原 著

実験的辺縁性歯周炎の接合およびポケット上皮の細胞動態 —特に AgNORs の組織形態計測学的研究

阿 部 洋 一 郎

東北大学歯学部口腔病理学講座（指導：大家 清教授）

〔受付：平成 7 年 7 月 26 日，受理：平成 7 年 12 月 11 日〕

A histomorphometric study of AgNORs in cellular alterations of junctional and pocket epithelia
in experimental periodontitis

Yoichiro Abe

Department of Oral Pathology, Tohoku University School of Dentistry
(Director : Prof. Kiyoshi Ooya)

4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-77, Japan

[Received on July 26, 1995 ; Accepted on December 11, 1995]

Key words : periodontitis/junctional epithelium/pocket epithelium/AgNORs/dog

Abstract : The present study investigated changes in histological features and nuclear organizer regions (NORs) in the junctional and pocket epithelia of an experimental model of periodontitis in adult dogs were examined. In one group (the ligature group), a silk ligature was placed below the gingival margin for 1, 3, or 6 months. In the other group (the removal group), the dogs were followed up for 1, 3, or 6 months after removing the silk ligature, which had been applied for 6 months.

The results were as follows : 1. Histopathologically, both groups showed destruction and repair of the epithelium in marginal periodontitis. 2. On the basis of the silver staining of NORs (AgNORs), the mean number of AgNORs per nucleus (AgNORs number) of junctional and pocket epithelial cells in the control and experimental groups was in the range of 1.21~2.73. The mean AgNORs number increased with time in the ligature groups and decreased in the removal groups. The number of AgNORs per epithelial cell ranged from 0 to 5. In the control group, there was a larger number of AgNORs, clustered in the basal cell layer and apical junctional epithelium. During destruction of the epithelium in the ligature groups, AgNORs increased in all layers and showed a scattered distribution. During the repair of the epithelium in the removal groups, there initially was a reduced number of AgNORs in the basal layer. Subsequently, the mean AgNORs number approximated that in the control group.

The changes in the AgNORs number and distribution in junctional and pocket epithelia appear to be useful as indicators of destruction and repair of the epithelium in marginal periodontitis.

抄録：本研究は成犬の実験的辺縁性歯周炎モデルで、接合上皮とポケット上皮での組織像と AgNORs の変化

を検索した。実験群は、歯肉縁下グループを形成し縫合糸で結紮し、1, 3, 6カ月経過した結紮群と、結紮6カ月後に縫合糸を除去し1, 3, 6カ月経過した除去群とした。その結果、1. 病理組織学的に、結紮群は辺縁性歯周炎の発症・進行過程を、除去群は、治癒過程を示した。2. AgNORs染色の観察では、両群の上皮の平均AgNORs数は1.21から2.73の間で増減した。平均AgNORs数は、進行過程では増加、治癒過程では減少傾向を示した。AgNORs数は0から5の範囲で認められた。対照群では基底細胞層および接合上皮尖端部でAgNORs数が多かった。辺縁性歯周炎の進行につれてAgNORs数は基底細胞層から全層にわたり高くなり、治癒過程が進むと基底細胞層からAgNORs数が減少し、平均AgNORs数は対照群に近づいた。

以上の結果より辺縁性歯周炎の接合およびポケット上皮のAgNORsの数と分布は、病変の進行の程度をよく表していることが確認された。

緒 言

歯周組織に発生する歯周病は、大部分が炎症性疾患である。歯肉炎が進行し、炎症が歯根膜、歯槽骨および歯周炎に移行すると、病変は不可逆的となる。しかし、歯周組織の破壊は、深部組織に向かって一方的に進行するのではなく、適切な治療によっては、病変の進行を止めることや早期病変の組織学的状態にもどすことが可能とされている^{1,2)}。歯周組織の辺縁部に生じる辺縁性歯周炎は、主たる病因は歯垢中の細菌であり、病態は急性炎症を伴うことがあるが、主に慢性的過程をとり進行する。

歯肉炎から歯周炎への移行については、組織学的にPageとSchroeder¹⁾は歯肉炎の開始期、早期、確立期および歯周炎の発展期の4期に分けた。発展期では接合上皮はセメント質に沿って深部に侵入し、歯肉とセメント質との間には歯周ポケットが形成され、歯肉縁下の歯垢中の細菌はさらに根尖方向へ侵入し、歯根膜線維の破壊や歯槽骨の吸収を示す辺縁性歯周炎となる。ポケットの深化の過程には、接合上皮の破壊とセメント質表面からの剝離、上皮細胞の深部への伸長等がみられる³⁾。

