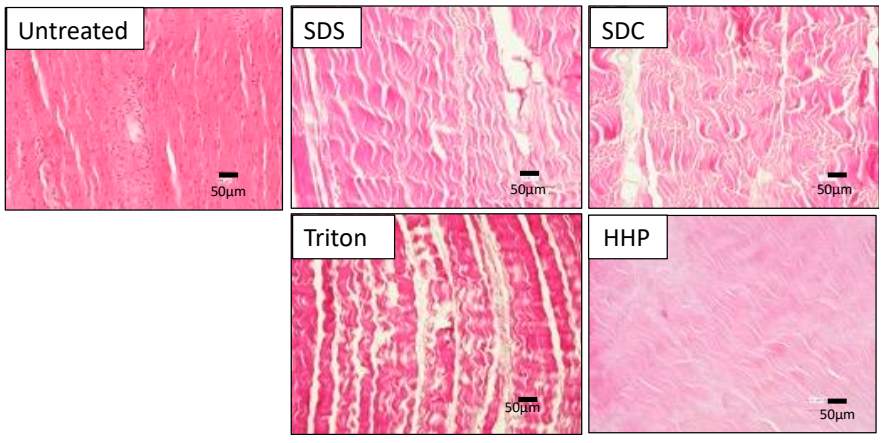
203　歯周靭帯再構築のための脱細胞化腱シートの開発	中村　奈緒子

【目的】歯周靭帯（歯根膜）は、歯槽骨や歯のセメント質と強固に結合して歯を固定しており、細菌による感染を防止する、咬合の感覚を司る、咬合時のショックを和らげる働きを担っている。現在の歯科用インプラントは、歯槽骨に埋入されて直接結合しているため、歯周靭帯の機能が欠如している。そのため、インプラント材料と歯槽骨の間に歯周靭帯様の組織を再構築することが期待されている。しかし、人工的に組織構造を再現することの困難さから実現には至っていない。そこで、本研究では歯周靭帯の線維構造に注目し同様の構造を持つブタの足底腱から歯周靭帯様細胞外マトリックスの脱細胞化腱シートを作製し、生体内における線維の配向性と骨組織との結合を明らかにすることを目的とした。

【方法】ブタ足底腱を薄切し、高静水圧処理法（HHP）および 3 種類の界面活性剤法（SDS：ドデシル硫酸ナトリウム、SDC：デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100）にて脱細胞化処理を行った。組織学的評価および残存 DNA 量により、細胞成分の除去および細胞外マトリックスの構造の維持について評価した。作製したシートをラットの頭蓋骨基質上と頭蓋骨の骨膜間に移植した。8 週間後に取り出し、脱細胞化腱シートと骨の界面の繊維の配向性や骨形成に関連する細胞に注目し評価を行った。コラーゲン線維の配向性を定量的に評価するために頭蓋骨と腱シートの線維がなす角の分布を求めた。ラットの頭蓋骨基質上に脱細胞化腱シート、表面処理したチタンプレートの順で移植し、12 週間後に、作製した脱細胞化腱シートを介したチタンプレートの頭蓋骨への結合を評価した。

【結果】高静水圧および界面活性剤処理法により、細胞成分の除去および細胞外マトリックスの構造の維持が可能であった。また、界面活性剤処理では、コラーゲン線維間に間隙が観察された。頭蓋骨基質上および骨膜間に移植した結果、両者にて多くの細胞が浸潤していることがわかった。また、骨基質を露出した骨基質上移植は破骨細胞も観察されたことより、脱細胞化腱シートと骨の間で骨のリモデリングが行われ、その過程でシートの線維が取り込まれ結合する可能性が示唆された。また、骨膜間および骨基質上への移植において、脱細胞化腱シートの構造が維持され、移植時の配向性が保たれていることがわかった。脱細胞化処理法によりコラーゲン線維の間隙の違いはあったものの、移植後はどのサンプルにおいても同様に構造が維持されていたことより、本実験で得られた程度の組織構造の違いは、再細胞化に影響を与えないことがわかった。脱細胞化腱シートをチタンプレートと骨基質上に移植し、12 週間後にチタンプレートを把持したところ、頭蓋骨と結合していることがわかった。以上より、脱細胞化腱シートを介したチタンプレートの頭蓋骨への結合の可能性が示された。今後、および脱細胞化腱シートとチタン表面の界面における骨形成を評価する予定である。

