サル歯槽骨欠損部への collagen solution 応用に関する実験病理学的研究

古 郷 辰 二¹⁾ 三 辺 正 人^{1,2)} 杉 山 裕 一¹⁾
金 田 有 正¹⁾ 佐 藤 肇¹⁾ 児 玉 利 朗¹⁾
菅 谷 彰¹⁾ 田 村 利 之¹⁾ 福 野 光 男¹⁾
堀 俊 雄¹⁾ 渡 辺 是 久³⁾

1) 神奈川歯科大学保存学教室第2講座

(主任: 堀 俊雄教授)

2) 国立予防衛生研究所

筑波医学実験用霊長類センター協力研究員

3) 神奈川歯科大学病理学教室

(指導: 久田太郎教授)

(昭和63年3月29日受付)

The Application of Collagen-solution on Periodontal Osseous Defects in Colony-bred Monkeys

— Experimental and Histopathological Studies —

Tatsuji KOGOU¹⁾, Masato MINABE^{1,2)}, Yuuichi SUGIYAMA¹⁾,
Arimasa KANEDA¹⁾, Hajime SATOU¹⁾, Toshiro KODAMA¹⁾,
Akira SUGAYA¹⁾, Toshiyuki TAMURA¹⁾, Mitsuo FUKUNO¹⁾,
Toshio HORI¹⁾ and Yoshihisa WATANABE³⁾

1) Department of Periodontology, Kanagawa Dental College

(Chief: Prof. Toshio HORI)

2) Co-worker of Tsukuba Primate Center for Medical Science, National Institute of Health

3) Department of Pathology, Kanagawa Dental College

(Director: Prof. Tarou HISADA)

The present experiment was performed to investigate the effects on periodontal regeneration in flap surgery of acid conditioning and application of collagen solution to the root surface.

Bony defects were artificially produced in four monkeys by removing cortical bone on the apical

side within 4 mm from the alveolar bone crest following incision and elevation of the buccal gingiva of the second premolars, first molars and lateral incisors of the maxilla and mandibula. After root planing, the root surface at the bottom of the bone defect was notched.

The root surfaces were then subjected to various types of root preparation and divided into (1) a group given topical application of collagen solution following acid conditioning, (2) a group given topically applied collagen solution, (3) a group given acid conditioning and (4) controls. The animals were sacrificed three or six weeks after surgery and histo-

pathologically examined.

The results indicated that the method of applying collagen solution to the root surface following acid conditioning in flap surgery promoted suppression of epithelial migration and new cementum formation more predominantly than with the conventional method of preparation using acid conditioning alone.

Key words : Collagen, Acid conditioning, Periodontal regeneration

要旨 : 歯肉剥離搔爬手術時に根面への酸処理および collagen solution 塗布処理を応用した場合、歯周組織再生にどのような影響を与えるかについて検索する目的で本実験を行なった。

本研究では、4頭のカンクイザルの上下顎、左右側の第2小臼歯、第1大臼歯および側切歯部の頬側歯肉を切開、剥離後、歯槽骨頂より根尖側4mmの範囲で皮質骨を削除し、人工的骨欠損を作製した。次に、ルートプレーニングを行なった後骨欠損底部根面に notch を付与し、4種の根面処理を施した。すなわち、(1) 酸処理後に collagen 塗布を施した群、(2) collagen 塗布のみの群、(3) 酸処理のみの群、(4) 未処理群の4群を設定した。術後3週、6週に屠殺し、病理組織学的検索を行なった。

その結果、歯肉剥離搔爬手術時に、酸処理を施した根面に対し collagen solution を併用することにより、従来の酸処理のみの根面処理法と比較して、上皮深部増殖抑制および新生セメント質形成が顕著となることが解った。

索引用語 : コラーゲン、酸処理、歯周組織再生

緒 言

近年、歯周疾患罹患歯根面に対し、従来のルートプレーニングの重要性に加え積極的に創傷治癒環境を助長する試みが数多く報告されている。Boyko¹⁾、Polson ら²⁾は、根面を酸処理することにより生ずる脱灰根面の露出膠原線維が、細胞付着の基質として膠原線維形成の足場となることを報告している。また、Crigger ら³⁾は、根面への酸処理により cementogenesis が生ずる可能性を示唆している。さらに最近では、早期創傷治癒過程における根面状態とともに根面に相対する軟組織との一致した対応を重要視する報告⁴⁾も多い。一方、これに関して、根面と相対する軟組織側の治癒を促進させるために collagen を応用した報告もなされている。

そこで我々は、免疫活性がなく、生体内で一定期間経過後に吸収分解される材料として、仔牛真皮由来の不溶性コラーゲンをペプシン処理することにより、テロペプチドのみが消化切断された collagen (Atelocollagen) に注目し、歯肉剥離搔爬手術時にルートプレーニングを行なった根面に対して酸処理および collagen solution 塗布処理を併用した場合、歯周組織再生にどのような影響を与えるかについて病理組織学的検索を行なった。

材料および方法

実験動物には、筑波霊長類センターにて繁殖育成され、全身所見、口腔内所見ともに異常の認められないカンクイザル(雄、年齢9歳3ヵ月、体重7.4~7.6kg)4頭を用いた。実験期間を通じて各猿とも個別のステンレス製ケージに入れ、オリエンタル社製固型飼料、リンゴ、ミカン、飲料水で飼育された。

