ラット歯周組織の創傷治癒過程に関する 免疫組織化学的研究

—実験的フラップ手術後のI型コラーゲン、
III型コラーゲン、フィブロネクチンの局在—

佐 藤 聡 鴨 井 久 一

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

(主任：鴨井久一教授)

(平成3年6月17日受付)

Immunohistochemical Study of Wound Healing in Periodontal Tissue of Rats —Distribution of Type I Collagen, Type III Collagen and Fibronectin after Experimental Flap Operation—

Soh SATO and Kyuichi KAMOI

Department of Periodontology, School of Dentistry at Tokyo, The Nippon Dental University

2-3-16 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo, 102, Japan

(Chief : Kyuichi KAMOI)

This study describes the distribution of Type I collagen, Type III collagen and fibronectin after periodontal flap operations in rats. Full thickness flaps were raised and the dental roots were surgically exposed. The animals were sacrificed at 1, 3, 4, 5, 7, 14, 28 and 56 days and the wounds were examined using polyclonal antibodies. The specimens were fixed in 10% neutral buffered formalin, decalcified with EDTA, made into serial paraffin sections, and also examined. The three following different stainings were done : Hematoxylin and eosin. Masson-trichrome and indirect immunofluorescence for the Type I collagen, Type III collagen and fibronectin. After flap operation, fibronectin was detected in the fibrin clot which was negative for Type I collagen and Type III collagen (day 1). Newly formed granulation tissue (3~7 days) stained moderately for Type I collagen, and strongly for fibronectin and Type III collagen. As

the number of fibroblasts decreased in the newly synthesized granulation tissue, fibronectin gradually decreased and the amount of Type I collagen increased (14~56 days). On the surgically exposed root dentin surface staining was strongly positive for Type I collagen but negative for Type III collagen. Dense fibrillar networks of Type I collagen and fibronectin were aligned parallel to the exposed root dentin surface, evidence of connective tissue regenerating. Eventually, the regenerated connective tissue fibers stained strongly positive for Type I collagen, negative for fibronectin, and at the site of reattachment of the regenerated collagen bundle was stained positive for Type III collagen (56 days). These results indicate that in the regeneration of connective tissue, the appearance of Type III collagen precedes that of Type I collagen, and functions as an extracellular scaffold for Type I collagen. Fibronectin may be important in the

organization of the collagenous connective tissue. They also suggest that, on the root surface, Type III

collagen functions as a scaffold for reattachment.

Key words : Type I collagen, Type III collagen, Fibronectin, Wound healing, Flap operation

要旨: 実験的フラップ手術後の創傷治癒過程におけるI型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチンの動態を検索した。ラットは上顎口蓋側歯肉を剥離し、その後根面を削除した。術後、1, 3, 4, 5, 7, 14, 28, 56日後に屠殺、I型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチンの局在は間接蛍光抗体法にて観察した。その結果、①肉芽組織に一致してIII型コラーゲン、フィブロネクチンは、I型コラーゲンに比較して強陽性に認められた。②結合組織線維が削除した根面に対し平行に走行するときには、その根面に沿ってフィブロネクチンの局在が認められ、さらにその線維に一致してI型コラーゲンが観察された。また再付着所見が認められるときには根面にフィブロネクチンは認められず、付着する線維に一致してIII型コラーゲンが観察された。以上のことから、線維性付着の再生に際しIII型コラーゲンは、I型コラーゲンに先行し、その足場を形成していることが示唆された。

索引用語: I型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチン、創傷治癒、フラップ手術

結 言

炎症性病変により破壊された歯周組織の回復を期待する治療方法のひとつに歯周外科治療がある。歯周外科治療後の創傷治癒過程に関しては、従来から多くの病理組織学的研究がなされている。さらに、歯周外科治療により新たに再構成される歯周組織の形態と機能の回復状態を把握することは、術後の予後の判定にとって重要と考えられる。

これまで創傷治癒過程は、皮膚^{1,2)}、筋肉³⁾、腱^{4,5)}、角膜⁶⁾それに歯周組織⁷⁻⁹⁾と多くの組織において研究報告されてきた。とくに歯周組織の創傷治癒過程では、根面に付着する細胞(上皮由来の細胞、歯肉結合組織由来の細胞、骨由来の細胞、歯根膜由来の細胞)により治癒形態が決定されるといわれており¹⁰⁾、各々の細胞に対する再生能が検索されている。

一方、結合組織は、細胞と細胞外基質から構成されている。細胞と細胞外基質の相互作用は、組織の形態と維持にとって不可欠である。さらに細胞外基質は、細胞の接着、移動、分化、形質発現を調節する動的構造物であり、創傷治癒過程における細胞と細胞外基質との相互作用を知することは重要と考えられる。この細胞外基質を構成する分子群は、大きくコラーゲン群、プロテオグリカン群、フィブロネクチンやラミニンなどの非コラーゲン性糖タンパク質群、エラスチン群の4つに大別できる¹¹⁾。

I型コラーゲンは、生体内の全コラーゲンのほぼ90%を占め皮膚、腱、骨、歯(象牙質)、動脈壁、肝、腎、肺、角膜など広く組織中に分布している。生体内

においてIII型コラーゲンは、I型コラーゲンより細い線維を形成し、皮膚、動脈壁、肝、腎、肺などI型コラーゲンと共存しているが、骨、腱、では微量である。さらにIII型コラーゲンは、I型コラーゲンに比較し幼弱な組織中に占める割合は多く、組織の成熟にともないI型コラーゲンの割合が多くなる。

フィブロネクチンは、線維芽細胞、血管内皮細胞、マクロファージにより合成、分泌される分子量22万のサブユニットからなる接着性糖タンパク質である。またフィブロネクチンは、2量体からなる血漿性フィブロネクチンと多量体からなる細胞性フィブロネクチンの2種類が存在し、両者の化学的組成、構造、抗原性、生物学的機能は、近似している¹²⁾。その機能は、細胞と細胞、細胞と基質の接着¹²⁻¹⁵⁾、走化性¹⁶⁻¹⁹⁾、分化²⁰⁾、創傷治癒²¹⁻²³⁾、血液凝固^{24,25)}など多彩な生物学的機能を示すことが知られている。

これまで創傷治癒過程におけるコラーゲン、フィブロネクチンの動態については、多くの研究が行われている^{3,4,21,23,26-28)}。しかし、歯周組織の創傷治癒過程におけるI型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチンの動態と相互作用に関する研究は、比較的少ない。そこで本研究は、ラットに実験的フラップ手術(歯肉剥離搔爬手術)を行い創傷治癒過程におけるI型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチンの局在と推移とを間接蛍光抗体法を用いて観察した。さらに、創傷治癒過程における型別コラーゲンと、フィブロネクチンとの相互作用について検討を加えた結果をここに報告する。

実験材料および実験方法

1. 実験動物

ウィスター系雄性ラット（日本クレア社製，東京）7週齢（200～220 g）40匹を1週間，固型飼料CE-2®（日本クレア社製，東京）と水道水とで順応飼育し実験に供した。

2. 実験方法

ラットをソムノベンチル®（Pitman Moore 社製，U.S.A.）0.5 ml/kg の腹腔内投与にて全身麻酔後，背位で開口固定した。次いで上顎左側第一臼歯から第三臼歯にかけて口蓋側歯肉に，No. 12 の外科用替え刃メスにて歯肉溝切開を加え，歯科用エキスカベーターを用い粘膜骨膜弁にて剥離を行った。剥離後，露出した根面の歯根膜およびセメント質を除去する目的で，#1/2 のラウンドバーを用い根面を削除した。その後，削屑を滅菌生理食塩液にて洗浄し，歯肉弁を復位した。なお，上顎右側口蓋側の歯周組織は，無処置で対照側とした。術後，1日，3日，4日，5日，7日，14日，28日，56日後に各群5匹を一群として経日的に屠殺した。

3. 病理組織学的検索

屠殺後，直ちに上顎を摘出，10% 中性緩衝ホルマリンにて浸漬固定，EDTA にて脱灰，通法に従いパラフィン包埋を行った。病理組織切片は，厚さ3 μ m の頬舌の連続切片を作製し，Hematoxyline-eosin 染色（H-E 染色），Masson-trichrome 染色を行い病理組織的变化を検索した。また，I 型コラーゲン，III 型コラーゲン，フィブロネクチンの検索には間接蛍光抗体法を用いた（図1）。

4. 免疫組織化学的検索

1) 抗I型コラーゲン血清を用いた間接蛍光抗体法
作製した組織切片は，脱パラフィン後，蒸留水にて洗浄し，抗原性の賦活化のため，0.01 N HCl 溶液にペプシン（和光純薬社製，大阪）を加え0.4% としたペプシン溶液を37°C，20 分間反応させた。0.01 M リン酸緩衝生理食塩液（以下 PBS と略す）pH 7.2 にて5 分間3 回洗浄後，非特異的反応を減少させるため，PBS に卵白アルブミン（Difco 社製，U.S.A.）を加え1% としたアルブミン溶液を室温にて10 分間反応させた。さらに PBS にて5 分間3 回洗浄後，第一抗体としてウサギ抗ラットテール I 型コラーゲン血清（PBS にて1,000 倍希釈，アドバンス社製，東京）と4°C，24 時間反応させた。ついで PBS にて5 分間3 回洗浄し，

