

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670828

研究課題名(和文)根尖病巣に対する挑戦的再生療法の確立

研究課題名(英文)Regeneration therapy of the peri-apical lesions

研究代表者

井上 孝(Inoue, Takashi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20125008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、根尖病巣の大きさに合う粘膜穴を介して歯槽骨に穴を開けて、根周囲の清掃、消毒後、三次元ゲルを充填することで、歯根周囲の再生を促し、歯を保存するというものであった。

1年目は、本研究の仮説を裏付けるために、実際東京歯科大学付属病院での外科的切除根尖病巣摘出標本を分析し、口腔検査学会雑誌に投稿した。同時に、犬に窩洞を形成し、実験に着手した。2年目には、実験的に形成された窩洞を感染させ、洗浄液の分析、歯髄細胞を含むコラーゲンゲルを充填し、検討した。しかし、歯周組織の再生は一部でのみ見られたものの、全周にわたるものではなかった。

研究成果の概要(英文)：Firstly, opens a mucous and alviolar bone hole in accord with the volume of apical lesion. Then, hole was cleaning and the sterilization around the root.

Then, the hole was filled with three-dimensional gel. As a result, regeneration of periodontal tissue around the tooth root was expected.

In the 1st year, analyzed the surgical resection apical lesion sample at the hospital to support the hypothesis of this study. In the mean time, formed a cavity to a dog and started an experiment. In the second year, the collagen gel including the pulp cell were filled in the cavity. However, the reproduction of the periodontium was seen only in a part.

研究分野：臨床検査病理学

キーワード：根尖病巣 再生医療 足場 歯髄細胞

### 1. 研究開始当初の背景

従来の治療法では、根尖病巣の治癒再生には限界があり、それは次の論法から説明できる。

大前提：従来の根尖病巣の治療は歯内療法が原則である。

小前提：歯内療法では主根管を通じてのみ治療が行われる。

結論：故に副根管や歯根周囲にある根尖病巣は治療はできない。

その結果、原因細菌の同定、根充時期の決定、治癒の判定などは術者と患者の主観により決定され、今でも再発、再治療が繰り返されている。

### 2. 研究の目的

本研究では、根尖病巣の治療を歯内療法から脱却し、歯槽骨開窓による挑戦的な組織再生を目指し、歯は歯内療法で治療、根尖病巣は挑戦的根尖療法で治療し、再発を防ぎ、病巣部を再生させ、その結果歯を守ることである。

### 3. 研究の方法

本研究は、根尖治療法の確立と三次元ゲルによる再生実験を計画する。

1：ビーグル成犬を用い、歯牙抜髄後、根尖部に病原菌を混合感染させ、根尖病巣を作る(先行論文あり)。歯内には綿栓を入れておく。

2：抜髄された歯髄は、培養し細胞の数を増殖させ使用時まで凍結保存する。

3：病巣の歯牙直上に生検トレパンを用いて、粘膜穴を開け、ついで生検トレパンと同直径のラウンドバーにて病巣に穿孔を開ける。この穿孔は同直径のチタン円盤で封鎖する。

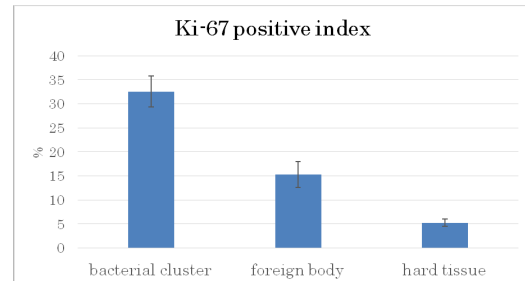
4：根管から注入した洗浄液が穿孔より流出することを確認し、1日おきに洗浄を繰り返す。

5：洗浄液を毎回回収し、細菌検査を行い確認する。

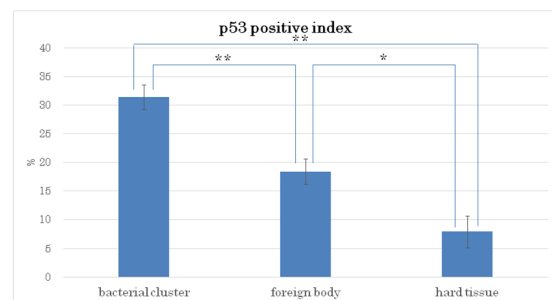
6：細菌の激減を確認後、三次元培養歯髄を含むゲル作製注入し、形態学的に再生を確認する。

### 4. 研究成果

仮説を証明する為の研究として、1590例の根尖病巣の病態解析を行い、根管充填材や根管治療薬と考えられる異物が223例(14.0%)、標本内に細菌や真菌などの微生物塊が観察されたものは172例(10.8%)、セメント質や象牙質、感染性硬組織を認めたものは202例(12.7%)で、あった。免疫組織学的に、細菌感染がある症例では高いβディフェンシンの発現がみられ、硬組織片や異物が存在する症例ではマクロファージ由来のCD68陽性細胞が顕著にみられた。Ki67陽性細胞は、微生物塊群で基底細胞、棘細胞に陽性を示し、異物群、硬組織片群に比べ有意差を持って多く発現していた。



