

冷凍保存した歯の移植

河田 俊嗣, 河野 信也, 釜田 寛子*
 田井 雅子*, 加来 真人, 藤田 正*
 當麻愉衣子, 本川 雅英, 筒井 啓介
 大谷 淳二, 重河 真央*, 柄 なつみ*
 丹根 一夫*

Transplantation of Cryopreserved Tooth

Toshitsugu Kawata, Shinya Kohno, Hiroko Kamada, Masako Tai*, Masato Kaku, Tadashi Fujita*,
 Yuiko Tohma, Masahide Motokawa, Keisuke Tsutsui, Junji Ohtani, Mao Shigekawa*,
 Natsumi Tsuka* and Kazuo Tanne*

(平成17年9月30日受付)

緒 言

再生医療は、21世紀に最も期待される医療の1つである。また、その基礎研究と臨床応用の進展には大いに期待が寄せられる。歯の移植や再植は生体組織を用いた移植医療であり置換医療でもあることから、歯科の再生医療の原点と考えられる。本治療法については、1990年に Andreasen¹⁾ によって体系化がなされた。歯の移植や再植の成功の成否の要因については様々考えられるが、近年、ドナー歯とレシピエント側の歯根膜の生存率がその結果に大きく関与することが示唆されてきた。さらに、歯の移植を念頭に入れた歯根膜組織について、歯科再生医療分野において多方面から検討されている。これまで、歯の移植や再植において、ドナー歯の歯根膜の乾燥を防止し、再植を速やかに完了することが望ましいとされることから、歯の即時自家移植が一般的に行われてきた²⁻⁷⁾。

一方、冷凍保存技術は医療、工業、食品業界で目覚ましい発展を遂げている。近年、冷凍保存技術が医療へ与える影響は大きく、特に臍帯血バンク⁸⁾ や精子および卵子の凍結保存⁹⁾ などから一般生活においても身近な存在となってきた。ヒトの組織や細胞の冷凍保存方法としては、液体窒素中へ直接常温または水温から

投入する方法が一般的であった¹⁰⁾。しかしながら、この方法では冷凍時の急激な温度変化による組織や細胞の破壊が生じることから、温度管理を行いながら凍結させるプログラムフリージングが近年開発された。プログラムフリージングの特徴は、凍結時に氷が生長する温度帯域を一気に通過させることで組織や細胞への悪影響を軽減することである¹¹⁾。さらに、温度管理を行いながら微少磁場を加えることにより、均一な氷を造る冷凍保存法が開発された。この方法によって、液体窒素による冷凍が原因で生存率が低い組織や細胞に対しても生存率の向上が望め、長期冷凍保存が可能であると考えられる。

歯の移植医療における冷凍および解凍時の組織や細胞の破壊は、移植成績に致命的な影響を及ぼすことから、凍害や氷害を防止した冷凍保存技術の進歩はさらに重要な因子と考えられる。また、再生医療の普及にともなって組織や細胞の冷凍保存を目指したバンクが急速に発展していくと期待される。

本研究は、抜歯したラット切歯を微少磁場を加えながらプログラムフリージングを行い、冷凍保存した後、解凍、再植した場合の歯周組織再生へ与える影響を明らかにすることを目的とした。

研究 方 法

本研究は、広島大学動物実験指針および広島大学自然科学研究支援開発センター 内規にしたがって行った。

広島大学病院口腔健康発育歯科矯正歯科

* 広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座

表1 実験に供されたラットの日齢と匹数

処 置	抜歯直後	急速冷凍	プログラム フリージング	非再植歯	抜歯後 再植	急速冷凍 後再植	抜歯プログラム フリージング後再植
ALP 染色	60(3)	60(3)	60(3)	-	-	-	-
歯周組織像と酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色	-	-	-	実験側の 反対側を 観察 (0)	67(3)	67(3)	67(3)