種々の方法により作製された脱細胞化腱シートの HE 染色



203. 歯周靭帯再構築のための脱細胞化腱シートの開発

中村　奈緒子

芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科 細胞制御工学研究室

Key words：歯周靭帯，歯根膜，脱細胞化腱，細胞外マトリックス，コラーゲン線維

緒　言

腱・靭帯は主にコラーゲン線維で構成されるが、この線維は束状構造を形成している。線維の配列が密で走行が張力の方向に沿った配向をしていることから密性結合組織と呼ばれ、非常に強い力に耐えうる構造をし、これらは骨格を動かすための重要な役割を担っている。腱は骨と筋肉を、靭帯は骨と骨を繋いでいるが、腱・靭帯と骨との結合部位は、軟組織である腱・靭帯のコラーゲン線維が、硬組織である骨の内部に突き刺すような構造で結合している。この複雑な構造は、組織の発生の段階で構築されたものと考えられており、現時点では人工的に再現することは困難である。本研究課題では特に歯周靭帯（歯根膜）に着目した。歯周靭帯は骨と歯のセメント質を繋ぐ靭帯であるが、力学的に歯を支えるだけでなく、多くの血管や神経を含んでいることから、歯への栄養供給や噛みごたえの感覚を司る役目、また、細菌感染の予防などの役割も担っている。歯の喪失に対する現在の歯科治療において、歯科インプラントは欠かせない治療法の一つであるが、歯科インプラント治療はインプラントを歯槽骨に直接埋入して結合させるため、本来の歯と歯周組織が有する歯周靭帯の機能が欠如していることが問題としてあげられる。上記の問題を解決するため、次世代の歯科インプラント治療技術として、歯周靭帯機能を有する「歯周靭帯機能付与型の歯科インプラント治療」の創製が期待される。

国内外の先行研究では、歯周靭帯細胞で調製した歯周靭帯細胞シートを用いた治療法や、歯胚細胞を用いた歯周靭帯創製に関する研究が行われ、良好な結果が得られている。これらは、細胞を主体としたアプローチであり、歯根膜細胞シートでは、患者自身から細胞を採取し、培養して増殖させ、それらを目的の状態にして患者に戻す作業を必要とし、器官原基法では、胎児から歯胚を採取する必要がある。

一方、われわれは材料を主体としたアプローチとして、三次元構造を有する細胞外マトリックスによる歯周靭帯再生を目指した。これまでに、細胞成分を除去した脱細胞化下顎骨を用い、歯周靭帯の細胞外マトリックスと人工歯との結合に関して検討し、脱細胞化下顎骨に歯周靭帯を残存させた状態で歯を抜去し、抜歯部の形状に適合する形状のインプラントモデルを挿入し、脱細胞化歯周靭帯の再細胞化によりインプラントモデル表面との脱細胞化歯周靭帯が結合することが明らかとなった。これは、歯周靭帯の細胞外マトリックスが生体内で異所性に細胞を再配置させることが可能であること、さらに、その細胞に機能発現を誘導することが可能であることから、歯周靭帯を再構築させ、その過程を経てインプラントモデル表面と結合させることが可能であると考えられた［1］。

