

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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659344

研究課題名（和文） 多光子励起顕微鏡法と膜電位感知タンパク解析法を用いた歯髄リンパ網の研究

研究課題名（英文） A study on pulp lymphatic system using multiphoton-excitation microscopy and analysis of membrane potential-sensitivity

研究代表者

池田 英治（IKEDA HIDEHARU）

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20222896

研究成果の概要（和文）：

(1) 歯髄リンパ管の新生：ラット臼歯露出象牙質下に歯髄炎を誘発し、リンパ管の分布・密度変化を、特異抗体でラベルし、多光子励起顕微鏡を用いて観察し、リンパ管新生と思われる像を確認した。

(2) 歯髄リンパ網が調節する動水力学的水圧の空隙測定：0.1-0.2 μm の蛍光小球は象牙芽細胞突起と象牙細管壁間の空隙を通過して歯髄に到達したが、それより大きいものは外向きの先細りである象牙細管を通過できなかった。

研究成果の概要（英文）：

(1) Lymphangiogenesis caused by experimentally induced pulpitis: Pulpal inflammation was induced by applying bacterial irritants to rat exposed dentin. Changes in distribution and density of lymphatic vessels were observed using two-photon microscopy following specific antibodies (VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1). Images showed lymphangiogenesis-like change.

(2) Measurement of functional space of fluid movement in the dentinal tubules: Small fluorescent microspheres (diameter: 0.1-0.2 μm) could pass the space between dentinal tubules and cellular components in the human dentinal tubules. But big microspheres could not reach dental pulp despite the outward tapering of dentinal tubules.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|---------|--------|---------|
| 2010年度 | 900000 | 0 | 900000 |
| 2011年度 | 600000 | 180000 | 780000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 1500000 | 180000 | 1680000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯学，多光子励起顕微鏡，膜電位感知タンパク，リンパ管新生，歯髄炎

1. 研究開始当初の背景

歯髄リンパ系の機能に関する報告はほとんどない。Matsumotoらが5'-nucleotidase(5

'-Nase)-Alkaline phosphatase二重染色法を用いて酵素組織化学的に(Cell tissue Res 1997, Microscopy Res Tech 2002), Sawa

ら(Tissue Cell 1998)が免疫組織化学的に顕微鏡学的観察を行ってきた。

2. 研究の目的

(1)ラット歯髄慢性炎症あるいは外傷後に生ずる、歯髄リンパ管新生動態を多光子励起顕微鏡(two-photon microscopy)を用いて形態学的に解析する。

①蛍光microsphereを用いて歯髄リンパ管ネットワークを形態学的に明らかにする。

②VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1抗体を用いて、炎症時あるいは外傷後の歯髄リンパ管の分布・密度変化を健常時と比較する。

(2)歯髄リンパ液が調節する動水力学的水圧の作用スペースの計測

歯髄リンパ管と血管の圧力に基づく歯髄組織陽圧が齶す、象牙細管内容液の流れの場である象牙芽細胞突起と象牙細管壁との機能的スペースを計測する

3. 研究の方法

(1)歯髄リンパ管網の免疫組織学的解析

①動物：成熟ラットの臼歯に窩洞を形成し、ヒト歯垢、う蝕象牙質、口腔環境に曝露後8-14日で灌流固定する。顎を切除した後固定し、脱灰する。

②免疫組織学的手法：リンパ管の特異マーカーである VEGFR-3(vascular endothelial growth factor) と LYVE-1(lymphatics endothelial hyaluronan receptor)で、リンパ管新生の有無、その量と局在を解析する。

(2)歯髄リンパ網が調節する動水力学的水圧のスペース測定

歯髄リンパ系が関与する外向き組織圧によって象牙細管内容液が外向きの流れを有している。この流れによって、大きさと励起波長が異なる蛍光microsphereを露出象牙質面に作用させ、多光子励起顕微鏡

