

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年9月30日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010年～2012年

課題番号：22592209

研究課題名（和文） 凍結保存歯の歯根膜を再生させて、「歯の移植」の適応症を拡大する

研究課題名（英文） Development of effective methods for regeneration of the periodontal ligament of cryopreserved teeth, for expansion of indications for tooth transplantation.

研究代表者 泉 直也

（新潟大学・医歯学総合病院・助教）

研究者番号：10361908

研究成果の概要（和文）：

歯の移植の適応拡大のため、凍結保存歯の歯根膜を有効に再生させる方法を確認する目的で、ラット臼歯を抜歯後、凍結保存して解凍後に腹部皮膚に移植する実験系を作成した。凍結保存歯は解凍した後、一定期間器官培養して腹部皮下へ移植した。凍結保存歯は、即時移植した歯と比較して明確な歯根膜の再生能の改善は見いだされなかった。凍結保存した歯の移植が、即時移植と同様あるいはそれ以上に生着することを目指して、今後も器官培養の技術を向上させて試料を組織学的に検索することで、凍結保存歯の器官培養の有効性および技術的問題点を明らかにしていく予定である。

研究成果の概要（英文）：

For expansion of indications for tooth transplantation, we examined the regeneration of the periodontal tissues after cryopreservation using a rat model. The maxillary molars of rats were extracted and transplanted into the abdominal subcutaneous tissue either immediately or after cryopreservation. The cryopreserved teeth were thawed and transplanted after having done organ culture for a certain period of time. As for the cryopreserved tooth which it transplanted after having done organ culture, the improvement of the periodontal regenerative activity was not found clearly. We intend to improve culture method and are going to determine efficacy of the organ culture of the cryopreserved tooth and technical problems in future.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯の移植、凍結保存、歯根膜

1. 研究開始当初の背景

歯は歯周病、う蝕および外傷などが原因で喪失してしまうことが多く、そのような歯の

欠損部はブリッジ、義歯あるいは歯科インプラントなど人工物で補わなければならないことが多い。新潟大学医歯学総合病院ではそ

これらの方法の他に、埋伏している第三大白歯や矯正治療で便宜的に抜去された小白歯など機能していない歯を移植する「歯の移植」を多数手がけている。しかし、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、健康な移植歯と移植床が同時に存在する必要がある、これが歯の移植の適応症を制限している。そのため私達は、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例以上凍結保存し、そのうち10例に移植を行い、概ね良好な結果を得ている。しかし、凍結保存移植歯は、即時移植歯と比べ、緩慢な置換性歯根吸収が認められることが多く、その原因として凍結操作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、私達の共同研究者であるKawasakiらがラット臼歯をプログラムフリーザにて緩速凍結した後、液体窒素(-196度)に一晩凍結保存し、その後解凍して腹部の皮下に移植した報告がある。その結果、凍結保存歯は、抜歯直後に腹部皮下へ移植した歯と比較すると、若干の遅延はあるがほぼ同様な歯槽骨を含めた歯周組織の再生過程を示すことを報告している(Kawasaki N et al. Periodontal regeneration of transplanted rat molars after cryopreservation. Arch. Oral Biol. 2004; 49: 59-69)。私達もラット臼歯を腹部皮膚に移植する実験系を用いて、以下のような研究成果を報告している。

(1) Kawasakiらの報告より長い期間にわたり凍結保存をした歯の歯周組織再生機構を明らかにするため、4週齢のWistar系雄ラットの上顎第一、第二臼歯を抜歯後、プログラムフリーザにて緩速凍結した後、ディープフリーザ(-80度)に4週間凍結保存した。その後解凍し、腹部の皮下に移植した。その結果、凍結保存歯は、抜歯直後に腹部皮下へ移植した歯(即時移植歯)と比較すると、若干の遅延はあるがほぼ同様な歯槽骨を含めた歯周組織の再生過程を示すことが明らかとなった(Izumi N et al. Periodontal regeneration of transplanted rat teeth subcutaneously after cryopreservation. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2007; 36: 838-844)。

(2) (1)の研究結果をもとにして、実際の臨床に即し、より長期間凍結保存したラット移植歯のモデルを用いて、歯周組織の再生機構を形態学的に検索した。4週齢のWistar系雄ラットの上顎第一、第二臼歯を抜歯後、プログラムフリーザにて緩速凍結した後、ディープフリーザ(-80度)に6か月凍結保存

した。その後解凍し、腹部の皮下に移植した。6ヶ月凍結保存した移植歯は、抜歯直後に腹部皮下へ移植した歯と比較すると、遅延はあるが歯槽骨を含めた歯周組織の再生を示した。しかし、4週間凍結保存した移植歯と比較しても、若干の遅延を示していた。

(3) 凍結保存歯はプログラムフリーザによる緩速凍結後に超低温ディープフリーザ(-152°C)に保存するため、実用化を目指した場合、操作が煩雑であり特別な施設を必要なことから汎用性に問題がある。歯の凍結保存方法がより簡便になれば凍結保存歯移植の適応拡大につながると思われる。そこで私達は凍結保存方法の簡略化と汎用化を目的に凍結操作や温度が凍結保存歯の歯周組織再生へ及ぼす影響についてラット臼歯を用いて形態学的に検索した。その結果、-80°Cで保存すれば歯槽骨を含めた歯周組織を再生させることが可能であり、プログラムフリーザによる緩速凍結を併用すればより有効であることが明らかになった。また、保存温度が-20°Cでは、プログラムフリーザの併用の有無によらず、有効に歯周組織を再生させることは出来ないことが明らかになった。

