

学位論文題名

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

学位論文内容の要旨

緒言

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、現在行われているGTR法などの再生療法はほとんど困難であり、適切な治療法がないため抜歯されることが多く、新しい治療法の開発が望まれている。すでに、Boykoら、大森ら、松下らは、他の歯から採取した歯根膜細胞を*in vitro*で継代培養し歯根象牙質に付着させ*in vivo*に移植した結果、培養歯根膜細胞は結合組織性付着を形成する可能性があることを示唆している。しかし、培養歯根膜細胞は初代細胞を用いた場合にはセメント質を形成するが、増殖のため継代を繰り返した細胞の場合にはセメント質の形成が認められず、さらに細胞培養を長期間行くと歯根膜細胞の特徴である高いアルカリフォスファターゼ(ALP)活性が低下することが報告されている。

そこで、著者は露出根面を歯根膜細胞で覆う別の方法として、抜去歯に残存している歯根膜を*in vitro*で組織培養し、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*へ戻す方法に着目した。すなわち、抜去歯に残存している歯根膜を*in vitro*で培養して歯根膜細胞を露出根面へ増殖させれば、歯根膜細胞の特徴が失われず、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より高いのではないかと考えた。しかしながら抜去歯の残存歯根膜を培養した報告はきわめて少なく、残存歯根膜から露出根面への細胞の増殖については明らかにされていない。

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由来細胞を増殖させ移植する新しい歯周組織再生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、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目的で、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った。さらに、歯根膜由来細胞の性質を検討するため、ALPおよび増殖細胞核抗原(PCNA)の局在を観察した。

材料および方法

成ネコ7頭の抜去した犬歯を歯軸方向に半切して歯冠と根尖部を切除し、歯根の中央にノッチを付与して根尖側1/2の歯根膜を保存し(残存歯根膜)、歯冠側1/2をルートプレーニングした(露出根面)30試験片を作製した。試験片は15% FBS、抗生物質含有 α -MEM中で37℃、5%CO₂、95%Airの条件下で0、2、4、6週間培養を行った。

培養期間終了後、ギムザ染色を行い、試験片の表面を実体顕微鏡で観察し、ノッチから露出根面への歯根膜由来細胞の遊走距離および密度を計測した。細胞密度は1~29、30~59、60~89、90以上の4段階に分類した。次に連続脱灰標本を作成してHE染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

さらに、一部の試験片は酵素組織化学的にALP染色を行いギムザ染色と比較し、ALP発現部位と歯根膜由来細胞の付着部位を比較した。また、PCNAの免疫組織化学染色を行い、HE染色と比較した。

結果

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露出根面には細胞は認められず、2週群では露出根面に細胞がわずかに認められた。4週群と6週群では露出根面に細胞が増加し、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。

2. 歯根膜由来細胞の細胞遊走距離と密度の計測

細胞遊走距離は2週群で0.8mm、4週群で4.6mm、6週群で5.2mmとなり、培養期間が増加するに伴い、細胞遊走距離は増加する傾向にあった。露出根面の細胞密度はノッチから遠くなるに従って減少する傾向にあった。また、密度の高い部位が経時的に広がっていた。

3. 光学顕微鏡による歯根膜由来細胞と残存歯根膜の観察

残存歯根膜の表層には0週群では細胞は認められず、2週群では紡錘形の線維芽細胞様細胞が多数認められた。4週群、6週群では細胞層が厚くなる傾向にあった。一方、残存歯根膜のセメント質付近には0週群では細胞が多数認められたが、2週群では細胞が減少し、4、6週群ではさらに減少してした。

露出根面には、0週群では細胞は認められず、2週群ではノッチ付近に点在していた。4週群では細胞は連続した1~2層となり、6週群ではさらに細

胞層は厚くなる傾向にあった。

4. ALP発現部位の観察

2週群では、ALPは残存歯根膜全体に認められたが、露出根面上に増殖した細胞にはほとんど認められなかった。6週群では、ALPは残存歯根膜全体および露出根面の細胞密度が高い部位に認められた。

5. 増殖（PCNA陽性）細胞の観察

残存歯根膜では、PCNA陽性細胞は残存歯根膜の表面付近に多数認められ、深部にはほとんど認められなかった。一方、露出根面にも、PCNA陽性細胞が多数認められ、特に細胞層の表面付近に多く認められた。

考察

抜去歯の残存歯根膜を *in vitro* で培養すると歯根膜由来細胞がルートプレーニングした露出根面へ遊走増殖し、6週間後には作製した露出根面のほぼ全面を歯根膜由来細胞が被覆していた。さらに、細胞密度の高い部位が経時的に広くなるのが認められた。以上の結果から *in vitro* で抜去歯の残存歯根膜を培養すると、歯根膜由来細胞が露出根面全体を被覆することが可能であることが示唆された。本研究では露出根面をノッチから平均5.3mm作製したが、露出根面がより広い場合、さらに広範囲を歯根膜由来細胞が被覆する可能性があると考えられる。

