抜去歯に残存する歯根膜の組織培養による 露出象牙質への細胞増殖に関する研究

島田 顕 齋藤 彰 加藤 熙

北海道大学歯学部歯科保存学第二講座

(主任：加藤 熙)

(平成9年8月11日受付)

A Study of Proliferation of Periodontal Ligament Cells to Exposed Root Surface from Remaining Periodontal Ligament on the Extracted Teeth

Akira Shimada, Akira Saito and Hiroshi Kato

Department of Periodontology and Endodontology, Hokkaido University School of Dentistry

(Chief : Prof. Hiroshi Kato)

Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo 060, Japan

To develop a new periodontal regeneration technique from the cells of remaining periodontal ligament, in teeth involved with advanced periodontitis, this study was designed to examine the possibility of cellular proliferation and migration from remaining periodontal ligament of extracted teeth on the root planed and exposed root surface *in vitro* longitudinally.

Thirty teeth specimen were notched at the center along the tooth long axis with root planed coronal half (5.3 ± 1.4 mm) and periodontal ligament remaining apical half obtained from extracted canines of seven adult cats. They were cultured for 0, 2, 4 and 6 weeks *in vitro*.

Stereomicroscopic, histological and immunohistochemical examinations showed following findings ; The distance of cell migration from the notch at the border of remaining periodontal ligament on the exposed root planed surface was 0.8 ± 0.2 mm at 2 weeks. At 4 weeks the distance increased markedly (4.6 ± 1.9 mm), the cell density was high at the

notch and tended to decrease coronally and multiple cell-layers became evident around the notch. At 6 weeks the distance (5.2 ± 1.4 mm) and the density further increased and cells covered the whole exposed root planed surface. The number of cells on the surface of the remaining periodontal ligament increased and the number of cells inside remaining periodontal ligament decreased longitudinally. Alkaline phosphatase (ALP) activity was detected in cells on remaining periodontal ligament and migrated and proliferated cells on the exposed root planed surface 2 mm beyond the notch in 6 week specimens. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected in cells on the remaining periodontal ligament and cells on the root planed surface. These results suggested that when the remaining periodontal ligament on extracted tooth was cultured, cells from the ligament could migrate, proliferate, show ALP activity, and cover the root planed surface *in vitro*.

Key words : Extracted tooth, Remaining periodontal ligament, Periodontal ligament derived cell, Proliferating cell nuclear antigen, Alkaline phosphatase

要旨 : 重度歯周炎罹患歯に歯周組織を再生させる新しい治療法の開発を目指し、抜去歯に残存する歯根膜を

in vitro で培養し、ルートプレーニングした露出根面への歯根膜細胞の遊走増殖を経時的に観察し検討した。成ネコ7頭の犬歯を抜去し、歯根中央にノッチを付与して根尖側1/2の歯根膜を保存し、歯冠側を露出根面 (5.3 ± 1.4 mm) とした30試験片を作製した。*in vitro* で0, 2, 4, 6週間培養し、歯根膜由来細胞の観察と細胞遊走距離の計測を行った。その結果、細胞遊走距離は2週では 0.8 ± 0.2 mm だったが、4週ではノッチを大きく越えて露出根面へ遊走し 4.6 ± 1.9 mm となり、ノッチ付近では細胞密度が高く、歯冠側へ向かって細胞密度が低くなっていた。6週では 5.2 ± 1.4 mm となり露出根面全体をほぼ被覆し、細胞密度の高い部分が拡大していた。残存歯根膜では表層の細胞が経時的に増加し、歯根膜内部の細胞は減少していた。アルカリフォスファターゼは、6週で残存歯根膜全面および露出根面に増殖した細胞のうちノッチから約2mmの部位に認められた。増殖核抗原陽性細胞は残存歯根膜の表面と、露出根面に増殖した歯根膜由来細胞の最表層全面に認められた。これらの結果、抜去歯に残存する歯根膜を *in vitro* で培養すると、歯根膜由来細胞は露出根面へ遊走増殖して根面を被覆し、歯根膜細胞の特性を維持している可能性が高いことが示唆された。

索引用語：抜去歯、残存歯根膜、歯根膜由来細胞、増殖細胞核抗原、アルカリフォスファターゼ

緒 言

歯周組織の再生は歯周治療の大きな目標であり、結合組織性付着の再生を目指して近年組織誘導再生法 (GTR 法) が行われている。しかしその適応症は限られ、水平性骨欠損やⅢ度の分岐部病変などでは結合組織性付着の再生が困難なのが現状である^{1,2)}。GTR 法により結合組織性付着を獲得するためには、歯根膜由来細胞が遊走増殖して歯根表面を覆うことが必要とされ^{3,4)}、これを阻害する歯根膜細胞以外の歯周組織の細胞である歯肉上皮、歯肉結合組織、歯槽骨由来の細胞が根面に接触しないよう確実に排除し、さらに残存した歯根膜細胞が根面へ遊走増殖するためのスペースが必要である^{5,6)}。しかし、現在 GTR 法に使用されているバリアー膜は、臨床的に高い頻度で認められる水平性や一壁性の骨欠損では膜の適合が困難であったり、膜が欠損部へ陥入するなど十分なスペースを確保するのが難しい⁷⁾。さらに、重度歯周炎でアタッチメントロスが高度に進行した症例では再生療法はほとんど困難であり、適切な治療法がなく、抜歯されることが多い。

