



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13476
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/91598
Type	doctoral thesis
File Information	Mitsuhiko_Nishimi.pdf



博士論文

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

平成 31 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

西見光彦

緒言

歯の外傷には歯冠、歯根の破折、異常な動揺や歯の転移を伴わない震盪、歯の転移はないが動揺を伴う亜脱臼、歯軸方向以外への転移を伴う側方脱臼、歯の根尖方向への転移を伴う陥入、切縁方向への転移を伴う挺出、歯槽骨からの歯の完全な脱離を伴う完全脱臼がある。その中でも、一番重篤なものの一つに完全脱臼があり、受傷の約1.5~16%¹⁾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²⁾。再植が遅れると予後不良となる場合が多く、Guedesらの研究では、外傷後1~8年間で34.34%の炎症性歯根吸収が発生していたと報告されている³⁾。

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が主な原因とされているが、歯髄壊死とも関連がある⁴⁾。国際歯科外傷学会 (IADT)の歯科外傷ガイドでは、1時間以上経過した歯に対しては、口腔外での歯髄処置が推奨されている⁵⁾。脱臼歯の治療に使用する根管貼薬剤には、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必要と思われる。現在、一般的には水酸化カルシウム(Ca(OH)₂)製剤が広く使用されている。Ca(OH)₂は、抗菌作用⁶⁾、抗炎症作用⁷⁾、硬組織形成能⁸⁾、歯根吸収抑制作用⁹⁾を持つため、外傷歯の根管貼薬剤として適している。しかし、Ca(OH)₂の根尖孔外への漏出は合併症を引き起こす可能性がある¹⁰⁾。また、長期使用は歯根象牙質を脆弱化させるとの報告があり¹¹⁾、長期の使用は難しい。そのため、新規な根管貼薬剤の開発が期待されている。

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^{12,13)}、炎症性サイトカインであるTNF- α 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⁷⁾。これらの報告からNACが歯髄の細菌感染、外傷による炎症に対応することができると考えられる。ここで、歯根吸収抑制作用を示せば根管治療薬としての使用を検証することが可能と思われる。しかし、歯根吸収を抑制するとの報告は多くない。

本研究では、NACの外傷歯の歯根吸収に対する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、歯根吸収に対する根管貼薬剤としてNACを使用した。併せて、RAW264.7細胞に破骨細胞分化誘導因子(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANKL)とNACとを作用させ、破骨細胞分化に対するNACの効果を検討した。

材料と方法

1. ラット外傷歯モデルの作製

実験動物には生後 6 週齢の SD 系雄性ラット (Sankyo Labo Service Corporation, INC. Tokyo, Japan) を用いた。根管貼薬材料には *N*-Acetyl-L-cysteine (NAC: SIGMA-ALDRICH, MO, USA) を使用した。本実験の動物実験は、国立大学法人北海道大学動物実験委員会の承認を受け、同指針に従って行った (計画承認番号: 第 14-0063 号)。ラットにペントバルビタール (ソムノペンチル[®], Kyoritsuiseiyaku Corporation, Tokyo, Japan) およびイソフルラン (エスカイン[®], Pfizer, Tokyo, Japan) を用いて全身麻酔を施した後、左右の上顎第一臼歯を抜歯し、1 時間乾燥させた。ラウンドバーを用いて天蓋を除去し、K-ファイルにて 25 号まで拡大後に次亜塩素酸ナトリウム (ネオクリナー[®], Neo Dental Chemical Products CO., LTD. Tokyo, Japan) を使用し、根管内を洗浄した。乾燥後再植のみを行った歯を control とし、NAC で根管貼薬後に再植したものを実験群とした (1 mM NAC, 5 mM NAC, 10 mM NAC)。根尖側を接着性レジンセメント (スーパーボンド[®], Sun Medical Company, Ltd, Shiga, Japan)、歯冠側をグラスアイオノマーセメント (フジアイオノマータイプ II[®], GC, Tokyo, Japan) で封鎖、乾燥後に再植を行い、対合歯を切削した。2 週間後に安楽死させ、4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako pure Chemical, Osaka, Japan) を用いて灌流固定を行い、上顎骨を摘出して浸漬固定を行った。EDTA で試料を脱灰、通法に従ってパラフィン包埋し、歯軸に対して垂直に厚さ 5 μm の薄切標本を作製した。その後、ヘマトキシリン・エオジン染色 (H-E 染色) を行い、歯根の断面を撮影した。Image J (NIH, MD, USA) を用いて歯根面積を測定し、未処置歯の平均歯根面積を基準として各実験群の残存歯根面積 (%) を測定した (n=4)。さらに Fast Red Violet LB Salt (SIGMA-ALDRICH) を含む酒石酸耐性酸性フォスファターゼ染色 (TRAP 染色) を行い、歯根表面に隣接した破歯細胞の観察を光学顕微鏡を用いて行った (n=4)。

2. 細胞の準備

マウス腹水由来の単球マクロファージである RAW264.7 細胞 (ATCC no. TIB-71TM; VA, USA) を破骨細胞の前駆細胞として使用した。RAW264.7 細胞は RANK を発現しており、M-CSF の刺激がなくても RANKL の刺激により破骨細胞に分化することができる¹⁴⁾。10% 牛胎児血清 (Invitrogen, CA, USA) と 66.5 $\mu\text{g/l}$ 硫酸カナマイシン (Meiji Seika, Tokyo, Japan) を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地 (D-MEM: Wako Pure Chemical) を用いて培養した。100 mm スタンダードディッシュ (BD Falcon, NJ, USA) 中で D-MEM を用いて細胞を、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%

CO₂の環境下にて培養し、Dulbecco's phosphate-buffered saline (Ca²⁺, Mg²⁺不含: PBS)で洗浄後、0.48 mM EDTA 含有 PBS を用いて細胞を回収した。

3. 生細胞数の測定

培養した RAW264.7 細胞を 96 well プレートに、1 well につき 1.0×10^4 個の細胞密度となるように播種した。細胞を 10% 牛胎児血清、434.4 mg/l L-アラニル-L-グルタミン (Wako Pure Chemical), 72.7 mg/l L-アスコルビン酸 2-リン酸 (SIGMA-ALDRICH), 66.5 μ g/l 硫酸カナマイシンを含む α -minimum essential 培地 (α -MEM: Wako Pure Chemical) に、pH7.2 に調整した 100 mM NAC stock solution を、最終濃度が 1 mM, 5 mM, 10 mM となるよう添加した。NAC 無添加を control とし、37 °C, 5% CO₂の環境下にて培養した。プレートに RAW264.7 細胞を播種した日を培養 1 日目とし、3 日目に培養液交換、5 日目に細胞内の ATP 量を測定し、生細胞数を確認した。測定には ViaLight™ plus kit (LONZA, MD, USA) を使用し、Wallac 1420 ARVOSX マルチラベルカウンター (PerminElmer, Inc, MA, USA) にて蛍光測定を行った (n=8)。

4. 破骨細胞分化の確認

培養した RAW264.7 細胞を 24 well プレートに、1 well につき 1.0×10^4 個の細胞密度となるように播種した。生細胞の確認時に使用した α -MEM に最終濃度 50 ng/ml の RANKL のみを添加したものを control, RANKL と同時に NAC を添加したものを実験群 (1 mM NAC, 5 mM NAC, 10 mM NAC) とし、37 °C, 5% CO₂の環境下にて培養した。プレートに RAW264.7 細胞を播種した日を培養 1 日目とし、3 日目に培養液交換、5 日目に PBS にて洗浄した後に 10% ホルマリンにて固定し、その後、蒸留水で洗浄した。Fast Red Violet LB Salt を含む TRAP 染色液 (pH 5.0) を用いて染色を行った。光学顕微鏡を用いて破骨細胞の形態を観察した。さらに、破骨細胞のうち 2 核から 7 核のものは各核数で、8 核以上を巨大破骨細胞として、各細胞数を計測した (n=4)。

