

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10123

研究課題名(和文) 歯髄の治癒促進と硬組織接着性を併せ持つ革新的直接覆髄材の探索研究

研究課題名(英文) Exploratory research of innovative pulp capping materials both with promoting healing of dental pulp and adhesive property to hard tissue

研究代表者

佐野 英彦 (sano, hidehiko)

北海道大学・歯学研究院・教授

研究者番号：90205998

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)：戸井田らの研究で、リン酸化プルラン含有MTA覆髄材は良好な歯髄治癒を得られることが、サルを用いた検討で判明した。ラット歯髄を用いたIslamらの研究では、コントロールの4-META/MMA-TBBレジンと比べて、リン酸化プルラン含有MTA覆髄材は極めて良好な結果を示し、加えてリン酸化プルラン単味では歯髄に何ら悪影響を及ぼさないことが判明した。予備実験として、白金ナノコロイド(CPN)をプライマーとして露髄面に塗布した場合、その後の治癒過程で、ほとんど炎症が認められないことや短期間で血管造成が見られ歯髄の治癒に貢献する可能性が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MTAの有効性が新たなキャリア(リン酸化プルラン)を用いた場合にさらに発揮することが判明し、この成果をもとにクラス2の材料として認可されている。また、リン酸化プルランは、生体内で何ら悪影響を及ぼさないことが判明し、将来的に生体内硬組織への接着性キャリアとして応用可能であろうことが示唆された。白金ナノコロイド(CPN)は、生体内に作用させると、ほとんど炎症が認められないことや短期間で血管造成が見られることから、抗炎症作用と治癒促進作用を有すると考えられる。これに関する将来の検討が、新たな生体への機能的材料開発の糸口となる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Based on the study by Toida et al, (Dent Mater J. ;41:126-133 2022), the combination of MTA and phosphorylated-pullulan resulted in good healing of exposed monkey pulp. Moreover, adhesive property of phosphorylated-pullulan made it possible to user friendly handlings and perfect dentin sealing. A report of pupal reactions after pulp capping treatments from Islam R et al, (Int Endod J. ;54:1902-1914 2021) stated interesting results. They used 4-META/MMA-TBB resin as a control material. The combination of MTA and phosphorylated-pullulan showed superior healing of pulp after application, compared to plain use of MTA. Additionally, plain use of phosphorylated-pullulan to the pulp did not show any adverse effect on the pulp healing. Preliminary study using colloidal platinum nanoparticles (CPN) to the exposed pulp demonstrated excellent pulp healing with less inflammatory reactions and prompt angiogenesis within the exposed pulp which might contribute to support good healing of the pulp.

研究分野：歯科保存学

キーワード：歯髄 接着歯学 直接覆髄 高分子材料 生体材料 歯科理工学 直接覆髄材 MTAセメント

1. 研究開始当初の背景

齲蝕や外傷等において歯を切削する際に、切削を必要とする範囲が大きく歯の神経(歯髄)まで削る場合がある。その場合、炎症を生じた歯髄に対し、抜髄という歯髄を除去する治療法がある。抜髄を行った場合、炎症は消失するが、歯の根(歯根)の破折(歯根破折)が生じやすくなる。歯根破折の場合では、抜歯が必要であり、歯の寿命が著しく減少する。しかし、歯髄への傷害が軽度である場合、歯髄に対し直接覆髄材と呼ばれる材料を貼付し、歯髄を保存する直接覆髄法と呼ばれる治療法がある。これまでのところ、水酸化カルシウムセメントやMTAセメントが直接覆髄材として臨床で使用されている。これらの材料は硬組織形成能を有すること、高pHによる抗菌作用を有することが報告されている(Asgary S et al, 2007, Iran Endod J)。水酸化カルシウムは形成される修復象牙質の形態が骨様の象牙質を形成しやすいことや、MTAセメントは修復象牙質の形態は良好であるものの操作性や価格等の改善点が指摘されている。加えて、これらの材料には歯質接着性が付与されていない。そのため、新規材料の開発が喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、露出歯髄を封鎖し、傷害された歯髄の治癒を促進する新規直接覆髄材の開発を検討することを目的とした。本研究ではリン酸化プルラン、CPN、MPC、ポリリン酸等の高分子材料に着目した。これらの材料はこれまでに硬組織接着能を有するという所見が報告されている。さらに、リン酸化プルラン含有MTAセメントは処置後の炎症を軽減させる報告がある。一方、CPNは抗酸化作用が報告されている。また、ポリリン酸はその分子量によって短鎖・中鎖・長鎖に分類されるが、中鎖では骨芽細胞誘導、長鎖では抗酸化作用があると *in vitro* で報告されている(Doi et al, 2014, Dent Mat J) (Plamena R Angelova et al, 2014, ACS Chem Biol)。そこでそれらの材料とMTAを練和することで接着性を有し、その他の生体作用を有する新規MTAセメントの開発の可能性について検討することは、臨床的に大きな意義があると考えられる。

