

各種歯牙保存液が培養線維芽細胞に及ぼす影響

紀田 晃生

大学院歯学独立研究科 健康増進口腔健康分析学講座
(主指導教員: 宮沢 裕夫 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士 (歯学) 学位申請論文

Effects of tooth preservation liquids on fibroblastic cell

AKIO KIDA

*Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor: Professor Hiroo Miyazawa)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

要 旨

小児期には歯の外傷により脱臼や陥入といった状態を呈することが多く、歯が脱落した場合には歯根膜の可及的保存が患歯の予後を左右する重要な因子となる。歯根膜組織を可及的に保存するためには、口腔外環境における当該組織の保護を目的とした歯牙保存液の応用が必要不可欠であり、保護効果のほかに緊急時における入手の容易性や溶液の安定性が必要条件となる。

そこで各種歯牙保存液が歯根膜組織に与える影響を解明するため、培養線維芽細胞の形態観察と生存率の推移について検討した。

本研究ではティースキーパー「ネオ」(ネオ群: ネオ製薬工業株式会社)、歯科用インプラント用抜去及び代用歯根保存液(保存群: 第一薬品産業株式会社)、北海道牛乳(牛乳群: 明治牛乳

社)を実験群とし、対照群には滅菌生理食塩液(生食群: 大塚製薬株式会社)を用いた。

マウス線維芽細胞株 L929 を 96 well プレートに 2×10^3 cells/well ずつ播種し、10% 仔牛胎児血清添加 α MEM を加え、37℃、5% CO₂ 下で 24 時間培養した。その後培養液を各種被験液に置換し、3, 6, 24, 48 時間後の細胞の形態観察を行った。また、細胞増殖および細胞の生存率を Cell Proliferation Kit II (XTT) Cat No. 1465015 (ロシュ・ダイニングノスティックス株式会社) による呈色反応を Microplate Reader で定量化して観察した。

細胞の形態観察では保存群、生食群において 6 時間後から経時的に細胞数が減少する傾向がみられ、円形を呈する細胞が多く観察できた。また、細胞生存率は牛乳群、ネオ群の順に高い傾向が確認できた。なお、牛乳群では細胞生存率が 48 時間後でも高い傾向が認められた。

培養線維芽細胞の形態観察と生存率の推移について検討した結果、歯根膜細胞の保護という観点から牛乳群、ネオ群の有用性が示された。しかしながら、歯牙保存液が歯根膜組織に与える影響は不明確であり、*in vivo*での検索により有用な保存液と組成成分を検討する必要性も推測できた。

緒 言

小児期には歯の外傷により脱臼や陥入といった状態を呈することが多く、歯が脱落した場合には歯根膜の可及的保存が患歯の予後を左右する重要な因子となる。外傷により歯が脱落し再植が行われるまでの間に歯根膜が乾燥した場合には再植後に歯根膜細胞が壊死し再植歯が骨性癒着や歯根の吸収を招くといわれている¹⁻¹⁰⁾。そのために脱落した歯の歯根膜組織を可及的に保存するためには、口腔外環境における当該組織の保護を目的とした歯牙保存液の応用が必要不可欠であり、歯根膜組織の保護効果のほかに緊急時における入手の容易性や溶液の安定性が必要条件となっている。

外傷によって脱落した保存液としては自己の唾液が身近であるが、口腔内に保持して歯科を受診することは困難である。その中で牛乳は入手が容易で緊急時に応用が可能であり、歯根膜細胞に悪影響を及ぼさないとされる¹¹⁻¹⁸⁾。また、蛋白質、脂質、糖質、各種ミネラルおよびビタミンを豊富に含み必須の全アミノ酸がバランス良く含まれており、生体内のあらゆる細胞づくりに関与することからBlomlofは脱落した歯牙の保存液として牛乳を推奨している¹⁻⁴⁾。

そこで本研究では市販されている歯牙保存液や牛乳が歯根膜組織に与える影響を検討するため、マウス培養線維芽細胞の形態観察と細胞増殖率、生存率の推移について観察し、その有効性につい

て検討を加えた。

実験材料及び方法

実験群としてティースキーパー「ネオ」(ネオ群：ネオ製薬工業株式会社)、歯科用インプラント用抜去及び代用歯根保存液(保存群：第一薬品産業株式会社)、北海道牛乳(牛乳群：明治牛乳社)、対照群には滅菌生理食塩液(生食群：大塚製薬株式会社)を室温下で保管し用いた(表1)。