歯周炎の初期病変としての接合上皮の変化については、ヒトにおける観察、イヌ、ラット等を用いた実験的歯周炎での光顕および電子顕微鏡的観察等が多く行われ、接合上皮の変性、細胞間結合の消失がポケット上皮形成の大きな要因であるといわれている⁴⁻⁶⁾。

辺縁性歯周炎の治癒には、病変部の炎症の消退が大きな役割をなし、接合上皮の深部への伸長の停止が必要である。臨床的には、辺縁性歯周炎の治療により罹患根面に結合繊維付着を得ることは難しく接合上皮との付着になるといわれている⁷⁻⁹⁾。また、歯肉、歯根膜および破壊された歯槽骨部の肉芽組織の癒着が治癒の特徴とされる。ポケット上皮は、創傷面を被覆する再生上皮の役割と類似した態度を示すと考えられる。したがって、辺縁性歯周炎の経過で接合およびポケット上皮の動態を知ることが重要であると考えられる。そして形態学的に、主

にヒトでの観察^{10,11)}、上皮の透過性¹²⁾、実験的観察¹³⁾等で述べられてきたが、その多くは電子顕微鏡を用いた内容となっている。

本研究では、実験的辺縁性歯周炎の発症・進行および治癒過程での、接合およびポケット上皮の変化について、病理組織学的および細胞活性能とその分布の組織計量形態学的検索を行い、比較検討することにより、上皮の細胞動態を明確にすることを目的とした。病理組織学的にはHematoxylin-Eosin染色法を用い、組織計量形態学的にはAgNORs染色法^{14,15)}(細胞の染色体の核小体形成部(Nucleolar Organizer Regions: NORs)関連蛋白を病理組織標本で鍍銀染色する方法)を用いた。

材料および方法

1. 動物の外科的処置

実験動物には、出産時より同一犬舎で飼育された健康な成犬11頭(4.5~9.4歳;平均5.8歳)を用いて、ペントバルビタールナトリウム(sodium pentobarbital)静脈麻酔下で、歯周炎に罹患していない上下顎左側犬歯、前臼歯、後臼歯にラウンドバー(#1/2)で近遠心セメントエナメル境部に歯肉縁下グループを作成し、外科用縫合糸(絹糸、 $\phi 0.9$ mm)で結紮した(Fig. 1)。

2. 実験群

1)対照群:外科的処置を施さなかった。2)結紮群:結紮期間は、1カ月、3カ月、6カ月の3群とした。結紮期間中は、ブラッシングおよび歯周処置は行わなかった。3)除去群:結紮6カ月後、ペントバルビタール静脈麻酔下で縫合糸を除去し、スクーリングを施し、1カ月、3カ月、6カ月経過させた除去群3群とした。除去期間中、毎日ブラッシングを、歯磨剤を用いずに行った。その他の歯周処置は行わなかった。動物は、本学附属動物実験施設にて、犬固形飼料(CD1,日本クレア社,東京)で飼育した。上記方法にて上下顎犬歯、前臼歯、後臼歯を含む、1)対照群:7歯、2)結紮群:結紮期間1カ

Fig. 1 Schematic representation of a cross section indicating the area (black) examined quantitatively.

G : groove below the gingival margin, L : ligature, PE : pocket epithelium, JE : junctional epithelium

月9歯, 3カ月9歯, 6カ月5歯, 3) 除去群: 6カ月結紮後除去期間1カ月9歯, 3カ月6歯, 6カ月4歯を得た。以上の実験は「東北大学における動物実験に関する指針」に基づいて行った。

3. 病理組織学的観察

ペントバルビタールナトリウム静脈麻酔下で, 滅菌生理食塩水 (500 ml, 加ヘパリン 150 IU/ml) で左右頸動脈より灌流固定 (1% glutaraldehyde と 4% paraformaldehyde (pH 7.2, 0.1M cacodylate buffer)) を, 30 分行った後, 上下顎骨を摘出した。摘出顎骨は, ダイヤモンドディスクにて1歯ごとに細断した後, thin Sectioning Machine (Gillings Hamco) にて歯根軸・頬舌側方向に連続的に厚さ約 1.5 mm の切片として 1% glutaraldehyde と 4% paraformaldehyde (pH 7.2, 0.1M cacodylate buffer, 4°C) で固定した。固定後, 4% EDTA 脱灰 (pH 7.2, 4週間, 加 3% glutaraldehyde, 4°C) を行い, 通法に従い, 脱水およびパラフィン包埋し, 厚さ

約 3 μ m の連続切片を作製した。染色は Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色, AgNORs 染色を行った。

