

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3月1日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792468

研究課題名（和文） 咬合は形成過程の歯根に影響するか？

研究課題名（英文） Is occlusion affected to a tooth-root during development?

研究代表者

中曽根 直弘 (NAKASONE NAOHIRO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：20447634

研究成果の概要（和文）：ラット臼歯発生過程において、同時期に開始される咬合が、発生過程の歯根に影響を与えるか解析した。まずマイクロ CT を用いて咬頭の幅および歯根長を測定した。私たちは、実験群よりコントロール群で咬頭の幅が有意に広いことや歯根長が有意に短いことを示した。更に、免疫染色にてコントロール群の歯根根尖部の増殖細胞数が有意に少ないことを明らかにした。これらのデータをまとめた論文は、*European Journal of Oral Sciences* に受理、発刊された。

研究成果の概要（英文）：We analyzed whether occlusion is related to a tooth-root during root development in rat molars. First, we measured the width of cusps and root length using μ -CT. We demonstrated that the width of cusps in normal groups is significantly wider than that of experimental groups and the root length in normal groups is shorter than that in experimental groups. Furthermore, we elucidated that proliferating cells in root apex of normal groups is significantly less than that of experimental groups. These data have been accepted and published in *European Journal of Oral Sciences*.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：咬合、歯根発生、歯根伸長、細胞増殖、ラット

1. 研究開始当初の背景

歯根形成は歯冠形成に連続して上皮間葉相互作用により生じる。歯冠形成後、内外エナメル上皮はヘルトヴィッヒの上皮鞘 (HERS) という二層構造体を形成し、歯根形成過程において歯乳頭に侵入し歯根形成に関与する。HERS についてはまだ明らかになっていないことも多いが、最近の研究において、HERS 細胞の数、HERS の長さ、

HERS の運命などが明らかとなっている。また歯根形成には bone morphogenetic protein (BMP)-4, sonic hedgehog (Shh), Nuclear factor I (NFI) -C, periostin, Msx2 のように様々な遺伝子の関与が報告されている。このように、歯根形成は多くの遺伝子によって制御されているが、歯根長や歯根の幅といった歯根のサイズに影響を与える遺伝子の報告は Shh や *sulf1/sulf2* を除いて

まだない。

我々の過去の研究では、ラット臼歯発生過程において増殖細胞分布を解析し、歯根形成期に形成部位での細胞増殖活性が急激に減少することを示した(Nakasone et al, 2006)。この歯根形成期は咬合開始期でもあり、咬合が加わる方向が歯の萌出方向と逆方向であるので、咬合が歯根形成部位の増殖活性に影響を与えていることが推測された。

2. 研究の目的

我々は“咬合を排除する”ことで咬合の影響を解析する実験系を樹立した。したがって、本研究では咬合の排除により歯根形成部での増殖活性が維持され、それにより歯根長が延長するかどうかを形態学的に解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

- ・15日齢のWistar系のラットを用いる。

(2) 試料採取

- ・実験群: 8% 抱水クロラールにて深麻酔後に、萌出前の右側下顎第一臼歯を抜去する。
- ・対照群: 正常発生の未処置の上顎第一臼歯を用いる。
- ・10日(25週齢)、15日(30週齢)後にプロモデオキシウリジン(BrdU)を腹腔内に投与することで増殖細胞をラベルし、2時間後にアルデヒド系固定液にて固定する。

(3) μ -CT解析

- ・ μ -CT撮影後三次元構築し、得られた画像から咬頭の状態を確認する。
- ・その後矢状断にスライスした画像を用いて近心根の歯根長を計測し、統計解析まで行う。

(4) 組織学的および免疫組織学的解析

- ・ μ -CT撮影後EDTAにて脱灰し、通法に従ってパラフィン包埋する。ミクロトームにて5 μ mに薄切し、パラフィン切片を作製する。
- ・通法どおり脱パラフィン、脱水後にヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色およびAzan染色を行う。

