歯周組織創傷治癒過程におけるエナメルマトリックスタンパク質の 上皮細胞の動態に及ぼす影響

川 井 英 敬

東京歯科大学大学院歯学研究科歯科保存学第二講座

(2001年10月13日受理)

Epithelial Cell Kinetics of Periodontal Wound Healing after Application of Enamel Matrix Proteins

Hidetaka Kawai

Department of Periodontics, Tokyo Dental College

Accepted for publication 13 October 2001

The present study was designed to examine the effects of enamel matrix proteins (EMP) on the proliferation of the junctional epithelial cells during wound healing in periodontal tissues. Proliferative cell nuclear antigen (PCNA) was immunohistochemically used to detect proliferative activity of epithelial cells, and immunolocalization of laminin was also demonstrated to evaluate the distribution of basement membrane during periodontal tissue healing. Forty Wistar Rats were used in this study. The palatal bone of the first molar was removed, and the exposed root surface was carefully planed to remove the cementum. The exposed root was conditioned for 15 s by means of cotton pellets soaked in a saturated solution of citric acid (pH 1) and then carefully rinsed with sterile physiologic saline. EMP was applied to the treated root surface and left first molar (experimental group), but no EMP was applied to the right first molar (control group). The flap was repositioned. On 1, 2, 3, 4 and 8 weeks after the treatment, the animals were sacrificed and block sections taken from the jaws. Tissue sections were stained with hematoxylin-eosin (H-E), and immunohistochemical reactivities for PCNA and laminin were examined. Epithelial down-growth was decreased in the experimental group, which was statistically significant ($p < 0.05$) from post-treated week 1 to 8. PCNA positive cells in epithelial cells was higher in the control group than those in the experimental group from postoperative week 1 to 4, with a highly significant difference observed in weeks 3 and 4. From week 1 to 4, immuno-reactivity for laminin in the epithelium was not observed in the experimental group, while the activity was obvious in earlier stages in the control group. The results of this study suggest that EMP may act as epithelial cytostatic agent, and inhibit the growth of epithelial cells. J. Jpn. Soc. Periodontol., 43 : 396~408, 2001.

Key words : enamel matrix proteins, epithelial cell, wound healing

要旨 : 本研究の目的は、歯周組織の創傷治癒過程における上皮細胞の再生に対するエナメルマトリックスタンパク質（以下EMPと略す）の影響を検索することにある。上皮細胞の増殖能を検索するためにPCNA免疫組織化学的染色を、また、創傷治癒過程における基底膜の分布を検索する目的でラミニン免疫組織化学的染色を施した。本実験には、ウィスター系ラットを40匹使用した。第一臼歯の口蓋側歯槽骨を除去後、露出根面を注意深くルートプレーニングし、セメント質を除去した。露出させた歯根面をpH1のクエン酸溶液に浸潤させた綿球で15秒間エッチング処理し、その後生理食塩液にて洗浄した。次に実験群である左側第一臼歯にEMPを塗布し、対照群である右側第一臼歯はエッチングのみとした。その後、弁を復位した。術後、1週、2週、3週、4週、8週目に屠殺し、顎骨から組織標本を採取した。連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色およびPCNAとラミニンの免疫組織化学的染色を施した。実験群の再生付着上皮率は対照群と比較して術後1週から

8週で統計学的に有意に少なかった ($p < 0.05$)。再生付着上皮における PCNA 陽性細胞率では、対照群では術後1週から4週において実験群と比較して高く、特に術後3週と4週で有意に高かった。ラミニンの局在は、実験群では術後1週から4週にかけて付着上皮の基底膜相当部に認められず、対照群では早期から付着上皮の基底膜相当部に認められた。本研究の結果から EMP は、上皮細胞の増殖抑制因子として作用し、上皮の根端側方向への増殖を抑制することが示唆された。

索引用語：エナメルマトリックスタンパク質、上皮細胞、創傷治癒

緒 言

歯周治療におけるゴールの1つは、歯周疾患によって破壊された部位の再生による構築である¹⁾。しかし、治療後における治癒は、失われた組織の一部が他の組織によって置換される修復による治癒である^{2,3)}。近年、組織再生誘導法 (guided tissue regeneration, GTR) は、手術野から歯肉結合組織由来細胞や歯肉上皮組織由来細胞を排除し、歯根膜由来細胞を増殖、分化させ、再生による治癒を可能にした⁴⁻⁶⁾。この療法は、Melcher^{7,8)}、Line ら⁹⁾の仮説、すなわち歯根膜細胞のみが結合組織性付着形成能を有する細胞であるという考えに基づいて行われた。その後、歯の発生段階におけるセメント質形成にエナメルマトリックスタンパク質 (Enamel Matrix Protein, 以下 EMP と略す) が関与することが明らかにされた^{10,11)}。EMP は、ヘルトヴィッチ上皮鞘細胞から分泌され、無細胞性セメント質の形成に関与している¹²⁻¹⁵⁾。Hammarström ら^{16,17)}は、ブタの歯胚より抽出した EMP をサルの歯根に応用し、EMP が無細胞性セメント質の形成に関与し、歯槽骨、歯根膜組織の各組織を再構築することを示した。また、培養下で EMP がどのように歯根膜細胞の分化、増殖に関与するかに関し、Gestrelus ら¹⁸⁾は、ヒト歯根膜細胞を用い、EMP が歯根膜細胞の増殖を促進させることや歯根膜細胞によるタンパク合成量を増加させ、EMP は歯根膜細胞の石灰化結節の形成を促進することを報告した¹⁹⁾。歯周組織の再生療法において歯根面に沿った上皮の根端側方向への増殖は、正常な歯周組織構造の再構築を妨げる最も障害となる因子の一つである²⁰⁻²³⁾。EMP が歯周組織を再構築する上で付着上皮に及ぼす影響に関して、Hammarström ら¹⁷⁾は *in vivo* で、EMP の応用により再生された歯周組織は上皮の深部侵入がみられないことを報告している。Kawase ら²⁴⁾は、5-Bromo-2-Deoxyuridine (以下 BrdU と略す) 標識や flow cytometry を用いて上皮細胞に対する EMP の影響を検討した結果、EMP が上皮細胞の増殖を抑制することを報告している。斉藤 ら²⁵⁾は、ラットを用い、BrdU による免疫組織化学的

