

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463073

研究課題名(和文)凍結保存歯の歯根膜細胞は高い増殖能を維持できるか

研究課題名(英文)Proliferating activity of cryopreserved periodontal ligament cells

研究代表者

小野 由起子(ONO, Yukiko)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師

研究者番号：80345511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯の移植には健全な移植歯と移植床が同時に存在する必要があり、適応症が制限されるため、私たちは凍結保存歯の移植を検討し、これまでの研究において凍結保存歯の歯周組織が再生可能であることを明らかにしてきたが、歯周組織再生の遅延や緩慢な置換性歯根吸収がみられることがある。そこで凍結保存歯の歯根膜細胞の高い増殖能を長期間維持する凍結保存方法を検討した。4週齢雄性Wisterラットの大白歯をプログラムフリーザーによる緩速凍結法、過冷却急速凍結法を用いて凍結し、一定期間凍結保存した後急速解凍して歯根膜細胞を分離、培養して増殖能を調べたところ、過冷却急速凍結群の増殖能が若干高いものの有意差はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to compare the effect of some cryopreservation methods on periodontal regeneration of rat teeth in vitro. The maxillary molars of 4-week old Wister rats were extracted and frozen by gradual freezing method using a programmed freezer or super cooling-rapid freezing method for 1, 3, 6, 9, 12 months, and then thawed in a water bath at 37°C. The periodontal ligament cells were isolated and cultured. Cell proliferation of super cooling-rapid freezing group was slightly higher than gradual freezing one, but there was no significant difference.

研究分野：口腔外科学

キーワード：凍結保存 歯 歯根膜 幹細胞 培養 細胞工学 再生医療

1. 研究開始当初の背景

歯は咀嚼機能を担う最も重要な器官であるが、加齢に従って蝕や歯周病で失われてしまうことが多い。このような歯の欠損部に新たに歯を補う方法として、歯の再生に関する研究が盛んに行われてはいるものの、未だ臨床応用には至ってはならず、現在のところ歯の欠損を補う方法としては義歯、ブリッジ、歯科インプラントに加え、歯の移植が有用とされている()。歯の移植は、移植歯の歯周組織が良好に治癒し再生すれば、正常歯と同様の機能を果たすことが可能であるという点で人工材料による治療よりも優れており、また埋伏智歯など機能していない歯を移植歯として用いるために、自分自身の組織や器官を有効活用できるという利点がある。新潟大学歯学総合病院「歯の移植外来」では、主に埋伏智歯や矯正治療で便宜的に抜去された第一小臼歯などの歯根完成歯の移植を年間 60-70 例行っているが、90%の症例が良好に経過していることが示された()。しかしながら、歯の移植の対象のほとんどは移植歯の抜歯と移植を同時に行う「即時移植」であり、健全な移植歯と移植床が同時に存在する必要があり、このことが歯の移植の適応症を制限している。

そこで私たちは、歯の移植の適応症拡大のため、歯を一時的に保存して移植する「歯の凍結保存と凍結保存歯の移植」について検討を進めており、現在までに 200 歯以上を凍結保存し、そのうち 12 例に移植を行い概ね良好な結果を得ているが、なかには緩慢な置換性歯根吸収が認められるものもあり、その原因として凍結保存による歯根膜の損傷が考えられる()。凍結保存歯の移植に関する基礎研究として、私たちはこれまでラット臼歯を腹部皮膚に移植する実験系を用いて、凍結保存歯の歯周組織再生能力について検討してきた。その結果、ラット臼歯を抜去しプログラムフリーザで緩速凍結した後、ディープフリーザで最低 1 晩から最長 6 か月間凍結保存したところ、保存期間が長くなると抜歯直後の歯に比べ、腹部移植後の歯周組織再生速度は遅延する傾向にあることが判った()。実際の臨床症例では凍結保存期間は年単位であることが多いが、以上のような問題点を考えると、現在私たちが行っている凍結保存方法でどのくらいの期間歯の凍結保存が可能かについては明らかになってはいない。一方、私たちはこれまでラット大腿骨から採取した骨髓細胞と -TCP の複合体によって歯周組織再生を試みている()、科学研究費補助金 若手研究 (B) No.16791232、基盤研究 (C) No.19592288、基盤研究 (C) No.22592210) が、この研究においては 1 年以上凍結した細胞を用いても採取直後の細胞と同程度の骨形成がみられている。このことから歯根膜細胞自体が凍結操作によるダメージを受けやすい性質をもつのか、組織レベルと細胞レベルでは凍結操作で受ける影

