膜組織の細胞密度，血管分布，増殖細胞核抗原陽性率およびマラッセの上皮遺残の分布と密度を検索した。術後1カ月例で切断部には，周囲歯槽骨より伸びる細い骨組織が侵入しており，切断された歯牙との間に歯根膜様組織が再生し，歯牙の象牙質切断面には上下壁ともにセメント質が沈着していた。細胞成分はセメント質領域で最も多く，血管は中央部領域で最も高い値

を示していた。PCNA に陽性を示す細胞は中央領域に最も多く、これらの結果は対照群とほぼ同様であった。しかし再生歯根膜内には、マラッセの上皮遺残は観察できなかった。2 カ月例では部分的に再生し侵入した骨組織と歯牙とが強直を示す例が観察された。以上再生歯根膜内にはマラッセの上皮遺残が観察されずに強直が観察されたことより、マラッセの上皮遺残が歯根膜空隙の恒常性維持に大きく寄与している可能性があると思われた。

結 言

歯根膜は生涯一定の幅を維持し、障害に際してはその強い再生能をもって修復することは周知の事実である。しかしながらその生理的のみならず再生後の恒常性を維持する調節因子に関しては、十分な検索がなされていない。われわれは、正常なビーグル犬の歯根膜における細胞密度および血管の分布について形態計測ならびに免疫組織化学的に検索し、細胞成分はセメント質側に多く、血管は歯槽骨側に占有面積を広く持ち、さらに増殖細胞核抗原 (PCNA) の陽性細胞は中央部の特に血管周囲に多く存在していることを明らかにした¹⁾。またマラッセの上皮遺残はセメント質側にのみ存在し、およそ 2 % 程度の占有面積で存在していることも明らかにした¹⁾。このマラッセの上皮遺残については、発生学的、形態学的および生化学的研究が *in vivo*, *in vitro* を通じて研究が進められ、多くのことが解明されている。しかし、その働きについては、ほとんど知られていない。Berglunch *et al.* (1991)²⁾ は加齢によるマラッセの上皮遺残の占有、分布領域に有意差はないと報告し、これらのことよりマラッセの上皮遺残の存在が歯根膜空隙を一定に保つ因子のひとつである可能性が示唆されている。

本研究の目的は、ビーグル成犬に歯槽骨一歯根窩洞を形成した後に再生する歯根膜組織の細胞密度、血管分布、PCNA (増殖細胞核抗原: proliferating cell nuclear antigen) 陽性率およびマラッセの上皮遺残の分布と密度を正常な歯根膜と比較検討し、歯根膜の恒常性を維持する因子を検索することである。

材料および方法

実験動物には、ビーグル成犬 4 頭の上下顎前臼歯 (1 頭につき 14 本: 下顎片側 4 本, 上顎片側 3 本) を用いて、ネンブタール静脈麻酔下に口腔内をアルコールにて清掃し、前臼歯部に 2 % キシロカイン浸潤麻酔を施した。その後粘膜骨膜弁を形成し、滅菌生理食塩水の注水下にて直径が 1 mm のフィッシャーバーにて歯槽骨一歯根膜一歯牙一歯根膜一歯槽骨と切断し、粘膜骨膜弁を閉鎖して実験を終了した (Fig. 1)。実験後 2 頭を 1 カ月後に 2

頭を、他の 2 カ月後に両側頸動脈よりフォルモメタノール (37% フォルマリン: 99% メタノール: 蒸留水 = 1: 1: 2 V/V) 約 500 ml にて灌流固定を行った。灌流固定後、下顎および上顎を切り出し、同固定液にてさらに 24 時間浸漬固定を行った。その後実験部位を歯牙の長軸方向に唇舌のないし頬舌的に切り出し、10% EDTA 溶液にて約 2 カ月間脱灰した。脱灰後は通法に従い、脱水、パラフィン包埋を行い、厚さ約 5 ミクロンの切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色ならびに免疫組織化学染色を施し検鏡した。

免疫組織化学染色のためには、ヒストファイン SAB-PO (M) キット (ニチレイ、東京) を用いた。まず、パラフィン切片作製後に内因性のペルオキシダーゼを阻止するために 3 % の H_2O_2 加メタノールにて処理後、一次抗体として、低分子ケラチン (Cytokeratin, PKK-1, Lab system 社製: 以下 PKK-1 と略) および増殖細胞核抗原 (Proliferating cell nuclear antigen, PC-10, DAKO 社製: 以下 PCNA と略) をそれぞれ 50 倍または 100 倍に希釈して応用した。次いで、ビオチン標識 IgG, IgA, IgM よりなる二次抗体を作用させ、3.3 ジアミノベンチジン 4 塩酸塩トリス塩酸緩衝液にて呈色させ観察した。

