

氏名	田中容子
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯) 第14号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
博士論文名	Histochemical and immunocytochemical study on hard tissue formation in the dental pulp during the healing process after tooth replantation in rat molars (ラット臼歯再植後の治癒過程における歯髄内硬組織形成メカニズムの酵素組織化学的・免疫組織化学的検索)
論文審査委員	主査 教授 大島 勇 人 副査 教授 高木 律 男 教授 齊藤 力

#### 博士論文の要旨

象牙質・歯髄複合体は損傷に対する修復能力をもっており、う蝕、咬耗・摩耗、歯の切削などにより歯が損傷を受けると第三象牙質を形成して防御に働くが、歯の再植後にも同様な防御機構が働くことが知られている。歯の再植とは、意図的、もしくは外傷により偶発的に歯が歯槽窩から脱落してしまった場合、歯をもう一度もとの歯槽窩(抜歯窩)に戻す処置である。歯の再植は歯科臨床で一般的に行われている処置法であるにもかかわらず、その後に歯髄でどのような変化が起こっているのかについての理解や歯の再植後の治癒を左右する歯髄の重要性についての認識は乏しい。これまでの研究により、歯の再植後には、歯髄腔内に第三象牙質が形成されることに加え、骨組織が形成されることが知られている。しかしながら、歯の再植後の歯髄治癒過程を規定するメカニズムについては明らかになっていない。

そこで、本研究は、硬組織形成細胞のマーカーとしてアルカリ性フォスファターゼ(ALP)酵素組織化学、破骨細胞系細胞のマーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ(TRAP)酵素組織化学ならびにカテプシン K 免疫組織化学、象牙芽細胞の分化マーカーとしてストレスタンパク質 Heat Shock Protein (HSP)-25 免疫組織化学を用いて歯の再植後の歯髄の治癒過程を検索した。また、切片作製前にマイクロCTを用いて歯髄の治癒パターンをスクリーニングした。

材料として4週齢 Wistar 系ラットを用い、右側上顎第一臼歯を深麻酔下にて抜歯後ただちに再植し、無処置の左側上顎第一臼歯を対照群とした。再植後 1、3、5、7、10、12、14、28、60 日に深麻酔下で灌流固定後、マイクロCTにより歯髄内硬組織形成の有無を観察した。引き続き EDTA にて脱灰後、凍結切片を作製し、抗 HSP-25 抗体、抗カテプシン K (CK) 抗体を用いた免疫染色、ALP・TRAP 二重染色を施した。CK 免疫染色をした試料の一部は後固定・脱水後樹脂包埋し、透過電顕にて観察した。

マイクロCT観察により、再植歯の歯髄内硬組織形成過程や周囲組織の変化をスクリーニングできることが明らかとなった。再植後12日以降には、歯髄内に形成される硬組織として第三象牙質と骨組織を区別することができ、歯根吸収も明瞭に確認することができた。

酵素組織化学ならびに免疫組織化学的検索により、再植後の歯髄治癒過程で HSP-25、ALP、TRAP、CK の発現パターンがダイナミックに変化することが明らかとなった。対照群では、歯冠部象牙芽細胞が HSP-25 および ALP 強陽性を示し、歯髄内には TRAP および CK 陽性反応は認められなかった。再植後 1～3 日では、歯髄での HSP-25 および ALP 陽性反応が減弱し、5～10 日で根尖側から歯冠歯髄にかけて HSP-25 および ALP 陽性反応が回復し、その後第三象牙質形成が観察された。一方、HSP-25 および ALP 陽性反応が回復しない場合には、再植後 5 日以降に歯髄内に多数の TRAP および CK 陽性の単核および多核の破骨細胞系細胞が出現し、象牙質・歯髄界面にもこれらの細胞が集積し、象牙細管内へ細胞突起を伸ばしていた。再植後 12～60 日には歯髄腔内に骨組織形成が認められ、TRAP および CK 陽性細胞は骨表面に残存した。透過電顕による観察により、CK 陽性破骨細胞系細胞が核小体の明瞭な細胞内小器官の発達した間葉細胞と直接接触していることが明らかとなった。また、ANOVA 検索により再植時間と再植後の歯根吸収との間に統計学的な有意差が認められた。

