三次元培養法の応用による歯周組織モデルの 開発とその形態学的構造

小 杉 禎 久

昭和大学歯学部歯周治療学教室

(指導：長谷川紘司教授)

(平成4年12月18日受付)

A New *In Vitro* Model of Periodontal Tissue Using Three Dimensional Culture : Morphological Structure of Dento-Epithelial Attachment

Yoshihisa KOSUGI

Department of Periodontics, Showa University Dental School

2-1-1, Kitasenzoku, Ohta-ku, Tokyo 145, Japan

(Director : Prof. Kohji HASEGAWA)

The purpose of the present study was to observe the formation of dento-epithelial attachment apparatus *in vitro*, and to demonstrate the detailed morphology of these structures.

Epithelial and fibroblast-like cells were individually isolated from gingiva and periodontal ligament of adult rabbits. For cell culture, the double chamber method was used. Collagen gel containing fibroblast-like cells were embedded into the inner chamber. The lower part of the root segments were implanted in collagen gel, and epithelial cells were seeded on collagen gel surface.

After 3 days culture, the growth medium was removed from the inner chamber and only the epithelial cell layer was exposed to air. After 7 more

days, the cultured epithelium was compared to the oral epithelium of adult rabbit with light and electron microscopy.

As a result of this model, surface layer of epithelium was keratinized upon exposure to air. Epithelial cells were observed to be attached by hemidesmosomes to root surfaces. A restrained downgrowth of the epithelial cells was observed in collagen gel along the root surface. Epithelium in this new developed three dimensional culture model using collagen gel may be similar to the oral epithelium *in vivo*. This model makes it possible to explore the effect of specific factors on dento-epithelial interactions.

Key words : Dento-epithelial attachment, *In vitro*, Collagen gel, Hemidesmosome, Three dimensional culture model

要旨：本研究は白色家兎歯根膜由来線維芽細胞様 (RPDL) 細胞含有コラーゲン・ゲルを用い *in vitro* において三次元的な歯周組織の構造と機能を再現し、歯-上皮結合の状態を検討したものである。白色家兎抜去歯根片を RPDL 細胞含有のコラーゲン・ゲル中に植立し、さらに口腔粘膜上皮由来の上皮細胞をゲル上に培養した。培養3日後に上皮部分のみを空気に暴露し、さらに7日間培養を行い、顕微鏡および電顕試料を作成した。その試料を白色家兎歯周組織と比較し、組織学的に検討を加えた。その結果、上皮細胞は歯面に沿ってゲル中に増殖し、歯面とヘミデスモゾームにより付着していた。付着部中間層の上皮細胞は細胞間隙が拡大していた。なお、ゲル

本論文の要旨は、第38回 JADR (1990年11月30日)、第34回春季日本歯周病学会総会 (1991年5月16日)、第70回 IADR (1992年7月2日) において発表した。

上の上皮細胞は重層化し、最表層部で角化傾向を認めた。以上の所見は、*in vivo* で認める口腔上皮と類似した組織形態であり、コラーゲン・ゲルを用いた三次元培養法の有用性が示唆された。

索引用語：歯-上皮結合、*in vitro*、コラーゲン・ゲル、ヘミデスモゾーム、三次元培養法

緒 言

歯肉組織における粘膜上皮は、角化性上皮である外縁上皮と非角化性上皮である内縁上皮に分類される。また内縁上皮は、さらに歯肉溝上皮と付着上皮に区別される。付着上皮は、細菌や起炎物質などの様々な外来刺激に対し、他の口腔粘膜上皮とともに歯周組織を被覆し、保護する機能を有しているが、一方では他の口腔粘膜上皮より物質透過性が高いという特徴を有している。したがって歯周病に罹患した場合、付着上皮は、細菌などの発症因子が容易に上皮結合組織へ侵入し、歯周組織の破壊が始まる初期病変の場となっていることが指摘されている¹⁻⁵⁾。また、この付着上皮の形態学的特徴として、細胞質内に異物の処理を行なうライソゾームのほかに貪食能を有するとされる細胞質空胞などの細胞微小器官が発達しており、他の口腔粘膜上皮と比較し、その特徴的な機能が重要視されている⁶⁻⁸⁾。

一方、歯周外科処置後の歯周組織の治癒過程には上皮性付着および結合組織性付着を認める。特に、上皮性付着における long junctional epithelium の形成には、上皮細胞と歯肉線維芽細胞が深く関わり合っていると考えられている⁹⁻¹²⁾。事実、long junctional epithelium の上皮の遊走は線維芽細胞との接触によりその遊走が停止し、その部で上皮-線維芽細胞の結合部を形成すると考えられ、上皮細胞の歯面への付着や遊走は線維芽細胞よりも早く開始される¹³⁾。また、上皮細胞と結合組織細胞を混合培養し、それらの細胞の相互作用を維持した状態で培養すると上皮の増殖や分化が、上皮単独培養と比較してより強い発現が見られている^{14,15)}。そして、これらの培養条件のもとでの上皮細胞の特性の発現は角質層の形成、基底膜の形成および、デスモゾームやヘミデスモゾームによる細胞あるいは結合組織との結合など様々な特性の発現が挙げられている¹⁶⁻¹⁸⁾。したがって、上皮細胞と結合組織細胞との相互作用は、それらの細胞の増殖や分化の恒常性の維持に非常に重要な因子であることを示している。

