

令和 5 年 4 月 6 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09632

研究課題名(和文)キトサンナノパーティクル付与象牙質誘導デバイスによる細管象牙質再生

研究課題名(英文)Tubular dentin regeneration by the lead device of dentin with nanoparticle

研究代表者

庵原 耕一郎 (Iohara, Koichiro)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・室長

研究者番号：60435865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：研究成果の概要(和文)：私共は歯髄・象牙質再生治療法の開発を行ってきた。今回、強度の高い細管象牙質を再生させることを目的として、象牙質誘導デバイスを開発した。まずin vitroにおいて象牙質誘導デバイスの最適条件決定およびナノパーティクルによる抗菌性を付与することに成功した。実際に象牙質誘導デバイスを適応して象牙質を誘導できるかをイヌ生活歯髄切断モデルにて確認した。この結果、象牙質形成を確認できた。また歯髄再生モデルにおける象牙質誘導を行ったところ、再生歯髄中に象牙質の形成がみられた。これより、象牙質誘導デバイスの象牙質再生の有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

象牙質再生の研究においてはMTAやBiodentinを用いた場合、in vitro, in vivoにおいて、骨様象牙質の再生の報告があるが、細管象牙質の再生ができた研究報告はない。骨様象牙質は、方向性がなく石灰化が不十分で脆弱、網目状である欠点がある。今回の研究結果より細管象牙質が再生されたことで、骨様象牙質による被蓋象牙質形成を改善し、強固で方向性のある細管象牙質で再生できるため、二次う蝕や歯髄炎を防止できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We have been developing pulp and dentin regenerative therapy. This time, we have made a dentin induction device for regenerating high-strength tubular dentin. First, we determined the optimum conditions for the dentin induction device in vitro. And we succeeded in imparting antibacterial properties with nanoparticles. In canine pulpectomy and pulpotomy model, the dentin induction device induced dentin. These results suggest the effectiveness of dentin regeneration of the dentin induction device.

研究分野：歯内治療学

キーワード：象牙質再生 細管象牙質 象牙質誘導デバイス

1. 研究開始当初の背景

深い虫歯や歯髄炎で歯の神経（歯髄）を完全に除去（抜髄）した場合、従来の治療法では自然に歯髄は再生することはない。私共は、歯髄幹細胞を歯（根管）内に移植し、歯髄・象牙質を再生させ歯の機能を回復させる独創的歯髄・象牙質再生治療法の開発を行ってきた。また実際に臨床研究を行い、安全性を確認し、有効性を示唆した^{1,2)}。この臨床研究において再生象牙質形成前に、仮封用セメントの隙間から細菌感染が生じる（微小漏洩）可能性がある事が問題となった。

一方、一般的に歯科において覆髄材として用いられているセメントはリン酸亜鉛セメント、ガラスイオノマーセメント等があるが、これらは接着性・微小漏洩の問題があり、最近ではMTAやBiodentineなど、より封鎖性に優れた材料が使用されるようになってきた。しかし、これらのセメントは改善されてきてはいるものの人工物であるため、長期間使用していると天然歯との間にすきまが生じ、そこから細菌が侵入してしまう³⁾。これに対して、再生象牙質は既存の象牙質と完全に癒合するため、漏洩は生じない。ただし、冠部の再生象牙質は少なくとも移植後6ヵ月経たないと十分に形成されないことが、非臨床研究において明らかになっている⁴⁾。一方、現在非常に良い材料とされているMTAでも4ヵ月で感染が起き始めることが明らかになっている⁵⁾。これより、少なくとも3ヵ月以内に象牙質を大量に再生させる必要がある。また、再生される象牙質が骨様であると、方向性が不規則で石灰化が未熟であるため細菌が侵入しやすく、強度も十分ではない。さらに、細管象牙質を形成する象牙芽細胞は歯髄の最外層に存在するため、齶蝕や機械的刺激・化学的刺激に対して最初に反応し、歯髄組織の自然免疫に重要な役割を担っている⁶⁾。したがって、骨様象牙質ではなく細管象牙質を早期に誘導させる必要がある。

2. 研究の目的

象牙質の再生を行う研究は、多くあるが、いずれも骨様象牙質を形成しており、生体本来の象牙質である強度が高く方向性のある細管象牙質を生体で誘導したものは未だにない。一方、私共は天然の象牙質を180℃で焼成することで、物理的構造のみ残してタンパク成分を除去した焼成象牙質を作製した。これを歯髄切断面に移植すると、焼成象牙質の細管構造に対応して細管象牙質が再生されることが明らかにした。そこで今回、象牙質の主成分であるハイドロキシアパタイトを寸法直径1mm、厚み1mmの形状に成型し、象牙細管と類似の小孔（直径5μm、ピッチ10μm、深さ10μm）をチタン鋳型にて付与した象牙質誘導デバイスを作製した。これを歯の冠部にセットしておくことで、再生されてきた歯髄面上に強度の高い細管象牙質が短期間に再生され、細菌感染を完全に遮断できるかを検討した。また、象牙質誘導デバイスにキトサンパーティクルを付与することで、in vitroでの抗菌性を確認した。

