

令和 2 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11696

研究課題名（和文）接着性と薬効を両立した革新的歯内療法用材料の創製と臨床応用に向けた橋渡し研究

研究課題名（英文）Studies on the production for an innovative endodontic material having both bonding effectiveness and drug effectiveness, and the clinical application.

研究代表者

井上 哲（Inoue, Satoshi）

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：80184745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：う蝕が進行すると覆髄や根の治療が必要となるが成功率は低く、辺縁封鎖性と硬組織再生能を両立した材料の開発が急務であるため、我が国発世界初の体内埋植用吸収性接着材料のリン酸化プルランを主成分とした歯内療法用材料の開発を目指した。アパタイト系などの試験物は動物実験等で検討した結果、リン酸化プルランを主成分としたものが最も有効であった。さらにラットを使用し、直接覆髄に対する組織学的評価を行った結果、リン酸化プルラン配合MTAセメントが直接覆髄材として優れていることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リン酸化プルラン含有セメントはガンマ線滅菌が可能であること、製造過程において細菌内毒素の除去が可能であることから、製造コストがその他の体内埋植用製品と比較して低い。本邦ではすでに薬事認可を得ており、臨床試験の実施を開始しており、近い将来市販されることが期待される。本材料はその硬組織への接着性や誘導能を持つことから直接覆髄後の感染を防ぎ、歯髄神経を保存する上で優れた材料となる可能性を有しているため、日本独自の全く新しい国際的競争力を持った直接覆髄材の開発へ繋げたい。

研究成果の概要（英文）：Treatment of direct pulp capping or root canal treatment is needed when the dental caries reach the pulp. Because the success rate of the root canal treatment is now low, we should aim to develop an innovative endodontic material having both bonding effectiveness and drug effectiveness, and the clinical application, including phosphorylated pullulan as a main component. Among the all materials of tested materials including apatites, glass beads, or phosphorylated pullulan, the material with phosphorylated pullulan showed the best results by the histological analysis. The material with phosphorylated pullulan is concluded to be the best material for capping the dental pulp.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯学 リン酸化プルラン 歯内療法 接着性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、年間 1699 万件的根管治療費が保険診療報酬として支払われており、その内、過去の治療の不具合により再治療となったものは 724 万件、損失額は 200 億円にも上る (H24 年社会医療診療行為別調査 H24 年 6 月診療分より算出)。さらに問題となるのは、現在の歯内療法用材料では治療を施しても約 4 割が再治療となり、再治療を繰り返すことで将来的に歯の破折、それに続く抜歯へと至る。仮にインプラント治療を受ける患者の 1 / 3 が歯の破折や根管治療の不具合によるものだとしても、その経済的損失は年間 1000 億円 (50 万円×20 万本) に達する。インプラントは海外製品が大半を占めることも、我が国の経済への打撃に繋がっている。しかし、これはあくまでもインプラント治療の数から算出した直接的な損失額の一部であり、ブリッジや義歯等その他の治療や QOL の低下、健康寿命への影響まで含めると覆髄や根管治療の最適な治療法が開発されていないことによる経済的損失は計り知れない。治療効果の高い歯内療法用材料の開発・実用化は、歯科として取り組むべき重要課題である。

研究分担者の吉田が開発したリン酸化プルランは、従来品にはなかった接着性を有する生体吸収性材料として注目され、PMMA 骨セメントを超える高い接着性と重度の歯周病にも対応できる優れた硬組織誘導性を両立した世界初の人工骨として、実用化に取り組んでいる。本研究で開発する歯内療法用材料は、人工骨の開発過程で生まれたものであり、辺縁封鎖性と硬組織再生性を両立した革新的な歯内療法用材料として優れた治療効果が期待できる。

