

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11708

研究課題名(和文) 訪問・在宅に向けた新しい概念の保存治療法の開発 高周波/電磁波などを応用して

研究課題名(英文) Development of a new approach to the treatments in conservative dentistry based on a concept for home or visit care.

研究代表者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・非常勤講師

研究者番号：30173800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：高周波/電磁波のう蝕と初期歯髄炎への効果を検討した。高周波/電磁波はう蝕細菌のミュータンス菌のみならず他の細菌に対しても殺菌効果が認められた。象牙細管内の細菌には高周波/電磁波はあまり作用を示さず、更なる出力や照射条件の探索が求められた。高周波/電磁波を深在性う蝕へ応用するにあたり、まず初期歯髄炎へのカテキン(EGCG)およびポリフェノール(CAPE)の作用を解析した。その結果、EGCGは象牙芽細胞のケモカイン産生およびiNOS発現を抑制すること、CAPEはVEGF産生を増強すること等の抗炎症作用が明らかとなり、今後の高周波/電磁波治療との併用に筋道がついた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会となり、在宅・訪問診療がこれからの歯科医療において重要な位置を占めると考えられる。我々はポータブル高周波/電磁波治療器を用いた新しい治療法を開発し、これを在宅・訪問診療に活用しようと考えた。今回、高周波/電磁波には殺菌作用と共に宿主細胞の活性化効果のあることを明らかとし、初期歯髄炎を伴う深在性齲蝕治療への応用に筋道をつけた。健康寿命の延伸が医療費削減の観点からも喫緊の課題となっており、健康寿命の延伸には口腔機能の維持が必須である。在宅・訪問診療の現場で高周波/電磁波治療器を用いた保存的治療を行うことにより、口腔機能ひいては健康寿命延伸に寄与できるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)： We studied the effects of electromagnetic wave irradiation (EMWI) to dental caries and initial stage of pulpitis. EMWI showed the bactericidal effects not only to mutans streptococci but also other bacteria. However, EMWI showed little effect to the bacteria in dentinal tubules. Further analysis will be needed.

We also investigated the natural immunity of dental pulp, because bacteria or its components would induce the inflammation of the pulp. We found epigallocatechin-3-gallate (EGCG) suppressed the production of chemokines and iNOS from the odontoblasts, and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) induced VEGF expression, indicating EGCG or CAPE can be used as anti-inflammation agents. We are further to investigate to use EMWI together with EGCG or CAPE.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：高周波/電磁波 う蝕治療 初期歯髄炎 在宅・訪問診療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2011年(平成22)9月に100歳以上が4万人を突破するなど、我が国では高齢化が急激に進み2025年(令和7)には後期高齢者(75歳以上)は総人口の18%になると予想されている。そして介護施設に居住する人は2012年で92万人であるが、令和7年には161万人になると予想されていた。

高齢者の残存歯数は、幼年期のう蝕予防や歯周治療、そして口腔ケアへの認識の向上により大幅に増加している。しかしその一方、ADL(日常生活動作)の低下による二次齲蝕や根面齲蝕、それに続発する歯髄炎が新たな問題としてクローズアップされていた。食事や会話は高齢者の大きな楽しみの一つであるが、これらが阻害されて起こるQOLの低下は、高齢化社会の由々しき問題と考えられた。

介護施設や居住系介護の高齢者が歯科診療所へ通うのは、たとえそれが近隣であっても限界があり、在宅・訪問がこれからの歯科医療の重要なポイントになって行くものと思われた。在宅・訪問診療にはポータブル機器で簡便に行える治療法の開発が望まれた。特に深在性齲蝕症例では、放置すると歯髄炎の激しい痛みが予想されるため、これに対する保存的治療法の開発が望まれた。

我々は高周波/電磁波を用いた新しい治療法を開発してきた。そして、高周波/電磁波を照射することにより細菌が不活性化する可能性のあること、そして病変部の治癒促進に寄与する可能性のあることを見出した。実際、難治性の根尖性歯周炎に高周波/電磁波を応用すると、根尖病変が劇的に治癒することを報告した(日歯内療誌, 2010)。

国内、国外でも深在性齲蝕の治療法は解決すべき重要なテーマとされており、3MIX-MP法(日歯保歯, 1998)、Stepwise法(Dent Traumatol, 1996)等が提唱され、臨床的にも検討されている。我々も深在性齲蝕・初期歯髄炎に対する治療法を開発を目指してきた。すなわち、コンポジットレジン接着システムを応用した齲蝕細菌封じ込め法(STOC法, クインテッセンス1999)、アパタイト結晶構造の向上と抗菌作用を持つ抗菌薬添加フッ化ジアミンシリケートの齲蝕治療への応用(Am J Dent, 2011)、抗菌作用と歯髄への抗炎症作用を持つ緑茶カテキンの初期歯髄炎への応用(Life Sci, 2010, Eur J Oral Sci, 2010)等を報告してきた。

