歯周病罹患歯の生物学的処理法の検討

—フィブロネクチンの応用—

川 西 文 子 谷 川 昌 生 東 富 恵 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62年12月20日受付)

Biological Treatment of Periodontally Involved Root Surfaces

—The effect of citric acid and fibronectin application—

Fumiko KAWANISHI, Yoshio TANIKAWA, Tomie HIGASHI and Hiroshi OKAMOTO

Department of Endodontology and Periodontology, School of Dentistry, Hiroshima University

(Chief : Prof. Hiroshi OKAMOTO)

The purpose of this study was to examine the effect of fibronectin application on root surface collagen fibers exposed by citric acid. Following scaling and root planing of extracted human periodontally involved teeth, the crown was cut and removed and the root thus obtained was split longitudinally for use as samples. The samples were treated with citric acid (pH 1.0) for 3 minutes, immersed in phosphate buffered saline (PBS) containing antibiotics for 24 hours, and then treated for 10 minutes with human plasma fibronectin (PFN) in four different concentrations, that is, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ml. The samples not immersed in PFN but treated only with citric acid were employed as controls. The morphology of the root surface following these treatments was observed by scanning electron microscopy.

The foregoing treated root samples were cultured with use of human gingival fibroblasts and following fixation, the number of cells attached to the root surface was counted under a light microscope. A morphological observation of the attached fibroblasts was also made. The following results were obtained.

1. Some difference in the root surfaces of the con-

trols was observed depending on the site, but many exposed collagen fibers were observed.

2. Exposure of collagen fibers was also observed on the root surface treated with citric acid plus PFN, but the fiber diameter tended to be large.

3. Though no significant difference in the number of attached cells could be demonstrated between the root surface treated with 0.25 mg/ml PFN and that of the controls, a significant increase in the number was observed when treated with PFN with a concentration greater than 0.5 mg/ml. Furthermore, the number of attached cells did not differ within the PFN concentration range of from 0.5 mg/ml to 2.0 mg/ml. These findings suggest that citric acid treatment following root planing and treatment with PFN having a concentration greater than 0.5 mg/ml are effective in enhancing attachment of fibroblasts.

4. It was observed by scanning electron microscopy following culture after either treatment with citric acid or treatment with citric acid plus PFN that the fibroblasts were so extended and densely attached that they almost completely covered the root surface.

Key words : Periodontally involved root surface, Cell attachment, Human gingival fibroblast, Plasma fibronectin, Citric acid

要旨 : 歯周病罹患歯露出根面に対する処理の一つとして、クエン酸により裸出した根表面膠原線維に対してフィブロネクチンを応用してその影響を検討した。ルートプレーニング後にクエン酸処理 (pH 1.0, 3分間) し、プラズマフィブロネクチン (PFN 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) に10分間浸漬した歯根表面の形態学的観察と各々の処理歯根への培養線維芽細胞の付着数を測定した。その結果、クエン酸 + PFN 処理の表面像はクエン酸処理のものと同様に多数の膠原線維が裸出していたが、その線維の直径が太い傾向が認められた。また付着細胞数においては 0.25 mg/ml PFN 処理歯根面ではクエン酸処理のみとの間に有意差は認められなかったが、0.5 mg/ml 以上の PFN 濃度のもものでは有意な増加を認めた。以上のことより、ルートプレーニング後にクエン酸処理を行い、さらに 0.5 mg/ml 以上の濃度の PFN 処理を加えると、線維芽細胞の付着促進に有効であることが示唆された。