検索を行い、EMP の歯根膜細胞および再生上皮細胞に対する作用を検討し、上皮細胞に対し増殖を抑制すると報告している。基底膜は、上皮と結合組織の接合する部位であり、上皮細胞の代謝、増殖、分化に関与している^{26,27)}。基底膜の主要成分であるラミニンは上皮細胞や血管の内皮細胞によって産生され、創傷治癒過程における上皮細胞の伸展および移動に関与していることが報告されている²⁸⁻³¹⁾。従来、EMP 応用後の歯周組織創傷治癒過程における検索は形態学的観察が多く行われているが、上皮細胞と基底膜、特にラミニンの動態との関連性についての報告はされていない。また、上皮細胞の増殖能については、従来より多くの増殖能の検索方法が用いられてきた³²⁻³⁴⁾が、細胞周期の G1 期から S 期に増加する proliferating cell nuclear antigen (以下 PCNA と略す) に対する monoclonal 抗体が開発され、PCNA は正常な組織における細胞の増殖能や腫瘍性病変における異常増殖などの同定に用いられ、客観的な検索法として有効であることが報告されている³⁵⁻³⁷⁾。

そこで、本研究の目的は、ラミニンおよび PCNA による免疫組織化学的染色を用いて EMP の歯周組織の再生過程における付着上皮細胞の分化、増殖に及ぼす影響を検索することである。

材料および方法

1. 実験材料

実験動物は、体重 250 g 前後のウィスター系ラット 40 匹を用いた。食餌は固形飼料 MF (オリエンタル酵母株式会社 東京) および水道水を十分に与えた。EMP はエムドゲイン® (製造番号: 961971 ビオラ社 スウェーデン) を用いた。なお、この研究は、東京歯科大学実験動物指針に基づいて行われた。

2. 実験方法

1) 実験母地の作製

ラットを、チオペンタールナトリウム (ラボナール®1 管中チオペンタールナトリウム 0.3 g, 乾燥炭酸ナトリウム 0.018 g, 日本薬局方注射水 1 管 12 ml/田辺製薬株式会社 大阪) 0.004 ml/g の腹腔内投与にて、全身麻酔後、背位で開口固定した。上顎第一臼

歯 (M1) から第二臼歯 (M2) の口蓋側歯頸部歯肉に #12 替刃式外科用メス (フェザー工業株式会社 岐阜) で内斜切開を加え、歯科用エキスカベーターにて剝離翻転し粘膜骨膜弁を形成した。M1 の口蓋側に先端を加工した歯科用エキスカベーターにてセメント・エナメル境 (以下 CEJ と略す) より根端側方向へ 1 mm, 近遠心方向へ 1 mm の裂開型骨欠損形態を印記し、骨を除去した。その後、露出根面に対して加工した歯科用エキスカベーターを用いてルートプレーニングを行い、象牙質を露出した。なお、実験群は左側 M1 近心根、対照群は右側 M1 近心根を用いた。

2) EMP の応用法

EMP は、根面塗布 10~15 分前に調整した。プロピレングリコールアルギネート溶液 (以下 PGA と略す) は全量 (1.0 ml) を吸引し、EMP の入った容器に注出し、バイアルを数回回転させて EMP を溶解した。ルートプレーニング後手術部位を滅菌生理食塩液にて洗浄し、スメア層を除去する目的でエッチング処理 (クエン酸 pH1) を 15 秒間応用し、滅菌生理食塩液で十分に洗浄した。その後実験群には EMP を塗布し、対照群はエッチングのみとした。なお EMP 塗布は 19 G 注射針付きの 1 ml のツベルクリン用シリンジ (テルモ株式会社 東京) に EMP を吸引し、0.05 ml を根面に塗布した。塗布後、粘膜骨膜弁を復位し滅菌針付縫合糸 (日腸工業株式会社 東京) を用いて縫合した。抜糸は術後 1 週に行った。

