

論文の内容の要旨

氏名：井 口 慎 也

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Effect of local bone marrow stromal cell injection on ligature-induced periodontitis in mice

（マウス結紮糸誘発性歯周炎に対する骨髄間質細胞の効果）

歯周病は、主として歯周病原菌の感染に対する宿主応答の結果、歯周組織に破壊が生じる炎症性疾患である。その発症は、プラークの蓄積に起因し、歯周ポケットの形成、歯肉線維と歯根膜線維の喪失、アタッチメントロスの発生（接合上皮の根尖移動）および歯槽骨の吸収が生じる。

一方で、様々な再生医療において用いられる幹細胞には近年、免疫系にも作用することが明らかとなり、炎症の抑制作用を有し、炎症性疾患への有効な治療法の一つとして考えられるようになった。しかし、炎症性疾患である歯周炎に対する研究は少ない。そこで、本研究では、歯周炎の実験動物モデルに幹細胞を含んだ骨髄間質細胞（以下、BMSCs）が、歯周炎の進行抑制に有用であるかを検討した。

実験には、8週齢の野生型 C57BL/6 マウス（ $n = 15$ ）を用いた。マウスの大腿骨および脛骨より骨髄から採取し、コラゲナーゼ処理後、遠心分離を行い、さらに血球成分を取り除いた後、7日間培養した。その後、8週齢のオスの野生型 C57BL/6 マウスを用い、塩酸メデトミジン（0.15 mg/kg）、ミダゾラム（2 mg/kg）および酒石酸ブトルファノール（2.5 mg/kg）の三種混合麻酔薬を腹腔内に投与し全身麻酔した後、歯周炎を誘発するため、5-0 の絹糸を右側上顎第二臼歯の周囲に結紮した。結紮糸の脱離の有無を実験期間である 14 日間毎日検査した。また、実験期間中、体重の変化を記録したが、各実験群間に有意差は認められなかった。

実験は、1) 結紮 + BMSCs 投与群（ $n = 15$ ）、2) 結紮 + PBS 投与群（ $n = 15$ ）、および 3) 結紮を行わない群をコントロール群（ $n = 15$ ）の 3 群として行った。細胞の適切な投与量については、BMSCs を 10^4 個/5 μ L、 10^5 個/5 μ L または 10^6 個/5 μ L の異なる細胞数に調整し、歯周組織の変化を観察して決定した。投与方法は、33G のハミルトンシリンジを用いて、第二臼歯の近心歯間乳頭部に局所投与した。その後、実験動物用 3D マイクロ CT による画像解析および組織学的解析によって第二臼歯の歯周組織を観察した。撮影は、実験動物を CT 撮影機内のステージ上に固定して、90 kV および 100 μ A の条件で行った。露出パラメータで関心領域を画像化し、i-View ソフトウェアを用いて画像を再構成した。関心領域内における骨量の測定は、骨体積計測ソフトを用いて定量的に評価を行った。

組織学的解析は、安楽死させた後、目的の第二臼歯周囲の組織を採取し、10%中性緩衝ホルマリン中で 48 時間固定し、15% EDTA 中で 5 週間脱灰し、段階的エタノールを通して脱水し、次いでパラフィンに包埋した。標本はマイクロトームを用いて矢状断面（厚さ 4 μ m）に切断し、ヘマトキシリン-エオジン染色あるいは酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（以下、TRAP）染色を行い、第二臼歯周囲の歯槽骨の吸収量、破骨・破歯細胞数の変化および歯肉の退縮量を観察し、評価した。定量分析は、光学顕微鏡下で、第二臼歯の近心および遠心根におけるセメントエナメル境（以下、CEJ）と歯槽骨稜（ABC）および分岐部と ABC との間の距離を測定することによって歯槽骨の吸収量を定量した。また、歯肉の退縮量は、接合上皮頂端部と CEJ との間の距離を測定した。

次で、投与した BMSCs の局在を調べるため、蛍光トレーサ色素（以下、DiI）を用い、BMSCs を標識した後、結紮 3 日後のマウスに投与した。投与後 0 日（投与後 1 時間後）および 4 日後の個体の組織切片を作製の後、投与した細胞の存在を蛍光顕微鏡下で観察した。多群間の解析は、one-way analysis of variance (ANOVA) に続いて、Tukey-Kramer post hoc test を用い、危険率は 5% とした。

試適細胞数を検討した結果、投与する細胞数は BMSCs を 10^6 個とした。

マイクロ CT 観察の結果、結紮後 5 日目に結紮 + PBS 投与群は、第二臼歯近心・遠心根周囲の歯槽骨が歯根長の約 1/2 程度、結紮 + BMSCs 投与群では約 1/3 程度の吸収を示した。結紮後 7 日目および 14 日目においては、結紮 + PBS 投与群は、根尖におよぶ歯槽骨が吸収しことが観察されたが、これと比較し、結紮 + BMSCs 投与群では近心根周囲に歯槽骨が確認でき、有意に歯槽骨の吸収を抑制した ($p < 0.05$)。コントロール群は実験 14 日後まで歯槽骨の吸収を示さなかった。

組織学的解析において、結紮 5 日目において、結紮 + BMSCs 投与群は、結紮群と比較して歯肉上皮および第二臼歯分岐部に炎症性細胞の浸潤と思われる単核細胞数の顕著な減少を示した。さらに、歯肉および歯根膜の線維は、結紮 + BMSCs 投与群の近心根周囲で観察されたが、結紮 + PBS 投与群ではその線維が観察できなかった。また、結紮 + PBS 投与群は、第二臼歯分岐部の歯槽骨およびセメント質表面上に多核細胞の顕著な増加を示し、その後、TRAP 陽性の破骨細胞および破歯細胞として同定された。定量分析では、結紮 + BMSCs 投与群は、結紮 + PBS 投与群と比較し、結紮 7 日目以降有意に短い CEJ-ABC 間距離および歯肉退縮量を示した ($p < 0.05$)。

DiI 標識を施した細胞は、細胞投与 4 日後において、第二臼歯周囲辺縁歯肉に認められた。

以上のことより、本実験の結果から、BMSCs は炎症歯肉部に定着し、炎症および歯槽骨の吸収を抑制したことから、BMSCs の局所投与は、歯周炎を改善する可能性が示唆された。