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 酵素活性 との関係に関する組織化学的研究

中 村 亨

東京医科歯科大学難治疾患研究所機能病理学部門

(指導：秋吉正豊名誉教授)

(昭和54年6月20日受付)

Histochemical Study on Relationship Between Change of
Insoluble Collagen Fiber and Activity of Lysosomal
Enzyme of Fibroblast in the Periodontal Membrane

Tooru NAKAMURA

Department of Pathology, Medical Research Institute

Tokyo Medical and Dental University

(Director: Honorary Prof. M. AKIYOSHI)

The present histochemical study was made to clarify the mechanism of the disappearance of salt-insoluble collagen fibers in the periodontal membrane after abrupt discontinuance of occlusal function and in acute osteolathyrism induced by Aminoacetonitrile (2.5%) in Wistar rats. The salt-insoluble collagen fibers were stained with van Gieson mixture consisting of only picric acid and acid fuchsin on formalin fixed paraffin sections after extraction of salt-soluble collagen in 1 M NaCl solution. On the other hand, acid phosphatase was stained by azo-dye method (Barka and Anderson 1963) to demonstrate activity of lysosomal enzyme of fibroblasts in the periodontal membrane after decalcification in Tetrasodium ethylenediaminetetraacetate solution. The following results were obtained: 1) The discontinuance of occlusal function resulted in rapidly progressing disappearance of the salt-insoluble collagen fiber from the alveolar side of the periodontal membrane in molar. Concurrently with the disappearance of the insoluble collagen fiber the acid phosphatase of the fibroblast in the alveolar side of the periodontal membrane increased considerably in activity. 2) In Aminoacetonitrile induced osteolathyrism the salt-insoluble collagen fiber in the periodontal membrane progressively extensively disappeared from the alveolar bone side. Pathologic osteoid matrix appeared in relatively regular arrangement in the periodontal membrane with reduced insoluble collagen fiber. The acid phosphatase of the fibroblasts did not increase considerably in activity of the enzyme. 3) These findings suggest that in the discontinuance of occlusal function more active degradation and subsequent intracellular digestion of collagen by fibroblast may be responsible for the disappearance of the insoluble collagen fiber in the periodontal membrane. In acute osteolathyrism the impaired maturation of newly synthesized collagen molecule and not impaired process of extracellular degradation as well as intracellular digestion of collagen by the fibroblast probably result in the disappearance of the insoluble collagen fiber in the periodontal membrane.

本論文の要旨は第17回秋季日本歯周病学会総会(昭和49年10月)、第7回日本結合組織学会総会(昭和50年7月)、第19回秋季日本歯周病学会総会(昭和51年10月)、および第24回 IADR 日本部会(昭和51年12月)において発表した。

I. 緒 言

骨格骨では骨芽細胞による骨新生と、破骨細胞による骨吸収が組織学的に明らかに観察される。このような骨新生と骨吸収による骨の改造は一生を通じて行なわれていて、骨格骨に加わる機能的要請の変化や、代謝の変化に適応した構築構造の変化を生ずる。

結合組織内に発達している線維構造においても、骨組織における同じように *turn-over* の起る可能性が生化学的研究^{1,2,3)}や電顕的^{4,5)}ならびに組織化学的研究^{6,7)}によって次第に明らかにされてきている。

生化学的研究によれば線維芽細胞の細胞内における生合成過程で生合成され分泌された *procollagen* は、細胞外で *procollagen peptidase* の作用によって *tropocollagen* 分子となり、さらに *lysyl oxidase* によって分子内および分子間の架橋結合を増しながら次第に成熟した不溶性コラーゲン線維に発達してゆく^{8,9)}。一方線維芽細胞はコラーゲンの生合成とともに *collagenase* や *lysosome* の酸性水解酵素をも生合成し、細胞外で *collagenase* の影響をうけたコラーゲン線維片を摂取して細胞内で *lysosome* 酵素によってさらに分解消化してゆくと考えられている^{10,11,12)}。すなわち、線維構造の新生過程は線維芽細胞内のコラーゲンの生合成および分泌と細胞外での酵素によるコラーゲンの成熟過程よりなり、他方線維構造の破壊過程は線維芽細胞から分泌された *collagenase* によるコラーゲン線維の特定結合部位における分解と¹³⁾、線維芽細胞内へ取りこまれたコラーゲン線維片の消化とからなると考えられる。電顕的には線維芽細胞内にコラーゲンの生合成と分泌過程に関係ある粗面小胞体と Golgi 装置の著しい発達と、コラーゲンの細胞内消化に関係あるコラーゲン線維断片の摂取像とが認められている^{14,15)}。また、³H-proline を使用した *autoradiography* によって、コラーゲンの生合成および分泌過程が明らかにされている^{16~18)}。

今回、われわれはコラーゲン線維の細胞外での成熟過程を障害した場合に歯根膜の線維構造に起こる変化と、機械的機能を中絶させた場合に起こる歯根膜の線維構造の急速な消失と線維芽細胞の *lysosome* 酵素 (*Acid phosphatase* など) の活性との関係をラットの臼歯について、組織学的ならびに組織化学的に検索し、さらにそれぞれの場合に於ける歯根膜の線維構造の変化の発生機序の一部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。

II. 実験材料および方法

1. 実験材料

a) 実験的廃用性萎縮の実験

Wistar 系雌ラット、体重 80~120 g、80 匹を使用した。

b) Osteolathyrism の実験

Wistar 系雌ラット、体重 60~100 g、65 匹を使用した。

上記 a), b) の実験動物にはそれぞれオリエンタル固型飼料および水道水を充分にあたえ飼育した。

2. 実験方法

a) 実験的廃用性萎縮

各動物の上顎左側第 1, 第 2, 第 3 臼歯をエーテル麻醉下で抜去し、対合下顎臼歯に咬合中絶の状態を生ぜしめた。実験動物は対合歯抜去後 3 日, 1 週, 2 週, 3 週の各時期に断頭屠殺し、直ちに左右顎骨を切除、摘出した。また同一動物の右側下顎骨は通常の咬合機能を営む状態におかれ、対照として用いた。

実験動物の半数は病理組織学的検索にもちい、他の半数は酵素組織学的検索用とした。

b) 実験的 Osteolathyrism

実験群の各動物に 2.5% aminoacetonitrile (AAN) 酸性硫酸塩水溶液を 20 mg/100 g 体重の割合で 1 日 1 回ほぼ同一時刻に連続皮下注射した。実験動物は注射開始後 3 日, 7 日, 12 日の各時期および 12 日間 AAN を連続投与後、投与を中止し 2 日, 4 日, 7 日を経過した各時期に断頭屠殺し、直ちに左右下顎骨を切除摘出し、右側下顎骨を病理組織学的検索用、左側下顎骨を酵素組織化学的検索用としてもちい、両者を比較検討した。

なお実験の各時期について、同一条件で飼育した未処置動物を 2, 3 匹あて対照として用いた。

3. 標本作成のための前処理および染色

1) 塩可溶性コラーゲンの抽出標本作成のための前処理および染色¹⁹⁾

a), b) 各実験とも下顎骨は摘出後切歯部を切除し、直ちに氷結ミクロトームにて歯根表面が露出する程度に頬舌方向に薄切し (約 500 μ)、1 M NaCl にて 4°C、48 時間 magnetic stirrer にて振盪、塩可溶性コラーゲンを抽出除去後、10% 緩衝ホルマリンに約 7 日間固定し、Plank-Rychlo の迅速脱灰液で脱灰、水洗、その後通法に従がいパラフィン包埋を行い、下顎骨を近遠心方向に薄切 (6 μ) し、van Gieson 染色 (核染色抜き) を行っ

た。

2) 酵素組織化学的検索のための前処理および方法

i) Acid phosphatase^{20,21,22)}

下顎骨は摘出後直ちに切歯を抜去し、氷結ミクロトームで顎骨頬舌面の骨皮質を除去する程度に薄切し、2.5% Buffered Glutaraldehyde (pH 7.2) にて4°C、2時間振盪固定後、4°C、24時間 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2) で洗い、次に10% EDTA液 (EDTA・2Na, 0.1 M phosphate buffer, pH 7.5) で4°C、96時間脱灰、水洗後、下顎骨の Cryostat 切片 (6 μ) を作製した。

