

学 位 論 文 題 名

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－

学位論文内容の要旨

緒 言

歯根膜、セメント質の再生は、バリヤーとして人工膜を用いて組織を誘導する方法（GTR法）が応用されているが、歯根膜の再生量に限界があり、広範囲な骨欠損を伴う重度歯周炎、水平性骨欠損部などには応用が困難である。そこで、歯根膜の細胞を培養・増殖させ、移植することにより、歯根膜、セメント質を再生させるという新しい治療法の検討が必要ではないかと考えられた。培養歯根膜細胞を利用した今までの研究報告では、歯根膜様の線維の形成は認められたが、セメント質形成は観察されず、培養歯根膜細胞のセメント質、骨形成能は明らかにされなかった。さらにその後も、歯根膜細胞を*in vitro*で培養、生体内に移植し、歯周組織の再生能力などを研究した報告はきわめて少なく、特にセメント質の形成などについて経時的に観察した報告は、全く行われていないのが現状である。

そこで今回、培養歯根膜細胞を*in vivo*に移植することにより、歯根膜、セメント質が形成されるかを検討する目的で、培養細胞を付着・増殖させた象牙質片を、ラット頭蓋に形成した骨欠損部に移植し、象牙質片の細胞付着面の変化を組織学的に観察した。

材料と方法

- 実験動物：本実験には近親交配ウィスター系雄性ラット90匹を用い、そのうちの60匹を被移植ラットとして、次の3群に分けた。実験群は、ラット歯根膜細胞を*in vitro*で培養し、それをラットの象牙質片上に播種し、さらに培養を行い増殖させた後、ラット頭蓋に形成した骨欠損部に移植した。移植に用いた象牙質片はラット上下顎切歯を採取し、エナメル質、セメント質、および歯髄を除去、大きさ約 $2.0 \times 1.0 \times 0.5$ mmのものを作製した。象牙質片は、クエン酸で処理を行った後、抗生物質を含む培地中で、十分に超音波洗浄を行った。播種した歯根膜細胞は、ラットの上下顎切歯の歯冠と根尖を切除後、歯軸方向に半切、歯髄を除去し歯根膜組織のみが残存する歯根を、培養dish上に歯根膜面が下を向くように静置し培養を行い、outgrowthし、confluent になったものを用いた。対照群は、実験群と同じ処理を行った象牙質片を、培養細胞を付着させずに移植した。歯根移植群は、移植手術時に、別のラットの上顎切歯を採取し、歯冠と歯髄を除去後、約 $2.0 \times 1.0 \times 0.5$ mmに切削した新鮮な歯根膜が付着している象牙質片を移植した。
- 移植方法：ラットに全身麻酔下で頭蓋部を切開し、骨膜を剥離した。その後、フィッシャーバーを用いて約 $2.0 \times 1.0 \times 0.3$ mmの骨欠損を作成し、実験群は培養歯根膜細胞付着面が、骨欠損部に面するように移植し、対照群は作製した象牙質片をそのまま骨欠損部に移植した。歯根移植群は歯根膜付着側が、骨欠損部に面するように移植した。さらに、移植した象牙質片とその周囲の骨を、ゴアテックス[®]膜を用いて被覆し、弁の縫合を行った。
- 観察方法：移植後、2週、4週、6週に屠殺し通法に従って組織切片を作製し、光顕的観察を行った。

結 果

対照群：移植2週後、頭蓋骨が移植象牙質片表面まで増殖して、アンキ

ローシスがみられたものが7例中4例みられた。4週後には、骨とのアンキローシスが骨欠損部に面した象牙質片表面の全面にわたっているのが、5例全ての標本に観察された。6週後には、骨とのアンキローシスがさらに進行し、象牙質片の吸収が拡大していた。

実験群：移植2週後、6例中1例の標本の中央部に硬組織が新生されていた。硬組織の形成量のごくわずかであったが内部に細胞を含んでおり、連続切片で観察した結果、頭蓋骨とは連続していなかった。なお、全ての標本において周囲の骨とのアンキローシスは観察されなかった。4週後には10例中4例の標本の骨欠損部に面した象牙質面には、頭蓋骨とは連続していない厚さ数 μ m程度の薄い硬組織の形成が観察された。この硬組織中には圧平された細胞が散在し、細胞セメント質の構造と類似していた。しかし6週後には、全症例とも頭蓋骨が増殖し、骨欠損部に面した象牙質片の表面に、骨とのアンキローシスが生じていた。