AgNORs 染色には, Ploton ら¹⁴⁾の方法に従い, 1% 蟻酸水溶液に 2% グラチンを溶解させた溶液と 50% 硝酸銀水溶液を 1:2 の割合で暗室中で混合した溶液中で, 脱パラフィンした標本を 40 分間室温で反応させ, 蒸留水でよく洗浄した後, 脱水, 透徹して観察した^{14,15)}。

4. AgNORs 観察方法

AgNORs 染色標本においては, 接合およびポケット上皮を 40 倍で顕微鏡写真を撮影し, 特四切 (20.3×30.5 cm) の印画紙 (フジプロ WP, 富士写真フィルム, 東京) に焼き付け後, FUJI XEROX (Able 1300) で 2 倍に拡大コピーした。接合上皮先端を中心に半径 0.8 mm の半円内の上皮細胞全てについて核 1 個あたりの AgNORs 数を油浸対物レンズを用い 1,000 倍で計測し, 拡大コピー上に記入した。拡大コピーから上皮細胞の位置および各々の AgNORs 数をトレースし, マクロ撮影にて, スライドを作製した。35 mm フィルムスキャナ (Coolscan, ニコン, 東京) によりスライドを読み込み, パーソナルコンピュータ (Power Macintosh 8100/80AV) を用い, 上皮細胞の核 1 個あたりの AgNORs 数の 0 個をダークブルー, 1 個をグリーン, 2 個をライトグリーン, 3 個をイエロー, 4 個をオレンジ, 5 個をマゼンタに色分けし, 図示した。

結 果

1. H-E 染色標本

1) 対照群 (7 歯) (Fig. 2 (0))

接合上皮は, 基底細胞側では上皮突起は目立たず平坦で, 歯質側ではエナメル質表面に接合していた。ポケットの形成はみられなかった。セメントエナメル境から根尖方向への上皮の深部増殖はみられなかった。慢性炎症性細胞浸潤が上皮下で軽度に見られたが, 膠原線維の破壊はみられなかった。

2) 実験群 (42 歯)

(1) 結紮群 (23 歯) (Fig. 2 (+1, +3, +6))

結紮 1 カ月群: 接合上皮のセメント質に沿った深部への増殖がみられたが, 上皮突起はみられなかった。ポケット上皮では上皮突起の軽度の伸長がみられた。上皮内および上皮下に急性および慢性炎症性細胞浸潤, 膠原線維の破壊, 血管の増生がみられた (Fig. 2 (+1))。

結紮 3 カ月群: 接合上皮のセメント質に沿った深部への増殖がみられたが, 上皮突起は目立たなかった。ポッケ

0

Fig. 2 Histological changes of junctional and pocket epithelia in ligature groups (+) and removal groups (-). The ligature group was produced by placing a silk ligature below the gingival margin for 1 (+1), 3 (+3) and 6(+6) months. The removal group was followed up for 1(-1), 3(-3), and 6(-6) months after removing the silk ligature, which had been applied for 6 months.

+ 1

+ 3

+ 6

- 1

- 3

- 6

ト上皮では糜爛、潰瘍形成と上皮突起の伸長が目立った。上皮内および上皮下に慢性および急性炎症性細胞の高度の浸潤と膠原線維の破壊がみられた (Fig. 2 (+3))。

結紮 6 カ月群：接合上皮は、さらに深部へ増殖し、層の厚さの増加がみられた。ポケット上皮では糜爛、潰瘍形成と上皮突起の伸長が目立ち、網状となった。上皮内および上皮下に慢性および急性炎症性細胞の高度の浸潤、血管の増生と拡張、膠原線維の破壊がみられた (Fig. 2 (+6))。

(2) 除去群 (19 歯) (Fig. 2 (-1, -3, -6))

除去 1 カ月群：接合上皮の深部への増殖がみられたが、上皮突起は目立たなかった。ポケット上皮では糜爛と上皮突起の伸長はみられたが、菲薄となった。上皮内および上皮下の中等度の慢性炎症性細胞浸潤がみられた (Fig. 2 (-1))。

除去 3 カ月群：接合上皮の深部への増殖がみられたが、上皮突起は目立たなかった。ポケット上皮では糜爛と上皮突起の伸長がみられた。上皮内および上皮下に中等度の慢性炎症性細胞浸潤がみられた (Fig. 2 (-3))。

除去 6 カ月群：接合上皮の厚さの増加が目立ち、上皮突起は目立たなかった。ポケット上皮の上皮突起は目立たなくなった。上皮内および上皮下の軽度の慢性炎症性細胞浸潤がみられた。深部結合組織内の一部に瘢痕化がみられた (Fig. 2 (-6))。