第二抗体として Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識ヤギ抗ウサギ IgG 血清（PBS にて100 倍希釈，Cappel 社製，U.S.A.）と37°C，60 分間反応させた。PBS にて5 分間3 回洗浄後，切片を Gel/Mount®（BIO-MEDA 社製，U.S.A.）で封入し，落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

2) 抗III型コラーゲン血清を用いた間接蛍光抗体法
作製した組織切片は，脱パラフィン後，蒸留水にて洗浄し，抗原性の賦活化のため，0.01 N HCl 溶液にペプシン（和光純薬社製，大阪）を加え0.4% としたペプシン溶液を37°C，20 分間反応させた。PBS にて5 分間3 回洗浄後，非特異的反応を減少させるため，PBS に卵白アルブミン（Difco 社製，U.S.A.）を加え1% としたアルブミン溶液を室温にて10 分間反応させた。さらに PBS にて5 分間3 回洗浄後，第一抗体としてヤギ抗ヒト・ウシIII型コラーゲン血清（PBS にて1,000 倍希釈，Southern Biotechnology Associates 社製，U.S.A.）と4°C，24 時間反応させた。ついで PBS にて5 分間3 回洗浄し，第二抗体として FITC 標識ウサギ抗ヤギ IgG 血清（PBS にて200 倍希釈，ZYMED LABORATORIES 社製，U.S.A.）と37°C，60 分間反応させた。PBS にて5 分間3 回洗浄後，切片を Gel/Mount®（BIO-MEDA 社製，U.S.A.）で封入し，落射型蛍光顕微鏡にて観察した。

3) 抗フィブロネクチン血清を用いた間接蛍光抗体法

作製した組織切片は，脱パラフィン後，PBS にて洗浄し，抗原性の賦活化のため，PBS にトリプシン（Difco 社製，U.S.A.）を加え0.1% としたトリプシン溶液を37°C，30 分間反応させた。PBS にて5 分間3 回洗浄後，非特異的反応を減少させるため，PBS に卵白アルブミン（Difco 社製，U.S.A.）を加え1% としたアルブミン溶液を室温にて10 分間反応させた。さらに PBS にて5 分間3 回洗浄後，第一抗体としてウサギ抗ウシフィブロネクチン血清²⁹⁾（PBS にて1,000 倍希釈）と4°C，24 時間反応させた。ついで PBS にて5 分間3 回洗浄し，第二抗体として FITC 標識ヤギ抗ウサギ IgG 血清（PBS にて100 倍希釈，Cappel 社製，U.S.A.）と37°C，60 分間反応させた。PBS にて5 分間3 回洗浄後，切片を Gel/Mount®（BIO-MEDA 社製，U.S.A.）で封入し，落射型蛍光顕微鏡にて観察した（図1）。

5. 抗血清の特異性の検定

抗血清の特異性は，ウェスタンブロット法（図2）および Enzymelinked immunosorbent assay（以下，

図 1 実験概要

ELISA 法と略す。図 3) により検定した。

1) 抗 I 型コラーゲン血清の検定

抗Ⅰ型コラーゲン血清の特異性は、Ⅰ型コラーゲン、Ⅱ型コラーゲン、Ⅲ型コラーゲン、Ⅳ型コラーゲン、Ⅴ型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンと抗Ⅰ型コラーゲン血清が交叉反応を示すかどうかを調べた。

ウェスタンブロット法では、Laemmli 法³⁰⁾に準じ、4~20% の濃度勾配を有する SDS-PAG プレート 4/20®(第一化学薬品社製、東京)を用いて抗原を分離した。分離した抗原をさらに電気泳動により(10 V/cm 定電圧) 3 時間通電し、ニトロセルロース膜(VIO-RAD 社製、U.S.A.)へ転写した。これに抗血清を用いた免疫染色、あるいはコロイド性金粒子溶液を用い

たタンパク質染色を行った。

抗血清を用いた免疫染色では、ニトロセルロース膜を 0.01% Tween 20-Saline にて洗浄後、0.01% Tween 20-Saline に卵白アルブミン (Difco 社製, U.S.A.) を加え 1% としたアルブミン溶液と室温にて 15 分間反応させた。さらに、第一抗体として抗 I 型コラーゲン血清 (50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline 緩衝液にて 1,000 倍希釈) と 4°C, 24 時間反応させた。ついで 0.01% Tween 20-Saline にて 5 分間 3 回洗浄後、第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 血清 (50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline 緩衝液にて 1,000 倍希釈, Cappel 社製, U.S.A.) と 37°C, 1 時間反応させた。その後、0.01% Tween 20-Saline にて洗浄し、0.04% の 3,3'-ジアミノベンチ

図2 ウェスタンブロット法による抗体の特異性の検
定法

ジン四塩酸塩(以下 DAB と略す, Dotite 社製, U.S.A.)と 0.003% の H_2O_2 を含む 50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline 緩衝液に浸し発色させた。バンドが発色した時点で蒸留水にて洗浄, 反応を停止させた。その結果, 抗 I 型コラーゲン血清は, I 型コラーゲンとのみ交叉し, 他のものとは交叉反応を示さなかった。

一方, コロイド性金粒子溶液を用いたタンパク質染色では, ニトロセルロース膜を 0.3% Tween 20 を含む PBS にて十分洗浄, その後蒸留水にて洗浄, コロイド性金粒子溶液である Aurodyne®(JANSSEN PHARMACEUTICA 社製, U.S.A.) と 4°C, 12 時間反応させた (図 4)。

ELISA 法では, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるように 0.1

M ホウ酸緩衝液 (pH 8.2) に溶解した各抗原を, 96 穴マイクロタイタープレート (CORNING 社製, U.S.A.) の各ウェルに 100 μl ずつ加え, 4°C, 24 時間インキュベートし, 抗原をコーティングした。使用前に 0.05% Tween 20-Saline にて 5 回洗浄, その後, 抗 I 型コラーゲン血清 (50 mM-PBS-0.05% Tween 20 緩衝液, pH 7.1 にて 1,000 倍希釈) を各ウェルに 100 μl ずつ加え, 37°C, 2 時間反応させた。ついで 0.05% Tween 20-Saline にて 5 回洗浄, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 血清 (50 mM-PBS-0.05% Tween 20 緩衝液, pH 7.1 にて 1,000 倍希釈, Cappel 社製, U.S.A.) と 37°C, 1 時間反応させた。ついで 0.05% Tween 20-Saline にて 5 回洗浄後, 0.04% の α -フェニレンジ

図 3 ELISA 法による抗体の特異性の検定法

アミンを含む 50 mM クエン酸緩衝液 (pH 4.9) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え反応させた。反応後, ただちに 1 N H_2SO_4 溶液 50 μ l を各ウェルに加え反応を停止させた。その後, マイクロプレートリーダー (東ソー社製, 東京) を用いて, 各ウェルの 492 nm における吸光度 (OD_{492}) を測定した。その結果, 抗 I 型コラーゲン血清は, I 型コラーゲンとのみ交叉し, 他のものとは交叉反応を示さなかった (図 5)。

2) 抗 III 型コラーゲン血清の検定

抗 III 型コラーゲン血清の特異性は, I 型コラーゲン, II 型コラーゲン, III 型コラーゲン, IV 型コラーゲン, V 型コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニンと抗 III 型コラーゲン血清が交叉反応を示すかどうかを調べた。

ウェスタンブロット法は, 抗 I 型コラーゲン血清の検定と同様に行い, 第一抗体として, 抗 III 型コラーゲン血清 (50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline

緩衝液にて 1,000 倍希釈) と 4℃, 24 時間反応させた。ついで第二抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG 血清 (50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline 緩衝液にて 1,000 倍希釈, ZYMED LABORATORIES 社製, U.S.A.) と 37℃, 1 時間反応させた。その結果, 抗 III 型コラーゲン血清は, III 型コラーゲンとのみ交叉し, 他のものとは交叉反応を示さなかった。

一方, コロイド性金粒子溶液を用いたタンパク質染色は, 抗 I 型コラーゲン血清の検定と同様に行った (図 6)。

ELISA 法では, 抗 I 型コラーゲン血清の検定と同様に行い, 第一抗体として抗 III 型コラーゲン血清 (50 mM-PBS-0.05% Tween 20 緩衝液, pH 7.1 にて 1,000 倍希釈) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え, 37℃, 2 時間反応させた。ついで第二抗体として, ペルオキシダーゼ標識抗ヤギ IgG 血清 (50 mM-PBS-0.05% Tween 20 緩衝液, pH 7.1 にて 1,000 倍希釈, ZYMED

図4 ウェスタンブロット法による抗I型コラーゲン血清の特異性の検定結果

金コロイド粒子によるタンパク質染色

A. I型コラーゲン

抗I型コラーゲン血清による免疫染色

1. I型コラーゲン 5. V型コラーゲン
2. II型コラーゲン 6. フィブロネクチン
3. III型コラーゲン 7. ラミニン
4. IV型コラーゲン

LABORATORIES 社製, U.S.A.)と 37°C, 1時間反応させた。その結果, 抗III型コラーゲン血清は, III型コラーゲンとのみ交叉し, 他のものとは交叉反応を示さなかった (図7)。