5. real-time PCR

培養した RAW264.7 細胞を 6 well プレートに、1 well につき 5.0×10^4 個の細胞密度となるように播種した。生細胞の確認時に使用した α -MEM に最終濃度 50 ng/ml の RANKL のみを添加したものを control, RANKL と同時に NAC を添加したものを実験群 (1 mM NAC, 5 mM NAC, 10 mM NAC) とし、12 時間, 24 時間, 5 日間培養した。培養後、細胞から Trizol (Invitrogen) を用いて RNA を回収した。Rever Tra Ace- α FSK-101 (Toyobo, Osaka, Japan) にて逆転写反応を行い、1.0 μ g の RNA から cDNA を合成した。real-time PCR は ABI7300 (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, INC., MA, USA) を用いた。プライマー (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) は、TRAP (Mm00475698_m1), RANK (Mm00437132_m1), cathepsin-K (Cath-K: Mm00484039_m1), NFATc1

(Mm00479445_m1), DC-STAMP (Mm04209236_m1), OC-STAMP (Mm00512445_m1), CD47 (Mm00495011_m1), Nox1 (Mm01340621_g1)を使用した。各サンプルの遺伝子発現量は、GAPDH の発現量を用いて標準化して $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法にて計算した (n=4)。

6. 統計学的分析

すべてのデータは平均値 \pm S. D. で示した。統計学的有意差の検定には Bonferroni's test を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結果

1. 組織学的所見

未処置歯では歯根象牙質周囲に石灰化物を認めた。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 (図 1-A)。各濃度の NAC を貼薬して再植したところ、1 mM NAC で歯根の吸収、多核巨細胞、及び破歯細胞を認めたが、5 mM NAC、10 mM NAC では吸収窩、破歯細胞共に減少傾向を示した (図 1-A)。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 (図 1-B)。

2. NAC が破骨細胞分化に与える影響

破骨細胞分化に対する NAC の効果を観察した。生細胞を確認するために RAW264.7 細胞に各濃度の NAC を添加して 5 日間培養した後に細胞内の ATP 量を測定した。NAC 無添加 (control) と比較して、本実験では NAC 濃度に関係なく ATP の減少を示さなかった (図 2-A)。RAW264.7 細胞に RANKL のみを加えた control と、各濃度の NAC を作用させた実験群の破骨細胞数を測定した。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 (図 2-B)。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 (図 2-C)。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 (図 2-D)。

3. 破骨細胞関連遺伝子の発現量

破骨細胞関連遺伝子の mRNA の発現量を定量するために、real-time PCR を行った。RANKL のみを添加したものを control とし、各濃度の NAC を 12 時間、24 時間、5 日間作用させたものを実験群とした。mRNA の発現量は 12 時間では DC-STAMP の 5 mM NAC、10 mM NAC で、24 時間では NFATc1、DC-STAMP の 5 mM NAC、10 mM NAC で有意に減少していた (図 3-A, B, C, D, E)。5 日間では RANK の 5 mM NAC、10 mM NAC、NFATc1 の 5 mM NAC、DC-STAMP の 5 mM NAC、10 mM NAC、CD47 の 5 mM NAC、10 mM NAC、OC-STAMP の 5 mM NAC、Nox1 の 5 mM NAC、10 mM NAC、cathepsin K の 5 mM

NAC, 10 mM NAC, TRAP の 1 mM NAC で有意に減少していた (図 4-A, B, C, D, E, F, G, H).

考察

本実験では、ラット外傷歯モデルを使用して NAC を貼薬後に再植し、歯根吸収に影響するかどうか、及び RAW264.7 細胞に RANKL と NAC を添加し、破骨細胞分化に影響するかどうかを検討した。脱臼歯は短い乾燥時間、もしくは適切な保存液にて保存されていれば、再植後の予後は比較的良好である^{15,16}。しかし、脱臼歯の乾燥時間が長くなり、再植が遅延すると歯根膜組織、及び歯髓組織の壊死が起こり、予後不良例として歯根吸収が発生するケースが多くなる。IADT のガイドライン⁵)では、1 時間以上の乾燥状態で再植の遅延としているため、本実験では外傷歯モデルを作製するにあたって乾燥時間を 1 時間とした。組織学的所見では control, 及び 1 mM NAC において破骨細胞を有する吸収窩を認め、5 mM NAC, 10 mM NAC では吸収窩や歯根に隣接する破骨細胞の減少傾向を示した (図 1-A)。歯根の面積でも 10 mM NAC で歯根吸収抑制を示した (図 1-B)。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髓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⁴)。そのため、control では脱臼による歯根膜の壊死、及び歯髓壊死が原因により歯根吸収が発生したと考えられた。しかし、1 mM NAC では抜髄、貼薬をしているにも関わらず、control と同等の歯根吸収を認めた。これは歯根膜の壊死、歯髓壊死だけが歯根吸収の原因ではなく、脱臼時の機械的刺激により破骨細胞が誘導された可能性が考えられた。

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 (図 2-B)、総破骨細胞数でも control と比較して減少した。核数別では 2 核, 3 核で 10 mM NAC が、4 核, 5 核で 5 mM NAC が有意に減少した (図 2-C, D, 表 1)。RAW264.7 細胞に NAC を添加して生細胞を確認するために、細胞内の ATP 量を測定したところ、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 (図 2-A)。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。さらに、少数核細胞の減少は分化過程の初期段階で、多数核の減少は後期段階である細胞同士の融合過程で抑制された可能性が考えられた。

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 NFATc1¹⁷)や RANKL の受容体である RANK¹⁸)が必須である。破骨細胞の融合には DC-STAMP が重要¹⁹)であり、少数核同士の破骨細胞融合に関係する CD47²⁰)、多数核の融合に関与する OC-

STAMP²¹⁾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²²⁾。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²³⁾。

本研究において、10 mM NAC は外傷に起因する歯根吸収に対して抑制的に働いた(図 3, 4, 表 2)。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。しかし、10 mM NAC は 2 核以上の破骨細胞数の減少を認めたが、real-time PCR の結果からは破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP の発現量において、control との差を認めなかった。TRAP は単核の破骨細胞でも発現しているが、本実験では破骨細胞の計測を 2 核以上としているため、結果の不一致が生じていると考えられた。多数核細胞の数は control と有意差を認めなかった。これは多数核細胞の融合に関係する OC-STAMP の発現量において control と 10 mM NAC 間で有意差を認めなかったことと一致する。また、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。本研究の結果では ROS を生成する NADPH オキシダーゼ(NADPH oxidase; Nox)²⁴⁾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。

今回の実験において、ラットの歯根周囲には石灰化物が確認できた。歯根象牙質との境界が存在せず一体化している部分も多いため、石灰化物も含めて歯根として NAC の効果を検討した。5 mM NAC は real-time PCR の結果からは 10 mM NAC と大きな違いはなかったが、歯根吸収において control との有意差を認めなかった。細胞培養では NAC の濃度が変化せずに作用するが、根管貼薬では根尖側、歯冠側共に封鎖している関係により歯根周囲の組織には象牙細管からの放出しか期待できない。そのため、使用した濃度よりも低い値として作用している可能性が考えられた。根管貼薬に適した濃度に関しては今後の研究で確認していく必要があると考えられた。

本結果より、10 mM NAC は破骨細胞の分化、融合をつかさどる転写因子や遺伝子を抑制することでラット外傷歯モデルにおける歯根吸収を抑制する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吸収される可能性が高いと考えられた。また、Ca(OH)₂ (pH 12)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^{25,26)}。今回の研究で使用した NAC は pH を中性

(pH 7.2)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た。NACは以前に抗菌作用、抗炎症作用も明らかにされているため、NACは外傷歯に対する根管貼薬剤として選択肢の一つとなり得る可能性が考えられた。

ラットとヒトの歯周組織には組織学的に類似点があるとされている²⁷⁾。そのため、ラットの歯を使用した実験は現在までに行われて来た²⁸⁾。本研究結果に基づきNACの臨床応用を検討する際には、根管貼薬に適した濃度、象牙質の強度に対するNACの影響、さらに、ヒトの歯を使用した実験も含めて今後さらなる研究が必要と思われる。