響に違いがあるのかという疑問が生じる。そこで、歯をより長期間凍結保存することが歯周組織再生能力にどのように影響するのかを明らかにするために、凍結保存歯から採取した歯根膜細胞と、抜去直後の歯から採取した歯根膜細胞を培養し、細胞増殖能を分析し、凍結保存期間、凍結保存方法ごとに比較検討することでこれまでの in vivo 研究の側面だけでなく、in vitro の側面からもアプローチすることができ、凍結保存歯の歯周組織再生能力について総合的な評価ができると考えた。

2. 研究の目的

ラット臼歯を抜去し、これまで私たちが行ってきた理論的には理想的手法とされるプログラムフリーザを用いた緩速凍結法(緩速凍結群)、近年簡便かつ保存能力が高いと推奨されている過冷却急速凍結法(過冷却急速凍結群)を用いて凍結保存を行い、凍結保存後 1、3、6、9、12 か月間経過時に凍結保存歯を解凍して歯根膜細胞を単離、培養し、細胞増殖能等について凍結保存期間、凍結方法による差を検索する。対照群として抜去直後のラット臼歯の歯根膜細胞を単離、培養し、細胞増殖能等を検索する。それぞれの凍結保存法によって凍結保存された歯の歯根膜細胞集団および凍結保存をしない歯の歯根膜細胞集団の結果を比較し、歯根膜細胞へのダメージをできるだけ抑える凍結保存方法について検討し、歯根膜幹細胞の高い増殖活性を長期間維持する凍結保存方法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 凍結保存歯の作製

本研究には、4 週齢 Wistar 系雄ラットを用いるが、どの操作もセボフルレンで麻酔導入後、抱水クロラルを腹腔内投与して麻酔を施し、十分に徐痛が得られた状態で行った。上顎第一、第二臼歯を抜歯後、プログラムフリーザ(太陽東洋酸素)による緩速凍結法、過冷却急速凍システム(三菱)による過冷却急速凍結法によって凍結し、-80 のディープフリーザで 1、3、6、9、12 か月間凍結保存した。凍害防止剤はセルバンカー® 1(日本全薬工業)を用いた。また解凍は 37 の恒温槽で加温しておこなった。対照として凍結しない上顎第一、第二臼歯を用いた。

(2) 歯根膜細胞の培養(凍結保存群、非凍結保存群(対照群))

凍結保存歯および凍結していない歯の歯根膜を採取し、歯根膜細胞を培養した。すなわち歯根膜を歯根上方 1/3~1/4 部から No.15 メスで切離して、24 well ディッシュを用い、expansion technique で行った。実験には 2 回目の継代時に獲得した細胞を用いた。緩速凍結法で凍結保存した歯から採取した歯根膜細胞を緩速凍結群、過冷却急速凍結法で凍結保存した歯から採取した歯根膜細胞を過冷却急速凍結群、凍結保存していない歯から

採取した歯根膜細胞を対照群とした。

(3) 凍結保存歯の歯根膜細胞の増殖能分析、細胞の形態観察および酵素組織化学的検索
上述の方法で獲得した歯根膜細胞を Type コラーゲン処理した 6 well ディッシュに 1×10^4 個で播種し、1 日置きに 2 週間、まず位相差顕微鏡で細胞像を観察してからトリパンブルーで細胞の染色を行い生細胞数を計測し、結果を統計学的に分析した。また培養 2 週目に骨芽細胞系細胞のマーカー酵素であるアルカリホスファターゼ活性を酵素組織化学的染色で検索した。

なお動物実験に関しては、新潟大学動物実験委員会に実験計画の申請を行い、許可を受けたあと実験を開始した。動物実験の指針は「動物の愛護および管理に関する法律」、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本方針、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学術会議）に基づいて作成された新潟大学動物実験規則に従って行った。

4. 研究成果

歯の移植を成功に導くための最も重要な因子は歯根膜細胞の増殖能を含む活性の維持である。健全な移植床と移植歯が同時に確保できないなど即時移植ができない場合、歯を凍結保存することは歯の移植の適応症の拡大につながる。そこで凍結保存した歯の歯根膜の損傷を最小限にして移植歯の生着率を上げるためには、歯根膜細胞の増殖能をできるだけ維持する凍結保存方法を選択することが必要となる。

