歯肉剥離掻爬手術後の新付着に関する研究

—歯肉結合組織，歯根膜および歯槽骨由来の培養細胞
における形態的，機能的検討—

林 正 純

大阪歯科大学大学院歯学研究科歯周病学専攻

(指導：山岡 昭教授)

(昭和63年1月6日受付)

Morphological and Functional Study *in vitro* on Culture Cells Derived from Gingival Connective Tissue, Periodontal Ligament and Alveolar Bone

Masazumi HAYASHI

Department of Periodontology, Osaka Dental University

(Director : Prof. Akira YAMAOKA)

It is suggested that the type of cells responsible for the initial repopulation to the root surface determines the repair process following flap surgery. Recent studies have indicated that cells derived from the periodontal ligament, in contrast to those from the gingival connective tissue and alveolar bone, have the potential to restore periodontal architecture with new attachment. However, several studies suggested that osteogenesis enhanced the new attachment. The purpose of the present study is to determine the phenotype of cells which leads to the periodontal regeneration with new attachment.

Culture cells were isolated the gingival connective tissue, periodontal ligament and alveolar bone by using explant method. After the three types of cells were compared in regard to morphology (light and transmission electron microscopy) and function (doubling time, saturation density, life span) *in vitro*, they were each co-cultured with dentin slices in MEM+10% FBS to study on their attachment phase. Dentin

slices were picked up after 1, 3 and 7 days of incubation.

The phase-contrast microscopic findings showed that emigrating culture cells from gingiva and periodontal ligament appeared to be fibroblastic, while culture cells from alveolar bone had mosaic appearance. Little difference in ultrastructural features was found among the three types of cells, but cell junction and extracellular microfibrils were observed in cells from alveolar bone only. The log of growth curve showed that cells from periodontal ligament were inferior to those from gingiva and alveolar bone in the proliferation and migration potency. Concerning the attachment-activity to the root surface, cells from alveolar bone were superior to those from gingival and periodontal ligament.

These findings suggest that the osteoblast-like cells which appeared to the coronal root surface could, at least in part, be concerned in the new cementum formation in a limited portion of supracrestal area.

本論文の要旨は，第30回春季日本歯周病学会（1987年4月17日）および第360回大阪歯科学会例会（1987年6月30日）において発表した。

Key words : Culture, Fibroblast, Osteoblast, New cementum, New attachment

要旨：歯肉剥離掻爬手術後の新付着にどのような細胞 phenotype が関与するかを解明する目的で、ニホンザル歯周組織（歯肉結合組織部、歯根膜部、歯槽骨再生部）由来培養細胞について、超微形態、増殖速度、倍加時間、および根象牙質面との付着様式を検索した。その結果、形態学的には、歯肉由来細胞および歯根膜由来細胞は、線維芽細胞様形態を示していたのに対し、歯槽骨由来細胞は、モザイク状を呈していた。超微構造的には、骨由来細胞のみ細胞間接合や多量の未熟な微細線維の形成が見られた。増殖速度、倍加時間に関しては、骨由来細胞が他の細胞より優れていた。根象牙質面との付着様式は、各細胞間に際だった差異は観察されなかったものの、骨由来細胞のみ、根面に対して積極的な付着傾向を示した。以上の所見から、歯槽骨頂部に限局してみられる新付着には、骨芽細胞様細胞が関与することが示唆された。

索引用語：培養、線維芽細胞、骨芽細胞、新生セメント質、新付着

緒 言

歯肉剥離掻爬手術後、より歯冠側での新付着獲得のため、今日まで、硬軟両組織に対し種々の視点から多面的アプローチがなされている。現在、対硬組織に関しては、新生歯肉により適切な根面を提供するため、歯周疾患汚染根面に対する機械的¹⁻³⁾、生物学的^{4,5)}、化学的⁶⁻¹⁰⁾等の根面処置法が行われている。一方、対軟組織の面では、新付着を促進する細胞群を優先的に根面上に再集積させようとする試み¹¹⁻¹³⁾がなされている。すなわち、軟組織側からの術後の付着様式を考慮した場合、根面上に集積する細胞群の特性がその付着形成に少なからず影響を与える¹⁴⁻¹⁶⁾ことから、現在研究の焦点は、組織再構築に参画する細胞 phenotype にあてられている。

細胞は、そのおかれている微小環境により、種々の構造的、機能的変化をうけるとともに、常に活発な代謝を行っている。線維芽細胞は、一般に細胞外基質コラーゲン線維の分泌、合成に関与するとともに、その分解、吸収に携わる¹⁷⁻¹⁹⁾。さらにこの一般の性質の他に、それらの存在する部位により、その特性を異にすることが明らかにされている²⁰⁾。近年、歯周組織の再生に関連して、歯肉結合組織由来および歯根膜由来細胞の機能的役割について数多くの検索が行われている。これらの報告によれば、歯肉由来細胞が、術後根面に集積すると、根吸収を惹起せしめ、新付着成就には好ましくない²¹⁻²³⁾とされている。一方、歯根膜由来細胞は、石灰化組織であるセメント質、骨の基質形成に関与すると考えられ^{24,25)}、新付着にはこの細胞集積の必要性^{11,14)}が唱えられている。すなわち歯周外科処置後の再構築様式は、構築細胞の domain が重要で¹⁴⁾、新付着形成には、概念的な考えではあるが、歯根膜由来細胞がより早期に歯冠側へ移動することが望まれている^{21,26-28)}。半面、歯槽骨の再生と新付

着との関連性についての検索もなされており²⁹⁻³⁷⁾、新付着に対する骨再生部由来細胞の関連性も示唆されている³²⁻³⁷⁾。

以上述べてきたように、現在まで歯周組織各部細胞群の根面への対応について、多面的分析はなされているものの、なお未詳な点が少なくない。特に、各組織由来細胞群の増殖能、付着様式を比較検討した研究は皆無である。そこで著者は、これらの歯周組織の治癒に関与する細胞の構造や機能的役割を明確にするため、ニホンザル歯周組織より歯肉結合組織由来 (Monkey Gingival Fibroblast = MGF)、歯根膜由来 (Monkey Periodontal Ligament Fibroblast = MPF)、ならびに歯槽骨由来細胞 (Monkey Bone derived Fibroblast, Osteoblast-like cell = MBF) を単離、培養し、それらの培養細胞について比較検討した。

実験材料と方法

1. 培養細胞

実験には、ニホンザル1頭を用い、健康歯肉結合組織から単離した線維芽細胞 (MGF)、および抜去歯歯根に付着している歯根膜から単離した線維芽細胞 (MPF)、そして歯槽骨骨再生部から単離した細胞 (MBF) を使用した。

2. 初代培養および継代培養

まず各種細胞を得るために、あらかじめブラッシングおよびスクレーピングによるプラークコントロールを徹底させたニホンザルを用いた。各種細胞のうち骨由来細胞を得る前処置として、上顎小白歯部の歯肉を剥離した後、頰側骨内にグループを入れ、さらに骨内グループへの歯肉由来細胞の混入をさけるためミリポアフィルター (Millipore 社製) を介し、歯肉弁を復位縫合した。術後10日目に Fig. 1 に示す様に、A の歯肉結合組織部、B の

Fig. 1 Schema demonstrating the periodontal tissue after 10 days of flap surgery. Tissues are obtained from gingival connective tissue (A), periodontal ligament (B) and alveolar bone (C).