() は匹数

1. 実験動物

生後60日齢ウイスター系雄性ラット (平均体重172.5 ± 13.3 g) 18匹を実験に供した。ラットの飼育では、粉餌飼育 (日本クレア社製 CE2, 東京) および水道水を自由に摂取できるようにした。

2. 歯の冷凍保存と再植方法

ラット18匹を対象として、ネンブタール (ダイナポット社, 大阪) 深麻酔下でダイヤコートミニ残根鉗子 (木村鉗子製作所, 東京) を用いて右側上顎中切歯を抜去した。次いで、アルカリフォスファターゼ活性陽性反応と破骨細胞数の同定のため、同ラット3匹において抜歯後直ちに抜歯部位へ再植し、左側上顎中切歯を矯正歯科用接着レジン (オルソマイトスーパーボンド, サンメディカル, 滋賀) にて強固に固定した。また、ラット6匹を抜歯後直ちにマイナス196度で冷凍した群と、抜歯後にプログラムフリーザー (アビー社製, 千葉) を使用し、マイナス30度で誘電率を15 mA (0.015ミリテスラ) とした群とに等分した。なお、歯の冷凍保存液としてバンバンカー2 (日本ジェネティクス社製, 東京) をチューブ内に9 ml 使用した。

プログラムフリージング後、超低温フリーザー (サンヨー, 大阪) を用いてマイナス150度にて3日間冷凍保存した後、再植時に気温プラス15度の室内で自然解凍した。解凍後の歯を歯牙保存液ネオ (ネオ製薬工業, 東京) にて十分洗浄した。次いで、抜歯窩を生理食塩水で十分洗浄し、再植を行った後、探針を用いて抜歯窩の汚れを除去し、同部位の自然な出血を確認した。再植した歯は、左側上顎中切歯と矯正歯科用接着レジン (オルソマイトスーパーボンド, サンメディカル, 滋賀) を用いて強固に固定した。また、抜去や再植を行わなかった左側上顎中切歯を対照歯とした。なお、実験に供したラットの週齢と匹数については、表1に示す。

3. 歯の再植に伴う組織変化ならびに破骨および破歯細胞数の検討

1) アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の組織化学的所見

ネンブタール深麻酔下で灌流固定前の右側上顎中切歯を前述の方法で抜去し、New Fuchsin Substrate System (DAKO) を用いて切歯歯根表面をALP染色した。同歯の歯頸部から根尖方向へ20~40 μmの範囲について実体顕微鏡 (オリンパス, SZ61, 東京) を用いて観察した。

2) 歯根表面と組織切片作製方法および免疫組織化学染色方法

歯の再植7日後、免疫組織化学的染色のためネンブタール深麻酔下で4%の中性緩衝ホルマリン溶液による灌流固定を行い、上顎骨を摘出後12時間同液にて浸漬固定を行った。次いで、10%エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム溶液 (pH=7.4) を用いて2週間脱灰し、アルコールによる脱水後、パラフィン包埋した。同パラフィンブロックを図1に示す方向にて7 μm 前頭断連続切片を作製し、歯頸部より根尖方向へ20~40 μm 範囲について酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) を施し、対比染色としてヘマトキシリンエオジン染色を行った。

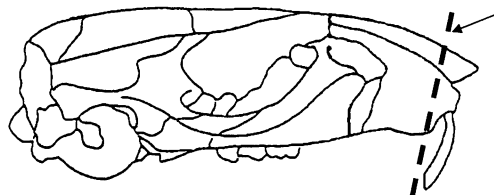


図1 観察方向と部位

前頭断連続パラフィン切片の方向と観察部位
歯頸部より根尖側へ20~40 μm 範囲 (矢印部)

3) 破骨細胞および破歯細胞数の算定

TRAP染色を施した再植歯の組織切片を光学顕微鏡下で観察し、一切片上のTRAP陽性細胞数を算定した。破骨細胞と破歯細胞については、骨表面に近接するTRAP陽性細胞を破骨細胞とし、歯根表面に近接する