歯根移植群：移植2週後、骨欠損部に面する象牙質片表面のセメント質と歯根膜線維は残存しており、セメント質から歯根膜線維がほぼ垂直に走り出していた。4週後では、全例とも骨欠損部に面する象牙質片表面の大部分のセメント質と歯根膜が残存していた。しかし6週後には、全例とも頭蓋骨の骨欠損部から増殖した骨と広範囲にわたるアンキローシスが観察された。

考 察

移植2週後、対照群ではアンキローシスの確認された標本が7例中4例あったのに対して、実験群、歯根移植群においては1例も観察されなかった。この結果より、移植後初期では、健康な歯根膜がアンキローシスを阻止するのと同様に、培養歯根膜細胞がアンキローシスを阻止できる可能性が示唆された。実験群の移植2週後の6例中1例、4週後の10例中4例では象牙質表面に、頭蓋骨とは連続していないセメント質様の硬組織が形成されていた。培養歯根膜細胞を移植した今までの研究報告では、このような報告はなく、本実験でセメント質様の硬組織が形成された理由として、歯根膜組織を採取する際、歯根を抜去するのではなく顎骨ごと取り出し、歯槽骨を除去したため歯根膜の骨に近い部分まで採取され、硬組織形成能の高い細胞が多く含まれていた可能

性があること、骨欠損を作成しているので硬組織形成能の高い細胞に分化しやすい環境にあったこと、継代をせずに細胞を移植したこと、人工膜を用いて周囲組織の侵入を最小限に抑えたことなどが考えられた。しかし、移植4週後の実験群では、10例中5例にアンキローシスがみられ、移植6週間には実験群、対照群、歯根移植群の全標本とも、アンキローシスが認められた。これらの理由として、実験群では、象牙質片上の細胞付着数が少なかったこと、時間とともに付着していた細胞の活性が失われたこと、あるいは移植片と頭蓋骨との距離が近接しすぎていたことなどが考えられる。しかし、歯根移植群においてもすでに4週後に、一部アンキローシスが認められ、6週間には歯根膜側全面にアンキローシスが生じていたことから、骨と近接していて機能圧が加わらない環境においては歯根膜細胞はその特性を失い、骨とのアンキローシスを阻止しするのは困難となるのではないかと考えられた。

結 語

今回、*in vitro*で培養、増殖させた歯根膜細胞を、*in vivo*に移植することにより、歯根膜、セメント質が形されるかを検討する目的で、培養細胞を付着・増殖させた象牙質片を、ラット頭蓋に形成した骨欠損部に移植し、象牙質片の細胞付着面の変化を組織学的に観察した。その結果、

- 1、移植後初期では、歯根移植群と同様に、培養歯根膜細胞移植により、アンキローシスを阻止できることが示唆された。
- 2、象牙質片にセメント質様硬組織の形成が観察された。
- 3、時間が経過するとアンキローシスが生じていた。
- 4、以上より、培養歯根膜細胞移植により、歯根膜、セメント質を再生できる可能性が示唆された。しかし、時間が経過すると歯根移植群と同様にアンキローシスがみられたことから、培養歯根膜細胞を移植する場合、培養方法、移植部位などの条件をさらに検討するとともに、適切な時期に咬合力、あるいはそれに類似した機能を与えることが必要ではないかと考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙

副 査 教 授 雨 宮 璋

副 査 教 授 脇 田 稔

学 位 論 文 題 名

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－

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭でなされた。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めたところ、以下の内容について論述した。

歯根膜、セメント質の再生は、GTR法が臨床応用されているが、歯根膜の再生量に限界があり、広範囲な骨欠損を伴う重度歯周炎、水平性骨欠損部などには応用が困難である。そこで、歯根膜の細胞を培養・増殖させ、移植することにより、歯根膜、セメント質を再生させるという新しい治療法の検討が必要ではないかと考えられた。培養歯根膜細胞を利用した今までの研究報告では、セメント質形成は観察されず、培養歯根膜細胞のセメント質、骨形成能は明らかにされなかった。そこで今回、培養歯根膜細胞を*in vivo*に移植することにより、歯根膜、セメント質が形成されるかを検討する目的で、培養細胞を付着・増殖させた象牙質片をラット頭蓋に形成した骨欠損部に移植し、象牙質片の細胞付着面の変化を組織学的に観察した。