索引用語 : 歯周病罹患歯根面, 細胞付着, ヒト歯肉由来線維芽細胞, プラズマフィブロネクチン, クエン酸

緒 言

歯周病罹患歯の病的露出根面は、歯石の付着とともにブラーク及びブラーク由来の種々の有害物質が浸透あるいは吸着¹⁻⁴⁾しており、化学的、形態学的変化^{5,6)}をきたしている。このような根面に対しては、歯周外科処置を行っても上皮の深行増殖や付着上皮の根尖側移動を生じ、付着様式の中では最も抵抗性のない long junctional epithelial attachment を示すことが多く、望ましい結合織性新付着は起こりにくいといわれる。そこで外科処置後に露出根面と歯根膜線維や歯肉との機能的線維性付着、すなわち新生セメント質添加を伴う結合織付着を促進することを目的として、今日までに多くの研究がなされてきた。著者らも、この目的のためルートプレーニング後にクエン酸処理を行った根面への培養線維芽細胞の付着について検討し、ルートプレーニングのみのものと比較してクエン酸処理により付着細胞数が有意に増加し、その有用性を示唆する結果を得た⁷⁻¹⁰⁾。このことはルートプレーニングによる、歯根表面のエンドトキシンを含む有害物質の機械的除去と、クエン酸処理による基質膠原線維の裸出との相乗効果によると考えられた。

一方、接着性糖タンパク質であるフィブロネクチン (FN) は線維芽細胞がコラーゲンやフィブリンなどの基質に付着するために、重要な役割を果たすといわれている^{11,12)}ことから、今回は今までの実験に加えて、この FN を種々の濃度で応用することにより、FN がクエン酸により裸出した膠原線維や、培養線維芽細胞に対してどのような影響を及ぼすかを検討してみた。

材料ならびに方法

1. 実験材料

本実験に使用した歯は、広島大学歯学部附属病院第2保存科外来に来院した患者の、保存不可能と診断された抜去歯で、スケーリングやルートプレーニングなどの根面処置が施されないで歯石沈着の顕著な歯周病罹患歯20本を用いた。

被験歯は抜去後直ちに生理食塩水で洗浄し、歯根面に付着する血液や歯垢、歯肉を除去した後、 -80°C にて冷凍保存した。

2. 実験方法

被験歯を室温解凍後、まず歯頸線と結合織付着部に #1/2 round bur を用いタービンで溝を入れて、露出境界部を明らかにした後、超音波スケーラー (Ultrason 880 A) と手用スケーラー (Y.B. 式、鎌型) で除石した。その後、Gracy curette (Hu-Friedy 社製) にて、ガラス様の滑沢な歯根面が得られるまでルートプレーニング (RP) を行った。

次に歯冠部を切断除去し、得られた歯根部を歯軸方向に分割して被験歯根片とし、生理食塩水中で超音波洗浄を10分間行った。その後、これらの被験歯根片を pH 1.0 のクエン酸 (CA) に3分間浸漬し、phosphate buffered saline (PBS) で洗浄した。次いで、歯根片を 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン、600 $\mu\text{g/ml}$ ペニシリン、20 $\mu\text{g/ml}$ アンホテリシン B を含む PBS に24時間浸漬滅菌した。さらに、凍結乾燥ヒトプラズマフィブロネクチン (PFN, ミドリ十字社製) を無血清培地 BM 86 Wisler (Boehringer Mannheim 社製) 中に溶解させ 0.25, 0.5, 1.0, および、2.0 mg/ml の4種の濃度の溶液を作

図 1 a RP のみ；スケーラー操作による条痕と平滑な表面像

図 1 b 1a の一部拡大像；鱗状のセメント質。線維の裸出はない

製した。各濃度の PFN 溶液中に、歯根片をそれぞれ 10 個ずつ 10 分間浸漬し 4 実験群とした。なお、RP+CA 処理のみで PFN 中に浸漬しないものを対照群とし、計 5 種類の処理歯根片を細胞付着実験に供した。

各処理後の歯根表面の形態を観察するために RP, RP+CA, RP+CA+0.25 mg/ml PFN 処理, RP+CA+1.0 mg/ml PFN 処理の被験歯根片を数個 PBS で洗浄後、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、同緩衝液で洗浄後、同緩衝 1% オスミウム酸溶液で 1 時間の後固定を行った。次いで、エタノール上昇系列にて脱水、酢酸イソアミル置換、液化二酸化炭素による臨界点乾燥 (HCP-1 型、日立社製) を経て、イオンコーター (IB-3 型、エイコー社製) による金蒸着を行い、走査型電子顕微鏡用試料とした。一方、細胞付着実験に用いた線維芽細胞は、ヒト歯肉を 10% ウシ胎児血清 (Gibco 社製) を含む 199 培地 (日本水社製) 中で 5% CO₂ 気相下、37°C にて培養し、0.25% トリプシン溶液 (Difco 社製) で単離分散し、6~7 回継代して得た。

