フェニトイン性歯肉増殖症由来細胞の生化学的特性

—非コラーゲン性タンパク質合成について—

出口 眞二 大山 晃 福野 光男 堀 俊雄
川瀬 俊夫* 青木 章子* 鈴木 清* 斎藤 滋*

神奈川歯科大学保存教室第二講座

(主任：堀 俊雄教授)

* 神奈川歯科大学口腔生化学教室

(主任：斎藤 滋教授)

(昭和63年8月15日受付)

Biochemical Characterization of Phenytoin-induced Hyperplastic Human Gingival Fibroblasts — Non-collagenous Proteins Biosynthesis —

Shinji DEGUCHI, Akira OOOYAMA, Mitsuo FUKUNO, Toshio HORI,
Toshio KAWASE*, Fumiko AOKI*, Kiyoshi SUZUKI* and Shigeru SAITO*

Department of Periodontology, Kanagawa Dental College

(Chief : Prof. Toshio HORI)

* Department of Oral Biochemistry, Kanagawa Dental College

(Chief : Prof. Shigeru SAITO)

Phenytoin (PHT), administered as an anticonvulsant, has a side effect gingiva overgrowth in approximately 50% of patients. The present study was attempted to explore the biochemical mechanism on non-collagenous protein biosynthesis as affected by PHT.

Responder cells (RES A3, RES C2) of a patient with gingival overgrowth were obtained by the method of Kawase et al. Normal human gingival fibroblasts (Gin-1), purchased from ATCC, were also used. All cells were inoculated at 1×10^4 cells/cm² (12 multi-well plate or 60 mm tissue culture dish), and then cultured for 4, 8 and 12 days with or without PHT (5 μ g/ml). Prior to harvesting at the indicated times, cells were incubated with ¹⁴C-amino acids (1.25 μ Ci/ml) for 24 hours. The ¹⁴C-labeled proteins were isolated from the cell layers including

extracellular matrix, following Kurkinen et al. with a minor change. Each ¹⁴C-labeled fraction was dissolved in 3 ml of Aquasol-2 and the radioactivity by a liquid scintillation counter.

The DNA content of cell layers affected by PHT was increased on Gin-1, RES A3 and RES C2 at the post-confluence, resulting also in an increase in cell number. Two morphologically different phenotypes of responder cells were observed, differing in nuclear and cell sizes. At 12 days culture, RES A3, were stimulated by PHT, showed increased synthesis of both total extractable proteins (EP) and binding proteins (BP) labeled with ¹⁴C-amino acids.

Therefore, at least two distinct phenotypic responder cells are present in the PHT-induced overgrowth gingiva, alter the synthesis of non-collagenous proteins.

Key words : Phenytoin-induced hyperplasia, Phenytoin, Non-collagenous protein, Extracellular matrix

要旨: フェニトイン性歯肉増殖症の発現機序を解明するために、増殖歯肉より歯肉線維芽細胞を確立し Responder cells として用いた。添加基質として Amino acid mixture ^{14}C を用い、PHT (5 $\mu\text{g/ml}$) 添加による各細胞への影響を非コラーゲン性タンパク質合成能についての検索と、あわせて形態的観察を行った。

その結果、形態学的には Responder cells に少なくとも2種類の phenotype が認められた。一方、非コラーゲン性タンパク質中に、PHI 添加により、有意に増加する Amino acid mixture ^{14}C 由来のタンパク質の存在が RES A 3 の12日培養に認められた。BP においても、同様な影響が認められた。このことは、タンパク質合成能および培養細胞形態において Responder cells 中に2種類以上の pheno-type の存在を示唆した。

索引用語: フェニトイン性歯肉増殖症, フェニトイン, 非コラーゲン性タンパク質, 細胞外基質

緒 言

抗痙攣薬である phenytoin (以下 PHT と略す) は、副作用として歯肉増殖症を発現させることが Kimball¹⁾ により報告されて以来、その発現機序解明のために多くの研究がなされている。しかし、未だに不明な点が数多く残されている。PHT 性歯肉増殖症は、PHT 服用者の約50%に出現し、特に、精神形成過程である若年者に多発すること²⁾が知られている。このことから、原因の究明は急務とされている。

