

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592143

研究課題名（和文） 高気圧酸素療法を応用した新しい歯牙再植法の開発

研究課題名（英文） Development of new treatment in replantation of teeth used at hyperbaric oxygen therapy

研究代表者

高橋 敏幸 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：80360923

研究成果の概要（和文）：本研究は高気圧酸素治療(HBO)が、ラット上顎第一臼歯の歯牙再植治療に及ぼす影響を調べた。HBOを行わない群をコントロールとし、HBOは100%酸素を2.5 atmosphere absoluteにて1日2時間手術当日から連続5日間行い飼育し、術後7日で検体を採取した。ヘマトキシリン・エオジン染色像では、再植歯の歯周組織において繊維芽細胞や小血管の密度が増しているように思われた。歯牙再植にHBO治療を加えると、治療過程を促進する可能性があるかと推察された。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to investigate the effect of hyperbaric oxygen (HBO) on the healing of the replanted molar in rat. Group 1 consisted of rats which underwent HBO, and Group 2 consisted of rats receiving no treatment. Group 2 rats were given HBO (100% oxygen at 2.5 atmosphere absolute) for 120 minutes per day for five days, beginning the day of surgery. The experimental tissues in both groups were removed at 7 day after operation. By histological evaluation, the HBO therapy seemed to increase microvessel density and fibroblast in periodontal tissues of replanted molar. It was suggested that HBO therapy has a positive effects on the healing of the replanted molar in rat.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：高気圧酸素治療、歯牙再植

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

これまで、我々は口腔外傷の予防と軽減を目的としマウスガード材料の改良・開発及び形態に関する研究とマウスガードの普及啓発を行ってきた。しかしながら、平成18年度の独立行政法人日本スポーツ振興センターの統計によれば、歯牙障害は、義務教育諸学校、高等学校、高等専門学校、幼稚園及び保育所の管理下における災害に対する障害見舞金の約22.7%を占め、障害種別では、外貌・露出部分の醜状障害（約27.8%）、視力・眼球運動障害（23.1%）について3番目に高い割合になっている。また、国内で口腔外科に来院する外傷患者では、転倒転落、殴打、交通事故、スポーツなどが原因となっており、歯牙外傷は全体の約12%である、との報告もある。これらのことから、これからのスポーツ歯学に求められていることは、単にマウスガードで歯を守るというだけでなく、不幸にも損傷し失われかけた歯を救う、ということも非常に重要な役割であると考えられる。

一方、高気圧酸素治療(HBO)は1917年から行われるようになったが、オーバーインディケーション(過度の適応)が進み、逆にそれで衰退したという歴史がある。オランダの心臓外科医Boeremaは3 atmosphere absolute(ATA)純酸素下で仔豚の脱血希釈は生存したという実験結果を得た。つまりこれは、3ATA酸素環境下ではヘモグロビンがなくても循環が維持されていれば、組織が必要とする酸素は溶解型酸素のみで供給できる、ということの意味する。これによって“Life without blood”という表現がとられ、再び注目されるようになった。スポーツ外傷への適応も、アメリカでは1990年代から、日本でも1990年代半ばくらいから盛んに研究が進められるようになった。

2. 研究の目的

HBOの臨床応用として、第一に生体内低酸素状態の改善があげられ、具体的には一酸化炭素中毒などヘモグロビンがその機能を果たせなくなった時、あるいは動脈閉塞などで組織への酸素供給が減少したとき、気道閉塞で外呼吸ができなくなったとき、乏血性ショックなどでヘモグロビンが大量喪失したとき、などが有効と考えられる。これらに加えて近年では、運動時の筋疲労に対する効果やスポーツ外傷などによる軟部組織損傷に対しても用いられてきている。

歯科領域においても、ウサギの両側下顎骨に腸骨移植を行い、移植骨にインプラントを植立した実験では、HBO非施行群と比較してHBO施行群は有意に高い骨結合率が認められた。さらに、ビーグル犬の上顎骨に人工的骨欠損を作製した顎裂モデルを用いて骨延長術を行った報告は、HBOにより骨延長装置装着期間の短縮が可能であることを示唆した。このように顎顔面領域においても、HBOに関する基礎的研究が行われている。

そこで、本研究では歯の外傷のうち約半数を占めるといわれている歯の脱臼と脱離時の治療法の一つであり、歯科臨床に不可欠な治療法として適用症例も数多く報告されている歯の再植に、HBOを応用することで、治療率を向上させることができるか否か検討した。

3. 研究の方法

本研究は東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得たのち動物実験ガイドラインに沿って行った。

5週齢のWistar系雄性ラットを使用した。抱水クロラル(280mg/kg)を腹腔内に注射して全身麻酔を施行した。

実験(1) 抜歯窩治癒についての実験では、周囲組織を損傷させないように上顎第一臼歯を抜歯した。

実験(2) 歯牙再植については、上顎第一臼歯を脱臼させ抜歯窩に戻した。

実験(1)、実験(2)ともに、HBO 治療を行わない群を Control 群とし、通常のケージで飼育した。HBO 治療を行う群 (HBO 群) は、手術当日から連続 5 日間 HBO を施行しケージで飼育した。術後 7 日で屠殺し、速やかに検体を採取した。HBO 治療は、動物実験用高気圧タンクを用い 100%酸素を 2.5 atmosphere absolute (ATA) にて 1 日 2 時間行った。この際ラットのストレスを出来るだけ避けるため加圧は 15 分、減圧は 10 分かけて行った。

実験 1 の抜歯窩粘膜の評価は、リアルタイム RT-PCR を用い I 型プロコラーゲン遺伝子の発現量の比較とヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色による組織学的評価により行った。実験 2 の評価は、micro-computed tomography (マイクロ CT) と HE 染色による組織学的評価により行った。