歯根膜部、およびCの骨内グループ骨再生部より組織片を採取した。そして、それら採取した組織片を、Phosphate Buffered Saline without $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$ (PBS⁻) 中にて血液成分を十分に洗浄し、続いて Messentimal Essential Medium (MEM)+Antibiotics (Penicillin-Streptomycin solution, Pen. 500 u/ml, St. 500 mcg/ml) 中にて数回超音波洗浄し、可及的に無菌状態とした。その後、組織片を No. 15 Disposable Scalpels (FEATHER 社製) にて細切し、35 mm プラスチック培養シャーレ (CORNING 社製) に貼り付け、開放系にて初代培養を行った。貼り付け後3日毎に培養液の交換を行い、4週目に組織片より十分に遊出した細胞を、0.25% トリプシンにて処理し、採取した。得られた細胞を初代培養と同じく、増殖培地として、抗生物質無添加の 10%FBS 加 MEM を使用し、5% CO_2 -95% air の条件下で 25 cm²/Tissue Culture Flask (CORNING 社製) 中にて単層培養した。実験に際しては、培養初期、継代3~5代の培養細胞を用いた。

3. 培養細胞の同定

a) 染色体分析

得られた継代3~5代の各細胞を、カバーガラスを入

れた 35 mm プラスチック培養シャーレに 1×10^4 cells/dish になるように植え込んだ。3日間培養し、ついでコルセミド (10^{-7} M) を含む培養液に置換し、さらに2時間培養した。培養液を捨て、0.2%KCl 液 (37°C) を約 1.5 ml/dish 加え、20分間処理し、細胞が十分に膨化したのちに変法カルノア液約 1.5 ml/dish を加え、10分間弱固定した。さらに固定液を換え、30分間強固定した。その後2% ギムザ液で20分間染色し、水洗、乾燥の後、スライドガラス上に封入した。油浸レンズを用い光学顕微鏡にて鏡検し、写真撮影の後、染色体分析を行った。

b) 形態学的分析

位相差顕微鏡観察として、各組織片からの細胞遊出状況を、*in situ* にて1週、3週および4週と経過的に観察した。また継代を経て得た各々の細胞群 (PDL 3~5) も位相差顕微鏡を用いて観察した。

電子顕微鏡観察には、初代培養の後得られた細胞で、継代初期 (PDL 3~5) のものを使用した。各々の培養細胞 (5×10^4 cells/dish) を、35 mm プラスチック培養シャーレ中で培養し、3日後0.1 M カコジル酸ナトリウム (pH 7.2) 緩衝 2.0% グルタルアルデヒドにて1時間4°C で前固定し、洗浄の後、0.1 M カコジル酸ナトリウム (pH 7.2) 緩衝 1.0% オスミウム酸で30分間後固定を行った。次いで、エタノール系列による脱水を経て Epon 812 中に包埋、重合した。超薄切片作成の後、酢酸ウラニールとクエン酸鉛の重染色を施し、HITACHI H-800 透過型電子顕微鏡にて同定を兼ねて、鏡検、比較検討した。

4. 増殖曲線

35 mm プラスチック培養シャーレに 1×10^4 cells/dish になるように各細胞をまき、24時間毎に血球計算板にて細胞数を計測し、細胞の増殖曲線 (growth curve)、倍加時間 (doubling time) および飽和密度 (saturation density) を求めた。また、得られた各培養細胞の生存曲線 (life span) を調べるため、実験使用後も継代を続け、継代間隔と継代数を記録した。

5. 歯根面への付着様式

各細胞群の歯根片 (健全象牙質) への初期付着様式を観察するため、根象牙質片 (5 mm $\times$ 5 mm $\times$ 2 mm) を 35 mm dish のプラスチック培養シャーレ中に置き、その上に各細胞群 (5×10^4 cells/dish) を各々植え込み、培養した。植え込み後24時間、3日そして7日目に、歯根片を取り出した。その後、0.1 M カコジル酸ナトリウム (pH 7.2) 緩衝 2.0% グルタルアルデヒドにて1時間4°C で前固定し、洗浄の後、0.1 M カコジル酸ナトリウム

Fig. 2-A Phase-contrast micrograph of an explant (Ex) from gingival connective tissue (A) and cellular outgrowth after 7 days of culture. ($\times 100$)

Fig. 2-B Phase-contrast micrograph of an explant (Ex) from periodontal ligament (B) after 7 days of culture. ($\times 100$) Few cellular outgrowth are observed at 7-day point of incubation.

Fig. 2-C Phase-contrast micrograph of an explant (Ex) from granulation of alveolar bone (C) and cellular outgrowth after 7 days of culture. ($\times 100$)

(pH 7.2) 緩衝 1.0% オスミウム酸で 30 分間後固定を行った。次いで、エタノール系列による脱水を経て Epon 812 中に包埋、未脱灰にて超薄切片を作成した。酢酸ウラニールとクエン酸鉛の重染色を施した後、HITACHI H-800 透過型電子顕微鏡にて観察、比較検討した。

Fig. 3-A Phase-contrast micrograph of an explant (Ex) from gingival connective tissue (A) and cellular outgrowth after 3 weeks of culture. ($\times 70$) Outgrowth of epithelial cells is observed.

Fig. 3-B Phase-contrast micrograph of an explant (Ex) from periodontal ligament (B) and cellular outgrowth after 3 weeks of culture. ($\times 70$)

Fig. 3-C Phase-contrast micrograph of an explant (Ex) from granulation of alveolar bone (C) and cellular outgrowth after 3 weeks of culture. ($\times 70$)

実験成績

1. 初代培養

歯肉由来および歯槽骨由来細胞は、組織片貼り付け後、1週目に線維芽細胞様細胞の遊出が見られた (Fig. 2-A,

Fig. 4-A, B, C Photomicrograph displaying the chromosome of gingival cell (4-A), periodontal ligament cell (4-B) and alveolar bone cell (4-C). ($\times 1,000$)
No chromosome aberration is observed.

2-C)。歯根膜片からの細胞の遊出は1週目では、ほとんど見られなかった (Fig. 2-B)。貼り付け後3週においては、単層細胞 (monolayer cell) の遊出がどの組織片からも見られ、放射状に増殖していた (Fig. 3-A, 3-B, 3-C)。また歯肉片からは、上皮様細胞の遊出も活発に見られた (Fig. 3-A)。貼り付け後4週には、細胞はシャーレ面に飽和状態 (confluent) になり、採取することが可能となった。

Fig. 5-A Phase-contrast microscopic appearance of culture cells (PDL 3-5) derived from gingival connective tissue. ($\times 100$)
These monolayer cells have a fibroblastic appearance.

Fig. 5-B Phase-contrast microscopic appearance of culture cells (PDL 3-5) derived from periodontal ligament. ($\times 100$)
These monolayer cells have a fibroblastic morphology, but there was heterogeneity in these cells.

Fig. 5-C Phase-contrast microscopic appearance of culture cells (PDL 3-5) derived from alveolar bone. ($\times 100$)
These monolayer cells have a mosaic appearance.

Table 1 General findings of electron micrograph of each culture cells.

1. The nucleus had abundant euchromatin and its out-line was smooth.
2. Short profiles of cisternae of the r-ER were located near the nucleus.
3. Immature Golgi apparatus were mainly observed around the nucleus.
4. Elongated mitochondria (half-developed) were shown.
5. The free ribosomes could be seen abundantly in the cytoplasm.
6. Phagolysosomes showed various morphology were observed.