形態学的研究においては、Hassell ら³⁾は線維芽細胞の核の長さや、一定面積当たりの核の数に PHT 性歯肉増殖症患者の歯肉 (Responder) と正常な歯肉 (Normal) との間に有意な差を認めなかったのに対し、Johnson ら⁴⁾は Normal cell より Responder cell の核が有意に長いことを報告している。この様に、Responder cell に対する形態学的意見の統一は未だみられていない。

組織培養においては、PHT 添加による高分子合成の増加⁵⁾、細胞培養では PHT (5 $\mu\text{g/ml}$) 添加によりヒト線維芽細胞のコラーゲン合成に影響を示さなかったという報告⁶⁾や、Hassell ら⁷⁾は Normal cell, Nonresponder cell および Responder cell のタンパク合成、コラーゲン合成について検討した結果、PHT 非添加において Responder cell は他の2細胞より有意に高い値を示すものの、PHT 添加による同一細胞間には差を認めていない。一方、Vernillo ら⁸⁾は Responder cell, Normal cell 共に、PHT 添加、非添加によりタンパク合成、コラーゲン合成、グリコサミノグリカン (GAG) 合成の増加を認めている。以上のごとく、Responder cell の採取方法や培養法により異なった結果が生じる事が考えられる。なお、Deguchi ら⁹⁾は、ヒト歯根膜線維細胞の非コラーゲン性タンパク質中に、PHT 添加により特異的に増加さ

れるタンパク質を認めている。PHT 性歯肉増殖症の発現機序を解明するため、PHT 服用により発現した増殖歯肉より歯肉線維芽細胞を採取し、Responder cell に対する PHT の直接添加による影響を検討することは重要なことと考え、今回、我々は、非浸潤麻酔下にて採取した Responder cell の非コラーゲン性タンパク質に対する PHT の影響について検索した。

材料および方法

1. 歯肉由来細胞の培養

Responder cell はレノックス症候群にて PHT を長期服用し、歯肉増殖症を有する患者より全身麻酔下にて歯肉切除時に歯肉を採取し、それを約 1 mm³ に細片し、Kawase ら¹⁰⁾の方法に従い得られた。なお、位相差顕微鏡観察により形態が有意に異なる二種類の Responder cell が得られたので各々を RES A 3, RES C 2 とし3代継代細胞を以下の実験に供した。また、正常ヒト歯肉線維芽細胞として8代継代細胞の Gin-1 (ATCC) を用いた。

2. 細胞培養条件

Gin-1 および RES A 3, RES C 2 の各細胞は、 2.5×10^4 cells/22 mm well (12 multi-well plate; Linbro) の細胞密度で D-MEM (含 2 mg/ml 透析乾燥牛胎児血清, 50 $\mu\text{g/ml}$ ascorbic acid, 100 unit/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin : Gibco # 600-5140) を用い 37°C, 5% CO₂+95% air 下にて培養した。PHT 群には、最終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ の PHT (Sigama Chemical Co., St. Louis, Mo) 溶液を2日毎の培養液交換と同時に添加した。コントロール群には、PHT 溶液の溶媒 (エタノール溶液, プロピレングリコール, 0.01% NaOH 溶液を 1:1:1 の容積比で作成した混合液) を PHT 群と同濃度で添加した。細胞培養における PHT の影響を検索するために培

養 4, 8, 12 日目に培養液を除去し, phosphate buffer saline (PBS (-): Code 05913) にて 3 回洗浄後, DNA 量の分析に供した。

一方, 各細胞を 1.25×10^5 cells/60 mm culture dish の細胞密度で前述と同条件にて, PHT 群とコントロール群を作成し, 細胞停止 (4, 8, 12 日目) の 24 時間前に Amino acid mixture, L-[^{14}C (U)]-(New England Nuclear, Boston, Mass) を $1.25 \mu\text{Ci/ml}$ の濃度で培地中に添加した。同様に, 各培養日数終了後 PBS (-) にて 3 回洗浄し, 生成非コラーゲン性タンパク質の分析を行った。