前述の 5 種類の処理歯根片を 35 mm プラスチックシャーレ (Falcon 社製) に静置しておき、1 シャーレにつき 4×10^5 個の培養線維芽細胞を含む 199 培地を加え、5% CO₂ 気相下、37°C にて 3 日間培養した。

その後歯根片を PBS で洗浄後、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 時間前固定し洗浄後、ギムザ染色を行った。光学顕微鏡下に 10×10 mm, 400 方眼の接眼マイクロメーターを取りつけ、被験歯根表面の任意の 5 カ所を選び、各測定箇所

における 100 方眼の占める視野 (倍率 15×10) の細胞数をカウントし、5 カ所の合計を 1 歯根片の付着細胞数とした。その後、前述と同様な方法で走査型電子顕微鏡用試料を作製し、歯根面へ付着した細胞の形態学的観察を行った。

結 果

1. 処理歯根面像

1) RP 処理群

表面にはスケーラー操作によると思われる細い線状の条痕が多数認められ、表面は平滑であるが一部、鱗状にセメント質が剝離しかけた部位が観察された。シャープな線維、基質線維の裸出は認められなかった (図 1 a, b)。

2) RP+CA 処理群

類円形の結節状あるいは敷石状のなだらかな小隆起群が認められ (図 2 a)、小隆起部、その周囲ともに基質線維の裸出が多数観察された (図 2 b)。また、半球状の小陥凹が存在する部位もあり、拡大すると陥凹の周囲を縁どりするように線維の裸出が観察された (図 3 a, b)。

一方、根面の凹凸が比較的少なく、根面から突出した細い線維束が不規則に裸出しているものも認められ、また、根表面にはしばしばセメント小孔の露出像が観察された (図 4 a, b)。

3) RP+CA+0.25 mg/ml PFN 処理群

基質線維がレース状に交錯するように裸出していた (図 5 a)。拡大像では基質線維あるいは線維束が交織し

図 2 a RP+CA 処理；類円形の小隆起

図 2 b 2a の一部拡大像；基質線維の裸出

図 3 a RP+CA 処理；半球状の小陥凹

図 3 b 3a の一部拡大像；陥凹の周囲の基質線維の裸出

て不規則に走行していた（図 5b）。

また、RP 時にできたひだ状の条痕が認められる（図 6a）ものもあった。拡大すると、その表面には多数の基質線維が裸出錯走しており、さらに CA 処理群より径の太い（ $0.2 \sim 0.4 \mu\text{m}$ ）、大小の長さの線維が表面から突出しているのが認められた。象牙細管の露出も観察され、一部突出線維がこの象牙細管より出ている像も見られた（図 6b）。

4) RP+CA+1.0 mg/ml PFN 処理群

表面は比較的平滑なものもあるが（図 7a）、その拡大像においては、0.25 mg/ml PFN 処理群の像と同様に CA 処理群よりやや太めの突出線維が観察された（図 7b）。

またセメント質が一部鱗状に剝離しかけた部位では、

錯走したセメント質由来の細い線維集団が認められる部位もあった（図 8a, b）。

5) 培養細胞付着像

培養細胞は、CA 処理群（図 9a）、1.0 mg/ml PFN 群（図 9b）ともいずれもよく根面に付着しており、その形態は両者ともよく伸長して根面を被覆するほど密に付着増殖しているのが観察された。両者の形態における差は特に認められなかった。

2. 処理歯根面への細胞付着数

前記の各々の被験歯根面への付着細胞数を算出し、10 歯片の平均値と標準誤差を図 10 に示した。RP+CA の対照群は 364 ± 31 、RP+CA+0.25 mg/ml PFN 群は 420 ± 28 、0.5 mg/ml PFN 群は 501 ± 27 、1.0 mg/ml PFN 群