しかしながら、接着依存性 (anchorage-depen-

dent) 細胞である上皮細胞および線維芽細胞が歯面に付着する場合、いかなる相互作用を有しながらそれらの細胞が歯面と付着するかなどの、細胞付着や遊走の機構を解明するための *in vitro* の研究や、それらの研究を行なうための実験モデルの報告は非常に数少ない¹⁹⁾。

そこで本研究は、歯根膜由来の線維芽細胞様細胞を含有するコラーゲン・ゲル表層に口腔粘膜上皮より分離した角化細胞を培養し、さらにゲル中に歯根片を植立させ、上皮細胞、線維芽細胞の相互作用を保持した状態での歯面との細胞付着を検索できる三次元的な実験的歯周組織モデルを開発し、この培養系を用いて上皮の分化、機能および歯面との付着様式を形態学的に検索したものである。

材料と方法

1. 実験材料

1) 歯根片の作製

白色家兎 (日本白色種) (体重 3.5 kg) より抜去した歯を、直ちに滅菌冷リン酸緩衝液 (PBS, NaCl 0.14 M, pH 7.4) にて洗浄後、歯根表面に付着する残存軟組織を滅菌ガーゼにて機械的に除去し、再び PBS にて洗浄した。次に硬組織切断機 (Ezact 社、ドイツ) にて歯冠部および根尖部を除去後、歯根部より 1.5×1.5×5.0 mm の大きさの歯根片を歯軸に平行に切り出した。これらの歯根片は、500 U/ml penicillin G, 500 µg/ml (明治製菓社、東京) streptomycin および 3 µg/ml (明治製菓社、東京) fungizone (Gibco 社、USA) 含有 PBS 中にて、10 分間ずつ 4 回洗浄し、さらに 2 時間、同 PBS にて浸漬滅菌した。次いで歯根片は Brunette ら²⁰⁾の方法にもとづき 3 mg/ml collagenase および 23 U/ml の hyaluronidase 含有の酵素溶液中に 24 時間浸漬し、歯根表面の残存軟組織を完全に除去した。その際に、無作為に取り出した歯根片を顕微鏡下に包埋し、超薄切片を作製後、電子顕微鏡下に残存軟組織の有無を確認した。

2) 培養細胞

(1) 白色家兎歯根膜由来線維芽細胞様 (RPDL) 細胞の培養

歯根膜は、白色家兎より抜去した歯の歯根表面中央約 1/3 を替刃メスにて搾過して採取した。採取した歯根膜は、out-growth 法にて培養した。培養液は、Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM) (Sigma 社, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco 社, USA) および 50 U/ml penicillin G, 50 μ g/ml streptomycin を添加したものを用いた。培養は 37°C, 5% CO₂, 95% air 気相下で行なった。培養 7 日後 out-growth した細胞は、0.05% トリプシン/EDTA 溶液 (NaCl 0.14 M, KCl 5.36 mM, C₆H₁₂O₆ 5.55 mM, NaHCO₃ 6.90 mM, Na₂EDTA 0.54 mM トリプシン 0.05%) (Difco 社, USA) を用いて剝離し、継代した。なお、本研究では 4~8 代継代した RPDL 細胞を実験に供した。

(2) 口腔粘膜上皮細胞の培養

白色家兎の頬粘膜および歯肉の口腔粘膜上皮を替刃メスにて採取し、PBS にて洗浄した。採取した粘膜上皮片は、外科用ハサミで結合組織部および筋層を可及的に除去した後、上皮組織を細分し、500 U/ml penicillin G, 500 μ g/ml streptomycin および 3 μ g/ml fungizone 含有 PBS 中にて、10 分ずつ 4 回洗浄した。その後、上皮組織片を 0.1% トリプシン含有 Earle's balanced salts 溶液 (Sigma 社, USA) 中で 4°C, 12 時間浸漬した。その後、上皮部は、実体顕微鏡下で上皮組織部と結合組織部を分離し、上皮組織部のみを 0.05% トリプシン/EDTA (Difco 社, USA) 溶液で処理し、上皮細胞を培養した。培養方法および培養条件は RPDL 細胞と同様である。

2. 実験方法

1) コラーゲン・ゲルの調整

コラーゲン・ゲルは、Cellmatrix Type I-A (新田ゼラチン社, 大阪) を使用した。コラーゲン 7 容量に対し、5 倍濃度の D-MEM 2 容量, 0.05 N NaOH と 2.2% NaHCO₃ を含有する、0.2 M HEPES (Sigma 社, USA) 再構成緩衝液 1 容量を加え攪拌調整した。次に、細胞含有コラーゲン・ゲル作製時にはコラーゲン・ゲル内に 10% FBS を添加した。

2) 三次元培養法

培養方法は、ダブルチャンバー法を用いた。外側チャンバーは、6 穴マルチプレート (Falcon 社, USA) を使用し、その各ウェル内に内側チャンバー

図 1 三次元培養法

として pore size 0.4 μ m のミリセル (MILLICELL-CM, Millipore 社, USA) を設置した。ミリセル内にまず細胞を含有していないコラーゲン溶液を 1.0 ml/分注し、37°C のインキュベーター内でゲル化させ basal layer とした。次に、 1×10^5 /ml の RPDL 細胞とコラーゲン溶液を basal layer 上に 2.0 ml ずつ積層させ cell layer とした。各ゲルを積層後、直ちにミリセル内中央部ゲル中に、歯根片の下半分を埋入するように植立し、再び、37°C のインキュベーター内でゲルを硬化させた。ゲルが完全に硬化した後、ミリセル内の cell layer 上に上皮細胞を 3×10^5 /ml の割合でまき、さらに内側および外側のチャンバー内に FBS 添加の D-MEM を加え培養を開始した (図 1)。培養開始 3 日後、ミリセル内の培養液のみを完全に除去し、上皮部分のみを空气中に暴露した。その際、外側チャンバー内の培養液の高さは、ミリセル内の上皮部分より下方になるように調整し、さらに空气中に暴露した状態で 7 日間培養した。外側チャンバー内の培養液の交換は毎日行った。