3) 観察期間および実験頭数

観察期間は、術後 1 週, 2 週, 3 週, 4 週, 8 週とした。各観察期間 8 匹とし、40 匹使用した。

3. 病理組織学的観察

1) 病理組織標本作製法

各実験期間終了後、前述と同様の全身麻酔を施し、カテーテルを左心室に挿入し、生理食塩液にて前灌流を施し脱血により安楽死させた。次に 20% 中性緩衝ホルマリン溶液で灌流固定を行い、実験部位を含む上顎骨を一塊として摘出し、さらに同固定液で 48 時間浸漬固定した。その後、10% EDTA 溶液にて 3 週間脱灰した。脱灰後、通法に従いパラフィン包埋し、厚さ約 3 μ m の頬側・口蓋側方向の連続切片を作製した。病理組織学的検索は、ヘマトキシリン・エオジン重染色 (H・E 染色) およびアザン・マロリー染色を行い、光学顕微鏡 (Axioplan® 2 Carl Zeiss 社 ドイツ) で検鏡した。

2) 免疫組織化学的染色法

(1) ラミニン

ラミニン検出法は、EnVision+キット (ダコジャパン株式会社 京都) を用いた。薄切した切片は、脱

パラフィン過程として、キシレン処理、エタノール処理を行い 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6 以後 TBS と略す ダコジャパン株式会社) に 5 分間浸漬した。その後切片は、タンパク分解酵素処理としてプロテイナーゼ K (ダコジャパン株式会社) を室温で 6 分間作用させ、その後 5 分間水洗した。次に切片は内因性ペルオキシターゼのブロッキングとして 3% 過酸化水素水で 10 分間処理し、5 分間水洗後、5 分間 TBS 中に浸漬した。さらに非特異反応ブロッキング試薬 (ダコジャパン株式会社) を 5 分間作用させた。一次抗体としては抗ラミニン抗体 (抗ラットラミニン・ウサギポリクローナル抗体 ダコジャパン株式会社) を 800 倍に希釈し 60 分常温で作用させた。その後、TBS で洗浄し、さらに TBS 5 分間浸漬を 2 回行った。二次抗体は、EnVision+ポリマー試薬 (ダコジャパン株式会社) を用い 30 分反応させた。反応後、TBS 5 分間浸漬を 2 回行った。発色は、3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩 (ダコジャパン株式会社) を作用させ、マイヤーのヘマトキシリンによる核染色を施し光学顕微鏡で検鏡した。

(2) PCNA

薄切した切片は、脱パラフィン過程として、キシレン処理、エタノール処理を行い、TBS で 5 分間浸漬し、10 分間蒸留水中でマイクロウェーブ処理を施した。次に内因性ペルオキシターゼのブロッキングとして 3% 過酸化水素水で 10 分間処理し、5 分間水洗後、さらに 5 分間 TBS 中に浸漬した。次に非特異反応ブロッキング試薬 (ダコジャパン株式会社) を 5 分間作用させた。一次抗体としてはマウス IgG₂ PCNA 抗体 (ダコジャパン株式会社) を 100 倍に希釈し 60 分間作用させ、二次抗体は、ダコ LSAB2 キット/HRP-ラット組織細胞標本用 (ダコジャパン株式会社) を用いた。ピオチン標識二次抗体試薬を用いて室温で 10 分間作用させた。反応後、TBS 5 分間浸漬を 2 回を行い、さらに酵素試薬 (ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン) を 10 分間作用させた。反応後、TBS 5 分間の浸漬を 2 回行った。発色は、3,3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩 (ダコジャパン株式会社) で反応させ、マイヤーのヘマトキシリンによる核染色を施し光学顕微鏡で検鏡した。

4. 再生付着上皮の組織学的計測方法

組織計測は、マイクロスコープシステム (MS-803 MORITEX 東京) を用いて、各群において被験歯近心根の頬口蓋側欠損部中央部に相当する部分を選択し、各被験歯につき 100 μ m 間隔で連続的で 5 枚ずつ選択し、その平均値を算出して代表値とした。計測基準は、図 1 に示す基準点に従って計測し、歯周ポケット

CEJ：セメント・エナメル境 D：CEJ から ARP の距離
A：歯周ポケット底部
ARP：ルートプレーニング最根端部
B：付着上皮最根端部

図 1 組織計測の基準点

ト底部から付着上皮最根端部を再生付着上皮率とし、 $JE/D \times 100$ (%) を算出した。なお、CEJ より根端側方向に 1 mm を ARP の位置とした。各群の各組織計測量については、Mann-Whitney の U 検定を用いた。

5. PCNA 陽性細胞率の算出法

PCNA 陽性細胞率の算出は、各群、各期間につき切片を 100 μ m 間隔で連続的に 5 枚ずつ選択し、光学顕微鏡 (Carl Zeiss 社 ドイツ) で 20 $\times$ 10 倍で撮影を行った。次に写真上で図 2 に示す計測基準範囲を設定し、以下に示す各部位での計測基準範囲の全細胞数に対する PCNA 陽性細胞数を百分率で算出した。統計学的分析は Mann-Whitney の U 検定を用いた。

1) 再生付着上皮内の PCNA 陽性細胞率

再生付着上皮最根端部から歯冠側方向に 0.1 mm $\times$ 0.1 mm 範囲 (図 2 ①) における付着上皮細胞の全細胞数に対する PCNA 陽性細胞数の百分率を算出した。

