

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 1 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592886

研究課題名(和文) 歯根膜から得た細胞を用いた三次元再構成培養組織を併用する歯の再植法に関する研究

研究課題名(英文) A study of intentional replantation using with three-dimensional reconstructed organotypic culture of rat periodontal cells

研究代表者

五十嵐 勝 (IGARASHI, MASARU)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：90168104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、6週齢のラットM1の抜歯手技を確立後、正常な歯周靭帯を有する歯の意図的移植後の治癒経過をまず検索した。また、M1の近心根を切断し、歯髄と歯周組織を除去後、歯根軸に沿って4分割し長さ1mmに調整した。この小片を抜歯後2週時に、骨面に形成した浅い皿状欠損上に象牙質小片を移植した。歯根膜に細胞の量が少なかったため、PDL細胞は初代培養で得られなかった。2、4週後、動物は屠殺し、パラフィン包埋後、連続断片をHE染色し観察した。標本では、歯根の外部吸収例が観察されたが、いかなる炎症反応は全ての実験群でもみられなかった。周囲組織の治癒形態は線維性癒痕治癒を示し、骨性癒痕治癒はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：This investigation showed the procedures for extraction of rat upper molar and the healing process after intentional implantation of the tooth with normal periodontal ligament. The periodontal tissues were obtained from the molar tooth and used for the primary culture. The largest root was cut off and the dental pulp and periodontal tissue were removed. The root was cut into the 4 pieces at longitudinal plane and 1mm length. Two weeks later, the piece was replanted to the previous tooth socket. The animals were sacrificed after 2 and 4 weeks and the decalcified paraffin sections were prepared. The sections were stained with hematoxylin-eosin and observed. The sections showed that the resorptions of the root surface appeared at 2 and 4 weeks. However the inflammations were not seen on any experimental groups. The type of the tissue healings were fibrous scar healing not osseous healing.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯根膜 再生医学 三次元培養 再植法 抜歯窩 歯根 セメント質 移植

1. 研究開始当初の背景

外傷性脱臼歯で良好な治癒経過を得るためには、脱臼後にできるだけ早期に再植することが重要である。健康な歯根膜が存在する場合、歯根の表面にある歯根膜と歯槽窩表面に残った歯根膜が再植後に再度連結し健康な状態で歯が復位することが期待でき、その後、歯の機能を維持することができる。一方、歯根膜の損傷が著しい場合には debridement 後に再植を行う必要があり、そのような歯根膜組織を失った歯では、再植後の歯根の外部吸収や置換性骨吸収が起こりやすく、予後不良例が多い。平成6年度科学研究費補助金では、歯の再植する際、患歯の根管を開放する場合と根管充填後の再植の違いについて検索した結果、根管開放で根尖部の浸出液による内圧をコントロールして行う方が歯根膜の再生に良好な結果が得られている。また、歯根膜を擦過除去して再植を行うと骨性癒着 ankyloses が生じやすく、置換性外部吸収も起こることを発表した。平成21~23年度科学研究費補助金では、歯根膜から得られた線維芽細胞と上皮細胞を用いて三次元再構成培養組織を形成し、ヌードマウスの背中に形成した皮膚欠損部に移植した後の組織修復を検索した結果、移植片はマウス背部組織に生着し、体毛や皮脂腺などの皮膚付属器官を含まない上皮組織による治癒形態を観察することができた。現在まで、抜去歯歯根膜から線維芽細胞と上皮細胞を分離増殖させ三次元再構成培養組織を形成することができるようになり、その移植の可能性が示された。

2. 研究の目的

外傷で脱臼した歯を再植する場合、良好な治癒経過を得るには健全な歯根膜の存在と迅速な対応が重要である。歯根膜の汚染や損傷が著しい場合や脱臼歯が乾燥して歯根膜組織が壊死したと考えられる場合には、それ

らの壊死組織を徹底して除去しておく必要がある。ところが、歯根膜などの軟組織を失い、セメント質や象牙質が露出した状態で再植が行われると、歯根の外部吸収や骨性癒着が起こりやすいといわれている。そこで再植を行った後、歯根膜様の線維組織を根面に再生させることができれば、破骨細胞のセメント質吸着を防止でき、術後の外部吸収、骨性、置換性歯根吸収などを回避できるものと推察できる。本研究は、歯髄や歯根膜などの軟組織を伴わない象牙質小片をラット歯肉下に埋入し、その後の組織反応を検索するための実験術式を確立させることを目的として行われた。