- ・H-E染色、Azan染色した切片の連続切を用いて、cytokeratin 14およびBrdU抗体による免疫染色を行う。
- ・H-E染色、Azan染色および免疫組織所見は同一部位を写真撮影し、特に形成中の歯根尖部に焦点を当てる。

4. 研究成果

(1) μ -CTによる咬耗量と歯根長計測

図1: A,B,Cは25週齢コントロール群(N25)、D,E,Fは25週齢実験群(E25)、G,H,Iは30週齢コントロール群(N30)、J,K,Lは30週齢実験群(E30)を示す。

また、A,D,G,Jは三次元構築側面観、B,E,H,Kは三次元構築咬合面観、C,F,I,Lは三次元構築矢状断像を示す。B,E,H,K中の赤色・青色・緑色のバーは、咬頭の幅の計測ポイントである。C,F,I,L中の黄色の線は、計測した近心根の歯根を、また赤色・黄色矢印は歯槽骨を示す。

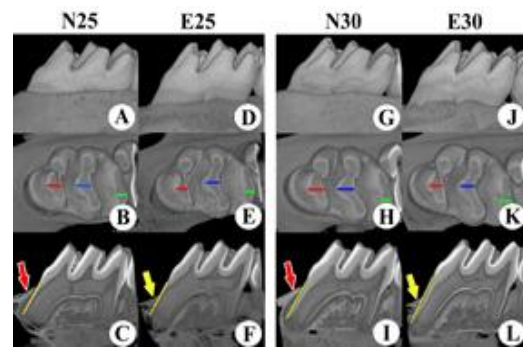


表1: 咬頭の幅の計測

	Mesial (μ m)	Middle (μ m)	Distal (μ m)
N25	529.3 \pm 13.6	525.9 \pm 9.5	389.5 \pm 6.3
E25	496.8 \pm 9.2**	472.4 \pm 10.7**	376.6 \pm 4.3*
N30	574.9 \pm 17.5 [†]	565.8 \pm 10.9 [†]	413.0 \pm 8.7 [†]
E30	499.7 \pm 9.5 ^{††}	484.8 \pm 8.4 ^{††}	379.6 \pm 4.8 ^{††}

* p<0.05 versus N25, ** p<0.01 versus N25.
[†] p<0.01 versus N25, ^{††} p<0.01 versus N30;
 Student's *t*-test.

表2: 近心根歯根長の計測

	Root length (μ m)
N25	1478.3 \pm 14.8
E25	1515.3 \pm 15.5*
N30	1725.7 \pm 19.3 [†]
E30	1898.7 \pm 24.7 ^{**††}

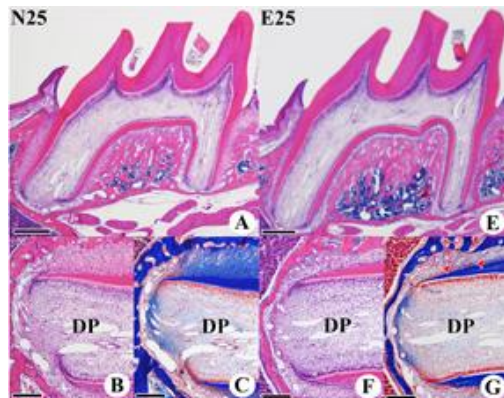
* $p < 0.05$ versus N25, ** $p < 0.01$ versus N30.
 † $p < 0.01$ versus N25. †† $p < 0.01$ versus E25;
 Student's *t*-test

表 2 より、コントロール群の方が実験群と比較して有意に咬頭の幅が大きかった。つまりコントロール群では咬耗量に有意な差があったといえる。表 3 より、歯根長の計測においても、実験群の方がコントロール群と比較して有意に歯根長が長いことが示された。

