

ふりがな くらたてももこ
氏 名 鞍立 桃子
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第 113 号
学位授与の日付 平成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博 士 論 文 名

Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate

(Mineral trioxide aggregate による直接覆髄後の修復過程における nestin, osteopontin および増殖細胞の免疫組織化学的解析)

論文審査委員 主査 教 授 興地 隆史
 副査 教 授 大島 勇人
 教 授 前田 健康

博士論文の要旨

【緒言】

直接覆髄材として水酸化カルシウム製剤が長年用いられているが、近年 Mineral Trioxide Aggregate (MTA) が、それに代わる材料として注目されている。MTA はポルトランドセメントに類似した成分の材料であり、覆髄面に被蓋硬組織の形成による治癒を高率に誘導し、生体親和性や封鎖性にも優れるという報告がなされている。また、線維芽細胞や骨芽細胞を刺激し、osteopontin、osteocalcin、osteonectin 等の硬組織形成に関与するタンパクを誘導するともいわれているが、未だその硬組織形成のメカニズムは完全には解明されていない。そこで本研究では、MTA による直接覆髄後の修復過程の探究を目的として、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU)ラベリングによる増殖細胞の検索、ならびに象牙芽細胞に発現する中間径フィラメントである nestin、基質の石灰化に関与するといわれる非コラーゲン性タンパクの osteopontin の局在の経時的変動について、免疫組織化学的検索を行った。

【材料と方法】

実験動物として 20 頭の 8 週齢 Wistar 系雄性ラットを用いた。全身麻酔下で上顎左側第一臼歯を #1 ラウンドカーバイドバー (直径 0.8mm) で咬合面より露髄させ止血を施したのち、MTA による直接覆髄を行った。観察期間は術後 1 日、3 日、5 日、7 日、14 日とし、BrdU 腹腔内投与 2 時間後に 4 %パラホルムアルデヒドで灌流固定した。EDTA 脱灰後パラフィン切片を作製し、H-E 染色による組織学的観察ならびに、抗 BrdU、抗 nestin、抗 osteopontin 抗体による免疫染色を行い、光学顕微鏡で観察した。さらに、覆髄面直下の冠部歯髄における BrdU 陽性細胞数について統計学的解析 (一元配置分散分析) を行った。

【結果】

術後 1 日で覆髄部直下に変性層がみられ、その下層に軽度の炎症性細胞浸潤がみられた。5 日後では覆髄部直下に線維性基質形成が観察され、7 日後には薄い被蓋硬組織が形成された。14 日後では細管構造を示す象牙質様基質が認められた。

Nestin 陽性細胞は術後 3 日より変性層下に出現し、5 日後では線維性基質直下に配列するとともに、その下層にも分布していた。7 日、14 日後では被蓋硬組織直下に配列す

る象牙芽細胞様細胞が主として標識された。Osteopontin の反応は1日後から歯髄変性層直下に認められ、5日後では線維性基質表層に強い反応が確認された。7日、14日後では被蓋硬組織の表層に反応が認められた。BrdU 陽性細胞は3日後に変性層下層や血管周囲に多数出現し、以後減少した。3日後の陽性細胞数は他の時点と比較して有意に多数であった。

【考察】

今回の結果は、MTA が象牙質様基質による被蓋硬組織形成を高率に誘導することを追認するものであった。また、MTA で誘導される修復過程が、水酸化カルシウムによるものと基本的に同一であることが示された。これは、MTA の硬化過程で水酸化カルシウムが形成されることである程度説明されよう。しかしながら、MTA では、初期の炎症反応が水酸化カルシウムと比べて軽微と思われる。

BrdU ラベリングの結果から、術後3日をピークとして露髄部直下と血管周囲で細胞増殖活性が増大することが確認されたが、その時点で新しい線維性基質の形成は不明確であった BrdU で標識された細胞が新生象牙芽細胞様細胞に分化するか否かは今回の結果からは断定できないものの、これらの結果は先行研究と一致するものであった。