3) 組織学的観察

(1) 光学顕微鏡用試料の作製と観察

培養終了後、植立した歯根片を含むコラーゲン・ゲルを 10% 緩衝ホルマリンにて浸漬固定し、7 日間、10% 蟻酸にて脱灰、アルコール上昇系列にて脱水後、パラフィンに包埋した。薄切は歯軸と平行に行い、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し光顕により観察を行った。

(2) 電子顕微鏡用試料の作製と観察

同様の試料を Karnovsky 溶液 (2.5% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4) にて 4°C, 1 時間固定し、続

いて1% オスミウム酸にて4°C, 1時間後固定した。以後通法に従い脱水し, QY-1・エボンで浸漬, 置換後, Poly Bed 812 (Polysciences 社, USA) にて包埋した。次に, 歯軸と平行に非脱灰1 μ m切片を作製し, トルイジンプルー染色を施し光顕観察後, 超薄切片を作製した。超薄切片は, 酢酸ウラニル・クエン酸鉛による二重染色を施し透過型電子顕微鏡(日立-300電子顕微鏡, 日立社, 東京)にて観察, 撮影を行った。

(3) 白色家兎歯周組織との比較

培養した試料との組織学的比較を行うため白色家兎より下顎臼歯部の歯周組織を採取し, 光顕および電顕観察用試料を上記の方法と同様に作製し, 観察を行った。

結 果

1. 白色家兎の歯肉上皮

歯周組織の上皮は外縁上皮と内縁上皮に分けられる。外縁上皮は5-7層構造を呈し, その表層はエオシンに濃染され角化を示していた。一方, 内縁上皮の歯肉溝上皮は4-6層構造を呈し, その表層部に位置する細胞は紡錘形を呈し, 細胞質にはエオシンに濃染され, 核の残存をいまだ認める錯角化の形態を呈する角化性上皮として認められた(図2)。

これらの歯肉溝上皮はその基底部で歯根面と付着し, いわゆる2-3層構造を呈する付着上皮に移行していた。この付着上皮細胞は, 多角形を呈し, 細胞質には集束したトノフィラメントが散在していた。リボゾームの多くはポリゾームの形態を呈し, 粗面小胞体は少数しか認められなかった。小型のミトコンドリアは細胞質全体に散在していた。また, 円形の電子密度

図2 白色家兎歯周組織(×35)
H-E染色

図3 三次元培養法による歯周組織モデル(×70)
CG; コラーゲン・ゲル
H-E染色

の高い dense granule が細胞辺縁に散在していた。付着上皮の細胞間隙は広く、短い多数の細胞突起を認め、細胞どうしは互いにデスモゾームによる結合を認めた。これらの広い細胞間隙には多数の好中球の浸潤が見られた (図 4)。付着上皮と歯根面は非常に密に付着するが、これらの間には electron dense zone および electron lucent zone を認めヘミデスモゾームによる結合が見られた。

2. コラーゲン・ゲル培養上の上皮細胞の形態所見

コラーゲン・ゲル上に培養した上皮細胞は層状を呈し、上皮細胞の表層は光顕的にエオシンに濃染し、角化傾向を認めた (図 3)。

電顕的観察において、この部位の上皮細胞層は、10-12 層構造を呈しており、コラーゲン・ゲル側より類円形の基底細胞、やや紡錘形の有棘細胞、顆粒細胞および角質層を区別できた。表層の細胞は、核が消失しており角化様の形態を呈した。これらの上皮は、*in vivo* で認める上皮構造とよく類似した構造を呈した。

基底細胞の核は大きく、核周囲には、多数のミトコンドリア、発達したゴルジ装置やリボゾームなどの細胞内小器官が認められた。コラーゲン・ゲルと接する基底細胞の細胞質内にはマイクロフィラメントが集合し、アタッチメントブラーク様の構造を呈した。コラーゲン・ゲルとはヘミデスモゾームによる結合を認めた (図 5-a, c)。

中間層の細胞は紡錘形を呈し、核周囲には多数の細胞内小器官やトノフィラメントの集束を認めた。細胞間隙は比較的密に接しており細胞突起による鉗合は余り認められず、細胞は互いにデスモゾームにより結合していた。

空気に暴露した表層の細胞は、基底細胞や中間層の細胞と異なり、核が消失し、細胞内小器官はほとんど認められず、わずかに小空胞を認めるだけであった。この細胞の特徴としては、細胞質内に多くのケラチンフィラメントが存在し、角化像として認められた (図 5-b)。

3. 歯根片と上皮細胞

コラーゲン・ゲルの歯根片上部 1/4 に位置する上皮細胞は 5-8 層の層状化を示し、歯根面と密に接着していた (上部歯根面付着上皮部)。これらの細胞は、多角形を呈し、細胞間隙は広く、多数の細胞突起による鉗合やデスモゾームによる結合を認めた。細胞質内に集束した電子密度の高いトノフィラメントや円形で小型のミトコンドリアを認めた。リボゾームは細胞質全