凍結速度が速すぎると凍結時に細胞内に氷晶が形成され細胞を傷害し、遅すぎると細胞内外の浸透圧のバランスが崩れて細胞内脱水が生じ細胞が過収縮を起こす。そこでこれまでは精密に温度と時間をコントロールできるプログラムフリーザを用いて緩速凍結法をおこなってきた。一方、水の温度が凍結点より低くなっているにも関わらず凍結しない過冷却状態の細胞に急激な温度変化や衝撃を与えると氷核が生まれ、一気に凍結させることができる過冷却急速凍結法は、氷の結晶が非常に微細となるため、細胞が破壊されにくくなるといわれている。

今回は歯根膜細胞への傷害が少ないと考えられるこの 2 つの方法を用いて歯の凍結保存を行い、一定期間のちに解凍して歯根膜組織を採取し、そこから歯根膜細胞を分離して培養し、実験に用いた。その際、解凍は細胞内氷晶が大きくなる再氷晶化現象を防ぐために 37 の恒温槽で素早くおこなった。

緩速凍結群、過冷却急速凍結群を比較すると過冷却急速凍結群の歯根膜細胞の増殖能が若干高いものの有意差はみられなかった。両者ともに対照群と比較すると増殖能は低下していた。いずれも培養 5 日目頃から活発な細胞増殖を示し、11 日目頃にはほぼコンプレントとなった。また凍結保存期間による有意

差はいずれの群においても認められなかった。形態学的観察においては、どちらの凍結保存群のいずれの凍結保存期間においても対照群と同様の細胞形態を示した。また培養 2 週目では実験群、対照群いずれにおいても多数の細胞にアルカリホスファターゼ活性陽性反応がみられたことから、いずれの凍結保存群においても歯周組織再生能、特に歯槽骨再生能が十分保たれている可能性が示唆された。これらのことから、過冷却急速凍結法は従来のプログラムフリーザによる緩速凍結法よりも比較的短時間に簡便に凍結保存することができ、しかも緩速凍結法と同程度の細胞増殖能を保つことができるので、有用な歯の凍結保存方法であることが示唆された。また凍結保存期間によって細胞増殖能に有意差は認められなかったことから、12 か月程度であれば凍結保存期間が歯根膜細胞の増殖能に大きな影響は及ぼさないと考えられた。

歯を凍結保存する意義を考慮すると、今後はさらに長期間の凍結保存が歯根膜細胞に及ぼす影響を検討する必要がある。またラットの皮下に歯を移植する実験系を用いて in vivo での凍結保存歯の歯周組織再生過程を組織学的に比較したいと考えている。

<引用文献>

- Mejäre B, Wannfors K, Jansson L. A prospective study on transplantation of third molars with complete root formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* Vol.97(2), 2004, 231-238
- Sugai T, Yoshizawa M, Kobayashi T, Ono K, Takagi R, Kitamura N, Okiji T, Saito C, Clinical study on prognostic factors for autotransplantation of teeth with complete root formation. *Int J Oral Maxillofac Surg.* Vol.39(12), 2010, 1193-1203
- Yoshizawa M, Koyama T, Izumi N, Niimi K, Ono Y, Ajima H, Funayama A, Mikami T, Kobayashi T, Ono K, Takagi R, Saito C, Autotransplantation or replantation of cryopreserved teeth: a case series and literature review, *Dental traumatology*, Vol.30, 2014, 71-75
- Kawasaki N, Hamamoto Y, Nakajima T, Irie K, Ozawa H, Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. *Arch Oral Biol.* Vol. 49(1), 2004, 59-69
- Izumi N, Yoshizawa M, Ono Y, Kobayashi T, Hamamoto Y, Saito C, Periodontal regeneration of transplanted rat teeth subcutaneously after cryoreservation, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* Vol.36, 2007,

838-844

小野由起子、泉 直也、芳澤享子、齊藤力、骨髓細胞・多孔性 -TCP ブロック複合体による骨形成に関する組織学的検討、日本口腔外科学会雑誌、53 巻、2007、468-480

5 . 主な発表論文等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小野 由起子 (ONO, Yukiko)
新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・非常勤講師
研究者番号： 8 0 3 4 5 5 1 1

(2)研究分担者

芳澤 享子 (YOSHIKAWA, Michiko)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号： 6 0 3 0 3 1 3 7