そこで、高周波/電磁波の殺菌・消毒作用、細胞賦活化作用に着目し、これを深在性齲蝕および初期歯髄炎の治療に応用できるのではと考えた。そして、開発中の高周波/電磁波治療器の小型化を進めてポータブル化すれば、訪問・在宅診療に用いることが可能と考えた。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎え、介護施設や居住系介護の高齢者への対応が喫緊の課題となっている。特に痛みの激しい歯髄炎の治療は在宅では困難となるため、これを避けるための簡便で侵襲の少ない深在性齲蝕の治療法が開発が望まれる。我々は高周波/電磁波が殺菌作用を示すのみならず、細胞の賦活化作用を持つことを明らかにし、これを応用した難治性根尖性歯周炎の新しい治療法を開発してきた。今回、高周波/電磁波を深在性齲蝕および初期歯髄炎の治療に活用することを目的に、この齲蝕原性細菌などへの消毒効果、象牙細管侵入細菌への殺菌効果を検討した。また、う蝕進行抑制剤の開発のため、ammonium hexafluorosilicate(SiF)への抗菌性物質の添加効果を検討した。さらに、新しい歯髄炎の保存療法を開発することを目的に、ラット象牙芽細胞様細胞を用いて自然免疫関連レセプターを解析すると共に、ポリフェノール類の初期歯髄炎への治療効果を検討した。

3. 研究の方法

(1) 齲蝕原性細菌などに対する高周波/電磁波照射の効果とその機序の解析

・*Streptococcus mutans*と*Enterococcus faecalis*への高周波電磁波の殺菌作用とその作用機序を解析した。すなわち、細菌を培養し、高周波/電磁波を電極を用いて培養溶液内で照射して菌の発育状況を検討した。なお、照射条件はこれまでの研究結果より500kHzとし、照射時間を変えて検討した。また、照射後の細菌の形態的变化を観察し、その殺菌作用の機序を解析した。

(2) 象牙細管内細菌に対する高周波/電磁波照射の効果とその機序の解析

・既に確立している齲蝕細菌象牙細管侵入モデルを用いて、高周波/電磁波を照射し、侵入細菌の生死を培養法および上記の組織学的方法で解析した。

(3) 抗菌性薬物添加SiF溶液の象牙質齲蝕への効果

・SiF溶液にクロルヘキシジン、塩化セチルピリミジン、イソプロピルメチルフェノール、カテキンを加え、ハイドロキシアパタイトに塗布してその耐酸性及び抗菌性を解析した。

(4) 歯髄炎初期における歯髄自然免疫系の解析およびその治療法の開発

・臨床的に得た歯髄組織および象牙芽細胞様細胞であるKN-3を用い、自然免疫関連レセプターMacrophage-inducible C-type lectin (Mincle)の発現と機能を解析した。

(5) 歯髄炎初期における治療法の開発

・KN-3を用い、象牙芽細胞へのカテキン類epigallocatechin-3-gallate(EGCG)の抗炎症作用およびプロポリスの成分でポリフェノールのCaffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)のVascular Endothelial Growth Factor (VEGF)産生に与える作用を検討した。

4. 研究成果

(1) 高周波/電磁波照射の効果

・ *S. mutans* MT8148 に高周波/電磁波照射(500kHz)を行い、その殺菌効果を培養法を用いて検討した。その結果、能動電極の挿入程度により菌の生存率に差が出た。すなわち、電極の挿入深度が深いほど殺菌作用が強く、9mm で菌はほぼ死滅した。これは高周波/電磁波を齶蝕に用いる場合、電極の接触部位を広くする必要性のあることを示唆している(図1)。

