

ヒト歯髄幹細胞のスフェロイド培養と歯髄による脊髄神経の再生

村田 勝 [北海道医療大学歯学部／准教授]
伊東 学 [北海道大学大学院医学研究科／教授]
赤澤 敏之 [北海道総合研究機構／主幹]
平 敏夫 [株式会社プライマリーセル／社長]
柏崎 晴彦 [北海道大学大学院歯学研究科／助教]
長野 二三 [北海道医療大学歯学部／助教]

背景・目的

2005年経産省支援を受けてスタートした「歯のバイオリサイクル医療システムの開発」事業で、2装置の開発に成功し、特許申請や自家象牙質移植の臨床研究開始などの成果を得た。自家象牙質移植による顎骨再生治療は有害事象なく治療目的を達成し、韓国で先行して普及した。一方、歯髄細胞のプロセッシング研究は発展途上であり、また歯で他領域の組織再生に貢献する挑戦的研究はなされていない。

本研究では、歯髄と象牙質を有効利用する「歯のリサイクル」プロジェクトを確実に発展させるため、ヒト抜去歯から歯髄を迅速かつ無菌的に採取するプロセスの確立、歯髄スフェロイド培養、腸骨欠損モデルと脊椎損傷モデルへのヒト象牙質移植を医歯工連携で試みた。

内容・方法

1) 汚染歯の除菌と歯髄採取のプロセッシング技術

歯の除菌処置：抗菌薬溶液中の超音波洗浄。ナノ・マイクロバブル効果による除菌時間の短縮化

歯髄採取方法：ダイアモンドディスクを用いた分割法の場合；歯種形態の相違による分割部位の選定

自動粉碎法の場合；回転数と時間の適正化

2) 歯髄のスフェロイド培養と細切培養

培養方法：10%FBS、100 Unit / ml ペニシリン G、0.1 mg/ml ストレプトマイシン、2.5 μ g/ml アンフォテリシン B を添加した DMEM 培地を細胞培養用シャーレ(直径9 cm)2枚に5 ml 分注した。

PBS で洗浄した歯髄をひとつずつ静置した。一方は滅菌したカバーガラスを歯髄の上に置き、他方はそのまま培養した。1週間、2週間、3週間、4週間後に培地を交換し、実体顕微鏡で細胞を観察した。

3) ヒツジ腸骨欠損部へのヒト象牙質移植実験

全身麻酔下で皮膚に切開を加えて、腸骨に到達し、腸骨欠損モデルを作成した。同部にヒト抜去歯から調整した3種類の歯根型象牙質(30分脱灰、60分脱灰、24時間脱灰)を移植した。創部は緊密に縫合した。

移植2か月、4か月後に切除して、エックス線 CT撮影と組織切片作製(ヘマトキシリン・エオジン染色：HE)

を試みた。

4) ヒツジ脊椎椎間板損傷モデルへのヒト象牙質移植実験

全身麻酔下で皮膚・筋肉に切開を加えて、脊椎に到達し、第2-第3腰椎部(L2/3)とL4/5部の椎間板と椎体終板を削除した。同部にヒト抜去歯から調整した2種類の歯根型象牙質(30分脱灰、60分脱灰)を移植した。

移植2か月、4か月後に切除して、エックス線 CT撮影と組織切片作製(HE染色)を試みた。

結果・成果

1) 汚染歯の除菌と歯髄採取のプロセッシング技術

除菌対策：抗菌薬(ペニシリン G、ストレプトマイシン、アンフォテリシン B 含有)溶液中の2分間超音波洗浄により歯面からバイオフィルムが除去でき、チオグリコール酸培地の7日間培養検定で細菌増殖を認めなかつた。ナノ・マイクロバブル(キャビテーション)効果により無菌化時間を短縮できた。

採取対策：ダイアモンドディスクを用いた分割の場合；歯を装置(本学独占特許；商品名：Fixくん)に固定後、歯頸部から3 mm 下方での分割が適していた。ただし、歯根形態の相違による分割部位の微量調整は必要である。冷却自動粉碎法の場合；電動粉碎装置(本学特許；商品名：OSTEOMILL)12,000 rpm、3秒が適していた。

2) 歯髄スフェロイド培養

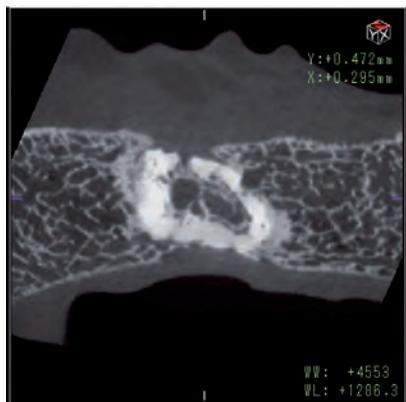
歯髄単独群、歯髄/カバーガラス群とも1、2、3、4週間後では歯髄由来細胞の outgrowth は確認できなかつた。機能分化した細胞層が外周に存在しており、増殖能の高い細胞が内層に存在したためと考える。同様な培養条件で、細切歯髄断面からは4週後に細胞の outgrowth を認めている。なお、スフェロイド培養歯髄に outgrowth は認めなかつたものの組織の融解壊死は起きなかつた。

3) ヒツジ腸骨欠損部へのヒト象牙質移植実験

移植2か月後、30分脱灰歯根型象牙質は母骨と連続し、4か月後には象牙質内部への骨形成が CT により確認できた。現在、組織切片を作製中である。



移植後2か月(縦断面)



移植後4か月(横断面)

4) ヒツジ脊椎椎間板損傷モデルへのヒト象牙質移植 実験

移植2か月後、30分脱灰歯根型象牙質と60分脱灰歯根型象牙質周囲に新生骨の形成を示唆する陰影がCTにより確認できた。椎体からの反応性骨形成はわずかであった。現在、組織切片を作製中である。

今後の展望

硬組織・歯から軟組織・歯髄を採取する簡便な方法がなかった。装置を用いた新規な歯髄採取法とそのプロセッシングの基盤となる技術である。この基盤技術をまず歯髄の基礎研究に役立て、将来の臨床研究に備えたい。ヒト象牙質マテリアルを顎顔面外の骨組織内に世界で初めて移植できた。歯由来組織で他領域の骨再生や神経再生に貢献できるように切除組織をCTのみならずMRIや組織切片で評価して論文発表する。これらの成果をもとに北大はじめ、韓国・ソウル国立大学を含む国際共同研究へ発展させたい。