3. 研究の方法

(1) 象牙質誘導デバイス上で象牙芽細胞分化を誘導する最適条件の検討(in vitro)

細胞の付着に最適な細胞外基質の決定：穴加工象牙質誘導デバイス（クアーズテック）上に1%コラーゲン（高研）、1mg/mlラミニン（Invitrogen）、1mg/mlフィブロネクチン（Sigma）をコーティング（30分浸漬後1時間乾燥）後、イヌ歯髄幹細胞を播種培養した。24時間後に固定し、最も細胞が付着できる条件を走査電子顕微鏡（Keyence）にて確認した。

(2) ナノパーティクル付与象牙質誘導デバイスの抗菌性の確認(in vitro)

ナノパーティクル（ナノカム）の最適な濃度を感受性試験にて確認した。*Streptococcus mutans* ATCC 25175をBHI培地5mlにて培養し、培養した培地をBHI寒天培地にスプレッダーで塗抹

した。この上に原液、2倍、20倍、50倍、200倍希釈したナノパーティクルを浸したる紙を置いて37℃にて培養した。24時間後阻止円の有無を確認した。

次にこのナノパーティクルの抗菌性を確認した。48well細胞培養プレートの各wellにBHI Broth + 5% スクロースを1ml添加した後、同wellに50µlの*Streptococcus mutans*培養液を加えた。穴加工象牙質誘導デバイスを浸漬し、48時間培養し、歯垢・バイオフィルムを形成させた。ナノパーティクルの抗菌効果を検討するため、穴加工象牙質誘導デバイスに3分作用させた後、グルタルアルデヒドにて12時間固定し、30、50、70、90、100%エタノールにて脱水後、白金10kVにて蒸着(導電膜蒸着(スパッターコーティング)MSP-20-UM, 真空デバイス)した。その後、それぞれの標本を走査電子顕微鏡(VE9800, KEYENCE)にて観察した。

(3) イヌ生活歯髄切断モデルにおける象牙質誘導デバイスの象牙質誘導効果

ビーグル犬(北山ラベス, 伊那)メス14~18か月齢において、全身麻酔を施した後、ダイヤモンドポイントを用いて上下顎左右切歯4番の歯冠側を開拓し、#18ラウンドバーにて約2mm穿通させ、直径約1.8mmの大きさで生活歯髄切断した。その後、交互洗浄を行い、生理食塩水にて窩洞を洗浄した。洗浄後、切断面上に圧をかけないようにしてナノパーティクル付与穴加工象牙質誘導デバイスを窩洞に設置した。この上から止血用ゼラチンスポンジ(スポンジェル®, アステラス製薬)およびBiodentine (Septodont)を置き、ボンディング材(Clearfil Mega Bond2, クラレメディカル)を塗布後、光重合型コンポジットレジン(クリアフィル® DC コア オートミックス® ONE, ノリタケデンタル, 東京)にて窩洞を完全封鎖した。処置後3か月目に抜歯し、通常法に従って縦断面のパラフィン切片5µmを作製し、ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を行って歯髄創傷治癒過程を光学顕微鏡にて観察した。

(4) イヌ抜髄後歯髄再生モデルにおける象牙質誘導デバイスの象牙質再生

全身麻酔下、イヌ上下顎前歯部に抜髄処置を行い、根尖部まで#25まで穿通させ、#55まで0.5mmアンダーで拡大後、交互洗浄した。さらに生理食塩水で洗浄し、乾燥、止血した後、セメントとレジンにて完全に仮封した。抜髄処置7日~14日後、仮封をはずし、再度交互洗浄、生理食塩水で洗浄後、スメアクリーン(日本歯科薬品)を2分反応させ、さらに生理食塩水で洗浄、乾燥させた。歯髄幹細胞 5×10^5 個を20µlのコラーゲン(アテロコラーゲンインプラント、株式会社高研)に分散させ、さらにG-CSF(ノイトロジン、中外製薬)を最終濃度15ng/µlで添加し、気泡を入れないよう注意しながら根管内に注入した。注入後、歯冠部の窩洞にナノパーティクル付与穴加工象牙質誘導デバイスを根管に入り込まないように設置した。その後、Biodentine (Septodont)およびレジにて窩洞を封鎖した。移植6ヶ月後に抜歯し、縦断面の5µmパラフィン切片を作製し、HE染色した。また、象牙質および細胞移植6ヶ月後に患歯を歯科用コンビームCT(CBCT)(Veraviewepocs3D, モリタ, 吹田)にて撮影した。

