



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	FGF2と新規ケイ酸カルシウム系材料を用いた生活歯髄切断法の基礎的研究
Author(s)	近, 加名代
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14533号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14533
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81245
Type	doctoral thesis
File Information	Kanayo_Kon.pdf



博 士 論 文

FGF2 と新規ケイ酸カルシウム系材料を 用いた生活歯髄切断法の基礎的研究

令和 3 年 3 月 申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

近 加 名 代

目次

要旨	3
緒言	5
材料と方法	8
結果	17
考察	22
結論	27
謝辞	27
参考文献	28

要旨

生活歯髄切断法は、冠部歯髄を除去し根部歯髄を存続させる方法で、通常乳歯や幼若永久歯に用いられる。しかし、歯根完成後の永久歯において歯髄に不可逆的な炎症が生じた場合は、生活歯髄切断法では期待された効果が得られず、抜髄処置の適応となることが多い。生活歯髄切断法の利点として、残存歯髄組織による知覚の維持や象牙質への栄養供給、修復象牙質形成が期待されること、複雑な根管治療を行わず根管治療の失敗による根尖性歯周炎を未然に防ぐことができるなどがあげられる。

生活歯髄切断法においては、覆髄剤として用いられる水酸化カルシウム製剤により、歯髄切断面に壊死層が生じ、その後誘導された象牙芽細胞によってデンティンブリッジが形成され、歯髄と歯根が分離される。乳歯や幼若永久歯で生活歯髄切断法が成功する理由は、歯髄細胞の増殖活性が高く、血液循環が良好であるためと考えられている。しかし、歯根完成後は歯髄の修復に重要な血流量が減少し、歯髄幹細胞の存在が期待できず、そのため歯髄損傷後の修復が困難であると考えられる。そのため、永久歯の治療においては炎症が歯冠部歯髄のわずかな領域に限局している場合でも、抜髄処置が適応され、歯髄は保存

されない。したがって、歯髄再生作用のある材料を用いた生活歯髄切断法の開発は永久歯の歯髄保存療法における重要な課題となっている。

そこで、本研究では、塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, 以下 FGF2)と生体親和性の高い新規ケイ酸カルシウム系材料 Vericom Well Pulp PT (ペントロンジャパン, 以下 WPPT) を覆髄材として使用し、ラットの生活歯髄切断後の歯髄修復に及ぼす作用を組織学的に検討した。

デンティンブリッジ形成の厚み及び面積は、処置後から経時的に増加したが、処置後 30 日目では材料間による有意な差は認められなかった。しかし、処置後 30 日目の歯髄の状態を組織学的に評価したところ、FGF2 とケイ酸カルシウム系材料を併用した群でのみ、他の群で観察された歯髄壊死や好中球浸潤が認められず、残存歯髄の血管数および血管腔の面積も他の群に比べ少なかった。なお、生活歯髄切断後 7 日目では、FGF2 とケイ酸カルシウム系材料を併用した群では他の群に比べ血管数が最も多かった。

以上の結果より、FGF2 とケイ酸カルシウム系材料の併用は、残存歯髄の血管新生ならびに修復を促進し、歯髄保存を可能とすることが示唆された。

本研究により、FGF2 とケイ酸カルシウム系材料の併用によって、歯根完成後の永久歯にも生活歯髄切断法を応用できる可能性が示唆された。

緒言

歯髄は、硬組織である象牙質に囲まれ、歯周組織とは根尖孔のみで交通しており閉鎖空間に近い特殊な環境に置かれている。各種の外來刺激により炎症が惹起されると生体の防御反応や組織の修復機転が起こりにくいことが広く認知されている。

歯髄組織は、象牙芽細胞、線維芽細胞、未分化間葉細胞、神経、血管などで構成されている。歯髄組織に含まれる未分化間葉細胞は、咬耗やう蝕、歯の切削などの刺激に応じて象牙芽細胞に分化し、デンティンブリッジを形成することが知られている³⁾。無菌的な状態では、露髄しても歯髄はデンティンブリッジを形成し、ある程度治癒することが報告されている⁴⁾。乳歯や幼若永久歯では、歯冠部歯髄に炎症が起きた場合に、水酸化カルシウム製剤を直接覆髄剤として用い、デンティンブリッジの形成を誘導して根部歯髄を残す生活歯髄切断法が用いられる。しかし、歯根完成後では歯髄保存療法の適応が限られており、多くは抜髄となることから、歯髄を温存できる新たな治療法の開発が求められている。

塩基性線維芽細胞増殖因子(basic fibroblast growth factor, 以下 FGF2) は、1970 年代にウシ脳下垂体から線維芽細胞の増殖を促進する物質として発見

されたタンパク質である^{5, 6)}。その後の研究により、FGF2は線維芽細胞のみならず、血管内皮細胞、神経外胚葉系、骨芽細胞などの種々の細胞の増殖や分化に関与することが明らかにされている^{7~9)}。また、FGF2は強力な血管新生作用を有し、損傷時の組織に早期に炎症や肉芽形成を誘導し、組織の修復、再生促進にはたらくことが報告されており¹⁰⁾、褥瘡・皮膚潰瘍の治療¹¹⁾や歯周病の治療にも利用されている¹²⁾。

近年、デンティンブリッジの形成を目的としてMTA (Mineral Trioxide Aggregate) セメントが覆髄材として多く使用されている^{13, 14)}。MTA セメントは、1990年代初頭に開発された生体親和性に優れた水硬性セメントで、逆根管充填¹⁵⁾や穿孔部の封鎖¹⁶⁾、直接覆髄¹⁷⁾などに適用可能とされる。主成分はケイ酸三カルシウム ($3\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$) であり、その他ケイ酸二カルシウム ($2\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$)、アルミン酸三カルシウム ($3\text{CaO} \cdot \text{Al}_2\text{O}_3$) などの無機質酸化物が含まれ、これに石膏、酸化ビスマスが添加されている¹⁸⁾。MTA セメントによる直接覆髄後のデンティンブリッジ形成機序については多くの報告があり、MTA セメントから放出された水酸化カルシウムは、象牙質中の成長因子やシグナル伝達物質を可溶化させることが報告されている¹⁹⁾。これら象牙質由来の生理活性物質は、露髄部周辺の未分化な歯髄細胞の増殖促進、象牙芽細胞への分化誘導をもたらし、デンティンブリッジ形成に働くと考えられている²⁰⁾。しかし、

MTA セメントは操作性の悪さ，硬化時間の長さなどの欠点が指摘されている．

最近，これらの MTA セメントの短所を改良した新規のケイ酸カルシウム系材料が開発されており^{21, 22)}，MTA と同様の効果を示している．

そこで，本研究では，ラットを用いて，新規のケイ酸カルシウム系材料である Vericom Well Pulp PT（ペントロンジャパン，以下 WPPT）に FGF2 を組み合わせることで覆髄材として用い，治療効果の向上の有無を病理組織学的に検討した．

材料と方法

1) 実験動物

実験には 24 匹の 7 週齢，雌 Wistar 系ラット（株式会社 ホクドー）を用いた．なお，本研究に関わる動物実験は，「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」（承認番号：13-0058）に基づき行った．