2. 細胞の同定

1) 染色体分析

各細胞は、大型 metacentric の A 群を除く、染色体数 42 の二倍性細胞 (diploid cell) であった (Fig. 4-A, 4-B, 4-C)。染色体チェックの結果、これらの単離された培養細胞 (PDL 3~5) の正常性は、85%以上を維持していた。

2) 形態学的分析

a. 倒立顕微鏡所見

歯肉由来、歯根膜由来および歯槽骨由来の線維芽細胞の位相差顕微鏡像は、すべて単層で飽和状態を示していた。それぞれの形態に関しては、まず、歯肉由来細胞は、典型的な紡錐形で、線維芽細胞様形態を呈していた (Fig. 5-A)。歯根膜由来細胞は、全体的には紡錐形を呈するものの、歯肉由来細胞に比べて丸みを帯びた細胞の混在が認められ、不均一な様相を示していた (Fig. 5-B)。しかし、歯槽骨由来細胞は、全体的に卵円形あるいはモザイク状を呈していた (Fig. 5-C)。

b. 電子顕微鏡所見

超微構造学的には、3種の培養細胞とも多くの面で所見は共通しており、*in vivo* での基本的な形態を維持していた。その一般的所見をまとめたものを、Table 1 に示した。すなわち核は euchromatic であり、その外形はスムーズであった。核周囲には、余り発達の良いくない rough endoplasmic reticulum (以下 r-ER と略す) の half cisternae, Golgi apparatus, ならびに中等度に発達した mitochondria が見られた。また全体に free ribosome に富み、種々の形態を示す phagolysosome も観察された。細胞によっては多量の空胞の存在も確認された。

各細胞の超微構造的特徴については、歯肉由来細胞の

核は heterochromatin に乏しく、その外形線はスムーズであった。核膜の二重構造は明瞭であるが、細胞内小器官の発達は中等度であった。細胞と細胞の接触はいくらかの試料で見られたが、gap-type junctionあるいはattachment site は観察されなかった。核周囲に存在する Golgi fields には、多数の小胞が観察され、かつ大きな空胞には、電子密度の低い free granular material が認められた (Fig. 6-A, 6-B)。

歯根膜由来細胞の超微形態も、細胞内微細線維がやや目立って見られたものの、先の歯肉結合組織由来細胞とほぼ同様の所見を呈した (Fig. 7-A, 7-B)。

さらに骨由来細胞も、細胞内微細構造に関しては、歯肉由来細胞ならびに歯根膜由来細胞と概ね差異はなかった。しかし、この骨由来細胞では、細胞質に比べ核の占める割合が多く、卵円形の大きな核が観察された (Fig. 8-A, 9-A)。細胞内には、多数の phagolysosome が目立ち、細胞間には、細胞間結合の形成も見られた (Fig. 8-B)。細胞の断端では、電子密度の高いフィラメント束、および pinocytotic vesicle が観察された (Fig. 9-A)。また、細胞突起部では、細胞外に多量の未熟な微細線維が認められた (Fig. 9-B)。

3. 増殖能

各細胞の同定後、それぞれの増殖能力を比較するために、増殖曲線を作成した (Fig. 10)。この増殖曲線によると、培養 24 時間までは、初期接種時のダメージがあり、各細胞ともその細胞数は、培養開始時の 1×10^5 cells/dish を下回る約 0.9×10^5 cells/dish になっていた。培養 24 時間以降では、歯肉由来細胞および歯槽骨由来細胞は対数増殖に入り、培養 48 時間後には、約 2×10^5 cells/dish に増殖していた。しかしながら、歯根膜由来細胞は、培養 48 時間までは依然増殖が遅れ、その後対数増殖に入った。すなわち、歯根膜由来細胞のみその増殖率の立ち上がりが悪く、対数増殖期に入るのに他の細胞より 24 時間の time lag を認めた。

この増殖曲線をもとに、倍加時間を求めた。結果は Table 2 に示す通りで、その速さは、骨由来、ついで歯肉由来、歯根膜由来の順で、各々 45.2 時間、50.1 時間、そして 63.0 時間であった。

飽和密度に関しては、3種の培養細胞とも全体的に低いものの、とくに差異はなく、約 3.1×10^5 cells/dish であった (Table 2)。各細胞の大きさに関しては、この飽和密度の結果から計算するとほぼ同一であった。

生存曲線に関しては、Fig. 11 に示すように、各細胞とも概ね差異は認められず、継代 10 代前後において対数増

Fig. 6-A Electron micrograph of Fig. 5-A (cells derived from gingival connective tissue).

Euchromatic nucleus have a smooth out-line.

Fig. 6-B High-power magnification of Fig. 6-A.

Paranuclear cytoplasmic portion have r-ER half-cisternae, several Golgi fields with narrow cisternae and small vacuole.

殖期に入り, 継代 40 代前後で定常期, そして継代 50 代前後で死滅期へと移行した。また各細胞の形質転換もみられなかった。しかしながら, phase I における継代間隔は, 前後の増殖曲線に相関して, 歯肉由来および歯槽骨由来細胞は各々 5 日に一度であるのに対し, 歯根膜由来細胞

は 7 日に一度の割合であった。死滅期への移行も, 歯根膜由来細胞のみ他の 2 者より 3~5 代早い所見が得られた。

4. 根象牙質面と各種培養細胞との付着様式

培養 1 日

歯肉由来細胞は, 象牙質面によく伸展していた。しか

Fig. 7-A Electron micrograph of Fig. 5-B (cells derived from periodontal ligament).
These culture cells resemble the TEM's feature illustrated in Fig. 6-A, B.

Fig. 7-B High-power magnification of Fig. 7-A.
Cytoplasmic filaments are depicted at cytoplasmic periphery.

しながら，細胞のごく一部が象牙質突出部と接触している以外，大部分は根面と距離を隔てていた (Fig. 12-A)。

歯根膜由来細胞においても，歯肉由来細胞と同様の附着状況を示していたが，細胞突起の伸展は，歯肉由来細胞に比べ劣っていた (Fig. 12-B)。

歯槽骨由来細胞も，先の細胞と概ね同様な附着状況であった。しかし，前2者に比べ，phagolysosome, lipid dropletが目立ち，r-ERの発達も良好で，細胞の一部にpinocytotic vesicleの並列が認められた (Fig. 12-C)。

培養3日

Fig. 8-A Electron micrograph of Fig. 5-C (cells derived from alveolar bone).

These cells have the decreased cytoplasmic volume, and ovoid shaped nucleus.

Fig. 8-B High-power magnification of Fig. 8-A (arrowed).

Attachment site (cell junction) is observed.

歯肉由来細胞の細胞質内には、r-ERの拡張が目立って見られた。細胞突起が互いに伸展してきており、ところどころ細胞突起の断端が見え、オーバーラップが観察された。細胞間に matrix 様物質の形成が認められるものの、細胞と根象牙質面間には、そのような物質は何ら認

められず、細胞と根面との関係は1日目と特に変化はなかった (Fig. 13-A)。

歯根膜由来細胞でも、1日目に比べ、細胞突起の伸展が見られ、細胞突起相互のオーバーラップが見られた。しかし、対根面関係では、歯肉由来細胞と同様の所見し

Fig. 9-A Electron micrograph of Fig. 5-C (cells derived from alveolar bone).

These cells have densely staining filament bundle and numerous phagolysosome.

Fig. 9-B High-power magnification of Fig. 9-A (arrowed).

Immature micro-fibrils are observed at the extracellular portion.

か得られなかった (Fig. 13-B)。

一方、歯槽骨由来細胞では、前2者に比べて細胞内小器官が豊富で、とくに Golgi apparatus, mitochondria が目立ち、象牙質との関係もより積極的で、細胞突起が

象牙質面に伸出していく様な像が見られた (Fig. 13-C)。

培養 7 日

歯肉由来細胞は、1 日、3 日目と比べて細胞内小器官が目立ち、象牙質面により密着する傾向を示したが、明

⑩ **Fig. 10** Growth curve of culture cells derived from gingival connective tissue, periodontal ligament and alveolar bone. Only periodontal ligament cells have a time lag (24hr) on cell-growth.

⑪ **Fig. 11** Life span of culture cells derived from gingival connective tissue, periodontal ligament and alveolar bone. The findings of transformation are not observed.