2. AgNORs 染色標本

AgNORs は核内で点状かつ茶褐色に染色された。Figure 3 は結紮 6 カ月の AgNORs 染色標本の 1 例である。

1) 対照群 (2 歯中の 1 例を図示) (Fig. 4 (0))

接合上皮は、全体的には一核あたり AgNORs 数 1～2 個が主体で、平均 AgNORs 数は 1.55 であった。部分的には接合上皮先端部と基底細胞層に 2～3 個が多く分布し、歯質側細胞層では大部分が 1～2 個で占められていた。すなわち接合上皮では基底細胞層および先端部の活性能が歯質側細胞層より高くなっていた。

2) 実験群 (12 歯)

(1) 結紮群 (6 歯) (Fig. 4 (+1, +3, +6))

結紮 1 カ月群 (2 歯中の 1 例を図示)：接合上皮およびポケット上皮は、全体的には一核あたり AgNORs 数 2～3 個が主体で、平均 AgNORs 数は 2.14 であった。部分的には接合上皮およびポケット上皮の差はなく、基底細胞層で 2～3 個が主体であるが 4 個が増加していた。歯質側細胞層では 2～3 個が主体であった。すなわち接合上皮、ポケット上皮とも基底細胞層の活性能が歯質側細胞層より高くなっていた。また接合上皮とポケット上

Fig. 3 Light micrograph showing AgNORs of junctional epithelium (+6). Epithelial cell nuclei contain silver-stained AgNOR particles.

C : cementum

皮の活性能は同等であった (Fig. 4 (+1))。

結紮 3 カ月群 (2 歯中の 1 例を図示)：接合上皮およびポケット上皮は全体的には一核あたり AgNORs 数 2～3 個が主体であるが、4 個の増加が認められ、平均 AgNORs 数は 2.34 であった。部分的には接合上皮の歯質側細胞層で 2～3 個が主体であり、一部 4 個が認められ、接合上皮基底細胞層およびポケット上皮上皮突起部では 2～4 個が分布し、とくに結紮 1 カ月群に比して 4 個の増加が認められた。すなわち接合上皮、ポケット上皮とも基底細胞層および上皮突起部の活性能が歯質側細胞層より高くなっていた。また接合上皮とポケット上皮の活性能は同等であった (Fig. 4 (+3))。

結紮 6 カ月群 (2 歯中の 1 例を図示)：接合上皮およびポケット上皮は全体的には一核あたり AgNORs 数 3 個が主体で、平均 AgNORs 数は 2.39 であった。部分的には接合上皮の歯質側細胞層で 3～4 個が主体で、一部 5 個が認められた。基底細胞層は 3 個が主体で、4 個も認められた。上皮突起部は 2～3 個が主体で 4 個も認められた。すなわち接合上皮では基底細胞層の活性能が歯質側細胞層より低くなっていた。ポケット上皮では上皮突起部の活性能が歯質側細胞層より低くなっていた。また接合上皮とポケット上皮では接合上皮の活性能が高くなっていた (Fig. 4 (+6))。

(2) 除去群 (6 歯) (Fig. 4 (-1, -3, -6))

除去 1 カ月群 (2 歯中の 1 例を図示)：接合上皮および

ポケット上皮は全体的には一核あたり AgNORs 数 2 ～ 3 個が主体で、結紮 6 カ月群に比して 2 個の増加が顕著であり、平均 AgNORs 数は 2.08 であった。部分的には接合上皮の歯質側細胞層で 2 ～ 3 個が主体で、基底細胞層で 2 個が主体であった。ポケット上皮では歯質側細胞層で 3 個が主体で、4 個も認められるが、基底細胞層では 2 ～ 3 個が主体であった。すなわち接合上皮、ポケット上皮とも基底細胞層および上皮突起部の活性能が歯質側細胞層より低くなっていた。また接合上皮の活性能がポケット上皮より低くなっていた (Fig. 4 (-1))。

除去 3 カ月群 (2 歯中の 1 例を図示)：接合上皮およびポケット上皮は全体的には一核あたり AgNORs 数 2 ～ 3 個が主体で、平均 AgNORs 数は 2.21 であった。部分的には接合上皮の歯質側細胞層で 2 個が主体であった。ポケット上皮では歯質側細胞層が 2 ～ 3 個が主体で、基底細胞層では 2 個が主体であった。上皮突起部は 3 個が主体であった。すなわち接合上皮、ポケット上皮とも基底細胞層の活性能が歯質側細胞層より低くなっていた。また接合上皮の活性能がポケット上皮より低くなっていた (Fig. 4 (-3))。

