

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

田中 翔

論文題目

歯根未完成歯および歯根完成歯を口腔外のマウス背部皮下に移植したときの歯髄内応答の組織学的解析

歯髄が細菌に感染し、部分的または完全に壊死した場合には歯内治療が必要となる。現在、歯根が完成した永久歯では歯内治療が日常的におこなわれ、高い成功率を得ている。しかし、歯根未完成永久歯の歯内治療は困難である。従来、壊死した歯髄を有する歯根未完成歯の治療にはアペキシフィケーションがおこなわれてきた。これは、根尖部に水酸化カルシウム等の薬剤を貼付することで、根尖を硬組織で閉鎖させる方法であるが、それ以上の歯根の成長は望めない。従って、歯根未完成永久歯にある歯髄の機能を維持することは、継続的な根の発達と根尖の狭窄に不可欠である。

近年、歯根未完成歯に再生歯内療法 (Regenerative endodontic therapy: RET) をおこなうことにより、歯根象牙質に硬組織が添加されることに加え、歯根が伸長することも報告されている。しかし、RET の治療結果を術前に予測することは困難である。これまで、RET が臨床的に成功したとする報告が散見されるが、現在の RET の治療成績から手技を決定するには未だ根拠が不十分である。例えば、RET とアペキシフィケーションの成績に関する最近のメタアナリシスでは、治療した歯の成功率および生存率の間に有意な差は認めなかった。さらに、実験動物を使用した組織学的研究で、RET をおこなった歯の根管内に形成された組織は、歯髄ではなくセメント質、骨、歯周組織と報告されている。つまり、現在、歯根未完成永久歯の壊死歯髄を治療する技術として、RET を適用することが有益であるかはわからない。RET の最大の目的は象牙質-歯髄複合体の再生であり、RET を成功させるには、

損傷した歯髄組織が硬組織に置き換わる問題点を克服する必要がある。そこで、動物モデルを使用し、象牙質-歯髄複合体の性質を正確に把握することが重要である。これは、現在の RET のプロトコールでは、形成された歯髄あるいは象牙質を組織学的に確認できる手段がないからである。これまでのところ、RET の実験モデルはラットやフェレットなどの実験動物を使用することが多かったが、動物の口腔内は視野が狭く、器具の柔軟性がないため RET や抜髄は困難であり、これが根管治療に関する研究が進展しにくい原因の 1 つであるのではないかと考えられる。現在、ラットとマウスの歯を口腔外で移植する動物実験モデルが存在し、皮下組織は無菌であり、移植された歯は感染の兆候を示さなかったことが報告されている。感染により炎症の惹起を考慮せずに済む異所性移植モデルは、非常に有用で再現性があると考えられる。従って、本研究では、まずは象牙質-歯髄複合体を再生できる RET の技術を開発するための核心となる歯の背部移植モデルを確立することを目的とした。また、マウスを選択した理由としては、サイズがラットの約 10% であるため飼育環境を確保しやすく、取り扱いが容易で、かつ高い繁殖率や低コスト、そして、歯根形態の違いによりラットに比べてマウスの方が抜歯にかかる時間は短く、本動物実験モデルとしては実用的である。そして、緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: GFP) を発現する C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) マウス (GFP マウス) を使用することで、移植後のレシピエント側の細胞とドナー側の細胞の挙

動を観察し、再生された組織が歯周組織などの局所組織由来のものか、骨髓に存在する幹細胞から分化したものかを探索する。

まず、使用するマウスの週齢を決定するために歯根が完成する時期を確認した。マイクロコンピューター断層撮影法 (micro-CT) を用いて雄性 C57BL/6J マウス 3 週齢から 14 週齢までの下顎第 1 臼歯を撮影し、近心根の根管口から根尖までの長さおよび生理学的根尖孔の直径を測定した。その結果、マウス下顎第 1 臼歯歯根が 8 週齢で完成することを示した。本結果に基づき、歯根の発達程度 (根尖孔径) が異なる 3 週齢 (根未完成歯)、6 週齢 (根が完成する直前)、および 12 週齢 (根完成歯) の C57BL/6J マウスおよび GFP マウスを選択した。

3、6 および 12 週齢の C57BL/6J マウス下顎第 1 臼歯を 3 週齢の GFP マウスの背部皮下へ、次に 3、6 および 12 週齢の GFP マウス下顎第 1 臼歯を 3 週齢 C57BL/6J マウスの背部皮下へ移植した (各週齢  $n = 25$ )。この際、歯根破折を認めた抜去歯は除外した。移植してから 5 週間経過後、摘出した移植体の組織学的および免疫組織学的解析をおこなった。なお、組織学的解析にはヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色を用いた。3 および 6 週齢で移植した歯の歯髓壊死の割合は 32% (7/25) であり、12 週齢で移植した歯の歯髓壊死の割合は 68% (18/25) であった。また、3 週齢で移植した歯の髓腔において、髓室には象牙芽細胞様細胞を認めないが、根管には象牙前質に沿って配列する象牙芽細胞様細胞が観察された。6 および 12 週齢