図 4 a RP+CA 処理；セメント小孔の認められる根面

図 4 b 4a の一部拡大像；基質線維の裸出

図 5 a RP+CA+0.25 mg/ml PFN 処理；レース状に交錯する基質線維

図 5 b 5a の一部拡大像；不規則な線維の走行。象牙細管の露出（矢印）

では 493 ± 38 , 2.0 mg/ml PFN 群は 511 ± 29 の値を示した。これらを統計学的に分析すると, 0.25 mg/ml PFN 群では対照群との間に有意差は認められなかったが, 0.5 mg/ml 以上の PFN 群では対照群に比べ有意な細胞数の増加を認めた。

考 察

歯周疾患罹患歯の露出セメント質は, 歯石とともに, 細菌叢や付着物でおおわれており^{13,14}, 表層過石灰化^{5,6}, 膠原線維束の変化^{9,10,15,16}, 病的顆粒成分の集積¹⁷などの形態学的変化や, 細菌内毒素^{1~3}, 細胞増殖抑制物質⁴の浸透, 吸着などの細菌学的・生化学的变化が存在する

ことが報告されており, このような根面に, いかにしてセメント質を新生させ, それに膠原線維束を埋入させた, いわゆる機能的線維性再付着を起こさせるかが歯周治療の課題となっている。

長期間口腔内に露出した根面表層の膠原線維束には, 時間の経過とともに, 膨化, 癒着, 配列の乱れ, 細線維化などが生じ^{9,10,14}, これにより発現した線維間隙には沈着物が付着, 埋入し, しだいに膠原線維束の構造を失っていくといわれている¹⁵。このような構造変化をきたす原因の一つに, 表層の膠原線維束の石灰化があり, これは露出セメント質表面の膠原線維に付着した細菌層の成熟に伴った石灰化¹⁸と, 唾液由来の Ca, P, Mg 元素の沈着で起こる石灰化¹⁹によるものと考えられている。

図 6 a RP+CA+0.25 mg/ml PFN 処理；セメント質表層剝離像

図 6 b 6a の一部拡大像；裸出錯走する多数の基質線維。表面から突出する直径 0.2~0.4 μm の太い線維（矢印）

図 7 a RP+CA+1.0 mg/ml PFN 処理；比較的平滑な表面像

図 7 b 7a の一部拡大像；太い線維の突出（矢印）

また、従来よりエンドトキシン等の組織為害性物質はセメント質深部に浸透していると報告されてきた^{1~3, 20)}。しかし最近、Nakib ら²¹⁾により、ヒト歯周病罹患歯根をエンドトキシン中に浸漬しても、エンドトキシンは露出セメント質表層に吸着されるのみで、その深部までは浸透しないことが示され、さらに、大島²²⁾は、歯周病罹患歯の表面から削片を採取し、可溶成分の抽出を行い、培養線維芽細胞の増殖に及ぼす影響を調べ、表層より 20 μm 以内に細胞増殖抑制物質が存在すると述べている。このように、露出セメント質におけるエンドトキシンの浸透範囲については、さらに検討を要するが、この生物学的為害物質除去のため、臨床的には従来より機械的な

RP 処理が行われており、硬い平滑な面になるまで行うと Nishimine ら²³⁾はエンドトキシン量が約 1/80 に減少することを報告し、RP の重要性を示唆している。

次に露出歯根への化学的処理として、CA が取り上げられ、RP 後の使用にその有効性が認められている^{24~28)}。すなわち濱⁶⁾および Garret ら²⁷⁾によると、露出セメント質に pH 1.0 CA を塗布すると、その一部にのみコーゲン様線維の裸出が見られるだけで、セメント質表面の大部分は泥状の物質に覆われ平坦なままであり、露出セメント質の表面は CA の脱灰作用に対し、かなり抵抗性のあるもので覆われており、同様に CA を露出セメント質表層の過石灰化層に塗布してもほとんど脱灰効果は