計測は、1 カ月例、2 カ月例ともに切断された部位に再生した組織を対象に H-E 染色標本ならびに免疫染色標本をそれぞれ 200 倍で顕微鏡撮影し、カラー写真を作製した。ついでこの写真上で、切断面上に再生したセメント質様組織と切断面に侵入した歯槽骨様骨組織に向けて線を引きその線と平行になるように約 1 cm 間隔で線を引いた (文献 1 参照)。さらに各線を 3 等分し、セメント質様組織側 1/3 に位置する点ならびに歯槽骨様骨組織 1/3 に位置する点をそれぞれ結んだ。すなわち再生した歯根膜様組織を 3 等分し、1: セメント質側領域、2: 中央部領域、3: 歯槽骨側領域に分け計測領域とした。

計測領域における測定内容

- 1) H-E 染色標本写真上で、各計測領域面積に対する血管面積の占める割合を算出した (平均 ± 標準偏差%)。
- 2) PKK-1 免疫染色標本写真上で、各計測領域面積内に対する PKK-1 陽性細胞領域合計面積の割合を算出した (平均 ± 標準偏差%)。

1), 2) の計測はパーソナルコンピュータ (Apple

Fig. 1 Schema showing the method of cavity preparation in periodontal tissues.

Fig. 2 Schema showing the regeneration of the periodontal tissue following wounding. New bone invades into a space from alveolar bone and regeneration of periodontal ligament occurred except absence of Malassez's epithelial rest.

Macintosh IIfx) を用いて、画像解析プログラム (NIH Image, 1.47) にて解析した。

3) H-E 染色標本写真上で、歯根膜全領域内に存在する細胞数に対する、各領域内の細胞数の割合を算出した (平均±標準偏差%)。

4) PCNA 免疫染色標本写真上で、歯根膜全領域内と各計測領域内で、総細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の割合と、さらにこの PCNA 陽性細胞が血管周囲に位置する割合を算出した。なお血管周囲とは血管周囲 10 ミクロン以内に存在するものとした (平均±標準偏差%)。

3), 4) の計測は、写真上で細胞数を計測した。

以上 1) ~ 4) の計測値はすべて、Student t-test により統計学的に比較検討を行った。

なお対照群は、正常歯根膜組織としたが、これは先に報告したデータ¹⁾をそのまま使用し、実験群と比較検討した。

結 果

1. H-E 染色標本

1) 対照群

犬の正常歯根膜はセメント質寄りが細胞成分に富み、血管は歯槽骨寄りないしは中央部に多く認められ、マラッセの上皮遺残は数個~数十個の細胞塊としてセメン

ト質に近接して点在している像が観察された。またセメント質は不規則な添加線を示していた。

2) 実験群

1 カ月例で切痕部には、周囲歯槽骨より伸びる細い骨組織が侵入しており、切断された歯牙との間に歯根膜様組織が再生していた (Fig. 2 および 3)。歯牙の象牙質切断面には上下壁ともにセメント質が沈着し、周囲にはセメント芽細胞様細胞の配列も見られた。また、血管は中央部に再生した歯槽骨よりに多い傾向が見られた。切断された歯髄面は、基本的に骨様象牙質による閉鎖が観察された。しかし、中には歯髄腔内に向かって骨様象牙質が髄腔壁に沈着するものも見られた。再生歯根膜内には形態学的にマラッセの上皮遺残を見ることはできなかった。

2 カ月例でもほぼ 1 カ月例と同様の所見であった。

しかし部分的に侵入した再生骨組織と強直を示す例も観察された (Fig. 4)。

2. PCNA 免疫組織化学染色標本

1) 対照群

犬の正常歯根膜の PCNA 陽性所見は、核内が種々の

Fig. 3 One month after the experiment, newly formed bone invades into a wounded space. Periodontal ligament are found between new bone and new cementum which is produced on the cutting surface. D : dentin, Cem : cementum, PL : periodontal ligament, NPL : newly formed periodontal ligament, NB : Newly formed bone, NCem : newly formed cementum

Fig. 4 Two months after the experiment, a few occasion, so-called ankylosis between new bone and new cementum could be seen. D : dentin, Cem : cementum, PL : periodontal ligament

Table 1 Comparison between area of blood vessels in each of three areas between regenerated periodontal ligament (experiment) and control groups (Mean $\pm$ SD%).