実験方法は、術前処置として手術1ヵ月前より動物用ケタラール50®(三共株式会社製)0.1~0.3ml/kg 筋肉内注射による全身麻酔下で週1回のブラッシングおよびスケーリングを行なった。また、屠殺までの期間は0.05% chlorhexidine 水溶液を飲料水として自由に与えた。

実験部位は、各猿ともに $\frac{652}{652} \frac{256}{256}$ とし、動物用ケタラール50(0.3~0.6ml/kg) 筋肉内注射後、手術部位に歯科用キシロカイン®(藤沢薬品工業株式会社製)による浸潤麻酔を施し、同部位の頬側に歯肉剥離搔爬手術を行なった。すなわち、替刃メス #11 (フェザー社製)と骨膜剥離子を用いて頬側歯肉全層弁を剥離後、歯槽骨頂部より根尖側4mmの範囲の皮質骨を歯間部を含めて、注水下にてエンジン用カーバイトバーおよび歯科用チゼルを用いて削除し人工的骨欠損を作製した。次いで、露

図1 ルートプレーニング後、骨欠損底部根面に notch を付与したところを示す

図2 2% Atelocollagen implant®

出根面に残存するセメント質および付着線維をキュレット型スケーラーを用いて完全に除去後、骨欠損底部根面に #1/4 のラウンドバーにて notch を付与した (図1)。さらに、術野を生食水にて洗浄後、露出根面に対して4種の根面処理を施した。すなわち、(1) 小筆を用いて citric acid (pH 1.0) を塗布し3分間放置後、生食水にて洗浄したのち collagen (2% Atelocollagen implant®: 高研社製) 塗布を行なった群を Acid/Collagen 群、(2) collagen 塗布のみの群を Collagen 群、(3) citric acid 塗布のみの群を Acid 群、(4) 未処理の群を Control 群とした。図2は、本実験に使用した 2% Atelocollagen implant® を示す。使用方法は、露出根面と歯肉弁内面に局所麻酔用カートリッジを用いて塗布した (図3)。

その後、歯肉辺縁がセメント・エナメル境と一致するように全層歯肉弁を戻し、歯間部断続縫合を行なった。縫合後、歯肉弁と根面との適合を緊密にするため、生食水に浸したガーゼにて約3分間の圧接を行なった。

手術後1週間は、食物による歯肉への外力を可及的に防ぐ目的で固型飼料を水と混合し泥状にして与え、術後感染を予防するために筋肉内注射にてペニシリン G カリウム® (明治製菓株式会社製) 100,000 unit/day を投与した。また、ビタミン摂取不足を補うためにアスコルビン酸® (和光純薬工業株式会社製) 30 mg/day を定期的に飲料水と混合して摂取させた。

図3 下顎左側第2小臼歯、第1大臼歯部の頬側露出根面および歯肉弁内面に 2% Atelocollagen solution を塗布しているところを示す

表1 実験スケジュール

O. H. 1/W			FOP(I) : $\frac{65}{56}$
4 W	6 W		
	3 W		FOP(II) : $\frac{2}{652} \mid \frac{256}{2}$
FOP(I)	FOP(II)	Sacri	

手術後1週で抜糸を行ない、以後、屠殺までの期間は全身麻酔下で週1回のブラッシングを行なった。

実験期間は、同一の猿において実験各群ともに3、6週となるように実験スケジュールを設定した。すなわち、同一の猿において、 $\frac{65}{56}$ を術後6週の検索部位とし、 $\frac{2}{652} \mid \frac{256}{2}$ を術後3週の検索部位とした (表1)。

実験期間終了後に屠殺した後、直ちに上下顎を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。また、HE 染色標本中で osteoid および cementoid を識別できるように塩化シアヌル処理を施した。その後、10% 硝酸ホルマリン水溶液で脱灰した。次いで、パラフィン包埋後、近遠的に厚さ 4 μ の連続切片を作製した。染色方法は HE 染色、Azan Marrory 染色を行なった。以上の方法で作製した連続切片中から、歯根中央部を中心として前後 50 枚を選び組織観察に用いた。さらにその中から 200 μ 間隔で7枚選択し、顕微鏡下にて組織計測を行なった。

組織計測項目は図4に示すように、notch 底からセメント・エナメル境までの距離を基準とした時の、(1) 上皮深部増殖抑制率、(2) cementoid を含む新生セメント質形

CEJ: セメント-エナメル境
JE: 接合上皮の最根尖側部
NC: 新生セメント質形成部
NB: 新生骨形成部
N: ノッチ底部

図4 組織学的計測項目

成率, (3) 骨再生率を算出し, 各群間および経時的な比較, 検討を行なった。

組織計測結果に対する統計学的処理として, 上皮深部増殖抑制率, 新生セメント質形成率については Mann-Whitney's U test, 骨再生率については Ridit 分析を行なった。

結 果

1. 全身所見

筑波霊長類センターにおける飼育管理下での検診により, 健康状態, 食欲, 便性状等に異常は認められなかった。また, 体重変化については, 図5に示すとおり, 術後, 一時的な体重減少は認められるものの, いずれの個体においても経時的な体重減少率は5%以下であった。

2. 口腔内所見

術前処置として行なった1ヵ月間のプラークコントロールにより, 手術部位は臨床的にほぼ炎症が認められなかった。

手術後, 外科的侵襲による軽度の発赤, 腫脹が認められたが, 術後約2週でほぼ消退し臨床的には良好な治癒を示した。しかしながら, 臼歯部と比べ前歯部において歯肉弁の根面への密着がやや不良であった。