組織化学的証明法は、Barka, T. & Anderson, P.J.²³⁾の方法に従った。なお基質は BDH 社製 1-Naphthyl disodium orthophosphate (Sodium α-naphthyl phosphate, Product No. 40025) を用い、Hexazonium pararosaniline 用としては pararosaniline hydrochloride (SIGMA) を使用した。

ii) β-Glucuronidase^{24,25)}

i) と同様の操作で作製した Cryostat 切片について Hayashi, M. et al. の証明法を実施した。基質は Naphthol AS-BI β-glucuronic acid (Naphthol AS-BI β-glucuronide) (SIGMA) を用いた。

iii) Non-specific esterase²⁶⁾

Naphthol AS acetate 法を用いた。

iv) N-Acetyl-β-glucosaminidase^{27,28)}

林らの方法に従い基質としては Naphthol-AS-BI-N-acetyl-β-glucosaminide (SIGMA) を用い、capture reagent として hexazonium pararosanilin を使用した。

v) 脱水素酵素など²⁹⁾

NADH dehydrogenase (NADHDH)

Succinate dehydrogenase (SDH)

Malate dehydrogenase (MDH), Isocitrate dehydrogenase (ISDH)

Cytochrome oxidase

MDH および ISDH は NAD 依存性脱水素酵素について活性を検出した。

3) 普通染色^{30,31)}

標本の一部は通法に従い次の染色を施した。

Hematoxylin and Eosin 染色, Oxytalan 線維染色³²⁾

III. 結 果

I. 歯根膜の中性塩不溶性コラーゲン線維の構造と変化

(a) 咬合機能を営んでいる臼歯歯根膜の不溶性コラー

ゲン線維の構造

比較的強い咬合圧をうける臼歯の根外側の歯根膜内には、根を懸垂するのに適したように、歯槽壁から斜めに根尖方向に走る不溶性コラーゲン線維束よりなる線維構造の発達が認められた。

不溶性コラーゲン線維束の間には線維芽細胞の存在部位に相当する楕円形又は菱形の空隙が散在性に認められた。

不溶性コラーゲン線維の発達は部位により異っており、臼歯根の外側歯根膜では一般に良く、内側歯根膜ではやや発達が悪かった。

上記の不溶性コラーゲン線維は歯槽骨壁面とセメント質面では一般に比較的太い線維束を形成しており、中間部では細い線維束を形成して、隣接部の線維束に互に連絡していた。線維束はしばしば歯槽骨あるいはセメント質内に封入されているのが認められた。根尖部や根分岐部のように根の圧迫によって組織圧の上昇をきたす部位では上記の根外側部とは異なった線維構造を示していた。すなわち不溶性コラーゲン線維の発達は軽度で、拡張した血管壁の周囲に網状構造を示す不溶性コラーゲン線維が認められた。又根分岐部においても根尖部におけると同じ様に不溶性コラーゲン線維の発達は著しくなく、網状構造をした不溶性コラーゲン線維が認められた。

このように不溶性コラーゲン線維の配列および発達が歯根膜の部位によって異なるのは歯根膜における咬合圧の影響が同じではなく部位によってことなることを示すものである (図1a)。

(b) 咬合機能中絶をきたした臼歯歯根膜の不溶性コラーゲン線維の変化

(1) 対合歯抜去後3日目の歯根膜

歯根膜の不溶性コラーゲン線維は歯槽骨壁面で急速に融解消失をきたし、そのために歯槽骨壁面にそれまで付着していた多数の不溶性コラーゲン線維束は速やかに太さを減じ、殆んど消失をきたしていた。このような変化と関連して歯根膜における斜走線維も歯槽骨壁側では走行の乱れや線維束の著しい萎縮を示していた。

一方セメント質面においては、やや細くなった不溶性コラーゲン線維束が付着しており、附近歯根膜にも細くなった不溶性コラーゲン線維が不規則な走向を示して残存していた (図2a)。

(2) 対合歯抜去後1週目の歯根膜

歯槽骨壁面とその附近における不溶性コラーゲン線維束の減少は更に進み、その部の歯根膜には少数の細い線

維束が残っているにすぎなかった。しかしながらセメント質面とその附近にはまだかなり多数の不溶性コラーゲン線維束が付着していて、やや不規則な走向をなしていた(図3a)。

(3) 対合歯抜去後2週目の歯根膜

2週目においても不溶性コラーゲン線維の融解、消失はさらに広範となり歯槽骨壁面では太い不溶性コラーゲン線維束はほとんど消失し、少数の細い線維が不規則な走向をなして歯槽骨面に付着しているにすぎなくなっていた。しかしセメント質面にはまだ多数の不溶性コラーゲン線維束の存在が認められた(図4a)。

(4) 対合歯抜去後3週目の歯根膜

歯根膜における不溶性コラーゲン線維の減少の程度は、2週目のものと比べて著しい差異を認めることができなかった。すなわち歯槽骨壁面で著しい減少を示しているのに対し、セメント質面ではかなり多数の不溶性コラーゲン線維束が認められた。しかしながら、ところによってはセメント質面の不溶性コラーゲン線維束が減少を示している所見も認められた(図5a)。

以上の所見を表示すると別表1のようになる。すなわち、それまで咬合機能を行っていた臼歯の咬合機能の中絶させると、歯根膜には不溶性コラーゲン線維構造の急激な破壊が起こる。このような歯根膜における線維構造の破壊は、歯根を懸垂している斜走線維の付着している歯槽骨壁に近い部位から歯根膜の中間部にかけて強く起こり、進展するとその部に付着していた不溶性コラーゲン線維のかなり太い線維束はほとんど消失するようになる。これに対してセメント質に付着している不溶性コラーゲン線維の融解消失はやや遅れて起こり、程度は多

少軽い傾向を示していた。

(c) AAN 投与による臼歯歯根膜の不溶性コラーゲン線維の変化

(1) AAN 投与後3日目の歯根膜

歯根膜内の不溶性コラーゲン線維の線維構造は著明な萎縮をきたしていた。そのために歯根膜内の太い不溶性コラーゲン線維はかなり消失し、細い不溶性コラーゲン線維がやや不規則な走向をなして残存していた。歯槽骨面に付着していた太い線維束の多くは消失していた。一方セメント質面にはまだかなり多数の線維束が付着していたが、多くのものは太さを減じて、不規則な走向を示していた(図6a)。

(2) AAN 投与後7日目の歯根膜

歯根膜における不溶性コラーゲン線維の萎縮減少はさらに進み、斜走線維は広範に消失していた。このように不溶性コラーゲン線維の消失した歯根膜の中央部にはしばしば不溶性コラーゲン線維の発達をよくない類骨様組織の新生が認められた。またこの時期には歯槽骨壁面やセメント質面に付着していた不溶性コラーゲン線維束の減少もさらに広範になってきた(図7a)。

(3) AAN 投与後12日目の歯根膜

歯根膜内に発達のない不溶性コラーゲン線維の線維構造は殆んど消失しており、かわって発達をよくない不溶性コラーゲン線維よりなる類骨様組織が比較的規則正しい柵状配列をなして形成されていた。この様な類骨様組織の不規則な増生は歯槽骨面や根尖部の第2セメント質面にも認められたが、コラーゲン線維の量は van Gieson 染色の骨質所見からみて既存の歯槽骨より少ないようであった。

表 1 咬合機能中絶後の歯根膜の歯槽壁側部、中間部およびセメント質側部の各部分における不溶性コラーゲン線維と Oxytalan 線維の変化

		歯根膜の不溶性コラーゲン線維の量						Oxytalan線維の量
		歯 槽 壁 側 部		中 間 部		セメント質側部		M ₁ の近心辺縁部 根分岐部、根尖部
対 照 咬合機能歯根膜		太 い 束 (平行、緊張)	卍	細 い 束	卐	太 い 束 (平行、緊張)	卍	卍
咬 合 機 能 中 絶	3 日 後	細 い 束	十	束 不 明	十	太 い 束	卍	卍
	1 週 後	細 い 束	一	束 不 明	一	太 い 束 (走向乱)	卐	卐
	2 週 後	細 い 束 (走向乱)	一	束 不 明	一	細 い 束	卐	卐
	3 週 後	細 い 束	一	細 い 束	一	細 い 束	卐	十

なお、顎骨表面の咬筋付着部の骨膜下には他の骨格骨の腱付着部におけると同じように類骨組織の増生が認められた。しかしながら骨膜下に新生された骨質内には van Gieson で染色される不溶性コラーゲン線維は少なく、既存の顎骨骨質に比べてコラーゲン線維に乏しいことが認められた (図 8a)。

(4) AAN 投与中止後の歯根膜の回復像

(i) 12 日間 AAN 投与後 2 日を経過した臼歯歯根膜

歯根膜内に形成されていた類骨様組織は比較的速やかな消失傾向を示していたが、異物巨細胞などの関与はなかった。このような変化と対照的に不溶性コラーゲン線維は細い線維束をなして広範に再生し、斜走線維によってセメント質面と歯槽骨とを再び結合するようになっていた。しかしながらセメント質面と歯槽骨面に付着している線維束はまだ細く、注射前にみられたような太いものは認められなかった (図 9)。

