

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11279

研究課題名(和文) 抜去智歯歯髄組織の即時移植による新規抜歯窩治癒促進法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a new method for healing of tooth extraction by immediate implantation of extracted tooth pulp tissue

研究代表者

徳山 麗子(TOKUYAMA, Reiko)

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：20380090

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：下顎水平埋伏智歯抜歯は口腔外科臨床において最も多く遭遇する外科処置の一つである。本研究では、下顎水平埋伏智歯の抜歯に際し、抜歯直後に抜去歯から歯髄組織を摘出し、抜歯窩に移植することにより抜歯窩の治癒促進を図ることが可能かどうかについて検討した。マウスの上顎左右第一臼歯を抜去した。この抜去歯から歯髄組織を摘出し、抜歯窩に移植後、治癒経過を経時的に組織学的に観察した。その結果、歯髄組織移植側において、治癒が促進される傾向が認められたが、明らかな有意差は認められなかった。今後は、歯髄組織を移植する際にスキャホールドとなるような基材を用いての検討を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Mandibular horizontal impaction tooth is one of the most common surgical procedures encountered in oral surgery clinic. In this study, we examined whether or not it is possible to promote healing of tooth extraction cavity by extracting dental pulp tissue from extracted teeth immediately after tooth extraction and transplanting to tooth extraction cavity just after tooth extraction of mandibular horizontal impacted tooth. Both sides of upper first molar of the mouse were extracted. The pulp tissue was removed from this extracted tooth and after implantation in the extraction tooth cavity, the healing process was observed histologically time dependent. As a result, on the dental pulp tissue transplant side, there was a tendency to promote healing, but there was no obvious significant difference. In the future, we plan to investigate using scaffold-based substrates when transplanting dental pulp tissue.

研究分野：再生医療

キーワード：抜歯窩治癒促進法 歯髄組織

1. 研究開始当初の背景

日常の口腔外科診療に際し、もっとも多く遭遇する処置の一つが智歯抜歯である。智歯は現代人においては生涯を通じて萌出せず、咬合に参加しないこともあるが、半埋伏等の萌出異常を背景として智歯周囲炎などのトラブルの原因となることも多く、抜歯が選択されることが多い。特に下顎水平埋伏智歯では、この傾向が極めて強いが、その抜歯にあたっては、周囲の骨の削除が必要となることも多いことから、抜歯窩における骨欠損が大きく、正常な治癒過程をたどった場合においても疼痛や腫脹が大部分の症例で認められ、欠損部が骨性治癒するまでには長期間を要する。さらに、抜歯後感染やドライソケットなどの治癒不全を継発することもしばしば認められる。しかし、智歯抜歯後に適した効果的な骨組織再生療法は未だ確立されておらず、自然治癒を待つのが現状である。

歯が欠損するとその歯が植立していた歯槽骨は吸収され顎堤の低下につながる。また、智歯抜歯後には同部の歯槽骨吸収により第二大臼歯の遠心根面が露出したり、さらに知覚過敏を惹起したりすることもたびたび認められる。これまでに智歯を含め、歯の欠損や歯槽骨あるいは顎骨の欠損に対して、様々な再生治療が試みられてきた。例えば、人工材料による再生、あるいは自己組織由来の細胞を事前にあるいは事後に培養過程を経て再生に利用するなどの方法が試みられている。しかし、人工材料による抜歯窩の補填による骨再生は、人工材料が自家骨に置換されるまでに長期間を要することや、人工材料への感染の危険性などの欠点があげられる。また、自己組織由来の培養細胞を用いる場合、細胞源として組織を採取する必要があることから新たな外科的侵襲が加わるという欠点に加え、細胞培養の過程が加わることで、マイコプラズマなどの感染の危険性や、手技の煩雑さ、培養期間の長さや高コストといった問題があげられる。このことから、より効果的で簡便で安全な抜歯窩治癒促進法の開発が期待されているが、なされていないのが現状であった。