本研究では、細胞外マトリックスによる異所性への細胞の再配置や機能発現誘導に注目した。歯周靭帯と同様に密にコラーゲン線維が配列した腱・靭帯を用いることで、歯周靭帯の再生に必要な細胞を生体内で適切に配置させ、さらに神経細胞等の歯周靭帯の機能を担う細胞の機能の発現を促せると考えた。腱・靭帯は、身体の部位によりその長さが異なるが、薄くシート状に加工することで、歯周靭帯を模擬できると考えた（図 1）。これまでに靭帯組織のシート加工を試みたが、靭帯組織の採取における量的な制約、採取方法の困難さ、サイズの問題があった。そこで、同様の構造を有し、より多くの組織を採取できてサイズの問題も解決できる腱を利用することとした。本研究では、「歯周靭帯機能付与型の歯科インプラント治療」の創製を目指し、シート状に加工した脱細胞化腱の歯周靭帯様材料としての応用について検討した。

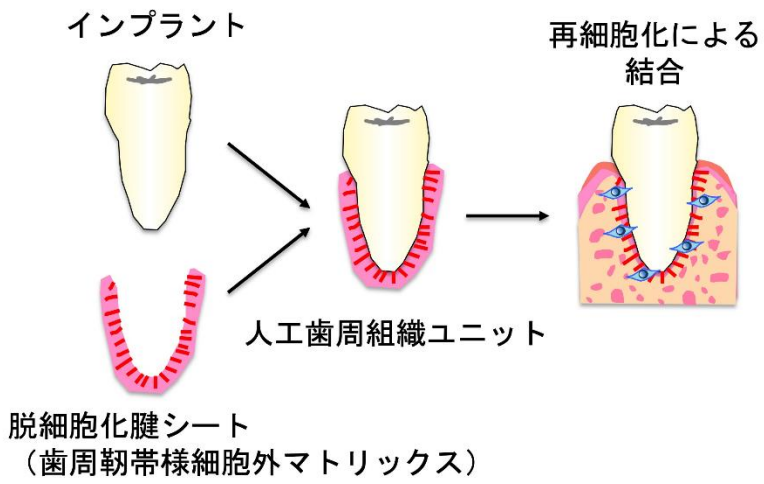


図 1. インプラント/歯周靭帯一体型の人工歯周組織ユニットの概念図
従来の歯科インプラント（人工歯根）にシート状に加工した脱細胞化腱を付与することで、歯科インプラントと歯槽骨の直接的な骨結合ではなく、歯周靭帯を介した結合を目指した。

方　法

1. 歯周靭帯マトリックス様の脱細胞化腱組織シートの作製

ブタの腓骨－脛骨から足底腱を摘出し、－20℃で冷凍後スライサーを用いて薄切した。殺菌後 3 種類の界面活性剤（SDS：ドデシル硫酸ナトリウム、SDC：デオキシコール酸ナトリウム、Triton X-100）に浸漬、およびまた、高静水圧処理（HHP）にて細胞膜を破壊した後、核分解酵素（DNase）を用いて核の分解を行った。これらの手法で作製したシートと、未処理のシートを繊維の配向性や残存 DNA 量に注目して評価を行った。

2. 生体内における脱細胞化腱シートの繊維配向性及び細胞浸潤性評価

作製したシートをラットの頭蓋骨基質上と頭蓋骨の骨膜間に移植した。頭蓋骨基質上は骨が完全に露出するように骨膜を剥離させ、シートを埋入した。一方、骨膜間は骨膜を剥離し骨膜と骨膜の間にシートを埋入した。8 週間後に取り出し、シートと骨の界面の繊維の配向性や骨形成に関連する細胞に注目し評価を行った。線維の配向性を定量的に評価するために頭蓋骨と腱シートの線維がなす角を測定し、骨近傍の腱シートの線維から頭蓋骨に 10 本線を引き、測定した角度の分布を求めた。

3. 脱細胞化腱シートのインプラント材料表面および骨との結合の検討

インプラント材料として、歯科インプラントに広く用いられているチタンを用いた。チタンプレートを表面処理し、走査型電子顕微鏡（SEM）観察にて表面構造を評価した。ラットの頭蓋骨基質上に作製したシート、表面処理したチタンプレートの順で移植し、12 週間後に取り出した。作製した脱細胞化腱シートを介したチタンプレートの頭蓋骨への結合を評価した。