結論

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。以上より歯根吸収に対するNACの応用の可能性が示唆された。

謝辞

本稿を終えるにあたり数々のご援助、ご協力をいただきました北海道大学歯学研究院・学術支援部の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Andreasen JO: Etiology and pathogenesis of traumatic dental injuries. A clinical study of 1,298 cases. Scand J Dent Res 78: 329-342, 1970.
- 2) Zhang X, Gong Y: Characteristics of avulsed permanent teeth treated at Beijing Stomatological Hospital. Dent Traumatol 27: 379-384, 2011.
- 3) Guedes OA, Borges AH, Bandeca MC, Estrela CRA, Ana Helena, AlencarAHG, Estrela C: Analysis of 261 avulsed teeth of patients treated in a dental urgency service. J Dent Res Rev 2: 25-29, 2015.
- 4) Andreasen JO: Relationship between surface and inflammatory resorption and changes in the pulp after replantation of permanent incisors in monkeys. J Endod 7: 294-301, 1981.
- 5) Flores MT, Andersson L, Andreasen JO, Bakland LK, Malmgren B, Barnett F, Bourguignon C, DiAngelis A, Hicks L, Sigurdsson A, Trope M, Tsukiboshi M, von Arx T; IADT: Guidelines for the management of traumatic dental injuries. II. Avulsion of permanent teeth. Dent Traumatol 23: 130-136, 2007.

- 6) Silva LA, Romualdo PC, Silva RA, Souza-Gugelmin MC, Pazelli LC, De Freitas AC, Faria G, Nelson-Filho P: Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide With or Without Chlorhexidine as Intracanal Dressing in Primary Teeth With Apical Periodontitis. *Pediatr Dent* 39: 28-33, 2017.
- 7) Pinar Karapinar S, Ulum YZ, Ozcelik B, Dogan Buzoglu H, Ceyhan D, Balci Peynircioglu B, Aksoy Y: The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- α and TGF- β 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol* 68: 48-54, 2016.
- 8) Wang S, Sasaki Y, Ogata Y: Calcium hydroxide regulates bone sialoprotein gene transcription in human osteoblast-like Saos2 cells. *J Oral Sci* 53: 77-86, 2011.
- 9) Lengheden A, Blomlöf L, Lindskog S: Effect of immediate calcium hydroxide treatment and permanent root-filling on periodontal healing in contaminated replanted teeth. *Scand J Dent Res* 99: 139-146, 1991.
- 10) Sharma S, Hackett R, Webb R, Macpherson D, Wilson A: Severe tissue necrosis following intra-arterial injection of endodontic calcium hydroxide: a case series. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105: 666-669, 2008.
- 11) Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC: Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* 18: 134-137, 2002.
- 12) Moon JH, Jang EY, Shim KS, Lee JY: In vitro effects of N-acetyl cysteine alone and in combination with antibiotics on *Prevotella intermedia*. *J Microbiol* 53: 321-329, 2015.
- 13) Amaral EP, Conceição EL, Costa DL, Rocha MS, Marinho JM, Cordeiro-Santos M, D'Império-Lima MR, Barbosa T, Sher A, Andrade BB: N-acetyl-cysteine exhibits potent anti-mycobacterial activity in addition to its known anti-oxidative functions. *BMC Microbiol* 16: 251, 2016.
- 14) Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, Yoshida T, Yokochi T: Receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells via augmented production of macrophage-colony-stimulating factor. *Microbiol Immunol*, 52: 585-590, 2008.
- 15) Leite MC, Okamoto T: The influence of extra-oral time upon healing after tooth replantation. A histological study in rat incisors. *J Nihon Univ Sch Dent* 26: 316-330, 1984.
- 16) Pettiette M, Hupp J, Mesaros S, Trope M: Periodontal healing of extracted dogs' teeth air-dried for extended periods and soaked in various media. *Endod Dent*

- Traumatol 13: 113-118, 1997.
- 17) Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell* 3: 889-901, 2002.
 - 18) Dougall WC, Glaccum M, Charrier K, Rohrbach K, Brasel K, De Smedt T, Daro E, Smith J, Tometsko ME, Maliszewski CR, Armstrong A, Shen V, Bain S, Cosman D, Anderson D, Morrissey PJ, Peschon JJ, Schuh J: RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev* 13: 2412-2424, 1999.
 - 19) Xing L, Xiu Y, Boyce BF: Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop* 3: 212-222, 2012.
 - 20) Lundberg P, Koskinen C, Baldock PA, Löthgren H, Stenberg A, Lerner UH, Oldenborg PA: Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRPalpha-interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352: 444-448, 2007.
 - 21) Witwicka H, Hwang SY, Reyes-Gutierrez P, Jia H, Odgren PE, Donahue LR, Birnbaum MJ, Odgren PR: Studies of OC-STAMP in Osteoclast Fusion: A New Knockout Mouse Model, Rescue of Cell Fusion, and Transmembrane Topology. *PLoS One* 10: e0128275, 2015.
 - 22) Troen BR: The role of cathepsin K in normal bone resorption. *Drug News Perspect* 17: 19-28, 2004.
 - 23) Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY: A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood* 106: 852-859, 2005.
 - 24) Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW: Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74: 1141-1148, 1994.
 - 25) Rosenberg B, Murray PE, Namerow K: The effect of calcium hydroxide root filling on dentin fracture strength. *Dent Traumatol* 23: 26-29, 2007.
 - 26) Batur YB, Erdemir U, Sancakli HS: The long-term effect of calcium hydroxide application on dentin fracture strength of endodontically treated teeth. *Dent Traumatol* 29: 461-464, 2013.
 - 27) Klausen B: Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol* 62: 59-73, 1991.
 - 28) Esteves JC, Marão HF, Silva PI, Poi WR, Panzarini SR, Aranega AM, Ribeiro ED, Sonoda CK: Delayed tooth replantation following root canal filling with

calcium hydroxide and MTA: Histomorphometric study in rats. Arch Oral Biol
60: 1254-1262, 2015.

表 1 破歯細胞数における NAC の効果

	1 mM NAC	5 mM NAC	10 mM NAC
破歯細胞数(2核以上)	—	↓	↓
2, 3核	—	—	↓
4, 5核	—	↓	—

表 2 破骨細胞関連遺伝子の発現量における NAC の効果

		1 mM NAC	5 mM NAC	10 mM NAC
12 h	RANK	—	—	—
	NFATc1	—	—	—
	TRAP	—	—	—
	DC-STAMP	—	↓	↓
	CD47	↓	↓	—
24 h	RANK	—	—	—
	NFATc1	—	—	↓
	TRAP	—	—	—
	DC-STAMP	—	—	↓
	CD47	—	—	—
Day 5	RANK	↓	↓	↓
	NFATc1	—	↓	—
	TRAP	↓	—	—
	DC-STAMP	↓	↓	↓
	CD47	↓	↓	↓
	OC-STAMP	—	↓	—
	Cath-K	↓	↓	↓
	Nox1	—	↓	↓

