硬組織ラベリング法によるセメント質再生の観察

小 倉 信 哉 米 良 豊 常 峯 岸 大 造
林 成 忠 浦 口 良 治 石 川 烈

東京医科歯科大学歯学部第二歯科保存学教室

(主任：石川 烈教授)

(平成元年3月20日受付)

Process of Regeneration of Cementum Observed by Various Fluorescent-Labeling Methods

Nobuya OGURA, Toyotsune MERA, Daizo MINEGISHI,
Cherng-Jong LIN, Ryoji URAGUCHI and Isao ISHIKAWA

Department of Periodontology, School of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University
(Chief: Prof. Isao ISHIKAWA)

The purpose of this study was to evaluate the effect of various fluorescent-labeling methods on longitudinal information associated with the process of regeneration of cementum after periodontal therapy.

Mandibular bilateral premolars and molars in three monkeys were used. Prior to the labeling, experimental periodontitis was surgically produced at the mesial site of each tooth.

In four weeks, scaling and root planing were carried out, and time marking was performed by injection of 3 kinds of fluorescent-labeling materials, tetracycline hydrochloride (30 mg/kg), calcein (8 mg/kg), and alizarin complexon (20 mg/kg), intramuscularly.

The animals were sacrificed 4 days after the last injection and serial sections without decalcification were prepared. They were examined under a fluo-

rescence microscope and further observed by contact microradiography (CMR) and staining with toluidine blue.

According to the observations made by fluorescence microscopy, marked regeneration of the cementum was revealed by each of the 3 labeling agents. Also, the presence of regenerated cementum was supported by the observations by CMR and after toluidine blue staining. In addition, the regeneration of new cementum was shown to start in about 2 weeks after scaling and root planing.

Judging from the results of this experiment, the various fluorescent-labeling methods seem to be effective for observing the process of regeneration of cementum.

Key words: Cementum, Fluorescent-labeling methods

要旨: 本研究の目的は、歯周治療後のセメント質の再生の過程を経時的に観察するために硬組織ラベリング法を応用し、その効果を検討することであった。

3頭の日本猿の左右両側の下顎大白歯および小白歯の近心隣接面部に実験的歯周炎を惹起し、4週後にスケーリングおよびルートプレーニングを行なった後、テトラサイクリン、カルセイン、アリザリンコンプレクソンの各ラベリング剤を投与した。非脱灰研磨標本作製後、蛍光顕微鏡、コンタクトマイクロラジオグラフィー (CMR) およびトル

本論文の要旨は、第31回秋季日本歯周病学会総会 (1988年10月29日) において発表した。

イジンプルー染色によって組織学的な観察を行なった。

硬組織ラベリング剤を応用することにより、蛍光顕微鏡下でセメント質の再生過程を経時的に観察することができた。また、再生されたセメント質の存在は CMR とトルイジンプルーによる観察によっても裏付けられた。

さらに、歯根面の処置後2週という短期間の観察でセメント質の再生が観察された。

索引用語：セメント質，硬組織ラベリング法

緒 言

歯周病の治療後の治癒状態を、歯根面と結合組織間の治癒形態に着目して評価する場合、セメント質の再生状態を組織学的に観察することは重要である¹⁻³⁾。

従来、この目的のためには主として脱灰組織切片を用いた観察が行われてきた。しかしながらこの方法では、1枚の組織標本から経時的な情報を得ることは出来ない。即ち、およそどのくらいの時間的経過で歯周組織の治癒、再生が起こったのか、ある期間内の再生量はどの程度であるか、あるいはどの様な方向性をもって歯周組織の治癒が起きたのかを読み取ることは困難である。

そこで著者らは、セメント質の治癒を経時的に観察する手段として、硬組織ラベリング法⁴⁻¹⁰⁾を用いた。この手法は、比較的観察の容易な骨組織や象牙質などの硬組織の変化を捉える手段として通常用いられている¹¹⁻¹³⁾。セメント質再生の観察方法としては、Blomlof ら¹⁴⁾のテトラサイクリン単独のラベリングによるものに留まっている。

今回の研究では、3種類の硬組織ラベリング剤を用いて⁸⁻¹⁰⁾ 1枚の組織標本における経時情報を含む、セメント質再生のより詳細な観察を試み、その有用性について検討を加えた。