2) 覆髄材

FGF2（rhFGF2 liquid, 1.2mg/mL, ORIENTAL YEAST CO., LTD.）は超純水にて 0.5mg/mL に希釈し使用した．FGF2 を直接歯髄腔に注入すると，FGF2 が急速に放出，拡散し，分解されて生物学的活性を失うため，組織再生を誘導することが困難であると報告されている²³⁾．そこで，FGF2 を徐放性にするためにゼラチンハイドロゲルに含浸させる方法が報告されており²³⁻²⁵⁾，本実験では MedGel シート（MedGel®, 新田ゼラチン株式会社）を使用した．MedGel シートは，ゼラチンを架橋して非水溶性にさせた材料で，生体内に埋入すると組織の細胞から分泌されるコラゲナーゼなどの分解酵素により基材が分解され，含浸させた物質が徐放されることが考えられている．

MTA セメントは操作性が悪く、硬化時間が長いという欠点があることから、今回の実験では、MTA セメントと同様の作用機序を持つと考えられるケイ酸カルシウム系材料 Vericom Well Pulp PT（ペントロンジャパン、以下 WPPT）を使用した。

3) 生活歯髄切断処置

ラットに対し、イソフルラン（ファイザー株式会社）を吸入させた後、塩酸メデトミジン 0.15mg/kg（ドミトール® ゼノアック）とミダゾラム 2mg/kg（ドルミカム® 丸石製薬株式会社），ブトルファノール 2.5mg/kg（ベトルファール® Meiji Seika ファルマ株式会社）の三種混合麻酔を腹腔内に投与した。

ラットの頭を固定するために、即時重合レジンで作成した頭部固定用枕に穴をあけ、マイクロブラシの柄を通したものをコルク板に固定し、治療台とした。全身麻酔を施したラットを治療台に置き、頭部固定用枕のマイクロブラシの柄に上顎切歯を掛け、ラットの手首を紐で縛り固定した(図 1-A)。ピンセットで舌を牽引しながら、クリップに下顎切歯と舌をかけて開口させ（図 1-B），その後、クリップに紐を通し、閉口しないようラットの足元に設置した棒に固定した。

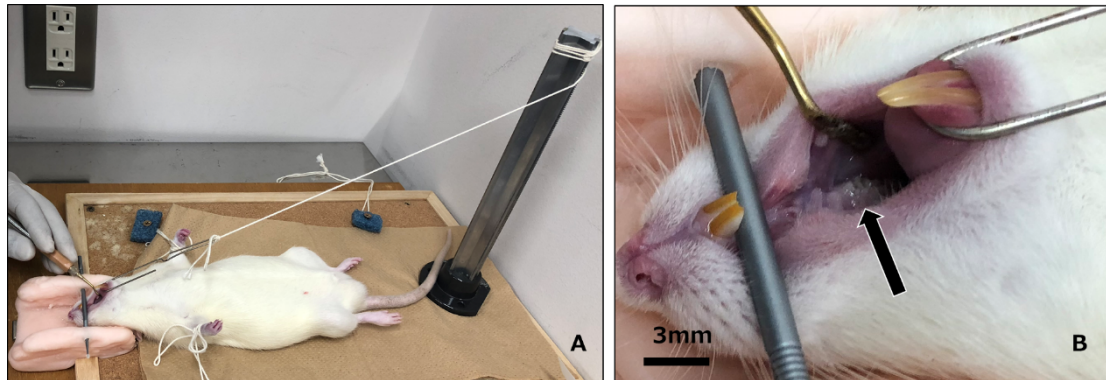


図 1 ラットの固定

A: 頭部固定用枕に穴をあけ、マイクロブラシの柄を通したものをコルク板に固定し、全身麻酔を施したラットの上顎前歯を柄に掛け固定した。

B: クリップに下顎前歯と舌を掛け開口させた。矢印は左側上顎第一大臼歯。

両側上顎第一大臼歯を 70%エタノール（関東化学株式会社）で消毒後、#1/2 の滅菌スチールラウンドバー(0.6mm 株式会社松風)にて、咬合面から歯髓腔に達するまで直径約 1.0mm の露髓面を形成した。マイクロ用エキスカベーターを用いて歯髓を除去し、生活歯髓切断を行った（図 2-A）。

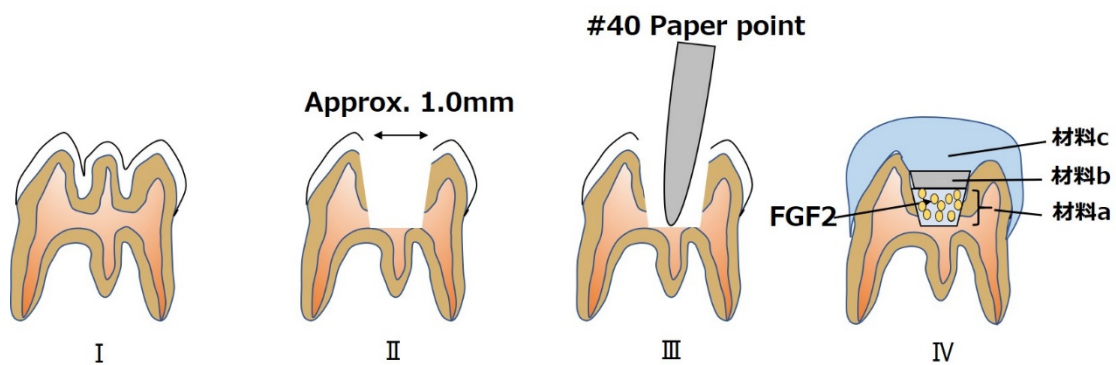


図 2-A 生活歯髓切断法

I: ラット上顎左右第一大臼歯を用いた。II: 咬合面に #1/2 滅菌スチールラウンドバーで、直径 約1.0 mm の露髓面を作成し、その後、マイクロ用スプーンエキスカベーターにて冠部歯髓を断髓した。III: 滅菌生理食塩水で洗浄し、滅菌ペーパーポイントにて圧迫止血した。IV: 図のように覆髓材を留置し、スーパーボンドにより仮封した。

歯髄切断後，滅菌生理食塩水で洗浄し，#40 滅菌ペーパーポイントにて圧迫止血を行い，止血を確認後，覆髄材を 1. 超純水を含浸させた MedGel シートを充填した群 (FGF2-/WPPT-群)，2. 超純水を含浸させた MedGel シートの上に WPPT を充填した群 (FGF2-/WPPT+群)，3. FGF2 を含浸させた MedGel シートを充填した群 (FGF2+/WPPT-群)，4. FGF2 を含浸した MedGel シートの上に WPPT を充填した群 (FGF2+/WPPT+群) の 4 群にわけて用いた（図 2-B）．実験材料を留置後，すべての歯牙を Super-Bond（サンメディカル）にて被覆した．対合歯を骨鉗子で碎き，餌を粉末の飼料に変え，恒温恒湿（室温 24～25° C，湿度 40～70%）に保たれた飼育室で飼育した．