近年の骨代謝研究において、破骨細胞の分化と機能発現が骨芽細胞／間質細胞による OPG、RANKL、M-CSF により調節されていることが明らかになっており、骨芽細胞／間質細胞と破骨細胞前駆細胞との直接接触が破骨細胞分化に必須であることが知られている。本研究において、歯髄腔内に TRAP および CK 陽性の破骨細胞系細胞と歯髄内間葉細胞との直接接触は、再植後の歯髄内における破骨細胞分化と骨組織形成過程に起こるイベントであると考えられた。一方、第三象牙質形成が起こる場合には歯髄内には破骨細胞系細胞は出現せず、象牙芽細胞もしくは象牙芽細胞に分化すると考えられている神経堤由来細胞による歯髄内における破骨細胞および骨芽細胞への分化を抑制する何らかのメカニズムが働いていることが推察された。最近の研究で歯髄細胞が OPG、RANKL、M-CSF などの破骨細胞分化調節因子を発現していることが明らかになっており、歯髄内には骨代謝を抑制するメカニズムが存在することが報告されており、この事実も我々の仮説を支持するものと思われる。

以上より、歯の再植後に歯髄内に TRAP および CK 陽性の破骨細胞系細胞が出現することが歯髄内骨組織形成の起点となることが明らかとなった。

## 審査結果の要旨

歯の再植とは、意図的、もしくは外傷により偶発的に歯が歯槽窩から脱落してしまった場合、歯をもう一度もとの歯槽窩（抜歯窩）に戻す処置である。歯の再植は歯科臨床で一般的に行われている処置法であるにもかかわらず、その後に歯髄でどのような変化が起こっているのかについての理解や歯の再植後の治癒を左右する歯髄の重要性についての認識は乏しいように思われる。歯の移植後に抜髄を余儀なくされることは、歯髄炎に起因する炎症性歯根吸収や置換性歯根吸収（アンキローシス）を未然に防ぐためであるが、根尖孔の開いた幼弱な歯であれば血行と神経が回復し、歯の再植後に歯髄が再生することが報告されている。歯の再植後の歯髄や歯周組織の治癒過程は歯が受ける損傷程度によりさまざまであるが、再植時には根尖（もしくは髄床底に存在する髄管）で血管と神経が切断されるため、健全な歯を再植したとしても歯髄は低酸素状態に陥り、歯髄細胞は大きなダメージを受けることになる。本研究はラットを用いた歯の再植実験モデルにおける歯髄治癒過程を酵素組織化学的・免疫細胞化学的に検索し、歯の再植後の歯髄内硬組織形成メカニズムの解明に重要な示唆を提供している。

歯の再植後の歯髄治癒過程を考える場合に重要なことは、「再植後に象牙芽細胞がどうなるか」ということである。歯の再植後の歯髄では、根尖で神経と血管が切断されるので、歯髄内の血行が遮断されることになる。血行の遮断は歯髄細胞への酸素供給が低下し、象牙芽細胞は酸素不足で死んでいくことになる。低酸素状態を強いられた象牙芽細胞が生き残るか否かは血行回復までの時間にかかっていると思われるが、影響を与える因子として抜歯から歯の再植までにかかった時間や歯髄の機械的な傷害程度が考えられる。本研究では再植時間と再植歯の歯根吸収の関係を検索し両者に相関があることを明らかにした。