3. DNA の定量

Puzas and Goodman¹¹⁾の方法に準じて, Standard には Salmon sperm (和光) の DNA を $1.0 \text{ N NH}_4\text{OH}$ で溶解し 2.0 mg/ml の stock solution を作成し, 0, 4, 10, 20, $30 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整し 12 well plate の wells に滴下した。培養した wells と同時に乾燥器にて 70°C で (45~60 分) 完全に乾燥させた。バックグラウンドの蛍光を低下させるために, 2 M 3, 5-diaminobenzoic acid dihydrochloride (DABA) に Norit decolorizing carbon (0.1 g/ml) を加えて 15 分間放置した後, $0.22 \mu\text{m}$ Nal-gene filter により濾過し, 各 sample wells に 1 ml 加え, 60°C , 30 分間インキュベーションした。反応を停止させるために 2 ml の 0.6 N perchloric acid solution (PCA) を加えた。蛍光測定には Difference spectrofluorophotometer RF-503 A (Shimadzu) を使用し励起波長: 408 nm , 蛍光波長: 500 nm の条件で測定した。

4. 生成非コラーゲン性タンパク質の分画法

Gelatin binding proteins (BP) の抽出は Fig. 1 に示すように Kurkinen ら¹²⁾の変法に従った。Amino acid mixture- ^{14}C で前述の方法にて標識された各 wells は, 培養液を除去し PBS (-) にて 3 回洗浄後 1 ml の lysis buffer (1% Nonidet P-40, 0.15 M NaCl, 50 mM Tris, 5 mM EDTA, 2 mM N-ethylmaleimide, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, $\text{pH } 8.0$) により低温室にて 20 分間抽出を行った。その後, $12,000 \times g$ で 20 分間遠心をし, その上清を Total extractable protein (EP) とした。上清に gelatin-Sepharose 4 B を 50% (v/v) 含む buffer A (1% Nonidet P-40, 0.4 M NaCl, 50 mM Tris, $\text{pH } 8.0$, 5 mM EDTA, 2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 mM N-ethylmaleimide) を加えて総量を 1 ml とし, 上清中のタンパク質の gelatin への結合は, 低温室にて 2 時間振盪反応させて得られた。その後, Gelatin-Sepharose Beads に対し 1 ml の buffer A にて

Fig. 1 Experimental procedures of the separation of extractable proteins (EP) and gelatin binding proteins (BP) incorporated ^{14}C -amino acids with or without PHT on Gin-1, Res A 3 and Res C 2 cells.

洗浄し, 遠心操作を 2 回行い, さらに, SDS-gel electrophoresis sample buffer (0.0625 M Tris-HCl, $\text{pH } 6.8$, 7.5% sucrose, 1.25% SDS, 1.25% 2-mercaptoethanol, 0.00125% bromphenol blue) を $50 \mu\text{l}$ 加えて 3 分間煮沸することにより BP を抽出した。

各々の分画より $10 \mu\text{l}$ を採取し 3 ml の Aquasol-2 (New England Nuclear, Boston) に溶かし溶液シンチレーションカウンター (ALOKA; LSC 753) にて放射活性を測定した。

Fig. 2 The effect of PHT on the cell growth of Gin-1, RES A3 and RES C2

結 果

1. Responder cell における形態観察

Gin-1, RES A3 と RES C2 を 2.5×10^4 cells の密度で incubate し、培養 8 日目において位相差顕微鏡で観

察したところ Fig. 2 に示す像が得られた。すなわち、Gin-1, と RES C2 は類似した形態が認められたが、RES A3 は明らかに Gin-1 および RES C2 と比較し大きな核および細胞形態が観察された。しかし、各細胞共に PHT 添加による明らかな影響は形態観察において認められなかった。

Table 1 DNA content of cultures with or without PHT (control=CONT) treatment. Values are presented as $\mu\text{g}/\text{well}$ and the mean $\pm$ SD (n=4).

Culture period	Gin-1		RES A3		RES C2	
	CONT	PHT	CONT	PHT	CONT	PHT
4 Days	0.80 $\pm$ 0.23	0.81 $\pm$ 0.17	0.41 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$ 0.09	0.55 $\pm$ 0.13	0.55 $\pm$ 0.13
8 Days	1.11 $\pm$ 0.25	1.38 $\pm$ 0.29	0.65 $\pm$ 0.17	0.96 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.21	1.06 $\pm$ 0.23
12 Days	1.84 $\pm$ 0.25	3.68 $\pm$ 0.42	0.95 $\pm$ 0.12	1.81 $\pm$ 0.24	1.49 $\pm$ 0.37	2.07 $\pm$ 0.03