	材料a	材料b	材料c	Number of tooth
FGF2-/WPPT-	MedGelシート+超純水	—	スーパーボンド	n=4
FGF2-/WPPT+	MedGelシート+超純水	WPPT	スーパーボンド	n=4
FGF2+/WPPT-	MedGelシート+FGF2	—	スーパーボンド	n=4
FGF2+/WPPT+	MedGelシート+FGF2	WPPT	スーパーボンド	n=4

図 2-B 覆髄材の組み合わせ

4) 標本作製

生活歯髄切断後ラットを 7, 14, 30 日間飼育し，イソフルラン吸引により安楽死させた（図 3）．安楽死させたラットより上顎骨を摘出し，4% パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（和光純薬工業株式会社）にて 24 時間浸漬固定した．続いて，10% EDTA 溶液（シグマ アルドリッチ ジャパン株式会社）で 4 週

間脱灰した。その後、通法に従いパラフィン包埋を行った。顎骨は上顎第一大臼歯を含む前頭断の平面で、厚さ $5\mu\text{m}$ の連続切片標本を作製した。作製したパラフィン切片に Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施し、光学顕微鏡にて組織学的に観察した。

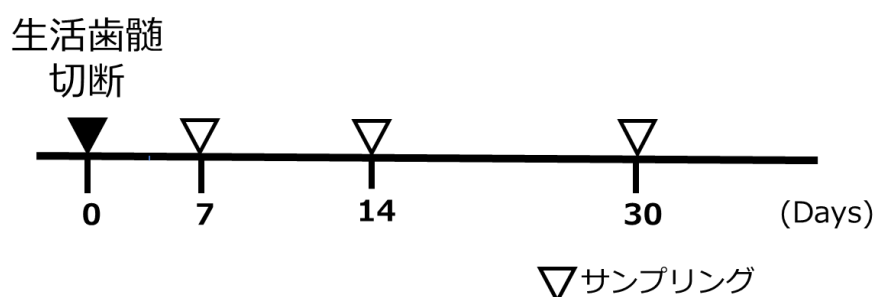


図 3 実験スケジュール
生活歯髄切断後、7日、14日、30日目に、ラットをイソフルラン吸入により安楽死させ、上顎第一大臼歯を上顎骨ごと摘出した。

5) 免疫組織染色

免疫組織染色には $5\mu\text{m}$ に薄切したパラフィン切片を用いた。脱パラフィン後、3% H_2O_2 に 5 分間反応させて内因性ペルオキシダーゼを不活化した。5% Bovine Serum Albumin solution (SIGMA-ALDRICH) にてブロッキング処理を室温で 10 分間行った後、一次抗体として抗 CD34 抗体 (Anti-CD34 antibody ab81289 Abcam) を 200 倍に希釈し、室温にて 60 分間反応させた。次に、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 抗体 (Dako Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG) を用い、室温で 30 分反応させた。DAB 基質ユニット (Dako

DAB) により 30 秒間発色後，マイヤーヘマトキシリンにて核染色を行った．通常法に従い脱水，封入した切片を光学顕微鏡にて観察した．

6) デンティンブリッジ形成の厚みの測定

歯牙の HE 染色像を用いて，除去した歯髄に隣接する領域でデンティンブリッジが最も形成されている部位の厚みを計測した（図 4）．（デンティンブリッジの厚み/天蓋から髄床底までの長さ） $\times 100(\%)$ を算出し，グラフを作成した．

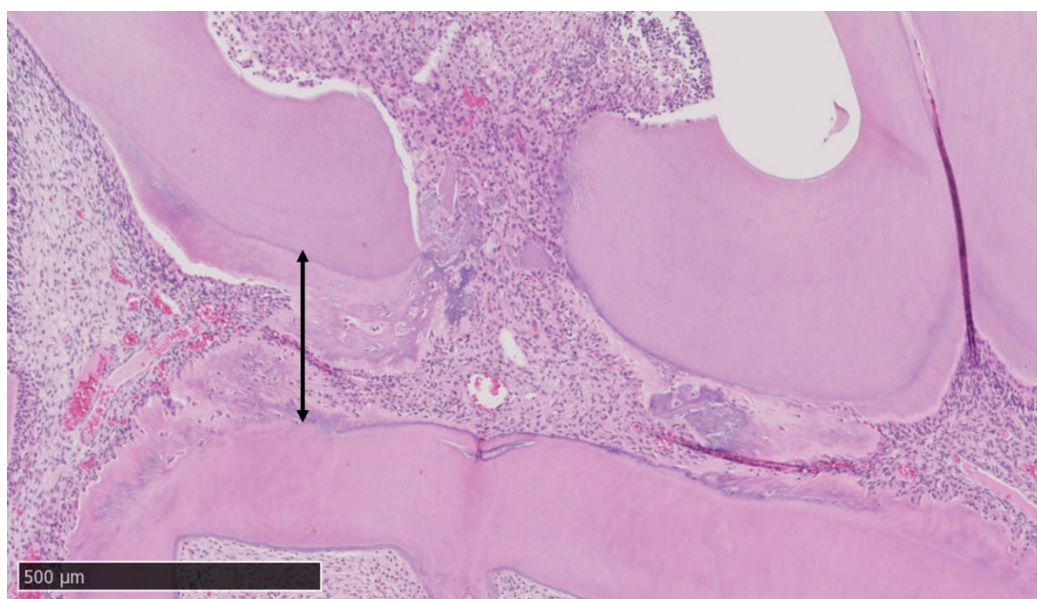


図 4 デンティンブリッジの厚みの測定
除去した歯髄に隣接する領域でデンティンブリッジが最も形成された部位（両矢印）の厚みを計測した．スケールバー：500μm

7) 形成されたデンティンブリッジの割合の測定

歯牙の HE 染色像を用いて，除去した歯髄に隣接した左右の領域に 1 辺 $400\mu\text{m}$ の正方形を設定し，処置前の歯髄腔の面積及び新たに形成されたデンティンブリッジの面積を計測した（図 5）．1 歯牙あたり 2 箇所の正方形内の面積を，画像解析ソフトであるイメージ J（National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA）を用いて計測し，形成されたデンティンブリッジの割合を 100 分率で算出しグラフを作成した．