リアルタイム RT-PCR: 採取した第一大臼歯抜歯窩周囲粘膜を QIAzol Lysis reagent (QIAGEN) を用いてホモジナイズし、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (QIAGEN) のプロトコールに従って RNA を抽出、精製した。精製した RNA 量は吸光度により測定した。精製した RNA を PrimeScript RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて逆転写し、cDNA を合成した。リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq II (タカラバイオ株式会社) を使用した。内部標準遺伝子としてグリセルアルデヒド 3 リン酸脱水酵素を用い、その PCR 産物量との比を持って補正し、相対的発現量とした。

HE 染色: ラット上顎臼歯部歯周組織を顎骨と一塊にして切り出した後、すみやかに 4% パラホルムアルデヒド 0.05M リン酸緩衝固

定液に浸漬させ、24 時間固定を行い、脱灰液 (10%EDTA solution) にて 2 週間脱灰を行った。パラフィンにて包埋し、歯根に平行に厚さ 5 μ m の連続切片を作製した。その後、レモゾールに 2 回 10 分ずつ浸漬後、60%アルコール、70%アルコール、80%アルコール、90%アルコール、95%アルコール、100%アルコール、100%アルコールの順に浸漬し脱パラフィンを行った。さらに、流水下に 5 分、蒸留水に 5 分浸漬して、ヘマトキシリンに浸漬し流水下で 30 分後、エオジンに浸漬した。その後、60%アルコール、70%アルコール、80%アルコール、90%アルコール、95%アルコール、100%アルコール、100%アルコール、レモゾール、レモゾールの順に浸漬後、封入しヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

マイクロ CT: ラット上顎臼歯部歯周組織を顎骨と一塊にして切り出し、マイクロ CT (InspeXio, SMX-90CT, 島津製作所) にて撮影を行った。エージング処理を予め行い、電圧 75kV、電流 140 μ A に設定した。画像サイズは 1024 \times 1024、ビュー数: 1200、アベレージ数 8、スライス厚 0.005、とした。

4. 研究成果

I 型プロコラーゲン遺伝子の発現量は、HBO 群ではコントロール群と比較して有意に多かった (図 1)。今回の実験で測定した I 型プロコラーゲン遺伝子は、線維芽細胞で発現していると考えられ、またこれらの発現が増加したのは、高気圧酸素治療により、細胞が活性化されたためと思われる。また、細胞培養実験ではあるが、線維芽細胞の増殖は 1 日 1 時間までの HBO 治療は有効ではなく、2 時間の負荷では有効との報告は、本研究と一致した結果であった。

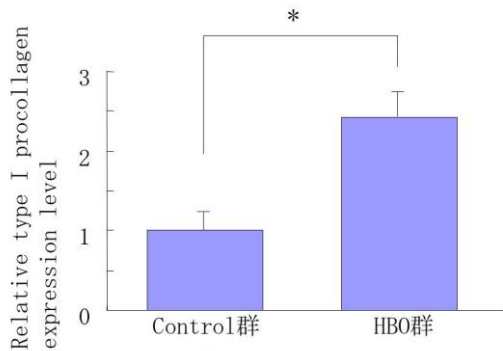


図1 I型プロコラーゲン遺伝子発現

HE染色像では、HBO群の方がControl群より、抜歯窩周囲粘膜と再植歯歯周組織の繊維芽細胞や小血管の密度が増しているように思われた(図2)。マイクロCT像では、HBO群、Control群で顕著な違いは認められなかった。高気圧酸素は、動脈血中の酸素分圧を著しく増加させ、血中溶解型酸素の量を増やすことで組織への酸素分圧を増やし組織への酸素供給量を増加させる。このことにより、血管新生に必要な酸素依存型コラーゲン基質の生成を促進することによって虚血組織の治癒を促進する。ラットの大腿骨骨欠損モデルにおいてHBO処置を2気圧にて90分間1日1回行った群と1日2回行った群を比較すると、前者は骨修復と血管新生が促進されたとの報告がある。また工藤らは、移植骨片中の歯髄を計測し、血流の早期回復に高気圧酸素が影響を及ぼしたということを示し、このことは高気圧酸素治療の血管新生効果によるところが大きいと考察している。

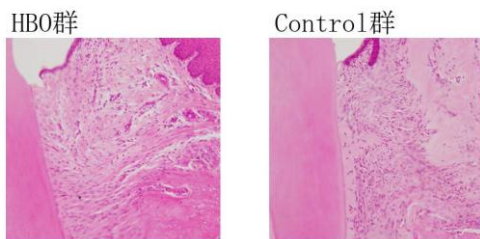


図2 再植歯周囲の組織像 (HE染色)

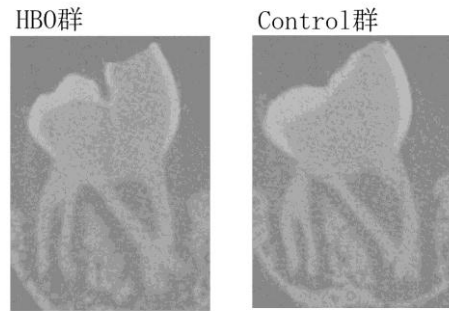


図3 再植歯周囲のCT画像

今後、設定条件や評価方法を追加し、さらに長期にわたりHBOの影響を観察する必要があると考えられる。

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 件)

[学会発表] (計 件)

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 敏幸 (TAKAHASHI TOSHIYUKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：80360923

(2)研究分担者

上野 俊明 (UENO TOSHIAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・准教授

研究者番号：30292981

加藤 剛 (KATO TSUYOSHI)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

(3)連携研究者

()

研究者番号：