

学 位 論 文 題 名

直接覆髄におけるポリリン酸の効果

学位論文内容の要旨

[緒言]

直接覆髄法は生活歯髄の保存のために重要な術式で、従来より用いられてきた水酸化カルシウム製剤に代わる様々な材料が検討されてきた。我々は、リン酸が直鎖状に重合したポリマーであるポリリン酸が細胞の種々の生理機能を活性化させる作用があることを報告してきた。ポリリン酸は fibroblast growth factor-1, 2 (FGF-1, 2) を安定化し、FGF と FGF レセプターの結合を強固にすることや、マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞の石灰化を促進することが示唆されている。さらに、ポリリン酸は古くから食品添加物等に使用されてきたことから生体親和性に優れていると考えられ、*S.mutans* や *P.gingivalis* の菌体増殖抑制効果をもつことも確認されている。そこで今回、ポリリン酸を直接覆髄材として用いた場合の歯髄の反応について、ラットを用いて検討した。

[材料と方法]

1) 使用材料

加熱溶解したゼラチン溶液(最終濃度 4% (w/v))に、平均鎖長約 60 のポリリン酸ナトリウムを最終濃度が 1% (w/v) になるように溶解させ、ゲル状に調整したものをを用いた。

2) 動物実験モデルにおける評価

6 週齢 Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯咬合面に露髄窩洞を形成し、次亜塩素酸ナトリウム及び過酸化水素水による交互洗浄後、生理食塩水による水洗を行い、滅菌綿球にて窩洞の乾燥を行った。止血を確認後、ポリリン酸で露髄面を被覆し、窩洞を Fuji III(GC) にて仮封した。水酸化カルシウム製剤であるダイカル(デンツプライ三金)を塗布したものを比較対照群とし、術後 3,5,7,14,28 日後にラットを安楽死させた。その後、通法に従い連続切片標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、病理組織学的に検索した。

3) 定量 RT-PCR による遺伝子発現の検索

2)と同様にラットに直接覆髄を施し、術後 1,3,5,7,14,28 日後に被験歯を採取した。その歯髄より total RNA を抽出し、cDNA 合成後、定量 PCR により Type I collagen (ColI) の遺伝子発現量を定量化した。

[結果]

1) 病理組織学的所見

術後 3 日のポリリン酸投与群(実験群)では急性炎症は消退し、毛細血管の増生、未分化間葉系細胞の増加を伴う肉芽組織の形成が認められたのに対して、対照群では、好中球を主体とした炎症性細胞が広範囲に著しく浸潤していた。

術後 5 日の実験群では、炎症性細胞の浸潤は軽度で歯髓の器質化がみられ、骨様象牙質の新生が認められた。一方、対照群ではダイカル直下に壊死層が形成され、隣接する歯髓組織には好中球を主体とした炎症性細胞の帯状の浸潤が認められた。

術後 7 日目の実験群では、歯髓の器質化はより進行し、象牙質表層には大型の骨芽細胞様細胞の活発な増殖が認められ、骨様象牙質の形成が著明であった。対象群でも、露髄面より離れた歯髓の器質化が進行し、象牙質表面には骨芽細胞様細胞の増生がみられ、骨様象牙質の新生が認められたが、ダイカル直下に壊死組織が残存し、隣接する歯髓組織には血管の拡張を伴う炎症性反応が認められ、実験群に比し器質化は遅延する傾向が認められた。

術後 14 日では、対照群および実験群の両群とも、露髄面は骨様象牙質から成る被蓋硬組織の形成が著明となり、術後 28 日においては、両群とも、デンチンブリッジが露髄した部分の歯髓を置換していた。対照群のデンチンブリッジは、主に細胞封入を伴う骨様象牙質から成り、トンネル状欠損も認められたのに対し、実験群では、主に細管構造を有する象牙質から成る緻密なデンチンブリッジの形成が認められた。

