

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11720

研究課題名(和文) 根未完成失活歯に象牙芽細胞活性化因子を併用した血管再生療法の根管壁硬組織再生

研究課題名(英文) Root canal wall hard tissue regeneration of vascular regeneration therapy using Plate Rich Plasma in immature nonvital teeth

研究代表者

北島 佳代子 (Kitajima, Kayoko)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・准教授

研究者番号：00177841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：6週齢のwister系雄性ラット上顎臼歯を用い、ラバーダム防湿下で抜髄、根管拡大後、NaOClとEDTAで洗浄し、止血を確認した。ラット血液からPRP(Plate Rich Plasma)を抽出し、根管内歯頸部まで滴下した。根管口部にMTAを貼付し、コンポジットレジンで封鎖した。術後4週と8週でsacrificeし、ホルマリン固定、脱灰後、5 μ mのパラフィン包埋切片を作製し、HE染色とSchmorl染色を施して顕微鏡観察した。4週例では根未完成部の根管壁を被覆するように硬組織形成を生じ、8週例では根管壁面にほぼ平行に硬組織が形成され、歯頸側硬組織との間に髄角様構造を示す例も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根未完成失活歯では、従来アペキシフィケーションが適応されてきたが、根尖部の硬組織による封鎖は期待できるが、歯根の伸長と根尖部根管壁の厚みの増加は期待できず、歯根破折の危険を伴う。そこで当講座では、根尖部から血餅を誘導して血管を再生するrevascularizationを試みている。根尖部周囲から根管内に不規則な骨様硬組織が形成され、歯根の伸長と根管壁の厚みの増加は期待できるが、規則的な硬組織形成を継続する理想的な再生には至っていない。本PRP応用法では、根管壁面に沿った規則的な硬組織形成と歯根の伸長、根管壁の厚みの増加が可能となり、理想的な硬組織形成が期待できるため学術的、社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Using 6-week-old wister-based male rats' maxillary molars, pulpectomy under rubber dam isolation technique, root canal enlargement and canal irrigation with NaOCl and EDTA were performed, and then the hemostatic was confirmed. PRP (Plate Rich Plasma) by centrifugation twice from rat blood was created and added dropwise until the root canal orifice. MTA was applied to the root canal orifice and sealed off with photopolymerized composite resin. They were sacrificed at 4 weeks and 8 weeks after surgery and fixed by formalin to prepare paraffin-embedded thin sections. HE and Schmorl staining sections were observed by optical microscope. 4 weeks examples caused hard tissue formation so as to cover the root canal wall of the immature portion. In the 8week examples hard tissue formed substantially parallel to the root canal wall was confirmed and the pulp horn-like structure between hard tissue of the cervical side was also confirmed.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯根未完成歯 失活 PRP 血管再生療法 根管壁 硬組織 再生

様式 C 19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

歯根未完成幼若永久歯の生活歯では、生活歯髄切断法に準じた apexogenesis により根の成長を維持できる。一方、歯髄壊死に陥ったり、根尖性歯周疾患に罹患した場合には、象牙芽細胞の失活により、正常な歯根の継続的形成が行われず、残存歯根歯質も菲薄なままとなる。このような歯では、緊密な根管充填を行うことは不可能である。

1966年に Alfred L Frank¹⁾は、失活歯の根未完成歯に対し、水酸化カルシウムの長期貼薬により、セメント質様硬組織や線維性組織形成によって根尖孔の縮小あるいは閉鎖を起こさせる治療法 apexification を発表した。その後、1999年に Torabinejad ら²⁾は、mineral trioxide aggregate(MTA)を応用した改良法を発表している。Simon ら(2007)³⁾によれば、MTA を応用した1回法の apexification では、治療期間を短縮することが可能であるとしている。しかし、歯根側面の菲薄な根管壁への象牙質の添加は根尖部に限定的であるため、歯根全体としては十分な強度が不足し、後に歯根破折を生じる危険性が依然として残っている。