体に分布し、粗面小胞体は少数しか認められなかった。歯根面と上皮細胞は密に付着し、その付着部位の細胞膜は電子密度が増加し、トノフィラメントの裏打ちを認めるヘミデスモゾーム構造を呈した (図 6-a, b)。

これらの上皮は歯根面の下方に行くに従い、細胞の層状化が被薄化し、約 1-2 層の構造を呈していた。(下部歯根面付着上皮部) この部の細胞は上部に位置する細胞と比較し、細胞は紡錘形となり、細胞間隙は非常に密で、細胞突起も少数しか認められなかった。細胞は互いに少数の小型のデスモゾームによる結合を認めた。細胞質内のトノフィラメントの形成は少なく、リボゾームは細胞質全体に認め、粗面小胞体は非常に少数しか認められなかった。また、円形の、電子密度の高い dense granule は細胞質辺縁に散在していた。これらの細胞は歯根面と非常に密に接着し、歯根面とはトノフィラメントの裏打ちを有するヘミデスモゾームによる接着を認めた。

また、歯根面に接する細胞質内には集束したフィラメントが走行し、細胞膜の裏打ち構造として認め、同時に、コラーゲン・ゲルに接する細胞はその接着面に数多くのヘミデスモゾームの形成を認めた。また、コラーゲン・ゲルとの接着面にマイクロフィブリルの集合像として見られる基底膜の形成が部分的に認められた (図 7-a, b, c)。

考 察

1. 三次元培養における歯と上皮性および結合組織性付着について

歯周組織である歯肉、歯根膜、歯槽骨、セメント質は、機械的および機能的に歯を支持する役目を持つ組織である。歯周病はこれらの組織が破壊されることにより発症するが、その初期病変の場合は、歯肉の歯肉溝上皮と付着上皮の機能的組織の破壊により開始される。加えて、歯周外科処置後の上皮性および結合組織性の付着はその病変の予後の良否に重要な因子となっている。それゆえに歯周病の発症原因や発症過程の検索や歯周外科処置後の治癒過程を検索する際には、これらの組織の機能や代謝、さらにはその形態学的検索を行なう必要に迫られる。

現在、歯周病における歯肉溝上皮や付着上皮の検索は、その多くが *in vivo* で行なわれている²¹⁻²⁴⁾。しかし、*in vivo* での実験的歯周病は、歯周病の発症自体

に多くの因子が関与すること²⁵⁾でその病変の進行過程を詳しく検索することが困難である。また、動物における歯周病の発症因子を持続的に維持させることが困難であったり、歯周病の発症後、その病変の自然治癒やその治療に対する歯周組織の治癒反応がヒトに比べて非常に早い治癒過程を呈することなどが挙げられる。したがって、これらの組織の治癒過程、とりわけ、結合組織性および上皮性付着の形成過程を経時的に観察することが困難であるなど、多くの問題点を抱えている。

そこで、*in vitro* において歯と歯周組織を構成する細胞との付着性実験が行なわれるようになったが、それらの多くは線維芽細胞の付着を検索した研究^{26~30)}であり、上皮細胞と歯との付着を検索した研究は非常に少ない。Pitaru ら¹⁹⁾は、二次元の培養方法を用い、線維芽細胞を培養したシャーレ上に歯根片を静止し、その歯根片の表面上に上皮細胞を植え付け、各々の細胞の遊走性の違いによる上皮-線維芽細胞結合の変化を検索している。しかしながら、この実験において上皮と線維芽細胞はいかなる結合様式を呈するか、あるいは歯と上皮および線維芽細胞がいかなる結合様式を呈するかなどの検索は行なわれていない。さらに、上皮細胞と結合組織細胞を混合培養し、各々の細胞の付着について同時に検索を行った研究は見当たらない。

本研究は歯根膜由来線維芽細胞様細胞をコラーゲン・ゲル中に含有させ、さらに、コラーゲン・ゲル中に歯を植立させ、ゲルの硬化後に上皮細胞を植え付けた三次元的方法を用いて培養したものである。上皮細胞は歯根面と付着し（上部歯根面付着上皮部）、その一部は歯根面に沿って付着を有しながらコラーゲン・ゲル中に増殖が見られた（下部歯根面付着上皮部）。上部歯根面付着部の上皮細胞は、上皮細胞は多角形を呈し、5-8層の層状構造を形成していた。細胞質内には短い、集束したトノフィラメントが細胞質内に散在し、その一部はデスモゾームの裏打ち構造に移行していた。

また、ミトコンドリアは小型で核周辺に存在し、リボゾームは細胞質全体に認められた。粗面小胞体は少なく、細胞質全体に散在していた。細胞間隙は広く、短い細胞突起を認め、細胞は互いにデスモゾームによる結合を認めた。これらの細胞層の表層の細胞は核が消失し、細胞質内には多数のマイクロフィラメントにより占められる角質層の形成を認めた。このような構造ならびに組織学的形態は、*in vivo* で認められる付

着上皮の構造、形態と極めて類似した所見を呈していた。

歯面と上皮細胞の構造形態は、部分的に空隙を認める結合様式を呈した。歯面と接着する部では上皮細胞の細胞膜の電子密度が増加し、その外側は *dense layer* や *lucent layer* を認めるヘミデスモゾームによる結合を認めた。この上皮と歯面との付着様式は、*in vivo* で認めるヘミデスモゾームによる結合様式と一致し、*in vitro* において歯-上皮の結合を再現したといえよう。

コラーゲン・ゲルと接する上皮細胞の基底部では部分的にマイクロフィブリルの集合像が見られ、基底膜として認められた。この基底膜と上皮細胞は、トノフィラメントの裏打ち構造を有するヘミデスモゾームにより結合していた。