2) 結合組織細胞における PCNA 陽性細胞率

再生付着上皮最根端部より根端側に歯根面に沿って、0.25 mm $\times$ 0.07 mm の範囲 (図 2 ②) における全細胞数に対する PCNA 陽性細胞数を算出した。

結 果

1. 病理組織学的所見

1) 術後 1 週：実験群では、わずかな再生付着上皮

図 2 PCNA 陽性細胞率の組織計測の基準点

①：再生付着上皮内の PCNA 陽性細胞率

②：結合組織細胞に対する PCNA 陽性細胞率

が根端側方向の歯根面に形成されていた (図 3)。一方、ルートプレーニングした歯根面の広い範囲には、幼弱な結合組織の再生が認められた (図 3)。多数の線維芽細胞が歯根表面の再生した結合組織内に認められた (図 3)。対照群では、上皮組織の根端側方向への侵入はほとんど認められなかった (図 4)。幼弱な結合組織の再生がルートプレーニングした歯根の広い範囲に認められた (図 4)。多くの線維芽細胞がこれら結合組織内に認めた。

2) 術後 2 週：実験群では、わずかな再生付着上皮が歯根表面に形成されていた (図 5)。また、多くの線維芽細胞が歯根表面付近に認められ、歯軸の長軸と平行に走向していた (図 6)。残存した歯槽骨では、骨の再生を認めなかった。対照群では、明らかな再生付着上皮の形成を認めた (図 7)。これら再生した付着上皮は、歯根表面を根端側方向に伸展していた (図 7)。一方、歯根表面には、結合組織の再生がルートプレーニングした歯根の広い範囲に認められた。多くの線維芽細胞がこれら結合組織内に認めた (図 7)。

3) 術後 3 週：実験群では、再生付着上皮は、根端側方向に短く、不規則な形態を呈していた (図 8)。この再生付着上皮は、わずかな上皮細胞で構成されていた。一方、歯根表面付近には、再生した結合組織が広い範囲に認められた (図 8)。これらの結合組織は、歯根表面に発達した線維芽細胞が多く認められた。しかし、ルートプレーニング後の象牙質表面には、セメント質の再生は認められなかった。対照群では、再生付着上皮が歯根面を根端側方向に著しく伸展しているのが認められた (図 9)。この再生付着上皮は、ルー

図 3 術後1週：実験群
歯根表面の広範囲に結合組織の再生を認める。
H・E染色 (×50)

図 4 術後1週：対照群
歯根表面に幼弱な結合組織の再生を認める。
H・E染色 (×50)

図 5 術後2週：実験群
再生付着上皮が、歯根表面に形成されている。
H・E染色 (×50)

図 6 図5の拡大像
歯根表面には歯軸を平行に走行する線維芽細胞が多数認められる。
H・E染色 (×200)

図 7 術後2週：対照群

再生した付着上皮は、歯根表面を根端側方向に伸展している。

H・E染色（×50）

図 8 術後3週：実験群

再生付着上皮は、根端側部に短く、不規則な形態を呈している。

矢印：再生付着上皮最先端部

H・E染色（×50）

トプレーニングした歯根の歯冠側1/2を覆い、幅の広い上皮層を形成していた。結合組織性付着は、再生付着上皮最根端側部よりわずかな範囲の歯根表面に認められるのみであった。

4) 術後4週：実験群では、再生付着上皮は根端側部へ侵入していた（図10）。また、この再生付着上皮は短く、不規則に配列していた。一方、結合組織性付着は、再生付着上皮より根端側の広い範囲の歯根表面に形成されていた（図10）。ルートプレーニング後の象牙質表面には、一層の再生セメント質の形成を認めた（図11）。しかし、骨の再生は認められなかった。対照群では、再生付着上皮の形成が根端側方向に認められた（図12）。これら上皮は、ルートプレーニングした歯根のほぼ歯冠側1/2を占め、数層から成る上皮細胞で形成されていた。一方、歯根表面には、線維芽細胞の付着が認められた。しかし、象牙質表面には、セメント質の再生は認められなかった。また、骨の再生も認められなかった。

5) 術後8週：実験群では、再生付着上皮が、根端側方向に認められた（図13）。この付着上皮層は、2～3層の上皮細胞で構成されていた。一方、セメント質の再生を伴う結合組織性付着が付着上皮層の最根端側部より根端側方向に広い範囲のルートプレーニング後の象牙質表面に形成されていた（図14）。この再生

図 9 術後3週：対照群

根端側方向に著しく伸展した再生付着上皮が認められる。

矢印：再生付着上皮最先端部

H・E染色（×50）

図 10 術後4週：実験群
歯根表面の広範囲に結合組織性付着が認められる。

矢印：再生付着上皮最先端部
H・E染色（×50）

図 11 図10の拡大像
一層のセメント質の形成が認められる。
H・E染色（×400）

セメント質は、エオジン好性を示し、薄く歯根面を覆っていた（図14）。また、結合組織のコラーゲン線維が再生セメント質に直角に走行していた（図15）。骨の再生はほとんど認められなかった。対照群では、長い再生付着上皮が、根端側方向に形成されていた（図16）。これら長い再生付着上皮は、歯根表面の歯冠側2/3を占め、最根端部は、1~2層の上皮細胞で構成されていた。一方、結合組織性付着がこの長い再生付着上皮最根端側より根端側のわずかな範囲に認められた（図16）。歯根表面には線維芽細胞の付着を認めたが、セメント質の再生は認められなかった。また、骨の再生も認められなかった（図16）。