材料および方法

3頭の日本猿(雌, 6.0 kg~8.3 kg)の左右両側の下顎大臼歯および小臼歯近心隣接面部、合計24部位の歯槽骨に歯肉弁剥離後、ヘミセプター型の骨欠損をバーおよびチゼルを用いて作製した(図1)。次に、骨の再生を阻止し、炎症を起こさせるために骨欠損内に銅板を挿入し、ワイヤーにて結紮後、縫合を行なった。

骨欠損作製後4週間、ブラッシングを行わずにプラークを蓄積させた。その後銅板を除去し、歯根面のセメント質を完全に除去するためのスクレーピングおよびルートプレーニングを行ない、その時点で週3回のブラッシン

図1 骨欠損の模式図

図2 実験のタイムスケジュール

グとフロッシングによるプラークコントロールを開始した。

銅板除去後に再生したセメント質を経時的に観察するために、3種類の硬組織ラベリング剤による時刻描記⁸⁻¹⁰⁾を行った。各ラベリング剤は以下に述べるものを用い、いずれも筋肉内注射によって投与した。

1. テトラサイクリン(以下、TCと略す, Oxytetracycline, 台糖ファイザー社, 東京), 30 mg/kg。

2. カルセイン(以下、Calと略す, 3, 3'-Bis [N, N-di (carboxymethyl) aminomethyl-fluorescein, 同仁化学研究所, 熊本), 8 mg/kg。生理的食塩水で2%溶液にして投与した。

3. アリザリンコンプレクソン(以下、ACと略す, 1, 2-di-hydroxyanthraquinon-3-yl-methylamine-N, N-diacetic acid, 同仁化学研究所, 熊本), 20 mg/kg。生理的食塩水で2%溶液として投与した。

なお、投与時期、投与期間については図2に示す通りである。このタイムスケジュールにより、歯根面のスケ

図 3 各観察部位におけるプロービングデプスの変化

図 4 再生したセメント質様組織の長さの度数分布

ーリングおよびルートプレーニング後 2, 3, 4, 5, 6, 9 週における治癒状態の観察が可能となった。また、各薬剤の投与は全て 1 週に 2 回の割合で行なった。異なる種類のラベリング剤に移行する場合には、1 週間何も投与しない期間をおき、その後新たな種類のラベリング剤の投与を開始した。

すべての動物は最終注射後 4 日目に屠殺し、標本は中性ホルマリンで固定し、アルコール系列にて脱水しリゾラックで樹脂包埋を行なった⁵⁾。その後クリスタルカッター MC-202 D (マルター) にて 550 μm 間隔に薄切り、HT 式研磨装置にて 50 μm の厚さで非脱灰研磨標本作製した。

作製した組織切片について、次に述べる 3 種類の方法によって観察を試み、セメント質の再生状態を検討した。

1. 蛍光顕微鏡による観察

各組織標本をカバーガラス下に精製水で封入し、落射蛍光顕微鏡 (ライツ社、西ドイツ) を用いて、BV 励起にて観察および写真撮影を行なった。

2. コンタクトマイクロラジオグラフィ (以下 CMR と略す) による観察^{5, 15, 16)}

撮影は、軟 X 線撮影装置、FX-500 型 (ソフレイ株式会社、東京) を用いて、加速電圧 22 kVp、エックス線量

表 1 各観察部位におけるセメント質様組織再生の有無

歯 種		— 5	— 6	— 7	— 8
サル I	左	+	—	+	+
	右	+	—	—	—
サル II	左	+	+	+	—
	右	—	+	+	+
サル III	左	+	+	+	+
	右	+	+	+	+

3 mA、露出時間 7 分という条件下で行なった。

3. トルイジンブルー染色による観察

蛍光顕微鏡および CMR による観察が終了した時点で、染色を行ない、光学顕微鏡 (ライツ社、西ドイツ) にて観察および写真撮影を行なった。

また、染色後の標本について光学顕微鏡下で、歯根面の処置後に再生したと思われるセメント質様組織、および歯肉辺縁から上皮の最根尖側までの長軸方向の長さを測定した。

なお、スケーリングおよびルートプレーニング後の臨床的な変化を見る指標としてプロービングデプスを用いた。スケーリングおよびルートプレーニング後 1 週目をベースラインとして測定をし、各々の観察部位においてラベリング剤の投与が終了した時点 (3, 6, 9 週) で再度測定を行ってそれぞれの値を比較した。

結 果

スケーリングおよびルートプレーニング後の臨床的な変化を見る指標として用いたプロービングデプスの測定結果を図 3 に示した。いずれの部位においても、スケーリングおよびルートプレーニング後にはプロービングデプスが減少していることがわかった。

