歯肉切除後における新生ヒト歯肉コラーゲンの形態学的及び生化学的分析

原 沢 正 昭

新潟大学歯学部歯科保存学第二教室

(指導: 原 耕二 教授)

(昭和52年6月6日受付)

Correlated Morphological and Biochemical Analysis of Newly Formed Human Gingival Collagen after Gingivectomy

Masaaki Harasawa

Department of Periodontology and Endodontics, Niigata University School of Dentistry

(Director: Prof. Kohji Hara)

The present study was undertaken to examine biochemically and histologically the relationship between tissue repair and collagen formation after gingivectomy. Two biopsy samples of labial gingival tissue were taken from the same area of each patient with periodontal disease at three times; before, one month and six months after surgery. The neutral salt-soluble and -insoluble collagen content in these biopsy samples was assayed colorimetrically, while a parameter for evaluation of the collagen fibers in 5μ histologic sections stained with Masson-Goldner was expressed in term of numerical density under the multispectrophotometer.

The results were as follows;

1. The amount of soluble collagen extracted 3 times every 24 hours decreased with time.
2. The soluble collagen content before surgery averaged $47.66 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg}$ (gingival wet weight), and it increased to $68.66 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg}$ at one month after surgery, and followed by a slight decrease to $60.82 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg}$ at six months after surgery. This may reflex a more active collagen synthesis in the gingival tissue at one month after surgery.
3. The mean preoperative value of insoluble collagen was $71.83 \mu\text{g}/\text{mg}$ and at one month after surgery the amount decreased to $32.83 \mu\text{g}/\text{mg}$, less than half of preoperative value, and then at six months after surgery it returned to $68.49 \mu\text{g}/\text{mg}$, approximately preoperative value. This may show that the collagen maturation in the gingival tissue repair has completed by six months after surgery.
4. In the present study a close correlation was demonstrated between the insoluble collagen content and the numerical density of collagen fibers in the histologic sections.
5. In the histologic sections before and six months after surgery the collagen fibers were more dense in oral epithelium site than pocket epithelium site, whereas they were found loosely throughout gingival lamina propria of one month postoperative sections. It may be related to the degree of the inflammatory cell infiltration and the amount of mature collagen that the distribution of collagen fibers before and six months after surgery was different from one month after surgery.

緒 論

歯周病の進行とともに、歯周ポケットが形成されるが、ポケット除去法として近年歯石除去と根面の滑沢化、各種の歯周手術法が開発、改良され、技術的進歩とともに著しい治療効果をあげている。歯周治療後の創傷治癒に関しては、病理組織学ないしは生化学の両分野に亘り、広汎な研究が行なわれている。その中で歯肉切除後の組織の修復過程については、上皮化、微少循環系の変化、結合組織の形成や成熟化、それに伴って起こる細胞浸潤の動きなどが詳細に報告されている¹⁻⁸⁾。

一方、歯肉結合組織の主要な線維成分であるコラーゲン蛋白に関しては、多くの報告がみられる⁹⁻¹⁷⁾。それによると、炎症歯肉は健康歯肉にくらべて歯肉コラーゲン含量は少く、歯肉コラーゲンは歯肉の炎症に対して、鋭敏に反応するといわれる。

他方、原ら¹⁸⁾は歯肉滲出液中のグルコース、ヘキサミン、ウロン酸を定量し、また Paunio¹⁹⁾ は滲出液を分画してヒドロキシプロリンの存在を認めた。これらの所見は、滲出液に歯肉結合組織線維のコラーゲンや基質成分であるグリコサミノグリカンが存在することを示唆している。Arnold ら²⁰⁾、Sandalli ら²¹⁾は歯肉切除後の創傷治癒を評価するパラメーターとして歯肉滲出液の量を測定している。原ら²²⁾は、さらに歯周手術前後に採取した滲出液中のヒドロキシプロリンを定量し、手術後の歯肉組織の修復のさいのコラーゲンの役割を検討した。しかしながら、創傷の治癒過程における歯肉コラーゲンの変動を生化学的ならびに組織学的両面から経時的に追求した研究は、極めて少ないのが現状である²³⁾。

そこで本研究は、切除後の歯肉組織の修復とコラーゲン形成との関係をより明確にするために、経時的に同一部位より歯肉片を採取し、その中のコラーゲン含量を分析し、併せてコラーゲン線維の分布状態を組織学的にしらべ、両者を比較検討することとした。

研究材料と方法

被検者は新潟大学歯学部附属病院保存科に来院した年令 16~49 才の歯周病罹患患者 11 名（女性 7，男性 4）である。研究材料即ち歯肉片は、被検者の上顎または下顎側切歯いずれかの唇側歯肉辺縁中央部から採取することにし、採取前に予め採取部位の肉眼的炎症状態²⁴⁾、歯周ポケットの深さ、付着歯肉の幅^{25, 26)}、および X 線写真

図 1 歯肉片の採取方法

表 1 材料の調製と測定

歯肉片 (2 or 2')	
秤量	
中性塩可溶性コラーゲン抽出 (1M-NaCl+5mM-EDTA) 4°C., 72hrs (24hrs ごとに溶液交換)	
抽出後の歯肉片	抽出液
ホルマリン固定	加水分解 (6N-HCl) 110°C, 16 hrs
5μの連続切片作製	水解物中のヒドロキシプロリン量 (Kivirikko らの方法) で比色定量
Masson-Goldner 変法染色 コラーゲン線維の密度 (マルチ測光顕微鏡による吸光度で測定)	
9)	
※ コラーゲン量 ÷ ヒドロキシプロリン量 × 7.46	

で歯槽骨の吸収度 (%) の診査を行なった。

採取の方法は図 1 に示したとおりで、歯肉縁から歯槽粘膜にまでおよぶ長方形（長さ約 5 mm × 幅約 2 mm）のものを同一部位より 2 片採取した。その中 1 片は生化学的分析用に、もう 1 片は形態学的観察用に供した。尚、歯肉片の採取は第 1 回目から 1 ヶ月後に同一部位に新生した歯肉について第 2 回目を行ない、それから 6 ヶ月後に第 3 回目を同様に行なった。1 回目の採取時に採取された以外の部位については、適応症に応じた歯周手術を行なった。

材料の調製と測定 (表 1) 各時期に採取した 2 片の歯肉材料は、直ちに化学天秤で重量を測定したのちに、5 mM EDTA 含有 1 M NaCl 溶液^{27, 28)} 2.5 ml を用いて、4°C の低温下、72 時間に亘り中性塩可溶性コラーゲンを抽出した。十分な抽出を行なうため、24 時間ごと

