人工骨材料-collagen 複合体移植が歯周組織再生に およぼす影響についての病理組織学的研究

菅 谷 章

神奈川県大学保存学教室第二講座

(指導:堀 俊雄教授)

(平成元年4月27日受付)

The Effect of Periodontal Regeneration Using Collagen Coated Synthetic Bone Implant Materials

— Histopathological Study —

Akira SUGAYA

Department of Periodontology, Kanagawa Dental College

(Director: Prof. Toshio HORI)

Granulated artificial bone implant materials such as hydroxyapatite (HAP) and tricalcium phosphate (TCP) have been frequently used in attempts to restore periodontal tissue lost as a result periodontitis. However, these materials are considered insufficient for the maintenance and stability of granules at sites losing bone, for active bone formation, or for periodontal ligament regeneration. We have now developed a complex consisting of HAP or TCP coated with atelocollagen (which has recently received attention as a biomaterial) and have conducted experiments to determine the effects of this material on the reconstruction of periodontal tissue. Implantations were performed using a HAP-atelocollagen complex, TCP-atelocollagen complex, HAP and TCP at

three-wall bone defect sites in experimentally-induced periodontitis in dogs. A control group without the implants was included in the study. Histopathological observations were conducted 2, 4 and 12 weeks after surgery. Compared with the control group, the groups implanted with the complex displayed enhanced maintenance and stability of granules, suppression of epithelial downgrowth, and acceleration of new bone and cementum formation. These results indicate that the implant method using an atelocollagen-coated artificial bone implant material would be useful for periodontal surgical treatment, eliminating some of the disadvantages of conventional implant methods.

Key words: Atelocollagen, Hydroxyapatite, Tricalcium phosphate, Complex implant, Histopathological observations

要旨: 歯周疾患により喪失した歯周組織を回復する目的で Hydroxyapatite (HAP) や Tricalcium phosphate (TCP) 等の顆粒状の人工骨移植材が頻繁に使用されている。しかしながら、これらの材料は骨欠損内での顆粒の維持安定性や、積極的な骨形成能、歯根膜再生能に欠けると考えられる。そこで近年 Biomaterial として注目されている atelocollagen を HAP, TCP にコーティングした複合体を作製し、本材料の歯周組織再生に及ぼす影響を検索する目的で実験を行なった。

本論文の要旨は、第31回春季日本歯周病学会総会(1988年4月14日)、第31回秋季日本歯周病学会総会(1988年10月28日)、第32回春季日本歯周病学会総会(1989年5月13日)において発表した。

方法は実験的歯周炎を惹起させたイヌの3壁性骨欠損部に HAP-atelocollagen 複合体, TCP-atelocollagen 複合体, HAP, および TCP の移植を行ない, さらに何も移植を行わない Control を加え, 術後2週, 4週, 12週の治癒過程について病理組織学的検索を行なった。

その結果, HAP および TCP と atelocollagen 複合体移植を行なうことにより, 顆粒の維持安定性が向上し, 上皮の根尖方向への深部増殖が抑制されると共に, 新生骨および新生セメント質形成量が増加することが解った。

以上の結果より, 人工骨移植材 (HAP, TCP) に atelocollagen をコーティングした複合体移植法は, 従来の移植材の欠点を補う有用な歯周外科処置法となりうることが示唆された。

索引用語: アテロコラーゲン, ハイドロキシアパタイト, 第3リン酸カルシウム, 複合体移植, 病理組織学的検索

緒 言

近年歯周疾患により喪失した歯槽骨の再生修復を図る目的で歯周外科療法の1つである骨移植法が多数試みられている¹⁻⁶¹⁾。骨移植法は自家骨移植, 同種骨移植 (他家骨移植), 異種骨移植, 人工骨移植等に分類されるが, 移植後の免疫応答, 2次的な外科侵襲, 移植材の入手の容易さ, 臨床操作性などの点を考慮して, 現在臨床においては Hydroxyapatite 顆粒や Tricalcium phosphate 顆粒などのリン酸カルシウム系の人工骨材料が頻繁に使用されている¹⁻⁴⁶⁾。Hydroxyapatite 顆粒は骨伝導現象により再生された骨と直接結合し, 骨組織中の核として残存する生体活性型材料であり^{1-5, 8-14, 30-32)}, Tricalcium phosphate 顆粒は同様に骨伝導現象により骨組織再生の核となる一方で材料自体は吸収され, 骨組織に置換する生体崩壊性材料であり^{18-21, 23-26, 30-32)}, いずれの材料も歯周治療における有用性が報告されている。しかしながら, これらの材料は良好な生体親和性を示すものの, 骨形成能や, 歯周組織再生において重要と考えられる新付着形成能に関しては否定的な報告が多い^{1-3, 16, 17)}。さらに臨床での使用に際し, 材料の形態付与性および維持安定性が欠如しているために, 複雑で広範囲におよぶ骨欠損部においては顆粒の填塞操作が困難となることに加え, 縫合部や根面と歯肉の間からの顆粒の流出や, それに伴う創面の哆開による治癒の遅延などの問題が指摘されている^{14, 21, 42)}。これらの問題に対してはいくつかのアプローチが現在迄なされている。例えば移植材料の構造に改良を加え, 移植時の維持安定性や骨伝導効果を高めようとする試みや⁴⁷⁻⁴⁹⁾, 手術時の切開法や縫合法を改良したり⁵⁰⁾, 組織接着剤を併用することにより顆粒の流出を防止し, 形態付与性を高めようとする試みである⁵¹⁻⁵⁵⁾。

最近 collagen の有する生物学的性質が collagen を biomaterial に応用する際に重要であることが認識されている。すなわち collagen の Type, 構造, 生体内溶解

性などをコントロールすることにより, 組織修復, 人工臓器, 細胞培養への応用が期待され人工皮膚, 粘膜, 骨形成因子の担体, 人工歯根への応用等が検討されている⁶²⁻⁸⁰⁾。歯周領域においては, Blumenthal ら⁶⁷⁾や Yaffe ら⁶⁸⁾が外科的治療に応用し骨誘導能の増強や, 上皮移動の防止, 歯根膜再生の足場としての作用を報告している。著者らもイヌ歯槽骨欠損部への Hydroxyapatite 顆粒と collagen の混合移植を試みた結果, 新生セメント質形成が有意に増加し, 上皮の深部増殖も抑制される傾向が認められたことを報告してきた⁶⁹⁾。また臨床においては Blumenthal⁷²⁾ が, 人工骨移植に collagen gel を併用した結果, 歯肉退縮やアタッチメントレベル等に改善がみられたことを報告し, 渡辺ら⁷⁴⁾も Hydroxyapatite 顆粒と collagen gel の混合移植により顆粒の流出が有意に防止されたことを報告している。

本研究では, ① 骨移植材間の機械的嵌合力を向上させることにより, 骨移植材の骨欠損内での維持安定が高まる⁸⁰⁾, ② *in vitro* の実験系において, 人工骨移植材表面に collagen をコーティングすることにより collagen をコーティングしない場合と比較して骨芽細胞様細胞の材料表面への付着が著しく増加する⁷¹⁾, ③ *in vivo* の実験から, 骨移植後の治癒初期段階における移植材周囲への骨芽細胞の集積に移植材表面の collagen 線維束の存在が重要であることが示唆されている⁶⁰⁾, などの点を考慮して, collagen と人工骨移植材の混合に加えて人工骨移植材料表面に collagen をコーティングした複合体移植材料を使用した。そして歯周治療における有用性を明らかにする目的で, 複合体移植材料をイヌ歯槽骨欠損部へ移植後の歯周組織再生過程におよぼす影響を病理組織学的に比較検討した。

実験材料および方法

1. 実験材料

実験動物には全身所見, 口腔内所見共に異常の認めら

a HAP 顆粒像 (×100)

a TCP 顆粒像 (×100)

b HAP 顆粒の表面構造 (×2000)

b TCP 顆粒の表面構造 (×2000)

c HAP-collagen 複合体の表面構造 (×2000)

図 1

c TCP-collagen 複合体の表面構造 (×2000)

図 2

れない雑種成犬 (体重, 10~15 kg, 推定年齢 2~8 歳) 18 頭を使用した。骨移植材料には非吸収性の生体活性型材料として多孔質 Hydroxyapatite 顆粒 (アパセラムタイプ G®, 粒径 300~600 μ , 旭光学社製, 以下 HAP) およ

び吸収性の生体内崩壊性材料として多孔質 β -Tricalcium phosphate 顆粒 (Synthograft®, 粒径 200~300 μ , Johnson and Johnson 社製, 以下 TCP) を使用した。HAP および TCP 顆粒へのコラーゲンのコーティング

図3 移植部位及び骨欠損形態

には 0.5% atelocollagen 分子状分散溶液中に HAP, TCP 顆粒を減圧下で含浸させ、アンモニアガスにて中和した後、真空乾燥することにより、顆粒表面に atelocollagen をコーティングした。Atelocollagen の物理的架橋処理は紫外線を照射 (15 W. 照射時間 30 min. 照射距離間隔 20 cm.) することによって行なった (図 1 a, b, c, 2 a, b, c)。またコーティング処理された顆粒は atelocollagen solution (2% Atelocollagen implant® 高研社製) と混合後、骨欠損部へ移植した。

2. 実験方法

移植部位を確保する目的で、下顎両側第一後臼歯を抜き、2ヵ月後に第四前臼歯遠心部 ($\overline{P}_4$) および第二後臼歯近心部 ($\overline{M}_2$) に歯肉溝切開を行ない歯肉弁を剝離し、近遠心径 5 mm, 深さ 5 mm, 頬舌径 3 mm, の 3 壁性骨欠損を作製した。骨欠損の作製には、歯科用 #700 フィッシャーバーを使用し、生理的食塩水の注水下で行なった。骨欠損内を生理的食塩水で洗浄後、 $\overline{P}_4$, $\overline{M}_2$ に暫間固定用ワイヤーを結紮し、ワイヤーの一部を骨欠損内へ折り曲げ即時重合型歯科用レジン (Ostron®) を用いて骨欠損内を充填し歯肉弁を復位、縫合を行なった。その後ショ糖 30% 含有軟性飼料 (日本クレア社製) および飲料水で飼育し、実験的歯周炎を惹起させた。6 週間後ワイヤーおよびレジンを除去し、さらに 2 週間放置後、歯肉剝離掻爬術に準じ移植手術を施行した。すなわち歯肉弁を剝離、骨欠損内の不良肉芽組織および根面汚染セメント質をキュレット型スクレーラーを用いて可及的に除去し

a 移植直前の状態, 3 壁性骨欠損を示す

b 顆粒を歯槽骨頂部付近まで充填した状態

図4

た。さらに骨欠損底部の骨壁を #1/2 のラウンドバーにて穿孔し海綿骨と交通させた。また組織学的計測のための参照点として骨欠損底部に位置する根面部に #1/4 のラウンドバーを用いてノッチを付与した。その後、何も移植せずに歯肉弁を復位縫合したものを control 群とし、HAP 顆粒、または TCP 顆粒を骨頂部まで外科用鋭匙を用いて填塞移植したものを HAP 群、TCP 群とした。HAP および TCP 顆粒に atelocollagen をコーティングした複合体材料は、ダッペングラス上で atelocollagen solution と容積比 1:1 の割合で混合したものを骨欠損

