

平成21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791410
 研究課題名（和文） 損傷歯髄細胞の膜修復機構—象牙芽細胞への分化誘導への検討—
 研究課題名（英文） Plasma Membrane Disruption in Oral Tissue and Tooth pulp by Mechanical stimulation
 研究代表者
 天野 カオリ (AMANO KAORI)
 杏林大学・医学部・助教
 研究者番号：70316470

研究成果の概要：

研究成果の概要：平成19・20年度科学研究課題である損傷歯髄細胞の膜修復機構の研究を遂行するにあたり、本研究の主旨である口腔領域組織における機械的刺激による細胞膜修復過程についての成果を2007年 Journal of Dental research(86(8)769-774)にて報告した。
 この結果に基づきラット歯牙を使用して、歯髄細胞に外部からの機械的損傷を与え細胞の損傷状態と修復過程について観察を行なった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	240,000	3,440,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学再生、細胞損傷、歯髄、細胞・組織、初期発生

1. 研究開始当初の背景

近年、移植・再生領域における著しい医科学研究成果の発展に伴い、歯科学領域においても研究と技術・材料の向上と共にインプラントの需要普及率が年々増加傾向にある。インプラントならびに、移植・再植治療は原則的には「損失歯牙」に対する治療手段であ

り、リスクを含めて全ての症例に対応しうる優先的な治療手段とはいえず、当然従来のウ蝕や歯周病疾患に対する新しい処置方法の研究開発も、さらなる発展向上の必要性があるといえる。

深部ウ蝕の治療においても、ウ蝕部分を完全に除去せず修復を行なう方法が注目されているが、実際は抜髄処置が今なお一般的であ

る。しかしながら抜髄処置後の歯牙における歯根破折の危険性や、歯髄が持つ歯牙に対する様々な役割を考慮すると、歯髄細胞や歯牙の再生を細胞膜レベルで明らかにすることはきわめて重要な課題といえる。

本研究は損傷を受けた歯髄細胞の膜修復機構を解明することで治療への応用も期待できる新たな発展を担う研究である。

2. 研究の目的

口腔領域の組織は種々の生理的あるいは病的環境下において日常的に機械的刺激を受けている。この刺激によって生じる大小異なる損傷により死滅にいたる細胞群も多い。

機械的刺激の中には口腔環境を良好に保つ目的で歯牙や歯周組織に行なうブラッシングがあるが、ブラッシングにより歯周組織は損傷を受けていないのか、また受けた細胞はどのように修復・治癒していくのか（または死滅するのか）をラット歯肉・舌筋を使用して観察したところ、損傷を受けて死滅せず、生存し続ける細胞群の存在を確認した。

この結果に基づき口腔領域の再生研究では未だ解明できない領域を残す歯髄細胞について、機械的損傷による細胞の損傷状態ならびに修復・治癒過程を明らかにすることを本研究目的とした。

3. 研究の方法

1) 歯肉・舌筋の機械的損傷

10 週齢 Wistar 系ラットを使用し、麻酔下で損傷細胞蛍光標識 (injury marker) として 0.05%FDx/PBS (fluorescein-labeledextran10000) を静注した。15 分後に電動歯ブラシにて下顎中切歯間歯肉と舌を 2 分間ブラッシングして 15 分後、3 時間後にそれぞれ 4%パラホ

ルムアルデヒド溶液にて還流固定を行なった。下顎中切歯間歯肉と舌筋は摘出後、通常に従い 20 μ 凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡下で観察をおこない、画像上で定量化をおこなった。また試料の一部は、Cfos 抗体 (2%bovine serum albumin で希釈) にて染色を行い、同様に顕微鏡下で観察し、定量化をおこなった。

2) タービン切削後における歯髄細胞の損傷

12 週齢 Wistar 系ラットの下顎中切歯歯頸部付近を麻酔後、注水下で高速歯科用エンジンにて露髄させる程度に損傷させ 30 分後に 4%パラホルムアルデヒド溶液にて還流固定を行なった。下顎中切歯は周囲組織と共に一塊で摘出し、EDTA 溶液にて脱灰後、パラフィン切片用試料とし、10 μ 矢状断切片を作製した。

