

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592108

研究課題名（和文）組織工学を用いた接着性レジン上に歯周組織再生を伴う垂直破折歯根接着治療法の開発

研究課題名（英文）A development of the bonding treatment of vertically fractured roots with periodontal regeneration adhesive resin using tissue engineering

研究代表者

田中 佐織（TANAKA SAORI）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：90344522

研究成果の概要（和文）：垂直歯根破折歯の接着治療法の成功率向上のため、破折部を修復したレジン上に歯周組織再生を目指して実験を行った。レジンと象牙質粉末、及び $\beta$ -TCPを混ぜた試料の細胞増殖性の検討では細胞増殖がみられた。rhBMP-2を塗布した試料を培養細胞シートで被覆し動物の皮下に埋植し組織学的評価を行った。象牙質含有試料周囲は線維に被包された。rhBMP-2を塗布した $\beta$ -TCP含有試料上に硬組織形成が観察され、レジン上に歯周組織再生の可能性が見出された。

研究成果の概要（英文）：To enhance the bonding treatment of vertically fractured roots, we aimed to the newly cementum formation on a compound of resin and dentin powder, or  $\beta$ -TCP which may improve the binding between resin and cementum. In vitro, cytotoxicity was assessed. It had little cytotoxicity. In vivo, we observed the newly hard tissue formation on a resin containing  $\beta$ -TCP applied by rhBMP-2 and cultured bone marrow stromal cell sheets. This experiment might exhibit a possibility of the newly hard tissue formation on a resin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療学

キーワード：(1) 垂直歯根破折接着治療法 (2) 象牙質粉末含有接着性レジンセメント  
(3)  $\beta$ -TCP含有接着性レジンセメント(4) 培養細胞シート (5) 歯周組織再生 (6) 生体親和性  
(7) rhBMP-2

## 1. 研究開始当初の背景

(1) ①歯根の垂直破折は齶蝕と歯周病に続き大きな抜歯原因のひとつとなっている。齶蝕と歯周病に関しては治療法や予防法の発展により減少しており、今後は歯根破折で苦

しむ患者が増えると予想されたが、これまでは垂直歯根破折歯は多くの場合で抜歯となっており、世界的にもその治療法に関する研究はほとんど行われていなかった。

②1995年より接着性レジンセメント

(4-META/MMA-TBBレジン、スーパーボンド C&B)を用いて破折歯根の接着治療(破折部をレジンを封鎖することにより破折部からの漏洩による感染を防止する)を行ってきた。この治療法により5年後の生存率が70-80%と良好な成果を上げていることを報告し、同時に4-META/MMA-TBBレジンの基礎的、臨床的研究により、セメント質に対して象牙質と同程度の接着力を有すること、封鎖性、耐久性に優れていること、生体親和性が高いことを報告してきた。これらの結果から、4-META/MMA-TBBレジンを用いる接着治療法は垂直破折した歯根の有効な治療法となり、長期的な口腔機能の維持に貢献すると考えた。

(2) ①接着治療法の予知性を高めるためには破折歯根面に残存する歯根膜を保存することが重要であり、これまでに垂直破折歯根を走査型電子顕微鏡で観察し、肉眼的に歯根膜喪失とされる根面には細菌汚染がなく、歯根膜線維残存を確認した。しかし、歯周組織破壊が進行した臨床例では、歯根膜喪失が著しい場合があり、破折部を接着したレジんに沿って深い歯周ポケットが残存することが多く、また動物実験でも、レジン上にセメント質の形成は認められなかった。

②臨床では歯根破折と診断されるには歯周組織破壊が進行している陳臼性の場合が多く、そのような症例では可及的に歯根膜を残す努力をしているにも関わらず、破折した歯根を修復するレジンの幅が広いため、破折線に沿って深いポケットが残存することが多く、長期的に観察して抜歯に至ることもある。

③これまでの4-META/MMA-TBBレジンを用いて行った動物実験よりレジン周囲には炎症は少なく、平行な線維は観察されるがセメント質の形成は観察されなかったことから4-META/MMA-TBBレジン上にセメント質が形成される可能性は極めて低いと考えられた。

(3) ①破折部を修復したレジン面に象牙質が存在し、すでに歯周組織再生療法として応用されているエムドゲインを併用することによってセメント質形成が可能となるのではないかと考え、レジンへの象牙質添加による再生促進の可能性について検討してきた。

