

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 QUISPE SALCEDO ANGELA
学位 博士(歯学)
学位記番号 新大院博(歯)第313号
学位授与の日付 平成26年9月22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 response to a triple antibiotic solution following intentionally delayed tooth replantation in mice**
(マウス意図的歯の遅延再植後の三種抗菌性薬剤に対する歯髄反応)
論文審査委員 主査 大島 勇人 教授
副査 興地 隆史 教授
副査 朔 敬 教授

博士論文の要旨

Ciprofloxacin、Metronidazole、Minocycline 三種混合薬剤 (3Mix) は、*in vitro* および *in vivo* におけるう蝕や根管病変の口腔内細菌に対して効果的であることが報告されてきた。しかしながら、外傷歯の治療への3Mixの応用については殆ど報告がない。歯の脱臼は歯槽窩からの歯の完全な脱離であり、結果として付着の損傷と歯髄壊死が惹起される。歯の再植は、脱臼歯を歯槽窩へ戻す処置であり、少なくとも象牙質及び/または骨組織形成という二種類の歯髄治癒パターンが知られている。実験動物やヒトを用いた研究により、歯の再植後に歯髄が再生することが報告されているが、炎症反応が遅延すると骨組織形成が起こる。歯髄腔内に骨組織形成が惹起されると歯根アンキローシスが容易に起こることから、再植歯の歯髄治癒パターンをコントロールすることは临床上重要である。再植後の歯髄治癒パターンの決定は、象牙芽細胞系細胞の死や生存と密接に関係しており、適切な酸素環境はこれらの細胞の生存の決定因子になる。意図的歯の遅延再植は象牙芽細胞系細胞の死を誘導する。さらに咬合性外傷も歯髄再生に悪影響を及ぼし、歯根表面の細菌の存在は歯根膜の適切な治癒に影響を及ぼす様である。したがって、歯槽窩の血餅に付随する細菌同様、歯根表面の細菌を制限することは再植歯の治癒に極めて重要である。本研究は、「マウス意図的歯の遅延再植後の三種抗菌性薬剤に対する歯髄反応」を3報に分けて解析し、外傷歯の治療への3Mixの応用の基盤となる生物学的知見を提供することを目的とした。

分化した象牙芽細胞は唯一の表現型マーカーによって同定できないが、象牙質リンタンパク質 (Dpp)、象牙質シアロタンパク質 (Dsp)、象牙質基質タンパク質 1 (Dmp1)、ネスチンがこれらの細胞の評価に利用できるかもしれない。しかしながら、これらのタンパク質の象牙芽細胞分化マーカーとしての有用性は意見の分かれるところである。第1報においては、外傷歯の歯髄再生を評価するために必要な象牙芽細胞分化マーカーについて検証した。ICRマウスを用いて生後3週齢切歯と生後1~8週の臼歯におけるネスチン、Dspタンパク質、Dsp mRNA 発現を免疫組織化学・*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。切歯・臼歯共に、前象牙芽細胞はネスチン、Dspタンパク質、Dsp mRNA の発現を開始し、象牙芽細胞分化過程に従い発現が増強した。ネスチンは象牙質基質沈着が完了した後も分化した象牙芽細胞に持続して発現した。Dsp mRNA 発現は象牙質基質沈着のための象牙芽細胞の分泌活性と一致していた。一方、Dspタンパク質については、分化した象牙芽細胞に加え、他の歯髄細胞、象牙前質、象牙細管も陽性反応を示した。結論として、ネスチンタンパク質は象牙芽細胞分化マーカーとして、Dsp mRNA は象牙芽細胞の分泌活性の機能的マーカーとして有用であることが明らかになった。

第2報では、意図的歯の遅延再植への3Mixの応用のためのマウスを用いた動物実験モデルを確立し、歯

髓および歯周組織の治癒過程に及ぼす 3Mix の効果を研究することを目的とした。ICR マウス上顎第一臼歯を抜去後、5～60 分間リン酸緩衝液 (PBS) または異なる濃度の 3Mix 溶液に浸漬した後に PBS で清浄または洗浄せずに、抜歯窩に再植した。術後 7～21 日後に動物を固定し、ネスチン及び Ki-67 免疫組織化学、TRAP 酵素組織化学、TUNEL 評価を行った。PBS 群では、術後 1 週でアポトーシスが增加し、引き続き術後 2 週で細胞増殖、術後 3 週で第三象牙質及び/または骨組織形成が観察された。一方、3Mix 群では、術後 1～2 週でアポトーシスと細胞増殖に引き続き歯髄・象牙質界面にネスチン陽性の新たに分化した象牙芽細胞様細胞が遷列を開始し、歯髄治癒が促進された。また、3Mix 群では、重篤な歯根アンキローシスが観察されたが、再植前に PBS で洗浄することで歯根膜の生存性をレスキューしたが、歯髄治癒は遅延した。以上、3Mix の応用は意図的遅延再植歯の歯髄再生を促進するが、その使用は歯周組織に重篤なダメージを誘導することがある。

第 3 報では、意図的歯の遅延再植後の 3Mix の応用によって引き起こされる歯髄のダイナミクスの背後にある詳細な生物学的なイベントを分子レベルで解析した。ICR マウス上顎第一臼歯を抜去後 30 分 3Mix 溶液または PBS に浸漬後抜歯窩に再植した。術後 0～14 日の抜去/再植歯について、細胞増殖・アポトーシス・分化を免疫組織化学・RT-PCR 法を用いて解析した。3Mix 溶液は分化を促進し、術後 7 日で象牙芽細胞様細胞分化、14 日で第三象牙質形成が起こったが、PBS 群では再生過程が遅延した。3Mix 群では術後 5～7 日で細胞増殖とアポトーシスが亢進し、術後 7～14 日で減少した。術後 5 日で、3Mix 群では象牙質シアロリタンパク質 (*Dsp*) とネスチンが最初に回復したが、PBS 群ではアルカリ性フォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンの発現レベルが亢進した。*Oct3/4A* と *3/4B* の発現レベルは術後 1 日で最大になり、3Mix グループでの *Cd11c* の最大発現レベルは術後 1 日で最初に観察され、その後術後 5～7 日に観察された。本結果は、3Mix の応用が損傷部位への樹状細胞の遊走と幹細胞/前駆細胞の活性化により骨芽細胞分化を抑制し、結果として象牙芽細胞様細胞分化を促進することを示唆している。