2. PCNA免疫組織化学的所見

術後1~2週においては、実験群では、PCNA陽性細胞は歯根表面付近の結合組織内に多く認められた。（図17）。一方、再生付着上皮内には、PCNA陽性細胞はほとんど認められなかった。対照群では、PCNA陽性細胞は、歯根表面に付着している上皮層直下の結合組織に散在性に認められるのみであり、再生付着上皮にはほとんど認められなかった。術後3週においては、実験群では、PCNA陽性細胞は、歯根表面に再生した結合組織に多く分布していた。一方、PCNA陽性細胞は再生付着上皮の細胞にはほとんど認められなかった（図18）。対照群では、PCNA陽性細胞が、根端側に伸展した再生付着上皮層に多く認

図 12 術後4週：対照群
根端側方向へ長い再生付着上皮の形成が認められる。

矢印：再生付着上皮最先端部
H・E染色（×50）

図 13 術後8週：実験群
根端側方向へ再生付着上皮の形成が認められる。
矢印：再生付着上皮最先端部
H・E染色（×50）

図 14 図13の拡大像
歯根面にセメント質の再生を伴う結合組織性付着を形成している。
H・E染色（×400）

図 15 図13のアザン・マロリー染色
再生セメント質にコラーゲン線維が直角に走行している。
アザン・マロリー染色（×200）

図 16 術後8週：対照群
長い再生付着上皮が、根端側方向に形成されている。
矢印：再生付着上皮最先端部
H・E染色（×50）

められた（図19）。すなわち、再生付着上皮の最先端部の上皮細胞にもPCNA陽性細胞が認められた（図19）。一方、歯根表面に付着する結合組織では、

図 17 術後2週：実験群
PCNA 陽性細胞は歯根
膜表面付近に多く認めら
れる。
PCNA 免疫組織化学的
染色 (×200)

図 18 術後3週：実験群
PCNA 陽性細胞は再生
付着上皮内にほとんど認
められない。
PCNA 免疫組織化学的
染色 (×200)

図 19 術後3週：対照群
PCNA 陽性細胞が、再
生付着上皮に多く認めら
れる。
PCNA 免疫組織化学的
染色 (×200)

図 20 術後4週：実験群
PCNA 陽性細胞は再生
付着上皮内にほとんど認
められない。
PCNA 免疫組織化学的
染色 (×200)

図 21 術後4週：対照群
PCNA 陽性細胞は再生
付着上皮の基底細胞に多
く認められる。
PCNA 免疫組織化学的
染色 (×200)

図 22 術後3週：実験群
再生付着上皮の最先端
部の基底膜相当部にラミ
ニンの局在は認められない。
ラミニン免疫組織化学
的染色 (×200)

図 23 術後3週：対照群
再生付着上皮の最先端
部の基底膜相当部にラミ
ニンの局在が認められない。
ラミニン免疫組織化学
的染色 (×200)

図 24 術後4週：実験群
再生付着上皮の最先端
部の基底膜相当部にラミ
ニンの局在が認められない。
ラミニン免疫組織化学
的染色 (×200)

図 25 術後4週：対照群
再生付着上皮の最先端
部の基底膜相当部にラミ
ニンの局在が認められる。
ラミニン免疫組織化学
的染色 (×200)

図 26 再生付着上皮率

PCNA 陽性細胞は歯根面付近ならび歯肉結合組織内に散在性に認めるのみであった。術後4週においては、実験群ではPCNA 陽性細胞は、歯根表面に付着している結合組織の広い範囲に分布していた。とくに、歯根表面付近の結合組織内にPCNA 陽性細胞が多く分布していた。一方、再生付着上皮内の細胞には、PCNA 陽性細胞はほとんど認められなかった(図20)。対照群では、PCNA 陽性細胞は、再生付着上皮内の上皮細胞に多く認められた(図21)。歯根表面に付着する結合組織では、PCNA 陽性細胞は歯根面付近ならびに歯肉結合組織内にも術後3週に比較してやや多く認められた。術後8週では、実験群および対照群の両群の再生付着上皮内に同程度のPCNA 陽性反応を認められた。さらに両群の歯根表面に付着する結合組織にもPCNA 陽性細胞が散在性に分布していた。

3. ラミニン免疫組織化学的所見

術後2週では、ラミニンの局在は、実験群および対照群ともに再生した付着上皮最先端側部の基底膜相当部には認められなかった。術後3週のラミニンの局在は、実験群では再生した付着上皮下の基底膜相当部では一部認められるものの、最先端部の基底膜相当部には認められなかった(図22)。対照群では、付着上皮の最先端部を除く、基底膜相当部位にラミニンの局在が認められた(図23)。術後4週では、実験群では、再生した付着上皮の最先端部位の基底膜相当部位では、ラミニンの局在は観察されなかった(図24)。しかし、対照群では、再生した付着上皮の最先端部位の基底膜相当部位にも線状にラミニンの局在を認めた(図25)。術後8週では、実験群および対照群の両群ともに再生した再生付着上皮下の最先端部位の基底膜