細胞はマウス線維芽細胞株L929(NCTC clone 929)(Connective tissue,mouse) Clone of strain L(DSファーマバイオメディカル株式会社)を96welプレートに 2×10^3 cells/wellずつ播種し、10%仔牛胎児血清添加 α MEMを加え、37℃、5%CO₂下で24時間培養した。その後培養液を各種被験液に置換し、3, 6, 24, 48時間後の細胞の形態観察を行った(図1)。なお、牛乳群は観察時に白く確認が困難であるため、被験液をDulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM)に置換した。また、細胞増殖および細胞の生存率を確認する目的でCell Proliferation Kit II(XTT) Cat No.1465015(ロシュ・ダイニングノステイツ

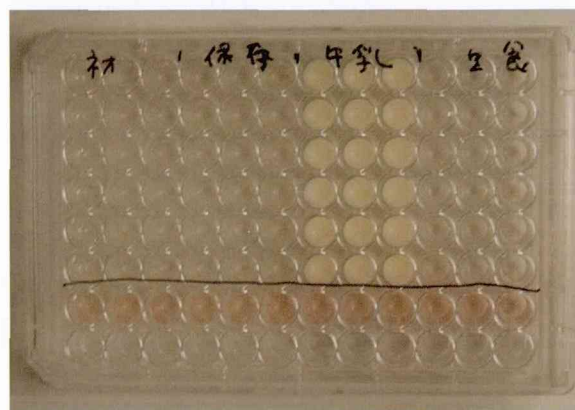


図1：プレートに置換した各種被験液

表1：各種被験液

名称	略称	pH	浸透圧 (mOsm/kg)	浸透圧比
ティースキーパーネオ	ネオ群	7.2	280	0.98
歯科用インプラント用 抜去及び 代用歯根保存液	保存群	7.4	320	1.12
北海道牛乳	牛乳群	6.8	309	1.08

浸透圧比は生理食塩水の浸透圧に対する各被験液の比で示す



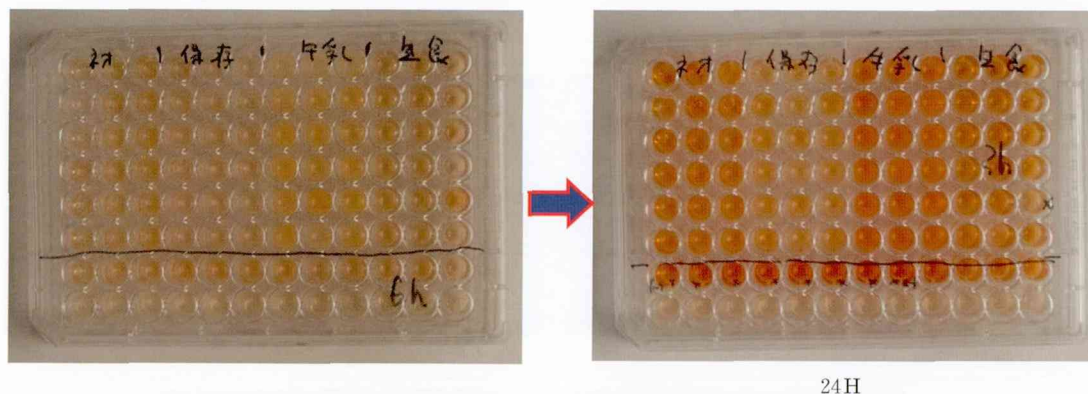


図2：Cell Proliferation Kit II (XTT) による呈色反応

細胞増殖および細胞の生存率を Cell Proliferation Kit II (XTT) Cat.No. 1465015 (ロシュ・ダイニングノスティックス株式会社) による呈色反応を Microplate Reader で定量化した。

