

学位論文題名

培養・移植した歯根膜細胞の動態と歯周組織再生の研究

学位論文内容の要旨

緒言

歯周疾患の治療において、失われた歯周組織の再生は極めて重要な問題である。歯周組織の再生には、歯周組織の失われた歯根面に歯根膜の組織を誘導して増殖させることが重要であり、現在GTR法が臨床応用されている。しかしGTR法の適応は比較的軽度の症例に限られ、歯周組織の再生量に限界があるのが現状である。そこで当教室では、歯根膜細胞を生体から採取し、in vitro で培養、増殖させた後に、in vivo へ移植して歯周組織を再生させる方法に注目し研究を行ってきた。1996年に大森がラットの歯根膜細胞を培養・増殖させ、象牙質片上に付着させて頭蓋骨の骨欠損作成部へ移植した結果、セメント質様の硬組織が新生したと報告した。しかし移植した培養細胞が生体内でどのような動態を示し、どのような役割を担ったかは明確にはされていない。そこで本研究の目的は、ラットより採取した歯根膜細胞を培養・増殖して象牙質片に付着させ、頭蓋骨へ移植した後の細胞の動態と硬組織形成についてさらに検討を行うことである。

材料および方法

1. 実験動物

本実験では臓器移植で免疫学的に組織適合性が確立されている近親交配の雄性ラット、WKA/Sea (WKAラット) を用いた。

2. 実験方法

1) 実験群

- (1)歯根膜細胞の採取：WKAラット4週齢から採取した切歯を歯軸方向に半切し、歯根膜面が35mm 培養 dish 底面に接するように静置して、12%ウシ胎児血性、抗生剤添加培地 (MEM) を用い培養を行った。
- (2)象牙質片の作製：ラット上顎切歯から大きさ2×1×0.5mmの象牙質片を作製した。象牙質片はクエン酸 (pH1.0) にて1分間処理し、超音波洗浄を行った。
- (3)培養歯根膜細胞の播種と培養：歯根膜より細胞が増殖し、confluent になった時点で細胞を回収し、前述の象牙質片上に播種した。培地の交換は細胞の播種後48時間ごとに0.05% Bromodeoxyuridine (BrdU)含有 MEM で行った。2週間後、象牙質面に細

胞が付着していることを確認し、実験群の移植片とした。

(4)移植方法：WKAラット（12～13週齢）の頭蓋骨に骨欠損を作成し、歯根膜細胞を培養・付着させた象牙質片を細胞付着面が骨欠損部に面するように移植し、象牙質片と周囲の骨面をゴアテックス®膜を用いて被覆し、頭皮を復位、縫合した。

## 2) 対照群

実験群と同様の方法で象牙質片を作成し、歯根膜細胞を播種せず、WKAラットの頭蓋骨に形成した骨欠損部に実験群と同様の方法で移植した。

## 3. 観察方法

象牙質片移植後7日、14日、21日、28日後に屠殺し、4%パラホルムアルデヒドで72時間固定後、10% EDTAで30日脱灰し、脱水後、ヒストレジンプラス®に包埋し、5  $\mu$ mの連続組織切片を作成した。染色は抗BrdUモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色（BrdU染色）、酒石酸耐性アシドフォスファターゼ染色（TRAP染色）、アルカリフォスファターゼ染色（ALP染色）、ヘマトキシリン-エオジン重染色（HE染色）を行い、光学的顕微鏡を用いて観察した。

## 結 果

### 1. 移植7日後

実験群では、頭蓋骨の骨欠損部と移植象牙質片との間に結合組織が存在し、象牙質表面には線維芽細胞と思われる細胞が存在した。頭蓋骨と象牙質片の表面にはTRAP陽性細胞が認められた。ALP陽性細胞は、頭蓋骨の骨欠損面や骨髓腔内に認められ、象牙質表面には認められなかった。一方対照群では、頭蓋骨と移植象牙質片の間に実験群と同様、結合組織が存在し、アンキローシスは観察されなかった。TRAP陽性細胞は骨欠損部および象牙質片の表面に認められたが、ALP陽性細胞は象牙質片周囲には認められなかった。

