歯周組織における実験的治癒過程での Transforming growth factor- β の効果について

杉 下 彰 男 松 江 美代子

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

(指導：松江一郎教授)

(平成 7 年 12 月 4 日受付)

Regulatory Effect of Transforming Growth Factor- β in an Experimental Wound Healing of the Periodontium

Akio Sugishita and Miyoko Matsue

Department of Periodontology

Nihon University, School of Dentistry at Matsudo

(Director : Prof. Ichiro Matsue)

870-1 Sakaecho-Nishi-2, Matsudo, Chiba 271, Japan

Transforming growth factor- β (TGF- β) is a polypeptide biologic mediator considered to play a role in the wound healing processes including cell proliferation and migration. The purpose of this study was to clear if TGF- β would stimulate the proliferation of fibroblasts and further enhance tissue regeneration *in vivo*.

Standardized 3×5 mm buccal fenestration defects were made at midroot level in five beagle dogs. The exposed root surfaces were planed and each defect received either ① PBS solution (C group), ② a collagen piece soaked in PBS solution (P group) or ③ a collagen piece soaked in TGF- β solution (T₂₀ group : 20 ng/10 μ l and T₄ group : 4 ng/10 μ l in concentration) prior to flap replacement. Each dog underwent the four different treatments at random. Animals were sacrificed at 3, 8 and 21 days after the procedure and prepared for light microscopic examination.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) positive cells were counted to determine the proliferative activity of fibroblast-like cells in each of the following histologic compartments of the periodontal ligament (PDL) at the apical border level of the fenestration adjacent to the root surface and the wound proper.

Although no significant differences were seen in

terms of either inflammation or fibronectin deposition, the use of collagen with silicon membranes (P, T₂₀, T₄ groups) suppressed fibroblast-like cell proliferation when compared to the group without membrane (C group). Significant differences were noted on the 3rd day in the T₄ group, as reflected by increased migration of PCNA positive cells to the defect from the adjacent periodontium. Furthermore, on day 8 in the T₂₀ group proliferation was decreased, as compared to the T₄ group. The 8-day specimens exhibited compartments containing a great number of fibroblast-like cells at the proliferating level in each group, while the T₄ group demonstrated marked numbers of fibroblast-like cells. The 21-day specimens of the T₄ group had abundant fibroblast-like cells and collagen-components and a low bone formation rate in the wound compartments.

The present study suggests that PDL tissue supplies cells to periodontal wounds containing a surgically created periodontal space and that TGF- β enhances fibroblast-like cell migration and proliferation in early periodontal wound healing in combination with collagen as a carrier of TGF- β and a barrier-membrane. Moreover an effect of TGF- β was recognized in fibroblast-like cells, which differentiated into mature fibroblasts in the PDL and

prepared the new collagen components, while there was no evidence of an effect on the osteoblast-like

cell differentiation associated with the production of new bone.

Key words : TGF- β , Periodontium, PCNA, Fibroblast, Alveolar bone

要旨 : この研究の目的は, Transforming growth factor- β (TGF- β) が実験的歯周組織欠損部において, 歯根膜細胞の遊走および増殖を刺激し, 組織の修復を促進させるかどうかを明らかにすることである。5頭のビーグル犬の歯根 30 部位の頰側に縦 3 mm×横 5 mm の開窓状骨欠損を作成し, 露出した歯根面をルートプレーニングして, そのまま歯肉弁で被覆した群 (C 群), コラーゲンおよびシリコン膜を貼付し, リン酸緩衝食塩水 (PBS) を注入したプラセボ群 (P 群), 20 ng/10 μ l または 4 ng/10 μ l の TGF- β を注入した群 (T₂₀ 群, T₄ 群) の 4 群に分けた。術後 3, 8 および 21 日目に屠殺して, 骨欠損の歯冠方向上端から根尖方向下端に根面に沿った観察領域を設定し, 組織形態学的に分析を行った。炎症やフィブロネクチンの所見では顕著な差は認められなかったが, 全体としては P, T₂₀, T₄ 群は, C 群と比べると線維芽細胞様細胞の数は少なかったが, 3 日目の T₄ 群で近接した歯周組織から欠損部に向かって Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性細胞が多く認められた。8 日目の T₄ 群は, 多数の線維芽細胞様細胞の増殖を示したが, T₂₀ 群は最も少なかった。21 日目の T₄ 群は線維芽細胞様細胞とコラーゲン線維に富んでいたが, 創傷部位で新生骨はほとんど認められなかった。以上のことから, 4 ng/10 μ l の TGF- β は歯周組織の初期治癒過程において線維芽細胞様細胞の遊走や増殖を高めて, 歯根膜内でコラーゲンを産生させるが, 新生骨を作る骨芽細胞様細胞の分化には効果はないと示唆された。

索引用語 : TGF- β , 歯根膜組織, PCNA, 線維芽細胞, 歯槽骨

緒 言

近年, サイトカインが歯周疾患の発症と進行あるいは治癒に影響を与えているという報告¹⁾が多い。そのうち, Transforming growth factor- β (以下 TGF- β とする) は, 血小板に多く含まれており, また骨組織にも大量に存在するために, 歯周組織に傷害が生じた場合の創傷治癒に, 細胞遊走因子や細胞成長因子として働き, 増殖した歯根膜細胞がコラーゲン線維や骨, セメント質を形成する細胞に分化する調節機構を担っているといわれる^{2~8)}。一方, TGF- β は *in vitro* で免疫担当細胞や上皮細胞の増殖を抑制するという報告^{9,10)}もある。

TGF- β はマスキングプロテインと結合した潜在型として組織中に存在するが, 酸性で活性型 TGF- β に置換され, *in vivo* でも創傷治癒のメカニズムに関与して, 種々の細胞に対して増殖や抑制の作用があると報告¹¹⁾されており, 細胞の走化性の促進やフィブロネクチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生, 血管新生などとも関わっていることが判っている^{12~14)}。

そこで, 歯周組織の創傷治癒における TGF- β の治療応用の可能性が示唆され, 臨床的には, 局所における結合組織や骨組織の修復促進作用があるかどうかについて注目されてきた。

本研究の目的は, 実験的に歯根膜部が露出するよう

な開窓状の骨欠損を作製して, 歯肉結合組織を膜によって遮断した創傷治癒部に TGF- β を投与し, 21 日目までの治癒過程を組織学的に検索して, TGF- β が局所の細胞の増殖や分化にどのような影響を与えているのか, その結果, 歯周組織再生に TGF- β が有効に関わっているのかどうかを明らかにすることである。

材料および方法

1. 実験動物および被験部位

雌のビーグル犬 5 頭 (2.5~3 歳齢, 体重 10.5~16 kg) を用いた。実験に先立って一定期間スケージングおよびブラッシングを行い, 歯肉に炎症のない状態を臨床的診査で確認して, 上下顎左右 P₂, P₃, P₄ および下顎左右 M₁ の中から隣接しない 30 歯を選択し, それぞれの近心または遠心の 1 根を被験部位とした。

2. 使用材料

実験に使用した材料は, 凍結乾燥ヒト血小板由来の TGF- β ₁ (宝酒造, 京都) で, 解凍後, 2 mg/ml のウシ血清アルブミンを含む 5 mM の HCl を用いて活性化させ, リン酸緩衝液 (pH 7.4) (以下, PBS とする) で所定の濃度に調整して使用した。また, 担体として仔牛由来熱架橋アテロコラーゲンを原材料としたコラーゲンをを用いた。これはコラーゲン層と厚さ 100 μ m のシリコン膜からなる構造を有する (テルダミス®, テルモ社, 東京, 以下コラーゲンおよび膜と

図1 コラーゲンおよび膜のSEM像

担体として使用したコラーゲンとシリコン膜の表面と断面。シリコン層(a)とコラーゲン層(b)の境界が不明瞭である。

する；図1)。

3. 実験部位の作製

麻酔下で、被験歯根頰側の辺縁歯肉に内斜切開を入れて歯肉弁を作製後、鈴木ら¹⁵⁾の方法に準じて、被験部位歯根面に対応する頰側に、歯槽骨頂から約2mmの位置から根尖方向へ縦3mm×横5mmの開窓状骨欠損を作製した。露出した歯根面をルートプレーニングして、骨欠損部下端の骨頂の高さで根面に幅約1mmのノッチを付けた。