次に組織学的な観察として、各部位におけるセメント質様組織の再生の有無の状態を表 1 に示した。全 24 カ所の観察部位中、18 部位においてセメント質様組織の再生を確認することができた。しかしながら、この再生量は部位によって様々であり、スケーリングおよびルートプレーニングを行なった歯根面の最根尖側部付近にのみ局限したものも数多くみられた。再生したセメント質様組織の長軸方向の長さの測定結果は、100~2,360 μm (平均 636 μm) であり、その分布の状態は図 4 に示すような

表 2 各観察部位における上皮の長さの測定結果
(mm)

歯 種		— 5	— 6	— 7	— 8
サル I	左	ND	4.7	3.8	2.5
	右	2.3	ND	3.4	ND
サル II	左	ND	3.5	ND	ND
	右	ND	2.5	3.1	3.8
サル III	左	2.7	ND	ND	ND
	右	ND	2.7	ND	ND

ND：測定不能

図 5 再生したセメント質様組織の蛍光顕微鏡による観察 (×50)

ものであった。

歯肉辺縁から上皮の最根尖側までの長軸方向の長さの測定結果は表 2 に示した通りであるが、今回の観察ではいわゆる長い接合上皮と内縁上皮の区別はできなかった。また、標本作製の段階での破折や、作製後の乾燥によるひび割れなどのため正確な測定のできない部位があった。

図 5 は蛍光顕微鏡による組織所見である。この部位においては、歯根面の処置後、TC、Cal、AC の 3 種の硬組織ラベリング剤をそれぞれ 0～3 週、4～5 週、6～8 週の間に順に投与した。組織像中の左側が象牙質部分、右側が軟組織部分である。歯根面のうち、スケーリングおよびルートプレーニングを行なった部分に限局して、ラベ

図 6 再生したセメント質様組織の CMR 像 (×50)

図 7 再生したセメント質様組織の光学顕微鏡による観察像 (×50)

リング剤によって 3 色に標識された構造物が認められる。この組織は象牙質側から黄色、黄緑色、オレンジ色というように明瞭に識別可能な層状構造をなしている。黄色の層は、歯根面の処置後 4 週のに再生された組織がテトラサイクリンによって標識されたものである。黄緑色の層は、4 週から 6 週のに再生された組織がカルセインによって標識されたものである。そしてオレンジ色の層は、6 週から 9 週のに再生された組織がアリザ

図 8 セメント質様組織の再生の起こらなかった部位の蛍光顕微鏡による観察像 (×50)

図 9 セメント質様組織の再生の起こらなかった部位の CMR 像 (×50)

リンコンプレクソンによって標識されたものである。

図 6 は、図 5 と同一の標本の CMR 像であるが、蛍光顕微鏡下で観察されたラベリング剤による標識部位に一致して、他の均一な石灰化度を示す部分とは異なる石灰化度を持つ構造物が認められ、これはセメント質様組織が再生されたものであると考えられる。

図 7 は、図 5、6 と同一標本のトルイジンブルー染色による組織像である。やはり図 5 に見られるラベリング剤による標識部位に一致して、再生されたセメント質様組織が染色されているのがわかる。また、この組織像においては、上皮がセメント質様組織の最歯冠側部に接して侵入している所見が認められる。さらに、結合組織線維がセメント質様組織に対してほぼ直角に埋入している所見も観察することができる。

図 8 は、歯根面の処置後、TC、Cal の 2 種の硬組織ラベリング剤をそれぞれ、0～2 週、2～6 週の間に投与した部位の蛍光顕微鏡による組織所見である。歯根面には、ラベリング剤によって標識された構造物は認められない。図 9 は同じ部位の CMR 像であるが、ここにおいてもセメント質の再生を示すような新たな石灰化像はみられない。従って、この部位においてはセメント質様組織の再生は起こらなかったと考えられる。さらに、同じ部位のトルイジンブルー染色による組織像を図 10 に示す。この観察像においても、セメント質様組織の再生は認められず、上皮がスクーリングおよびルートプレーニング

図 10 セメント質様組織の再生の起こらなかった部位の光学顕微鏡による観察像 (×50)