(Two-photon microscopy)を用いて形態学的に解析を試みた。

①ラット臼歯の象牙細管を露出させ、直径と励起波長の異なる蛍光microsphereの混合液を作用させる。

②灌流固定後、脱灰し多光子励起顕微鏡(two-photon microscopy)で蛍光microsphereの進入深度を観察する。

4. 研究成果

(1)歯髄リンパ管の新生・再生

多光子励起顕微鏡(Two-photon microscopy)を用いて、実験動物の唾液、ヒト歯垢、ヒトう蝕象牙質をラット臼歯に形成した象牙質窩洞内に封入して歯髄炎を誘発した。この歯髄炎時のリンパ管の分布・密度変化を健常時と比較して、リンパ管の分布に変

化が生じていることを確認し、それが歯髄生活性を維持するための lymphangiogenesis であると考えられた。

それに対して、歯髄炎症時の歯髄リンパ管の新生、再生を解明する目的で、免疫組織学的に VEGFR-3, LYVE-1, Prox-1 抗体を用いて、コントロールとして健常組織のリンパ組織を染色してみた。すると、健常状態の歯髄では、この3種の抗体に対する反応が、矯正治療目的で抜歯した直後のヒト小臼歯でも、実験動物(ラット)臼歯でも陽性反応を検出できなかった。

(2). 歯髄リンパ網が調節する動水力学的水圧のスペース測定

その結果、0.1-0.2 μm の microsphere は象牙芽細胞突起と象牙細管壁の間のギャップと通過して歯髄に到達することができた。本来、象牙細管は外向きの先細りであるにも関わらず、この内側ほど狭いスペース(逆向きテーパ)によって、象牙芽細胞は象牙質内側で象牙細管との間の狭いスペースを有することになり、動水力学的水圧を上昇させる機能的意味をもち、神経線維終末の機械的変形と同時に象牙芽細胞突起の歪みをおこなっていると考えられた。

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14件)

① Ikeda H、Answer to the mechanism of dentin hypersensitivity、The Journal of Dental Engineering、査読有、vol 30、2011、32-33.

② 池田英治、第8回 IFEA アテネ大会参加報告、日本歯内療法学会雑誌、査読無、32 巻、2011、55-59.

③ 山本弥生子、池田英治、須田英明、歯内治療専門医による根管内破折器具の除去成績、ザ・クインテッセンス、査読無、30 巻、2 号、2011、131-133.

④ 宮良香菜、池田英治、須田英明、矯正治療中における外部吸収 既根管治療歯と生活歯で差があるか?、ザ・クインテッセンス、査読無、30 巻、3 号、2011、138-139.

⑤ 小松恵、池田英治、須田英明、超音波器具によるポスト除去時の温度上昇と冷却材の使用、ザ・クインテッセンス、査読無、30 巻、6 号、2011、114-115.

⑥ 白金由紀子、池田英治、須田英明、う蝕罹患性に違いはあるか? 既根管治療歯と生活歯の比較、ザ・クインテッセンス、査読無、

30 卷、9 号、2011、140-141.

⑦新井淳子、池田英治、須田英明、髓腔開拓された小臼歯の咬頭被覆が破折抵抗に与える影響、ザ・クインテッセンス、査読無、30 卷、12 号、2011、107-109.

⑧池田英治、象牙質知覚過敏発症のメカニズム、The Journal of Dental Engineering、査読有、29、2010、285-288.

⑨池田英治、歯がしみるのはすべて象牙質知覚過敏症か？象牙質知覚過敏症 目からうるこのパーフェクト治療ガイド、歯界展望、査読無、116、2010、616.

⑩池田英治、外傷と歯髄神経 外傷歯のトピックス、よくわかる外傷歯 症例から学ぶ治療のエッセンス、デンタルダイヤモンド、査読無、特別号、2010、130-131.

⑪辺見浩一、池田英治、須田英明、壊死した幼若永久歯の再生的歯内療法、ザ・クインテッセンス、査読無、29 卷、4 号、2010、140-141.

⑫坂上斉、池田英治、須田英明、下顎第二大臼歯における C 字型根管の根管探索、ザ・クインテッセンス、査読無、29 卷、5 号、2010、135-137.