次に、膜の部分が欠損部辺縁の上下左右1mmを被覆するような5mm×7mmのシリコン膜の中央に、約2mmの厚さの3mm×5mmのコラーゲンが位置するようにトリミングし、コラーゲンを骨欠損部に挿入するように貼付した。この際、実験群では、所定の濃度のTGF- β を丁度欠損部のコラーゲンを浸漬するように注入した。その上を歯肉弁で被覆して歯冠部で縫合し、テトラサイクリン2.0mg/kgを皮下に注射して外科処置を終了した。TGF- β は20ng/10 μ l (60pmol/ml) および4ng/10 μ l (12pmol/ml)の濃度のものを用い、それぞれ欠損部に約10 μ lを注入し、T₂₀群、T₄群とした。また、骨欠損を膜を用いないでそのまま歯肉弁で被覆したコントロール群(以下C群とする)、TGF- β の代わりにPBSを注入したプラセボ群(以下P群とする)を作製した。

外科処置日から屠殺するまでの期間を3日、8日、21日目となるように各被験歯根をグループに分け、また使用したイヌの左右両側が異なったグループに属するように上下顎の左右側合計30部位をランダムに

各実験群に分けた。ここで、3日目と21日目のグループは各群2部位ずつ、8日目のグループは各群4部位ずつとし、それぞれ所定の日に外科処置を行った。なお、T₂₀群については8日目までを実験期間とした。

4. 組織学的観察および分析の方法

屠殺後、処置部位を顎骨から切り出し、直ちに10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬して水平の方法¹⁶⁾を参考としてマイクロウェーブを10秒間照射後、さらに10%中性緩衝ホルマリン液で2週間固定、ギ酸・クエン酸ナトリウム溶液で3週間脱灰を行った。その後、通法に従い、脱水、パラフィン包埋を行い、歯根近心から遠心方向へ厚さ約6 μ mの頬舌断組織切片を作製した。そのうち歯根中央部の標本を、以下に述べる5種類の染色に対してそれぞれ約300 μ mの間隔で3枚、合計15枚ずつを選択し、ヘマトキシリン・エオジン重染色(以下H.E.重染色とする)、アザン・マロリー染色やProliferating cell nuclear antigen(以下PCNAとする)免疫染色、フィブロネクチン(以下FNとする)免疫染色、アルカリフォスターゼ(以下ALPaseとする)免疫染色などの各種染色を施した。

1) 実験で行った免疫染色法について

(1) PCNA免疫染色

PCNA免疫染色は、LSAB Kit (labelled streptavidin biotin, Dako社, Denmark)を用いて行った。すなわち、パラフィン切片を脱パラフィン後、内因性ペルオキシダーゼのブロッキングのために3%過酸化水素水を5分間作用させた後、ウシ血清アルブミンで非特異反応のブロッキングを5分間行った。その後、一次抗体としてマウス単クローナル抗PCNA抗体(50倍希釈, Dako社, Denmark)を室温で40分間反応させ、さらに二次抗体としてビオチン標識抗マウスイムノグロブリン・ヤギ抗体を10分間反応させた。次にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを10分間反応させ、3%3-アミノ-9-エチルカルバゾールでペルオキシダーゼ発色反応を行った。水洗後、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行い、グリセロール水溶性封入剤で封入した。なお、ネガティブコントロールとして、一次抗体のかわりに0.15M NaCl含有0.05M トリス塩酸緩衝液(pH 7.6)を反応させた。

(2) FN免疫染色

パラフィン切片を脱パラフィン後、0.1%トリプシンを含む0.1%塩化カルシウム溶液で37°C、30分間酵素処理を行った。以下、PCNA免疫染色と同様に、LSAB Kitを用いて、免疫組織化学染色を行った。一

図2 組織学的分析のための観察領域
被検部位頬側歯根側の観察領域A,
B, C, D (200 μ m $\times$ 250 μ m)。膜の
内側や外側にもそれぞれ3領域を設定
した。

次抗体としては、ラビット抗ヒトフィブロネクチン抗体 (200 倍希釈, DAKO 社, Denmark) を室温で 30 分間反応させた。ネガティブコントロールとして、一次抗体のかわりに 0.15 M NaCl 含有 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) を反応させた。

(3) ALPase 免疫染色

ALPase 免疫染色においても、LSAB Kit を用いて染色した。一次抗体としては、マウス単クローナル抗アルカリフォスファターゼ抗体 (2000 倍希釈, Sigma 社, USA) を 37°C にて 30 分間反応させた。ネガティブコントロールとして、一次抗体のかわりに 0.15 M NaCl 含有 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6) を反応させた。

2) 組織標本における分析方法

(1) 組織標本における観察領域の設定

図2に示したように、被験歯根標本の頬側にAからDまでの4領域を選出し、また使用した膜の内側や外側にも領域を設定して、以下の解析を行った。

各領域は、縦 200 μ m $\times$ 横 250 μ m の一定の面積を有する。測定は、400 倍光学顕微鏡下で2部位あるいは4部位の実験群について、それぞれ1部位につき約 300 μ m の間隔ごとに選出した合計3枚の標本を用いて行い、各群についてその平均値および標準偏差を算定した。

a. 細胞数の算定

各群における領域AからDの根面側の、PCNA 陽性細胞数の算定は、明らかに他の細胞と区別可能な陽性細胞数を計測した。

次に、H.E. 重染色標本を用いて、C群、P群、T₄群の3日目および8日目のグループの根面側の領域Cの全細胞数を計測し、その中のPCNA 陽性細胞数の割合を求めた。

b. 各領域での各種細胞の割合の算定

Weibel ら¹⁷⁾の方法による組織学的形態計測法 (以下 Weibel 法とする) に準じて、H.E. 重染色標本上での各領域で、縦 200 μ m $\times$ 横 250 μ m で 25 μ m 間隔のグリッドの交点 (99 点) 直下の細胞を観察し、その形態的特徴から、骨組織や根、脈管と無関係な紡錘状の細胞を線維芽細胞様細胞、作製された骨欠損内で根面に密着した円形、扁平あるいは短円柱状の細胞をセメント芽細胞様細胞、骨の類骨層と密着した丸い、扁平な短円柱状細胞を骨芽細胞様細胞、血管壁を構成している細胞を血管内皮細胞として4種類に分類し、その他の細胞と区別しながら細胞の種類を判定して、それらの数を計測した。また、骨組織や炎症性浸潤細胞、上皮細胞の存在する部位などは除外している。

c. 根面側の領域CにおけるPCNA 陽性細胞数/線維芽細胞様細胞数の比の算定

H.E. 重染色標本を用いて測定した8日目グループの根面側の領域Cの全ての細胞数を測定し、これに前述の方法によって求めた線維芽細胞様細胞の割合を乗じて線維芽細胞様細胞の数を算定し、PCNA 陽性細胞数/線維芽細胞様細胞数の比を算定した。

(2) FN の局在の観察

FN 免疫染色標本を用いて、根面側の各領域のFNの局在を観察した。ここでは、ネガティブコントロールと比較して明らかに強陽性を呈する所見からFNの陽性部位を確認した。

(3) コラーゲン占有率の算定

アザン染色標本を用いて、各領域ごとに図3のようにWeibel法によるグリッドの交点直下を観察し、領域内で青染部が占める割合を算定し、コラーゲン占有率とした。

(4) ALPase 免疫染色陽性細胞の数の算定

根面側の領域B, Cについて、200 倍光学顕微鏡下で400 倍で観察したのと同じ領域内においてALPase 免疫染色標本を観察した。判定には、ネガティブコントロールと比較して明らかに強陽性を呈するものをALPase 染色陽性細胞とし、各領域のALPase 免疫染色陽性細胞の数を算定した。