図 2 マルチ測光顕微鏡 MMSP

に新しい溶液と交換した。歯肉片の重量は平均 20.2 mg (約 10~50 mg) に相当することから、歯肉湿重量 1 mg 当り 0.125 ml の溶液でコラーゲンを抽出したことになる。72 時間抽出後、1 本の遠沈管に抽出液を集め、これを 4°C で冷却しながら 9,300×g で 10 分間遠沈した。上清を約 1 ml になるまで室温で減圧濃縮し、一方、沈渣に蒸留水 1 ml を添加し、これに抽出後の歯肉片を加え、それぞれ 12 N HCl 1 ml ずつを追加して 6 N HCl 溶液を作製した。封管後 110°C で 16 時間加水分解し、上清水解物を中性塩可溶性コラーゲン分画、歯肉水解物を中性塩不溶性コラーゲン分画として、水解物中のヒドロキシプロリンを Kivirikko らの方法²⁹⁾ で比色定量した。以下本文に示すコラーゲン量は、ヒドロキシプロリン量を 7.46 倍したもので表わす⁹⁾。

形態学的観察用の歯肉材料は、中性塩可溶性コラーゲン抽出後直ちに 10% 中性ホルマリンで 2 日間固定し、通法により 5 μ のパラフィン連続切片を作製した。検体全体にいき渡るように 2 枚おきに切片を数十枚選び最初 H-E 染色を行なった。その中からほぼ染色性の一様なものを 10 枚ほど選び出し、その前後の切片約 10 枚について一定の条件下で Masson-Goldner 変法染色³⁰⁾ を施した。顕微鏡下で極端に染色性の異なる切片は除き、他の切片についてオリンパス光学工業株式会社製のマルチ測光顕微鏡 MMSP (図 2) を用いて歯肉固有層中のコラーゲン線維 (中性塩不溶性コラーゲンとみなす) の分布密度を顕微鏡学的吸光値で測定した。マルチ測光顕微鏡による測定の概要は次のとおりである。この顕微鏡の測光照明系は Koana-Naora 方式³¹⁾ で、Schwarzschild-Villiger 効果による吸光度の誤差を少なくするために、コンデンサーに対物レンズと同じものを使用していることが特長である。まずタングステンランプ光源から出た光は分光装置 (干渉フィルター) で単色光にされピンホールを通過する。ピンホールを通過した単色光はミラー

図 3 マルチ測光顕微鏡による測定箇所

で反射されコンデンサーに入るが、コンデンサーレンズは対物レンズと同じもので、しかも試料をはさんで対物レンズと逆向きにおかれているので、このコンデンサーによって単色光の測光光束は試料面上に縮小され、測定しようとする試料の微小部分に単色光が当たる。この被測定微小部分を通過するさいに吸収される単色光の量が、表示部に 0 から 2 までを 4 ケタの数値で表示される。この数値が顕微鏡学的吸光値である。今回の研究では単色光として Masson-Goldner 変法染色で用いたライトグリーンに対して最も高い吸光度を示す 650 mμ の波長を選んだ。ピンホールはできるだけ大きくするためにピンホールターレットの目盛を 10 に固定し、コンデンサーレンズには F10X を使用した。このようにすると試料面上でのピンホールの径が 80.2 μ となる。図 3 は組織切片における測定箇所を示す。測定が歯肉全体にいき渡るように切片の中央部を縦に 20 カ所と、横は切片を大体上中下と 3 等分し、各列に 10 カ所の測定箇所を設けたわけで、従って 1 枚の切片につき合計 50 カ所

を測定することになる。以上のようにして測定した50ヵ所の吸光平均値を10枚の各切片についてそれぞれ算出し、その中から大小に差のある値は棄却し、最終的には5枚の切片の平均値をもって検体の顕微鏡学的吸光値とみなした。なお口腔上皮側とポケット上皮側に分けた歯肉固有層内の部位別コラーゲン線維の分布状態を評価する場合には、横上段を中央部より2分した5ヵ所ずつの吸光平均値をもって、それぞれ口腔上皮側、ポケット上皮側の顕微鏡学的吸光値と定めた。

結 果

1) 中性塩可溶性コラーゲンの時間別抽出率
表2、図4で示すように、72時間までの中性塩可溶性

表 2 中性塩可溶性コラーゲンの時間別抽出率

	抽出時間(hrs.)		
	24	48	72
検 体 数	33	33	33
平 均 値	61.95*	25.49	12.55
標 準 偏 差	6.46	4.99	3.85

* %

コラーゲンの抽出率を100%としたとき、最初の24時間でそのうちの約60%が抽出され、次の24時間で約25%、最後の24時間で約15%と時間の経過につれてほぼ

図 4 中性塩可溶性コラーゲンの時間別抽出率

表 3 中性塩可溶性コラーゲン量 (×10⁻² μg/mg)

切 除 前		切除後 1 ヶ月		切除後 6 ヶ月
a	b - a	b	c - b	c
65.80*	-11.27	54.53	+ 3.36	57.89
44.16	+ 3.36	47.52	- 0.07	47.45
44.91	+13.73	58.64	+40.58	99.22
33.72	+45.21	78.93	-29.69	49.24
49.24	+25.66	74.90	+ 6.94	81.84
39.76	+22.61	62.37	-13.66	48.71
42.82	+69.60	112.42	-78.77	33.65
49.31	+24.84	74.15	+ 8.88	83.03
49.09	+12.68	61.77	-15.97	45.80
—	—	92.95	-54.23	38.72
57.82	+ 3.58	61.40	- 0.08	61.32

n = 11

Mean	47.66	+21.00 ^S	68.66	- 7.85 ^{NS}	60.82
S. D.	9.06	23.01	18.18	31.09	20.66
S. E.		7.28		9.84	

S P<0.05 で有意差あり

NS P>0.05 で有意差なし

* ハイプロ×7.46

表 4 中性塩不溶性コラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

切 除 前	切除後 1 ヶ月			切除後 6 ヶ月	
a	b - a	b	c - b	c	
70.57 [*]	-28.42	42.15	+10.52	52.67	
55.50	-15.44	40.06	+24.69	64.75	
93.10	-69.68	23.42	+47.30	70.72	
51.10	-24.47	26.63	+78.48	105.11	
44.80	-28.91	15.89	+60.58	76.47	
99.14	-79.82	19.32	+57.74	77.06	
59.38	-31.26	28.12	+27.61	55.73	
90.71	-45.20	45.51	+19.69	65.20	
76.24	-35.58	40.66	+11.63	52.29	
105.19	-49.84	55.35	+27.98	83.33	
44.39	-20.37	24.02	+26.04	50.06	
n = 11					
Mean	71.83	-39.00 ^S	32.83	+35.66 ^S	68.49
S.D.	22.41	20.40	12.51	22.09	16.56
S.E.		6.15		6.65	
S P<0.005 で有意差あり					
[*] ハイプロ× 7.46					