3. 研究の方法

実験 抜歯術式の確立

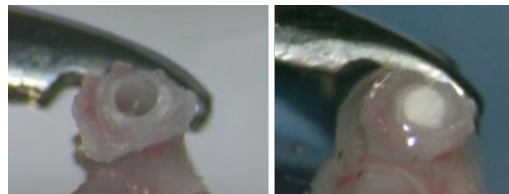
(1)ラット全身麻酔による全身管理と上顎第一臼歯の抜歯手技の確立

ラット全身麻酔

薬剤として4%抱水クロラルを用い、1ml/100gで腹腔内注射を施し、10分間観察後、麻酔の安定を行った。実験にはWistar系雄性ラット5週齢を入手し、環境が管理された動物舎内で環境に慣らすために1週の予備飼育を行い実験に供した。6週齢ラットは体重が200g前後のため、各ラットに応じた必要な用量の全身麻酔薬を腹腔内投与で応用した。

ラット四肢の固定と上下顎骨の固定

ラット手術台としてプラスチック板を改造して作製し、四肢をたこ糸で固定し、同様にタコ糸で開口状態を維持した。マグネット式スタンドを取り付けられるように、プラスチック板表面に厚さ1mmのステンレス板を貼り付け、固定源とした。全身麻酔中の体温維



持には、使い捨てカイロを動物の背部に敷き保温を行いながら実験を遂行した。

局所麻酔

30G 注射針を取り付けたツベルクリン用シリンジを使用し、2%リドカイン液(1/8万エピネフリン含有)0.01mlを口蓋皺壁から刺入して浸潤麻酔を施した。歯肉の貧血帯を確認しながら行い、そのまま1分間注射針を刺入したまま維持し、抜針した後は刺入点をヘラ型充填器で圧接して麻酔液が逆流しないようにした。

歯周靭帯の切断と歯の脱臼

ヤマウラ社製スプーンエクスカベーター(#18)を使用し、歯肉溝に刃部を挿入し、M1全周の靭帯を切断した。

歯の脱臼には、まず刃部を隣接面に挿入して歯間離開を行い、その後、遠心頬側咬頭を近心舌側方向に持ち上げるように力を加えるようにして行った。M1の歯根は5根性で、近心舌側根が最も太く、舌側中央の根が細くて破折を生じやすい。脱臼は歯肉溝からの出血が生じる事で確認できるため、歯間周囲から出血で脱臼を確認し、次の抜歯に取りかかった。

実験 歯根膜残存歯の再植後の歯根膜変化について

(1)実験動物に6週齢のwistar系雄性ラット16匹を使用し、全身麻酔下で手術台に固定後、上顎右側第一臼歯(M1)口蓋歯肉に2%キシロカイン(1/8アドレナリン含有)0.1mlで浸潤麻酔を行った。通法に従いエレベーターで脱臼後、鉗子で抜去した。近心舌側根の根尖約0.5mmをダイヤモンドポイントで切断し、さらに0.5mmの深さの逆根管充填用窩洞を形成した。窩洞内を乾燥後、被験材料のMTAで逆根管充填を施した後、抜歯窩に再植を行った。S-PRGは粉液比を1:2とした。

(2)再植後の縫合や固定は行わず、そのまま静置した。実験期間を術後0日、2週、4週

とし、倫理規定術式に則り動物を安楽死後、根尖歯周組織を含めて実験歯ごと摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中に固定した。その後、試料を10%EDTAで脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行い、厚さ6 μ mの連続パラフィン切片を作製し、HE染色を施して光顕にて観察した。

なお本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部倫理委員会の承認(承認番号NDUN-137)を得て実施された。