そこで、著者らは重度歯周炎罹患歯の歯周組織再生を目指し、歯根膜細胞は結合組織性付着を生じる可能性が高いことから、GTR 法のように *in vivo* でバリアー膜でスペースを作り歯根膜細胞を増殖させるのではなく、抜去歯に残存している歯根膜を *in vitro* で培養し、残存歯根膜から歯根膜由来細胞を露出根面へ増殖させ被覆し、これを *in vivo* へ移植して戻す方法に着目した。

過去の報告では、あらかじめ *in vitro* で細胞培養し増殖させた歯根膜細胞を用いて、これを歯根膜の欠損した露出根面に付着させることにより結合組織性付着を獲得する方法が試みられている⁸⁻¹⁰⁾。Boyko ら⁸⁾は

in vitro であらかじめ歯根膜細胞を培養し露出根面に付着させ移植した結果、結合組織性付着を一部に認めたと報告している。一方、大森ら⁹⁾はラットの培養歯根膜細胞を付着させた象牙質片を頭蓋骨に移植し、4週後に移植片の約半数にセメント質様硬組織の形成を認めたと報告している。これらの報告から、培養歯根膜細胞を根面に付着させ移植を行った場合、培養歯根膜細胞が結合組織性付着を獲得しうる能力を有する可能性があると考えられる。また培養歯根膜細胞は、継代を繰り返した場合より、初代細胞を用いたほうがセメント質の形成が生じやすく⁹⁾、細胞培養を長期間行うとアルカリフォスファターゼ (以下 ALP と略す) 活性が低くなると報告されている¹¹⁾ことから、露出根面を覆う歯根膜細胞は、歯根膜から直接露出根面へ細胞を培養増殖させることが重要なのではないかと考えられる。抜去歯の残存歯根膜を根面上で培養した報告はわずかに Reinholdt ら¹²⁾の1例のみで、残存歯根膜の経時変化について病理組織学的観察を行っているが、露出根面へ残存歯根膜細胞が増殖することについては全く観察を行っていない。

そこで我々は抜去歯に残存している歯根膜を *in vitro* で培養し、歯根膜由来細胞を露出根面へ増殖させることが可能であれば、歯根膜由来細胞が歯根膜の欠損した根面に結合組織性付着を形成する可能性があると考えた。さらにこの方法では *in vitro* で残存歯根膜から歯根膜由来細胞が遊走し露出根面を被覆するので、*in vivo* へ戻したとき結合組織性付着を形成する可能性が高くなるのではないかとと思われる。

本研究は重度歯周炎罹患歯を一度抜去し、抜去歯に残存する歯根膜を *in vitro* で培養し、ルートプレーニングした露出根面へ歯根膜細胞を増殖させ、再(移)植する新しい歯周組織再生法の開発を目指し、ネコの健全な犬歯を抜去して人工的に歯冠側1/2の歯根膜を除去し、根尖側1/2の根面に残存する歯根膜の培養を行

い、残存歯根膜から露出根面への歯根膜由来細胞の遊走について検討するため、歯根膜由来細胞の経時的観察および歯根膜由来細胞の遊走距離の計測を行うとともに、歯根膜由来細胞の性質を検討するため、アルカリフォスファターゼおよび増殖核抗原（以下 PCNA と略す）陽性細胞の局在について観察を行った。

材料および方法

1. 実験動物および実験歯

実験には全身および口腔に異常のない成ネコ 7 匹（雑種雄 3, 雌 4）を用い、実験歯にはこれらのネコの上下顎の犬歯のうち歯根破折を起こさずに抜歯できた 20 歯を用いた。ネコの飼育には 1 日 1 回固形飼料（キャネット®, ペットライン, 東京）および水を与えた。

2. 実験方法

1) 実験歯の抜去

塩酸クロロプロマジン（コントミン®注, 吉富製薬, 大阪）と塩酸ケタミン（ケタラール®50, 三共, 東京）筋肉内投与による全身麻酔とエピネフリン（1:80000）含有 2% 塩酸リドカイン（歯科用キシロカインカートリッジ®, 藤沢薬品, 大阪）浸潤麻酔の併用下で、実験歯の口腔内に露出した歯質をタービンを用いて削除し、ポピドンヨード（イソジン®液, 明治製菓, 東京）を原液のまま用いて 60 秒間消毒した後、挺子と鉗子にて抜歯した。抜去後、直ちに抗生物質（1.2 mg/ml Kanamycin Sulfate®, GIBCO, U.S.A., 30 µg/ml Amphotericin B®, GIBCO, U.S.A.）を含む滅菌リン酸緩衝生理食塩水（以下 PBS と略す）に浸漬洗浄した。