表 5 経時的顕微鏡学的吸光値
歯肉固有層全体

切 除 前	切除後 1 ヲ月			切除後 6 ヲ月	
a	b - a	b	c - b	c	
575.4 [*]	-141.2	434.3	+233.2	667.5	
540.4	-164.4	376.0	+380.3	756.3	
530.2	-132.2	398.0	+496.0	894.0	
546.8	-142.9	403.9	+516.6	920.5	
548.4	- 84.1	464.2	+286.7	750.9	
724.4	-304.7	419.7	+593.8	1013.5	
590.3	-225.1	365.2	+151.5	516.7	
739.5	-199.0	540.5	+ 78.5	619.0	
715.5	-196.4	519.1	+112.5	631.6	
800.2	-324.6	475.6	+124.2	599.8	
758.8	-483.9	274.9	+298.7	573.6	
Mean	642.72	-218.05 ^S	424.67	+297.45 ^S	722.13
S.D.	103.98	114.09	74.89	178.84	160.26
S.E.		34.40		53.92	
S	P<0.001 で有意差あり				
[*]	同一検体より選んだ切片 5 枚の平均値 実測値×10 ³				

直線的に抽出率の減少していく傾向がみられた。

2) 中性塩可溶性コラーゲン量の変動

表 3 でみられるように、切除前の中性塩可溶性コラーゲン量の平均値およびその標準偏差は (47.66±9.06)×10⁻² $\mu\text{g}/\text{mg}$ である。切除後 1 ヶ月になると (68.66±18.18)×10⁻² $\mu\text{g}/\text{mg}$ と切除前の値より増加し、切除後 6 ヶ月では (60.82±20.66)×10⁻² $\mu\text{g}/\text{mg}$ と切除後 1 ヶ月値とほぼ同じ値を示した。統計的には切除前の値と切除

図 5 経時的顕微鏡学的吸光値
歯肉固有層全体

図 6 顕微鏡学的吸光値と中性塩不溶性コラーゲン量との関係

後 1 ヶ月値との間には有意の差がみられたが ($P<0.05$), 切除後 1 ヶ月と 6 ヶ月の間には有意差は認められなかった ($P>0.05$).

3) 中性塩不溶性コラーゲン量の変動

表 4 に示すとおり, 切除前の中性塩不溶性コラーゲン量の平均値と標準偏差は $71.83 \pm 22.41 \mu\text{g/mg}$ であったものが, 切除後 1 ヶ月は全症例において切除前の値より減少し, $32.83 \pm 12.51 \mu\text{g/mg}$ と切除前の値の半分以下の値で認められた。しかし切除後 6 ヶ月になると全症例が切除後 1 ヶ月値より増加し, $68.49 \pm 16.56 \mu\text{g/mg}$ とほぼ切除前の値まで回復した。なお統計的には切除後

1 ヶ月値は切除前および切除後 6 ヶ月値のいずれに対しても有意差がみられた ($P<0.005$)。

4) 顕微鏡学的吸光値 (コラーゲン線維の分布密度) の経時的変動

(i) 歯肉固有層全体

表 5, 図 5 にみられるように 11 症例の顕微鏡学的吸光平均値と標準偏差は切除前において 642.72 ± 103.98 であったが, 切除後 1 ヶ月では 424.67 ± 74.89 と減少し, 切除後 6 ヶ月になると再び増加して 722.13 ± 160.26 と高い値を示した。この傾向は中性塩不溶性コラーゲン量の変動と似ており, 統計的にも切除後 1 ヶ月値と切除前の値ならびに切除後 6 ヶ月値との間に有意差が認められた ($P<0.001$)。次いで中性塩不溶性コラーゲン量と顕微鏡学的吸光値との両者の関連性を調べてみると, 図 6 に示されるように両者の相関係数は $r=0.74$ となり, 統計的にも両者の間に緊密な関係のあることが認められた ($P<0.001$)。即ち中性塩不溶性コラーゲン量が増加するにつれて顕微鏡学的吸光値も増加した。このことはコラーゲン線維の分布状態を客観的に知る方法として MMSP による顕微鏡学的吸光値が有用であることを示唆するものである。

(ii) 口腔上皮側

横上段を測定個所とした歯肉固有層上部における口腔上皮側コラーゲン線維の分布状態の経時的変動をまとめたものが表 6, 図 7 である。切除前の平均値と標準偏差は 682.25 ± 117.93 であったものが, 切除後 1 ヶ月では 406.48 ± 89.27 と低い値を示し, 切除後 6 ヶ月になると 722.83 ± 202.65 と切除後 1 ヶ月より増加した。統計的

表 6 経時的顕微鏡学的吸光値
口腔上皮側

	切 除 前		切除後 1 ヶ月		切除後 6 ヶ月
	a	b - a	b	c - b	c
	596.4*	-190.4	406.0	+330.1	736.1
	555.0	-256.9	298.1	+484.1	782.2
	556.2	-147.2	409.0	+446.6	855.6
	540.3	-152.1	388.2	+606.5	994.7
	575.6	-75.0	500.6	+179.0	679.6
	784.1	-411.3	372.8	+727.4	1100.2
	731.0	-360.6	370.4	+118.6	489.0
	803.6	-260.2	543.4	+31.7	575.1
	789.3	-336.1	453.2	+128.0	581.2
	847.4	-356.3	491.1	+216.1	707.2
	725.8	-487.3	238.5	+211.7	450.2
Mean	682.25	-275.76 ^S	406.48	+316.35 ^S	722.83
S.D.	117.93	126.67	89.27	222.25	202.65
S.E.		38.19		67.01	
S	P<0.001 で有意差あり				
*	同一検体より選んだ切片 5 枚の平均値 実測値×10 ³

