歯周病罹患歯露出根面への培養細胞付着について

東 富 恵 中 西 恵 治 岡 本 莫

広島大学歯学部歯科保存学第2講座

(主任：岡本 莫教授)

(昭和58年8月31日受付)

Cell Attachment of Cultured Fibroblasts to the Exposed Root Surfaces of Periodontally Involved Teeth

Tomie HIGASHI, Keiji NAKANISHI and Hiroshi OKAMOTO

Department of Endodontology and periodontology,

School of Dentistry, Hiroshima University

(Director : Prof. Hiroshi OKAMOTO)

The purpose of this study is to investigate cell attachment in vitro to the exposed root surfaces of periodontally involved teeth. Extracted human teeth were split longitudinally into four pieces. The root segments of one group were untreated. Those of the other groups were root-planed or underwent application of either citric acid (pH 1.0) or sodium deoxycholate (NaD) and human serum after being root-planed. These samples were autoclaved and incubated with cultured fibroblast-like cells derived from the human gingiva. After being fixed and stained, the number of attached cells on each sample was calculated using a light microscope. A few samples were prepared for scanning electron microscopic

study. The following results were obtained.

1. Untreated root surfaces allowed little or no cell attachment.
2. On the root surfaces of the citric-acid-treated group, denuded fibers were observed and attached cells were the most numerous ; this was followed by the NaD-treated group and root-planed group, in that order.
3. The differences of the mean cell counts of the untreated group and the others were significant ($p \leq 0.001$). The root surfaces of the citric-acid-treated group and the NaD-treated group allowed a significantly higher degree of cell attachment than those of the root-planed group.

Key word : Cell attachment, Cultured fibroblast, Exposed root surface, Periodontally involved tooth

要旨 : 病的露出根面の処置法を確立するための第一段階として、未処理、ルートプレーニング、ルートプレーニング後クエン酸処理または sodium deoxycholate と human serum 処理の4種類について、歯周病罹患抜去歯露出根面への、ヒト歯肉由来培養線維芽細胞の付着増殖効果を、付着細胞の計数と走査電子顕微鏡観察により検討した。

その結果、未処理群の根表面には付着細胞はほとんど認められなかった。一方、クエン酸処理群の根表面には基質線維の裸出像が観察され、付着細胞数は4群の中最も高い値を示し、sodium deoxycholate 処理群、ルートプレーニング群の順に付着細胞数の減少が認められた。未処理群と実験群の付着細胞数の間には統計的に有意差が認められた。実験群間ではルートプレーニング群とクエン酸処理群および NaD 処理群との間には有意差が認められた。

索引用語 : 細胞付着、培養線維芽細胞、露出根面、歯周病罹患歯。

序 言

歯周病に罹患し、口腔内に露出した歯根面は、歯垢、歯石の付着とともに細菌由来の組織有害物質で汚染されており¹⁻⁴⁾、深い歯周ポケットの存在下では、これらを完全に除去することは極めて困難である。また、これらの存在は、歯周ポケット除去手術後の結合組織性再付着を妨げる要因の一つと考えられている。このような露出根面の処置法として、臨床的にはルートプレーニングの重要性が述べられており、実験的には Aleo ら⁵⁾により、in vitro で phenol water 法を用いてエンドトキシンの抽出を行った根面に、培養線維芽細胞が付着しやすいことが報告されている。さらに歯周外科処置後の再付着を促進する方法として、Register⁶⁾は、根表面の酸処理により基質線維の裸出をはかることが有効であると述べている。しかし一方では、セメント質除去に伴う知覚過敏症の発現や根面う蝕誘発の恐れがあり、また使用する根面処理液が歯肉に及ぼす影響も無視できない問題である。そこで本論文では、結合組織性再付着機序の解明の一端として、病的露出根面の処置法を確立する目的で、in vitro で種々の処理を施した根面への培養細胞の付着に関して検討した。

材料ならびに方法

1. 被験歯の処理

被験歯には、保存不可能と診断され抜去された高度の歯周病罹患歯 12 歯を用い、抜歯後直ちにあるいは冷凍保存後に、歯科用タービンを用いて歯冠部を除去し、得られた歯根を歯軸を中心に近遠心、頬舌方向に 4 分割し、各歯根片それぞれに下記の処理の一つを施した。