ラットを用いた動物実験モデルにより歯の再植後の歯髄治癒過程を検索すると、歯髄内に第三象牙質が形成される場合と歯髄が骨組織に置換する場合があり、後者の治癒経過を辿る場合が多い。これまで両者の治癒機転を規定するメカニズムは明らかになっていないが、歯髄内硬組織を造る細胞の由来と分化能、細胞の分化に影響を与える局所の微小環境が重要になる。微小環境は、象牙質や歯髄結合組織内のコラーゲン線維などの細胞外基質に加え、細胞によって分泌されるシグナルによって規定されると考えられる。本研究では、歯髄内硬組織形成パターンの解析にマイクロ CT を応用し、試料作製前に歯髄治癒パターンをスクリーニングできることを明らかにしている。本研究の最も重要な所見は、歯髄内に第三象牙質が形成される場合には出現することのない破骨細胞系細胞が骨形成群の歯髄内に出現することである。破骨細胞系細胞のマーカーとして酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学、カテプシン K (CK) 免疫組織化学に加え、CK 免疫電顕的観察を行い、歯の再植後 5～7 日後に破骨細胞系細胞が歯髄内に出現し、あるものは象牙細管内に細胞突起を伸ばすことを明らかにしている。さらに、核小体の明瞭な細胞内小器官の発達した骨芽細胞に分化すると考えられる間葉細胞と破骨系細胞が直接接触することを明らかにしている。これまでの研究により破骨細胞の分化と機能発現が骨芽細胞/間質細胞による OPG、RANKL、M-CSF により調節されていることが明らかになっており、骨芽細胞/間質細胞と破骨細胞前駆細胞との直接接触が破骨細胞分化に必須であることが知られている。本研究において、歯髄腔内に TRAP および CK 陽性の破骨細胞系細胞と歯髄内間葉細胞との直接接触は、再植後の歯髄内における破骨細胞分化と骨組織形成過程に起こるイベントであることが明らかとなった。

歯の再植後の歯髄におけるストレスタンパク質 HSP-25 免疫反応をみてみると、HSP-25 強陽性の象牙芽細胞は再植後の血行の遮断により、1 日後には HSP-25 を失い、血行が回復する再植 5 日後までに、複数の突起をもつ HSP-25 強陽性の象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列し、その後多量の第三象牙質形成が見られた。また、硬組織形成細胞のマーカーであるアルカリ性フォスファターゼ活性が HSP-25 発現と同じパターンをとるのは興味深い。

炎症性細胞のマーカーを用いて歯の再植後の歯髄における治癒過程を観察すると、歯髄内に炎症反応が停滞すると骨形成が惹起され、歯髄が骨組織に置換したものは、歯根吸収やアンキローシスを起こしやすい。標本によっては、歯冠部を除き、歯が周囲の歯槽骨と一体化したものも観察される。一方、歯髄内に象牙質が形成される場合は、象牙質の部分的吸収を受けたとしてもアンキローシスを起こすことはない。また、乳歯の歯根吸収メカニズムについても十分にわかっていないが、乳歯が歯根吸収を受ける前には象牙芽細胞が消失してしまうことを考え合わせると、『単なる象牙質を形成する細胞という以外に象牙芽細胞の歯髄内における存在自体が何らかの重要な意味を持つ』と考えられる。

最近の歯髄生物学の分野では、歯髄には少なくとも二つの異なる由来をもつ細胞が存在すると考えられている。それは、歯髄には神経堤由来細胞に加え、もともと

歯胚形成部位に存在していた中胚葉由来細胞も存在するという考えである。この考えに従えば、歯髄は象牙芽細胞に分化する能力のある神経堤由来細胞と骨形成能をもつ中胚葉由来細胞のハイブリッドな組織であると言える。本研究の歯の再植の場合は、歯髄が広範な損傷を受けるために象牙芽細胞と骨芽細胞に分化する能力のある二つの細胞群のバランス、もしくは両者の分化をコントロールしているシグナルのバランスがくずれ、場合によっては歯髄が完全に骨に置換してしまう場合も起こりうると考えられる。それに対して正常歯髄では、骨芽細胞への分化を抑制する何らかのメカニズムが働いている可能性を示している。

以上より、本研究は、卓越した形態学的な手法を用いて歯の再植後の歯髄治癒パターンを酵素組織化学的・免疫細胞化学的に解明しており、歯の再植後の歯髄治癒パターンを規定しているメカニズムを解明する糸口を提供しており、学位論文としての価値を認める。