コントロール群

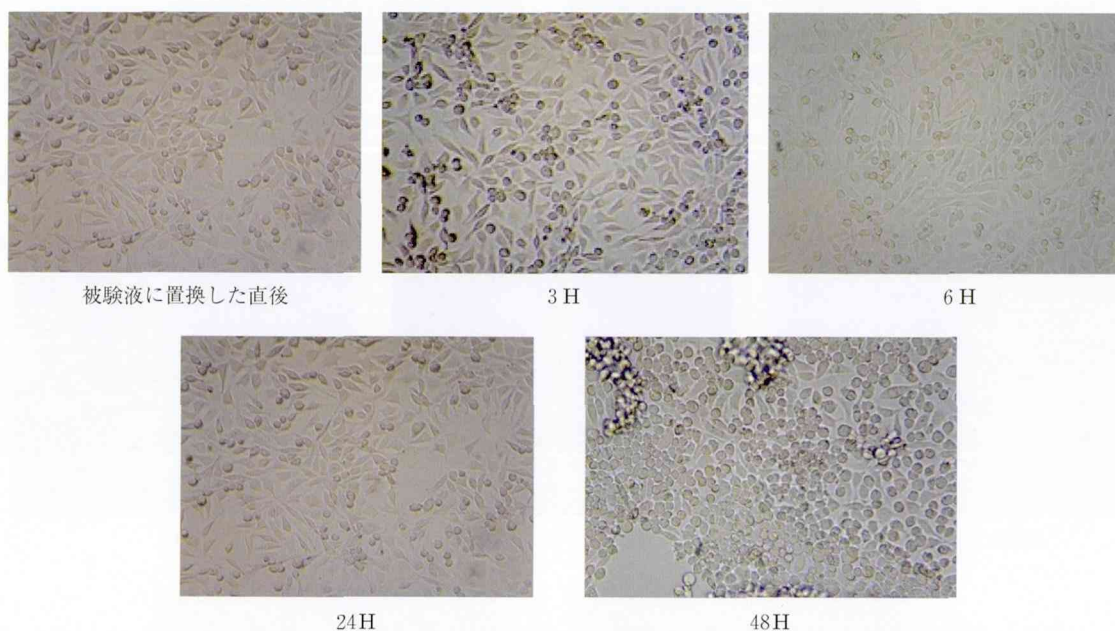


図3：細胞の形態観察 ×100

クス株式会社) による呈色反応を Microplate Reader で定量化し観察を行った(図2)。なお、生存率の統計処理は Student の t test を用いて統計的な有意性を評価した。

結 果

1. 細胞の形態観察

細胞の形態観察ではコントロールの細胞の形態は、被検液に置換した直後から、培養線維芽細胞は48時間まで数の減少もなく、形態は紡錘形を示し異常は確認できなかった(図3)。ネオ群では被検液に置換後、3時間まで細胞数はほとんど変

化がなく、6時間後から細胞数の減少がみられた。細胞形態は24時間後から円形を呈する細胞が多く認められた(図4)。保存群では被検液に置換後、3時間後から細胞数の減少がみられ、6時間後からはその傾向は顕著に認められた。細胞形態は24時間後から円形を呈する細胞が多くみられた(図5)。牛乳群では被検液に置換後、6時間後から細胞数の減少が認められた。細胞形態は6時間後から円形を呈する細胞がみられたが、円形を呈する細胞数は6時間後から48時間後まで変化が認められなかった(図6)。生食群では被検液に置換後、6時間後細胞数の減少がみられ、各種