(ii) 12 日間 AAN 投与後 4 日を経過した臼歯歯根膜

歯根膜内には不溶性コラーゲン線維の線維構造の発達がきわめて著明になり、斜走線維はやや太い束を形成するようになっていた。またセメント質と歯槽骨の表面には不溶性コラーゲン線維が線維束を形成し付着しているのが明らかに認められた。一方歯根膜内に形成されていた類骨様組織は殆んど消失していた (図 10a)。

(iii) 12 日間 AAN 投与後 7 日を経過した臼歯歯根膜

不溶性コラーゲン線維は比較的太い線維束を形成するようになり、比較的太い斜走線維によりセメント質面と歯槽骨とを結合するようになっていた。このような不溶性コラーゲン線維の付着している歯槽骨面とセメント質面には太い線維束の形成が再び認められた。この時期の歯根膜の不溶性コラーゲン線維の線維構造はほぼ AAN 投与前の状態に回復していた。

なお下顎骨骨膜下の骨増殖部に形成された骨染は、AAN 投与中止次第に吸収されてゆき、吸収部に新生された骨質は van Gieson 染色で染色度を増していて、不溶性コラーゲン線維の新生が AAN の投与前の状態に回復したことを示唆していた (図 11)。

以上の所見を表示すると表 2 のようになる。すなわち AAN を投与した臼歯歯根膜における不溶性コラーゲン線維の線維構造の萎縮は対合歯抜去後の歯根膜におけるより広範に起こる傾向を示していたが、このような変化は歯槽骨面においてセメント質面におけるよりも、より強く起こる傾向を示していた。このような不溶性コラーゲン線維の線維構造の広範な萎縮に関連して、歯槽骨面と根尖第 2 セメント質面からは不溶性コラーゲン線維の発達の悪い類骨様組織の多量の新生が起こり、歯根膜腔を充たすようになっていた。しかしながら AAN 投与を中止すると不溶性コラーゲン線維は速やかに線維束を形成

表 2 AAN 投与ラットの歯根膜の歯槽壁側部、中間部およびセメント質側部における不溶性コラーゲン線維の変化と ANN 投与中止後の不溶性コラーゲン線維の修復

未処置 対照歯根膜		歯根膜の不溶性コラーゲン線維の量					
		歯槽壁側部		中間部		セメント質側部	
		太い束	細い束	太い束	細い束	太い束	細い束
ANN 投与	3 日	細い束 (解)	+	細い束 (解)	+	太い束 (解)	+
	7 日	太い束 細い束	++ +	細い束	+	太い束 Osteoid	++ +
	12 日	細い束 Osteoid	++ ++	細い束 Osteoid	++ ++	細い束 Osteoid	++ ++
AAN 12日間 投与後 中止	2 日後	細い束 Osteoid	++ ++	細い束 Osteoid	++ ++	細い束 Osteoid	++ ++
	4 日後	束太さます	++	束太さます Osteoid	++ ±	細い束	++
	7 日後	中等度太い束 (波状) Osteoid	++ —	や、太い束 Osteoid	++ —	中等度太い束 Osteoid	++ —

し、再び AAN 投与前の線維構造を示すようになってきた。このような不溶性コラーゲン線維の急速な再生とは反対にそれまで歯根膜内に多量に形成されていた類骨様組織は特別な吸収細胞の出現をきたすことなく、速やかに消失をきたし、4 日以降にはほとんど認められなかった。

II. 歯根膜の Oxytalan 線維の変化

(a) 咬合機能を営んでいる臼歯歯根膜の Oxytalan 線維の変化

咬合機能を営んでいる臼歯歯根膜では Oxytalan 線維は場所により比較的規則正しい走向を示していた。すなわち近心側では細い Oxytalan 線維が歯槽壁近くに存在する血管の周囲から歯根面に向かって冠側へゆるやかなカーブをえがいて走りセメント質面に付着していた。また、Oxytalan 線維の一部は血管周囲より歯肉側へほぼ平行に走っていた。遠心側歯根膜に於ては、歯槽壁面の血管の周囲から出た Oxytalan 線維は冠側の歯根面へ向って走りセメント質面に鋭角をなして付着していた。

根分岐部に於ては比較的太い Oxytalan 線維が歯槽骨よりセメント質面にあたかも歯根を押し上げる様な走向を示して存在していた。又根尖部に於ては、歯槽面に存在する血管の周囲から根尖部の歯根面へ比較的多数の Oxytalan 線維が走っていた。これらの Oxytalan 線維は線維束を形成することなく単独に走り、比較的粗な配列を示していて、不溶性コラーゲン線維の線維構造とは明らかな差異を示していた。

(b) 対合歯抜去後の歯根膜の Oxytalan 線維の変化

対合歯抜去後 3 日目ではすでに Oxytalan 線維は歯との明らかな結合関係を失い、かつ又染色性の低下を示していた。根分岐部に於ても対合歯抜去後 1 週間目においては Oxytalan 線維は著明な減少を示すようになった。このような変化は抜歯後 2 週目においてかなり明らかになった。根尖部に於てもこの時期には Oxytalan 線維は著明な減少と染色性の低下を示すようになる。抜歯後 3 週目に於ては Oxytalan 線維はさらに減少と染色性の低下を示していた。

すなわち、正常の咬合を行なっている歯の歯根膜内には細い Oxytalan 線維がコラーゲン線維の走向とは全く異なった配列をなし特有な線維構造を形成しているが、咬合機能が中絶されると、歯根膜のコラーゲン線維の線維構造の急速な破壊とともに Oxytalan 線維の線維構造にも破壊がみられた。

III. 歯根膜の Acid phosphatase 活性の変化

(a) 未処置対照動物の咬合機能を営んでいる臼歯歯根膜の Acid phosphatase 活性⁶²⁾

歯根膜の線維芽細胞は明らかな酵素活性を示し歯根膜線維の間に介在していた。またセメント質表面のセメント芽細胞はセメント質の新生が活発でない原生セメント質では一般に弱い酵素活性を示していたが、新生の活発な根尖部の第 2 セメント質の部位に於ては比較的強い酵素活性を示していた。これに対し歯槽壁面の骨芽細胞は比較的強い酵素活性を示しており、一方破骨巨細胞はさらに強い酵素活性を示していた。また歯槽骨内の骨細胞も明らかな活性を示していた (図 1b)。

(b) 抜歯した動物の咬合機能中絶をきたした臼歯歯根膜の Acid phosphatase 活性

対合歯抜去後 3 日目においては歯槽壁面に近い部位の歯根膜の線維芽細胞はその他の部位の線維芽細胞におけるよりも酸性ホスファターゼ活性の著しい増強を示していた。このような部位では反応産物は線維芽細胞の細胞外にもかなり強く認められた (図 2b)。

対合歯抜去後 1 週間目の歯根膜に於ても歯槽壁に近い歯根膜の線維芽細胞には酸性ホスファターゼの活性の著しい増強が認められていた。このような部位では同一標本上でコラーゲン線維束の減少が認められた。またこの時期に於ては、しばしばセメント質面に近い歯根膜内の線維芽細胞が酸性ホスファターゼ活性の軽度の増強を示していた (図 3b)。

対合歯抜去後 2 週間目では線維芽細胞の酵素活性は歯槽壁面に近い歯根膜に於て著しい増強を示しており、さらにセメント質面に近い部位に於ても線維芽細胞の酵素活性の増強がみとめられた。線維芽細胞の酵素活性の増強が著しい歯槽骨面に近い部位では、反応産物が細胞外にも認められていた (図 4b)。

このような線維芽細胞の酵素活性の増強は対合歯抜去後 3 週目に於ても認められたが、この時期では歯槽壁附近の線維芽細胞の酵素活性が多少減弱している部位もみられた (図 5b)。

咬合機能中絶後の歯根膜各部における Acid phosphatase の活性の変化を表示すると表 3 になる。すなわち、線維芽細胞の活性についてみると、対照の咬合を行っている歯根膜では、線維芽細胞は比較的軽度の活性を示している。咬合機能が中絶されると、歯根膜の線維芽細胞の活性は、急速に増強を示す。線維芽細胞の増強は一般に歯槽壁側に強く、中間部ではやや弱く、セメント質側ではそれほど明らかな変化はなかった。骨芽細胞やセメ