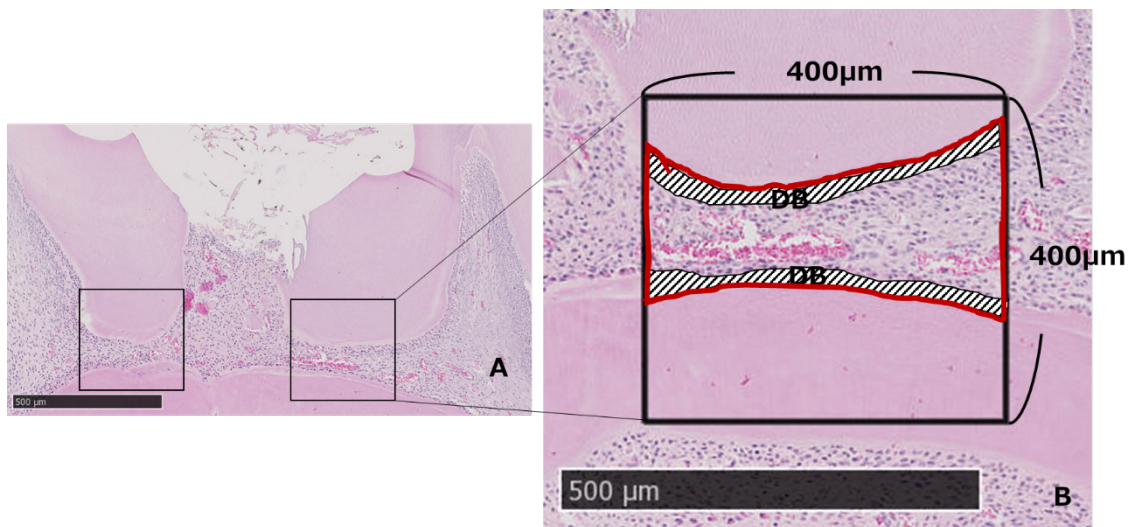


図 5 形成されたデンティンブリッジの割合の測定

除去した歯髄に隣接する冠部歯髄を含む領域に1辺 $400\mu\text{m}$ の正方形を計測領域として設置（黒枠）．元の歯髄腔が存在した天蓋から髄床底までの面積（赤枠）と，形成されたデンティンブリッジ（DB, 斜線）の面積をイメージJにて計測した．BはAの黒枠部の拡大．スケールバー：A= $500\mu\text{m}$, B= $500\mu\text{m}$

8) 覆髄材による歯髄の炎症性変化の解析

生活歯髄切断後 30 日目の HE 標本の残存歯髄を観察し，炎症性変化について組織学的に解析した．各群における好中球浸潤および歯髄壊死がみられた歯牙数の割合を算出し，グラフを作成した．

9) 残存歯髄にみられる血管数と血管腔の面積の測定

生活歯髄切断後 7 日目，30 日目の歯牙パラフィン切片を用いて，血管内皮細胞のマーカーである CD34 の免疫染色を行った．CD34 免疫染色標本を用いて上顎第一大臼歯の残存歯髄の単位面積当たりの血管数と単位面積当たりの血管腔の面積を計測した．画像解析ソフトであるイメージ J を用いて残存歯髄の面積，血管の個数（図 6），血管腔の面積（図 7）を計測した．統計処理は t 検定を用い， $p < 0.05$ を有意差ありとした．

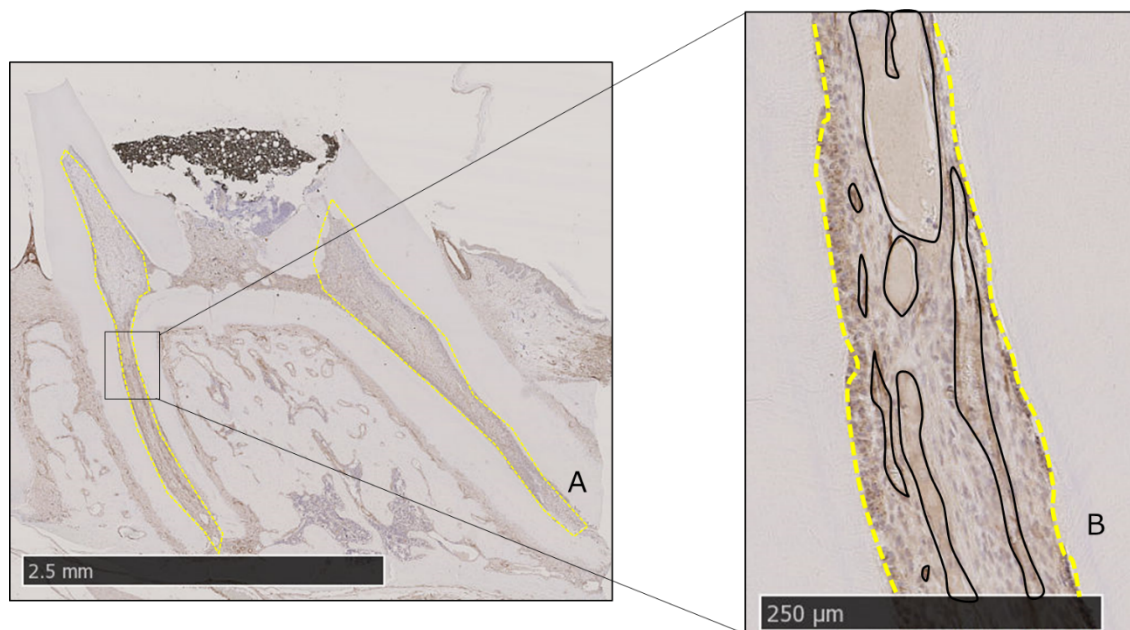


図 6 残存歯髓の血管数測定

生活歯髓切断後の組織を用いて免疫染色を行い, 残存歯髓(黄色点線内) のCD34陽性血管数を計測した. BはAの黒枠部の拡大. 黒色実線: CD34陽性血管.

スケールバー: A=2.5mm, B=250μm

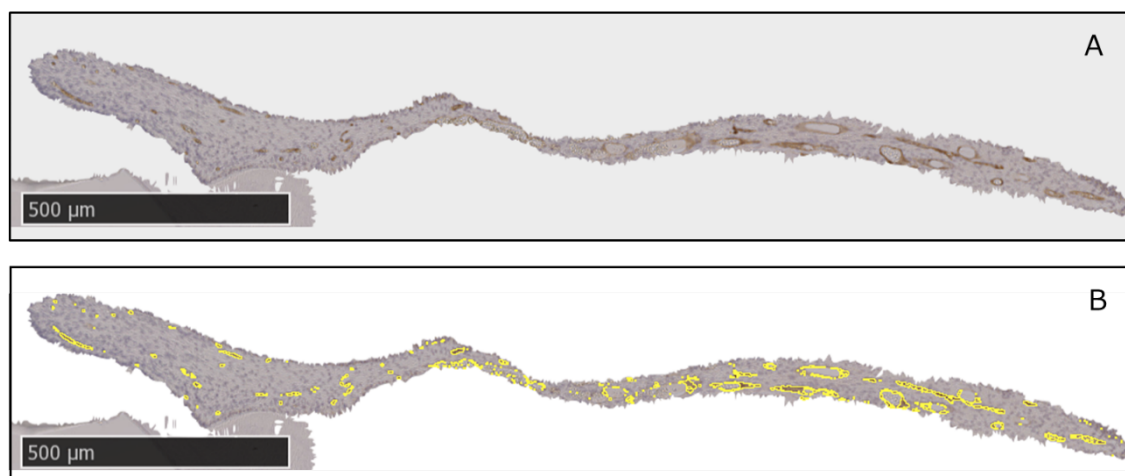


図 7 残存歯髓の血管の面積測定

生活歯髓切断後の組織を用いて免疫染色を行い, 残存歯髓の単位面積当たりのCD34陽性血管の面積を計測した. A: CD34免疫染色像. B: Aを画像解析ソフトイメージJで処理した画像. 黄色実線はCD34陽性血管を示す. スケールバー: 500μm