Table 2 Doubling time and saturation density of cells derived from gingival connective tissue, periodontal ligament and alveolar bone. The doubling time and saturation density were calculated from the log of growth curve.

	cells derived from gingiva	cells derived from periodontal ligament	cells derived from alveolar bone
doubling time (hr)	50.1	63.0	45.2
saturation density ($\times 10^3$ cells)	314.2/dish	300.3/dish	317.3/dish

白な付着機構の形成は認められなかった。また細胞と象牙質面間には、細胞突起の断端が見られるものの、その間に matrix 様物質の形成は認められなかった (Fig. 14-A)。

歯根膜由来細胞においても、歯肉由来細胞と同様の所見を呈し、根面との関係は 3 日目と何ら変化はなかった (Fig. 14-B)。

しかし、歯槽骨由来細胞は、細胞内微細構造の発達

3 日目と比べてほとんど変化はみられないものの、細胞のほぼ全域が歯根表面に近接するのがみられ (Fig. 14-C)、特に密着している部分 (Fig. 14-C, arrows) では、Fig. 15 に示すような細胞膜の肥厚が観察された。

考 察

歯肉剝離搔爬手術後、再生歯肉により適切な根面性状

Fig. 12-A Electron micrograph of the cell derived from gingival connective tissue co-cultured with the dentin slice.
After 1 day of culture. Cell processus overgrow on the dentin surface, but the organelles don't develop.

Fig. 12-B Electron micrograph of the cell derived from periodontal ligament co-cultured with the dentin slice.
After 1 day of culture. This cell resembles the feature of gingival fibroblast (Fig. 12-A).

Fig. 12-C Electron micrograph of the cell derived from alveolar bone co-cultured with the dentin slice.
After 1 day of culture. There are some phagolysosome, lipid droplet, pinocytic vesicle and well-developed r-ER in cytoplasm.

を提供するため、現在、種々の根面処理法が試みられている^{1~10)}。一方、新付着成就には、根面上に集積する細胞のタイプが付着様式決定に大きく関与する^{14~16)}ことから、セメント質形成能を有する細胞を選択的に根面に集合させる努力が払われている。さらに現在、新付着成就にどのような細胞群が関与するか検索するため、多彩なアプローチがなされている。現在まで、*in vivo*の実験系でこの点を追求した報告は数多い^{11~16, 21, 26~28)}が、検索に伴う付随的要因が多いため、最近では、細胞そのものに

焦点をあてた研究が増加している。Melcher ら(1986)³⁸⁾は、歯肉由来、歯根膜由来および骨由来細胞を歯根片とともに各々培養し、その硬組織形成能を比較しているものの、培養細胞の種統一性に欠ける。しかも、それら細胞群の増殖能力、移動能力の差を同時に比較していない。また Marmary ら (1976)³⁹⁾は、上皮細胞と歯根膜細胞の増殖能を比較しているが、歯肉由来細胞および歯槽骨由来細胞についての検討は行っていない。

そこで本実験においては、治癒に関与するであろう細

Fig. 13-A Electron micrograph of the cell derived from gingival connective tissue co-cultured with the dentin slice.

After 3 days of culture. There is no extracellular matrix between the culture cell and the dentin slice, but there are more developments of the organelle in cytoplasm.

Fig. 13-B Electron micrograph of the cell derived from periodontal ligament co-cultured with the dentin slice.

After 3 days of culture. There are many cell process piled up on the dentin slice, but the morphological changes of organelle are not observed.

Fig. 13-C Electron micrograph of the cell derived from alveolar bone co-cultured with the dentin slice.

After 3 days of culture. This culture cell has well-developed mitochondria and Golgi apparatus. There is the cell process extended to the dentin surface.

胞群，すなわち，歯肉由来細胞，歯根膜由来細胞および歯槽骨由来細胞を同一個体のサルより単離，培養し，それら各細胞の増殖能力ならびに根面との付着能力を検索した。

1. 培養細胞の由来について

初代培養の方法には，現在大きく分けて，酵素（コラ

ゲナーゼ）により分離，培養する方法，および培養皿に組織片を貼り付け，種々の細胞を誘導させる貼り付け法がある。本研究の初代培養は，後者の貼り付け法で行った。貼り付け法の場合，得られる細胞は，Explant 片中に含まれる種々の細胞集積から遊出するので，線維芽細胞以外の細胞，例えば，血管内皮細胞なども出現する可

Fig. 14-A Electron micrograph of the cell derived from gingival connective tissue co-cultured with the dentin slice.
After 7 days of culture. The cell intimately attached to the dentin surface is observed. However, there is no extracellular matrix between the cell and the dentin surface.

Fig. 14-B Electron micrograph of the cell derived from periodontal ligament co-cultured with the dentin slice.
After 7 days of culture. This cell resembles the 7 day's feature of the gingival cell.

Fig. 14-C Electron micrograph of the cell derived from alveolar bone co-cultured with the dentin slice.
After 7 days of culture. This cell attaches to the dentin surface extensively, and more developed organelles are observed.

能性が大きい。しかし、酵素による単離法と比較して、細胞ダメージが少なく、*in vivo* の特徴を反映した細胞が得られるという利点がある。

一般に、培養線維芽細胞の由来は次の様に考えられて

いる。第一に、線維芽細胞の幹細胞からの由来、第二は、上皮細胞が脱分化し線維芽細胞へ変化し由来、第三は、血管内皮細胞から由来するというものである⁴⁰⁾。今回の初代培養で得られた各細胞群の形態像は、核が球形また

Fig. 15 High-power magnification of Fig. 14-C (arrowed).
There are small areas of increased density on the plasma membrane (white arrows).

は卵円形，細胞質の r-ER や Golgi apparatus が未発達で，細胞突起は少ない。この特徴は，組織切片中の毛細血管周囲細胞あるいはその周囲の結合組織中の細胞に似ている。さらにこの所見は，血管内皮細胞の特徴的所見（核が小さく，細胞質に発達した r-ER, 大きな Golgi apparatus, autophagic vacuole を有し，多くの細胞突起を持つ）と異なっていることから，これら細胞が結合組織に由来することを示唆している。

通常，その結合組織細胞が器官の性質を決定する⁴¹⁾ことから，結合組織に器官決定因子が存在すると見て良い。今回得られた細胞群は，結合組織由来といえ，十分その組織特異性を有しているといえる。

また前述したように，貼り付け法の問題点には上皮細胞の混入がある。ヒトの歯根膜組織を酵素による分離法で培養した Ragnarsson (1985)⁴²⁾ は，そこから上皮様細胞と線維芽細胞様細胞の二者を単離している。一方，Brunette ら (1977)⁴³⁾ がサル (*Macaca irus*) 歯根膜，そして Blomlof and Otteskog (1981)⁴⁴⁾ がヒト歯根膜を貼り付け法で培養しているが，やはり上皮様細胞と線維芽細胞様細胞両者の単離を認めている。今回の歯根膜由来細胞群には，上皮様細胞の混入は見られず，歯肉由来細胞においてのみその派生が見られた。しかし，その

上皮様細胞も，0.25% トリプシンにおいてはシャーレ面から剥がれず，継代を進めると希釈され，最終的には線維芽細胞の単一の集積となった。

2. 培養細胞の同定について

細胞間汚染防止のため，現在，培養細胞株の使用に先立ち，細胞の性状解析が義務付けられている。本実験系においても歯周組織各部の細胞を初代培養した後，その性状解析のため，染色体分析および形態学的分析を行った。染色体チェックの結果は，各細胞とも細胞間汚染は無く，染色体数 42 の二倍性細胞で，正常性 85% 以上を維持していた。この値は，これら培養細胞が実験に使用し得る十分な正常性を示している。またこの事を追証する意味で，これら細胞群を実験使用後も継代を続け，生存曲線を作成した。その結果，細胞自身の形質転換は観察されず，継代 50 代前後で死滅期へと移行した。この所見は，“ヒトの正常細胞は自然形質転換はせず，継代 50 代前後で分裂できなくなる”という Hayflick and Moorhead (1961)⁴⁵⁾ の所見と一致する。