結果および考察

1. 歯周靭帯マトリックス様の脱細胞化腱組織シートの作製

HE 染色による組織学的評価を行った結果、脱細胞化処理によって細胞核が除去されていることがわかった（図 2）。また、SDS と SDC で処理したシートでは大きい空隙、Triton で処理したシートでは小さく複数の空隙が観察された。一方 DNA 定量では、未処理と比較し脱細胞化処理を行ったシートのほうが、残存 DNA 量が有意に減少していた。また、脱細胞化基準［2］である 50 ng/mg をすべての脱細胞化処理で満たしていた。

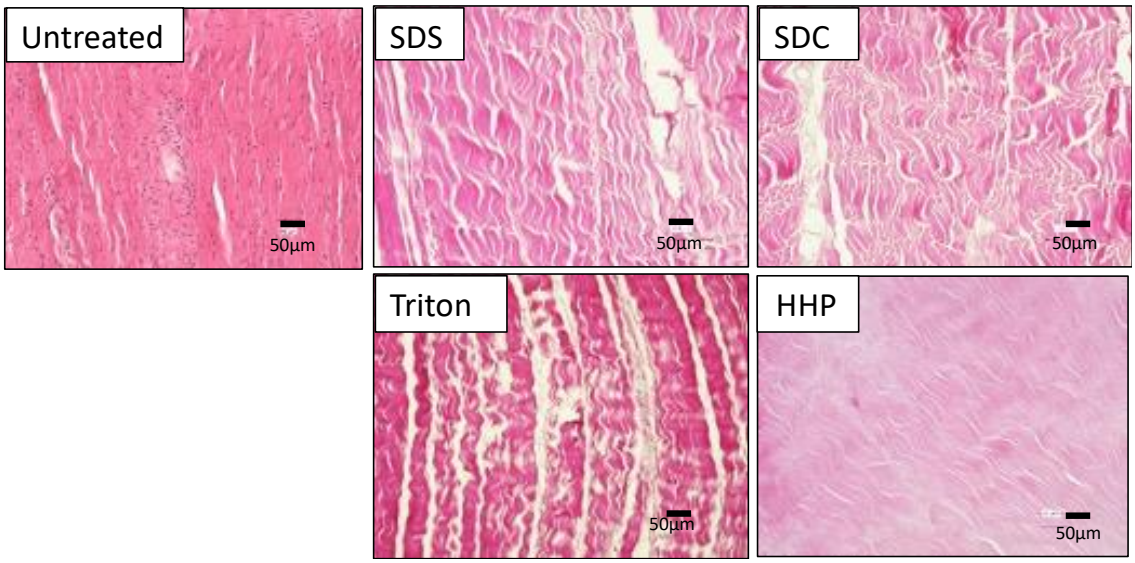


図 2. 脱細胞化処理後の腱シートの HE 染色
青紫色は細胞核、ピンク色は細胞質および細胞外マトリックスを示している。スケールバーは 50 μ m。

2. 生体内における脱細胞化腱シートの繊維配向性及び細胞浸潤性評価

骨膜間に移植された脱細胞化腱シートでは、移植前と比較して細胞核が多く観察され、細胞が浸潤していることがわかった（図 3)。これらの細胞の多くはその形状から線維芽細胞であると考えられた。また、骨基質を露出した骨基質上移植でも骨膜間移植と同様に細胞の浸潤が観察されたが、この条件では線維芽細胞のほかに脱細胞化腱シートと骨の間に破骨細胞も観察された。骨のリモデリングが行われる際には、まず破骨細胞が骨を吸収し、その後、破骨細胞が骨芽細胞を誘導し骨形成が行われると考えられている。骨基質を露出した骨基質上において脱細胞化腱シートと頭蓋骨の間に破骨細胞が観察されたことから、脱細胞化腱シートと骨の間で骨のリモデリングが行われ、その過程でシートの線維が取り込まれ結合する可能性が示唆された。

