

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861602

研究課題名(和文) 歯髄・根尖歯周組織再生療法におけるバイオガラス配合セメントの応用

研究課題名(英文) Application of bioglass cement in the regeneration therapy of dental pulp and periapical tissue

研究代表者

鷲尾 絢子 (Washio, Ayako)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10582786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、象牙質・歯髄複合体および根尖歯周組織再生療法を確立するという最終目標の達成に向け、生体医療材料の一種である「バイオガラス」を配合した歯科用セメント(NSY-222)の研究開発を行うことである。

NSY-222は歯科用材料として適した物性を有しており、NSY-222に形成されたタグ様構造により良好な封鎖性が得られること、また除去することが可能であること、さらに、歯髄および根尖歯周組織へ生体親和性を有することが示唆された。また、NSY-222は石灰化組織誘導能も有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The final goal of this study is to establish the regeneration therapy of dentin and pulp complex and periapical tissue. To achieve the aim, I develop and investigate dental cement (NSY-222) combined "the bioglass" which is kind of biomedical materials.

NSY-222 had suitable properties as dental material. It was suggested that tag-like structure formed in NSY-222 provided good penetration, NSY-222 was removed from root canal, and NSY-222 have biocompatibility for pulp and apical periodontal tissue. In addition, it was suggested that NSY-222 had the inducibility of calcified tissue.

研究分野：歯内治療学

キーワード：バイオガラス 歯科用セメント ハイドロキシアパタイト 生体親和性

## 1. 研究開始当初の背景

国民生活の質を向上させる要件として、健全な歯の維持が重要であることは周知の事実である。健全な歯の維持に歯髄が重要な役割を果たすことから、歯科医師は歯髄喪失による歯の機能低下を阻止するため歯髄保護処置を行う。また、疾患の進行により歯髄除去を余儀なくされた場合も、健全な根尖歯周組織を維持するため、確実な歯内治療を行うことで歯科医師は歯の保全に努める。歯髄保存処置や歯内治療により適切な創傷治癒を誘導する上で、歯髄・根尖歯周組織という生体と直接接触する歯科用セメントには重要な役割が求められる。歯科用セメントには、良好な封鎖性を獲得するための組織との融合、及び生体親和性や硬組織形成誘導能等の所要性質を有することが期待されているが、これらの要件をすべて満たす歯科用セメントは現状では数少ない。

近年、新しい歯科用セメントとして、Mineral trioxide aggregate (MTA) が注目されている。MTA は擬似体液 (SBF) など生体内容液組成を模倣した緩衝溶液に浸漬すると、表面にハイドロキシアパタイト (HAp) 様結晶が析出する。また、MTA 象牙質間の空隙を析出物結晶が封鎖する像や、歯根管の象牙細管内に析出物結晶が入り込んだ像が観察されること、*in vivo* 実験において材料表面に石灰化合物が現れること、MTA から溶出するカルシウムイオンが細胞の増殖・分化を促進することから、生体親和性・硬組織誘導能等を有するセメントとして期待されている。しかし、一方で、主成分が工業用セメントのポルトランドセメント以外の組成は不明であること、操作性が悪いこと、及び高価であることなどの問題点が報告されている。

我々の研究グループは、MTA の問題点を改善し、明確な組成や硬化メカニズムを示すセメントを開発することとした。

## 2. 研究の目的

本研究の最終目標は、象牙質・歯髄複合体および根尖歯周組織再生療法の確立にある。最終目標の達成に向け、本研究では、生体医療材料の一種で、整形外科領域で汎用されている「バイオガラス」を配合した歯科用セメント (NSY-222) の研究開発を歯科関連企業と共同研究のもと行う。バイオガラスは「バイオセラミクス」と呼ばれる非金属無機系医療材料であり、MTA と同じくケイ酸カルシウムを含んでいる等、MTA の特性・成分と類似点がある。

まず、このセメントを臨床応用していくために、物理学的特性および生体親和性を有することを明らかにすることを第一の目的としている。さらに、得られた知見を基に、試作バイオガラス配合セメントと Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) や Platelet-Rich