### 2. 研究の目的

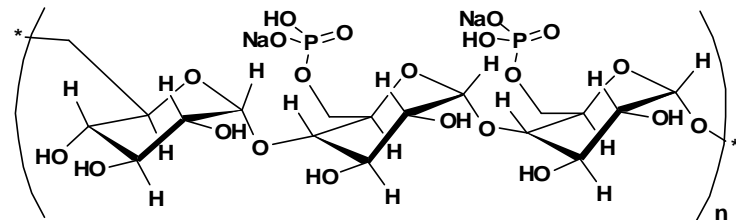
覆髄や根管治療の不具合は歯を喪失する大きな要因である。根管治療の成功率は 6 割に留まり、4 割も再治療に至る。治療数の多さと再治療率の高さを考えると、医療費の高騰による国家予算の逼迫に喘ぐ我が国にとって、早急に対処すべき緊急課題の一つと言える。本研究では、我が国発世界初の体内埋植用吸収性接着材料であるリン酸化プルランをキーマテリアルとして、辺縁封鎖性と硬組織再生性を両立した革新的な歯内療法用材料を開発し、実用化につなげることを目的とし、歯内療法の治療成績の著しい向上が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 材料の調整および最適化

##### 接着性 MTA の調整

歯科用水硬性セメントである MTA (Mineral Trioxide Aggregate) は、歯内療法用材料として幅広く用いられているが、歯質に接着しないため、操作性や辺縁封鎖性に問題がある。近年、レジン系材料に MTA を添加した製品も市場に出てきてはいるが、①レジンで包埋されるため、MTA の薬効が激減する。また、②乾燥の難しい歯内療法では、レジンの歯質接着性十分に発現できず辺縁漏洩が生じる。これは、接着性に優れたレジン系材料でも改善できない問題点である。そこで湿った生体硬組織にも接着するように一分子中に多数のリン酸基を導入した多糖誘導体リン酸化プルラン(右図)を歯内療法用材料に添加した。



##### アパタイト系およびバイオガラス系接着性歯内療法用材料の試作

アパタイト系やバイオガラス系などいくつかの歯内療法用材料を試作し、硬化特性と機械的性質を中心に、操作性など臨床使用を想定して必要となる試験項目も含めて幅広く評価した。さらに、これらの試験を通して抽出したアパタイト系やバイオガラス系試作歯内療法用材料の問題点に対して、研究期間中に改善の余地を見出せるかも合わせて検討した。

#### (2) 覆髄・歯髄再生能の組織学的観察

サル歯髄の前段階として、ラットを用い、リン酸化プルランを混和した試作接着性 MTA セメントにて直接覆髄した。コントロールにはリン酸化プルラン単味、白金ナノコロイド第一世代、第二世代、および第三世代を用いた。ウィスターラットオス 8 ~ 9 週齢にイソフルランによる吸入麻酔後、3 種混合注射を行い全身麻酔を施した。上顎左右第 1 臼歯にスチールバーを用いて近心側から露髄させた。止血確認後、上記の材料をそれぞれ歯髄に貼付し、スーパーボンドにて仮封を行った。0 ~ 8 週で屠殺し、通法に従い固定、脱灰、包埋を行った。厚み 5 μm の切片を作製した後、ヘマトキシリン-エオジン染色標本での評価を行った。短期においては炎症反応、長期においてはデンチンブリッジの形成能を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 材料の調整および最適化

##### 接着性 MTA の調整

接着性 MTA に関しては、医工連携事業化推進事業 (平成 26-28 年度) にて株式会社ジーシーが試作品を作製している。覆髄用とルートシーラーに具備すべき特性を有した試作品が完成しており、動物実験にはそれらの組成物を用いた。