図5 各実験動物の経時的体重変化

3. 組織学的観察結果

1) Control 群

術後3週経過例では, ルートプレーニングした根面に沿って, 再生上皮が高度に深部増殖している所見が認められた(図6a)。上皮根尖側端から notch 底までの根面には膠原線維束の再生が認められたが, その走向は根面と並行に配列していた(図6b)。Notch 内においては, 根面に沿って極めて狭小なエオジン好性の cementoid 様硬組織の形成が観察された。同部の再生線維束も根面と並行に配列している所見が多く, 多くの標本で認められた(図6c)。また, 一部の標本では根面に表在性吸収窩が認められた。再生上皮近傍や根面に沿って再生された歯肉結合組織には, 炎症性滲出あるいは炎症細胞浸潤は殆ど観察されなかった。

術後6週を経過すると, 根面に沿って再生上皮の深部増殖が術後3週経過例と比較してさらに高度に認められた。上皮根尖側端から notch 底までの根面には一層のエオジン好性 cementoid 様硬組織の形成が認められたが, 同部に明らかな再生線維束の機能的配列は観察されなかった(図7)。

2) Acid 群

術後3週経過例では, 根面に沿って再生上皮の深部増殖は抑制されている傾向が認められた(図8a)。上皮根尖側端から notch 底までの根面に沿って並行に配列する膠原線維束の再生が認められた。Notch 内根面に沿って一層の狭小なエオジン好性 cementoid 様硬組織の形成が認められ, 同部の線維束は不規則な走向を呈してい

図 6 a, b, c Control 群術後 3 週経過例

- 6 a) 上皮深部増殖が高度に認められた。(HE 染色, ×16)
- 6 b) 上皮根尖側端から根面に沿って並行に配列する膠原線維束の形成が認められた。(HE 染色, ×50)
- 6 c) Notch 内根面に沿って, エオジン好性の一層の cementoid 様硬組織の形成が認められた。(HE 染色, ×50)

図 7 Control 群術後 6 週経過例

著しい上皮深部増殖および notch 内根面に沿って一層のエオジン好性 cementoid 様硬組織の形成が認められた (矢印) (HE 染色, ×20)

た (図 8 b)。

術後 6 週を経過すると, 再生上皮の深部増殖は比較的高度となり, 上皮根尖側端から notch 底にかけての根面に多数の表在性吸収窩が認められた。同部の根面に沿って, 同様の cementoid 様硬組織の形成が観察されたが, 再生線維束の機能的配列は認められなかった (図 9)。一部の標本では, 上皮の最根尖側端が根面の表在性吸収窩において停止し, 上皮根尖側端から notch 底までの根面に対して cementoid 様硬組織の形成と不規則に走向する再生線維束が認められた (図 10)。また, 上皮と接する根面に表在性吸収窩は観察されなかった。術後 3, 6 週ともに炎症性変化は殆ど認められなかった。

3) Collagen 群

術後 3 週経過例では, 根面に沿った再生上皮の深部増殖は抑制され, 上皮の根尖側端近傍の根面には線維芽細胞様細胞の豊富な線維性結合組織の再生が認められた (図 11 a)。Notch 近傍の根面では Control 群, Acid 群と比較して, 歯肉結合組織と連続した強固な膠原線維束の再生が観察された。これらの再生線維束は限局的に根面と垂直性に配列し, 機能的構造を呈する所見が認められた。多くの標本で notch 内根面に沿って既存のセメント質

図 8 a, b Acid 群術後 3 週経過例

- 8 a) 上皮深部増殖は抑制され、根面と並行に配列する膠原線維束の形成が認められた。(HE 染色, $\times 20$)
- 8 b) Notch 内根面に沿って一層のエオジン好性 cementoid 様硬組織の形成が認められた。(HE 染色, $\times 25$)

と連続的に細胞性セメント質の再生が観察された(図 11 b)。

術後 6 週を経過しても根面に沿った再生上皮の高度な深部増殖は認められず、上皮根尖側端から notch 底までの根面に沿って再生線維束の機能的配列を示す領域が拡大していた(図 12 a)。Notch 内根面に沿って再生された細胞性セメント質に対して、再生線維束が封入されると同時に、その配列も垂直性で機能的構造を呈していたが、多くの標本で再生セメント質が根面と剝離している所見が観察された(図 12 b)。術後 3, 6 週ともに根面の表在性吸収窩は殆ど観察されなかった。また、炎症細胞浸潤を含む炎症性変化も認められなかった。

4) Acid/Collagen 群

術後 3 週経過例では、根面に沿った再生上皮の深部増殖は軽度で、Collagen 群と同様、上皮最根尖側端近傍の根面に沿って密な線維芽細胞様細胞の集合が観察された(図 13)。また、一部の標本では、根面と再生線維束との機能的配列が認められた(図 14)。Notch 内根面には、エオジン好性 cementoid 様硬組織の形成が認められたと同時に、少数の標本で細胞性セメント質形成も観察された(図 15)。

術後 6 週を経過すると、再生上皮最根尖側端から細胞

図 9 Acid 群 術後 6 週経過例

比較的高度な上皮深部増殖および上皮根尖側端から多数認められる根面の表在性吸収窩に沿って、一層のエオジン好性 cementoid 様硬組織が認められた。

(HE 染色, $\times 25$)

