

塩酸テトラサイクリン処理した象牙質移植片周囲の 骨組織形成に関する組織学的研究

劉 牧 菲

A Histologic Study on New Bone Formation around Human Dentine Blocks Treated with Tetracycline-Hydrochloride and Implanted in Rat Maxillae

Lui Mu-Fei

(平成9年2月4日受付)

緒 言

テトラサイクリン類は *Streptomyces aureofaciens* の培養液から分離されたクロルテトラサイクリンを基にして、その側鎖を修飾した化学療法剤である。テトラサイクリン類はグラム陽性菌、陰性菌のいずれにも抗菌性を発揮する。またテトラサイクリン類は嫌気性菌に対しても抗菌性を示すことや歯肉溝滲出液中へ容易に移行することから、歯周病の治療に高頻度に使用されている¹⁻¹⁰。さらに、テトラサイクリン類を歯周病治療に応用した場合、単に歯周局所の細菌を量的および質的に変化させる⁴⁻⁷だけでなく、歯槽骨の再生を誘導することが多くの症例で報告されている⁸⁻¹⁰。

テトラサイクリン類は硬組織代謝に関わる種々の非抗菌作用を有している¹¹⁻²⁴。すなわち、骨芽細胞に対しては、アルカリホスファターゼやコラーゲン産生を促進し、結果として硬組織形成を誘導すると考えられている^{11,13-15}。一方、破骨細胞に対してはその骨吸収を抑制する効果が知られている。硬組織代謝におけるテトラサイクリン類の作用機序としては、破骨細胞あるいは骨芽細胞に由来するコラーゲナーゼの阻害¹⁵⁻¹⁷、破骨細胞が産生する reactive oxygen species を排除しプロエンザイムとして産生されるコラーゲナーゼやゼラチナーゼの活性型への変換の阻害^{17,18}、破骨細胞のシステインプロテアーゼ産生の抑制^{19,20}、脱灰された骨基質コラーゲンの吸収の阻害^{21,22}、破骨細胞刷子縁のプロトンポンプからのプロトンの遊離を阻害

してライソゾームエンザイムの至適 pH を変化させる^{23,24}、酸による骨ミネラル溶解の阻害^{10,22,24}などが報告されている。

一方で、塩酸テトラサイクリンについては脱灰歯根面処理剤としての可能性も検討されている²⁵⁻²⁷。これまでに、脱灰歯根面処理剤としてはクエン酸の使用が報告されており^{28,29}、根面の脱灰によって I 型コラーゲンを根表面に露出させ、結合組織性付着の獲得と同時に上皮の根尖側への移動を防止する³⁰⁻³²と考えられている。また、塩酸による根面処理には脱灰基質中の bone morphogenetic proteins (BMP) をはじめとする石灰化因子の露出が期待できることから、これについての多くの実験的研究も報告されている³³⁻³⁸。塩酸テトラサイクリンによる根面処理では、塩酸に類似した塩酸基による脱灰効果およびテトラサイクリン自身による硬組織の形成促進や吸収抑制の効果が報告されている^{10,11,15}。しかしながら、塩酸テトラサイクリンが局所において歯周組織の再生にどのような効果を及ぼすかについては依然不明な点が多い。

本研究では塩酸テトラサイクリンが局所において歯周組織の再生、とりわけ硬組織再生にどのような効果を及ぼすかを明らかにする目的で、ラット抜歯窩に塩酸テトラサイクリン処理した象牙質片を移植し、移植片周囲の反応を組織学的に検索した。

材料ならびに方法

I. 移植材料

移植材料は歯周病罹患ヒト抜歯より作製した。抜きした歯は直ちに生理食塩水で洗浄後 -70°C で凍結保存した。移植象牙質片を分離・整形する前に、歯根

面のプラーク除去、スケーリングおよびルートプレーニングを手用器具で行った。歯根部から歯科用タービンを用いて注水下で1×1×3 mmの象牙質片を分離・整形した。整形した象牙質片をペニシリン G (明治製菓, 10万単位/ml) 含有の生理食塩水 (PBS) で4°C, 48時間処理した。その後, 塩酸テトラサイクリン (200 mg/ml, pH 1.6, 片山化学社製), 塩酸 (0.3 N, pH 0.7), クエン酸 (pH 1.0) あるいは PBS で室温下にて5分間処理した。その後, 試料を PBS で洗浄した。洗浄は洗浄液の pH が中性になるまで繰り返した。塩酸テトラサイクリンで処理した象牙質片 (TC), 塩酸で処理した象牙質片 (HA), クエン酸で処理した象牙質片 (CA) および PBS で処理した象牙質片 (コントロール) を移植材料とした。

II. 移植方法

移植対象動物として8週齢, ウィスター系雄性ラット100匹を用いた。ペントバルビタール・ナトリウム (ネンプタール®, 大日本製薬社製) の腹腔内麻酔下で上顎左右第一臼歯周囲の歯肉全層弁を開き近心根を分割抜去した後, 120号のリーマーによって抜歯窩を拡大し, 歯周靭帯組織を機械的に除去して移植床とした。左右の移植床に異なる処理を施した象牙質片を移植し, 全層弁を縫合した。

III. 組織標本作製法

象牙質片移植後の3, 7, 14, 28, 56日目に深麻酔下でラットから象牙質片移植部を含む組織を摘出し, 直ちに10%中性ホルマリンで固定した。試料の一部を蟻酸・クエン酸混合液で脱灰し, 脱水後パラフィンに包埋した。移植象牙質片の長軸に平行で矢状方向の切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を施した後に光学顕微鏡観察および組織学的計測を行った。残りの試料は非脱灰試料としてポリエステル樹脂 (リゴラック®, 日新 EM 社製) に包埋した。樹脂が硬化した後に, 移植象牙質片の長軸に平行で矢状方向に厚さ 30~50 μm の研磨標本作製した。

IV. 組織学的計測法

組織計測は, 各群の各観察期間5個体よりそれぞれ切片を抽出し, 顕微鏡画像解析装置 (オリンパス社製) および Image grabber PCI (Neotech 社製) を用いて以下の項目について計測した。

1. 象牙質片周囲の炎症細胞数

図1に示す範囲に存在した好中球とリンパ球数を数えることによって移植象牙質片周囲の炎症の程度を評価した。炎症の程度は浸潤細胞数に従って以下のスコ

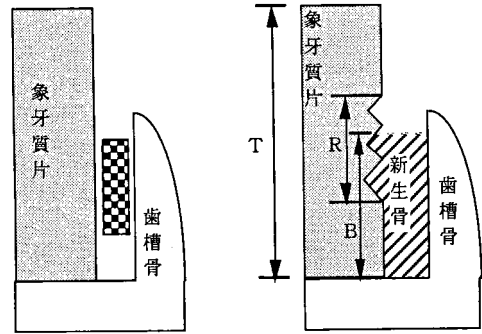


図1 組織学的計測部位。

象牙質片周囲の炎症細胞数の測定部位 (左) と, 象牙質片と新生骨組織とのアンキローシスの割合, および象牙質片の吸収の割合 (右) を示す模式図。

■炎症細胞測定部位, T: 象牙質片の長軸の全長, B: 象牙質片と新生骨組織が直接結合していた長さ, R: 象牙質片の吸収の観察された長さ。

アに分類した。すなわち, 計測範囲に細胞浸潤がなかったものを0, 計測範囲の浸潤細胞数が1以上10未満のものを1, 10以上30未満を2, 30以上を3とした。

2. 象牙質片と新生骨組織とのアンキローシスの割合および象牙質片の吸収の割合

象牙質片と新生骨組織とが癒着するいわゆるアンキローシスの割合および象牙質片の吸収の割合は, 象牙質片の長軸について象牙質片と新生骨組織が直接結合していた長さを B, 象牙質片の吸収の観察された長さを R, として象牙質片の長軸の全長 (T) に対する百分率で表した。すなわち,

$$\text{象牙質片と新生骨組織とのアンキローシス (\%)} = (B/T) \times 100$$

$$\text{象牙質片の吸収 (\%)} = (R/T) \times 100$$

とした。

V. 蛍光顕微鏡観察

非脱灰研磨標本を透過型蛍光顕微鏡 (オリンパス社製) を用いて 380~490 nm の波長の BV 励起で観察した。

VI. マイクロラジオグラム観察

藤田の方法³⁹⁾に従って観察した。すなわち, 研磨標本に軟エックス線発生装置 (Sofron SRO-M50, 綜研社製) から 15 kV, 4 mA の軟エックス線を焦点間距離 5 cm で3分間照射し, 撮影を行った。撮影用フイ