ネオ群

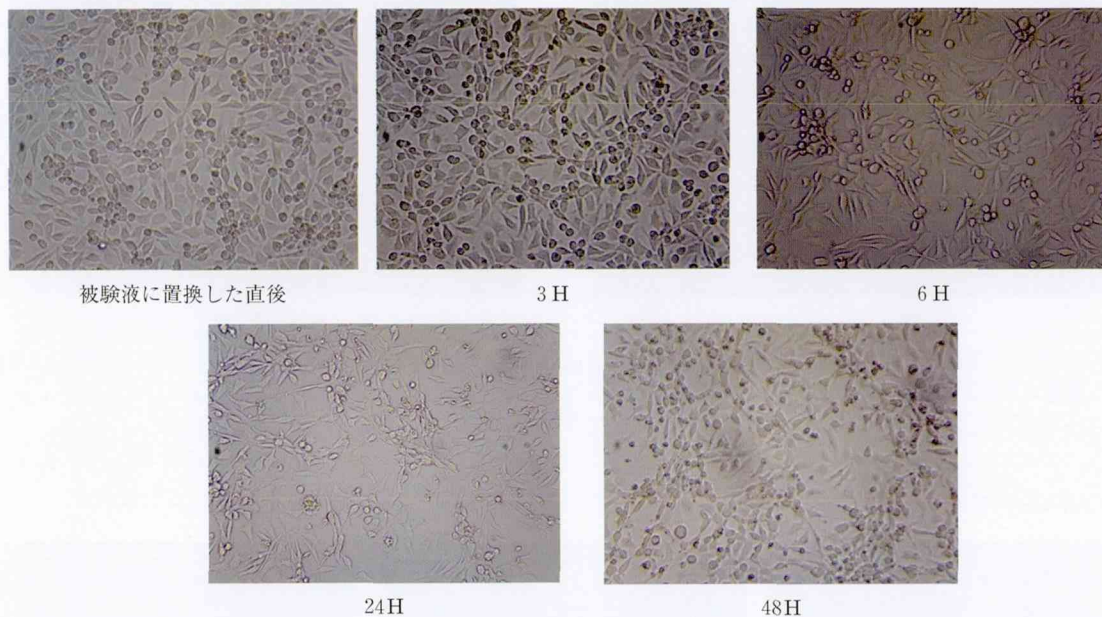


図4：細胞の形態観察 ×100

保存群

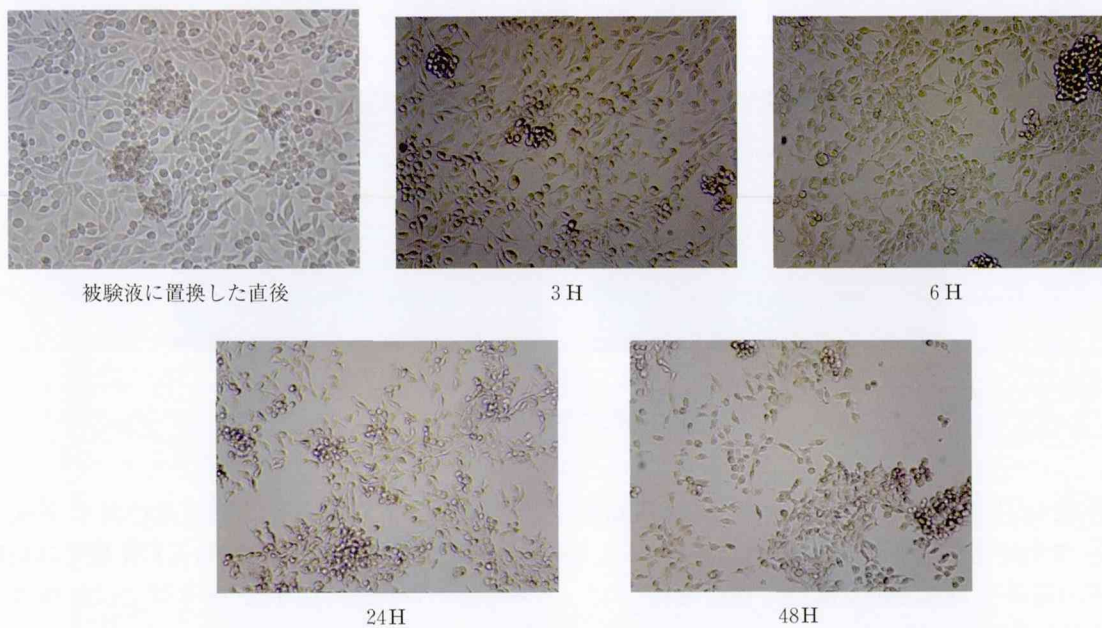


図5：細胞の形態観察 ×100

被験液に比べ6時間後から細胞数が著しく減少していることが認められた。細胞形態は3時間後から円形を呈する細胞が多くみられた(図7)。

2. 細胞増殖および細胞の生存率

細胞増殖および細胞の生存率を Cell Proliferation Kit II (XTT) を用いた呈色反応の定量化に

よる細胞増殖および細胞の生存率では、ネオ群では3時間後よりも6時間後に吸光度1.028と高い値を示し、24時間後に0.866を示し、48時間後には吸光度が低くなることが確認できた。保存群は最も吸光度が有意に低い ($p < 0.001$) 値を示し、3時間後に吸光度が0.482を示したが、6時

