

令和元年6月13日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20467

研究課題名(和文) 歯髄由来細胞含有コラーゲンゲルで被包した意図的再植歯周囲の硬組織再生に関する研究

研究課題名(英文) A study of hard tissue regeneration around on the periodontal ligament in tooth replantation using dental pulp cells

研究代表者

山田 理絵 (YAMADA, Rie)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・非常勤講師

研究者番号：70772151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、歯髄由来細胞が象牙質や歯根膜組織などへの分化の可能性を検索することである。まず、ラット切歯歯髄の初代培養を行った。象牙質片を作製し、歯髄由来細胞含有コラーゲンゲルで被包し、ヌードマウスの背部皮下に移植した。6週後に屠殺し、パラフィン切片で観察した。象牙質片周囲に新生血管と象牙芽細胞様構造が観察された。

つぎにラット上顎第一臼歯の近心根に逆根管充填を行い、歯根膜組織を可及的に取り除いた後抜歯窩に歯髄由来細胞含有コラーゲンゲルを注入、復位した。2、4週後に屠殺し、パラフィン切片で観察した。根尖部付近で新生骨様組織が、歯頸部付近でセメント質に埋入するコラーゲン線維がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、乳歯や永久歯の歯髄幹細胞を利用した再生医療の開発が進められており、将来の再生医療分野で期待される。本研究は、ラットの歯髄から得た細胞が象牙質および歯根膜組織に分化する可能性を検討する目的で行った。培養した細胞を含有させたコラーゲンゲルに象牙質片を被包させてヌードマウスに移植すると、象牙芽細胞様構造が観察され、象牙質分化マーカーの発現がみられた。またラット第一臼歯を抜歯し、細胞含有コラーゲンゲルを注入し再植すると、歯頸部分でコラーゲン線維が観察され、根尖部分では新生骨様組織がみられた。以上から移植した歯髄細胞がコラーゲンゲルを足場とし、生体組織との相互作用が起これり分化した可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is searching for differentiation the dental pulp-derived cells possess the potential to dentin and periodontal tissue. First, primary culture of rat incisor dental pulp tissue was performed. The dentin pieces were encapsulated with dental pulp-derived cells-containing collagen gel and transplanted subcutaneously in the back of nude mice. 6 weeks later nude mice were sacrificed and observed. New blood vessels and odontoblast-like structures were observed around the transplanted dentin pieces. Next, the mesial root canal of the maxillary first molar of the rat was filled with the retrograde root canal filling material, and the periodontal ligament was removed. Dental pulp-derived cells-containing collagen gel was injected into the extraction socket and the tooth were returned. 2 weeks and 4 weeks later, rats were sacrificed and observed. New bone-like tissue was observed the apical area, and collagen fibers entering cementum near the cervical area were observed.

研究分野：歯内療法

キーワード：歯髄 コラーゲンゲル 再生医療 移植 細胞培養

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

外傷により過度な外力を受けて脱臼した歯は、歯根膜線維と歯髄血管の断裂を早期に治癒させるために、可能な限り早く歯を正しい位置に戻し、安静を保つことが大切である。ところが、脱落後の経過時間が長く歯根膜に障害が及んだ場合や歯根膜汚染が著明で保存不能な場合、壊死歯根膜に対し debridement を施した後に再植術が施される。その場合、セメント質が剥き出しの状態となるため、術後に外部吸収や骨性癒着を生じやすくなり、その防止には歯根膜様組織の介在が必要となる。

所属研究室では Michigan 大学との共同研究により、収縮することがないコラーゲンを使用した三次元組織培養法で、再構成培養法を確立した。また平成 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再構成した三次元再構成培養組織をヌードマウスの背部皮膚欠損部に移植し、移植片がマウス背部組織に正着し、上皮組織による治癒形態が起きることを観察した。そこでは、移植に用いた細胞に生細胞染色法を施しておいたことから、移植後の細胞の生存を確認できたことにより、移植に用いた細胞が周囲組織と融合することを確認できた。

引き続き研究では、歯根膜由来細胞を併用する象牙質片周囲の硬組織添加について検索し、コラーゲンの併用がない場合には、埋入象牙質片は線維性組織により被包されるとともに、一部では外部吸収や新生骨と癒着が発現することが確認された。