審査結果の要旨

本博士論文は「マウス意図的歯の遅延再植後の三種抗菌性薬剤に対する歯髄反応」を 3 報に分けて解析し、外傷歯の治療への 3Mix の応用の基盤となる生物学的知見を提供している。

第 1 報においては、象牙芽細胞の分化マーカーの検証を行っている。歯髄生物学研究において、研究結果の正しい評価のために適切な象牙芽細胞分化マーカーの利用が求められる。これまで、象牙芽細胞分化マーカーとして *Dsp* タンパク質が広く用いられてきたが、象牙芽細胞以外の歯髄細胞や骨芽細胞が陽性反応を示すため、*Dpp* や *Dmp1* 等他の象牙芽細胞分化マーカーとの併用が必要であった。しかしながら、各分化マーカーの有用性の適切な検証が行われていないのが現状であった。本研究では、常生歯であるマウス切歯と有根歯であるマウス臼歯発生過程における象牙芽細胞分化マーカー発現について、著者らの研究グループで利用してきたネスチンタンパク質と *Dsp* タンパク質、*Dsp* mRNA の発現パターンを比較検討した。蛍光二重染色や発生過程における細胞分化過程での詳細な発現パターンの解析により、ネスチンタンパク質発現が象牙芽細胞分化マーカーとして、*Dsp* mRNA 発現が象牙芽細胞の分泌機能マーカーとして有用であることが示された。一方、*Dsp* タンパク質発現は、発生過程に進行に伴って象牙芽細胞以外の歯髄細胞や基質にも陽性反応が認められるようになり、象牙芽細胞分化マーカーとしての利用には注意が必要であることが明らかになった。さらに本研究では、上記マーカーを用いて象牙芽細胞の分類を行っている。象牙芽細胞の分化過程に伴った名称については研究者により異なる用語が用いられていたが、今回上記 3 つのマーカーを併用することで、幼若象牙芽細胞、成熟象牙芽細胞、休止期象牙芽細胞と明確なステージ分けを可能にしたことは特筆に値する。

第 2 報においては、意図的歯の遅延再植への 3Mix の応用のためのマウスを用いた動物実験モデルを確立し、歯髄および歯周組織の治癒過程に及ぼす 3Mix の効果を明らかにした。歯の再植は、外傷に伴う歯の完全脱臼後や意図的に行われる治療法である。著者らの研究グループはこれまで、マウスを用いた歯の再植動物実験モデルを確立しており、意図的な遅延再植が歯髄治癒過程に及ぼす影響を検証している。歯の脱臼が

ら再植までの時間の遅延は歯髄の治癒パターンにも影響を与え、歯髄内に容易に骨組織形成を惹起することから、マウスを用いた意図的な遅延再植実験モデルは臨床を想定したモデルとなりうる。著者らはこのモデルに 3Mix を応用した実験を立案し、特に歯髄治癒パターンへの影響を様々な条件で検証している。意図的遅延再植歯への適切な条件の 3Mix の応用により、歯髄治癒が促進されることが明らかになった。一方で、3Mix 群では重篤な歯根アンキローシスが観察され、再植前に PBS で洗浄することで歯根膜の生存性をレスキューしたが、歯髄治癒は遅延した。以上より、3Mix の応用は意図的遅延再植歯の歯髄再生を促進するが、その使用は歯周組織に重篤なダメージを誘導することがあることが明らかになり、再植歯への 3Mix の応用には解決すべき課題が残されている。しかしながら、3Mix の応用で歯髄治癒が促進される事実は外傷歯の歯髄保存療法を考える上で非常に興味深い事実である。

第 3 報においては、意図的歯の遅延再植後の 3Mix の応用によって引き起こされる歯髄のダイナミクスの背後にある詳細な生物学的なイベントを分子レベルで明らかにした。本研究により、3Mix の応用により、歯髄アポトーシスと増殖活性、象牙芽細胞分化マーカー発現が早期に起こり歯髄治癒が促進され、第三象牙質形成を促進されることが明らかになった。対照群では、アルカリ性フォスファターゼ、オステオポンチン、オステオカルシンの発現レベルが亢進し、歯髄の治癒が骨組織形成に傾いているのに対し、3Mix の応用で象牙質形成にシフトしている事実は興味深い。*Oct3/4A* と *3/4B* の発現レベルは術後 1 日で最大になり、3Mix 群での *Cd11c* の最大発現レベルは術後 1 日で最初に観察され、その後術後 5~7 日に観察されたことにより、3Mix の応用が損傷部位への樹状細胞の遊走と幹細胞/前駆細胞の活性化により骨芽細胞分化を抑制し、結果として象牙芽細胞様細胞分化を促進する可能性が示された。

本博士論文「マウス意図的歯の遅延再植後の三種抗菌性薬剤に対する歯髄反応」は、再現性の高いマウス動物実験を用い、形態学的・分子生物学的手法を用いて、外傷歯の治療への 3Mix の応用の基盤となる生物学的知見を提供しており、将来の臨床応用を見据えたオーラルバイオサイエンスへの貢献度が極めて高いので、学位論文としての価値を認める。