

【緒言】歯周病は、歯周組織の破壊を招く慢性炎症疾患で、歯を失う最大の原因とされている。歯周病等で失われた歯周組織の再生は、歯科医療にとって大きな目標の一つである。近年、歯周組織の再生には、新生歯根膜組織の存在が重要とされており、歯根膜由来の線維芽細胞を増殖させ、自家移植することで歯周組織を再生する試みが報告されている。その報告では、*in vitro*にて培養した歯根膜由来細胞を使用して歯周組織を再生することは可能であるが、細胞分化や移植に関しては、適切な基質の存在が重要であると示している。羊膜は胎盤の最表層を覆う薄膜で、一定の厚みを持った実質組織から構成される。分娩後に通常破棄される組織で、胎盤よりほぼ無菌的に採取され、倫理的、技術的に容易に入手することが可能である。羊膜は抗炎症作用・感染抑制作用などの特徴を有し、古くから眼表面の再建材料など、さまざまな手術療法に用いられてきた。また最近では、細胞の培養基質としての高い有用性・有効性が注目されている生体材料である。

そこで本研究は、歯根膜由来細胞の培養基質として羊膜を用いることを着想し、*in vitro*にて培養した歯根膜由来細胞を羊膜上で培養した、新規培養歯根膜由来細胞シートの開発を行った。

【材料と方法】実験材料の羊膜は、帝王切開時に胎盤より採取し、洗浄後、羊膜上皮細胞を剥離・除去したものを使用した。歯根膜由来細胞は、矯正治療目的に抜去された健全な智歯の歯根中央部 1/3 の歯根膜組織を剥離・採取し、初代培養後、3～4 代継代培養したものを使用した。継代培養した歯根膜由来細胞を、セルカルチャーインサート上に静置した羊膜上に播種し、約 2～3 週間の培養を行い羊膜上培養歯根膜由来細胞シートを作製した。作製した培養細胞シートに対して、免疫組織化学的および電子顕微鏡による観察を行い、羊膜上の培養歯根膜由来細胞が機能的な特性を有しているか、また羊膜が歯根膜由来細胞の培養基質として適しているかについて検討を行った。

尚、本研究における歯根膜および羊膜の利用については、該当患者に対し、本研究の内容と安全性についての説明を行い、同意を得た上で実施した。また、京都府立医科大学医学倫理審査委員会の許可（R-21）を受けた上で行った。

【結果】蛍光抗体法での免疫組織化学的な観察では、羊膜上培養歯根膜由来細胞シートにおける歯根膜由

来細胞の細胞質において、細胞増殖マーカー（Ki-67）陽性反応の局在と間葉系細胞マーカー（vimentin）の発現を認めた。培養細胞間においてはデスモゾーム構成タンパク（desmoplakin）、タイト結合構成タンパク（ZO-1）の発現を認め、培養細胞の基底部（細胞-羊膜境）においては、基底膜構成細胞接着タンパク（laminin 5/alpha 5 chain）、基底膜構成コラーゲン（collagenIV/VII）の発現を認めた。電子顕微鏡（SEMおよびTEM）による羊膜上培養歯根膜由来細胞の観察では、培養 2 週間後で細胞増殖し、培養 3 週間後では約 3～5 層の重層化を認めた。重層化した細胞は表層および下層（基底層）で平坦な細胞形態を呈しており、下層（基底層）の細胞は羊膜組織中に進入し結合するような構造が観察された。そして、羊膜上培養歯根膜由来細胞同士は隣接する細胞間で接着し、デスモゾーム様の結合が観察された。

【考察】組織欠損部の再生に重要な要素として、細胞、基質、増殖因子が必要と言われており、治癒の過程でこれらが同時に存在し、相互連携することで組織が新生される。歯周病等により失われた歯周組織の再生もこれと同様であり、近年の報告においても、歯周組織再生には新生歯根膜組織の存在が重要であり、細胞移植には基質の必要性が示されている。これまで歯根膜組織由来の細胞と様々な基質を用いて、歯根膜由来細胞シートの作製を行う研究がみられるが、理想的な基質はまだ開発されていない。そこで本研究では、抗炎症作用・感染抑制作用等の諸作用があり、細胞の培養基質としての高い有用性・有効性が注目されている羊膜の性質に着想し、羊膜上培養歯根膜由来細胞シートの開発を試みた。歯根膜由来細胞の培養基質に羊膜を用いた研究報告はこれまでに無いため、将来的に同培養細胞シートを用いた歯周組織再生療法の開発を目指すうえで、羊膜上における歯根膜由来細胞の特性の検討を行うことは、重要であると考えた。

結果として、羊膜上培養歯根膜由来細胞シートは羊膜上にて培養した歯根膜由来細胞が、歯根膜組織に近い性質を保持し、細胞増殖していることが確認出来た。また歯根膜由来細胞間にみられた強固な接着装置の存在は、培養細胞が一枚の細胞シート状の構造を維持していることを示した。そしてさらに、羊膜上にて基底膜を構成し接着していたことより、羊膜が歯根膜由来細胞の分化と増殖に適当な基質であることを証明した。

さらなる検討が必要と思われるが、羊膜上培養歯根膜由来細胞シートは今までにない歯周組織の再生治療に応用可能な新たな移植材料となる可能性が示唆された。今後、同培養細胞シートの *in vivo*での移植実験などを行い、歯周組織再生能などについてさらに検討を加えていく必要があると考えている。