

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462885

研究課題名(和文)高周波/電磁波治療の深在性齲蝕治療への応用 訪問・在宅治療を目指して

研究課題名(英文)Application of electromagnetic wave irradiation to deep caries lesion.

研究代表者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学系)・教授

研究者番号：30173800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：高周波/電磁波治療を深在性齲蝕へ応用するにあたり、生体に対する効果と影響を解明する必要がある。高周波/電磁波はジュール熱を発生するため殺菌作用とともに組織為害作用があると考えられるが、少し離れたところでは生体の細胞、とくに硬組織形成細胞の活性化を促進することを見出した。しかし、象牙細管内細菌殺菌および静菌効果については、それほどの作用は示さず、さらなる出力および照射条件の探索が求められた。深在性齲蝕では菌体成分が象牙芽細胞に作用し起炎すると考えられるが、自然免疫機構で重要な働きをするパターン認識受容体が象牙芽細胞に存在し、菌体成分と結合することにより、ケモカインを産生することを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Electromagnetic wave irradiation (EMWI) has inactivation or bactericidal activities. We intended to apply EMWI to deep caries lesion. In the deep lesions, bacteria invaded dentin along the dentinal tubules, but intact tissue exists around infected tubules. Hence, it needs to elucidate not only the effects to invading bacteria but also the pulpal cells. EMWI induce Joule heat that seems to harm pulpal cells. We clarified that this harmful effect occurred only small area around EMWI apparatus, and EMWI promoted the cell activities of hard tissue. These findings suggested that EMWI had beneficial effects to pulpal cells. Odontoblasts in the pulp have projections in the dentinal tubules. Thereby, pulpitis occurs when its projections encounters the bacterial components. Hence, we studied the innate immunity of pulpal cells and elucidated that odontoblasts had pattern recognition receptors and when they bound to the bacterial components, they produced chemokines that evoked inflammation.

研究分野：歯科保存学分野

キーワード：深在性齲蝕 歯髄炎 高周波/電磁波 歯髄細胞 象牙芽細胞 自然免疫機構

1. 研究開始当初の背景

2011年(H22)9月に100歳以上が4万人を突破するなど、我が国では高齢化が急激に進み、2025年(H37)には後期高齢者(75歳以上)は総人口の18%になると予想されている。そして介護施設に居住する人はH23年で92万人であるが、2025年には161万人になると予想されている。

高齢者の残存歯数は、幼年期の齲蝕の予防や歯周治療、口腔ケア認識の高まりにより大幅に増加しているが、その一方、ADL(日常生活動作)の低下による二次齲蝕や根面齲蝕、それに続発する歯髄炎が新たな問題としてクローズアップされている。食事や会話は高齢者の大きな楽しみの一つであるが、これらが阻害されて起こるQOLの低下は、高齢化社会の由々しき問題であろう。介護施設や居住系介護の高齢者が歯科診療所に通うには限界があり、在宅・訪問治療がこれからの歯科の主流になって行くものと思われる。このためにはポータブル機器で簡便に行える治療法の開発が望まれる。特に放置すると歯髄炎の激しい痛みが予想される深在齲蝕症例における治療法の開発は喫緊の課題である。我々は高周波/電磁波を用いた新しい治療法の開発を目指した。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎え、介護施設や居住系介護の高齢者への対応が喫緊の課題となっている。特に痛みの激しい歯髄炎の治療は在宅では困難となるため、これを避けるための簡便で侵襲の少ない深在性齲蝕の治療法の開発が望まれる。我々は高周波/電磁波が殺菌作用を示すのみならず、細胞の賦活化作用を持つことを明らかにし、これを応用した難治性根尖性歯周炎の新しい治療法を開発してきた。今回、高周波/電磁波を深在性齲蝕および初期歯髄炎の治療に活用することを目的に、齲蝕原性細菌への消毒効果、プラークへの抑制効果、象牙細管侵入細菌への殺菌効果、そして、初期歯髄炎への治療効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) 齲蝕原性細菌に対する高周波/電磁波照射の効果とその機序の解析