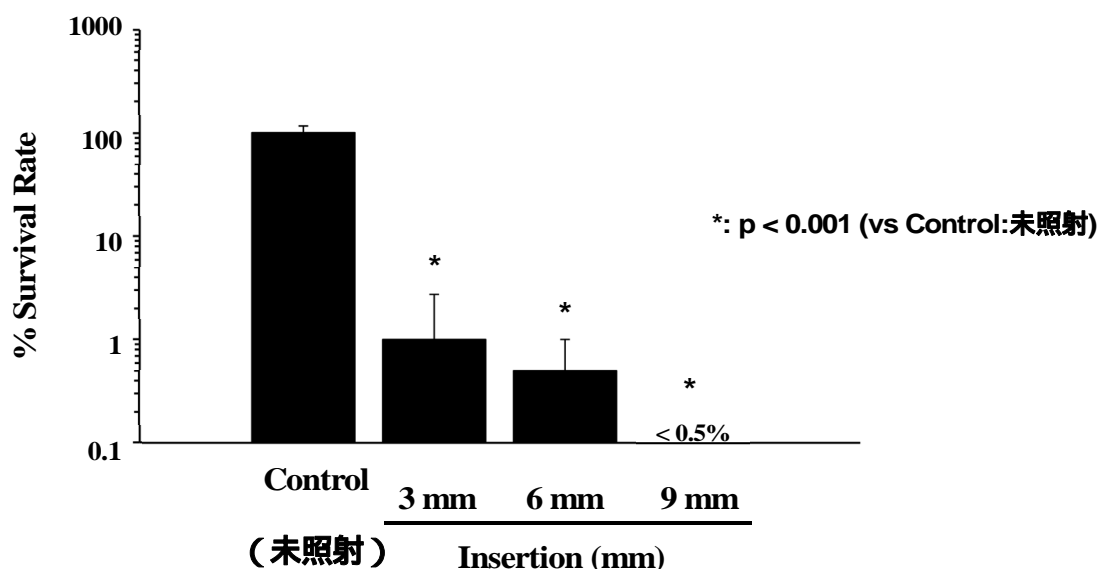


図1 高周波/電磁波の殺菌効果

なお、*E. faecalis* に対しても同様の効果が得られた。

(2) 象牙細管内細菌に対する高周波/電磁波照射の効果とその機序の解析

・ 一方、高周波/電磁波照射の象牙細管内細菌への効果は、当初予想されたほど認められなかった。これはミュータンス菌などへの殺菌効果が、高周波/電磁波照射機器の周辺では見られるものの、少し離れるとその効果は著しく減弱することより、高周波/電磁波照射によるジュール熱の発生が限られており、温熱効果だけでは細菌を不活化することは難しいためと考えられた。高周波/電磁波照射はジュール熱だけではない他の抗菌作用を持つ可能性があり、照射方法や条件、薬剤等の併用が今後の課題となった。

(3) 抗菌性薬物添加 SiF 溶液の象牙質齶蝕への効果

・ う蝕進行抑制作用を持つ SiF 溶液に、クロルヘキシジン(CHX)、塩化セチルピリミジン(CPC)、イソプロピルメチルフェノール、カテキンを加え、その耐酸性・抗菌性の増強作用を解析した。その結果、CPC 添加群が最もアパタイトブロックの酸抵抗性を強め、抗菌性については、陽性対象のフッ化ジアンミン銀には及ばなかったものの、CHX 添加群や CPC 添加群が高い抗菌性を示した。これらの結果は、抗菌性 SiF と高周波/電磁波照射の併用により、高い齶蝕抑制効果を期待できることが示している。

(4) 歯髄炎初期における歯髄自然免疫系の解析およびその治療法の開発

・ C 型レクチン Mincle は結核菌やカンジダの構成成分を認識するほか、核内タンパク質 Spliceosome-associated protein 130 も認識し種々のサイトカイン産生を増強させる。臨床的に得たヒト歯髄組織ならびに KN-3 細胞を用い、Mincle mRNA を RT-PCR 法で解析した。その結果、ヒト歯髄組織ならびに KN-3 細胞に Mincle mRNA が発現しており、iE-DAP で増強された。さらに、Mincle の特異的リガンドの Trehalose dimycolate 刺激で CCL4 mRNA 発現を増強することが明らかとなった。

(5) 歯髄炎初期における治療法の開発

・ 深在性齶蝕は症状の有無は別として、歯髄炎を伴うことが明らかとなっている。高周波/電磁波照射による齶蝕治療を行うにあたり、初期の歯髄炎の病理・病態の解析は必須である。そこで、歯髄炎の初期に重要な働きを担うと考えられる自然免疫機構に着目し研究を進めた。齶蝕において象牙細管に侵入してきた細菌成分に出会うのは、歯髄組織では象牙芽細胞と考えられる。そこで、象牙芽細胞様細胞である KN-3 を用いて検討した。その結果、KN-3 細胞には病原体関連分子パターンを認識するパターン認識受容体、特に細胞質内パターン認識受容体の NOD1 が多く存在することが明らかとなった。そこで、緑茶より抽出される生理活性物質のカテキン EGCG に着目し、象牙芽細胞に対する抗炎症作用を検討した。その結果、EGCG は TNF- や IL-1

