

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K19025
研究課題名(和文) う蝕細菌由来の可逆性歯髄炎動物モデル確立による炎症歯髄創傷治癒メカニズムの解明
研究課題名(英文) Animal reversible-pulpitis models reveal the pulpitis-specific pulpal wound healing mechanisms
研究代表者
小道 俊吾 (Komichi, Shungo)
大阪大学・歯学研究科・招へい教員
研究者番号：40804456
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)：「う蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルの確立」に焦点をあてた研究をおこなった。すでにカリオロジーの分野で確立されているラットう蝕モデルを応用し、前処置としての窩洞形成や播種する菌量、飼育期間等を検討することで、歯の特定の部位のみにう蝕病変を作成し、マイクロCTを用いて評価方法をおこなう可逆性歯髄炎を惹起するモデルを確立することに成功した。確立したう蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルを用いて覆髄実験をおこなった場合、従来の健全歯髄にたいする覆髄モデルと比較して、覆髄直下の歯髄組織におけるPCNA陽性細胞の数が多いことがわかり、可逆性歯髄炎の創傷治癒の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
研究期間を通じて、歯の特定の部位のみにう蝕病変を作成し、可逆性歯髄炎を惹起するラットモデルを確立することに成功した。作成したう蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルを用いて直接覆髄実験をおこなった結果、健全象牙質と比較し多量の第三象牙質が形成しており、窩洞直下の歯髄組織におけるPCNA陽性細胞数が増加傾向にあることが判明し、可逆性炎症歯髄特異的な創傷治癒メカニズムの存在が示唆された。本モデルの確立により、実際の臨床における可逆性炎症歯髄を再現し、炎症歯髄特異的な創傷治癒メカニズムを解明することは、より安全・効果的な覆髄剤の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：We conducted a study focusing on "establishment of a rat model with reversible pulpitis derived from caries bacteria". By modifying a rat caries model that has already been established in the field of cariology and examining cavity preparation as pretreatment, the amount of bacteria to be disseminated and the breeding period, we successfully established a model that induces reversible pulpitis. In this model, caries lesions are created in specific parts of the teeth and evaluated by micro CT. When pulp capping experiments were performed using an established caries-derived reversible pulpitis rat model, PCNA and positive cells in the pulp tissue immediately below the pulp capping were compared with the conventional pulp capping model with healthy pulp. As results, the number of PCNA positive cells were increased in pulpitis model. From these results, a part of wound healing mechanisms of reversible pulpitis was clarified.

研究分野：歯髄生物学

キーワード：歯髄 創傷治癒

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

直接覆髄法の目的である第三象牙質形成は歯髄の創傷治癒の結果であるが、そのメカニズムは未だ不明である。歯髄創傷治癒機序の解明を目指し、これまで様々な研究が世界中で展開されており、動物の歯に窩洞形成および覆髄をおこなう実験モデルは、歯髄創傷治癒過程の評価に適した実験系であり、これまでの研究でも多く用いられている。

しかし、当該分野の研究のポジティブコントロールとしてみなされている Mineral Trioxide Aggregate (MTA)を用いた場合でも実際の臨床における直接覆髄の成功率は 60~70%程度と報告されており、動物実験の結果と臨床成績に明らかな乖離が認められる。この乖離は、様々な環境の違いに起因していると考えられるが、最も大きな要因の一つとして、これまで実施されてきた覆髄動物実験モデルは健全な歯に窩洞形成をおこない、健全な歯髄を覆髄後に評価するものであることが挙げられる。つまり、従来の覆髄実験モデルでは実際の臨床において覆髄処置の対象となる深いう蝕罹患歯に特有の歯髄充血状態や可逆性歯髄炎の病態が再現できておらず、創傷治癒過程を包括的に評価できていない。う蝕罹患歯では覆髄処置を開始する時点で歯髄の炎症状態や細胞の構成などの環境が健全歯髄とは大きく異なることから、上述した覆髄における研究と臨床の乖離を埋めるためには、う蝕細菌に由来する可逆性歯髄炎モデルを確立し、炎症の消退を含めた創傷治癒過程を包括的に評価することで可逆性歯髄炎特有の創傷治癒メカニズムを解明することが必要である。

2. 研究の目的

う蝕細菌由来可逆性歯髄炎ラットモデルの確立により可逆性歯髄炎病態を再現し、「可逆性炎症歯髄と健全歯髄の間に、いかなる創傷治癒機序の差異があるか」という問いを究明することで可逆性炎症歯髄特有の歯髄創傷治癒メカニズムの解明を目指すものである。