## アパタイト系バイオガラス系接着性歯内療法用材料の試作

当初は MTA 同様、アパタイト系やバイオガラス系などいくつかの候補材料についても検討したが、歯内療法用材料としての操作性と機能を得るには至らなかった。まず、アパタイト系試作歯内療法用材料では、リン酸化プルランのような有機物の添加量が増えるに従い、結晶成長が遅れて臨床での使用に足る性質が得られないことが分かった。またバイオガラス系は、ナトリウム塩の形で添加したリン酸化プルランでは、十分な効果につながらないことが示唆された。これらは材料本来の特性によるところが大きいと、改善する方法を見いだすのは難しく、また、仮に改善できて安全性が担保できるかなど新たな問題が生じる。改善に要する時間に加え、製造コストの上昇も避けられない。これに対して、接着性 MTA の場合は、元々の MTA の操作性の問題点がリン酸化プルランの添加で改善できることが、実験開始当初から明らかになっていた。さらには国内外の歯科医療の流れが歯内療法用材料として MTA を支持する方向に傾いたため、将来的な実用化を考えて、上記の接着性 MTA を開発・実用化する戦略で研究資源を投じることにした。

### (2) 覆髄・歯髄再生の組織学的評価

#### 動物実験方法の確立

ラット歯髄を用いた実験では麻酔導入から処置を行い覚醒、その後の飼育等様々な段階があり、それぞれが実験結果に影響を及ぼす。そこで、本実験では動物実験方法の確立をまず一年目に行った。

ラット覆髄実験では麻酔導入後覆髄処置を行う際の歯が小さいことが難点の一つである。ラット歯は非常に小さく均一な露髄面を形成することが困難である。そこで覆髄処置を行う機器を工夫作成し、簡便な手技によって覆髄処置を行うことが可能



ラット左右上顎第一白歯は非常に小さく、覆髄処置は困難である

となった。また、予備実験の段階でラット覚醒後、エサを咬合すると歯が破折することや、エサが歯髄の中に迷入することがあった。そこで、本実験では粉末状の餌を与えることでそれらの問題点を解決した。

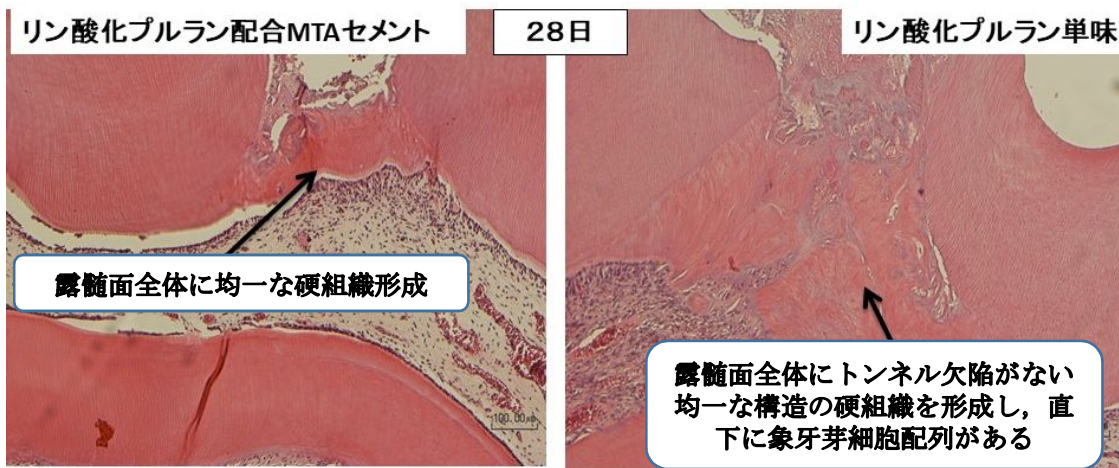
組織学的研究では免疫染色の際の試薬や手技が結果に影響を及ぼすことがある。硬組織を加熱処理による不活化を行った場合飼料がスライドガラスから剥離することがあった。そこで、不活化方法を変更することで免疫染色を可能にした。

以上の方法により、ラット直接覆髄の動物実験方法を確立した。

#### 組織学的評価

2年目以降は、ラットを用い、リン酸化プルランを混和した試作接着性 MTA セメントにて直接覆髄した。コントロールにはリン酸化プルラン単味、白金ナノコロイド第一世代、第二世代、および第三世代を用いた。3・7・28日後の歯髄反応を組織学的に評価した。

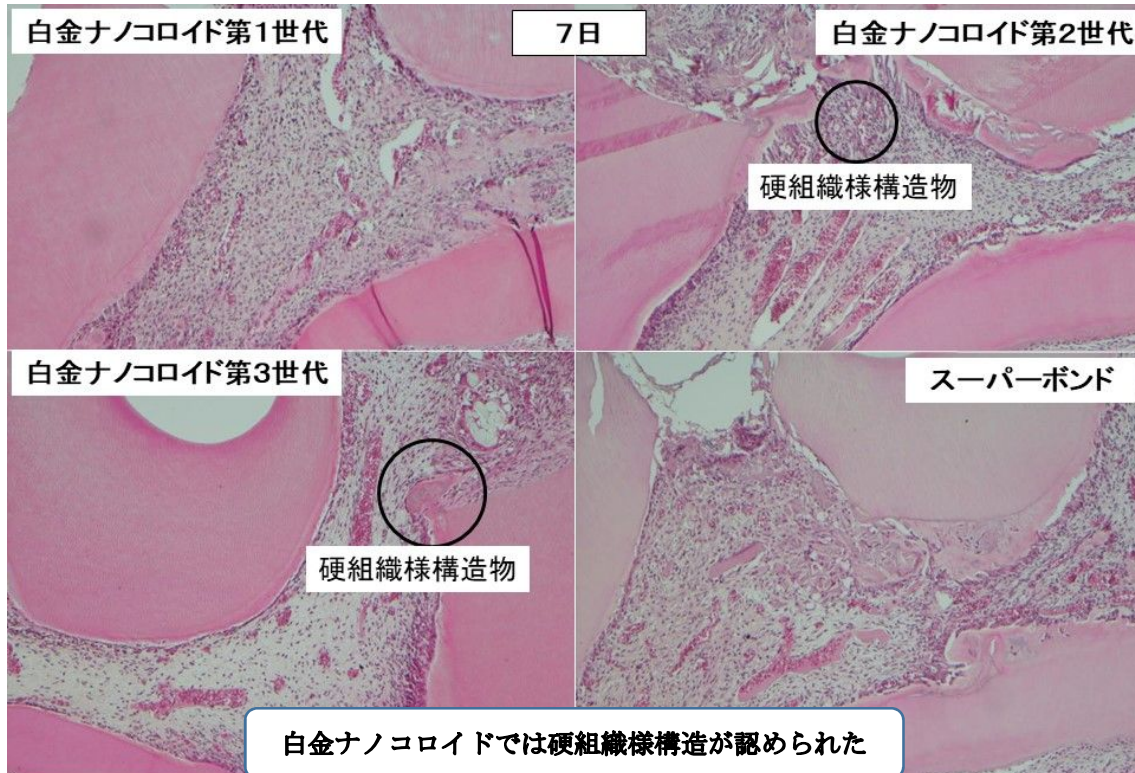
HE 染色では、3日ではリン酸化プルラン配合 MTA セメント及びリン酸化プルランは露髄面直下に僅かな炎症が生じていたものの、血管拡張や充血は認められず正常な状態に近い組織像を示した。7日でリン酸化プルラン配合 MTA セメント、リン酸化プルランいずれの材料でも既に露



髄面に硬組織様構造が形成され、象牙芽細胞が断端に沿って配列しているのが認められた。28日後ではリン酸化プルラン配合 MTA セメントは露髄面全体に均一で厚くトンネル欠陥と呼ばれる空洞が無く、硬組織直下に象牙芽細胞が配列する正常組織に近い硬組織が形成された。リン酸化プルランでも同様の所見が認められたが、一部の試料において露髄面の深部でも硬組織が形成されていた(上図参照)。このことからリン酸化プルラン単独でも旺盛な硬組織形成が生じさ