今回の結果から nestin が新生象牙芽細胞様細胞のマーカーとして有用であることが示唆された。また、特に術後3日、5日では典型的な新生象牙芽細胞様細胞以外にも陽性像がみられたが、この所見から、分化途上の前駆細胞も修復過程初期に nestin を発現することが推察される。

Osteopontin 陽性反応は、修復象牙質形成の起点と考えられる変性層と歯髄の境界で明瞭に観察された。従って、osteopontin が同部で、新生象牙芽細胞の前駆細胞の誘導、これらの分化の制御、マクロファージの集積誘導、石灰化硬組織形成にさきがけたカルシウムイオンの集積促進など、さまざまな役割を担っていることが推察される。

【結論】

MTA による直接覆髄後の修復過程では、その初期に歯髄表層に osteopontin が沈着したのち細胞増殖活性が亢進し、次いで nestin 陽性の新生象牙芽細胞様細胞が出現して被蓋硬組織形成が生じることが示された。これらの結果から、MTA に対する反応は歯髄が生来備える創傷治癒過程を主として反映したものであること、および osteopontin はその過程の発動に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

審査結果の要旨

Mineral trioxide aggregate (MTA)は、覆髄面に被蓋硬組織の形成による治癒を高率に誘導することから、水酸化カルシウムに代わる直接覆髄材として注目される新規生体材料である。しかしながら、本材料適用後に露髄部で営まれる組織修復機構には不明の点が残されている。本研究はこの点に着目し、MTA による直接覆髄後の新生硬組織形成過程で営まれる細胞・分子機構の探究を目的として実施されたものである。

本研究では、8週齢 Wistar 系雄性ラットの上顎左側第一臼歯を切削・露髄させ、MTA による直接覆髄を施したのち、覆髄部における1, 3, 5, 7, 14日後の組織反応が免疫組織化学的に検索されている。すなわち、象牙芽細胞の分化マーカーの一つである nestin および硬組織関連タンパクである osteopontin の免疫局在性の観察、ならびに BrdU 標識法による増殖細胞の検索が行われている。

その結果、術後1日では適用部直下に変性層と軽度の炎症性変化が観察されているものの、以後線維性基質形成に引き続き、14日後には全例で細管構造を示す新生被蓋硬組織の形成を認めている。一方 nestin 陽性細胞は術後3日より変性層下に出現を確認するとともに、5日後ではこれらが線維性基質直下に配列すること、さらに7・14日後では被蓋硬組織直下に配列する象牙芽細胞様細胞が nestin で標識されることを明確に示している。さらに osteopontin の免疫活性の局在については、1日後すでに歯髄変性層直下に明瞭に証明しており、5日後では線維性基質表層に、また、14日後では被蓋硬組織の表層に確認している。BrdU 陽性細胞が変性層下層や血管周囲を中心に、3日後をピークとする有意な増加を示すことも示している。

以上の結果は、MTA が被蓋硬組織形成を高率に誘導することを確認するものである。さらに、MTA 適用後の硬組織形成過程では、水酸化カルシウム覆髄後と同様に細胞増殖活性の亢進に引き続き前駆細胞の新生象牙芽細胞様細胞への分化が生じることを明らかにしているのみならず、MTA に対する組織反応の重要な特徴として、適用部直下での変性・壊死や初期の炎症反応が水酸化カルシウムと比べて軽微であることを明確に示唆している。さらに本研究は、nestin に対する免疫反応性の観察から、前駆細胞が新生象牙芽細胞様細胞に分化を示す過程での形態・局在の経時的変動を明瞭に示している。これらに加えて、osteopontin が新生硬組織形成の起点と考えられる変性層・歯髄境界部で、覆髄直後より著明に局在するという新規性の高い知見を提示している。

以上のように、本研究は MTA による直接覆髄後の硬組織形成過程で営まれる新生象牙芽細胞様細胞の分化過程を明瞭に示しているのみならず、osteopontin の歯髄創傷治癒過程への関与という新たな研究領域の端緒というべき知見を提示しており、学位論文としての価値を認める。