図 7 経時的顕微鏡学的吸光値
口腔上皮側

に、切除後 1 ヶ月値と切除前の値および切除後 6 ヶ月値との間には有意差がみられた ($P<0.001$)。

(iii) ポケット上皮側

表 7、図 8 は口腔上皮側と同様に横上段を測定箇所としたポケット上皮側コラーゲン線維の分布状態の経時的変動をまとめたものである。切除前の平均値と標準偏差は 481.07 ± 109.07 であり、切除後 1 ヶ月値も 409.28 ± 64.49 と切除前の値と変わらずともに低い値を示した。統計的にも両者の間には有意差は認められなかった ($P>$

0.05)。しかし切除後 6 ヶ月になると 541.96 ± 180.29 と増加し、切除後 1 ヶ月値との間に有意差がみられた ($P<0.05$)。

5) 顕微鏡学的吸光値 (コラーゲン線維の分布密度) の部位別変動

同一標本について歯肉固有層内コラーゲン線維の分布密度を、口腔上皮側とポケット上皮側とで比較したものである。表 8 に示すように、切除前の平均値と標準偏差は口腔上皮側が 682.25 ± 117.93 とポケット上皮側の

表 7 経時的顕微鏡学的吸光値
ポケット上皮側

	切 除 前		切除後 1 ヶ月		切除後 6 ヶ月
	a	b - a	b	c - b	c
	566.9*	-159.1	407.8	+189.8	597.6
	421.0	- 76.3	344.7	+193.4	538.1
	507.3	-120.1	387.2	+376.2	763.4
	463.5	- 3.6	459.9	+182.9	642.8
	283.5	+132.4	415.9	+249.1	665.0
	506.9	-140.9	366.0	+480.3	846.3
	461.7	- 98.5	363.2	- 81.7	281.5
	469.8	+ 41.1	510.9	- 91.5	419.4
	435.0	+ 39.6	474.6	-128.9	345.7
	732.6	-261.1	471.5	+ 26.2	497.7
	443.6	-143.2	300.4	+ 63.7	364.1
Mean	481.07	- 71.79 ^{NS}	409.28	+132.68 ^S	541.96
S.D.	109.07	113.09	64.49	195.93	180.29
S.E.		34.10		59.08	
NS	P>0.05 で有意差なし				
S	P<0.05 で有意差あり				
*	同一検体より選んだ切片 5 枚の平均値 実測値×10 ³

図 8 経時的顕微鏡学的吸光値
ポケット上皮側

481.07±109.07 より高く、統計的にも両者の間に有意差がみられた (P<0.001)。しかし切除後 1 ヶ月ではそれぞれ口腔上皮側が 406.48±89.27, ポケット上皮側が 409.28±64.49 となり両者の間に有意差は認められなかった (P>0.05)。また切除後 6 ヶ月になると切除前のように口腔上皮側が 722.83±202.65 とポケット上皮側の 541.96±180.29 より高い値を示し、両者の間には統計的にも有意差がみられた (P<0.001)。切除前の組織像は

ポケット上皮の肥厚や根尖側への増殖のみられるものが多く、歯肉上部のポケット側固有層に中等度の炎症性細胞浸潤が限局して存在しており、この部のコラーゲン線維は疎に分布していた。これに対して口腔上皮側固有層では炎症性細胞浸潤はほとんどみられず、コラーゲン線維は密に存在していた。切除後 1 ヶ月では未だ上皮の根尖側への増殖は認められないが、すでに炎症性細胞浸潤は歯肉固有層全体に散在していた。コラーゲン線維の分

表 8 同一標本における部位別顕微鏡学的吸光平均値

	切 除 前		切除後 1 ヲ月		切除後 6 ヲ月	
	O. E.	P. E.	O. E.	P. E.	O. E.	P. E.
Mean	682.25 ^S	481.07 ^S	406.48 ^{NS}	409.28 ^{NS}	722.83 ^S	541.96 ^S
S. D.	117.93	109.07	89.27	64.49	202.65	180.29
S. E.	36.48		13.47		28.61	

S P<0.001 で有意差あり O. E. 口腔上皮側
NS P>0.05 で有意差なし P. E. ポケット上皮側

図 9 歯肉コラーゲン線維の分布密度を示す模式図 倍率 ×20
A : 切除前 B : 切除後 1 ヲ月 C : 切除後 6 ヲ月

図 10 歯肉組織像 倍率 ×25
A : 切除前 B : 切除後 1 ヲ月 C : 切除後 6 ヲ月

布は口腔上皮側とポケット上皮側との間で変らないが、切除前に比べてコラーゲン線維は全体的に疎であった。切除後6ヵ月になると切除前ほどではないがポケット上皮の根尖側への増殖が認められ、歯肉上部のポケット上皮下の固有層には比較的低度で限局した炎症性細胞浸潤がみられた。このためポケット上皮側のコラーゲン線維は疎に存在しているのに対し、口腔上皮側では炎症性細胞浸潤は少く、コラーゲン線維は密に存在していた(図9, 10)。

考 察

本研究では歯肉片の採取を同一部位より3回に亘って行なった。採取の間隔は第1回目とその後1ヵ月経過のもの、2回目の採取後6ヵ月経過の3度であった。従って新生歯肉組織の経時的コラーゲンの変動を生化学的ならびに組織学的に検討したことになる。歯肉切除後の創傷治癒の尺度としてコラーゲン量の変動を経時的に定量した Stanton ら²³⁾の研究があり、また組織学的に追求したものに Ramfjord ら^{3,4)}、Stahl ら⁵⁾の報告がある。しかしながら、これらの研究は同一部位でのコラーゲンの変動をみたわけではなく、その点からしても本研究が同一部位での変動を生化学的及び組織学的の両面から検討したところに、従来の報告にみられない特色があるといえよう。

一般に結合組織のコラーゲンの抽出には中性塩(0.14 M~2.0 M NaCl)や弱酸(0.5 M クエン酸, 0.5 M 酢酸)が用いられており^{32,33)}、中性塩で抽出されたコラーゲンは中性塩可溶性コラーゲン、酸で抽出したものを酸可溶性コラーゲン、これらの処理で抽出されないコラーゲンを不溶性コラーゲンとして取扱われている。中性塩可溶性コラーゲンは新生まもないコラーゲンで不溶性コラーゲンの前駆物質であると考えられ^{34~38)}、cross-linking(架橋結合)を含まないため不安定であり¹²⁾、代謝活性も高いといわれる³⁹⁾。また一方では不溶性コラーゲンの生理的 turnover による分解産物も含むと考えられる^{35,40)}。酸可溶性コラーゲンには中性塩可溶性コラーゲンより、合成されてから時間経過の長いものが多く存在するといわれ³⁹⁾、定常状態ではその放射能比活性は不溶性コラーゲンのそれにほぼ等しく、中性塩可溶性コラーゲンのそれより3~5倍高いという報告もみられる³³⁾。不溶性コラーゲンはコラーゲン分子内および分子間の cross-linking の増加で相互の結合が強固になり、中性塩で可溶化されず^{12,41)}、しかも turnover も非常に遅く