2) 試験片の作製

抜去した犬歯の歯冠を鉗子で把持し、可及的に歯根膜を損傷しないように 0.005 mg/ml ポピドンヨード含有 PBS の注水下でダイヤモンドディスクにて歯を歯軸方向に半切した。次いでフィッシャーバーを用いて歯冠と根尖部を切除し、歯髓組織と根管壁表層の象牙質を一層削除し、試験片の中央にフィッシャーバーを用いて 0.5×0.5 mm のノッチを試験片の中央に付与した（図 1）。さらにノッチより歯冠側の根面はハンドスケーラーを用いて歯根膜とセメント質を除去した（以下露出根面とする）。一方、ノッチより根尖側はルートプレーニングせずに歯根膜が付着したままとした（以下、残存歯根膜とする）。作成した試料を試験片と呼び、これらの操作は、乾燥と汚染を防ぐため前述の抗生物質含有 PBS の湿潤下で行った。試験片の数は一本の歯を半切して作製したが、適切に半切で

さなかったものがあつたため、総計 38 個であつた。

これらの操作が完了した試験片は前述のポピドンヨード含有 PBS に 2 分間浸漬し、さらに前述の抗生物質含有 PBS に 1 分間ずつ 2 回、合計 2 分間の浸漬処理を行った。

3) 試験片に残存している歯根膜の培養

2) で作成した試験片を 35 mm 培養 dish 上に歯根表面が上を向き、根管壁表層の象牙質側が下を向くように静置し（図 1）、培地は 15% Fetal Bovine Serum (GIBCO, U.S.A.), 抗生物質（120 µg/ml Kanamycin Sulfate®, GIBCO, U.S.A., 3.0 µg/ml Amphotericin B®, GIBCO, U.S.A.）を含む α -MEM (GIBCO, U.S.A.) を用い、5%CO₂, 95% Air, 37°C の条件下で培養を行った。培地の交換は培養開始より 1 週間経過後、3 日に 1 回行った。

試験片は培養期間により 0, 2, 4, 6 週群に分け、試験片の数は 0 週群 n=6, 2 週群 n=10, 4 週群 n=10, 6 週は n=12 とした。

4) 観察方法

(1) 実体顕微鏡による歯根膜由来細胞の観察と細胞遊走距離の計測

試験片は培養期間終了後、2 週群と 6 週群の各 2 例を除いて 10% 中性緩衝ホルマリンにて固定し、ギムザ染色を行い、残存歯根膜と露出根面の表面を実体顕微鏡を用いて観察するとともに、ノッチの最根尖側を結んだ基準線から歯冠側へ歯根膜由来細胞の遊走増殖距離を計測した。

病理学的計測では、まず 0.5×0.5 mm のグリッドを用いてグリッドあたりの細胞の数を求め、1 以上 30 未満, 30 以上 60 未満, 60 以上 90 未満, 90 以上の 4 段階に細胞密度を分類した。細胞密度ごとにノッチの最根尖側からグリッドの最根尖側までの距離を計測し、各々の細胞遊走距離とした。

2 週群と 6 週群のうち各 2 試験片は、固定前に New Fuchsin Substrate System® (DAKO, 東京) を用いて ALP 発現部位を赤色に染色して実体顕微鏡で観察した後、他の試験片と同様にホルマリンで固定し、さらにギムザ染色を行い、ALP 発現部位と歯根膜由来細胞の付着している状態を観察し比較した。

(2) 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察

(1) の観察後、試験片を 10% EDTA にて脱灰し、通法に従いパラフィン包埋し試験片の根管壁表層の象牙質側の切断面に垂直にかつ歯軸と平行に薄切し、5 µm の連続切片を作成し、以下の 2 種類の染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

① ヘマトキシリン-エオジン重染色（以下 HE

図 1 試験片の作成方法および培養方法

染色と略す)

② 免疫組織化学染色：酵素抗体法（ストレプトアビジン-ビオチン法）による免疫組織化学染色を行い、PCNA の発現部位を観察した。染色には PC 10 モノクローナル抗体（DAKO, 東京）と抗マウスウサギ二次抗体を用い、抗原の可視化は 3,3'-ジアミノベンチジン 4 塩酸塩（DAB）にて行い、メチルグリーンで核染色を行った。

結 果

試験片 38 個のうち 4 個は培養期間中に細菌感染し、4 個は歯根膜が壊死したため、観察対象から除き、観察した試験片の数は 0 週群は $n=4$ 、2 週群と 4 週群は各々 $n=8$ 、6 週群は $n=10$ であった。