図 8 a RP+CA+1.0 mg/ml PFN 処理；セメント質が剝離しかけた粗造な表面像

図 8 b 8a の一部拡大像；錯走した細い裸出線維集団

図 9 a RP+CA 処理；よく伸長して、根面をほぼ被覆している培養線維芽細胞像

図 9 b RP+CA+1.0 mg/ml PFN 処理；9a と同様な所見

認められないが、この過石灰化層を RP であらかじめ取り除いておくと、TEM, SEM 像で根面にコラーゲン線維の裸出が認められた。また本実験においても、RP のものの表面像は線維成分の露出が見られなかったが、CA 処理を加えると、線維の裸出が著しく認められた。

さて線維性付着のメカニズムについては、Ririe ら²⁸⁾, Frank ら²⁹⁾は、根面の表層脱灰が起こって、裸出したデンチンコラーゲンに、歯肉の線維芽細胞が産生したコラーゲンが直接接合するのを観察しており、引き続いて脱灰されたデンチン表面の再石灰化と新生セメント質の添加が起こるのであろうと述べている。

さらに、この線維性付着をより歯冠側で起こさせるためには、上皮細胞が深行増殖する前に、できるだけすみやかに線維芽細胞を根面の裸出された膠原線維に誘導付着させて新生線維の形成を促進させる必要がある。そこで線維芽細胞の接着性糖タンパク質であり上皮細胞には親和性のない FN をあらかじめ根面上に塗布しておけば、線維芽細胞自身が FN を産生し、接着するのを待つ場合よりは、線維芽細胞の裸出膠原線維への付着がより一層速くなり、また付着位置もより歯冠側になると思われる。

当論文では、*in vitro* でより生体の条件に近づけるた

図 10 処理根面への付着細胞数

めに、RP+CA 処理後の歯根面を PFN で処理し、培養線維芽細胞の付着増殖状態を検索してみた。すなわち歯根を種々の濃度の PFN を含む無血清培地中であらかじめ処理し、線維芽細胞とともに培養した結果、PFN 処理しないものと比較して、血漿中の PFN 濃度 (0.33 mg/ml) より高い濃度の 0.5 mg/ml 以上において、付着細胞数の有意な増加を認めた。

著者らが行った予備実験において、RP 処理、RP+CA 処理、RP+PFN 処理の 3 処理を行い、同様に付着した培養線維芽細胞数を測定したが、RP+CA 処理では RP 処理のみと比較して付着細胞数が有意に多かったが、RP+PFN 処理では RP 処理のみとの間には有意差は認められなかった。これらのことから PFN は脱灰した膠原線維と線維芽細胞との結合に関与しており、CA 処理をしないと PFN の効果が現れないことがわかった。

Karp ら³⁰⁾は、ブタ小白歯のセメント質を除去したデンチン disk を非脱灰のまま、あるいは脱灰して FN または laminin に浸漬し、象牙質表面に結合するこれらの付着タンパク質の量を modified direct ELISA 法を用いて検討した。その結果、非脱灰のものより脱灰の方が FN 結合が 2 倍も大きく、一方、細菌の collagenase で処理した脱灰表面への FN 結合は阻止され、FN は裸出した膠原線維に結合することが示唆された。一方、上皮細胞付着を仲介する laminin は、脱灰歯根に比べて非脱灰歯根に 2 倍も結合したと述べている。

また、Terranova ら³¹⁾は、ヒト歯根を除石し非脱灰または脱灰後に FN 処理し、これに *in vitro* で線維芽細胞

と上皮細胞を付着させたところ、線維芽細胞は、非脱灰のものよりも脱灰したものに、上皮細胞は脱灰したものよりも非脱灰のものに多く付着した。これらの結果は露出歯根面の表面処理によって特殊な接着タンパク質の付着が促進され、ひいては歯根表面への細胞の選択的付着が促進されることを示唆している。