結果

1) 覆髄材によるデンティンブリッジ形成の量的検討

覆髄材として用いた FGF2 と WPPT の効果を評価するため、形成されたデンティンブリッジの厚み、面積の割合をそれぞれ検討した。生活歯髄切断後 7 日目で、FGF2+/WPPT+群のデンティンブリッジの厚みは、FGF2-/WPPT-群および FGF2+/WPPT-群に比べ有意に少なかった（図 8）。生活歯髄切断後 14 日目では、すべての群でデンティンブリッジの厚さは 90%ほど形成されており、FGF2-/WPPT-群で 100%に達している歯牙があった。生活歯髄切断後 30 日目では、14 日目とあまり変化はなかったが、FGF2-/WPPT-群および、FGF2+/WPPT+群の全例でほぼ 100%に達していた。また、FGF2-/WPPT+群では形成されたデンティンブリッジの厚みが他の群に比べわずかに少ない傾向がみられた。

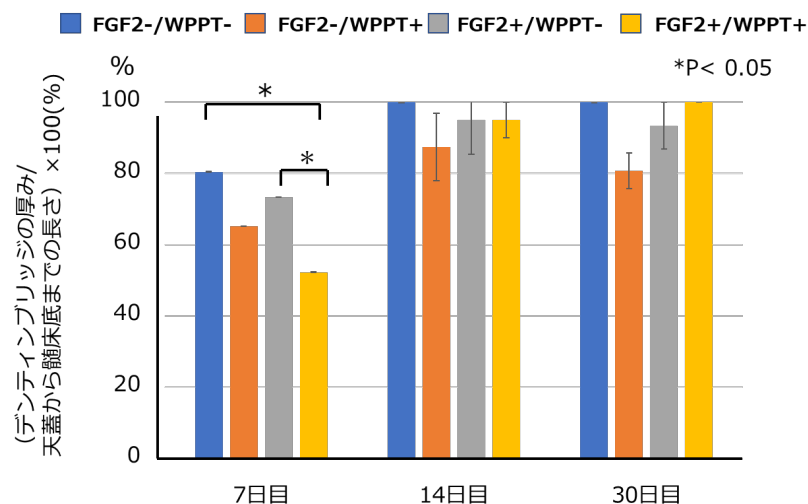


図 8 デンティンブリッジの厚みの測定
各材料により覆髄後、7,14,30日目に形成されたデンティンブリッジの厚みを計測し、
（デンティンブリッジの厚み/天蓋から髄床底までの長さ）×100%を算出し、グラフを
作成した。

次に、形成されたデンティンブリッジの面積を検討したところ、生活歯髄切断後 7 日目では、厚み同様すべての群で有意な差は認められなかった(図 9)．生活歯髄切断後 14 日目から 30 日目ではすべての群で面積がやや増加しており、30 日目における FGF2+/WPPT-群、FGF2+/WPPT+群では、デンティンブリッジの面積が他の 2 群に比べやや大きい傾向を示した．

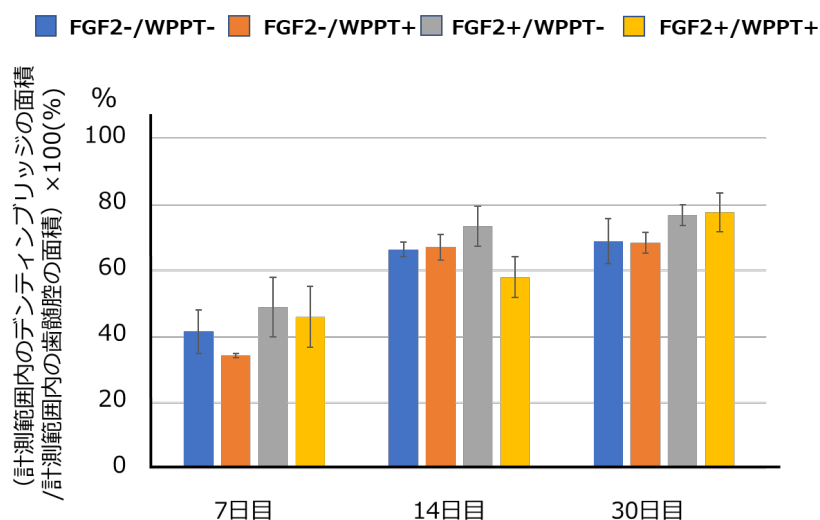


図 9 形成されたデンティンブリッジの割合の測定
各材料により覆髄後、7,14,30日目に形成されたデンティンブリッジの面積を計測し、
(計測範囲内のデンティンブリッジの面積/計測範囲内の元の歯髄腔の面積) ×100%を
算出し、グラフを作成した。

2) 覆髄材による歯髄の炎症性変化の解析

生活歯髄切断後 30 日目の HE 染色標本のうち、数例では残存歯髄に好中球浸潤が観察された(図 10)．好中球浸潤は根部歯髄上部から残存冠部歯髄の領域に認められ、多くの症例では壊死を伴っていた．好中球浸潤は、FGF2-/WPPT-群では、4 本中 1 本 (25%)，FGF2-/WPPT+群では、4 本中 2 本 (50%)，

FGF2+/WPPT-群では、2本中1本（50%）に観察されたが、FGF2+/WPPT+群では好中球浸潤はみられなかった（図 11-A）。また、歯髄壊死は、FGF2-/WPPT-群では、4本中1本（25%）、FGF2-/WPPT+群では、4本中1本（25%）、FGF2+/WPPT-群では、2本中1本（50%）に観察されたが、FGF2+/WPPT+群では歯髄壊死はみられなかった（図 11-B）。

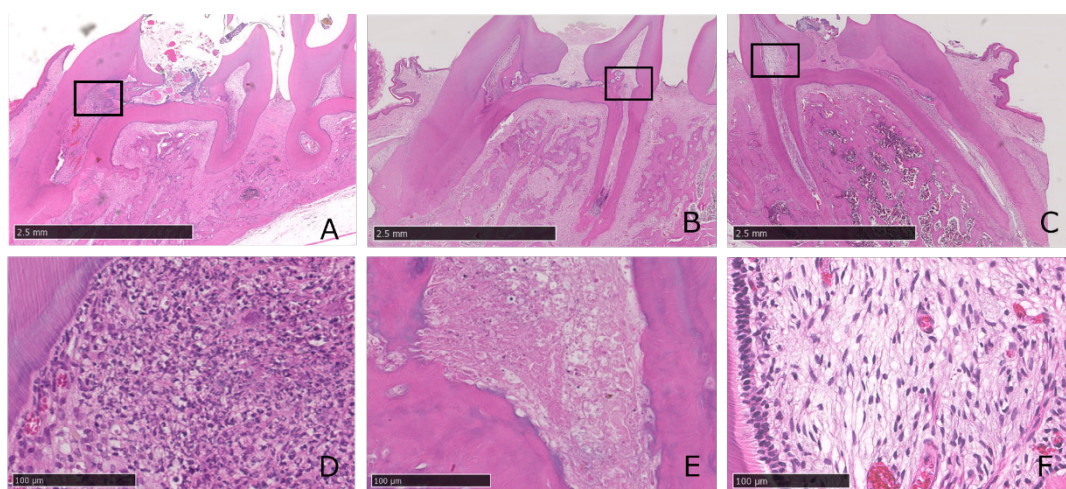


図 10 生活歯髄切断後30日後の歯髄の炎症性変化の解析

A: 歯髄内に好中球の浸潤がみられたもの (FGF2-/WPPT+), B: 歯髄壊死がみられたもの (FGF2-/WPPT-), C: 好中球の浸潤, 歯髄壊死がみられなかったもの (FGF2+/WPPT+).