図 10 Acid 群 術後 6 週経過良好例

一部の標本では、上皮根尖側端は根面の表在性吸収窩において停止し、上皮根尖側端から notch 底までの根面に沿って、一層のエオジン好性 cementoid 様硬組織の形成および不規則に走向する膠原線維束の形成が認められた (矢印)。

(HE 染色, $\times 50$)

性セメント質形成の認められる notch 内根面に沿って、強固な再生線維束が機能的に配列している所見が広範囲に認められた。この根面と歯肉結合組織との線維性再付着に伴って、再生上皮の深部増殖抑制が認められた (図 16 a)。Notch 内根面に沿って細胞性セメント質の形成が認められるとともに、エオジン好性の菲薄な cementoid および cementoid 様硬組織の形成も観察された (図 16 b, 17)。術後 3, 6 週ともに根面の表在性吸収窩が多数の標本で観察された。また、炎症細胞浸潤を含む炎症性変化は認められなかった。

4. 組織学的計測結果

図 18 および表 2 は、術後 3, 6 週経過例の上皮深部増殖抑制率の計測結果を示す。抑制率は、術後 3 週で Control 群 (66.0%) と比較して、Acid 群 (83.4%), Collagen 群 (76.4%), Acid/Collagen 群 (81.6%) において有意に抑制された。術後 6 週では、Acid/Collagen 群において最も深部増殖が抑制され、抑制率は、Control 群 (43.1%), Acid 群 (54.9%) と比較して、Collagen (73.1%), Acid/Collagen (80.1%) 両群において有意に抑制

された。Control 群に対して Acid 群も有意に抑制された。また、Control, Acid 両群ともに術後 3 週から 6 週にかけて経時的に有意な抑制率の低下が認められた。

図 19 および表 3 は、術後 3, 6 週経過例の cementoid を含む新生セメント質形成率の計測結果を示す。形成率は、術後 3 週で Acid/Collagen 群 (31.1%) が他の 3 群、すなわち Control 群 (16.5%), Acid 群 (19.4%), Collagen 群 (19.9%) と比較して有意に高かった。また、Control 群に対して Collagen 群も有意に高かった。術後 6 週においても Acid/Collagen 群 (49.1%) が最も形成率が高く、Control 群 (18.9%), Acid 群 (24.0%), Collagen 群 (41.0%) と比較して、形成率が有意に高かった。また、Collagen 群も Control, Acid 両群と比較して有意に形成率が高かった。また、Collagen, Acid/Collagen 両群ともに術後 3 週から 6 週にかけて経時的に有意な形成率の増加が認められた。

図 20 は、術後 3, 6 週経過例の骨再生率の計測結果を示す。術後 3 週で骨は吸収傾向を示すものから造骨傾向を示すものまで認められたため、骨頂が notch 最下端よりも低いものを負、高いものを正の符号とし、再生率の評価基準を 5 段階に分けた。すなわち、 -30% 以下、 $-30\sim-10\%$ 、 $-10\sim+10\%$ 、 $+10\sim+30\%$ 、 $+30\%$ 以上の 5 段階である。この場合の検定は符号検定となるため Ridit 分析を用いた。再生率は、術後 3, 6 週ともに、Control 群と比較して他の 3 群とも有意差は認められなかった。しかしながら、各群とも術後 3 週から 6 週にかけて経時的に増加傾向が認められ、特に Collagen, Acid/Collagen 両群において有意に骨再生率が増加した。

考 察

近年、歯周外科手術後の創傷治癒を促進する試みが数多く報告されるようになってきた。術後、上皮の根尖方向への移動を抑制することを目的とした手術方法として、Retardation technique^{5,6)}、Guided tissue regeneration technique^{7,8)} あるいは生物学的根面処理法などがある。特に根面処理法については、ルートプレーニングされた根面に対し酸処理を施す方法³⁾ の他に、fibronectin のような glycoprotein を応用する方法⁹⁻¹¹⁾ が試みられている。これらの方法は、in vitro 系^{1,12,13)}、あるいは外科的侵襲の少ない再植系^{2,14)} の実験モデルにおいては、線維芽細胞の根面との付着および線維性付着様式が早期に確立することが実証されている。しかしながら、自然発症あるいは実験的に歯周炎を惹起させた大型動物を用

図 11 a, b Collagen 群 術後3週経過例

- 11 a) 上皮深部増殖は抑制され，上皮根尖側端近傍の根面には線維芽細胞様細胞の密な集合が認められた。(HE 染色， $\times 20$)
- 11 b) Notch内根面に沿って既存のセメント質と連続的に細胞性セメント質の形成が認められた。(HE 染色， $\times 33$)

図 12 a, b Collagen 群 術後6週経過例

- 12 a) 上皮深部増殖は抑制され，上皮根尖側端から notch 底までの根面に沿って膠原線維束の機能的配列が認められた。(HE 染色， $\times 25$)
- 12 b) Notch 内に再生された細胞性セメント質は根面と剝離し，再生セメント質に対して膠原線維束は封入されると同時に機能的配列を呈していた(矢印)。(HE 染色， $\times 50$)

図 13 Acid/Collagen 群 術後3週経過例

上皮深部増殖は抑制され、上皮根尖側端近傍の根面に沿って、線維芽細胞様細胞の密な集合が認められた。さらに notch 内根面に沿って、一層のエオジン好性 cementoid 様硬組織の形成が認められた(矢印)。(HE 染色, $\times 20$)

