

露出根面処理後の培養細胞付着に関する超微形態学的観察 (2)

東 富恵, 恩塚 智子, 佐東 元
吉野 宏, 岡本 莫

Ultrastructural Study on Cell Attachment of Cultured Fibroblasts to Treated Root Surfaces (2)

Tomie Higashi, Tomoko Onzuka, Gen Satoh,
Hiroshi Yoshino, and Hiroshi Okamoto

(平成6年3月29日受付)

緒 言

歯周病罹患歯の病的露出根面に関しては、細菌由来の組織為害性物質による汚染^{1,2)}や歯根表層の化学的組成の変化^{3,4)}が報告されており、また形態学的変化については、著者らは現在までに、セメント質表層部のシャーピー線維の膨化や細線維化などを超微形態学的に観察し、その変化が表層下数 μm 程度であることを確認した⁵⁻⁷⁾。

歯周ポケット除去手術に際し、歯肉結合組織との再付着過程でアタッチメントレベルの獲得やポケット再発防止をはかり、新生セメント質の形成を促進するためには、根面処理は重要な役割を果たすと考えられる。著者らは現在までに、有効な根面処理を検索する目的で、培養4日後のヒト歯肉由来線維芽細胞の露出根面への付着実験を行い、細胞付着はルートプレーニング(RP)により促進すること、またRP後にクエン酸(CA)などの薬物で根面処理を行うことにより、RPのみを行った場合と比較してさらに付着細胞数が増加することを明かにした⁸⁾。さらに、4週間経過後のヒト歯根膜由来培養線維芽細胞の付着状態を透過型電子顕微鏡を用いて観察し、RP+CA群では細胞と根表面の間隙はRP群よりも広く、その部に無定形物質やマイクロフィブリルが認められることを報告した⁹⁾。しかし同実験期間内には根表面にコラーゲン線維が形成されていなかったため、比較的長期の培養期

間である6週間経過後の細胞付着状態と、コラーゲンの形成状態を超微形態学的に観察し、両実験群間での相違を検索した。

材料および方法

I. 被験歯の選択および処理

被験歯は露出部が歯根長の1/2以上で根面カリエスのない、保存不可能と診断されたヒト歯周病罹患歯10本で、抜去後直ちにあるいは冷凍保存後に下記の処理の1つを施した。

1. RP群：露出歯根を超音波スケーラーで除石し、Gracy curetteを用いて滑沢になるまでルートプレーニングを行い、超音波洗浄を行った。その後、diamond discで歯軸に垂直に切断し、500 μm 以下の厚さのルートスライスを作製し、再び超音波洗浄を3分間行った。

2. RP+CA群：RP群と同様な処理を行って得られたルートスライスをpH1.0のCA中に3分間浸漬後、超音波洗浄を3分間行った。

実験には、RP群およびRP+CA群のルートスライスを1000 units/ml ペニシリンGカリウム、1 mg/ml 硫酸ストレプトマイシン、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ファンギゾンを含むハンクス平衡塩類溶液中で72時間浸漬滅菌したものをを用いた。

II. 実験方法

臨床的に健康な歯周組織を有している抜去下顎第3大臼歯の歯根膜組織から得られた線維芽細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)、100 units/ml ペニシリンGカリウム、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 硫酸ストレプトマイシン、2.5

広島大学歯学部歯科保存学第二講座 (主任：岡本莫教授)

本論文の要旨は平成4年11月の日本歯科保存学会1992年度秋季学会(第97回)において発表した。

$\mu\text{g/ml}$ ファンギゾンを含むダルベッコ変法イーグル培地（ニッスイ）を用いて、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 気相下で継代培養し、5代細胞を実験に使用した。

前記の処理を施した同実験群内の2つのルートスライスを直径 35 mm の培養用シャーレに両者の間隔が $500 \mu\text{m}$ 以下となるように併置固定し、ヒト歯根膜由来線維芽細胞を 4×10^5 個の細胞数となるように播種し、 $50 \mu\text{g/ml}$ アスコルビン酸（SIGMA）を加えた継代培地中で6週間培養した。