なる^{37,42,43)}。本研究では1 M NaCl 溶液で72時間コラーゲンの抽出を行なったわけで、1 M NaCl 溶液はコラーゲンの抽出に用いる中性塩溶液の濃度としては比較的高濃度のものを使用し、しかも可及的な長時間抽出を行なった。しかしながら、抽出はなお充分とはいえないようである。これは組織をホモジナイズしない限り止むを得ないことと考えられる。このようにして可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンの両者の定量のみならず、成熟コラーゲン線維の分布状態を組織学的に観察することも可能になった。もし酸を用いたり、1 M NaCl 溶液で72時間以上攪拌させながら抽出したら、組織が脆弱になって組織学的観察は不可能になるおそれが生じたものと考えられる。

コラーゲン線維の染色にはあえて Masson-Goldner 変法染色を取入れた。予備実験の段階でライトグリーンの単一染色では、コラーゲン線維のみならずコラーゲン線維の存在しない炎症性細胞浸潤部も染色されることが証明された。そこで両者ををはっきりと区別するために Masson-Goldner 変法染色を用いたのである。

マルチ測光顕微鏡 MMSP は細胞内の微量物質を定量的に分析することを可能にさせたもので、特に Feulgen 反応を利用した核酸 DNA の定量に関する研究が広く行なわれている^{44~46)}。このようにマルチ測光顕微鏡は細胞内物質の定量に用いられるのがほとんどであるにもかかわらず、本研究ではコラーゲン線維の分布密度の測定に使用し、一応の成果を上げたことを付記したい。

本研究でのコラーゲン量は、歯肉の湿重量 mg 単位で表わしているが、歯肉は80%の水分を含有することから^{9,13)}、湿重量を乾燥重量に換算したのち、中性塩可溶性コラーゲン及び中性塩不溶性コラーゲン量と総コラーゲン量との比を表9に示した。

正常歯肉の総ハイドロキシプロリン量は、Fliednerら¹⁰⁾によると $0.091 \pm 0.012 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ 乾燥重量であるといい、Schultz-Haudt ら⁹⁾ は乾燥歯肉重量の31%を占めると述べている。また病的歯肉については、総ハイドロキシプロリン量は $0.037 \pm 0.009 \mu\text{g}/\mu\text{g}$ 乾燥重量¹⁰⁾、乾燥歯肉重量の24.5%⁹⁾と、正常歯肉含量よりも少いとしている。正常歯肉の中性塩可溶性コラーゲンについては Page¹²⁾、Page と Schroeder¹⁴⁾は総ハイドロキシプロリン量の2.2%、Stern¹¹⁾は3.43%と報告している。一方中等度の炎症では総ハイドロキシプロリン量の2.2%^{12,14)}、線維性の炎症歯肉では3.67%で正常歯肉含量と変らず、浮腫性の炎症歯肉では11.46%とあきらかな増加を認めている¹¹⁾。本研究においては表9に示すごと

表 9 中性塩可溶性及び不溶性コラーゲンの含量比

		切 除 前		切除後 1 ヶ月		切除後 6 ヶ月	
中性塩可溶性 コラーゲン量 ($\times 10^{-2} \mu\text{g}/\text{mg}$)	Mean	47.66*	238.30**	68.66*	343.30**	60.82*	304.10**
	S. D.	9.06		18.18		20.66	
	%	0.66		2.05		0.88	
中性塩不溶性 コラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Mean	71.83	359.15	32.83	164.15	68.49	342.45
	S. D.	22.41		12.51		16.56	
	%	99.34		97.95		99.12	
総コラーゲン量 ($\mu\text{g}/\text{mg}$)		72.31	361.53	33.52	167.58	69.10	345.49

* 湿重量 ** 乾燥重量

く切除前の歯肉での中性塩可溶性コラーゲン量は $2.38 \mu\text{g}/\text{mg}$ で総コラーゲン量 $361.53 \mu\text{g}/\text{mg}$ の 0.66% に当り, Page¹²⁾ (2.2%), Stern¹¹⁾ ($3.7\sim 11.5\%$) らの結果よりは少い。このことは本研究において歯肉片のまま中性塩可溶性コラーゲンの抽出をおこなったため, ホモジネートの材料を使用して得た抽出コラーゲン量との間に差異が生じたものと考えられる。

表 9 に示すごとく切除後 1 ヶ月経過の歯肉では総コラーゲン量は $167.58 \mu\text{g}/\text{mg}$ と切除前の値の半分以上に減少したが, 中性塩可溶性コラーゲン量は $3.43 \mu\text{g}/\text{mg}$ で総コラーゲン量との比は 2.05% となり切除前の歯肉よりも増加している。歯肉切除後 28 日目ではまだ結合組織の修復は活発におこなわれており⁵⁾, オートラジオグラフィを用いた Ramfjord ら⁴⁾の研究においても, 歯肉切除後の創傷の完全なる治癒には $21\sim 35$ 日を要するといわれる。またモルモットの皮膚の創傷治癒過程をみても, 創傷後 28 日前後では正常なコラーゲン線維よりも細いコラーゲン線維が多くみられ, 局所にはなお線維芽細胞を含む細胞浸潤が存在すると Williams⁴⁷⁾ は報告している。さらにラットの皮膚で行なった創傷部のコラーゲンは $6\sim 7$ 週間まで増加すること⁴⁸⁾, コラーゲンによる組織修復は約 50 日で終了するという Stanton ら²³⁾の報告を総括してみても, 切除後 1 ヶ月という時期はすでに上皮化は完了しているものの^{5,8)}, 歯肉結合組織内のコラーゲンの成熟化に伴う組織の修復は未だ終了していないと考えたい。

創傷治癒中の組織においては正常組織より線維芽細胞が増加し, コラーゲン合成が活発に行なわれている^{39,49~51)}。一方, この時期には組織の改造現象に類する