表 3 咬合機能中絶後の歯根膜の歯槽壁側部，中間部およびセメント質側部における線維芽細胞の Acid phosphatase 活性の変化

		歯根膜の線維芽細胞のAcid phosphatase活性		
		歯 槽 壁 側 部	中 間 部	セメント質側部
対 照 咬合機能歯根膜		＋ ～ 卅 ⁺ (骨芽細胞 卅)	＋ ～ 卅	＋ ～ 卅 ⁺ (セメント芽細胞 十～卅)
咬 合 機 能 中 絶	3 日 後	卅	卅	＋
	1 週 後	卅 ⁺ (骨芽細胞 卅)	卅	＋
	2 週 後	卅	卅 →	卅
	3 週 後	卅	卅 →	卅

表 4 AAN 投与後と投与中止後の歯根膜の歯槽壁側，中間部およびセメント質側部における線維芽細胞の Acid phosphatase 活性の変化

		歯根膜の線維芽細胞のAcid phosphatase活性		
		歯 槽 壁 側 部	中 間 部	セメント質側部
未 処 置 対 照 歯 根 膜		＋ ～ 卅 ⁺ (骨芽細胞 卅)	＋ ～ 卅	＋ ～ 卅 ⁺ (セメント芽細胞 十～卅)
AAN 投 与	3 日	＋ (骨芽細胞 卅)	＋	＋ (セメント芽細胞 十)
	7 日	＋ (骨芽細胞 卅)	＋	＋
	12 日	＋ (骨芽細胞 卅)	＋ (骨芽細胞 卅)	＋ (セメント芽細胞 卅)
AAN 12日間 投 与 後 中 止	2 日 後	＋	＋	＋
	4 日 後	＋ (骨芽細胞 卅)	＋ (骨芽細胞 卅)	＋
	7 日 後	＋	＋	＋

ント質新生部のセメント芽細胞はいずれも Acid phosphatae の中等度までの活性を示していた。時間の経過では歯槽壁側の活性の上昇は3日に現われ3週まで持続していた。一方セメント質側部では2週以後多少増強の傾向を示した。

(c) AAN 投与動物の臼歯歯根膜の Acid phosphatase 活性

AAN 投与後3日に於ては歯根膜の線維芽細胞には Acid phosphatase の活性が認められたが、未処置の対照動物に比較して特に著しい活性の増加は認められなかった。また線維芽細胞の酵素活性は歯槽骨に近い歯根膜

でもセメント質に近い部位でも大体同じ強さを示していた。骨芽細胞はやや強い活性を示していたが未処置の対照群と同じ程度であった(図6b)。

AAN 投与7日目では歯槽骨面の骨芽細胞は増殖をきたして、酵素活性の増強を示していたが、線維芽細胞にはいずれの部位でも酵素活性の増強は認められなかった。この時期の歯根膜内に新生される類骨様組織に接する紡錘形の細胞も骨芽細胞と同じ程度の酵素活性の増強を示していた。しかしながらセメント芽細胞には活性の増強はみられなかった(図7b)。

AAN 投与12日目に於ては歯根膜内に形成されてい

る多量の類骨様組織に接する紡錘形の細胞には比較強い酵素活性がみられた。一方線維芽細胞の酵素活性には明らかな増強は認められなかった。セメント質のセメント芽細胞の一部は酵素活性の軽度の増強を示していた(図8b)。

AAN 12日間投与後2日を経過した動物の歯根膜では線維芽細胞は酵素活性の軽度の低下を示していた。その他の細胞の活性も減弱を示していた。

AAN 12日間投与後4日以降に於ては歯根膜の線維芽細胞の酵素活性は再び回復を示し、注射前に近い活性を示した(図10b)。

AAN を投与した動物の歯根膜の歯槽壁側、中間部、セメント質側部などにおける線維芽細胞の Acid phosphatase 活性の変化を表示すると表4のようになる。すなわち AAN 投与においては歯根膜のいずれの部位においても線維芽細胞の Acid phosphatase には活性の上昇はみられなかった。また AAN の投与中止後においても歯根膜の Acid phosphatase の活性には著しい変化はみられなかった。

IV. 歯根膜のその他の lysosome 酵素活性の変化

(1) β -Glucuronidase 活性⁶⁴⁾

未処置対照動物の咬合機能を営んでいる歯根膜では、 β -Glucuronidase は線維芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞等に酵素活性が認められるが、Acid phosphatase の活性ほどは強くなかった。しかし破骨巨細胞は比較強い酵素活性を示していた(図12)。

抜歯した動物では、対合歯抜去後1週間目に歯槽壁面の線維芽細胞の一部は酵素活性の増強を示していた。しかしながらセメント質面の線維芽細胞の酵素活性には増強は認められなかった。

(2) Non-specific esterase 活性^{63,65)}

未処置対照動物の咬合機能を営んでいる臼歯の歯根膜に於ては、線維芽細胞は弱い活性を示しており、骨芽細胞及び骨細胞はやや強い活性を示していた。又セメント芽細胞及びセメント細胞も中等度の酵素活性を示していた(図13)。

抜歯した動物で、対合歯抜去後3日を経過した歯根膜では歯根膜線維の萎縮の著しい歯槽壁面では Esterase 活性の増強が認められた。その他の歯根膜に於ける線維芽細胞は対照動物に於けると同様な活性を示していた。セメント芽細胞にも軽度ながら活性の増強がみられた(図14)。

AAN 投与後3日を経過した動物の歯根膜に於ける線維芽細胞には、いずれの部位に於ても明らかな酵素活性

の増強はみられなかった。骨芽細胞及びセメント芽細胞に於ても酵素活性に明らかな変化はみられなかった(図15)。

(3) N-Acetyl- β -glucosaminidase 活性^{64,65)}

未処置対照動物の咬合機能を営んでいる臼歯の歯根膜では線維芽細胞は弱い酵素活性を示しており部位による差異は認められなかった。骨芽細胞及びセメント芽細胞も同じ程度の酵素活性を示していた(図16)。

抜歯した動物で、対合歯抜去後3日を経過した臼歯歯根膜では歯槽壁に近い部分の線維芽細胞はその他の部位に於けるよりも明らかな酵素活性の増強を示していた。セメント芽細胞には酵素活性の増強はみられなかった(図17)。

AAN 投与後3日を経過した動物では歯根膜に於ける線維芽細胞の酵素活性には特定部位における著しい増強はみられなかった。セメント芽細胞に於ても酵素活性の増強はなかった(図18)。

小括：歯根膜のその他の lysosome 酵素活性の変化

咬合機能中絶後の歯根膜では β -glucuronidase の活性は、Acid phosphatase の活性と同じように歯槽壁側の線維芽細胞に増強をきたしており、セメント質側の線維芽細胞には増強はみられなかった。また Non-specific esterase の活性もさらに N-Acetyl- β -glucosaminidase の活性も大体同じ傾向を示していた。

一方 AAN を投与した場合の歯根膜では Acid phosphatase の活性と同じように Non-specific esterase 及び N-Acetyl- β -glucosaminidase の活性は歯根膜のいずれの部位の線維芽細胞でも増強を示さなかった。

V. 歯根膜の脱水素酵素などの活性の変化

(a) 未処置対照動物の咬合機能を営んでいる臼歯歯根膜の脱水素酵素活性⁶¹⁾

咬合機能を営んでいる臼歯歯根膜では、コハク酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素(NAD 依存性)、イソクエン酸脱水素酵素、NADH 脱水素酵素、チトクローム酸化酵素、等の酵素はいずれもほぼ同じ様な活性を示していた。すなわち線維芽細胞では、SDH, MDH, ICDH, Cytochrome oxidase 等はいずれも中等度の酵素活性を示しており、NADH・DH のみは中等度から高度の活性を示していた。骨芽細胞はいずれの脱水素酵素に於ても、かなり高度の活性を示し、これに対しセメント芽細胞は、セメント質形成の弱い原生セメント質の部位ではいつの酵素に於ても弱い活性を示し、一方根尖部のセメント質形成の盛んな第2セメント質に於ては、いずれの酵素も高度の活性を示していた。破骨巨細胞はいずれの

表 5 咬合機能中絶後の歯根膜における脱水素酵素などの活性の変化

		SDH				MDH				ICDH				NADH・DH				Cyto. oxid.			
		骨芽細胞	線維芽細胞	セメント芽細胞	破骨細胞	骨芽細胞	線維芽細胞	セメント芽細胞	破骨細胞	骨芽細胞	線維芽細胞	セメント芽細胞	破骨細胞	骨芽細胞	線維芽細胞	セメント芽細胞	破骨細胞	骨芽細胞	線維芽細胞	セメント芽細胞	破骨細胞
対 照 咬合機能歯根膜		+++	++	++ +	+++	++	++	++ +	+++	+++	++	++ +	+++	+++	++ +	++ +	+++	+++	++	++ +	+++
咬 合 機 能 中 絶	3 日 後	+++	++	++ +	+++	++	++	++ +	+++	+++	++	++ +	+++	+++	++ +	++ +	+++	+++	++	++ +	+++
	1 週 後	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"
	2 週 後	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"
	3 週 後	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"	"	+	"	"