	Cementum area	Mid area	Alveolar area
Experiment	4.37 $\pm$ 4.26	16.84 $\pm$ 15.99	15.06 $\pm$ 12.26
Control	2.52 $\pm$ 2.37	17.02 $\pm$ 12.35	23.89 $\pm$ 23.64
t-test	NS	NS	NS

NS: No significant difference

Table 2 Statistic analysis between area of blood vessels in each of three areas of the regenerated periodontal ligament (experiment) group (Mean $\pm$ SD%)

	Alveolar area 15.06 $\pm$ 12.26	Cementum area 4.37 $\pm$ 4.26	
Mid area 16.84 $\pm$ 15.99	NS	*	

NS: No significant difference * p<0.05

程度に褐色に染まる陽性像が観察された。また陽性細胞の分布は歯根膜内血管周囲に多い傾向が見られた。しかし、マラッセの上皮遺残は陰性であった。

2) 実験群

実験群の再生した歯根膜様組織内にも、対照群に見られたような PCNA 陽性細胞が血管周囲に多く点在して観察された。

3. PKK-1 免疫組織化学染色標本

1) 対照群

犬の正常歯根膜では、細胞質内が種々の程度に褐色に染まる PKK-1 陽性細胞集団が観察された。陽性を示した細胞は形態学的にマラッセの上皮遺残と一致していた。しかし、その他の歯根膜内の細胞は陰性であった。

2) 実験群

再生した歯根膜様組織内には PKK-1 に陽性を示す細胞は観察されなかった。

4. 各計測領域面積に対する脈管面積の占める割合

1) 対照群

各計測領域内での領域面積に対する割合は、歯槽骨側領域で最も高く 23.89 $\pm$ 23.64%，次いで中央部領域で 17.02 $\pm$ 12.35%，セメント質側領域で 2.52 $\pm$ 2.37%と最も低い値を示していた (Table 1)。

2) 実験群

各計測領域内での領域面積に対する割合は、中央部領

域で 16.84 $\pm$ 15.99%，歯槽骨側領域で 15.06 $\pm$ 12.26%とほぼ同じ値を示し、セメント質側領域で 4.37 $\pm$ 4.26%と最も低い値を示していた (Table 1)。しかしながら、いずれの領域でも対照群と実験群の間に有意差は見られなかった (Table 1)。実験群の中では、中央部領域と歯槽骨側領域には有意差がないものの、これらの双方はセメント質側領域といずれも有意差 (p<0.05) をもって高い値を示していた (Table 2)。

5. 歯根膜内において各計測領域内に存在する細胞数の割合

1) 対照群

歯根膜組織の中で各計測領域内に存在する細胞密度はセメント質側領域で 43.46 $\pm$ 6.27%と最も多く、次いで歯槽骨側領域で 30.96 $\pm$ 6.21%と続き、そして中央部領域で 25.58 $\pm$ 4.40%と最も少なかった (Table 3)¹⁾。

2) 実験群

再生した歯根膜組織の中で各計測領域内に存在する細胞密度は、セメント質側領域で 40.81 $\pm$ 5.72%と最も多く、歯槽骨側領域が 30.04 $\pm$ 5.93%で中央部領域の 29.15 $\pm$ 4.67%とほぼ同じ値であった (Table 3)。しかしながらいずれの領域でも対照群と実験群の間に有意差は見られなかった (Table 3)。実験群の中では、中央部領域と歯槽骨側領域には有意差がないものの、セメント質側領域はこれら2つの領域に対して有意差 (歯槽骨側領域: p<0.01, 中央部領域: p<0.001) をもって高い値を

Table 3 Comparison between cell density in each of three areas between regenerated periodontal ligament (experiment) and control groups (Mean $\pm$ SD%).

	Cementum area	Mid area	Alveolar area
Experiment	40.81 $\pm$ 5.72	29.15 $\pm$ 4.67	30.04 $\pm$ 5.93
Control	43.46 $\pm$ 6.27	25.58 $\pm$ 4.40	30.96 $\pm$ 6.21
t-test	NS	NS	NS

NS : No significant difference

Table 4 Statistic analysis between cell density in each of three areas of the regenerated periodontal ligament (experiment) group (Mean $\pm$ SD%).

	Alveolar area 30.04 $\pm$ 5.93	Mid area 29.15 $\pm$ 4.67	NS
Cementum area 40.81 $\pm$ 5.72	* *	* * *	

NS : No significant difference **p<0.01 ***p<0.001

Table 5 Comparison between area of Malassez's epithelial rest in each of three areas between regenerated periodontal ligament (experiment) and control groups (Mean $\pm$ SD%).

	Cementum area	Mid area	Alveolar area	Whole area
Experiment	0	0	0	0
Control	2.32 $\pm$ 1.53	0	0	0.76 $\pm$ 0.01

Table 6 Statistic analysis between PCNA positive cell population in each of three areas between regenerated periodontal ligament (experiment) and control groups (Mean $\pm$ SD%).

