HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	再植後の歯根吸収に対するN-アセチルシステインの効果［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	西見, 光彦
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13476号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74010
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsuhiko_Nishimi_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　西　見　光　彦

学　位　論　文　題　名

再植後の歯根吸収に対する *N*-アセチルシステインの効果

歯の外傷で一番重篤なものの 1 つに完全脱臼があり，受傷の約 1.5～16%で発生している．脱臼後 1 時間以内に処置を行うことができれば予後は比較的良好だが，再植までに要した時間で最も多いのは 1～4 時間であったと報告されている．再植が遅れると歯根吸収の発生する割合が多くなり，予後不良となる可能性が高くなる．

脱臼から長時間経過し，歯根周囲の組織の生存が期待できない場合は，根管治療が必要となる．外傷歯における歯根吸収は歯根膜の乾燥，歯髄壊死と関連がある．脱臼歯の根管貼薬剤には，外傷時に起きる炎症に対する抗炎症作用，脱臼後に起こる細菌感染に対する抗菌作用，予後不良時の歯根吸収に対する歯根吸収抑制作用が期待される．一般的に水酸化カルシウム（$Ca(OH)_2$）は，抗菌作用，抗炎症作用，硬組織誘導作用，歯根吸収抑制作用を持つため，外傷歯の根管貼薬剤として使用されている．しかし，$Ca(OH)_2$が根尖孔外へ漏出した場合は，合併所を引き起こす可能性がある．また，$Ca(OH)_2$の長期使用は歯根象牙質を脆弱化させるとの報告があり，長期の使用が求められている歯根吸収の貼薬剤としては最適ではないと考えられるため，長期使用に耐えられる新規の根管貼薬剤の開発が望まれる．

抗酸化アミノ酸である *N*-アセチルシステイン（NAC）は，生体内で抗酸化作用を示すグルタチオンの前駆体である．抗菌作用を持ち，炎症性サイトカインの発現を抑制することで抗炎症作用を示すことが報告されている．これらの報告から NAC が歯周組織の細菌感染，外傷による炎症に対応することができると考えられる．さらに，歯根吸収抑制作用を示せば根管治療薬として応用することが可能と考えられる．しかし，歯根吸収を抑制するとの報告はない．

本研究では，外傷歯の歯根吸収に対する NAC の効果を検証するために，ラットの上顎第一臼歯を用いて外傷歯モデルを作製し，根管貼薬剤として NAC を使用した．併せて，RAW264.7 細胞に RANKL と NAC を作用させ，破骨細胞分化に対する NAC の効果を検討した．

生後 6 週齢の SD 系雄性ラットに全身麻酔を施した後，上顎第一臼歯を抜歯，1 時間乾燥させた．乾燥後再植のみを行った歯を control とし，近心根に 10 mM NAC を根管貼薬した後に再植したものを実験群とした．根尖側を接着性レジンセメント，歯冠側をグラスアイオノマーセメントで封鎖，乾燥後に再植を行い，対合歯を削合した．2 週間後に安楽死させ，試料を固定，脱灰した．歯軸に対して垂直に厚さ 5 μm の薄切標本を作製し，H-E 染色，TRAP 染色を行い残存歯根面積(%)の測定と破歯細胞の観察を行った．

また，RAW264.7 細胞に RANKL と各濃度の NAC(1 mM NAC，5 mM NAC，10 mM NAC)を添加して培養し，生細胞を確認するために細胞内の ATP 量，破骨細胞数，核数の測定と，real-time PCR にて破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量を定量することで，破骨細胞分化に対する NAC の効果も併せて検討した．

動物実験において，control では H-E 染色にて多核巨細胞を観察し，TRAP 染色にて破歯細胞であることを確認した．10 mM NAC を貼薬して再植したところ，control と比較して歯根の吸収，多核巨細胞，及び破歯細胞が減少していた．残存歯根面積を測定したところ，control と 10 mM NAC との間に有意差を認めた．