3) 統計学的処理

各群間, グループ間における差異については, 統計学的に Welch's t test で検定した。

図 3 Weibel 法によるコラーゲン占有率の算定

Weibel らの方法による組織学的形態計測法に準じて縦 $200\ \mu\text{m}$ × 横 $250\ \mu\text{m}$ の $25\ \mu\text{m}$ 間隔のグリッドの交点直下 (+ 点) を観察し, その点が青染しているかどうかにより領域内で青染部が占める割合を算定した。(アザン・マロリー染色, 原倍率 $\times 400$)

結 果

1. 治癒における組織所見と FN の局在について

創傷治癒過程の観察所見を以下に述べる。骨欠損作製部位の C 群, T_4 群の H.E. 重染色像を図 4 a, b に示した。膜を使用した P 群, T_{20} 群, T_4 群では, 担体として使用したコラーゲンは膨潤して, 標本作製時にシリコン膜が脱落し, 組織標本観察時には膜は認められなかった。

1) 3 日目の所見

H.E. 重染色像のすべての群で, 欠損部にフィブリン塊や炎症性細胞浸潤が認められた。

C 群では, 血管の拡張が骨欠損部根尖方向下端部領域 C とその根尖方向寄り領域 D に多く認められた。FN の局在は炎症部位や血管壁, 結合組織に強陽性に認めた。

P 群においても, 骨欠損部にフィブリン塊や炎症性細胞浸潤が認められたが, 部分的に担体のコラーゲンが残存していて, その周囲に単核の比較的大きな細胞も認められた。膜が脱落しているために膜の内側の周囲組織にはアーティファクトが認められた。骨欠損部位の根面側はその影響を受けていなかった。膜外面に接した部位は, 白血球や赤血球を含む血液成分によって囲まれていた。FN は, C 群同様に炎症部位や結合

図 4 骨欠損作製部位の H.E. 重染色像

a : T_4 群 8 日目, b : C 群 21 日目

膜を使用した T_4 群では, 膜は組織標本作製時に脱落した。(原倍率 $\times 40$)

c : P 群 21 日目, d : T_4 群 21 日目

領域 B の所見で, c では新生骨が認められるが, d では認められない。(原倍率 $\times 200$)

組織に強陽性に認めた。

T₂₀ 群でもほぼ同様の所見が認められたが、膜内側と根表面の領域では等しい割合にコラーゲンの残渣とフィブリン塊があり、また炎症性細胞浸潤がP群よりも多く観察された。領域Dには血管の拡張がC群やP群よりもわずかに多く認められた。FNの染色性は、炎症性細胞の浸潤が多い部位で、C群やP群よりも強陽性であった。

T₄ 群では、T₂₀ 群とほぼ同様の所見を示し、炎症性細胞浸潤を多く認めた。

2) 8日目の所見

C群で、欠損部の大部分の領域に新生された結合組織が認められた。炎症性細胞浸潤は領域A、Cには認められなくなったが、新生血管は多く認めた。FNは血管周囲と結合組織のコラーゲン線維の走行に沿って陽性箇所が拡大して認められた。

領域Bでは、炎症性細胞浸潤が多いが線維芽細胞もその周囲に疎に認められた。特に、領域A、Cで歯肉組織から密に骨表面にそって平行な線維芽細胞様細胞があり、それらは歯根膜組織の線維芽細胞様細胞の走行と交差しながら歯根面方向にまで認められた。

膜を用いたP群、T₂₀ 群、T₄ 群では欠損部上端、下端の外側骨面と膜との間に100~200 μ mの幅の結合組織が認められ、膜と骨とは密接な状態ではなかった。

P群で、炎症性細胞は膜の外側にも内側にも3日目より少ないが、リンパ球が増加していた。根面側ではC群と同様に領域Bに炎症域が多かった。担体であるコラーゲンは3日目よりは少ないが、膜内面に一部に残存していた。しかし、根面側に近接した部位には認めなかった。コラーゲンが残存している部分には新生血管はわずかしこ観察されなかった。FNは欠損部の領域に広範囲に認められたが、瀰漫性に強陽性を示した。

T₂₀ 群では、炎症性細胞の数がP群に比べて膜内側外側に多い。コラーゲンがP群よりも広い範囲に残存しており、新生血管は少なく、全体として欠損部の結合組織はP群よりも疎であった。FNについてはP群と同様な所見であった。

T₄ 群の欠損部には、T₂₀ 群と同様に炎症性細胞が多く、またその組成も赤血球やリンパ球が多かった。領域A、Cでは線維芽細胞様細胞とコラーゲン線維が骨面、セメント質表面に平行に認められ、既存の歯根膜組織のコラーゲン線維と連続している像が観察された。この傾向はT₂₀ 群に比べて多かった。また、この部位では血管も多く、図5に示したように血管周囲および根面や骨面に沿った線維にFNが強陽性に認

図5 T₄ 群8日目のFN免疫染色所見
血管周囲は強陽性に認められたが、結合組織中は染色は強くなく瀰漫性に認められた。(原倍率×400)

められた。

FNの8日目の染色性は、全体的に強くないが、領域的には広範囲に広がっていた。

3) 21日目の所見

すべての群において、欠損部は結合組織で満たされていた。C群では、根面領域の炎症性細胞はほとんど認められず、欠損部位の領域B、Cに新生骨が認められた。部分的に、歯根膜の幅も既存の組織に近似した幅に再生されていた。新しい歯根膜組織内には血管が多く、セメント質表面、骨表面にセメント芽細胞様細胞や骨芽細胞様細胞が認められた。露出歯根面に近接した部位での線維の走行は、根、骨面に平行であった。

C群に比べると、P群では炎症性細胞が領域Bに存在していた。膜の周囲にはリンパ球や単核細胞が認められた。領域Cに新生骨が認められたが、C群の新生骨量よりわずかに少なく、骨梁は疎な構造を呈していた。領域A、Cでの線維芽細胞様細胞は、8日目と比べて同程度に認められた。ただし、他の群に比較して、セメント質表面に平行にコラーゲン線維が密に観察された。

T₄ 群では、リンパ球を主体とする炎症性細胞成分が領域B付近の膜内側に多く認められ、また膜の外側にも広域に観察された。FNの強陽性部分は8日目とほとんど変化がなく、広範囲に認められた。欠損部では、領域B、Cに新生骨がほとんど観察されなかった。図4c, dにP群とT₄ 群の21日目のH.E.重染色像を示した。領域Bの膜内側にわずかにコラーゲン残渣がある例もあった。領域A、B、Cの根面側には、セメント質表面に平行に走行しているコラーゲン

図 6 C 群3日目の PCNA 免疫染色所見
観察領域の C, D を含む, 左側が根面側の組織像で, 陽性細胞は骨欠損根尖方向下端部から欠損内へ連続して観察された。(原倍率 $\times 200$)

図 7 P 群3日目の PCNA 免疫染色所見
領域 D で陽性細胞は少なく, 領域 C で領域 D から欠損内に連続する陽性細胞の数が C 群と比べて少ない。(原倍率 $\times 200$)

図 8 T₄ 群3日目の PCNA 免疫染色所見
陽性細胞は領域 C, D で多いが, 領域 C で欠損内に連続する陽性細胞の数は C 群と比べて少ない。(原倍率 $\times 200$)

線維が多く, 他の群のものに比較して最も高い密度に線維が認められた。アザン・マロリー染色標本では, 部位によってコラーゲン線維が束になって走行しているのが観察された。