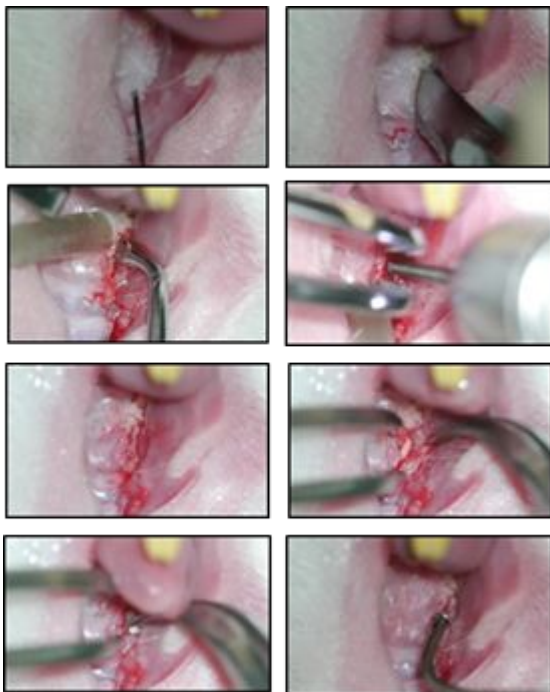
実験 抜歯窩への象牙質片移植後の組織反応

(1)外傷で脱臼した歯を再植する場合、良好な治癒経過を得るには健全な歯根膜の存在と迅速な対応が重要である。歯根膜の汚染や損傷が著しい場合や脱臼歯が乾燥して歯根膜組織が壊死したと考えられる場合には、それらの壊死組織を徹底して除去しておく必要がある。ところが、歯根膜などの軟組織を失い、セメント質や象牙質が露出した状態で再植が行われると、歯根の外部吸収や骨性癒着が起こりやすいといわれている。そこで再植を行った後、歯根膜様の線維組織を根面に再生させることができれば、破骨細胞のセメント質吸着を防止でき、術後の外部吸収、骨性癒着、置換性歯根吸収などを回避できるものと推察できる。本研究は、歯髓や歯根膜などの軟組織を伴わない象牙質小片をラット歯肉下に埋入し、その後の組織反応を検索するための実験術式を確立させることを目的として行われた。

(2)材料および方法:wistar系雄性ラット6週齢9匹を使用した。動物にチオペンタール25mg/kgを投与して全身麻酔を施し、手術台に固定した。上顎右側第一大臼歯(M1)の口蓋歯肉に浸潤麻酔を施し、歯科用エクスカベーターを抜歯用挺子として使用し、歯の抜去を行った。抜去歯の歯根表面を#11フェザーメスで擦過し、可及的に歯根膜組織を除去し

た後、近心根を根分岐部付近で切断し、抜髄と根管拡大を行った。根中央部を約 2 mm の大きさに調整し、歯根の長軸方向に沿って 4 分割し、滅菌生理食塩液中に浸漬し - 30 で凍結保存した。

抜歯 4 週後に抜歯窩相当部の歯肉を #15 メスで切開し、歯肉を剥離して歯槽骨を露出させた。カーバイトバーを使用し、骨面に約 0.5 mm の深さの窩洞を形成した。解凍した象牙質小片を窩洞内に埋入後、歯肉弁を復位した。創面の縫合は行わず、1 x 1.5 mm 大の滅菌不織布に手術用アロンアルファ A「三共」(第一三共株式会社)を浸潤させて創面を被覆し終了した。術後 2、4 週時にラットを安楽死させ、被験部位を根尖部歯周組織も含めて摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液中で固定を行った。試料を 10%EDTA で脱灰後、通法に従いパラフィン包埋を行い、厚さ 6 μm の連続切片を作製後、HE 染色を施し顕微鏡にて観察した。なお本研究は日本歯科大学新潟生命歯学部動物実験倫理委員会の承認(承認番号 137)を得て実施された。

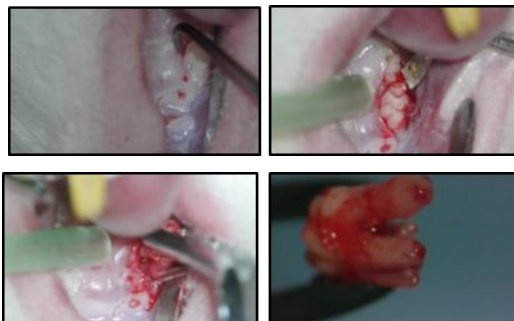


4. 研究成果

(1) 抜歯術式の確立(実験)

