

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10032

研究課題名(和文) 歯根膜の完全な再生を目指した意図的再移植法の新規開発

研究課題名(英文) Development of a novel intentional replantation technique for the reliable regeneration of periodontal ligament

研究代表者

長澤 麻沙子 (Nagasawa, Masako)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：40612239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯の破折に対する治療を確立するため、歯根破折歯に対する意図的再植術後の歯根周囲に、完全な歯根膜再生を目指す新規意図的再植法を開発することを目的とした。実際に臨床で使用されている各種材料を用いた所、生体材料表面へのセメント芽細胞の誘導や表面での石灰化、結合組織性付着は得られなかった。この結果を踏まえ、材料に成長因子を混和させる方法や材料の表面にエナメルマトリックスデリバティブ・アメロジェニン(歯の発生に係るタンパク質)を塗布する方法を検討した。その結果、一部のサンプルにおいて充填材料表面に硬組織様組織が認められた。しかしながら軟組織が材料表面に介在する場合もあり、引き続き詳細な検討が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者らの研究室では、歯根破折歯修復の臨床研究を行い、歯根破折歯の病因、病態、治療の効果を報告している。しかしながらこの治療の過程で、治療後も残存する局所的な歯周ポケットが長期的に問題となることを認識し、同部位に歯根膜を再生させる方法を模索すべきであると考えた。これによって接着材料の生体内での経年的劣化も防げる可能性が高い。この実現によって、歯根破折修復処置後の患歯の生存率を上げ、患者の咬合崩壊を食い止めることができるため、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a novel intentional replantation technique for regenerating the periodontal ligament at the material's surface. Using various materials used in clinics, induction of cementum cells to the surface of biomaterials, calcification on the surface, and connective tissue attachment were not obtained. Based on these results, methods of mixing growth factors into materials and applying enamel matrix derivative amelogenin (EMD) to the surface of materials were considered. As a result, hard tissue-like tissue was observed on the surface of the filling material in some samples. However, soft tissue also intervened on the surface of the material in those samples. Further study should be needed.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯根破折 歯根膜

1. 研究開始当初の背景

平成 30 年度の公益財団法人 8020 推進財団の調査によると、日本の永久歯の抜歯原因の第 3 位は「歯の破折」である。前回の調査と比較すると、う蝕や歯周病による歯の喪失は年々減少している一方で、破折による喪失は増加している。予防先進国であるスウェーデンでは 40 代からの歯の喪失原因の第一位は「破折」であり、本邦でも近い将来、これと同じ状況になる可能性が非常に高い。さらに、「歯の破折」は生活歯より補綴後の失活歯に多く認められるが、超高齢社会である日本では、口腔内に補綴物を有する患者の長期経過症例が増加しているため、今後も増え続ける「歯の破折」に対する対応とその解決策が求められている。

従来、歯根破折に対する対応の多くは「抜歯」もしくは「経過観察」であったが、4-META/MMA-TBB レジンセメントを応用することにより、その接着力の高さ故に垂直歯根破折歯に対する治療が可能となった。しかしながら、全世界的にも見ても、歯根破折歯修復の臨床データは少なく、治療法に関する研究開発もほとんどなされていない。近年、本学附属病院において歯根破折歯の修復と意図的再植処置を受けた患歯の生存率は 3 ~ 5 年後で 70 ~ 82% であった。その一方で、破折修復部位に線状にレジンセメントが残存、露出することは避けられず、この部位を垂直方向に軟組織が覆い、歯周ポケットが残存してしまう問題がある。また生体内におけるレジンセメントの劣化のため、再度接着部位で破折する症例もある。そこで我々は、歯根破折修復部位にセメント芽細胞を誘導し、表面にセメント質再生を促すことによって、歯根膜を完全に再生させることができないかと考えた。一般的な歯周疾患とは異なり、歯根破折歯周辺の歯槽骨欠損の特徴は局所的・垂直的な歯周組織の崩壊である。つまり破折線近傍の歯根周囲には健全な歯根膜、セメント質、歯槽骨が存在するため、水平的な骨欠損とは異なり、歯根膜を再生できる可能性は高い。この実現によって、歯根破折修復処置後の患歯の生存率を上げ、患者の咬合崩壊を食い止めることができると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、意図的再植術後の歯根周囲に完全な歯根膜再生を目指す、新規意図的再植法を開発することである。研究代表者らの研究室では、歯根破折歯修復の臨床研究を行い、歯根破折歯の病因、病態、治療の効果を報告している (Hamaya K, Nagasawa M et al. 新潟大学医歯学総合病院冠ブリッジ診療科における歯根破折治療の報告 .平成 28 年度日本補綴歯科学会関東支部大会, 2016 .)。この治療の過程で、治療後も残存する局所的な歯周ポケットが長期的に問題となることを認識し、同部位に歯根膜を再生させる方法を模索すべきであると考えた。これによって接着材料の生体内での経年的劣化も防げる可能性が高い。