を行なった歯根面の最根尖側部付近まで侵入しているのがわかる。このようにセメント質様組織の再生が認められなかった部位は、全 24 部位中 6 部位あった。

また、セメント質様組織の再生時期について検討を加えた結果、歯根面の処置後 2 週目という比較的短期間の観察を行なった 8 部位のうち、4 部位の歯根面において

セメント質様組織の再生が認められた。

考 察

1. 実験方法について

本研究の主たる目的は、歯周治療後のセメント質再生の過程を経時的に観察するための方法論の確立を試みることにある。硬組織ラベリング法は、蛍光物質が新たに石灰化の起こった部分に限局して沈着するという性質を利用したものであるが⁵⁻⁷⁾、これを実験動物に応用する場合はいくつかの問題点がある。

ラベリング像には顕微鏡下で観察や測定を行ない得るだけの明瞭さ、あるいは連続性が要求されるため、ある程度多量の投与が必要になってくるが、反面、実験動物に対する全身的な影響や硬組織の形成障害という問題も考慮にいれなければならない。

さらに、各ラベリング剤の投与の間隔をどの程度にすべきかという問題がある。今回は、セメント質の再生を経時的に観察するために3種のラベリング剤を用いているが、その際各ラベリング剤による像が互いに境界明瞭でないと、ある期間内での再生量を知りたい場合などに判断を行なう上で不都合が生じる。これを避けるためには、ある程度の間隔をおかなくてはならないが、一方、間隔をあけすぎると再生の開始時期を調べたいような場合には、大まかな範囲でしか判らないという問題が生じる。

以上のような点を考慮にいれ、3種のラベリング剤の選択として、TC、Cal、ACを⁴⁾、投与方法および投与の間隔は、形成速度の遅いセメント質の観察に適しているという意味で筋肉内注射^{5,10)}を1週の間隔をおいて行ない⁵⁾、投与量については前述の高橋ら⁸⁾および徳田ら¹⁰⁾の報告を参考にして決定した。

2. 実験結果について

今回行なわれた3種類の観察方法によって認められた組織が、再生したセメント質であろうという判断をおこなった根拠として次のような事があげられる。

第一に、蛍光顕微鏡による観察結果から、スケーリングおよびルートプレーニングによってセメント質の完全に除去された歯根面上に、新たな石灰化が起こったことを示す比較的明瞭なラベリング像が、観察部位の多くで認められたということがあげられる。次に、CMRによる観察像において、蛍光顕微鏡で観察されたラベリング剤による歯根面の標識部位に一致して、他の部分とは石灰化度の異なる構造物が認められたこと。また、トルイ

ジンプルー染色による組織像においても、蛍光顕微鏡でのラベリング剤による標識部位に一致して、他の構造物と染色性の異なる組織が認められ、上皮がこの組織の最歯冠側部付近まで侵入していた。さらに、この組織中には結合組織線維が、ほぼ直角に近い状態で埋入している所見が認められたことなどから、本実験において観察された組織は、スケーリングおよびルートプレーニングという歯根面の処置後に再生したセメント質であると考えられる。

また、多くの観察部位において、複数のラベリング剤によって標識されたセメント質様組織は層状構造をなし、その各層は互いに明瞭な識別が可能であった。このことより、今回の実験系で用いたラベリング剤投与に関する諸条件は概ね望ましいものであったと考えられる。

本研究においてはセメント質再生の経時的な観察手段の確立に主眼をおいたため、実験群に対する対照群となるべき観察部位をもうけていない。従って、セメント質の再生に関しても、再生の有無および再生の開始時期についての考察を行なうにとどめた。

セメント質の再生の有無を判定する際問題となった点として、再生したセメント質の真のラベリング像とアーチファクトの鑑別の必要性があげられる。今回セメント質の再生の有無の判定を行なう上で、蛍光顕微鏡の観察像単独では判断の困難な場合があった。即ち、ラベリング剤によって標識されているものの、CMR像やトルイジンプルー染色による組織所見ではその存在が確認できないものが何例もあり、このような場合については再生したセメント質ではないという判断をした。これは、ラベリング剤が組織中に残留したのか、あるいはプラークなどの物質がラベリング剤によって標識されたのではないかと考えられる。今後、再生したセメント質の厚さや長さを測定する場合などにアーチファクトと真のセメント質との鑑別は重要であることから考えて、CMRおよびトルイジンプルーなどの染色による観察を併用することは有用であろう。