細胞・FN・膠原線維の結合様式について Kleinman¹¹⁾は、FN にはコラーゲンと細胞膜表面を認識する部位があり、FN はまず、コラーゲンの特異的なアミノ酸配列部に結合し、次に細胞膜表面の glycolipid として存在する FN レセプターが、proteoglycan の調節下に、FN-コラーゲン複合体に結合し、さらに、細胞質内のアクチン線維束と連絡して細胞伸展を起こすのではないかと考察している。

PFN の形態に関しては通常、血漿中や他の体液中に中性で二量体で溶けているが、4°C、低イオン強度の液内で徐々に会合して線維状複合体となる。線維の基本は 2~3 nm の直径で長さは数 μm となり、側方へも会合して光学顕微鏡でみられる線維に成長する¹²⁾と言われている。今回の実験においては処理条件が室温であったため、PFN の存在をはっきりと断定できないが、CA 処理のものと比較して、根面の裸出線維の径が太かったという点から考えて、膠原線維の表面に PFN が多量に結合していたことが推察される。これらの確認のためには、さらに蛍光抗体法等の免疫化学的方法や、細胞表面標識法等による検索がなされなければならない。

in vivo においては、Caffesse ら³²⁾はイヌを用いて組織学的に調べ、CA+FN 処理では CA 処理に比べて、結合組織再付着がより歯冠側に位置するという結果を得ている。

以上、接着性糖タンパク質である FN を RP+CA 処理後に用いると、線維芽細胞の付着をより促進することがわかった。今後は臨床応用のための方法・条件について検討を加えていく必要がある。

総 括

RP 処理を施したヒト歯周病罹患歯露出根面に、CA、または CA+PFN (0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/ml) の処理を行い、これら根面の走査電顕による形態学的観察とともに、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. CA 処理後の根表面は部位により多少の差を示したが、多数の膠原線維の裸出像が観察された。

2. CA+PFN 処理の表面像においても、膠原線維の裸出が認められたが、その径が太い傾向を示した。

3. 付着細胞数においては、0.25 mg/ml PFN 処理歯根面では CA 処理のみとの間に有意差は認められなかったが、0.5 mg/ml 以上の濃度の PFN 処理では有意な増加を認めた。

4. 培養後の走査電顕像においては、CA 処理、CA+PFN 処理とともに、根表面の線維芽細胞はいずれもよく伸長しており、歯根表面をほぼ被覆しつくすほど密に付着しているのが観察された。

これらのことから、RP 後に CA 処理を施し、さらに 0.5 mg/ml 以上の濃度の PFN 処理を加えると、線維芽細胞の付着促進に有効であることが示唆された。