Plasma (PRP) を徐放するゼラチンハイドロゲルを組み合わせ、組織の創傷治癒・再生を誘導する新たな生体医療材料の開発に取り組むことを第二の目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) NSY-222 の物理学的特性の解析

NSY-222 の溶解性、エックス線造影性や NSY-222 の溶出物などの物理学的性質を各種測定器によって検討した。

### (2) NSY-222 のシーラーとしての特性

根管充填材としての使用を想定して、歯科用根管充填シーラーの国際規格 (ISO6876 : 2012) に則って、NSY-222 の稠度、操作時間、硬化時間、被膜厚さ、崩壊率、および X 線造影性の試験を行った。さらに、NSY-222 の象牙質への封鎖性、および根管内および根管壁からの除去性を検討した。

封鎖性試験は、ヒト歯を用い、根尖側から長さ 1.0 cm の根管形成・洗浄乾燥後、各種シーラーを用いて根管充填を行った。擬似体液 (SBF) に根尖部のみが浸漬するように被験歯を固定し、歯冠側に銅フタロシアンテトラスルホン酸四ナトリウム溶液 (以後色素液) を注入した。経過日数ごとに SBF 中に漏出した色素液量を吸光光度計 (測定波長: 630 nm) にて測定した。さらに、歯質と NSY-222 との界面を Scanning Electron Microscope (SEM) で観察する。

除去性試験は、ヒト歯を用い、根尖側から長さ 1.0 cm の被験歯の根管形成・洗浄乾燥後、各種シーラーを用いて根管充填 (シングルポイント法、マルチポイント法) を行った。37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、湿度 100 % で 4 週間インキュベート後、根管充填材を GPR (MANI) で除去し、GPR が作業用に到達する時間を測定するとともに、根尖孔穿通および再根管拡大形成の可否を確認した。

### (3) NSY-222 の抗菌性

齲蝕原因菌である *Streptococcus mutans* や難治性根尖性歯周炎原因菌である *Enterococcus faecalis* に対する抗菌能を、菌液の濁度測定や阻止円測定によって検討する。

### (4) NSY-222 の各種細胞への影響を検討

象牙芽細胞様細胞である KN-3 細胞 (J Endod, 2007)、骨芽細胞様細胞である MC3T3-E1 細胞、歯根膜細胞である HPDL 細胞に練和直後および硬化後 NSY-222 を作用させ、一定時間培養後、細胞の形態変化、細胞増殖・生存に及ぼす影響を解析する。

細胞の形態変化は位相差顕微鏡を用いて観察し、細胞増殖・生存は、Trypan blue 染色法により解析を行う。

### (5) *in vivo* における NSY-222 の象牙質形

#### 成へ及ぼす影響を検討

週齢 9 週のラットに 5% ペントバルビタールナトリウム 30mg / kgw で腹腔内麻酔後、全身麻酔下で上顎第一臼歯咬合面よりラウンドバーにて露髄を行う。露髄部に充填する材料は、Dycal®、ProRoot MTA®、NSY-222 をそれぞれ用い、仮封する。充填後 14 日で 5% ペントバルビタールナトリウム 100mg / kgw を過剰投与し、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、10% EDTA による脱灰を行い、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン-エオシン染色を用いて効果を比較検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) NSY-222 の物理学的特性の解析

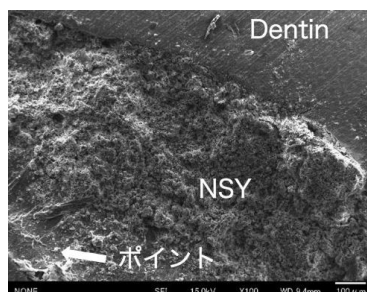
NSY-222 の溶解率は 2.0%、エックス線造影性は Al7.2 mm を示し、NSY-222 からは継続的にカルシウムおよびケイ素の溶出が認められた。