図 5 実験スケジュール

部へ移植した（HAP-collagen 複合体移植群，以下 H+C 群および TCP-collagen 複合体移植群，以下 T+C 群）。また複合体材料の移植前にはあらかじめ注射用シリンジを用いて atelocollagen gel を骨欠損内歯根面に塗布した（図 3, 4 a, b）。なお歯周外科手術は，硫酸アトロピン 1 mL (0.5 mg/1 mL, 田辺製薬社製) を皮下注射後，動物用ケタラール 50 (50 mg/mL, 三共株式会社, 12.5 mg/kg) の筋注および，ペントバルビタール (50 mg/mL 大日本製薬株式会社, 25 mg/kg) の静注による全身麻酔下において施行した。また外科手術の 3 日前から術後 1 週までは感染防止のため，ペニシリン G (10 万単位/day) の筋注を行なった。各群について経時的な歯周組織再生過程を検索する目的で移植後の期間が 2 週，4 週，12 週，となるように実験スケジュールを設定した（図 5）。各群 4 部位ずつ手術を行ない合計 60 部位を実験部位とした。ワイヤーおよびレジン除去後 1 週から屠殺までの期間（歯周外科手術後の 1 週間を除く）は 1 週間に 2 回のブラッシングと，0.2% Chlorhexidine gluconate の局所塗布を行なった。屠殺はペントバルビタールの過剰投与により行なった。また実験的歯周炎惹起後の歯周組織の状態を確認するため，抜歯後 2 ヶ月目と移植直前の歯周組織の状態についても病理組織学的に観察した。病理組織学的検索方法は屠殺後直ちに下顎骨を切断し，P₄ の近心部から M₂ 遠心部までを離断した後，10% 中性緩衝ホルマリンで 1 週間固定を行なった。その後さらに不要な組織および頬舌側の皮質骨を可及的に除去し，移植後の治癒過程におけるオステオイドの形成状態を検索する目的で脱灰 H-E 染色法によるオステオイドの証明法である塩化シアヌル処理を行なった⁸¹⁾。すなわちホルマリン固定後の標本を水洗，上昇エタノールで脱水後，塩化シアヌル液に室温で 2 日間浸漬し，下降エタノールで加水した。その後 10% 硝酸ホルマリン溶液にて約 4 週間脱灰し，通法に従ってパラフィン包埋を行なった。

図 6 組織学的計測項目

CEJ；セメントエナメル境
PD；ポケット底部
JE；接合上皮の最根尖側部
GF；顆粒の最歯冠側部
NC；新生セメント質形成最歯冠側部
NB；新生骨形成最歯冠側部
N；ノッチ底部

切片は近遠心的な厚さ約 5 μ の連続切片を作製し，Hematoxylin Eosin 染色および Azan Mallory 染色を行ない組織学的検索を行なった。組織学的計測は骨欠損の頬舌の中央部付近のノッチおよび根尖部の確認できる切片を近遠心的に 30～50 μ 間隔で各標本より 10～20 枚選択した。計測は接眼マイクロメーターを使用し，40 倍の鏡顕下にて行なった。ノッチ根尖部からセメント-エナメル境までの距離に対するノッチよりポケット底部までの距離，接合上皮の最根尖側端までの距離，新生セメント質形成が認められる最歯冠側端部までの距離，新生骨形成の認められる最歯冠側端部までの距離，残存する顆粒の最歯冠側端部までの距離の比率を各々ポケット形成抑

図 7 抜歯後 2 カ月の歯周組織
生理的な歯槽骨と歯根膜組織が認められる H-E染色 (×5)

図 8 移植直前の歯周組織
上皮の深部増殖および広範な歯槽骨欠損が認められる H-E 染色 (×5)

制率 (S.P), 上皮の深部増殖抑制率 (S.E), 新生セメント質形成率 (N.C), 新生骨形成率 (N.B) および顆粒填塞率 (G.F) として百分率で算出した (図 6)。また特に新生骨や顆粒の計測は, 根面に比較的近接した部位 (根面より 3 mm 以内) に限定して行なった。なお各群間の統計学的比較には, Mann Whitney の U 検定を用いた。

図 9 図 8 の上皮基底部の強拡大像
形質細胞を中心とした慢性炎症細胞浸潤が著明に認められる
H-E 染色 (×100)

実験結果

1. 組織学的観察所見

1) 移植手術前の歯周組織の状態

抜歯後 2 カ月では, ポケットは底部はセメント-エナメル境部に位置し, 上皮直下根面には, 垂直方向に結合する密な線維性付着が認められた。歯槽骨はセメント-エナメル境の高さ付近まで認められた。骨と根面との間には, 多数の血管を含む歯根膜線維組織が観察された (図 7)。移植直前の所見では, ポケット底部の位置はセメント-エナメル境より根尖側に位置し, さらに根尖方向において, 上皮の深部増殖所見が認められた (図 8)。歯槽骨欠損の大部分は線維性結合組織により満たされており, 上皮基底領域および骨欠損底部に形質細胞を中心とした慢性炎症細胞の浸潤が認められた (図 9)。

2) Control 群

術後 2 週経過時では, 骨欠損部は線維性結合組織により満たされており, ポケット底部や, 骨欠損中央部結合組織内に少数の炎症細胞浸潤が認められた (図 10)。骨欠損底部から歯冠側方向に向かい軽度の新生骨梁の形成が観察された。またこれらの骨梁からの連続的にオステオイドの形成が認められ, 新生骨梁やオステオイドは母床骨の骨梁と比べ幅が狭く全体的に粗な所見を呈していた

図 10 Control 群術後 2 週例
骨欠損内は線維性結合組織により満たされている H-E 染色 (×5)

図 11 図 10 欠損底部の強拡大像
新生骨梁が母床骨から連続的に形成されている H-E 染色 (×25)

(図 11)。根面部では上皮の基底部に種々の程度の慢性炎症細胞浸潤が認められた。欠損底部においてはその一部にセメントイドを含む新生セメント質の形成が軽度認められた。

術後 4 週を経過すると骨欠損内部における炎症性細胞浸潤はほとんど消失し、新生骨形成もさらに歯冠側方向

図 12 Control 群術後 12 週例
新生骨の形成は骨欠損の 1/2 程度まで認められる H-E 染色 (×5)

に伸展して認められたが、母床骨と非連続的な新生骨梁の形成は認められなかった。上皮の深部増殖は術後 2 週と比較して高度となり、ポケット底部の位置はさらに根尖方向に位置して認められ、骨欠損の中央部付近まで進行する所見がみられた。上皮の最根尖側端からノッチ間においては、ほぼ根面と平行に走行する結合組織線維が認められたが、ノッチ内や骨欠損底部付近の一部に根面と斜めあるいは垂直に配列する線維が認められるようになり、同部の根面には新生セメント質、セメントイドの形成が認められた。

術後 12 週例では、多数の新生血管の形成を伴った新生骨形成がみられ、それらはさらに歯冠側方向へ伸展し、骨欠損の深さの約 1/2 程度まで認められた。また、新生骨梁組織は既存の母床骨梁組織と類似する形態を示し (図 12)、上皮の深部増殖およびポケット底部の位置は術後 4 週とほぼ類似した所見を呈した。上皮の最根尖側端からノッチにかけての結合組織線維の走行は根面に対して斜めからほぼ垂直に走行し、新生セメント質形成も上皮の最根尖側端付近まで認められる所見が多数観察された (図 13)。また、新生された骨組織と根面との間では、多数の新生血管を含む歯根膜様構造が認められた。

3) HAP 移植群

移植後 2 週を経過すると骨欠損部は、結合組織ならびに残存する顆粒により満たされた状態を示し、また上皮基底部付近や、骨欠損内の一部には少数の炎症性細胞浸

図 13 Control 群術後 12 週例
上皮の最根尖側付近まで新生セメント質の形成が認められる
H-E 染色 (×25)

図 14 HAP 群移植後 2 週例
顆粒は骨欠損底部で比較的密な填塞状態を、歯冠側部では疎な填塞状態を呈している H-E 染色 (×5)

潤が認められた。HAP 顆粒は、骨欠損底部付近のものは比較的均密な状態で残存していたが、歯冠側部においては骨欠損底部に比べ疎な状態であった (図 14)。新生骨形成も骨欠損底部より歯冠側方向に向かって軽度認められ、骨欠損底部に位置する顆粒の一部は新生された幼

図 15 HAP 群移植後 2 週例
欠損底部顆粒は新生された骨組織と直接結合している H-E 染色 (×25)

図 16 HAP 群移植後 2 週例
顆粒周囲は顆粒と平行に走行する結合組織線維に被覆されマクロファージや多核巨細胞などの食食細胞の付着も認められる H-E 染色 (×50)

若な骨梁組織と直接結合している所見が認められた (図 15)。一方、骨欠損中央部から歯冠側に位置する顆粒は、周囲を顆粒と平行に走向する結合組織線維に取り囲まれ、マクロファージや多核巨細胞などの食食細胞の付着も認められた (図 16)。根面部では上皮の深部増殖がみられ、基底部には慢性炎症性細胞浸潤が認められた。ノッチから上皮までの間の根面では、結合組織線維が根面に対して平行に走行していた (図 17)。

移植後 4 週例では、骨欠損内の炎症細胞はほとんど消失していたが、上皮基底部にはなお少数の慢性炎症性細

図 17 HAP 群移植後 2 週例
根面と顆粒間に結合繊維が平行に
走行する H-E 染色 (×50)