次にセメント質様組織の再生時期についてであるが、歯肉剝離掻爬術後に、セメント質が再生し始めるまでに要する期間は、Stahl¹⁷⁾はイヌで3~4週、Tonna¹⁸⁾は50日、吉田¹⁹⁾および庄司²⁰⁾はイヌを用いて14日としているが、今回の日本猿を用いた経時的な観察の結果、部位によっては歯根面のスケーリングおよびルートプレーニング後2週の期間内に、セメント質様組織の再生の開始が認められた。この結果は、イヌを用いた吉田¹⁹⁾および庄司²⁰⁾の報告と一致するものであった。

結 論

今回著者らは、3種類のラベリング剤を用いて蛍光顕微鏡で観察することにより、セメント質再生の時期、ある期間内における再生量、および再生の方向性などをより的確に検索できる可能性を示すことができた。

今回の結果より、硬組織ラベリング法はセメント質再生の経時的な観察手段として有効であると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、組織学的検索を行なう際に御指導、御助言を戴きました本学薬理学教室、大谷啓一助教授、俣木志朗講師、並びに本研究を遂行するにあたり、御助力戴いた第二歯科保存学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Lindhe, J. : Textbook of Clinical Periodontology, 1st edition, Munksgaard, Copenhagen, 1984, 410-432.
- 2) Bogle, G., Garrett, S., Crigger, M. and Egelberg, J. : New connective tissue attachment in beagles with advanced natural periodontitis. J. Periodont. Res., 18 : 220-228, 1983.
- 3) Egelberg, J. : Regeneration and repair of periodontal tissues. J. Periodont. Res., 22 : 233-242, 1987.
- 4) 高橋栄明 : 非脱灰骨組織像の読み方. 骨代謝, 6 : 53-63, 1973.
- 5) 須賀昭一, 小椋秀亮 : テトラサイクリンによるラベリング法, 須賀昭一, 田熊庄三郎, 佐々木哲, 歯の研究法, 医歯薬出版, 東京, 1973, 227-242, 44-69, 133-155.
- 6) 大野康亮 : テトラサイクリンによる形成期硬組織のラベリング像に及ぼす諸条件について. 歯基礎誌, 20 : 252-269, 1978.
- 7) 須賀昭一 : 硬組織と Tetracycline. 歯学, 53 : 137-143, 1965.
- 8) 高橋 学, 川口哲郎, 中島早苗, 浅野安生, 龍口基雄 : 石灰化組織の多色ラベリングのためのラベリング剤と投与方法について. 歯学, 67 : 53-66, 1979.
- 9) 狩山昌万 : 三色蛍光標示法によるワニの歯と顎骨の発育に関する研究. 阪大歯誌, 14 : 17-31, 1969.
- 10) 徳田信春, 吉沢 寛, 花田晃治 : 大型実験動物に対する硬組織多色ラベリング法の改良に関する研究. 新潟歯学会誌, 13 : 1-7, 1983.
- 11) Boyne, P.J. : The use of tetracycline in studies of bone healing, Staple, P.H., Advances in Oral Biology, Academic Press, New York, 1968, 121-144.
- 12) Rahn, B.A. and Perren, S.M. : Calcein blue as a fluorescent label in bone. Experientia, 26 : 519-520, 1970.
- 13) Rahn, B.A. and Perren, S.M. : Alizarin Komplexon-Fluorochrom zur Markierung von Knochen und Dentinanbau. Experientia, 28 : 180, 1972.
- 14) Blomlof, L., Lindsog, S., Appelgren, R., Jonsson, B., Weintraub, A., Hammarstrom, L. : New attachment in monkeys with experimental periodontitis with and without removal of the cementum. J. Clin. Periodont., 14 : 136-143, 1987.
- 15) 須賀昭一 : 硬組織の microradiography. 歯界展望, 27 : 495-515, 1966.
- 16) 田熊庄三郎 : 白亜質の超微構造と加齢変化. 日本歯科評論, 489 : 51-68, 1983.
- 17) Stahl, S.S., Slavkin, H.C., Yamada, L., Levine, S. : Speculation about gingival repair. J. Periodont., 43 : 395-402, 1972.
- 18) Tonna, E.A. : Factors (Aging) affecting bone and cementum. J. Periodontol., 47 : 267-280, 1976.
- 19) 吉田導子 : 歯根窩洞における白亜質, 歯根膜, および歯槽骨の再生に関する実験的研究. 歯科学報, 76 : 1197-1222, 1976.
- 20) 庄司 茂 : 歯周組織再生に関する実験的研究とくに, セメント質及び歯槽骨について. 日歯周誌, 22 : 592-608, 1980.