ものを破歯細胞とした。各実験群から得られた破骨細胞数と破歯細胞数について分散分析を行った後、Fisher法により多重比較検定を行い有意差の検定を行った。

結 果

1. ALP 活性における変化

ALP 活性陽性反応は、拔牙直後再植群とプログラムフリージング群の歯根表面については大きな差異が認められなかったが、急速冷凍群において活性の低下が認められた。また、特に ALP 活性の低下しているほと

んどの部位で、拔牙時の外傷と思われる歯根膜の損傷が認められた (図2)。

2. 歯周組織内の歯根膜線維、血管と歯槽骨の再生について

組織変性や歯根吸収などについて実験群間の大きな差異は認められなかった。しかし、急速冷凍後に移植された群では、他群と比較して歯根膜腔が広く、歯根膜に面する歯槽骨の凹凸が顕著であった。さらに歯槽骨に近接する歯根膜中の血管数が急速冷凍後に移植された群においてのみ著しく減少していた (図3)。

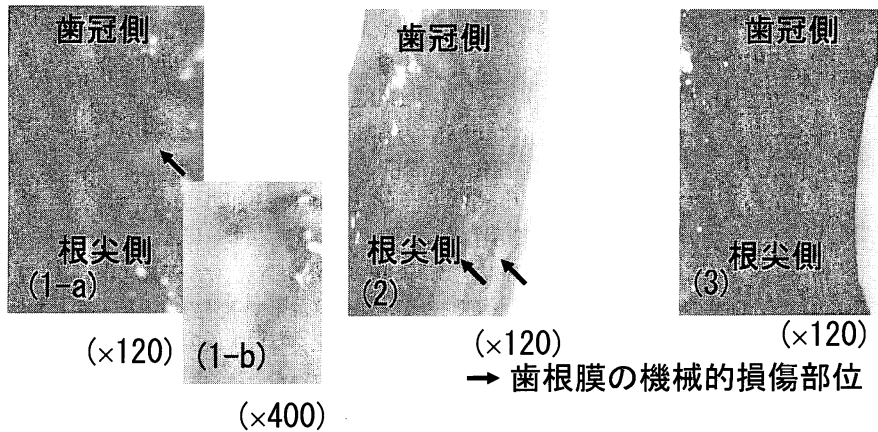


図2 ラット上顎切歯における歯根表面の ALP 活性組織化学的所見
 (1-a) 拔牙直後
 (1-b) 拔牙直後 強拡大
 (2) 急速冷凍後
 (3) プログラムフリージング後

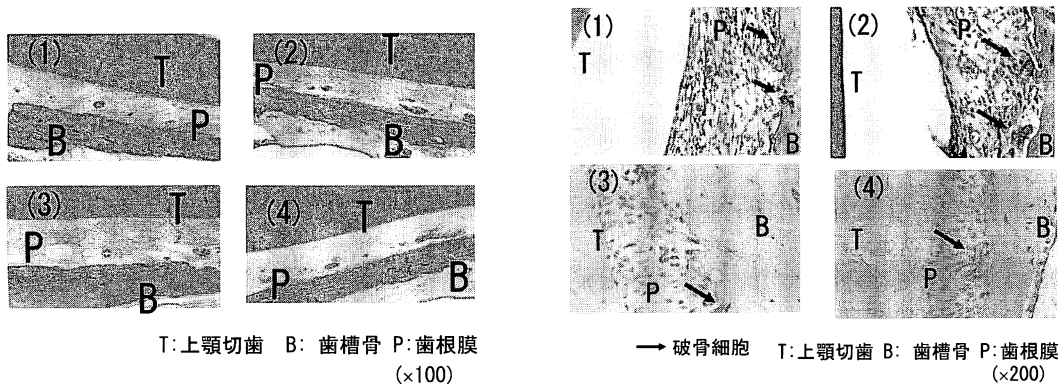


図3 上顎切歯の歯周組織像
 (1) 非再植歯
 (2) 拔牙後再植
 (3) 急速冷凍後3日間冷凍保存後再植
 (4) プログラムフリージング後3日間冷凍保存後再植