牛乳群

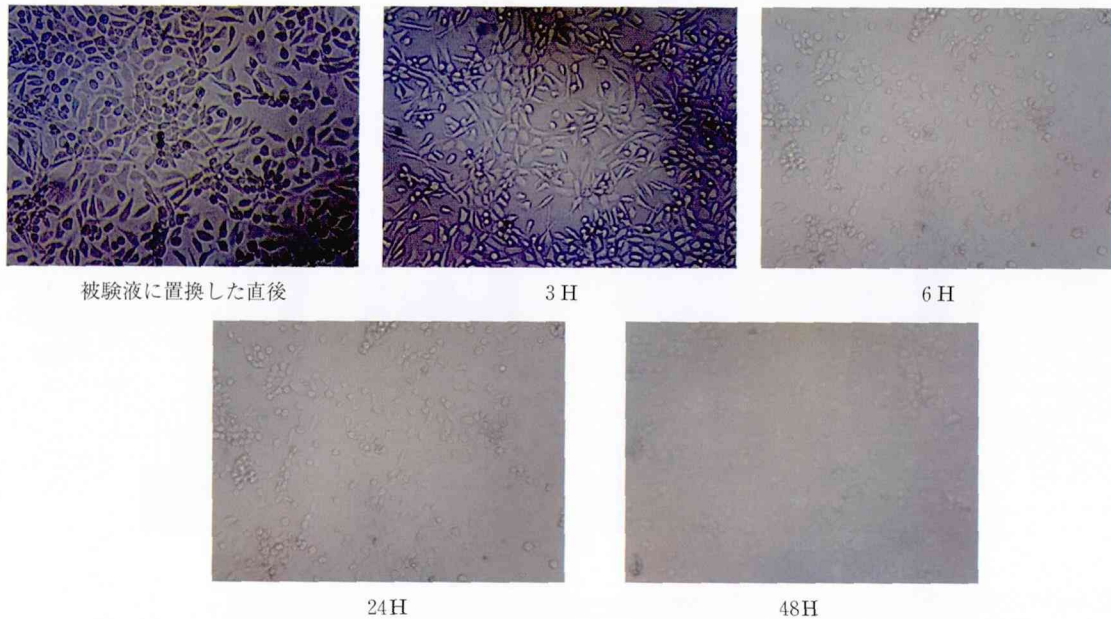


図6：細胞の形態観察 ×100

生食群

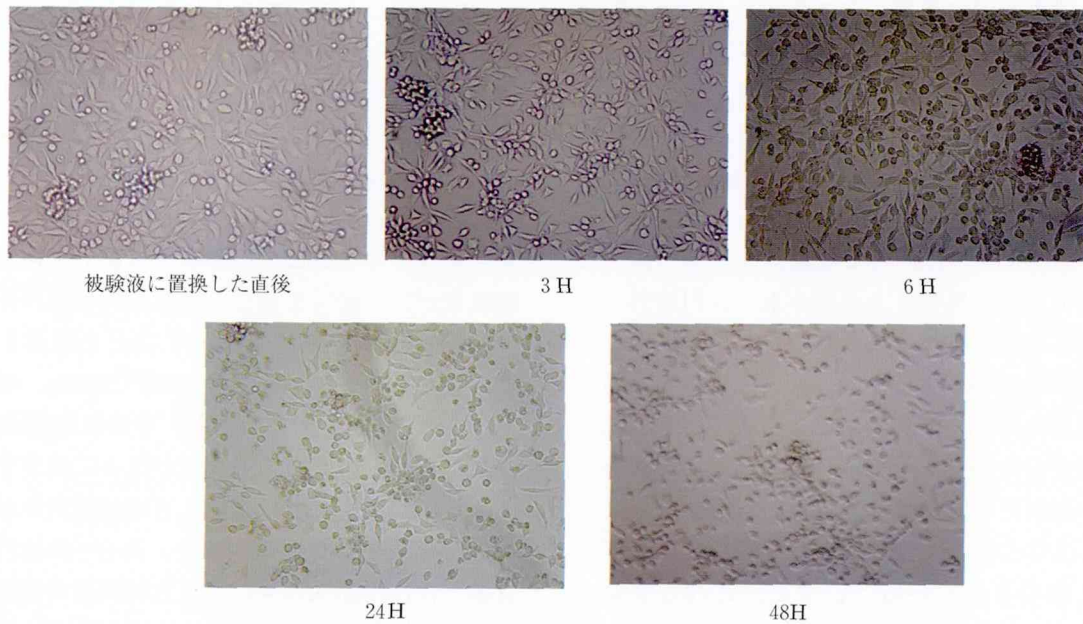


図7：細胞の形態観察 ×100

間後には0.267を示し、経時的に低くなった。牛乳群は各群に比べ吸光度が有意に高い ($p < 0.001$) 値を示し、3時間後に1.227を示したが、48時間後も1.420を示し生存率が高くなった。生食群ではネオ群と同様に6時間後に吸光度0.798と高い値を示し、24時間後には0.209、48時間に