そこで新しく考え出されたのが pulp revascularization (Iwaya ら⁴⁾、Banchs ら⁵⁾)である。すなわち Banchs ら⁵⁾は、1回目の治療で根管内の無菌化を図り、1か月後の2回目に根尖歯周組織を刺激して出血を促し、根管内にできた血餅の上に MTA セメントを充填して経過観察すると、歯根の成長が確認でき、根管も狭小化する。この方法は、歯根の長さのみならず厚みも増加させることが期待でき、歯根破折のリスクを減らすことが可能であるという。

当教室では、pulp revascularization の短期経過例を観察したが、血餅内に不規則なセメント質様硬組織や象牙質塊が観察されたものの象牙芽細胞による歯根象牙質の新生はみられなかった⁶⁾。象牙質塊は、根管拡大時の象牙質削片の影響も考えられ、この状態で長期経過した場合、血流が不十分となり、予後不良となる恐れもある。そこで長期経過例の観察とともに、不規則な硬組織形成を防止し、象牙芽細胞による根管壁象牙質新生を誘導する新しい歯髄再生療法を確立する必要があると考えた。

本研究分担者五十嵐らは、サルを用いた apexification に関する実験で、不規則な根管様の形態をもって歯根形成がみられた例、根管が線維性治癒した例、根管内に骨様硬組織形成がみられた例等を報告しており、治癒の形態は、根尖周囲組織の病態に依存していることを示している。歯根未完成歯では根尖部がラッパ状に開大しており、いわゆる根管内の歯髄が失活していたとしても、根尖部に残存している歯髄組織や歯周組織により、歯根の成長や根管の狭小化を生ずる可能性があると考えられ、Iwaya らの報告した pulp revascularization は、このような状態が起因していたことも考えられる。臨床的にエックス線写真のみからでは、根尖周囲組織の状態を確実に把握することは困難であるため、歯根周囲にわずかでも歯髄組織の存在が見込まれる場合には良好な治癒が期待されるが、存在しない場合においても、生理的な歯根の成長と成長後の根尖部閉鎖を確実に導くための新しい方法の確立が望まれる。

2000年に歯髄幹細胞の存在が初めて確認され、高い分化増殖能を有し、分取の容易な歯髄幹

細胞の再生医療への応用と貢献への期待が一気にクローズアップされた。

歯根未完成歯では、歯根端部がラッパ状に開大し、根尖歯周組織には豊富な脈管系が存在しており、歯髓幹細胞の混在している可能性も考えられる。前述の短期実験において、出血による血餅への歯髓血流再生の可能性が十分期待できることが確認されている。今後は、象牙芽細胞への分化誘導により、象牙芽細胞による根管壁象牙質の形成による根管壁新生の可能性を考究したい。

2．研究の目的

本研究では、(1)象牙質削片の影響、血餅内骨様硬組織形成の長期的観察、(2)無機質溶解剤 EDTA 応用による根管拡大形成後の象牙質削片除去による組織的検討、(3)ラット切歯歯髓からの象牙芽細胞様細胞株の樹立、(4)PDGF、TGF- β 、VEGF、EGF 等の成長因子を含み、間葉系細胞誘導を期待できる象牙芽細胞活性化因子 PRP(多血小板血漿)のラット自己血からの調整、血餅内注入による、感染や副作用を排除した根管壁硬組織新生を期待した新しい歯髓再生療法の確立を目的とする。

