

氏名 川岸 恵理子
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第51号
学位授与の日付 平成18年3月23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 Pulpal responses to cavity preparation in aged rat molars
(高齢ラット臼歯窩洞形成後の歯髄反応)

論文審査委員 主査 教授 大島 勇 人
副査 教授 興地 隆 史
教授 野村 修 一

博士論文の要旨

I. 目的

歯髄は高い修復能力を有しており、咬耗・磨耗・齶蝕や窩洞形成等の歯の損傷に対して、第三象牙質を形成し外界の刺激から自身を防衛することが知られている。これまでに我々は、100日齢ラット臼歯窩洞形成モデルを用いて歯の損傷後の歯髄修復過程を明らかにしている。すなわち、象牙質の切削後に損傷を受けた象牙芽細胞は層構造を失いバラバラになり6時間後にマクロファージに処理され、12時間後には抗原提示細胞が歯髄・象牙質界面に一過性に現れ、その細胞突起を象牙細管に伸ばす。3日後になると新たに分化した象牙芽細胞が歯髄・象牙質界面に配列し、抗原提示細胞は象牙芽細胞下層に移動する。さらにストレスタンパク質 heat shock protein (HSP)-25 の発現パターンが象牙芽細胞の変性・再生過程を反映していることが明らかになっている。しかしながら、加齢に伴う歯の損傷に対する歯髄反応ならびに歯髄免疫防御機構の変化については不明な点が多い。

そこで本研究では、歯髄免疫防御機構の加齢変化を明らかにするために、これまでに明らかにしてきた成獣ラットの所見と比較して、高齢ラットでの歯牙切削に対する歯髄の反応性について免疫組織化学的に検索した。

II. 方法

実験動物として生後300～360日齢 Wistar 系ラットを用いた。上顎左側第一臼歯近心面にエアタービンにて注水下でグループ状に窩洞形成を施した。窩底部残存象牙質の厚みを150～200 μ mとし、仮封等の処置は行わず開放状態とした。尚、無処置の右側第一臼歯を対照群とした。窩洞形成直後、6、12、24時間、3、5日後にアルデヒド系固定液にて灌流固定、EDTA 脱灰後、凍結およびパラフィン切片を作製した。象牙芽細胞の分化マーカーとして抗 HSP-25 ポリクローナル抗体および抗 nestin モノクローナル抗体、抗原提示細胞のマーカーとして OX6 モノクローナル抗体を用い、ABC 法にて免疫組織化学染色を行った。また、一部の試料は、HSP-25 免疫染色後、オスミウム後固定、脱水、樹脂

包埋後、準超薄・超薄切片を作製し、光顕、電顕にて観察した。一方、歯髄周辺部の OX6 陽性細胞分布密度を比較するために 100 日齢ラット第一臼歯の OX6 免疫染色標本を作製した。

III. 結果と考察

高齢ラットでは、象牙芽細胞が HSP-25 免疫強陽性を示したが、髄角における第三象牙質形成、咬頭間領域や髄床底部における第二象牙質形成により歯髄腔が狭窄していた。さらに、歯髄周辺部の OX6 陽性細胞密度が有意に増加し、象牙前質にも存在していた。

窩洞形成を行うと、高齢ラットでは2つの異なる反応 (severe damage、 mild damage) が観察された。すなわち、前者の反応では、成獣ラットと同様に、窩洞形成直後に象牙芽細胞が損傷を受け、12 時間後には抗原提示細胞が一過性に歯髄・象牙質界面に出現し、細胞突起を象牙細管内へ伸ばしていた。24 時間後には歯髄・象牙質界面より HSP-25 陽性の象牙芽細胞が消失したが、3日後には歯髄・象牙質界面に HSP-25 陽性の再生象牙芽細胞が配列した。しかし、成獣ラットに比べ浸出性変化は少なく歯髄での炎症反応が穏やかだった。一方後者の反応では、窩洞形成 6~24 時間後において損傷部位の HSP-25 強陽性象牙芽細胞が層構造を維持していた。しかし、12 時間後には前者の反応と同様に抗原提示細胞が一過性に歯髄・象牙質界面に出現し、細胞突起を象牙細管内へ伸ばしていた。同部位を透過電顕にて観察すると、損傷部位の象牙細管が空になっているものもみられ、樹状細胞や好中球が空の細管に侵入していた。このことは、象牙芽細胞によっては損傷を受けずに生き残る細胞がいることを示唆しており、細胞によって象牙細管もしくは細胞突起の状態が異なることが推測された。