いた実験モデル,あるいは臨床に応用した場合,その効果は必ずしも一定していない^{10,11,15,16})。Gottlow ら¹⁷)は, citric acid を用いた酸処理法が創傷治癒におよぼす影響を検索した結果,① 酸処理を施した根面において根吸収およびアンキローシスが認められた。② 歯根膜細胞の歯冠側への移動の程度は,脱灰根面と非脱灰根面とで差異が認められなかった。③ 上皮の down growth が認められない脱灰根面において新付着は生じなかったと報告している。すなわち,新付着を獲得するためには,酸処理などによる根面処理の他に,それに対応する軟組織側の一致した態度が重要であると考えられる。

外科手術後の結合織性付着に対して阻害的に働く軟組織側の態度とは,第1に,術後の創傷部における炎症性反応の存在が挙げられる。すなわち, Nasjleti ら¹⁸)が示唆しているように,主に歯槽頂上部結合織領域において,術後早期に出現する多型核白血球やマクロファージによる phagocytosis の結果としての基質の直接的溶解作用による治癒過程の遅延である。これに関して Stahl¹⁹)は術後の炎症の程度と持続期間が創傷治癒過程を左右する因子の1つであると示唆している。一方, Nasjleti らは, Lyophilized autologous plasma (LAP) を用いた一連の研究で,炎症組織中の好中球から放出さ

図 14, 15 Acid/Collagen 群 術後3週経過例

- 14) 一部の標本では,根面と再生された膠原線維束との機能的配列が認められた(矢印)。(HE 染色, $\times 50$)
- 15) 一部の標本では, notch 内根面に沿って細胞性セメント質の形成が認められた(矢印)。(HE 染色, $\times 50$)

図 16 a, b, 17 Acid/Collagen 群 術後 6 週経過例

- 16 a) 上皮根尖側端から notch 底までの根面に沿って、セメント質形成が認められ、根面と歯肉結合組織との線維性付着に伴い上皮深部増殖抑制が認められた (矢印)。(HE 染色, $\times 33$)
- 16 b, 17) Notch 内根面に沿って細胞性セメント質形成が認められるとともに、エオジン好性の菲薄な cementoid および cementoid 様硬組織の形成が認められた (矢印)。(HE 染色, $\times 66$)

れる中性プロテアーゼにより変性した Fibronectine が炎症反応を助長することから、充分量の fibronectine を創傷部に補充する必要性を指摘している^{18,20-22})。これに対し Wikejö らは、fibronectine による根面処理法が、*in vitro*^{23,24}) における研究結果と反して、*in vivo*¹¹) においては線維性付着量は増加せず、根面吸収あるいはアンキロージスを防止し得なかったことを報告しており、*in vitro* および *in vivo* における実験結果が一致しない理由として、第 1 に、早期創傷治癒過程における炎症性細胞浸潤とそれに伴う蛋白溶解酵素の影響を示唆している。これらの見解を裏づける報告として、西村ら²⁵) は、citric acid 塗布根面への術後初期の付着過程を電顕的に観察した結果、術後 7 日目においても創傷部の状態は殆ど変化せず、根面脱灰層に付着した fibrin 網間に多型核白血球を主体とした炎症性細胞浸潤像を認めている。すなわち、脱灰露出線維と新生線維との interdigitation が生ずる前に露出線維が酵素的溶解を受ける可能性を示唆している。

第 2 に、Caton ら²⁶) は、術後、根面に対する歯肉弁の適合不全、あるいは外力による歯肉弁の移動による創傷

治癒の遅延を挙げている。

今回、我々が行なった研究と類似した大型動物の頬側皮質骨を削除する実験モデルにおいては、術後 1 ヶ月前後の治癒形式は、根面に対し並行に走向する膠原線維の接合と接合上皮性付着より成り、術後 1~2 ヶ月では、新生セメント質形成を伴う機能的な線維性結合が生ずることが報告されている^{4,27,28})。そして、歯肉弁の根面への密着を阻害する因子、すなわち歯肉弁の閉鎖不全、食物などによる外傷、狭小な付着歯肉、小帯の高位付着などが存在する場合には、持続的な上皮深部増殖が生ずる可能性があると考えられる。

本研究では、collagen solution を用いた根面処理が歯周外科手術後の創傷治癒を促進し得るかな否かについて探索することを目的としている。そのため、できる限り臨床に近い条件下で、なおかつ実験各群間で創傷治癒環境に差異が生じないような実験動物および実験モデルを選択した。すなわち、年齢および生後の飼育環境が極めて類似している大型動物を使用するために、筑波霊長類センターにて完全管理下で繁殖育成された年齢 9 歳 3 ヶ月の雄カニクイザル (体重 7.4~7.6 kg) 4 頭を用いた。

図 18 術後 3 週, 6 週における上皮深部増殖抑制率 (%) (Mann-Whitney's U-test)

表 2 術後 3 週, 6 週における上皮深部増殖抑制率の計測結果を示す

	Control	Acid	Collagen	Acid/Collagen
3 W	66.0±3.4	83.4±5.1	76.4±4.7	81.6±4.5
6 W	43.1±8.6	54.9±14.7	73.1±2.9	80.1±11.4

* : Mann-Whitney's U-test
(significant $p < 0.05$)