2. PCNA 陽性細胞の分布および経時的変化

1) 3 日目の所見

図 6, 7, 8 に 3 日目の領域 C, D における C 群, P 群, T₄ 群の PCNA 免疫染色の組織写真をそれぞれ示した。C 群, P 群共に領域 B では, 陽性細胞はほとんど認めなかった。C 群では領域 C, D で PCNA 陽性細胞が著しく多く観察された。細胞は骨欠損部根尖方向下端部から欠損内へ連続して観察された。また, 歯根膜内の領域 D で, PCNA 陽性細胞は骨表面に近接して認められ, セメント質表面にはほとんど認めなかった。C 群と比べると P 群では, 特に領域 D で PCNA 陽性細胞は少なく認められた。T₂₀ 群では, P 群と同様な所見が認められたが, T₄ 群では領域 C, D で多く観察された。ただし, T₄ 群の領域 C を観察すると, 欠損内に連続する PCNA 陽性細胞数は C 群に比べて少なかった。また T₄ 群の領域 D で, PCNA 陽性細胞は骨表面とセメント質表面の両方に認められた。

2) 8 日目の所見

図 9, 10 に, 8 日目の T₂₀ 群と T₄ 群の領域 C, D

図9 T₂₀群8日目のPCNA免疫染色所見

領域C, Dでは陽性細胞が矢印のように散在している。(原倍率×200)

図10 T₄群8日目のPCNA免疫染色所見

領域Cでは陽性細胞はT₂₀群より多く観察される。領域Dでは特に骨表面に陽性細胞が認められる。(原倍率×200)

* : $p < 0.01$ ** : $p < 0.05$ *** : 有意差なし

図11 根面側の領域B, C中の8日目のPCNA陽性細胞数(平均値±標準偏差)

のPCNA免疫染色標本を示した。また図11に根面側領域B, CのPCNA陽性細胞数の平均値と標準偏差を示した。C群では、多くのPCNA陽性細胞が観察され、P群はC群よりも少なく観察された ($p < 0.05$)。このときT₂₀群とT₄群を比較すると、T₂₀群で陽性細胞数が有意に少なかった ($p < 0.01$)。

図9, 10では、領域Dの骨表面にPCNA陽性細胞が散在していた。

3) 21日目の所見

すべての群において、3日目や8日目に比べると陽性細胞は少なかった。C群やP群の新生骨の表面に近接して陽性細胞が見られた。T₄群では新生骨は認められないが、結合組織中に陽性細胞が見られ、結果的にはC群、P群と同程度の陽性細胞数であった。

4) 経時的変化

図12に、C群、P群、T₄群の根面側の領域B, Cで、PCNA陽性細胞数の平均値を経時的に示した。8日目のC群、P群、T₄群のいずれにおいても、陽性細胞数は3日目より多いが、なかでもP群で3日目と比べて8日目に有意に多く認められた ($p < 0.01$)。21日目にはいずれの群でも少なく観察された。T₄群における8日目と21日目の変化に有意な差が認められた ($p < 0.01$)。

3日目および8日目の根面側の領域C中のPCNA陽性細胞数/線維芽細胞様細胞数の比率を図13に示した。3日目でT₄群は、C群と同程度にPCNA陽性細胞の占める割合が大きく、P群が最も低かった。8日目になると、すべての群で少ない割合となったが、P群があまり変化していないのに比較すると、C群、T₄群で著しく減少し、特にT₄群は3日目の1/2以

図 12 3日目、8日目および21日目の根面側の領域B、C中のPCNA陽性細胞数
外科処置を行わない部位を対照とした。
(平均値±標準偏差)

図 13 3日目および8日目の根面側の領域C中のPCNA陽性細胞数/線維芽細胞様細胞数 (%)
全線維芽細胞様細胞数を100%として黒カラムの長さでPCNA陽性細胞数の比率を示した。

図 14 各領域における8日目の線維芽細胞様細胞の割合

図2に示した根面側の観察領域A、B、C、D、膜内面側の観察領域および膜外面側の観察領域について、線維芽細胞様細胞の占める割合(%)を図示した。

下になった。

3. 各領域での線維芽細胞様細胞の割合

各領域における8日目の線維芽細胞様細胞の割合を図14に示した。各群とも、領域によって細胞の分布にばらつきが見られたが、根面側に沿った領域A、B、C、Dでは、T₄群の方がP群より大きかった。

3日目および8日目の根面側の領域C中の線維芽細胞様細胞の割合を図15に示した。3日目と8日目のいずれも、P群に比べてT₄群、C群は多く、統計的有意差がP群とT₄群間に認められた ($p < 0.01$)。3日目と8日目の値を比較すると、いずれの群も8日目になるとそれぞれ3日目と比較して約2倍程度に線維

図 15 3日目および8日目の根面側の領域C中の線維芽細胞様細胞の割合の比較

図 16 根面側の領域B, C中のALPase免疫染色陽性細胞数
外科処置を行わない部位を対照とした。(平均値±標準偏差)

表 1 根面側の領域B, C中の線維芽細胞様細胞の割合とコラーゲン占有率

	8日目		21日目	
	線維芽細胞様細胞 (%)	コラーゲン (%)	線維芽細胞様細胞 (%)	コラーゲン (%)
C 群	31.3±6.7	35.5±20.0	34.7±15.5	49.2±6.6
P 群	22.5±7.2	26.0±17.5	26.5±10.4	35.7±5.0
T ₄ 群	29.7±9.1	30.9±11.5	30.0±6.1	50.6±6.3

(平均値±標準偏差) * : $p < 0.01$

芽細胞様細胞の割合が高くなった。

4. 領域B, Cでの線維芽細胞様細胞の割合とコラーゲン占有率

8日目および21日目の根面側の領域B, C中の線維芽細胞様細胞の割合の平均とコラーゲンの占有率を表1に示した。8日目と21日目の値を比較すると、線維芽細胞様細胞はC群, P群, T₄群に著しい差は認められなかった。コラーゲンの占有率は、21日目は8日目よりC群, P群, T₄群で多かったが、統計学的有意差はT₄群にのみに認められた ($p < 0.01$)。特にT₄群は21日目にはP群と比べても有意に多かった ($p < 0.01$)。

5. ALPase局在と骨芽細胞様細胞数, セメント芽細胞様細胞数

根面側の領域B, C中で、ALPase活性の高い細胞が認められる局在を確認し、その細胞数の経時変化

を図16に示した。3日目のC群, P群, T₄群は、いずれもALPase陽性細胞数は非常に少なかったが、8日目では多く認められた。図17に8日目におけるT₄群のALPase免疫染色像を示した。21日目には、いずれの群も減少した。8日目の各群間では、ALPase免疫染色陽性細胞数に有意な差は認められなかったが、ALPaseの局在箇所は骨やセメント質に近接しているものが多く観察された。21日目のC群およびP群では、新生骨の部分に密接して多く認められた。しかし、T₄群では骨やセメント質に接していない細胞が多く認められ、C群とP群については骨に接しているものがほとんどであった。

考 察

歯周組織の創傷治癒の過程で、歯根膜由来の細胞の

図 17 T₄ 群 8 日目の ALPase 免疫染色所見
骨面から結合組織が剝離するアーティファクトが見られるが、矢印で示したように、露出歯根面、骨表面および骨やセメント質から離れた結合組織中に陽性細胞が認められる。(原倍率×200)

増殖・分化の調節を担う細胞成長因子として注目を浴びているものとしては、Platelet derived growth factor (以下 PDGF とする)、TGF- β 、Bone morphogenetic protein (以下 BMP とする) などがある。しかし、それらの研究は培養ヒト歯根膜細胞や小動物の骨芽細胞などを用いたものが多く¹⁸⁻²¹⁾、歯周組織の中での複雑な調整機構を明解するにはまだ不明なところが多い。そこで動物を用いての *in vivo* の実験系がいろいろ紹介されている。現在までに、水平的骨欠損や根分岐部骨欠損を作製して歯根を露出させ、歯根膜組織が歯冠方向に再生するのを観察する方法²²⁻²⁴⁾、また本研究で行ったような開窓状骨欠損を作製し、歯肉辺縁部の細菌性刺激を受けないような環境下で、修復に携わる細胞のオリジンを探求する方法が考案されてきた^{15,25-27)}。

