

令和元年6月3日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20459

研究課題名(和文)体性幹細胞ホーミング因子を用いた新規根管充填法の開発

研究課題名(英文)A new method of root canal filling with stem cell homing factor

研究代表者

松裏 貴史(MATSUURA, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10721037

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文): 根管模型内に気泡を入れずにコラーゲンゲルを注入する安定した実験系を確立したものの、実際の生体に近い歯髄組織を再生させるには、根管象牙質の存在が必要であることがわかったため、その後歯髄再生の方法を確立するため更なる研究が必要であることがわかった。また、今まで得られた結果をまとめたものが、査読付き英文学術誌に出版された。また、歯髄組織の再生の研究を行うにあたり、アクセスオープニングした歯冠部の修復材料に関して検討することが必要であるため、直接覆髄材のシステマティックレビューを行い、歯髄再生の際に用いるのに適した歯科材料を探索した。そして研究成果を査読付き英文学術誌にて論文発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄を失った歯は、歯根破折や根尖性歯周炎が生じ易くなり、それにより抜歯になることも多い。そして、歯髄再生には歯髄幹細胞を用いた方法が多く研究されているが、細胞移植には多額のコストがかかること、及び細胞培養時のコンタミのリスクなどが問題点として挙げられる。これらのことより、感染歯髄の除去後、細胞移植を行うことなく歯髄を新生させることが出来れば、ローコスト、ローリスクで革新的な新規歯科治療法となる。昨年度にその試みを学術論文の形で報告できたことには、学術的および社会的な意義があるといえる。

研究成果の概要(英文): We established the method of injection of collagen gel into root canal model which doesn't include any bubble. However, dental pulp regeneration seems to need dentin, thus we need to use extracted teeth for dental pulp regeneration. Our research was published at Journal of Oral Science on December 2018. We need to know the most suitable material for dental pulp regeneration, we performed systematic review about the long-term efficiency of direct pulp capping materials. And this research was published at Journal of Oral Science on March 2019.

研究分野：歯内治療学

キーワード：歯髄再生

1. 研究開始当初の背景

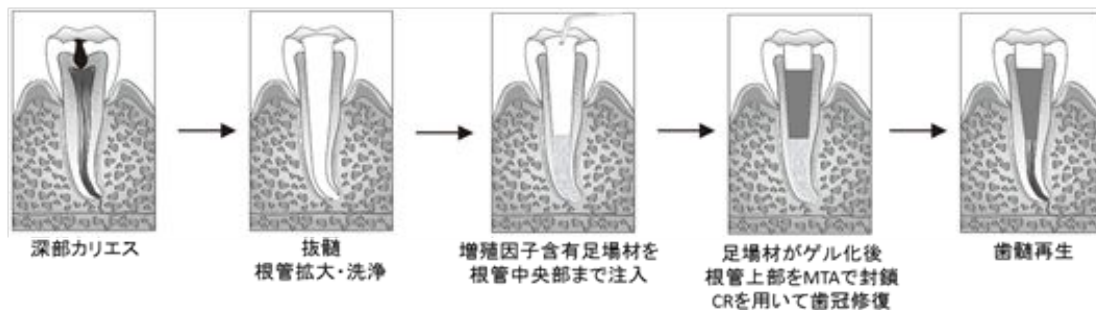
現在の歯科治療では、虫歯が深く進行すると、一度細菌感染した歯髓の保存はほぼ不可能であり、歯髓を除去しなければならない。そして、一度歯髓を取り除いた歯は、根管を根管充填材で緊密に封鎖される。しかし、一度この治療を行った歯は、歯牙破折が起りやすく、また根管充填材と根管壁との間隙から細菌が侵入することによる根尖性歯周炎が生じ易くなり、抜歯となるケースも多い (Ingle et al., 2002, Dammaschke et al., 2003)。これらのことより、深部齲蝕が生じた際でも、歯髓を除去し、消毒した後、再度新しく歯髓を再生することが出来れば、持続的な象牙質の形成、外来刺激に対する象牙細管内の防御、および免疫機能の回復につながり、そのことによって歯牙破折や根尖性歯周炎といった抜歯につながる病態を防ぐことができる。これはとても有用な歯科医療手段となることは明白であり、多くの国民を救うことができる可能性を秘めている。以下の表にて、従来の根管充填法と歯髓再生療法とを比較する。

	従来の根管充填法	歯髓再生療法
歯の破折	歯髓がないため二次象牙質が形成されず、歯の破折が生じやすい	持続的な象牙質形成により、歯の破折が生じにくい
根尖性歯周炎	根管充填材と根管壁との間隙から根尖部への再感染の可能性はある	歯髓を再生させるため、根尖部への感染の予防が可能