同様に抗酸化作用を示す材料として玄米酵素(FBRA)がある。FBRAに含まれる麹菌が発酵することで、玄米の有する抗炎症作用成分が増加する(Onuma K et al, 2015, Nutrients)。FBRAは製造が安価であるという特徴を有するため、安価で良好な新規直接覆髄材の開発が可能であると考えられる。

硬組織接着性と歯髄治癒機能を兼ね備えた直接覆髄材は数少ない。接着性を有することで、材料と象牙質の間隙を防止することが可能となり、長期的にはそれらの間隙から生じる細菌感染を防ぐことが期待される。また、今回用いた材料の接着性や、その他の効果についても検討を行うことも目的とした。

さらに材料の物性は臨床操作や予後に影響を与えることが考えられる。そのため、MTA含有セメントの物性を損なわない新規材料であることも重要である。そこで、本研究では新規材料の理学的特性についての予備的評価も行った。

3. 研究の方法

(1) ラット歯髄組織学的探索

8週齢ウィスター雄ラットに対しイソフルランと三種混合麻酔を用いて全身麻酔を施した。ラットを固定後、上顎両側第一大臼歯を1/2スチールラウンドバーで切削し、#20Kファイルを用いて点状露髄を行った。露髄面を生理食塩水で洗浄後、ペーパーポイントを用いて止血した。ポジティブコントロールとして、リン酸化プルランとFBRAは材料単味を蒸留水で混和、CPN、MPC、

短鎖・中鎖・長鎖ポリリン酸を MTA と練和後、露髄面に貼付し、ネガティブコントロールとして、直接覆髄材を貼付せず、スーパーボンドにて仮封した。その後、対合歯を研磨した。1・3・7・14 日後に麻酔薬を過剰投与し、安楽死させた後、ラット上顎骨を摘出した。試料をホルマリン固定後、10%EDTA で脱灰し、その後通法に従いパラフィン包埋した。試料をマイクロトームで厚さ 5 μm の薄切片を作製した。その後、HE 染色を行い、組織学的評価を行った。

(2) 新規直接覆髄の理工学的特性測定

微小ビッカース硬さ測定

MTA セメントと新規材料をそれぞれ練和後、直径 17mm 厚さ 1.5mm のプラスチック製円柱形モールドに材料を充填し、ガラスプレートを用いて圧接し、湿箱に保管した。ビッカース圧子を装着した微小硬度計 MVK-50 型を用いて微小ビッカース硬さを測定した。測定は、荷重 50g 荷重時間 15 秒の条件の下で、それぞれ 1 試料につき 10 点の計測を行った。

pH 測定

各種材料を練和し、37℃ 蒸留水中に浸漬した。3 時間、5 日、31 日後に各群の pH を pH メータ HM-25R 型にて測定した。

比重測定

MTA セメントと各種材料をそれぞれ練和し直径 17mm 厚さ 1mm のプラスチック製円柱形モールドに充填し、ガラスプレートで圧接し、湿箱に保管した。

24 時間後ゲーリュサック型比重瓶の空の質量を測定した(1)。その後、比重瓶の中に試料を追加し、再度質量を測定した(2)。さらに、蒸留水を比重瓶に満たし、質量を測定した(3)。最後に、比重瓶から試料を除去し、再度蒸留水を比重瓶に満たし質量を測定した(4)。(1)-(4)の値を求めたのち、次式から比重を求めた。