3) 抗フィブロネクチン血清の検定

抗フィブロネクチン血清の特異性は, I型コラーゲン, II型コラーゲン, III型コラーゲン, IV型コラーゲン, V型コラーゲン, フィブロネクチン, ラミニンと抗フィブロネクチン血清が交叉反応を示すかどうかを調べた。

ウェスタンブロット法は, 抗I型コラーゲン血清の検定と同様に行い, 第一抗体として, 抗フィブロネクチン血清 (50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline 緩衝液にて 1,000 倍希釈) と 4°C, 24 時間反応させた。ついで第二抗体として, ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 血清 (50 mM-Tris HCl-0.01% Tween 20-Saline 緩衝液にて 1,000 倍希釈, Cappel 社製, U.S.A.) と 37°C, 1時間反応させた。その結果, 抗フィブロネクチン血清は, フィブロネクチンとのみ交叉し, 他のものとは交叉反応を示さなかった。

一方, コロイド性金粒子溶液を用いたタンパク質染色は, 抗I型コラーゲン血清の検定と同様に行った (図8)。

ELISA 法では, 抗I型コラーゲン血清の検定と同様に行い, 第一抗体として, 抗フィブロネクチン血清 (50 mM-PBS-0.05% Tween 20 緩衝液, pH 7.1 にて 1,000 倍希釈) を各ウェルに 100 μ l ずつ加え, 37°C,

図5 ELISA 法による抗I型コラーゲン血清の特異性の検定結果

図6 ウェスタンブロット法による抗Ⅲ型コラーゲン血清の特異性の検定結果
金コロイド粒子によるタンパク質染色
A. Ⅲ型コラーゲン
抗Ⅲ型コラーゲン血清による免疫染色
1. Ⅰ型コラーゲン 5. Ⅴ型コラーゲン
2. Ⅱ型コラーゲン 6. フィブロネクチン
3. Ⅲ型コラーゲン 7. ラミニン
4. Ⅳ型コラーゲン

図7 ELISA法による抗Ⅲ型コラーゲン血清の特異性の検定結果

2時間反応させた。ついで第二抗体として、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 血清 (50 mM-PBS-0.05% Tween 20 緩衝液, pH 7.1 にて 1,000 倍希釈, Cappel 社製, U.S.A.) と 37°C, 1 時間反応させた。その結果, 抗フィブロネクチン血清は, フィブロネクチンとのみ交叉し, 他のものとは交叉反応を示さなかった (図 9)。

実験結果

1. 対照側

1) 対照側 (無処置) の所見

全実験期間を通じ, 接合上皮の根尖側端はセメント・エナメル境に位置し, 上皮の根尖側への進行増殖は認められなかった。歯肉結合組織では, 上皮直下にわずかな炎症性細胞浸潤が認められた。しかし毛細血管の拡張, 充血などの炎症性変化は, 観察されなかった。結合組織線維は正常な配列を示していた (図 10)。

I 型コラーゲンの局在は, 上皮内には認められず, 歯肉結合組織においては血管壁および結合組織線維の走行に沿って全層にわたり均一な陽性所見が認められた。歯根膜においても線維の走行に沿って観察された。歯槽骨においては, 骨小腔と骨小管を取り巻く骨層板と層板構造を取らない線維性骨に I 型コラーゲンの陽性所見が弥漫性に認められた。象牙質においては, 象牙細管に I 型コラーゲンの陽性所見が観察された。しかしセメント質においては, I 型コラーゲンの陽性所見は認められなかった (図 11)。

図8 ウェスタンブロット法による抗フィブロネクチン血清の特異性の検定結果
金コロイド粒子によるタンパク質染色

A. フィブロネクチン

抗フィブロネクチン血清による免疫染色

1. I型コラーゲン 5. V型コラーゲン
2. II型コラーゲン 6. フィブロネクチン
3. III型コラーゲン 7. ラミニン
4. IV型コラーゲン

図9 ELISA法による抗フィブロネクチン血清の特異性の検定結果

III型コラーゲンの局在は、上皮内には認められず、歯肉結合組織において血管壁および結合組織線維の走行に沿って全層にわたり陽性所見が認められ、とくに上皮直下の歯肉結合組織において強く観察された。歯根膜においても線維の走行に沿って観察され、とくにセメント質に沿った線維性付着部位では根面に垂直に配列した細い線維に沿って強く観察された。歯槽骨においてIII型コラーゲンは、骨小腔と骨小管を取り巻く骨層板と層板構造を取らない線維性骨において認められなかった。一方、骨小腔と骨小管の内側に位置する骨内膜に一致してIII型コラーゲンの局在が認められた。象牙質におけるIII型コラーゲンの局在は、象牙細管およびセメント質において観察されなかった(図12)。

フィブロネクチンの局在は、歯肉上皮内には認められず、上皮直下の基底膜および血管壁に線状に観察された。歯肉結合組織および歯根膜においては結合組織の走行に沿って、さらに歯槽骨骨頂部の歯槽膜に沿って認められた。歯槽骨においてフィブロネクチンは、骨小腔と骨小管を取り巻く骨層板と層板構造を取らない線維性骨において認められなかった。

象牙質においてフィブロネクチンの局在は、象牙細管および根面セメント質に沿った付着部位において認められなかった(図13)。

2. 実験例

1) 術後1日経過の所見

剝離した歯肉縁では、歯肉上皮の歯根方向への進行増殖がわずかに観察された。創傷部に存在する線維素

性滲出物には、その表層に高度の多形核白血球の集積が認められた。歯肉結合組織においては、血管の拡張、浮腫性変化が高度に観察され、炎症性細胞の浸潤も弥漫性に認められた（図 14）。

I 型コラーゲンは、剝離部分に存在する線維素性滲出物中には認められなかった。歯肉結合組織および歯根膜において I 型コラーゲンの陽性所見は、対照側と同様に配列の乱れた結合組織線維と拡張した血管周囲に認められた。また、セメント質を削除し露出した象牙質面に沿って I 型コラーゲンの陽性所見が観察された（図 15）。

III 型コラーゲンは、剝離部分に存在する線維素性滲出物中には観察されなかった。創傷表面に接する歯肉結合組織および歯根膜において III 型コラーゲンの強い反応を示す陽性所見が認められた。しかし、セメント質を削除し露出した象牙質面には、III 型コラーゲンの局在は認められなかった（図 16）。

フィブロネクチンの局在は、剝離した創傷部の表面および線維素性滲出物において強陽性に認められた。歯肉結合組織においては、フィブロネクチンは、再生上皮直下の浮腫性変化の強い部位に結合組織線維の走行に沿って強く観察された。また、拡張した血管壁にもフィブロネクチンは対照側と比較して強く認められた（図 17）。

2) 術後 3 日経過の所見

再生した上皮は、根面付近に達するようになり、さらに根面に沿って歯冠側方向に伸展、増殖するのが認められた。この再生した上皮は、層状ではあるものの、不規則な構造を呈していた。根面付近の上皮下には、線維素性滲出物が継続して観察された。歯肉結合組織においては、浮腫性変化は消退し、炎症性細胞浸潤の減少が認められた。さらに、線維芽細胞の増生、結合組織線維の再生が軽度で認められた（図 18）。

I 型コラーゲンは、再生した上皮下に存在する線維素性滲出物中において認められなかった。歯肉結合組織および歯根膜の創傷部の表面に沿って I 型コラーゲンは、術後 1 日に比べ強く観察された（図 19）。

III 型コラーゲンは、創傷面に沿った歯肉結合組織および歯根膜において陽性に認められた。上皮下には線維素性滲出物の残存が認められ、III 型コラーゲンの特異蛍光を示す細い線維が認められた（図 20）。

フィブロネクチンは、再生した上皮の基底膜と再生した上皮下に残存する線維素性滲出物に一致して、強陽性に認められた。歯肉結合組織におけるフィブロネ

クチンは、浮腫性変化の消退にともない特異蛍光は減弱した（図 21）。

3) 術後 4 日経過の所見

根面に達した上皮は、いまだ不規則な構造を呈し根尖側方向に深行増殖するのが認められた。歯肉結合組織においては、線維芽細胞の増加と線維の再生が観察された。歯肉結合組織内では、軽度の血管の拡張と浮腫性変化の消退が認められた（図 22）。

I 型コラーゲンは、歯肉結合組織および歯根膜において、創傷面に沿った既存の歯肉結合組織および歯根膜より幼弱な歯肉結合組織に向かう線維が観察され、その線維に一致して I 型コラーゲンが観察された（図 23）。

創傷部の歯肉結合組織および歯根膜表面において III 型コラーゲンの反応は、強く観察された。また、同部位より幼弱な歯肉結合組織に向かう線維が観察され、その細い線維に一致して III 型コラーゲンの強い反応が認められた（図 24）。

フィブロネクチンは、再生した上皮下の幼弱な歯肉結合組織に弥漫性に、強い反応が認められた（図 25）。

4) 術後 5 日経過の所見

再生した上皮は、根面付近においてその厚さを増し、歯肉溝の形態も観察されるようになった。歯肉結合組織においては、根面付近に線維芽細胞を主体とする細胞成分に富んだ線維の再生が観察された。また、歯肉結合組織内の浮腫性変化は認められなくなった（図 26）。

I 型コラーゲンは、歯肉結合組織および歯根膜において、対照側と同様に認められた。再生した上皮下の細胞成分に富んだ組織において I 型コラーゲンは、術後 4 日に比較し広範囲に陽性に認められた（図 27）。