さらに、これらの上皮細胞は歯根面の中央部にまで増殖していた（下部歯根面付着上皮部）。この上皮細胞は上部歯根面付着部の上皮細胞と異なり、紡錘形の細胞が2層構造を形成し、歯面と非常に密に接合していた。細胞質内にはトノフィラメントの形成が少なく、細胞質全体にリボゾームを認めた。また、円形の電子密度の高い *dense granule* は歯根面側の細胞質に散在していた。細胞間隙は非常に密で、細胞突起は少数しか認めず、細胞は互いに小さなデスモゾームによる結合を示した。歯面と細胞はトノフィラメントの裏打ちを有するヘミデスモゾームにより結合していた。また、上皮細胞とコラーゲン・ゲルとの境界部には部分的に基底膜の形成を認め、この基底膜と細胞はヘミデスモゾームによる結合を示した。

これらの形態は *in vivo* で認められる付着上皮の根尖部の形態あるいは *long junctional epithelium* と非常に類似していた。このような長い上皮の形成は、次の2つの理由によるものと考えられた。その1つは、植立した歯とコラーゲン・ゲルが完全に密な機械的接着を示していないこと。第2に植立した歯とコラーゲン・ゲル中の線維芽細胞様細胞が結合組織性の付着をしていないことが考えられた。これらの理由から上皮がこのような間隙に歯面と付着しながら侵入し、あたかも歯周外科処置後の上皮性付着が形成された状態と同様な所見を示したと考えられた。また、正常な生体では付着上皮は、*cement-enamel junction (CEJ)* の近辺で終末を認める。これは、歯の萌出時に退縮エナメル上皮は、エナメル質表面の一次性上皮付着を介しエナメル質と結合をしており、歯の萌出とともにこの

一次性上皮付着は付着上皮へと転換され二次性上皮付着となる。この過程において付着上皮の終末はCEJの近辺に位置すると考えられている。事実、歯を矯正学的に挺出させた場合、歯の移動に伴い付着上皮は、正常なCEJ付近で上皮の接合を示している³¹⁾。したがって本研究では、抜歯という操作過程で上皮の付着部を破壊した歯根片あるいは、コラゲナーゼ処理により歯面に付着する歯根の軟組織を除去しシャープピー線維を有しない歯根片を使用したことで、付着上皮の侵入があたかもlong junctional epitheliumのごとく形成されたものと思われる。

また、ヒトの付着上皮は歯原性上皮であり、口腔粘膜上皮はその形成に関与しないとする考え方が多い³²⁻³⁴⁾。しかし、Listgarten^{35,36)}は、サルの歯肉切除術後、その創傷の治癒過程において口腔粘膜上皮細胞が創面を覆い、継いでこの上皮は歯面と付着し、付着上皮を形成せしめたと報告している。また、Krawczyk³⁷⁾は、創傷面に基底膜が存在しない場合、上皮細胞はフィブリンや間葉系細胞と直接に接触しながら痂皮下を伸展、移動をしていくと報告している。本実験で使用した口腔粘膜の上皮細胞は、歯面と接合することにより付着上皮を形成したことから *in vivo* で行なわれる付着実験結果を非常によく再現したものと考えられる。また、これらの付着上皮の形成には培養で使用する牛胎児血清中に存在する糖タンパクの一つである fibronectin が上皮細胞の伸展、遊走に深く関与していると考えられている。

一方、上皮細胞が歯根面に沿って深部に増殖し、歯面とヘミデスモゾームによる付着様式を示したことは、ゲル中の歯根膜由来の線維芽細胞様細胞の産生する増殖因子や、培養液中に添加した牛胎児血清に含有されている fibronectin 等の接着性糖タンパクがこの現象に多分に関与していることを示唆している。実際の歯周組織においてヘミデスモゾームは、結合組織もしくは歯根面と、上皮細胞との付着部に認められ、結合組織側の基板は、IV型コラーゲン、laminin、fibronectin などのタンパクにより構成されていることが報告³⁸⁾されている。本研究においてヘミデスモゾームを形成する歯面部にはマイクロフィブリル様の物質を認めたが、その構成成分については、免疫組織化学的な検索を行っていないために明確にすることが出来なかった。

2. 三次元培養における上皮の角化について

培養において扁平上皮の基底細胞を分化させ、角質

層を形成、発現させるために多くの方法によりその検索が行なわれている。これらの培養条件の中でとりわけ重要な因子となるものが上皮-間葉系細胞の相互作用であると考えられる。この相互作用を得るために、3T3細胞の上に上皮細胞を培養したり、細胞を死滅させた結合織上に上皮の培養をおこなったり、あるいは基質としてコラーゲン・ゲルを用い、そのコラーゲン・ゲル中に線維芽細胞を含有させた後、ゲル表面に上皮細胞を植え付け、培養する方法³⁹⁻⁴²⁾が取られている。このように上皮細胞と間葉系細胞との相互作用を形成させることにより、上皮細胞の持つ最終分化である角質層を形成せしめることが可能となった。しかしながら、形成された角質層は *in vivo* の角質層と比較して、いまだ十分な正角化 (orthokeratosis) を発現させることが不十分であった。そこで、これらの方法を用いて正角化を発現させるためには上皮細胞層を空気に暴露させ、培養することが重要であることが判明した。上皮細胞層を空気に暴露させることにより上皮細胞の最終分化のマーカーとして考えられている 67 KDa のケラチン蛋白の発現⁴³⁾を認めている。