除去 6 カ月群 (2 歯中の 1 例を図示)：接合上皮およびポケット上皮は全体的には一核あたり AgNORs 数 1 ～ 2 個が主体で、平均 AgNORs 数は 1.87 であった。部分的には接合上皮の歯質側細胞層で 1 ～ 2 個であり、基底細胞層で 1 ～ 3 個が認められた。ポケット上皮では歯質側細胞層で 2 個が主体で、基底細胞層では 3 個が主体であった。上皮突起部は 1 ～ 2 個が主体であった。すなわち接合上皮、ポケット上皮とも基底細胞層の活性能が歯質側細胞層より高くなっていた。また接合上皮の活性能がポケット上皮より低くなっていた (Fig. 4 (-6))。

各群における平均 AgNORs 数の推移をみると、結紮 1 カ月後では増加を示し、その後、結紮 6 カ月後まで微増傾向を示し、除去後は減少傾向がみられ、6 カ月で対照群の値に近づいていた (Fig. 5)。

各群での全核数に占める AgNORs 数 0 ～ 5 個の割合をみると、各群ともに、AgNORs 数 2 個をピークとしていた。対照群では 1 個以下の割合が 3 個以上と比較して高かった。結紮群では 1 個より 3 個の割合が高かった。除去群では 1 個以下の割合が結紮群より高かった (Table 1, Fig. 6)。

Fig. 5 Scattergram showing the mean number of AgNORs per nucleus in the ligature groups (+) and removal groups (-).

Table 1 Changes in AgNORs percentage for cells in the ligature groups (+) and removal groups (-).

Group (nuclei)	AgNORs number					
	0	1	2	3	4	5
0 (724)	13.1	33.7	36.3	13.0	3.7	0.2
+ 1 (1016)	2.7	15.7	53.7	25.3	2.4	0.2
+ 3 (2859)	1.0	13.5	44.4	33.2	6.8	0.7
+ 6 (2628)	0.8	19.8	36.2	33.7	9.0	0.5
- 1 (2096)	2.9	29.1	35.1	28.9	3.9	0.1
- 3 (1395)	1.6	18.1	42.5	32.4	5.2	0.2
- 6 (1508)	3.1	28.7	36.1	30.9	1.2	0.0

考 察

辺縁性歯周炎のモデルとして、実験的に歯周炎を発生させるために、糸の歯頸部結紮が、歯垢、歯石の付着を容易にすることと操作が容易かつ確実であるので、古くからイヌ^{16,17)}、サル¹⁸⁻²⁰⁾等に用いられている。歯周炎は慢性疾患であるので、実験期間を長くすることが病変の経過を知る上で必要と思われた。

辺縁性歯周炎の病変の進行と治癒の組織学的な判定基準には炎症性細胞浸潤の種類と多寡がある¹⁾。本研究の結紮群では急性炎から慢性炎への移行がみられたが、特に急性炎時にはポケットの形成と糜爛がみられた。結紮群では経過とともに組織破壊が進み、病変は根尖側に進行を示したが、除去群では炎症の消退と瘢痕化がみられ治癒を表し、ヒト類似の経過を示したと考えられた。

辺縁性歯周炎での接合上皮は、硬組織であるセメント質と接合し、外界から生体の結合組織を保護する役割を有している。上皮下の結合組織が炎症性細胞の浸潤により、特に根面に結合した歯根膜線維が失われることが主な原因となり、接合上皮は根面に沿って根尖側方向に伸長すると考えられる²¹⁻²⁴⁾。ポケットの形成は、接合上皮の歯冠側端での炎症の増強により接合上皮細胞が変性、脱離することから始まり、さらに深化する過程で、接合上皮は歯面から剥離して、ポケット上皮になると報告されている^{3-6,25)}。ポケット上皮は、歯周炎の進行による結合組織の破壊を補填する形での増殖がみられ、潰瘍の治癒修復機転として考えられた²⁶⁻²⁸⁾。

歯肉上皮細胞の移動については、放射性同位元素を用いたサルの接合上皮細胞のターンオーバーが付着歯肉上皮細胞の8.9日より早い4.6日で、その理由として炎症

Fig. 6 AgNORs percentage for cells in the ligature groups (+) and removal groups (-).