##### (2) NSY-222 のシーラーとしての特性

NSY-222 はシーラーの ISO の要求事項を満たしていた。

封鎖性試験では SBF 中への色素液漏洩量は経日的に減少し、FE-SEM 観察により、牛歯根管の象牙細管内には NSY-222 によって析出したハイドロキシアパタイト (HAp) 様の結晶構造 (タグ様構造) が観察された (図 1)。

また、NSY-222 の除去性試験では、いずれの根管充填方法においても除去可能で、根尖孔穿通および再根管拡大形成が可能であった。



(図 1) 象牙質/NSY-222/ポイントの界面

##### (3) NSY-222 の抗菌性

NSY-222 に抗菌性は認められなかった。

##### (4) NSY-222 の各種細胞への影響を検討

各種細胞に対して練和直後 NSY-222 を作用させたところ、NSY-222 の存在しないコントロールと比較して NSY-222 存在下では、細胞質内に顆粒状を有する細胞が認められるものの、細胞増殖は同程度であった。さらに、トリパブルー染色により細胞増殖・生存率を検討したところ、他と比較して高い細胞増殖・生存率を示していた。さらに、硬化後 NSY-222 存在下では、コントロールと同様の形態、細胞増殖、および同等の細胞増殖・生

存率を示していた。

##### (5) *in vivo* における NSY-222 の象牙質形成へ及ぼす影響を検討

Dycal® 実験群では、炎症反応 (リンパ球、好中球の浸潤) が認められた。

ProRoot MTA® 実験群では、リンパ球、好中球の浸潤は認められず、硬組織様の形成部位が一部認められた。

NSY-22 実験群では、リンパ球、好中球の浸潤が認められるとともに、硬組織様の形成部位も一部認められた。

以上より、NSY-222 は歯科用材料として適した物性を有しているとともに、シーラーに適した物理的性質を有していることが示唆された。さらに封鎖性試験結果から、NSY-222 では良好な根管封鎖性が得られ、その要因としては NSY-222 によって形成されたタグ様構造の関与が考えられた。そして、除去性試験の結果から、NSY-222 は再歯内治療時に除去することが可能であることが示唆された。さらに、抗菌性は示さないものの細胞への毒性も示さないことが示唆された。また、*in vivo* における実験により、NSY-222 は硬組織様の形成を誘導する可能性が示唆された。

今後、*in vitro*、*in vivo* のおける実験をさらに検討する予定である。

#### 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 4 件)

(1) 永吉雅人, 吉居慎二, 角館直樹, 福泉隆喜, 末松美希, 平田-土屋志津, 鷲尾絢子, 西野宇信, 矢野淳也, 諸富孝彦, 北村知昭: 歯内治療における術後疼痛の発症に関わる要因の解析. 日本歯科保存学会雑誌 57(5), 407-413, 2014.

(2) Washio A, Nakagawa A, Nishihara T, Maeda H, Kitamura C: Physicochemical properties of newly developed bioactive glass cement and its effects on various cells. Journal of Biomedical Materials Research: Part B -Applied Biomaterials 103(2):373-80, 2014.

(3) Yeom K, Ariyoshi W, Okinaga T, Washio A, Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T: Platelet-rich plasma

enhances the differentiation of dental pulp progenitor cells into odontoblasts. International Endodontic Journal, 2016 Mar;49(3):271-8.

- (4) Morotomi T, Hirata-Tsuchiya S, Washio A, Kitamura C: Effects of 4-META/MMA-TBB resin at different curing stages on osteoblasts and gingival epithelial cells. Journal of Adhesive Dentistry, 2016;18(2):111-8.