本研究は一部、文部省科学研究費（昭和 60 年度奨励研究 A、課題番号 60771582）によった。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Daly, C.G., Seymour, G.J., Kiser, J.B. and Corbet, E.F. : Histological assessment of periodontally involved cementum. J. Clin. Periodontol., 9 : 266-274, 1982.
- 4) Olson, R.H., Adams, D.F. and Layman, D.L. : Inhibitory effect of periodontally diseased root extracts on the growth of human gingival fibroblasts. J. Periodontol., 56 : 592-596, 1985.
- 5) Wirthlin, M.R., Pederson, E.D., Hancock, E. B., Lamberts, B.L. and Leonard, E.P. : The hypermineralization of diseased root surfaces. J. Periodontol., 50 : 125-127, 1979.
- 6) 濱 久友 : 歯周疾患に罹患した歯根面とその改善に関する研究. 日歯周誌, 24 : 8-25, 1982.
- 7) 東 富恵, 中西恵治, 岡本 莫 : 歯周病罹患歯露出根面への培養細胞付着について. 日歯周誌, 25 : 800-805, 1983.
- 8) 東 富恵, 岡本 莫 : 歯周病罹患及び健全歯根面への培養細胞付着について. 広大歯誌, 15 : 344-348, 1983.
- 9) 東 富恵, 萩原一宏, 川西文子, 谷川昌生, 岡本 莫 : 歯周病罹患歯露出根面の変化とその処理法について. 広島歯誌, 14 : 1-8, 1986.
- 10) 岡本 莫, 東 富恵 : 露出セメント質の病的変化とその処置法. 歯科ジャーナル, 26 : 29-37, 1987.
- 11) Kleinman, H.K., Klebe, R.J. and Martin, G.R. : Role of collagenous matrices in the adhesion and growth of cells. J. Cell. Biol., 88 : 473-485, 1981.
- 12) 柄崎脩一 : 細胞表面の接着性糖蛋白高分子 : フィブロネクチン. 蛋白質 核酸 酵素, 25 : 890-905, 1980.
- 13) 東 富恵, 飯田康二, 岡本 莫 : 歯周病罹患歯露出根面の走査電子顕微鏡的検索. 広大歯誌, 15 : 60-65, 1983.
- 14) 萩原一宏, 東 富恵, 川西文子, 岡本 莫 : 歯周病罹患歯セメント質断面の走査型電子顕微鏡的検索. 広大歯誌, 18 : 324-330, 1986.
- 15) 米沢 実 : ラット露出根面表層における膠原線維の変化に関する走査型電子顕微鏡的研究. 日歯周誌, 23 : 306-326, 1980.
- 16) Selvig, K.A. : Ultrastructural changes in cementum and adjacent connective tissue in periodontal disease. Acta. Odon. Scand., 24 : 459-500, 1966.
- 17) Armitage, G.C. and Christie, T.M. : Structural changes in exposed human cementum. I. Light microscopic observation. J. Periodontol. Res., 8 : 343-355, 1973.
- 18) Rizzo, A.A., Scott, D.B. and Bladen, H.A. : Calcification of oral bacteria. An. N.Y. Acad. Sci., 109 : 14-22, 1963.
- 19) 濱上弘晴 : ヒト白亜質表層における微細構造の変化に関する走査型電子顕微鏡的研究—シャーペー線維の変化について—. 歯科学報, 80 : 1069-1093, 1980.
- 20) 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.

- 21) Nakib, N.M., Bissada, N.F., Simmelink, J.W. and Goldstine, S.N. : Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. J. Periodontol., 53 : 368-378, 1982.
- 22) 大島光宏 : 細胞培養法を用いたスケーリング・ルートプレーニングの効果に関する研究. 日歯周誌, 29 : 65-75, 1987.
- 23) Nishimine, D. and O'Leary, T.J. : Hand instrumentation versus ultrasonics in the removal of endotoxins from root surfaces. J. Periodontol., 50 : 345-349, 1979.
- 24) Crigger, M., Bogle, G., Nilvéus, R., Egelberg, J. and Selvig, K.A. : The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. J. Periodont. Res., 13 : 538-549, 1978.
- 25) Register, A.A. and Burdick, F.A. : Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, Demineralized *in situ*. I. Optimum range. J. Periodontol., 46 : 646-655, 1975.
- 26) Register, A.A. and Burdick, F.A. : Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, Demineralized *in situ*. II. Defect repair. J. Periodontol., 47 : 497-505, 1976.
- 27) Garret, J.S., Crigger, M. and Egelberg, J. : Effects of citric acid on diseased root surfaces. J. Periodont. Res., 13 : 155-163, 1978.
- 28) 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.
- 29) Frank, R., Fiore-Donno, G., Cimasoni, G. and Matter, J. : Ultrastructural study of epithelial and connective gingival reattachment in man. J. Periodontol., 45 : 626-635, 1974.
- 30) Karp, W., Sodek, J., Aubin, J.E. and Melcher, A.H. : A comparison of fibronectin and laminin binding to undemineralized and demineralized tooth root surfaces. J. Periodont. Res., 21 : 30-38, 1986.
- 31) Terranova, V.P. and Martin, G.R. : Molecular factors determining gingival tissue interaction with tooth structure. J. Periodont. Res., 17 : 530-533, 1982.
- 32) Caffesse, R.G., Holden, M.J., Kon, S. and Nasjleti, C.E. : The effect of citric acid and fibronectin application on healing following surgical treatment of naturally occurring periodontal disease in beagle dogs. J. Clin. Periodontol., 12 : 578-590, 1985.