本研究で作製した 3 mm×5 mm の開窓状骨欠損では、図 2 に示したように創傷治癒部の露出歯根に近接して、歯冠側、根尖側および近、遠心側の 4 方向に歯槽骨が存在する。したがって、近遠心的中央部の歯根表面を観察するかぎりにおいては、修復は上端と下端においてのみ認められることとなる。上端部(領域 A)と下端部(領域 C)を比較すると、より特徴的な所見が下端部に認められた。Wang ら²⁷⁾は観察領域として開窓状骨欠損の本研究の A、B、C 相当領域を、Iglhaut ら²⁸⁾は本研究における領域 C の下端部から 100 μ m ごとの領域を術後 7 日目まで観察し、それぞれ術後 3 日目までは領域 C で、7 日目には領域 B、C で増殖細胞数が増加することを認めている。本研究では、治癒初期の術後 3 日目までは歯根膜細胞の遊走、

増殖を見るために主に既存歯根膜組織に近い領域 C について解析を行い、8 日目および 21 日目では観察範囲を拡げて領域 B、C について解析した。

歯肉結合組織と欠損部をできるだけ遮断するために膜を用いている報告も多いが^{22,26,27)}、それらの報告の多くは、膜の使用は歯周組織、特に新生セメント質や新生骨の再生に有利であるとしている。この場合、辺縁部の上皮細胞の深部増殖が抑制されて、根面との間に上皮性付着が生じにくいともいわれている¹⁰⁾。開窓状骨欠損に対して膜を使用した本研究でも、ほとんどの組織学的標本で、歯肉線維芽細胞の遊走が膜によって遮断されているのが、また上皮性付着の進行が限局されているのが観察された。

このような環境下において、本研究では TGF- β を 1 回(シングル)局所投与して、3、8、21 日目までを組織学的に検索した。研究者によっては、組織成長因子を歯周組織創傷治癒部へ投与する方法として、局所にコットンペレットを 1 分間おく方法²⁷⁾、メチルセルロースゲルやアテロコラーゲンを注入する方法^{24,28)}あるいはシリンジで連続投与する方法^{12,14)}を採用している。しかし、これらの方法では、組織成長因子の濃度を規格化することが難しい。その解決方法として、松本²⁹⁾は BMP をコラーゲン線維ペレットの複合体として凍結乾燥する方法を紹介している。

本研究では、シリコン膜に密着したコラーゲンを担体として、それを欠損部の大きさに適合するようにトリミングし、シリコンの遮断膜としての効果を期待するとともに、担体が移動しないように工夫して、できるだけ一定量の細胞成長因子(TGF- β)を投与する方法を考案した。この担体は他のコラーゲンやタンパクに比較して抗原性が弱いとされるアテロコラーゲンを原料とし、線維化アテロコラーゲンと熱変性アテロコラーゲンを 9:1 の割合で凍結乾燥したもので、外側になる部分に厚さ 100 μ m のシリコン膜を付与して、熱脱水架橋して作製したものである³⁰⁾。コラーゲンは、コラーゲナーゼなどによって低分子のタンパクやアミノ酸に分解されるか、中性プロテアーゼで切断されてから食細胞に取り込まれ、細胞内でアミノ酸へと分解されて、生体内で消失するといわれている^{25,30)}。本研究において、コラーゲンの周囲に単核の比較的大きな細胞が多く認められたが、術後 8 日目にまだコラーゲン残渣が認められた。シリコン膜の部分の構造は、図 1 に示したようにコラーゲン部に接した部分の気孔率などがコラーゲン部と類似して、その境界が不明瞭である。しかし、膜の外側を観察すると、細胞成分を通過させない構造を早していて、膜が歯肉線維芽細胞を遮断して、歯肉方向からの歯肉線維

芽細胞の遊走を妨げているような所見が観察された。つまり、図 12 に示したように 3 日目の根表面における PCNA 陽性細胞数は、膜を用いない C 群のほうが膜を用いた P 群より多く観察された。

なお、シリコンは生体内では吸収されないので、鈴木ら¹⁵⁾の研究の Gore Tex 膜のような周囲組織と膜が密接している像が認められず、膜の周囲にはフィブリンや血球成分を含む壊死物質の無構造な層が認められ、生体親和性が低いと考えられた。また、コラーゲンが膨化しているのが観察された。

再生組織の細胞増殖に関与するマーカーのうち、Wang ら²⁷⁾は S 期のマーカーとして ³H-チミジンを用いているが、放射線同位元素を用いる方法は施設が制限されて難しい。その他に細胞増殖のマーカーとして Nucleolar organizer regions (AgNORs) 染色や Anti-human proliferating cell (Ki-67 antigen) MIB-1 免疫組織化学染色を用いて検索している研究³¹⁾もあるが、本研究ではパラフィン切片を用いて詳細に組織学的観察を行うために PCNA 免疫染色を採用した。細胞の増殖マーカーとして知られる PCNA は、増殖サイクルの主として G₁ 後期から S 早期にかけて細胞核内に蓄積し、DNA 合成に密接に関与して、分裂期の細胞数にほぼ応じた陽性細胞数が組織標本上で観察できるといわれている³²⁾。しかし、G₁ 後期から S 早期の細胞のみならず、より広範囲の細胞サイクル、あるいはサイクルを終了した細胞内にも検出されるという報告³³⁾もあり、実際よりも少し多い目に観察される可能性がある。PDGF を用いた Wang ら²⁷⁾の報告と比較すると、本研究での細胞の分布は使用した成長因子が異なっていて直接比較することは難しいが、観察領域の面積が 200 $\mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$ で Wang らの 400 $\mu\text{m} \times 400 \mu\text{m}$ と比べて小さいにもかかわらず、陽性細胞数が約 2 倍多く認められる傾向にあった。

Choi ら²⁵⁾はコラーゲンを欠損部に填入しても、組織の治癒を促進も阻害もしなかったと報告している。また、TGF- β は *in vivo* で、血管の新生を促進する作用をもつことも報告¹⁴⁾されている。

本研究では、新生血管などの進入、細胞増殖が C 群に比べて T₂₀、T₄ 群で少なく認められた。これは、TGF- β は血管内皮細胞の増殖を抑制するといわれており³⁴⁾、その効果であるとも考えられるが、一方では、使用した担体が 8 日目まで残存していることに起因しているとも考えられる。

膜を用いない C 群では、連続して歯肉側から線維芽細胞やコラーゲン線維が欠損部骨面断端に平行に認められる所見であったが、膜を用いた群の 8 日目の所見では、歯根膜部から歯根表面へ連続して認められた。

また、図 12 に示したように TGF- β を使用した T₄ 群 3 日目では、P 群に比べて領域 B、C に PCNA 陽性細胞が多く、このことから、TGF- β と膜を用いた場合には欠損部内での細胞の増殖は歯根膜細胞由来のものが多いと考えられた。

TGF- β の成長因子としての作用のうち、歯根膜細胞の増殖や分化に関してはヒト線維芽細胞と比較したもの^{18,35)}あるいは免疫担当細胞や上皮組織に対する作用を検索した報告^{9,10)}があり、いろいろな細胞に対する作用が、濃度に依存して増加するもの、また高濃度ではかえって抑制効果があると述べている報告^{11,20)}もある。*In vitro* の実験で鈴木³⁵⁾や牛ら⁶⁾は、ヒト歯根膜細胞に TGF- β を適用すると、濃度依存的に細胞増殖を促進したという。一方、Matsuda ら¹⁹⁾の実験では、ラットの歯根膜細胞に 0.1~10 ng/ml の TGF- β を適用すると、細胞の分裂能が低下したという。このように、歯根膜細胞の遊走や増殖に対する TGF- β の作用は複雑多様である。TGF- β は G₁ 期から S 期へのシフトを促進させ細胞増殖に有利に働くといわれている⁹⁾が、TGF- β の作用する濃度や環境条件、個体差などにより影響を受けることが示唆された。

TGF- β の投与量についてはラット口蓋¹²⁾へ塗布したり、ラット切創¹¹⁾や犬の根分岐部²²⁾に投与した *in vivo* の実験の使用濃度、量を参考として、創傷部位の面積や注入後の血液の混入などを考慮にいれ、一部位当たり T₂₀ 群で 20 ng、T₄ 群で 4 ng とした。また、予備実験の結果、および杉下ら³⁶⁾の方法に準じて一部位あたりに 10 μl を注入した。