3．研究の方法

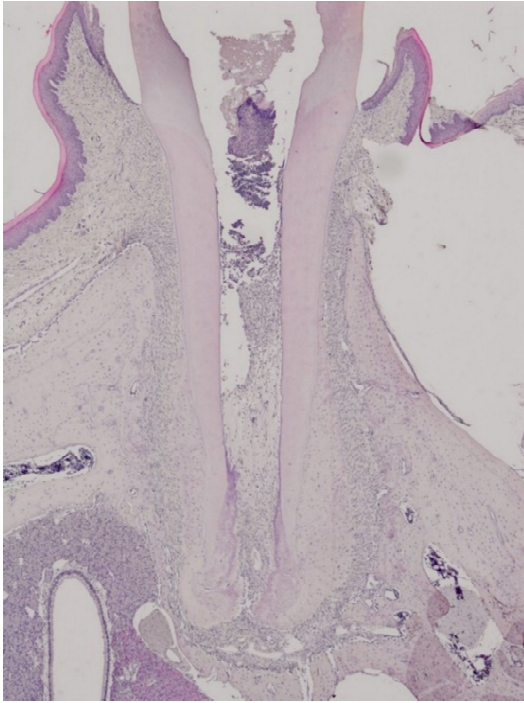
- (1) ラット歯根未完成第一永久臼歯(n=12)にラバーダム防湿を施し、全身麻酔下で近心根管を抜髄し、作業長 3.5mm で NiTi ロータリーファイル(Pro Taper)を用いて根管拡大し、NaClO と EDTA で洗浄、乾燥し、マイクロスコープ下で止血を確認した。
近心根管以外の根管は、生活歯髓切断法を施し、MTA を貼付後、光重合型コンポジットレジンで充填を行った。
- (2) 施術に先立ち、ラットから採取した血液に抗凝固薬としてクエン酸ナトリウムを加え、2回の遠心分離操作により PRP を調整した。ラット第一永久臼歯近心根の根管内に歯頸部まで PRP を滴下し、MTA を貼付後、光重合型コンポジットレジンで充填を行った。
- (3) 術後 4 週と 8 週にホルマリン還流固定、脱灰、パラフィン包埋後、5 μ m の連続薄切片を作成し、HE 染色、schmorl 染色を施して光学顕微鏡観察を行い、歯髓再生と硬組織新生について検討した。
なお、本研究は、本学動物実験倫理基準に則り遂行した。

4．研究成果

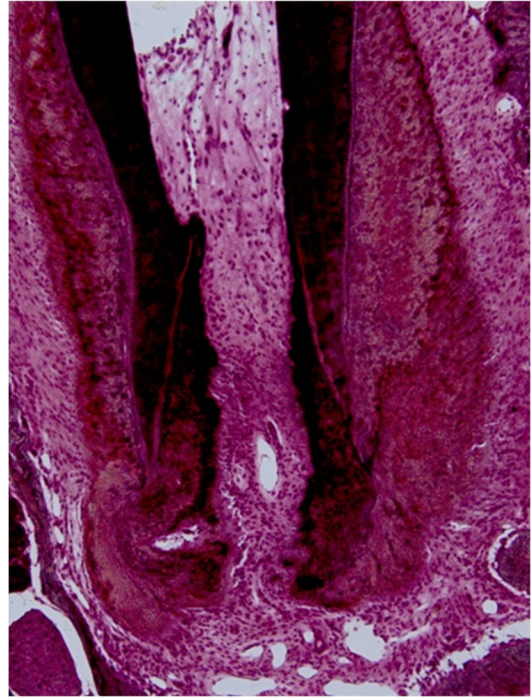
(1)4 週例の組織所見

根尖部の菲薄な残存象牙質の根管側に新生硬組織の形成が確認された。さらに根尖部セメント質がこの新生硬組織を取り囲むように形成されているのが確認された。これにより、根尖部歯質の厚みが増加し、歯根は伸長していることが確認された。根管内の不規則な骨様構造は少なく、根管内は細胞成分に富む組織で満たされていた。

以下に 4 週例の 1 例を提示する。



4 週例 HE (× 40)