1. 実体顕微鏡による歯根膜由来細胞の観察

0 週群ではノッチより歯冠側のルートプレーニングした露出根面には無論のこと、ノッチより根尖側の残存歯根膜の表面にも細胞は認められなかった（図 2 a）。2 週群では全標本において残存歯根膜の表面全体に歯根膜由来細胞が増殖し、ノッチより歯冠側の露出根面にはノッチを越えて遊走増殖した細胞が少数認められた。4 週群と 6 週群では全標本の残存歯根膜全体に歯根膜由来細胞が増殖し、4 週から 6 週と培養期間が長くなるに伴い、ノッチより歯冠側の露出根面には遊走増殖した細胞が増加し、4 週群の 8 例中 4 例および 6 週群の 10 例中 9 例では露出根面全てが細胞で被覆されていた（図 2 b）。露出根面上の歯根膜由来細胞

は、残存歯根膜の増殖活性の高い部位から放射状に増殖し、ノッチを結んだ基準線から必ずしも平行に増殖していなかった。

さらに、培養 dish 上にも歯根膜由来細胞が 2 週群から認められたが、6 週群でも confluent になったものはなかった。dish 上の細胞は残存歯根膜から放射状に増殖し、一部の細胞は多層化していた。増殖した細胞には様々な形態の細胞が存在していた。最も多かったのは紡錘形の線維芽細胞様細胞で、そのほかに類円形の上皮様細胞や、著しく核が大きく、多核のマクロファージ様細胞も認められた。

2. 歯根膜由来細胞の細胞遊走距離の計測

露出根面上の細胞の増殖状態を細胞密度で 4 段階に分類し、各細胞密度ごとにノッチの最根尖側から細胞の存在するグリッドの根尖側端までの細胞遊走距離を表 1、図 3 に示した。ノッチ付近の露出根面には、2、4、6 週群の全標本とも細胞一個一個が判別できないほど細胞密度が増加していたが、ノッチから遠くなるに従って細胞密度は減少する傾向にあり、遊走細胞の最先端部では細胞はところどころに観察される状態であった。

細胞密度 1 以上 30 未満の細胞遊走距離は 2 週群では 0.8 ± 0.2 mm であったが、4 週群では 4.6 ± 1.9 mm、6 週群では 5.2 ± 1.4 mm となり、培養期間が増加するに伴い、細胞遊走距離は増加し、2 週群と 4 週群、および 6 週群との間では有意差が認められ ($p < 0.01$)、4 週群と 6 週群との間には有意差は認められなかった。細胞密度 30 以上 60 未満、60 以上 90

図2 実体顕微鏡による歯根膜由来細胞の観察

- a: 0週群, ギムザ染色 ノッチより根尖側には残存歯根膜が認められ, ノッチより歯冠側のルートプレーニングした露出根面には細胞が認められない。(×2.5)
- b: 4週群, ギムザ染色 残存歯根膜表面には歯根膜細胞が増加し, 露出根面上には歯根膜細胞が遊走増殖しており, ノッチ寄りの部分で細胞密度が高く, ノッチから遠くなるに従い細胞密度は減少している。(×1.5)

未満の細胞遊走距離も, 細胞密度1以上30未満とほぼ同じ傾向を示した。しかし, 細胞密度90以上では2週群と4週群の間に有意差はなく, 4週群と6週群の間に有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

3. ALP 活性発現部位の観察

ALP 染色を行った2週群の2例では, ALP 陽性を示す濃赤色の部位が残存歯根膜表面全体に認められた。6週群の2例では, 残存歯根膜の表面全体および露出根面上に認められた (図4a)。しかし, 露出根面の歯根膜由来細胞が存在する部位全てに ALP 活性が認められたわけではなく, ノッチから約2mmの細胞密度が90以上の部位の一部に ALP 陽性細胞が認められた (図4b)。

4. 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察

(1) 歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察

0週群では, ノッチより根尖側の根面に付着してい

る残存歯根膜は, 健全歯根膜と同様に細胞が多数認められる部位と, 細胞の多くが壊死し減少している部位が認められ, 全体として健全歯根膜と比較して細胞密度は低い傾向にあった。残存歯根膜の深部すなわちセメント質表面付近では損傷を受けずに正常な細胞が多数認められた (図5b)。一方, 残存歯根膜の表層付近では細胞は壊死して染色性を失ったり, 核濃縮を起こしたものが認められた。なお一部には歯根膜が失われ, セメント質が露出した部分もあった。セメント小腔の多くにはセメント細胞が認められた。一方, ルートプレーニングした露出根面では, セメント質と歯根膜が消失し, 象牙質が露出し表面に細胞は認められなかった (図5c)。

2週群では, ノッチより根尖側の残存歯根膜の表層に細胞が層状に多数認められた。一方, 残存歯根膜の深部であるセメント質表面付近では細胞が減少しており, しかも核濃縮などの変性を示した細胞が多数認め