In vivo と *in vitro* の細胞の類似性に関しては，Ten Cate (1972)⁴⁶⁾ は，両者間では構造が幾分異なると述べ，*in vitro* の細胞では，r-ER が少なく，collagen coating vacuole は見られなかったとしている。また Nishimura

ら (1985)⁴⁷⁾ は、ヒト歯肉線維芽細胞の *in vivo* と *in vitro* (PDL 20) の超微形態を比較検討したところ、*in vitro* の細胞質内には、free ribosome、微細線維が特に多いとし、両者間に差異を認めている。本実験の継代3～5代の各培養細胞は、*in vivo* の細胞に比べやや未分化な像を呈するものの、オリジナルの形態学的特徴を有していた。

各細胞の形態学的分析については、光学ならびに電子顕微鏡的アプローチによった。光顕的には、どの細胞も正常細胞特有の接触阻止現象 (contact inhibition) の性質を有し、pile up の所見は見られなかった。歯肉由来細胞および歯根膜由来細胞の形態は、Brunette ら (1976)⁴⁸⁾ (1977)⁴³⁾、Rose ら (1980)¹⁷⁾ (1987)⁴⁹⁾、Pitaru and Melcher (1983)⁵⁰⁾ の観察と同様、線維芽細胞様形態を呈した。歯根膜由来細胞は、歯肉由来細胞に比べて不均一な様相を呈するが、その他では差異はなかった。しかし、歯槽骨由来細胞は、その形状がモザイク様を呈し、Sudo ら (1983)⁵¹⁾ の分離、培養したマウスのカルバリア由来骨芽細胞ときわめて類似していた。超微構造的には、Engel ら (1980)⁵²⁾ がヒト歯肉由来細胞、Rose ら (1987)⁴⁹⁾、Gould (1983)⁵³⁾ が歯根膜由来細胞、そしてSudo ら (1983)⁵¹⁾、Escarot-Charrier ら (1983)⁵⁴⁾、Bab ら (1984)⁵⁵⁾ が骨由来細胞の超微構造を検索している。今回の所見はそれぞれ、彼らの所見と概ね一致していた。因みに、本実験で得られた歯槽骨由来細胞は、微細線維、lysosome、r-ER、Golgi apparatus が核周囲に多く見られ、細胞質に比べ核の占める割合が多く、Sudo ら (1983)⁵¹⁾ のカルバリア由来骨芽細胞と合致する像を示した。また、骨由来細胞にのみ、細胞外で未熟な微細線維の形成や、細胞間結合の形成が見られた。すなわち、培養期間の同じ三種の細胞間で、骨由来細胞のみに見られたことは、この細胞が他の細胞に比べ、定常期に入るのが速く、かつ蛋白合成速度も他の細胞より速いことを意味しており、後述の増殖能と関連して興味ある所見といえる。

3. 各種培養細胞の増殖能について

根面との治癒様式を決定する重要因子の一つとして、治癒に関与する細胞の増殖能がある。今回本実験では、各組織由来細胞の増殖能を検索対象の一つとした。Marmay ら (1976)³⁹⁾ は、サル (*Macaca irus*) の歯根膜由来培養細胞の増殖能について検索し、その倍加時間は約17時間であったと報告している。しかし、今回のデータによると、歯根膜由来細胞の倍加時間は、60.1時間と大幅に遅れていた。また、歯肉由来細胞、歯槽骨由来細胞

も各々、50.1時間、45.2時間と全体的に長く、Paul (1970)⁵⁶⁾ が記載している一般的な fast growing cell の倍加時間の範囲を越えていた。このことは、まず第一に、今回使用した細胞が継代初期の3～5代のものであり、完全な対数増殖期に入っていないこと (生存曲線に示すように10代以降では、増殖率はあがっていた)、第二に、自己樹立株細胞を使用したために、トリプシン処理によるダメージが影響したことが考えられる。いずれにしても、歯根膜由来細胞のみ特に低かったことは、この細胞が分裂、増殖するのに必要な最低接種数が他の細胞より多い事を示唆している。すなわち同一条件下での本実験では、歯肉由来細胞および歯槽骨由来細胞と、歯根膜由来細胞との倍加時間の相違、ならびに対数増殖に入るまでの time lag の相違が認められ、興味深い。これに加えて、初代培養時の組織片からの細胞遊出も歯根膜由来細胞が他の細胞に比べて遅れたことから、歯根膜由来の細胞が他の細胞に先駆けて歯冠側へ移動する可能性の低い事を示唆した。

一方、各細胞群のオリジナルな位置的關係から歯肉剝離搔爬術後の細胞集積を単純に考えると、術後根面へ集積する可能性が高い細胞群は歯肉由来細胞である。従って現在、この細胞群の根面への接触を防ぎ、優先的に歯根膜由来細胞を根面に参集させる試みがある^{11-13, 57, 58)}。Gottlow ら (1984)¹²⁾、Nyman ら (1982)²³⁾ は、根面と剝離歯肉弁との間にミリポアフィルターを介在させることによって、根面に多量の新生セメント質の形成を見ている。そして、彼らはその新生セメント質が歯根膜由来細胞によってのみ形成されたと限定し、この時点では後年、Pettersson and Aukhil (1986)¹³⁾、Aukhi ら (1986)⁵⁷⁾ (1987)⁵⁸⁾ が、彼らの一連の研究で指摘している歯槽骨由来細胞関与の可能性を考慮していない。

Nishimura ら (1984)³³⁾、高田 (1985)³⁴⁾、野口 (1984)³⁵⁾ は、サル (*Macaca irus*) に歯肉剝離搔爬手術を行い、その治癒過程を観察したところ、骨の再生という組織環境が、対応根面上での術後の新付着を促進する重要な因子として作用することを指摘している。また、Stahl (1977)⁵⁹⁾ は骨内欠損へ脱灰骨移植を行い、その結果、骨再生という現象を促す事により近接根面に骨様セメント質形成を見ている。さらに永石 (1987)⁶⁰⁾ も Stahl (1977)⁵⁹⁾ と類似した実験を行ったところ、根面に骨芽細胞様細胞が活発にセメント質形成を行っている電顕像を観察し、骨再生時には、骨類似細胞によってセメント質形成が行われることを示している。Melcher ら (1986)³⁸⁾ もまた、彼らの行った実験から、歯槽骨由来の細胞が近

接根面へ移動していく可能性を全く否定することができないとしている。以上のことと本実験結果を照らし合わせると、ミリポアフィルター介在によって得られた新生セメント質は、歯根膜由来細胞の参画によってなされたものでなく、歯根膜由来細胞の増殖に先駆けて起こる歯槽骨由来細胞の増殖が何らかの形で関与していることは濃厚である。

4. 各種培養細胞の根象牙質面への付着について

細胞が分化していく足場としての根面性状の果たす役割はきわめて大きい。Aukhilら(1986)⁶¹⁾は歯周組織創傷治療中に、前セメント芽細胞がセメント芽細胞に分化するには、根象牙質面に接する必要があると述べている。Nishimuraら(1985)⁶²⁾は、種々の根面操作を施した歯周疾患罹患歯根面に培養細胞(歯肉由来線維芽細胞)を付着させ、その根面性状の有効性を検索している。その結果、深層セメント質保存面、深層セメント質クエン酸処理面に細胞との親和性がみられたとしている。しかし、現在のところ、治療に関与する細胞群の差異が、根面に対しどのような対応をするかを検索したものはみられない。そこで今回著者は、象牙質面に対する歯周組織各部由来の細胞群の対応を検討した。