### 2. 移植14日後

実験群では、頭蓋骨と移植象牙質片との間隙に結合組織が介在し、血管の新生が認められ、線維芽細胞と思われる細胞が多数存在していた。とくに7例中1例では象牙質表面が一部吸収され、この吸収窩に添加するように硬組織がわずかに形成されていた。連続切片で観察した結果、この新生硬組織と頭蓋骨との連続性は認められなかった。一方対照群では、5例中4例に頭蓋骨と象牙質片が幼若な骨によりアンキローシスしている像が観察された。またアンキローシスしていない部位では、象牙質の吸収が進行し、広範囲で深部に及んでいた。

### 3. 移植21日後

実験群では、8例中2例に実験群の14日後と同様、象牙質片の吸収窩に頭蓋骨と非連続性の硬組織が形成された。この象牙質片表面の硬組織は14日後よりも広範囲にわたって形成されており、内部に封入された細胞数も多く、細胞性セメント質の構造と類似していた。硬組織の表面にはALP陽性の細胞が認められ、その周囲にはTRAP陽性細胞がわずかに認められた。一方、対照群では、5例全て頭蓋骨と象牙質片がアンキ

ローシスしており、移植14日後よりも広範囲に及んでいた。アンキローシス部では、TRAP陽性細胞、ALP陽性細胞がほとんど認められなかった。

#### 4. 移植28日後

実験群では、7例中6例は頭蓋骨と象牙質片とのアンキローシスが観察されたが、1例はアンキローシスせず、新生硬組織が象牙質面に添加するように広範囲に形成されており、内部には細胞が封入されていた。新生された硬組織は21日後よりも広く厚みも増加していた。象牙質片と頭蓋骨との距離は狭くなっていたが、数層の線維芽細胞様の細胞を含む結合組織により隔てられていた。またBrdU陽性の線維芽細胞様細胞が、新生硬組織の周囲および象牙質片の表面に認められた。一方対照群では、4例全て象牙質片のほぼ全面にわたり頭蓋骨とアンキローシスしていた。

### 考 察

本研究は、歯周組織の新しい再生療法として、歯根膜から採取した細胞を培養・増殖させて歯根膜が失われた根面に移植する方法を開発し発展させる目的で、生体に移植した培養歯根膜細胞の動態および硬組織形成に関して検討を行った。培養細胞を標識するためにBrdUを用い、さらに硬組織形成との関連性を知るためにALP染色とTRAP染色を行った。BrdUは細胞合成期にDNAに取り込まれ、かつ非放射性であることから培養歯根膜細胞の標識として用いた。その結果、BrdU陽性の細胞が移植28日後まで観察されたことから、移植した細胞が少なくとも28日間は生存していたと考えられた。また対照群は実験群よりアンキローシスした割合が多だけでなく、広範囲にわたりアンキローシスしていたことから、培養細胞がアンキローシスを阻止する役割を果たした可能性が高いと考えられた。

さらに実験群では象牙質表面にセメント質様硬組織の形成が認められたが、移植時にゴアテックス膜を用いて周囲から細胞の侵入を防いだことから、移植した培養歯根膜細胞がセメント質様硬組織形成に強く関与した可能性が高いと考えられた。しかし以前に行われた大森らの研究では、4週後以降は実験群も全てアンキローシスしていたことから、歯根膜細胞の培養、移植による再生療法を発展させるには、移植した歯根膜細胞の長期生存、増殖をはかる方法を検討するとともに、歯根膜細胞が歯根面や歯槽骨など周囲の環境や咬合機能により歯周組織形成にどのような役割を果たしているのか、今後さらに検討することが必要と思われる。