図 19 HAP 群移植後 4 週例
歯冠側領域の顆粒の著明な減少を示
す H-E 染色 (×5)

図 18 HAP 群移植後 4 週例
新生骨形成が欠損底部から歯冠側方
向に伸展している H-E 染色 (×5)

図 20 HAP 群移植後 4 週例
上皮基底部から顆粒が流出していく
経上皮性異物排除機構が認められる
H-E 染色 (×31.2)

胞の残存が認められるものもあった。新生骨梁は、骨欠損底部母床骨から歯冠側方向に向かい顆粒を包埋する形で形成され (図 18)、顆粒の填塞状態も骨欠損底部では比較的均密な状態であるのに対し、歯冠側部では疎な状態を示す所見が多く、一部の標本では歯冠側領域において著明な顆粒の減少を示す所見も認められた (図 19)。

また上皮基底部から顆粒が流出していく経上皮性異物排除機構と考えられる所見も認められた (図 20)。顆粒周囲の組織反応は基本的に術後 2 週例のものと同様で、新生骨に包埋されているものは骨梁と直接的に結合し、結合組織内に存在するものは顆粒と平行に走行する線維に

図 21 HAP 群移植後 4 週例

結合組織内に存在する顆粒周囲にはマクロファージや多核巨細胞の付着が継続して認められる H-E 染色 (×25)

図 22 HAP 群移植後 12 週例

新生骨形成は歯冠側に残存する顆粒周囲にまで認められる

H-E 染色 (×5)

囲まれ、マクロファージや多核巨細胞の付着も認められた (図 21)。上皮の深部増殖も根尖方向に進行しており、上皮の最根尖側端とのノッチ間の根面においては、根面とほぼ平行に走向する結合組織線維が認められた。骨欠損底部領域での新生セメント質やセメントイドの形成を伴

図 23 HAP 群移植後 12 週例

多くの顆粒は骨と直接結合する形で新生骨組織に包埋されている

H-E 染色 (×25)

う根面と垂直あるいは斜めに走向する結合組織線維が多く認められた。

移植後 12 週例については新生骨形成は、さらに歯冠側方向へ進行し、歯冠側に残存する顆粒周囲にまで認められた (図 22)。ほとんどの顆粒は骨と直接結合する形で新生骨組織に包埋されていた (図 23)。歯冠側領域の一部に骨に未包埋の顆粒の残存が少数認められたが、4 週例と同様に顆粒とほぼ平行に走向する結合組織線維により被覆されていた。しかしマクロファージ、多核巨細胞などの貪食細胞の付着はほとんど認められなかった。上皮の深部増殖は移植後 4 週例とほぼ同様な程度であったが、ポケット底部の位置の根尖方向への移動が軽度で認められた。ノッチ底部から上皮直下付近にいたるまでの根面では control 群と同様に、根面に対して垂直に結合する線維を伴う新生セメント質形成が認められた (図 24)。

4) TCP 移植群

移植後 2 週経過時には骨欠損内の一部あるいは上皮基底部付近に少数の炎症性細胞の存在が認められた。また、顆粒の残存状態は、HAP 顆粒の場合と類似しており、骨欠損底部付近のものは比較的均密な状態で、歯冠側部のものは疎な状態で残存していた (図 25)。新生骨形成も骨欠損底部より歯冠側方向に向かい軽度で認められ、骨欠損底部の一部の顆粒は、周囲を直接骨組織により取り

図 24 HAP 群移植後 12 週例
根面と垂直に結合する線維を伴う新生セメント質形成が認められる
H-E 染色 (×50)

図 26 TCP 群移植後 2 週例
顆粒周囲には多数のマクロファージや多核巨細胞の付着が認められる
H-E 染色 (×50)

図 25 TCP 群移植後 2 週例
顆粒は骨欠損底部では比較的緊密な状態で残存している H-E 染色 (×5)

図 27 TCP 群移植後 2 週例
上皮直下では根面と平行に走行する結合組織線維が認められる
H-E 染色 (×100)

囲まれている所見が認められたが、骨欠損中央部から歯冠側領域にかけて残存する顆粒は線維性結合組織により被覆され、マクロファージや多核巨細胞の付着は、HAP 顆粒に比較して多数認められた (図 26)。上皮の深部増殖は比較的高度で、上皮の根尖側端からノッチまでの根面

では結合組織線維が平行に走向し、新生セメント質、セメントイドの形成もほとんど認められなかった (図 27)。

移植後 4 週例では新生骨形成はさらに歯冠側領域にまで伸展していた (図 28)。骨梁の形成様式は HAP と同様、欠損底部から顆粒を包埋する形で認められ (図 29)、

図 28 TCP 群移植後 4 週例
 新生骨形成はノッチ、ポケット底部
 間の 1/2 程度まで認められる
 H-E 染色 (×5)

図 30 TCP 群移植後 12 週例
 新生骨形成が顆粒の残存部位に一致
 して認められる H-E 染色 (×5)

図 29 TCP 群移植後 4 週例
 骨梁の形成が欠損底部から顆粒を包埋する形で認
 められる H-E 染色 (×50)

骨に未包埋な顆粒は、術後 2 週例のものと同様に結合組織線維により囲まれ、マクロファージや多核巨細胞の付着が認められた。顆粒の填塞状態や上皮の深部増殖、ポケット底部の根尖方向への移動も移植後 2 週例と同程度に認められた。根面における垂直方向に配列する結合組織線維の付着や、新生セメント質の形成については HAP 群と同様、骨欠損底部付近に局限して認められた。

移植後 12 週を経過すると新生骨形成量は増加し、顆粒の残存している領域、あるいは上皮の最根尖側端部まで新生骨形成が認められた (図 30)。顆粒の多くは新生

図 31 TCP 群移植後 12 週例
 一部の顆粒辺縁にはマクロファージ
 や多核巨細胞による食食像が観察され
 る H-E 染色 (×50)

された骨組織と直接結合していたが、一部の顆粒辺縁にはマクロファージや多核巨細胞の付着が認められ、顆粒の食食吸収像が観察された (図 31)。上皮の深部増殖やポケット底部の位置は移植後 4 週例とほぼ同様であった。根面における結合組織線維の付着や新生セメント質の

図 32 TCP 群移植後 12 週例
結合組織線維付着が上皮直下付近まで認められる H-E 染色 (×25)

図 34 H+C 群移植後 2 週例
骨梁に包埋されていない顆粒は顆粒と平行に走行する結合組織線維により被覆されている H-E 染色 (×25)

図 33 H+C 群移植後 2 週例
上皮の深部増殖は抑制され、顆粒は緊密な状態で填塞されている H-E 染色 (×5)

形成は上皮直下付近まで認められた (図 32)。再生された骨組織と根面との間には多数の新生血管を含む歯根膜様構造が認められた。

5) HAP-collagen 複合体移植群 (H+C 群)

移植後 2 週経過時には骨欠損内を、多数の HAP 顆粒

と結合組織が満たしている状態が観察された。また、上皮基底部付近に少数の炎症性細胞浸潤が認められた。顆粒の填塞状態は、骨欠損底部から歯冠側領域付近まではほぼ緊密な状態で填塞されている所見を呈していた。新生骨形成は、骨欠損底部より歯冠側方向に伸展して認められた (図 33)。骨欠損底部の顆粒は新生骨梁と直接結合し、結合組織内の顆粒は、顆粒と平行に走行する比較密な結合組織線維により被覆されていた (図 34)。また、一部の顆粒にはマクロファージや多核巨細胞の付着像もみられ、collagen をコーティングした顆粒周囲の組織反応は collagen をコーティングしていない HAP 群と基本的には同様の所見であった。しかし H+C 群の場合、上皮の深部増殖はほとんど認められず、セメント-エナメル境付近にはほぼ一致して上皮の深部増殖が停止されている所見が多く、多くの標本で観察された (図 35)。上皮直下からノッチにかけては、根面と平行あるいは斜めに走向する比較密な結合組織線維が認められた (図 33, 35)。

移植後 4 週例では上皮の深部増殖もほとんど認められず、顆粒の填塞状態も移植後 2 週例と同様に良好であった (図 36)。顆粒填塞部付近では、根面に沿ってセメントイドや無細胞性の新生セメント質形成ならびに根面と斜めあるいは垂直に走向する線維が認められた (図 37)。新生骨形成は、基本的には移植後 2 週例と同様に、骨欠損底部の既存の母床骨が歯冠側方向へ連続的に進展して

図 35 図 33 上皮直下部の強拡大像
上皮直下には根面と平行あるいは斜めに走行する結合繊維が認められる
H-E 染色 (×25)

図 37 図 36 上皮下領域の強拡大像
歯肉結合繊維が根面と垂直に結合し新生セメントの形成も認められる
H-E 染色 (×25)

図 36 H+C 群移植後 4 週例
上皮の深部増殖はみられず良好な顆粒の填塞状態が認められる
H-E 染色 (×5)

図 38 H+C 群移植後 12 週例
新生骨形成は残存する顆粒の最歯冠側端にほぼ一致して認められる
H-E 染色 (×5)

いたが、特に顆粒周囲における骨形成が良好に認められた (図 36)。しかしながら、明らかな母床骨との非連続的な骨形成は観察されなかった。骨組織に未包埋な顆粒周囲では、顆粒とほぼ平行に走向する密な結合繊維によ

り取り囲まれていたが、マクロファージや、多核巨細胞などの貪食細胞の付着はほとんど認められなかった。また一部の標本では顆粒と根面とが垂直的に配列する線維により結合している所見が認められた (図 37)。

図 39 H+C群移植後 12 週例

上皮下からノッチまでは根面と垂直に結合する線維を伴う新生セメント質が認められる H-E 染色 (×10)

図 40 T+C群移植後 2 週例

顆粒の填塞状態は骨欠損底部から歯冠側領域にかけてほぼ均一に認められる H-E 染色 (×5)

移植後 12 週経過時においても顆粒の残存は著明であり、しかも均密な状態で骨欠損底部からセメント-エナメル境付近まで填塞されていた。新生骨はこれらの残存顆粒の最歯冠側端にほぼ一致して認められた。また新生

図 41 T+C群移植後 2 週例

骨組織に未包埋な多くの顆粒では顆粒周囲全体にマクロファージや多核巨細胞の付着が観察される

H-E 染色 (×25)