本研究は歯根膜由来の線維芽細胞様細胞を含有させたコラーゲン・ゲルの表面に上皮細胞を植え付け、培養した後、上皮表層を空気に暴露させて上皮細胞の角質層の形成を発現させたものである。コラーゲン・ゲル表層の上皮細胞は 10-12 層の層状構造を呈した。上皮層はコラーゲン・ゲル側より基底細胞、棘細胞、顆粒細胞および角質層の配列を認めた。基底細胞は類円形ないし多角形細胞が 1-3 層構造を呈し、細胞質内には核周囲にゴルジ装置や多くの集束したトノフィラメントを認めた。細胞間は密で、多数の細胞突起をみると、細胞は互いにデスモゾームによる結合を示した。基底細胞とコラーゲン・ゲル間には線維の集合が部分的に見られ、基底膜の形成として認められた。

これらの基底膜と基底細胞は dense layer や luent layer およびアンカーリングフィラメントの構造を有し、トノフィラメントの裏打ちを有するヘミデスモゾームを認めた。棘細胞は多角形で 5-8 層構造を呈し、細胞質内に多数の集束したトノフィラメントが認められることを特徴とした。細胞間には多数の細胞突起を認め、細胞が互いに多数のデスモゾームによる結合を認めた。

顆粒細胞は紡錘形で 3-4 層構造を呈し、細胞質内に多量のフィラメントとケラトヒアリン顆粒をみとめることを特徴とした。さらにこの細胞の上部には核が消

失し、細胞質内にはフィラメントが充満している角質層の形成を認めた。しかしながら、この角質層の一部ではまだその細胞の表面に微小突起を認め、正角化を呈しない部位も認められた。

In vitro における角質層の形成は上皮細胞と間葉系細胞の相互作用とともに、上皮細胞を空気に暴露させることにより角化が発現されるという Freeman ら⁴¹⁾の結果と一致した所見である。上皮細胞は、本来生体内において間質細胞 (stromal cell) や細胞外の基質上あるいはその成分に取り囲まれて存在している。本実験系の培養上皮細胞の重層化が認められたことは、間質細胞である歯根膜由来の線維芽細胞様細胞を含有するコラーゲン・ゲル上で培養した上皮細胞の環境が生体内の環境に近いことを示唆していると思われる。

また、空気に暴露した上皮の最表層が角化傾向を示したことは、空気暴露という状態が上皮に何らかの刺激となったと考えられる。このことは、菱川ら⁴⁴⁾が報告したコラーゲン・ゲル上でラットの上皮を培養したところ、空気暴露例においてその表層部は角化傾向を示したが、暴露を行っていない、いわゆる overlay medium の状態では上皮細胞の角化傾向は得られなかった結果と一致している。Caffesse ら^{45,46)}は、Rhesus monkey の実験においてフラップ弁の口腔上皮角化部を歯面に接するように翻転、縫合し経時的組織検索をしたところ、歯面に接する角化層は 60 日で欠落していたと報告している。また、フラップ弁を外側に翻転、縫合すると非角化の歯肉溝上皮や付着上皮が角化を示すと報告している。このことから、空気に直接暴露していない部位では角化が起らず、空気に暴露した部位では角化が起ると考えられる。以上のことより、生体内に非常に近い環境下での培養は、上皮細胞の分化、機能に大きな影響があることが示唆された。

今後、本研究で開発した三次元的歯周組織モデルを応用することにより歯一上皮の相互関係をさらに明確にし、細胞増殖因子や内毒素などさまざまな因子に対する影響を検索することが可能であると思われる。さらには、歯周組織における創傷治癒のメカニズムの解明にも役立つと考えられる。

結 語

本研究は、コラーゲン・ゲルを用い実験的歯周組織モデルを開発し、上皮細胞の増殖、機能および歯根面との付着様式について実際の歯周組織と組織学的に検

索したもので、以下の結論をえた。

1. コラーゲン・ゲル上に培養した上皮細胞は重層化し、空気暴露によりその表層は、核が消失し、角化傾向を呈した。
2. 上皮細胞は歯根面と付着し、その構造は上部歯根面付着上皮と歯根面に沿ってゲル中に増殖する下部歯根面付着上皮に分けられた。
3. 上部歯根面付着上皮は、5-8 層の層状構造を呈した。この部の細胞は短い細胞突起を有し、細胞間隙は拡大しており、その結合はデスモゾームによるものであった。
4. 下部歯根面付着上皮は 2 層構造を呈し、歯根面と密に付着していた。この部の上皮細胞は、歯根面ならびにコラーゲン・ゲルとトノフィラメントの裏打ちを有するヘミデスモゾームで結合していた。
5. 上記の *in vitro* での組織構造は、*in vivo* の歯周組織で認める付着上皮と比較し、上部歯根面上皮付着部は付着上皮中間層と下部歯根面上皮付着部は付着上皮根尖側部と非常に類似していた。
6. 以上のことより、本研究で行なった三次元培養は生体の歯周組織構造を再現したものであり、歯周組織実験モデルとして有用であると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導、御校閲を賜りました昭和大学歯周治療学教室、長谷川紘司教授に深く感謝いたします。また本研究の遂行に際し、終始懇切なる御指導と御校閲を賜りました本学口腔病理学教室、吉木周作教授、立川哲彦助教授に厚く御礼申し上げます。最後に本研究に御理解と御支援を頂きました本学歯周治療学教室、宮下元教授をはじめ教員各位ならびに口腔病理教室員各位に心から御礼申し上げます。