	Cementum area	Mid area	Alveolar area	Whole area
Experiment	1.92 $\pm$ 1.42	2.39 $\pm$ 1.70	1.28 $\pm$ 1.24	2.13 $\pm$ 1.23
Control	4.50 $\pm$ 2.71	5.72 $\pm$ 3.30	3.25 $\pm$ 2.01	4.40 $\pm$ 2.13
t-test	*	*	*	*

示していた (Table 4)。

6. 各計測領域内で領域面積に対する PKK-1 に陽性を示す細胞の総合計面積の割合

1) 対照群

PKK-1 陽性細胞はセメント質寄りにのみ観察されセメント質領域内での占有面積率は 2.32 $\pm$ 1.53% で、全歯根膜領域面積内では 0.76 $\pm$ 0.01% であった (Table 5) ¹⁾。

2) 実験群

PKK-1 陽性細胞は観察されなかった (Table 5)。

7. 各計測領域内で全細胞数に対する PCNA 陽性細胞の占める割合

1) 対照群

歯根膜組織の中で PCNA に陽性を示す細胞は、中央領域で 5.72 $\pm$ 3.30% と最高値を示し、ついでセメント質側領域の 4.50 $\pm$ 2.71%、そして歯槽骨側領域で 3.25 $\pm$ 2.01% と最も低い値を示した。全歯根膜領域内での PCNA 陽性細胞率は 4.40 $\pm$ 2.13% であった (Table 6) ¹⁾。

2) 実験群

再生した歯根膜様組織の中で PCNA に陽性を示す細

Table 7 Statistic analysis between PCNA positive cell population in each of three areas of the regenerated periodontal ligament (experiment) group (Mean $\pm$ SD%).

	Alveolar area 1.28 $\pm$ 1.24	Cementum area 1.92 $\pm$ 1.42	NS
Mid area 2.39 $\pm$ 1.70	NS	NS	

NS : No significant difference

Table 8 Comparison between PCNA positive cell population related to blood vessels in each of three areas between regenerated periodontal ligament (experiment) and control groups (Mean $\pm$ SD%).

	Cementum area	Mid area	Alveolar area	Whole area
Experiment	32.65 $\pm$ 35.75	64.37 $\pm$ 36.19	59.26 $\pm$ 40.37	51.12 $\pm$ 22.64
Control	27.81 $\pm$ 26.16	69.56 $\pm$ 24.75	49.43 $\pm$ 38.02	48.55 $\pm$ 14.13
t-test	NS	NS	NS	NS

NS : No significant difference

Table 9 Statistic analysis between PCNA positive cell population related to blood vessels in each of three areas of the regenerated periodontal ligament (experiment) group (Mean $\pm$ SD%).

	Alveolar area 59.26 $\pm$ 40.37	Cementum area 32.65 $\pm$ 35.75	NS
Mid area 64.37 $\pm$ 36.19	NS	NS	

NS : No significant difference

胞は、中央領域で2.39 $\pm$ 1.70%と最高値を示し、ついでセメント質側領域の1.92 $\pm$ 1.42%、そして歯槽骨側領域で1.28 $\pm$ 1.24%と最も低い値を示した。全再生歯根膜領域内のPCNA陽性細胞率は2.13 $\pm$ 1.23%であった。いずれの領域も対照群に比べ有意差(p<0.05)を持って低い値をしめていた(Table 6)。実験群の中では、いずれの領域も有意差を認めなかった(Table 7)。

8. 各計測領域内で全PCNA陽性細胞に対する血管周囲PCNA陽性細胞数の割合

1) 対照群

歯根膜内でPCNA陽性を示す細胞が血管周囲と関連しているものは、中央領域で69.56 $\pm$ 24.75%と最も多く、ついで歯槽骨側領域の49.43 $\pm$ 38.02%と続き、セメント質側領域では27.81 $\pm$ 26.16%と最も低い値を示した。全歯根膜内総細胞数でのPCNA陽性細胞が血管周

囲と関連しているものは48.55 $\pm$ 14.13%であった(Table 8)¹)。

2) 実験群

再生した歯根膜様組織の中でPCNA陽性を示す細胞が血管周囲と関連しているものは、中央領域で64.37 $\pm$ 36.19%と最も多く、ついで歯槽骨側領域の59.26 $\pm$ 40.37%と続き、セメント質側領域では32.65 $\pm$ 35.75%と最も低い値を示した。全再生歯根膜領域内総細胞数でのPCNA陽性細胞が血管と関連しているものは51.12 $\pm$ 22.64%であった。これらの値は対照群と有意差はなかった(Table 8)。また実験群の中でも、いずれの領域も有意差を認めなかった(Table 9)。

以上結果の4から8までの項目はまとめて、Figure 5(対照群)およびFigure 6(実験群)として折れ線グラフとした。

Fig. 5 Summary of the results in control groups.