* : Significant at $p < 0.01$

** : Significant at $p < 0.001$

Fig. 3 The effect of PHT on total extractable proteins synthesis with amino acid mixture- ^{14}C in Gin-1 (A), RES A3 (B) and RES C2 (C) for 24 h incubation. The cells were cultured with (grey bars) or without (open bars) PHT. Values are presented as the mean $\pm$ SD (n=4)

2. DNA 量の測定

細胞増殖の指標を、細胞当せりの DNA 量が一定であることから、Gin-1, RES A3 と RES C2 における 4, 8 と 12 日目のコントロール群および PHT 群の DNA 測定を 3, 5-Diaminobenzoic acid dihydrochloride 法により行ったところ Table 1 に示す結果となった。すなわち、4 日目の培養において PHT 添加により有意な DNA 量の増加が認められなかった。しかし、8 および 12 日目の培養細胞は既に confluent cells の状態にあり、この状態の各細胞において共に有意な PHT の影響として

DNA 量増加が確認された。一方、Table 1 より培養 4～8 日目、8～12 日目、4～12 日目における DNA 量の増加率に対する PHT 群/コントロール群の比で表すと Gin-1 : 1.8, 2.5, 2.7, RES A3 : 2.5, 1.9, 2.7 および RES C2 : 1.5, 1.4, 1.6 となり PHT による増加率への影響は各細胞、各培養日数間により異なっているが、培養 4 日目から 12 日目までの DNA 量の増加率に対する PHT の影響は、Gin-1 (2.7), RES A3 (2.7) が RES C2 (1.6) に対し有意に高い値を示した。

Fig. 4 The effect of PHT on binding proteins synthesis with amino acid mixture-¹⁴C in Gin-1 (A), RES A3 (B) and RES C2 (C) for 24 h incubation. The cells were cultured with (grey bars) or without (open bars) PHT. Values are presented as the mean $\pm$ SD (n=4)

3. 生成非コラーゲン性タンパク質の分画

1) EP の生成

1% Nodidet P-40 を含む Lysis buffer により抽出された総タンパク質への 24 時間 incubation による Amino acid mixture-¹⁴C の取り込みについて Fig. 3 に示す結果が得られた。すなわち、Gin-1, RES C2 は培養日数と共に増加を示すものの、PHT 添加による影響は認められなかった。RES A3 のコントロール群においては、培養 8 日目より 12 日目に取り込みの減少が認められたが PHT 群では培養 12 日目においてその減少が認められなかった。このことより、培養 12 日目において PHT 添加によりコントロール群と比較して有意 ($p < 0.02$) な増加が認められた。

2) BP の生成

細胞外基質、特にコラーゲンに親和性のあるタンパク質を検索するため、Lysis buffer により抽出されたタンパク質中 gelatin Sepharose に対し binding した非コラーゲン性タンパク質分画への Amino acid mixture-¹⁴C の取り込みは Fig. 4 に示す結果となった。Gin-1 のコントロール群において 4 日目と 8 日目培養間では、¹⁴C の取り込み量に有意な変化を示さないが、12 日目培養で

は 8 日目と比較して約 10 倍、PHT 群では約 16 倍の増加が認められた。RES C2 においても Gin-1 同様、4, 8 日目培養に対して 12 日目培養ではコントロール群および PHT 群、共に約 10 倍の増加を示した。一方、RES A3 のコントロール群では 12 日目培養で 8 日目培養に比べ約 2 倍の減少を示し、12 日目培養では PHT 添加により BP 生成に有意 ($p < 0.01$) な増加が認められた。なお、培養期間の日数に対し Gin-1, RES C2 は有意な増加を示すのに対し、RES A3 は減少を示した。

考 察

PHT 性歯肉増殖症の細胞の形態学的研究^{3,4)}における、歯肉線維芽細胞の核の大きさに対する結果の不一致、および細胞培養を用いた生化学的研究において PHT 添加によるタンパク質合成、コラーゲン合成、GAG 合成への影響は研究者により異なった結果が報告^{7,8,13,14)}されている。PHT 性歯肉増殖症の発現機序を解明するために、PHT 性歯肉増殖症歯肉より得る Responder cell 培養系を使用することは有効な手段であると考えられる。それと同時に、培養 Responder cell に対する形態学的