# 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 脇 田 稔

## 学 位 論 文 題 名

### 培養・移植した歯根膜細胞の動態と歯周組織再生の研究

審査は審査担当者3名が一堂に会して口頭で行った。まず論文提出者に提出論文の内容について論述させた。

歯周疾患の治療において、失われた歯周組織の再生は極めて重要な問題である。歯周組織の再生には、歯周組織の失われた歯根面に歯根膜の組織を誘導して増殖させることが重要であり、現在GTR法が臨床応用されているが、その適応は比較的軽度な症例に限られ、歯周組織の再生量に限界があるのが現状である。そこで当教室では、歯根膜細胞を生体から採取し、*in vitro*で培養、増殖させた後に、*in vivo*へ移植して歯周組織を再生させる方法に注目し研究を行ってきた。これまでラットの歯根膜細胞を培養・増殖させ、象牙質片上に付着させて頭蓋骨の骨欠損作成部へ移植した結果、セメント質様の硬組織が新生したと報告してきたが、移植した培養細胞が生体内でどのような動態を示し、どのような役割を担ったかは明確にされていない。本研究の目的は、ラットより採取した歯根膜細胞を培養・増殖して象牙質片に付着させ、頭蓋骨へ移植した後の細胞の動態と硬組織形成についてさらに検討を行うことである。

#### 材料および方法

実験動物は近親交配の雄性ラットWKA/Seaを用いた。実験群では、4週齢ラットから採取した歯根膜細胞を0.05% Bromodeoxyuridine (BrdU)含有MEMを用いて象牙質片上で培養し、12~13週齢ラットの頭蓋骨の骨欠損作成部に移植した。対照群では歯根膜細胞を付着させていない象牙質片のみを実験群と同様の方法で移植した。象牙質片移植後7日、14日、21日、28日後に屠殺し、4%パラホルムアルデヒドで72時間固定後、10% EDTAで30日間脱灰し、脱水後、ヒストレジンプラス®に包埋し、5  $\mu$ mの連続組織切片を作成した。染色は抗BrdUモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色、酒石酸耐性アシドフォスファターゼ (TRAP) 染色、アルカリフォスファターゼ (ALP) 染色、ヘマトキシリン-エオジン重染色を行った。

## 結 果

実験群では、移植7日後には象牙質片が一部吸収され、吸収窩に TRAP 陽性細胞が観察された。14、21、28日後では一部に骨性癒着する標本も認められたが、象牙質片表面に頭蓋骨と非連続性で内部に細胞を封入するセメント質様の硬組織の新生が新生し、周囲には ALP 陽性細胞が観察される標本が認められた。また28日後の新生硬組織周囲にはBrdU陽性細胞が観察された。対照群では、移植7日後、移植象牙質表面の吸収が認められ、14日後には頭蓋骨より骨が増殖し象牙質片の一部とアンキローシスが生じており、21、28日後では全てアンキローシスしていた。

## 考 察

本研究は、歯周組織の新しい再生療法として、歯根膜から採取した細胞を培養・増殖させて歯根膜が失われた根面に移植する方法を開発し発展させる目的で、生体に移植した培養歯根膜細胞の動態および硬組織形成に関して検討を行った。培養細胞を標識するためにBrdUを用い、さらに硬組織形成との関連性を知るためにALP染色とTRAP染色を行った。その結果、BrdU陽性の細胞が移植28日後まで観察されたことから、移植した細胞が少なくとも28日間は生存していたと考えられた。実験群でセメント質様硬組織の形成が認められただけでなく、対照群では実験群より骨性癒着した割合が多いただけでなく、広範囲にわたり骨性癒着していたことから、移植した培養歯根膜細胞がセメント質様硬組織形成に強く関与し、骨性癒着を阻止する役割を果たした可能性が高いと考えられた。しかし以前の報告では、28日後以降は実験群も含めて全て骨性癒着していたことから、歯根膜細胞の培養、移植による再生療法を発展させるには、移植した歯根膜細胞の長期生存、増殖をはかる方法を検討するとともに、歯根膜細胞が歯根面や歯槽骨など周囲の環境や咬合機能により歯周組織形成にどのような役割を果たしているのか、今後さらに検討することが必要と思われる。

ひきつづき各審査員と申請者のあいだで、本論分の内容とその関連項目について質疑応答が行われた。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適切な回答を行った。本研究は、象牙質片と共に生体内に移植した培養歯根膜細胞が28日間生存し、セメント質様の硬組織の新生に関与す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しうるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと判断された。