過程が存在し^{52~55)}, コラーゲンの分解もまたある程度亢進しているものと想像される。歯周手術 1 ヶ月の歯肉溝からの滲出液や血清中のヒドロキシプロリン量は歯周手術前, 術後 6 ヶ月よりも高いと報告している原ら²²⁾の研究は, 歯肉においてもこれらに類する現象がおこっていることを間接的に証明しているといえよう。中性塩可溶性コラーゲンは必ずしもすべて不溶性コラーゲンに移行するとは限らず, たとえば正常なラットの皮膚では約 65% が不溶性コラーゲンになるといわれ³⁷⁾, また Page ら⁴³⁾は皮膚より歯肉の方が成熟する割合が高いと報告している。ともかくも切除後 1 ヶ月経過の歯肉組織中のコラーゲン分解は亢進しているという観点からすると, 中性塩可溶性の幼若コラーゲンは成熟コラーゲンに移行していく過程で分解されたり, 成熟されたコラーゲンの一部はまもなく分解されたりする結果, 切除後 1 ヶ月目の歯肉での中性塩不溶性コラーゲン量は, 未だ切除前の約半分であると考えられる。切除後 6 ヶ月経過の歯肉は, コラーゲンの成熟化による修復がすでに完了していることが組織学的^{4,8,47,48)}ならびに生化学的²³⁾観察で認められている。成熟化によってコラーゲンは turnover がしだいに遅くなり⁵⁶⁾, その合成・分解が不活発になる^{56,57)}。中性塩不溶性コラーゲンの割合が多くなり^{39,58)}, 逆に中性塩可溶性コラーゲンの割合が減少する^{58,59)}。本研究においては切除後 6 ヶ月経過した歯肉中の中性塩不溶性コラーゲン量は, 切除後 1 ヶ月経過のものよりは明らかに増加している。この事実は, 以上述べたごとくコラーゲンの成熟化の時期から説明がつく。

炎症による歯肉結合組織の変化を組織学的に観察した報告の中で, 固有層中のコラーゲン線維の破壊と炎症性

細胞浸潤との関係について、軽度の炎症性細胞浸潤のみられる部位ではコラーゲン線維は減少し、炎症性細胞浸潤が高度な場合、その部位のコラーゲン線維はほとんど破壊・消失してしまうといわれる^{60,61)}。また歯肉固有層中の炎症性細胞浸潤とコラーゲン線維とを組織学的に定量したところ、両者の間に相関性のあることも報告されている^{13,62)}。すなわち炎症歯肉 1 cm³ 中にコラーゲンは 36 mg と少いが、正常歯肉では 126 mg と多く含まれる¹³⁾。病変の強い歯肉ではコラーゲン量が少く、反対にコラーゲン量の多い歯肉では病変が軽度なことは生化学的ならびに形態学的に証明されている^{63,64)}。

本研究において、切除後 1 ヶ月経過の歯肉においてすでに軽度ではあるが炎症性細胞浸潤が歯肉固有層全体に散在し、しかもコラーゲン線維は固有層全体に疎に分布していた。Ramfjord ら⁴⁾の報告では、歯肉切除後 35 日目歯肉溝底部にリンパ球、形質細胞を主体とする炎症性細胞浸潤がみられたり、Stahl ら⁵⁾による歯肉切除後 28 日目の所見ですすでに歯肉組織に炎症像がみられたわけである。本研究からは今回、炎症性細胞の種類は同定できなかったが、これらの細胞浸潤がコラーゲンの合成、分解に何らかに関与していることは確かなものと考えられる。

一方、切除前と切除後 6 ヶ月経過の組織所見は、程度の差こそあれ炎症性細胞浸潤はポケット上皮下の結合組織に局限しておられたという点で似ている。その部のコラーゲン線維は破壊され減少しており、このような炎症性細胞浸潤像は、切除後 1 ヶ月経過の所見とは明らかに異なっていることが、本研究から確認できた。

総括ならびに結論

本研究は、歯肉切除後の組織の修復とコラーゲン形成との関係をより明確にするために、11 名の歯周病罹患者から歯肉切除前、切除後 1 ヶ月および 6 ヶ月の 3 回に亘り、上顎または下顎いずれか側切歯唇側の同一部位より各 2 片の歯肉を採取し、経時的に歯肉コラーゲンの変動を生化学的分析ならびに組織学的観察の両面から追求した。

まず、歯肉片を 1 M NaCl 溶液で 4°C に保ちながら 72 時間抽出後、抽出液と抽出後の歯肉を 6 N HCl で加水分解し、前者を中性塩可溶性コラーゲン分画、後者を中性塩不溶性コラーゲン分画として Kivirikko らの方法で比色定量した。抽出後の他の一片の歯肉については、通法により 5 μ の連続組織切片を作製し、一定の条

件下で Masson-Goldner 変法染色を施したのち、オリンパス社製マルチ測光顕微鏡 MMSP を用いて歯肉固有層中のコラーゲン線維の分布密度を測定した。

その結果、次のような所見が得られた。

1. 中性塩可溶性コラーゲンの時間別抽出率は、72 時間までの抽出率を 100% としたとき、最初の 24 時間で約 60% が抽出され、次の 24 時間では約 25%、最後の 24 時間では約 15% と時間の経過につれてほぼ直線的に減少していく傾向がみられた。

2. 中性塩可溶性コラーゲン量は切除前、切除後 1 ヶ月および 6 ヶ月において、それぞれ平均で湿重量 mg 当り、 $47.66 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ 、 $68.66 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ 、 $60.82 \times 10^{-2} \mu\text{g}$ となり、切除後 1 ヶ月値は切除前の値より明らかに増加し、切除後 6 ヶ月値は、切除後 1 ヶ月値よりやや減少した。これは切除後 1 ヶ月の歯肉において、コラーゲン合成が活発におこなわれていることを示唆している。

3. 中性塩不溶性コラーゲン量はそれぞれ平均で湿重量 mg 当り、 $71.83 \mu\text{g}$ 、 $32.83 \mu\text{g}$ 、 $68.49 \mu\text{g}$ となり、切除後 1 ヶ月値は切除前の値にくらべて半分以下の量しか認められなかったが、切除後 6 ヶ月になると、ほぼ切除前の値に回復した。このことからコラーゲン成熟化に伴う組織の修復は、切除後 1 ヶ月では未だ終了しておらず、切除後 6 ヶ月になるとすでに完了したものと思われる。