2. 研究の目的

外傷により過度な外力を受けて脱臼した歯は、歯根膜線維と歯髄血管の断裂を治癒させるために、可能な限り早く歯を正しい位置に戻し、安静を保つことが大切である。脱臼歯の歯根膜の汚染や損傷が顕著な場合や長時間放置されて歯根膜組織が壊死した場合、歯根膜組織は徹底して除去される必要がある。しかし、歯根膜様の軟組織を失いセメント質や歯根象牙質が露出した状態で再植術を行うと歯根の外部吸収や骨性癒着が起こりやすくなる。その防止には歯根膜様組織の介在が必要となる。本研究の目的は、歯髄由来細胞を含有するコラーゲンで被包した象牙質片周囲の組織変化を検索し、その後の脱臼歯のセメント質の形成や歯根膜組織の再生の有無を病理組織学的に検索することである。

3. 研究の方法

実験 1 ラット歯髄由来細胞の細胞培養

(1) ラット歯髄細胞の初代培養

ラットの全身麻酔

実験には 5 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。SPF 環境に管理された動物舎内で環境に慣らすため 1 週間予備飼育を行った。全身麻酔薬として三種混合麻酔薬 (塩酸メドミジン 0.375mg/kg, ミダゾラム 2.0mg/kg, 酒石酸ブトルフェール 2.5mg/kg) を 0.5ml/100g 腹腔内に注射し、全身麻酔を行った。

切歯の抜歯

手術台に固定し、上下顎切歯を希釈ヨードチンキで消毒した。ヤマウラ社製スプーンエキスカベーター (#18) を歯肉溝部に挿入し全周の靭帯を切断、脱臼し、歯科用ピンセットで把持し抜歯した。

初代培養

抜去した上下顎切歯を消毒、洗浄した後、分割し、歯髄組織を無菌的に取り出した。実体顕微鏡下で歯髄組織を No.15 メスで細切し、Type コラーゲンコートされた 100 mm ディッシュに静置した。培養液は自家調整した 10%FBS 含有 DMEM (DMEM-FBS) を用いて 5%CO₂ 環境下でインキュベートした。

象牙質片の作製

初代培養後に残った切歯の象牙質を用いて 2 mm × 2 mm の大きさの象牙質片を作製し、4 リン酸緩衝液 (PBS) 中に保管した。

実験 2 ヌードマウスへの移植実験

(1) 歯髄由来細胞含有コラーゲンの作製

コラーゲンの作製には新田ゼラチン社製の Cell matrix® を用いた。遠心回収した歯髄由来細胞 (3 ~ 4 代) のペレットを加え、冷却化で Cell matrix Type1-A : 10 倍濃度の濃縮培養液 : 再構成緩衝液を 8 : 1 : 1 の割合で混和した後小プレートに 1.0 × 10⁵ 個/ml になるよう分注し、象牙質片を埋入静置して 37 °C で 30 分間静置しゲル化させた。

(2) ヌードマウスの全身麻酔

実験には 5 週齢の雄性ヌードマウスを用いた。SPF 環境下で 1 週間予備飼育した後、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン 0.375mg/kg, ミダゾラム 2.0mg/kg, 酒石酸ブトルフェール 2.5mg/kg) を 0.1ml/10g 腹腔内に注射し全身麻酔を施した。

ヌードマウスの固定

全身麻酔下のヌードマウスを伏臥位にし、四肢をタコ糸で固定器に固定した。実験中の体温維持には小動物保温用温熱パッドを動物の下に敷き、体温を一定にして実験

- を行った。
- (3) 歯髓由来細胞含有コラーゲンゲルの移植
 ノードマウスの背部皮膚を希ヨードチンキと消毒用アルコールで清拭し、背部皮膚両側に No.15 メスで長さ約 2 cm の切開線を入れた。眼科用剪刀にて鈍的に剥離し、背部皮下に約 2 cm のポケットを形成した。作製した上記細胞含有コラーゲンゲルを切開部から約 1 cm 以上離して挿入し、筋膜上に静置した。
 創部の閉鎖
 創部は大きさ約 1 cm × 2.2 cm の滅菌ガーゼに外科用アロンアルファ A「三共」(第一三共株式会社)を浸潤させて創面を被覆し、閉鎖創とした。
- (4) 試料の作製
 実験期間は 6 週間とし、実験期間終了後、実験動物を安楽死させ、移植片と周囲組織を一塊として取り出し、4%パラホルムアルデヒド溶液に浸漬固定した。10%EDTA 溶液で脱灰後、厚さ 5 μm の連続パラフィン切片を作製し、HE 染色および免疫染色を行い、光学顕微鏡下で観察した。