は0.118を示し吸光度が低くなることが確認できた。(表2, 図8)。

考 察

小児期は転倒や転落など口腔外傷の頻度が多く、乳歯や幼若永久歯では支持組織も未成熟であ

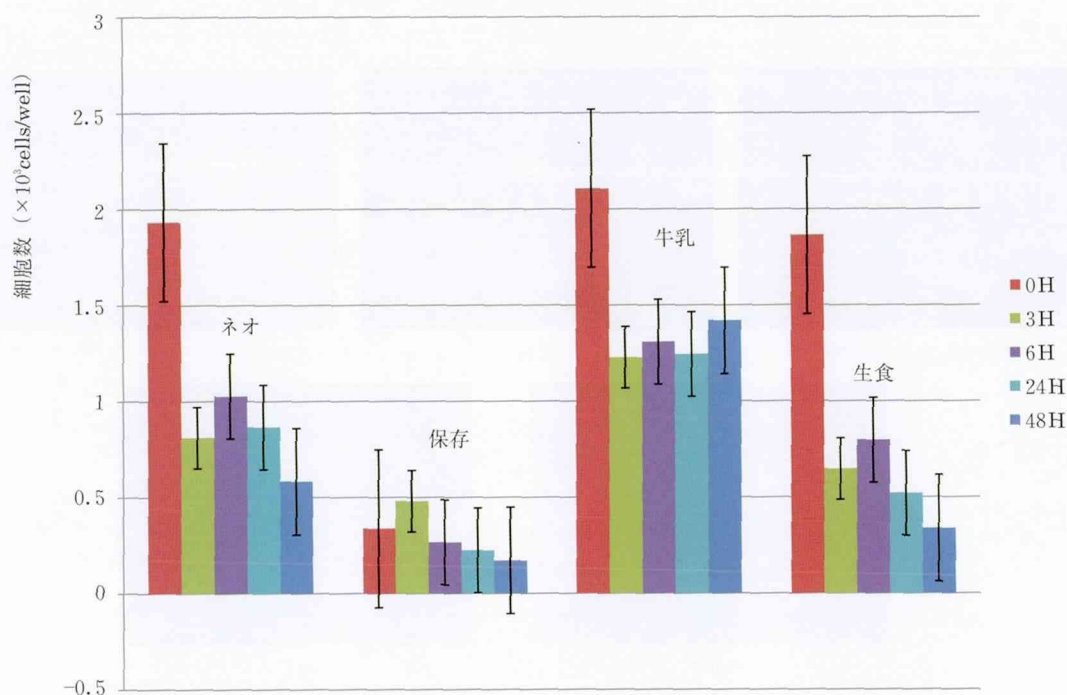


図8：各種保存液と細胞数の変化

り脱臼など歯が脱落することが多い。小児歯科臨床でも外傷症例に遭遇することが多く、歯が脱落した場合には歯根膜の可及的保存が必要不可欠であり、患歯の予後を左右する重要な因子となる。外傷により歯が脱落し再植が行われるまでに歯根膜が乾燥した場合には、再植後に歯根膜細胞が壊死し再植歯が骨性癒着や歯根の吸収を招くといわれている¹⁸⁻²³⁾。そのためにも脱落した歯の歯根膜組織を可及的に保存する必要がある。口腔外環境における当該組織の保護を目的とした歯牙保存液の応用が必要不可欠である。特に、歯根膜組織の保護効果のほかに緊急時における入手の容易性及溶液の安定性が必要であり、牛乳は適切な保存液の第一選択として歯根膜組織に為害性がほとんどなく、入手が容易であることから緊急時の保存液として推奨されている¹⁻⁴⁾。また、これらを満たす剤品の開発や研究もなされており、ソフトコンタクトレンズの保存液、生理食塩水、スポーツ飲料水を用いた報告¹⁷⁾もみられる。そこで今回は2種類の保存液と牛乳、生理食塩水を対照用として培養線維芽細胞への影響について検討した。

ヒト歯根膜細胞では細胞の活性の維持を目的とした保存液の条件としては浸透圧、pHが生理的であることがあげられ、温度によって細胞の代謝を抑制することも報告⁵⁾されている。今回用いた

保存液は室温下で保管しpHも一定していることから保存液として良好な条件を備えていると考えられる。

再植歯の保存方法や再植の報告で塩路ら²²⁾は生食、牛乳および10%牛胎児血清含有 dulbwcco's Modified Eagle's Medium を培養液として使用し、各種保存時間による細胞の影響を検討した結果、生食、牛乳および培養液ともに30分保存では細胞数が70~80%を示し、保存液の種類にかかわらず増加率は減少傾向を示すことを報告している。しかしながら牛乳では120分で132%、培養液では60分で120%まで増加し、それ以後保存時間が長くなると細胞数の増加率が徐々に減少する傾向を示すが、生食ではほとんど増加傾向を示さないことを報告している。また、河合¹⁷⁾の報告でも移植・再植用歯保存液は牛乳と同程度の細胞活性を示し、細胞形態の観察からも問題のない所見を得たため脱落歯保存液として有効であると報告している。浅井²²⁾らは、抜去歯を移植・再植用歯保存液に24時間含浸した後に再植した場合の病理組織像において歯根膜組織の再生が認められたことを報告していることから、脱落歯の再植時には歯根膜組織をできるだけ損傷しないような術式と保存法の採用が重要であると考えられる。