せるが、MTA セメントを配合することでその形成がコントロールされることが示唆された。

白金ナノコロイドでは3日の時点でネガティブコントロールであるスーパーボンドでは炎症範囲が広く、歯髄全体に炎症が広がっているものが観察された。さらに露髄面直下では拡張した血管内で充血が認められた。一方、直接覆髄材として白金ナノコロイドを貼付したところ、第一世代、第二世代、第三世代いずれにおいてもネガティブコントロールと比較して歯髄の炎症範囲は少なく、血管拡張や充血も少なかった。7日ではスーパーボンドは炎症範囲、血管拡張と充血



が減少しているものの、露髄面直下の範囲で炎症と充血が継続していた。一方、白金ナノコロイドでは炎症は露髄面のごく一部や全く炎症が生じていなく、充血や血管拡張も減少していた。さらに、一部の試料では硬組織様構造物が形成されていた。28日後の試料ではネガティブコントロール群では硬組織が形成されるものの、露髄面全体を覆っていない試料や、形成された硬組織直下に象牙芽細胞の配列が認められなく、硬組織内にトンネル欠陥と呼ばれる空洞が生じている試料も認められた。白金ナノコロイドでは硬組織が露髄面全体を被覆し、形成面直下では象牙芽細胞が配列し、トンネル欠陥が認められない試料が多く観察された。白金ナノコロイドが示した作用は白金ナノコロイドの抗酸化作用とスーパーボンドに含まれるモノマー成分の浸潤を妨げることが寄与したことが考えられる（上図参照）。

今後追加実験を行い、白金ナノコロイドの歯髄に対する影響を検討する。本研究によって白金ナノコロイドも直接覆髄材として有用であることが示唆された。

白金ナノコロイドではリン酸化ブルラン配合 MTA セメントと同様の傾向の組織学的所見が示され直接覆髄材として用いられる可能性が示唆された。さらに、覆髄直後での炎症が減少し処置後の疼痛が減少する可能性が示された。

HE 染色の結果から象牙芽細胞がどのような機序を経て硬組織形成を行うのかを確認するために、象牙芽細胞に対する免疫染色を行った。その結果、いずれの材料でも露髄後徐々に象牙芽細胞が露髄面の境界に配列され硬組織が形成されていくことが明らかになった。さらにリン酸化ブルランと白金ナノコロイドはスーパーボンドと比較して、早期に象牙芽細胞の配列を誘導し、硬組織形成が早期に生じていくことが示された。

これらの結果から、リン酸化ブルラン配合 MTA 及び、リン酸化ブルラン、白金ナノコロイドが直接覆髄材として良好な成績を示したので、歯髄を保存するうえで優れた材料となる可能性が示唆された。本研究の意義は大きいと考える。

また本研究は、当初リン酸化ブルラン配合 MTA セメントのラット歯髄に対する影響を評価していたが、リン酸化ブルラン単味、各種白金ナノコロイドも直接覆髄材として応用可能であることが明らかになったので、今後さらに詳細に研究を続行することを考えている。さらに、細胞・遺伝子に着目して、直接覆髄材の歯髄に対する影響や歯髄治癒過程のメカニズムを解明し、最終的には、日本独自の全く新しい国際的競争力を持った直接覆髄材の開発に繋げたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 ISLAM R, TOIDA Y, CHEN F, CHOWDHURY AA, TANAKA T, SANO H, KITAMURA T, HIDA K, IIZUKA T, YOSHIDA Y.
2. 発表標題 Evaluation of a novel direct pulp capping material containing Phosphorylated Pullulan.
3. 学会等名 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	阿部 薫明 (Abe Shigeaki)  (40374566)	北海道大学・歯学研究院・助教  (10101)	
研究分担者	吉田 靖弘 (Yoshida Yasuhiro)  (90281162)	北海道大学・歯学研究院・教授  (10101)	