D,E,Fは, A,B,Cのそれぞれの拡大. スケールバー: A,B,C=2.5mm, D,E,F=100μm

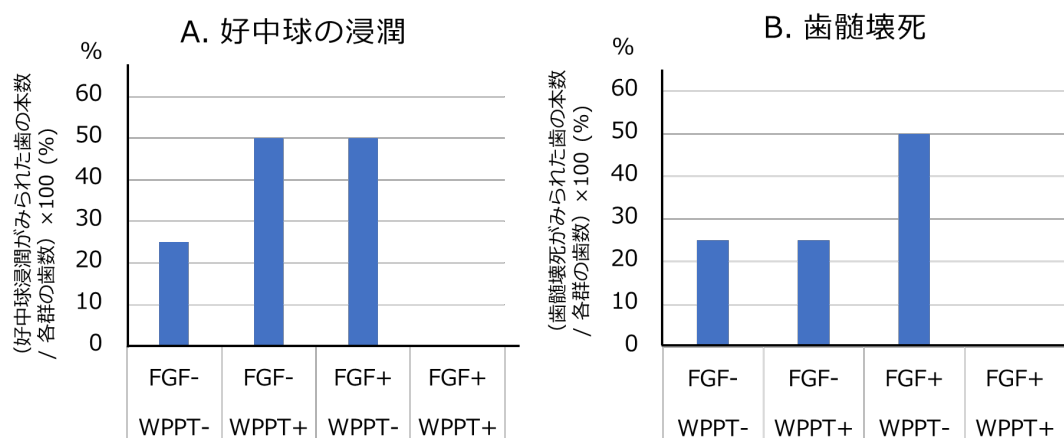


図 11 生活歯髄切断後30日目の歯髄の炎症性変化の解析

各群のサンプルのうち、歯髄に、A. 好中球の浸潤、B. 歯髄壊死がみられたものの割合を算出し、グラフを作成した。

形成されたデンティンブリッジの厚みや面積、残存歯髄の状態を判定し、FGF2+/WPPT+群が最適な組み合わせと考えられ、その機序を検索するため残存歯髄の血管について免疫組織学的に検討した。

3) 残存歯髄にみられる血管の密度の検討

生活歯髄切断後 7 日目、30 日目の標本を用いて、血管内皮細胞のマーカーである CD34 に対する免疫染色を行い、生活歯髄切断処置を行った上顎第一大臼歯の残存歯髄の単位面積当たりの血管数と単位面積当たりの血管腔の面積を計測した。

残存歯髄の血管数は、生活歯髄切断後 30 日目では有意な差はみられなかったが、FGF+/WPPT+群は他 3 群と比較し単位面積当たりの血管数が少ない傾向を示した (図 12-A)。また、単位面積当たりの血管腔の面積も同様に、FGF+/WPPT+群は他 3 群と比較し小さい傾向を示した (図 12-B)。

生活歯髄切断後 7 日目では、FGF+/WPPT+群の血管数は FGF-/WPPT-群に比べ有意に増加していた (図 13-A)。また、FGF-/WPPT+群や FGF+/WPPT-群も、FGF-/WPPT-群に比べ血管数が増加していた。単位面積あたりの血管腔の面積はすべての群でほとんど差がみられなかった (図 13-B)。