XTT を用いた non-RI 呈色システムは細胞の

増殖や生存率は RI を使わない吸光度の測定で定量化するようにデザインされており、細胞障害性や増殖阻止を定量化するために使用されている。

また、Microplate Reader で直接定量することから信頼性も高くコンピューター処理によって直接データの収集、計算が可能になり多くの試料を迅速かつ容易に処理できることから、本研究においても細胞増殖および細胞の生存率を確認するために XTT を用いた呈色反応の定量化による細胞増殖および細胞の生存率の確認は有用であると考えられる。

ネオ群の細胞形態の観察では被検液に置換後、3 時間まで細胞数はほとんど変化がなく、6 時間後から細胞数の減少がみられた。細胞形態は 24 時間後から円形を呈する細胞が多く認められた。細胞増殖および細胞の生存率では牛乳群に次いで 6 時間後に吸光度が高くなり、24 時間後から低くなった。これはネオ群の組成に塩化カリウム、塩化マグネシウム、硫化マグネシウム、塩化カルシウムなどの無機塩類と浸透圧調整剤等から構成され pH が 7.2 であることから細胞培養液に類似した成分構成であるための結果と考えられた。

保存群の細胞形態の観察では被検液に置換後、3 時間後から細胞数の減少がみられ、6 時間後からはその傾向は顕著に確認できた。細胞形態は 24 時間後から円形を呈する細胞が多くみられ、細胞増殖および細胞の生存率は吸光度が最も低い値を示した。保存群は歯科用インプラント用抜去及び代用歯根保存液であるが抜去歯を移植歯として保存する目的に開発されているため、リンゲル液を基礎としており、新陳代謝促進のためコンドロイチン硫酸ナトリウム、クロロプタノールが腐敗防止に添加されていることから細胞の活性維持に悪影響を及ぼしていると推測できた²⁴⁾。

牛乳群の細胞形態の観察では被検液に置換後、6 時間後から細胞数の減少がみられ、細胞形態は 6 時間後から円形を呈する細胞が多く認められたが、円形を呈する細胞数は 6 時間後から 48 時間後まで変化がみられなかった。細胞増殖および細胞の生存率では 48 時間後まで吸光度が高い傾向がみられた。これは今までの報告¹⁻¹⁸⁾の通り、牛乳は浸透圧の等張性、pH が生理的であることや牛乳自体に含有する糖質のラクトースや蛋白質の

カゼイン、アルブミン、各種ミネラルを豊富に含んでいる。また、膜からの吸収に都合のよい微細な球状を呈する乳脂肪はエネルギー源として優れており、膜構成に必要なリン脂質はじめ遊離コレステロールも豊富に含まれている。糖質は微量のグルコースやガラクトースも含まれ、ミネラルはカルシウム、リン、マグネシウムなどを多く含み、pH の維持、浸透圧の調節などエネルギー代謝の補因子として重要な働きをすることから本実験群でも細胞増殖率や生存率が最も高くなったと推測できた。

生食群の細胞形態の観察では被検液に置換後、6 時間後細胞数の減少がみられ、各種被検液に比べ 6 時間後から細胞数が著しく減少した。細胞形態は 3 時間後から円形を呈する細胞が多くみられた。細胞増殖および細胞の生存率では 6 時間後に高い吸光度を示し、24 時間後から吸光度が低くなった。生理食塩水は電解質溶液であり長時間の浸漬保存により基質形成の細胞のみならず休止期にある細胞も破壊され、細胞活性が失われることから歯根膜組織への強度の傷害が生じ、本研究でも細胞数の減少や細胞形態の変化が早期にみられたと推測できる²⁶⁾。

