

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659887

研究課題名（和文）歯の再植後の置換性歯根外部吸収発症機構の解明と歯根膜再生療法への展開

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of post-replantation replacement resorption as a basis for the development of periodontal ligament regeneration therapy

研究代表者

興地 隆史 (OKIJI TAKASHI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号 80204098

研究成果の概要（和文）：

置換性歯根外部吸収は骨と歯根の癒合（アンキローシス）を特徴とし、歯の再植後の制御不能な継発症として知られる。本研究はその発症機構探索の端緒として、ラット臼歯を即時再植あるいは次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）浸漬後再植し、1-3週後の病態を組織学的、免疫組織化学的に追究した。その結果、アンキローシス、歯髓腔内骨様組織形成、及びCD68陽性マクロファージ浸潤がNaClO浸漬群で即時再植群より著明に観察された。根表面の歯根膜細胞の高度の損傷が上記の病態形成の誘引となることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

External replacement resorption, characterized by the fusion of the bone and tooth root (ankylosis), is known as an uncontrollable complication after tooth replantation. This study was conducted as an initial exploration of the pathogenic mechanisms of post-replantation replacement resorption. Experimental replantation of rat molars were carried out in two different conditions (immediate replantation and replantation after sodium hypochlorite immersion), and pathological changes of the pulpal and periodontal ligament (PDL) tissues were examined at 1 to 3 weeks postoperatively by means of histology and immunohistochemistry. Results demonstrated that (i) ankylotic changes in the PDL, (ii) bone-like tissue formation in the pulp, and (iii) CD68-expressing macrophage infiltration in the pulp and PDL were more prominent in the NaClO-immersed group than in the immediately replanted group. These findings suggest that severe damage to the PDL cells remaining on the root surface triggers the development of the above-mentioned pathological changes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学、歯根膜、歯根吸収、免疫組織化学、マクロファージ、アンキローシス

1. 研究開始当初の背景

置換性歯根外部吸収は歯の再植術後の重篤な継発症と位置づけられており、ひとたび発

症した場合、確実に回復させる方法は知られていない。しかしながら、再現性良く実験的に置換性歯根外部吸収を誘発することは困難

であるため、この病態の発症機序について細胞・分子レベルの知見は極めて限られている。さらに、歯根膜の創傷治癒機構自体についても幹細胞の動態など不明な点が多く残されている。これらを解明することにより、置換性歯根外部吸収の発症回避、あるいは歯根膜再生療法創成につながる基礎的知見が得られ、歯の再植の臨床的予知性の向上に寄与しうるものと考えられる。

一方、我々はこれまで多彩な観点から歯根膜や歯髄の創傷治癒機構を検索している。例えばラット臼歯再植後に歯根膜に一過性かつ著明なマクロファージ浸潤が早期に生じることを確認し、これらの細胞が増殖因子等の産生を介して血管新生などの修復機転に関与することを推定している

(Rungvechvuttivittaya S, Okiji T, et al.: Arch Oral Biol, 1998)。また、再植の遅延により置換性吸収の初期反応である ankylosis が高頻度に誘発されることも確認している。さらに、歯髄の創傷治癒過程では osteopontin、dentin matrix protein-1 等の硬組織基質タンパクが創部に集積し、新生硬組織形成に関与する可能性を見いだしている (Kuratate M, Okiji T, et al.: J Endod, 2008)。

2. 研究の目的

本研究は以上の背景のもと、置換性歯根外部吸収の発症機構探索の端緒として、歯根膜におけるマクロファージ関連細胞、幹細胞マーカー陽性細胞あるいは硬組織基質タンパクを検索対象とし、これらの正常・炎症歯根膜における局在様式、ならびに歯の再植後の分布の変動と置換性外部吸収発症の様相との関連を追究し、置換性外部吸収発症に特有の機序を探索することを目的とした。すなわち、これらのラット臼歯を ankylosis 誘発条件 (歯根膜損傷) もしくは通常条件 (即時再植) で再植し、歯根膜における上記の各種因子の発現状況を免疫組織化学的あるいは分子生物学的に解析し、正常歯根膜との相違や ankylosis 誘発条件に特有の変化の有無を解析した。

3. 研究の方法

(1) 歯の再植

5 週齢の Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯を被験歯とした。

被験動物にセボフルレンおよび 8% 包水クロラールによって麻酔を施した後、上記被験歯を抜歯後、即時再植 (生理食塩水に 3 分間浸漬したのち、抜歯窩に戻し接着性レジンで隣在歯と固定)、あるいは 10% 次亜塩素酸ナト