文 献

- 1) McDougall, W.A. : Pathways of penetration and effects of horseradish peroxidase in rat molar gingiva. Archs. Oral Biol., 15 : 621-633, 1970.
- 2) McDougall, W.A. : Penetration pathways of a topically applied foreign protein into rat gingiva. J. Periodont. Res., 6 : 89-99, 1971.
- 3) Cowley, G.C. and Levine, M. : The effect of plaque on gingival epithelium (Oral Sciences Reviews 1), Munksgaard, Copenhagen, 1972, 110-127.
- 4) Attström, R. : The roles of gingival epithelium

- and phagocytosing leukocytes in gingival defence. *J. Clin. Periodontol.*, 2 : 25-32, 1975.
- 5) Page, R.C. and Schroeder, H.E. : Pathogenesis of inflammatory periodontal disease. A summary of current work. *Lab. Invest.*, 34 : 235-249, 1976.
 - 6) Yamazaki, A., Nikai, H., Nittani, K. and Ijuhin, N. : Ultrastructure of the junctional epithelium of germfree rat gingiva. *J. Periodontol.*, 50 : 641-648, 1979.
 - 7) 仁井谷 究 : ラット臼歯部付着上皮の形成過程に関する超微形態学的研究. *日歯周誌*, 21 : 111-133, 1979.
 - 8) 山崎 章, 二階宏昌, 伊集院直邦, 仁井谷 究, 高田 隆 : ラット臼歯部付着上皮における酸性ホスファターゼの電顕的証明. *日歯周誌*, 21 : 435-444, 1979.
 - 9) Ellegaard, B., Karring, T. and Löe, H. : New periodontal attachment procedure based on retardation of epithelial migration. *J. Clin. Periodontol.*, 1 : 75-88, 1974.
 - 10) Ellegaard, B., Karring, T. and Löe, H. : Retardation of epithelial migration in new attachment attempts in intrabony defects in monkeys. *J. Clin. Periodontol.*, 3 : 23-37, 1976.
 - 11) Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal tissues. *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
 - 12) Listgarten, M.A. and Rosenberg, S. : Progressive replacement of epithelial attachment by a connective tissue junction after experimental periodontal surgery in rats. *J. Periodontol.*, 53 : 659-670, 1982.
 - 13) Nyman, S., Lindhe, J. and Karring, T. : Reattachment-New attachment, Lindhe, J., Textbook of clinical periodontology, Munksgaard, Copenhagen, 1985, 410-432.
 - 14) Briggaman, R.A. and Wheeler, C.E., Jr. : Epidermal-dermal interactions in adult human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 56 : 18-26, 1971.
 - 15) Briggaman, R.A., Dalldorf, F.G. and Wheeler, C.E., Jr. : Formation and origin of basal lamina and anchoring fibrils in adult human skin. *J. Cell Biol.*, 51 : 384-395, 1971.
 - 16) 石橋康正 : 角化の問題点. *皮膚病診療*, 8 : 1125-1132, 1986.
 - 17) Dembitzer, H.M., Herz, F., Schermer, A., Wolley, R.C. and Koss, L.G. : Desmosome development in an *in vitro* model. *J. Cell Biol.*, 85 : 695-702, 1980.
 - 18) Krawczyk, W.S. and Wilgram, G.F. : Hemidesmosome and desmosome morphogenesis during epidermal wound healing. *J. Ultrastruct. Res.*, 45 : 93-101, 1973.
 - 19) Pitaru, S., Hekmati, M., Metzger, Z. and Savion, N. : Epithelial-connective tissue interaction on the tooth surface : An *in vitro* model. *J. Periodont. Res.*, 26 : 461-467, 1991.
 - 20) Brunette, D.M., Melcher, A.H. and Moe, H.K. : Culture and origin of epithelium-like and fibroblast-like cells from porcine periodontal ligament explants and cell suspensions. *Archs. Oral Biol.*, 21 : 393-400, 1976.
 - 21) Yukna, R.A. : A clinical and histologic study of healing following the excisional new attachment procedure in rhesus monkey. *J. Periodontol.*, 47 : 701-709, 1976.
 - 22) Frank, R., Fiore-Donno, G., Cimasoni, G. and Matter, J. : Ultrastructural study of epithelial and connective gingival reattachment in man. *J. Periodontol.*, 45 : 626-635, 1974.
 - 23) Stahl, S.S. : Repair potential of the soft tissue-root interface. *J. Periodontol.*, 48 : 545-552, 1977.
 - 24) Kakehashi, S. and Parakkal, P.F. : Proceedings from the state of the art workshop on surgical therapy for periodontitis. *J. Periodontol.*, 53 : 475-501, 1982.
 - 25) Attström, R. and Lindhe, J. : Pathogenesis of Plaque Associated Periodontal disease, Lindhe, J., Textbook of clinical periodontology, Munksgaard, Copenhagen, 1985, 154-185.
 - 26) 東 富恵, 中西恵治, 岡本 莫 : 歯周病罹患歯露出歯根面への培養細胞の付着について. *日歯周誌*, 25 : 800-805, 1983.
 - 27) Fardal, O., Aubin, J.E., Lowenberg, B.F. and Freeman, E. : Initial attachment of fibroblast like cells to periodontally-diseased root surfaces *in vitro*. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 735-739, 1986.
 - 28) Lowenberg, B.F., Aubin, J.E., Pitaru, S. and Melcher, A.H. : A new 51 Chromium assay for accurate measurement of cell attachment to demineralized and non-demineralized dentine *in vitro*. *J. Periodont. Res.*, 19 : 40-50, 1984.
 - 29) Pitaru, S., Aubin, J.E., Gray, A., Metzger, Z. and Melcher, A.H. : Cell migration, attachment and orientation *in vitro* are enhanced by partial demineralization of dentine and cementum and inhibited by bacterial endotoxin. *J. Periodont. Res.*, 19 : 661-665, 1984.
 - 30) 田中裕子 : *In vitro* における歯根面への線維芽細胞様細胞の付着様式に関する電子顕微鏡的観察. *日歯周誌*, 31 : 434-461, 1989.
 - 31) Batenhorst, K.F., Bowers, G.M., and Williams, J.E., Jr. : Tissue changes resulting from facial tipping and extrusion of incisors in monkeys. *J. Periodontol.*, 45 : 660-668, 1974.
 - 32) Uohara, G.I. : Histogenesis of the gingival sulcus epithelium in the rat. *J. Periodontol.*, 30 : 326-350, 1959.
 - 33) McHugh, W.D. : The development of the gingival epithelium in the monkey. *Dent. Practit.*, 11 : 314-324, 1961.
 - 34) Listgarten, M.A. : Changing concepts about the dento-epithelial junction. *J. Canad. dent. Ass.*,

