

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09590

研究課題名(和文)硬組織誘導性新規合成ペプチドの歯内治療への適用についての検索

研究課題名(英文) Search for the application of a novel synthetic peptide that induces hard tissue to endodontic treatment

研究代表者

辻 則正 (TSUJI, NORIMASA)

大阪歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30454565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エナメルマトリックスデリバティブの研究をもとに作成した硬組織誘導性新規合成ペプチドでラット直接覆髄をおこない直接覆髄材として歯内治療への応用の可能性を探った。直接覆髄二週後、ラット上顎骨を摘出し、マイクロCT撮影した。その後脱灰し病理組織標本を作製し比較検討した。CT像では、ペプチド処置群は非処置群と比べて歯冠部歯髄腔の体積に占める不透過像の割合が有意に高かった。また、病理組織像でもペプチド処置群に大量の硬組織形成が確認された。新規合成ペプチドの直接覆髄材の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エナメルマトリックスデリバティブは歯周治療で硬組織再生に用いられ、良好な臨床成績を残している。しかし、ブタの歯胚由来の材料であるため、未知の病原への可能性が払拭できず患者の拒否感が強いのも事実である。エナメルマトリックスデリバティブを基に作成した新規合成ペプチドは硬組織誘導性を残しながら未知の病原への可能性を払拭した材料である。今回、in vivoで、硬組織形成を確認し、歯内治療応用への可能性を明らかとした本研究の意義は極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to examine the reaction of dental pulp tissue directly capped with a synthetic peptide prepared based on EMD research, and to investigate its potential as a pulp capping material.

CT images for both groups showed an opaque area in the coronal pulp cavity, and the fraction of images showing opacity was significantly higher in the peptide group. A large amount of hard tissue was formed in the coronal pulp cavity in the peptide group, around which aggregation of cells with eosinophilic substances in polytopes was observed. Only slight hard tissue formation was observed in the control group. As it showed eosinophilicity on hematoxylin and eosin staining, the synthetic peptide was suggested to be involved in hard tissue formation. Synthetic peptides can potentially be used as pulp capping materials.

研究分野：歯内治療学

キーワード：新規合成ペプチド 直接覆髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エナメルマトリックスデリバティブをラット背部皮下へ注射すると、好酸性の円柱小体と軟骨様組織が形成することが確認され、その、円柱小体を MALDI-TOF 解析して得たフラグメントの中から WYQNMIR という共通の7種類のアミノ酸シークエンスが含まれていることを確認した。WYQNMIR は、ブタのアメロジェニン・エクソン5の部分配列であるとともに、ウシにおける同配列であることも確認した。そのシークエンスから合成したペプチドを、ラット皮下に接種したところ、2週後にラット背部皮下に異所性に骨、軟骨および軟骨内骨化を認め、合成したペプチドが硬組織分化誘導能を有している可能性を示唆した。

一方、歯内治療領域では、エナメルマトリックスデリバティブがヒト歯髄細胞の硬組織細胞への分化ならびに硬組織形成を促進するという報告や、エナメルマトリックスデリバティブをラットの露髄部に直接覆髄剤として使用したところ覆髄部に象牙芽細胞様細胞を認め、覆髄剤として有用であることを示唆する研究結果が報告されており、歯髄の硬組織形成にもエナメルマトリックスデリバティブが関与しうる可能性は高いと考えられている。今後、歯内治療領域においてもエナメルマトリックスデリバティブの応用範囲が拡大することが予測されるが、現在歯周炎患者の歯周組織再生治療用として市場に流通しているエナメルマトリックスデリバティブは、幼若ブタの歯胚から抽出している生物由来材料であるため、未知の病原体への問題点を完全に払拭することが出来ず、患者からの拒否感が強いことも事実である。

そこで、生物由来材料ではないエナメルマトリックスデリバティブを元に作成した合成ペプチドが歯髄組織にどのように作用するのかを *in vivo* で調べることにした。