した骨組織も母床骨とほぼ同様な組織構造を示していた (図 38)。上皮の深部増殖、ポケット底部の根尖方向への位置の移動はみられず上皮直下から根面に対しては垂直に結合する線維を伴う新生セメント質形成がノッチ底部まで連続して認められた (図 39)。

6) TCP-collagen 複合体移植群 (T+C 群)

移植後 2 週経過時では骨欠損内は、TCP 顆粒と結合組織により満たされていた (図 40)。新生骨形成は、骨欠損底部の母床骨より歯冠側方向に向かって認められ、骨欠損底部付近に限局してエオジン染色性の強い幼若な新生骨形成が認められた。顆粒の骨組織に包埋された部分は、骨組織と直接結合し、骨組織に包埋されていない部分では、顆粒面とほぼ平行に走向する結合組織線維に被覆されているか、あるいはマクロファージや多核巨細胞の付着が多数観察された (図 41)。上皮の深部増殖はほとんど認められず、セメント-エナメル境付近に残存する顆粒の最歯冠側部付近にほぼ一致して、上皮の深部増殖が抑制されていた。上皮直下からノッチにかけての根面においては、根面と平行に走向する比較的密な結合組織線維が認められ、また骨欠損底部の根面に若干の新生セメント質の形成が認められた。

移植後 4 週例では、上皮の深部増殖はほとんど観察されず、一部の標本では接合上皮の根尖側にセメントイド

図 42 T+C群移植後4週例
上皮直下では根面と垂直に結合する線維を封入した新生セメント質の形成が認められた H-E 染色 (×25)

図 43 T+C群移植後4週例
根面では斜めあるいは垂直に結合する線維とセメントイドの形成が観察される H-E 染色 (×25)

あるいは無細胞性の新生セメント質の形成が認められた (図 42)。また顆粒填塞部の根面では根面と斜めあるいは垂直に結合する線維とこれに接するセメントイドや、新生セメント形成が観察された (図 43)。新生骨形成も移

図 44 T+C群移植後4週例
顆粒周囲にはオステオイドや新生骨形成が著明に認められる
H-E 染色 (×25)

図 45 図 44 の強拡大像
顆粒周囲にはエオジン染色性の強いオステオイドの形成が顕著に認められる
H-E 染色 (×25)

植後2週例と比べさらに歯冠側方向に伸展する所見が認められた。顆粒の填塞状態も良好で、セメント-エナメル境付近まで存在する像が多数観察された。顆粒周囲の反応は基本的には移植後2週例と同様で、骨組織に包埋された部分では、骨組織と顆粒が直接結合し、骨に未包埋な部分は、顆粒面と平行に走向する線維性結合組織に囲まれるか、あるいは、多数のマクロファージや、多核巨細胞の付着が観察された。また一部の標本では、顆粒周囲の骨にエオジン染色性の強いオステオイドの形成が

図 46 T+C群移植後 12 週例
上皮の深部増殖は認められず良好な
歯槽骨再生が認められる
H-E 染色 (×25)

図 48 T+C群移植後 12 週例
顆粒は多数の血管新生の認められる
骨組織により包埋されている
H-E 染色 (×25)

図 47 図 46 上皮直下部の強拡大像
根面と垂直は走行する結合繊維を
伴う新生セメント質形成が認められる
H-E 染色 (×25)

図 49 T+C群移植後 12 週例
顆粒の一部にはマクロファージや多
核巨細胞による貪食吸収像が認められ
る H-E 染色 (×50)

顕著に認められた (図 44, 45)。

移植後 12 週経過時には上皮の深部増殖は認められず、結合上皮下方の領域には根面と垂直に走向する結合繊維を伴う新生セメント質形成を認める所見が多数観察さ

れた (図 46, 47)。骨欠損内は新生骨組織の形成が極めて良好であった (図 46)。顆粒の大部分は、直接新生骨組織によって包埋されていたが (図 48)、顆粒の一部は、マクロファージや多核巨細胞による貪食吸収作用を受け、部

図 50 T+C群移植後12週例
新生された骨と根面との間は多数の
新生血管を含む歯根膜様構造が認めら
れる H-E 染色 (×50)

分的な崩壊吸収像が認められた (図 49)。骨組織中,特に顆粒付近には多数の血管の新生が認められた (図 48)。一部の標本では,骨組織に未包埋な顆粒の残存もみられ,移植後4週例と同様に,顆粒面と平行に走向する結合線維によって取り囲まれていたが,貪食細胞の付着は軽度であった。ノッチ底部から上皮直下まで根面においては,根面と垂直に結合する線維を伴う新生セメント質形成が認められ,新生骨と根面との間には多数の新生された血管を含む歯根膜様構造が認められた (図 46, 50)。

2. 組織学的計測結果について (表1)

本研究においては,2週,4週および12週経過時における control 群, HAP 群, TCP 群, H+C 群, T+C 群の経時的变化を,組織計測値により比較検討すべく計画したが,その結果2週および4週例では計測値にばらつきが多いため,最も長期例である12週経過時の計測結果についてのみをポケット形成抑制率,上皮の深部増殖抑制率,新生セメント質形成率,新生骨形成率ならびに顆粒埋塞率について比較検討を行った。

1) Control 群, HAP 群, HAP-collagen 複合体移植群間での比較

ポケット形成抑制率 (S.P) および,上皮の深部増殖抑制率 (S.E),新生セメント質形成率 (N.C),新生骨形成率 (N.B) は, H+C 群, HAP 群, control 群の順で高

い値を示し各群間に有意差 ($P<0.01$) が認められた。顆粒埋塞率 (G.F) についても H+C 群が HAP 群に比べ有意に高い値 ($P<0.01$) を示した。

2) Control 群, TCP 移植群, TCP-collagen 複合体移植群間での比較

ポケット形成抑制率 (S.P) および,新生セメント質形成率 (N.C) 間については T+C 群, TCP 群, Control 群の順で高い値を示し,各群間に有意差 ($P<0.01$) が認められた。また上皮の深部増殖抑制率 (S.E) に関しても T+C 群, TCP 群, control 群の順で高い値を示し, T+C 群, TCP 群間では ($P<0.05$), TCP 群, Control 群間, および T+C 群, control 群間では ($P<0.01$) で有意差が認められた。新生骨形成率 (N.B) に関しても, T+C 群, TCP 群, control 群の順で高い値を示し, T+C 群, TCP 群間に有意差 ($p<0.01$) が認められた。顆粒埋塞率 (G.F) に関しても T+C 群が TCP 群に比べ有意に高い値 ($p<0.01$) を示した。

3) HAP 移植群と TCP 移植群間および HAP-collagen 複合体移植群と TCP-collagen 複合体移植群間での比較について

ポケット形成抑制率 (S.P), 新生セメント質形成率 (N.C) については HAP 群, TCP 群間および H+C 群, T+C 群間に差異は認められなかった。新生骨形成率 (N.B) については HAP 群 TCP 群間 ($p<0.05$) および H+C 群, T+C 群 ($p<0.01$) で有意差が認められた。顆粒埋塞率 (G.F) に関しては, HAP 群が TCP 群に比べ有意に高い値 ($p<0.01$) を示したが, H+C 群, T+C 群間においては差異は認められなかった。

考 察

1. 実験方法について

実験的に歯周炎を惹起させる方法としては,現在までに様々な報告がなされている^{7,10,24,35,59~61,67,69,85~89})。動物実験において,ヒト歯周疾患により近い状態を実験的に再現するためには,サルやビーグル犬の歯頸部にワイヤーを結紮し,一定期間毎にワイヤーを交換しながら長期間軟性飼料を与えて飼育する方法が最も自然治癒が生じにくく確実性のある方法と考えられている。しかしながら,本研究のように骨移植後の治癒過程をできる限り客観的に評価しようとする場合には,骨欠損の規格化を考慮する必要がある,自然治癒が生じにくい環境を作るために外科的に骨欠損を形成後,慢性炎症を生じさせる方法が選択されている。川浪は⁸⁷⁾絹糸を歯牙周囲に結紮

表 1 組織学的計測結果

	S. P	S. E	N. C	N. B	G. F
Cont (N=57)	65.9±7.6	53.7±8.3	48.6±9.8	37.6±9.9	
HAP (N=71)	73.4±6.9	64.4±8.0	62.2±9.5	45.7±15.0	45.9±14.1
TCP (N=49)	76.3±7.4	67.0±10.0	63.3±10.0	41.2±5.8	40.2±9.4
HAP + Collagen (N=62)	87.6±7.1	72.6±18.0	67.5±18.4	69.6±13.3	64.9±5.6
TCP + Collagen (N=61)	85.9±6.2	71.5±8.4	68.5±8.7	61.1±11.1	62.8±12.2

1) Control 群, HAP 移植群, HAP-collagen 複合体移植群での比較

S. P ★★ Cont-HAP, Cont-HAP+Coll, HAP-HAP+Coll

S. E ★★ Cont-HAP, Cont-HAP+Coll, HAP-HAP+Coll

N. C ★★ Cont-HAP, Cont-HAP+Coll, HAP-HAP+Coll

N. B ★★ Cont-HAP, Cont-HAP+Coll, HAP-HAP+Coll

G. F ★★ HAP-HAP+Coll

2) Control 群, TCP 移植群, TCP-collagen 複合体移植群での比較

S. P ★★ Cont-TCP, Cont-TCP+Coll, TCP-TCP+Coll

S. E ★★ Cont-TCP, Cont-TCP+Coll ★ TCP-TCP+Coll

N. C ★★ Cont-TCP, Cont-TCP+Coll, TCP-TCP+Coll

N. B ★★ Cont-TCP+Coll, TCP-TCP+Coll

G. F ★★ TCP-TCP+Coll

3) HAP 移植群と TCP 移植群間および HAP-collagen 複合体移植群と TCP-collagen 複合体移植群間での比較について

S. P

S. E ★ HAP-TCP

N. C

N. B ★★ HAP+Coll-TCP+Coll ★ HAP-TCP

G. F ★★

Mann Whitney's U-test

★★ p<0.01 ★ p<0.05

することにより歯周炎を惹起させる方法では、深い歯周ポケットを確立するためには長時間を必要とし、外科的に骨を削除し異物を挿入する方法では、短時間で骨欠損を伴う深い歯周ポケットが形成されるが確実性に欠けると考察している。一方、山之内⁶⁰⁾、関谷⁶¹⁾は軟化したガッターチャーとテンポラリーストップピングを骨欠損内に2週間挿入し、除去後1週間放置することにより、炎症の存在を伴った骨移植母地の規格化が可能になったことを報告している。本研究では実験的歯周炎を惹起させ