・齲蝕原性細菌の *S. mutans* や *L. casei*、*A. viscosus* などへの高周波電磁波の殺菌作用とその作用機序を解析する。すなわち、これらの細菌を寒天培地上で培養歯、高周波/電磁波を照射してその発育状況を検討する。なお、照射条件はこれまでの研究結果より500kHzとし、照射時間を変えて検討する。また、照射後の細菌の形態的变化を観察し、その殺菌作用の機序を解析する。

(2) 象牙細管内細菌に対する高周波/電磁波照射の効果とその機序の解析

・既に確立している齲蝕細菌象牙細管侵入モデルを用いて、高周波/電磁波を照射し、侵入細菌の生死を培養法および上記の組織学的方法で解析する。また、照射条件を変化させ、象牙質内での殺菌効果の最適値を決定す

る。

(3) 歯髄炎初期における歯髄自然免疫系の解析およびその治療法の開発

・ヒト歯髄より得た歯髄細胞を培養しTLR2、TLR4、NID-1、NOD-2などのパターン認識受容体発現への作用と機序を、特異抗体およびmRNA発現を解析することにより検討する。

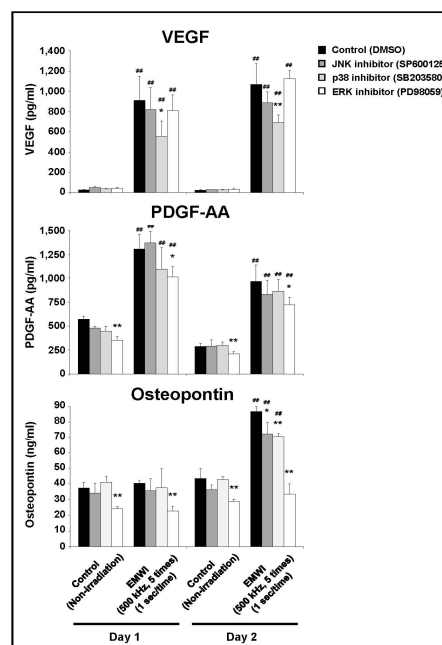
(4) 歯髄炎初期における治療法の開発

・歯髄培養細胞を用い、これを齲蝕原性細菌で刺激した場合のCXCL10などのケモカインやIL-1などのサイトカイン産生をELISAで検討するとともに、カテキン類などの抗炎症作用を検討する。

4. 研究成果

(1) 高周波/電磁波照射の硬組織形成細胞に及ぼす影響

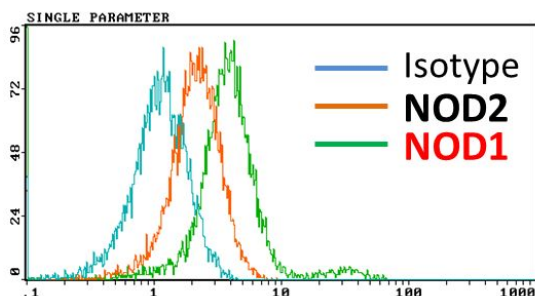
・骨芽細胞様細胞であるMC3T3-E1細胞に高周波/電磁波照射(500-1,000 KHz, 5 times, 1 sec/time)を行い、細胞増殖や細胞障害性を検討した。その結果、照射3日目において有意に細胞増殖を認めたと、細胞障害性は見られなかった。高周波/電磁波照射はジュール熱を発生して抗菌作用を示すと考えられるが、この事実は高周波/電磁波照射が上記の条件では細胞障害性を持たないことを示しており、臨床応用に向けての安全性が示唆された。なお、高周波/電磁波照射が細胞増殖作用を示したことは、新たな知見として評価できる。このメカニズムを解析したところ、高周波/電磁波照射が血小板由来成長因子(PDGF)や血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などの放出を増強するためと考えられた。さらに、細胞内伝達経路を解析したところ、高周波/電磁波照射はERK1/2やp38MAPK、SAPK/JNKのリン酸化を誘導してこれらの増殖因子を産生していることがMAPKなど特異的な抑制因子を用いることにより明らかとなった(下図)。



一方、当初予想されたミュータンス菌などの齧蝕原性細菌に対する殺菌効果は、高周波/電磁波照射機器の周辺では見られるものの、少し離れるとその効果は著しく減弱した。これは高周波/電磁波照射によるジュール熱の発生が限られており、温熱効果だけでは細菌を不活化することは難しいと考えられた。臨床的に根尖病変に高周波/電磁波照射を行った場合には治癒が見られることより、高周波/電磁波照射はジュール熱だけではない他の抗菌作用を持つ可能性があり、今後の課題となった。