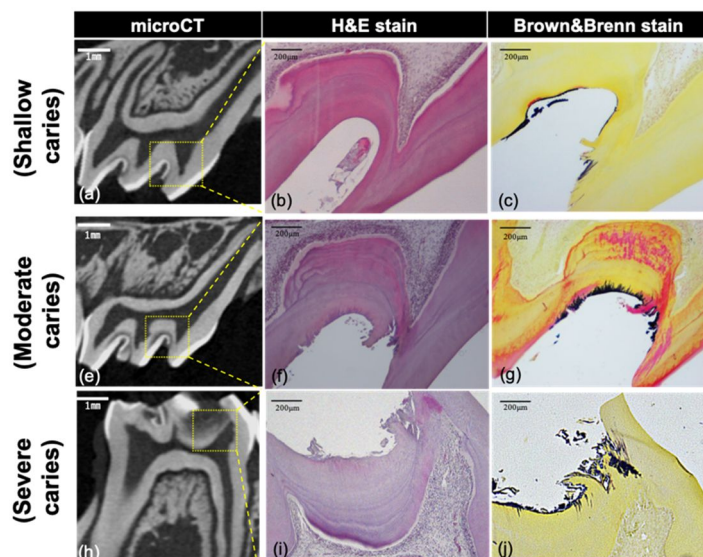
3. 研究の方法

まず、すでにカリオロジーの分野で確立されているラットう蝕モデルを応用し、歯の特定の部位のみにう蝕病変を作成するモデルを確立した。抗生剤投与後のラット臼歯についてマイクロスコブ観察下で咬合面の小窩裂溝をシーラントにて填塞後、同歯の近心咬頭近心軸面に象牙質に至る窩洞形成をおこなった。数日間連続で窩洞形成部に *S. mutans* 菌の接種をおこない、高スクロース含有う蝕誘発餌にてラットを飼育することで窩洞形成部に限局したう蝕病変を作成させた。続いて、上記の限局性う蝕モデルにおける感染期間および飼育期間をコントロールすることでう蝕細菌由来可逆性歯髄炎モデルの確立した。マイクロCT および病理組織学的評価をおこなうことで可逆性歯髄炎を誘発する条件を設定し、その条件にて誘発されたう蝕を除去し、MTAを用いた直接覆髄をおこない第三象牙質形成の有無を確認した。

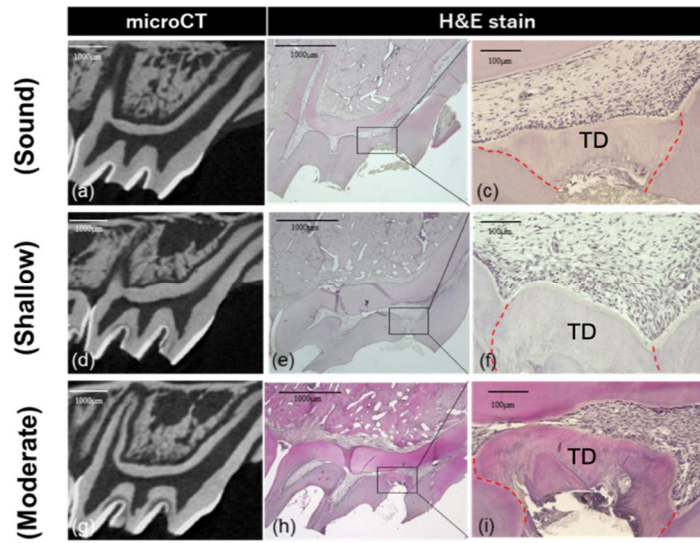
確立したう蝕細菌由来可逆性歯髄炎モデルを用い、可逆性炎症歯髄と健全歯髄の創傷治癒機序の差異を解明するために、歯髄内における LPS を検知するパターン認識受容体 (TLR2) や PCNA 陽性細胞数を評価した。

4. 研究成果

A.

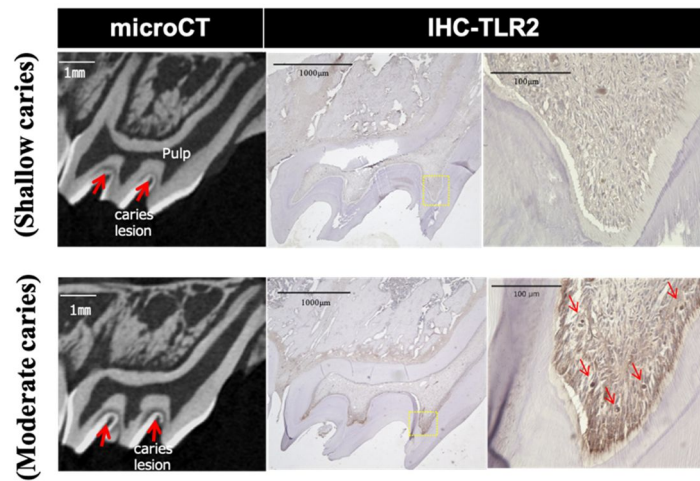


B.