コラーゲン線維の配向性は、本実験ではコラーゲン線維が骨に対して垂直となるように移植した結果、骨膜間移植ではすべてのサンプルで歯根膜の骨に対する角度の 60° から移植時の 90° の範囲で配向性が維持されていることがわかった（図 4)。また、物理学的手法の HHP 脱細胞化腱シートでは歯根膜のコラーゲン線維の角度と類似した傾向を示し、化学的手法による脱細胞化腱シートでは異なる傾向を示した。一方、骨基質露出のコラーゲン線維の配向性は、歯根膜の配向性とは類似していないものの、すべてのサンプルで歯根膜の骨に対する角度の 60° から移植時の 90° の範囲で配向性が維持されていることがわかった。したがって、骨膜間および骨基質上への移植において、脱細胞化腱シートの構造が維持され、移植時の配向性が保たれていることがわかった。骨基質上でのみ破骨細胞による骨のリモデリングの可能性が示唆されたことより、骨基質上への移植により骨結合が期待できると考えられた。

物理的な手法である HHP と化学的な手法の界面活性剤を用いた方法では、脱細胞化処理後のコラーゲン線維の間隙等の違いはあったものの、移植後ではどのサンプルにおいても同様に構造が維持されていたことより、本実験で得られた程度の組織構造の違いは、再細胞化に影響を与えないことがわかった。

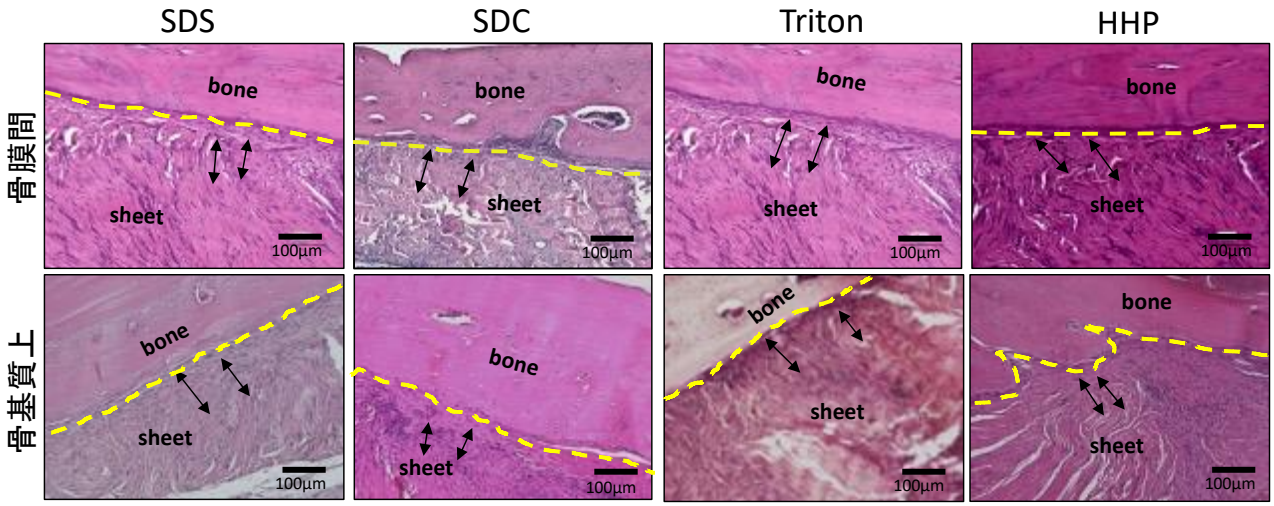


図 3. 移植 8 週後の脱細胞化腱シートの HE 染色

頭蓋骨の骨膜間および骨基質上に移植された脱細胞化腱シートの HE 染色像。黄色の破線は骨とシートの界面を示しており、矢印はシートの繊維方向を示している。スケールバーは 100 μm。