2. 研究の目的

歯周治療では、エナメルマトリックスデリバティブが硬組織を誘導し歯周組織の再生に応用されている。この分子は歯内治療領域においても硬組織誘導、あるいは歯髄再生治療に応用できないか検討が進められ、*in vitro* では良好な成果を得つつあった。しかし、現在市場に流通しているエナメルマトリックスデリバティブは幼若ブタの歯胚由来のため、未知の病原体の問題点を完全に排除できていない。そこで、今回、エナメルマトリックスデリバティブの基礎研究を元に作成した合成ペプチドを歯内治療に応用するために実験に供することにした。今回使用する合成ペプチドは歯周組織に硬組織形成を誘導することが明らかとなっており、本研究では、合成ペプチドの歯髄組織に対する作用について解析することを目的とした。

3. 研究の方法

6週齢の雄性 Sprague Dawley ラット上顎臼歯を実験に供した。全身麻酔後、上顎臼歯にラバーダム防湿を行い、咬合面を点状露髄させた。生理食塩水にて洗浄止血後露髄面を乾燥し、アルギン酸プロピレングリコール水溶液に混和した合成ペプチドで直接覆髄を行い実験群とした。直接覆髄後、窩洞は光重合型レジン強化グラスアイオノマーセメントで封鎖し仮封した。対照は反対側の臼歯とし、点状露髄させた後、生理食塩水にて洗浄止血後、露髄面を乾燥させた後、露髄面を何も処置することなく、光重合型レジン強化グラスアイオノマーセメントで窩洞を封鎖し対照群とした。

2週後、麻酔薬の過剰投与で安楽死後、10%中性緩衝ホルマリン水溶液で還流固定を行った。その後、上顎骨を摘出して同固定液にて浸漬し、マイクロフォーカス CT 撮影を行った。マイクロフォーカス CT 像を読影後、歯冠部歯髄腔の体積を歯冠部歯髄腔内にある不透過像の体積を計測し、その割合を算出し、t 検定をおこなった。その後試料は 10%EDTA 溶液にて脱灰した。脱灰後、パラフィン包埋を行い、薄切後、ヘマトキシリンエオジン染色を施し、病理組織学的に観察し検討した。

4. 研究成果

マイクロフォーカス CT 像では実験群、対照群ともに歯冠部歯髄腔に不透過像を認めた。歯根部歯髄腔にはともに不透過像は認めなかった。実験群では歯冠部歯髄腔に不透過像が散在していた。対照群ではわずかな不透過像を認めた。

マイクロフォーカス CT 像における歯冠部歯髄腔に対する不透過像の割合は実験群で $9.52 \pm 1.68\%$ 、対照群で $2.68 \pm 0.13\%$ であった。計測で得られた実験群と対照群の不透過像が歯髄腔に占める割合を t 検定で評価すると、実験群の不透過像の割合は対照群の不透過像の割合に対し、有意に高かった。 $(p < 0.01)$

病理組織標本像では実験群では、全ての歯の歯冠部の歯髄腔に硬組織がみとめられ、歯冠部の

歯髓腔の象牙質壁から中央部、遠心部へと大きく形成された。(図1) また、遠心部には正常な歯髓が広がっており、歯根部には硬組織の形成はみとめなかった。また、硬組織形成部位の近辺で、好酸性物質を胞体にもつ細胞の集簇が認められた(図2)。露髄面には好中球などの炎症性細胞の浸潤が生じていた。対照群では、全ての歯の露髄面直下で歯冠部の歯髓腔の象牙質壁につながるように硬組織の形成をみとめた。しかしその大きさは歯冠部の歯髓腔中央部で象牙質壁にわずかに形成されたただけであった。また、遠心部には正常歯髓が見られ、歯根部には硬組織の形成はみとめなかった。露髄面には炎症性細胞の浸潤が生じていた。

マイクロフォーカスCT像を分析した結果、歯髓腔の体積に対する不透過像の体積の割合は実験群が対照群と比較して有意に高く、硬組織を新生したことが示唆された。新生した不透過像は露髄面ではなく、歯冠部歯髓に散在していた。今回、合成ペプチドを *in vivo* で歯髓組織に初めて用いたことで、歯髓組織に硬組織が形成されたことが確認できたことは合成ペプチドの臨床応用への可能性を考えるとその意義は大きい。