ルムには Spectroscopic Safety Film Type 649-1 (Kodak 社製) を用いた。

Ⅶ. 統計処理

組織計測後の統計処理は、2元および3元の分散分析によって行った。

結 果

Ⅰ. 脱灰標本による組織学的観察結果

移植後3日

TC 表面には脱灰によって生じたとみなされるエオジン好染色性の層が観察された (図 2a), TC 周囲には炎症細胞浸潤はほとんど認められず, 幼若な肉芽組織が形成されていた (図 2a)。一方, HA 周囲には, 多くの好中球が浸潤していた (図 2b)。CA では, フィブリンネットワークの存在 (図 2c), コントロールでは好中球を主体とした炎症細胞浸潤が認められた (図 2d)。

移植後7日

TC 表面にはしばしば類骨組織が認められ, 一部では新生骨組織が形成されていた。これらの組織と TC との境界はヘマトキシリンに濃染していた (図 3a)。HA 周囲では, 依然として好中球主体の炎症細胞が浸

潤していた (図 3b)。CA は肉芽組織で囲まれており, 一部に象牙質が吸収されている像が観察された (図 3c)。コントロール周囲では, なおも好中球を主体とする炎症細胞が浸潤していた (図 3d)。

移植後14日

TC では, 多くの標本で象牙質片の周囲に新生骨が形成され, 象牙質片の吸収を伴わない象牙質片と新生骨とのアンキローシスが観察された (図 4a)。その境界部は術後7日目におけると同様に, ヘマトキシリンに濃染していた。HA, CA, コントロールは, いずれも肉芽組織で取り囲まれていた (図 4b, c, d)。CA (図 4c) およびコントロール (図 4d) では, 象牙質片表面に多くの吸収像が観察された。

移植後28日

TC では象牙質片の吸収を伴わない新生骨とのアンキローシスが広範囲に存在した (図 5a)。HA と新生骨組織との間には線維性の結合組織が認められた (図 5b)。CA でも, 周囲に線維性の結合組織が存在し, 線維束は象牙質表面に平行に走っていた (図 5c)。また, コントロールにおいても, 象牙質片は線維性結合組織で囲まれ, その表面の大部分が吸収されていた (図 5d)。

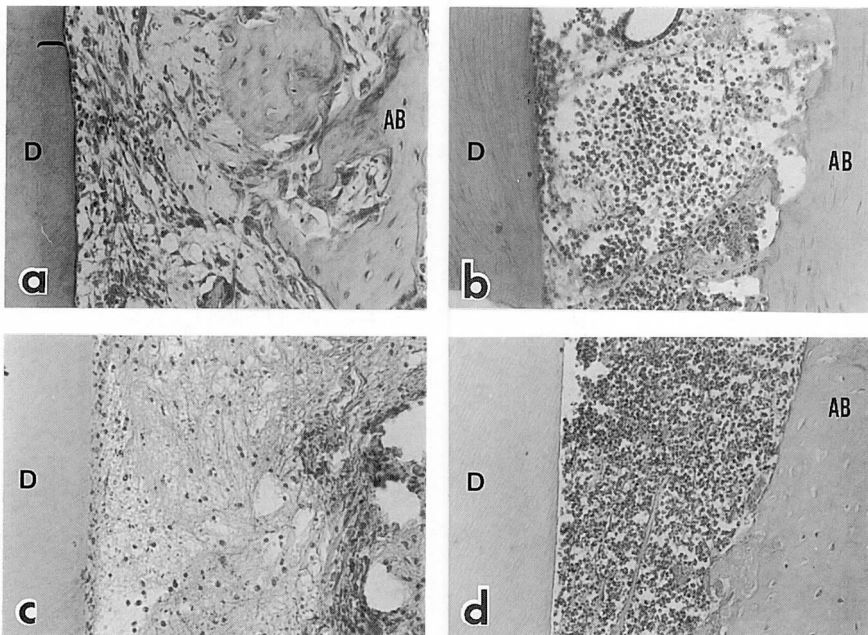


図2 移植後3日の光顕像。

a: TC 群, b: HA 群, c: CA 群, d: コントロール群。TC 周囲には幼若な肉芽組織が形成されている。TC 表面はエオジン好染色性を示す (鈎括弧)。HA およびコントロール群では好中球主体の炎症細胞浸潤, CA 群ではフィブリンネットワークが認められる。D: 象牙質片, AB: 歯槽骨 ×150, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色。

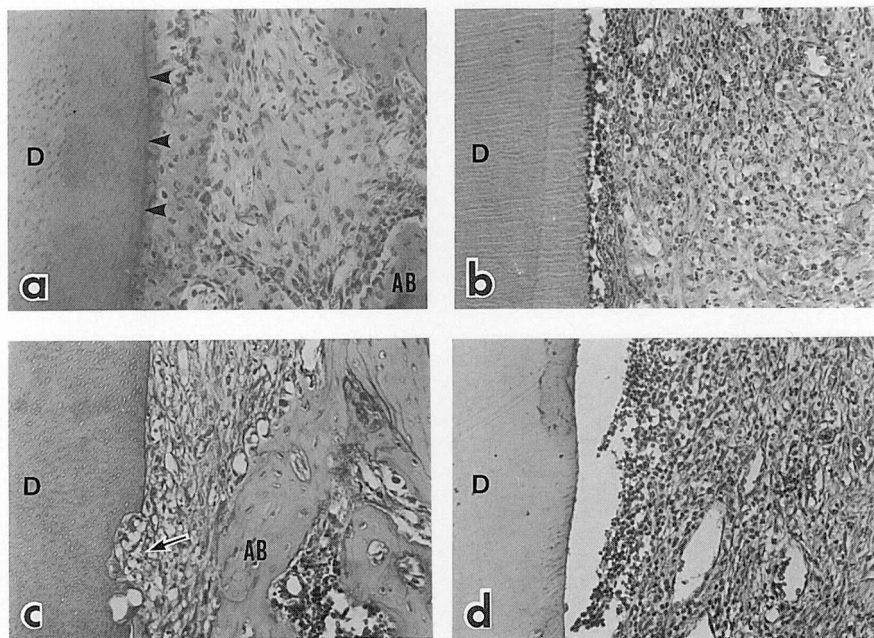


図3 移植後7日の光顕像。

a: TC群, b: HA群, c: CA群, d: コントロール群. TC表面には類骨および骨組織が形成されており, その境界はヘマトキシリンに濃染している(矢頭). HAおよびコントロール群では好中球主体の炎症細胞浸潤, CA群では肉芽組織が移植片周囲に認められ, CA表面は一部吸収されている(矢印). D: 象牙質片, AB: 歯槽骨 ×150, HE染色.