による変化であろうとの報告²⁹⁾がある。本研究では接合上皮およびポケット上皮の活性能の検索法として、AgNORs法を用いたが、AgNORs数が細胞の増殖、分裂能、生物学的悪性度と関連するという結果から病理診断の有用性が認められている^{15,30-32)}。特に癌細胞での利用が試みられており、ヒト食道癌での核1個あたりの平均AgNORs数は約7.12³⁰⁾で、本研究では炎症による接合上皮およびポケット上皮では1.21~2.73で増減し、正常の上顎洞粘膜の0.91±0.12³¹⁾より高く、上皮異形成の5.61±4.03³²⁾より低い値を示した。

AgNORs数の分布では、本研究の対照群で基底細胞層の活性能が歯質側細胞層よりも高くなっていた。そして、結紮1カ月群および3カ月群では対照群と同様に基底細胞層および上皮突起部の活性能が歯質側細胞層より高くなっていた。しかし、結紮3カ月群では歯質側細胞層にAgNORs数の多い核がみられるようになり、結紮6カ月群では歯質側細胞層の活性能が基底細胞層および上皮突起部より高くなっていた。すなわち辺縁性歯周炎の発症期から進行期においては、まず基底細胞層および上皮突起部で活性能が増加し、つぎに歯質側細胞層の活性能が増加してくると思われた。さらに除去1カ月群および3カ月群では基底細胞層および上皮突起部の活性能が歯質側細胞層より低くなり、除去6カ月群では基底細胞層

および上皮突起部の活性能が歯質側細胞層より高くなっていた。すなわち辺縁性歯周炎の治癒期においては、まず基底細胞層および上皮突起部で活性能が減少し、つぎに歯質側細胞層の活性能が減少してくると考えられた。そしてさらに治癒が進むと対照群と同様に基底細胞層の活性能が増加してくると考えられた。

一方、接合上皮とポケット上皮の細胞動態に注目すると結紮1カ月群および3カ月群では同等の活性能が認められ、結紮6カ月群では接合上皮の活性能がポケット上皮より高くなり、除去1カ月群、3カ月群および6カ月群ではいずれも接合上皮の活性能が低くなっていた。すなわち辺縁性歯周炎の進行とともに接合上皮から活性能が増加し、治癒とともに接合上皮から活性能が減少すると考えられた。

接合上皮およびポケット上皮の AgNORs 数を、本研究では病変を異にした状態で検索し、結紮群では接合上皮とポケット上皮ともに基底細胞層に強い細胞活性能がみられたことより、上皮は深部への増殖と、結合組織の破壊による潰瘍などの創傷治癒としての役割を表していると考えられた。近年、創傷治癒での上皮の増殖は、線維芽細胞の増殖との相互作用により制御をうけているとの報告がある^{33,34)}。放射性同位元素を用いたサルでの歯周炎の検索では、接合上皮およびポケット上皮の基底細胞に強い細胞増殖をみたとの報告がある³⁵⁾。白色ウサギの角膜上皮を欠損させ、細胞増殖の指標として proliferating cell nuclear antigen (PCNA) を、分化の指標として anti-epithelial keratin 1 (AE1) を用いて免疫組織化学的に検討し、基底細胞が上皮欠損部の治癒過程で細胞増殖の役割と分化動態の正常化の役割を担っていることを示唆した報告³⁶⁾があるが、これは本研究における接合上皮およびポケット上皮の基底細胞層の動態と関連性を有していると考えられた。

また、Müller-Glauser と Schroeder¹³⁾ はポケット上皮の特徴として不規則な上皮突起を有するとのべているが、本研究でも同様の所見がみられた。結紮除去群で接合上皮がポケット上皮に比し、早期に AgNORs 数の減少をみたことは、速やかな組織の修復を表していると考えられた。そして上皮下の結合組織の瘢痕化とともに接合上皮が上皮突起を伴わずに厚くなった所見は、深部への増殖がおさえられて正常な接合上皮の機能に戻ったことを表していると考えられた³⁷⁾。

AgNORs 法の応用は、口腔領域でも良性、悪性腫瘍の研究に広く使われているが³⁸⁻⁴⁰⁾、本研究のごとく炎症の場での細胞の動態および放射性同位元素を用いることのできない場合のヒトでの細胞動態を比較的簡便に知る上

で有効であると考えられた。

結 論

成犬の歯頸部に縫合糸結紮により実験的辺縁性歯周炎を生じた結紮群と、結紮6カ月後に縫合糸を除去した除去群について、病理組織学的観察と接合およびポケット上皮の AgNORs 染色の観察より、次の結論を得た。

1. 病理組織学的に結紮群は辺縁性歯周炎の発症・進行過程を、除去群は治癒過程を示した。

2. AgNORs 染色の観察では、(1) 上皮の AgNORs 数は0から5の範囲で、平均 AgNORs 数は1.21から2.73の間で増減し、時間の経過とともに、結紮群では増加、除去群では減少傾向を示した。(2) 対照群では、基底細胞層および接合上皮尖端部で他部位に比べて AgNORs 数が高かった。(3) 結紮群では経過とともに、AgNORs 数は基底細胞層から全層にわたり高くなり、除去群では基底細胞層から減少し、平均 AgNORs 数は対照群に近づいた。