②数種類のウシ象牙質粉末とレジンの混合試料を試作し、*in vitro*で理工学的性質と生体親和性を検討し、最適粒子径の象牙質含有レジンを作製した。*in vivo*では、象牙質含有レジんにエムドゲインを塗布したところ、数例にレジン上に周囲セメント質から連続する新生セメント質が認められたが、形成量はわずかであり、歯周組織の再生量が少ないことが問題点として残った。

(4) そこで、象牙質含有レジんに強力な硬組織分化誘導促進因子と細胞を供給する方法を用いて克服することが出来ると考えた。強力な分化誘導因子であるBMP-2は国内外で数多くの研究報告がある。また、近年、複数の研究機関では歯根膜、骨髄、粘膜等の細胞を培養後、シート状にして組織再生に用いる方法の開発が進められている。本研究では、これらの研究成果を背景として、細胞の流失を最小限に抑制するために、細胞シートを作製し移植法を採用した。細胞シートはすでに大量の細胞外マトリックスを含有し、細胞はマトリックスを足場として付着しているため、歯周組織再生の可能性はきわめて高いと考えた。

## 2. 研究の目的

象牙質を含有する 4-META/MMA-TBB レジン上に骨誘導を強力に促進する rhBMP-2 と培養歯根膜細胞シートを応用し、レジン上に歯周組織が再生する可能性があるかを明らかにする

## 3. 研究の方法

(1) *in vitro* では、象牙質粉末及び  $\beta$ -TCP と 4-META/MMA-TBB レジンを混合した試料に rhBMP-2 を応用した。細胞には MC3T3-E1 細胞を用いた。24 well plate にレジンブロックを静置し、1 万個に調整した E1 細胞を播種、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行う。3 日後から培地を ascorbic acid(50  $\mu$ g/ml)、10mM  $\beta$ -lycerophosphate、100nM dexamethason を添加した osteogenic medium にして、培養 7 日後に試料を固定し、ALP 活性の測定を ALP 染色キット (コスモバイオ社製) で行い骨形成マーカーの発現を確認した。

(2) 象牙質含有レジン (rhBMP-2 塗布+培養骨髄細胞シート) のラット頭蓋骨への埋入

①試料の作製: ヒト歯根象牙質をルートブ

レーニングした後、ブロック状に成型 (5×5×2 mm)。根面に十字のグルーブを形成し象牙質含有レジンを充填後 (右図)



rhBMP-2 コーティングする。

②培養骨髄細胞シートの作製：ラッ

ト F344/Jc1 ラット(週令：6 週令 性別：♂) 大腿骨より骨髄を採取し、10%FBS と 1% 抗生物質添加の MEM で培養を行い、細胞シートベースを作製する。その後、細胞  $1 \times 10^5$  cell を 1, 3, 5 日目にベースに追加播種することで多層シートの作製を行う。追加播種を開始後は、培地を ascorbic acid (50  $\mu$ g/ml)、10mM  $\beta$ -lycerophosphate、100nM dexamethason を添加した osteogenic medium にする。培養 7 日後にスクレーパーにて細胞シートをディッシュより剥離し以下に用いた。

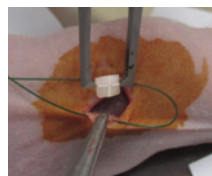
③試料の頭蓋骨への移植

F344/Jc1ラット(9週令・性別♂)に全身麻酔および局所麻酔を施し試料に rhBMP-2塗布後培養骨髄細胞シートを貼り移植した。5週間後に屠殺し、組織標本を作製した。



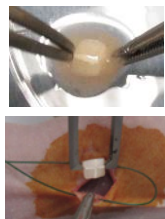
(3) 象牙質含有レジン(rhBMP-2 塗布) のヌードマウス皮下への移植

ヌードマウス (BALB/cAJc1-nu/nuJc1 8週令・性別♂) に全身麻酔および局所麻酔を施し試料に rhBMP-2を塗布し皮下へ移植した。2、4週間後に屠殺し、組織標本を作製した。



(4) 象牙質及び  $\beta$ -TCP 含有レジン(rhBMP-2 塗布+培養骨髄細胞シート) のヌードマウス皮下への移植

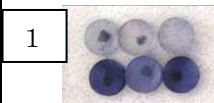
ヌードマウス (BALB/cAJc1-nu/nuJc1 8週令・性別♂) に全身麻酔および局所麻酔を施し試料に rhBMP-2塗布、培養骨髄細胞シート (Jc1:Wistar系 3 週齢) を貼り移植した。4週間後に屠殺し、組織標本を作製した。