刺激による KN-3 細胞からのケモカイン産生および iNOS 発現を抑制することが明らかとなった。また、CAPE により KN-3 細胞からの VEGF 産生が増強されること、石灰化活性を誘導することを明らかにした。さらに、この CAPE の作用は nuclear factor- κ B (NF- κ B) を介して行われること、そして、この作用は二つある VEGF 受容体の内、VEGFR-2 のみを増強することが明らかとなった (図 2)。

Fig.6 VEGF receptors mRNA expressions in CAPE-treated KN-3 cells

(B) VEGFR-2

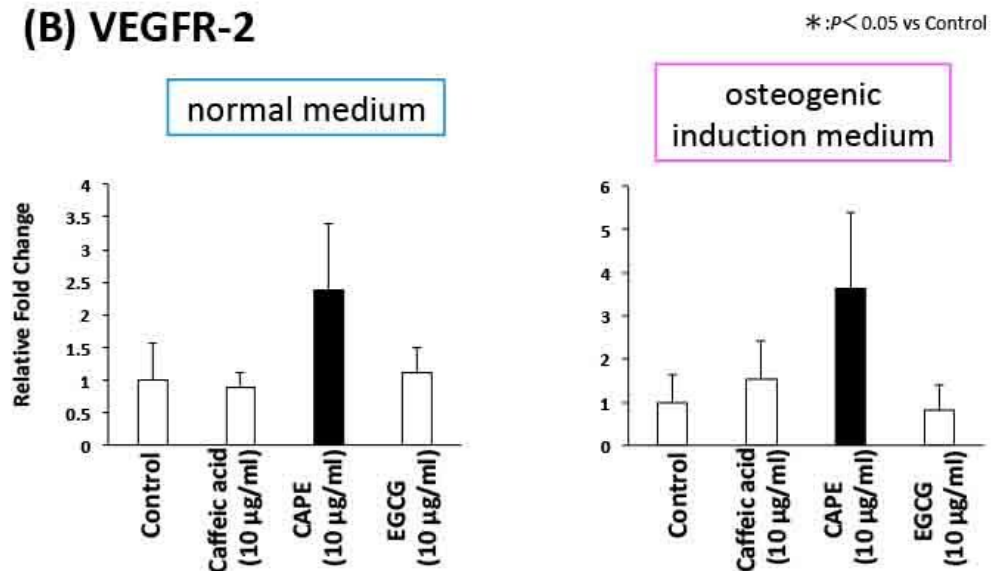


図 2 CAPE 処理による KN-3 細胞 VEGF 受容体の mRNA 発現

今後、カテキンおよびプロポリスの成分の歯髄防御作用に対し、どのように高周波/電磁波照射が影響を及ぼすかを、象牙芽細胞の硬組織誘導と合わせて検討して行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Hitomi Kuramoto, Kouji Hirao, Hironichi Yumoto, Yuki Hosokawa, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Ayako Washio, Chiaki Kitamura, Takashi Matsuo	4. 巻 -
2. 論文標題 Caffeic acid phenetyl ester (CAPE) induces VEGF Expression and production in rat odontoblastic cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 松尾敬志, 中西 正	4. 巻 62
2. 論文標題 深在性う蝕への対応と歯髄の免疫反応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Hironichi Yumoto, Kouji Hirao, Yuki Hosokawa, Hitomi Kuramoto, Daisuke Takegawa, Tadashi Nakanishi, Takashi Matsuo	4. 巻 54
2. 論文標題 The roles of odontoblasts in dental pulp innate immunity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 105-117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Toshiyuki Suge, Shingo Shibata, Kunio Ishikawa, Takashi Matsuo	4. 巻 31
2. 論文標題 Fluoride activity of antibacterial ammonium hexafluorosilicate solution for the prevention of dentin caries.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Dentistry	6. 最初と最後の頁 103-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 蔵本瞳, 鷺尾絢子, 中西 正, 武川大輔, 北村知昭, 松尾敬志	4. 巻 60
2. 論文標題 ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)におけるカテキンの抗炎症作用.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯科保存学雑誌	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 中西 正, 松尾敬志	4. 巻 77
2. 論文標題 感染根管における細菌感染の実態	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯科評論	6. 最初と最後の頁 45-58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 武川大輔, 中西正, 平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 蔵本瞳, 松尾敬志
2. 発表標題 NODリガンド刺激したヒト象牙芽細胞様細胞におけるインターフェロン の影響
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年度春季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蔵本瞳, 湯本浩通, 平尾功治, 細川由樹, 松尾敬志
2. 発表標題 ラット象牙芽細胞(KN-3)におけるVEGF産生誘導機序の解析
3. 学会等名 第40回歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takashi Matsuo
2. 発表標題 Dental caries and its sequelae - From a point of view of infection
3. 学会等名 20th KACD & JACD joint scientific meeting (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾敬志
2. 発表標題 歯科保険に関するもの
3. 学会等名 第58回全国国保地域医療学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Toshiyuki Suge, Takashi Matsuo
2. 発表標題 Effects of toothpaste containing surface pre-reacted glass-ionomer filler on demineralization
3. 学会等名 96th General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 蔵本 暲, 湯本 浩通, 平尾 功治, 細川 由樹, 中西 正, 武川 大輔, 松尾 敬志
2. 発表標題 Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE)の象牙芽細胞と骨芽細胞におけるVEGF産生誘導機序の解析
3. 学会等名 日本歯科保存学会2018年度春季学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平尾功治, 蔵本瞳, 湯本浩通, 細川由樹, 松尾敬志
2. 発表標題 プロポリス生理活性物質 (CAPE: Caffeic Acid Phenethyl Ester) を用いた新規覆髄剤の開発
3. 学会等名 第17回西日本歯内療法学会研修会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 蔵本瞳, 松尾敬志
2. 発表標題 ヒト歯髄組織ならびにラット象牙芽細胞様細胞 (KN-3) におけるMincle発現と象牙芽細胞での機能解析
3. 学会等名 第38回日本歯内療法学会学術大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計5件