2. 研究の目的

近年、再生医療の実現を目指すための細胞源として歯髄細胞が注目されている。これまで医療廃棄物として処理されるのみであった抜去歯(乳歯、智歯など)の歯髄を採取し、ここから歯髄幹細胞を分離培養し、再生医療に用いる試みがなされている。歯髄幹細胞は採取が簡単であること、増殖能が高いこと、多分化能を有していること、細胞の長期保存が可能であること、同種移植が可能であることなどの利点を有している。事実、われわれもこれまでに歯髄組織より歯髄幹細胞を分離培養し、様々な細胞・組織に分化誘導し、再生医療に用いるための細胞源として有効であることを報告してきた。しかし、この方法では細胞を分離培養するという煩雑な過程が必要で、また感染の危険性、分化誘導のための添加試薬の選択や安全性の確認など解決すべき問題も残っているのが現状である。

一方、傷害を受けた組織の自然治癒過程では、サイトカインなど傷害部位における組織の再生に必要な様々な細胞間情報伝達物質が周囲の細胞から分泌され、それに応答するように周囲組織から細胞が遊走、増殖し、その部位に適した細胞へと分化し、治癒過程が進むことが知られている。これは骨組織においても同様であり、これらの生体における治癒メカニズムを考慮すると、生体が治癒しようとする環境においては、その細胞間情報伝達物質を受け取り、増殖、分化し、適切な細胞外基質タンパク質を産生・分泌し、治癒を促進する役割を担う細胞の供給が、組織再生促進のための重要な因子の一つであると考えられる。このことから、これまでに行われている生体外で歯髄幹細胞を分離培養し、これを生体内に移植するという方法と異なり、抜歯後、欠損となった抜歯窩に、抜去歯から摘出した歯髄組織そのものを細切して移植し、歯髄組織中の細胞を治癒のために利用するという全く新しい画期的で簡便な方法に着想した。先に述べた生体における治癒環境の中で、移植歯髄組織が細胞供給源となり、治癒を促進させることができれば、歯の抜去後すぐに摘出し、細切後抜歯窩に移植することで感染の機会がほぼないこと、自己組織であることから免疫応答への憂慮がないこと

などから、安全かつ簡便な方法が確立できると考えられる。本研究において、抜去歯の歯髄組織による抜歯窩治癒促進効果が証明されれば、臨床で問題となる抜歯窩の治癒不全や、その他の症状発現の予防効果が期待でき、抜歯後の種々のトラブルを回避し得ることが期待でき、智歯抜歯を受けるすべての患者におけるQOLの向上に貢献できると考えられる。そこで、本研究では、抜去智歯より摘出した歯髄組織を即時移植することで、抜歯窩治癒促進が可能か否かについて、検討することとした。

3. 研究の方法

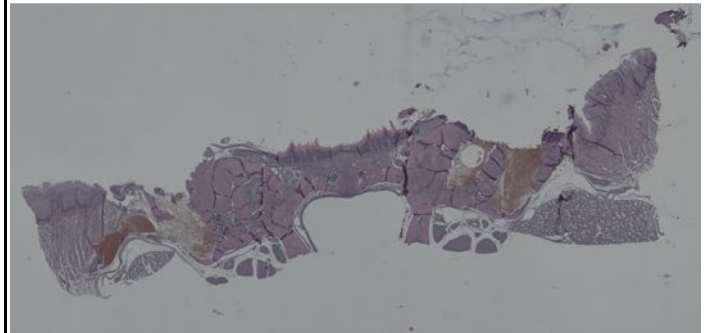
歯髄組織移植による抜歯窩治癒促進が可能か否かについて明らかにすることを目的に以下の検討を行った。マウスの左右上顎第一臼歯を同時に抜去した。マウスの抜去歯からは歯髄組織を摘出し、それを細切した。マウスの抜歯窩に対して、右側は歯髄組織移植群、左側にはコントロール群として右側に細切した歯髄組織を移植し、左側はそのままとした。抜歯窩は光重合レジンにて被覆し口腔内と遮断した。その後1, 3, 5, 7日後に抜歯窩を含む上顎組織を摘出し、コントロール群、歯髄組織移植群において抜歯窩治癒過程を組織学的に検討した。また、治癒組織内における骨関連分子、幹細胞関連分子、線維芽細胞関連分子の発現について免疫組織化学的手法によりに検討し、移植歯髄組織が抜歯窩治癒に及ぼす影響について分子細胞生物学的検討を行った。