図 27 再生付着上皮におけるPCNA 陽性細胞率

図 28 結合組織に対するPCNA 陽性細胞率

相当部に線状のラミニンの局在が観察された。

4. 組織計測所見

実験群は対照群に比較し術後1週ですでに再生付着上皮率が有意に少なかった ($p < 0.05$) (図26)。また、その後の各実験期間においても同様に実験群は対照群に比較し有意に少なかった ($p < 0.05$)。

再生付着上皮におけるPCNA 陽性細胞率では、実験群は、対照群に比較し術後1および2週で低く、とくに術後3および4週では、有意に実験群で低かった ($p < 0.05$) (図27)。その後、術後8週では、両群ほぼ同程度のPCNA 陽性細胞率を示した。一方、再生結合組織におけるPCNA 陽性細胞率では、実験群は、対照群に比較し、術後2および3週では、有意に実験群で高く ($p < 0.05$)、その後、術後8週では、両群ほぼ同程度のPCNA 陽性細胞率を示した(図28)。

考 察

歯根面に沿った上皮の根端側方向への増殖は、正常な歯周組織構造の再構築を妨げる最も障害となる因子である^{20~23)}。そのため、再生療法では上皮の根端側方向への増殖をいかに阻止するかが重要である。本研究では、EMPの応用により、再生付着上皮率が減少することを明らかにした(図26)。また、再生付着上皮中のPCNA陽性細胞率は、EMP群ではすでに術後1週で低く、とくに術後3週および4週で有意に低い($p<0.05$)ことを示した(図27)。PCNAは、正常な組織における生理的な増殖を示す細胞や腫瘍性病変における細胞の異常増殖などの同定や客観的に細胞の増殖を検索する手段として有用であることが示されている^{35~37)}。EMP群が再生付着上皮層で明らかなPCNA陽性細胞率の低値を示していることより、対照群に比較して上皮細胞の増殖の低下をきたし、付着上皮の深部増殖の減少を生じたものと考えられる。そこで、EMPの上皮細胞に対する影響を見ると、PCNA陽性細胞率は、EMP群では付着上皮における術後1~4週において対照群より低く、対照群では、特に術後3, 4週で高い値を示した。また、この期間、病理組織学的には付着上皮の根端側方向への増殖はEMP群ではみられず、対照群では、術後3, 4週で明らかに増殖していた。さらに、再生付着上皮の最先端部の基底膜相当部のラミニンの局在は、EMP群では術後1~4週では認められないが、対照群では、術後1~3週では認められず、術後4週で認められた。ラミニンは、上皮細胞や血管の内皮細胞で産生されていることが報告されている^{28,29)}。さらに、ラミニンは、種々の組織の基底膜に存在し、IV型コラーゲンおよび上皮細胞に特異的な接着促進作用がある^{38~43)}。本研究の結果は、上皮細胞におけるPCNA陽性細胞の発現とラミニンの付着上皮の基底膜相当部の局在について、EMP群の術後1~4週における付着上皮層ではPCNA陽性細胞率が対照群より低く、かつ再生付着上皮先端部にラミニンの局在を認めないことから、EMPは、創傷治癒の早期の段階で上皮細胞の増殖能および上皮細胞のラミニン産生を抑制したものと考えられる。齊藤ら²⁵⁾は、ラットを用い、BrdUによる免疫組織化学的検索を行いEMPに対する歯根膜細胞と再生上皮細胞の分裂活性に関し、EMP応用群では、術後3日と1週で上皮の標識細胞率が対照群と比較して低く、EMPは上皮細胞の増殖抑制に作用することを報告している。このことは、本研究においてEMPが上皮細胞の増殖に対して抑制的に作用すると

した結果と一致し、さらに本実験では術後3週と4週で有意に低い値を示した。

本研究では、再生付着上皮細胞層内のPCNA陽性細胞率は、EMP群において術後1~4週で低下していたが、術後8週では対照群と同程度まで回復した。また、ラミニンは、術後1~4週で局在を認めていなかったが、同様に術後8週では、明らかに局在していた。したがって、EMPは、創傷治癒の早期で上皮細胞の増殖を抑制するが、その後、上皮細胞の増殖は回復しているのでEMPは上皮細胞に対して増殖能を一時的に早期の時期に低下させることを示唆している。Kawaseら²⁴⁾は、BrdU標識やflow cytometryを用いて上皮細胞に対するEMPの影響を検討し、上皮細胞の増殖を抑制するとしている。この報告は、EMPが、上皮細胞の増殖能を抑制するとした本研究の結果を裏付けるものである。しかし、今後、EMPが上皮細胞の増殖を抑制するメカニズムの詳細な検索が必要である。また、基剤であるPGAのみを投与した群も対照群として必要であり、今後その様な検討を行う予定である。