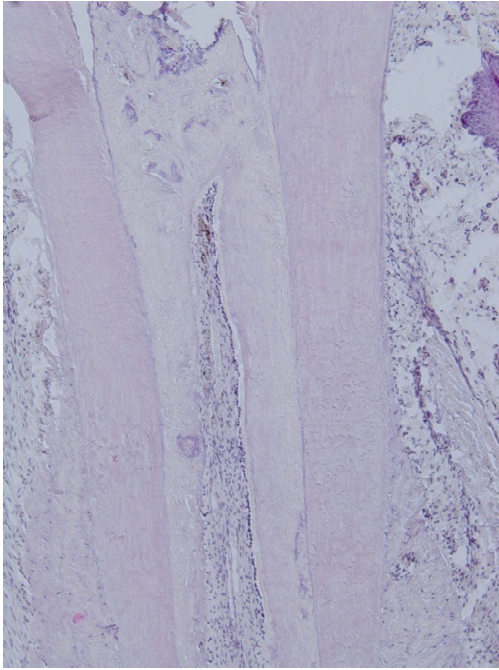


4 週例 Schmorl (× 100) 根尖部拡大

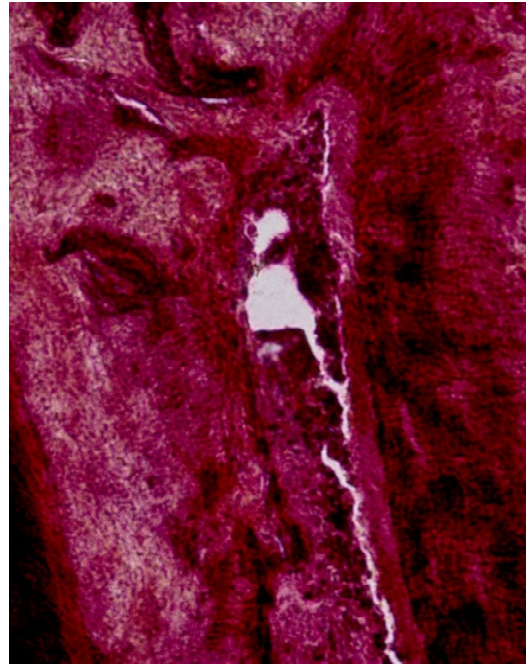
(2) 8 週例の組織所見

根尖部の菲薄な残存象牙質の根管側に形成された新生硬組織は長さや厚みを増し、根尖部歯周組織から連続する硬組織様構造が根尖部を広く被覆していた。これにより歯根の伸長が明らかに観察された。根尖部は閉鎖傾向を示し、根尖孔を形成する傾向が観察された。歯根は丸みを帯びた外形を形成していた。根管内の不規則な骨様構造は少なく、根管内は細胞成分に富む組織で満たされていた。根管壁面に沿って象牙芽細胞様細胞の配列が確認され、象牙質様硬組織が形成されていた。歯頸側の硬組織との移行部には髓角様構造が確認された。根管内の不規則な硬組織形成は少なく規則的な組織構造を示していた。

以下に 8 週例の 1 例を提示する。



8週例 HE (× 100) 髓角様構造



8週例 Schmorl (× 400) 髓角様構造

今後、DMP1、nestin 等を用いた免疫染色を行い、象牙質形成に関するより詳細な検討を継続していく予定である。

<引用文献>

- 1) Alfred L Frank. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation, J of Ameri Dent Assoc 1966,72; 87-93.
- 2) Torabinejad M, Chivian N. Clinical Applications of Mineral Trioxide Aggregate. J of Endod 1999, 25; 197-205.
- 3) Simon S, Rilliard F, Berdal A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. Int Endod J 2007, 40; 186-197. 2007
- 4) Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent teeth with apical periodontitis and sinus tract. Dent Traumatol 2001, 17; 185-187.
- 5) Banchs F, Trop M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? J Endod 2004, 30; 196-200.
- 6) Minato Hanae, Kitajima Kayoko, Arai Kyoko, Igarashi Masaru. Revascularization after pulpectomy of immature molars in rats. Jpn J Conserv Dent 2019,62,27-38.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	新井 恭子 (Arai Kyoko) (10434143)	日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師 (32667)	
研究分担者	五十嵐 勝 (Igarashi Masaru) (90168104)	日本歯科大学・生命歯学部・教授 (32667)	