培養期間中は倒立位相差顕微鏡を用いて観察した。培養後のルートスライスおよび細胞は、 0.1 M カコジル酸ナトリウム緩衝 4% パラホルムアルデヒド- 5% グルタルアルデヒド混合固定液中（ $\text{pH} 7.4$ 、 4°C ）で1.5時間の前固定を行った。次いで 5% EDTA 水溶液中で2週間脱灰後、 1% オスミウム酸溶液中で1時間の後固定を行い、アルコール上昇系列にて脱水した。続いてエボン812に包埋し、根表面に垂直方向に超薄切片を作製後、タングステン酸アンモニウム、パラ酢酸ウラニルとクエン酸鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡（日本電子社 JEM-100S、加速電圧 80 kV ）による観察を行った。

結 果

I. 位相差顕微鏡および光学顕微鏡像

培養4日後では、RP および RP+CA 群において、線維芽細胞はシャーレ面と歯根外周の一部とつながりかかっており、その部分は傾斜があるため屈折率が異なり位相差像で光って見えた。培養3週後では、歯根外周に沿って光っている部分は多くなり、6週間の光顕像では対面する両歯根の間隙を橋渡ししていた（図1）。また、RP 群と RP+CA 群で違いは見られなかった。

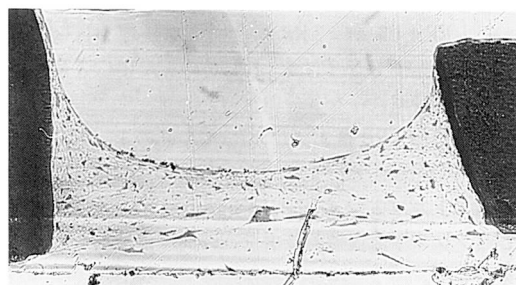


図1 RP+CA 群の光顕像（6週）
二つの歯根間を細胞が橋渡ししている。 $\times 100$

II. 透過型電子顕微鏡像

1. 対照群

対照としたルートスライスを cell free の培地中に

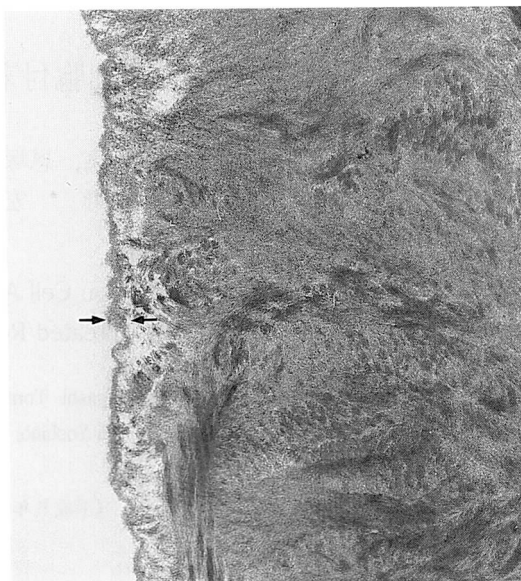


図2 RP 群の歯根表面像（6週）
cell free の状態で培地中に浸漬した歯根のセメント質表面に矢印間で示す無定形物質が付着している。 $\times 8,000$

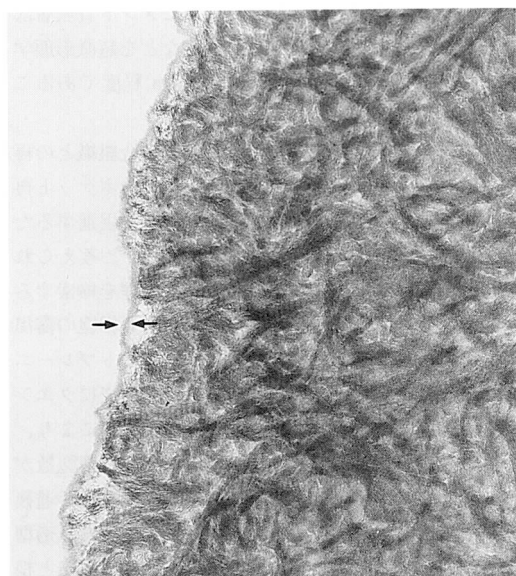


図3 RP 群の歯根表面像（6週）
cell free の状態で培地中に浸漬した歯根の象牙質表面に矢印間で示す無定形物質が付着している。 $\times 8,000$