結 論

培養線維芽細胞の形態観察と生存率の推移について検討した結果、歯根膜細胞の保護という観点から牛乳群の生存率が最も高く、次いで、ネオ群の順に有用性が確認できた。しかしながら、歯牙保存液が歯根膜組織に与える影響は不明確であり、in vivo での検索により有用な保存液と組成成分を検討する必要性も推測できた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終止御親篤なる御指導、御鞭撻と御高閲を賜った松本歯科大学大学院健康増進口腔科学講座 宮沢裕夫教授、岩崎 浩准教授、大須賀直人准教授ならびに平井 要准教授に衷心より感謝申し上げます。また、御指導を賜りました健康増進口腔科学講座 音琴淳一教授、松本歯科大学大学院硬組織疾患制御再建学講座 中村浩彰教授、ならびに硬組織疾患制御再建学講座 服部敏己准教授に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Blomlöf L and Otteskog P (1980) Viability human periodontal ligament cells after storage in milk or saliva. *Scand J Dent Res* **88** : 436-52.
- 2) Blomlöf L and Otteskog P (1981) Effect of storage in media with different ion strengths and osmolalities on human periodontal ligament cells. *J Dent Res* **89** : 180-7.
- 3) Blomlöf L, Otteskog P and Hammarstrom L (1981) Periodontal healing of exarticulated monkey teeth stored in milk or saliva. *J Dent Res* **89** : 251-9.
- 4) Blomlöf L (1981) Storage of periodontal ligament cells in a combination of different media. *J Dent Res* **90** : 1904-6.
- 5) Blomlöf L (1981) Milk and saliva as possible storage media for traumatically exarticulated teeth prior to replantation. *J Swe Res* **8** : 1-26.
- 6) Lindskog S and Blomlöf L (1982) Influence of osmolality and composition of some storage media on human periodontal ligament cells. *Acta Odontol Scand* **40** : 435-41.
- 7) Blomlöf L, Lindskog S, Anderson L, Hedstrom KG and Hammarstrom L (1983) Storage of experimentally avulsed teeth in milk prior to replantation. *J Dent Res* **92** : 912-6.
- 8) Lindskog S, Blomlöf L and Hammarstrom L (1983) Mitoses and microorganisms in periodontal membrane after storage in milk saliva. *Scand J Dent Res* **91** : 465-72.
- 9) Trope M and Frieman S (1992) Periodontal healing of replanted dog teeth stored in viaspan, milk and Hank's balanced salt solution. *Endod Dent Traumatol* **8** : 183-8.
- 10) Harkacz OM, Carnes DLJ and Walker WA (1997) Determination of periodontal ligament cell viability in the oral rehydration fluid Gatorade and milks of varying fat content. *J Endod* **23** : 687-90.
- 11) Olson BD, Maihot JM, Anderson RW, Schuster GS and Weller R (1997) Comparison of various transport media on human periodontal ligament cell viability. *J Endodont* **23** : 676-9.
- 12) Hiltz J and Trope M (1991) Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and viaspan storage media. *Endo Dent Traumatol* **7** : 69-72.
- 13) Huang SC, Remeikis NA and Daniel JC (1996) Effects of long-term exposure of human periodontal ligament cells to milk and other solutions. *J Endodont* **22** : 30-3.
- 14) Kawase T, Nakajima M, Matumoto T, Kishi H, Nagase T and Tamura Y (1987) Characterization of alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblastlike cells in vitro. *Bull Kanagawa Dent* **15** : 65-9.
- 15) Mosmann T (1984) Rapid colorimetric assay cellular growth and survival. *J Immunol Methods* **65** : 55-63.
- 16) 瀧澤秀樹 (1998) 移植・再植歯の保存法に関する実験. 補綴誌 **35** : 723-37.
- 17) 河合利方 (1998) 外傷における脱落歯の保存法に関する研究. 愛院大歯誌 **36** : 21-36.
- 18) 巖 恭輔 (1996) ヒト歯根膜細胞への影響からみた再植歯保存液の有用性. 日歯保誌 **39** : 110-27.
- 19) 磯野珠貴 (1998) 歯牙再植後の歯周組織の治癒に対する保存液の効果に関する研究. 日口インプラント誌 **11** : 375-85.
- 20) 藤井利彦, 吉田隆氏, 中川寛一 (1999) 牛乳および UW 液のヒト歯根膜組織に及ぼす影響に関する微細構造学的研究. 日歯保誌 **42** : 786-800.
- 21) 大山裕子, 大山明博, 若林克敏, 丸谷善彦, 芝 輝彦 (2004) 移植歯の保存方法に関する基礎的検索. 昭和歯誌 **24** : 127-38.
- 22) 塩路伊佐子, 上田佳世, 林 宏行, 松田孝之, 上野眞徳, 前田潤一郎, 池尾 隆 (2005) 再植歯の保存方法に関する研究 -牛乳による保存期間がヒト歯根膜細胞由来アルカリホスファターゼ活性に及ぼす影響-. 歯科医学 **68** : 120-9.
- 23) Matsumura K, Tsutsumi S and Syon SH (2006) Epigallocatechin-3-gallate as a novel preservation additive for tooth transplantation. *J Oral Tissue Engin* **3** : 123-30.
- 24) 山根捻夫 (1981) 歯科用インプラントのすすめ方. 医歯薬出版 : 99-126.
- 25) 浅井康宏 (1997) 歯牙の移植・再植と歯根膜の保存 (第1回) -基礎と臨床からのアプローチ-. 日歯医師会誌 **50** : 6-16.
- 26) 中川寛一, 市之川 浩 (2002) 脱落歯の保存と歯牙保存液についての考え方. *Quintessence* **21** : 133-41.