以上の結果より辺縁性歯周炎の接合およびポケット上皮の AgNORs の数と分布は、病変の進行の程度をよく表していた。

稿を終えるにあたり、終始ご懇篤なるご指導ならびにご検閲を賜りました東北大学歯学部口腔病理学講座大家清教授に謹んで感謝の意を表します。また、本実験に際し貴重なご助言、ご協力をいただいた口腔病理学講座小野寺健博士をはじめとする当講座の皆様へ深謝いたします。

本論文は東北大学審査学位論文（博士）である。

本論文の一部は、第22回東北大学歯学会（1992年12月、仙台）、第35回歯科基礎医学会総会（1993年10月、長崎）および第37回日本歯周病学会（1994年4月、仙台）において発表した。

文 献

- 1) Page, R. C. and Schroeder, H. E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Laboratory Invest.* **33** : 235~249, 1976.
- 2) Rylander, H., Lindhe, J. and Rosling, B. : The cause related phase of periodontal therapy, Lindhe, J., In : *Textbook of clinical periodontology.* (edited by Lindhe, J.), pp. 327~352, Munksgaard, Copenhagen, 1985.
- 3) Schroeder, H. E. and Attstrom, R. : The borderland between caries and periodontal disease II,

- pp. 99~123, Academic press, London, 1980.
- 4) 芝 五鈴：実験的歯肉炎にみられる接合上皮の電子顕微鏡的研究. 鶴見歯学 **14** : 173~198, 1988.
 - 5) Takata, T. and Donath, K. : The mechanism of pocket formation. A light microscopic study on undecalcified human material. *J. Periodontol.* **59** : 215~221, 1988..
 - 6) 安彦善裕：ラットにおける実験的歯周炎に関する病理組織学的研究—特にポケット上皮と長い付着上皮の微細構造, 透過性, 免疫組織化学および形態計測について—. 歯科学報 **89** : 1819~1847, 1989.
 - 7) Caton, J. G. and Zander, H. A. : The attachment between tooth and gingival tissues after periodic root planing and soft tissue curettage. *J. Periodontol.* **50** : 462~466, 1979.
 - 8) Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Rylander, H. : New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **9** : 290~296, 1982.
 - 9) 西村和晃, 高田耕平, 野口吉広, 野口秀夫, 永石真幸, 林 正純, 仲 秀典, 白井義英, 山岡 昭：歯肉剝離搔爬手術後の新付着に関する研究 (第4報) —術後の結合繊維付着部に対するX線定量分析によるセメント質沈着の可能性について—. 日歯周誌 **27** : 416~423, 1985.
 - 10) Takarada, H., Cattoni, M., Sugimoto, A. and Rose, G. G. : Ultrastructural studies of human gingiva. I. The upper part of the pocket epithelium in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **45** : 30~42, 1974.
 - 11) Takarada, H., Cattoni, M., Sugimoto, A. and Rose, G. G. : Ultrastructural studies of human gingiva. II. The lower part of the pocket epithelium in chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **45** : 155~169, 1974
 - 12) Shimono, M. and Clementi, F. : Intercellular junctions of oral epithelium. I. Studies with freeze-fracture and tracing methods of normal rat keratinized oral epithelium. *J. Ultrastruct. Res.* **56** : 121~136, 1976.
 - 13) Müller-Glauser, W. and Schroeder, H. E. : The pocket epithelium : A light- and electronmicroscopic study. *J. Periodontol.* **53** : 133~144, 1982.
 - 14) Ploton, D., Menager, M., Jeannesson, P., Himber, G., Pigeon, F. and Adnet, J. J. : Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.* **18** : 5~14, 1986.
 - 15) 笹野公伸, 宮崎修吉, 伊達文子, 佐藤郁郎 : AgNORs—病理組織診断への応用. 病理と臨床 **9** : 890~893, 1991.
 - 16) Ericsson, I., Lindhe, J., Rylander, H. and Okamoto, H. : Experimental periodontal breakdown in the dog. *Scand. J. Dent. Res.* **83** : 189~192, 1975.
 - 17) 小野寺健：イヌ実験的歯周炎におけるオキシタラン線維の動態に関する病理組織学的研究. 日歯周誌 **32** : 971~983, 1990.
 - 18) Kennedy, J. E. and Polson, A. M. : Experimental marginal periodontitis in Squirrel monkeys. *J. Periodontol.* **44** : 140~144, 1973.
 - 19) 野田俊克, 吉江弘正, 神田敬子, 根津雄一, 高山文晴, 原 耕二：結紮および菌破壊液の滴下により発生したサルの実験的歯周炎. 日歯周誌 **22** : 252~266, 1980.
 - 20) Brecx, M. C., Nalbandian, J., Ooya, K., Kornman, K. S. and Robertson, P. B. : Morphological studies on periodontal disease in the cynomolgus monkey. II. Light microscopic observations on ligature-induced periodontitis. *J. Periodontal Res.* **20** : 165~175, 1985.
 - 21) Aisenberg, M. S. and Aisenberg, A. D. : A new concept of pocket formation. *Oral Surg. Oral Med. & Oral Path.* **1** : 1047~1055, 1948.
 - 22) Akiyoshi, M. and Mori, K. : Marginal periodontitis : A histological study of the incipient stage. *J. Periodontol.* **38** : 45~52, 1967.
 - 23) Stahl, S. S., Slavkin, H. C., Yamada, L. and Levine, S. : Speculations about gingival repair. *J. Periodontol.* **43** : 395~402, 1972.
 - 24) 佐藤 佐：歯肉上皮付着部の電子顕微鏡的研究. 特に初期病変のみられた上皮付着部について. 日歯周誌 **15** : 3~28, 1973.
 - 25) Caton, J. G. and Zander, H. A. : Primate model for testing periodontal treatment procedures : I. Histologic investigation of localized periodontal pockets produced by orthodontic elastics. *J. Periodontol.* **46** : 71~77, 1975.
 - 26) Stahl, S. S. : Repair potential of the soft tissue-root interface. *J. Periodontol.* **48** : 545~552, 1977.
 - 27) Ooya, K. and Yamamoto, H. : A scanning electron microscopic study of the destruction of human alveolar crest in periodontal disease. *J. Periodontal Res.* **13** : 498~503, 1978.
 - 28) 大家 清, 長坂多賀子：ヒト歯肉上皮—結合組織境界部の炎症性変化の走査電子顕微鏡的観察. 東北歯誌 **5** : 69~73, 1986.
 - 29) Skougaard, M. : Turnover of the gingival epithelium.