本研究における 8 日目の PCNA 陽性細胞数の結果を図 11 に示したが、T₂₀ 群は T₄ 群に比べて PCNA 陽性細胞数が有意に少なく、この濃度では歯根膜からの細胞の遊走、増殖が抑制されていると考えられた。一方、杉下ら³⁶⁾はキチン膜を用いた *in vivo* の実験で、7 週目に 10 ng/5 μl (60 pmol/ml) よりも、2 ng/5 μl (12 pmol/ml) の濃度で骨やセメント質の再生が促進されたと報告しており、その意味においても T₄ 群の濃度に興味をもたれた。

3 日目の T₄ 群では線維芽細胞様細胞数に比べて PCNA 陽性細胞の割合が多いが、8 日目においては少ない (図 13)。このことは、T₄ 群の増殖した多くの細胞が、すでに紡錘状の線維芽細胞様に形態変化していることを示しており、その程度は TGF- β を用いない P 群よりも多い。組織所見の 8 日目の項において示したように、線維芽細胞様細胞やその産物であるコラーゲン線維が骨やセメント質面に平行に既存の歯根膜線維と連続して走行しているのを考慮に入ると、4 ng/10 μl (12 pmol/ml) の低濃度の TGF- β は、歯

根膜由来の細胞の遊走、増殖に対して作用したと考えられた。この場合、牛ら⁹⁾が観察しているように、TGF- β を投与して3日目くらいまで、細胞の遊走、増殖が活発であったことが示唆された。

本研究では、TGF- β を創傷治癒の初期の段階でシングル投与しているが、TGF- β の連続投与によって組織の再生が促進されたという報告^{37,38)}も多い。そこで、シングル投与すると、その効果がどのように持続的に現れるかを考察する必要がある。

TGF- β は、いろいろな細胞から産生され、活性のない潜在型 TGF- β として細胞外に分泌されるが、TGF- β は活性型となつてはじめて作用する³⁹⁾。Joyce ら⁴⁾は血管系の破壊を含んだ創傷部で血小板の凝集反応があり、その血小板から TGF- β が放出されたり、また遊走してきた単球から分泌される TGF- β によって、外科的侵襲をうけると局所での TGF- β 濃度が高くなるとしている。また、Robey ら⁵⁾は骨芽細胞で分泌されることを報告しているが、骨に含まれる TGF- β が骨折端の基質から遊離されることも、局所における TGF- β 濃度が高くなる原因となる。その TGF- β が創傷治癒に関わっている可能性が高い。また、笹栗⁴⁰⁾によってヒト歯根膜線維芽細胞でも TGF- β が合成されている可能性も示唆されている。そのような TGF- β は、たとえば局所の酸性度が上がれば活性型に変換される^{39,41)}。

ただし、TGF- β には構造の類似したものはいくつかあり、哺乳類では TGF- $\beta_1 \sim \beta_3$ の3つが存在するが、TGF- β_2 をラット骨欠損部に連続して投与すると、TGF- β_1 よりも活性化されるという報告⁴¹⁾などがあるものの、これらの TGF- β には多くの共通点があるので、本研究では TGF- β_1 を用いて実験を行い、その代表名 TGF- β として記載している。

一方で、TGF- β は単球や線維芽細胞に対してその遊走を促進する、つまり、単球も線維芽細胞も TGF- β に対するリセプターをもち、ある濃度の TGF- β がその遊走を促進するといわれている⁷⁾。ただし、TGF- β は、動物種においても、リセプターにおいても種特異性はないといわれている⁴²⁾。そこで、本研究ではヒト血小板由来の TGF- β を局所に投与し、この初期の細胞の遊走、増殖を促進させることを期待した。

Pierce ら¹¹⁾は PDGF や TGF- β を局所に投与することによって線維芽細胞を刺激し、線維芽細胞の TGF- β の遊離を促進させるというふうに、治癒のサイクルが進行する方向に働くと述べている。したがって繰り返して投与しなくても、組織の修復に対して成長因子の影響が続いているものと考えられた。これ

は、TGF- β の静脈内での半減期は短い、創傷治癒の場では効果が持続するという考え³⁴⁾を支持している。

Wang ら²⁷⁾は、創傷治癒初期にフィブリン塊のある部位に線維芽細胞が遊走し、7日目頃からコラーゲンを合成し始めることを観察している。本研究においても C 群では同様の所見がみられた。

TGF- β が、コラーゲンや FN などの細胞外基質蛋白質の産生を促進するという報告^{13,19)}は多い。一方で、細胞外基質を分解するプロテアーゼやコラゲナーゼなどの分解酵素の産生ならびに分泌を抑制し⁴³⁾、総じて細胞外基質が増量蓄積して組織が繊維化する方向に働くことが明らかになっている^{40,43)}。術後21日目の 4 ng/10 μ l の TGF- β を投与した T₄ 群において、線維芽細胞の割合が P 群とほぼ同程度であるのに、コラーゲンの占有率は T₄ 群で有意に多く認められたということは、つまり、組織の繊維化が認められ、これらの研究者の所見を支持するものであった。

実際に、TGF- β が歯根膜由来の線維芽細胞のコラーゲン合成を促進させたという報告^{13,14,18)}は多い。

本研究では治癒時に生じる FN の局在に対する TGF- β の効果については明確な結果は得られなかった。そのため、細胞の遊走という点からも、TGF- β の FN 産生という点からも考察することはできなかった。

一般的に創傷治癒の線維芽細胞数は術後3日目で増大し始め、創傷部位でタンパク質が新生されない静止期を経て、5日目ごろからコラーゲン性および非コラーゲン性の結合組織タンパク質を活発に合成し始めるといわれている²⁷⁾。一方、松原²⁰⁾がイヌの培養歯根膜細胞に対して TGF- β を投与し、PCNA 陽性細胞数を算定して、投与5時間後に最も大きな値を示したと報告している。そういう意味においても *in vivo* で本研究では、3日目よりも前に細胞が活発に増殖した時期があると考えられた。Iglhaut ら²⁶⁾も *in vivo* で創傷治癒部位について調べているが、組織成長因子を用いることによる細胞増殖の差異が認められたのは3日目位からであった。

本研究によると、PCNA 陽性細胞数の所見は、術後3日目では P 群に比べて T₄ 群が多く、平均値として約3倍であった。Wang ら²⁷⁾や Iglhaut ら²⁶⁾も約2倍であると報告しており、TGF- β には細胞の誘導、増殖を促進する効果があると考えられた。PDGF のような他の細胞成長因子では、その後も8日目までさらに著明に細胞増殖が続いていることが報告されている²⁷⁾。本研究では、8日目の P 群と T₄ 群の PCNA 陽性細胞数の差は少なく観察された (図12)。この違い

から、TGF- β は長期的な線維芽細胞の遊走、増殖に関しては、PDGF に比べて効果が少ないことが考えられた。しかし、線維芽細胞の遊走性については、Matsuda ら¹⁹⁾は、TGF- β は遊走性も増殖性も持たないと報告している。PDGF は細胞を刺激して TGF- β などを遊離する働きもあるといわれており¹¹⁾、PDGF を投与した場合の線維芽細胞の遊走、増殖作用は、他のサイトカインの効果と相乗的に認められる^{14,24,44)}ためかもしれない。それを裏付けるものとしては、TGF- β と PDGF の併用によって最も高い増殖効果が発現したという報告²⁾がある。

また、TGF- β は骨芽細胞の I 型コラーゲンの合成や他の非コラーゲン性の骨基質などを発現させ、骨形成を促進するファクターである^{41,45)}。in vivo においては、骨芽細胞を増殖させ、骨の新生を促進することが報告されている^{38,45)}。一方、TGF- β は破骨細胞の活性化を抑制するといわれるが^{45,46)}、いろいろな動物の破骨細胞、またその増殖ステージによって、あるいは他の成長因子との相互作用によって、TGF- β の作用は相反する場合が起こりうるという意見が多い^{8,41,47)}。