材 料 と 方 法

実験動物には近親交配ウィスター系雄性ラットを用い、次の3

群に分けた。実験群は、ラット歯根膜細胞を *in vitro* で培養しそれをラットの象牙質片上に播種し、さらに培養を行い増殖させた後、ラット頭蓋に形成した骨欠損部に移植した。対照群は、実験群と同じ処理を行った象牙質片を、培養細胞を付着させずに移植した。歯根移植群は、移植手術時に、別のラットの上顎切歯を採取し、新鮮な歯根膜が付着している象牙質片を移植した。移植方法は、ラット頭蓋部に骨欠損を作成し、実験群は培養歯根膜細胞付着面が骨欠損部に面するように移植し、対照群は作製した象牙質片をそのまま骨欠損部に移植した。歯根移植群は歯根膜付着側が骨欠損部に面するように移植した。さらに、移植した象牙質片とその周囲の骨を、ゴアテックス[®]膜を用いて被覆した。移植後、2、4、6週に屠殺し通法に従って組織切片を作製し、光顕的観察を行った。

結 果

対照群の移植2週後、頭蓋骨が移植象牙質片表面まで増殖して、アンキローシスがみられたものが7例中4例みられたのに対して、実験群2週後では、全ての標本においてアンキローシスは観察されなかった。また、6例中1例にわずかな硬組織の新生が観察された。対照群の4週後、6週後には、骨とのアンキローシスが骨欠損部に面した象牙質片表面の全面にわたっているのが、全ての標本に観察された。実験群4週後には10例中4例の標本の骨欠損部に面した象牙質面には、頭蓋骨とは連続していない、セメント質様の硬組織の形成が観察された。しかし6週後には、全症例とも骨とのアンキローシスが生じていた。歯根移植群では、移植2週後、骨欠損部に面する象牙質片表面のセメント質と歯根膜線維は残存していた。4週後でも、全例とも象牙質片表面の大部分のセメント質と歯根膜が残存していた。しかし6週後には、全例とも頭蓋骨との広範囲にわたるアンキローシスが観察された。

考 察

移植2週後、対照群ではアンキローシスが生じていた標本が存在したのに対して、実験群、歯根移植群においては1例も観察されなかつ

た。この結果より、移植2週後は、健康な歯根膜がアンキローシスを阻止するのと同様に、培養歯根膜細胞がアンキローシスを阻止できる可能性が示唆された。さらに、実験群では移植2週、4週後の象牙質片表面に、頭蓋骨とは連続していないセメント質様の硬組織が形成されていた。このことより、培養歯根膜細胞移植により、歯根膜、セメント質を再生できる可能性が示唆された。硬組織が形成された理由として、培養歯根膜中に硬組織形成能のある細胞が存在し、増殖、分化しセメント質様の硬組織が形成された可能性と、培養歯根膜細胞自体は移植後吸収されるが、その際に何らかのシグナルを創傷治癒部に存在する細胞に送り、硬組織を形成する細胞に分化させた可能性が考えられた。しかし、時間が経過すると両群とも全面に、アンキローシスが起こっていた。歯根移植群においても同様にアンキローシスが生じていたことから、骨と近接していて機能圧が加わらない環境においては歯根膜細胞はその特性を失い、骨とのアンキローシスを阻止するのは困難であり、今後検討していかなければならない点である。

ひきつづき各審査員と申請者のあいだで、本論文の内容とその関連項目について質疑応答がなされた。これらに対して申請者は本研究から得た知見と文献を引用して明快かつ適切な回答を行った。本研究は、培養歯根膜細胞移植により、歯根膜、セメント質を再生できる可能性を示唆したこと、アンキローシスを阻止できる可能性を示唆したことが高く評価された。これらのことは、歯科医学の発展に十分貢献するものであり、博士(歯学)の学位授与に値するものと判断した。