る方法として、3壁性骨欠損を形成後、歯牙周囲にワイヤーを結紮し、骨欠損内に折り込みさらにレジンを骨欠損内に充填する方法を用いた。さらに実験期間中の飼料についてもプラークの停滞を助長する目的で30%ショ糖含有軟性飼料を与えた⁸⁸⁾。移植手術直前の歯周組織の状態を病理組織学的に検索した結果、比較的広範囲におよぶ垂直性の骨欠損の存在と、上皮の根面に沿った深部増殖所見および上皮基底部付近や骨欠損底部付近に形質細胞を含む著明な慢性炎症細胞浸潤が認められた。本実

験モデルにおいて自然治癒が観察期間中にどの程度生じたかについては未処置群を設定していないため不明である。しかしながら以前著者らが行った実験的歯周炎を惹起させていないイヌの3壁性骨欠損においては、術後12週ではほぼ骨欠損作製前の位置まで骨が再生し、上皮の根尖方向への深部増殖もほとんど認められなかったのに対し²⁷⁾、本研究の術後12週のcontrol群では、骨再生量が37.6%、上皮の根尖方向への深部増殖がルートプレーニングした根面の40%程度認められており、歯周炎存在下での骨移植材の効果を病理組織学的に検索するのに十分な実験モデルと考えられた。組織計測値に関しては実測値ではなく、CEJとノッチ間を基準とした時の百分率を計測値として表現した。また、群間の計測値の比較には、Mann-WhitneyのU検定法を用いた。本検定法は計測値の分布の形にとらわれず位置の差を検出するものであり、全ての計測値が検定の結果関与してくる方法である。次に実験期間に関しては、原ら⁷⁾は、イヌを使用した移植実験で、実験的歯周炎を惹起させた3壁性骨欠損においてはcontrol群、移植群共に上皮下結合組織および歯槽骨の創傷治癒は3ヵ月でほぼ完了したと報告している。さらに原ら⁸⁾は、イヌを用いた移植実験後の長期観察を行なった結果、12ヵ月後においても3ヵ月後のcontrol群、および移植群で得られた歯槽骨レベルが保持されたと報告している。また高山⁹⁰⁾は、イヌを用いた実験的研究において術後12週を経過すると歯槽骨と歯根膜の再生が明瞭となったことを報告している。これらの実験期間に関する報告から本研究においては術後12週までの期間の病理組織所見を観察した。さらに組織計測では2週、4週における計測値のばらつきが多いことを考慮し、12週経過時の計測値についてののみ比較検討を行ない、人工骨移植におけるatelocollagenの歯周組織再生におよぼす影響について検索を行なった。

2. 実験結果について

1) 顆粒の填塞状態について

HAP, TCP群共に移植後の顆粒の流出傾向が認められた。顆粒の填塞率はHAP群については、移植後12週では45.9%、TCP群についても移植後40.2%、とかなりの流出があったと考えられる。一方、複合体移植群ではH+C群で64.9%、T+C群が62.8%と顆粒単独移植群と比較して高い填塞結果が得られ、顆粒の流出は少なかったものと考えられる。三辺ら²¹⁾は、術後の移植材の流出についてX線学的に評価した結果、術後1ヵ月までに顆粒は著明に減少し、以後比較的安定していることから、創面の哆開などによる移植材の流出を可及的に防

止できればかなり予後成績が向上するものと考察している。原ら⁴²⁾は、HAP顆粒の流出の原因について、HAPが欠損部を満たしている場合、上皮細胞の増殖、移動の足場となる線維素が欠如しているため上皮の閉鎖がなされず、顆粒が流出する可能性があることに加えて、上皮の閉鎖があった場合でも経上皮性異物排除機構の様式に類似した排出機構も考えられると考察している。本実験結果において、複合体移植群の顆粒填塞率が有意に高い値を示した理由として、使用したatelocollagenが低温では流動性のある液体状であるが37°C付近まで加温するとcollagen線維が再構築して、流動性を失いゲル化する性質があり、この作用により顆粒の維持安定が高まったものとする。また顆粒にコーティングしたcollagenが顆粒間の機械的嵌合力を増強させ、顆粒の維持安定が高められたことも考えられる。さらにはcollagenが上皮細胞や線維芽細胞増殖の基質としてすぐれており、collagen分子あるいはcollagen分子が凝集してできる原線維(fibril)が上皮細胞増殖、移動の足場をつくり⁹¹⁾、結合組織の成熟を促進したため顆粒の流出を減少させたものと考えられる。経上皮性異物排除機構については本実験において、その出現の有無や頻度は明らかではなかったが、森下ら⁹²⁾は、この現象の発現に炎症細胞の関与を示唆しており本実験においても、HAP, TCP単独移植群では複合体移植群に比べて接合上皮最根尖側端部の炎症の存在が認められる所見が多いことから、複合体移植群の方が、経上皮性異物排除機構が働く可能性が少ないものと推察された。また単独移植群においてTCP群がHAP群に比べ流出傾向が大きかったことに関しては、TCP顆粒がHAP顆粒に比べて表面構造が凹凸の明瞭な不定型を呈していたことから、術後の炎症反応が持続しやすかったこと³²⁾や、顆粒径が小さいために顆粒の流出が生じやすかったことなどが考えられる⁹⁾が、今後さらに詳細な検討が必要と思われる。

2) 新生骨形成について

5群共に骨欠損底部から歯冠側に向かって生じていた。新生された骨組織は術後2週では比較的骨梁幅も増加し、ほぼ正常な骨新生が行なわれたものと考えられる。新生骨形成率は、移植群ではcontrol群より高く、特に複合体移植群で高い値を示した。また移植群では移植後12週において顆粒填塞率(GF)と新生骨形成率(NB)が近似した値を示した。このように複合体移植群が単独移植群と比較して骨形成率を増加させた理由として、collagen自体は骨誘導能を有さないとされていることから⁶⁵⁾、collagenのコーティングあるいは混合により

顆粒の填塞率が向上したことが結果として骨伝導能を高めたためと考えられる。また本実験における特徴的な所見の1つとして、移植後4週におけるT+C群の顆粒周囲に骨やオステオイドの形成が著明に認められたことが挙げられる。この理由について、①TCP顆粒が崩壊吸収を受けることにより、骨形成に有利な微小環境が形成される²⁸⁾、②TCP顆粒からの Ca^{++} の溶出が局所の Ca^{++} 濃度を上昇させ、骨形成が生じやすい環境を作り出す可能性がある^{62,48)}などTCP材料の骨形成に関する従来の報告に加えて、③atelocollagenをコーティングした移植材ではatelocollagenをコーティングしていない材料と比較して骨芽細胞様細胞との親和性が良好になる⁷¹⁾、④atelocollagenは骨形成細胞の足場としての働きを有する^{62,65~67,73)}などの報告を総合して考えると、移植材表面、あるいは移植材間のcollagenの存在がTCP周囲における骨形成細胞増殖の足場となるとともに、骨形成に有利に作用している可能性が推察される。

3) 上皮の深部増殖について

組織計測結果においては12週で複合体移植群が他群に比べ有意に高い値を示した。組織所見においても術後早期より上皮の深部増殖を抑制している所見が観察された。Yaffeら⁶⁸⁾、Blumenthalら⁶⁷⁾は、collagen溶液を歯周外科手術に応用後の治癒過程を病理組織学的に検索した結果、上皮の深部増殖抑制効果が術後4週において認められたことを報告し、その理由としてcollagenが上皮の深部増殖に対して物理的バリアーとして作用した可能性を示唆している。古郷ら⁷⁵⁾も同様な実験でatelo-collagen溶液が37°C以上で不溶性fibrilを形成することから、それ自体が物理的なバリアーとして上皮の深部増殖を抑制したものと考察している。さらに上皮の深部増殖に対する物理的な抑制因子として、歯冠側領域に多数残存する顆粒の存在が考えられる。本研究結果においては、複合体移植群のように顆粒填塞率が比較的高い場合には、上皮の深部増殖が抑制されているのに対し、顆粒の填塞率が低いHAP群およびTCP群においては、上皮の深部増殖が著明に認められたことから、歯冠側領域における顆粒の残存が上皮の深部増殖を抑制する上で重要な働きをなしていると推察される。峯岸¹⁰⁾は、HAP顆粒が根面と骨欠損部の間に存在すると上皮の入り込むスペースがなくなるため、上皮の深部増殖が抑制されると考察している。また林³⁵⁾は、アパタイトが骨欠損部を満たすことにより歯肉弁が安定な状態となるため、上皮の深部増殖が起こりにくくなるものと考えている。さらに上皮の深部増殖が抑制された原因として、外因性の

collagenの創傷部への添加が線維芽細胞の集積を促進し、歯肉結合組織線維の形成を早期に確立したことが考えられる。歯肉結合組織線維による上皮の深部増殖抑制は、Stahl⁹³⁾が述べているように結合組織線維が根面に対して垂直に結合せず、接合状態であっても起こり得るとされている。さらに根面に対して移植材のようなsecond substratumが一定の間隔をおいて存在した場合、線維芽細胞の移動、配列が生じやすくなり、結果として歯肉結合組織線維が根面と顆粒間を垂直的に走向することが*in vitro*^{94,95)}、*in vivo*⁹⁶⁾両面の研究で明らかにされている。この現象は、酸処理による脱灰根面や脱灰骨基質などのようにcollagen線維が表面に露出している場合や、基質間に外因性collagenが存在する場合には、特に顕著に認められることが報告されている^{79,97)}。本研究においても歯冠側部根面に対して、collagen gelを介して複合体顆粒が存在した場合には、根面と顆粒間を垂直に走向する歯肉結合組織線維が上皮の根尖方向への移動が生ずる前に形成された可能性も考えられる。実際に、移植後4週例のH+C群(図37)においては、光学顕微鏡による観察ではあるが、顆粒表層に明瞭な骨やオステオイドの形成を認めない状態で根面と顆粒が歯肉結合組織線維により結合している所見が観察された。