- lium in marmosets. *Acta. Odont. Scand.* **23** : 623~643, 1965.
- 30) Miyazaki, S., Sasano, H., Suzuki, T., Sawai, T., Nishihira, T. and Mori, S. : Nucleolar organizer regions in human esophageal disorders : Comparison with proliferating cell nuclear antigen by immunostaining. *Modern Pathology* **5** : 396~401, 1992.
- 31) Kuwabara, H., Miyaguchi, M., Uda, H., Krenacs, T., Sepp, R. and Sakai, S. : Nucleolar organizer regions in human maxillary sinus squamous cell carcinoma. *Acta Pathologica Japonica* **43** : 18~21, 1993.
- 32) Warnakulasuriya, K. A. A. S. and Johnson, N. W. : Nucleolar organiser region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* **22** : 77~81, 1993.
- 33) 牧野綾子, 吉里勝利 : 組織再構築. *細胞* **22** : 178~181, 1990.
- 34) 上田 実 : 粘膜の創傷治癒—上皮形成と拘縮のメカニズム—. *細胞* **22** : 182~186, 1990.
- 35) Engler, W. O., Ramfjord, S. P. and Hiniker, J. J. : Development of epithelial attachment and gingival sulcus in rhesus monkeys. *J. Periodontol.* **36** : 44~57, 1965.
- 36) 山田昌和, 真島行彦 : 創傷治癒過程における角膜上皮基底細胞の増殖, 分化動態. *日眼会誌* **99** : 10~16, 1995.
- 37) Attström, R., Graf-de Beer, M. and Schroeder, H. E. : Clinical and histologic characteristics of normal gingiva in dogs. *J. Periodontal Res.* **10** : 115~127, 1975.
- 38) Morgan, D. W., Crocker, J., Watts, A. and Shenoi, P. M. : Salivary gland tumours studied by means of the AgNOR technique. *Histopathology* **13** : 553~559, 1988.
- 39) Yoshimi, N., Gimenez-Conti, I. B. and Slaga, T. J. : Morphological changes of the nucleolar organizer regions induced by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene in the hamster cheek pouch. *J. Oral Pathol. Med.* **22** : 97~100, 1993.
- 40) Whitaker, S. B., Vigneswaran, N., Budnick, S. D. and Waldron, C. A. : Giant cell lesions of the jaws : evaluation of nucleolar organizer regions in lesions of varying behavior. *J. Oral Pathol. Med.* **22** : 402~405, 1993.