本実験結果によると、培養1日目では、どの細胞も根面にただ接するだけで、その付着様式には大差はみられなかった。3日目においても1日目と同様、何ら付着様式には変化は見られなかった。しかし、骨由来細胞のr-ER, Golgi apparatusは発達し、多数のmitochondria, free ribosomeがみられ、細胞の活性の高さを示した。一方、歯肉由来あるいは歯根膜由来細胞は、細胞内小器官の発達程度は低く、これら両細胞の根面への親和性の弱さを示した。他方、細胞外物質の形成は、3日目で各試料の細胞-細胞間に認められたものの、細胞-根面間には7日目になってもどの試料にも見られなかった。同様の実験を行っているMelcherら(1986)³⁸⁾も培養7日目では、根面-細胞間にmatrix様物質の形成を認めておらず、この形成にはより長期の培養期間が必要と思われた。しかし、7日目において見られた骨由来細胞の細胞質膜肥厚は、付着機構の形成を思わせ、興味深い。

ところで、これら各細胞が将来セメント質形成を行うかどうかは今後の検索対象となるが、各種培養細胞の産生する物質についての報告は多い⁶³⁻⁶⁷⁾。Simmonsら(1982)⁶³⁾は、胎児ラットカルバリアから単離した骨由来細胞が、*in vivo*中において、またWhitsonら(1984)⁶⁴⁾、Bellowsら(1986)⁶⁵⁾は*in vitro*において、骨由来細胞による骨様組織の形成を証明(これらの骨様組織は、

Type I コラーゲン、アルカリフォスファターゼ活性、そしてosteonectinの優位の存在により特徴づけられている)している。さらに、Melcherら(1986)³⁸⁾は、骨由来細胞を根面上で一ヶ月培養することにより、無細胞性のセメント質様物質の形成をみている。このことは、骨組織とセメント質は血液供給の有無により区別されるのみで、形態的にほぼ類似した構造を有し⁶⁸⁻⁷²⁾、また両者は、発生学的に同系統である^{73,74)}から必ずしも奇異なことではない。従って、今回分離、培養した骨由来細胞を、今後、より長期に培養を続けると、根面上に骨様セメント質を形成する可能性も高い。反面、Melcherら(1986)³⁸⁾はその実験で、歯肉由来および歯根膜由来の細胞群ではセメント質の形成はなかったと報告している。このようなことから、創傷治療時に、もし増殖能の高い骨由来細胞が直接根面に関与するようであれば、それらが骨様セメント質形成による新付着成就に寄与することも十分考えられる。

5. 新付着を促す細胞群ならびに新付着の可能性について

健全歯のセメント質は、それに近接するセメント芽細胞によって必要に応じて形成されるが、既存のセメント質を除去した象牙質面には、発生学的見地から、本来のセメント芽細胞は再び得ることができないとStahlら(1972)⁷⁵⁾、Stahl(1977)⁷⁶⁾は述べている。そのため、再生セメント質に関して、とりわけその形成に関与する細胞群について種々の論議がかわされているが、現在のところ一応、多潜能性を有する歯根膜由来細胞がその役割を果たすと考えられている^{21,26-28)}。他方、歯肉由来細胞を脱灰象牙質基質で培養することによって、matrix vesicleの形成をみたというRoseら(1981)⁷⁷⁾の報告もあるが、一般的にはこの細胞群には、セメント質形成能力がないとされている^{14,16,21,23)}。したがって従来から、セメント質の再生に関して歯根膜細胞を対象とする研究が多くみられる。歯根膜組織は、厳密に言えば、セメント芽細胞、線維芽細胞および骨芽細胞の3種のphenotypeを示す細胞群を含んでおり、不均一性(heterogeneity)を有した組織であるといえる。すなわち、歯根膜組織中央部の線維芽細胞は活発なコラーゲン代謝を行い、歯根膜線維の恒常性維持に寄与している⁷⁸⁻⁸⁰⁾が、セメント側、骨側の細胞群は、各々が独自のコラーゲン代謝、分裂活性を示し、中央部の細胞群とは異なった行動様式をとる^{81,82)}。

本実験で単離された歯根膜細胞はセメント質側組織からのものであるが、本実験結果が示す様に、増殖能力は

他の細胞群（特に歯槽骨由来細胞）より劣り、かつ傷害に対する反応も time lag を有したことから、この細胞の歯冠側への移動能力は低いと推察された。また McCulloch and Melcher (1983)^{83,84}, Davidson and McCulloch (1986)⁸⁵ は、歯根膜細胞そのものの歯冠側への移動はあり得ないことでは無いが、歯根膜そのものを閉鎖的な組織と考えた方が良く、やはりその歯冠側への移動を否定的にとらえている。加えて、Yamasaki ら (1987)⁸⁶ は、歯根膜中の歯槽骨側の細胞は活発な蛋白合成を示唆する像を呈するが、セメント質に接するセメント芽細胞はほとんどが機能的に休止した状態であることを示している。以上の見解と、骨由来細胞が高い増殖能を示した本実験結果とを照らし合わせると、新付着に関与する細胞は、歯根膜由来細胞に先駆けて増殖する歯槽骨由来細胞もしくはそれに類似した細胞と考えた方が妥当なように思われる。最近、Caton ら (1987)⁸⁷ もまた根面への選択的細胞誘導に関する概念で、骨由来細胞の多大な根面への働きかけを指摘し、新付着への骨細胞の関与も考慮しなければならないことを示唆している。

以上、本実験の結果と先人の報告から、歯槽骨頂対応根面にみられるセメント質形成は、歯槽骨由来細胞の根面への直接移動によって行われるのではない、あるいは近接する組織特性により同部の間葉細胞が骨類似細胞に分化することによって行われるのではない、などの示唆を得たが、この点に関しては今後さらなる検討が必要と考えられる。

結 論

歯肉剥離掻爬手術後の根面との新付着を促進する細胞群の phenotype を検索するため、ニホンザル歯周組織から歯肉結合組織、歯根膜および歯槽骨由来細胞を単離、培養し、得られた各培養細胞について形態的、機能的差異を比較検討した。

その結果、歯槽骨由来細胞の増殖能が他の細胞より優れており、根面に対する反応に関しても、歯槽骨由来細胞が他の細胞より積極的な根面関係を示したことから、歯槽骨頂部に限局して見られる新付着には、少なくとも骨芽細胞様細胞が関与するものと考えられる。

謝 辞

稿を終るにあたり、ご懇篤なご指導とご校閲を賜った山岡 昭教授に深甚の謝意を表します。

また、本研究に際し、ご教示をいただいた西村和晃講師をは

じめ、ご協力くださった教室員各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Nishimura, K., Noguchi, Y., Hayashi, M. and Yamaoka, A. : Ultrastructural of new gingival attachment on various root surfaces (part 6). J. Electron Microsc., 36 : 107-116, 1987.
- 2) Blomlöf, L., Lindskog, S., Appelgren, R., Jonsson, B., Weintraub, A. and Hammarström, L. : New attachment in monkeys with experimental periodontitis with and without removal of the cementum. J. Clin. Periodontol., 14 : 136-143, 1987.
- 3) Horning, G.M., Cobb, C.M. and Killoy, W.J. : Effect of an air-powder abrasive system on root surfaces in periodontal surgery. J. Clin. Periodontol., 14 : 213-220, 1987.
- 4) Terranova, V.P., Franzetti, L.C., Hic, S., Di-Florio, R.M., Lyall, R.M., Wikesjö, U.M.E., Baker, P.J., Christersson, L.A. and Genco, R. J. : A biochemical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. J. Periodontal Res., 21 : 330-337, 1986.
- 5) Sarbinoff, J.A., O'Leary, T.J. and Miller, C. H. : The comparative effectiveness of various agents in detoxifying diseased root surfaces. J. Periodontol., 54 : 77-80, 1983.
- 6) Register, A.A. and Burdick, F.A. : Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. J. Periodontol., 46 : 646-655, 1975.
- 7) Caton, J.G., Polson, A.M., PiniPrato, G., Bartolucci, E.G. and Clauser, C. : Healing after application of tissue-adhesive material to denuded and citric acid-treated root surfaces. J. Periodontol., 57 : 385-390, 1986.
- 8) Daryabegi, P., Pameijer, C.H. and Ruben, M. P. : Topography of root surfaces treated *in vitro* with citric acid, elastase and hyaluronidase. J. Periodontol., 52 : 736-742, 1981.
- 9) Heritier, M. : Ultrastructural study of new connective tissue attachment following phosphoric

- acid application on human root dentin. J. Periodontol., 54 : 515-521, 1983.
- 10) AL-Joburi, W.A., Denys, F.R. and Cogen, R.B. : Fluoride-treated roots and viability and attachment of human gingival fibroblasts. J. Dent. Res., 63 : 1206-1210, 1984.
 - 11) Melcher, A.H. : Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. Archs oral Biol., 15 : 1183-1204, 1970.
 - 12) Gottlow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. J. Clin. Periodontol., 11 : 494-503, 1984.
 - 13) Pettersson, E.C. and Aukhil, I. : Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J. Periodontal Res., 21 : 543-552, 1986.
 - 14) Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol., 47 : 256-260, 1976.
 - 15) Boyko, G.A., Melcher, A.H. and Brunette, D. M. : Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted *in vivo* after culture *in vitro*. J. Periodontal Res., 16 : 73-88, 1981.
 - 16) Melcher, A.H. : Cells of periodontium : their role in the healing of wounds. Ann. Roy. Col. Surg. Eng., 67 : 130-131, 1985.
 - 17) Rose, G.G., Yajima, T. and Mahan, C.J. : Human gingival fibroblast cell lines *in vitro*. J. Periodontal Res., 15 : 53-70, 1980.
 - 18) Yajima, T., Rose, G.G. and Mahan, C.J. : Human gingival fibroblast cell lines *in vitro*. J. Periodontal Res., 15 : 267-287, 1980.
 - 19) Yoshizato, K., Taira, T., Yamamoto, N. and Sasaki, K. : Remodeling of collagen : An *in vitro* model of connective tissue. Biomedical Res., 6 : 287-296, 1985.
 - 20) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. : 中村桂子, 松原謙一 (監訳) : 細胞の分子生物学, 教育社, 1985, 611-671.
 - 21) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S. : Healing following implantation of periodontitis affected roots into gingival connective tissue. J. Clin. Periodontol., 7 : 394-401, 1980.
 - 22) Line, S.E., Polson, A.M. and Zander, H.A. : Relationship between periodontal injury, selective cell repopulation and ankylosis. J. Periodontol., 45 : 725-730, 1974.
 - 23) 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.
 - 24) Melcher, A.H. and Eastoe, J.E. : Connective tissues of the periodontium, In : Biology of the periodontium, Academic Press, London, 1969, 167-343.
 - 25) Deporter, D.A. and Ten Cate, A.R. : Collagen resorption by periodontal ligament fibroblasts at the hard tissue-ligament interfaces of the mouse periodontium. J. Periodontol., 51 : 429-432, 1980.
 - 26) Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J. : The regenerative potential of the periodontal ligament. J. Clin. Periodontol., 9 : 257-265, 1982.
 - 27) Karring, T., Isidor, F., Nyman, S. and Lindhe, J. : New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. J. Clin. Periodontol., 12 : 51-60, 1985.
 - 28) Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T. and Egelberg, J. : Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connective tissue and epithelium during healing. J. Periodontal Res., 20 : 201-208, 1985.
 - 29) Nyman, S. and Karring, T. : Regeneration of surgically removed buccal alveolar bone in dogs. J. Periodontal Res., 14 : 86-92, 1979.
 - 30) Polson, A.M. and Caton, J. : Factors influencing periodontal repair and regeneration. J. Periodontol., 53 : 617-625, 1982.
 - 31) Stahl, S.S. and Froum, S. : Histological evaluation of human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. J. Periodontol., 57 : 211-217, 1986.

- 32) Bogle, G., Claffey, N. and Egelberg, J. : Healing of horizontal circumferential periodontal defects following regenerative surgery in beagle dogs. *J. Clin. Periodontol.*, 12 : 837-849, 1985.
- 33) Nishimura, K., Takada, K., Noguchi, Y., Yamaguchi, T. and Yamaoka, A. : Scanning electron microscopy of root surfaces, cementum, periodontal ligament and alveolar bone following periodontal surgery. *J. Clin. Electron Microscopy.*, 17 : 503-517, 1984.
- 34) 高田耕平 : 歯肉剝離搔爬手術後の新付着に関する研究—骨再生が新生セメント質形成に及ぼす影響について. *J. Clin. Electron Microscopy*, 18 : 283-303, 1985.
- 35) 野口吉廣 : 歯肉剝離搔爬手術後の歯肉の付着に関する超微構造学的研究—外科的に象牙質を裸出させた根面に対する剝離歯肉弁の付着について. *日歯周誌*, 26 : 21-48, 1984.
- 36) 西村和晃, 永石真幸, 林 正純, 白井義英, 山田実, 英保武志, 中谷 聡, 山岡 昭 : 歯肉剝離搔爬手術後の新付着に関する研究 (第12報). 骨再生が近接歯根面上へのセメント質形成に及ぼす影響について. *日歯周誌*, 29 : 172-178, 1987.
- 37) Björn, H. : Experimental studies on reattachment. *Dent. Pract.*, 11 : 351-354, 1961.
- 38) Melcher, A.H., Cheong, T., Cox, J., Nemeth, E. and Shiga, A. : Synthesis of cementum-like tissue *in vitro* by cells cultured from bone : a light and electron microscope study. *J. Periodontal Res.*, 21 : 592-612, 1986.
- 39) Marmary, Y., Brunette, D.M. and Heersche, J.N.M. : Differences *in vitro* between cells derived from periodontal ligament and skin of MACACA IRUS. *Archs oral Biol.*, 21 : 709-716, 1976.
- 40) Franks, L.M. and Wilson, P.D. : "Spontaneous" neoplastic transformation *in vitro* : the ultrastructure of the tissue culture cell. *Eur. J. Cancer*, 6 : 517-523, 1970.
- 41) Aronson, J.F., McClaskey, J.W. and Cristofalo, V.J. : Human fetal lung fibroblasts : observations on origin and stability in culture. *Mech. Age. Dev.*, 21 : 229-244, 1983.
- 42) Ragnarsson, B., Carr, G. and Daniel, J.C. : Isolation and Growth of human periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Dent. Res.*, 64 : 1026-1030, 1985.
- 43) Brunette, D.M., Kanoza, R.J., Marmary, Y., Chan, J. and Melcher, A.H. : Interactions between epithelial and fibroblast-like cells in cultures derived from monkey periodontal ligament. *J. Cell Sci.*, 27 : 127-140, 1977.
- 44) Blomlöf, L. and Otteskog, P. : Composition of human periodontal ligament cells in tissue culture. *Scand J. Dent. Res.*, 89 : 43-46, 1981.
- 45) Hayflick, L. and Moorhead, P.S. : The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25 : 585-621, 1961.
- 46) Ten Cate, A.R. : Morphological studies of fibrocytes in connective tissue undergoing rapid remodeling. *J. Anat.*, 112 : 401-414, 1972.
- 47) Nishimura, K., Noguchi, Y., Hayashi, M. and Yamaoka, A. : Ultrastructural comparison between human gingival fibroblasts *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Electron Microscopy.*, 18 : 5-6, 1985.
- 48) Brunette, D.M., Melcher, A.H. and Moe, H.K. : Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions. *Archs oral Biol.*, 21 : 393-400, 1976.
- 49) Rose, G.G., Yamasaki, A., Pinero, G.J. and Mahan, C.J. : Human periodontal ligament cells *in vitro*. *J. Periodontal Res.*, 22 : 20-28, 1987.
- 50) Pitaru, S. and Melcher, A.H. : Orientation of gingival fibroblasts and newly-synthesized collagen fibers *in vitro*. *J. Periodontal Res.*, 18 : 483-500, 1983.
- 51) Sudo, H., Kodama, H., Amagai, Y., Yamamoto, S. and Kasai, S. : *In vitro* differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J. Cell Biol.*, 96 : 191-198, 1983.
- 52) Engel, D., Schroeder, H.E., Gay, R. and Clagett, J. : Fine structure of cultured human gingival fibroblasts and demonstration of simultaneous synthesis of types I and III collagen.