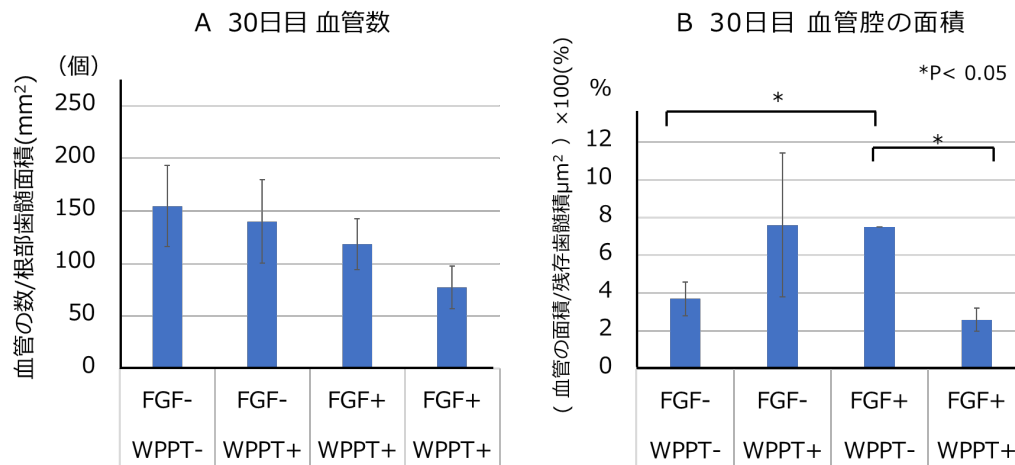


図 12 残存歯髄にみられる血管の密度

A. 生活歯髄切断後30日目の歯髄内の血管数, B. 生活歯髄切断後30日目の歯髄に占める血管腔の面積の割合.

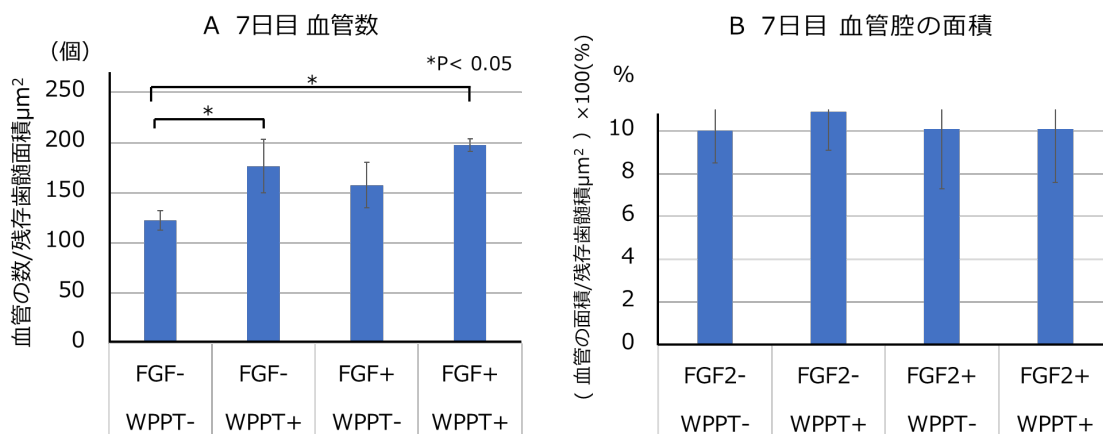


図13 残存歯髄にみられる血管の密度

A. 生活歯髄切断後7日目の歯髄内の血管数, B. 生活歯髄切断後7日目の歯髄に占める血管腔の面積の割合.

考察

生活歯髄切断法は、歯冠歯髄を根管口部で切断し、歯根部歯髄を保存する治療法で、乳歯や幼若永久歯に対する歯髄処置として多く用いられている治療法である。しかし、歯根が完成した永久歯に行うと良好な予後を得ることが困難であり、現在では永久歯に対して施行されることは殆どない。生活歯髄切断法が乳歯や根未完成幼若永久歯に用いられる理由は、乳歯あるいは幼若永久歯では根尖孔が広く歯髄組織に十分な血管の流入があることや、歯髄細胞の増殖活性が高いことが挙げられる。生活歯髄切断法の利点は、根未完成歯の歯根完成を期待できることや治療手技が複雑である根管治療の必要が無いこと、根管治療に伴う偶発事故や根尖歯周組織への障害がないこと、治療成績不良の場合、抜髄、根管治療へ移行できることなどがある。しかし、生活歯髄切断法には抜髄に比べ治療成績がやや劣るなどの問題点もある。その理由としては、生活歯髄切断法によって切断部歯髄に炎症が生じることがあげられる。生活歯髄切断法では、損傷を受けた細胞から化学伝達物質が遊走し、その作用により血管が過度に拡張し、血管内皮細胞が障害される。障害された血管からは血漿タンパクが組織内に漏出し、浮腫が生じる。組織への浸出液が増えると、周囲を硬い象牙質に囲まれた環境下にある歯髄の内圧はさらに増大する。そのため血管が狭窄し、次第に血流量が減少して血栓形成がおこると、さらに還流障害が増

悪、最終的に歯髄壊死に陥る^{27, 28)}。つまり、歯髄の血管の状態が生活歯髄切断法の成否を担っていると考えられることから、本研究では線維芽細胞成長因子であるFGF2に着目した。FGF2は、血管内皮細胞の増殖や管腔形成による強力な血管新生作用を有し、早期に炎症や肉芽組織形成を誘導し、組織の修復や再生を促進することに加え、種々の間葉系細胞の増殖を促進することが知られている¹⁰⁾。

現在、生活歯髄切断法では水酸化カルシウムが広く利用されている²⁸⁾が、水酸化カルシウムは封鎖性が弱く、形成されたデンティンブリッジは多孔質のため、細菌の侵入が生じやすいこと、強アルカリによる歯髄傷害性があることが報告されている²⁸⁾。MTAセメントは、1990年代に水酸化カルシウムに変わる材料として開発された。MTAセメントは水酸化カルシウムと比較して封鎖性がよく、細胞毒性が低いことが報告されている²⁹⁾。組織学的には、MTAによる直接覆髄後、露髄面直下に一層の歯髄変性層が形成され、その後覆髄部近傍で活発な細胞増殖が観察される。次いで覆髄部に線維性基質が形成され、新生象牙芽細胞様細胞の配列が観察される。その後に細管構造を有するデンティンブリッジの形成が確認され、以降経時的に厚みを増して観察されることが報告されている³⁰⁾。新しいケイ酸カルシウム系材料はMTAセメントと同様に細胞毒性がなく、デンティンブリッジの形成を促進することが報告されている^{21, 22)}。また、

MTAセメントと同様に封鎖性が良好であるため、今回の実験において用いた Super-Bondから溶出した残留モノマーによる歯髄炎³¹⁾を防ぐことができたのではないかと考えた。

本研究では、FGF2とケイ酸カルシウム系材料Vericom Well Pulp PT (WPPT) を用い、生活歯髄切断後の歯髄の修復について検討した。

本実験で形成されたデンティンブリッジの量的な検討では、観察対象とした髄床底から天蓋までの領域では、どの組み合わせの覆髄材でも14日目までに厚みが90%以上、面積が60%以上形成され、その後30日目まではその速度がやや緩やかとなることが明らかとなった。厚みは14日目、30日目でFGF2-/WPPT-群のほとんどが100%近くに達し、他の実験群に比べ優れていたが、面積では30日目ではFGF2を含むFGF2+/WPPT-群、FGF2+/WPPT+群がFGF2を含まない2群と比較して優れていた。FGF2-/WPPT-群では、デンティンブリッジの厚みが他の群よりも優れていたにもかかわらず、面積が他の群より劣っていたことから、この群では形成された象牙質が質的に一様でない可能性が示唆された。また、FGF2の細胞増殖や細胞分化を誘導する作用を総合的に考えると、FGF2は生活歯髄切断後の歯髄損傷部に遊走する歯髄幹細胞に作用し、歯髄幹細胞の増殖や象牙芽細胞への分化を誘導し、デンティンブリッジの形成を促進した可能性が考えられた。

形成されたデンティンブリッジの厚みや面積などの量的評価では、FGF2+/WPPT+がやや優れていたものの有意な差はみられなかったが、FGF2+/WPPT+群では、30 日後の残存歯髄に、他の群で観察された好中球浸潤と歯髄壊死がみられず（図 13）、FGF2 と WPPT の併用による優位性が認められた。これらの所見は、覆髄剤の評価はデンティンブリッジの厚みや面積などの量的評価だけでは不十分で、歯髄の状態を組織学的に観察する必要があることを示している。

FGF2 と WPPT の併用による優位性の機序を明らかにするため、残存歯髄の血管数の評価を行った。生活歯髄切断後 30 日目では、FGF2+/WPPT+群における残存歯髄の血管数および血管腔の面積が他の群に比べ少なかった。これは、FGF2+/WPPT+群では壊死や好中球浸潤がみられなかったことに関連しており、FGF2+/WPPT+群では、他の群と異なり残存歯髄での炎症が消退していることや、形成されたデンティンブリッジの封鎖性が優れていると考えられた。

生活歯髄切断後 7 日目では、FGF2+/WPPT+群の血管数が FGF2-/WPPT-群に比べ平均値で約 1.5 倍増加していたが、血管腔の面積はすべての群が同程度であった（図 13）ことから、FGF2+/WPPT+群では小型の血管が増生していたと考えられ、血管新生が盛んに起きていたことが示唆された。歯髄は周囲を硬組織で囲まれ、根尖孔のみから血液供給を受けていることから、血管拡張に伴う組織圧

の上昇は血管を圧迫し、歯髄の循環障害を生じる原因となることが考えられる

³²⁾ . FGF2-/WPPT-群, FGF2-/WPPT+群, FGF2+/WPPT-群では、歯髄の循環障害が生じ、正常な創傷治癒の過程が起きなかったため生活歯髄切断後 30 日後にも炎症が慢性化して持続していることが推察された。