表 1 各細胞密度の細胞遊走距離

群/細胞数	90 以上	60 以上 90 未満	30 以上 60 未満	1 以上 30 未満
2 週群 (n=8)	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.3	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2
4 週群 (n=8)	** 2.0 ± 1.6	** 2.8 ± 1.9	** 3.7 ± 2.0	** 4.6 ± 1.9
6 週群 (n=10)	3.7 ± 0.9	4.1 ± 0.7	4.6 ± 0.5	5.2 ± 1.4

単位: mm * : p<0.05
NS: not significant ** : p<0.01

られた。歯根膜線維の走行はほとんど根面に平行であり、一部には硝子変性や壊死をおこした部分も認められた。残存歯根膜の表層の細胞は紡錘形の線維芽細胞様細胞が多く、残存歯根膜のほぼ全体を被覆していたが、部位により細胞層の厚さは異なり、多いところで4~5層、少ないところでは単層であった(図6b)。一方、露出根面では歯根膜由来細胞がノッチを越えて歯冠側へ向かって遊走増殖しているのが認められた。しかし、細胞数は少なく、ほとんどは単層で、多くは紡錘形の線維芽細胞様細胞であった(図6c)。なお、露出根面に歯根膜由来細胞が全く認められない試験片が8例中1例認められた。また、セメント小腔内のセメント細胞は0週群と同様に認められた。

4週群では、0, 2週群と比較して、ノッチより根尖側の残存歯根膜の表層に厚い細胞層が認められた。一方、残存歯根膜の深部であるセメント質表面付近では

細胞数がさらに減少していた。歯根膜線維の走行は2週群と同様にほとんど根面と平行であった。残存歯根膜の表層の細胞は紡錘形の線維芽細胞様細胞が多く、残存歯根膜のほぼ全体を被覆し、細胞層が2週群よりも厚くなっていた(図7b)。一方、露出根面では歯根膜由来細胞が露出根面の1/3以上を被覆し、細胞層はノッチ付近では数層となっており(図7c)、歯冠方向へ行くに従い減少し、最歯冠側では単層になっていた(図7d)。なお、脱灰標本において歯根膜由来細胞が数層になっているのが観察された部位は、実体顕微鏡で細胞密度が高く、細胞一個一個が判別できなかった部位とほぼ一致していた。セメント小腔内のセメント細胞は減少する傾向にあった。

6週群では、4週群と比較して、ノッチより根尖側の残存歯根膜の表層の細胞層はさらに厚くなり、残存歯根膜の深部であるセメント質表面付近の細胞数はほぼ同じであった。歯根膜線維の走行は2, 4週群と同様にほとんど根面に平行であった。残存歯根膜の表層の細胞は紡錘形の線維芽細胞様細胞が多く、残存歯根膜の全体を被覆し、細胞の層は4週よりもさらに厚く多いところで7~8層になっている部分も認められた(図8b)。一方、大部分の露出根面では歯根膜由来細胞が多数認められ、全体の3/4以上を被覆していた。細胞層の厚さはノッチ付近から歯冠側方向へ行くに従い減少していたが、最歯冠側でも2~3層のものも観察された(図8c, d)。セメント小腔内のセメント細胞はほとんど消失し、ごく少数しか認められなかった。

(2) 増殖細胞の観察

PCNA陽性細胞は各群の残存歯根膜を被覆している歯根膜細胞の最表層付近に多かった。一方、残存歯根膜内部の細胞にはほとんど認められなかった(図9a)。

一方、露出根面上の歯根膜由来細胞層ではPCNA陽性細胞は各群とも細胞層の最表層全体に認められた。すなわち、単層の部分では象牙質に表層に付着した細胞に認められ、2層以上の部分では細胞層の最表層に認められた(図9b)。

図 4 実体顕微鏡による ALP 活性発現部位の観察

- a : 6 週群, ALP 染色 赤色に染色した部分が ALP 活性発現部位で, 残存歯根膜表面全体および露出根面上のノッチから約 2 mm の所に認められた。(×2.5)
- b : 6 週群, ALP とギムザの重染色 歯根膜細胞は露出根面全体に増殖しており, ノッチ付近の部分で細胞密度が高く, ノッチから遠くなるに従い減少していた。(×2.5)

考 察

本研究では将来ヒトの歯周治療に臨床応用することを考え, 実験歯にヒトの歯根の大きさにより近い歯根長を有し, ある程度均一な大きさの歯を用いることとし, 石川ら¹³⁾, 加藤ら¹⁴⁾, 斎藤ら¹⁵⁾が歯周疾患の実験に用い, ヒトの歯周組織と類似した反応を示すことが報告されているネコの犬歯を用いた。

試験片の露出根面は, 歯根膜およびセメント質を除去して作製した。これは健全歯の歯根膜とセメント質を除去した根面に歯根膜細胞を播種した場合, 歯周炎罹患歯の汚染根面を十分スケーリングルートプレーニングした場合とほぼ同程度の付着が生じたという報告^{16~18)}に基づき, 臨床で歯周炎罹患歯の根面を徹底的にスケーリング, ルートプレーニングした場合を想定して試験片を作製した。