4. 研究成果

(1) *in vitro*

1：スーパーボンドのみ



2：象牙質含有

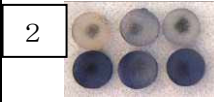
3： $\beta$ -TCP 含有

(上段：材料のみ

下段に rhBMP-2 を塗布)

1W 後の ALP 染色：材料のみでも染色が観察された

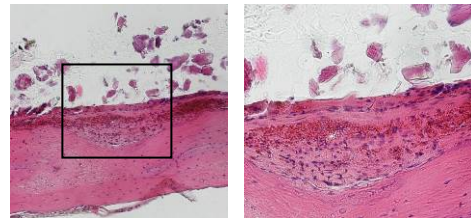
が、rhBMP-2 を塗布した群では顕著な染色が観察された。



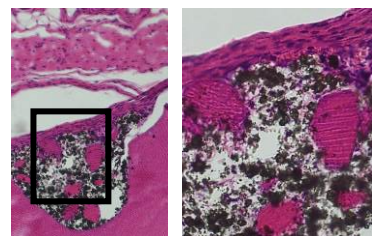
(2) 象牙質含有レジン(rhBMP-2 塗布+培養骨髄細胞シート) のラット頭蓋骨への埋入

左図は右図の拡大

・線維の被包が観察された



(3) 象牙質含有レジン(rhBMP-2 塗布) のヌードマウス皮下への移植

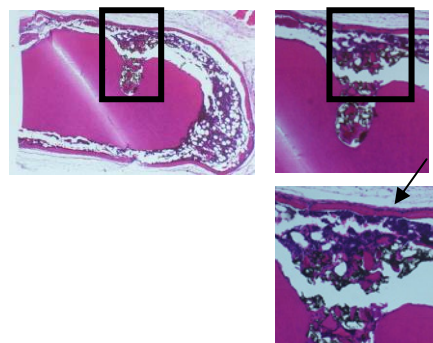


右図は左図の拡大

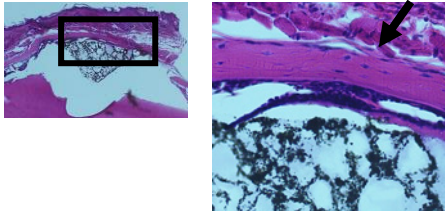
・線維の被包が観察された

(4) 象牙質及び  $\beta$ -TCP 含有レジン(rhBMP-2 塗布+培養骨髄細胞シート) のヌードマウス皮下への移植

・象牙質試料：線維の被包 (→)



・  $\beta$ -TCP 含有レジン：骨様組織形成



本研究では接着性レジンセメントに象牙質及び、 $\beta$ -TCP を添加し、rhBMP-2 と骨髄細胞培養シートを用いて、レジン上への再生促進の可能性を検討した。象牙質及び  $\beta$ -TCP 添加レジンに rhBMP-2 を塗布し培養細胞シートを貼り、ヌードマウス皮下に移植したところ、 $\beta$ -TCP 添加レジン上のみ硬組織形成が認められたが（上図）、形成量はわずかであり硬組織の形成量が少ないことが問題点として残った。

現在レジンが生体に接する面に歯周組織再生が観察された報告はほとんどないことより、本研究は垂直破折歯根接着治療法をはじめとする、歯根をレジン封鎖する治療において生体に接するレジン表面に歯周組織再生を試みる新たな治療法であると位置づけられる。

今後は新たな材料を用いて細胞増殖の足場を形成させ、細胞侵入や組織構築を促進させることが必要である。

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 5 件）

- ① Hirofumi MIYAJI, Hiroyuki YOKOYAMA, Yuta KOSEN, Hiroyuki NISHIMURA, Kazuyasu NAKANE, Saori TANAKA, Kaori OTANI, Kana INOUE, Asako IBARA, Izumi KANAYAMA, Takashi YOSHIDA, Kosuke OGAWA, Erika NISHIDA and Masamitsu KAWANAMI  
one Augmentation in Rat by Highly Porous  $\beta$ -TCP Scaffolds with Different Open-cell Sizes in Combination with Fibroblast Growth Factor-2. *J Oral Tissue Engin* 2013;10(3):172-181. 査読有
- ② Otani K, Sugaya T, Tomita M, Hasegawa Y, Miyaji H, Tenkumo T, Tanaka S, Motoki Y, Takanawa Y, Kawanami M: Healing of

experimental apical periodontitis after apicoectomy using different sealing materials on the resected root end. *Dent Mater J*, 30(4): 485-492, 2011. 査読有