III 型コラーゲンは、再生した歯肉上皮下の細胞成分に富んだ組織において I 型コラーゲンに比較し、細い線維に沿って強く観察された（図 28）。

フィブロネクチンの局在は、歯肉上皮下の細胞成分の豊富な結合組織成分に一致して弥漫性に認められた（図 29）。

5) 術後 7 日経過の所見

術後 5 日と比較して、歯肉溝上皮および接合上皮の形態は、その構造が明瞭となり、歯肉溝の形態も正常に近い所見となった。根面付近に再生された歯肉結合組織では線維成分の増加、線維芽細胞の減少が認められた（図 30）。

I 型コラーゲンは、術後 5 日と比較して再生した歯

図 10 対照側（無処置）の所見
×25 (H-E 染色)

図 11 対照側（無処置）の所見
×25 (I型コラーゲンの局在)

肉結合組織線維に沿って広範囲に認められ、増加する傾向が観察された（図 31）。

Ⅲ型コラーゲンは、Ⅰ型コラーゲンと比較し、再生した上皮下の細胞成分の豊富な歯肉結合組織において、配列の乱れた歯肉結合組織線維に沿って強い反応を示した（図 32）。

フィブロネクチンは、術後 5 日と同様に幼弱な細胞成分の豊富な歯肉結合組織に彌漫性の陽性所見を示した（図 33）。

6) 術後 14 日経過の所見

歯肉溝上皮および接合上皮は、再生され正常な構造を示した。再生した歯肉結合組織には、結合組織線維束の形成が認められたが、その配列は不規則であり、

細胞成分も多数混在していた。歯根膜およびセメント質の再生所見は、観察されなかった（図 34）。

Ⅰ型コラーゲンは、歯肉結合組織において対照側とほぼ同様の特異蛍光を示したが、Ⅰ型コラーゲンに一致して認められる線維の走行は、いまだ不規則に観察された。根面部分では、削除した根面に沿ってⅠ型コラーゲンの陽性所見が認められた（図 35）。

Ⅲ型コラーゲンは、上皮直下の歯肉結合組織において、対照側と同様強い陽性所見が認められた。歯肉結合組織において、対照側と同様に線維の走行に沿ってⅢ型コラーゲンが観察された（図 36）。

フィブロネクチンの局在は、根面付近の細胞成分の比較的豊富な結合組織線維の配列が不規則な部分に、

図 12 対照側（無処置）の所見
×25（Ⅲ型コラーゲンの局在）

図 13 対照側（無処置）の所見
×25（フィブロネクチンの局在）

弥漫性に観察された（図 37）。

7) 術後 28 日経過の所見

歯肉溝上皮、接合上皮および歯肉結合組織は、ほぼ対照側と同様の状態まで再生された。しかし、削除した根面部分においては、結合組織線維は根面に対して平行に走行し、セメント質および歯根膜の再生は観察されなかった（図 38）。

I 型コラーゲンは、歯肉結合組織において対照側とほぼ同様に観察された。しかし、削除した根面部分では、削除した根面および根面に平行に走行する結合組織線維に沿って I 型コラーゲンの陽性所見が認められた（図 39）。

Ⅲ型コラーゲンは、歯肉結合組織において対照側と

ほぼ同様に線維の走行に沿って観察された。一方、削除した根面および根面に平行に走行する結合組織線維には、Ⅲ型コラーゲンの弱い特異蛍光を示す反応が観察された（図 40）。

フィブロネクチンは、対照側とほぼ同様に観察された。しかし、根面部分では、根面に平行に走行する結合組織線維に沿ってフィブロネクチンの陽性所見が認められた（図 41）。

8) 術後 56 日経過の所見

歯肉溝上皮、接合上皮および歯肉結合組織は、対照側とほぼ同様な状態に再生された。根面部分においては、根尖側よりの部分で、根面に対して結合組織線維が垂直に走行する所見が認められた。しかし、上皮直

図 14 術後1日経過の所見

a : $\times 25$ (H-E 染色) b : $\times 50$ (Masson trichrome 染色)

図 15 術後1日経過の I 型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

削除した根面に沿って I 型コラーゲンが認められる (矢印)。

図 16 術後1日経過のⅢ型コラーゲンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 17 術後1日経過のフィブロネクチンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 18 術後 3 日経過の所見

a : ×25 (H-E 染色) b : ×50 (Masson trichrome 染色)

図 19 術後 3 日経過の I 型コラーゲンの局在

a : ×25 b : ×50

図 20 術後3日経過のⅢ型コラーゲンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 21 術後3日経過のフィブロネクチンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 22 術後 4 日経過の所見

a : $\times 25$ (H-E 染色) b : $\times 50$ (Masson trichrome 染色)

図 23 術後 4 日経過の I 型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 24 術後 4 日経過のⅢ型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 25 術後 4 日経過のフィブロネクチンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 26 術後5日経過の所見

a : ×25 (H-E 染色) b : ×50 (Masson trichrome 染色)

図 27 術後5日経過のI型コラーゲンの局在

a : ×25 b : ×50

図 28 術後5日経過のIII型コラーゲンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 29 術後5日経過のフィブロネクチンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 30 術後 7 日経過の所見
a : ×25 (H-E 染色) b : ×50 (Masson trichrome 染色)

図 31 術後 7 日経過の I 型コラーゲンの局在
a : ×25 b : ×50

図 32 術後 7 日経過のⅢ型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 33 術後 7 日経過のフィブロンectinの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 34 術後 14 日経過の所見

a : ×25 (H-E 染色) b : ×50 (Masson trichrome 染色)

図 35 術後 14 日経過の I 型コラーゲンの局在

a : ×25 b : ×50

図 36 術後14日経過のⅢ型コラーゲンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 37 術後14日経過のフィブロネクチンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 38 術後 28 日経過の所見

a : $\times 25$ (H-E 染色) b : $\times 50$ (Masson trichrome 染色)

結合組織線維が根面と平行に走行している (矢印)。

図 39 術後 28 日経過の I 型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

削除した根面と根面に平行に走行する結合組織線維に沿って I 型コラーゲンが認められる (矢印)。

図 40 術後 28 日経過のⅢ型コラーゲンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 41 術後 28 日経過のフィブロネクチンの局在
a : $\times 25$ b : $\times 50$

根面に沿ってフィブロネクチンが認められる (矢印)。

図 42 術後 56 日経過の所見

a : $\times 25$ (H-E 染色) b : $\times 50$ (Masson trichrome 染色)

結合組織線維が根面に対し垂直に走行している (矢印)。

図 43 術後 56 日経過の I 型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

図 44 術後 56 日経過のⅢ型コラーゲンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

根面に垂直に走行する結合組織線維に沿って
Ⅲ型コラーゲンが認められる (矢印)。

図 45 術後 56 日経過のフィブロネクチンの局在

a : $\times 25$ b : $\times 50$

結合組織線維が根面に対し垂直に走行する部位には、
フィブロネクチンは認められない (矢印)。

下の根面に対しては、結合組織線維は、いまだ平行に走行していた (図 42)。

I 型コラーゲンは、歯肉結合組織において対照側とほぼ同様に観察された。根面部分では、削除した根面および根面に平行に走行する結合組織線維に沿った I 型コラーゲンの反応は、強く観察された。しかし、削除した根面に対して垂直に走行する結合組織線維に沿った I 型コラーゲンの反応は、弱く観察された (図 43)。

III 型コラーゲンは、歯肉結合組織において対照側とほぼ同様に観察された。根面部分では、根面に対して垂直に走行する結合組織線維に III 型コラーゲンは、強い反応で認められた。一方、削除した根面および根面に平行に走行する結合組織線維に沿って III 型コラーゲンの反応は、弱く観察された (図 44)。

フィブロネクチンの局在は、結合組織線維が根面に対して垂直に走行する根尖側よりの部分では、観察されなかった。一方、結合組織線維が根面に対して平行に走行する歯冠側よりの部分では、その結合組織線維の走行に沿って、フィブロネクチンが継続して認められた (図 45)。

考 察

創傷は、正常組織の死滅または統合性の喪失をもたらすようなすべての病的過程をいうが、多くは物理的な力によって生じた組織損傷を指す。創傷治癒は、こうした組織損傷に対する生体の修復反応であり、組織あるいは損傷の種類により、その基本的原理は同じであり、歯周組織もその例外ではない。

Melcher¹⁰⁾ は、歯周組織の創傷治癒は、異なった再生能を有する 4 種の細胞 (上皮由来の細胞、歯肉結合組織由来の細胞、骨由来の細胞、歯根膜由来の細胞) により決定されると述べている。さらに生体は、細胞と細胞外基質で構成されている。細胞外基質は、組織内で活発な代謝を受け、細胞の接着、移動、分化に影響を与えている。したがって、歯周組織の創傷治癒過程において、これらの細胞と細胞外基質における相互作用を知ることは、歯周組織創傷治癒を知るうえに重要と思われる。本研究では、ラット口蓋側歯肉に実験的フラップ手術を行い、生体内全コラーゲンのほぼ 90% を占める I 型コラーゲンと創傷治癒初期および幼弱組織に多く含まれる III 型コラーゲンと、接着性の糖タンパクで多彩な生物機能を有するフィブロネクチ