図1-A

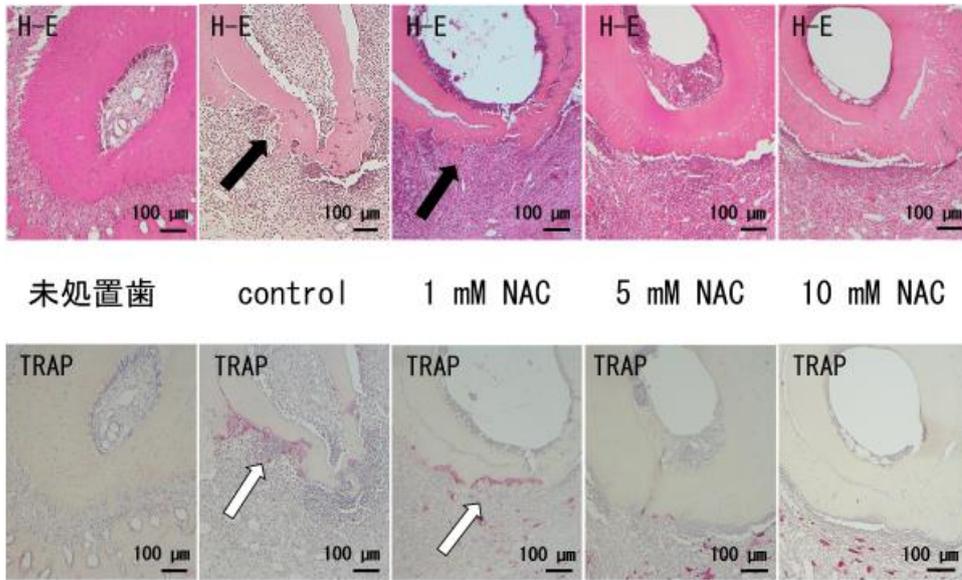


図1-B

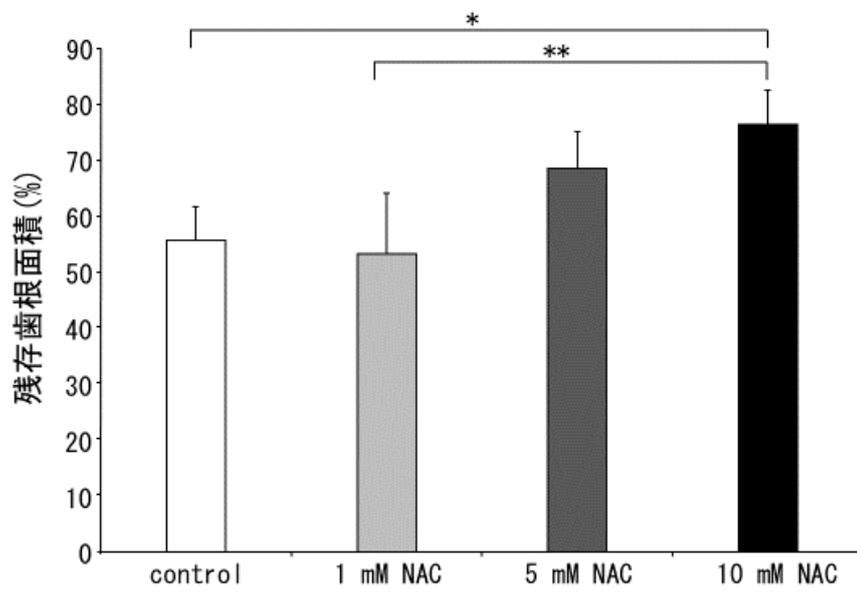


図2-A

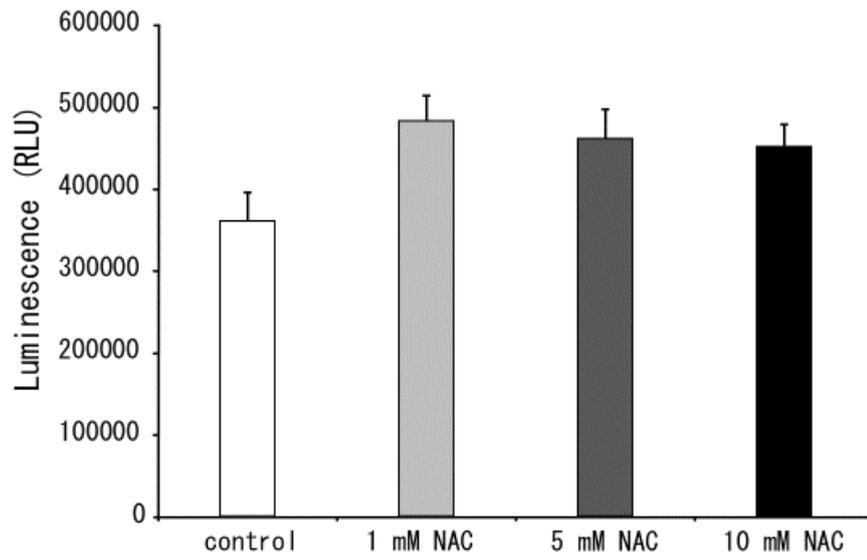


図2-B

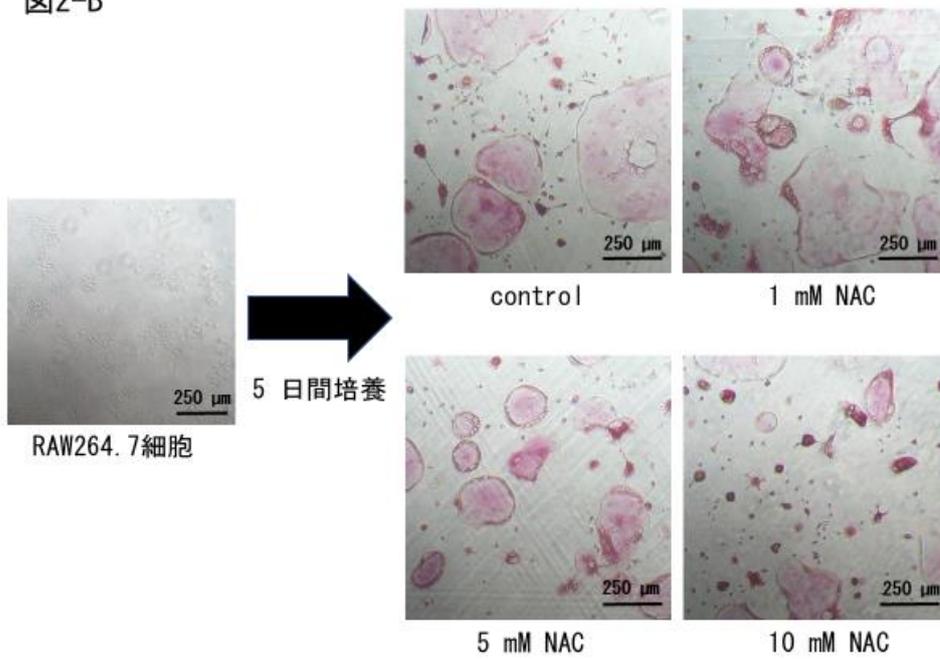


図2-C

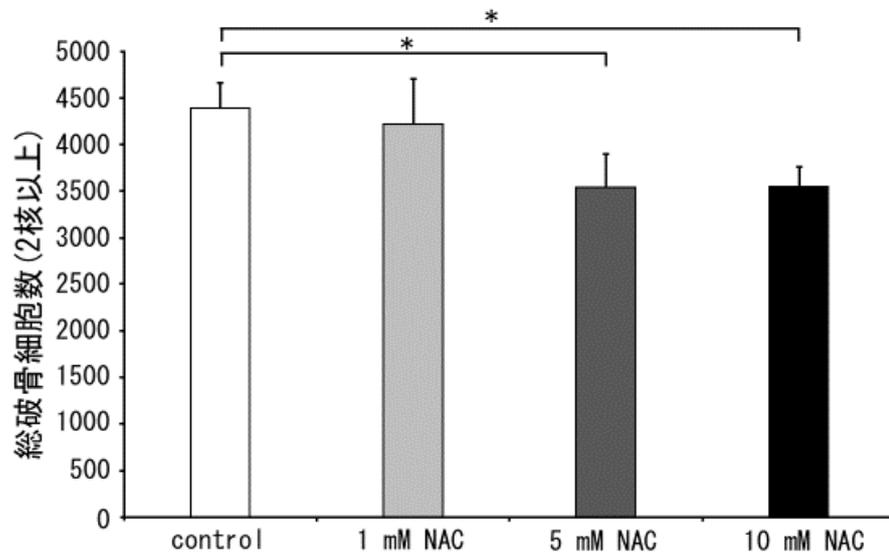
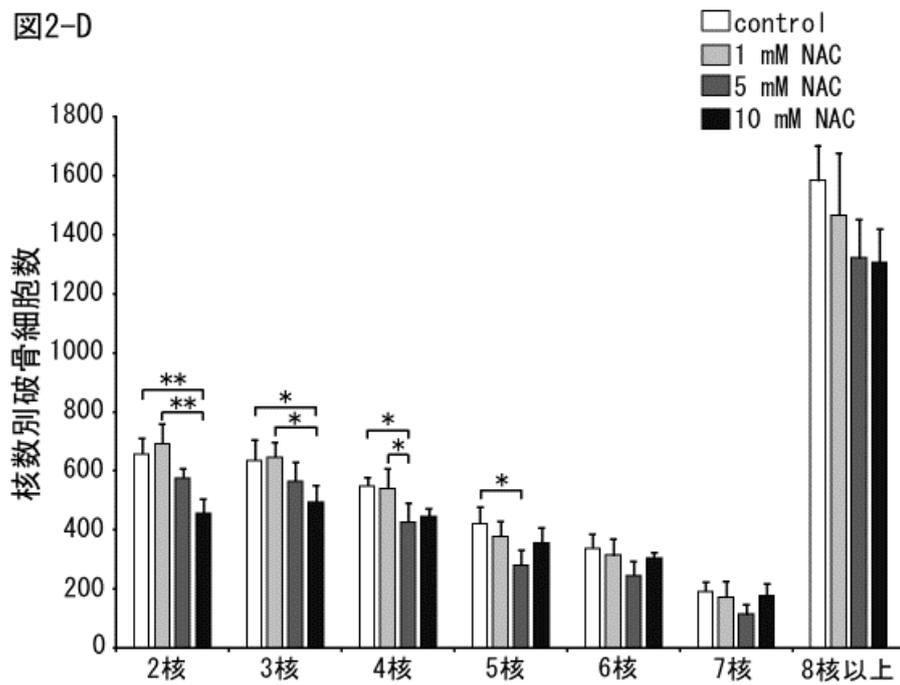