$$\text{比重} = \{(2) - (1)\} \div \{(4) + (2) - (1) - (3)\}$$

象牙質-材料接着界面観察

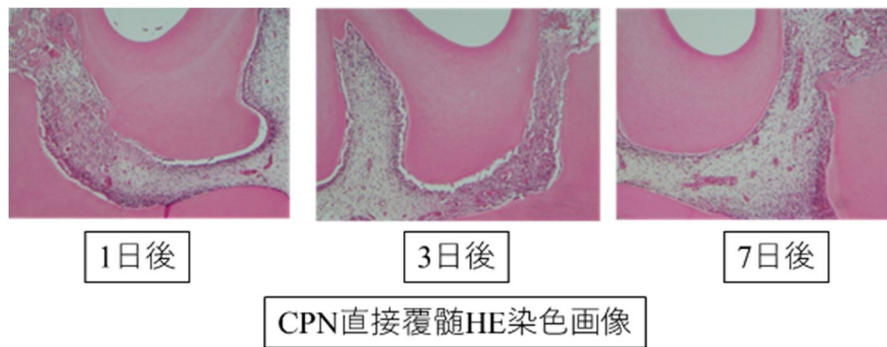
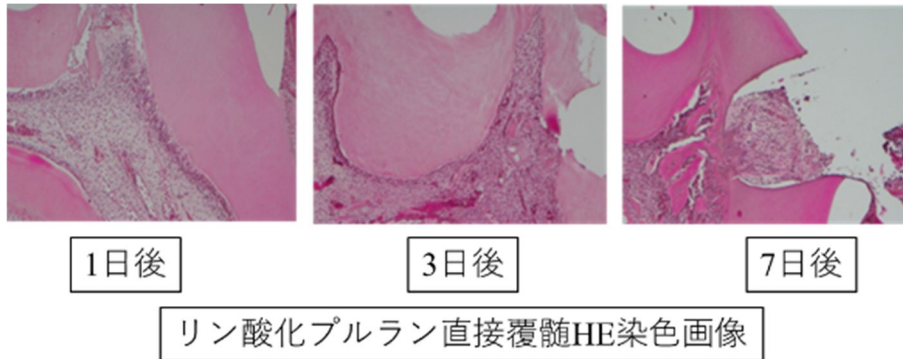
ヒト抜去歯を万能切削器具(Isomet)を用いて象牙質を露出させた。各種材料を練和し、象牙質に貼付した。相対湿度 100%の室箱に室温にて 24 時間保管した。その後、Isomet を用いて試料を厚さ 1.5mm で歯軸に平行に切断した。さらに、試料をシリコン印象材(ジルデフィットウォッシュタイプ)にて印象採得した。硬化した印象材に 100%エポキシレジンを填入し、60℃ の恒温槽内で 24 時間重合した。硬化したエポキシ樹脂に対し Pt-Pd イオンで 120 秒コーティングを行い、走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて加速電圧 5.0kV にて界面観察を行った。

4. 研究成果

(1) ラット歯髄組織学的探索

各材料群の組織像を評価したところ、CPN では 1 日後において MTA セメントと比較して、炎症が軽度であることが観察された。3 日後では露髄面において旺盛な血管増生が生じることが示された。7 日後では炎症がほとんど認められなかった。以上のことから、CPN は処置後の炎症を軽減し、血管組織に作用して治癒を促進させることが示唆された。

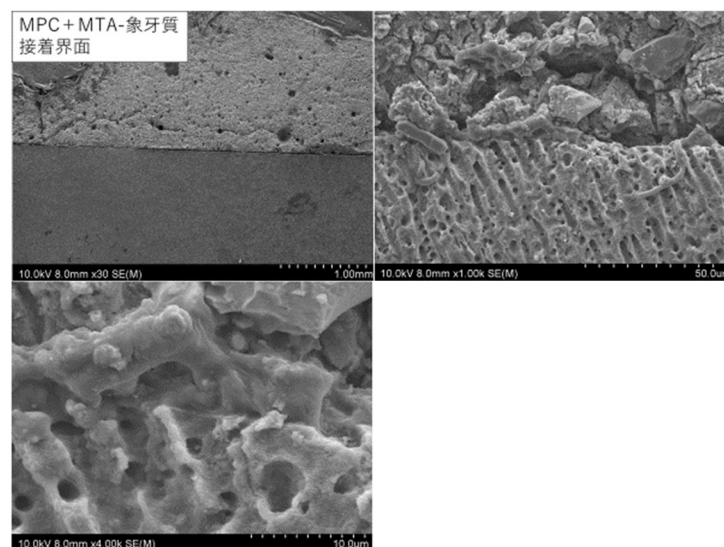
また、リン酸化プルランでは覆髄 1 日後において炎症が非常に軽度であることが示された。3 日後では軽度な炎症が認められ、7 日後においては修復象牙質の基質形成が認められた。



今後はその他の材料についても実験を行う。また、臨床応用にあたり、今回用いた実験材料の結果を基に、直接覆髄材に用いる適切なキャリアの選択を行う。さらに、MTA とキャリアの配合と組織学的影響の関連を解明することも検討中である。