興味深いことに、高齢ラットの歯髄内では、歯髄周辺部で抗原提示細胞密度が増加し、同細胞が象牙前質にも存在していた。ヒトの歯でも同様の現象がみられ、抗原提示細胞が複数の象牙芽細胞突起とコンタクトしており、象牙芽細胞の恒常性への関与が推測されている。今後、電顕レベルで抗原提示細胞と象牙芽細胞突起の関係を明らかにする必要がある。

以上の結果より、高齢ラットにおいて歯髄防御・修復機能が保持されていることが明らかとなったが、窩洞形成後の象牙芽細胞の反応性に違いが観察された。このことにより、高齢ラットでは個体により象牙芽細胞の突起もしくは細管内の状態が異なることが予想され、この違いが窩洞形成後の歯髄反応の多様性を引き起こしていると考えられた。

審査結果の要旨

歯髄は歯に栄養や知覚を与えているばかりでなく、高い防御機能を付与しており、この高い防御機能により象牙質・歯髄複合体は歯の損傷に対して第三象牙質を形成して外的刺激から歯髄を防御している。歯の損傷後の歯髄防御機構について、近年歯髄免疫担当細胞、とりわけ歯髄樹状細胞が重要な役割をすることが明らかになっている。樹状細胞は細胞膜にクラス II 主要組織適合性抗原 (MHC) をもち T リンパ球に抗原提示する初期免疫応答に重要な役割を果たしている細胞である。歯の切削後には損傷を受けた象牙芽細胞は変性し、その後新たな象牙芽細胞が分化するが、その歯髄治癒過程に樹状細胞が一過性に出現することが明らかになっている。

象牙質・歯髄複合体は、象牙質透過性の低下、歯髄腔の狭窄、知覚の低下などの加齢変化を受けることが知られている。しかしながら、歯の損傷後の歯髄防御機能の加齢変化についてはほとんど分かっていない。本研究は、歯髄防御機能の加齢変

化を明らかにすることを目的に、象牙芽細胞の分化マーカーとして抗ストレスタンパク質 HSP-25 抗体と抗ネスチン抗体、樹状細胞のマーカーとして OX6 抗体を用いて、加齢ラットにおける歯の切削後の歯髄反応を免疫組織化学的、微細構造学的に検索している。

本研究によって、歯の切削後の歯髄防御機能が加齢ラットにおいても保持されていることが明らかになり、成獣ラットにおいて見られた象牙芽細胞の変性、歯髄樹状細胞の出現、象牙芽細胞の再生の過程が加齢ラットにおいても観察された。さらに、興味深いことに、歯の切削後の歯髄治癒過程に二つのパターンがあることが明らかになった。成獣ラットにおいて観察されるパターンに加え、光学顕微鏡レベルで明らかな象牙芽細胞層の損傷が確認できないパターンが出現した。電子顕微鏡による観察により、光顕レベルで損傷がないように見えても、損傷を受けて変性している象牙芽細胞が存在することも確認できた。象牙質・歯髄複合体の反応性は象牙細管中を走行する象牙芽細胞突起の存在によって規定されると考えられている。象牙細管中の象牙芽細胞突起がどこまで伸びているかという事は、標本作成中のアーチファクトの問題や突起の存在の証明方法の難しさから現在でも未解決な問題である。本研究の実験系において、象牙質の厚みの半分の切削により二つのパターンの歯髄反応が見られたことは、加齢により象牙芽細胞突起もしくは象牙細管の状態が個体により異なることが予想されたが、今後象牙芽細胞突起の状態の加齢変化を明らかにする必要がある。

さらに、歯髄の加齢変化として、過去に報告されている咬耗による第三象牙質形成、第二象牙質形成による歯髄腔の狭窄、セメント質沈着などが確認できたが、今回象牙芽細胞分化マーカーを用いることにより、部位における象牙芽細胞層の違いが明らかになった。窩洞形成を行った歯冠部象牙芽細胞層は成獣ラットと同じ状態を維持していたが、髓床部では象牙芽細胞層が連続性を失い、象牙芽細胞下層の消失が起こることが明らかとなった。象牙芽細胞下層は新たな象牙芽細胞へ分化する能力のある歯髄幹細胞が存在すると考えられており、加齢にしたがって部位によりその分布パターンが変化することが予想され、今後の歯髄再生療法を考える上でも興味深い現象である。

以上より、本研究は、卓越した形態学的な手法を用いて加齢ラットにおける歯の切削後の歯髄治癒過程を免疫細胞化学的に解明しており、歯の切削後の歯髄防御機構の加齢変化を明らかにした点で、学位論文としての価値を認める。