また、合成ペプチドによる直接覆髄後の歯髓組織と新生硬組織を確認するために組織標本を作製し分析した。合成ペプチドで直接覆髄を行った露髄面では炎症細胞の浸潤がみられた。炎症所見は好ましいものではないが、直接覆髄処置による外傷の影響、すなわち露髄処置やペプチド貼付の際の操作的な問題が原因である可能性も考えられる。合成ペプチドによる直接覆髄後の新生硬組織は露髄面ではなく露髄面直下の歯髓組織に多数観察され、いわゆるデンティンブリッジは形成されなかった。これは、露髄面に生じた炎症が影響したのかもしれない。対照群では、マイクロフォーカスCT像と同様に、歯髓腔に少量の新生硬組織をみとめたが、このことはラットの特性として、露髄処置後に薬剤を作用させなくても10~14日後に硬組織の形成が生じたことが以前から報告があり知られている。また、実験群の新生硬組織形成部位の近辺で、好酸性物質を胞体にもつ細胞の集簇が認められた。合成ペプチドはヘマトキシリンエオジン染色では好酸性を示すため、合成ペプチドが硬組織の形成に関与した可能性は高い。しかし、直接覆髄において理想的にはデンティンブリッジの形成が望ましい。今回、合成ペプチドを適用した基材の性状や、ペプチドの濃度などの影響で歯髓内部にペプチドが作用したことで、デンティンブリッジが形成しなかった可能性もあると考えられる。また、上述のラットのような小型の動物での操作の難易性を鑑みると、犬のような大型の動物で歯髓反応を確認することが求められるかもしれない。

様々な検討課題はあるが、本課題に使用した合成ペプチドはラット直接覆髄への適用による硬組織形成に関与し、歯内治療への応用の可能性が示唆された。

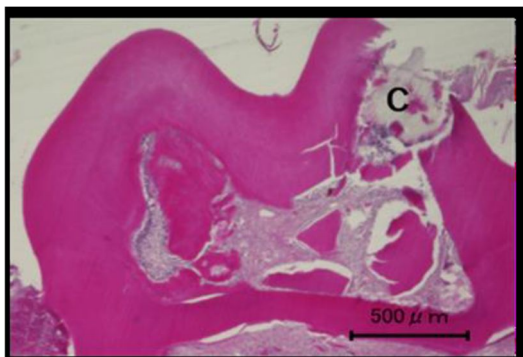


図1 実験群組織標本(4倍)
歯髓腔に多数の新生硬組織が散在している。
C: 窩洞

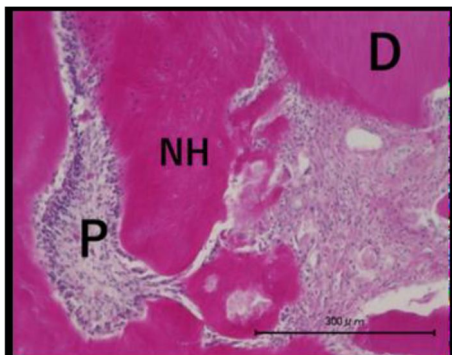


図2 実験群組織標本(20倍)
硬組織形成部位の近辺で、好酸性物質を胞体にもつ細胞の集簇を認める。
D: 象牙質 P: 歯髓 NH: 新生硬組織

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nozomi Matsuo, Norimasa Tsuji, Kazuya Tominaga and Hiroshi Maeda	4. 巻 8
2. 論文標題 Hard tissue inducibility of a novel synthetic peptide in rat pulp	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 World Journal of Advanced Research and Reviews	6. 最初と最後の頁 392,401
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.30574/wjarr.2020.8.3.0495	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松尾望、辻則正、富永和也、前田博史
2. 発表標題 ラット歯髄における新規合成ペプチドの硬組織誘導性
3. 学会等名 大阪歯科学会
4. 発表年 2020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	前田 博史 (Maeda Hiroshi) (00274001)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	
研究分担者	富永 和也 (Tominaga Kazuya) (80278572)	大阪歯科大学・歯学部・教授 (34408)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------