4) 歯周ポケットについては

歯周ポケットの抑制率は上皮の深部増殖抑制率や新生セメント質形成率とほぼ相関していた。すなわち上皮の深部増殖が認められた場合には、ポケットの深化や新生セメント質形成の減少も同時に生じていた。Control群を含め各移植群共に上皮性付着の幅すなわちポケット底部から上皮の最根尖側端までの距離の割合は、移植後12週を経過するとルートプレーニングされた根面の10~15%で著明な差異は認められなかった。臨床的な検索においてはHAPやTCPを移植した結果、臨床的付着量が増加したという報告が多数認められる^{13,14,21,26)}。本研究で組織学的評価に用いた歯周ポケットの抑制率は、セメント-エナメル境を基準とした顆粒底の位置の変化を計測したもので、臨床的評価に用いられる臨床的付着量の変化と相応するものと考えられる。すなわち複合体移植群においては単独移植群と比べて臨床的付着量の増加が期待できるものと考えられる。

5) 新生セメント質形成について

新生セメント質形成率は5群共に、術後12週を経過時には、上皮の最根尖側端付近まで認められるようになった。複合体移植群は他群と比べ有意に高い値を示し、単独移植群についても、control群と比較し有意差が認

められた。人工骨移植後に新生セメント質形成量が増加するか否かに関しては、否定的な報告が多い^{1,3,16,48)}。本研究結果においては、新生セメント質形成は control 群と基本的に類似しており、新生骨形成と共に増加する傾向を示した。特に、骨欠損底部領域に沈着するセメント質は細胞性骨様セメント質であった。すなわち、新生セメント質形成に骨由来細胞が関与している可能性が示唆された。西村ら^{98,99)}、高田¹⁰⁰⁾は、骨形成の旺盛な部位において形成される新生セメント質は、その表面構造が骨に類似しており、術後、根尖側部に局限して形成されるセメント質は、細胞性骨様セメント質であることを報告している。また、Melcher ら¹⁰¹⁾も *in vitro* の実験において、培養後、象牙質片表面にセメント質様物質が沈着したことを報告している。本研究結果において認められた根面に対する結合繊維の付着形成については、繊維の走行は術後 2 週から 4 週にかけては、根面に対して平行な場合が多く、術後 12 週には、斜めから垂直方向に配列するとともに、新生セメント質内と結合する傾向を示した。また、骨欠損底部領域においてその傾向は特に明瞭であった。渡辺¹⁰²⁾、歯周外科手術後の根面の治癒を検討した結果、根面部の結合組織は初期には根面に対して平行に走行し、しだいに垂直な走行を示すようになり、その後に第 2 セメント質の添加が認められるとしている。また、高山⁹⁰⁾はイヌの歯周組織の再付着について検討した結果、術後 4 週経過例の所見では結合組織繊維の配列は疎で、走行は平行なものが多くみられるのに対し、術後 12 週経過例の所見では繊維は密で垂直な走行を示すものが多くみられるようになり、繊維の走行が密で垂直方向に配列する程、新生セメント質の象牙質面との接合が強固となる傾向があると報告している。以上のことから考えると、HAP、TCP 単独移植における新生セメント質形成および結合繊維の根面に対する付着過程は、通常の歯周外科手術後の治癒過程と基本的には同一であるものと推察される。また、本実験の術後 12 週において HAP、TCP 移植群では、control 群に比べ新生セメント質形成率が高い値を示した理由としては、顆粒の存在により上皮の深部増殖が物理的に抑制され、骨あるいはセメントの歯冠側方向における形成の場が確保されたものと考えられる。高山⁹⁰⁾は、新生セメント質の長さとして上皮の深部増殖との間に強い相関があると報告しており、本実験結果を裏づけるものと考えられる。一方、H+C 群、T+C 群では、両群間において新生セメント質形成率に差異は認められなかったが、他群と比較して有意に高い値を示した。新生セメント質形成率が control

群や単独移植群と比べて、高値を示した理由としては、第一に新生骨形成率が、複合体移植群において単独移植群より高い値を示したことから、新生セメント質形成に骨由来細胞が関与した可能性が考えられる⁹³⁻⁹⁵⁾。しかしながら、単独移植群の新生骨形成率が 40~45% を示しているのに対し、新生セメント質形成率が 62~63% を示していることや、歯冠側部根面において、移植後 4 週例において形成された新生セメント質は、根尖部付近で観察される新生セメント質とは構造の異なる無細胞性セメント質であることが多いことなどから、骨由来細胞以外の因子の関与が考えられる。現在、セメント質形成能を有する細胞としては、歯根膜由来細胞であるという報告が多い¹⁰³⁾。本研究において、複合体顆粒と根面との間に、外因性の collagen の介在を伴った間隙が確保されたとすれば、その間隙は、歯根膜細胞にとって、いわゆる tractional field としての役割をなし、歯根膜由来細胞の歯冠側方向への移動増殖が促進され新生セメント質形成を助長したことも考えられる^{68,79,104)}。

結 論

Hydroxyapatite 顆粒 (HAP) および Tricalcium phosphate 顆粒 (TCP) に atelocollagen をコーティングした HAP-collagen 複合体、TCP-collagen 複合体をイヌの実験的歯周炎を惹起させた 3 壁性歯槽骨欠損部へ移植した。移植後、2 週、4 週、12 週の歯周組織再生治癒過程について、HAP、TCP の単独移植および移植を行なわなかった場合を対照として、病理組織学的観察ならびに組織計測により比較検討した結果以下の結論を得た。

1. 組織学的観察結果より

新生骨形成は atelocollagen のコーティングの有無にかかわらず、移植後 2 週から 12 週にかけて、骨欠損底部母床骨より歯冠側方向に伸展して認められた。HAP 単独移植群および HAP-collagen 複合体移植群においては、顆粒は新生骨梁と直接結合し、骨組織に未包埋な部分では結合繊維により被覆された。一方、TCP 単独移植群および TCP-collagen 複合体移植群においては骨組織に未包埋な顆粒は、マクロファージや多核巨細胞による貪食吸収作用を受け顆粒の部分的な崩壊吸収像が認められた。また特徴的所見として、移植後 4 週の TCP-collagen 複合体においては、顆粒周囲のオステオイド形成が TCP 単独移植群に比べて顕著に認められた。

2. 術後 12 週経過時における組織学的計測結果より

1) 顆粒埋塞率は, HAP および TCP-collagen 複合体移植群が, HAP および TCP 単独移植群に比べて有意に高い値を示した。

2) 新生骨形成率は, HAP および TCP-collagen 複合体移植群, HAP および TCP 単独移植群, control 群の順に高い値を示し複合体移植群と他群の間に有意差が認められた。

3) 上皮の深部増殖抑制率およびポケット形成抑制率は, HAP および TCP-collagen 複合体移植群, HAP および TCP 単独移植群, control 群の順に高い値を示し, 各群間で有意差が認められたが, HAP と TCP の材料の相違による差異は認められなかった。

4) 新生セメント質形成率は, HAP および TCP-collagen 複合体移植群が, HAP および TCP 単独移植群, Control 群に比べて有意に高い値を示したが, HAP と TCP の材料の相違による差異は認められなかった。

以上の成績により, 人工骨移植材料と atelocollagen の複合体移植法は従来の人工骨材料を用いた単独移植法の欠点を補う有用な歯周外科処置法となり得ることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御教示と御校閲を頂きました, 本学保存学教室第二講座 堀 俊雄教授ならびに保存学教室第三講座 長田 保教授に謹んで感謝の意を表します。さらに貴重な御教授ならびに御助言を頂きました, 口腔外科学教室 志村介三教授ならびに口腔解剖学教室 高橋和人教授, 口腔生化学教室 斉藤 滋教授に深く感謝致します。また終始御指導と御助言を頂きました, 病理学教室 渡辺は久助教授に心から御礼を申し上げるとともに, 本研究の実施にあたり種々御協力下さいました三辺正人博士をはじめ保存学教室第二講座の皆様にも厚く謝意を表します。

尚, 本研究の一部は, 昭和 63 年度文部省科学研究費(奨励研究 A, 課題番号 63771586)の補助を受けて行なわれたことを付記する。

文 献

- 1) Stahl, S.S. and Froum, S.J. : Histologic and clinical responses to porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. Three to twelve months post implantation. J. Periodontol., 58 : 689-695, 1987.
- 2) Kenny, E.B., Lekovic, V., Sa Ferreira, J.C.,

- Han, T., Dimitrijevic, B. and Carranza, Jr.F.A. : Bone formation within porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. J. Periodontol., 57 : 76-83, 1986.
- 3) Moskow, B.S. and Lubarr, A. : Histological assessment of human periodontal defect after durapatite ceramic implant. Report of a case. J. Periodontol., 54 : 455-462, 1983.
- 4) Yukna, R.A., Harrison, B.G., Caudill, R.F., Evans, G.H., Mayer, E.T. and Miller, S. : Evaluation of durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. II. Twelve month reentry results. J. Periodontol., 56 : 540-547, 1985.
- 5) Sapkos, S.W. : The use of Periograf® in periodontal defects. Histologic findings. J. Periodontol., 57 : 7-13, 1986.
- 6) 原 宜興, 古川猛士, 岸 哲也, 鄭 有仁, 赤峰昭文, 青野正男 : リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用. 1. Hydroxyapatite についての基礎実験. 日歯周誌, 25 : 806-816, 1983.
- 7) 原 宜興, 岸 哲也, 古川猛士, 鄭 有仁, 長峰尚子, 谷 和代, 吉村祥子, 赤峰昭文, 前田勝正, 青野正男 : リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用. 3. 実験的歯周炎への hydroxyapatite の応用. 日歯周誌, 26 : 542-555, 1984.
- 8) 原 宜興, 古川猛士, 宮武祥子, 前田勝正, 赤峰昭文, 北村哲郎, 岩本恭行, 安部達也, 青野正男 : リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用. 7. Hydroxyapatite 周囲に再生した骨組織について. 日歯周誌, 29 : 545-556, 1987.
- 9) 林 成忠, 木村喜保, 呉 啓彦, 米良豊常, 西原達次, 野口俊英, 木下四郎 : サルの歯槽骨欠損部における Hydroxyapatite 移植の臨床的および組織学的研究. 日歯周誌, 25 : 919-935, 1983.
- 10) 峯岸大造 : サル歯槽骨欠損部への多孔質アパタイト顆粒の充填に関する研究. 日歯周誌, 28 : 87-100, 1986.
- 11) 石川一郎, 松江美代子, 田原 洋, 山田総一郎, 桐野忠昭, 松江一郎 : ビーグル犬の根分岐部病変への各種移植の比較検討. 日歯周誌, 27 : 570-587, 1985.
- 12) 塩入隆行, 松江美代子 : 根分岐部に移植した HAP の骨形成および歯根膜の再生に関する研究. 日歯