- 2 : 70-75, 1970.
- 35) Listgarten, M.A. : Electron microscopic features of the newly formed epithelial attachment after gingival surgery. J. Perodont. Res., 2 : 46-52, 1967.
 - 36) Listgarten, M.A. : Ultrastructure of the dento-gingival junction after gingivectomy. J. Perodont. Res., 7 : 151-160, 1972.
 - 37) Krawczyk, W.S. : A pattern of epidermal cell migration during wound healing. J. Cell. Biol., 49 : 247-263, 1971.
 - 38) 下野正基, 橋本貞充 : 歯周組織の構造と機能, 山村武夫, 治癒の病理, 医歯薬出版, 1988, 17-37.
 - 39) Rheinwald, J.E., Green, H. : Serial cultivation of strains of human keratinocytes. : The formation of keratinizing colonies from single cells. Cell., 6 : 331-343, 1975.
 - 40) Marcelo, C.L., Kim, Y.G., Kaine, J.L. and Voorhees, J.J. : Stratification, specialization, and proliferation of primary keratinocyte cultures. J. Cell Biol., 79 : 356-370, 1978.
 - 41) Freeman, A.E., Igel, H.I., Herrman, B.J. and Kleinfeld, K.L. : Growth and characterization of human skin epithelial cell cultures. *In vitro.*, 12 : 352-362, 1976.
 - 42) 河野葉子 : 上皮-間葉組織の相互作用による培養扁平上皮細胞の増殖・分化に関する電子顕微鏡的観察. 昭和歯学会雑誌, 8 : 30-46, 1988.
 - 43) Asselineau, D., Bernhard, B., Bailly, C. and Darman, M. : Epidermal morphogenesis and induction of the 67 KD keratin polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. Exp. Cell Res., 159 : 536-539, 1985.
 - 44) Hishikawa, K., Tachikawa, T. and Yoshiki, S. : Growth and differentiation of oral mucosal epithelial cells on collagen gels. J. Dent. Res., 70 : 794, 1991.
 - 45) Caffesse, R.G., Karring, T. and Nasjleti, C.E. : Keratinizing potential of sulcular epithelium. J. periodontol., 48 : 140-148, 1977.
 - 46) Caffesse, R.G., Nasjleti, C.E. and Casteill, W.A. : The role of sulcular environment in controlling epithelial keratinization. J. Periodonol., 50 : 1-6, 1979.

連絡先 :

昭和大学歯学部歯周治療学教室

〒145 東京都大田区北千束 2-1-1

図 4 白色家兎の付着上皮中間層
細胞間隙は広く、好中球の存在を認める。
PMN；好中球，D；デスモゾーム（ $\times 10,300$ ）

図 5 コラーゲン・ゲル上に培養した上皮細胞

a ; 上皮細胞は 10-12 層の重層化を示し，ゲル側より基底層，有棘層，顆粒層および角化層を認める。

CG ; コラーゲン・ゲル，T ; トノフィラメント，D ; デスモゾーム，SC ; 角化層 (×4,200)

b ; 表層の細胞内の核は消失し，細胞質内に豊富なケラチンフィラメントを認める。(×25,000)

c ; コラーゲン・ゲルと接する基底細胞内には，アタッチメントブランク様を呈するフィラメントの集合体 (矢尻) を認める。

CG ; コラーゲン・ゲル (×16,100)

図 6 上部歯根面上皮付着部の上皮細胞

a : 細胞間隙が拡大し，細胞どうしはデスモゾームにより結合していた。

D : デスモゾーム，T : トノフィラメント (×5,100)

b : 歯面とはヘミデスモゾーム (矢尻) により付着 (×37,500)

図 7 下部歯根面上皮付着部の上皮細胞

a ; 上皮細胞は 1-2 層構造を呈し，細胞間は非常に密である。(×6,300)

b ; 歯根面と接する上皮細胞

トノフィラメントの裏打ちを有するヘミデスモゾーム結合。

RS ; 歯根片，HD ; ヘミデスモゾーム (×45,000)

c ; コラーゲン・ゲルに接する上皮細胞

マイクロフィブリルの集合像とヘミデスモゾームによる結合。

CG ; コラーゲン・ゲル，HD ; ヘミデスモゾーム (×47,500)