実験3 ラットの意図的再植

- (1) 歯髓由来細胞含有コラーゲンゲルの作製
 ノードマウスの移植実験同様に 1.0×10^6 個/ml の濃度に調整した細胞含有コラーゲンゲルを作製し、冷却下に保存した。
- (2) ラットの全身麻酔
 実験には 8 週齢の Wistar 系雄性ラットを用いた。ノードマウスの移植実験同様に、三種混合麻酔を 0.5ml/100g 腹腔内に注射し、全身麻酔を行った。
 ラットの固定
 ラットを仰臥位で固定し、実験中の体温維持には小動物保温用温熱パッドを動物の下に敷き、体温を一定にして実験を行った。
- (3) 意図的再植術
 上顎第一臼歯 (M1) を希ヨードチンキで消毒し、ヤマウラ社製スプーンエキスカベーター #18 で脱臼し、根管充填用ピンセットで抜去した。歯根膜組織を可及的に除去し、近心根の根尖約 0.5 mm をダイヤモンドポイントで切断した。さらに約 0.5 mm の深さの逆根管充填用窩洞を形成した。窩洞内を乾燥後、MTA で逆根管充填を行った。抜歯窩を洗浄、乾燥した後、調整した (1) の細胞含有コラーゲンゲルを抜歯窩に注入した。
- (4) 試料の作製
 実験期間は 2 週と 4 週とした。実験期間終了後、動物を安楽死させ、根尖歯周組織を含めて被験歯ごと摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液に浸漬固定した。試料を 10%EDTA 溶液で脱灰後、通法に従ってパラフィン包埋を行い、厚さ 5 μm の連続パラフィン切片を作製した。HE 染色とアザン染色を施し光学顕微鏡で観察した。

なお本研究は、日本歯科大学新潟生命歯学部動物倫理審査委員会 (承認番号: 188) を得て動物実験倫理規定を遵守し、実施された。

4. 研究成果

近年、乳歯や永久歯の歯髓幹細胞が注目されており、歯髓細胞に含まれる歯髓幹細胞を利用した再生医療の開発が行われている。本研究の目的は、歯髓組織内の幹細胞の分化を期待し、象牙質や歯根膜組織の再生の可能性を検討することである。

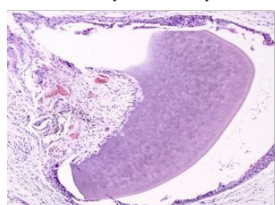
(1) ラット歯髓由来細胞の細胞培養 (実験 1)

ラットの細切した歯髓細胞から初代培養を行った。初代培養より 35 日目に細胞の外生が確認されたが、初代培養より 50 日目に細胞の増殖が停止してしまい、つぎの実験に必要な細胞数が十分に得られなかった。そのため細胞培養を中断し、再度初代培養を行った。初代培養 39 日目に細胞の外生がみられ、3~4 代継代し、移植実験および意図的再植に十分な細胞数が得られた。

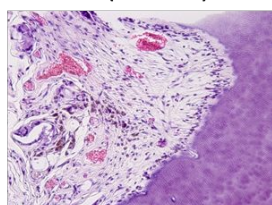
(2) ノードマウスへの移植実験 (実験 2)

本研究は、ラット歯髓由来細胞を含有したコラーゲンゲルで被包した象牙質片を免疫不全マウスの背部皮下組織に移植し、その後の周囲組織の反応について組織学的に観察した。HE 染色所見では象牙質片周囲に炎症性の細胞浸潤は認められず、血管新生と象牙芽細胞層様構造が観察された。

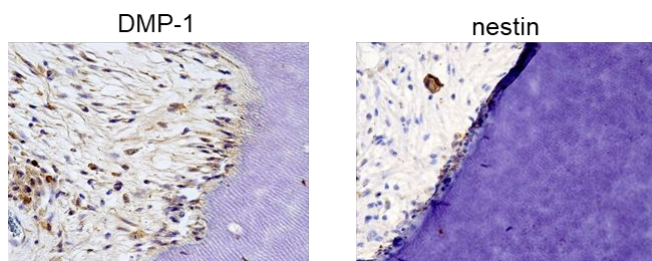
HE (× 100)