ンとの創傷治癒過程における局在を、間接蛍光抗体法を用い検索した。

1. 歯肉上皮および歯肉結合組織の治癒について

Fine³¹⁾ によると歯肉結合組織の創傷治癒過程は、組織学的知見より術後 1 時間～3 日の潜伏期、術後 3～20 日の再生期、術後 20 日以降の改造期に分類されるとしている。

1・1 潜伏期の治癒について

潜伏期において、創傷部の組織の欠損部は、離断組織中の断裂した血管より流出した線維素性渗出物により被覆され、その後、血管の拡張と透過性の亢進が見られる。一方、上皮の創縁では、肥厚化した上皮層が創内を横切って移動を始める。

本実験においても術後 3 日まで創傷部に線維素性渗出物の存在が観察され、その線維素性渗出物に沿って上皮細胞が、経時的に移動する所見が観察された。

フィブロネクチンは、活性化された血液凝固第 XIII 因子のもつトランスグルタミナーゼ作用により、フィブリンやコラーゲンと架橋結合 (crosslinking)^{24,25)} するなど血液凝固に関与していることが知られている。一方、コラーゲンにおいても血小板との結合により血小板凝集反応は促進される。Bensusan ら³²⁾ は、血小板にはコラーゲンの受容体が存在し、この受容体は血小板表面のフィブロネクチンそのものであると述べている。また、Chiang と Kang³³⁾ は、血小板表面よりフィブロネクチンそのものとは異なる 6.5 KD のコラーゲン受容体を分離している。本実験においても術後早期 (術後 1 日～3 日) に線維素性渗出物が創傷部に観察され、この線維性渗出物に一致してフィブロネクチンが、強陽性に認められた。一方、同時期の線維素性渗出物に I 型コラーゲン、III 型コラーゲンは認められなかった。このことは、創傷直後に起こる血餅の形成には、おもにフィブロネクチンが関与し、コラーゲンは、創傷部に露出した線維と接する血液の凝固に働くと考えられる。

フィブロネクチンの上皮細胞に対する機能については、*in vitro*^{34～36)}、*in vivo*^{37～39)} において既に多くの報告がある。Clark ら³⁸⁾ は、皮膚における創傷治癒において上皮細胞が、フィブロネクチンを含むマトリックス上を伸展、移動していくと報告している。Woodley ら³⁵⁾ は、*in vitro* においてフィブロネクチン、I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン上では上皮細胞の運動性は促進されると述べている。さらに Stenn ら⁴⁰⁾ は、*in vitro* の結果より、創内への上皮細胞の移動には、コ

ラーゲンの合成が必須であり, L-azetidine-2-carboxylic acid 添加により, コラーゲンの合成を阻害すると, 上皮細胞の移動は阻害されると述べている。さらに上皮細胞をコラーゲンシート上に培養した結果, I型コラーゲン上においてよく接着, 伸展⁴¹⁻⁴⁴⁾し, IV型コラーゲンには, I型コラーゲン, III型コラーゲンに比較しさらに接着すると報告されている⁴⁵⁻⁴⁷⁾。これは正常組織においてI型コラーゲン, III型コラーゲンは, 基底膜成分であるIV型コラーゲンを介して上皮細胞と接しているためと考えられる。しかし, 伸展, 増殖する上皮細胞の直下には, IV型コラーゲンは, 認められないとの報告もある⁴⁸⁾。そこで露出した創面におけるI型コラーゲン, III型コラーゲンと上皮細胞との相互関係が問題となってくる。Lillieら⁴⁹⁾は, 上皮細胞をI型コラーゲンとIII型コラーゲンと基底膜上に培養し, その状態を比較した。その結果, コラーゲン上では細胞の接着と移動は, 基底膜上に比較し緩やかであり, 結果として生ずるコロニーは重層化し分化した。また, それぞれの細胞はコラーゲンゲルの線維に接着し収縮した。さらに, 細胞は, I型コラーゲンゲル上では, 線維の網状構造に変化を示さなかったが, III型コラーゲンゲル上では細胞を中心とし, 放射状の線維構造に変化した。これはI型コラーゲンとIII型コラーゲンとの線維配列の違いによると報告している。本実験では, 上皮は術後3日までの間, フィブロネクチンを含む線維素性滲出物と創傷部に露出したコラーゲンとの間を伸展, 移動するのが観察された。さらに創傷部に露出したコラーゲンでは, I型コラーゲンは, 対照側と同様に観察された。一方, III型コラーゲンは, 創傷面に沿って強陽性に認められた。このことは, 創傷初期(術後1日~3日)の線維素性滲出物に認められるフィブロネクチンが, 上皮細胞の伸展, 移動と, 線維芽細胞, 血管内皮細胞との方向づけのための足場(scaffold)として機能し, 歯肉上皮の再生に作用することが考えられた。さらに基底膜の存在しない再生上皮先端において上皮細胞は, 既存のI型コラーゲン, III型コラーゲン上を伸展, 移動する。さらにIII型コラーゲンは, フィブロネクチン豊富な再生上皮直下において線維配列を変えることにより, 基底膜が再生する間, 上皮と強く接着することが考えられる。

歯肉結合組織においては, コラーゲン線維に対する線維芽細胞の接着, 移動に付随して起こる現象の一つとしてコラーゲンの収縮があり, 創傷治癒過程において, 創の閉鎖に関与すると考えられている^{50,51)}。さらに

線維芽細胞の収縮力は強く, 皮膚においては線維芽細胞の収縮力は, 上皮細胞の収縮力に比べ, 強いと報告されている^{50,51)}。本実験より術後3日になると, 再生した歯肉上皮により創傷部は閉鎖され, 創傷部周囲より線維芽細胞の増加傾向が認められた。しかし, 線維芽細胞の増加傾向の認められた幼弱な結合組織においてI型コラーゲンとIII型コラーゲンとの増加傾向は観察されなかった。したがって創傷初期(術後3日まで)に組織収縮による創の閉鎖には, 線維芽細胞と既存のコラーゲンが関与していると考えられる。

1.2 再生期の治癒について

再生期になると創傷部の炎症反応に続いて創傷部の修復を担当する細胞(上皮細胞, 線維芽細胞, 内皮細胞)の増殖が認められ, 創傷部の閉鎖, 血液供給および基質合成からなる結合組織形成が認められる。さらに創傷治癒過程にある組織では, 正常組織に比較し, 線維芽細胞は増加し, コラーゲン線維の合成は活発に行われている^{1,52)}。本実験においても, 術後4日において上皮は歯根面に達し創傷部の閉鎖が認められた。また上皮下歯肉結合組織では, 線維芽細胞の増殖およびコラーゲン線維の合成が認められた。

Avnur⁵³⁾は, フィブロネクチンを塗布した基質上に線維芽細胞を培養した時, 細胞接着部位のフィブロネクチンが消失することを報告している。さらに線維芽細胞の接着部位からフィブロネクチンが消失するメカニズムとして, 細胞の伸展, 移動という動きに伴う場合と, エンドサイトーシスによる場合との2つが考えられると述べている。またClarkら⁵⁴⁾は, 創傷治癒におけるフィブロネクチンが血漿由来か, 細胞由来か検索する目的で免疫抑制したマウスにラット皮膚を移植した。その結果, 創傷部において, 創傷治癒初期の術後2日~4日では血漿由来のマウス フィブロネクチンが作用し, 術後5日以降は, 細胞由来を示すラットフィブロネクチンの作用が認められたと報告している。本実験結果では, 術後3日より歯肉再生上皮下の結合組織内に線維芽細胞が認められるようになり, フィブロネクチンは, 線維芽細胞の増殖が認められた部位に, 一致して強陽性に認められた。また, 術後4日では, 同部位においてIII型コラーゲンの増加が認められた。このことは, 術後早期に認められる血漿由来のフィブロネクチンが, おもに上皮細胞および線維芽細胞の創傷部への移動に関与していると考えられる。さらに, その後のIII型コラーゲンを中心とするコラーゲン合成からなる肉芽組織の形成には, 創傷部へ遊走

してきた線維芽細胞が分泌する細胞由来のフィブロネクチンが、関与していると考えられる。一方、術後5日を過ぎると創傷部においては、Ⅲ型コラーゲンに加え、Ⅰ型コラーゲンの増加が認められた。線維芽細胞は、二種以上の型のコラーゲンを合成する。しかし、この時期における型の異なったコラーゲンの変化が、同一の細胞のコラーゲン代謝の変化であるか、それとも異なった線維芽細胞の増殖によるものかは定かではない。Hataら^{55,56)}は、ヒト皮膚線維芽細胞を用いて線維芽細胞のコラーゲン代謝が、培地のイオン濃度とその種類に応答して変化すると報告している。つまり培地内にNaClまたは CH_3COONa を添加することによりⅠ型コラーゲン、Ⅲ型コラーゲン合成はともに活性化され、さらにⅢ型コラーゲンの割合はNaCl濃度に依存して増加すると述べている。一方、培地内にKClあるいは CH_3COOK を添加することにより、逆にⅠ型コラーゲン合成は阻害され、Ⅲ型コラーゲン合成が顕著に活性化されるとも報告している。このことは、線維芽細胞の合成するⅠ型コラーゲン、Ⅲ型コラーゲンが独立に調節されていることを示している。本実験において術後4日になるとⅢ型コラーゲンの合成は活発に認められ、その後、術後5日でⅢ型コラーゲンに加え、Ⅰ型コラーゲンの増加傾向が観察された。このことは、術後3日で創傷面が再生上皮により閉鎖された後、幼弱な結合組織においてコラーゲンの代謝が独立して調節されていると考えられる。さらにコラーゲンの代謝調節に関与するものとしては、細胞相互作用、インスリン、コルチコステロイド、上皮細胞成長因子(EGF)、さらにサイクリックAMPなどが考えられる。