4. 中性塩不溶性コラーゲン量と顕微鏡学的吸光値との間には緊密な関係のあることが確認された。

5. コラーゲン線維の分布状態は切除前と切除後 6 ヶ月ではほぼ同じような傾向を示したが、切除後 1 ヶ月ではこれらとは異なった分布を示した。即ち、切除前と切除後 6 ヶ月においてはポケット上皮側より口腔上皮側にコラーゲン線維が密に存在するのに対し、切除後 1 ヶ月では両者の間に分布密度の差はなく、固有層全体にコラーゲン線維が疎に存在していることが認められた。このようなコラーゲン線維の分布状態の違いについては、それぞれの時期における成熟コラーゲン量および炎症性細胞浸潤の程度とが関係しているように思われる。

謝辞 稿を終るにあたり、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました原耕二教授に心から感謝申し上げます。また研究方法について御助言をいただきました東京医科歯科大学難治疾患研究所機能病理部門の秋吉正豊教授に謹んで感謝の意を表します。また懇切丁寧な御教示を賜りました本学口腔生化学教室野原広美教授ならびに高橋徳也助教授、さらに本研究の遂行に御助力いた

きました本学口腔病理学教室石木哲夫教授に深謝いたします。最後に、本研究の生化学的分析で終始多大な御援助をいただいた本学歯科保存学第2教室の錦織洋子薬学士に心から感謝するとともに、同教室員一同に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は昭和50年10月第18回日本歯周病学会総会ならびに昭和51年12月第24回IADR日本部会総会において発表した。

文 献

- 1) Grant, D.A., Stern, I.B. and Everett, F.G. : Orban's Periodontics, 4th ed., p. 460-471, C.V. Mosby Co., Saint Louis, 1972.
- 2) Goldman, H.M. and Cohen, D.W. : Periodontal Therapy, 5th ed., p. 875-961, C.V. Mosby Co., Saint Louis, 1973.
- 3) Ramfjord, S.P. and Costich, E.R. : Healing after simple gingivectomy. J. Periodontol., 34 : 401-415, 1963.
- 4) Ramfjord, S.P., Engler, W.O. and Hiniker, J.J. : A radioautographic study of healing following simple gingivectomy. II. The connective tissue. J. Periodontol., 37 : 179-189, 1966.
- 5) Stahl, S.S. et al. : Gingival healing. II. Clinical and histologic repair sequences following gingivectomy. J. Periodontol., 39 : 109-118, 1968.
- 6) Novaes, A.B. et al. : Visualization of the microvascularization of the healing periodontal wound. III. Gingivectomy. J. Periodontol., 40 : 359-371, 1969.
- 7) Stahl, S.S. : Repair following a standardized gingivectomy. Alpha Omegan, 63 : 175-178, 1970.
- 8) Stahl, S.S. et al. : Speculations about gingival repair. J. Periodontol., 43 : 395-402, 1972.
- 9) Schultz-Hautdt, S.D. and Aas, E. : Observations on the status of collagen in human gingiva. Arch. Oral Biol., 2 : 131-142, 1960.
- 10) Fliedner, D.E., Sun, C.N. and Schneider, B. C. : Chemistry of normal and inflamed human gingival tissues. Periodontics, 4 : 302-307, 1966.
- 11) Stern, B.D. : Collagen solubility of normal and inflamed human gingivae. Periodontics, 5 : 167-171, 1967.
- 12) Page, R.C. : Macromolecular interactions in the connective tissues of the periodontium. In Developmental Aspects of Oral Biology, ed. Slavkin, H.C. and Bavetta, L.A., p. 292-308, Academic Press, New York and London, 1972.
- 13) Schroeder, H.E., Münzel-Pedrazzoli, S. and Page, R.C. : Correlated morphometric and biological analysis of gingival tissue in early chronic gingivitis in man. Arch. Oral Biol., 18 : 899-923, 1973.
- 14) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Biochemical aspects of the connective tissue alterations in inflammatory gingival and periodontal disease. Int. Dent. J., 23 : 455-469, 1973.
- 15) 原 耕二, 他 : 歯周疾患とその病態について, I. 歯肉コラーゲンの代謝. 新潟歯学会誌, 1 : 22-30, 1971.
- 16) 岩山幸雄, 他 : ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究. I. ヘキソサミンならびにコラーゲン量について. 日歯周誌, 17 : 245-250, 1975.
- 17) 岩山幸雄, 他 : ヒト病的歯肉結合組織成分に関する研究. II. ウロン酸ならびに可溶性コラーゲンについて. 日歯周誌, 18 : 50-55, 1976.
- 18) Hara, K. and Löe, H. : Carbohydrate components in the gingival exudate. J. Periodont. Res., 4 : 202-207, 1969.
- 19) Paunio, K. : On the hydroxyproline-containing components in the gingival exudate. J. Periodont. Res., 6 : 115-117, 1971.
- 20) Arnold, R. et al. : Alterations in crevicular fluid flow during healing following gingival surgery. J. Periodont. Res., 1 : 303-308, 1966.
- 21) Sandalli, P. and Wade, A.B. : Alterations in crevicular fluid flow during healing following gingivectomy and flap procedures. J. Periodont. Res., 4 : 314-318, 1969.
- 22) Hara, K. and Takahashi, T. : Hydroxyproline content in gingival exudate before and after periodontal surgery. J. Periodont. Res., 10 :