酵素に於ても最も強い活性を示していた。又、骨細胞に於ては弱い活性を示していた。

(b) 抜歯した動物における咬合機能中絶後の臼歯歯根膜の脱水素酵素活性

対合歯抜去後の臼歯歯根膜に於ては抜去後 3 日目では線維芽細胞には酵素活性の明らかな変化は認められなかった。歯槽骨面では酵素活性の高い骨芽細胞の増殖が比較的広範に認められた。セメント質形成の盛んでないセメント芽細胞には酵素活性の変化は明らかでなかった。

このような傾向は抜去後一週間に於ても認められた。抜去後 2 週目に於ては線維芽細胞の活性はやや減少を示していたが、歯槽骨面に於ける骨芽細胞は強い酵素活性を示していた。根尖部のセメント芽細胞の一部にも酵素活性の軽度の増強がみられた。このような傾向は抜去後 3 週迄認められた (表 5)。

(c) AAN 投与動物の臼歯歯根膜の脱水素酵素活性

AAN を投与した動物の臼歯歯根膜に於ては投与後 4 日以降、歯槽骨面及び根尖部第 2 セメント質表面に類骨様組織の増生がみられ、歯根膜内にも処々に類骨様組織の形成が認められた。この様な部位には脱水素酵素の高い活性を示す骨芽細胞やセメント芽細胞が認められた。しかしながら線維芽細胞には脱水素酵素の活性の変化は明らかではなかった。

AAN 投与後 1 週以降歯根膜内の膠原線維の萎縮の進行と関連して類骨様組織の増生が進むが、線維芽細胞の酵素活性には特に著しい活性の減少は認められないようであった。

小括：歯根膜の脱水素酵素活性の変化

未処置の対照動物の歯根膜では線維芽細胞は SDH, MDH (NAD 依存性), ICDH, Cytochrome oxidase, 等の中等度の活性を示し、NADH・DH の活性はさらに強かった。また、骨芽細胞はいずれの酵素でも線維芽細胞よりも強い活性を示していた。

咬合機能中絶後の歯根膜では、線維芽細胞のこれらの酵素は 1 週後まで著しい活性の変化を示していなかったが、2 週後と 3 週後では軽度の低下をきたしていた。一方、歯槽壁の骨新生部の骨芽細胞はかなり高い活性を示していた。

AAN 投与後の歯根膜の線維芽細胞でも上記脱水素酵素は著しい活性の変化を示していなかった。

IV. 考 按

今回の研究では、咬合機能中絶時と AAN の投与時および投与中止後に臼歯歯根膜に現われる変化を不溶性コラーゲン線維の線維構造と lysosome 酵素活性の面から

検索して、それぞれの場合に起こる変化の本体を明らかにしようとした。そこで、これらの問題に関連して不溶性コラーゲン線維の分解過程、および線維芽細胞の役割ならびに歯根膜における turn over の面から考察を行ってみたい。

1. 咬合機能中絶時の変化について

この場合の歯根膜における主要な変化は歯根を歯槽骨壁に懸垂している不溶性コラーゲン線維の歯槽骨壁側より始まる進行性消失と不溶性コラーゲン線維の消失部位における acid phosphatase およびその他の lysosome 酵素の活性の著しい増強とであった。

(1) 不溶性コラーゲン線維の分解過程

不溶性コラーゲン線維についてみると生化学的には collagenase³³⁻³⁹⁾ による細胞外でのコラーゲン分子の特定部位における分解とその後におこる細胞内での lysosome 酵素による消化過程が関係をもつと考えられている。コラーゲンの分解過程に関与する細胞としては破骨細胞、線維芽細胞、異物巨細胞、大喰細胞、血管内皮細胞、上皮細胞、白血球等の細胞が報告されている(Woessner, 1968)⁴⁰⁾。

歯根膜においては Ten Cate 等^{4,14,15)} のモルモット、マウス等の正常歯根膜の電顕的研究により線維芽細胞がコラーゲンの分解過程において細胞内とりこみおよび消化に関与していることを示す所見が明らかにされている。このようなコラーゲン線維片の線維芽細胞内のとりこみの電顕的所見は Listgarten (1973)⁴¹⁾, Garant (1976)⁴²⁻⁴⁴⁾ 等によっても、ウサギ、ラット、ハムスターなどの歯根膜で確認されている。Ten Cate⁶⁾ は、また、線維芽細胞内にとりこまれたコラーゲン線維細片に acid phosphatase 活性の存在を電顕組織化学的に明らかにしている。

Werb, Z. and Dingle, J.T. (1976)¹⁰⁾ によれば線維芽細胞は結合組織のコラーゲン線維の分解に大きな役割をはたして、中性の pH で活性を発揮する collagenase を分泌することが報告されている。

コラーゲン線維の分解は線維芽細胞など(大喰細胞、好中球)から分泌された collagenase によって細胞外で一部分解をうけたのちに細胞内にとりこまれ、さらに lysosome の酸性の水解酵素例えば cathepsin D 等によって 2 次 lysosome 内で分解が進められると考えられている(Anderson, 1974)¹²⁾。

このような現在認められているコラーゲン線維の分解様式から考えると今回咬合機能中絶後に起こった歯根膜の不溶性コラーゲン線維の消失にも、このようなコラーゲン線維の分解過程の起こる可能性が考えられる。

(2) 歯根膜の Acid phosphatase およびその他の 2-3 の lysosome 酵素の活性の増強

今回の組織化学的検索では上述した歯根膜における不溶性コラーゲン線維の消失部位に一致して、線維芽細胞に acid phosphatase および β -glucuronidase, non-specific esterase, N-acetyl- β -glucosaminidase などの酵素活性の増強を示す所見が認められた。

歯根膜における線維芽細胞のこれら酵素の活性は不溶性コラーゲン線維の減少している歯槽骨壁側の部分に増強を示していたので、この部の線維芽細胞にみられた lysosome 酵素の活性の増強は、コラーゲン線維の細胞内消化に関連した 2 次 lysosome における活性の増強を示すものと考えられる。Ten Cate 等の電顕組織化学的検査所見からみると、歯根膜においては線維芽細胞がコラーゲン線維片のとりこみと 2 次 lysosome における分解の起こることが示唆されている⁷⁾。

歯根膜においては今回の実験では、喰細胞も好中球も殆んど出現していなかったので上記部位の不溶性コラーゲン線維の消失過程は主としてその部における線維芽細胞による collagenase の細胞外での分解と一部分解されたコラーゲン線維の線維芽細胞内への取り込みと 2 次 lysosome 内での酸性水解酵素による分解過程が大きな役割をはたしていたように考えられる。

次に歯槽骨壁側における不溶性コラーゲン線維の著しい消失とその部の歯根膜における線維芽細胞の lysosome 酵素の著しい酵素活性の増強の原因について考察したい。

これまでの ³H-proline をモルモットに投与した実験⁴⁵⁾ および ³H-glycine 或いは ³H-proline を用いたマウスの歯根膜における実験⁴⁶⁾ では歯槽骨壁側の部位においてコラーゲンの新生が活発におこることが認められている。また Listgarten (1973)⁴¹⁾ のウサギ、ラット、ハムスターにおける歯根膜の線維芽細胞の電顕的検索および Garant (1976)⁴²⁻⁴⁴⁾ のラットの歯根膜における線維芽細胞の電顕的観察によれば歯槽骨壁側の歯根膜における線維芽細胞に、より多くコラーゲン線維片の取り込み像が認められている。これらの所見は歯根膜線維の新生と分解が歯槽骨壁側においてはセメント質側よりも活発に行われていることを示している。咬合機能中絶の場合に歯根膜の膠原線維が消失をきたすことはこれまで動物実験⁴⁷⁾ や人の剖検材料⁴⁸⁾ などでもみとめられている。従って咬合機能中絶によるコラーゲンの新生低下が、新生および分解の活発に行われる歯槽骨壁側の線維芽細胞により強い影響を与え、この際分解に関与する collagenase⁴⁹⁻