さらに動物種を超えて検討結果が一致するか否かを確認するため、ラットを対象として検討を行った。具体的には、ラットの左右上顎第一臼歯を同時に抜去した。ラットの抜去歯からは歯髄組織を摘出し、それを細切した。ラットの抜歯窩に対して、右側は歯髄組織移植群、左側にはコントロール群として右側に細切した歯髄組織を移植し、左側はそのままとした。抜歯窩は光重合レジンにて被覆し口腔内と遮断した。その後1, 3, 5, 7日後に抜歯窩を含む上顎組織を摘出し、コントロール群、歯髄組織移植群において抜歯窩治癒過程を組織学的に検討した。また、治癒組織内における骨関連分子、幹細胞関連分子、線維芽細胞関連分子の発現について免疫組織化学的手法によりに検討し、移植歯髄組織が抜歯窩治癒に及ぼす影響について分子細胞生物学的検討を行うことで前項にて得ら

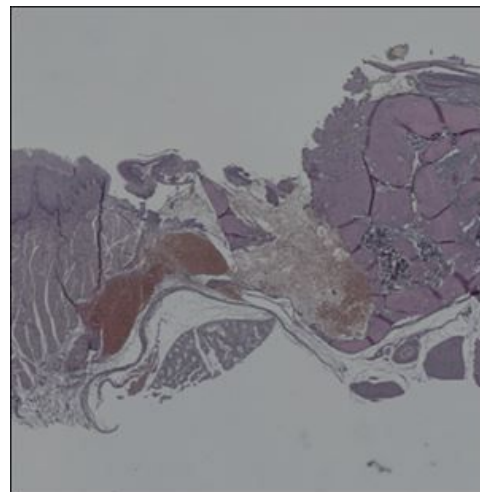
れたマウスの歯髄組織移植による抜歯窩治癒促進が動物種を超えてラットにおいても同様の結果が得られるか比較検討し、この手法が動物種に依存しない、異種動物間で共通に用いることが可能か否か検討した。

4. 研究成果

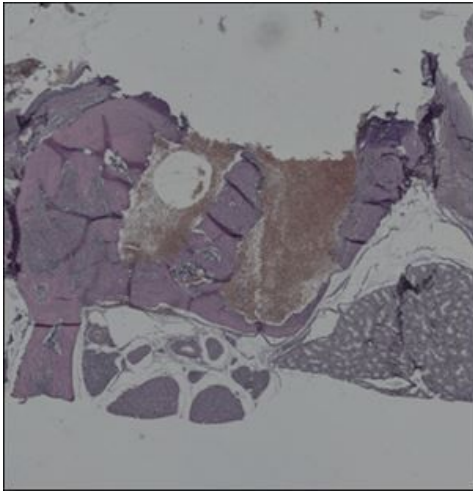
はじめに、マウスにおいて抜歯後即時歯髄移植した群とコントロール群において、当初予定通りに抜歯されているか、また移植歯髄組織が抜歯窩内にとどまっているかについて確認した。その結果、左右ともに臼歯が抜去され、右側抜歯窩には移植した歯髄組織および血餅が存在し、左側抜歯窩では血餅で満たされていることが確認できた。