ラット上顎第一臼歯 M1 の歯冠の大きさは、

近遠心頬舌で 1 x 2 mm 程度であり、歯の全長は約 2 mm と短い。そのため、ヒト抜歯鉗子よりも破骨鉗子の大きさが適合しているが、把持する際の力の加え方が難しく、歯冠破折が容易に起きるため、根管充填用ピンセットでの把持が良いことが分かった。抜歯に使用する最適な器具の根管充填用ピンセットは、横溝と縦溝が歯の把持に都合が良く、歯の滑脱が起こりにくく、強く把持してもピンセットが湾曲するだけで歯の破折は生じる力が加わらない利点があった。そのままやや歯を頬舌方向に揺さぶりながら咬合面方向に引き上げると歯の破損なく抜歯ができることがわかった。この時、頸部が真っ直ぐに伸びると頸部の圧迫が生じて疼痛性ショックや頸椎脱臼による死亡が起きるため、頸部は水平にならないように頸部を持ち上げて行う必要がある。抜歯後の止血を確認後、血餅が形成されたことを確認して抜歯を終了する。



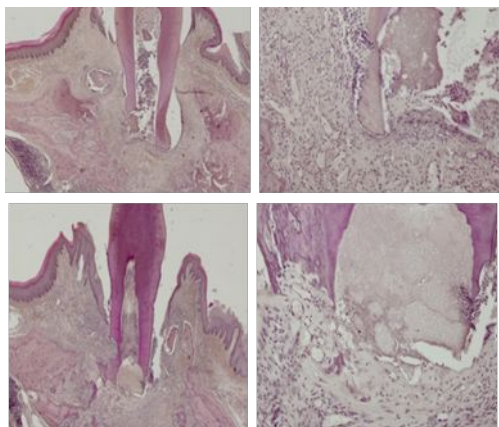
ラット頭部の処置をする際、頸部が床と平行な体位をとると、頸部の圧迫や気管の圧迫により気道閉塞が起こり、呼吸困難となり、窒息状態となって術中死に至ることが頻回に発生した。その際は、3ウェイシリンジで空気を肺に送り込む人工呼吸が有効であった。たびたびシリンジでの呼吸再開で一命を取り留めることが可能であった。そこで下顎を挙上する際も頭部が後方に傾斜し過ぎないように、シリコンパテで安頭台を作製し、頸部の保護を行うこととした。それにより抜歯時に加わる力で頸部の損傷を避けることが可能となった。

(2) 歯根膜残存歯の再植後の歯根膜変化(実

験)

ラット上顎右側 M1 の根尖部逆根管充填用窩洞と充填材料及び根尖周囲組織の組織学的観察を行った。実験歯は全て抜歯窩に生着し、脱落したものはなく、歯肉の炎症や膿瘍形成例はなかった。組織学的観察の結果、ラット歯根の象牙質厚径が薄く、窩洞形成時に方向がわずかにそれることで根尖部歯質が欠損してしまう例がみられた。

窩壁欠損例では、術後 0 日で既にセメントの脱落が生じた例があった。術後 0 日では根尖部に血餅が満たされ、死腔がみられることはなかった。術後 2 週では新生肉芽組織の形成がみられ、残存セメントと組織の界面には線維性癒痕治療がみられ、線維組織での被包が開始していた。術後 4 週では両群ともセメントに接する組織は線維性組織で硬組織添加はみられなかった。セメントの脱落した部位には肉芽組織の侵入がみられたが、残存するセメントとの界面に強い炎症所見はみられなかった。



本研究はラット上顎臼歯を用いて意図的再植を行い、逆根管充填の根尖部窩洞に応用したセメント界面に対する根尖周囲組織の反応を観察したものである。セメントに接触する歯根膜組織は線維性癒痕傾向を示しており、硬組織形成までは観察できなかったが、強い炎症反応等は観察されなかった。実験期間が短いことと再植術を併用した逆根管充填歯という術後侵襲の強い術式が関係していると考えられ、更に長期の観察の必要性が