(2) 深在性齧蝕にともなう初期歯髄炎の解析

・深在性齧蝕は症状の有無は別として、歯髄炎を伴うことが明らかとなっている。高周波/電磁波照射による齧蝕治療を行うにあたり、初期の歯髄炎の病理・病態の解析は必須である。そこで、歯髄炎の初期に重要な働きを担うと考えられる自然免疫機構に着目し、研究を進めた。齧蝕において象牙細管に侵入してきた細菌成分に出会うのは、歯髄組織では象牙芽細胞と考えられる。そこで、象牙芽細胞様細胞である KN-3 を用いて検討した。その結果、KN-3 細胞には病原体関連分子パターンを認識するパターン認識受容体、特に細胞質内パターン認識受容体の NOD1 が多く存在することが明らかとなった(下図)。



さらに、KN-3 細胞の NOD1 はその特異的リガンドに結合すると CINC-2 や CCL20 などのケモカインを誘導することが明らかとなった。これは深在性齧蝕において、象牙芽細胞は象牙細管内に侵入してきた細菌またはその菌体成分を、いち早くパターン認識受容体を介して感知し、ケモカイン等を産生して炎症細胞を局所に遊走させ、その侵入を防御していることを示している。今後、この防御作用にどのように高周波/電磁波照射が影響を及ぼすかを、象牙芽細胞の硬組織誘導と合わせて検討して行く予定である。

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 5 件)

Yuki Hosokawa, Kouji Hirao, Hirouchi Yumoto, Ayako Washio, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Chiaki Kitamura,

Takashi Matsuo, Functional Roles of NOD1 in Odontoblasts on Dental Pulp Innate Immunity. *BioMed Research International*. 査読あり, 2016, Article ID 9325436

松尾敬志, 中西 正, 湯本浩通, 平尾功治, 藤原千尋, 富永敏彦, 感染根管治療の考え方. *Journal of Oral Health and Biosciences*, 査読あり, 28(2), 87-92, 2016

Park SH, Ye L, L RM, Farges J-C, Yumoto, H, Inflammation of the dental pulp, Mediators of Inflammation. 査読あり, Volume 2015, Article ID 980196, 2 pages

Yumoto H, Hirao K, Tominaga T, Bando N, Takahashi K, Matsuo T, Electromagnetic wave irradiation promotes osteoblastic cell proliferation and up-regulates growth factors via activation of the ERK1/2 and p38 MAPK pathways. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 査読あり, 35, 601-615, 2015

Nakanishi T, Mukai K, Hosokawa Y, Takegawa D, Matsuo T, Catechins inhibit vascular endothelial growth factor production and cyclooxygenase-2 expression in human dental pulp cells. *International Endodontic Journal*, 査読あり, 48. 277-282, 2015

〔学会発表〕(計 15 件)

Yuki Hosokawa, Hirouchi Yumoto, Kouji Hirao, Hitomi Kumamoto, Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Takashi Matsuo, Anti-inflammatory effects of polyphenols on rat odontoblastic cells, 2017 General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research, Moscone West, 「San Francisco (アメリカ合衆国)」, 2017年3月22-25日

Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Hirouchi Yumoto, Kouji Hirao, Yuki Hosokawa, Takashi Matsuo, Effect of interleukin-17A on CCL20 production from odontoblastic-like cells, 2017 General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research, Moscone West, 「San Francisco (アメリカ合衆国)」, 2017年3月22-25日

湯本浩通, 高周波・電磁波照射の歯周組織再生療法への応用, 第75回日本矯正歯科学会大会, 徳島文理大学むらさきホール, (徳島県・徳島市), 2016年11月8日

松井沙織, 呉本勝隆, 米田直道, 恵比須繁之, 湯本浩通, 的場一成, 石本卓也, 中野貴由, 野杵由一郎, 林美加子, 新規開発したラット根管治療モデルを用いた電磁波根尖療法の評価. 日本歯科保存学会 2016年度秋季学術大会, キッセイ文化ホール, (長野県・松本市), 2016年10月28-29日