2. 研究の目的

上記のような基礎研究結果より、凍結保存歯でも移植後に歯周組織は再生することは明らかになった。しかし再生過程の若干の遅延が認められる。また、臨床的には凍結保存移植歯は、即時移植歯と比べ、緩慢な置換性歯根吸収が認められることが多い。これらは凍結操作による歯根膜の損傷が原因であると考えられる。本研究では、現在までに行ってきた実験系を使って、歯根膜の再生を促すために凍結保存歯を解凍後すぐに移植せず、一定期間器官培養した後、腹部皮下へ移植する実験群を作成し、歯周組織再生過程を組織学的に検索し、その有効性および問題点を明らかにする。本方法が確立されると、日常臨床での凍結保存歯の移植後の生着率が格段に上がることが予想される。

3. 研究の方法

(1) 凍結保存移植歯の作成

本研究には、4週齢Wistar系雄ラットを用いるが、どの操作もペントバルビタールで麻酔を行い、十分に徐痛が得られた状態で行い、手術後も餌などに配慮する。上顎第一、第二臼歯を抜歯後、プログラムフリーザによる緩速凍結を行い、1か月および6か月凍結保存(-80°Cと-20°C)して解凍した後、複数の培養条件下で2、4、7日器官培養した後、腹部の皮下に移植する。対象群として抜歯後、同様な条件で凍結保存して解凍した後、すぐに腹部の皮下に移植する群を作成。皮下に移植後、1、2、4週後に摘出、固定する。以

下のような形態学的手法を用いて、凍結保存移植歯の歯周組織再生過程を詳細に観察し、より有効な器官培養法を確立する。

(2) ヘマトキシリン、エオジン染色による凍結保存移植歯の観察

パラフィン切片を用いて、ヘマトキシリン、エオジン染色を施し、凍結保存移植歯の歯周組織を観察し、全体像を把握する。

(3) 破骨細胞系細胞と骨芽細胞系細胞に関する免疫および酵素組織化学的検索

近年、システインプロテアーゼの一つであるカテプシンKが破骨細胞系細胞に特異的に発現していることが報告され、骨基質分解に主要な役割を果たすとして注目を集めている。本研究では、パラフィン切片にてカテプシンKに対する抗体を用いて免疫染色を行い、凍結保存移植歯の歯周組織再生過程における破骨細胞系細胞の動態を明らかにする。一方、凍結切片を用いて、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

(ALP) 活性を酵素組織化学的手法にて検出し、凍結保存移植歯周囲の歯槽骨再生過程における骨芽細胞系細胞の分布を明らかにする。

(4) 微細構造学的

凍結保存移植歯の歯周組織を透過型電子顕微鏡にて観察し、再生された歯根膜や歯槽骨に分布する細胞の微細構造を詳細に検索する。

(5) マイクロCTによる再生歯槽骨の三次元構造の観察

凍結保存移植歯を非脱灰のまま、マイクロCTのサンプルホルダーにセットし、小X線源照射(X線発生源10 μ m、管電流0.1mA、管電圧30KeV)で行う。スキヤニングで得られたデータは、CT画像に再構築し、さらに三次元画像を作成して再生歯槽骨を観察する。経時的に観察し、歯槽骨がどの部分から再生してくるのかを明らかにする。

(6) 骨形成関連因子のメッセージレベル、タンパク質レベルの局在の検索

osteocalcin, osteopontin, TGF- β , BMP等の骨形成因子さらには、骨基質の主体であるtype I collagenの抗体およびRNAプローブを用いて、再生歯周組織での局在を比較検討するとともにそれらの産生担当細胞を同定する。

4. 研究成果

凍結操作によって損傷された歯根膜を可能な限り再生させた後に移植することを目的に、上記の実験系を使って、凍結保存歯を解凍後すぐに移植せず、一定期間器官培養した後、腹部皮下へ移植する実験群を作成した。器官培養をした後に移植した凍結保存後の移植歯は、即時移植歯と比較して、今のとこ

ろ明確な歯根膜の再生能の改善は見いだされなかった。凍結保存した歯の移植が、即時移植と同様あるいはそれ以上に生着することを目指して、今後も器官培養の技術を向上させて試料を組織学的に検索することで、凍結保存歯の器官培養の有効性および問題点を明らかにしていく予定である。

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)

[雑誌論文] (計2件)

1. Cryopreservation and autotransplantation of teeth
Yoshizawa M, Izumi N, Koyama T, Ono Y, Niimi K, Sugai T, Kobayashi T, Ono K, Takagi R, Saito C.
Hiroshima University, International Industry-academia Collaboration Symposium, Tokyo, Japan, March 6, 2011, International Symposium on Cell Freezing (suppl); p42-49, 2011.

2. Autotransplantation or replantation of cryopreserved teeth: a case series and literature review.
Yoshizawa M, Koyama T, Izumi N, Niimi K, Ono Y, Ajima H, Funayama A, Mikami T, Kobayashi T, Ono K, Takagi R, Saito C.
Dent Traumatol. 2013 Mar 10. doi: 10.1111/edt.12039. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者 泉 直也
(新潟大学・医歯学総合病院・助教)

研究者番号：10361908

(2) 研究分担者 小島 拓
(新潟大学・医歯学系・助教)

研究者番号：90515777

(3) 連携研究者
()

研究者番号：