さらに, 実験モデルとして上下顎前臼歯部の頬側皮質骨を除去した裂開型の骨欠損モデルを用いた。この際, 歯間部皮質骨を残すと, 骨欠損部の修復は欠損部の近遠心径の大きさに左右される²⁹⁾ため, 歯間部の骨を可及的に除去した。この実験モデルは, ① 根尖方向のみからの歯周組織再生過程を評価できるため, 1 次元組織計測を行なう妥当性がある。② 骨内欠損モデルと比較して術後の歯肉弁の安定が悪く, 歯肉弁の移動あるいは歯肉退縮の影響を考慮に入れることができる。③ 人為的に歯周炎を惹起させていないために, 実験部位間で歯肉結合組織内の炎症の存在と程度に大きな差異はない。などの本研究目的に合致した利点を有している。動物実験において歯周炎を惹起させる必要性の是非については, 実験目的の差異は考えられるが, 従来より歯周炎の有無に関わらず露出根面が汚染されていない場合, 結合組織再生の程度に差異がないことが *in vitro*¹³⁾, *in vivo*^{7,8,30)} 両面からの研究により裏づけられている。今後, 歯周外科手術後の創

傷治癒を促進するための種々の試みについて, その効果を検索する上で本実験モデルは有用であると考えられる³¹⁾。

本研究結果から, collagen を根面および歯肉弁内面に塗布することにより, 術後 3 週から 6 週にかけて新生セメント質形成量が増加し, 上皮深部増殖は抑制されることが明らかとなった。術後 3 週においては, Collagen 群, Acid/Collagen 群ともに, 根面に対し線維芽細胞様細胞の集合および付着が著明で, 特に Acid/Collagen 群では, 細胞成分を多く含む膠原線維束が直接根面に対して垂直に配列する所見が認められた。Caffesse ら⁹⁾は, ビーグル犬を用いた実験において, 根面酸処理と Fibronectine との併用処理により結合組織性付着が増強されたものの, Fibronectine 単独処理ではその効果が明らかではなかったことを報告している。これに対し, 今回の結果では, 酸処理を併用していない Collagen 群においても Control 群, Acid 群と比較して, 上皮深部増殖抑制および新

図 19 術後3週、6週における新生セメント質形成率(%) (Mann-Whitney's U-test)

表 3 術後3週、6週における新生セメント質形成率の計測結果を示す

	Control	Acid	Collagen	Acid/Collagen
3 W	16.5±2.9	19.4±4.5	19.9±1.7	31.1±10.1
6 W	18.9±8.3	24.0±11.9	41.0±8.8	49.1±4.8

* : Mann-Whitney's U-test
(significant $p < 0.05$)

生セメント質形成が著明であった。これは、外因性 collagen の存在により、膠原線維束の形成が術後早期より活発化したことや、それに加えて今回用いた Atelocollagen solution は、37°C 以上の温度で不溶性 fibril を形成することから、それ自体が物理的バリアーとして上皮深部増殖に対して抵抗したものと考えられる³²⁾。これに関して Stahl は、膠原線維が根面に対して機能的付着様式を生じておらず、接合している状況下でも上皮の根尖側移動を抑制できると報告している³³⁾。また、術後3週において、線維芽細胞様細胞が根面に積極的に集合、付着している所見が得られたことから、根表面は生理的脱灰をうけ、術後早期より新生された周囲膠原線維との結合が生じたものと考えられる³⁴⁾。

Collagen の添加により新生セメント質形成が増強された理由として、上皮深部増殖が抑制されるとともに、セメント質形成能を有するとされる歯根膜細胞の歯冠側

方向への増殖が活発化したことによるものと考えられる^{35,36)}。Melcher³⁷⁾ は、歯肉結合組織が根面に接すると、その後のセメント質形成を伴った機能的な線維性付着が阻害されると報告しており、西村ら³⁸⁾ は、歯冠側部歯肉結合組織領域におけるセメント質沈着の可能性を否定している。また、野口、高田ら^{4,39)} は、セメント質形成には線維形成能を有する細胞の根面への付着および線維形成が必要であると示唆している。さらに Egelberg は、術後の治癒形式を、歯根膜細胞の歯冠側移動により形成されるセメント質形成を伴った線維性付着と、より歯冠側部における歯肉結合組織性付着の2様式に区分している⁴⁰⁾。すなわち、根面と軟組織間における外因性 collagen の介在は、歯根膜由来細胞の歯冠側移動を助長するための tractional field としての有用性を示唆するものである⁴¹⁾。

本研究結果から、Control、Acid 両群で術後3週から

図 20 術後 3 週, 6 週における骨再生率 (Redit analysis)

6 週にかけて上皮深部増殖が増加していた。サルを用いた外科手術後の創傷治癒過程を観察した報告によると、術後、上皮化が完了するには 5~14 日を要し、結合組織が成熟するのに 15~35 日を要することが解っている^{42,43)}。すなわち、術後、反応性炎症の存在あるいは機械的外力などにより結合組織の成熟化が遅延した場合には上皮深部増殖が生ずるものと考えられる。Control, Acid 両群ともに、術後 6 週においても新生セメント質形成量が少なく、根面に対する結合組織線維の走向も不規則で、線維自体も未熟なものが多いことから、上皮深部増殖が生じ易い環境であったものと考えられる。しかしながら、Acid 群においては、一部の標本で、上皮の最根尖側端は根面の表在性吸収窩で停止している所見が認められたことや、Collagen 群で認められたような根面と新生セメント質とが剥離した所見が認められなかったことなどから、粗造根面では上皮根尖側移動が生じにくいという報告^{44,45)}や、citric acid により脱灰された象牙質表層部は、新生セメント質あるいはセメント質形成能を有する細胞と強固に接合、もしくは付着する機構を有するといった従来の報告^{46,47)}を裏づけた。すなわち、新付着獲得には、生理的あるいは人為的脱灰による根面膠原線維束の露出が、細胞付着および線維形成の基質として必要不可欠な要因であることに変わりはない。そして、酸処理による象牙質内膠原線維の露出は、① 初期細胞付着の増強、② 細胞の traction を容易にし、orientation が促進される。③ 新生された周囲膠原線維との結合などの点において重要であるが¹²⁾、酸処理だけでは特に③の作用が不十分