松尾敬志, 失敗から学ぶ歯内療法, 大阪歯科大学附属病院創立100周年記念館, (大阪

府・大阪市), 2016年9月10-11日

細川由樹, 湯本浩通, 平尾功治, 松尾敬志, ラット象牙化細胞様細胞(KN-3)に対するポリフェノールの炎症抑制効果, 第37回日本歯内療法学会学術大会, ウィンク愛知, (愛知県・名古屋市), 2016年7月23-24日

細川由樹, 湯本浩通, 平尾功治, 中西正, 武川大輔, 松尾敬志, 象牙芽細胞が有するMincleを介した死細胞認識機構とその歯髄炎症反応における役割. 日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会, 文京シビックホール, (東京都・文京区), 2015年11月12-13日

中西正, 武川大輔, 湯本浩通, 平尾功治, 細川由樹, 松尾敬志, Interleukin-17がラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)のCCL20産生に及ぼす影響. 日本歯科保存学会2015年度秋季学術大会, 文京シビックホール, (東京都・文京区), 2015年11月12-13日

富永敏彦, 高平一輝, 北池光輝, 板東直樹, 湯本浩通, 平尾功治, 松尾敬志, EMAT(Electro-Magnetic Apical Treatment)~根尖性歯周炎への応用に関する検討~第36回日本歯内療法学会学術大会, 鶴見大学記念館, (神奈川県・横浜市), 2015年7月11-12日

細川由樹, 湯本浩通, 平尾功治, 中西正, 武川大輔, 松尾敬志, ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)に対するカテキンとカフェイン酸の抗炎症作用. 日本歯科保存学会2015年度春季学術大会, 北九州国際会議場, (福岡県・北九州市) 2015年6月25-26日

平尾功治, 湯本浩通, 細川由樹, 中西正, 武川大輔, 松尾敬志, ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)におけるシグナル伝達経路の解析. 日本歯科保存学会2015年度春季学術大会, 北九州国際会議場, (福岡県・北九州市) 2015年6月25-26日

Tominaga T, Takahira K, Yumoto H, Matsuo T, Hirao K, EMAT(Electromagnetic Apical Treatment): Clinical application of pulsed electric current energization for root canal treatment. 2015 Annual meeting of American Association of Endodontists. Washington state convention & trade center, 「Seattle (アメリカ合衆国)」, 2015年5月17日

Tadashi Nakanishi, Daisuke Takegawa, Hironichi Yumoto, Kouji Hirao, Takashi Matsuo, Interleukin-17A regulates inflammatory mediator expression in IL-1-stimulated dental pulp cells. 93rd General Session & Exhibition of the International Association of Dental Research, Hynes Convention Center, 「Boston (アメリカ合衆国)」, 2015年3月14-15日

多良尾浩生, 湯本浩通, 平尾功治, 富永敏彦, 板東直樹, 高平一輝, 榎本崇宏, 芥川正武, 池原敏孝, 松尾敬志, 木内陽介, 電

磁波照射による骨芽細胞培養培地内の電流密度分布とVEGF産生. 第37回日本医工学会中国四国支部大会. 岡山大学大学院自然科学研究科, (岡山県・岡山市), 2014年10月4日

平尾功治, 湯本浩通, 中西正, 篠原千尋, 高橋加奈子, 武川大輔, 細川由樹, 松尾敬志, ラット象牙芽細胞様細胞(KN-3)における細菌関連病原因子刺激に対する自然免疫応答の解析. 日本歯科保存学会2014年度春季学術大会, 滋賀県立技術劇場琵琶湖ホール, (滋賀県・大津市), 2014年6月19-20日

〔図書〕(計2件)

松尾敬志 他80名, 永末書店, 第5版保存修復学21, 総ページ321(1-7), 2017年

松尾敬志 他90名, 医歯薬出版, 第2版保存修復学専門用語集, 総ページ129, 2017年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 敬志 (MATSUO, Takashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・教授

研究者番号: 30173800

(2) 研究分担者

中西 正 (NAKANISHI, Tadashi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授

研究者番号: 00217770

(3) 研究分担者

湯本 浩通 (YUMOTO, Hiromichi)

徳島大学・病院・講師

研究者番号: 60284303