3. 研究の方法

具体的な目標を以下の通り設定した。

【目標 1】生体充填材料および Growth factor を併用して歯根破折修復を行い、周囲組織の組織学的・形態組織学的検索を行う。材料表面に硬組織(セメント質)の誘導を試みる。

【目標 2】最適な処置法の検討を行う。材料表面に硬組織(セメント質)の誘導を試みる。

【目標 3】再生された周囲組織の機能評価を行う。機能に耐えうる歯根膜再生であるか否かの検証を行う。

<研究方法>

(1) 4 週齢 SD ラットの顎第一臼歯を抜歯する。実験群は第一臼歯近心根にダイヤモンドディスクにて破折線を模した窩洞を形成する。窩洞には生体充填材料(4-META/MMATBB レジンセメント、Mineral Trioxide Aggregate(MTA)セメント、MTA 配合レジンセメント、Bioactive Glass、光重合型レジン強化型ケイ酸カルシウム)を充填する。また、充填材料の表面にヒト bFGF (塩基性線維芽細胞増殖因子)、EMD (エナメルマトリックスデリバティブ・アメロジェニン)を塗布する。その後抜歯窩に再植し、固定する。対照群は実験群と同じ時間経過後に歯根に対する処置をせずに再植する。

(2) 再植 1, 3, 7, 14 日後にパラフォルムアルデヒドにて還流固定を行い、左右上顎骨を摘出してパラフィン包埋後に組織薄切標本を作製する。

(3) 組織標本は H-E 染色、アザン染色、鍍銀染色、ピクロシリウスレッド染色、免疫組織化学染色等を行い、修復処置実施した周囲組織(上皮、歯根膜、セメント質、歯槽骨)の組織学的観察・組織形態学的観察を光学顕微鏡下および偏光顕微鏡にて行う。特に修復材料表面の軟組織・硬組織、コラーゲン繊維の走行、セメント質の再生、骨吸収、歯根吸収を観察する。

(4) 修復材料表面の組織に関しては、セメント芽細胞が分泌し、形成されたセメント質中に存在する非コラーゲン蛋白質(オステオポンチン、ボーンシアロプロテイン)の局在、セメント芽細胞のオステオポンチン、アルカリフォスファターゼ、アクアポリン 1 の発現を免疫組織学的に観察する。また、上皮細胞に対しては pan-cytokeratin AE1/AE3、ヘミデスモゾームの検出のためプレクチン、ラミニン 2 鎖に対して蛍光染色による観察を行う。

評価

【目標1】材料表面の硬組織（セメント質）形成をH-E染色によって光学顕微鏡下に観察する。予備実験の結果では、4-META/MMA-TBB レジンセメントおよび Mineral Trioxide Aggregate(MTA)セメントの表面にはセメント質形成や石灰化が起こらないことが分かっている。しかしながら、使用する材料によって、表面に形成される線維の方向が異なり、特定の材料とサイトカインの併用によって、少なくとも石灰化層が形成される可能性は高い。この石灰化層に対して、免疫組織化学的手法によってセメント質の特性を有するか否かを検索する。また、歯根表面近傍のコラーゲン線維の走行も条件ごとに検索する。

【目標2】抜歯から再植までの時間、破折線の幅、再植する歯根の向き（破折線の位置）、充填時の前処置方法等について、組織学的所見と照らし合わせて、至適条件を見出す。

【目標3】歯根膜再生が得られる条件下では、再植一定期間後に再度レジンを用いて歯冠形態を回復し、歯根膜の構造変化（H-E染色、免疫組織化学染色）、コラーゲン線維の走行（ピクロシリウスレッド染色・アザン染色）を組織学的に検証する。

4. 研究成果

はじめに生体充填材料および Growth factor を併用して歯根破折修復を行い、周囲組織の組織学的・形態組織学的検索を行った。

破折を模した窩洞には既に臨床にて使用されている生体充填材料（4-META/MMATBB レジンセメント（SB群）、Mineral Trioxide Aggregate(MTA)セメント（MTA群）、MTA配合レジンセメント（RmMTA群）、Bioactive Glass（BG群）、光重合型レジン強化型ケイ酸カルシウム（LC群））を使用し、組織学的検索を行った。