6週間浸漬後の歯根表面には、RP 群では連続的に無定形物質が付着していたが（図2, 3）、RP+CA 群では、無定形物質の付着がわずかに認められるものと

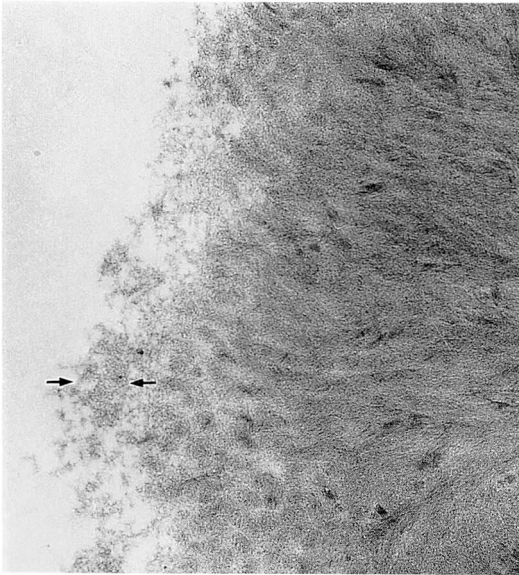


図4 RP+CA 群の歯根表面像（6週）
cell free の状態で培地中に浸漬した歯根のセメント質表面に矢印間で示す無定形物質が付着している。×8,000

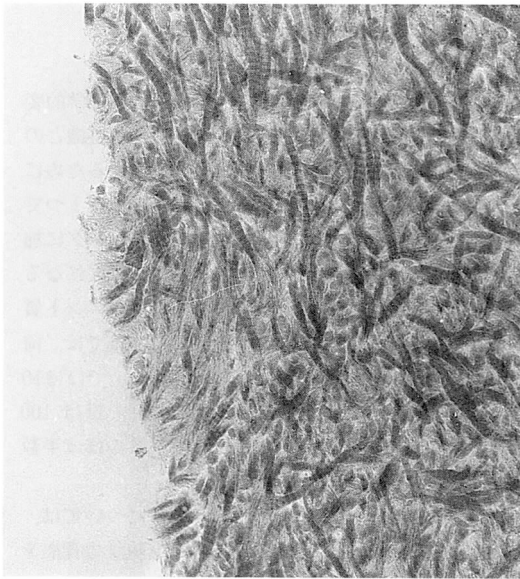


図5 RP+CA 群の歯根表面像（6週）
cell free の状態で培地中に浸漬した歯根の象牙質表面には無定形物質は認められない。

識別できないものがあつた（図4, 5）。処理歯根表面に象牙質が裸出している場合とセメント質とで表面像に違いは認められなかった。

2. RP 群

ルートスライス側面には、細胞が数層増殖しており、広い細胞間隙にコラーゲン線維が形成されていた（図6, 7）。しかし、この細胞層の最下層に相当する、根表面に最も近接した細胞は、無定形物質を介して根表面に付着しており、細胞と根表面との間隙は狭く、コラーゲン線維はその間隙には形成されていなかった。最下層の細胞が付着している無定形物質と根表面の付着は強固なものではなく、時折根表面からはずれている像も見られた（図7）。処理歯根表面がセメント質でも象牙質でも付着様式に違いは認められなかった。



図6 RP 群の細胞付着像（6週）
象牙質（D）上に数層増殖した細胞層の間隙には、コラーゲン線維が形成されているが、根表面に最も近接した細胞は、歯根側面に平行に長く伸びた状態で無定形物質（矢印）を介して付着しており、細胞と根面との間隙は狭く、そこにはコラーゲン線維は形成されていない。
×8,000

3. RP+CA 群

ルートスライスの側面では、RP 群と同様に数層増殖した細胞層の間隙は広く、同部にコラーゲン線維が形成されていた（図8, 9）。しかし、最下層の細胞層と根表面との間隙は、RP 群と比べて広く、同部にはコラーゲン線維が少量ではあるが形成されており、RP 群で存在していた無定形物質は認められなかった。新生された線維の直径は既存のセメント質や象牙質の基質線維の直径より細かった。また処理歯根表面