対 照 群：何ら根面処理を行わないもの

RP 群：超音波スケーラー (Ultrason 880a) と手用スケーラー (Y.B. 式) で除石し、ルートプレーニング (Gracy periodontal finishing curette) を行ったのち、超音波洗浄したもの

RP+CA 群：RP 群と同様の処理を行ったのち、pH 1.0 のクエン酸で 3 分間処理し、超音波洗浄したもの

RP+NaD 群：RP 群と同様の処理を行ったのち、生理的食塩水に溶解した 2% sodium deoxycholate (NaD) と human serum との等量混合液中に 3 分間浸漬し、超音波洗浄したもの

Fig. 1 Growth curve of 3rd subcultures of human gingival fibroblasts.
↑ : exchange of culture medium

Fig. 2 Cell calculation method

Fig. 3 Exposed root surface of periodontally involved tooth after 4 days incubation with gingival fibroblasts. No fibroblasts attached to root surface.

2. 実験方法

上記の処理を施した 12 歯のうちの 10 歯の各歯根片は 121°C、30 分間オートクレーブを用いて滅菌し、被験試料とした。

残り 2 歯は表面の形態観察を行うため、直ちに 0.1 M

カコジル酸ナトリウム緩衝 10% グルタルアルデヒド 溶液 (pH 7.4, 4°C) にて 1 時間の前固定ののち、同緩衝液中にて洗浄し、同緩衝 1% オスミウム酸溶液 (pH 7.4, 4°C) で 1 時間の後固定を行った。さらにエタノール上昇系列により脱水、酢酸イソアミル置換を経て、液化二酸化炭素を用いた臨界点乾燥 (HCP-1 型、日立製) を行い、イオンコーター (IB-3 型 EIKO 製) により金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡用試料に供した。

一方、ヒト歯肉を 10% ウシ胎児血清を含む 199 培地 (日水製) 中で 37°C, 5% CO₂ 気相下で培養、継代して得られた 2 代線維芽細胞に、0.25% トリプシンを添加し

て作製した細胞浮遊液を、あらかじめ被験歯根片を置いた 35 mm プラスチック製シャーレに、 4×10^5 個の細胞数となるように調整して加え、対数増殖期範囲内 (図 1) で、4 日間培養した。その後、歯根片を取り出し、洗浄後、0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝 10% グルタルアルデヒド溶液中で 1 時間前固定し、洗浄したのち、ギムザ染色を施した。図 2 に示すように、被験歯根片表面の任意の 5 箇所を選び、光学顕微鏡下に、接眼レンズにとりつけた 10×10 mm の方眼マイクロメーターの 400 方眼のうちの任意の 100 方眼の占める視野 (倍率 10×10 倍) の細胞数をカウントし、5 箇所の合計を付着細胞数

Fig. 4 Root-planned surface of periodontally involved tooth after 4 days incubation with gingival fibroblasts. A: Round or polygonal and spindle shaped fibroblasts attached to root surface. B: Fibroblasts attached very thin processes to root surface.

Fig. 5 Citric-acid-etched root surface of periodontally involved tooth. A: Hillock-like protrusions and grooves. B: Denuded fibers on root surface.

Fig. 6 Numerous cultured fibroblasts attached to citric-acid-etched root surface of periodontally involved tooth after 4 days incubation.

Fig. 7 NaD and human serum-prepared root surface of periodontally involved tooth after 4 days incubation with gingival fibroblasts.

Table 1 Effect of the preparation of diseased root surfaces on cell attachment in vitro

Preparation	Cont.	R.P.	R.P.+C.A.	R.P.+NaD
Number of cells	11.4 ± 4.1	159.7 ± 21.5	379.4 ± 33.8	288.2 ± 46.9

Significance levels indicated by brackets and asterisks: Cont. to R.P. (**), Cont. to R.P.+C.A. (**), Cont. to R.P.+NaD (**), R.P. to R.P.+C.A. (*), R.P. to R.P.+NaD (N.S.), R.P.+C.A. to R.P.+NaD (N.S.).