HE (× 200)



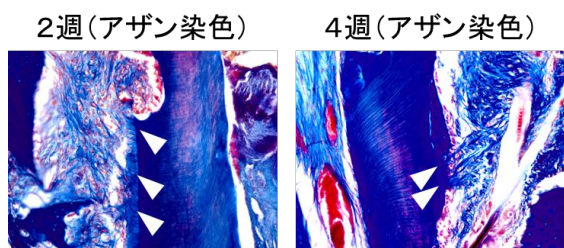
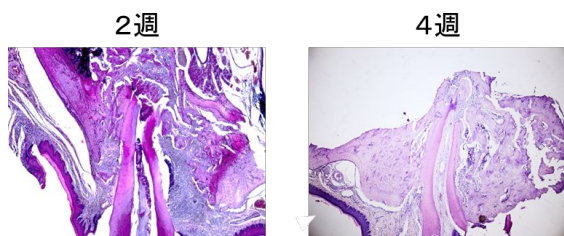
免疫染色は初期の石灰化に関連するマーカーである DMP-1 と象牙芽細胞マーカーである nestin を用いて行った。象牙芽細胞層様構造に DMP-1 の発現が観察され、一部で nestin の弱い反応が観察された。DMP-1 は石灰化開始期以降の象牙質に認められ、nestin は象牙芽細胞分化時に認められるとされ、これらの発現が象牙芽細胞層様構造に認められたことから、多くの未分化細胞が含まれる歯髄組織から得た細胞を用いたことにより、移植した歯髄由来細胞の一部がコラーゲンゲルと象牙質片を足場として象牙芽細胞層様構造へ誘導された可能性が示唆された。



(3) ラットの意図的再植 (実験3)

本研究は、ラット上顎第一臼歯の抜去後に、ラット歯髄由来細胞を抜歯窩に移植し、歯を再植した後の歯根膜再生の可能性を組織学的に観察した。2週と4週すべての被験歯で脱落および動揺はみられなかった。2週では骨とセメント質の間に幅の広い歯根膜様組織が観察された。また歯頸部付近で歯根膜様組織からセメント質に埋入するシャープピー線維様のコラーゲン線維が観察され、根尖部付近では新生骨様組織が観察された。新生血管もわずかにみられたが、一方で炎症性細胞浸潤が観察された部位では歯根の吸収がみられた。4週では歯頸部付近の一部で2週と同様に歯根膜様組織からセメント質に埋入するシャープピー線維様のコラーゲン線維が観察されたが、多くの部分で歯頸部付近まで新生骨様組織が観察された。

これらのことからラットから得た培養歯髄由来細胞を抜歯窩にコラーゲンゲルとともに注入したことにより、歯根膜様組織および骨様組織に分化し、コラーゲンゲルを足場としてだけでなく生体組織との相互作用があったと考えられる。また歯頸部付近でセメント質に埋入するコラーゲン線維が観察されたことから結合組織性の付着の可能性も示唆された。しかし炎症性細胞浸潤がみられた部位では歯根の吸収がみられ、今後長期的な観察を行う必要があると考えられる。



5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

山田理絵、湊華絵、清水公太、新井恭子、北島佳代子、五十嵐勝：ラット歯髄由来細胞を用いた意図的再植歯周囲の組織再生に関する組織学的観察。日本歯科保存学会 2019年度春季学術大会 (第150回); 2019

山田理絵、湊華絵、清水公太、新井恭子、北島佳代子、五十嵐勝：ラット歯髄由来細胞含有コラーゲンゲルに被包された移植象牙質片周囲組織の免疫組織学的観察。第39回日本歯内療法学会学術大会; 2018

山田理絵、湊華絵、清水公太、新井恭子、北島佳代子、五十嵐勝：ラット歯髄由来細胞含有コラーゲンゲルに被包された移植象牙質片周囲組織の反応。日本歯科保存学会 2018年度春季学術大会 (第148回); 2018

6 . 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：湊 華絵

ローマ字氏名：MINATO Hanae

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。