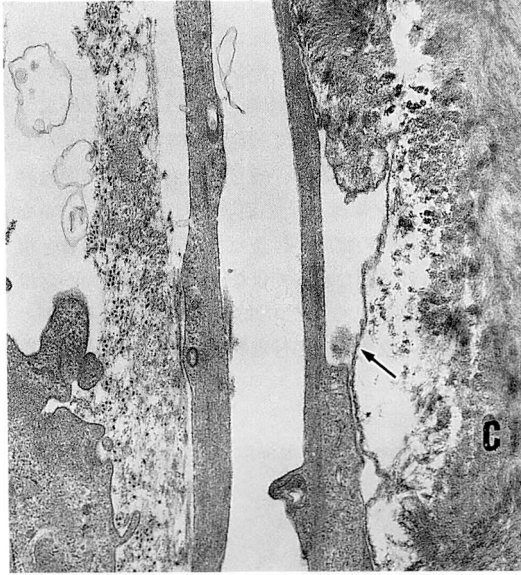


図7 RP群の細胞附着像(6週)
セメント質(C)上の細胞附着状態も図6と同様であるが、無定形物質の一部が根表面から離れている(矢印)。×8,000

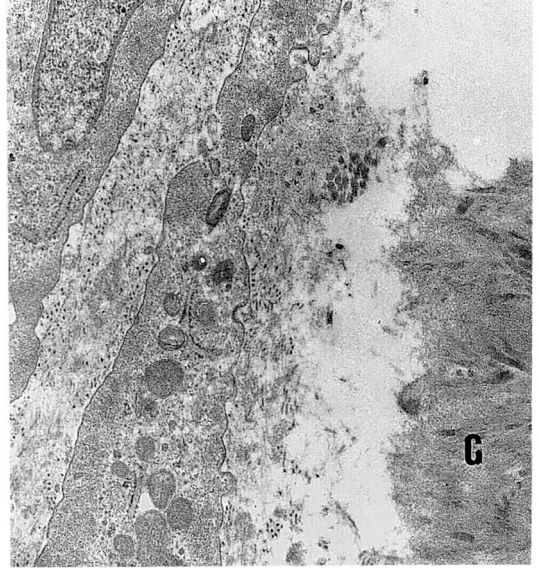


図9 RP+CA群の細胞附着像(6週)
セメント質(C)上の細胞附着状態も図8と同様である。×8,000

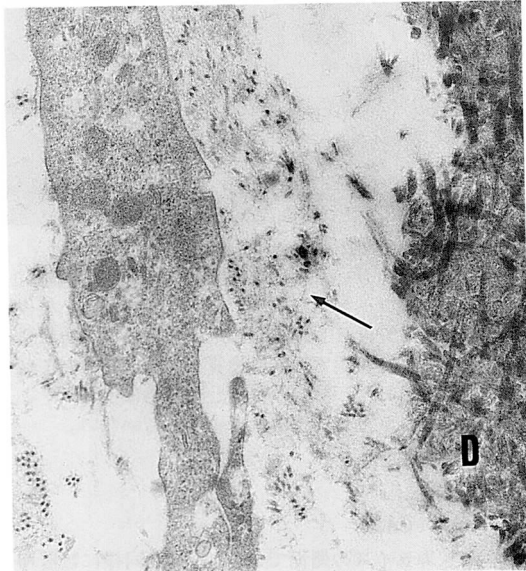


図8 RP+CA群の細胞附着像(6週)
象牙質(D)上に数層増殖した細胞層の間隙とともに、根表面に最も近接した細胞と象牙質の間にもコラーゲン線維が形成されており(矢印)、根表面には無定形物質は見られない。
×10,000

がセメント質でも象牙質でも附着様式に違いは認められなかった。

考 察

歯周疾患罹患歯の露出根表面の化学的、形態学的変化を取り除き、歯周ポケット除去手術で結合組織との再附着および新生セメント質の形成を促進するためには、有効な根面処理が必要である。根面処理の1つである機械的処理に関しては、RPはスケーリングに加えて必須と考えられているが、臨床的には滑沢になるまでRPを行うという目安があるだけで、セメント質の必要除去量を示す基準はない。今回の実験では、前回⁹⁾と同様に滑沢になるまでGracy curetteでほぼ10ストロークのRPを行った。これにより、ほぼ100 μm のセメント質が除去されており、試料のほぼ半数に象牙質の裸出が観察された。

次に、根面に対する化学的処理¹⁰⁻¹⁴⁾については、著者らは根表面の表層脱灰とコラーゲン線維の裸出を目的としてCA処理を選んでいるが、脱灰の効果としては、裸出コラーゲンと新生コラーゲンの連携が生じること、フィブリンが脱灰後の根表面に附着しやすいこと、上皮の深層増殖が抑制できること、線維芽細胞の親和性が良好であることなどが考えられている¹⁵⁾。しかし同処理が新附着形成に役立つという研究と¹⁶⁻¹⁹⁾、歯周組織再生には有効ではないという報告²⁰⁻²²⁾があり、これらを明らかにするために今回の実験を行った