骨芽細胞は高い ALPase 活性を有する。そのために、骨芽細胞のマーカーとして、また骨芽細胞における分化の指標として ALPase 免疫染色法が有用される^{20,35)}。Kawase ら⁴⁸⁾は歯肉線維芽細胞に比較して、歯根膜細胞の ALPase 活性が高いことを示し、骨芽細胞が歯根膜細胞から分化すると述べているが、本研究でも、根面側の領域 B、C で ALPase の陽性細胞が 8 日目でも最も多く観察された。そして、21 日目には 8 日目よりは少なくなるという傾向であった。ただし、TGF- β を用いた群と他の群との間に差は認められず、そのため TGF- β の ALPase 活性に対する効果は認められなかった。しかも、C 群と P 群に新生骨が認められたのに対して、T₄ 群ではほとんど新生骨は認められないという特徴的な結果を得た。

TGF- β は、in vitro で ALPase 活性を促進させたという報告^{6,21)}がある一方で、低濃度では促進させたが高濃度では抑制的に働いたという報告^{20,35)}もある。このように、TGF- β の ALPase 活性への効果は、その環境条件により左右されやすいと考えられるが、T₄ 群 21 日目にもほとんど新生骨が認められないところから、TGF- β は ALPase 活性に対して効果を及ぼさないと考えられた。

一方で、TGF- β がコラーゲンを生体内で吸収するために必要なコラーゲナーゼの活性化を抑制するという報告⁴³⁾があるように、コラーゲンの吸収が遅延していた T₄ 群では、局所でコラーゲンが吸収されず残存し

て、骨芽細胞を増殖分化させる場を提供できなかったとも考えられる。また TGF- β は単球などの PGE₂ の放出を促進し^{6,43,45)}、IL-1 によって起こる破骨細胞の活性化にも影響を与えるといわれている^{6,43,45)}。

井上ら³⁾は、歯根膜内の脈管分布と PCNA 陽性細胞との関連を調べ、血管周囲の細胞の分裂が活発であるという観察をした。その他の研究者⁴⁹⁾も歯根膜内の細胞供給は、血管の多い部分から歯槽骨およびセメント質側に向かって行われると述べている。

本研究で用いた担体のコラーゲンは 8 日目まで残存し、新生血管などの進入を遅延させる原因となった可能性も高い。

このような様々な原因が相互に関連していると考えられるものの、本研究では結果的に新生骨組織が形成されていない。この場合、TGF- β は骨芽細胞の分化にはマイナスの影響を与えていると考えた。

TGF- β スーパーファミリーに属する BMP は、未分化間葉系細胞から骨芽細胞の増殖、分化に重要な調節因子として働いて^{8,50)}、組織が損傷を受けると BMP も TGF- β などと同様に局所に溶出して、骨形成を活性化させると考えられる。しかし、オステオカルシンを指標とした高度に分化した骨芽細胞に対しては、TGF- β の作用はおよばないという報告⁹⁾があるように、TGF- β は骨を異所性に形成する能力はない。BMP は、TGF- β などの混合物の影響をうけて、その作用が増強されるともいわれている⁵¹⁾。本研究で用いた TGF- β には、骨を誘導する作用は確認されなかった。

本研究では、新生セメント質はほとんど形成されていなかったが、根表面にはセメント芽細胞様細胞が多く認められた。コラーゲン線維が線維束を形成している部

位があるものの、結果的に線維は歯根面に平行に配列していて、セメント質内に直角に埋入している像は観察されず、TGF- β がセメント質形成に与える影響はほとんどないと考えられた。

以上のことをまとめると、イヌの歯槽骨の頰側に開窓状の骨欠損を作製して歯根を露出させ、歯肉結合組織を遮断する膜で被覆した環境下で、コラーゲンを担体として作用させた TGF- β は、4 ng/10 μ l の濃度 (T₄ 群) で治癒初期に周囲歯根膜組織から欠損部への細胞の遊走、増殖を促進させた。また、21 日目までに結合組織の線維化が促進された。しかし、膜を使用して PBS を投与したプラセボ群 (P 群) と比較すると、T₄ 群では骨欠損部に新生骨はほとんど認められなかった。また、ALPase 陽性細胞の数はどの群も同程度であるが、T₄ 群では ALPase 陽性細胞が骨表

面に近接しているものの他に結合組織中に散在している像も観察された。このことから、TGF- β は骨芽細胞の分化には、むしろマイナスに作用したと考えられる。

文 献

- 1) Terranova, V.P. and Wikesjö, U.M.E. : Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium. *J. Periodontol.*, 58 : 371-380, 1987.
- 2) Dennison, D.K., Vallone, D.R., Pinero, G.J., Rittman, B. and Caffesse, R.G. : Differential effect of TGF- β_1 and PDGF on proliferation of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts. *J. Periodontol.*, 65 : 641-648, 1994.
- 3) 井上 孝, 橋本貞充, 臼田 準, 下野正基 : ビーグル犬における歯根膜の恒常性維持に関する因子の検索—特に細胞と脈管分布, 密度の免疫組織化学的検討—. *歯基礎誌*, 35 : 485-495, 1993.
- 4) Joyce, M.E., Roberts, A.B., Sporn, M.B. and Bolander, M.E. : Transforming growth factor- β and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J. Cell. Biol.*, 110 : 2195-2207, 1990.
- 5) Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondaiah, P., Reddi, A.H., Termine, J.D., Sporn, M.B. and Roberts, A.B. : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type β (TGF- β) *in vitro*. *J. Cell. Biol.*, 105 : 457-463, 1987.
- 6) 牛 忠英, 花澤重正, 竹下 玲, 村上幸生, 片山伊九右衛門, 北野繁雄 : ヒト歯根膜由来の線維芽細胞の機能と遺伝子発現に関する Transforming growth factor- β の作用. *歯基礎誌*, 33 : 133-140, 1991.
- 7) Wahl, S.M., Hunt, D.A., Wakefield, L.M., McCartney-Francis, N., Wahl, L.M., Roberts, A.B. and Sporn, M.B. : Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84 : 5788-5792, 1987.
- 8) Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T. and Yoshiki, S. : Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation *in vitro*. *J. Cell. Biol.*, 113 : 681-687, 1991.
- 9) Kehrl, J.H., Wakefield, L.M., Roberts, A.B., Jakowlew, S., Alvarezmon, M., Derynck, R., Sporn, M.B. and Fauci, A.S. : Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.*, 163 : 1037-1050, 1986.
- 10) Ohshima, M., Taguchi, M., Ogoshi, T., Fujikawa, K., Ito, K. and Otsuka, K. : Stimulation of human periodontal ligament fibroblast collagenase production by a gingival epithelial cell-derived factor. *J. Periodont. Res.*, 30 : 220-228, 1995.
- 11) Pierce, G.F., Mustoe, T.A., Lingelbach, J., Masakowski, V.R., Griffin, G.L., Senior, R.M. and Deuel, T.F. : Platelet-derived growth factor and transforming growth factor- β enhance tissue repair activities by unique mechanisms. *J. Cell. Biol.*, 109 : 429-440, 1989.
- 12) 市村 光 : ラット歯周組織の創傷治癒過程における fibronectin と laminin の局在性の変化—特に bFGF, PDGF および TGF- β 局所投与による影響—. *日歯周誌*, 33 : 280-296, 1991.
- 13) Varga, J., Rosenbloom, J. and Jimenez, S.A. : Transforming growth factor β (TGF β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem. J.*, 247 : 597-604, 1987.
- 14) Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.K. and Fauci, A.S. : Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 83 : 4167-4171, 1986.
- 15) 鈴木明夫, 山口進也, 松江美代子 : 歯周組織再生誘導膜を利用した治癒モデルにおける組織修復について. *日歯周誌*, 33 : 479-491, 1991.
- 16) 水平敏知 : マイクロウェーブ照射による生物試料の固定法. *医学のあゆみ*, 149 : 907-911, 1989.
- 17) Weibel, E.R., Kistler, G.S. and Scherle, W.F. : Practical stereological methods for morphometric cytology. *J. Cell Biol.*, 30 : 23-38, 1966.
- 18) Mailhot, J.M., Schuster, G.S., Garnick, J.J., Hanes, P.J., Lapp, C.A. and Lewis, J.B. : Human periodontal ligament and gingival fibroblast response to TGF- β_1 stimulation. *J. Clin. periodontol.*, 22 : 679-685, 1995.
- 19) Matsuda, N., Lin, W.L., Kumar, N.M., Cho, M.I. and Genco, R.J. : Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors *in vitro*. *J. Periodontol.*, 63 : 515-525, 1992.
- 20) 松原 茂 : 歯根膜細胞の分化調節に関する実験的研究—Transforming Growth Factor- β の影響について—. *日歯周誌*, 35 : 333-346, 1993.