図2-D



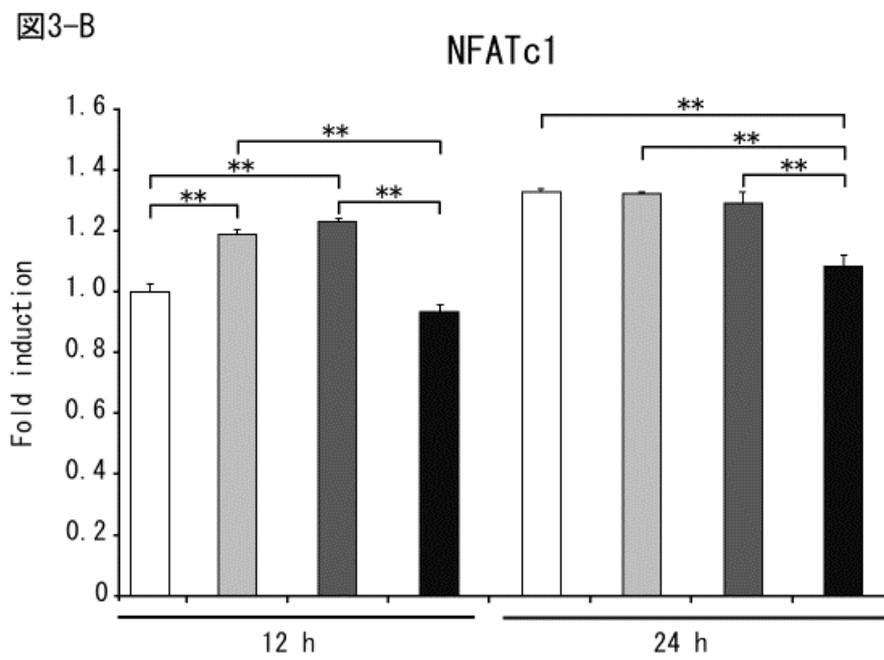
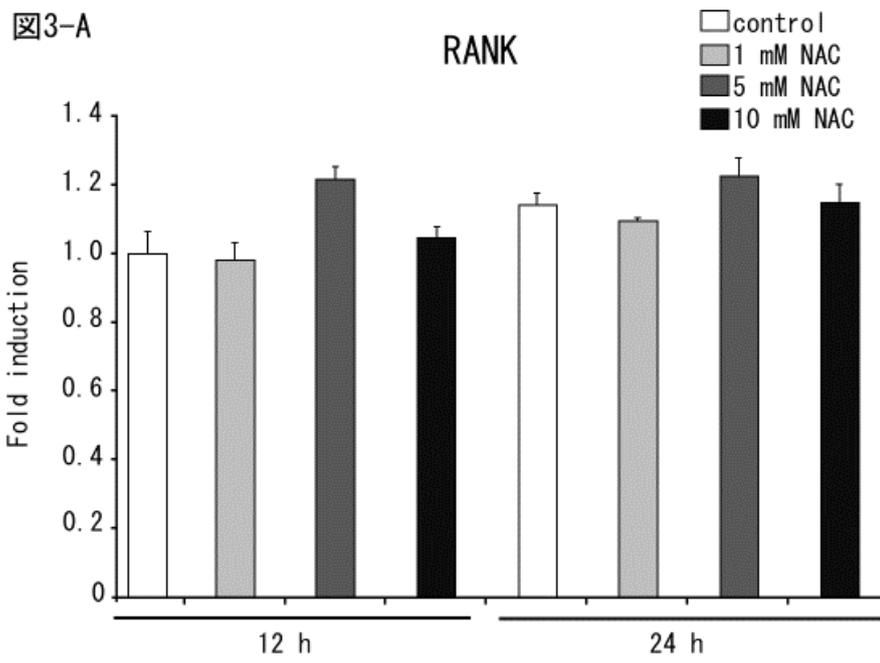