1・3 改造期の治癒について

改造期になると再生期までに形成された肉芽組織、結合組織においてコラーゲン代謝をはじめとする組織再構築が起こる。これによりコラーゲン線維は、必要な強度を獲得し正常な組織へと変化する。本実験においても術後28日を過ぎると歯肉溝上皮、接合上皮および歯肉結合組織は、ほぼ対照側と同様の状態まで再生するのが観察された。

コラーゲンと細胞の相互作用については、正常線維芽細胞をコラーゲンゲルと混合して培養したさまざまな研究が行われてきた。その結果、細胞増殖が抑制されコラーゲンゲルが収縮したという報告⁵⁷⁾やコラーゲンゲルの収縮度が細胞の種類によって異なることから細胞の機能の相違を示唆する報告^{50,58)}がある。

これらは正常な組織においては休止期にあるとされる結合組織線維芽細胞の安定性と、創傷部の線維芽細胞の活発な増殖性が肉芽形成後に再び低下することにより、コラーゲン線維が関与している可能性を示している。

さらに歯肉結合組織の成熟化にともない線維芽細胞のコラーゲン合成のturnoverは、しだいに遅くなり⁵⁹⁾、コラーゲンの合成、分解も不活発になる^{59,60)}との報告もある。また、このようなコラーゲンゲルの収縮機構でとくに問題となるのがフィブロネクチンである。フィブロネクチンは、細胞に結合するドメインと、コラーゲンに結合するドメインを有しておりGilleryら⁶¹⁾は、このことよりコラーゲンゲルの収縮にフィブロネクチンが関与していると報告している。一方、吉里ら⁶²⁾はフィブロネクチン血清を含有しない条件下で線維芽細胞の培養を行い、コラーゲンゲルの収縮が正常に起こったことを報告している。このことから、コラーゲンゲルの収縮には、フィブロネクチンは関与せず、細胞とコラーゲンとの直接的結合を含む相互作用が、コラーゲンゲル収縮の基本的メカニズムではないかと述べている。さらにForresterら⁶³⁾は、ラット皮膚の創傷治癒過程における組織の引っ張り強さと可溶性コラーゲンの消長を測定した。可溶性コラーゲンは、コラーゲンの維持構造に重要な架橋結合を含まず⁶⁴⁾代謝活性も高く⁵²⁾架橋結合をとる不溶性コラーゲンの前駆体といわれている⁶⁵⁻⁶⁷⁾。このような可溶性コラーゲンと不溶性コラーゲンとの組織内における変化を測定することは、組織成熟過程を知る上に一つの目安となる。その結果、組織の引っ張り強さは、受傷後150日後も正常値には戻らず、可溶性コラーゲンは、受傷後60日まで増量することを報告した。このことは、受傷後60日までコラーゲンの合成が活発に行われ、幼弱なコラーゲン線維が新生されていることを示している。さらにGrinnell⁶⁸⁾は、フィブロネクチン処理したラテックス粒子が線維芽細胞により活発に貪食されると述べている。本実験において術後28日および術後56日の創傷部結合組織では、Ⅰ型コラーゲン、Ⅲ型コラーゲンおよびフィブロネクチンは対照群と比較し同様に観察された。創傷部結合組織においてフィブロネクチンと親和性の高いⅢ型コラーゲンは⁶⁹⁾、線維芽細胞により貪食されやすい状態にあると考えられる。このことから創傷後期(術後28日、56日)において線維芽細胞は、活発なコラーゲンの合成を行う一方、活発なコラーゲンの貪食を行い、結果としてコラーゲンの絶対

量に変化が認められないものと考えられる。その後、コラーゲンは、強固な架橋結合を持つ線維へと変化してゆくことが考えられる。

2. 根面における治癒について

歯周外科治療を行われた根面においては、歯根膜由来の細胞による結合組織性の治癒すなわち新付着（セメント質の新生を伴う線維性付着）の形態が望まれる。しかし、歯周外科治療を行われた根面において多くは、歯肉上皮細胞の根尖側への深行による長い上皮性の付着の治癒形態をとる⁷⁰⁾。本実験においても術後14日、28日、56日のほとんどの標本において削除した根面に沿って長い上皮性の付着が観察された。

皮膚における創傷治癒において、断裂した上皮は、線維素性滲出物を足場として伸展、遊走し、上皮細胞の先端同志が接合すると、連続性を持った細胞層を形成し、細胞層は厚みを持つてくる。一方、歯周組織においては、断裂した上皮細胞同士が接合することではなく、断裂した上皮細胞は、同一の組織由来の細胞を求め根面に沿って根尖方向へ伸展、移動すると考えられる。さらにフィブロネクチンの上皮細胞に対する機能については、すでに多くの報告³⁴⁻³⁹⁾がされており、本実験結果からも根面に対する上皮細胞の伸展、移動に、フィブロネクチンが関与していることが考えられた。

しかし、創傷治癒の過程で、歯肉上皮細胞の根尖側への深行を排除しても線維性の付着が得られるとは考えられていない。本実験では、創傷治癒の後期（術後28日、56日）において多くの所見で、長い上皮性の付着の根尖側よりにおいて根面に対し平行に走行する結合組織線維が観察された。また同部位において、フィブロネクチンの陽性所見が認められた。

結合組織の創傷治癒過程において創の閉鎖には、線維芽細胞とコラーゲン線維との収縮が関与すると考えられている^{50,58)}。このことは、創傷治癒過程において組織収縮の始まる前の脆弱な組織において上皮細胞は根尖側へ深行増殖し、その後に起こる組織収縮によって根尖側へ深行増殖が抑制されるものと考えられる。したがって結合組織線維が根面に対し平行に走行する部位に認められるフィブロネクチンは、組織収縮によってバランスの保たれた組織においては、組織間隙を満たし組織構築に関与すると考えられる。しかし、炎症により組織収縮のバランスが崩れた時には上皮細胞の根尖側への深行増殖に相乗的に作用することが考えられる。創傷治癒過程で早期に形成され、ばらばらな方向へ向かっていたコラーゲン線維の多くは断裂し、厚

い線維束へと再形成される。この線維束は、形成される際、それぞれが治癒しつつある創に加わる張力線の方に沿って並び、最終的に大きな線維束となって集まり、創傷を受けなかった組織の線維束と同様の外観を呈するようになる⁷¹⁾。歯周組織においては創傷後、咀嚼、咬合において外力が加わりやすく、その為、歯軸方向へ張力が加わることが予想される。よってコラーゲン線維の配列も歯軸と平行の方向に取りやすいと考えられる。さらにフィブロネクチンは、結合組織線維が根面に対し平行に走行している部位に、一致して認められたとの報告もある²⁹⁾。これは本実験結果と一致する。さらに本実験においては、根面に対して平行に走行している結合組織線維に、I型コラーゲンの陽性所見が認められた。このことは、創傷治癒過程で創に加わる張力線が、歯軸方向であり、とくにIII型コラーゲンに比較し太い線維を形成するI型コラーゲンでは、とくに張力線に対する線維配列を取りやすいと考えられる。

一方、根面に対し結合組織線維が垂直に配列しかつセメント質の形成を伴う治癒形態は、歯周組織再生の目標で有り、根面に対し結合組織線維が平行に走行する治癒形態に比較し、強固に根面と結合していると考えられる。さらにフィブロネクチンは、根面に対して、結合組織線維が垂直に配列する線維性付着の部位においては認められず、このことより、フィブロネクチンは、線維性付着を形成するための足場として作用し、線維性付着の形成とともに消退するとの考察もある⁷²⁾。本実験においても術後56日に削除した根面の根尖側部において線維性付着を示す所見が観察され、同部位においてフィブロネクチンの局在は認められなかった。さらに削除した根面に対し垂直に配列する線維にIII型コラーゲンの陽性所見が認められた。本実験結果から全実験期間を通じ、削除した根面には、I型コラーゲンが観察された。さらにI型コラーゲンは、線維芽細胞を引き寄せる走化性因子を有している⁷²⁾。以上のことより、削除した根面に存在するフィブロネクチンと親和性のあるIII型コラーゲン⁶⁹⁾は、根面より露出したI型コラーゲンの周囲を取り巻くことにより線維性付着の足場を築き、その後、より太いI型コラーゲンへの改造現象が起これると考えられる。Nymanら⁷³⁾は、歯肉結合組織由来の肉芽組織は、歯根膜やセメント質の喪失の見られた根面において歯根吸収が認められたと報告しており、線維性付着の再生における歯根膜由来の細胞の重要性を述べている。一方、Kuboki