考 察

歯根膜の創傷治癒と歯根膜腔の幅について、吉田 (1976)⁸⁾、堀田 (1977)⁹⁾、酒井 (1979)¹⁰⁾、Armitage (1986)¹¹⁾らが粘膜骨膜弁を形成後に歯槽骨、歯根膜、セメント質を経て象牙質に至る直径が約 2 mm の歯根膜窩洞を形成すると、術後 1 カ月で窩洞内に新生骨が侵入増殖し、象牙質面にはセメント質が新生沈着し、既存の歯根膜と同様の幅を持つ新生歯根膜が形成されるという一連の実験がある。さらに森村 (1980)¹²⁾は歯牙水平折断実験において、歯髓にまで至る窩洞を形成し、同様の知見を報告している。しかし彼等の研究ではマラッセの上皮遺残についての報告はなかった。

歯牙の移植における歯根膜の再生も外吸収とアンキローシスが問題となり、Andreasen (1981)¹³⁾は欠損の大きさが 2 mm² 以内の場合にはその周囲の歯根膜組織により修復が可能であるが、それ以上大きな移植歯の歯根膜の欠損があるとその部はアンキローシスに陥ると述べている。われわれの今回の実験も切断幅は約 1 mm であるが、歯牙全面の切断を行っているために、歯根膜が再生するべく面積は歯牙歯根の切断面積で、少なくとも 2 mm² 以上はあったが切断中心部でも完全に歯槽骨の侵入再生が観察された。これは健全な周囲歯根膜組織からの細胞が切断面に侵入増殖したものと考えられ、この部でも細胞密度、血管分布、PCNA 陽性細胞の分布など正常の歯根膜と全く同様で、マラッセの上皮遺残が見られないこと以外は再生が起こったことが示唆される。歯科

Fig. 6 Summary of the results in experimental groups.

矯正においても、強い力が移動歯牙に加わると、マラッセの上皮遺残に代謝障害性の変化が起こり破壊され、アンキローシスが起こる可能性や、さらに矯正力により表面吸収が起こった部位に再びセメント質が沈着する際にも、マラッセの上皮遺残がその部位に動くという報告もある¹⁴⁾。今回のわれわれの実験でも、2 カ月後の数例に歯牙の切断面にアンキローシスが観察された。つまりその部にマラッセの上皮遺残が存在していなかったことにより歯根膜の幅の維持、または再生現象に重要な影響を及ぼしていることが示唆される。

マラッセの上皮遺残に関しては、歯根膜組織内に細胞集団があることを Serres (1817)¹⁵⁾が報告し、その後 1884 年に Malassez¹⁶⁾が上皮成分であることを確認したことに始まる。マラッセの上皮遺残の発生に関しては、ヘルトウィッチの上皮鞘が歯根膜中に残存したものであり、通常成長発育後にも歯根膜内すべてに存在するが、特に辺縁において根尖よりも多く観察されると言われる (Johansen, 1970¹⁷⁾, Listgarten 1975¹⁸⁾)。また、マラッセの上皮遺残は歯根表面に近接して存在し、歯槽骨側では見られないとの報告があり、セメント質からは平均しておよそ 6.9~11.2 μm、歯槽骨側からは 116.6~158.9 μm 離れているという報告がある (Cutress and Crigger, 1974¹⁹⁾)。これらの結果はわれわれの検索と同様の所見であった。

マラッセの上皮遺残の動態については静止状態、増殖状態、変性状態、分化状態などの種々なる過程のものが観察され、分裂を示したという報告もある (Kvam and Gilhuus-Moe, 1970²⁰⁾, Main 1972²¹⁾)。また、放射性同位

元素や、電子顕微鏡ならびに組織化学的検索でも一定の条件下では増殖するという報告もある (Ten Cate 1965²²⁾, Gilhuus-Moe and Kvam 1972²³⁾)。具体的に歯頸部付近に存在するマラッセの上皮遺残は、局所の歯肉の炎症により活発に増殖し、付着上皮と結合することによりポケット上皮を形成すると述べている研究者もいる (Orban and Weinmann, 1942²⁴⁾)。また歯根嚢胞の上皮の由来についても、歯髓疾患による感染性の抗原性物質が根尖孔を通じて根管から出た時、通常は静止状態にあるマラッセの上皮遺残が増殖を開始し、嚢胞の裏装上皮になるという説が通説となっている。この根拠はマラッセの上皮遺残はすべての歯牙に存在し、根尖病変と口腔粘膜上皮とは通常離れて存在し、極めて小さな病変でも上皮が観察されているし、培養条件や刺激によりマラッセの上皮細胞が増殖を開始することなどによる (Moskowitz, 1971²⁵⁾, Ten Cate, 1972²⁶⁾, Valderhaug, 1972²⁷⁾)。また歯原性上皮性腫瘍の上皮成分も、マラッセの上皮に由来するという説が多い。