リウム液 (以下 NaClO) 浸漬 (次亜塩素酸ナトリウム液に 2 分間浸漬後、生理食塩水に 1 分間浸漬したのち、同様に再植固定) を行い、1 から 3 週経過後の歯髄、歯根膜の病態を組織学的に観察した。

対照組織として、正常な歯根膜、および既報 (Kaneko T, Okiji T et al. Cell Tissue Res 2008) に準じて露髄開放のまま放置して誘発した実験的根尖性歯周炎の組織を用いた。

(2) 免疫組織化学

被験動物にセボフルレンおよび 8% 包水クロラールによって麻酔を施した後、4% パラホルムアルデヒドもしくは PLP 固定液で還流固定したのち被験歯を顎骨ごと摘出し、さらに同一固定液で浸漬固定した。その後、試料を 10% EDTA 液で脱灰後、通法に従い厚さ約 10 μ m の凍結切片とした。

次いで、マクロファージ (CD68, CD163 陽性細胞)、非コラーゲンタンパク (osteopontin)、および幹細胞様細胞 (MAP1B, CD146 二重陽性細胞) を検索対象とし、酵素抗体染色を行なった。すなわち avidin-biotin-peroxidase complex 法により免疫ペルオキシダーゼ染色を施し、光学顕微鏡で観察した。

(3) 分子生物学的解析

正常歯根膜を検索対象とし、既報 (Chokechanachaisakul U, Kaneko T, Okiji T et al., J Endod 2011) に準じて組織切片より歯根膜を回収し、total RNA を抽出後、幹細胞関連分子の mRNA 発現レベルをリアルタイム PCR 法で解析した。

4. 研究成果

(1) 組織学的所見

① 再植後の歯髄の変化

即時再植群、NaClO 浸漬群とも、術後 1 週では炎症性細胞浸潤と象牙芽細胞の変性像が種々の程度に観察された。術後 2 週以降では歯髄腔内の骨様組織形成、修復象牙質形成の二種の組織像が観察されたが、NaClO 浸漬群では全例で種々の程度に骨様組織形成がみられた一方、修復象牙質形成は即時再植群の一部の試料にのみ確認された。

② 歯根吸収

歯根吸収像は組織学的に炎症性肉芽組織の存在と破歯細胞の歯根表面への配列を特徴とする炎症性吸収、および歯根と歯槽骨との癒着像 (ankylosis) を特徴とする置換性吸収に分類された。即時再植群、NaClO 浸漬群とも、歯根吸収の程度は経時的に著明となる傾向が観察された。術後 1 週では炎症性吸収が主体であったが、2 週後以降では単独の被験歯に両者が混在する像がしばしば観察された。Ankylosis は NaClO 浸漬群でより著明に発現した。

(2) 免疫組織化学的・分子生物学的検討

① 正常歯根膜

歯根膜全域にわたり、主として紡錘形、不整多角形等の多彩な形態を呈する CD6 あるいは CD163 陽性細胞が分布していた。これらは形態、分布とも類似していることから、その多くは CD68, CD163 共陽性の常在性マクロファージと考えられた。

Osteopontin は無細胞セメントの基質およびセメント細胞、歯槽骨表面に配列する骨芽細胞様細胞および骨組織のいわゆるセメントラインなどに免疫陽性反応が観察された。

さらに、MAP1B, CD146 の二重染色により正常歯根膜の幹細胞様細胞を検出することが可能であった。これらは主として血管周囲に少数が分布しており、主として小型円形を呈していた。歯根膜における MAP1B, CD146 二重陽性細胞の密度は歯冠歯髄と比較して有意に低値であった。また、幹細胞関連分子である CD105, CD146, CD166 の mRNA 発現レベルについても同様に、歯根膜では歯冠歯髄と比べて有意に低値であった。

② 再植歯の変化

歯髄においては、再植後に著明な CD68 陽性のマクロファージ様細胞の浸潤が観察された。すなわち、類円形、不整多角形、紡錘状、樹枝状などのさまざまな形態を呈する CD68 陽性細胞が術後 1 週で歯髄全体にわたり高密度に分布していた。術後 3 週ではこれらの密度は即時再植群で修復象牙質形成が見られた試料を中心にやや減少する傾向を示したが、NaClO 浸漬群および即時再植群で骨様組織が形成された例では依然として著明に観察された。