歯髓創傷治療に関して、血液成分を活用した脈管再生療法は Bamchs と Trope(2004)が考案して以来多くの症例報告がなされているが、象牙質形成及び歯髓の再生に関して不明な点が多い。一方、真に生物学的な歯髓再生療法として、歯髓幹細胞、足場であるコラーゲン、成長因子 (G-CSF) を用いた方法が開発され、臨床前試験まで完成している (Iohara et al., 2013)。しかしこの方法にも、いくつかの問題点を含んでいる。即ち、(1)患者から歯髓幹細胞を採取するために、智歯や不要な歯の抜歯が必要であること、また、その細胞を培養するための血清も患者から採取しなければならず、患者への侵襲が少なくない。また、(2)患者から採取・分離した歯髓幹細胞は、無菌培養室(CPC)にて培養して細胞数を増やした後に治療へ応用することとなるため、培養のための人件費や材料費がかかり、CPC を備えた大掛かりな施設が必要であり、また、培養時のコンタミネーションのリスクもある。そこでこれらの問題点を解決するため、“細胞移植を用いずに歯髓再生治療をすることはできないものか？”との疑問から着想に至った。

近年、全身に分布している幹細胞や前駆細胞を含む細胞が、ある部位の損傷を回復させるため、損傷部位に向けて遊走してくるホーミングという現象が広く知られるようになってきている。元来、生体内の細胞は成長因子に導かれて移動する走化能を持つために、ホーミングが引き起こされると考えられている (Mao et al., 2010, Laird et al., 2008)。そこで、このメカニズムを応用し、成長因子を用いて歯周組織を含めた全身の細胞を根管へホーミングさせることによる今までになく全く新しい歯髓再生技術の開発を目指し、平成 26 年度～平成 27 年度の日本学術振興会の科研費(若手研究 B, 研究課題番号 26861598)の助成の元、研究を行ってきた。

そして、ホーミング因子を含有させたコラーゲンを注入した根管模型歯を、ラット背部皮下結合組織へ移植し、21 日後に灌流固定後に根管模型を取り出して H-E 染色にて解析した結果、根管模型歯の根管内の根尖 2mm に細胞が緊密に封鎖されていることを確認した。つまり、細胞移植を用いずに、根管へ細胞を動員できることを実証することに成功した。この得られた結果より、自分は下図に示すような治療方法を考案した。根尖が細胞で塞がれることによって根尖性歯周炎の発生を予防することが可能となり、また根尖からの垂直性歯根破折を防止することも可能になる。今後はこの治療法をブラッシュアップし、他施設における臨床研究ののち、最終的には一般歯科臨床の現場までトランスレーションすることがゴールである。



2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞移植を用いずに新規歯髓再生技術を開発することである。

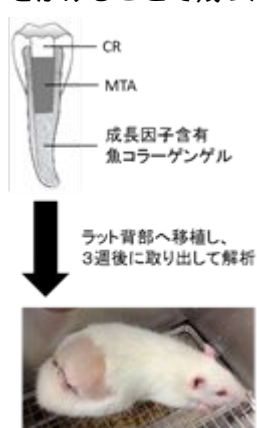
3. 研究の方法

根管模型歯を根管拡大・洗浄

ニッシン社の歯内療法実習用複製根 2 層模型歯 (B22X-END) を使用し、歯冠側よりアクセスオープニングを行い、根管を手用ファイルにて 70 号まで拡大する。その後、3 ウェイシリンジを用いて強圧で拡大後の根管を洗浄乾燥後、顕微鏡にて根管内に切削片が残っていないか確認し、5%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬して一晚消毒を行う。

ヒト抜去歯を根管拡大・洗浄

ヒト抜去歯 (上顎前歯) において、根管模型歯と同様の方法でアクセスオープニング、根管拡大、根管洗浄・乾燥を行う。その後、根尖部及び歯根膜組織をメスにて除去し、70%エタノールにて消毒し、5%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬して一晚消毒を行う。その後、オートクレーブをかけることで残った組織を無菌にする。



成長因子含有魚コラーゲンゲルを調製後、根管へ注入

VEGF2, FGF2, PDGF, NGF, BMP7, SDF1, G-CSF を歯髄再生因子の候補として用いる。これら成長因子を、単体、もしくは併用して魚コラーゲンゲル溶液中に溶解し、上述の方法で準備した根管模型歯もしくは抜去歯の歯髄腔内へ注射する。そして、37℃にて 30 分培養することでゲル化を誘導する。その後 MTA にて根管上部を封鎖し、CR にて歯冠修復を行う。コントロールには、成長因子を含有していない魚コラーゲンゲルを注入した根管模型歯もしくは抜去歯を用いる。

ラット背部皮下結合組織への移植

6 週齢 Wister 系雄ラットを三種混合麻酔薬にて麻酔した後、背部皮下を 4cm 程メスで切開し、準備した根管模型歯もしくは抜去歯を、ラット背部皮下結合組織内へ移植し、縫合する。移植 3 週間後、灌流固定を行い、移植した根管模型歯もしくは抜去歯を取り出して各種解析を用いる。

各種解析法

H-E 染色、免疫組織化学染色、in situ hybridization にて組織学的解析を、ELISA、RT-PCR、Western Blot、FACS にてタンパク及び遺伝子発現の解析を行うことにより、成長因子含有魚コラーゲンを注入した根管における、細胞増殖、血管再生、神経再生、二次象牙質形成を解析することによって、歯髄組織再生の程度を評価する。

動物歯牙歯髄腔内へコラーゲン注入

動物 (イヌ) の歯を抜髄し、70 号まで根管拡大後、5%次亜塩素酸ナトリウム溶液および 17%EDTA 溶液にて交互洗浄を行い、成長因子を染み込ませた魚コラーゲンを注入し、MTA にて根管上部を封鎖し、CR にて歯冠修復を行う。魚コラーゲンは体温にてゲル化する。3 週間後、動物より魚コラーゲンを注入した歯を抜去し、解析に用いる。コントロールには、成長因子を含有していない魚コラーゲンゲルを用いる。

各種解析法

H-E 染色、免疫組織化学染色、in situ hybridization にて組織学的解析を、ELISA、RT-PCR、Western Blot、FACS にてタンパク及び遺伝子発現の解析を行うことにより、成長因子含有魚コラーゲンを注入した根管における、細胞増殖、血管再生、神経再生、二次象牙質形成を解析することによって、歯髄組織再生の程度を評価する。

4. 研究成果

タービンで髄腔開拡大後、手用ステンレスファイルを用いて根管拡大・形成した根管模型内にコラーゲンゲルを注入する過程で、気泡が混入する問題があった。気泡が混入すると、その部分には細胞が侵入できず、歯髄組織も再生することが不可能であるため、気泡を入れずに、根管模型内へコラーゲンゲルを注入する必要がある。そのため、コラーゲンゲルを注入するのに使用するシリンジ、使用するコラーゲンゲルや根管模型の根管拡大号数の検討を行った。その結果、根管模型を手用ステンレスファイルの 60 号まで拡大し、30G の洗浄針を用いてコラーゲンゲルを注入することで、気泡を入れずにコラーゲンゲルを注入できるようになった。しかし、生体に存在する歯髄組織に近い歯髄を再生させるには、模型ではなく根管象牙質の存在が必要であることがわかったため、その後抜去歯を用いて実験を行うことを計画した。具体的には、抜去歯を歯冠側よりタービンにてアクセスオープニングを行い、根管を手用ステンレスファイルにて 60 号まで根管拡大・根管形成する。その後、3 ウェイシリンジを用いて強圧で根管拡大後の根管を洗浄乾燥後、顕微鏡にて根管内に切削片が残っていないか確認し、その後、根尖部及び歯根膜組織をメスにて除去し、70%エタノールにて消毒し、5%次亜塩素酸ナトリウムに浸漬して一晚消毒を行った。その後、オートクレーブをかけることで残った組織を無菌にする。その後増殖因子を含有させたコラーゲンゲルを 30G の洗浄針を用いて気泡が入らないように注入し、37℃にて 30 分培養することでゲル化を誘導し、その後 MTA セメントにて根管上部を封鎖し、CR にて歯冠修復を行った後にラット背部皮下へ移植し、3 週間後に取り出し、組織学的解析を行うことを計画していた。しかし、抜去歯は根管模型とは異なり根管壁が透明でないため、シリンジの位置や注入しているところを目で確認しながらコラーゲンゲルの注入操作を行えず、

コーラゲンゲルの注入操作が難しいためうまく実験が進まなかった。

本研究で得られた結果は、2018年12月に査読付き英文学術誌にて研究発表を行った。また、歯髄組織の再生の研究を行うにあたり、アクセスオープニングした歯冠部の修復材料に関して検討することが必要であるため、歯髄再生の際に用いるのに適した歯科材料を探索するために直接覆髄材のシステムティック・レビューを行った。そして研究成果を2019年2月に第15回長崎歯周病学講演会にて口頭発表を、2019年3月に査読付き英文学術誌にて論文発表を行った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Takashi Matsuura, Viviane K. S. Kawata-Matsuura, Shizuka Yamada: Long-term clinical and radiographic evaluation of the effectiveness of direct pulp capping materials. J Oral Sci 61(1) 1-12, 2019, 査読有, DOI: 10.2334/josnusd.18-0125
2. Takashi Matsuura, Kouji Sugimoto, Viviane K. S. Kawata-Matsuura, Kajiro Yanagiguchi, Shizuka Yamada, Yoshihiko Hayashi: Cell Migration Capability of Vascular Endothelial Growth Factor into The Root Apex of a Root Canal Model in vivo. J Oral Sci 60(4) 634-637, 2018, 査読有, DOI: 10.2334/josnusd.17-0456

〔学会発表〕(計1件)

1. ○松裏貴史：直接覆髄材の長期臨床成績：システムティック・レビュー 第15回長崎歯周病学講演会 口頭発表 長崎2019年2月23日

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。