(2) 組織学的解析

図 2: 25 週齢ラットの上顎第一臼歯における、コントロール群(A)および実験群(E)の H-E 所見を示す。

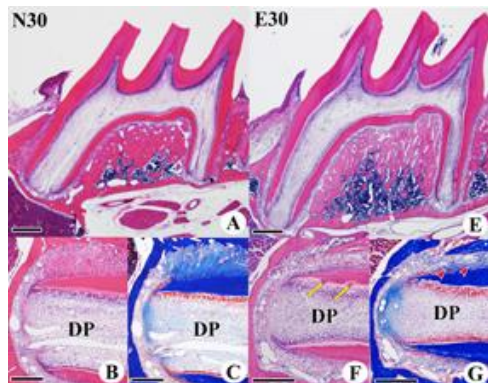
B, F はそれぞれ A, E の近心根根尖部の強拡大像、C, G はそれぞれ A, E の隣接切片における Azan 染色像を示す。



この次期には既に咬合が開始され、咬耗が見られる。E25 では歯冠部歯髓腔は広く、また歯根の伸長に伴って、根部歯髓腔は狭くなっている。実験群では未発達なシャープリー線維が見られる。

図 3: 30 週齢ラットの上顎第一臼歯における、コントロール群(A)および実験群(E)の H-E 所見を示す。

B, F はそれぞれ A, E の近心根根尖部の強拡大像、C, G はそれぞれ A, E の隣接切片における Azan 染色像を示す。



このじきでは歯根の長軸方向の成長はほぼ終了している。25 週齢と比較して、咬耗の程度が大きくなっている。μ-CT での所見と同じく、実験群歯根において明らかな歯根伸長が見られる。また、根尖部象牙質の一部形成異常様の像が見られる(黄色矢印)。シャープリー線維は 25 週齢時と同じく未発達な像を呈する(赤色矢頭)。

(3) 細胞増殖解析

図 4: 25 週齢ラットの上顎第一臼歯における、コントロール群(A)および実験群(C)の BrdU 免疫染色所見を示す。

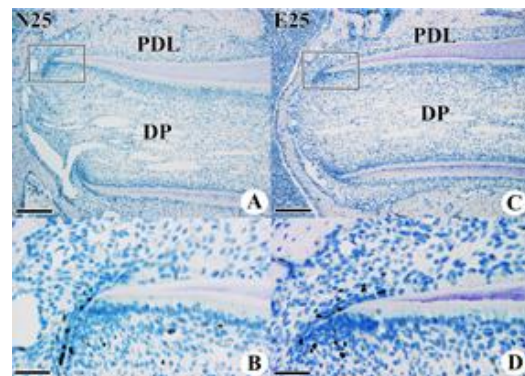


図 5: 30 週齢ラットの上顎第一臼歯における、コントロール群(A)および実験群(C)の BrdU 免疫染色所見を示す。

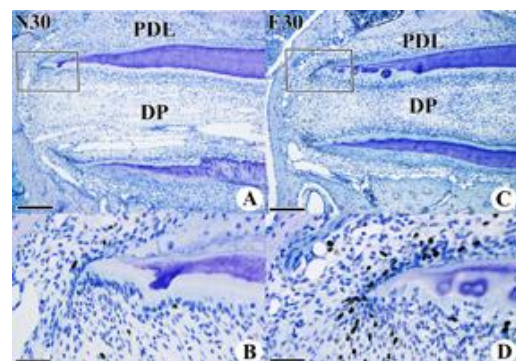


表 3: 歯根根尖部における増殖細胞数の計測

	Number of labeled cells/sections	Number of labeled cells/10 ⁵ μm ²
N25	56.0±8.4	9.1±1.1
E25	64.0±9.3	13.4±1.3
N30	20.8±3.6	4.2±0.6
E30	77.3±10.2	21.4±2.6 [†]

* $p < 0.01$ versus N25, ** $p < 0.01$ versus N30.

† p<0.01 versus E25; Student's *t*-test.