今回酵素組織化学的に培養細胞におけるALP活性の発現および免疫組織化学的に細胞増殖のマーカーであるPCNAの発現細胞の観察を行った。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考えられている。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の発現した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。本研究では増殖細胞の局在を検索する目的でPCNAを検出した。

また、ALP発現は培養初期では残存歯根膜に限局していたが、経時的に露出根面へ広がる傾向を示し、露出根面へ増殖した歯根膜由来細胞のうち細胞密度の高い部位に認められ、細胞密度の低い部位には認められなかった。一方、PCNA陽性細胞は増殖した歯根膜由来細胞層の表面付近に認められ、同部の増殖活性が高い傾向が示唆された。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発現が認められたと考えられる。組織学的観察では露出根面上に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高いと考えられる。

以上のことから、抜去歯に残存した歯根膜を*in vitro*で培養し、歯根膜由来細胞で露出根面を被覆した歯を*in vivo*に移植した場合、結合組織性付着が再生される可能性が高いと考えられる。今後*in vivo*への移植実験を行い、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ている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙
副 査 教 授 向 後 隆 男
副 査 教 授 久保木 芳 徳

学 位 論 文 題 名

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

審査は担当者のもと、論文提出者に対し口頭試験により論文の内容と関連分野について行われた。はじめに申請者に対し本論文の要旨の説明を求めて質疑応答を行ったところ、以下の内容について論述した。

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適切な治療がないため抜歯されることが多く、新しい治療法の開発が望まれている。これまでに歯根膜細胞が結合組織性付着を形成することに着目し、歯根膜細胞のみを*in vitro*で培養し*in vivo*に移植した結果、結合組織性付着を形成する可能性が報告されている。

そこで、本研究ではルートプレーニングして象牙質を露出させた根面を歯根膜細胞で被覆する別の方法として、抜去歯に残存している歯根膜を*in vitro*で歯ごと組織培養し、残存歯根膜から歯根膜細胞を露出根面へ遊走増殖させ被覆し、これを*in vivo*へ戻す方法を考案した。この方法は、すでに報告されている歯根膜細胞のみを生体から採取して培養する方法に比べ、露出根面へ増殖した細胞が歯根膜細胞の特徴を失わず、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高いと考えた。

本研究は重度歯周炎罹患歯の新しい歯周組織再生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、残存歯根膜から露出

根面への歯根膜由来細胞の遊走増殖について検討する目的で、歯根膜由来細胞の経時的観察および遊走距離の計測を行った。さらに、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（ALP）および増殖細胞核抗原（PCNA）の局在を観察した。

材料および方法

成ネコ7頭の犬歯から歯根の中央にノッチを付与して根尖側1/2の歯根膜を保存し（残存歯根膜）、歯冠側1/2をルートプレーニングした（露出根面）30試験片を作製した。試験片は0、2、4、6週間培養を行った。

培養期間終了後、ギムザ染色を行い、実体顕微鏡で観察し、ノッチから露出根面への歯根膜由来細胞の遊走距離および密度を計測した。一部の試験片は酵素組織学化学的にALP染色を行いギムザ染色と比較した。さらに連続脱灰標本を作成してHE染色またはPCNAの免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡にて観察した。

結果

0週群では露出根面には細胞は認められず、2週群ではルートプレーニングした露出根面に細胞がわずかに認められ、4週群と6週群では露出根面に細胞が増加し数層になっていた。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。細胞遊走距離は培養期間が増加するに伴い、増加する傾向にあった。細胞密度はノッチから遠くなるに従って減少する傾向にあった。一方、ALPは露出根面の細胞密度の低い部位には認められず、細胞密度が高い部位に認められた。PCNA陽性細胞は残存歯根膜と露出根面上に遊走した歯根膜細胞の最表層全体に認められた。

考察

抜去歯の残存歯根膜を*in vitro*で培養すると歯根膜由来細胞が露出根面へ遊走増殖し、6週後には露出根面のほぼ全面を被覆していた。さらに、細胞密度の高い部位が経時的に広くなるのが認められた。以上の結果からこの方法により露出根面全体を歯根膜由来細胞で被覆できる可能

性があると考えられた。

ALP発現部位とPCNA陽性細胞の観察から、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発現が認められたと考えられた。露出根面に増殖した細胞の密度は経時的に増加していくことから、これら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高いと考えられた。

以上の所見から、抜去歯に残存した歯根膜を*in vitro*で培養し、歯根膜由来細胞で露出根面を被覆した歯を*in vivo*に移植した場合、結合組織性付着が再生される可能性が高いと考えられた。今後*in vivo*への移植実験を行い、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ている。

引き続き各審査委員と申請者の間で、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解答を行った。本研究は従来抜歯が適応と考えられてきた重度歯周炎罹患歯の新しい歯周組織再生療法の開発を目指し、抜去歯に残存する歯根膜の培養を*in vitro*で行った結果、歯根膜由来細胞が露出根面全体を被覆すること、さらにこの細胞が歯根膜細胞の性質を有すること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。