[学会発表](計 26 件)

#### 国際学会

- (1) Washio A, Tabata Y, Kitamura C: Preparation of gelatin and bioglass sponge composites capable of fibroblast growth factor 2 release for dentin and pulp regeneration. The 41st International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kitakyushu (November 5th-7th), 2014.
- (2) Washio A, Kitamura C: Evaluation of gelatin and bioglass sponge composites capable of fibroblast growth factor 2 release for dentin and pulp regeneration. 3rd Asian Pacific International Conference, Kitakyushu (January 24th), 2015.
- (3) Yeom K, Ariyoshi W, Washio A, Kitamura C, Nishihara T: Platelet rich plasma induces differentiation of odontoblast-like cells. 3rd Asian Pacific International Conference, Kitakyushu (January 24th), 2015.

#### 国内学会

- (4) 鷺尾絢子, 松井 誠, 北村知昭, 田畑泰彦: 歯髄・根尖歯周組織の再生誘導における無機生体材料およびゼラチンハイドロゲルの有効性の検討. 第13回日本再生医療学会. 京都 (3月4~6日), 2014.

- (5) 市丸-末松美希, 平田-土屋志津, 西野宇信, 鷺尾絢子, 吉居慎二, 中山瑞樹, 熊谷智弘, 諸富孝彦, 北村知昭: 白歯部審美修復におけるMIフィルの臨床評価. 第74回九州歯科学会総会, 北九州 (5月31日, 6月1日), 2014.

- (6) 永吉雅人, 西野宇信, 鷺尾絢子, 平田志津, 市丸美希, 吉居慎二, 西藤法子, 廉 晃勲, 中川愛加, 北村知昭: 歯内治療における術後疼痛の分析(2). 第74回九州歯科学会総会, 北九州 (5月31日, 6月1日), 2014.

- (7) 末松美希, 平田-土屋志津, 浦田真梨子, 西野宇信, 鷺尾絢子, 吉居慎二, 中山瑞樹, 熊谷知弘, 諸富孝彦, 北村知昭: 白歯部におけるフロアブルナノハイブリットコンポジットレジンの臨床評価. 第140回日本歯科保存学会春季学術大会, 滋賀 (6月19, 20日), 2014.

- (8) 鷺尾絢子, 田畑泰彦, 北村知昭: 根尖部の慢性炎症制御を目的としたヒドロコルチゾン含有PLGA粒子の作製. 第140回日本歯科保存学会春季学術大会, 滋賀 (6月19, 20日), 2014.

- (9) 鷺尾絢子, 田畑泰彦, 北村知昭: 象牙質・歯髄複合体の再生誘導に用いるゼラチン-バイオガラス複合スポンジの検討. 第35回日本歯内療法学会学術大会, 新潟 (7月12, 13日), 2014.

- (10) 廉 晃勲, 鷺尾絢子, 諸富孝彦, 永吉雅人, 北村知昭: 多血小板血漿が象牙芽細胞様細胞 (KN-3細胞) に与える影響. 第141回日本歯科保存学会秋季学術大会, 山形 (10月30, 31日), 2014.

