

機関番号：32610

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791948

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（和文）：

平成21・22年度研究課題である損傷歯髄細胞の膜修復機構の遂行にあたり、10週齢ラットの歯牙を使用して歯髄細胞に高速タービンにより機械的損傷を与え細胞の損傷状態と修復過程についての観察を行った。加えて損傷歯髄内における神経系の状態の観察も同時に行った。本研究の一部は2007年 Journal of Dental Research(86(8)769-774)にて報告した。また2010年度杏林大学医学部研究奨励賞を授与された。現在研究は続行中である。

研究成果の概要（英文）：

To conduct this study, I investigated the wound and repair process of dental pulp following cavity preparation in rats' teeth using immunocytochemistry with C-fos protein. A part of this research was published in Journal of Dental Research(86(8)769-774, 2007), for which we received the Best Research Award from Kyorin University School of Medicine in 2010.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯学再生、歯髄細胞、細胞損傷、歯髄内神経

1. 研究開始当初の背景

近年、移植再生領域におけるめざましい医科学研究成果の発展に伴い、口腔医療においても研究の進化と技術・材料の向上と共にインプラントや再植の需要普及率が年々増加傾向にある。一般的には半永久的治療法として認識されているインプラントを含めた移

植・再植治療は根本的には損失歯牙に対する治療手段であり、すべての症例に対応する優先的な治療法とはいえ、従来のウ蝕や歯周病疾患に対する新たな治療法開発も更なる発展向上をする必要性があり、今後の口腔医療における重要な課題となることは明らかである。

歯科修復治療においては、ウ蝕部位を限局的

に除去・修復するミニマル・インタベンションの概念が普及し実践されている。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う方法が注目されているが、実際の治療では今なお抜髄処置が一般的である。すなわち損傷していても処置次第で十分に生存し続ける可能性を持つ歯髓組織を抜髄しているのが現状である。

しかし、歯髓が持つ歯牙に対する多大な役割を考慮すると、歯髓は可能なかぎり保存することを優先とした治療を行うことが最も理想的である。そこで本研究の目的である損傷後の歯髓細胞の修復・再生過程を細胞膜レベルで明らかにすることは、これまでの歯髓に対する治療法の概念とは全く異なる保存修復ならびに歯髓再生治療の起点として極めて重要な課題といえる。

さらに損傷を受けた歯髓細胞膜の修復段階における早期における治癒過程を解明することは、治療への応用化の可能性にもつながる。またより効果的な修復を誘導促進する環境ならびに関連因子について検討をおこなうことを含め、あらたな歯学再生医療の発展を担う課題である。

2. 研究の目的

機械的または物理的な刺激損傷を受けた細胞において細胞膜の修復ならびに治癒過程は、細胞組織の生物学的再生能を解明する上で極めて重要な事項であるといえる。

本研究の目的は日常的な環境下において、歯科治療時の機械的な刺激や軽度外傷、薬品による科学的ストレスを受けて損傷を負った歯髓細胞が死滅せず生き延びて治癒する過程について、特に早期における修復機構について明らかにすることである。さらには象牙芽細胞への分化誘導能を解明すると共に、分化誘導を促進する刺激因子を追及することにより、これからの歯髓再生治療を進展させ、最終的には実用化の実現を目標として本研究を遂行する。

3. 研究の方法

タービンによる切削後の歯髓細胞の損傷

12週齢 Wister 系ラットを使用し、深麻酔下で下顎中切歯歯頸部付近を注水下、高速歯科用タービンにて、点状露髄程度の損傷を与えた（非損傷の対照群は反対側下顎中切歯とする）。

Fig. 1 ラット歯牙損傷後 矢頭: 損傷部位



1時間後、3時間後、24時間後にそれぞれ4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液にて灌流固定を行った。下顎中切歯は下顎骨ならびに周囲組織と共に一塊で摘出し、4°C/10%EDTA溶液にて6週間脱灰後、30%シヨ糖溶液にて24時間浸漬後、凍結試料とし10 μ 切片を作製した。損傷細胞の染色にはC-Fos抗体(2%bovine serum albumin 1:100)を使用し、蛍光顕微鏡(キーエンスBZ9000)下にて観察を行った。また、一部試料は損傷歯髓内における神経の状態を観察するため神経系に特異的に反応するProtein Gene Product (PGP9.5, 1:200)による染色を行い、同様顕微鏡下で観察を行った。