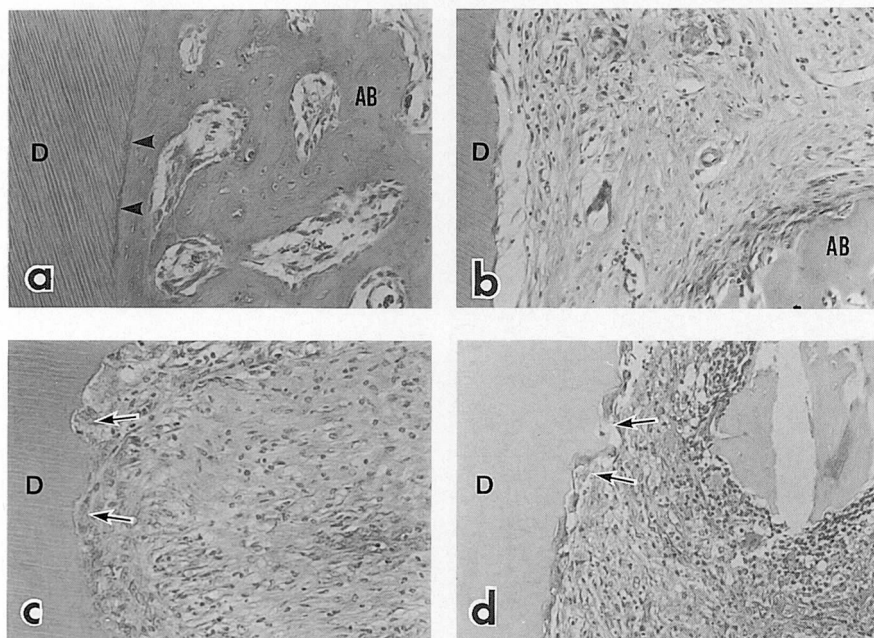


図4 移植後14日の光顕像。

a: TC群, b: HA群, c: CA群, d: コントロール群. TCと新生骨はヘマトキシリンに濃染する層を介して結合している(矢頭). HA, CA, コントロール群は肉芽組織で取り囲まれている. CA, コントロール群の象牙質表面は吸収されている(矢印). D: 象牙質片, AB: 歯槽骨 ×150, HE染色.

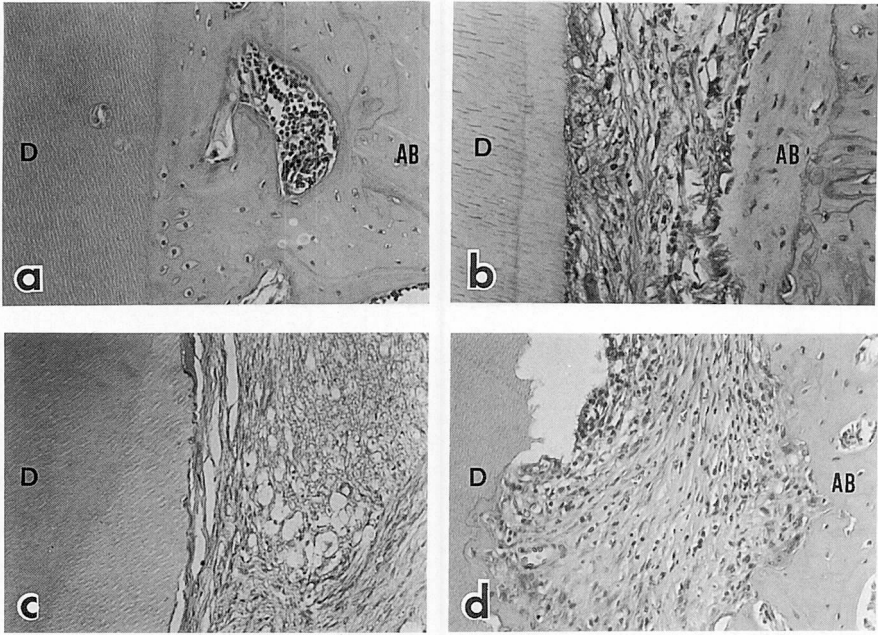


図5 移植後28日の光顕像。

a: TC 群, b: HA 群, c: CA 群, d: コントロール群. TC 群では吸収を伴わない象牙質片と新生骨とのアンキローシスがみられる. HA, CA, コントロール群では周囲には線維性結合組織が形成されている. D: 象牙質片, AB: 歯槽骨 ×150, HE 染色.

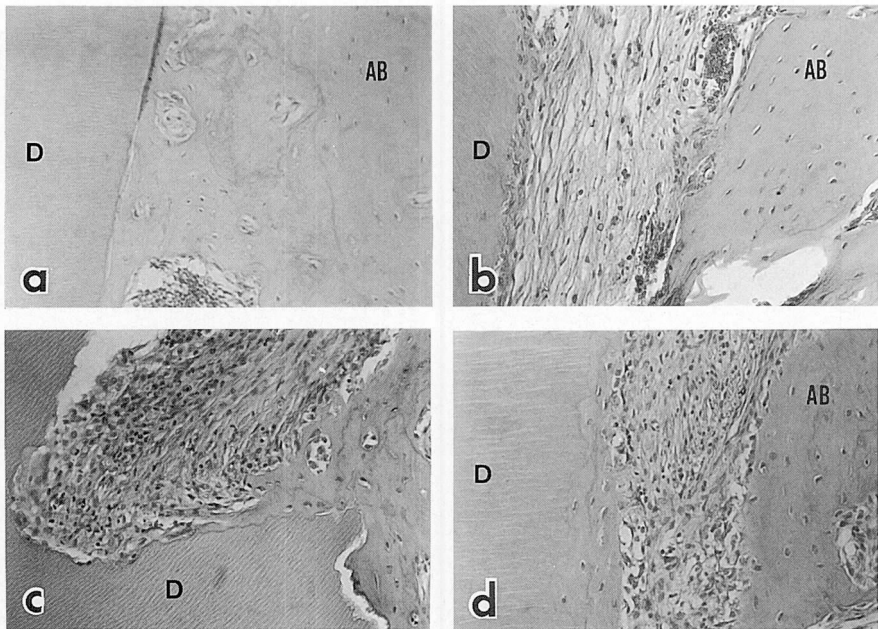


図6 移植後56日の光顕像。

a: TC 群, b: HA 群, c: CA 群, d: コントロール群. TC 群では吸収を伴わない象牙質片と新生骨が直接結合している. HA 表面には骨組織が形成され, その周囲には線維性結合組織が認められる. CA, コントロール群では吸収された象牙質周囲に線維性結合組織がみられるが, 象牙質表面の一部に骨組織も形成されている. D: 象牙質片, AB: 歯槽骨 ×150, HE 染色.

移植後56日

TC では、なおも吸収を示さない象牙質片と新生骨組織が直接結合していた (図 6a)。HA では、多くは移植後28日目と同様に線維性結合組織に取り囲まれていたが、HA 表面には骨組織が形成されていた (図 6b)。CA (図 6c) およびコントロール (図 6d) では、吸収された象牙質片に新生骨組織が癒着してアンキローシスを呈している部位と、線維性結合組織が接している部位が混在していた。

II. 組織学的計測結果

象牙質片周囲に浸潤した炎症細胞数は、移植後3日目のTCで他の3群と比べて有意に少なかった (図7)。象牙質片と新生骨とのアンキローシスの割合は、TCが他の3群すべてに対して有意に高い値を示した