- 周誌, 29 : 689-705, 1987.
- 13) 山田 了, 大須賀豊, 築瀬一彦, 大島みどり, 佐藤徹一郎, 小林 博, 渡辺嘉一, 本田 忍, 保母良基, 鴨井久一: Periograf® の垂直性骨欠損部への応用に関する臨床的研究. 日歯周誌, 28 : 144-160, 1986.
 - 14) 田中良彦, 和泉雄一, 渡辺 久, 萩原さつき, 石川 烈: 多孔質アパタイト移植に関する臨床的研究. 術後1年間の観察結果. 日歯周誌, 27 : 444-457, 1985.
 - 15) 小木曾誠: アパタイト表面における骨組織形成ならびにその石灰化について. 口病誌, 50 : 1-22, 1984.
 - 16) Stahl, S.S. and Froum, S. : Histological evaluation of human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants, I. Three to eight months. J. Periodontol., 57 : 211-217, 1986.
 - 17) Froum, S. and Stahl, S.S. : Human intraosseous healing responses to the placement of tricalcium phosphate ceramic implants. II. 13 to 18 months. J. Periodontol., 58 : 103-109, 1987.
 - 18) Levin, M.P., Getter, L. and Cutright, D.E. : A comparison of iliac marrow and biodegradable ceramic in periodontal defects. J. Biomed. Mater. Res., 9 : 185-195, 1975.
 - 19) 三辺正人, 田村利之, 菅谷 彰, 福田忠彰, 児玉利朗, 堀 俊雄: 骨移植材の保存領域への応用. 第1報: 骨移植材 (Synthograft) の使用経験と骨移植の文献学的考察. 神奈川歯学, 18 : 488-499, 1984.
 - 20) 三辺正人, 田村利之, 児玉利朗, 菅谷 彰, 福田忠彰, 古郷辰二, 友松栄子, 大場正道, 松能宗喜, 宮島 実, 堀 俊雄: 骨移植材の保存領域への応用. 第2報: 人工骨移植後の長期予後観察および歯周外科手術後の創傷治癒に関する文献学的考察. 神奈川歯学, 20 : 115-130, 1985.
 - 21) 三辺正人, 田村利之, 菅谷 彰, 佐藤 肇, 友松栄子, 山下 修, 桜井雅美, 花井純夫, 堀 俊雄: 人工骨移植に関する臨床的研究. 移植1年後のX線学的骨欠損充填率が予後成績におよぼす影響について. 日歯周誌, 29 : 557-567, 1987.
 - 22) 古川猛士, 岸 哲也, 原 宜興, 鄭 有仁, 吉村祥子, 赤峰昭文, 青野正男: リン酸カルシウム系セラミックスの歯周治療への応用. 2. Tricalcium phosphate についての基礎実験. 日歯周誌, 26 : 262-274, 1984.
 - 23) 清水光雄: イヌの実験的垂直性骨欠損に施した β -tricalcium phosphate 移植の効果. 主として病理組織学的観察を中心として. 日歯周誌, 28 : 79-86, 1986.
 - 24) 清水光雄: イヌの実験的垂直性骨欠損に施した β -tricalcium phosphate 移植の効果. 第2報. 主として病理組織学的観察を中心として. 日歯周誌, 28 : 1028-1043, 1986.
 - 25) 清水光雄, 原 耕二: シンソグラフト応用による垂直性骨欠損の補填. 2年間の観察期間症例について. 日歯周誌, 27 : 643-650, 1985.
 - 26) 茂手木義男, 大倉博顕, 宮下 元, 長谷川絃司, 堀口令一, 落合慶一, 新井 高, 中村治郎, 清水光雄, 山本玲子, 原 耕二: 歯周外科手術における Synthograft® の応用. 日歯周誌, 25 : 936-943, 1983.
 - 27) 菅谷 彰, 児玉利朗, 古郷辰二, 佐藤 肇, 渡辺是久, 堀 俊雄: イヌ歯槽骨欠損への Hydroxyapatite および Tricalcium phosphate 移植に関する組織学的研究. 日歯周誌, 29 : 179-197, 1987.
 - 28) 永原国央: Tricalcium phosphate (TCP) 及び hydroxyapatite (HAP) による骨形成とコラーゲン分子種の変化. 歯基礎誌, 29 : 131-155, 1987.
 - 29) Bye, F.I., Krause, M.E., Regezi, J.A. and Caffesse, R.G. : Histologic evaluation of periodontal implants in a biologically "closed" model. J. Periodontol., 58 : 110-114, 1987.
 - 30) Barney, V.C., Levin, M.P. and Adams, D.F. : Bioceramic implants in surgical periodontal defects. A comparison study. J. Periodontol., 57 : 764-770, 1986.
 - 31) 林 英昭, 鴨井久一: リン酸カルシウム系セラミックスの歯周組織再生に関する研究. 病理組織学およびオートラジオグラフィによる検討. 日歯周誌, 30 : 1-21, 1988.
 - 32) Misiek, D.J., Kent, J.N. and Carr, R.F. : Soft tissue responses to hydroxyapatite particles of different shapes. J. Oral. Maxillofac. Surg., 42 : 150-160, 1984.
 - 33) 飯島啓一郎, 板倉良暢, 大野 敬, 小玉博明, 天貝裕也, 須藤博子, 山本茂久: 骨原性細胞

- MCM3T3-E1 によるハイドロキシアパタイトの生体適合性に関する研究. 歯基礎誌, 28: 170-176, 1986.
- 34) Zander, D.J. and Yukna, R.A.: Particle size of periodontal bone grafting materials. J. Periodontol., 55: 406-409, 1984.
 - 35) 林 成忠: ハイドロキシアパタイト顆粒の歯周治療への応用に関する組織学的研究, その形状の違いが組織に及ぼす影響について. 日歯周誌, 28: 1004-1027, 1986.
 - 36) 倉科憲治, 小谷 朗, 田中 寿, 都田芳弘, 尾野幹也: Ceramics 材料の臨床応用に関する研究. 第一報; Dense calcium hydroxyapatite ceramics に対する骨の反応. 信州医誌, 30: 161-173, 1982.
 - 37) 倉科憲治, 小谷 朗, 尾野 幹也: Ceramics 材料の臨床応用に関する研究. 第二報; Porous calcium hydroxyapatite ceramics に対する骨の反応. 信州医誌, 30: 174-181, 1982.
 - 38) 若月達也: 顎骨欠損部への Hydroxyapatite (HAP) 移植後の治療過程に関する実験的研究. 多孔性 HAP と緻密性 HAP との比較について. 歯科学報, 85: 931-952, 1983.
 - 39) 川原春幸: より確かなセラミックインプラント. 補綴臨床, 16: 3-19, 1983.
 - 40) Klawitter, J.J. and Hulbert, S.F.: Application of porous ceramics for the attachment of load bearing internal orthopedic application. J. Biomed. Mater. Res. Symposium, 2: 161-229, 1971.
 - 41) Ameler, M.H.: Osteogenic potential of non-vital tissues and synthetic implant materials. J. Periodontol., 58: 758-761, 1987.
 - 42) 原 宜興, 前田勝正, 古川猛士, 鎮守信弘, 赤峰昭文, 鄭 有仁, 橋口 勇, 山田久仁子, 青野正男: リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用. 6. 顆粒状 hydroxyapatite block の臨床応用. 日歯周誌, 28: 1153-1160, 1986.
 - 43) 郡 正樹: 骨欠損部修復過程に及ぼすハイドロキシアパタイトセラミックの影響. 歯基礎誌, 30: 573-591, 1988.
 - 44) 橋本光示: Infrabony pocket への plaster implant 応用に関する基礎的研究. 実験的骨欠損に対する paste 状 plaster の応用. 日歯周誌, 25: 44-65, 1983.
 - 45) 永井教之, 竹下信義, 白須賀英樹, 秋場道保: 合成水酸アパタイトのラット顎骨補填時における病理組織学的研究. 日口外誌, 31: 1352-1361, 1985.
 - 46) 山岡 昭, 今井久夫, 西田良一, 民上良徳, 坂田勝憲, 西塔誠一, 斉藤徹雄, 南 俊子, 橋本光示: Infrabony pocket への plaster implant 応用に関する基礎的研究 (第2報). 日歯周誌, 16: 313-320, 1974.
 - 47) 原 宜興, 古川猛士, 鄭 有仁, 前田勝正, 赤峰昭文, 宮武祥子, 岩本恭行, 北村哲朗, 青野正男: リン酸カルシウム系セラミックの歯周治療への応用. 5. 広い人工骨欠損への Hydroxyapatite block の応用. 日歯周誌, 28: 131-143, 1986.
 - 48) 堀田善史: ブロック状ならびに顆粒状合成ハイドロキシアパタイトのサル人工的歯周骨欠損への移植. 日歯周誌, 29: 384-404, 1987.
 - 49) 石田ひとみ, 勝谷芳文, 村橋慶宜, 山村早百合, 堀口善史, 堀田優美, 田中龍男, 村上純一, 白木雅文, 岩山幸雄: 合成ハイドロキシアパタイトの歯周骨欠損移植材料としての臨床応用. 日歯周誌, 30: 292-299, 1988.
 - 50) Takei, H.H., Han, J., Carranza, Jr. F.A., Kenney, E.B. and Lekovic, V.: Flap technique for periodontal bone implants. Papilla preservation technique. J. Periodontol., 56: 204-210, 1985.
 - 51) Sugaya, A., Minabe, M., Tamura, T., Hori, T. and Watanabe, Y.: Histological study of Fibrin-hydroxyapatite complex implants on periodontol. Submitted, 1988.
 - 52) 横山敦郎, 郡 正樹, 三木敬一, 坂本 亘, 西風修, 向後隆男, 雨宮 璋: Fibrin-Hydroxyapatite 複合体 implant の基礎的研究. 歯基礎誌, 27: 212, 1985.
 - 53) 村瀬研一, 渋谷一行, 伊志嶺考一, 黒沢 尚, 福沢恭彬, 竹内啓泰: カルシウムアパタイト-フィブリンのり複合体の骨充填実験. 整形外科基礎科学, 12: 249-251, 1985.
 - 54) Bosch, P., Linter, F., Aebes, H. and Brend, G.: Experimental investigations of the effect of the fibrin adhesive on the Kiel heterologous bone graft. Arch. orthop. Traumat. Surg., 96: 177-185, 1980.
 - 55) 笹岡邦典, 瀬戸皖一, 松浦正朗, 近藤寿郎, 尾口