4. 研究成果

口腔内は日常的に生理的・機械的にあらゆる刺激や損傷を受ける活動的な環境下であり、口腔内組織は頻繁に損傷と修復を繰り返している。例えばブラッシングは歯牙や歯周組織の清掃ならびに口腔内環境を整える目的があるが、加えて適度な刺激による歯周組織の強化活性にもつながることが知られている。我々はこのブラッシングによる刺激の程度ならびに損傷レベルを知るため10週ラット歯周組織(歯肉・舌)にブラッシングを行い損傷後に死滅せず生存し続ける細胞群の存在を確認した(Amano K. et al.

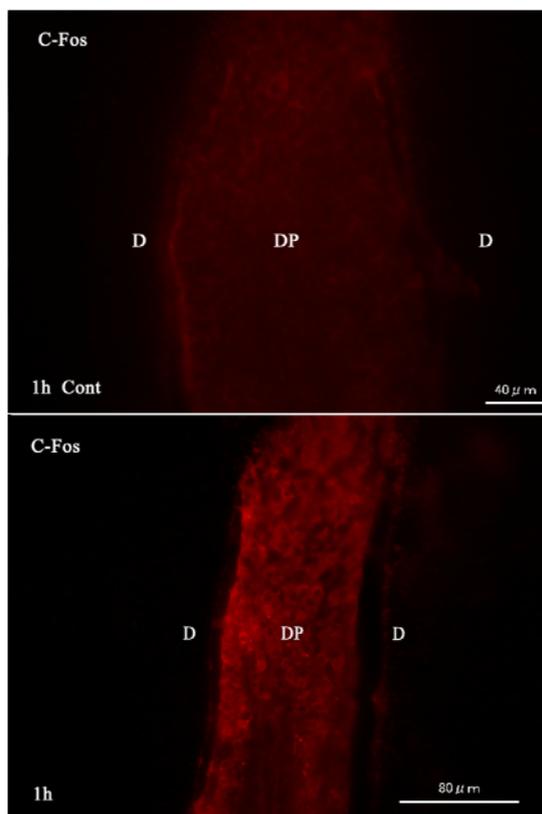
Breaking Biological Barriers with a toothbrush, Journal of Dental Research, 86 (8), 769-774. 2007)。

今回は歯髄細胞における損傷と修復過程を観察するため、硬組織である歯牙を損傷させるために機械的刺激のレベルを高くする必要があり、高速タービンによる切削いわゆる歯科治療時における窩洞形成を想定した損傷後の観察を行った。

窩洞形成後1時間後の損傷象牙質直下の歯髄細胞においてC-Fos抗体に濃染する細胞群が明瞭に認められた。

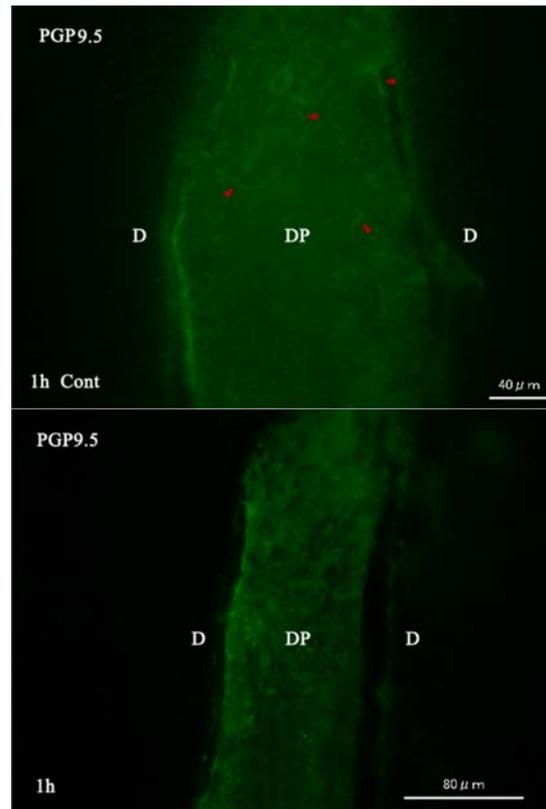
最表層の象牙芽細胞は破壊されていたが、生存する細胞群の存在もみとめられた。反対側対照群の歯髄細胞にC-Fos反応は認められなかった。