ら⁷⁴⁾は、口腔組織のコラーゲンの架橋結合の違いについて報告しており、象牙質におけるコラーゲン線維は、歯肉結合組織、歯根膜組織と比較して、線維形成が活発で幼弱な組織であると考察している。本実験では、線維性付着の認められた部位において著明な歯根吸収は観察されなかった。しかし、これらのことから象牙質より露出した幼弱な I 型コラーゲンは、結合組織由来のコラーゲンと結合し線維性の付着を形成する。さらにコラーゲン線維は、線維芽細胞により活発に合成と分解を繰り返すことにより成熟して行く。この過程で象牙質より露出した I 型コラーゲンは、次々と分解され結果として歯根吸収が認められると考えられる。この過程は、歯根膜由来の細胞においても同様に起こると考えられる。しかし、歯根膜由来の細胞の持つセメント質形成能^{7,10)}により線維性の付着部にセメント質の添加を促し歯根吸収を停止するものと考えられる。今後は、線維性の付着部におけるセメント質形成能に、いかなる因子が関与しているか検索する必要があると考えられる。

結 論

歯周組織の創傷治癒過程における I 型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチンの動態を検索する目的で、ラットに実験的フラップ手術を行い、術後 1 日、3 日、4 日、5 日、7 日、14 日、28 日、56 日ごとの I 型コラーゲン、III型コラーゲン、フィブロネクチンの局在を間接蛍光抗体法を用いて観察し、以下の結果を得た。

1. 術後 1 日において線維素性滲出物に一致してフィブロネクチンが観察された。一方、同部位に、I 型コラーゲン、III型コラーゲンは認められなかった。
2. 術後 3～7 日において III 型コラーゲンは、I 型コラーゲンに比較しフィブロネクチンが豊富な再生した歯肉結合組織中において、反応が強く観察された。
3. 再生した歯肉結合組織中のフィブロネクチンは、術後 14 日を過ぎると減少傾向を示した。さらに同部位において I 型コラーゲン、III型コラーゲンは、同様に不規則な走行を示す歯肉結合組織線維に沿って観察された。
4. 根面においては、I 型コラーゲンは、削除した象牙質面に沿ってその反応が強く観察された。
5. 削除した根面に対して平行に結合組織線維が走行しているときには、その根面に沿ってフィブロネク

チンの局在が認められた。さらにその線維に一致して I 型コラーゲンは観察された。

6. 削除した根面に対して垂直に結合組織線維が走行しているときには、その根面に沿ったフィブロネクチンの局在は認められなかった。さらにその線維に一致して III 型コラーゲンは観察された。

以上の結果より、実験的フラップ手術後の歯肉結合組織の創傷治癒過程において、III型コラーゲンは、I 型コラーゲンに先行して組織再構築をはじめ、その後、I 型コラーゲンの出現により組織成熟化へ変化することが示唆された。さらにフィブロネクチンは、これらコラーゲン間を満たすことにより組織構築に関与すると考えられた。

また、根面に対する治癒過程においても III 型コラーゲンは、I 型コラーゲンに先行し線維性付着の足場を形成し、その後、I 型コラーゲンによってより強固に結合することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに当たり、本研究について終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました東京慈恵会医科大学第二解剖学教室石川博教授、ならびに教室関係各位に謹んで感謝の意を表します。

さらに本研究に御支援、御協力を頂きました本学歯周病学教室仲谷 寛講師ならびに先生各位に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Ross, R. and Benditt, E.P.: Wound healing and collagen formation. I. Sequential changes in components of guinea pig skin wounds observed in the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 11: 677-700, 1961.
- 2) Ross, R. and Benditt, E.P.: Wound healing and collagen formation. II. Fine structure in experimental scurvy. *J. Cell. Biol.*, 12: 533-551, 1962.
- 3) Lehto, M., Duance, V.C. and Restall, D.: Collagen and fibronectin in a healing skeletal muscle injury. An immunohistological study of the effects of physical activity on the repair of injured gastrocnemius muscle in the rat. *J. Bone. Joint. Surg.*, 67: 820-828, 1985.
- 4) Fernando, N.V.P. and Movat, H.Z.: Fibrillogenesis in regenerating tendon. *Lab. Invest.*, 12: 214-229, 1963.
- 5) Williams, I.F., McCullagh, K.G. and Silver, I.A.: The distribution of Types I and III collagen and

- fibronectin in the healing equine tendon. *Conn. Tiss. Res.*, 12 : 211-227, 1984.
- 6) Fujikawa, L.S., Foster, C.S., Gipson, I.K. and Colvin, R.B. : Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds : Immunofluorescence and ultrastructural studies. *J. Cell. Biol.*, 98 : 128-138, 1984.
 - 7) Melcher, A.H. : Repair of wounds in the periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Archs. Oral Biol.*, 15 : 1183-1204, 1970.
 - 8) Tonna, E.A., Stall, S.S. and Asiedu, S. : A study of the reformation of severed gingival fibers in aging mice using ^3H -proline autoradiography. *J. Periodontal. Res.*, 15 : 43-52, 1980.
 - 9) Grevstad, H.J. : Collagen deposition during wound repair in rat gingiva. *Scand. J. Dent. Res.*, 96 : 561-568, 1988.
 - 10) Melcher, A.H. : On the repair potential periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
 - 11) Hay, E.D. : Cell Biology of Extracellular Matrix, Hay, E.D. et., Plenum Press, New York, 1981, p. 1-4.
 - 12) Yamada, K.M. and Olden, K. : Fibronectins-adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature*, 275 : 179-184, 1978.
 - 13) Chiquet, M., Puri, E.C. and Turner, D.C. : Fibronectin mediates attachment of chicken myoblasts to a gelatin-coated substratum. *J. Biol. Chem.*, 254 : 5475-5482, 1979.
 - 14) Klebe, R.J. : Isolation of a collagen-dependent cell attachment factor. *Nature*, 250 : 248-251, 1974.
 - 15) Grinnell, F. and Feld, M.K. : Initial adhesion of human fibroblasts in serum-free medium : possible role of secreted fibronectin. *Cell*, 17 : 117-129, 1979.
 - 16) Gauss-Müller, V., Kleinman, H.K., Martin, G.R. and Schiffmann, E. : Role of attachment factors and attractants in fibroblast chemotaxis. *J. Lab. Clin. Med.*, 96 : 1071-1080, 1980.
 - 17) Tsukamoto, Y., Helsel, W.E. and Wahl, S.M. : Macrophage production of fibronectin, a chemoattractant for fibroblasts. *J. Immunol.*, 127 : 673-678, 1981.
 - 18) Norris, D.A., Clark, R.A.F., Swigart, L.M., Huff, J. C., Weston, W.L. and Howell, S.E. : Fibronectin fragment (s) are chemotactic for human peripheral blood monocytes. *J. Immunol.*, 129 : 1612-1618, 1982.
 - 19) Gudewicz, P.W., Molnar, J., Zong Lai, M., Beezhold, D.W., Siefing, G.E. Jr., Credo, R.B. and Lorand, L. : Fibronectin-mediated uptake of gelatin-coated latex particles by peritoneal macrophages. *J. Cell. Biol.*, 87 : 427-433, 1980.
 - 20) Pennypacker, J.P., Hassell, J.R., Yamada, K.M. and Pratt, R.M. : The influence of an adhesive cell surface protein on chondrogenic expression in vitro. *Exp. Cell. Res.*, 121 : 411-415, 1979.
 - 21) Grinnell, F., Billingham, R.E. and Burgess, L. : Distribution of fibronectin during wound healing *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, 76 : 181-189, 1981.
 - 22) Kurkinen, M., Vaheri, A., Roberts, P.J. and Stenman, S. : Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab. Invest.*, 43 : 47-51, 1980.
 - 23) Repesh, L.A., Fitzgerald, T.J. and Furcht, L.T. : Fibronectin involvement in granulation tissue and wound healing in rabbits. *J. Histochem. Cytochem.*, 30 : 351-358, 1982.
 - 24) Mosher, D.F. : Cross-linking of cold-insoluble globulin by fibrin-stabilizing factor. *J. Biol. Chem.*, 250 : 6614-6621, 1975.
 - 25) Mosher, D.F. and Schad, P.E. : Cross-linking of fibronectin to collagen by blood coagulation factor XIII a. *J. Clin. Invest.*, 64 : 781-787, 1979.
 - 26) Gay, S., Martin, G.R., Müller, P.K., Timpl, R. and Kühn K. : Simultaneous synthesis of type I and III collagen by fibroblasts in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 73 : 4037-4040, 1976.
 - 27) Gay, S., Viljanto, J., Raekallio, J. and Penttinen, R. : Collagen types in early phases of wound healing in children. *Acta. Chir. Scand.*, 144 : 205-211, 1978.
 - 28) Kurita, K., Hashimoto, Y., Takei, T., Kawai, T. and Hayakawa, T. : Changes in collagen types during the healing of rabbit tooth extraction wounds. *J. Dent. Res.*, 64 : 28-32, 1985.
 - 29) 仲谷 寛, 鴨井久一 : ラット歯周組織の創傷治癒過程に関する免疫組織学的研究—歯肉剝離搔爬術後のfibronectinとlamininの局在一—. *日歯周誌*, 31 : 462-490, 1989.
 - 30) Laemmli, U.K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680-685, 1970.
 - 31) Fine, A.S. : Biochemistry of wound healing. In *Periodontal Surgery-Biologic Basis and technique*, Stahl, S.S. ed., Charles C. Thomas, Publisher, Springfield Illinois, 1976, p. 42-98.
 - 32) Bensusan, H.B., Koh, T.L., Henry, K.G., Murray, B.A. and Culp, L.A. : Evidence that fibronectin is the collagen receptor on platelet membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75 : 5864-5868, 1978.
 - 33) Chiang, T.M. and Kang, A.H. : Isolation and purification of collagen $\alpha 1(I)$ receptor from human platelet membrane. *J. Biol. Chem.*, 257 : 7581-7586, 1982.
 - 34) Clark, R.A.F., Folkvord, J.M. and Wertz, R.L. : Fibronectin, as well as other extracellular matrix proteins, mediate human keratinocyte adherence. *J. Invest. Dermatol.*, 84 : 378-383, 1985.
 - 35) Woodley, D.T., Bachmann, P.M. and O'keefe, E. J. : Laminin inhibits human keratinocyte migra-