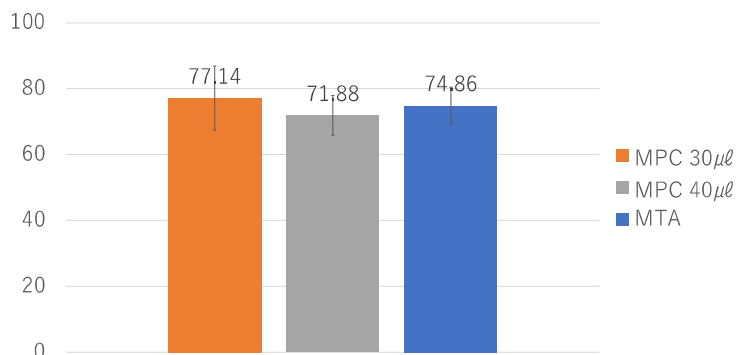
(2) 新規直接覆髄の理工学的特性測定

SEM を用いて拡大倍率 ×30, 1000, 4000 倍で材料と象牙質の接着界面の観察を行った。MPC + MTA 群では、界面において間隙が観察されなかった。この結果から、新規直接覆髄材は良好な封鎖性を有し、漏洩による細菌感染を防止する可能性が示唆された。

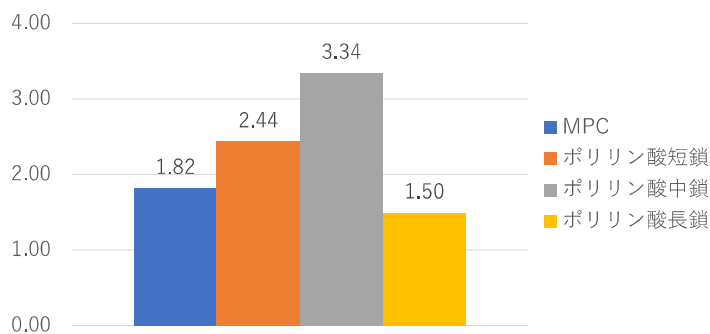


さらに、MPC + MTA セメントの微小ビッカース硬さ、MPC + MTA ・ポリリン酸 + MTA の比重、ポリリン酸 + MTA の pH をそれぞれ測定した。微小ビッカース硬さと pH では MTA と著しい差は認めら

ビッカース硬さ試験結果



MTA+ポリマーの比重



れなかった。一方、比重では中鎖ポリリン酸が最も大きな値を示し、長鎖ポリリン酸が最も小さな値を示した。これらの結果から、MPC+MTAでMTAと同様の機械的性質を示すこと、ポリリン酸は密度に影響を及ぼすこと、ポリリン酸+MTAはMTAセメントの高pHによる抗菌作用が維持されることが示唆された。

今後は様々なキャリアの組み合わせも考慮して物性の評価を行う予定である。

MTAセメントのpH

	pH(3h)	pH(5d)	pH(31d)
MTA+短鎖ポリリン酸	9.65	11.06	11.81
MTA+中鎖ポリリン酸	9.85	10.87	11.56
MTA+長鎖ポリリン酸	9.70	10.68	11.30
MTA	11.4	11.6 (7d)	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rafiqul Islam, Yu Toida, Fei Chen, Toru Tanaka, Satoshi Inoue, Tetsuya Kitamura, Yasuhiro Yoshida, Abu Faem Mohammad Almas Chowdhury, Hany Mohamed Aly Ahmed, Hidehiko Sano	4. 巻 54
2. 論文標題 Histological evaluation of a novel phosphorylated pullulan-based pulp capping material: An in vivo study on rat molars	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int Endod J.	6. 最初と最後の頁 1902-1914
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/iej.13587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yu TOIDA, Shimpei KAWANO, Rafiqul ISLAM, Fu JIALE, AFM A CHOWDHURY, Shuhei HOSHIKA, Yasushi SHIMADA, Junji TAGAMI, Masahiro YOSHIYAMA, Satoshi INOUE, Ricardo M. CARVALHO, Yasuhiro YOSHIDA, Hidehiko SANO	4. 巻 41
2. 論文標題 Pulpal response to mineral trioxide aggregate containing phosphorylated pullulan-based capping material	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 126-133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2021-153	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Islam R, Chowdhury AFMA, Toida Y, Chen F, Hoshika S, Ikeda T, Watanabe C, Tanaka T, Matsumoto M, Yamauti M, Sano H
2. 発表標題 Effects of Colloidal Platinum Nanoparticles on Dental Pulp
3. 学会等名 IADR/AADR/CADR General Session 98th General Session, (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Islam R, Toida Y, Islam MRR, Tanaka T, Chowdhury AFMA, Ahmed HMA, Sano H
2. 発表標題 Colloidal platinum nanoparticles enhance the healing potential of dental pulp
3. 学会等名 IADR/APR General Session & Exhibition (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

なし

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	松本 真理子 (Matsumoto Mariko) (30733969)	北海道大学・大学病院・助教 (10101)	
研究分担者	樋田 京子 (Hida Kyoko) (40399952)	北海道大学・歯学研究院・教授 (10101)	

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
---------	---------