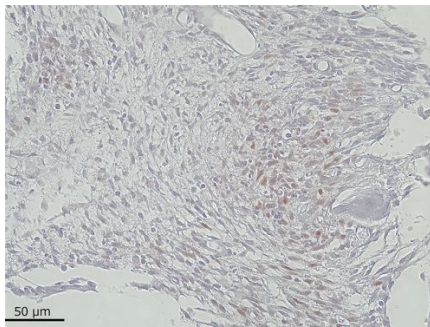


TD: tertiary dentin

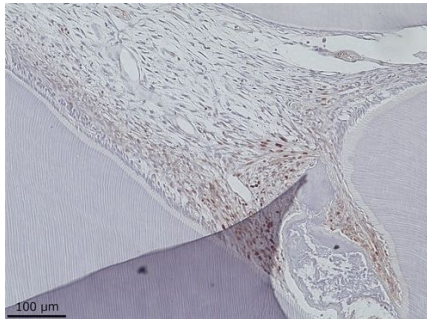
C.



D.



E.



A: マイクロ CT 所見にてう蝕進行度を shallow(象牙質 1/3 以下), moderate(1/3~2/3), severe(2/3 以上)に分類。それぞれの分類で代表的な HE 染色および Brown-Brenn 染色の像を示す。

- B: 健全歯, shallow, moderate に直接覆髄をおこない、4W 後の組織切片を評価。健全歯では象牙芽細胞様細胞の再配列が確認された。Moderate では健全歯や shallow と比較し、多量だが質の悪い第三象牙質形成が認められた。
- C: shallow および moderate のう蝕直下歯髄における TLR2 の発現の比較。Moderate ではより TLR2 の発現が強い (下向き赤矢印)。
- D,E: 健全歯(D)および moderate(E)の覆髄直下歯髄における PCNA 陽性細胞の染色像。健全歯と比較し、moderate における PCNA 陽性細胞数は多い傾向にある。

これらの結果から、う蝕細菌に由来する可逆性歯髄炎ラットモデルの確立に成功した。マイクロ CT による評価で、う蝕進行が象牙質の 1/3~2/3(moderate)の時、象牙芽細胞層付近における TLR2 の発現が増えたことから、歯髄がう蝕の影響を受けていることがわかった。そして moderate では健全歯とは違う第三象牙形成の様相が認められたことから、可逆性炎症歯髄特有の創傷治癒メカニズムの存在が示唆された。

Moderate では PCNA 陽性細胞数が多いことから、う蝕による刺激が細胞増殖に影響を与えていることがわかり、可逆性炎症歯髄の創傷治癒メカニズムの一端が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Komichi Shungo, Takahashi Yusuke, Okamoto Motoki, Ali Manahil, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Nakai Takeo, Cooper Paul, Hayashi Mikako	4. 巻 8
2. 論文標題 Protein S100-A7 Derived from Digested Dentin Is a Critical Molecule for Dentin Pulp Regeneration	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1002 ~ 1002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8091002	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 該当する
1. 著者名 Ali Manahil, Okamoto Motoki, Komichi Shungo, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 96
2. 論文標題 Lithium-containing surface pre-reacted glass fillers enhance hDPSC functions and induce reparative dentin formation in a rat pulp capping model through activation of Wnt/ -catenin signaling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Biomaterialia	6. 最初と最後の頁 594 ~ 604
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.actbio.2019.06.016	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 該当する
1. 著者名 Okamoto Motoki, Ali Manahil, Komichi Shungo, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Ito Yuki, Miura Jiro, Hirose Yujiro, Mizuhira Manabu, Takahashi Yusuke, Okuzaki Daisuke, Kawabata Shigetada, Imazato Satoshi, Hayashi Mikako	4. 巻 8
2. 論文標題 Surface Pre-Reacted Glass Filler Contributes to Tertiary Dentin Formation through a Mechanism Different Than That of Hydraulic Calcium-Silicate Cement	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/jcm8091440	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 該当する

〔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 Huang H, Okamoto M, Ali M, Watanabe M, Matsumoto S, Takahashi Y, Komichi S, Hayashi M.
2. 発表標題 Evaluation of Inflammatory Response During Wound Healing Process In Caries Affected Dental Pulp.
3. 学会等名 98th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会)
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
研究協力者	アリ マナヒル (Ali Manahil)		
研究協力者	渡邊 昌克 (Watanabe Masakatsu)		

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