

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 武井 絵梨花  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第316号  
学位授与の日付 平成27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 Initial Transient Accumulation of M2 Macrophage-associated Molecule-expressing Cells after Pulpotomy with Mineral Trioxide Aggregate in Rat Molars  
(Mineral Trioxide Aggregate を用いた生活歯髄後のラット臼歯歯髄の反応: M2 マクロファージ関連分子陽性細胞の一過性集積)

論文審査委員 主査 大島 勇人 教授  
副査 朔 敬 教授  
副査 吉羽 邦彦 准教授

### 博士論文の要旨

#### 【目的】

近年、活性化マクロファージに受容体の発現やサイトカイン産生パターンなどの異なる二種の亜群が存在し、機能に応じて生体防御修復機構に関与することが注目されている。古典的活性化 (M1)マクロファージは、微生物感染時に活性化し、炎症反応を促進するサイトカインを産生する。それに対して、組織修復等に関与する創傷台癒 (M2) マクロファージは、炎症反応の調節、組織修復や創傷台癒への関与が報告されている。

本研究では、歯髄創傷台癒過程におけるマクロファージ亜群、特に M2 マクロファージの挙動の実態を追究することを目的として、MTA で生活歯髄されたラット臼歯歯髄におけるマクロファージ系細胞の経時的動態を、免疫組織化学的に観察した。

#### 【材料及び方法】

全身麻酔下で8週齢 Wistar 系雌性ラットの上顎第一臼歯を咬合面より露髄させ、MTA にて生活歯髄後、フロアブルレジンにて被覆した。反対側未処置歯をコントロールとした。観察期間終了後に、PLP 固定液で灌流固定を行い、摘出した試料を 10%EDTA にて脱灰後、凍結切片を作成し、H-E 染色ならびに酵素抗体染色を行った。酵素抗体染色において、CD68 (汎マクロファージマーカー)、CD163 (常在性マクロファージ、M2 マクロファージのマーカー)、CD204 (抗ラットマクロファージスカベンジャー受容体、M2 マクロファージのマーカー) 抗体を使用した。

酵素抗体染色後、歯髄を歯髄部から 0 $\mu$ m-100 $\mu$ m、300 $\mu$ m-400 $\mu$ m の2領域に分け、それぞれの陽性細胞数をカウントした。さらに各領域の面積を ImageJ により算出して陽性細胞の密度を求めた後、統計解析を行った。

#### 【結果】

組織学的観察では、術後1日では歯髄部直下に変性層の形成が認められた。術後3日には歯髄部近傍の一部に円柱状の細胞が酒列し、術後7日には薄い被蓋膜組織が形成され、術後14日には一部細管構造を示す象牙質様基質が認められた。反対側未処置歯の免疫染色では、CD68、CD163、CD204 陽性細胞とも多彩な挙動を示し、歯髄全体に分布していた。

CD68 陽性細胞は、MTA による術後1日より変性層直下に集積し始め、術後2日、3日では顕著な集積像を呈し、0 $\mu$ m-100 $\mu$ m の領域において他領域よりも有意に増加した。以後、集積は徐々に不明瞭となり、領域間に有意差は認められなかった。一方、CD163 陽性細胞は、術後1日より変性層直下に集積し始め、術後2日では顕著な集積像を呈し、0 $\mu$ m-100 $\mu$ m の領域にて術後1-2日では他領域よりも有意に増加した。術後3日以降では、CD163 陽性細胞の集積は不明瞭となり、領域間で有意差はなかった。さらに CD204 陽性細胞は、術後1-3日では変性層直下に顕著に集積しており、0 $\mu$ m-100 $\mu$ m の領域では術後1-5日では他領域よりも有意な増加を示した。術後7日以降集積は不明瞭となり、領域間の有意差はなかった。

#### 【考察】

本研究では過去の研究と同様に、MTA による生活歯髄後、軽度の炎症性変化に続き基質形成が進行し被蓋膜組織の

形成に至った。さらに露髄部直下には CD68 陽性細胞のみならず M2 マクロファージマーカーを発現する細胞が、被蓋硬組織形成に先立ち一時的な集積を示した。これらの知見は、MTA を適用された歯髄における創傷台癒初期過程で、M2 マクロファージが役割を演じることを示唆するものである。

#### 審査結果の要旨

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、逆根管充填、直接覆髄・断髄、穿孔封鎖、アペキシフィケーション、アペキソグネーシスなど様々な用途に臨床応用され、良好な密封性、抗菌性、生体適合性、硬組織誘導能を有することが報告されており、これまで覆髄材のゴールドスタンダードとして使用されてきた水酸化カルシウム製剤に代わる生体機能性材料として注目されている。一方、MTA 覆髄後のデンティブリッジ形成機構も未だ不明な点も多い。ラットを用いて MTA 直接覆髄後のデンティブリッジ形成過程を検索した研究では、術後 1 日後に壊死層直下にオステオポンチン (OPN) の沈着が起こり、術後 5 日にネスチン陽性の象牙芽細胞様線維細胞の分化と象牙質形成が起こることが示されているが、デンティブリッジ形成過程における OPN の機能的な役割は明らかになっていない。また、最近の研究で、MTA が根尖部歯髄線維細胞の分化能を促進するという報告がある。

マクロファージは、レセプター発現、エフェクター機能、サイトカイン/ケモカイン産生の点で異種性を示すことが知られており、浸出性マクロファージや常在性マクロファージに分類されていた。最近、活性化マクロファージは M1 マクロファージと M2 マクロファージに分類され、M1 マクロファージが微生物や腫瘍細胞を殺傷し、多量の炎症誘発性サイトカインを産生するエフェクター細胞であり、M2 マクロファージが炎症反応を修飾し、残渣の掃除、血管新生促進、組織リモデリングや修復に関わる。最近の研究では、皮下への MTA の移植が M2 マクロファージの集積を惹起することが報告されている。しかしながら、MTA 直接覆髄後の M2 マクロファージの反応については報告がなかった。

本研究は、MTA 覆髄後の歯髄台癒過程におけるマクロファージ亜群の分布密度の変化を明らかにすることに成功した。結果として、MTA による生活断髄後、早期に歯髄切断部直下への M2 マクロファージマーカー陽性細胞の集積が観察された後、被蓋硬組織が形成されることが示され、歯髄の創傷台癒過程においても M2 マクロファージが関与していることが明らかになった。MTA による覆髄や断髄は臨床においても頻繁に行われている。本研究において、断髄後の創傷台癒過程において M2 マクロファージが重要な役割を果たしている可能性が示唆されたが、将来的に M2 マクロファージによる治癒に関与しているサイトカインが明らかになれば、それを歯髄に応用することにより、覆髄や断髄後の治癒が促進され、治療成績の向上に寄与する可能性が期待される。

本研究では、M2 マクロファージが創傷台癒早期に重要な役割を果たしていることは示唆されたものの、関与しているサイトカインについては明らかではない。また、常在性マクロファージと浸出性マクロファージのそれぞれの組織修復への関与についても未解決である。水酸化カルシウムを用いた場合との異同等、未解決課題の解明への今後の研究を期待したい。

以上、本研究は MTA 直接覆髄後の歯髄台癒過程における M2 マクロファージの反応を明らかにしており、MTA の水酸化カルシウム製剤に代わる生体機能性材料としての有用性を示唆する重要な知見を提示しており、歯内療法学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。