- 270-274, 1975.
- 23) Stanton, G., Levy, M. and Stahl, S.S. : Collagen restoration in healing human gingiva. *J. Dent. Res.*, 48 : 27-31, 1969.
 - 24) Le, H. : The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *J. Periodontol.*, 38 : 610-616, 1967.
 - 25) Bowers, G.M. : A study of the width of attached gingiva. *J. Periodontol.*, 34 : 201-209, 1963.
 - 26) 原 耕二, 小林幸男 : 歯周疾患にみられる付着歯肉の臨床的ならびに組織学的考察について. *日保歯誌*, 16 : 141-157, 1973.
 - 27) 鈴木公夫 : Lathyrism の場合の膠原線維の病変について. 特に歯根膜における病理組織学的変化ならびに酵素組織化学的变化について. *口病誌*, 40 : 189-214, 1973.
 - 28) 岡 静夫 : Lathyrism の場合の骨端軟骨の不溶性 collagen の変化についての組織学的研究. *口病誌*, 40 : 215-241, 1973.
 - 29) Kivirikko, K.I., Laitinen, O. and Prockop, D.J. : Modifications of a specific assay for hydroxyproline in urine. *Anal. Biochem.*, 19 : 249-255, 1967.
 - 30) 佐野 豊 : 組織学研究法, 第3版, 268-270 頁, 南山堂, 東京, 1970.
 - 31) 直良博人, 野間正喜 : 顕微分光測光法. 「細胞生物物理研究法 I」江橋節郎, 神谷宣郎 (編), 151-164 頁, 吉岡書店, 京都, 1969.
 - 32) Jackson, D.S. and Bentley, J.P. : On the significance of the extractable collagens. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 7 : 37-42, 1960.
 - 33) Klein, L., Gray, B.D. and Nowacek, J.P. : Evidence for an isotopic steady state in soluble collagens. *Biochem. Biophys. Commun.*, 34 : 8-13, 1969.
 - 34) Hosoda, Y. : Studies on granulation tissue. I. Soluble collagen in wound healing. *Keio J. Med.*, 9 : 261-285, 1960.
 - 35) From, S.H. and Schultz-Hautdt, S.D. : Comparative histological and microchemical evaluations of the collagen content of human gingiva. *J. Periodontol.*, 34 : 216-222, 1963.
 - 36) Veis, A. : Intact collagen. In *Treatise on Collagen*, ed. Ramachandran, G.N., Vol. 1, p. 367-440, Academic Press, London and New York, 1967.
 - 37) Nimni, M.E., DeGuia, E. and Bavetta, L. A. : Synthesis and turnover of collagen precursors in rabbit skin. *Biochem. J.*, 102 : 143-147, 1967.
 - 38) Gould, B.S. : Collagen biosynthesis. In *Treatise on Collagen*, ed. Gould, B.S., Vol. 2, Part A, p. 138-188, Academic Press, London and New York, 1968.
 - 39) 堺 隆弘 : コラーゲンと疾患. 「コラーゲン」野田春彦, 永井 裕, 藤本大三郎 (編), 207-250 頁, 南山堂, 東京・京都, 1975.
 - 40) 佐々木哲 : 結合組織を構成する物質. 「歯学生化学」押鐘篤監修, 8-32 頁, 医歯薬出版, 東京, 1966.
 - 41) 佐々木哲 : 結合組織とその代謝およびそれを支配する因子. 「歯学生化学」押鐘篤監修, 33-46 頁, 医歯薬出版, 東京, 1966.
 - 42) Gerber, G., Gerber, G. and Altman, K.I. : Studies on the metabolism of tissue proteins. I. Turnover of collagen labeled with proline-U-C in young rats. *J. Biol. Chem.*, 235 : 2653-2656, 1960.
 - 43) Page, R.C. and Ammons, W.F. : Collagen turnover in the gingiva and other mature connective tissues of the marmoset. *Arch. Oral Biol.*, 19 : 651-658, 1974.
 - 44) Naora, H. : Microspectrophotometry of cell nuclei stained with feulgen reaction. III. The DNA content of individual nuclei of rat tissues in the postnatal growth. *Exp. Cell Res.*, 12 : 1-14, 1957.
 - 45) 妹尾左知丸, 他 : 顕微分光測光法とその生物学への応用. 蛋白質・核酸・酵素, 10 : 1181-1196, 1965.
 - 46) 藤田哲也 : 顕微分光測光法. *医学のあゆみ*, 82 : 251-256, 1972.
 - 47) Williams, G. : The late phases of wound healings. Histological and ultrastructural studies of collagen and elastic tissues formation. *J. Pathol.*, 102 : 61-68, 1970.
 - 48) Schilling, J.A. : Wound healing. *Physiol.*

- Rev., 48 : 374-423, 1968.
- 49) Chapman, J.A. : Morphological and chemical studies of collagen formation. I. The fine structure of guinea pig granulomata. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9 : 639-651, 1961.
 - 50) Ross, R. and Benditt, E.P. : Wound healing and collagen formation. I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope. *J. Biochem. Cytol.*, 11 : 677-700, 1961.
 - 51) Ross, R. : Studies of collagen formation in healing wounds. In *Advances in Biology of Skin*, ed. Montagna, W. and Billingham, R. E., Vol. 5, p. 144-164, Macmillan Co., New York, 1964.
 - 52) Grillo, H.C. and Gross, J. : Collagenolytic activity during mammalian wound repair. *Develop. Biol.*, 15 : 300-317, 1967.
 - 53) 鶴藤 丞, 三井洋司 : 炎症における組織の修復・代謝, 8 : 576-581, 1971.
 - 54) 清水正春 : コラーゲン分解酵素活性の変化からみた歯周組織の反応性. 「歯周病の基礎, 臨床, 予防」松村敏治他 (編), 118-124 頁, ライオン歯科衛生研究所, 東京, 1973.
 - 55) 宇宿源太郎 : 結合組織. 総合臨床, 22 : 2393-2397, 1973 .
 - 56) Kao, K-Y.T., Hilker, D.M. and McGavack, T.H. : Connective tissue. V. Comparison of synthesis and turnover of collagen and elastin in tissues of rat at several ages. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 106 : 335-338, 1961.
 - 57) Schneir, M., Furuto, D. and Berger, K. : Collagens of oral soft tissues. I. The influence of age on the synthesis and maturation of collagen in rat palatal mucosa as determined in vitro. *J. Periodont. Res.*, 11 : 235-241, 1976.
 - 58) Procop, D.J. and Kivirikko, K.I. : Hydroxyproline and the metabolism of collagen. In *Treatise on Collagen*, ed. Gould, B.S. Vol. 2, Part A, p. 215-246, Academic Press, London and New York, 1968.
 - 59) Bakerman, S. : Distribution of the α - and β -components in human skin collagen with age. *Biochim. Biophys. Acta*, 90 : 621-623, 1964.
 - 60) Melcher, A.H. : Some histological and histochemical observations on the connective tissue of chronically inflamed human gingiva. *J. Periodont. Res.*, 2 : 127-146, 1967.
 - 61) Levy, B.M., Taylor, A.C. and Bernic, S. : Relationship between epithelium and connective tissue in gingival inflammation. *J. Dent. Res.*, 48 : 625-629, 1969.
 - 62) Payne, W.A. et al. : Histopathologic features of the initial and early stages of experimental gingivitis in man. *J. Periodont. Res.*, 10 : 51-64, 1975.
 - 63) Stanton, G. and Levy, M. : Method for the correlation of chemical and histologic composition. *J. Dent. Res.*, 48 : 38-42, 1969.
 - 64) Hara, K. et al. : A correlation between microscopic numerical evaluation, clinical scoring and total collagen content in inflamed gingivae. *J. Periodontol.*, 46 : 459-464, 1975.