

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文
内容の要旨

氏名(本籍)	保母浩児(東京都)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	乙第249号
学位授与年月日	平成25年12月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題目	歯周骨欠損部に移植した培養ヒト歯髓細胞の組織学的評価 日本歯科保存学会雑誌, 第55巻, 第1号 30頁~37頁掲載 平成24年2月29日発行
論文審査委員	主査 教授 下田信治 副査 教授 里村一人 副査 教授 五味一博

内容の要旨

【緒言】

近年腸骨由来骨髄細胞、歯根膜細胞、歯肉細胞などを細胞源として、組織工学的技法を用いた歯周組織再生療法の臨床研究も開始され、その有効性が検討されている。しかしながらこれら細胞採取に際して患者への負担が大きい。そこで我々は矯正学的見地から抜去される歯より採取可能な歯髓に注目した。歯髓組織を酵素処理し得られる歯髓細胞を b-FGF で幹細胞を増幅させ、コラーゲンゲルを足場としてヌードラットに形成した人工歯周骨欠損内に移植した。

本研究の目的は、ヒト歯髓細胞を b-FGF 添加培地で培養し、細胞の基本特性を解析し、アテロコラーゲンゲルを足場としてヌードラット第1臼歯口蓋側に形成した骨欠損部に移植する事で歯周組織再生が過程を組織学的に評価することにある。

【材料と方法】

本実験は鶴見大学倫理委員会の承認(第103号)をうけ、鶴見大学歯学部実験動物指針に従って行った。

1. 歯髓細胞の調整

ヒト歯髓細胞(以下 HDPC)は、本研究の目的を説明し書面にて同意が得られた矯正治療の必要性から便宜的に抜歯された小臼歯より得た。抜去歯は直ちに Gronthos S.らの方法に準じて、酵素処理法にて初代 HDPC を得た。HDPC は 1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有 α -MEM (以下 SM)中に 50ng/ml になるように b-FGF を加えて培養を行った。その後継代培養し実験には 3~5 継代の細胞を用いた。

2. アルカリフォスファターゼ(ALP)活性の測定

HDPC の石灰化を調べる目的で ALP 活性を測定した。HDPC を 1×10^5 /ml の細胞数で 96 ウェルプレートに播種し、1、5、10 日後に ALP 活性を吸光度より求めた。

3. 遺伝子発現

HDPC の分化を調べるため osteopontin (OPN), osteocalcine (OC), bone sialoprotein (BSP), dentin sialophosphoprotein (DSPP)の遺伝子発現について RT-PCR 法を行った。

4. 表面抗原特性

HDPC について、造血幹細胞マーカーである CD34、CD45 および間葉系幹細胞マーカーである CD44 と CD90 について発現解析をシングルカラー染色し、フローサイトメーターCytomics FC500M を用いて各抗体の発現解析を行った。

5. HDPC の歯周骨欠損部への移植

HDPC を 14 日間培養し、コールターカウンターを用いて細胞数を測定した後、アテロコラーゲンゲル中に懸濁し細胞数を 2.2×10^5 cells/ml に調整し移植試料とした。

実験動物としてヌードラット 6 匹を用いた。麻酔下に上顎左側第 1 臼歯口蓋側の歯肉を剥離翻転し骨面を露出させ 1/2 ラウンドバーにて人工骨欠損を作製した。露出歯根の最根尖側に 1/4 ラウンドバーでノッチを付与した。アテロコラーゲンに懸濁させた HDPC をツベリクリンシリンジにて注入移植した。またアテロコラーゲンゲルのみを移植を対照とした。

6. 病理組織学的観察と組織学的計測

移植後 5 週でヌードラットを安楽死させ、通常法に従いパラフィン包埋を行い、厚さ約 5 μ m の切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、以下の項目を計測した。

1) 露出歯根の長さ

セメントエナメル境と根尖部ノッチ間距離(ER)を計測。

2) 結合組織付着率

上皮付着最根尖側端と根尖側ノッチまでの距離(CA)を測定し、次式から算出。

$$CA \div ER \times 100 = \text{結合組織付着率}(\%)$$

3) 歯槽骨新生率

新生骨最歯冠側端から根尖部ノッチまでの距離(NB)を測定し、次式から算出。

$$NB \div ER \times 100 = \text{歯槽骨新生率}(\%)$$

各組織学的計測結果から平均値と標準偏差を求め、t-検定を用いて統計分析を行った。

【結果】

結 果

1. アルカリフォスファターゼ活性

HDPC を 50ng/ml b-FGF 添加下 SM で培養したところ、経日的に ALP 活性の上昇が認められた。これに対し、b-FGF 未添加群では経日的に ALP 活性は上昇するが b-FGF 添加群と比較して活性度は低かった。