EMPは、歯根膜由来細胞の増殖能を高めることが報告されている¹⁸⁾。本研究の結合組織中のPCNA陽性細胞率は、EMP群では、対照群に比較して術後1週ですでに高く、さらに術後2, 3週では、統計学的に有意に高かった($p<0.05$)。また、EMP群におけるこの時期のPCNA陽性細胞は歯根表面付近の線維芽細胞に明らかに多く発現していた。Gestrelusら¹⁸⁾は、EMPが歯根膜細胞の増殖に対する影響を*in vitro*で検索し、培養7~10日後に著しい増殖促進が発現することを示している。したがって、本研究では手術野の歯根表面に塗布したEMPは創傷治癒の早期(術後1~4週)において根端に存在する歯根膜由来細胞の増殖を促進させ、術後4週より歯根表面にセメント質の再生、術後8週では明らかな無細胞性セメント質を生じたと考えられる。また、彼らは、*in vitro*においてEMPが早期に歯根膜組織由来の未分化間葉系細胞の増殖を促進し、これら細胞が根面に付着することにより上皮組織の深部侵入の阻止を生じると考察している。Hammarströmら¹⁷⁾は、サルを用いて頰側に裂開型の骨欠損を作成、EMPを応用した結果、EMPは、歯根膜線維芽細胞の成長や細胞外マトリックス合成を助長し、上皮組織の深部侵入を阻止したとしている。これらの報告および本研究の結果より、EMPは、早期においてセメント質形成を伴う結合組織性付着を獲得するものと考えられる。

再生療法では上皮の根端側方向への増殖の阻止を計ることが重要であり、EMPは、上皮細胞の増殖能を

抑制的に作用するとともに、セメント質再生を伴う結合組織性付着を形成することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜った本大学歯科保存学第二講座主任山田 了教授に深謝致します。本研究の遂行にあたり、終始適切な御指導を頂きました当講座の渋川義宏博士、太田幹夫博士、伊藤太一博士に深謝致します。ならびに、歯科保存学第二講座の各位に厚く御礼申し上げます。