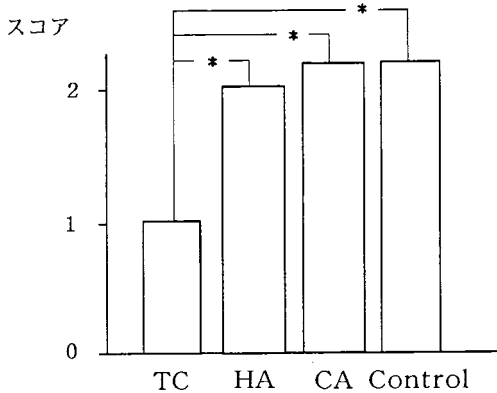


図7 移植後3日目の象牙質片周囲に認められた炎症細胞数の評価。
*: p<0.001

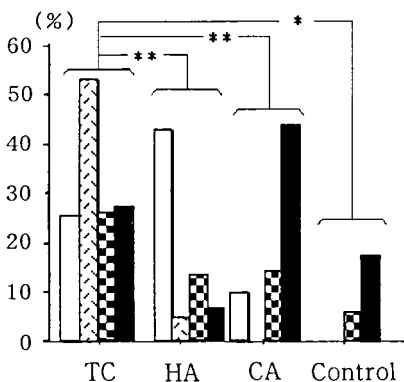


図8 象牙質片と新生骨とのアンキローシスの割合。
移植後: □7日, ▨14日, ▩28日, ■56日
*: p<0.001, **: p<0.05

(図8)。一方、移植象牙質片の吸収の割合は、TCで最も低く、ついでHA, CA, コントロールの順に高くなっていった (図9)。

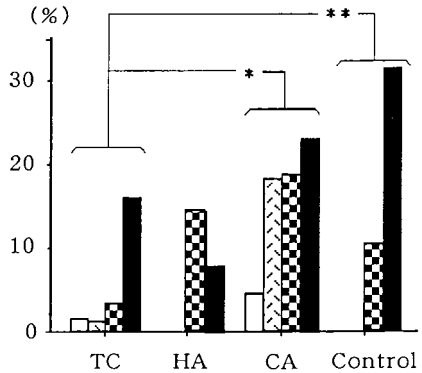


図9 象牙質片の吸収の割合。
移植後: □7日, ▨14日, ▩28日, ■56日
*: p<0.001, **: p<0.05

III. 蛍光顕微鏡観察結果

移植後3日目のTCでは、象牙質片辺縁部にテトラサイクリンの蛍光発色像が確認された。また、この発色は移植片の周囲組織にも観察された (図10a)。移植後14日 (図10b)、28日 (図10c)、56日 (図10d) においても依然として象牙質表面と周囲組織に蛍光の発色が認められた。一方、HA, CA およびコントロールでは発色像はみられなかった。

IV. マイクロラジオグラム観察結果

移植象牙質片周囲の石灰化の程度をマイクロラジオグラムによって評価した。移植後7日目のTCでは、象牙質片と歯槽骨との間に網目状のエックス線不透過像が存在し、このエックス線不透過像は象牙質および骨組織と連続していた (図11a)。一方、同時期のCAでは象牙質片と歯槽骨との間にエックス線透過性の部分が介在していた (図11b)。移植後28日のTCでは象牙質と歯槽骨とはエックス線不透過像として連続し、エックス線不透過性も充進していた (図11c)。一方、CAでは移植象牙質片表面に不規則なエックス線透過像が観察された (図11d)。

考 察

1. 実験方法について

テトラサイクリン類はその抗菌スペクトラムや体内動態から抗菌剤として歯周病の治療に頻用されている¹⁻¹⁰⁾。しかし、テトラサイクリン類は抗菌作用だけでなく非抗菌作用として硬組織代謝に種々の影響を

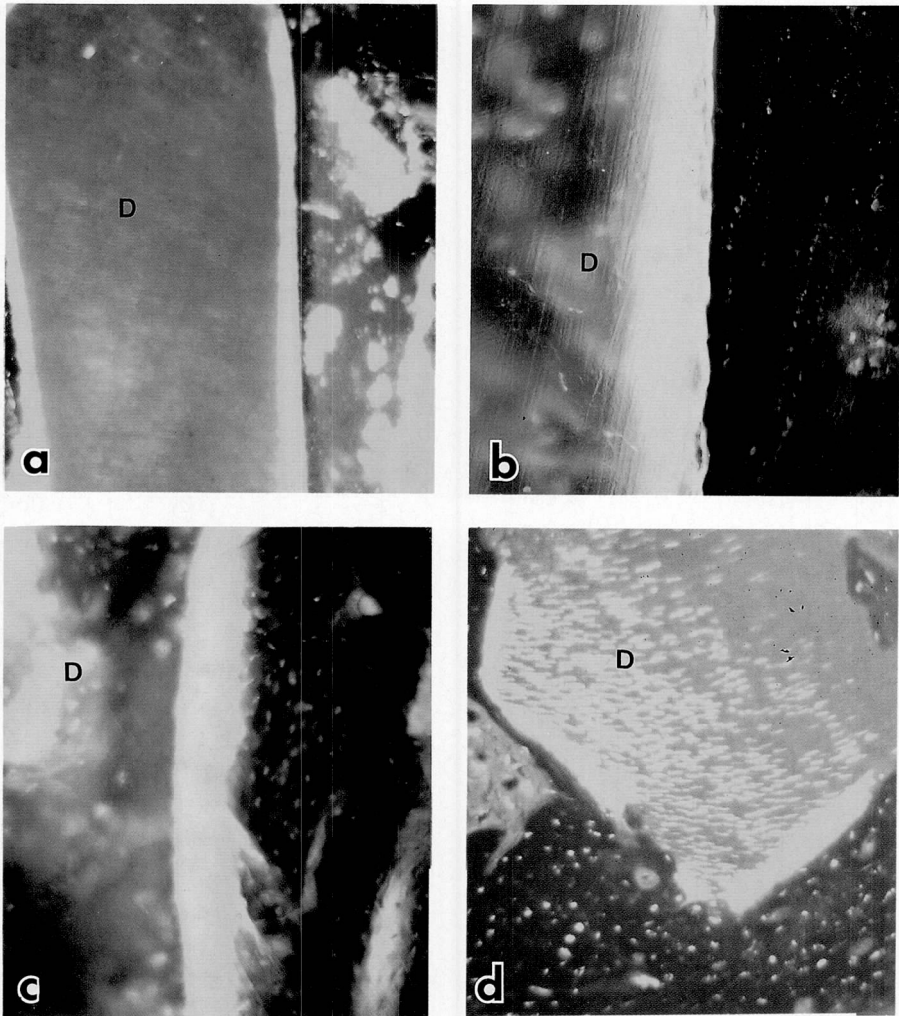


図10 TC 移植後の蛍光顕微鏡像。

a: 移植後3日, b: 移植後14日, c: 移植後28日, d: 移植後56日. 移植後3日で TC 辺縁部と周囲組織にテトラサイクリンによる蛍光の発色が認められる. 移植後14, 28, 56日においても TC 辺縁部と周囲組織に発色が認められた. D: 象牙質片 a; $\times 42$, b, c; $\times 150$, d; $\times 42$, HE 染色.

与える¹¹⁻²⁴). 本研究ではテトラサイクリン類の硬組織代謝に対する作用に注目して, 塩酸テトラサイクリンを歯根面処理剤として利用した場合に歯槽骨の再生にどのような効果を及ぼすかを, ラット歯槽骨へのヒト象牙質片の移植実験によって検討した。

本研究は異種他家移植実験であるが, これまでに報告されたヒト象牙質片のラット背部軟組織への移植実験によると, ラットはヒト象牙質片に対して移植片拒絶反応をほとんど起こさない⁴⁰). 本研究でも, マクロファージやリンパ球の浸潤を特徴とする移植片拒絶反応はほとんど観察されなかった。また, 線維性の被包化も認められず, 異物排除機構も働いていないと考え

られる。また, それぞれの群で程度の差は明らかにあるものの, 4種類の象牙質片処理のいずれにおいても, 移植象牙質片と新生骨組織が直接的に結合している像が観察され, ラットを用いたヒト象牙質移植の実験系が周囲の組織反応を検討するうえで有用であると考えられた。Polson らの実験⁴⁰)はラット背部皮下組織に歯根を移植して結合組織の付着をみたものであるが, 本研究では象牙質片を歯槽骨へ移植し, 移植象牙質片周囲の歯槽骨の反応を検討したもので, 実際の歯周病治療に近い実験系として応用性が高いと考える。また, 用いたヒト歯周病罹患抜去歯についても実際の歯周病治療を想定して, 前処置として歯周病罹患抜去