切片は Cfos 抗体 (2%bovine serum albumin で希釈) にて染色後、蛍光顕微鏡にて同様に観察を行なった。

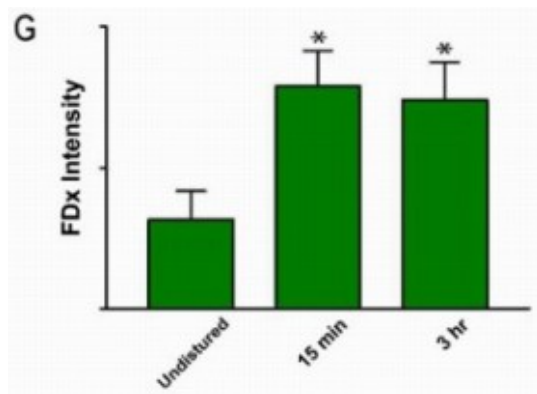
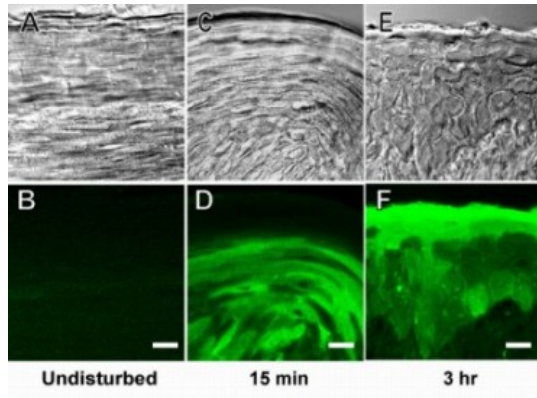
4. 研究成果

実験 1) 口腔内は日常的に機械的・生理的剌激を受ける活動的な環境下であり、口腔内組織細胞は頻繁に損傷と修復を繰り返している。ブラッシングは歯牙や歯周組織を清掃することで口腔内環境を整える目的があり、ブラッシングによる適度な剌激は歯周組織を強化することが知られている。本研究ではブラッシングにより細胞は損傷するのか、それはどの程度の損傷なのか、を知るために観察をおこなった。

ブラッシング後 15 分・3 時間後のラット下顎間歯肉において歯肉上皮下にブラッシングにより損傷後に死滅せず FDx に濃染した細胞の存在を確認した。損傷した細胞を定量化した結果、ブラッシング後 15 分後と 3 時間

後ではわずかに 15 分後の方が高い数値を示した。

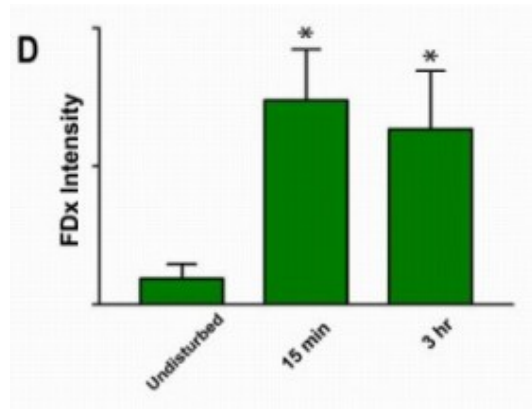
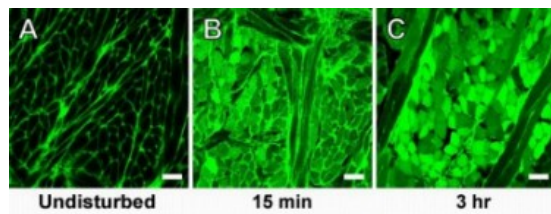
Fig. 1 ブラッシング後 15 分・3 時間後の歯肉