マラッセの上皮遺残はおおよそ4~10個の細胞集団より構成される場合が多く、それ以上のものも観察されたとの報告がある (Reeve and Wentz, 1962²⁸⁾, Valderhaug and Zander, 1967²⁹⁾)。その形態は楕円形、索状または房状などが多く、まれには歯根周囲を取り巻く網状の構造を取るものや、さらに付着上皮との連絡網を持つとしている研究者もいる (Cutress and Crigger, 1974¹⁹⁾, Spouge, 1980³⁰⁾, 1984³¹⁾, 1986³²⁾)。またマラッセの上皮遺残の大きさと数は加齢に関与するといわれ、加齢とともに数が減少するというもの (Wesseling and Beertsen, 1993³³⁾)、加齢とともにその数は減少するが、大きさは増加するというもの (Reeve and Wentz 1962²⁸⁾, Grant and Bernick 1969³⁴⁾)、反対に大きさは減少するという報告もある (Simpson 1965³⁵⁾)。これらマラッセの上皮遺残の加齢変化は、歯根膜内のセメント質瘤や歯髓内の象牙質瘤と関連していることも示唆されている (Grant and Bernick, 1969³⁴⁾, Moskowitz, 1971²⁵⁾)。最近の Berglund *et al.* (1991)²⁾ による研究では、幼若成犬の健康な歯根膜組織ではおよそ容積率として1.5%、老犬の健康な歯根膜組織ではおよそ容積率として1.7%を占めると述べている。Sterrett *et al.* (1993)³⁶⁾ は成犬と老犬でマラッセの上皮遺残を比較し、加齢とともにその数は減少したが、大きさは増加し、結局歯根膜内でのマラッセの上皮遺残占有率としては変わらないと述べ、さらに歯根からの距離は加齢とともに離れていると報告している。これらのことから、歯根膜の幅が生涯一定であるためにマラッセの上皮遺残の関与が強く示唆される。

マラッセの上皮遺残の機能については不明な点が多いが、周囲の歯周組織に少なからず影響を及ぼしているとする考え方が多い。なかでも1. 歯根膜腔の幅の維持 (Hodges, 1969³⁷⁾, Lindskog *et al.* 1988³⁸⁾)、2. セメント質形成のための刺激 (Orban 1952³⁹⁾)、3. 歯根吸収の保護 (Loe and Waerhaug, 1961⁴⁰⁾) などがいわれている。Spouge (1986)⁴¹⁾ は歯と歯根膜の間には常に一定の幅が必要で、この一定の幅が崩れた時にアンキローシス、歯の動揺および歯槽骨の吸収などが起こり、これらを司っているのはマラッセの上皮遺残の可能性があると述べている。今回のわれわれの結果はこの意見を支持するものであると考える。最近では Brunette *et al.* (1979)⁶⁾ はブタより分離したマラッセの上皮遺残の性格を検索し、プロスタグランジンや非プロスタグランジン性骨吸収活性化因子を産生し、これらが辺縁性歯周炎によって起こる歯槽骨の吸収に関与していると報告している。

以上のことより、歯根膜の創傷の治癒後に歯根膜は完全に治癒するが、その中にマラッセ上皮遺残が観察されず、時間の経過とともに強直部が観察されたことより、マラッセ上皮遺残が歯根膜空隙の恒常性維持に大きく寄与している可能性があると思われる。

結 論

本研究の目的は、ビーグル成犬に歯槽骨一歯根膜一歯根窩洞を形成した後に再生する歯根膜組織の細胞密度、血管分布、増殖細胞核抗原陽性率およびマラッセの上皮遺残の分布と密度を正常な歯根膜と比較検討し、歯根膜の恒常性を維持する因子を検索することである。

1. H-E 染色標本

1カ月例で切痕部には、周囲歯槽骨より伸びる細い骨組織が侵入しており、切断された歯牙との間に歯根膜様組織が再生していた。歯牙の象牙質切断面には上下壁ともにセメント質が沈着し、周囲にはセメント芽細胞様細胞の配列も見られた。また血管は中央部に再生した歯槽骨よりに多い傾向が見られた。再生歯根膜内には形態学的にマラッセの上皮遺残を見ることはできなかった。

2カ月例でもほぼ1カ月例と同様の所見であった。しかし部分的に侵入した再生骨組織と強直を示す例も観察された

2. 各計測領域面積に対する脈管面積の占める割合

各計測領域内での領域面積に対する割合は、中央部領域で $16.84 \pm 15.99\%$ と最も高く、次いで歯槽骨側領域で

15.06±12.26%と続き、セメント質側領域で4.37±4.26%と最も低い値を示していた。

3. 各計測領域内で領域面積に対する PKK-1 に陽性を示す細胞の総合計面積の割合

PKK-1 陽性細胞は全く観察されなかった。

4. 歯根膜内において各計測領域内に存在する細胞数の割合

再生した歯根膜組織の中で各計測領域内に存在する細胞密度は、セメント質側領域で40.81±5.72%と最も多く、歯槽骨側領域が30.04±5.93%、そして中央部領域が29.15±4.67%とほぼ同じ値であった。