図3-C

TRAP

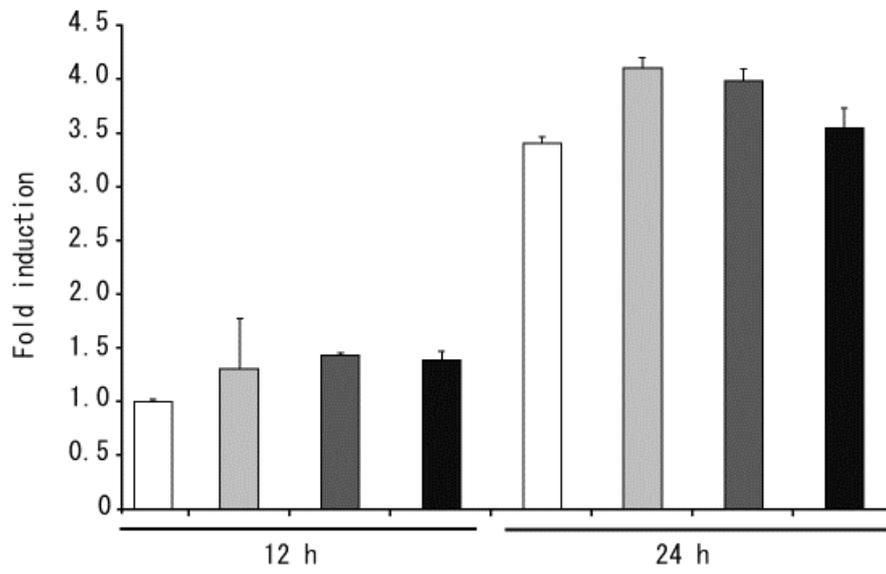


図3-D

DC-STAMP

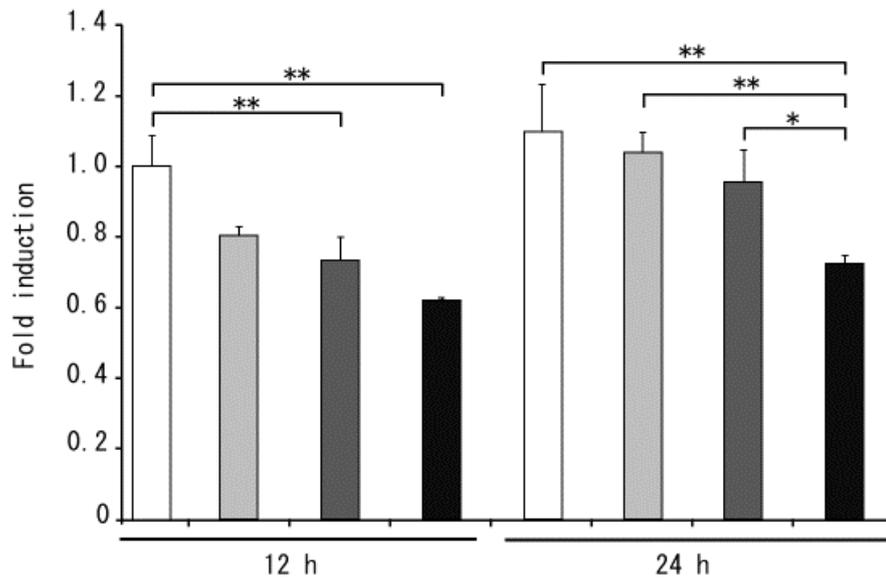


图3-E

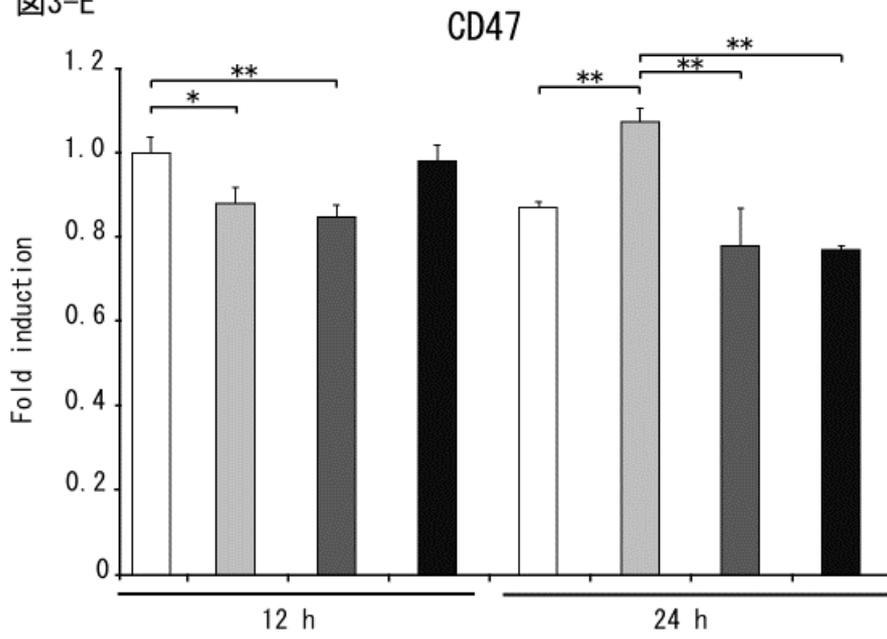


图4-A

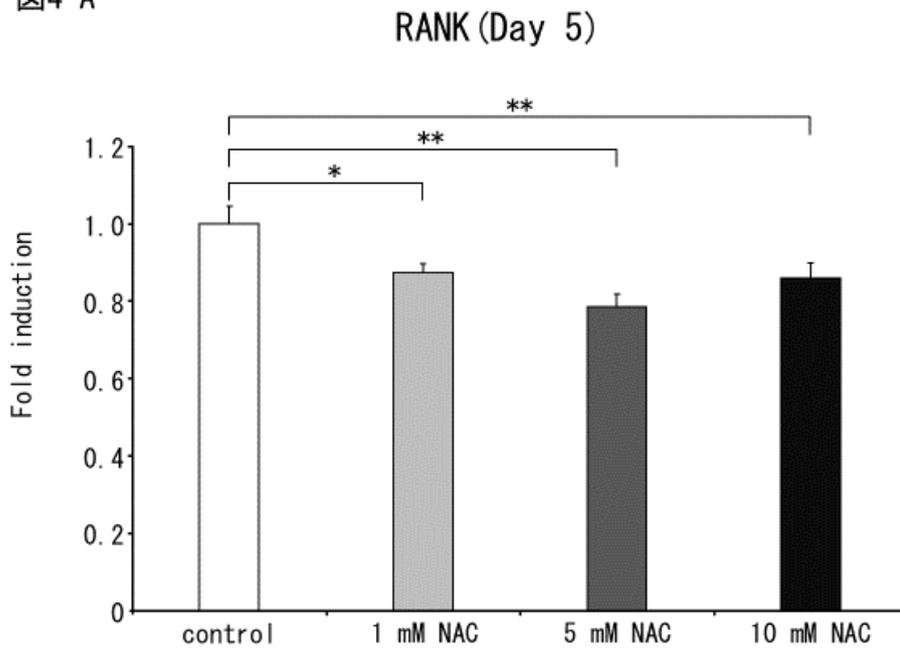


图4-B

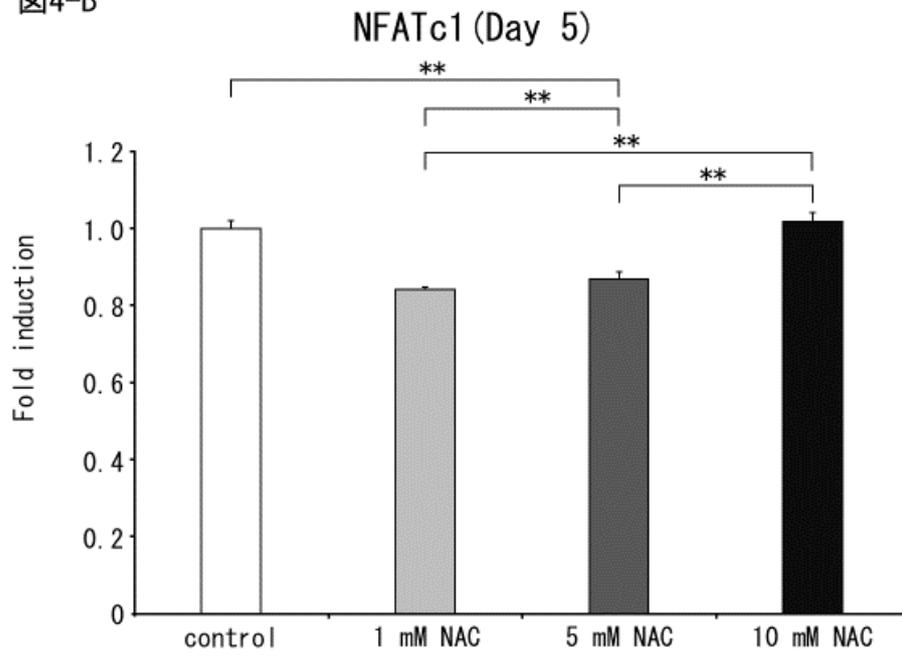


图4-C

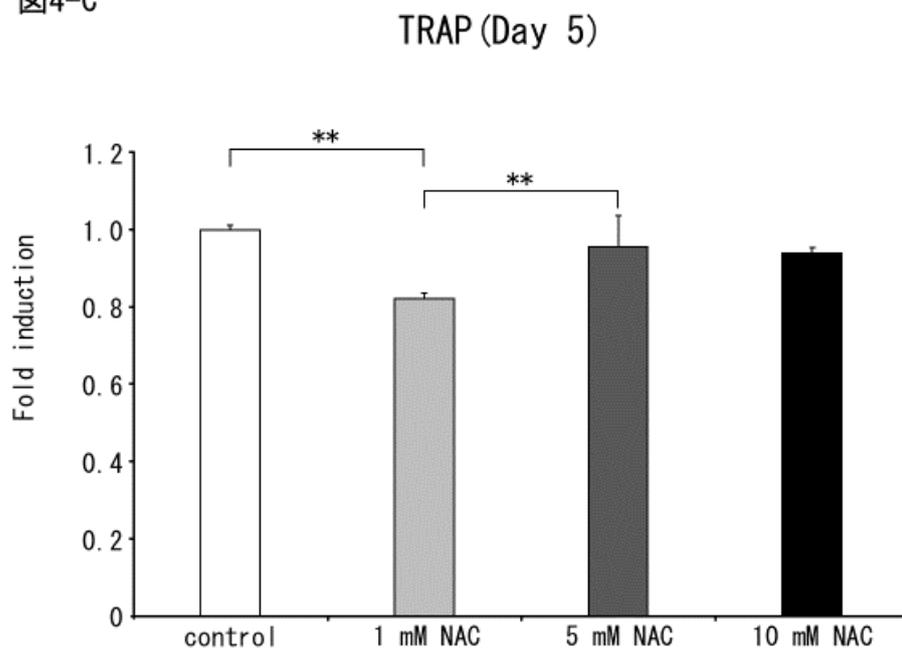


図4-D

DC-STAMP (Day 5)