- (11) 鷺尾絢子, 北村知昭, 田畑泰彦: 象牙質・歯髄複合体形成におけるゼラチン-バイオガラス複合スポンジの有効性の検討. 第36回日本バイオマテリ

- アル学会大会,東京(11月17,18日),  
2P-71,2014.
- (12) 鷺尾絢子,北村知昭,田畑泰彦:象牙質・歯髄複合体の再生誘導療法におけるゼラチン-バイオガラス複合スポンジの有効性の検討.第14回日本再生医療学会.横浜(3月19~21日),2015.
- (13) 花田可緒理,平田-土屋志津,市丸-末松美希,浦田真理子,西野宇信,鷺尾絢子,吉居慎二,西藤法子,諸富孝彦,北村知昭:ナノハイブリッド充填用フロアブルタイプ・コンポジットレジンの臨床評価.第75回九州歯科学会総会,北九州(5月23日,5月24日),2015.
- (14) 鷺尾絢子,吉居慎二,諸富孝彦,北村知昭:新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの各種細胞に及ぼす影響.第75回九州歯科学会総会,北九州(5月23日,5月24日),2015.
- (15) 鷺尾絢子,吉居慎二,諸富孝彦,北村知昭:新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの封鎖性と生物学的影響.第142回日本歯科保存学会学術大会,北九州(6月25,26日),2015.
- (16) 花田可緒理,平田-土屋志津,市丸-末松美希,浦田真理子,西野宇信,鷺尾絢子,吉居慎二,西藤法子,永吉雅人,諸富孝彦,北村知昭:ナノハイブリッド・インジェクタブルコンポジットレジンの2年後臨床評価.第142回日本歯科保存学会学術大会,北九州(6月25,26日),2015.
- (17) 西藤法子,諸富孝彦,鷺尾絢子,花田可緒理,平田-土屋志津,Wahlberg Lars, Emerich Dwaine,北村知昭:象牙芽細胞様細胞の生存維持におけるGDNF分泌デバイスの効果について.第142回日本歯科保存学会学術大会,北九州(6月25,26日),2015.
- (18) 諸富孝彦,角館直樹,西藤法子,吉居慎二,平田-土屋志津,鷺尾絢子,北村知昭,西原達次:「歯の治療学」におけるシナリオベース実習と体験先導型臨床基礎教育の効果.第34回歯学教育学会学術大会,鹿児島(7月10,11日),2015.
- (19) 村岡宏祐,小城辰郎,中村恵子,鷺尾絢子,細川隆司,鱈見進一,北村知昭,中島啓介,栗野秀慈:VASを用いたスキルアップ実習の評価について.第34回歯学教育学会学術大会,鹿児島(7月10,11日),2015.
- (20) 鷺尾絢子,吉居慎二,諸富孝彦,北村知昭:新規バイオガラス配合根管充填用シーラーの物理化学的特性と生物学的影響.第36回日本歯内療法学会学術大会,横浜(7月11,12日),2015.
- (21) 鷺尾絢子,田畑泰彦,北村知昭:象牙質・歯髄複合体の局所的再生誘導療法におけるゼラチン-バイオガラス複合スポンジの有効性の検討.第13回日本再生歯科医学会学術大会・総会,新潟(8月29日),2015.
- (22) 西藤法子,諸富孝彦,鷺尾絢子,平田-土屋志津,北村知昭:カプセル化された細胞から分泌されるGDNFの象牙芽細胞様細胞への効果.第13回日本再生歯科医学会学術大会・総会,新潟(8月29日),2015.
- (23) 諸富孝彦,西藤法子,鷺尾絢子,北村知昭:ストロンチウム置換生体活性ガラスの象牙芽細胞分化誘導能を有するスキャホールド材としての可能性.第13回日本再生歯科医学会学術大会・総会,新潟(8月29日),2015.
- (24) 西藤法子,諸富孝彦,鷺尾絢子,平田-土屋志津,北村知昭:カプセル化された細胞から分泌されたGDNFの象牙芽細胞様細胞生存能への影響.第37回日本バイオマテリアル学会大会,京都(11

月9日,10日),2015.

(25) 諸富孝彦,西藤法子,吉居慎二,平田-土屋志津,鷺尾絢子,市丸-末松美希,中川愛加,中山皓平,藤元政考,松山篤史,大塚麻衣,浦田真梨子,花田可緒理,宮原宏武,北村知昭:シナリオベース実習を用いた体験先導型臨床基礎教育の教育効果.第143回日本歯科保存学会学術大会,東京(11月12,13日),2015.

(26) 吉居慎二,鷺尾絢子,諸富孝彦,北村知昭:新規バイオガラス配合根管充填シーラーの根管封鎖性の検討.第143回日本歯科保存学会学術大会,東京(11月12,13日),2015.

〔図書〕(計1件)

(1) 鷺尾絢子,田畑泰彦,西原達次,北村知昭:バイオガラス:象牙質・歯髄の局所的再生療法への応用.In:特集 次世代の歯の治療 -歯髄・根尖歯周組織の再生- .歯界展望 124(1),109-112,2014.

〔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

鷺尾 絢子 (WASHIO AYAKO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号:10582786

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: