

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11136

研究課題名(和文) 感染歯髄へのMTA直接覆髄後のデンティンブリッジ形成機構の解明とOPNの役割

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of dentin bridge formation after MTA direct pulp to the infected dental pulp and the relevance of OPN

研究代表者

武藤 徳子 (MUTO, NORIKO)

神奈川県大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40510433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：MTAによる直接覆髄が感染歯髄に対しても有効か、感染歯髄へのMTA直接覆髄実験を行い、幹細胞生物学的な側面から考察した。マウスを用いて歯髄感染モデル、歯髄非感染モデルを作製し、それぞれMTA、水酸化カルシウム製剤にて覆髄を行い、対象群としてガラスアイオノマー(GI)で仮封を行った。パラフィン切片を作製、HE染色、免疫組織化学にて解析した。MTAは、感染を伴う直接覆髄に用いる生体機能性材料として有用であることが示唆され、水酸化カルシウム製剤群と比較し治癒経過は良好であった。しかし、GI群でも歯髄治癒が認められたことから、本実験におけるより長時間の感染モデルでの検証が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study carried out MTA direct capping experiments to clarify effects of MTA on the infected dental pulp and discussed the results from the viewpoint of stem cell biology. The infection model exposed to the oral environment after preparing the drilled cavity in the mouse molar and the non-infection model without remaining exposed after operation were sealed with MTA or calcium hydroxide cement (CH) in addition to glass ionomer cement (GI) as a control. Pulpal healing process was analyzed by HE staining and immunohistochemistry in the paraffin sections. The MTA group showed good healing process compared with the CH group. The findings suggest that MTA is useful as a substance for activating biofunction for infected dental pulp. However, the validity of the current experimental design remains to be verified in terms of the infection period, since the infected dental pulp was healed even in the GI group.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯髄免疫 直接覆髄 MTA

1. 研究開始当初の背景

Mineral Trioxide Aggregate (MTA) は、逆根管充填、直接覆髄・断髄、穿孔封鎖、アペキシフィケーション、アペキソゲネーシスなど様々な用途に臨床応用され、良好な封鎖性、抗菌性、生体適合性、硬組織誘導能を有することが報告されており、これまで覆髄材のゴールドスタンダードとして使用されてきた水酸化カルシウム製剤に代わる生体機能性材料として注目されている。しかしながら、MTA は水酸化カルシウム製剤ほどの抗菌力はないという報告があり、感染歯髄に対する MTA の効果を科学的に検証した研究がないのが現状である。一方、MTA 覆髄後のデンティンブリッジ形成機構も未だ不明な点も多い。ラットを用いて MTA 直接覆髄後のデンティンブリッジ形成過程を検索した研究 (J Endod 34: 970-974, 2008) では、術後 1 日後に壊死層直下に OPN の沈着が起こり、術後 5 日にネスチン陽性の象牙芽細胞様細胞の分化と象牙質形成が起こることが示されているが、デンティンブリッジ形成過程における OPN の機能的な役割は明らかになっていない。また、最近の研究で、MTA が根尖部歯髄幹細胞 (SCAP) の分化能を促進するという報告がある (J Endod 40: 640-647, 2014)。従って、直接覆髄後の感染歯髄治癒過程において、MTA の効果を水酸化カルシウム製剤と比較することで、その抗菌作用を検証し、歯髄幹細胞/前駆細胞の分化能促進への影響とデンティンブリッジ形成過程における OPN の機能を明らかにすることができれば、MTA の適応範囲を規定するエビデンスを提供することが可能になると推測されたため、本研究計画の立案に至った。

2. 研究の目的

歯の移植後の歯髄治癒過程において、(1) 歯髄腔に歯髄幹細胞/前駆細胞が維持されると象牙質形成が誘導されること、(2) オステオポンチン (OPN) の沈着が象牙芽細胞分化に先立つことを明らかにした。歯髄覆髄材として臨床応用されている Mineral Trioxide Aggregate (MTA) の感染歯髄への効果は未だ不明な点が多い。本研究では、MTA による直接覆髄が感染歯髄に対しても有効に働き、歯髄幹細胞/前駆細胞の分化を促進するのか、水酸化カルシウム製剤と比較して感染歯髄における MTA によるデンティンブリッジ形成効果を検証し、オステオポンチン (OPN) の機能に着目して、そのメカニズム解明を目的とする。本研究は感染歯髄に対する MTA の効果を幹細胞生物学的な側面から捉える独創的な試みであり、MTA の生体機能性材料としての有用性を解明すると考えられる。