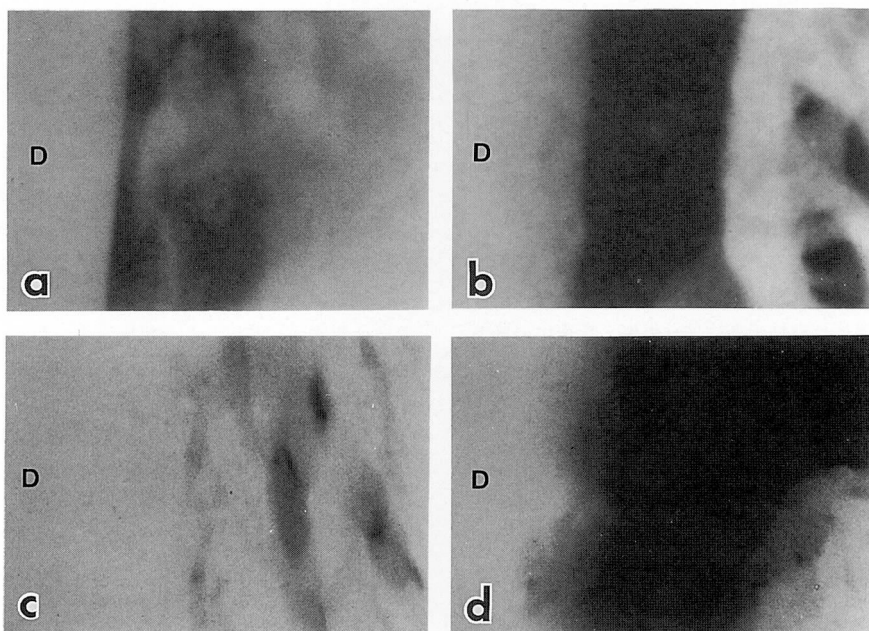


図11 マイクロラジオグラム像。

a: 移植後7日のTC群. 象牙質片と歯槽骨の間に網目状のエックス線不透過像が認められる. b: 移植後7日のCA群. 象牙質片と歯槽骨の間にエックス線透過性の部分が介在している. c: 移植後28日のTC群. 象牙質片と歯槽骨はエックス線不透過像として連続している. d: 移植後28日のCA群. 象牙質片表面に不規則なエックス線透過像が認められる. D: 象牙質片 ×150, HE 染色.

歯の根表面のスクーリング, ルートプレーニングを行った。さらに, 歯根部象牙質から $1 \times 1 \times 3$ mmの象牙質片を切り出して整形した。これらの機械的な前処置によって, 移植片表面には歯周病原性細菌はほとんど存在していないと考えられる。また, 移植片を分離・整形した後にペニシリンGによって移植片を処理し, 移植片に存在する細菌は可及的に殺菌した。従って, 本研究結果は, 歯周病罹患歯を実際に治療した後に想定される反応に近いと考えられる。すなわち, 歯根面のスクーリング, ルートプレーニングおよび塩酸テトラサイクリン処理を行なうことによって, 術後の炎症の抑制が十分に可能であることが示唆された。特に外科的な歯周病処置の際には歯根面に化学的に結合する能力のあるテトラサイクリン類による歯根面処理が術後の炎症の抑制に有効であろう。

歯根面処理に用いる酸の濃度や作用時間の至適条件については, クエン酸, 塩酸いずれについても報告がある^{32,36,37}。本研究では, クエン酸については結合組織性新附着の獲得効果が最も優れていると言われているpH1.0³⁷を, また塩酸については新生セメント質形成量が最も多いと報告された0.3規定³⁶を使用した。従って, 使用した酸のpHは統一しなかったが, 基本的にはそれぞれの酸に特徴的な組織反応が起こり

pHの差による影響は少ないと考える。本研究では薬剤処理した象牙質片は十分洗浄した後に移植されたもので, 薬剤のpHは象牙質処理の効果には影響しても, 移植後の象牙質片周囲の組織反応にはほとんど影響を与えなかったものと推察される。しかし, 脱灰根面処理に使用する薬剤のpHは生理的範囲にはないので, 臨床的に用いた場合には, 周囲組織に対して細胞, 分子レベルでの影響があるものと考えられる。

歯周病によって破壊された歯周組織の生理的な再生には, セメント質, 歯槽骨および歯周靭帯が揃って再生されなければならない。本研究では, 歯周靭帯を除去して実験系を単純化し, 象牙質処理に用いた薬剤および処理された象牙質が歯槽骨の再生にどのような効果を示すかを検討したものである。従って, 本研究では歯周靭帯に由来する未分化間葉系細胞の反応を評価していないので, 歯周組織再生について全面的に議論することはできないが, 歯槽骨の再生に限って言えば, 塩酸テトラサイクリンを根面処理剤として応用した場合, 歯根表面に結合した塩酸テトラサイクリンが軟組織を通して分散し歯槽骨の骨芽細胞を刺激することによって, 歯根表面への硬組織形成が促進される可能性が示唆された。おそらく, 歯周靭帯を残した実験系であっても本研究結果と類似の反応が起こると推察

されるが、その場合、歯根表面にセメント芽細胞が先に遊走するか、骨芽細胞が先に遊走するかによって歯根表面上に形成される組織が異なるものと予測される。

2. 炎症反応の抑制効果について

術後の移植象牙質片周囲の炎症の程度を浸潤している炎症細胞の数で評価したが、術後3日目のTC周囲の炎症は他の3群に比較して有意に少なかった。術後の炎症の原因には移植手術に伴う外傷、手術中の細菌感染および移植象牙質片を処理した薬剤の影響が考えられる。このうち、移植手術に伴う外傷性の炎症と細菌感染の可能性は、いずれの薬剤で処理した移植片の場合でも同等と考えられるが、TC群で術後の炎症は特に軽度であり、塩酸テトラサイクリンがこの2つの原因に対して有効であったと推察される。また、いずれの群の象牙質片もペニシリンG処置をしているが、その後の酸処理、洗浄処置によって象牙質片移植時にはペニシリンGの抗生物質としての働きはほとんど無くなっていたと考えられる。テトラサイクリン類はキレート剤として働き、硬組織中の2価の陽イオンと結合する²⁰⁾。本研究で用いた塩酸テトラサイクリンは象牙質片の表面に結合していたことが蛍光顕微鏡観察で確認されていることから、塩酸テトラサイクリンは移植後に、象牙質表面から周囲の組織中に分散して抗炎症作用を及ぼしたものと推察される。比較のために他の抗生物質を実験系に加える必要があったかもしれないが、今回の実験のプロトコールからすると、コントロールとしたPBS処理はペニシリンG処理後PBSで洗浄したのみであるので、これをペニシリンG処理象牙質片とみなすこともできる。従って、使用する抗生物質に象牙質との化学的な結合能力がない限り、抗生物質を象牙質片処理剤として用いても術後の炎症に対する効果はコントロールとほぼ同じであったと推察される。HA群、CA群にはpHの低い酸を用いたが、術後の炎症はPBS処理したコントロール群と大差が無いことから、酸処理後のPBS洗浄によって酸の影響は軽減されていたと考えられる。

3. 骨形成の促進および象牙質片吸収の抑制効果について

TC群では象牙質片と新生骨組織とのアンキローシスが他の3群に比較して有意に多かった。このことは、TC周囲で早期に多くの骨再生が起こったことを表わしている。マイクロラジオグラムによる観察の結果によると、塩酸テトラサイクリンで処理した象牙質片周囲の新生骨組織は、術後28日目で高いエックス線

不透過性を示し、移植時に存在していた歯槽骨と同程度の石灰化が早期に起こったと考えられる。歯根表面を塩酸で処理した場合に、根表面にBMPの露出が期待できる³⁵⁻³⁸⁾。本研究の結果、TC群の場合もHA群と同様の脱灰層が組織学的に観察された。おそらく、塩酸テトラサイクリンの塩酸基が塩酸テトラサイクリンから分離して、塩酸と同じように移植象牙質片に作用してBMPを露出させたと考えられる。その結果、早期に骨芽細胞が塩酸テトラサイクリン処理された象牙質表面に遊走し、骨組織形成を開始したものと考えられる。さらにTC群の場合は塩酸基の作用の他にテトラサイクリン自身の骨組織代謝への作用が加わったと考えられる。テトラサイクリン類は骨芽細胞に対してアルカリホスファターゼやコラーゲンの産生を促進することが知られている^{11,13-15)}。蛍光顕微鏡観察によって塩酸テトラサイクリンの分布を調べた結果、テトラサイクリンによる蛍光は象牙質片移植後3日目に既に移植片周囲の歯槽骨にも観察された。テトラサイクリン類はB環の12位のハイドロキシル基とC環の11位のカルボニルとの間で2価の陽イオンとキレートを形成する²⁰⁾。象牙質片表層の2価の陽イオンとキレートを形成して結合していた塩酸テトラサイクリンは、移植後に濃度勾配に従って周囲組織に分散し歯槽骨表面の2価の陽イオンとキレートを形成したものと考えられる。また、テトラサイクリンの蛍光が新生骨組織にも観察されたことからテトラサイクリンは長期間にわたって継続的に移植象牙質片から分散したものと推測される。歯槽骨に移行した塩酸テトラサイクリンは歯槽骨に近接する骨芽細胞に作用して骨組織形成を促進し、また、TC表面に遊走してきた骨芽細胞に対しては、TC表面に存在する塩酸テトラサイクリンが作用して骨組織形成が促進されたと推測される。

象牙質片の吸収に関しては、その主役である破歯細胞に対する根処理剤の作用が推察される。一般に、歯を再植あるいは移植した後はアンキローシスや歯根吸収あるいは置換性歯根吸収が起こる⁴¹⁾。アンキローシスは歯根と歯槽骨との骨性癒着である。また置換性の歯根吸収は歯根が継続的に吸収され、その後に歯槽骨が再生してくる。しかし、置換性歯根吸収の場合、根面と歯槽骨の直接的な結合はなく、歯根吸収と歯槽骨形成が継続的に起こっている。TC群では、吸収を伴わない象牙質片と新生骨組織とのアンキローシスが多く観察された。TC群の場合に象牙質吸収がほとんど観察されなかったのは、破歯細胞による象牙質の吸収が塩酸テトラサイクリンによって抑制されたことによると考えられるが、破歯細胞に対するテトラサイク

リン類の作用を研究した報告はない。しかし、破歯細胞による歯の吸収は破骨細胞による骨の吸収と類似している^{42,43}ことから、テトラサイクリン類は破骨細胞に対する阻害機序、すなわちコラゲナーゼやゼラチナーゼの阻害など、と同様の機序で破歯細胞による象牙質片の吸収を阻害したものと推察される。

4. 吸収を伴わない象牙質片と新生骨とのアンキローシスについて

吸収を伴わない象牙質片への新生骨組織の添加は、前述した様に象牙質片表面から周囲に形成される場合と既存の歯槽骨から形成され象牙質表面に接触する場合の2通りが考えられる。骨組織の形成、再生過程において骨組織が既存の基質や材料に接する状態が多く認められる。骨のリモデリング時には、再生骨は既存の骨と cement line と呼ばれる境界構造を形成して接する⁴⁴。また、軟骨性骨化時には、骨組織に接する石灰化軟骨との界面には lamina limitans が存在している⁴⁵。近年、免疫細胞化学的検索によって、cement line や lamina limitans などに代表される硬組織の界面には、オステオポンチンや骨シアロプロテイン等の非コラーゲン性の骨蛋白が豊富に存在していることが明らかとなった⁴⁶。さらに、これらの蛋白は骨と直接結合すると言われている人工骨移植材と新生骨の界面にも豊富に存在していることが報告された^{47,48}。これらのことより、オステオポンチンや骨シアロプロテイン等の非コラーゲン性骨蛋白が、基質と基質、あるいは基質と移植材の接着に重要な役割を演じている可能性が示唆される⁴⁹。本研究では免疫染色法による観察は行っていないが、新生骨組織が象牙質片に結合する場合も前述した場合と同様の構造物で象牙質片表面に界面を形成して接している可能性が高いと考えられる。

5. テトラサイクリン処理の臨床応用について

これまでに、歯周療法に際しての種々の根面処理法が提唱されている⁵⁰。根面処理法は大きく分けて、生物学的活性因子を根面に塗布する方法と歯根面を脱灰する方法に分けられる。前者の代表例はフィブロネクチンを根面に塗布する方法である⁵¹。フィブロネクチンはコラーゲンや細胞表面上の接着分子と結合することによって歯根表面にコラーゲンや歯周靭帯由来の未分化間葉系細胞の生理学的な付着を促進し歯周組織の再生を誘導することを目的としている。一方、脱灰根面処理法は歯根面の無機質を脱灰によって除去し、象牙質中の有機物を露出させて、その中の再付着に有用な物質を利用しようとするものである。本研究では、酸による脱灰根面処理法について比較検討したが、酸

による脱灰が起こっても、その後の反応は使用した酸の種類で大きく異なっていた。CA 群は象牙質の吸収あるいは新生骨組織の結合のいずれにおいてもコントロール群とほとんど差がなく、歯周組織における骨組織の再生という観点からするとクエン酸の歯根面処理は必ずしも有効な処置とは言えない。一方、HA 群はコントロール群と比較すると象牙質の吸収が少なく、またアンキローシスも多く認められる傾向を示し、塩酸による歯根面処置は骨組織再生という点からは有意義な処置と考えられる。塩酸テトラサイクリンによる根面処理の場合は、単に根表面の脱灰だけでなくテトラサイクリンそのものの骨代謝に対する作用も大きく作用し、歯根面からの徐放性のある local drug delivery と同じように機能しているとも解釈できる。

テトラサイクリン類の骨代謝に及ぼす作用は、テトラサイクリン類の分子中の抗菌作用に関わる部位とは異なった部位によることが、chemically modified tetracyclines (CMTs) を用いた研究によって確かめられている²⁰。CMTs はテトラサイクリンから合成された化学誘導体で、CMT-1 から CMT-10 まで報告されている。CMT-5 以外の CMTs は、コラゲナーゼやゼラチナーゼなどの matrix metalloproteinases (MMPs) を抑制する²⁰。このような抗菌性を示さない CMTs については関節炎などの全身疾患に対する治療薬としての使用が検討されている⁵²。また、歯周病についても、CMT-1 が *Forphyromonas gingivalis* によって誘導されるラットの実験的歯周炎において骨吸収を抑制することが判明している^{53,54}。CMT-1 は MMP inhibitor として歯周組織破壊を抑制し、結果的に歯周組織再生が強調され歯周炎の進行を抑えるものと考えられる。

塩酸テトラサイクリンによる根面処理を臨床応用する場合、歯周組織再生外科療法として注目されている guided tissue regeneration 法 (GTR 法) との併用が考えられる。この場合、歯槽骨の再生が促進されることが推測されるが、歯周ポケットの歯頸部寄りの部位では歯周靭帯が破壊されていてセメント芽細胞へと分化する未分化間葉系細胞が少ないため、近接する歯槽骨由来の骨芽細胞の遊走が早く起こり、歯槽骨と根面象牙質との間でアンキローシスを生じる危険性がある。今後、window 形成法などの歯周靭帯を残した実験方法によって塩酸テトラサイクリン処理した歯根面にどのような反応が起こるかを検討し、手技の確立を目指す必要がある。