- Archs oral Biol., 25 : 283-296, 1980.
- 53) Gould, T.R.L. : Ultrastructural characteristics of progenitor cell populations in the periodontal ligament. J. Dent. Res., 62 : 873-876, 1983.
 - 54) Escarot-Charrier, B., Glorieux, F.H., van der Rest, M. and Pereira, G. : Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. J. Cell Biol., 96 : 639-643, 1983.
 - 55) Bab, I., Howlett, C.R., Ashton, B.A. and Owen, M.E. : Ultrastructure of bone and cartilage formed *in vivo* in diffusion chambers. Clin. Orthop., 187 : 243-257, 1984.
 - 56) Paul, J. : Cell and tissue culture, 4th ed., Livingstone, Edinburgh and London, 1970.
 - 57) Aukhil, I., Greco, G., Suggs, C. and Torney, D. : Root resorption potentials of granulation tissue from bone and flap connective tissue. J. Periodontal Res., 21 : 531-542, 1986.
 - 58) Aukhil, I., Pettersson, E. and Suggs, C. : Periodontal wound healing in the absence of periodontal ligament cells. J. Periodontol., 58 : 71-77, 1987.
 - 59) Stahl, S.S. : Repair potential of the soft tissue-root interface. J. Periodontol., 48 : 545-552, 1977.
 - 60) 永石真幸 : 各種移植材がセメント質形成に及ぼす影響について. 歯科医学, 50 : 639-640, 1987.
 - 61) Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C. and Pettersson, E. : *In vivo* differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. J. Clin. Periodontol., 13 : 862-868, 1986.
 - 62) Nishimura, K., Takada, K., Noguchi, Y. and Yamaoka, A. : Cell attachment of cultured fibroblasts to various root surfaces. J. Dent. Res., (Special issue), 64 : 334, 1985.
 - 63) Simmons, D.J., Kent, G.N., Jilka, R.L., Scott, D.M., Fallon, M. and Cohn, D.V. : Formation of bone by isolated, cultured osteoblasts in millipore diffusion chambers. Calcif. Tissue Int., 34 : 291-294, 1982.
 - 64) Whitson, S.W., Harrison, W., Dunlap, M.K., Bowers, D.E. Jr., Fisher, L.W., Robey, P.G. and Termine, J.E. : Fetal bovine bone cells synthesize bone-specific matrix proteins. J. Cell Biol., 99 : 607-614, 1984.
 - 65) Bellows, C.G., Aubin, J.E., Heersche, J.N.M. and Antosz, M.E. : Mineralized bone nodules formed *in vitro* from enzymatically released rat calvaria cell populations. Calcif. Tissue Int., 38 : 143-154, 1986.
 - 66) Majeska, R.J., Rodan, S.B. and Rodan, G.A. : Culture and activity of osteoblasts and osteoblast-like cells, ed. Butler, W.T., Birmingham, In : Chemistry and Biology of Mineralized tissues, Ebsco, 1985, 279-385.
 - 67) Tung, P.S., Domenicucci, C., Wasi, S. and Sodek, J. : Specific immunohistochemical localization of osteonectin and collagen type I and III in foetal and adult porcine dental tissues. J. Histochem. Cytochem., 33 : 531, 1985.
 - 68) Furseth, R. and Mjör, I.A. : Histology of the human teeth, 2nd ed., Copenhagen, Munksgaard, 1979, 105-123.
 - 69) Freeman, E. : Periodontium. In : Oral histology : Development, structure, and function, ed. Ten Cate, A.R., 2nd ed., Saint Louis, C.V. Mosby, 1985, 234-263.
 - 70) Armitage, G.C. : Cementum, ed. Bhaskar, S.N., In : Orban's oral histology and embryology, 10th ed., C.V. Mosby, Saint Louis, 1986, 175-197.
 - 71) Furseth, R. : The fine structure of cellular cementum of young human teeth. Archs oral Biol., 14 : 1147-1158, 1969.
 - 72) Jande, S.S. and Bélanger, L.F. : Fine structural study of rat molar cementum. Anat. Rec., 167 : 439-464, 1970.
 - 73) Freeman, E. and Ten Cate, A.R. : Development of the periodontium. An electron microscopic study. J. Periodontol., 42 : 387-395, 1971.
 - 74) Ten Cate, A.R. : Formation of supporting bone in association with periodontal ligament organization in the mouse. Archs oral Biol., 20 : 137-138, 1975.
 - 75) Stahl, S.S., Slavkin, H.C., Yamada, L. and Levine, S. : Speculations about gingival repair. J. Periodontol., 43 : 395-402, 1972.
 - 76) Stahl, S.S. : Healing following simulated fiber

- retention procedures in rats. J. Periodontol., 48 : 67-73, 1977.
- 77) Rose, G.G., Yamasaki, A. and Mahan, C.J. : Bone induction *in vitro*. J. Periodontal Res., 16 : 344-357, 1981.
 - 78) Sodek, J. : A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. Archs oral Biol., 22 : 655-665, 1977.
 - 79) Vignery, A. and Baron, R. : Dynamic histomorphometry of alveolar bone remodeling in the adult rat. Anat. Rec., 196 : 191-200, 1980.
 - 80) Gould, T.R.L., Melcher, A.H. and Brunette, D.M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. J. Periodontal Res., 15 : 20-42, 1980.
 - 81) Roberts, W.E. : Cell kinetic nature and diurnal periodicity of the rat periodontal ligament. Archs oral Biol., 20 : 465-471, 1975.
 - 82) Roberts, W.E. and Chase, D.C. : Kinetics of cell proliferation and migration associated with orthodontically-induced osteogenesis. J. Dent. Res., 60 : 174-181, 1981.
 - 83) McCulloch, C.A.G. and Melcher, A.H. : Cell migration in the periodontal ligament of mice. J. Periodontal Res., 18 : 339-352, 1983.
 - 84) McCulloch, C.A.G. and Melcher, A.H. : Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. Am. J. Anat., 167 : 43-58, 1983.
 - 85) Davidson, D. and McCulloch, C.A.G. : Proliferative behavior of periodontal ligament cell populations. J. Periodontal Res., 21 : 414-428, 1986.
 - 86) Yamasaki, A., Rose, G.G., Pinero, G.J. and Mahan, C.J. : Ultrastructural and morphometric analysis of human cementoblasts and periodontal fibroblasts. J. Periodontol., 58 : 192-201, 1987.
 - 87) Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M. and Nyman, S. : Periodontal regeneration via selective cell repopulation. J. Periodontol., 58 : 546-552, 1987.
-