2) 定量 RT-PCR による Type I collagen mRNA 発現の検索

定量 RT-PCR により Type I collagen mRNA の発現について検索した。術後 3, 5 日目において、実験群の Type I collagen の発現量は対照群のそれぞれ 1.66 倍、2.1 倍を示した。実験群、対照群ともに術後 7 日目で発現はピークに達し、その後は漸次減少する傾向を示したが、実験群においては 7 日目以降も対照群に比べて高い発現を保っていた。

[考察]

対照群においては、術後 3 日目には広範囲におよぶ著しい急性炎症性細胞の浸潤が認められ、それは術後 5 日目においても帯状に残存していた。この急性炎症細胞の浸潤は、ダイカル自体が持つ高い pH に起因するものと考えられた。一方実験群においては、術後 3 日目には肉芽組織の形成が認められ、術後 5 日目にはポリリン酸直下の歯髓の器質化は進行し、骨様象牙質の新生が認められた。このような結果は、ポリリン酸の生体親和性の高さや抗菌作用によるものと思われた。本実験においては、直接覆髄を施した歯髓における Type I collagen mRNA の発現量も定量化し、合わせて検索した。コラーゲンは結合組織に含まれる主要なタンパク質であり、ヒト歯髓では乾燥重量の 30% を占める。歯髓では I 型コラーゲンの割合が最も高く、象牙質や象牙前質においてはコラーゲンの大部分が I 型であることが報告されている。I 型コラーゲンは象牙質の有機基質の大部分を占めることから、象牙質基質

形成のキーファクターと考えられており、術後 3, 5 日目におけるポリリン酸処理群での Type I collagen mRNA の高い発現は組織学的検索結果を裏付けていると考えられた。

術後 7 日目になると、実験群、対照群ともに歯髄組織の器質化の進行が認められた。特に実験群においては、対照群に比べ歯髄の器質化はより進行し、骨様象牙質の顕著な新生が認められた。その後、術後 14 日目には両群とも骨様象牙質から成る被蓋硬組織の形成が進行し、術後 28 日目においては、実験群、対照群ともに著明なデンチンブリッジの形成が認められたが、そのデンチンブリッジの質に大きな差が認められた。ダイカルによって誘導されたデンチンブリッジは主に骨様象牙質から成り、以前より指摘されているトンネル状欠損が認められた。修復物-歯質間の微小漏洩より侵入してきた細菌やその産生物等が、その欠損を通過し炎症を引き起こすことが懸念されている。一方、実験群においては大部分が細管構造を有する象牙質から成る緻密なデンチンブリッジの形成が認められた。細管構造を有するデンチンブリッジは、外来からの刺激を歯髄に伝えることにより歯髄の防御機構が早期段階で働き、象牙芽細胞による被蓋硬組織の早急な添加が期待でき、このような効果をもつポリリン酸は歯髄直接覆髄剤として有効な材料となることが示唆された。

[まとめ]

ポリリン酸投与群ではその応用初期より歯髄に器質化がみられ、対照群に比べ早期より骨様象牙質の新生が認められた。また、ポリリン酸により主に細管構造を有する象牙質から成る緻密なデンチンブリッジが誘導された。このような所見は、ポリリン酸の生体親和性が高く、ポリリン酸のもつ抗菌作用等による器質化促進が露髄歯牙でも生じ、組織誘導・再生が早期に起こることを意味しており、ポリリン酸による歯髄の再生医療への応用の可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 佐 野 英 彦
副 査 教 授 進 藤 正 信
副 査 教 授 川 浪 雅 光

学位論文題名

直接覆髄におけるポリリン酸の効果

審査は審査担当者が一同に会し、始めに申請者に本論文の概要の説明を求め、その後に口頭試問の形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【目的】直接覆髄法は生活歯髄の保存のために重要な術式で、従来から用いられてきた水酸化カルシウム製剤に代わる様々な材料が検討されてきた。我々は、リン酸が直鎖状に重合したポリマーであるポリリン酸が細胞の種々の生理機能を活性化させる作用があることを報告してきた。そこで今回、ポリリン酸を直接覆髄材として用いた場合の歯髄の反応について、ラットを用いて検討した。

【材料および方法】

1) 使用材料

加熱溶解したゼラチン溶液に、平均鎖長約 60 (リン酸残基数で約 60 個) のポリリン酸ナトリウムを最終濃度が 1%(w/v) になるように溶解させ、ゲル状に調整したものを用いた。

2) 動物実験モデルにおける評価

6 週齢 Wistar 系雄性ラットの上顎第一臼歯咬合面に露髄窩洞を形成後、ポリリン酸ゲルで露髄面を被覆し、窩洞を Fuji III(GC)にて仮封した。水酸化カルシウム製剤であるダイカル (デンツプライ三金) を露髄面に塗布したものを比較対照群とし、術後 3,5,7,14,28 日後にラットを安楽死させた。その後、通法に従い連続切片標本作製し、ヘマトキシリン-エオジン染色を施し、病理組織学的に検索した。

3) 定量 RT-PCR による遺伝子発現の検索

2) と同様にラットに直接覆髄を施し、術後 1,3,5,7,14,28 日後に被験歯を採取した。それらの歯髄より total RNA を抽出し、cDNA 合成後、定量 PCR により Type I collagen (ColI) の遺伝子発現量を定量化した。

【結果および考察】対照群においては、術後 3 日目には広範囲におよぶ著しい急性炎症性細胞の浸潤が認められ、それは術後 5 日目においても帯状に残存し

ていた。この急性炎症細胞の浸潤は、ダイカル自体が持つ高い pH に起因するものと考えられた。一方実験群においては、術後 3 日目には肉芽組織の形成が認められ、術後 5 日目にはポリリン酸直下の歯髓の器質化は進行し、骨様象牙質の新生が認められた。このような結果は、ポリリン酸の生体親和性の高さや抗菌作用によるものと思われた。本実験においては、直接覆髓を施した歯髓における Type I collagen mRNA の発現量も定量化し、合わせて検索した。I 型コラーゲンは象牙質の有機基質の大部分を占めることから、象牙質基質形成のキープクターと考えられており、術後 3, 5 日目におけるポリリン酸処理群での Type I collagen mRNA の高い発現は組織学的検索結果を裏付けていると考えられた。

術後 7 日目になると、実験群、対照群ともに歯髓組織の器質化の進行が認められた。特に実験群においては、対照群に比べ歯髓の器質化はより進行し、骨様象牙質の顕著な新生が認められた。その後、術後 14 日目には両群とも骨様象牙質から成る被蓋硬組織の形成が進行し、術後 28 日目においては、実験群、対照群ともに著明なデンチンブリッジの形成が認められたが、そのデンチンブリッジの質に大きな差が認められた。ダイカルによって誘導されたデンチンブリッジは主に骨様象牙質から成り、以前より指摘されているトンネル状欠損が認められた。一方、実験群においては大部分が細管構造を有する象牙質から成る緻密なデンチンブリッジの形成が認められた。

【結論】ポリリン酸投与群ではその応用初期より歯髓に器質化がみられ、対照群に比べ早期より骨様象牙質の新生が認められた。また、ポリリン酸により主に細管構造を有する象牙質から成る緻密なデンチンブリッジが誘導された。以上のような所見から、ポリリン酸は直接覆髓剤として有効な材料となることが示唆された。

各審査委員が行った主な質問は、以下の通りである。

- 1) 安全性について：食品で安全という理由のみでは、覆髓のように歯髓に直接接するようなものについては慎重な検討が必要と思われる。
- 2) 臨床応用について、どのような観点が考えられるか。
- 3) ポリリン酸が FGF を安定化させるメカニズムについて
- 4) ポリリン酸の細胞内に取り込まれるメカニズムについて
- 5) 今後の展望について

これらの質問に対して、申請者から明快な回答ならびに説明が得られた。その結果、本研究が学位論文として十分値し、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。