P53陽性細胞も、微生物塊群で基底細胞および棘細胞に陽性を示し、異物群、硬組織片群に比べ有意差を持って多く発現した。



今回の病理組織学的所見より、根管内の細菌の残存が歯科治療によって根尖孔外へ溢出される可能性が高いことが示唆された。また、歯根嚢胞の裏装上皮は高い細胞増殖能と腫瘍原性潜在能を持つことが示唆された。このことから、根管治療前には根管内細菌培養検査による根管内細菌叢の把握や薬剤感受性試験を行い、根管清掃材による網羅的な殺菌・清掃ではなく、エビデンス

(検査結果)に基づいた抗菌薬応用による細菌特異的な根管治療がなされるべきであると考えられた。また、根管治療期間中には、病巣内に存在する免疫応答細胞が出すサイトカインや周組織が出す抗菌タンパクなどの定性的・定量的に計測することで、疾患の診断や病態の程度を把握、治療方針の決定に結び、つけることが重要であると考えられた。

ビーグル犬を用いた実験では、窩洞の形成、病巣作製、歯髄細胞を含むゲル充填を行ったが、一部にセメント質および歯根膜の再生をみたものの、全体的なものではなかった。

また、充填するゲルの実験として、まず血小板フィブリンの働きを調べて報告した。Concentrated growth factor (CGF)は白血球・血小板由来の成長因子を含む完全自己血由来のフィブリン生体材料の一つで、骨再生への応用が期待されている。CGFに関する研究は少なく、過去の *in vitro* 研究は CGF 抽出液のみや、抽出液をのぞいたフィブリン膜のみを使用している。本研究は十分な可溶性因子を含んだ CGF の培養ラット骨髄細胞に対する効果を検索することを目的とした。さらに、*in vivo* においてラット頭蓋骨欠損に移植した CGF の影響を検索した。

フィブリンを有する CGF と platelet-poor plasma gel (PPP gel) をラット血液から生成した。*In vitro* では、CGF と PPP gel を約 30  $\mu\text{m}$  の厚さに凍結薄切し、直径 13.5 mm の cell disc 表面にコートした。次いで、ラット骨髄細胞を各試料上に播種し、無血清培地を用いて培養した。*In vivo* では、ラット頭蓋骨に直径 3.8 mm の骨欠損を作製し、CGF、PPP gel を移植した。また、移植なしをコントロールとした。

*in vitro* において CGF および PPP gel 上のラット骨髄細胞のストレスファイバーは

non-coat 群と比較して伸展傾向がみられたが、CGF と PPP gel 群間で明らかな差はみられなかった。CGF 群の細胞増殖と骨芽細胞分化は他の 2 群と比較して高かった。*in vivo* において CGF 群の新生骨形成量は他の 2 群と比較して有意に高かった。

*in vitro* において、CGF および PPP gel 群で顕著な細胞伸展がみられたことはフィブリンなどの足場形態によると考えられる。CGF および PPP gel 群とも類似した足場形態にもかかわらず CGF 群において細胞増殖活性および骨芽細胞分化が有意に高いのは、血小板・白血球由来の成長因子によるものと考えられた。また、*in vivo* においても CGF 移植群は他の 2 群と比較して有意な骨再生を示した。CGF はフィブリン構造から応用後すぐに消失せず、少なくとも 9-13 日にわたって成長因子を徐放することが報告されており、骨再生において長期的に良好な環境を提供すると考えられた。

CGF のフィブリンおよび可溶性因子は *in vitro* においてラット骨髄細胞の初期伸展、増殖、骨芽細胞分化を促進し、*in vivo* においてラット頭蓋骨欠損の骨治癒を促進する。今後、本実験へのゲルの応用を試みる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Sanuki T., Matsuzaka K., Inoue K., Hashimoto K., Inoue T. Radicular cyst and granuloma: A clinicopathological study of 1590 cases and a literature review. Journal of Japanese Society of Evidence and Professional. 6 : 44-49, 2014.

井上 孝, 根尖性歯周炎の病態的分析, 歯界展望, 125: 436-444, 2015.

Takeda Y., Kokubun K., Matsuzaka K., Inoue T. The effect of concentrated growth factor on rat bone marrow cells *in vitro* and on calvarial bone healing *in vivo*. Int.J Oral Maxillofac Implnats, 30:1187-1196, 2015.

〔学会発表〕(計2件)

佐貫展丈、井上健児、松坂賢一、井上 孝、  
根尖性歯周炎の病態的分析、第295回東京  
歯科大学学会(例会)2014年6月1日

武田侑大、國分克寿、松坂賢一<sup>1</sup>、井上 孝、  
PRFのラット骨髄細胞の初期形態変化、  
増殖、分化に対する影響、東京歯科大学  
学会(例会)第295回東京歯科大学学会  
(例会)2014年6月1日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 孝(Takashi INOUE)  
東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20125008

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：