⁵¹⁾や lysosome 酵素の産生を高める可能性が考えられるが、この点については更に今後の研究が必要である。

2. AAN 投与時の歯根膜の不溶性コラーゲン線維の変化とその発生機序について

この場合の歯根膜における主要な変化は歯根を懸垂している歯根膜の不溶性コラーゲン線維の急速な広範な消失と歯根膜の線維芽細胞の活性に著しい変化がみられないことであった。

コラーゲン線維の生成過程における AAN や β -aminopropionitrile (BAPN) などのような lathyrogen⁵²⁾の影響は、最近の多くの研究^{53~55)}によれば lathyrogen の投与前に生合成されたコラーゲン線維は変化をうけないが、新しく生合成されたコラーゲン線維が架橋結合の障害を起こし組織における可溶性コラーゲンの増加を来すと考えられている。しかしながら細胞の増殖や蛋白および glycosaminoglycan の生合成は比較的影響をうけないと云われている(Smith 1966, 1969^{56,57)}, Levene 1972, 1973^{58,59)})。

また、架橋結合の障害はコラーゲン分子の分子間および分子内の共有架橋結合の形成を阻害し、さらに分子間架橋結合の障害はコラーゲン線維の引っ張り強さをそこなうと考えられている^{8,54)}。

今回行ったわれわれの中性塩による可溶性コラーゲンの抽出後における不溶性コラーゲン線維の組織学的検索では、AAN 投与後咬合を行っている歯根を懸垂している不溶性コラーゲン線維の比較的速度やかな、広範な消失が認められた。このような消失は3日後においては、歯槽骨壁側に始まるが、速やかにその他の部位の歯根膜にも波及し、その後広範な不溶性コラーゲン線維の消失を起こすようになる。この時期には歯根膜内に多量の病的な不溶性コラーゲン線維に乏しい類骨様組織を生ずるようになる。しかしながら AAN の投与を中止すると不溶性コラーゲン線維の速やかな再生がおこり同時に病的類骨様組織も速やかに消失する。今回認められた AAN 投与後3日頃から比較的速度に始まった不溶性コラーゲン線維の消失は生化学的に認められている AAN によるコラーゲン線維の架橋結合の障害のみによっては理解しにくいように考えられる。

最近の ³H-glycin や ³H-proline などの取り込みの実験^{16~18,45,46)}や電子顕微鏡による歯根膜の線維芽細胞のコラーゲン線維小片の細胞内とりこみなどの研究^{14,15,41~44)}から、次のような可能性が考えられている。すなわち歯根膜では他の結合組織におけるよりもコラーゲン線維の turn over が活発であって、turn over の主役は線維

芽細胞である。又、咬合圧を受けている正常の歯根膜では turn over は歯槽骨壁側の部分でより活発であることが明らかにされている。

われわれの行った acid phosphatase の組織化学的研究によっても歯根膜の線維芽細胞には比較的高い acid phosphatase の活性が認められている。このような所見は線維芽細胞が lysosome 酵素の比較的高い活性をもっていて、コラーゲン線維の分解過程に大きな役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。このような線維芽細胞の acid phosphatase の活性は、AAN の投与後においては明らかな低下を示していなかった。また細胞のエネルギー代謝に関係をもつ種々な脱水素酵素などの活性もすでに発表されているように、AAN 投与によって殆んど著しい変化を示していなかった¹⁹⁾。このような所見をあわせ考えると歯根膜内に形成されていた不溶性コラーゲン線維の消失には線維芽細胞の働きによるコラーゲン線維の分解が大きな役割を果たしていたように考えられる。

次に AAN 投与中に新生された歯根膜コラーゲン線維の引っ張り強さの低下と咬合圧との関係について考察してみた。

BAPN のような lathyrogen を投与した動物では全身のコラーゲン線維が切れ易くなっていることが一般に認められている。また、lathyrogen の投与時には新生されたコラーゲン分子の成熟過程で分子内架橋結合の障害が起こり、そのために新生コラーゲン線維の引っ張り強さの低下をきたすことが明らかにされている^{8,54)}。

今回の実験に於ても、AAN を投与した動物の咬合圧をうけている臼歯の歯根膜内では不溶性コラーゲン線維の発達に高度に障害されていて正常動物の咬合圧をうけている歯根膜にみられるような不溶性コラーゲン線維の発達はほとんど認められなかった。一方、対合歯を抜去して咬合圧の作用を除いた臼歯の歯根膜では軽度ながら線維状の膠原線維の発達が認められている⁶⁰⁾。

咬合機能中絶の場合には歯根膜線維に機能中絶に関連した萎縮性の変化が起こるが、このような変化の発現を考慮に入れても、線維構造の発達は咬合圧をうけている歯根膜にくらべるとかなり良好な所見を示していた。従って咬合圧を受けている臼歯の歯根膜に認められた AAN 投与による不溶性コラーゲン線維の高度の形成障害の発生機序には歯根膜における線維芽細胞の作用によるコラーゲン線維の分解とともに、AAN 投与中に新生されたコラーゲン線維の引っ張り強さの低下とこのような線維に作用する咬合圧の過大な負担がそれぞれ影響を

与えコラーゲンの線維構造の形成を強く障害したものと考えられる。

V. 総 括

今回われわれはラットの臼歯について咬合機能の中絶した場合に起こる歯根膜の変化と、AANを投与した場合に咬合を営んでいる臼歯の歯根膜におこる変化とを不溶性コラーゲン線維と acid phosphatase 活性の面から病理組織学的および組織化学的に検索し次のような点を明らかにした。

1. 対合歯抜去の場合には歯根膜の不溶性コラーゲン線維は歯槽骨壁側より速やかな消失をきたし、同時にその部の線維芽細胞の lysosome 酵素活性に著明な増強を認めた。

2. AAN 投与の場合には、咬合を営んでいる臼歯の歯根膜には不溶性コラーゲン線維の急速な広範な消失が起こったが、歯根膜における線維芽細胞の lysosome 酵素の活性には増強も低下も認められなかった。

3. これらの場合における不溶性コラーゲン線維の消失はともに歯根膜における線維芽細胞の分泌した collagenase による細胞外分解と lysosome 酵素による細胞内消化によるもので、咬合機能中絶時には線維芽細胞による分解過程の亢進により、また AAN 投与時には、代謝障害をうけない線維芽細胞の分解過程によって不溶性コラーゲン線維の消失をきたすものと考えられる。

稿を終るにあたり、終始ご懇篤なるご指導ご校閲を賜った恩師秋吉正豊名誉教授に深甚な謝意をささげるとともに、御助力をいただいた歯学部口腔病理学教室岡田憲彦助手、難治疾患研究所機能病理学部門、田島たよ子技官ならびに教職員各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kivirikko, K.I. and Risteli, L. : Biosynthesis of collagen and its alterations in pathological states. *Medical Biol.*, 54 : 159-186, 1976.
- 2) Gay, S. and Miller, E.J. (ed.) : Collagen in the Physiology and Pathology of Connective Tissue. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, p. 9-24, 1978.
- 3) Rossman, L.E., Rosenbloom, J. and Robinson, P. : Biosynthesis of collagen in isolated periodontal ligament. *J. Dent. Res.* 54 (6) : 1115-1119, 1975.
- 4) Ten Cate, A.R. : Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodeling. *J. Anat.* 112 (3) : 401-414, 1972.
- 5) Ten Cate, A.R. and Freeman, E. : Collagen remodeling by fibroblasts in wound repair. Preliminary observations. *Anat. Rec.* 179, 543-546, 1974.
- 6) Deporter, D.A. and Ten Cate, A.R. : Fine structural localization of acid and alkaline phosphatase in collagen containing vesicles of fibroblasts. *J. Anat.* 114(3) : 457-461, 1973.
- 7) Ten Cate, A.R. and Syrubu, S. : A relationship between alkaline phosphatase activity and the phagocytosis and degradation of collagen by the fibroblast. *J. Anat.* 117 (2) : 351-359, 1974.
- 8) Bailey, A.J., Robins, S.P. and Balian, G. : Biological significance of the intermolecular crosslinks of collagen. *Nature*, 251, Sept. 13, 105-109, 1974.
- 9) Tanzer, M.L. : Cross-Linking of Collagen. *Science*, 180, 561-566, 1973.
- 10) Werb, Z. and Dingle, J.T. : Lysosomes as modulators of cellular functions. 3. Secretion of neutral proteinases from fibroblasts. In *Lysosomes in Biology and Pathology* (ed. Dingle, J.T. and Dean, R.T.) Vol. 5, Amsterdam : North Holland Publishing. 1976.
- 11) Pérez-Tamayo, R. : Collagen degradation and resorption : Physiology and pathology, In. *The Biochemistry of Disease Vol. 3. Molecular Pathology of Connective Tissues.* (ed. Pérez-Tamayo, R. and Rojkind) Marcel Dekker, INC, New York. 1973.
- 12) Anderson, A.J. : Degradation of insoluble collagen and other proteins by rat leucocytes. In. *Connective Tissues Biochemistry and Pathology*, (ed. Fricke, R. and Hartmann, F.) Springer Verlag Berlin 1974.
- 13) Harris, E.D., Jr. and Krane, S.M. : Collagenases. *N. Engl. J. Med.* 291 : 557-563, 605