図4 TRAP 染色による上顎切歯の歯周組織像
 (1) 非再植歯
 (2) 拔牙後再植
 (3) 急速冷凍後3日間冷凍保存後再植
 (4) プログラムフリージング後3日間冷凍保存後再植

3. 破骨細胞と破歯細胞について

いずれの実験4群においても歯槽骨上にTRAP陽性多核巨細胞が観察された(図4)。また、破骨細胞は非再植歯群と比較して有意な相関を示したが、破歯細胞においてはどの実験群間にも有意な相関は認められなかった(表2)。

表2 破骨細胞数と破歯細胞数

	破骨細胞数	破歯細胞数
非再植歯	2.9±0.22	0.23±0.21
抜歯後に再植	5.0±0.91*	0.22±0.44
急速冷凍	5.4±1.14*	0.34±0.53
プログラムフリージング	5.2±1.08*	0.20±0.45

*: p<0.05 vs 非再植歯(対照群)
各群 n=3

考 察

1. 実験方法について

1) 歯の再植と移植について

近年、自家歯牙移植については再植後の歯根膜中の細胞の再生¹²⁾、歯根膜の線維成分の再生¹²⁾、歯根膜の血管の再生¹³⁾、歯根膜の神経の再生^{14,15)}、歯髄組織の再生¹⁶⁾、歯槽骨の再生¹⁷⁾など、様々な分野における検討が進められてきた。しかしながら、再植や移植に関する基礎研究において、未だ不明な点が多数存在する。このことが、臨床での再植と移植の手技において多くの意見が存在する理由と考えられる。近年、多数の臨床報告が行われており、歯の再植や移植の術後管理に関しては一定の治療方法が得られつつある²⁻⁵⁾。

再植のため用いられた実験動物としては、大型動物としてサル、ネコ、イヌであり、小型動物としてラビット、ラット、マウスが多く用いられてきた。今回観察したラット切歯は、再植の術式が容易であることから頻繁に用いられてきた^{18,19)}。抜歯方法は、歯根膜や歯槽骨への損傷を配慮して鉗子のみによって行われ、切歯を小刻みに回転させて抜歯した。

2) 移植歯の固定方法について

再植歯の固定において動物実験のほとんどが、強固に固定され大型動物ではヒト移植症例と同様に咬合せないように咬合調整がなされたり、術後の感染防止のため口腔衛生状態の管理が定期的に行われた。歯の再植や移植の初期の術後管理は、これまでの研究結果から重要とされてきた^{20,21)}。我々の実験では、小動物を用いたことから強固に固定して傷口を保護するように歯科矯正用レジンが築造された。その結果、歯頸部付近の顕著な感染炎症は術後7日まで認められなかった。

2. 歯の冷凍保存について

1) 冷凍保存歯の in vivo における実験

歯の冷凍保存については、これまでイヌの歯の2年間の冷凍保存²³⁾ また、サルの歯の長期保存の報告がある^{24,25)}。さらに、ほぼ同様の方法による短期保存ではあるが、ヒトの歯を冷凍保存した後に自家歯牙移植した症例報告や^{26,27)} 温度管理のみのプログラムフリーザーを用いた冷凍方法による治験例が報告されている^{11,28)}。移植や再植のための抜歯方法、抜去歯の冷凍保存、その冷凍保存歯を用いた移植や再植方法において年々発展を遂げ、近年、冷凍保存歯の移植後の術後成績が発表されるまでに至っている¹¹⁾。