であり、軟組織側で術後早期より膠原線維束形成が活発化することが必要であると考えられる。

本研究結果においては、collagen の添加により、経時的に骨の再生量が増加する傾向が認められた。しかしながら、collagen が骨再生に何らかの影響をおよぼした可能性については確証は得られなかった。その理由として、本実験モデルのような裂開型骨欠損では、術後、比較的早期において骨再生が生じにくく、骨内欠損と比較して骨再生量が少ないことなどに起因していると考えられる^{48,49)}。また、骨削除部位における頬側皮質骨の厚みの差により、骨再生量にばらつきが生じたことも原因として考えられる²⁷⁾。今後、骨再生と細胞性セメント質との関連性について論じた報告^{4,50,51)}も多いことから、骨組織がおよぼす影響を再現性よく検討する工夫が必要であると思われる。

結 論

歯肉剥離搔爬手術時に、酸処理した根面に collagen を併用することにより、従来の酸処理のみの根面処理法と比較して、上皮深部増殖抑制および新生セメント質形成が顕著となることが解った。

このことから、酸処理および collagen の併用による根面処理法は、歯周外科手術後の創傷治癒環境を安定化させ、なおかつ、創傷治癒を促進させるために有用な外科手術方法と成り得ることが示唆された。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究の遂行に際して御助言、御助力を賜りました国立予防衛生研究所 筑波医学実験用霊長類センター所長本庄重男先生、同繁殖育成室室長長文昭先生ならびに同研究所員各位に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Boyko, G.A., Brunette, D.M. and Melcher, A.H. : Cell attachment to demineralized root surface *in vitro*. J. Periodontal Res., 15 : 297-303, 1980.
- 2) Polson, A.M. and Proye, M.P. : Effect of root surface alterations on periodontal healing. II. Citric acid treatment of the denuded root. J. Clin. Periodontol., 9 : 441-454, 1982.
- 3) Crigger, M., Bogle, G., Nilveus, R., Egelberg, J. and Selvig, K.A. : The effect of topical citric acid application on the healing of experimental furcation defects in dogs. J. Periodontal Res., 13 : 538-549, 1978.
- 4) 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.
- 5) Prichard, J.F. : The diagnosis and management of vertical bony defects. J. Periodontol., 54 : 29-35, 1983.
- 6) Ellegard, B., Karring, T. and Le, H. : Retardation of epithelial migration in new attachment attempts in intrabony defects in monkeys. J. Clin. Periodontol., 3 : 23-37, 1976.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Smith, B., Caffesse, R., Nasjleti, C., Kon, S. and Castelli, W. : Effects of citric acid and fibronectin and laminin application in treating periodontitis. J. Clin. Periodontol., 14 : 396-402, 1987.
- 11) Wikesj, U.M.E., Claffey, N., Christersson, L.A., Franzetti, L.C., Genco, R.J., Terranova, V.P. and Egelberg, J. : Repair of periodontal furcation defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralization with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. J. Clin. Periodontol., 15 : 73-80, 1988.
- 12) Pitaru, S., Gray, A., Aubin, J.E. and Melcher, A.H. : The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts *in vitro*. J. Periodontal Res., 19 : 408-418, 1984.
- 13) Fernyhough, W. and Page, R.C. : Attachment, growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin treated normal and diseased tooth roots. J. Periodontol., 54 : 133-140, 1983.
- 14) Polson, A.M. and Proye, M.P. : Fibrin Linkage : A precursor for new attachment. J. Periodontol., 54 : 141-147, 1983.
- 15) Renvert, S., Nilveus, R. and Egelberg, J. : Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. J. Clin. Periodontol., 12 : 619-629, 1985.
- 16) Inoue, T., Deporter, D.A. and Melcher, A.H. : Induction of cartilage and bone by dentin demineralized in citric acid. J. Periodontal Res., 21 : 243-255, 1986.
- 17) Gottlow, J., Nyman, S. and Karring, T. : Healing following citric acid conditioning of roots implanted into bone gingival connective tissue. J. Periodontal Res., 19 : 214-220, 1984.
- 18) Nasjleti, C.E., Caffesse, R.G., Castelli, W.A., Lopatin, D.E. and Kowalski, C. : Effect of Lyophilized autologous plasma on periodontal heal-