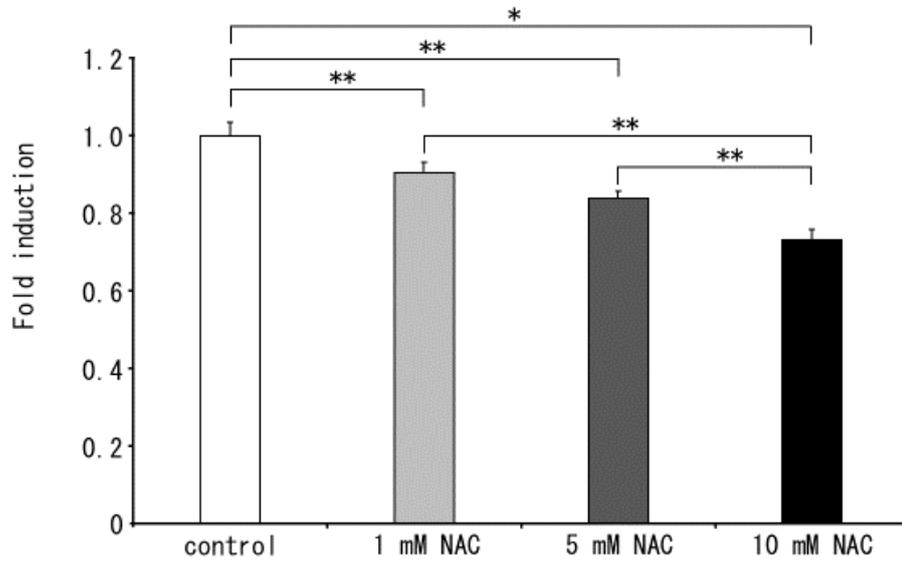


図4-E

CD47 (Day 5)