CD68 陽性細胞の浸潤は再植後の歯根膜においても著明であった、すなわち、術後 1 週では損傷された歯根膜全域に主として類円形、不整多角形など多彩な形態の CD68 陽性細胞が分布しており、術後 3 週においても炎症性歯根吸収部近傍を中心に多数の細胞が観察された。一方、CD163 陽性細胞の著明な浸潤は観察されなかった。

Osteopontin は NaClO 浸漬群および即時再植群とも、瀰漫性に歯髄、歯根膜のみならず象牙質、セメント質および歯槽骨に陽性反応を示した。しかしながら、これらの陽性像の一部が非特異反応の可能性も考えられたため、その特異性を検証中である。

(3) 考察

NaClO 浸漬群では即時再植群と比較して ankylosis や歯髄腔での骨様組織形成が県庁であったことから、歯根表面における歯根膜細胞の高度の損傷がこれらの病態形成の誘引となることが示唆された。

一方、ankylosis の実験的誘発との観点では、NaClO 浸漬はある程度有用と考えられたが、大

多数の被験歯で炎症性吸収も併存したことから、今回の実験条件では術後の細菌侵入の影響も大きいことが推察された。良好な再現性のもとでの ankylosis の実験的誘発は、この種の病態の成立機序検索に有用であり、本研究はその端緒となったように思われるが、より適切な誘発条件の探索が今後必要と考えられる。

また、本研究から歯の再植後に歯髄、歯周組織に著明な滲出性マクロファージの浸潤が生じることが明らかとなった。この種の変化は NaClO 浸漬群で即時再植群と比較して著明な傾向が観察されたことから、抜去歯表面の歯根膜組織の損傷が高度な場合に著明となることが示された。

これらの細胞浸潤は、口腔内細菌の創傷部への侵入に抗するための防御反応としての意義を有すると思われる。一方、これらのマクロファージの一部がいわゆる M2 マクロファージに分化して創傷治癒、組織修復にも関与する可能性も推定され今後の検討が必要かと思われる。

さらに本研究では各種幹細胞マーカー (CD146, MAP1B) 陽性細胞や osteopontin などの硬組織基質タンパクの免疫組織化学的観察を行うとともに、リアルタイム PCR による幹細胞マーカー mRNA 発現の定量解析についても検出条件を確立させた。今後これらの分子の再植後の挙動について検討を加えることにより、歯根膜の創傷治癒機構や ankylosis 発症機構についての新たな知見を得られることが期待されよう。

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)

(1) Kaneko T, Arayatrakoollikit U, Yamanaka Y, Ito T, Okiji T. Immunohistochemical and gene expression analysis of stem-cell-associated markers in rat dental pulp. Cell Tissue Res 351(3): 425-432, 2012 (査読あり). DOI: 10.1007/s00441-012-1539-9

[学会発表] (計 5 件)

(1) Yamanaka Y, *et al.* Stem cell-related marker-expression in rat dental pulp and periodontal ligament. 60th Annual Meeting of JADR, Niigata, December 14-15, 2012.
(2) Ito T, *et al.* CD146 and MAP1B expressing stem cell-like cells in rat dental pulp. 54th Symposium of the Society

for Histochemistry, Vienna, Austria, September 6-7, 2012.

(3) Ito T, *et al.* *In vivo* reaction of macrophage-associated antigen-expressing cells to dental biomaterials: a double-labeling immunohistochemical evaluation. 14th International congress of histochemistry and cytochemistry. Kyoto, August 26-29, 2012.

(4) Yamanaka Y, *et al.* Double immunolabeling of CD146 and MAP1B expressing stem cell-like cells in rat dental pulp and periodontal ligament. 14th International congress of histochemistry and cytochemistry. Kyoto, August 26-29, 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

興地 隆史 (OKIJI TAKASHI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：80204098

(2) 研究分担者

吉羽 邦彦 (YOSHIBA KUNIHICO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：30220718

吉羽 永子 (YOSHIBA NAGAKO)
新潟大学・医歯学総合病院・講師
研究者番号：10323974

重谷 佳見 (SHIGETANI YOSHIMI)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：80397132

金子 友厚 (KANEKO TOMOATSU)
新潟大学・医歯学総合病院・助教
研究者番号：70345297

(3) 研究協力者

山中 祐介 (YAMANAKA YUSUKE)
新潟大学・医歯学系・大学院生

伊藤 崇史 (ITO TAKAFUMI)
新潟大学・医歯学系・大学院生

日向 剛 (HINATA GO)
新潟大学・医歯学系・大学院生