- tion. *J. Cell. Physiol.*, 136 : 140-146, 1988.
- 36) Nishida, T., Nakagawa, S., Awata, T., Ohashi, Y., Watanabe, K. and Manabe, R. : Fibronectin promotes epithelial migration of cultured rabbit cornea *in situ*. *J. Cell. Biol.*, 97 : 1653-1657, 1983.
 - 37) Cheng, C.Y., Martin, D.E., Leggett, C.G., Reece, M. C. and Reese, A.C. : Fibronectin enhances healing of excised wounds in rats. *Arch. Dermatol.*, 124 : 221-225, 1988.
 - 38) Clark, R.A.F., Lanigan, J.M., Della-Pelle, P., Manseau, E., Dvorak, H.F. and Colvin, R.B. : Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization. *J. Invest. Dermatol.*, 79 : 264-269, 1982.
 - 39) Fujikawa, L.S., Foster, C.S., Gipson, I.K. and Colvin, R.G. : Basement membrane components in healing rabbit corneal epithelial wounds : Immunofluorescence and ultrastructural studies. *J. Cell. Biol.*, 98 : 128-138, 1984.
 - 40) Stenn, K.S., Madri, J.A. and Roll, F.J. : Migrating epidermis produces AB₂ collagen and requires continual collagen synthesis for movement. *Nature*, 277 : 229-232, 1979.
 - 41) O'Keefe, E.J., Payne, R.E., Russell, N. and Woodley, D.T. : Spreading and enhanced motility of human keratinocytes on fibronectin. *J. Invest. Dermatol.*, 85 : 125-130, 1985.
 - 42) Liu, S.C. and Karasek, M. : Isolation and growth of adult human epidermal keratinocytes in cell culture. *J. Invest. Dermatol.*, 71 : 157-162, 1978.
 - 43) Hawley-Nelson, P., Sullivan, J.E., Kung, M., Hennings, H. and Yuspa, S.H. : Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. *J. Invest. Dermatol.*, 75 : 176-182, 1980.
 - 44) Kariniemi, A.L., Lehto, V.P., Vartio, T. and Virtanen, I. : Cytoskeleton and pericellular matrix organization of pure adult human keratinocytes cultured from suction-blister roof epidermis. *J. Cell. Sci.*, 58 : 49-61, 1982.
 - 45) Kleinman, H.K., Murray, J.C., McGoodwin, E.B. and Martin, G.R. : Connective tissue structure : Cell binding to collagen. *J. Invest. Dermatol.*, 71 : 9-11, 1978.
 - 46) Terranova, V.P., Rohrbach, D.H. and Martin, G. R. : Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell*, 22 : 719-726, 1980.
 - 47) Murray, J.C., Stingl, G., Kleinman, H.K., Martin, G.R. and Katz, S.I. : Epidermal cells adhere preferentially to type IV (basement membrane) collagen. *J. Cell. Biol.*, 80 : 197-202, 1979.
 - 48) Stanley, J.R., Alvarez, O.M., Bare, E.W., Eaglstein, W.H. and Katz, S.I. : Detection of basement membrane zone antigens during epidermal wound healing in pigs. *J. Invest. Dermatol.*, 77 : 240-243, 1981.
 - 49) Lillie, J.H., MacCallum, D.K. and Jepsen, A. : The behavior of subcultivated stratified squamous epithelial cells on reconstituted extracellular matrices : Initial interactions. *Eur. J. Cell. Biol.*, 29 : 50-60, 1982.
 - 50) Bellows, C.G., Melcher, A.H. and Aubin, J.E. : Contraction and organization of collagen gels by cells cultured from periodontal ligament, gingiva and bone suggest functional differences between cell types. *J. Cell. Sci.*, 50 : 299-314, 1981.
 - 51) Harris, A.K., Stopak, D. and Wild, P. : Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290 : 249-251, 1981.
 - 52) 堀 隆弘 : コラーゲンと疾患. 「コラーゲン」野田春彦, 永井 裕, 藤本大三郎 (編), 南江堂, 東京・京都, 1975, p 207-250.
 - 53) Avnur, Z. and Geiger, B. : The removal of extracellular fibronectin from areas of cell-substrate contact. *Cell*, 25 : 121-132, 1981.
 - 54) Clark, R.A.F., Winn, H.J., Dvorak, H.F. and Clovin, R.B. : Fibronectin beneath reepithelializing epidermis *in vivo* : Sources and significance. *J. Invest. Dermatol.*, 80 : 26_s-30_s, 1983.
 - 55) Hata, R., Sunada, H. and Nagai, Y. : Sodium ion modulates collagen types in human fibroblastic cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 117 : 313-318, 1983.
 - 56) Hata, R., Sunada, H. and Arai, K. : Reciprocal effects of excess potassium salts in the culture medium on type I and type III collagen synthesis by human skin fibroblasts. *Cell Biol. Int. Rep.*, 8 : 433-440, 1984.
 - 57) Bell, E., Ivarsson, B. and Merrill, C. : Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76 : 1274-1278, 1979.
 - 58) Harris, A.K., Stopak, D. and Wild, P. : Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis. *Nature*, 290 : 249-251, 1981.
 - 59) Kao, K.Y.T., Hilker, D.M. and McGavack, T.H. : Connective tissue. V. Comparison of synthesis and turnover of collagen and elastin in tissues of rat at several ages. *Proc. Soc. Exp. Bio. Med.*, 106 : 335-338, 1961.
 - 60) Schneir, M., Furuto, D. and Berger, K. : Collagens of oral soft tissues. I. The influence of age on the synthesis and maturation of collagen in rat palatal mucosa as determined *in vitro*. *J. Periodont. Res.*, 11 : 235-241, 1976.
 - 61) Gillery, P., Maquart, F.X. and Borel, J.P. : Fibronectin dependence of the contraction of collagen lattices by human skin fibroblasts. *Ext. Cell. Res.*, 167 : 29-37, 1986.
 - 62) 吉里勝利 : 人工皮膚, 細胞, 20 : 213-216, 1988.
 - 63) Forrester, J.C., Zederfeldt, B.H., Thomas, L.H. and

- Thomas, K.H. : Mechanical, biochemical and architectural features of repair. in Repair and regeneration, 1969, p. 71-85.
- 64) Page, R.C. : Macromolecular interactions in the connective tissues of the periodontium. In Developmental Aspects of Oral Biology, ed. Slavkin, H.C. and Bavetta, L.A., Academic Press, New York and London, 1972, p. 292-308.
- 65) From, S.H. and Schultz-Hautt, S.D. : Comparative histological and microchemical evaluations of the collagen content of human gingiva. *J. Periodontol.*, 34 : 216-222, 1963.
- 66) Nimni, M.E., DeGuia, E. and Bavetta, L.A. : Synthesis and turnover of collagen precursors in rabbit skin. *J. Biochem.*, 102 : 143-147, 1967.
- 67) Gould, B.S. : Collagen biosynthesis. In Treatise on collagen, ed. Gould, B.S., Vol. 2, Part A, Academic Press, London and New York, 1968, p. 138-188.
- 68) Grinnell, F. : Fibroblast receptor for cell- substratum adhesion : Studies on the interaction of baby hamster kidney cells with latex beads coated by cold insoluble globulin (plasma fibronectin). *J. Cell. Biol.*, 86 : 104-112, 1980.
- 69) Grinnell, F. : Fibronectin and wound healing. *J. Cell. Biochem.*, 26 : 107-116, 1984.
- 70) Caton, J., Nyman, S. and Zander, H. : Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 224-231, 1980.
- 71) Ross, R. : 創傷治癒, 別冊サイエンス, 特集免疫学 I, 抗体とリンパ球, 日本経済新聞社, 東京, 1989, p. 166-177.
- 72) Goldberg, B.D. : Binding of soluble type I collagen to fibroblasts : act of thermal activation of ligand, ligand concentration, pinocytosis and cytoskeletal modifiers. *J. Cell Biol.*, 95 : 747-751, 1982.
- 73) Nyman, S., Karring, T., Lindhe, J. and Planten, S. : Healing following implantation of periodontitis-affected roots into gingival connective tissue. *J. Clin. Periodontol.*, 7 : 394-401, 1980.
- 74) Kuboki, Y., Takagi, T., Sasaki, S., Saito, S. and Mechanic, G.L. : Comparative collagen biochemistry of bovine periodontium, gingiva, and dental pulp. *J. Dent. Res.*, 60 : 159-163, 1981.

連絡先 :

日本歯科大学歯学部歯周病学教室

〒102 東京都千代田区富士見 2-3-16