- 609, 652-661, 1974.
- 14) Ten Cate, A.R. and Deporter, D.A. : The role of the fibroblast in collagen turnover in the functioning periodontal ligament of the mouse. *Archs. oral. Biol.* 19 : 339-340, 1974.
 - 15) Ten Cate, A.R., Deporter, D.A. and Freeman, E. : The role of fibroblasts in the remodeling of periodontal ligament during physiologic tooth movement. *Am. J. Orthod.* 69 : 155-168, 1976.
 - 16) Rippin, J.W. : Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces I. Young rat molars. *J. Periodont. Res.* 11 : 101-107, 1976.
 - 17) Rippin, J.W. : Collagen turnover in the periodontal ligament under normal and altered functional forces. II. Adult rat molars. *J. Periodont. Res.* 13 : 149-154, 1978.
 - 18) Garant, P.R. & Cho, M.I. : Autoradiographic evidence of the coordination of the genesis of Sharpey's fibers with new bone formation in the periodontium of the mouse. *J. Periodont. Res.* 14 : 107-114, 1979.
 - 19) 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 (3) 189, 1973.
 - 20) Ishii, T. and Balogh, K. Jr. : Acid phosphatase activity in the inner ear. *Acta otolaryngologica.* 62 : 185, 1967.
 - 21) Chan, J.F.Y. and Saleuddin, A.S.M. : Acid phosphatase in the mantle of the shell regenerating Snail *Helisoma duryi duryi*. *Calc. Tiss. Res.* 15 : 213-220, 1974.
 - 22) Wakabayashi, T., Asano, M., Kurono, C. and Kimura, K. : Effects of extremely low concentrations of glutaraldehyde together with shortening of fixation times on the maintenance of various enzyme activities. *J. Histochem. Cytochem.* 23 (8) : 632-634, 1975.
 - 23) Barka, T. and Anderson, P.J. : Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.* 10 : 741, 1962.
 - 24) 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗 : 酵素組織化学, p. 351, 朝倉書店, 東京, 1970.
 - 25) Poulsen, P.B. and Güttler, F. : Histochemical demonstration of acid β -glucuronidase and carboxylic ester hydrolase activity in sensitized lymphocytes during lysis of allogeneic fibroblasts. *Acta path. microbiol. scand. Sect. C.* 83 : 246-248, 1975.
 - 26) 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗 : 酵素組織化学, p. 224, 朝倉書店, 東京, 1970.
 - 27) 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗 : 酵素組織化学, p. 356, 朝倉書店, 東京, 1970.
 - 28) Hayashi, M. : Histochemical demonstration of N-Acetyl- β -glucosaminidase employing naphthol AS-BI-N-Acetyl- β -glucosaminide as substrate. *J. Histochem. Cytochem.* 13 (5) : 355-360, 1965.
 - 29) 武内忠男, 清水信夫, 小川和朗 : 酵素組織化学, 朝倉書店, 東京, 1970.
 - 30) 太田邦夫, 畠山 茂 : 病理組織学標本の作り方. 南山堂, 東京, 1965.
 - 31) 佐野 豊 : 組織学研究法. 南山堂, 東京, 1965.
 - 32) Fullmer, H.M. and Lillie, R.D. : The oxytalan fiber : a previously undescribed connective tissue fiber. *J. Histochem. Cytochem.* 6 : 425, 1958.
 - 33) Nagai, Y. : Collagenase digestion of collagen. *J. Biochem.* 50 (6) : 486-499, 1961.
 - 34) Gross, J. and Nagai, Y. : Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 54 : 1197-1204, 1965.
 - 35) Kang, A.H., Nagai, Y., Piez, K.A. and Gross, J. : Studies on the structure of collagen utilizing a collagenolytic enzyme from tadpole. *Biochemistry* 5 : 509-515, 1966.
 - 36) Nagai, Y., Lapiere, C.M. and Gross, J. : Tadpole collagenase. Preparation and purification. *Biochemistry* 5 : 3123-3130, 1966.
 - 37) Sakai, T. and Gross, J. : Some properties of the products of tadpole collagenase with collagen. *Biochemistry* 6 : 518-528, 1967.
 - 38) Harper, H., Bloch, K.J. and Gross, J. : The zymogen of tadpole collagenase. *Biochemistry*

- 10 : 3035-3041, 1971.
- 39) Sellers, A. and Reynolds, J.J. : Identification and partial characterization of an inhibitor of collagenase from rabbit bone. *Biochem. J.* 167 : 353-360, 1977.
 - 40) Woessner, J.F. Jr. : Biological mechanisms of collagen resorption. In *Treatise on Collagen*. Vol. 2. Biology of collagen. Part B. Chapter 3 : 309, 1968.
 - 41) 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.
 - 42) Garant, P.R. : Collagen resorption by fibroblasts : A theory of fibroblastic maintenance of the periodontal ligament. *J. Periodont.* 47 (7) : 380-390, 1976 b.
 - 43) Garant, P.R. : An electron microscopic study of the periodontal tissues of germ free rats and rats mono-infected with *Actinomyces Naeslundii*. *J. Periodont. Res. Supplement* 15, 1976 a.
 - 44) Garant, P.R. : Cytosegregated collagen fibrils and acid phosphatase in the periodontal ligament. *J. Dent. Res.* 53 (Suppl.) 223, 1974.
 - 45) Kaumas, H. and Mathews, J.L. : Effect of pressure on the formation of collagen in the periodontal ligament. *Am. J. Orthodont.* 604-612, Dec. 1969.
 - 46) Carneiro, J. and Fava de Moraes, F. : Radioantographic visualization of collagen metabolism in the periodontal tissues of the mouse. *Archs oral. Biol.* 10 : 833-848, 1965.
 - 47) 佐伯 誠 : ラットの大白歯の歯周組織における実験的廃用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.
 - 48) 秋吉正豊 : 歯周組織と機能的刺激の影響について *歯科学雑誌*, 6 : 442, 508, 1949.
 - 49) Fullmer, H.M. and Gibson, W.A. : Collagenolytic activity in the gingivae of man. *Nature* 209 : 728-729, 1966.
 - 50) Fullmer, H.M., Taylor, R.E. and Guthrie, R. W. : Human gingival collagenase : Purification, molecular weight and inhibitor studies. *J. Dent. Res.* 51 : Suppl. to No. 2, 349-355, 1972.
 - 51) Uitto, V.J., Turto, H. and Saxén, L. : Extraction of collagenase from human gingiva. *J. Periodont. Res.* 13 : 207-214, 1978.
 - 52) 鈴木暲俊, 松本 章, 糸賀正修 : Lathyrogen の作用機序に関する研究. *骨代謝*, 4 : 33, 1971.
 - 53) Tanzer, M.L. : Experimental lathyrisms. *Internat. Rev. Connective Tissue Res.* 3 : 91-112, 1965.
 - 54) Bornstein, P. : The cross-linking of collagen and elastin and its inhibition in osteolathyrisms. *Amer. J. Med.* 49 (4) : 429-435, 1970.
 - 55) Golub, B., Stern, B., Glimcher, M. and Goldhaber, P. : The effect of a lathyrogenic agent on the synthesis and degradation of mouse bone collagen in tissue culture. *Arch. Oral. Biol.* 13 : 1395-1398, 1968.
 - 56) Smith, D.J. : Biochemical aspects of repair in lathyrisms. *J. Dent. Res.* 45 (3) : 500, 1966.
 - 57) Smith, D.J. : The connective tissue fiber-water interface : physiological and pathological Implication. *J. Dent. Res.* 48 (5) : 676, 1969.
 - 58) Levene, C.I., Bates, C.J. and Bailey, A.J. : Biosynthesis of collagen cross-links in cultured $3T_6$ fibroblast : Effect of lathyrogens and ascorbic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* 263 : 574-584, 1972.
 - 59) Levene, C.I. : Lathyrisms : In "The Biochemistry of disease" Vol. 3, Molecular Pathology of connective tissues. (ed. R. Pérez-Tamayo and M. Rojkind), Marcel Dekker INC. New York, 1973.
 - 60) 梅原義信 : 実験的に Lathyrisms を起こしたラットの白歯の歯周組織の変化について. *口病誌*, 26 : 1432, 1959.
 - 61) Gibson, W.A., Fullmer, H.M. : Histochemistry of the Periodontal Ligament : I. The Hydrogenases. *Periodontics.* Vol. 4, No. 2, 63-70, 1966.
 - 62) Gibson, W.A., Fullmer, H.M. : Histochemistry of the Periodontal Ligament : II. The Phosphatases. *Periodontics.* Vol. 5, No. 5, 226-236,

1967.