総 括

本研究ではテトラサイクリン類の硬組織代謝に対する非抗菌作用に注目して、塩酸テトラサイクリンを歯

根面処理剤に用いた場合の歯槽骨再生への効果を、塩酸テトラサイクリン処理象牙質片のラットの歯槽骨への移植実験によって検討し、以下の結果を得た。

1. 移植後3日の象牙質周囲の炎症細胞浸潤は、他の3群と比較しTC群で有意に少なかった。移植後7日では、TC周囲の一部に象牙質片の吸収を伴わない新生骨とのアンキローシスが観察された。HA, CAおよびコントロール周囲には一般に肉芽組織が接し、CAおよびコントロール群では象牙質の吸収が多発した。TC群の象牙質片の吸収を伴わない新生骨とのアンキローシスは、移植後56日においても存続していた。

2. 組織計測の結果、TC群ではアンキローシスが他の3群と比較して有意に大きい割合を占めていた。一方、象牙質片の吸収はTC群で最も少なく、CA群とコントロール群に対して有意差を認めた。

3. テトラサイクリンによる蛍光は象牙質表層に長期間にわたって観察された。また、移植象牙質片周囲組織にも早期にその蛍光が観察され、さらに移植象牙質周囲に新生された骨組織にも存在していた。

4. TC群における移植片周囲の新生組織は、マイクログラフで強いエックス線不透過像を示し、移植象牙質片と緊密に接していた。

以上の結果より、塩酸テトラサイクリンの歯根面処理への応用は、術後の炎症および歯根面の吸収抑制と周囲への骨組織形成促進に有用であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の御指導および御校閲を賜りました本学歯科保存学第二講座栗原英見教授ならびに前本学歯科保存学第二講座教授岡本莫名誉教授に衷心より感謝の意を表します。本論文作成に際してそれぞれ御専門の立場から御教示ならびに御校閲を賜りました本学口腔病理学講座二階宏昌教授ならびに本学口腔解剖学第二講座内田隆教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究遂行上および本論文作成上、御指導、御助言を頂いた本学歯科保存学第二講座小川哲次講師、河口浩之博士および吉野宏博士に心から感謝の意を表します。さらに、本研究を遂行する上で、御指導、御協力して頂いた本学歯科放射線講座藤田實助教授、本学予防歯科学講座笹原妃佐子博士、本学歯科補綴学第一講座の方々ならびに本学歯科矯正学講座の方々に深謝いたします。最後に本研究を進めるに際し、多大なる御支援をいただいた本学歯科保存学第二講座の関係各位に感謝いたします。

文 献

- 1) Lowenguth, R.A., Chin, I., Caton, J.G., Cobb, C.M., Drisko, C.L., Killoy, W.J., Michalowicz, B.S., Pihlstrom, B.L. and Goodson, J.M.: Evaluation of periodontal treatments using controlled-release tetracycline fibers: microbiological response. *J. Periodontol.* **66**, 700-707, 1995.
- 2) Seymour, R.A. and Heasman, P.A.: Pharmacological control of periodontal disease. II. Antimicrobial agents. *J. Dent.* **23**, 5-14, 1995.
- 3) Kornman, K.S. and Karl, E.H.: The effect of long-term low-dose tetracycline therapy on the subgingival microflora in refractory adult periodontitis. *J. Periodontol.* **53**, 604-610, 1982.
- 4) Jeong, S.N., Han, S.B., Lee, S.W. and Magnusson, I.: Effects of tetracycline-containing gel and a mixture of tetracycline and citric acid-containing gel on non-surgical periodontal therapy. *J. Periodontol.* **65**, 840-847, 1994.
- 5) Greenstein, G.: Clinical significance of bacterial resistance to tetracyclines in the treatment of periodontal diseases. *J. Periodontol.* **66**, 925-932, 1995.
- 6) Weeks, D.B.: Tetracycline in the treatment of periodontal diseases: review of current literature. *J. Am. Dent. Ass.* **101**, 935-936, 1980.
- 7) Peros, W.J., Etherden, I., Gibbons, R.J. and Skobe, Z.: Alteration of fimbriation and cell hydrophobicity by sublethal concentrations of tetracycline. *J. Periodont. Res.* **20**, 24-30, 1985.
- 8) Moskow, B.S. and Tannenbaum, P.: Enhanced repair and regeneration of periodontal lesions in tetracycline-treated patients. Case reports. *J. Periodontol.* **62**, 341-350, 1991.
- 9) Masters, L.B., Mellonig, J.T., Brunsvold, M.A. and Nummikoski, P.V.: A clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft in combination with tetracycline in the treatment of periodontal osseous defects. *J. Periodontol.* **67**, 770-781, 1996.
- 10) Parashis, A.O. and Mitsis, F.J.: Clinical evaluation of the effect of tetracycline root preparation on guided tissue regeneration in the treatment of class II furcation defects. *J. Periodontol.* **64**, 133-136, 1993.
- 11) Vernillo, A.T., Ramamurthy, N.S., Golub, L.M. and Rifkin, B.R.: The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Curr. Opin. Periodontol.* **2**, 111-118, 1994.
- 12) Rifkin, B.R., Vernillo, A.T. and Golub, L.M.: Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemi-