本論文の要旨は、第43回春季日本歯周病学会学術大会(平成13年4月25日、新潟)において発表した。

文 献

- 1) Caton, J.G. and Greenstein, G.G. : Factor related to periodontal regeneration. *Periodontology* 2000, 1 : 9-15, 1993.
- 2) Bowers, G., Chadoroff, B., Carnevale, R., Melling, J., Corio, R., Emerson, J., Stevens, M. and Rosenberg, E. : Histologic evaluation of new attachment apparatus formation in human. Part I. *J. Periodontol.*, 60 : 664-674, 1989.
- 3) Caton, J.G. : Overview of clinical trials on periodontal regeneration. *Ann. Periodontol.*, 2 : 215-222, 1997.
- 4) 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.
- 5) Gottlow, J., Nyman, S., Lindhe, J., Karring, T. and Wennström, J. : New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J. Clin. Periodontol.*, 13 : 604-616, 1986.
- 6) Becker, W., Becker, B.E., Prichard, J.F., Caffesse, R., Rosenberg, E. and Gian-Grasso, J. : Root isolation for new attachment procedures. A surgical and suturing method : Three case reports. *J. Periodontol.*, 58 : 819-826, 1987.
- 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) Melcher, A.H. : On the repair potential of periodontal of tissues. *J. Periodontol.*, 47 : 256-260, 1976.
- 9) Line, S.E., Polson, A.M. and Zander, H.A. : Relationship between periodontal injury, selective cell repopulation and ankylosis. *J. Periodontol.*, 45 : 725-730, 1974.
- 10) Slavkin, H.C. and Boyde, A. : Cementum : An epithelial secretory product? *J. Dent. Res.*, 53 : 157, 1975.
- 11) Slavkin, H.C. : Towards a cellular and molecular understanding of periodontics. Cementogenesis revisited *J. Periodontol.*, 47 : 249-255, 1976.
- 12) Lindskog, S. : Formation of intermediate cementum. I : Early mineralization of aprismatic enamel and intermediate cementum. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 2 : 147-160, 1982.
- 13) Lindskog, S. : Formation of intermediate cementum. II : A scanning electron microscopic study of the epithelial root sheath of Hertwig. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 2 : 161-169, 1982.
- 14) Lindskog, S. and Hammarström, L. : Formation of intermediate cementum. III : ^3H -proline and ^3H -tryptophan uptake into the epithelial root sheath of Hertwig in vitro. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.*, 2 : 171-177, 1982.
- 15) Ten Cate, A.R. : Formation of supporting bone in association with periodontal ligament organization in the mouse. *Arch. Oral Biol.*, 20 : 137-138, 1975.
- 16) Hammarström, L. : Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 658-668, 1997.
- 17) Hammarström, L., Heijl, L. and Gestrelus, S. : Periodontal regeneration in a buccal dehiscence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 669-677, 1997.
- 18) Gestrelus, S., Andersson, C., Lidstrom, D., Hammarström, L. and Somerman, M. : In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 685-692, 1997.
- 19) Gestrelus, S., Andersson, C., Johansson, A.C., Persson, E., Brodin, A., Rydhag, L. and Hammarström, L. : Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 678-684, 1997.
- 20) Björn, H. : Experimental studies on reattachment. *Dent. Pract.*, 11 : 351-354, 1961.
- 21) Björn, H., Hollender, L. and Lindhe, J. : Tissue regeneration in patients with periodontal disease. *Odontol. Revy.*, 16 : 317-326, 1965.
- 22) Caton, J.C., 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.
- 23) Proye, M.P. and Polson, A.M. : Effect of root surface alterations on periodontal healing. (I). Surgical denudation. J. Clin. Periodontol., 9 : 428-440, 1982.
 - 24) Kawase, T., Okuda, K., Yoshie, H. and Burns, D. M. : Cytostatic action of enamel matrix derivative (EMDOGAIN®) on human oral squamous cell carcinoma-derived SCC 25 epithelial cells. J. Periodont. Res., 35 : 291-300, 2000.
 - 25) 斉藤文重, 沼部幸博, 鴨井久一 : フラップ手術後の歯周組織創傷治癒過程に関する研究—エナメルマトリックスタンパク質塗布後の上皮細胞および歯根膜細胞の動態について—. 日歯保存誌, 42 : 569-582, 1999.
 - 26) Bohnert, A., Hornung, J., Mackenzie, I.C. and Fusenig, N.E. : Epithelial-mesenchymal interactions control basement membrane production and differentiation in cultured and transplanted mouse keratinocytes. Cell Tissue Res., 244 : 413-429, 1986.
 - 27) Katz, S.I. and Bethesda, P.D. : The epidermal basement membrane zone—structure, ontogeny, and role in disease. J. Am. Acad. Dermatol., 11 : 1025-1037, 1984.
 - 28) Foidart, J.M., Bere, E.W. Jr., Yaar, M., Rennard, S.I., Gullino, M., Martin, G.R. and Katz, S.I. : Distribution and immunoelectron microscopic localization of laminin, a noncollagenous basement membrane glycoprotein. Lab. Invest., 42 : 336-342, 1980.
 - 29) Stanley, J.R., Hawley-Nelson, P., Yaar, M., Martin, G.R. and Katz, S.I. : Laminin and bullous pemphigoid antigen are distinct basement membrane proteins synthesized by epidermal cells. J. Invest. Dermatol., 82 : 456-459, 1982.
 - 30) 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化学的研究—歯肉剥離搔爬術後の fibronectin と laminin の局在—. 日歯周誌, 31 : 460-490, 1989.
 - 31) 仲谷 寛, 佐藤 聡, 宮里明子, 北島祐子, 青木威仁, 鴨井久一 : ラット歯周組織の創傷治癒における IV型コラーゲンとラミニンの局在. 日歯周誌, 34 : 179-186, 1992.
 - 32) Stone, S., Ramfjord, S.P. and Waldron, J. : Scaling and gingival curettage. A radioautographic study. J. Periodontol., 37 : 415-430, 1966.
 - 33) Engler, W.O., Ramfjord, S.P. and Hiniker, J.J. : Healing following simple gingivectomy. A tritiated thymidine radioautographic study. I. Epithelialization. J. Periodontol., 37 : 298-308, 1966.
 - 34) Gratzner, H.G. : Monoclonal antibody to 5-bromo and 5-iododeoxyuridine—A new reagent for detection of DNA replication. Science, 218 : 474-475, 1982.
 - 35) Waseem, N.H. and Lane, D.P. : Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) structural conservation and the detection of nuclear form. J. Cell Science, 96 : 121-129, 1990.
 - 36) Hall, P.A., Levison, D.A., Woods, A.L., Yu, C.C. W., Kellock, D.B., Watkins, J.A., Barnes, D.M., Gillett, C.E., Camplejohn, R., Dover, R., Wassem, N.H. and Lane, D.P. : Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunocalization in paraffin section : an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. J. Pathol., 162 : 285-294, 1990.
 - 37) Dawson, A.E., Norton, J.A. and Weinberg, D.S. : Comparative assessment of proliferation and DNA content in breast carcinoma by image analysis and flow cytometry. Am. J. Pathol., 136 : 1115-1124, 1990.
 - 38) Terranova, V.P., Rao, C.N., Kalebic, T., Margulies, I.M. and Liotta, L.A. : Laminin receptor on human breast carcinoma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80 : 444-448, 1983.
 - 39) Timpl, R., Engel, J. and Martin, G.R. : Laminin—a multifunctional protein of basement membranes. Trends. Biochem. Sci., 8 : 207-209, 1983.
 - 40) Kao, R.T., Hall, J., Engel, L. and Stern, R. : The matrix of human breast tumor cells is mitogenic for fibroblasts. Am. J. Pathol., 115 : 109-116, 1984.
 - 41) Sugrue, S.P. and Hay, E.D. : Response of basal epithelial cell surface and cytoskeleton to solubilized extracellular matrix molecules. J. Cell. Biol., 91 : 45-54, 1981.
 - 42) McCarthy, J.B., Palm, S.L. and Furcht, L.T. : Migration by haptotaxis of a schwann cell tumor line to the basement membrane glycoprotein laminin. J. Cell Biol., 97 : 772-777, 1983.
 - 43) McCarthy, J.B. and Furcht, L.T. : Laminin and fibronectin promote the haptotactic migration of B 16 mouse melanoma cells *in vitro*. J. Cell. Biol., 98 : 1474-1480, 1984.

連絡先 :

東京歯科大学歯科保存学第二講座

〒261-8502 千葉市美浜区真砂1丁目2番2号