Fig. 2 損傷後1hと対象群のC-Fos反応



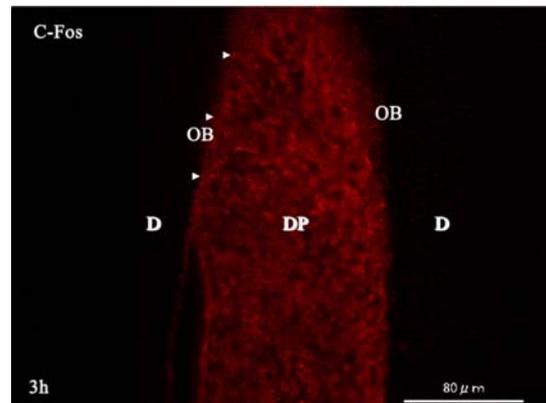
また損傷後1時間の歯髄内においてPGP9.5の反応は認められなかったが、非損傷群歯髄内においては神経(矢頭)の走行が認められた。

Fig. 3 損傷後1hの歯髄内PGP9.5抗体反応



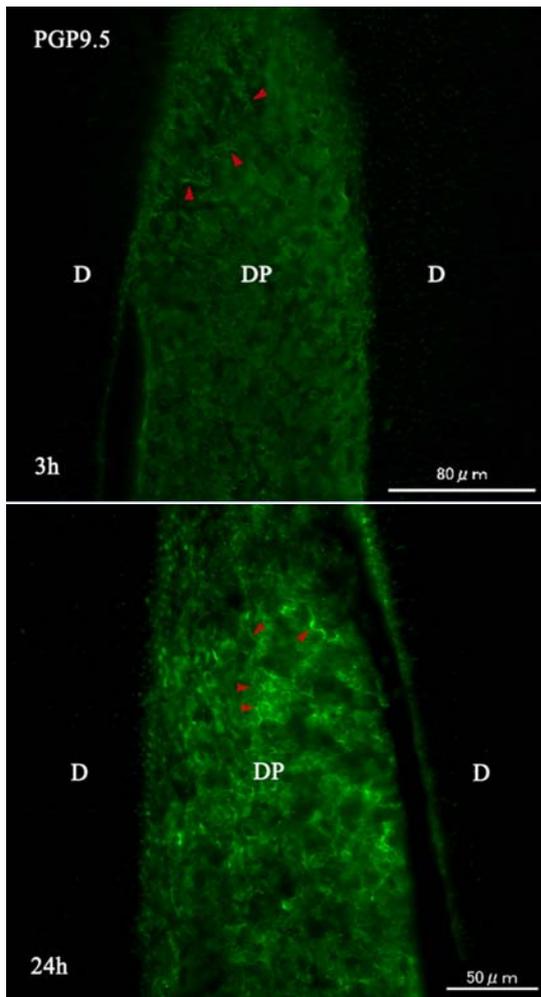
損傷後3時間において、損傷象牙質直下の歯髄内最表層部位において反応性または修復性と考えられる細胞(矢頭)の存在が認められた。

Fig. 4 損傷後3hの損傷群C-Fos反応



また損傷後3時間の損傷群歯髄内において、PGP9.5の反応がわずかに認められた。さらに損傷後24時間の損傷群歯髄内ではPGP9.5の反応が高くなっていた。これらの結果より、窩洞形成後1時間から3時間の間に歯髄細胞の修復が開始していることが示唆された。

Fig. 5 損傷後3h/24hの損傷群PGP9.5反応



本研究の結果の一部は、2010年度杏林大学医学部研究奨励賞研究費を取得した。

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2件)

① Amano K. et al: Morphological study of the parotid duct with special emphasis on the relationship between the buccinator muscle and the parotid duct. The Journal of Medical Investigation. Vol. 56, 255-257 2009. 査読有

② Amano K. et al: Morphological study of the fetal parotid duct and buccinator muscle and the relationship to salivary secretion, Clinical Anatomy 23:642-648, 2010. 査読有

[学会発表] (計1件)

① 天野カオリ 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-
杏林大学医学部研究奨励賞・中間報告会 杏林医学会総会 2010年11月20日東京

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：