- cally-modified analogs. *J. Periodontol.* **64**, 819-827, 1993.
- 13) Golub, L.M., McNamara, T.F., D'Angelo, G., Greenwald, R.A. and Ramamurthy, N.S.: A non-antibacterial chemically-modified tetracycline inhibits mammalian collagenase activity. *J. Dent. Res.* **66**, 1310-1314, 1987.
 - 14) Sasaki, T., Kaneko, H., Ramamurthy, N.S. and Golub, L.M.: Tetracycline administration restores osteoblast structure and function during experimental diabetes. *Anat. Rec.* **231**, 25-34, 1991.
 - 15) Sasaki, T., Ramamurthy, N.S. and Golub, L.M.: Tetracycline administration increases collagen synthesis in osteoblasts of streptozotocin-induced diabetic rats: a quantitative autoradiographic study. *Calcif. Tissue Int.* **50**, 411-419, 1992.
 - 16) Golub, L.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F., Gomes, B., Wolff, M., Casino, A., Kapoor, A., Zambon, J., Ciancio, S., Schneir, M. and Perry, H.: Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J. Periodont. Res.* **19**, 651-655, 1984.
 - 17) Golub, L.M., Wolff, M., Lee, H.M., McNamara, T.F., Ramamurthy, N.S., Zambon, J. and Ciancio, S.: Further evidence that tetracyclines inhibit collagenase activity in human crevicular fluid and from other mammalian sources. *J. Periodont. Res.* **20**, 12-23, 1985.
 - 18) Vernillo, A.T., Ramamurthy, N.S., Lee, H.M., Mallya, S., Auszmann, J., Golub, L.M. and Rifkin, B.R.: ROS and UMR osteoblast gelatinases: tetracycline inhibition. *J. Dent. Res.* **73**, 367, 1993.
 - 19) Chowdhury, M., Moak, S., Rifkin, B. and Greenwald, R.: Effect of tetracycline which have metalloproteinase inhibitory capacity on basal and heparin-stimulated bone resorption by chick osteoclasts. *Agents Actions* **40**, 124-128, 1993.
 - 20) Ryan, M.E., Ramamurthy, N.S. and Golub, L.M.: Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr. Opin. Periodontol.* **3**, 85-96, 1996.
 - 21) Greenwald, R.A., Moak, S.A., Ramamurthy, N.S. and Golub, L.M.: Tetracyclines suppress matrix metalloproteinase activity in adjuvant arthritis and in combination with flurbiprofen ameliorate bone damage. *J. Rheumatol.* **19**, 927-938, 1992.
 - 22) Ramamurthy, N.S., Vernillo, A.T., Greenwald, R.A., Lee, H.M., Sorsa, T., Golub, L.M. and Rifkin, B.R.: Reactive oxygen species activate and tetracyclines inhibit rat osteoblast collagenase. *J. Bone Miner. Res.* **8**, 1247-1253, 1993.
 - 23) Delaisse, J.M. and Vaes, G.: Mechanisms of mineral solubilization and matrix degradation in osteoclastic bone resorption; in *Biology and physiology of the osteoclast* (Rifkin, B.R. and Gay, C.V., editors). CRC Press, Boca Raton, 298-314, 1992.
 - 24) Rifkin, B.R., Ramamurthy, N.S. and Gay, C.V.: Effects of tetracyclines on acid production by Isolated osteoclasts. *J. Dent. Res.* **71**, 1038, 1992.
 - 25) Terranova, V.P., Franzetti, L.C., Hic, S., DiFlorio, R.M., Lyall, R.M., Wikesjo, U.M.E., Baker, P.J., Christersson, L.A. and Genco, R.J.: A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J. Periodont. Res.* **21**, 330-337, 1986.
 - 26) Frantz, B. and Polson, A.: Tissue interactions with dentin specimens after demineralization using tetracycline. *J. Periodontol.* **59**, 714-721, 1988.
 - 27) Minabe, M., Takeuchi, K., Kumada, H. and Umemoto, T.: The effect of root conditioning with minocycline HCl in removing endotoxin from the roots of periodontally-involved teeth. *J. Periodontol.* **65**, 387-392, 1994.
 - 28) Parodi, R.J. and Esper, M.E.: Effect of topical application of citric acid in the treatment of furcation involvement in human lower molars. *J. Clin. Periodontol.* **11**, 644-651, 1984.
 - 29) Stahl, S.S. and Froum, S.: Human clinical and histologic repair responses following the use of citric acid in periodontal therapy. *J. Periodontol.* **48**, 261-266, 1977.
 - 30) Polson, A.M. and Hanes, P.J.: Cell and fiber attachment to demineralized dentin. A comparison between normal and periodontitis-affected root surfaces. *J. Clin. Periodontol.* **14**, 357-365, 1987.
 - 31) Register, A.A. and Burdick, F.A.: Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. II. Defect repair. *J. Periodontol.* **47**, 497-505, 1976.
 - 32) Garrett, J.S., Crigger, M. and Egelberg, J.: Effects of citric acid on diseased root surface. *J. Periodont. Res.* **13**, 155-163, 1978.
 - 33) Ogawa, T., Kawaguchi, H., Fujitani, Y., Yoshino, H., Liu, M.F., Oliveira, J.M. Jr., Nakanishi, K., Higashi, T. and Kurihara, H.: New attachment to periodontally diseased root surfaces treated with hydrochloric acid. *Oral Med. Pathol.* **1**, 23-28, 1996.
 - 34) Register, A.A. and Burdick, F.A.: Accelerated reattachment with cementogenesis to dentin, demineralized *in situ*. I. Optimal range. *J. Periodontol.* **46**, 646-655, 1975.
 - 35) 加納利文, 小川哲次, 藤谷百合, 広嶋英雄, 河口浩之, 吉野美穂, Hossain, M.R., 白川正治, 岡本 莫: 塩酸脱灰象牙質面の新生セメント質

- 形成について. 広大歯誌 24, 70-78, 1992.
- 36) 藤谷百合, 小川哲次, 広嶋英雄, 河口浩之, 吉野美穂, 加納利文, 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.
- 37) Register, A.A.: Bone and cementum induction by dentin demineralized *in situ*. *J. Periodontol.* 44, 49-56, 1975.
- 38) 小川哲次, 藤谷百合, 吉野美穂, 加納利文, 朱正浩, 吉野 宏, 河口浩之, 白川正治, 岡本 莫: 歯周病罹患歯根面に対する塩酸処理後の上皮性ならびに結合組織性付着構造の再形成について. 広大歯誌 26, 121-128, 1994.
- 39) 藤田 實: 放射線照射による顎骨障害の初期変化に関する実験的研究. 歯放 27, 83-104, 1987.
- 40) Polson, A.M., Ladenheim, S. and Hanes, P.J.: Cell and fiber attachment to demineralized dentin from periodontitis-affected root surfaces. *J. Periodontol.* 57, 235-246, 1986.
- 41) 大出祥幸: 移植・再植における歯根吸収・アンキローシス; 治療の病理<臨床編> 第3巻(下野正基, 飯島国好編). 医歯薬出版, 東京, 193-211, 1995.
- 42) Brudevik, P and Rygh, P: The repair of orthodontic root resorption: an ultrastructural study. *Eur. J. Orthod.* 17, 189-198, 1995.
- 43) Okamura, T., Shimokawa, H., Takagi, Y., Ono, H. and Sasaki, S.: Detection of collagenase mRNA in odontoclasts of bovine root-resorbing tissue by *in situ* hybridization. *Calcif. Tissue Int.* 52, 325-330, 1993.
- 44) Whitson, S.W.: Bone; in Oral histology (Ten Cate, A.R. editor). ed. 4, Mosby, St. Louis, 120-146, 1994.
- 45) Scherft, J.P.: The lamina limitans of the organic matrix of calcified cartilage and bone. *J. Ultrastruct. Res.* 38, 318-331, 1972.
- 46) McKee, M.D., Farach-Carson, M.C., Butler, W.T., Hauschka, P.V. and Nanci, A.: Ultrastructural immunolocalization of noncollagenous (osteopontin and osteocalcin) and plasma (albumin and α_2 HS-glycoprotein) proteins in rat bone. *J. Bone Miner. Res.* 8, 485-496, 1993.
- 47) Kawaguchi, H., McKee, M.D., Okamoto, H. and Nanci, A.: Immunocytochemical and lectin-gold characterization of the interface between alveolar bone and implanted hydroxyapatite in the rat. *Cells Mater.* 3, 337-350, 1993.
- 48) Nanci, A., McCarthy, G.F., Clokie, C., Warshawsky, H., Zalzal, S. and McKee, M.D.: Tissue response to titanium implants in the rat tibia: ultrastructural, immunocytochemical and lectin-cytochemical characterization of the bone-titanium interface. *Cells Mater.* 4, 1-30, 1994.
- 49) McKee, M.D. and Nanci, A.: Ultrastructural, cytochemical and immunocytochemical studies on bone and its interfaces. *Cells Mater.* 3, 219-243, 1993.
- 50) 東 富恵, 岡本 莫: 病的露出根面の処置法—機械的療法と薬物療法の基礎的検討—歯科ジャーナル, 36, 243-249, 1992.
- 51) Fernyhough, W. and Page, R.C.: Attachment growth and synthesis by human gingival fibroblasts on demineralized or fibronectin-treated normal and diseased tooth roots. *J. Periodontol.* 54, 133-140, 1983.
- 52) Laihio, A., Salo, T., Ding, Y., Kontinen, Y.T., Nordstrom, D., Tschesche, H., Lahdevirta, J., Golub, L.M. and Sorsa, T.: *In vivo* inhibition of human neutrophil collagenase (MMP-8) activity during long-term combination therapy of doxycycline and non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) in acute reactive arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 98, 21-28, 1994.
- 53) Chang, K.M., Ramamurthy, N.S., McNamara, T.F., Evans, R.T., Klausen, B., Murray, P.A. and Golub, L.M.: Tetracyclines inhibit porphyromonas gingivalis-induced alveolar bone loss in rats by a non-antimicrobial mechanism. *J. Periodont. Res.* 29, 242-249, 1994.
- 54) Golub, L.M., Evans, R.T., McNamara, T.F., Lee, H.M. and Ramamurthy, N.S.: A non-antimicrobial tetracycline inhibits gingival matrix metalloproteinases and bone loss in porphyromonas gingivalis-induced periodontitis in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 732, 96-111, 1994.