Number of samples = 10 ; Number of cells = mean ± S. E.
N. S. : no significance, * : significance at P < 0.05, ** : significance at P < 0.001

とした（図2）。その後、被験歯根片は後固定ののち、前述と同様の方法で走査型電子顕微鏡用試料とし、S-430型走査電子顕微鏡（日立製）を用いて形態観察した。

結 果

- 1. 処理歯根面への培養細胞付着像について
- 1) 対照群
露出根表面には菌垢、歯石などが付着しており、線維芽細胞の付着増殖はほとんど観察されなかった（図3）。
- 2) RP 群
被験歯根表面には、器具使用時に生じたと思われる線

状の切痕や、ひだ状あるいは鱗状のセメント質表層削除像、削除片などが観察され、増殖した線維芽細胞が散在していた（図4 A）。付着細胞は球形、多角形あるいは長紡錘形を呈しており、細長い細胞体からは多数の細長い突起が伸びているのが観察された（図4 B）。

3) RP+CA 群

酸処理後の露出根表面は、比較的平滑な小隆起や小陥凹を示し、少量あるいは多量の基質線維の裸出像が観察された（図5 A, B）。このような根面上には、長紡錘形細胞が密に増殖しており、細胞体からは、細い樹枝状突起が多数伸びている像が観察された（図6）。

4) RP+NaD 群

NaD 処理を施した根表面は RP 群とほぼ同様な像を呈しており、所々に長紡錘形の細胞集落が観察された(図7)。

2.4 処理歯根面への付着細胞数について

種々な処理を加えた根表面上で、付着ならびに増殖した線維芽細胞数を被験歯根片当たりで計数し、10 試料の平均値を表1に示した。付着細胞数は RP+CA 群が 379.4 ± 33.8 で最も高い値を示し、RP+NaD 群が 288.2 ± 46.9 、RP 群が 159.7 ± 21.5 とこれに続き、対照群は 11.4 ± 4.1 で極めて低い値を示した。さらに各種処理根面上での付着細胞数の有意差検定を行ったところ、表1に示すように実験群は3者いずれも対照群との間に有意($P < 0.001$)な細胞数の増加が認められ、さらに実験群間でも RP 群と RP+CA 群の間 ($P < 0.001$)、RP 群と RP+NaD 群の間 ($P < 0.05$) に、それぞれ有意差が認められた。

考 察

歯周病に罹患し露出した歯根面には、歯垢、歯石の付着とともに、細菌由来の組織為害性物質が浸透しているといわれている。その中でグラム陰性菌の細胞壁外層膜の構成成分である内毒素は培養線維芽細胞の剥離効果^{7,8)}を示すと述べられており、露出セメント質中に含まれ、phenol water 法で抽出された内毒素は、*E.Coli* のそれと比べてほぼ 40 倍の培養細胞の増殖抑制効果を示すとも報告されている⁹⁾。これら内毒素を含む細菌由来の組織為害性物質は、歯周ポケット形成や歯槽骨破壊機序との密な関連性^{9,10)}に加えて、歯周外科手術後における新生細胞の付着障害因子としての可能性が強いと考えられている。

これらの組織為害性物質を除去するために臨床的には、除石に加えてルートプレーニングによる壊死セメント質除去の必要性が強調されており、O'Leary ら³⁾は除石により根面の内毒素量はほぼ 1/6、ルートプレーニングによりほぼ 1/20 に減少すると報告している。しかし、過度のセメント質除去は知覚過敏症を生ずることもあり、ルートプレーニングだけではこの問題は解決できないようである。一方、根面に含まれる内毒素を除去するために、クエン酸を中心とする酸や、次亜塩素酸ナトリウム、炭酸ナトリウムなどのアルカリ溶液を使用する薬物処理法も報告されている^{11,12)}。最近、内毒素の生物学的処理法として、胆汁酸塩である sodium deoxycholate

(NaD) を human plasma の存在下に用いる方法の有効性が報告されており¹³⁾、前者は、内毒素を可逆的に non-pyrogenic subunits に解離し^{14,15)}後者は内毒素を degradation し、さらに enzymic detoxification を行う¹⁶⁾といわれている。

本論文では、未処理の根面と比較しながらルートプレーニングやクエン酸処理及び NaD 処理を施した根面への培養線維芽細胞付着に関して検討した。著者らの得た結果では、クエン酸処理も NaD 処理もルートプレーニングのみと比較するといずれも付着細胞数に有意差が認められたが、クエン酸処理と NaD 処理の間には、前者が後者より多い傾向を示すものの、統計的に有意差は認められなかった。外科処置後の露出根面処理法として、最近報告の多いクエン酸処理法の結合織性再付着の効果の主体は、線維露出にある^{17,18)}と述べられているが、このような効果とともに酸脱灰による解毒作用も指摘されている¹¹⁾。これらの線維芽細胞の親和性は根面の解毒のみで得られるのか、あるいは根面の線維露出によるものかなどの疑問を明らかにするためには、in vivo での再付着の様式と合わせてさらに検討すべきであろう。