- 63) Gibson, W.A., Fullmer, H.M. : Histochemistry of the Periodontal Ligament. III. The Esterases. Periodontics. Vol. 6, No. 2, 71-77, 1968.
- 64) Gibson, W.A., Fullmer, H.M. : Histochemistry

of the Periodontal Ligament. IV. The Glycosidases. J. Periodont. 40 (8) : 34-39, 1969.

- 65) Gibson, W.A. : Endogenous Enzyme Activities of the Periodontium. J. Periodont. 41 (11) : 11-16, 1970.
-

図 1a

咬合機能を営んでいるラットの臼歯歯根膜における不溶性コラーゲン線維。歯根膜内には不溶性コラーゲン線維が発達し太い線維束をなして歯槽骨壁とセメント質面に付着。M₁の近心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×300

図 1b

咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の線維芽細胞, 骨芽細胞, セメント芽細胞(第2セメント質)は比較的高い酵素活性を示している。矢印: 線維芽細胞。

A : 歯槽骨, C : セメント質

acid phosphatase

×300

図 2a

咬合機能中絶後3日目のラットの臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維は歯槽骨壁側では萎縮減少を示している。セメント質面には太い線維束が付着している。M₁の遠心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×300

図 2b

咬合機能中絶後3日目のラット臼歯歯根膜における acid phosphatase 活性。線維芽細胞の活性は歯槽骨壁側で著しい増強を示している。M₁の近心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

acid phosphatase

×120

図 3a

咬合機能中絶後1週間目のラットの臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維の萎縮消失は歯槽骨壁側に著しい。セメント質面には比較的太い線維束が付着している。 M_1 の近心。

A: 歯槽骨, C: セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×200

図 3b

咬合機能中絶後1週間目のラットの臼歯歯根膜における acid phosphatase 活性。線維芽細胞の酵素活性は歯槽骨壁側により強い。骨芽細胞は強い活性を示している。 M_1 の近心。

A: 歯槽骨, C: セメント質, 矢印: 骨芽細胞

acid phosphatase

×200

図 4a

咬合機能中絶後2週目のラットの臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維の萎縮, 消失は歯槽骨壁面に強く, 線維束の付着は殆んど認められない。セメント質面の線維束も萎縮を示している。 M_1 の遠心。

A: 歯槽骨, C: セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×200

図 4b

咬合機能中絶後2週目のラットの臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性。歯槽骨壁側の線維芽細胞はセメント質面より高い活性を示している。 M_1 の近心。

A: 歯槽骨, C: セメント質

acid phosphatase

×400

図 5a

咬合機能中絶後3週目のラットの臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維は歯槽骨面では萎縮消失を示し、少数の細い線維が付着している。セメント質面には多数の線維束が付着しているが、一部は弛緩を示している。M₁の遠心。A：歯槽骨，C：セメント質
v. Gieson（核染色抜き） ×200

図 5b

咬合機能中絶後3週目のラットの臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性。歯槽骨壁側では線維芽細胞の活性の増強が認められる。M₁の遠心。
A：歯槽骨，C：セメント質
acid phosphatase ×200

図 6a

AAN 投与後3日目の咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維の萎縮および消失は歯槽骨壁側に著しいが、セメント質側にも及んでいる。正常の線維の配列はみられない。

A：歯槽骨，C：セメント質

v. Gieson（核染色抜き）

×200

図 6b

AAN 投与後3日目の咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性。線維芽細胞は歯槽骨壁側においても又中間部およびセメント質側においても著しい活性の増強を示していない。セメント芽細胞(矢印)は強い酵素活性を示している。

A：歯槽骨，C：セメント質

acid phosphatase

×300

図 7a

AAN 投与後 7 日目の咬合機能を営んでいるラットの臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維の萎縮、消失は広範にみられ正常の線維の配列が失われている。第 2 セメント質面には病的類骨様組織（星印）の増生がみられる。M₁ の遠心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×200

図 7b

AAN 投与後 7 日目の咬合機能を営んでいるラットの臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性。線維芽細胞は、歯槽骨壁側においても酵素活性の増強はみられない。病的類骨様組織の形成部位では形成細胞に酵素活性の増強（矢印）がみられる。

A : 歯槽骨, C : セメント質

acid phosphatase

×300

図 8a

AAN 投与後 12 日目の咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維は正常の歯根膜にみられるような線維束を形成していない。歯根膜内には処々に病的類骨様組織（矢印）の不規則な形成がみられる。

A : 歯槽骨, C : セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×300

図 8b

AAN 投与後 12 日目の咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性。線維芽細胞には歯槽骨壁面においてもセメント質面においても酵素活性の増強はみられない。病的類骨様組織の形成部位には形成細胞に酵素活性の増強が認められる。

A : 歯槽骨, C : セメント質

acid phosphatase

×100

図 9

AAN 12 日間投与後、中止 2 日後の咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維は再びセメント質と歯槽骨壁とを結合するような配列を示す。しかし太い線維束はまだ認められない。病的類骨様組織も消失過程を示している。 M_1 遠心根分岐部。

A : 歯槽骨, C : セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×200

図 10 a

AAN 12 日間投与後、中止 4 日を経た咬合機能を営むラット臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維は再生をきたし再び線維束を形成し、歯根を歯槽壁に懸垂するような線維走向をとる。 M_1 の遠心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×200

図 10 b

AAN 12 日間投与後、中止 4 日を経た咬合機能を営むラット臼歯歯根膜の acid phosphatase 活性。線維芽細胞には活性の特に著しい増強も低下もみられない。残存している病的類骨様組織の形成細胞はまだ比較的強い酵素活性を保っている。

A : 歯槽骨, C : セメント質

acid phosphatase

×200

図 11

AAN 12日間投与後、中止7日を経た咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜。不溶性コラーゲン線維は次第に太い線維束を形成し歯根を歯槽骨壁に懸垂するのに適した線維の走向を示すようになる。

M₁の遠心。A：歯槽骨，C：セメント質

v. Gieson (核染色抜き)

×200

図 12

咬合機能を営んでいる対照動物の臼歯歯根膜の β -glucuronidase 活性。歯槽骨壁の吸収部には強い酵素活性を示す破骨細胞 (oc) と少数の組織球 (矢印) がみられる。線維芽細胞の酵素活性は比較的弱く歯槽骨壁においても増強を示すことはない。

A：歯槽骨，C：セメント質

β -glucuronidase

×300

図 13

対照動物の臼歯歯根膜の non-specific esterase 活性。線維芽細胞は酵素活性を示しているが特定の場所における活性の増強を示していない。M₂の近心。

A：歯槽骨，C：セメント質

non-specific esterase

×200

図 14

咬合機能中絶後3日目のラット臼歯歯根膜の non-specific esterase 活性。歯槽骨壁側では線維芽細胞は高い酵素活性 (矢印) を示している。M₁の近心。

A：歯槽骨，C：セメント質

non-specific esterase

×100

図 15

AAN 投与後 3 日目の咬合機能を営むラット臼歯歯根膜の non-specific esterase 活性。線維芽細胞にはいずれの部位においても酵素活性に明らかな変化を示していない。M₁ の近心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

non-specific esterase

×200

図 16

対照動物の臼歯歯根膜の N-acetyl- β -glucosaminidase 活性。歯根膜の線維芽細胞は特定の部位における酵素活性の増強を示していない。M₁ の近心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

N-acetyl- β -glucosaminidase

×200

図 17

咬合機能中絶後 3 日目のラット臼歯歯根膜の N-acetyl- β -glucosaminidase 活性。歯槽骨壁側の線維芽細胞は酵素活性の増強を示している (矢印)。M₁ の近心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

N-acetyl- β -glucosaminidase

×200

図 18

AAN 投与後 3 日目の咬合機能を営んでいるラット臼歯歯根膜の N-acetyl- β -glucosaminidase 活性。線維芽細胞は一般にやや弱い酵素活性を示していて特定の部位における酵素活性の増強は認められない。M₁ の近心。

A : 歯槽骨, C : セメント質

N-acetyl- β -glucosaminidase

×200