各実験群の術後1日、3日はいずれも対照群と同様な所見で、他に特別な所見は認められなかったため、各々の術後7日、14日を以下で示す。

SB群の術後7日では炎症性細胞の浸潤は減少傾向にあるものの依然として認められ、軽度炎症性反応が継続していた。充填材料表面の歯根膜組織に接する部位にはエオジンに濃染する軟組織と多層で扁平な上皮様細胞が集積していた。破骨細胞様細胞が歯根膜内骨近傍及び歯槽骨周囲に散見された。窩洞形成部位に近接する歯槽骨には活発な骨改造はほとんど認められなかった。歯根膜のコラーゲン線維は一部充填材料に平行に走行しているものの、不規則で連続性も不十分であった。一部の線維は充填材料表面層に入り込むような所見も認められたものの、顕著ではなかった。術後14日では炎症性細胞の浸潤はほとんど認められなくなり、充填材料の表面近傍には、より顕著にエオジンに濃染する軟組織と多層で扁平な上皮様細胞が確認できた。窩洞形成部位近傍の歯槽骨には骨芽細胞様細胞が認められ、新生骨様組織も認められた。コラーゲン線維は充填材料表面付近では様々な方向に走行していた。術後7、14日ともに、窩洞形成部位周囲の歯根吸収はほとんど認められなかった。

MTA群では、術後7日では材料表面に炎症性細胞の浸潤がわずかに認められ、窩洞内には無細胞性の構造物が認められた。破骨細胞様細胞が歯根膜内及び歯根の窩洞断端に散見された。窩洞形成部位近傍の歯槽骨には活発な骨改造はほとんど認められなかった。術後14日では炎症性細胞はほとんど認められなくなり、術後7日と同様に無細胞の構造物が窩洞を満たしていた。また、充填材料表面には線維性の組織が認められたものの、歯根膜内の線維と連続する所見は確認できなかった。破骨細胞様細胞は減少し、窩洞近傍の歯槽骨では骨芽細胞様細胞と新生骨が認められた。術後7、14日ともに、歯根吸収はほとんど認められなかった。

RmMTA群は充填材料が窩洞から逸脱して充填材料が周囲組織内に存在している様子がみられた。一方でLC群は充填材料が窩洞からはみ出るとは少なかった。RmMTA群とLC群はいずれも術後7日では充填材料表面に炎症性細胞の浸潤が認められ、術後14日においても同様に炎症性反応は継続していた。また、窩洞近傍の歯根には高度な歯根吸収が多く認められた。中には窩洞形成部位付近の歯根が全て消失するほどの著しい歯根吸収も認められた。術後14日では、歯根膜線維の連続性・規則性はわずかではあるが回復している様子が認められたものの、歯槽骨から充填材料表面層近傍に至る線維は全く認められず、充填材料表面に平行な走行を示していた。

BG群では充填材料が窩洞から逸脱して周囲組織内に存在している様子がみられた。術後7日では、炎症性細胞の浸潤が他の群に比較して顕著であった。材料近傍の歯根や歯槽骨では破骨細胞様細胞や破骨細胞様細胞が認められ、術後7日ですでに歯根吸収している標本も多数あった。14日においても著しい炎症性細胞の浸潤が継続しており、歯根膜線維の連続性や規則性の回復はほとんど確認できなかった。

再植の試適条件に関しては、再植それ自体もしくは充填材料の特性により、炎症所見を示す組織像が散見されたため、研究途中から再植時に抗生物質の局所投与を行った。その結果、炎症細胞の浸潤をある程度押さえることができた。

上記で用いた各種生体材料表面へのセメント芽細胞の誘導や表面での石灰化、結合組織性の付着は得られなかった。また、各種材料の硬化後の強度に問題があり、再植後に窩洞内にとどまる材料が少なくなった可能性も否定できない。

これらの結果を踏まえ、我々は充填材料にGFを混和させる方法、および材料の表面にEMD（エナメルマトリックステリパティブ・アメロジェニン）を塗布する方法を検討した。その結果、一部のサンプルにおいて充填材料表面に硬組織様組織が認められた。しかしながら軟組織が材料表面に介在している場合もあり、現在細かい条件を検索中である。また、現在非脱灰標本を製作中であり、より詳細に材料と組織の界面を観察していきたい。

本研究期間においては、完全な歯根膜の再生は認められていないため、歯根膜再生後の咬合力付与は行っていない。前述の現在研究中的方法にて歯根膜再生できた場合は、当初の予定通り咬合力に耐える歯根膜かどうかの検証を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浜谷桂佑, 長澤麻沙子, 山本悠, 魚島勝美
2. 発表標題 垂直的歯根破折修復処置後の組織学的検索
3. 学会等名 2020年度日本補綴歯科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浜谷桂佑, 長澤麻沙子, 山本悠, 魚島勝美
2. 発表標題 歯科生体材料を用いたラット垂直歯根破折歯修復の組織学的検索
3. 学会等名 2020年度新潟歯学会第2回例会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	魚島 勝美 (Uoshima Katsumi) (50213400)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------