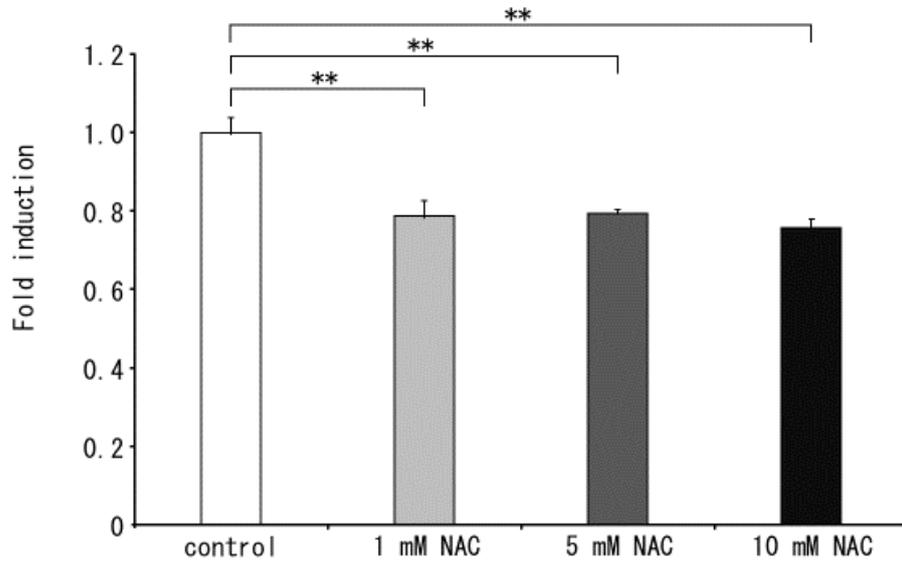


図4-F

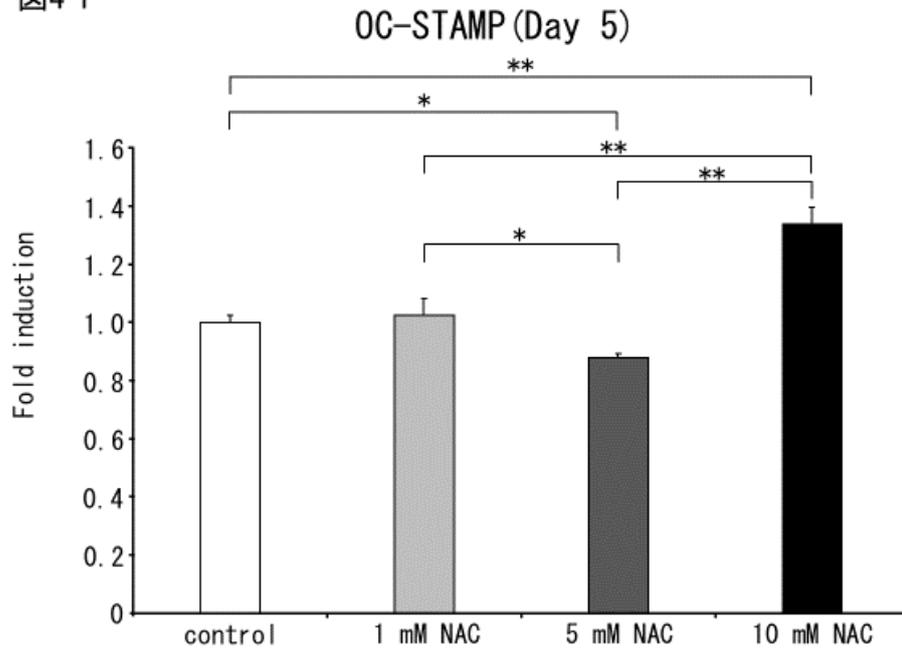


図4-G

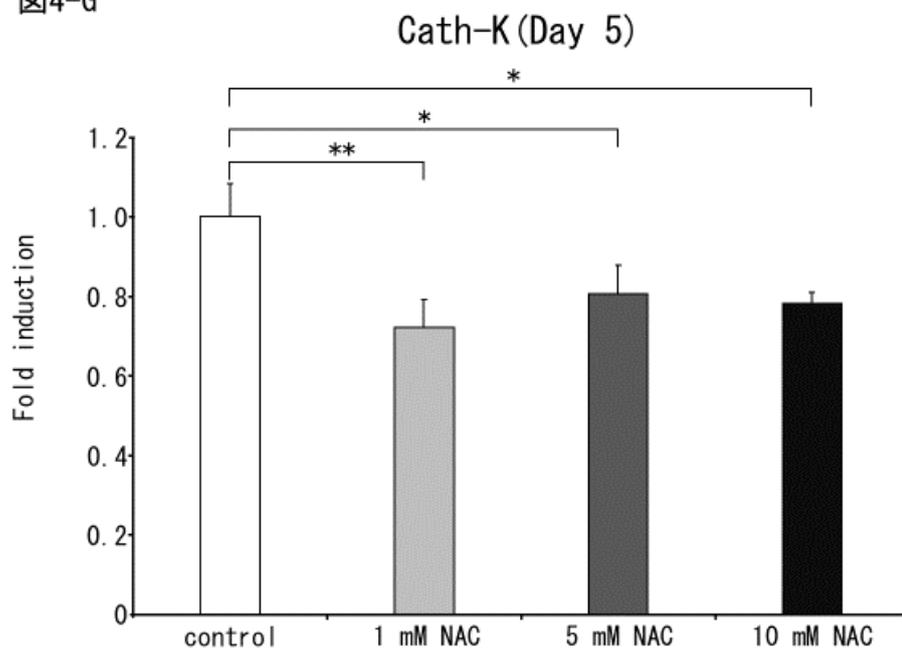
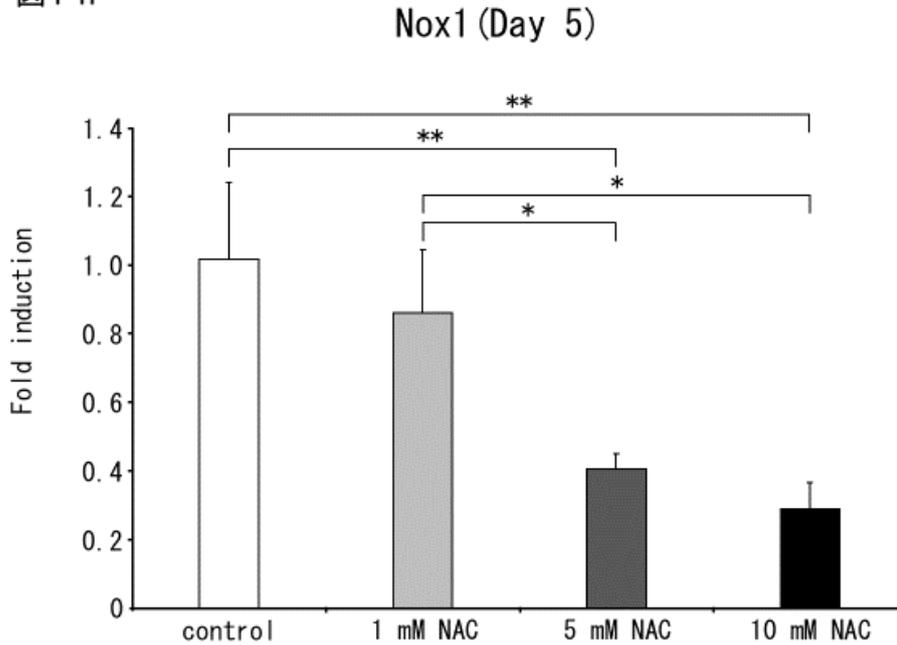


図4-H



図説

図 1. 各濃度の NAC を根管貼薬した組織像

上顎第一臼歯を抜歯し歯冠側から抜髄，各濃度の NAC を貼薬した．1 時間乾燥させたのちに再植した．

A) 未処置歯は歯根周囲に石灰化物が確認できた．control, 1 mM NAC では吸収窩，多核巨細胞(➡:H-E 染色)，破歯細胞(⇨:TRAP 染色)が確認できたが，5 mM NAC, 10 mM NAC では減少傾向を示した．

バー:100 μm

B) 10 mM NAC は control と比較して歯根吸収が抑制された．

残存歯根面積(%)=各実験群の試料の歯根面積/未処置歯の歯根面積の平均×100．

Mean ± SD, n=4, p < 0.01 (**), p < 0.05 (*).

図 2. 破骨細胞分化に対する NAC の影響

RAW264.7 細胞に各濃度の NAC を添加して 5 日間培養し，ViaLight™ plus kit を用いて細胞の ATP 量を測定，及び TRAP 染色を行い破骨細胞の観察を行った．

A) NAC 無添加(control)と比較して，各濃度の NAC を添加しても ATP 量の減少を認めなかった．

Mean ± SD, n=8.

B) control, 1 mM NAC では大きい破骨細胞が目立ち, 5 mM NAC, 10 mM NAC では細胞サイズが小さい傾向を示した.

バー:250 μ m

C) 2 核以上の総破骨細胞数は 5 mM NAC, 10 mM NAC で有意に減少した.

Mean \pm SD, n=4, p < 0.05 (*).

D) 核数別の破骨細胞数は 2 核, 3 核では 10 mM NAC で, 4 核, 5 核では 5 mM NAC で有意に減少した.

Mean \pm SD, n=4, p < 0.01 (**), p < 0.05 (*).

図 3. 12 時間, 24 時間培養後の破骨細胞関連遺伝子発現量の変化

RAW264.7 細胞に RANKL と各濃度の NAC を添加して 12 時間(12 h), 24 時間(24 h)培養し mRNA 発現量を比較した. 12 時間では DC-STAMP において 5 mM NAC, 10 mM NAC で, CD47 において 5 mM NAC で発現量が有意に減少した(D, E). 24 時間では NFATc1, DC-STAMP において 10 mM NAC で発現量が有意に減少した(C, D). TRAP, RANK では有意差を認めなかった(A, B).

Mean \pm SD, n=4, p < 0.01 (**), p < 0.05 (*).

図 4. 5 日間培養後の破骨細胞関連遺伝子発現量の変化

RAW264.7 細胞に RANKL と各濃度の NAC を添加して 5 日間(Day 5)培養し mRNA 発現量を比較した. 5 mM NAC では RANK, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP, CD47, Nox1, Cath-K において, 10 mM NAC では RANK, DC-STAMP, OC-STAMP, CD47, Nox1, Cath-K において発現量が有意に減少した.(A, B, D, E, F, G, H). TRAP では有意差を認めなかった(C).

Mean \pm SD, n=4, p < 0.01 (**), p < 0.05 (*).

Effect of N-Acetyl-L-cysteine on root resorption after delayed tooth replantation.

Mitsuhiro Nishimi¹⁾, Hajime Minamikawa²⁾, Kouichi Nakamura³⁾,
Yoshitaka Yoshimura²⁾, Yasutaka Yawaka³⁾

¹⁾ Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Yasutaka Yawaka), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾ Department of Molecular Cell Pharmacology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Associate prof. Yoshitaka Yoshimura), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

³⁾ Department of Dentistry for Children and Disabled Person, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief: Prof. Yasutaka Yawaka), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

Key Words: avulsed teeth, NAC, root resorption, osteoclast

Avulsion of permanent teeth is one of the most serious dental injuries. Prolonged extra-alveolar periods lead to poor prognosis and increase the risk of root resorption. Root resorption is associated with pulp necrosis and extended damage to the periodontal ligament. Calcium hydroxide is the most commonly used filling material for avulsed teeth; however, long-term exposure to calcium hydroxide may weaken the dentin in the teeth. *N*-Acetyl cysteine (NAC) is an antioxidant amino acid with anti-inflammatory and antibacterial activities. However, only limited information related to its ability to suppress root resorption is available. Therefore, this study examined whether NAC influences root resorption in a rat model of delayed tooth replantation and osteoclast differentiation *in vitro*.

Upper molars of six-week-old Sprague–Dawley rats were extracted. The teeth were maintained in dry storage for 60 min. The control group received no treatment. In the treatment group, dental pulp was removed and the canals were filled with 1, 5, or 10 mM NAC. The teeth were replanted, and the rats were euthanized after two weeks. For histological analysis, the obtained specimens were stained with hematoxylin and eosin and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP). RANKL-stimulated RAW 264.7 macrophage cells were treated with or without NAC for *in vitro* assay. The differentiation and formation were assayed using TRAP analysis. Osteoclast-related genetic mRNA expression was evaluated using real-time polymerase chain reaction (PCR).

In vivo studies revealed apical root resorption in the control group. Filling with 10 mM NAC decreased root resorption and the number of osteoclasts compared with the control group. *In vitro* studies revealed that the numbers of osteoclasts were lower when stimulated with 5 and 10 mM NAC than without NAC. In particular, the numbers of osteoclasts with two nuclei were decreased. Measurement of mRNA expression using real-time PCR indicated suppression of RANK, NFATc1, DC-STAMP, CD47, cathepsin K, and Nox1.

NAC reduced apical root resorption and the number of osteoclasts in a rat model of delayed tooth replantation; it also downregulated osteoclast-related genetic mRNA expression in cell culture. NAC inhibited root resorption via suppression of osteoclast

differentiation, fusion, and function. These results indicate that using NAC may be an effective technique for inhibiting root resorption following replantation of avulsed teeth.