5. 各計測領域内で全細胞数に対する PCNA 陽性細胞の占める割合

再生した歯根膜組織の中で PCNA に陽性を示す細胞は、中央領域で2.39±1.70%と最高値を示し、ついでセメント質側領域の1.92±1.42%、そして歯槽骨側領域で1.28±1.24%と最も低い値を示した。全再生歯根膜内での PCNA 陽性細胞率は2.13±1.23%であった。いずれの値も対照群に比べ低い値を占めていた。

6. 各計測領域内で全 PCNA 陽性細胞に対する血管周囲 PCNA 陽性細胞数の割合

再生した歯根膜組織の中で PCNA 陽性を示す細胞が血管周囲と関連しているものは、中央領域で64.37±36.19%と最も多く、ついで歯槽骨側領域の59.26±40.37%と続き、セメント質側領域では32.65±35.75%と最も低い値を示した。全再生歯根膜内総細胞数での PCNA 陽性細胞が血管と関連しているものは51.12±22.64%であった。

今回われわれの実験結果から歯根膜の創傷の治癒後にはマラッセ上の皮遺残が観察されず、数例に強直が観察されたことより、マラッセ上の皮遺残が歯根膜空隙の恒常性維持に大きく関与している可能性があると思われる。

文 献

- 井上 孝, 橋本貞充, 臼田 準, 下野正基: ビーグル犬における歯根膜の恒常性維持に関する因子の検索, 特に細胞と脈管分布, 密度の免疫組織化学的検討. 歯基礎誌 **35**: 485~495, 1993.
- Berglunch, T., Lindhe, J. and Sterrett, J. D.: Clinical and structural characteristic of periodontal tissue of young and old dogs. J. Clin. Periodont. **8**: 616~623, 1991.
- Salonen, J., Uitto, V. J., Pan, Y. M. and Oda, D.: Proliferating oral epithelial cells in culture are capable of both extracellular and intracellular degradation of interstitial collagen. Matrix **11**: 43~55, 1991.
- Uitto, V. J., Larjava, H., Peltonen, J. and Brunette, D. M.: Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament cells. J. Dent. Res. **71**: 1203~1211, 1992.
- Brunette, D. M., Melcher, A. H. and Moe, H. K.: Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions. Arch. Oral Biol. **21**: 393~400, 1976.
- Brunette, D. M., Heershe, J. N. M., Purdon, A. D., Sodek, J., Moe, H. K. and Assuras, J. N.: *In vitro* cultural parameters and protein and prostaglandin secretion of epithelial cells derived from porcine rests of Malassez. Arch. Oral Biol. **24**: 199~203, 1979.
- Abiko, Y., Saitoh, M., Inoue, T., Shimono, M. and Kaku, T.: Laminin localization and gelatinolytic activity of epithelial rest of Malassez grown on titanium. Bull. Tokyo Dent. Coll. **35**: 55~59, 1994.
- 吉田導子: 歯根窩洞における白亜質, 歯根膜および歯槽骨の再生に関する実験的研究. 歯科学報 **76**: 1179~1222, 1976.
- 堀田祐二: 無髄歯の歯根窩洞における白亜質, 歯根膜および歯槽骨の再生に関する実験的研究. 歯科学報, **77**: 487~519, 1977.
- 酒井康友: 歯根窩洞における歯牙支持組織の再生に関する実験的研究, 特に ³H-Thymidine autoradiography による再生初期の間葉細胞の増殖と分化について. 歯科学報 **79**: 461~488, 1979.
- Armitage, G. C.: Cementum, In Orban's Oral histology and embryology, 10th ed., pp. 175~197, 1986.
- 森村儀一: 歯牙および歯牙支持組織の創傷治癒に関する実験的研究. 歯科学報 **80**: 1723~1737, 1980.
- Andreasen, J. O. and Kristerson, L.: The effect of limited drying or removal of the periodontal ligament. Periodontal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. Acta Odontol. Scand. **39**: 1~13, 1981.
- Brice, G. L., Sampson, W. J. and Sims, M. R.: An