2) 矯正歯科治療に関わる自家歯牙移植について

矯正歯科分野における自家歯牙移植の適応としては、先天性欠如や既に何らかの理由で永久歯を抜去された症例が挙げられる⁶⁾。矯正歯科治療の一環として行われる即時自家歯牙移植の多くは、歯の移動の観点から矯正治療期間の延長を余儀なくされることが多い。矯正歯科治療において、便宜抜歯や智歯の抜歯が行われるが、抜去歯を長期保存し、将来移植歯として用いることは、再生医学の見地から意義があり、治療方法の選択肢の拡大につながると考えられる。

3) 磁場を用いた冷凍保存方法について

冷凍保存方法は、これまで組織の乾燥を防止するための保存液と凍害や氷害を防止した冷凍方法が別々に考えられてきた。これでは、最終型の氷が冷凍保存液にあわせた冷凍方法を模索するに過ぎず、抜去歯の歯根膜にとって好ましい氷が形成されているか否かは疑問である。よって、今回の実験の予備開発の段階で、臨床での使用可能な安全かつ安心して使用できる保存液の開発と、その保存液を凍害や氷害を防止したプログラムフリーザーの開発を同時に行った。保存液の成分は、動物由来の化合物を含まない塩化カリウム、塩化マグネシウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、ジメチルスルホキシド(DMSO)を混合して保存液を作製した。プログラムフリーザーは、温度管理をマイナス30度で固定し、誘電率を15 mA (0.015ミリテスラ)とすることで保存液が均等に冷凍される条件を見いだした。この条件下でマウスの切歯の冷凍保存を行った。

3. 抜歯された歯の歯根表面のALP活性と歯周組織像について

生後60日齢のラットにおける抜歯直後のALP活性は、歯根全体に強く認められた。一方、急速冷凍の歯根表面のALP活性は、抜歯直後と比較して顕著に抑制されていた。このことは、冷凍と解凍の過程において

歯根表面のセメント質細胞生存率の低下が示唆された。また、特に ALP 活性の低い部位においては歯根表面の強拡大で観察した結果から、抜歯時の機械的損傷が認められた。さらに、プログラムフリージングを行った歯根表面の ALP 活性は抜歯直後と比較してほぼ同様の所見が得られた。このような ALP 活性の結果から、今回我々が行ったプログラムフリージングでは、急速冷凍法と比較して歯根表面の歯根膜及びセメント質細胞生存率が高いことが示された。さらに、今回の我々の結果と直接比較はできないが、他社の温度管理のみのプログラムフリーザーを用いた冷凍方法と急速冷凍と比較してもほぼ同様の結果が得られた²⁹⁾。

非移植歯、抜歯後再植、抜歯後におけるプログラムフリージング使用の3群間において冷凍保存3日後に再植された結果は、ほぼ同様の良好な歯周組織の治癒を伺わせる組織学的所見が確認された。しかし、急速冷凍後3日間冷凍保存し、再植したものは、他の再植された実験群の歯周組織と比較して、歯根膜腔の拡大と歯槽骨表面の凹凸の状態から、冷凍時の歯根表面細胞の生存率低下によって治癒の遅延を引き起こしたと考えられる。冷凍保存とは直接関係がないと考えられるが、抜歯された歯根膜の生存率が高いほど再植後の治療成績に大きく関与する³⁰⁾との研究報告がある。よって、今回の結果から移植後の治癒を円滑にするため、歯の冷凍時、冷凍保存時、解凍時の歯根膜への損傷はできるだけ抑制すべきであると考ええる。

4. TRAP 染色による上顎切歯の歯周組織像

非再植群と比較して、他の実験群は有意に高い破骨細胞数を示した。このことは、歯の再植に反応して歯槽骨表面の骨改造が旺盛に営まれていることを示す。なお、全ての実験群間において破骨細胞数に有意な差は認められなかった。さらに、歯の移植7日目においても歯根吸収は認められなかった。