- 21) 小野崎純, 久保田隆朗, 笹栗健一, 佐藤貞雄, 鈴木祥井: ヒト培養歯根膜細胞における Proteoglycan 産生に及ぼす Transforming Growth Factor- β (TGF- β) の影響について. 歯基礎誌, 34 : 630-641, 1992.
- 22) Cho, M.I., Lin, W.L. and Genco, R.J. : Platelet-derived growth factor-modulated guided tissue regenerative therapy. J. Periodontol., 66 : 522-530, 1995.
- 23) Herr, Y., Matsuura, M., Lin, W.L., Genco, R.J. and Cho, M.I. : The origin of fibroblasts and their role in the early stages of horizontal furcation defect healing in the beagle dog. J. Periodontol., 66 : 716-730, 1995.
- 24) Lynch, S.E., Williams, R.C., Polson, A.M., Howell, T.H., Reddy, M.S., Zappa, U.E. and Antoniades, H.N. : A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. J. Clin. Periodontol., 16 : 545-548, 1989.
- 25) Choi, S.Y., Nilvéus, R.E., Minutello, R.D., Zimmerman, G.J. and Wikesjö, U.M.E. : Effect of a collagen matrix on healing in periodontal fenestration defects in dogs. J. Periodontol., 64 : 878-882, 1993.
- 26) Iglhaut, J., Aukhil, I., Simpson, D.M., Johnston, M. C. and Koch, G. : Progenitor cell kinetics during guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. J. Periodont. Res., 23 : 107-117, 1988.
- 27) Wang, H.L., Pappert, T.D., Castelli, W.A., Chiego, D.J., Shyr, Y. and Smith, B.A. : The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium : an autoradiographic study on dogs. J. Periodontol., 65 : 429-436, 1994.
- 28) 梅村昌孝, 河合達志, 三枝樹明道, 片岡宏康, 栗田新也, 鯉江正人, 神出敏影, 大野友三, 長谷川二郎, 野口俊英 : アテロコラーゲンを用いた骨形成因子のデリバリーシステムについて. 日歯周誌, 34 : 125-132, 1992.
- 29) 松本敦至 : Bone morphogenetic protein 配合のコラーゲン線維膜による骨誘導に関する病理組織学的研究—第1報 ラット背部皮下における観察—. 日歯周誌, 35 : 615-624, 1993.
- 30) 水木信之, 大村 進, 青木伸二郎, 海野 智, 川辺良一, 石川好美, 小野 繁, 藤田浄秀 : コラーゲン・シリコン複合体人工粘膜の口腔粘膜欠損部への臨床応用に関する検討. 日口外誌, 40 : 776-784, 1994.
- 31) 村井正彦 : 口腔異形成病変における AgNORs 染色, PCNA 及び MIB-1 免疫組織化学染色を用いた細胞増殖能の研究. 日大口腔科学, 20 : 169-182, 1994.
- 32) 松野吉宏, 向井 清 : 増殖細胞核抗原 (PCNA). 病理と臨床, 9 : 879-883, 1991.
- 33) 辻 龍雄, 佐々木功典, 木村由香, 前田寛治, 金川昭啓, 井上 敬, 早津良和, 篠崎文彦 : 増殖細胞核抗原 (PCNA) の免疫組織染色における問題点. 日口外誌, 38 : 1055-1058, 1992.
- 34) Sporn, M.B., Roberts, A.B., Wakefield, L.M. and Crombrughe, B. : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. J. Cell. Biol., 105 : 1039-1045, 1987.
- 35) 鈴木英之 : TGF- β および EGF のヒトの培養歯根膜細胞と歯肉線維芽細胞とへの影響—1. 細胞増殖とアルカリホスファターゼ活性. 日大歯学, 66 : 395-404, 1992.
- 36) 杉下彰男, 田原 洋, 遠藤弘康, 松江美代子, 松江一郎 : キチンおよび TGF- β の歯周組織再生治療への応用. 日歯周誌(春季特別号), 36 : 70, 1994.
- 37) 松江美代子, 小方頼昌, 横田祐司, 遠藤弘康, 松江一郎 : 創傷治癒モデルにおける Transforming Growth Factor- β の治癒促進効果について. 日歯周誌, 33 : 907-920, 1991.
- 38) Noda, M. and Camilliere, J.J. : *In vivo* stimulation of bone formation by transforming growth factor- β . Endocrinology, 124 : 2991-2994, 1989.
- 39) Bonewald, L.F. and Mundy, G.R. : Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. Clin. Orthop. Relat. Res., 250 : 261-276, 1990.
- 40) 笹栗健一 : ヒト歯根膜細胞の細胞外基質蛋白質の発現の特徴について. 歯基礎誌, 33 : 261-274, 1991.
- 41) Oreffo, R.O.C., Mundy, G.R., Seyedin, S.M. and Bonewald, L.F. : Activation of the bone-derived latent TGF beta complex by isolated osteoclasts. Biochem. Biophys. Res. Commun., 158 : 817-823, 1989.
- 42) Ruoslahti, E. and Yamaguchi, Y. : Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell, 64 : 867-869, 1991.
- 43) Edwards, D.R., Murphy, G., Reynolds, J.J., Whitham, S.E., Docherty, A.J.P., Angel, P. and Heath, J. K. : Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. The EMBO Journal, 6 : 1899-1904, 1987.
- 44) Lynch, S.E., Castilla, G.R., Williams, R.C., Kiritsy, C.P., Howell, T.H., Reddy, M.S. and Antoniades, H.N. : The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. J. Periodontol., 62 : 458-467, 1991.
- 45) Pfeilschifter, J., Seyedin, S.M. and Mundy, G.R. :

- Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures. J. Clin. Invest., 82 : 680-685, 1988.
- 46) Wikesjö, U.M.E., Crigger, M., Nilvéus, R. and Selvig, K.A. : Early healing events at the dentin-connective tissue interface. Light and transmission electron microscopy observations. J. Periodontol., 62 : 5-14, 1991.
 - 47) Shinar, D.M. and Rodan, G.A. : Biphasic effects of transforming growth factor- β on the production of osteoclast-like cells in mouse bone marrow cultures : the role of prostaglandins in the generation of these cells. Endocrinology, 126 : 3153-3158, 1990.
 - 48) Kawase, T., Sato, S., Miake, K. and Saito, S. : Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells. Adv. Dent. Res., 2 : 234-239, 1988.
 - 49) Gould, T.R.L., Melcher, A.H. and Brunette, D.M. : Migration and division of progenitor cell populations in periodontal ligament after wounding. J. Periodont. Res., 15 : 20-42, 1980.
 - 50) Owen, T.A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L.M., Wilming, L., Tassinari, M.S., Kennedy, M.B., Pockwinse, S., Lian, J.B. and Stein, G.S. : Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro* : Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. J. Cell. Physiology., 143 : 420-430, 1990.
 - 51) 櫻井規雄 : 骨誘導因子 (BMP) の精製および骨芽細胞系細胞に対する作用に関する研究. 口病誌, 60 : 169-182, 1993.

連絡先 :

日本大学松戸歯学部歯周病学講座

〒 271 千葉県松戸市栄町西 2-870-1