⑬河村隼、池田英治、須田英明、アペキシフィケーションーその終焉の始まり、ザ・クインテッセンス、査読無、29 卷、7 号、2010、104-105.

⑭石澤千鶴子、池田英治、須田英明、再根管治療でも治癒しなかった根尖性歯周炎を有する大臼歯の超微細構造歯内療法的バイオオフィルムの検査、ザ・クインテッセンス、査読無、29 卷、10 号、2010、114-115.

9.

[学会発表] (計 14 件)

①Ikeda H, Suda H, Regulatory Capacity of Volume and Form of Human Odontoblasts, International Association for Dental Research, 2011/03/18, San Diego, USA.

②Li Y, Ikeda H, Suda H, Measurement of Functional Space for Fluid Movement in Dentinal Tubules, International Association for Dental Research, 2011/03/18, San Diego, USA.

③ Ikeda H, Suda H, Localization of Intercellular Coupling between Human Odontoblasts, International Association for Dental Research, 2010/07/14, Barcelona, Spain.

④ Ikeda H, Suda H, Localization of Intercellular Coupling between Human Odontoblasts, Japanese Division of International Association for Dental Research, 2010/11/21, 北九州市.

⑤Ikeda H, Suda H, Circulation of the Pulp

牙髓循環系統 (招待講演), Chinese Division of International Association for Dental Research, 2010/11/02, 大連市、中華人民共和国.

⑥池田英治、須田英明、ヒト象牙芽細胞間カップリングの局在、日本歯科保存学会、2010/10/29、岐阜市.

⑦ Ikeda H, Suda H, Chronic pain (Nociceptive and neuropathic pain) associated with endodontic treatment, International Federation of Endodontic Association, 2010/10/07, Athena, Greece.

⑧Ikeda H, Suda H, Functional syncytium behavior of human odontoblasts to mechanical distortion, International Association for Dental Research (Symposium of Pulp Biology and Regeneration), 2010/07/18, Geneva, Switzerland.

⑨Ikeda H, Suda H, Mechanical distortion influences on transjunctional Ca^{2+} spreading in human odontoblasts, Korean Academy of Endodontics, 2010/04/22, Busan, Korea.

⑩池田英治、須田英明、重度の歯内疾患を有した若年患者の長期治癒経過観察症例の報告、日本歯科保存学会、2010/06/04、熊本市.

⑪池田英治、李穎、須田英明、象牙細管内の動水力学的な水圧に対する象牙芽細胞膜の歪みについて、日本歯科保存学会、2011/10/21、大阪市.

⑫竹田淳志、池田英治、小林千尋、須田英明、根管長測定可能な学生実習用顎模型の改良、日本歯科保存学会、2011/10/21、大阪市.

⑬池田英治、須田英明、交流イオン導入法を用いたヒトエナメル質の物質透過性促進、日本電気泳動学会総会、2011/10/12、横浜市.

⑭Ikeda H, Suda H, Response to mechanical deformation of human odontoblasts, Symposium on oral neurophysiology and molecular biology, 2011/07/26, Marseille France.

[図書] (計 5 件)

① Ikeda H, Suda H, Quintessence Int Publishing, Seltzer and Bender's The Dental Pulp, Chapter 6 Circulation of the Pulp 2010、総 p512.

②池田英治、永末書店、改訂版エンドドンテックス 21 第 17 章 偶発事故の予防と処置、2010、274-288.

③池田英治、クインテッセンス出版株式会社、口腔内疼痛症『口腔顎顔面痛のガイドライン』改訂版、2010、115-141.

④池田英治、デンタルダイヤモンド、よくわかる外傷歯 症例から学ぶ治療のエッセン

ス(外傷と歯髄神経 外傷歯のトピックス)、
2010、130-131.

⑤池田英治、医歯薬出版、象牙質知覚過敏症
目からうるこのパーフェクト治療ガイド、
2011、総ページ 53.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 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 0 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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 英治 (IKEDA HIDEHARU)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・講師

研究者番号：20222896

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

須田 英明 (SUDA HIDEAKI)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：00114760