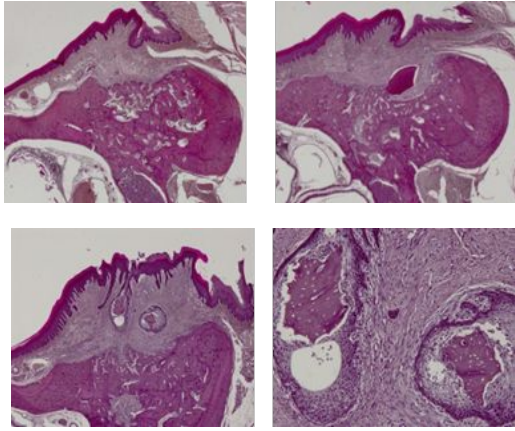
考えられた。根尖部歯根面に外部吸収が点在して観察されたが、意図的再植の影響によるものと考えられる。6 週齢のラットの M1 近心根は根尖未完成歯であったため根尖部歯質が薄く、窩洞形成後の歯質は薄く部分的に歯根膜穿孔がみられた。その手技上の理由からセメントの脱離例もあり、0 日で既にセメントを観察できない例もあった。手技の改善が必要であると考え。逆根管充填窩洞に穿孔が生じないように、窩洞形成の方向を定める必要性が示された。今後は窩洞形成や滅菌切削器具の徹底を含めた手技及び実験例数と実験期間の検討を継続する予定である。

以上の結果から、歯根膜の残存部位は抜歯歯根と歯根周囲組織が生着し、良好な炎症反応のない治癒を示した。また、根尖封鎖材と根尖部新生組織の界面には炎症反応が少なく、根尖歯周組織には線維性癒痕治療が生じており、組織刺激性の少ない材料であることが示された。

(3) 抜歯窩への象牙質片移植後の組織反応 (実験)

埋入した歯根片の多くは脱落し、歯肉下に残留したのは 2 例のみであった。埋入部に残存した象牙質小片は術後 2 週では、周囲組織に炎症性細胞浸潤はみとめられず、新生肉芽組織にて被包され、線維性癒痕を示していた。マクロファージや破歯細胞の発現は明らかではなく、セメント質などの硬組織添加や歯根膜様組織の再生もみられなかった。骨小片が歯肉内に残存した場合、上皮突起から上皮細胞が伸長して被包しており、骨表面は凹凸を示し、吸収が盛んに生じていた。埋入片の脱落は、口腔切創の接着法が不十分であったことや、不織布の違和感からラットが除去行為を行った際に創面から排出した可能性が考えられ、歯肉弁に対する縫合を今後検討する必要性が認められた。

本研究で M1 の抜歯術の術式が確立でき、抜歯窩への再植も可能であることが確認で



きたことから、創面の縫合と埋入片脱落に対する対策を行うことで再植実験系を確立できることが示された。今後は、歯肉切開部の縫合法を確立するとともに、脱臼歯から得られた歯根膜由来線維芽細胞をコラーゲンゲルと併用し、セメント質再生や歯根膜再生、外部吸収防止等について検索を継続する予定である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

(1)新井恭子、北島佳代子、五十嵐 勝、飯野華絵、山田理絵：歯の再植後の硬組織変化に対する組織学的検索モデルに関する考察。日本歯科保存学会 2015 年度春季学術大会 (第 143 回) プログラム・抄録集：

<http://www.hozon.or.jp/member/pdf/abstract143/all.pdf>

(2)飯野華絵、北島佳代子、新井恭子、五十嵐 勝：試作イオン徐放性 S-PRG 含有ルートチャンネルシーラーの根尖歯周組織治癒に関する組織学的評価，日本歯科保存学会 2014 年度秋季学術大会 (第 141 回) プログラム・抄録集：

<http://www.hozon.or.jp/member/pdf/abstract141/all.pdf>

6. 研究組織

(1)研究代表者

(1)研究代表者

五十嵐 勝 (IGARASHI MASARU)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・教授

研究者番号：90168104

(2)研究分担者

北島 佳代子 (KITAJIMA KAYOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：00177841

新井 恭子 (ARAI KYOKO)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：10434143