以上、抜去歯の冷凍保存を応用した歯の再植に関して、移植7日後の組織化学的検討結果から、全ての移植群において歯周組織の生着が認められた。この結果は、歯を冷凍保存した後に再植した他の動物実験の結果と一致する^{12, 24, 25, 28, 29)}。しかしながら、これまで冷凍保存方法の違いによる歯周組織の再生治癒の差異について、比較した研究は全く認められない。冷凍方法や解凍時の組織破壊について論じた報告は全くなく、再植後の歯周組織の治癒についてのみの検討にとどまっていた。また、長期、短期間の歯の冷凍保存による抜去歯牙への影響を、解凍時の歯根膜に対する影響を考慮した場合、プログラムフリージングによる均一な凍結は極めて重要であると考ええる。

以上、今後さらに歯の冷凍保存技術を向上させるための研究が、必要であると思われる。また、歯科の再生医療の観点から何らかの理由で比較的健康な歯根膜を有する歯を抜去する際には、冷凍保存を行うことで将来の歯科治療の選択肢の幅を拡大する可能性があると考ええる。

謝 辞

本稿の発表にあたり専門の分野からご指導いただきました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻 先端医療開発科学講座 分子口腔医学・顎顔面外科学（口腔外科学第一）岡本哲治教授、顎口腔頸部医科学講座（口腔外科学第二）鎌田伸之教授、東森秀年助手、病態情報医科学講座（歯科放射線学）谷本啓二教授 同研究科創生医科学専攻 先進医療開発科学講座歯周病態学（歯科保存学第二）栗原英見教授、林秀昭助手に深謝いたします。

ご支援いただきました、ひろしま産業振興機構、広島県商工労働部産業振興総室、プログラムフリーザー開発に際し、多大なご支援を頂きました株式会社アビーの大和田哲男様、冷凍保存液開発、株式会社日本ジェネティックス社の馬場憲三様に深謝いたします。

文 献

- 1) Andreasen, J.O., Paulsen, H.U., Yu, Z., Ahlquist, R., Bayer, T. and Schwartz, O.: A long-term study of 370 autotransplanted premolars. Part I. Surgical procedures and standardized techniques for monitoring healing. *Eur. J. Orthod.* **12**, 3-13, 1990.
- 2) 下地 勲：自家歯牙移植におけるトラブルとその対応 (1). 歯界展望 **84**, 882-892, 1994.
- 3) 下地 勲：自家歯牙移植におけるトラブルとその対応 (2). 歯界展望 **84**, 1131-1145, 1994.
- 4) 下地 勲：自家歯牙移植におけるトラブルとその対応 (3). 歯界展望 **84**, 1377-1391, 1994.
- 5) 下野正基, 井上 孝：歯の移植・再植における歯根膜の重要性, 下野正基, 飯島国好編, 治癒の病理 臨床編 第3巻. 歯の移植・再植, 医歯薬出版, 東京, 85-106, 1988.
- 6) 萩田洋児, 米山和伸, 松本圭司：自家歯牙移植を併用した臼歯部欠損症例. 東京矯歯誌 **14**, 185-189, 2004.
- 7) 渡辺八十夫, 渡辺禎之：根未完成埋伏歯の自家歯牙移植により治療. 中・四矯歯誌 **13**, 126-135, 2001.
- 8) 高田 圭, 長村登紀子, 須郷美智子, 塩谷美夏, 高橋敦子, 崔硯, 平井雅子, 田口淳史, 渡辺信和, 高橋恒夫：臍帯血バンクにおける ISO9002 品質保証システムの導入と運用. 日本輸血誌 **49**, 473-479, 2003.