結果, CA による脱灰によってのみ, 根表面と付着細胞との間にコラーゲン線維が少量ながら新たに形成されており, RP+CA 処理の有効性が確認できた。

対照として, cell free の状態で培地中に 6 週間浸漬しておいたルートスライスのセメント質および象牙質表面には, RP 群では無定形物質が連続して観察されたが, RP+CA 群では少量認められるものと認められないものがあつた。この無定形物質は培地由来の血漿性フィブロネクチンの可能性が高く, RP 群と RP+CA 群での違いは, 根表面の性状の違いによりフィブロネクチンの付着部位や付着量が異なるためではないかと考えられる。細胞を付着させた培養実験で RP 群の根表面に見られた無定形物質は, 対照群と同じ血漿性フィブロネクチンあるいは培養細胞による細胞性フィブロネクチンの両方が推察される。細胞が根面に付着するためには, コラーゲン線維, フィブロネクチン等の接着性糖タンパク, プロテオグリカンやフィブリン等の細胞外マトリックスが関与している²³⁾ ことから, RP 群ではフィブロネクチンが, RP+CA 群ではコラーゲン線維がそれぞれ細胞付着の足場になると考えられる。

次に, 根面処理に際して, セメント質の残存と象牙質の裸出のどちらがよいかという疑問に関しては, 細胞の移動と付着²⁴⁾ やセメント芽細胞の分化誘導²⁵⁾ の観点からは脱灰象牙質の方がセメント質より良いという報告と, これとは異なり, 象牙質ではなくセメント質からの抽出物が線維芽細胞の付着を促進する^{26,27)} という報告があり, また臨床的に象牙質知覚過敏を予防するためにも, 非罹患セメント質は保存したほうがよいとも考えられるが, セメント芽細胞の分化誘導に関してはまだ結論を見出すには至っていない。しかし, 細胞付着とコラーゲン線維形成のみに関しては, 今回の *in vitro* の実験では両者に明らかな違いはなく, 脱灰セメント質面でも象牙質面と同様の付着状態を示していた。

以上のことから, RP 後に CA 処理することは *in vivo* でも根表面への新生コラーゲン線維の形成を促進する可能性が示唆された。

結 論

歯周病罹患歯のルートスライスに RP と RP+CA 処理を施し, ヒト歯根膜由来線維芽細胞とともに 6 週間培養し, 細胞付着とコラーゲン線維の形成を検索し, 以下の結果を得た。

1. RP 群では根表面とこれに最も近接した歯根膜由来細胞との間隙は狭く, 細胞は無定形物質を介して付着しており, 細胞と根表面の間にはコラーゲン線維

は形成されていなかった。

2. RP+CA 群では, 根表面に無定形物質はみられず, 根表面に最も近接した細胞との間隙にコラーゲン線維が少量形成されていた。

3. 両群とも根表面がセメント質, 象牙質にかかわらず, 細胞付着やコラーゲン線維形成に違いは認められなかった。

文 献

- 1) Nakib, N.M., Bissada, N.F., Simmelinck, J.W. and Goldstine, S.N.: Endotoxin penetration into root cementum of periodontally healthy and diseased human teeth. *J. Periodontol.* 53, 368-378, 1982.
- 2) Aleo, J. J., De Renzis, F. A., Farber, P. A. and Varboncoeur, A. P.: The presence and biologic activity of cementum-bound endotoxin. *J. Periodontol.* 45, 672-675, 1974.
- 3) Wirthlin, M.R., Pederson, E.D., Hancock, E.B., Lamberts, B.L. and Leonard, E.P.: The hypermineralization of diseased root surfaces. *J. Periodontol.* 50, 125-127, 1979.
- 4) 古宅康久, 栗山正之, 鈴木 賢, 宮下 元, 長谷川絃司: 露出セメント質表層に見られる過石灰化帯のマイクロラジオグラフィによる観察. *日歯保誌* 25, 195-201, 1982.
- 5) 岡本 莫, 東 富恵: 露出セメント質の病的変化とその処置法. *歯科ジャーナル* 26, 29-37, 1987.
- 6) 萩原一宏, 東 富恵, 川西文子, 岡本 莫: 歯周病罹患歯セメント質断面の走査型電子顕微鏡的検索. *広大歯誌* 18, 324-330, 1986.
- 7) 竹本 史, 東 富恵, 川西文子, 谷川昌生, 白石 武, 岡本 莫: 歯周病罹患歯露出根面の透過電子顕微鏡的検索—未処理, ルートプレーニング, クエン酸処理後の形態学的変化—. *日歯周誌* 34, 681-688, 1992.
- 8) 東 富恵, 中西恵治, 岡本 莫: 歯周病罹患歯露出根面への培養細胞付着について. *日歯周誌* 25, 800-805, 1983.
- 9) 大坪 宏, 東 富恵, 竹本 史, 池口直子, 川西文子, 吉野 宏, 岡本 莫: 露出根面処理後の培養細胞付着に関する超微形態学的観察(1). *日歯周誌* 34, 689-694, 1992.
- 10) Frants, B. and Polson, A.: Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline. *J. Periodontol.* 59, 714-721, 1988.
- 11) Wikesjö, U. M. E., Claffey, N., Nilvéus, R. and Egelberg, J.: Periodontal repair in dogs. Effect of root surface treatment with stannous fluoride or citric acid on root resorption. *J. Periodontol.* 62, 180-184, 1991.
- 12) 藤谷百合, 小川哲次, 廣島英雄, 河口浩之, 吉野美穂, 加納利文, 佐藤裕紀, 白川正治, 岡本 莫: フラップ手術後の塩酸脱灰処理歯根面に対