- ultrastructural evaluation of the relationship between epithelial rests of Malassez and orthodontic root resorption and repair in man. *Aust. Orthod. J.* **12** : 90~94, 1991.
- 15) Serres, A. : Essai sur l'anatomie et la physiologie des dents, ou nouvelle theorie de la dentition, 1st ed. p 28, Paris, Mequignon-Marvis, 1817.
 - 16) Malassez, L. : Sur l'existence de masses epitheliales dans le ligament alveolodentaire chez l'homme adulte et a l'etat normal. *Comptes Rendus-Societe de Biologie* **36** : 241~244, 1884.
 - 17) Johansen, J. : Incorporation of tritiated thymidine by the epithelial rests of Malassez after attempted extraction of rat molars. *Acta. Odont. Scand.* **28** : 463~470, 1970.
 - 18) Listgarten, M. : Cell rests in the periodontal ligament of mouse molars. *J. Periodont. Res.* **10** : 197~202, 1975.
 - 19) Cutress, T. W. and Crigger, M. : Cell rests of the sheep periodontium. *New Zealand Dent. Journal* **70** : 39~49, 1974.
 - 20) Kvam, E. and Gilhuus-Moe, O. : Uptake of ^3H -thymidine by an epithelial rest in the periodontal membrane. A preliminary report. *Acta. Odont. Scand.* **28** : 143~146, 1970.
 - 21) Main, D. M. G. : Odontogenic epithelial residues around rabbit mandibular cheek teeth. *J. Dent. Res.* **51** : 841 (abstr. #7), 1972.
 - 22) Ten Cate, A. R. : The histochemical demonstration of specific oxidative enzymes and glycogen in the epithelial rests of Malassez. *Arch. Oral Biol.* **10** : 207~213, 1965.
 - 23) Gilhuus-Moe, O. and Kvam, E. : Behavior of the epithelial remnants of Malassez following experimental movement of rat molars. *Acta. Odont. Scand.* **30** : 139~149, 1972.
 - 24) Orban, B. and Weinmann, J. P. : Diffuse atrophy of the alveolar bone (periodontosis). *J. Periodontol.* **13** : 13, 1942.
 - 25) Moskow, B. S. : Origin, histogenesis and fate of calcified bodies in the periodontal ligament. *J. Periodontol.* **42** : 131~143, 1971.
 - 26) Ten Cate, A. R. : The epithelial rests of Malassez and the genesis of the dental cyst. *Oral Surg.* **34** : 956~964, 1972.
 - 27) Valderhaug, J. : A histologic study of experimentally induced radicular cysts. *International J. Oral Surg.* **1** : 137~147, 1972.
 - 28) Reeve, M. R. and Wentz, F. M. : The prevalence, morphology and distribution of epithelial rests in the human periodontal ligament. *Oral Surg. Oral Medicine and Oral Pathology* **15** : 785~793, 1962.
 - 29) Valderhaug, J. and Zander, H. A. : Relationship of "Epithelial rests of Malassez" to other periodontal structures. *Periodontics.* **5** : 254~258, 1967.
 - 30) Spouge, J. D. : A new look at the rest of Malassez. A review of their embryological origin, anatomy, and possible role in periodontal health and disease. *J. Periodontol.* **51** : 437~444, 1980.
 - 31) Spouge, J. D. : The rests of Malassez and chronic marginal periodontitis. *J. Clin. Periodont.* **11** : 340~347, 1984b.
 - 32) Spouge, J. D. : A method of schematic three-dimensional reconstruction for studying the gross morphology of epithelial residues in periodontal ligament. *Arch Oral Biol.* **29** : 253~255, 1986a.
 - 33) Wesselink, P. R. and Beertsen, W. : The prevalence and distribution of Malassez in the mouse molar and their possible role in repair and maintenance of the periodontal ligament. *Arch. Oral Biol.* **38** : 399~403, 1993.
 - 34) Grant, D. A. and Bernick, S. : A possible continuity between epithelial rests and epithelial attachment in miniature swine. *J. Periodontol* **40** : 87~95, 1969.
 - 35) Simpson, H. E. : The degeneration of the rests of Malassez with age as observed by the apoxestic technique. *J. Periodontol.* **36** : 288~291, 1965.
 - 36) Sterrett, J. D., Lindhe, J. and Berglundh, T. : Epithelial remnants in the crestal periodontium of the dog. *J. Clin. Periodontol.* **20** : 109~116, 1993.
 - 37) Hodges, G. M. : Evolution of the mammalian periodontium. In : *Biology of the Periodontium*, eds. Melcher, A. H. and Bowen, W. H. pp 42, New York, Academic Press.
 - 38) Lindskog, S., Blomlof, I. and Hammarstrom, L. : Evidence for a role of odontogenic epithelium in maintaining the periodontal space. *J. Clin. Periodontol.* **15** : 371~373, 1988.
 - 39) Orban, B. : The epithelial network in the periodontal membrane. *J. Amer. Dent. Assoc.* **44** : 632~635, 1952.
 - 40) Loe, H. and Waerhaug, J. : Experimental re-plantation of teeth in dogs and monkeys. *Arch. Oral Biol.* **3** : 176~184, 1961.
 - 41) Spouge, J. D. : A study of epithelial odontogenic residues in the pig. *J. Periodontol.* **57** : 1164~1171,

1986.

- 42) Lambrichts, I., Creemers, J. and Van-Steenberghe, D. : Periodontal neural endings intimately relate

to epithelial rests of Malassez in humans. A light and electron microscope study. J. Anat. **182** : 153 ~162, 1993.