- 仁志, 柴田 豊, 太田義隆: 顆粒状ハイドロキシアパタイトの骨欠損填塞時におけるフィブリン糊の応用. 日口外誌, 31: 2351-2357, 1985.
- 56) Schallhorn, R.G.: Postoperative problems associated with iliac transplants. J. Periodontol., 43: 3-9, 1972.
- 57) Dragoo, M.R. and Sullivan, H.C.: A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. Part II. External root resorption. J. Periodontol., 44: 614-625, 1973.
- 58) Ibbott, C.G.: Root resorption associated with placement of a ceramic implant. Report of case. J. Periodontol., 56: 419-421, 1985.
- 59) 関本恵一: 粉碎脱灰骨基質の歯周外科への応用に関する基礎的研究. 日歯周誌, 26: 179-200, 1984.
- 60) 山之内一也: イヌ歯槽骨欠損部への混合移植 (新鮮自家骨と粉碎脱灰骨基質) による創傷治癒に関する実験病理組織学的研究. 日歯周誌, 29: 706-748, 1987.
- 61) 関谷 栄: イヌ歯槽骨欠損部への粉碎脱灰骨基質移植に関する実験病理組織学的研究. 日歯周誌, 29: 749-787, 1987.
- 62) 宮田暉夫: 硬タンパク質の生医学材料としての利用. 皮革化学, 28: 75-89, 1982.
- 63) 宮田暉夫: バイオテクノロジーへの線維材料の応用. 繊維学会誌, 39: 427-435, 1983.
- 64) 宮田暉夫: バイオマテリアルとしてのコラーゲン膜. 膜, 10: 268-278, 1985.
- 65) 中原治彦, 津田隆之, 菅本一臣, 増原健作, 吉川秀樹, 清水信幸, 高岡邦夫, 小野啓郎: 骨形成因子の担体としての collagen の有用性. 第4回日本骨代謝学会抄録集, 55, 1986.
- 66) 朝比奈泉, 原 清, 須田 聡, 古森孝英, 榎本昭二, 津崎まり: 骨形成蛋白 (BMP) の臨床応用に関する検討. BMP と有機基質の複合による骨形成. 第4回日本骨代謝学会抄録集, 55, 1986.
- 67) Blumenthal, N., Sabet, T. and Barrington, E.: Healing responses to grafting of combined collagen. Decalcified bone in periodontal defects in dogs. J. Periodontol., 57: 84-90, 1986.
- 68) Yaffe, A., Ehrlich, J. and Shoshan, S.: Restoration of periodontal attachment employing enriched collagen solution in the dogs. J. Periodontol., 55: 623-628, 1984.
- 69) Minabe, M., Sugaya, A., Satou, H., Ogawa, Y., Hori, T. and Watanabe, Y.: Histological study of the hydroxyapatite-collagen implants in periodontal osseous defects in dogs. J. Periodontol., 59: 671-678, 1988.
- 70) 小川優司: Hydroxyapatite-Collagen 複合体移植群の歯周組織に与える影響についての実験的研究. 神奈川歯学, 22: 669-686, 1988.
- 71) 辰巳順一, 栗原徳善, 渡辺幸男, 池田克己, 菅谷彰, 三辺正人, 堀 俊雄, 沼部幸博, 林 英昭, 鴨井久一: 焼成骨の歯周治療への応用 (II). HAP, β -TCP および TBC における Collagen coating の効果 (in vitro). 日歯周誌, 30 (秋季特別): 42, 1988.
- 72) Blumenthal, N.M.: The effect of supracrestal tricalcium phosphate ceramic-microfibrillar collagen grafting on postsurgical soft tissue level. J. Periodontol., 59: 18-22, 1988.
- 73) 渡辺是久, 菅谷 彰, 三辺正人, 田村利之, 堀俊雄: 人工骨へのコラーゲンの応用について. ハイドロキシアパタイト-コラーゲン複合体移植に関する病理組織学的検討. 歯科ジャーナル, 28: 206-213, 1988.
- 74) 渡辺幸男, 栗原徳善, 中島啓次, 小野寺修, 大沢一茂, 真島 徹, 桑原 豊, 宮田 隆, 池田克己: 歯槽骨欠損部に充填したハイドロキシアパタイト流出防止の症例. 日歯周誌, 30: 1108-1115, 1988.
- 75) 古郷辰二, 三辺正人, 杉山裕一, 金田有正, 佐藤肇, 児玉利朗, 菅谷 彰, 田村利之, 福野光男, 堀 俊雄, 渡辺是久: 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. 日歯周誌, 30: 542-557, 1988.
- 76) Pitaru, S., Tal, H., Seldinger, M., Grosskopf, A. and Noff, M.: Partial regeneration of periodontal tissues using collagen barriers. J. Periodontol., 59: 380-386, 1988.
- 77) Minabe, M., Kodama, T., Hori, T. and Watanabe, Y.: Effects of atelocollagen on the wound healing reaction following palatal gingivectomy in rats. J. Periodont. Res., 75: 1989. inpress.
- 78) Lowenberg, B.F., Aubin, J.E., Deporter, D.A., Sodek, J. and Melcher, A.H.: Attachment mig-

- ration, and orientation of human gingival fibroblasts to collagen coated, surface-demineralized, and untreated root slices. J. Dent. Res., 76 : 1106-1110, 1985.
- 79) Fernyhough, W., Aukhil, I. and Link, T. : Orientation of gingival fibroblasts in simulated periodontal spaces *in vitro* containing collagen gel. J. Periodontol., 58 : 762-769, 1987.
 - 80) Mehlisch, D.R., Taylor, T.D., Leibold, D.G., Hiatt, R., Waite, D.E., Waite, P.D., Laskin, D.M., Smith, S.T. and Koretz, M.M. : Evaluation of collagen/hydroxyapatite for augmenting deficient alveolar ridges. J. Oral Maxillofac Surg., 45 : 408-413, 1987.
 - 81) 吉木周作 : 脱灰, H-E 染色法によるオステオイドの簡単な証明法, 高橋栄明編, 骨形態計測ハンドブック, 西村書店, 新潟, 1983, 61-66.
 - 82) Gottrow, J., Nyman, S., Karring, T. and Lindhe, J. : New attachment formation as the results of controlled tissue regeneration. J. Clin. Periodontol., 11 : 494-503, 1984.
 - 83) Gottrow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennstrom, J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. J. Clin. Periodontol., 13 : 604-616, 1986.
 - 84) Larjava, H., Salonen, J., Hakkinen, L. and Narhi, T. : Effect of citric acid treatment on the migration of epithelium on root surfaces *in vitro*. J. Periodontol., 59 : 95-99, 1988.
 - 85) Caton, J.G. and Zander, H.A. : Primate model for testing periodontal treatment procedures; I. Histological investigation of localized periodontal pockets produced by orthodontic elastics. J. Periodontol., 46 : 71-77, 1975.
 - 86) 野田俊克, 吉江弘正, 神田敬子, 根津雄一, 高山文晴, 原 耕仕 : 結紮および菌破壊液の滴下により発生したサルの実験的歯周炎. 日歯周誌, 22 : 252-266, 1980.
 - 87) 川浪雅光 : サルの外科的露出根面における歯垢形成の実験的研究. 日歯周誌, 22 : 187-203, 1980.
 - 88) 池野直人, 本間 博, 石川 純 : 蔗糖を含む Soft Food による実験的歯肉炎. カニクイザルでの観察. 日歯周誌, 18 : 350-361, 1976.
 - 89) 滝澤 久 : ゴールデンハムスターにおけるブラークと辺縁性歯周炎との関係に関する実験的研究. 日歯周誌, 24 : 363-384, 1982.
 - 90) 高山文晴 : 実験的セメント質削除後のイヌ歯周組織の再付着について. 有髄歯と無髄歯の比較. 日歯周誌, 22 : 11-37, 1980.
 - 91) Ross, R. : 内田久則 (訳) : Wound healing. 別冊サイエンス. 免疫学 I. 抗体とリンパ球, (柏木登監訳), 日本経済新聞社, 1979, 166-177.
 - 92) 森下美知子, 佐藤良夫 : 皮膚の経上皮性異物排除機構. 臨床免疫, 17 : 718-126, 1985.
 - 93) Stahl, S.S., Slavkin, H.C., Yamada, L. and Levine, S. : Speculations about gingival repair. J. Periodontol., 43 : 395-402, 1972.
 - 94) Aukhil, I., Iglhaut, J., Suggs, C., Schaberg, T.V. and Mandalinich, D. : An *in vivo* model to study migration of cells and orientation of connective tissue fibers in simulated periodontal spaces. J. Periodont. Res., 20 : 392-402, 1985.
 - 95) Aukhil, I. and Fernyhough, W.S. : Orientation of gingival fibroblasts in simulated periodontal spaces *in vitro*. SEM observations. J. Periodontol., 57 : 405-412, 1986.
 - 96) Aukhil, I., Schaberg, T.V. and Lutins, N.D. : Orientation of cells in the experimental periodontal wound. J. Periodont. Res., 19 : 526-529, 1984.
 - 97) Bellows, C.G., Melchre, A.H. and Brunette, D.M. : Orientation of calvaria and periodontal ligament cells *in vitro* by pairs of demineralized dentine particles. J. cell Sci., 44 : 59-73, 1980.
 - 98) 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 : 歯肉剝離搔爬術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.
 - 99) 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 : 歯肉剝離搔爬術の新付着に関する研究 (第12報). 骨再生が近接歯根面状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.

- 100) 高田耕平：歯肉剝離搔爬術の新付着に関する研究。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。J. Clin. Electron Microscopy, 18 : 283-303, 1985.
- 101) Melcher, A.H., Chenog, T.K., 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.
- 102) 渡辺是久：歯周外科手術における創傷治癒の概念。病理学的過程。歯科ジャーナル, 14 : 445-457, 1981.
- 103) Aukhil, I., Simpson, D.M., Suggs, C. and Petterson, E. : *In vivo* differentiation of progenitor cell of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. J. Clin. Periodontol., 13 : 862-868, 1986.
- 104) 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. Periodont. Res., 22 : 320-326, 1987.
-