一方、FGF2+/WPPT+群では正常な肉芽形成と吸収に必要な十分な血管新生が生じたため循環障害が起らず、壊死が観察されなかったのではないかと考えられた。

以上の結果より FGF2 と WPPT を併用すると、デンティンブリッジの早期の形成が促進され、残存歯髄の炎症が抑制されることが示された。また歯髄の壊死が抑制され、生活歯髄切断後の歯髄の保存が可能となることが示唆された。

これらの結果が FGF2 と WPPT の併用による直接作用であるのかを証明することは今回の検討のみでは困難である。今後は歯髄細胞を用いて、FGF2 と WPPT の併用による歯髄修復のメカニズムを明らかにする必要がある。生活歯髄切断法を成人に応用することを可能とする覆髄剤の開発は、歯髄の保存、高齢者の残存歯数増加につながり、オーラルフレイルの予防を介して健康寿命の延長に寄与するものと考えられる。

結論

FGF2 と WPPT の併用によりデンティンブリッジの早期の形成が促進され，残存歯髓の壊死が抑制されることで，生活歯髓切断後の歯髓の保存が可能となることが示唆された．

謝辞

本研究に多大なるご支援とご協力をいただきました北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学講座血管生物分子病理学教室 樋田京子教授，東野史裕准教授，松田彩特任助教，間石奈湖助教，北海道口腔病理診断所 所長 北村哲也先生（旧・血管生物分子病理学教室特任講師）ならびに血管生物分子病理学教室 教室員各位，口腔健康科学講座歯科保存学教室 佐野英彦教授ならびに戸井田侑先生（同教室 旧大学院生，現・口腔病態学講座薬理学教室 学術研究員），大学院 4 年生 Rafiqul Isram 先生，口腔病態学講座薬理学教室 旧助教 南川元先生に厚く御礼申し上げます．

参考文献

- 1) Ward J: Vital pulp therapy in cariously exposed permanent teeth and its limitations. Aust Endod J 28: 29-37, 2002.
- 2) Takahashi K: Changes in the pulpal vasculature during inflammation. J Endod 16: 92-7, 1990.
- 3) Gronthos S, Brahimi J, Li W, et al: Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J Dent Res 81: 531-535, 2002.
- 4) Cox CF, Tarim B, Kopel H, et al: Technique sensitivity: biological factors contributing to clinical success with various restorative materials. Adv Dent Res 15: 85-90, 2001.
- 5) Armelin H A: Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth. Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.) 70: 2702-2706, 1973.
- 6) Gospodarowicz D: Purification of fibroblast growth factor from bovine pituitary. J. Biol. Chem. 250: 2515-2520, 1975.
- 7) Cuevas R, Burgos J, Baird A: Basic fibroblast growth factor (FGF) promotes cartilage repair in vivo. Biochem Biophys Res Commun

156: 611– 618, 1988.

8) Globus R K, Plouet J, Gospodarowicz D : Cultured bovine bone cells synthesize basic fibroblast growth factor and store it in their extracellular matrix. *Endocrinology* 124: 1539–1547, 1989.

9) Sato Y, Shimada T, Takaki R : Autocrinological role of basic fibroblast growth factor on tube formation of vascular endothelial cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 1098–1102, 1991.

10) Takayama S, Yoshida J, Hirano H , et al: Effects of basic fibroblast growth factor on human gingival epithelial cells. *J Periodontol* 73: 1467–1473, 2002.

11) Akita S, Akino K, Imaizumi T, et al: Basic fibroblast growth factor accelerates and improves second-degree burn wound healing. *Wound Repair Regen* 16: 635–41, 2008.

12) Murakami S: Periodontal tissue regeneration by signaling molecule(s): what role does basic fibroblast growth factor (FGF-2) have in periodontal therapy? *Periodontol* 2001, 56: 188–208, 2011.

13) Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, et al: Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth after

pulp capping with calcium hydroxide. J Dent Res 75: 1590-7, 1996.

14) Zarrabi M H, Javidi, M, Jafarian, A H, et al:

Immunohistochemical expression of fibronectin and tenascin in human tooth pulp capped with mineral trioxide aggregate and a novel endodontic cement. J Endod 37: 1613-8, 2011.

15) Chong B S, Pitt Ford T R, Hudson M B: A prospective clinical study of Mineral Trioxide Aggregate and IRM when used as root-end filling materials in endodontic surgery.2003. Int Endod J 42: 414-20, 2009.

16) Main C, Mirzayan, N, Shabahang S, Torabinejad M: Repair of root perforations using mineral trioxide aggregate: a long-term study. J Endod 30: 80-3,2004.

17) Mente J, Geletneky B, Ohle M, et al: Mineral trioxide aggregate or calcium hydroxide direct pulp capping: an analysis of the clinical treatment outcome. J Endod 36: 806-13, 2010.

18) Camilleri J & Pitt Ford T. R: Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. International Endodontic Journal 39: 747-754, 2006.

- 19) Graham L, Cooper P, Cassidy N, et al.: The effect of calcium hydroxide on solubilization of bioactive dentin matrix components, *Biomaterials*, 27: 2865–2873, 2006.
- 20) Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, et al: Dissolution of bioactive dentin matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent* 35: 636–642, 2007.
- 21) Laurent P, Camps J, De Méo MLaurent, et al: Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5) -based posterior restorative material. *Dent Mater* 24:1486–94, 2008.
- 22) Okiji T, Yoshida K: Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent* 2009: 464280, 2009.
- 23) Tabata Y, Nagano A. Ikada Y, et al: Biodegradation of hydrogel carrier incorporating fibroblast growth factor. *Tissue Eng* 5: 127–38, 1999.
- 24) Ishimatsu H, Kitamura C. Morotomi T, et al: Formation of dentinal bridge on surface of regenerated dental pulp in dentin defects by controlled release of fibroblast growth factor-2 from

gelatin hydrogels. J Endod 35: 858-65, 2009.

25) Kikuchi N. Kitamura C. Morotomi T, et al: Formation of dentin-like particles in dentin defects above exposed pulp by controlled release of fibroblast growth factor 2 from gelatin hydrogels. J Endod 33: 1198-202, 2007.

26) 石橋眞澄著: 歯内療法学論考, 末永書店: 11-16, 1987.

27) Samuel Seltzer/I. B. Bender 著: 戸田忠夫監訳: 医歯薬出版株式会社: 129, 1988.

28) Hilton, T.J: Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. Oper Dent 34: 615-25, 2009.

29) Torabinejad M, Parirokh M: Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--part II: leakage and biocompatibility investigations. J Endod 36: 190-202, 2010.

30) Kuratate M, Yoshioka K, Shigetani Y, Yoshioka N, Ohshima H, and Okiji T: Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. J Endod, 34: 970-974, 2008

31) Eiichi Yoshii: Cytotoxic effects of acrylates and

methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity.

Journal of Biomedical materials Research 37: 517-524, 1997.

32) Syngcuk Kim, Jutta Dörscher Kim MA: Hemodynamic regulation of the dental pulp in a low compliance environment. Journal of

Endodontics 15: 404-408, 1989.