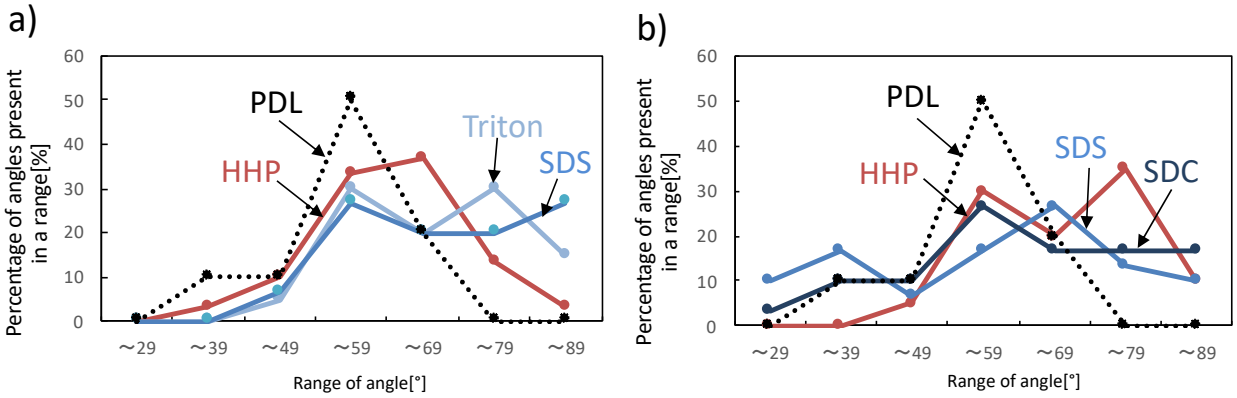


図 4. 頭蓋骨と脱細胞化腱シートがなす角の角度分布

a) 骨膜間移植における角度分布。

b) 骨基質上移植による角度分布

3. 脱細胞化腱シートのインプラント材料表面および骨との結合の検討

チタンプレートを表面処理し、SEM 観察した結果、機械加工表面の表面と比較すると、表面処理により微細な構造が形成されていることがわかった（図 5）。これらのチタンプレートを脱細胞化腱シートとともに骨基質上に移植し、12 週間後に取り出したところ、結合組織の膜で覆われていた。結合組織を除去し、チタンプレートを把持したところ、頭蓋骨と結合していることがわかった。

以上より、脱細胞化腱シートを介したチタンプレートの頭蓋骨への結合の可能性が示された。今後、および脱細胞化腱シートとチタン表面の界面における骨形成を評価する予定である。

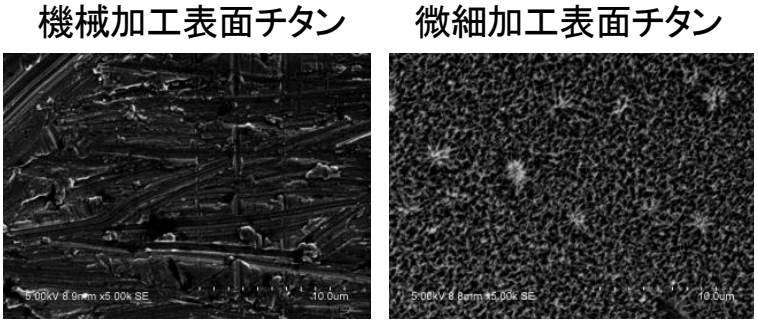


図 5. 表面処理したチタンプレートの SEM 観察
スケールバーは 10 μ m。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京医科歯科大学生体材料工学研究所物質医工学分野の岸田晶夫教授、木村剛准教授である。また、チタンプレートの表面処理に関して、東北大学大学院歯学研究科分子・再生歯科補綴学分野の山田将博准教授にご協力いただいた。

文　献

1) Nakamura N, Ito A, Kimura T, Kishida A. Extracellular Matrix Induces Periodontal Ligament Reconstruction In Vivo. Int J Mol Sci. 2019 Jul 3;20(13):3277. doi: 10.3390/ijms20133277. PMID: 31277305

2) Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials. 2011 Apr;32(12):3233-43. Epub 2011 Feb 5. PMID: 21296410 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057.