- 9) 京野廣一, 福永憲隆, 拝郷浩佑, 淵之上康平, 千葉せつよ, 中條友紀子, 八木亜季子: GV (Germinal Vesicle = 卵核胞) 期卵子の凍結保存. 産婦人科の実際 52, 1481-1486, 2003.
- 10) 右島富士男, 横山峯介, 西島正博: ガラス化法による卵巣凍結保存の検討. 産婦人科の実際 52, 2379-2382, 2003.
- 11) 河野正司, 花田晃治, 前田健康, 吉江弘正, 高木律男, 斎藤 力, 興地隆史, 小野和宏, 小林正治, 八卷正樹, 芳澤享子, 村田雅史, 澤田宏二, 布川寧子: 歯の移植の科学. クインテッセンス出版 東京, 9-20, 2003.
- 12) 井上 孝, 松坂賢一: 自家歯牙移植における創傷の治癒過程. 日本歯科評論 64, 69-77, 2004.
- 13) 岸 好彰, 松尾雅斗, 自家歯牙移植における血管の再生はどこまで可能か. 日本歯科評論 64, 78-86, 2004.
- 14) 下地 勲: 移植しに歯根膜感覚受容器は蘇るか?. 歯界展望 103, 918-934, 2004.
- 15) 田崎雅和: 自家歯牙移植における神経の再生の目標. 日本歯科評論 64, 87-94, 2004.
- 16) Andreasen J.O.: Effect of extra-alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal healing after replantation of mature permanent incisors in monkeys. *Int. J. Oral Surg.* 10, 43-53, 1981.
- 17) 下地 勲: 歯牙移植をインプラントより優先させたい場合とは. 日本歯科評論 64, 51-60, 2004.
- 18) 前田健康, 高野吉郎: 歯根膜の機能と神経分布: 治癒の病理<臨床編>第三巻 歯の移植・再植: 医歯薬出版, 東京, 107-125, 1995.
- 19) 前田健康, 高野吉郎: 神経の再生: 治癒の病理<臨床編>第三巻 歯の移植・再植, 医歯薬出版, 東京, 172-181, 1995.
- 20) 大島章久: 自家歯牙移植の臨床応用 第24報 移植歯の固定期間に関する一考察. 抄録, 愛院大歯誌 41, 380, 2003.
- 21) 大島章久: 自家歯牙移植の臨床応用 第23報 移植歯の固定法に関する一考察 (リジット固定かセミリジット固定か). 抄録, 愛院大歯誌 41, 380, 2003.
- 22) 山森徹雄, 高録伸郎, 島崎政人, 古澤正克, 島崎伸子, 清野和夫: 自家移植歯をブリッジ支台歯に応用した一症例. 奥羽大歯誌 30, 77-83, 2003.
- 23) 雨宮 啓, 下野正基, 井上 孝: 長期凍結保存が歯根膜細胞の活性に及ぼす影響——ビーグル犬の歯根膜細胞を用いた in vitro による研究——. 日口腔インプラント誌 15, 10-16, 2002.
- 24) Schwartz, O. and Andreasen, J.O.: Cryopreservation of mature teeth before replantation in monkeys (I). Effect of different cryoprotective agents and freezing devices. *Int. J. Oral Surg.* 12, 425-36, 1983.
- 25) Schwartz, O., Andreasen, J.O. and Greve, T.: Cryopreservation before replantation of mature teeth in monkeys. (II). Effect of preincubation, different freezing and equilibration rates and endodontic treatment upon periodontal healing. *Int. J. Oral Surg.* 14, 350-361, 1985.
- 26) Schwartz, O.: Cryopreservation as long-term storage of teeth for transplantation or replantation. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 15, 30-32, 1986.
- 27) Schwartz, O. and Rank, C.P.: Autotransplantation of cryopreserved tooth in connection with orthodontic treatment. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.* 90, 67-72, 1986.
- 28) 濱本宣興: 移植歯の冷凍保存に関する研究. 歯牙移植の臨床像. クインテッセンス出版, 東京, 109-112, 1996.
- 29) 菊地俊輝: 歯の凍結長期保存に関する実験的研究. 日口腔インプラント誌, 16, 48-62, 2003.
- 30) Berglund, L., Kurol, J. and Kvint S.: Orthodontic pre-treatment prior to autotransplantation of palatally impacted maxillary canines: case reports on a new approach. *Eur. J. Orthod.* 18, 449-456, 1996.