③ H Miyaji, T Sugaya, K Ibe, R Ishizuka, K Tokunaga, M Kawanami : Influence of root surface conditioning with bone morphogenetic protein-2 on periodontal wound healing in beagle dogs. *J Oral Tissue Engin* 8: 173-180, 2011. 査読有

④ A Kato, H Miyaji, Y Kosen, H Yokoyama, R Ishizuka, K Tokunaga, K Inoue, M Henmi, S Tanaka, T Sugaya, M Kawanami : Periodontal healing by implantation of collagen hydrogel-sponge composite in one-wall infrabony defects in beagle dogs. *J Oral Tissue Engin*, 8: 39-46, 2010. 査読有

⑤ 菅谷 勉, 田中佐織, 元木洋史, 川浪雅光, 木村喜芳, 野口裕史, 加藤 熙 : 垂直破折歯根の接着治療とその診断. (1) 診査結果に基づく保存・抜歯の見極めと, 治療法の選択. 歯界展望, 116 (1) : 52-59, 2010. 査読無

〔学会発表〕（計 8 件）

① 田中佐織 : コンポジットレジンへのカーボンナノチューブコーティング技術の応用. 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回), 広島国際会議場 (広島), 平成 24 年 11 月 22-23 日, 2012.

② 井原朝子 : ナノ  $\beta$ -TCP/コラーゲン Scaffold の作製と骨再生療法への応用. 日本歯科保存学会 2012 年度秋季学術大会 (第 137 回), 広島国際会議場 (広島), 平成 24 年 11 月 22-23 日, 2012.

③ A Kato : The bone-forming effect of nano- $\beta$ -TCP/collagen scaffold. 98<sup>th</sup> annual meeting of AAP in collaboration with JSP, Los Angeles Convention Center (USA), Sept 29-Oct 2, 2012.

④ 宮治裕史 : 高気孔性  $\beta$ -TCP Scaffold の作製と評価. 第 55 回春季日本歯周病学会学術大会, 札幌コンベンションセンター (札幌市), 平成 24 年 5 月 18-19 日, 2012.

⑤ 井原朝子：ナノ  $\beta$ -TCP配合コラーゲン  
スキャフォールドの作製と評価. 第33回バイ  
オマテリアル学会大会, 2011年11月21日, 京  
都テルサ (京都府), 2011.

⑥ 宮治裕史: 高気孔性  $\beta$ -TCP フォームへの  
FGF2 添加による骨新生効果. 第 33 回日本バ  
イオマテリアル学会大会, 京都テルサ (京都),  
平成 23 年 11 月 21-22 日, 2011.

⑦ 宮治裕史: ゼラチンコーティング  $\beta$ -T C  
P フォームの開発と骨再生療法への応用. 第  
32回日本バイオマテリアル学会大会, グラン  
ドプリンスホテル広島 (広島県), 平成22年  
11月29-30日, 2010.

⑧ 福田寛恵: 血液の汚染時間が  
4-META/MMA-TBBレジンと歯根象牙質の接着に  
及ぼす影響. 第132回春季日本歯科保存学会,  
崇城大学市民ホール (熊本県), 平成22年6  
月5日, 2010.

[その他]

ホームページ等

<http://www.den.hokudai.ac.jp/hozon2/perio.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田中 佐織 (TANAKA SAORI)  
北海道大学・北海道大学病院・助教  
研究者番号: 90344522

### (2) 研究分担者

菅谷 勉 (SUGAYA TSUTOMU)  
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 10211301  
宮治 裕史 (MIYAJI HIROFUMI)  
北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 50372256

### (3) 連携研究者

下地 伸司 (SHIMOJI SHINJI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 30431373  
吉村 善隆 (YOSHIMURA YOSHITAKA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 30230816  
田中 享 (TANAKA TORU)

北海道大学・北海道大学病院・講師  
研究者番号: 10179771

### (4) 研究協力者

加藤 昭人 (KATO AKIHITO)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
大谷 香織 (OTANI KAORI)  
北海道大学・北海道大学病院・医員  
井上 加奈 (INOUE KANA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・医員  
福田 寛恵 (FUKUDA HIROE)  
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生  
井原 麻子 (IBARA ASAKO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生  
金山 和泉 (KANAYAMA IZUMI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生  
百瀬 赳人 (MOMOSE TAKEHITO)  
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生  
西田 恵利香 (NUSHIDA ERIKA)  
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生  
宮田 さほり (MIYATA SAORI)  
北海道大学・大学院歯学研究科・大学院生