1. 著者名 松尾敬志, 飯島洋一, 池島巖, 稲井紀通, 興地隆史, 大月昌幸, 北村知昭, 河野篤, 齋藤隆史, 佐野英彦, 島田康史, 千田章, 田上順次, 中島正俊, 奈良陽一郎, 二階堂徹, 住谷佳浩, 藤谷盛興, 山本一世, 横瀬敏志, 吉山昌宏 他66名	4. 発行年 2020年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 321
3. 書名 第5版保存修復学21	

1. 著者名 松尾敬志, 中西正, 中村洋, 恵比須繁之, 阿南壽, 古市保志, 森真理, 林美加子, 泉利夫, 興地隆史, 中川寛一, 諸富孝彦, 石井信之, 寺下正道, 木村裕一, 勝海一郎, 松島潔, 前田宗宏, 小木曾文内, 五十嵐勝 他8名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 292
3. 書名 第5版歯内治療学	

1. 著者名 松尾敬志, 菅俊行, 渡辺聡, 興地隆史, 吉岡隆知, 砂田勝久, 林美加子, 岡口守雄, 和泉英之, 辺見浩一, 坂東信, 齋藤正寛, 武市収, 小木曾文内, 阿部修, 柴秀樹, 前田英史, 中川寛一, 西谷佳浩, 星加知宏 他2名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 デンタルダイヤモンド	5. 総ページ数 250
3. 書名 MUST OF INITIAL TREATMENT	

1. 著者名 松尾敬志, 中西正, 赤峰昭文, 荒木孝二, 伊藤祥作, 小木曾文内, 北村知昭, 木村裕一, 砂川光宏, 中川寛一, 中田和彦, 野杵由一郎, 林善彦, 細矢哲康他, 前田宗宏, 村松敬, 諸富孝彦, 藪根俊晃, 横瀬敏志, 吉嶺嘉人	4. 発行年 2018年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 321
3. 書名 第5版エンドドンティクス	

1. 著者名 松尾敬志, 菅俊行, 田中利典, 吉岡隆知, 石井宏, 大墨竜也, 野杵由一郎, 西藤法子, 柴秀樹, 古澤成博, 武市収, 小木曾文内, 三橋晃, 吉岡俊彦, 辻本真規, 朝日陽子, 林美加子, 福西浩一, 和達礼子, 須藤亨, 澤田則宏 他19名	4. 発行年 2018年
2. 出版社 デンタルダイヤモンド	5. 総ページ数 201
3. 書名 歯内療法のレベルアップ&ヒント	

〔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	中西 正 (NAKANISHI Tadashi) (00217770)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	湯本 浩通 (YUMOTO Hiromichi) (60284303)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	菅 俊行 (SUGE Toshiyuki) (60243713)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究 分 担 者	平尾 功治 (HIRAO Kouji) (00581399)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部（歯学域）・助教 (16101)	