今回酵素組織化学的に培養細胞の ALP 発現および

免疫組織化学的に PCNA 発現の観察を行った。ALP 活性は歯根膜および骨細胞で高いことが示されており, 歯根膜細胞の特性を示す指標の一つとされている¹⁹⁾。本研究では歯根膜細胞の特性を備えていると考えられる ALP 陽性の歯根膜由来細胞の局在を観察した。また, PCNA は細胞増殖のマーカー核タンパクで, S 期の核に検出されると報告されている²⁰⁾。本研究では増殖細胞の局在を観察する目的で PCNA を検出した。

ノッチより歯冠側の露出根面では, 培養 2 週後に残存歯根膜からノッチを越えて細胞の増殖が観察され, 6 週後には増殖してきた歯根膜由来細胞が露出根面全体をほぼ被覆しており, 10 例中 9 例は細胞が多層化している部分が多かった。増殖した細胞が多層になっている部分は, 細胞密度 90 以上に一致していると思われる, この部分は 4 週から 6 週にかけて顕著に増加し, 6 週群ではノッチから平均 3.7 mm に達していた。なお, 本研究では露出根面をノッチから約 5 mm

図 5 0 週群, 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察 (HE 染色)

- a : 弱拡大像。* 1 は残存歯根膜, * 2 は露出根面を示す ($\times 3.5$)
- b : * 1 の強拡大像。残存歯根膜 (PL) はセメント質 (C) 表面付近では損傷を受けずに正常な細胞が多く, 表層付近では細胞は変性していた。セメント小腔にはセメント細胞が認められる。 ($\times 50$)
- c : * 2 の強拡大像。歯根膜とセメント質は除去され, 象牙質 (D) が露出している。 ($\times 50$)

作製したが, 6 週ではほぼ全体を増殖細胞が被覆しており, 露出根面がより広い場合はさらに広範囲に歯根膜由来細胞が増殖被覆する可能性があると考えられる。ALP 陽性細胞は, 2 週群の露出根面上には, 認められなかった (図 4 b)。6 週群の露出根面では細胞が全体を被覆していたが, ALP 陽性細胞は細胞密度の高いノッチに近い部分に観察された。PCNA 陽性細胞は残存歯根膜と露出根膜の両方に増殖した細胞層の表層に認められ, 分裂期の細胞が存在することを示していた。これは, 細胞密度の低い部位には細胞分裂周期にある細胞が多いため ALP の発現は認められず, 一方, 細胞密度の高い部位には分化した細胞が多いため ALP の発現が認められたと考えられました。

図 6 2 週群, 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察 (HE 染色)

- a : 弱拡大像。* 1 は残存歯根膜, * 2 は露出根面を示す ($\times 3$)
- b : * 1 の強拡大像。残存歯根膜 (PL) の表層に紡錘形の細胞が 2, 3 層で, セメント質 (C) 表面付近では細胞数が減少し, 細胞の多くは核濃縮などの変性を示したものが多い。 ($\times 50$)
- c : * 2 の強拡大像。象牙質 (D) 上に細胞が付着し点在しているのが認められた。 ($\times 50$)

露出根面へ増殖した細胞の密度は経時的に増加していくことから, この細胞は歯根膜細胞の性質である高い ALP 活性をもつ可能性があると考えられる。

抜歯直後の 0 週群の, 残存歯根膜では, 抜歯により断裂した歯根膜表層に近い部位は, セメント質表層に近い深層部と比較して損傷を受けて変性した細胞が多数認められた。一方, 歯根膜の深層部は, 2 週群では細胞が消失した部位が約半分を占め, 4, 6 週群では大部分に及んでいた。抜歯直後に残存歯根膜の表層の細胞が消失した理由として, 抜歯時の侵襲のため壊死した可能性が考えられる。また, 残存歯根膜の深層部の細胞が消失した理由として, 今回用いた培養法では栄養が不十分のために細胞が壊死したか, もしくは細胞が培養液に面する残存歯根膜表層へ移動した可能性

図7 4週群, 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察 (HE 染色)

- a: 弱拡大像。*1は残存歯根膜, *2はノッチ, *3は露出根面を示す (×2.5)
- b: *1の強拡大像。残存歯根膜 (PL) 表層の紡錘形の細胞は2週群よりも厚く4, 5層となっている。セメント質 (C) 表面の細胞はさらに減少し, ほとんど認められなかった。(×50)
- c: *2の強拡大像。残存歯根膜からノッチを越えて露出根面へ細胞が増殖しており, ノッチ付近の細胞層の厚さは約5層認められる (×50)
- d: *3の強拡大像。露出根面の中央部付近では細胞は単層になっている。(×50)

図8 6週群, 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察 (HE 染色)