検索も加えることが重要であると思われる。

そこで本研究では、可及的に細胞への浸潤麻酔剤の影響を避けるため、全身麻酔を行った後、組織片が得られた。歯肉組織片より migrate した細胞を継代し、passage 3 の Responder cells を位相差顕微鏡で観察すると Fig. 2 に示すごとく明らかに異なる細胞形態が得られた。しかし、5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度の PHT によりさらに形態変化を起こすことはなかった。このことは、少なくとも 2 種類の Responder cells が培養系に得られたことになり、PHT 性歯肉増殖症歯肉結合組織中の線維芽細胞は形態的に異なる細胞から構成されることが示唆された。

1. DNA 量への影響

各々の細胞は、PHT 添加により confluent に達した培養 8 と 12 日目において有意な DNA 量の増加を認めた (Table 1)。このことは、PHT 添加により細胞の増殖能が高められたという Shafer¹⁵⁾ の報告と一致する。しかし、Benveniste ら¹⁴⁾ は Normal および Responder 両細胞において、PHT 添加による影響は postconfluent phase より growth phase での有意な DNA 量の増加を示し、PHT は細胞分化活性の高い時期に影響を与えると考察している。しかし、今回の結果は、細胞分化機能発現時である postconfluent 以降に PHT の影響が認められた。DNA 量の 4 日目から 12 日目までの増加率に対する PHT の影響では、Gin-1 と RES A3 は 2.7 と同程度であったが、RES C2 は 1.6 と他の 2 細胞に比べ低い値を示した。このことより、細胞形態としては Gin-1 と RES C2 が類似しているものの、細胞増加率に対する PHT の影響では Gin-1 と RES A3 が類似した高い値を示した。

以上のことにより、同一患者より採取した Responder cell にでさえ単一の細胞群だけでなく、異なった性格を有する phenotype の存在が示唆された。このことは、Narayanan ら¹³⁾ が報告している Responder cell には mRNA およびコラーゲン合成が有意に高い細胞と、Normal cell と同程度の細胞の 2 種類が存在したという結果を裏付けるものと考えられる。

2. 生成非コラーゲン性タンパク質への影響

Lysis buffer により抽出された総タンパク質への PHT の影響は、RES A3 の 12 日培養で有意な増加を示した (Fig. 3)。細胞外マトリックス中の非コラーゲン性タンパク質としては、糖タンパクとしてのフィブロネクチン (FN)¹²⁾ などがあるが、今回の結果は、PHT 添加により GAG 合成の増加を認めた Vernillo ら⁷⁾ や宮城¹⁶⁾ の報告と一致していた。また、RES C2 においては Gin-1

と同様、PHT 添加による影響は認められなかった。一方、Lysis buffer により抽出された総タンパク質のうち gelatin Sepharose beads に対し、binding した BP については、Gin-1 と RES C2 は PHT 添加による影響から認められなかったが、培養 12 日目において他の培養期間と比べコントロールおよび PHT 群共に、有意に高い値 (10~16 倍) を示した。RES A3 においては、他の 2 細胞のような、各培養期間による有意な差を認めないものの、培養 12 日目において PHT 添加により、有意な増加 ($p < 0.01$) を示した (Fig. 4)。

このように、非コラーゲン性タンパク質への PHT 添加による影響としては、Responder cells の RES A3、RES C2 間に大きな差異が認められた。細胞外マトリックス中の非コラーゲン性タンパク質である FN、GAG は細胞の分化、増殖および伸展など細胞機能維持に深くかかわっていると考えられている^{12,17)}。従って、タンパク質合成能の結果が示すように、Responder cells 中には少なくとも 2 種類の phenotype の存在が認められた。さらに、今後、PHT の影響について Responder cells の応答能を検索するには、細胞を形態的な差から分離することの有効性、および Responder cells の非コラーゲン性タンパク質合成は PHT 添加により誘導されることを示唆した。

結 語

抗癌薬である PHT を長期服用し、歯肉増殖を有する患者の歯肉線維芽細胞 (Responder cells) を用いて PHT の影響を、位相差顕微鏡による形態学的観察および、Amino acid mixture-¹⁴C をトレーサーとして細胞外マトリックス中の非コラーゲン性タンパク質合成について検索し、以下の結論を得た。

1. 形態学的観察により、同一患者の Responder cells 中に少なくとも 2 種類の phenotype が存在することを示した。
2. 各細胞共に PHT 添加により、DNA 量の増加が postconfluent で認められた。
3. 非コラーゲン性タンパク質に PHT 添加により、Amino acid mixture-¹⁴C 由来のタンパク質の増加が認められた。
4. 非コラーゲン性タンパク質の BP に対しても PHT 添加により、有意な増加を示す RES A3 と、影響の認められなかった RES C2 が存在した。このことより、生化学的結果からも Responder cells には、少なく