で移植した歯の髄腔には、象牙前質周囲に細胞の配列や象牙芽細胞様細胞を認めず、3週齢と比較すると髄腔内の細胞も疎であった。3、6および12週齢の歯髄壊死を起こしていない全ての髄腔には血管および硬組織の形成を認めた。歯髄の血管の再建は、髄腔内に血管が新生されるか、あるいは歯周組織からの血管と歯髄に元々存在する血管が吻合するかのどちらかであり、それらを GFP マウスおよび抗 GFP 抗体を用いて確認した。根未完成歯および根完成歯に関わらず、血管内皮細胞は冠部歯髄ではドナー由来の細胞で、根部歯髄ではレシピエント由来の細胞で構成されていた。本研究結果は、歯周組織から侵入した血管と元の歯髄に存在する血管が吻合して血管が再建されることを示唆するものである。

また、本研究では、以前の研究と同様に2種類の硬組織が歯髄腔に形成され、1つは、象牙質壁に連続した無細胞の層として観察され、もう1つは細胞が封入されたセメント質に類似したものであった。なお、抗ネスチン抗体および抗ペリオスチン抗体を用いた免疫染色や ALP および TRAP 染色は、それぞれ象牙芽細胞、セメント芽細胞、骨芽細胞および破骨細胞を特定するために使用した。抗ペリオスチン抗体を使用することで、歯髄腔に再生された組織が歯周組織に関係するかどうかを確認できる。以前の研究で、破骨細胞の存在は歯の再植後の歯髄における骨形成の誘導と常に関連しており、TRAP 反応を確認することで骨との識別に利用できることを示唆している。本研究で観察された細胞が封入されていない象牙質壁に連続し

た硬組織の特性は、ドナーであるマウスの週齢（3、6および12週齢）によって異なっていた。ネスチン陽性細胞は3週齢の移植歯に形成された象牙質壁に連続した硬組織の表面に認められた。しかし、6週齢と12週齢の移植歯に形成された象牙質壁に連続した硬組織は抗ネスチン抗体、ペリオスチン抗体およびTRAPには陽性反応を示さなかったが、ALPには陽性反応を示した。これらの結果により、3週齢で移植した歯の根管に形成された無細胞で象牙質に連続した硬組織は象牙質である可能性が示唆された。

次に、象牙芽細胞の由来を確認するために抗ネスチン抗体および抗GFP抗体の二重蛍光免疫染色をおこなった。ネスチン陽性反応は3週齢の歯根部のみに観察され、象牙芽細胞がレシピエント由来の細胞で構成されており、以前の研究で示されたように歯髄、歯乳頭、歯周組織などの局所組織からではなく、骨髄に存在する間葉系幹細胞から分化した可能性が示唆された。また、髓腔内に形成されたセメント質様の硬組織は、抗ネスチン抗体、抗ペリオスチン抗体、およびTRAPには陽性反応を示さなかったが、ALPには陽性反応を示した。この結果は、形成された硬組織が象牙質、骨およびセメント質のいずれでもないことを示した。従って、セメント質様の硬組織および6週齢と12週齢の象牙質壁に連続した硬組織は最終的に石灰化組織になる可能性のある calcific metamorphosis の関与が示唆される。

Calcific metamorphosis は、髓腔への硬組織の沈着を特徴とする外傷に対する歯髄の反応として定義されており、歯髄の神経血管供給の損傷が、

このメカニズムに関係していると報告されている。また別の報告では、血管と神経線維の断裂、象牙芽細胞の損傷および損傷後の歯髄変化が、歯髄組織に何らかの反応を誘発し、硬組織の沈着を加速する可能性があることを示している。ただし、本研究では移植期間が5週と短いため、形成された硬組織の特性や硬組織を形成する細胞の特徴を今後明らかにするためには、より長い移植期間が必要である。さらに、GFP マウスおよび抗 GFP 抗体を用いることで、髄腔に生き残ったドナー由来の細胞やレシピエント由来の細胞が calcific metamorphosis を形成する細胞に分化する可能性があることを示唆した。

本研究の結果より、歯根完成歯でも背部皮下移植後に血管が髄腔内に侵入して、硬組織の形成が観察されたことから、歯根未完成歯および歯根完成歯の背部移植は RET の研究およびプロトコルを確立するための有用なモデルとなり得ることが示された。