3. 研究の方法

深麻酔下にて 6 週齢 ICR マウスの両側上顎第一臼歯咬合面に 1 級窩洞を形成し歯科用実体顕微鏡にて露髄を確認後、24 時間口腔内環境

に露出させ、歯髄感染モデルを、露髄後即時に覆髄処置を行う歯髄非感染モデルをそれ

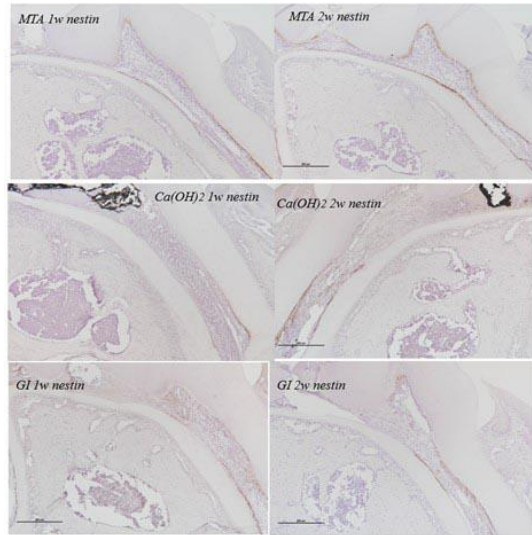


図 1. 歯髄感染モデル：2 週後

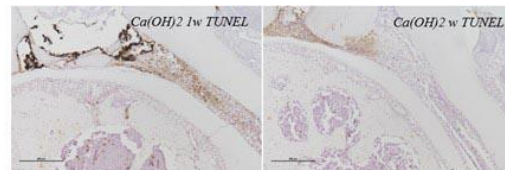


図 2. 歯髄感染モデル：水酸化カルシウム製剤 TUNEL

ぞれ作製した。歯髄感染モデルでは、窩洞内の残渣を除去・洗浄後、MTA、水酸化カルシウム製剤を露髄面に貼薬後、グラスアイオノマーセメント (GI) にて仮封した。対象群として GI で仮封を行った。術後 1、2 週間で深麻酔下にて固定し、その歯髄治癒過程を HE 染色、抗 nestin・抗 OPN・抗 Ki67 抗体による免疫組織化学、TUNEL 法にて解析した。

4. 研究成果

歯髄感染モデルにおいて、MTA 群では、窩洞直下歯髄組織の炎症が軽度であるが、水酸化カルシウム製剤群、GI 群では歯冠部歯髄の

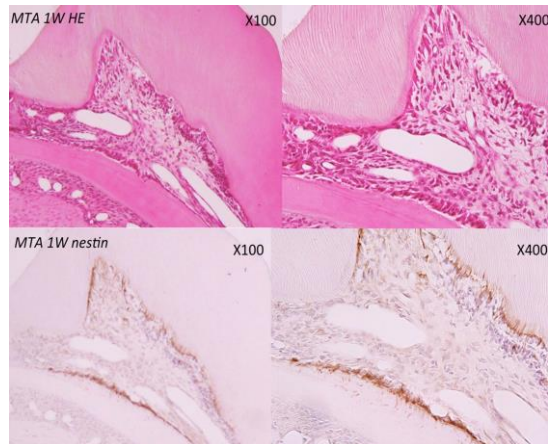


図 3. 歯髄非感染：MTA 群 1 週後



強い炎症性細胞浸潤が認められた。Nestin 染色においては MTA 群では術後 1 週間後より髄床底から歯根において陽性所見が認められ、術後 2 週間後も同様の所見が認められた。水酸化カルシウム群、GI 群では術後 1 週間で歯根下部 1/2 に Nestin 陽性細胞を認めた (図 1)。TUNEL 染色においては MTA 群では術後 1 週間において歯髄組織内に陽性細胞が認められたが、術後 2 週間後では陽性所見は認められなかった。水酸化カルシウム製剤群では術後 1 週間において窩洞周囲歯髄組織に多くの陽性細胞が認められ、術後 2 週間後には歯冠から歯根にその範囲が拡大していた (図 2)。GI 群は術後 1 週、2 週後ともに歯冠部歯根部歯髄組織内に多数の陽性所見が認められた。上記の結果より、MTA 群では水酸化カルシウム製剤群に比べ歯髄へのダメージが限定的で歯冠部歯髄組織が治癒するのに対し、水酸化カルシウム製剤、GI