- a: 弱拡大像。*1はノッチ, *2は露出根面中央部, *3は露出根面先端部を示す (×3)
- b: *1の強拡大像。残存歯根膜 (PL) 表層の紡錘形の細胞層はノッチを越えて露出根面へ増殖しており, 6~8層になっている。(×50)
- c: *2の強拡大像。露出根面中央部で増殖細胞は2, 3層認められた。(×50)
- d: *3の強拡大像。露出根面先端部では増殖細胞が点在し, 単層になっている (×50)

が考えられる。細胞増殖は2週群より残存歯根膜表層に近い部位に認められ, 経時的に細胞層が多層化しているのが観察され, Reinholdt ら¹²⁾の所見とほぼ同じであった。また残存歯根膜の表層の細胞層は, 正常な歯根膜ではセメント質と歯槽骨の中央部に分布する分裂能が高い細胞が分布している^{21,22)}ため, この部分の細胞が主に分裂し, 増殖した可能性が考えられる。

図 9 6 週群, 増殖細胞の観察

- a : ノッチ付近の培養歯根膜層では PCNA 陽性細胞が最表層付近に認められた。(×200)
 b : 露出根面先端部では単層の増殖細胞層の中に PCNA 陽性細胞が認められた。(×200)

Boyko ら⁸⁾は *in vitro* でイヌの歯根膜細胞を 1~2 代継代培養し, 歯根膜およびセメント質を除去した露出根面に培養歯根膜細胞を *in vitro* で付着させ移植した結果, 結合組織性付着は一部にみられ, 培養歯根膜細胞が結合組織性付着を獲得しうる能力を有することを示したが, 全ての歯にアンキローシスが認められたと報告している。さらに, 大森ら⁹⁾はラットの初代培養歯根膜細胞を用いて移植した結果, 移植後 4 週で約半数の移植片にセメント質様硬組織の形成が認められたが, 残りの半数の移植片にはアンキローシスが生じたと報告している。一方, 松下ら¹⁰⁾はイヌの歯根膜細胞を 3~5 代継代培養し, 露出根面に播種した後さらに 4 週間培養を行い歯根膜細胞で露出根面を完全に覆った歯を移植した結果, 根吸収およびアンキローシスは生じなかったが, セメント質の形成は見られず, 線維の走行は根面に平行であったと報告している。これらの報告は培養歯根膜細胞が結合組織性付着を獲得しうる能力を有し, さらに培養歯根膜細胞が根面を被覆することによりアンキローシスを阻止する可能性を示唆していると考えられる。培養歯根膜細胞によるセメント質形成は, 初代培養歯根膜細胞を用いた研究⁹⁾ではセメント質形成が認められたのに対し, 4, 5 代

継代した培養歯根膜細胞を用いた研究¹⁰⁾では, セメント質形成は全く認められていない。このことより継代を繰り返すことにより歯根膜細胞のセメント質形成能が消失していくのではないかと考えられる。すなわち, 歯根膜細胞を培養増殖させて結合組織性付着を獲得するためには, 継代した細胞ではなく, 歯根膜細胞としての特徴を維持している可能性が高い初代細胞を使用し, これを根面上で培養して根面を高密度の細胞で被覆する必要があると考えられる。抜去した歯の残存歯根膜から歯根膜由来細胞を露出根面へ増殖させれば, この条件を達成できるのではないと思われる。

本研究の結果から抜去歯に残存した歯根膜を *in vitro* で培養するとスケーリング, ルートプレーニングした露出根面へ歯根膜由来細胞が遊走して経時的に露出根面を被覆していき遊走距離は 6 週で 5.2 mm であり, この細胞は ALP 活性を有する可能性が明らかとなった。従ってこの歯を *in vivo* に再植した場合, アンキローシスを起こさずに結合組織性付着が再生される可能性があると考えられる。また, 露出根面を遊走して被覆した歯根膜由来細胞は残存歯根膜, 露出根面のどちらでも最表層の細胞に増殖活性が認められ, 培養初期では ALP 活性を示す部位が少なくノッチ付近に局限していたが, 培養期間が長くなると増殖細胞全体に広がる傾向を示した。このことは培養期間によって根面に付着した歯根膜由来細胞の性質が変化し, 再植した歯の付着様式が異なる可能性があるものと考えられる。今後 *in vivo* への再植実験を行い, この治療法の可能性をさらに検討していく必要があると考えられる。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 本研究の推進にあたり御助言を頂きました本学, 口腔病理学講座, 進藤正信助手, 歯科薬理学講座, 吉村善隆助手, 口腔解剖学第二講座, 山本恒之助教授に深謝致します。さらに本研究に御協力と御鞭撻を戴きました当教室の川浪雅光助教授, 本郷興人講師, 坂上竜資講師, 小田島朝臣氏, 藤井恵美子事務官をはじめ, 第 2 保存学教室各位に感謝申し上げます。最後に本学動物室・田巻照房技官をはじめ, 諸兄に心から御礼申し上げます。

なお, 本論文は北海道大学審査学位論文である。

文 献

- 1) Magnusson, I., Stenberg, W.V., Batich, C. and Egelberg, J. : Connective tissue repair in circumferential periodontal defects in dogs following use of a biodegradable membrane. J. Clin. Peri-