2. 遺伝子発現

HDPC を b-FGF 添加培地で 7 日間培養後にトータル RNA を抽出し OPN、OC、BSP、DSPP の遺伝子発現について調べたところ、b-FGF 添加群および未添加群ともに各遺伝子の発現が認められた。特に b-FGF 添加群では未添加群より明らかな遺伝子発現の増強が認められた。

2. 表面抗原特性

造血幹細胞のマーカーである CD34 と CD45 は陰性であった。間葉系幹細胞マーカーの CD44 と CD90 は陽性であった。

3. 組織学的観察

対照群では、骨欠損部への上皮の深行増殖が観察された。また、歯根表面に新生セメント質の形成および結合組織性の付着はわずかにしか認められなかった。これに対し実験群では、上皮付

着が CEJ 付近に維持され、歯根との間に結合組織性の付着が認められた。しかし、既存セメント質とは離れた部位にセメント質様と思われる組織の形成が認められたが、明らかなセメント質の形成は認められなかった。また、歯槽骨の歯冠側への再生も認められなかった。

5. 組織学的計測結果

1) 結合組織付着率

実験群の歯根面への結合組織付着率は $85.2 \pm 2.96\%$ であったのに対し、コントロール群では $54.96 \pm 11.68\%$ であり、両者間に 0.05% で有意差を認めた。

2) 歯槽骨新生率

実験群の歯槽骨新生率は $-4.66 \pm 6.09\%$ 、コントロール群では $-3.69 \pm 4.66\%$ でありともに歯槽骨の新生は認められず逆に歯槽骨の吸収が認められた。両者間には有意差は認められなかった。

【考察】

歯科領域では歯根膜細胞を用いた細胞シート工学による歯周組織再生や、骨髄細胞を用いた歯周組織、骨組織再生に対する臨床研究が行われている。しかしこれらの細胞を採取するには侵襲が大きく、矯正治療における便宜抜去歯より歯髄組織を採取し、HDPC を用いた組織工学的手法により歯周組織の再生が可能かについて検討を行った。

HDPC は ALP 活性を有することが知られているが、 50ng/ml b-FGF を添加することでその活性が増強されることが示された。b-FGF には間葉系幹細胞を増殖させる作用があることが報告されており、骨髄に含まれる骨髄幹細胞の増殖に応用されていることから、HDPC 中の幹細胞も増加させる可能性があると考えている。HDPC の骨分子マーカーとして OPN、OC、BSP を、象牙質分子マーカーとして DSPP について、b-FGF の添加、未添加での違いを調べるところ、いずれの遺伝子も b-FGF 添加条件で発現の増強が認められた。このことから HDPC においても歯槽骨を含む歯周組織再生の可能性が示唆された。さらに細胞表面抗原マーカーを用いた解析と併せて考えると、培養を行った HDPC には骨系の間葉系幹細胞が多く含まれる可能性が示された。

このような特性を持ったヒト HDPC を b-FGF 添加培地で培養後、アテロコラーゲンゲルに細胞を懸濁させ人工骨欠損を形成し、この部に HDPC 懸濁コラーゲンゲルを注入移植して歯周組織再生過程を観察した。実験群では歯根面への良好な結合組織付着が認められ、歯肉上皮の根尖側への移動はわずかであった。一方、対照群では歯根面への歯肉組織の付着は弱く、上皮の根尖側への移動が認められた。しかしながら、実験群においてセメント質様と思われる組織像が既存セメント質から離れた部位にわずかに観察されたが、歯根面への明らかなセメント様の組織の新生は認められなかった。また、歯槽骨の新生も認められなかった。今回の研究ではセメント質、歯根膜、歯槽骨からなる完全な形での歯周組織の再生は認められなかったが、良好な結合組織性の付着が生じていたこと、わずかながらセメント質様の形成を認めたことから、HDPC を用いた歯周組織再生の可能性が示唆された。

【結論】

HDPC を b-FGF 添加下で培養すると、ALP 活性の上昇と骨系遺伝子の発現が上昇した。また、間葉系幹細胞マーカーである CD44 と CD90 がポジティブであった。本細胞の人工骨欠損部への移植により歯根との間に結合組織性の付着は認められたが、セメント質および骨の新生は認められな

った。今回の実験では歯槽骨の再生は認められなかったが、歯髄幹細胞を用いた歯周組織再生の可能性示唆された。