総 括

未処理、ルートプレーニング、ルートプレーニング後にクエン酸処理又は sodium deoxycholate (NaD) と human serum 処理の1つを施した病的露出根面へのヒト歯肉由来培養線維芽細胞の付着増殖効果を検討し、以下の結果を得た。

1. 未処理の根表面には、付着細胞はほとんど認められなかった。
2. クエン酸処理を施した根表面には基質線維の裸出像が観察され、付着細胞数は4群中最も高い値を示し、NaD 処理群、ルートプレーニング群の順に、付着細胞数の減少が認められた。
3. 未処理群と実験群の付着細胞数の間には、統計的に有意差が認められた。実験群間ではルートプレーニング群とクエン酸処理群及び NaD 処理群との間には、有意差が認められた。

文 献

- 1) Hatfield, C.G. and Baumhammers, A. : Cytotoxic effects of periodontally involved surfaces of human teeth. Archs oral Biol., 16 : 465-468,

- 1971.
- 2) Aleo, J.J., De Renzis, F.A., Farber, P.A. and Varboncoeur, A.P. : The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J. Periodontol.*, 45 : 672-675, 1974.
- 3) Jones, W.A. and O'Leary, T.J. : The effectiveness of in vivo root planing in removing bacterial endotoxin from the roots of periodontally involved teeth. *J. Periodontol.*, 49 : 337-342, 1978.
- 4) Lucas, R.M., Chen, S.Y. and Aleo, J.J. : Hist-chemical study of strain L fibroblasts exposed to endotoxin. The effect on cellular organelles. *J. Periodontol.*, 50 : 20-22, 1979.
- 5) Aleo, J.J., De Renzis, F.A. and Farber, P.A. : In vitro attachment of human gingival fibroblasts to root surfaces. *J. Periodontol.*, 46 : 639-645, 1975.
- 6) Register, A. : Bone and cementum induction by dentin demineralized in situ. *J. Periodontol.*, 44 : 49-54, 1973.
- 7) Bergman, S. and Weibull, C. : Effect of endotoxin on tissue culture cells. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 77 : 698-706, 1969.
- 8) Neiders, M.E. and Weiss, L. : The effects of endotoxin on cell detachment in vitro. *Archs oral Biol.*, 18 : 499-504, 1973.
- 9) 青野正男, 岡田 宏 : 歯周疾患と細菌内毒素. 歯界展望, 46 : 217-223, 1975.
- 10) 内田武志, 岡本 莫 : 歯周病における細菌内毒素の役割. 広大歯誌, 9 : 1-11, 1977.
- 11) Selvig, K.A., Ririe, C.M., Nilvéus, R. and Egelberg, J. : Fine structure of new connective tissue attachment following acid treatment of experimental furcation pockets in dogs. *J. Periodont. Res.*, 16 : 123-129, 1981.
- 12) Niwa, M., Milner, K.C., Ribic, E. and Rudbach, J.A. : Alteration of physical, chemical and biological properties of endotoxin by treatment with mild alkali. *J. Bacteriol.*, 97 : 1069-1077, 1969.
- 13) Wirthlin, M.R. and Hancock, E.B. : Biologic preparation of diseased root surfaces. *J. Periodontol.*, 51 : 291-297, 1980.
- 14) Tarmina, D.F., Milner, K.C., Ribic, E. and Rudbach, J.A. : Reaction of endotoxin and surfactants. II Immunologic properties of endotoxins treated with sodium deoxycholate. *J. Immunol.*, 100 : 444-450, 1968.
- 15) Rudbach, J.A., Anacker, R.L., Haskins, W.T., Johnson, A.G., Milner, K.C. and Ribic, E. : Physical aspects of reversible inactivation of endotoxin. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 133 : 629-643, 1966.
- 16) Skarnes, R.C. : In vivo interaction of endotoxin with a plasma lipoprotein having esterase activity. *J. Bacteriol.*, 95 : 2031-2034, 1969.
- 17) Garret, J.S., Crigger, M. and Egelberg, J. : Effects of citric acid on diseased root surfaces. *J. Periodont. Res.*, 13 : 155-163, 1978.
- 18) Ririe, C.M., Crigger, M. and Selvig, K.A. : Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J. Periodont. Res.*, 15 : 314-327, 1980.