- ing of replanted teeth. J. Periodontol., 57 : 568-578, 1986.
- 19) Stahl, S. : Speculations on periodontal attachment loss. J. Clin. Periodontol., 13 : 1-5, 1986.
 - 20) Caffesse, R.G., Smith, B.A., Nasjleti, C.E. and Lopatin, D.E. : Cell Proliferation after Flap Surgery, Root Conditioning and Fibronectin Application. J. Periodontol., 58 : 661-666, 1987.
 - 21) Smith, B.A., Smith, J.S., Caffesse, R.G., Nasjleti, C.E., Lopatin, D.E. and Kowalski, C.J. : Effect of Citric Acid and Various Concentrations of Fibronectin on Healing Following Periodontal Flap Surgery in Dogs. J. Periodontol., 58 : 667-673, 1987.
 - 22) Nasjleti, C.E., Caffesse, R.G., Castelli, W.A., Smith, B.A., Lopatin, D.E. and Kowalski, C.J. : Effect of Citric Acid and Lyophilized Autologous Plasma on Healing Following Periodontal Flap Surgery in Monkeys. J. Periodontol., 58 : 770-779, 1987.
 - 23) Terranova, V.P. and Wikesjö, M.E. : Extracellular Matrices and Polypeptide Growth Factors as Mediators of Functions of Cells of the Periodontium. J. Periodontol., 58 : 371-380, 1987.
 - 24) Wikesjö, U.M.E., Baker, P.J., Christersson, L., Genco, R.J., Lyall, R.M., Hic, S., Diflorio, R.M. and Terranova, V.P. : A biochemical approach to periodontal regeneration : Tetracycline treatment conditions dentin surfaces. J. Periodontal Res., 21 : 322-329, 1986.
 - 25) 山岡 昭, 西村和晃 : 歯と歯周の手術後の付着に関する諸問題. The Quintessence, 5 : 109-125, 1986.
 - 26) Caton, J.G., Polson, A.M., Prato, G.P., 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.
 - 27) 木村喜保 : 実験的歯肉剥離掻爬手術後の結合組織性再付着の可能性について. 日歯周誌, 23 : 104-125, 1981.
 - 28) 菅野寿一 : 再付着における歯根膜の役割に関する病理組織学的研究. 日歯周誌, 25 : 273-299, 1983.
 - 29) Nyman, S. and Karring, T. : Regeneration of surgically removed buccal alveolar bone in dogs. J. Periodontal Res., 14 : 86-92, 1979.
 - 30) 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.
 - 31) Iglhaut, J., Suggs, C., Borjesson, B. and Aukhil, I. : Apical migration of oral epithelium in experimental dehiscence wounds. J. Clin. Periodontol., 14 : 508-514, 1987.
 - 32) Yaffe, A., Ehrlich, J. and Shoshan, S. : Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dog. J. Periodontol., 55 : 623-628, 1984.
 - 33) Stahl, S.S., Slavkin, H.C., Yamada, L. and Levine, S. : Speculations about gingival repair. J. Periodontol., 43 : 395-402, 1972.
 - 34) 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.
 - 35) 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*. A preliminary study of transplanted roots in the dog. J. Periodontal Res., 16 : 73-88, 1981.
 - 36) Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C. and Pettersson, E. : *In vivo* differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. J. Clin. Periodontol., 13 : 862-868, 1986.
 - 37) Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol., 47 : 256-266, 1976.
 - 38) 西村和晃, 高田耕平, 野口吉広, 野口秀夫, 永石真幸, 林 正純, 仲 秀典, 白井義英, 山岡 昭 : 歯肉剥離掻爬手術後の新付着に関する研究 (第4報) — 術後の結合組織付着部に対するX線定量分析によるセメント質沈着の可能性について —. 日歯周誌, 27 : 416-423, 1985.
 - 39) 高田耕平 : 歯肉剥離掻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 (3) : 283-303, 1985.
- 40) Egelberg, J. : Regeneration and repair of periodontal tissues. J. Periodontal Res., 22 : 233-242, 1987.
 - 41) Ripamonti, U., Petit, J.C., Lemmer, J. and Austin, J.C. : Regeneration of the connective tissue attachment on surgically exposed roots using a fibrin-fibronectin adhesive system. An experimental study on the baboon (*Papio ursinus*). J. Periodontal Res., 22 : 320-326, 1987.
 - 42) Stahl, S.S. and Tonna, E.A. : Cell proliferative activity of injured periodontal tissue. J. Periodontal Res., 7 : 328-333, 1972.
 - 43) Stahl, S.S. : Gingivectomy. Stahl, S.S. ed., Periodontal surgery, biologic basis and technique, Thomas, 1976, 219.
 - 44) Caton, J.G. and Zander, H.A. : The attachment between tooth and gingival tissue after periodic root planing and soft tissue curettage. J. Periodontol., 50 : 462-466, 1979.
 - 45) Squier, C.A. and Collins, P. : The relationship between soft tissue attachment, epithelial down growth and surface porosity. J. Periodontal Res., 16 : 434-440, 1981.
 - 46) Nalbandian, J. and Cote, N. : Direct histological comparison of periodontal wound healing in the beagle dog with and without citric acid conditioning. J. Periodontal Res., 17 : 552-562, 1982.
 - 47) 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. Periodontal Res., 21 : 30-38, 1986.
 - 48) 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 : 歯肉剝離掻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.
 - 49) 小林英和 : サルの歯槽骨にいろいろな欠損を与えた場合の修復過程について. 口病誌, 38 (3) : 404-423, 1971.
 - 50) 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.
 - 51) Patterson, R.L., Collings, C.K. and Zimmerman, E.R. : Autogenous implants in the alveolar process of the dog with induced periodontitis. J. Periodontics, 2 : 80-86, 1975.