- する結合組織性再付着について. 日歯周誌 34, 446-455, 1992.
- 13) Wirthlin, M. R., Hancock, E. B. and Gaugler, R. W.: Regeneration and repair after biologic treatment of root surfaces in monkeys. *J. Periodontol.* 52, 729-735, 1981.
 - 14) 川西文子, 谷川昌生, 東 富恵, 岡本 莫: 歯周病罹患歯の生物学的処理法の検討—フィブロネクチンの応用—. 日歯周誌 30, 123-132, 1988.
 - 15) Pitaru, S., Gray, A., Aubin, J.E. and Melcher, A. H.: The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment and orientation of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J. Periodont. Res.* 19, 408-418, 1984.
 - 16) Nalbandian, J. and Frank, R.M.: Electron microscopic study of the regeneration of cementum and periodontal connective tissue attachment in the cat. *J. Periodont. Res.* 15, 71-89, 1980.
 - 17) Cole, R.T., Crigger, M., Bogle, G., Egelberg, J. and Selvig, K.A.: Connective tissue regeneration to periodontally diseased teeth. A histological study. *J. Periodont. Res.* 15, 1-9, 1980.
 - 18) Ririe, C.M., Crigger, M. and Selvig, K.A.: Healing of periodontal connective tissues following surgical wounding and application of citric acid in dogs. *J. Periodont. Res.* 15, 314-327, 1980.
 - 19) Frank, R.M., Fiore-Donno, G. and Simasoni, G.: Cementogenesis and soft tissue attachment after citric acid treatment in a human. An electron microscopic study. *J. Periodontol.* 54, 389-401, 1983.
 - 20) Stahl, S.S. and Froum, S.J.: Human clinical and histroic repair responses following the use of citric acid in periodontal therapy. *J. Periodontol.* 48, 261-266, 1977.
 - 21) Nyman, S., Lindhe, J. and Karring, T.: Healing following surgical treatment and root demineralization in monkeys with periodontal disease. *Clin. Periodontol.* 8, 249-258, 1981.
 - 22) Sterrett, J. D., Bankey, T. and Murphy, H. J.: Dentin demineralization. The effects of citric acid concentration and application time. *J. Clin. Periodontol.* 20, 366-370, 1993.
 - 23) 林 利彦: 細胞外マトリックスの成分とその機能. 細胞 21, 3-7, 1989.
 - 24) Pitaru, S., Gray, A., Aubin, J.E. and Melcher, H.: The influence of the morphological and chemical nature of dental surfaces on the migration, attachment, and orientation of human gingival fibroblasts *in vitro*. *J. Periodont. Res.* 19, 408-418, 1984.
 - 25) Aukhil, I., Simpson, DM., Suggs, C. and Pettersson, E.: *In vivo* differentiation of progenitor cells of the periodontal ligament. An experimental study using physical barriers. *J. Clin. Periodontol.* 13, 862-868, 1986.
 - 26) Somerman, MJ., Archer SY., Shteyer, A. and Foster, RA.: Protain production by human gingival fibroblasts is enhanced by guanidine EDTA extracts of cementum. *J. Periodont. Res.*, 22, 75-77, 1987.
 - 27) Somerman, MJ., Foster, RA., Imm, GM., Sauk, J.J. and Archer, SY.: Periodontal ligament cells and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. *J. Periodontol.* 60, 73-77, 1989.