とも2種類の phenotype の存在が示唆された。

文 献

- 1) Kimboll, O.P. : The effect of epilepsy with sodium diphenyl hydantoinate. *J. Am. Med. Assoc.*, 112 : 1244-1245, 1939.
- 2) Klar, L.A. : Gingival hyperplasia during dilantin-therapy ; A survey of 312 patients. *J. Public Health Dent.*, 33 : 180-185, 1973.
- 3) Hassell, T.M., Page, R.C. and Lindhe, J. : Histologic evidence for impaired growth control in diphenylhydantoin gingival overgrowth in man. *Arch. Oral Biol.*, 23 : 381-384, 1978.
- 4) Johnson, B.D., EL-Guindy, M., Ammons, W.A., Narayanan, A.S. and Page, R.C. : A defect in fibroblasts from an uni-identified syndrome with gingival hyperplasia as the predominant feature. *J. Periodont. Res.*, 21 : 403-413, 1986.
- 5) 出口眞二 : ジフェニールヒダントイン性歯肉増殖症の生化学的研究—ラット歯肉コハク酸-1, 4-¹⁴C代謝における DPH の影響—. *日歯周誌*, 28 : 1-16, 1986.
- 6) Houck, J.C., Cheng, R.F. and Waters, M.D. : The effect of dilantin upon fibroblast proliferation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139 : 969-971, 1972.
- 7) Hassell, T.M., Page, R.C., Narayanan, A.S. and Cooper, C.G. : Diphenylhydantoin (dilantin) gingival hyperplasia : Drug-induced abnormality of connective tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 73 : 2909-2912, 1976.
- 8) Vernillo, A.T. and Schwartz, N.B. : The effect of phenytoin (5, 5-diphenylhydantoin) on human gingival fibroblasts in culture. *J. Periodont. Res.*, 22 : 307-312, 1978.
- 9) Deguchi, S., Hori, T., Kawase, T. and Saito, S. : The effect of phenytoin on non-collagenous proteins synthesis of human periodontium cells in vitro. The 3rd Meeting of International Academy Periodontology (In press).
- 10) Kawase, T., Nakajima, M., Matsumoto, T., Kishi, H., Nagase, T., Tamada, Y., Akagi, K., Ukiya, M. and Saito, S. : Characterization of alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells in vitro. *Bull. Kanagawa Dent. Coll.*, 15 : 65-69, 1987.
- 11) Puzas, J.E. and Goodman, D.B. : A rapid assay for cellular deoxyribonucleic acid. *Anal. Biochem.*, 86 : 50-55, 1978.
- 12) Kurkinen, K., Taylor, A., Gurreis, J.I. and Hogan, B.L.M. : Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J. Biol. Chem.* 259 : 5915-5922, 1984.
- 13) Narayanan, A.S., Meyers, D.F. and Page, R.C. : Regulation of collagen production in fibroblasts cultured from normal and phenytoin-induced hyperplastic human gingiva. *J. Periodont. Res.*, 23 : 118-121, 1988.
- 14) Benveniste, K. and Bitar, M. : Effect of phenytoin on cultured human gingival fibroblasts. In : *Phenytoin-induced teratology and gingival pathology*, ed. Hassell, T.M., Johnston, M.C. and Dudley, K.H., Raven Press, New York 1980, 199-213.
- 15) Safer, W.G. : Response of radiated human gingival fibroblast-like cells to dilantin sodium in tissue culture. *J. Dent. Res.*, 44 : 671-677, 1965.
- 16) 宮城 功 : ジフェニールヒダントイン性歯肉増殖症の生化学的研究—ラット歯肉コハク酸-1, 4-¹⁴C由来 glycosaminoglycan 合成における DPH の影響—. *神奈川歯学*, 21 : 473-483, 1987.
- 17) Enat, R., Jefferson, D.M., Ruiz-Opazo, N., Gatmaitan, Z., Leinwand, L.A. and Reid, L.M. : Hepatocyte proliferation in vitro : Its dependence on the use of serum-free hormonally defined medium and substrata of extracellular matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 1411-1415, 1984.