実験群の増殖細胞数はコントロール群に比較して、有意に多いことが示された。

〈まとめ〉

以上の結果より、ラット臼歯発生過程において、咬合を排除することにより、歯根根尖部での増殖細胞数は維持され、そのことが歯根伸長に重要であることが示唆された。

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 3 件)

1. Nakasone N, Ishida K, Yokoyama T, Okada M, Komatsu Y, Yoshie H. The change of HERS cell number and gene expression profile by occlusion during root development in rat molars. *Open J Stomatology* in press
2. Komatsu, Y, Morozumi T, Abe D, Okada M, Nakasone N, Okuda K, Yoshie H. Effects of Erbium-Doped: Yttrium Aluminum Garnet (Er: YAG) Laser on Bacteremia due to Scaling and Root Planing. *J Lasers Med Sci*, 3,175-184, 2012
3. Nakasone N and Yoshie H: Occlusion regulates tooth- root elongation during root development in rat molars. *Eur J Oral Sci*, 119, 418-426, 2011

[学会発表] (計 10 件)

1. Kubota T, Mauyama S, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Amyloid beta (A4) precursor protein expression in periodontitis-affected gingival tissues. The 98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U.S.A., Sep 29 - Oct 2, 2012.
2. Shimizu T, Kubota T, Iwasaki M, Morozumi T, Nakasone N, Yoshie H: Molecular biological factors in drug-induced gingival overgrowth. The

98th Annual Meeting American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology (Research Forum Poster Session), Los Angeles, U.S.A., Sep 29 - Oct 2, 2012

3. Kubota T, Maruyama D, Abe D, Shimizu T, Nakasone N, Morozumi T, Saku T, Yoshie H: Amyloid beta (A4) precursor protein expression in periodontitis-affected gingival tissues. EUROPERIO7 (Poster presentations), Vienna, Austria, June 6-9, 2012.
4. Abe D, Kubota T, Morozumi T, Nakasone N, Shimizu T, Yoshie H: Toll-like receptor (TLR) signaling pathway is upregulated in periodontitis-affected gingival tissues. EUROPERIO7 (Poster presentations), Vienna, Austria, June 6-9, 2012.
5. Tomita T, Kubota T, Nakasone N, Iiyama M, Morozumi T, Nagata M, Horimizu M, Nono K, Yoshie H: Gene and protein expression of TNF- α converting enzyme (TACE/ADAM17) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 in gingival tissues from periodontitis patients with drug-induced gingival overgrowth. EUROPERIO7, Vienne, Austria, Jun 4-6, 2012.
6. 中曽根 直弘、石田 光平、横山 智子、岡田 萌、小松 康高、吉江 弘正: ラット臼歯歯根発生過程における、咬合によるヘルトヴィッヒの上皮鞘細胞数の変化. 第 136 回春季日本歯科保存学会, 宜野湾, 2012.6.27-28.
7. Nakasone N and Yoshie H: Occlusion regulates tooth root elongation during root development in rat molars. 97th American Academy of Periodontology Annual Meeting, Miami Beach, Florida, Nov 12-15, 2011.
8. 小松 康高, 両角 俊哉, 小林 哲夫, 阿部 大輔, 岡田 萌, 奥田 一博, 中曽根 直弘, 吉江 弘正: Er: YAG レーザーによる SRP 治癒効果および菌血症予防効果の検討. 第 135 回秋季日本歯科保存学会, 大阪, 2011. 10. 20-21

研究者番号：

9. 富田 尊志, 久保田 健彦, 中曽根直弘 飯山 真奈美, 両角 俊哉, 永田 昌毅, 堀水 慎, 濃野 要, 吉江 弘正: TACE 及び TIMP-3 の炎症性歯肉組織中における遺伝子発現とタンパク質局在。第 54 回秋季日本歯周病学会, 歯周病学会会誌, 下関, 2011. 09.24
10. 中曽根 直弘, 吉江 弘正: ラット臼歯歯根発生過程における咬合の影響。第 54 回春季日本歯周病学会, 歯周病学会会誌, 博多, 2011. 05.27.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中曽根 直弘 (NAKASONE NAOHIRO)
新潟大学・医歯学総合病院・医員
研究者番号：20447634

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()