マウス上顎第一臼歯部の全体像。右側および左側第一臼歯抜歯窩が確認できる。



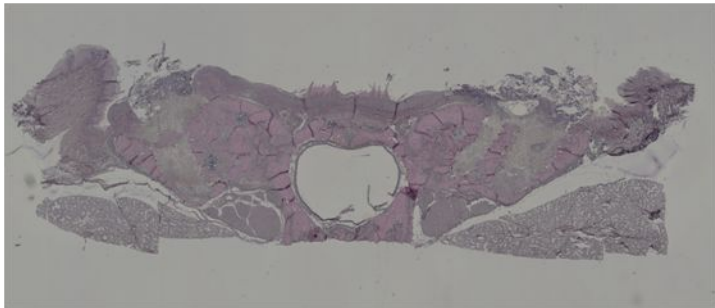
右側抜歯窩拡大図。第一臼歯が抜去され、移植歯髄組織及び血餅で満たされている。



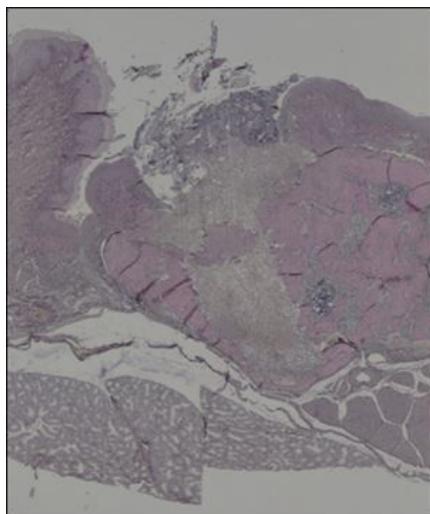
左側抜歯窩拡大図。第一臼歯が抜去され、血餅で満たされている。

次に、抜歯後1日目において組織学的に検討したところ、右側には歯髄組織が確認され、左側では血餅のみが確認できるものの、抜歯当日と大きな差は確認できなかった。

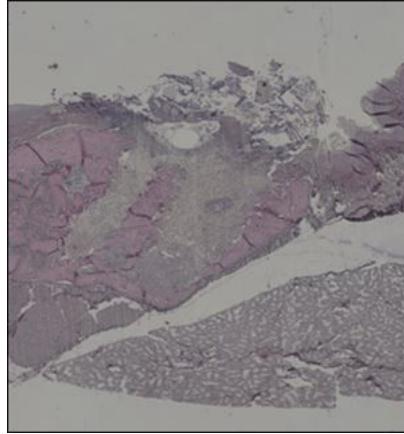
さらに抜歯後3日目において組織学的に検討すると、右側の歯髄組織移植群において新生骨形成が認められるものの、左側のコントロール群において骨組織形成は認められず、抜歯後即時歯髄組織移植による抜歯窩治癒促進効果が認められた。