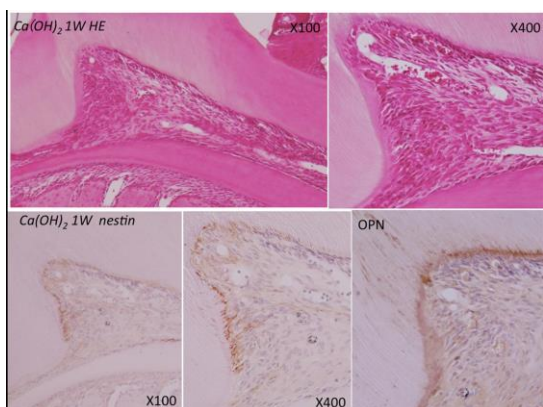


図 4. 歯髄非感染：水酸化カルシウム製剤群 1 週後

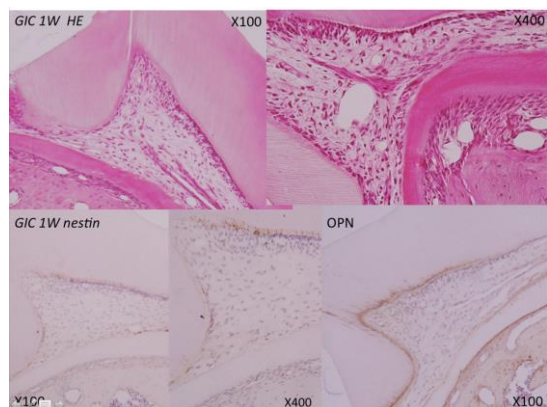


図 5. 歯髄非感染：GI 群 1 週後

群では歯冠部歯髄広範な壊死層が認められた。歯髄非感染モデルにおいては、術後 1 週間後、MTA 群は、露髄面から歯冠部歯髄腔の範囲に局限して炎症性細胞浸潤が認められた (図 3)。水酸化カルシウム製剤群では、歯冠部歯髄組織にやや強い炎症性細胞浸潤が認められた (図 4)。GI 群では、炎症性細胞の浸潤及び血管の拡張が見られた (図 5)。Nestin

染色において陽性細胞は、MTA 群にでは窩洞直下に近接した髄床底にすでに局在しているが、水酸化カルシウム製剤、GI 両群による覆髄では、歯根部で陽性所見が見られる。術後 2 週間後においては MTA 群で歯冠部に Nestin 染色にて陽性細胞が認められ、歯髄治

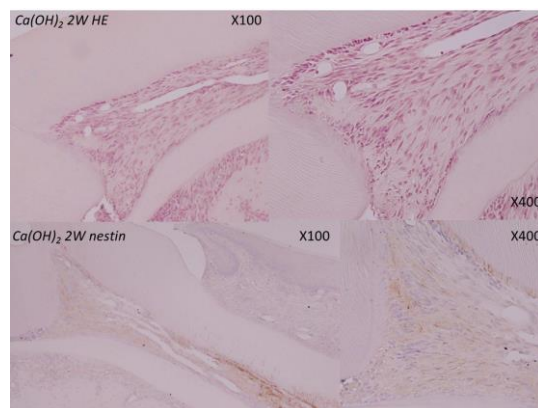


図 6. 歯髄非感染：水酸化カルシウム製剤群 2 週後

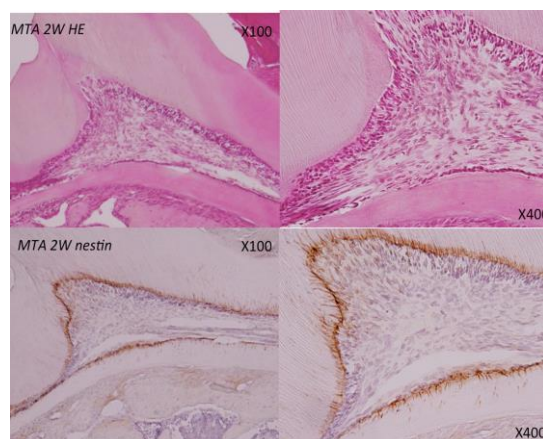


図 7. 歯髄非感染：MTA 群 2 週後

癒傾向が認められたが、水酸化カルシウム製剤、GI 群では、陽性細胞の局在が歯冠部に認められず、陽性所見は歯根尖 1/2 に認められ、術後 1 週間後より後退していることから治癒遅延傾向が認められた (図 6、7)。以上より、MTA は、感染を伴う直接覆髄に用いる生体機能性材料として有用であることが示唆された。しかしながら、GI 群でも歯髄治癒が認められたことから、本実験の感染の程度が弱いことが予想され、より長時間の感染モデルでの検証が必要であると考えられた。

##### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Nakaki T, Nakakura-Ohshima K, Nakagawa E, Ishikawa Y, Saito K, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Donor-host

- tissue interaction in the allogenic transplanted tooth germ with special reference to periodontal tissue. J Oral Biosci 査読有 60: 21-30, 2018.
- ② Saito K, Ohshima H: Differentiation capacity and maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in the process of pulpal healing following tooth injuries. J Oral Biosci 査読有 59:63-70, 2017.
- ③ Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Oda M, Domon H, Iwase Y, Sawami T, Matsueda K, Terao Y, Ohshima H, Noguchi H, Hayasaki H: Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. Arch Oral Biol 査読有 81: 110-120, 2017.
- ④ Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Osteopontin is essential for type I collagen secretion in reparative dentin. J Dent Res 査読有 95: 1034-1041, 2016.
- ⑤ Ida-Yonemochi H, Otsu K, Ohshima H, Harada H: The glycogen metabolism via Akt signalling is an important for the secretion of enamel matrix in amelogenesis. Mech Dev 査読有 139: 18-30, 2016.
- ⑥ Shigetani Y, Ohshima H, Okiji T (他 4 名, 4 番目): GaAlAs laser-induced pulp mineralization involves DMP1 and osteopontin expression. Oral Dis 査読有 22(5): 399-405, 2016.
- ⑦ Goto N, Ohshima H, (他 8 名, 5 番目): Role of MSX1 in osteogenic differentiation of human dental pulp cells. Stem Cells Int 査読有 2016: 8035759.
- ⑧ Saitoh I, Ohshima H, Hayasaki H(他 6 名, 7・8 番目): Tissue-specific stem cells obtained by reprogramming of non-obese diabetic (NOD) mouse-derived pancreatic cells confer insulin production in response to glucose. PLoS One. 査読有 11(9): e0163580, 2016.
- ⑨ Nakaki T, Ohshima H (他 5 名, 6 番目): Contribution of Donor and Host Mesenchyme to the Transplanted Tooth Germs. J Dent Res 査読有 94: 112-120, 2015.
- ⑩ Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: The effects of enzymatically synthesized glycogen on the pulpal healing process of teeth with intentionally delayed replantation in mice. J Oral Biosci 査読有 57:124-130, 2015.
- ⑪ Saito K, Ida-Yonemochi H, Ushiki T, Ohshima H: Responses of pulp vasculature to cavity preparation in rat molars. J Oral Biosci 査読有 57: 157-164, 2015.
- ⑫ Shigetani Y, Ohshima H, (他 5 名, 6 番目): Temporospatial localisation of dentine matrix protein 1 following direct pulp capping with calcium hydroxide in rat molars. Int Endod J 査読有 48: 573-581, 2015.
- ⑬ Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Ohshima H, Terao Y, Okiji T: Residual structure of Streptococcus mutans biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. PLoS One 査読有 10:e0116647, 2015.
- ⑭ Saito K, Kenmotsu S, Nakatomi M, Ohshima H: Allogenic tooth transplantation inhibits the maintenance of dental pulp stem/progenitor cells in mice. Cell Tissue Res 査読有 356: 357-367, 2014.
- ⑮ Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H: Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics following intentionally delayed tooth replantation in mice. J. Endod 査読有 40: 1566-1572, 2014.
- ⑯ Ida-Yonemochi H, Nakatomi M, Ohshima H: Establishment of in vitro culture system for evaluating dentin-pulp complex regeneration with special reference to the differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells. Histochem Cell Biol 査読有 142: 323-333, 2014.
- [学会発表] (計 2 件)
- ① N.Mutoh, N.Tani-Ishii  
Innate immune response induce the dentin regeneration in dental pulp.  
第 46 回日本免疫学会学術大会  
2017 年
- ② 武藤徳子、許多、石井信之  
感染歯髄への MTA 直接覆髄後のデンティンブリッジ形成機構の解明。  
神奈川歯科大学学会 第 52 回総会  
2017 年
- [図書] (計 0 件)
- [産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武藤 徳子 (MUTO Noriko)  
神奈川県立歯科大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号：40510433

(2) 研究分担者

石井信之 (ISHII Nobuyuki)  
神奈川県立歯科大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：20163610

(3) 研究分担者

大島 勇人 (OHSHIMA Hayato)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号：70251824

(4) 連携研究者

( )

研究者番号：

(5) 研究協力者

( )