舌筋も同様にブラッシング後 15 分・3 時間後において損傷を受けた骨格筋細胞の存在が明瞭に認められた。

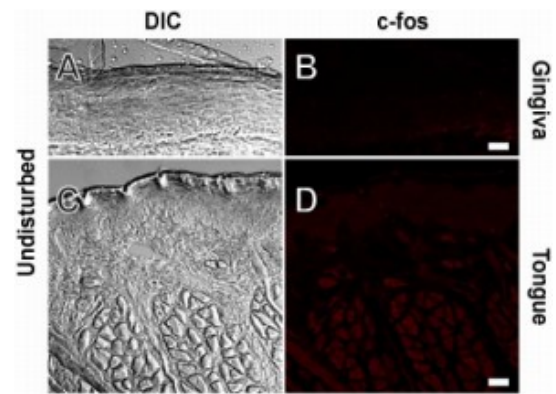
対して未ブラッシング歯肉と（同個体上顎間歯肉）舌筋の対照群細胞については両者共に Fdx の反応が認められなかった。

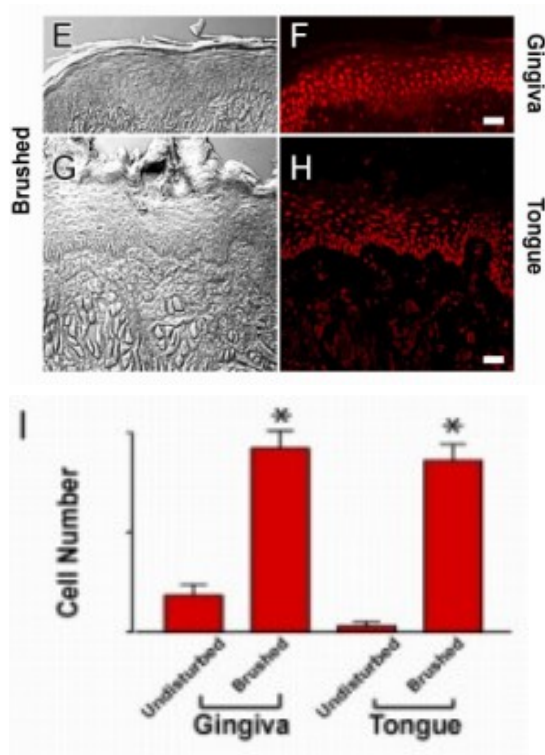
Fig. 2 ブラッシング後 15 分・3 時間後の舌筋



さらに Cfos 抗体染色においてもブラッシング後の歯肉・舌筋細胞（骨格筋細胞）において Cfos の発現がブラッシングした領域に認められ、未ブラッシング対照群細胞において Cfos の発現は認められなかった。Cfos は Immediate early genes の一種であり、種々の外的刺激や損傷により早期に急速かつ一過的に発現する神経細胞マーカーとして知られているが、本研究より日常的な刺激であるブラッシングは Cfos の強い発現を誘導させる外的因子であることが確認できた。

Fig. 3 ブラッシング後歯肉・舌筋の Cfos 反応





これらの結果を 2007 年 8 月 Journal of Dental research (Breaking Biological Barriers with a Toothbrush, J Dent Res 86(8):769-774)にて報告した。

実験 2) タービンにより機械的に損傷を加えたラット歯髓細胞切片を C fos 抗体で染色した結果、歯髓細胞の一部に C fos が発現しているのが認められた。対する未損傷の対照群(上顎中切歯歯髓)に関して C fos の発現は認められなかった。実験 2) に関しては、現段階では例数が少ないため現在例数を増やしながら研究を継続する意向である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

K. Amano, K. Miyake, J. L. Borke, P. L. McNeil, Breaking Biological Barriers with a toothbrush, Journal of Dental Research, 86(8), 769-774, 2007 査読有

[学会発表] (計 1 件)

Activation of Gene Expression by Toothbrushing induced Cell Wounding, J. Bork, K. Amano, K. Miyake, P. L. McNeil, IADR 24March, 2007, New Orleans USA

[図書] (計 1 件)

松村讓児, 川上速人, 高見茂, 天野カオリ, メディカルサイエンス・インターナショナル, ガートナーハイアット組織学カラーアトラス第 2 版 (共訳), 2007, 第 4, 6, 12, 13 章

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

(なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野カオリ (KAORI AMANO)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 70316470

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