抜歯後3日目のマウス上顎第一臼歯部の全体像。右側は歯髄移植群、左側はコントロール群。

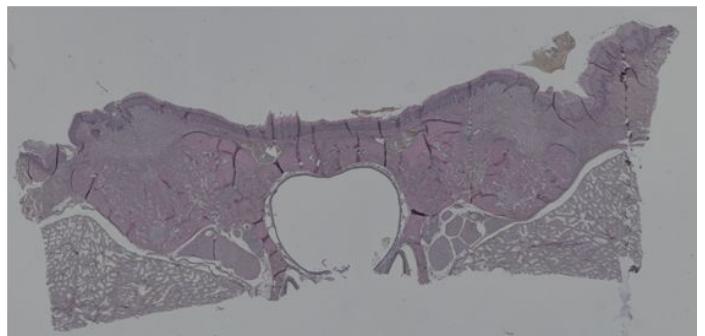


右側抜歯窩拡大図。第一臼歯が抜去され、その抜歯窩が移植細胞及び血餅で満たされており、かつ、一部に幼弱な骨形成が認められる。

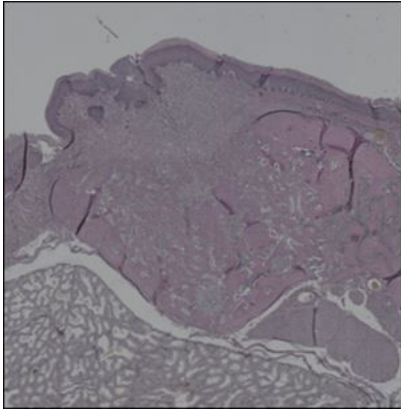


左側抜歯窩拡大図。第一臼歯が抜去され、抜歯窩は血餅及び細胞成分で満たされているが、骨形成は認められない。

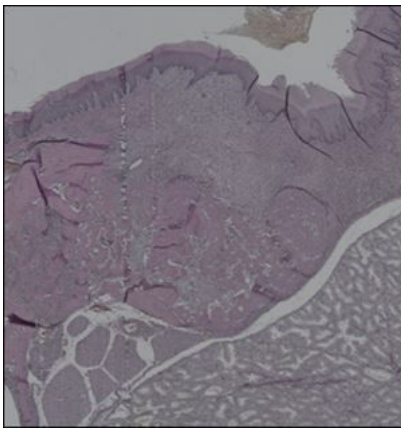
加えて、抜歯後5日目、7日目においても組織学的検討を行ったところ、右側の歯髄組織移植群において新生骨形成が認められたものの、左側のコントロール群においても新生骨形成が認められた。左右の新生骨形成部分を NIH Image 等の画像解析ソフトを用いて左右で比較検討したところ、右側に治癒促進傾向が認められるものの、明らかな有意差は認められなかった。また、3日目に関しても、右側のみで新生骨形成の認められる個体があるものの、そうでない個体も認められ、移植された歯髄組織量や、比較する経時的タイミングなどもさらに詳細に検討する必要があると思われた。



抜歯後7日目のマウス上顎第一臼歯部の全体像。右側は歯髄移植群、左側はコントロール群。



右側拔牙窩拡大図。拔牙窩が細胞成分で満たされており、かつ、新生骨形成が認められ、治癒が進んでいるのがわかる。



左側拔牙窩拡大図。拔牙窩が細胞成分で満たされており、かつ、新生骨形成が認められ、治癒が進んでいるものの、右側に比較して骨形成量が少ない傾向にあった。ただ、明らかな有意差は認められなかった。

これらの組織に対して、拔牙窩治癒過程における新生骨形成を評価するために骨関連分子、幹細胞関連分子、線維芽細胞関連分子を指標として免疫組織化学的検討を行ったところ、これらの分子の発現に明らかな有意差は認められなかった。ここまでの結果はラットにおいても同様であった。

これらの結果から、拔牙窩における即時歯髓組織移植による治癒促進法は、ある程度の治癒促進作用があると思われるものの、より効果的な方法とするためには今後改良が必要であると考察される。今後は、歯髓組織を移植する際にコラーゲンスポンジやゲルなどの移植歯髓組織のスキヤホールドとなるような基材を用いての検討を行うことで、移植歯髓組織による拔牙窩治癒促進効果が得られるか否かを検討し、エビデンスの蓄積を行い、臨床応用を目指す予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計1件)

竹部祐生亮、館原誠晃、今村武浩、福島龍洋、戸田(徳山)麗子、里村一人 歯髓幹細胞の効率的回収を可能とする新規凍結保存法の開発、第26回日本口腔内科学会・第29回日本口腔診断学会合同学術大会、2016年

6. 研究組織

(1)研究代表者

徳山 麗子 (TOKUYAMA, Reiko)

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：20380090

(2)研究分担者

里村 一人 (SATOMURA, Kazuhito)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：80243715

井出 信次 (IDE, Shinji)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：00611998