細胞培養実験において，RAW264.7 細胞に各濃度の NAC を添加し培養しても NAC 無添加と比較して ATP の減少を示さなかった．RAW264.7 細胞に RANKL のみを加えた control と，各濃度の NAC を添加し培養した実験群の破骨細胞数を測定したところ，control，1 mM NAC では巨大な破骨細胞が目立ち，5 mM NAC，10 mM NAC では破骨細胞の大きさが小さい傾向を示した．2 核以上の破骨細胞の数は，control と比較して 5 mM NAC，10 mM NAC で有意に減少していた．核数別の破骨細胞数を測定したところ，control と比較して，2 核，3 核で 10 mM NAC が，4 核，5 核で 5 mM NAC が有意に減少していた．real-time PCR による破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量は，RANK，NFATc1，DC-STAMP，CD47，OC-STAMP，cathepsin K，Nox1 の項目で control と比較し 5 mM NAC，または 10 mM NAC で有意に減少していた．

動物実験による組織学的所見では control において破歯細胞を有する吸収窩を認め，10 mM NAC では吸収窩や歯根に隣接する破歯細胞が有意に減少していた．歯根の面積でも 10 mM NAC で歯根吸収抑制を示した．歯根吸収は歯根膜の壊死等による欠損部に象牙細管から歯髄壊死組織の細菌や内毒素が移動することで発生すると考えられている．そのため，control では完全脱臼時の乾燥による歯根膜の壊死，及び歯髄壊死が原因により歯根吸収が発生したと考えられた．

細胞培養では光学顕微鏡下で 5 mM NAC，及び 10 mM NAC で破骨細胞分化抑制傾向を示し，総破骨細胞数でも control と比較して減少した．細胞内の ATP を測定したところ，使用した全ての濃度で NAC 無添加の control との差を認めなかった．つまり，総破骨細胞数の減少は，細胞の死滅によって起きたわ

けではなく，破骨細胞への分化を抑制したためと考えられた．歯根吸収を担う細胞は破骨細胞(破歯細胞)である．組織を吸収するためには造血幹細胞由来の単球/マクロファージ系前駆細胞から単核の破骨細胞に分化し，さらに破骨細胞同士の融合により多核化することが重要になる．破骨細胞分化にはマスター転写因子である NFATc1 や RANKL の受容体である RANK が必須である．破骨細胞の融合には DC-STAMP が重要であり，少数核同士の破骨細胞融合に関係する CD47，多数核の融合に関与する OC-STAMP がある．破骨細胞が骨を吸収する際には I 型コラーゲンを分解するシステインプロテアーゼである cathepsin K が重要となる．また，破骨細胞の分化には活性酸素種(ROS)との関連も報告されている．

本研究において, 10 mM NAC は再植の遅延に起因する歯根吸収に対して抑制的に働いた．real-time PCR の結果では，10 mM NAC において，RANK, NFATc1，DC-STAMP，CD47 の mRNA 発現量が減少していた．RANK, NFATc1 の減少が破骨細胞分化に影響し，DC-STAMP，CD47 の減少が，破骨細胞同士の融合に影響したと考えられた．これは本研究の結果である破骨細胞数の減少，少数核細胞の減少と一致する結果となった．cathepsin K の mRNA 発現量も減少していた．これにより，破骨細胞の分化，融合の抑制だけではなく，破骨細胞の機能も抑制する可能性が考えられた．さらに，ROS を生成する NADPH オキシダーゼ(NADPH oxidase; Nox)である Nox1 の発現も減少したため，ROS が関連する破骨細胞分化経路も抑制した可能性が考えられた．

$Ca(OH)_2$では根尖溢出による合併症が報告されているが， NAC 自体は抗酸化アミノ酸であるため， 根尖から溢出しても合併症の発生する可能性は低いと考えられる． また， $Ca(OH)_2$の使用によりアルカリ環境が長期にわたり継続すると， 歯根組織の変性が起こり， 象牙質の強度低下を引き起こす可能性が考えられている． 今回の研究で使用した NAC は pH を中性(pH7.2)に調整して使用しているため，象牙質の強度低下を予防できる可能性が考えられる．

本結果より，NAC の使用は，ラット外傷歯モデルで歯根吸収抑制と破歯細胞の減少傾向を示し，細胞培養で破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制した．NAC は破歯細胞数を減少させて歯根吸収を抑制し， 破骨細胞への分化， 融合， 破骨細胞の機能抑制が関与していると考えられた． 以上より外傷歯における歯根吸収に対する NAC の応用の可能性が示唆された．