- odontol., 17: 243-248, 1990.
- 2) Minabe, M.: A critical review of the biologic rationale for guided tissue regeneration. J. Periodontol., 62: 171-179, 1991.
 - 3) Melcher, A.H.: On the repair potential of periodontal tissues. J. Periodontol., 47: 256-260, 1976.
 - 4) Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T. and Lindhe, J.: The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in monkey. J. Clin. Periodontol., 9: 257-265, 1982.
 - 5) Karring, T., Isidor, F., Nyman, S. and Lindhe, J.: New attachment formation on teeth with a reduced but healthy periodontal ligament. J. Clin. Periodontol., 12: 51-60, 1985.
 - 6) Isidor, F., Karring, T., Nyman, S. and Lindhe, J.: The significance of coronal growth of periodontal ligament tissue for new attachment formation. J. Clin. Periodontol., 13: 145-150, 1986.
 - 7) 伊藤公一: 歯周治療への GTR 法の応用例と注意点. 末田 武, 岡本 浩, GTR 法の臨床, 日本歯科評論社, 東京, 1993, 110-127.
 - 8) Boyko, G.A., Melcher, A.H. and Brunette, D.M.: Formation of new periodontal ligament by periodontal ligament cells implanted *in vivo* after culture *in vitro*: A preliminary study of transplanted roots in the dog. J. Periodont. Res., 16: 73-88, 1981.
 - 9) 大森幹朗, 菅谷 勉: 培養歯根膜細胞移植による歯根膜, セメント質の再生に関する研究—歯根膜細胞を培養・付着させた移植象牙質片の組織学的検討—. 日歯周誌, 38: 447-456, 1996.
 - 10) 松下和彦, 西村和晃: 歯根膜細胞を付着させた歯の再植後付着様式について—再植歯根への新付着形成法—. 歯科医学, 57: 453-464, 1994.
 - 11) 中島正人: 生体材料の生化学的研究—ヒト歯根膜細胞の特性について—. 神奈川歯学, 22: 340-354, 1988.
 - 12) Reinholdt, J., Andreasen, J.O., Söder, P.-Ö., Otteskog, P., Dybdahl, R. and Riis, I.: Cultivation of periodontal ligament fibroblasts on extracted monkey incisors: A histologic study of three culturing methods. Int. J. Oral Surg., 7: 215-225, 1977.
 - 13) 石川 純, 松江一郎, 鈴木文男: 局所的刺激による実験的歯肉炎の発生とその治癒に関する研究. (その 1) 実験的歯肉炎の発生について. 日歯漏誌, 5: 57~65, 1963.
 - 14) 加藤 熙, 鈴木文男, 鈴木康司: 局所的刺激による歯肉炎の発生とその治癒に関する研究—歯肉炎発生後の経時的变化について—. 日歯周誌, 15: 227-237, 1973.
 - 15) 斉藤 彰, 加藤 熙, 久保木芳徳: Bone morphogenetic protein (BMP) による水平性骨欠損部の再生療法の研究. 日歯周誌, 36: 810-822, 1994.
 - 16) 小川哲次: 歯周病罹患歯根周囲組織の再形成過程に関する実験病理学的研究. 2. 歯肉剥離搔爬術後の再生結合組織性付着の光顕ならびに電顕による観察. 広歯周誌, 21: 120-146, 1989.
 - 17) 小川哲次, 河口浩之, 廣島英雄, 寿賀野泰司, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本 莫: 歯肉剥離搔爬術後の歯周組織の再形成過程に関する病理組織学的研究. 1. 裸出象牙質面に対する上皮性ならびに結合組織性再付着構造の光顕像について. 広歯周誌, 21: 225-235, 1989.
 - 18) 小川哲次, 河口浩之, 廣島英雄, 寿賀野泰司, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本 莫: 歯肉剥離搔爬術後の歯周組織の再形成過程に関する病理組織学的研究. 2. 裸出象牙質面に対する上皮性ならびに結合組織性再付着構造の電顕像について. 広歯周誌, 21: 236-245, 1989.
 - 19) Kawase, T., Sato, S., Deguchi, S., Kato, Y. and Saito, S.: Character of osteoblastic-fibroblast derived from human periodontal ligament *in vitro*. Bull. of Kanagawa Dent. Coll., 18: 135-141, 1990.
 - 20) 野島 博: 細胞周期のはなし. 羊土社, 東京, 1996, 85-99.
 - 21) McCulloch, C.A.G.: Progenitor cell populations in the periodontal ligament of mice. Anat. Rec., 211: 258-262, 1985.
 - 22) 井上 孝, 橋本貞充, 白田 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. 歯科基礎誌, 35: 485-495, 1993.

連絡先:

北海道大学歯学部歯科保存学第二講座

〒060 札幌市北区北 13 条西 7 丁目 25