4. 研究成果

(1) 象牙質誘導デバイス上で象牙芽細胞分化を誘導する最適条件の検討(in vitro)

象牙質誘導デバイスにフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンをコーティングしたもの、およびプラズマコーティングしたものに歯髄幹細胞を播種して接着率を測定した所、特にデバイスにコーティングをしなくても細胞の接着が確認できた。(図5)

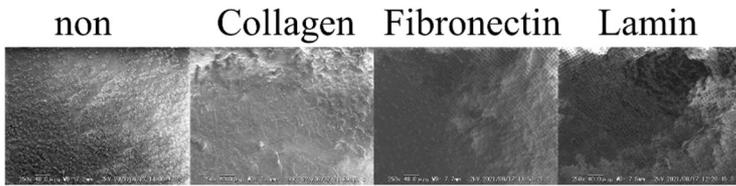


図5. 象牙質誘導デバイスにおける細胞接着の最適条件

(2) ナノパーティクル付与象牙質誘導デバイスの抗菌性の確認(in vitro)

ナノパーティクルは原液で阻止円が確認でき、希釈すると阻止円は消失した(図6)。これより、ナノパーティクルを象牙質誘導デバイスに付与する際は原液で使用することとした。

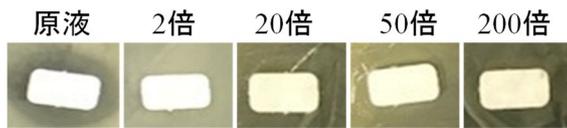


図6 ナノパーティクルの感受性試験

次に、ナノパーティクルの抗菌性を確認した。共焦点顕微鏡でナノパーティクルのバイオフィルム除去効果を観察したところ、*S. mutans* のバイオフィルムは、ほぼ除去出来た(図7)。

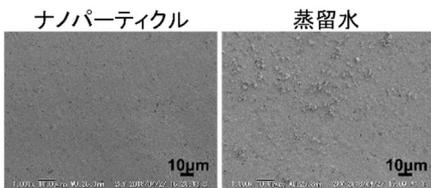


図7 ナノパーティクルによるバイオフィルム除去実験

(3) イヌ生活歯髄切断モデルにおける象牙質誘導デバイスの細管象牙質誘導効果の確認

生活歯髄切断面下に大量の被蓋象牙質形成がみられ一部が細管象牙質を形成しており、その直下に突起を有する象牙芽細胞様の細胞層を確認することが出来た(図8A, B)。また、象牙芽細胞のマーカーの一つあるDsppの免疫染色を行ったところ、同様に被蓋象牙質に接する細胞層に発現がみられたことから象牙芽細胞への分化誘導が明らかとなった(図8C)。コントロールでは特に大きな象牙質誘導はみられなかった。これにより、象牙質誘導デバイスによる象牙質形成効果を確認できた。

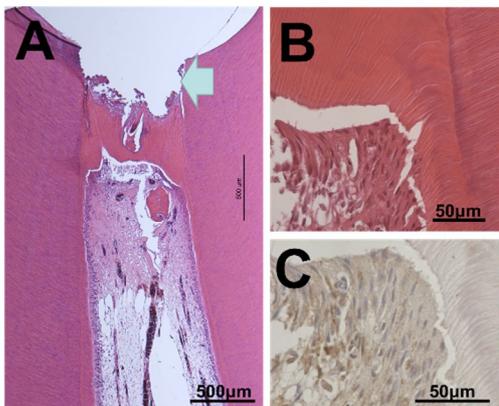


図8 イヌ生活歯髄切断モデルにおける象牙質誘導デバイスの象牙質誘導効果

A, B. ヘマトキシリン・エオジン染色 (A:低倍、B:高倍) 矢印: 象牙質誘導デバイス移植位置

C. DSPP 免疫染色 矢印: 陽性部位

(4) イヌ抜髄後歯髄再生モデルにおける穴加工象牙質誘導デバイスの象牙質再生有効性試験

歯髄幹細胞および穴加工象牙質誘導デバイスを根管に移植後、6カ月において、CBCT撮影すると、歯冠部に根管に蓋をする形の硬組織様不透過像がみられた(図9A)。また、形態学的解析により、歯根上部まで歯髄が再生し、歯冠部に象牙質の形成がみられた(図9B)。歯冠部の象牙質を高倍で観察すると、ほとんどが骨様象牙質であった(図9C)。これは、生活歯髄切断面に穴加工象牙質誘導デバイスを置いた場合の象牙質形成とは異なっていた。また、再生歯髄中に広範囲にわたって骨様象牙質の形成がみられた(図9D)。さらに、象牙芽細胞のマーカーの一つあるDsppの免疫染色を行ったところ、再生歯髄中央部に形成された象牙質に発現がみられた(図9E)。これも生活歯髄切断面に穴加工象牙質誘導デバイスを置いた場合とは異なっていた。この

歯髄内部の象牙質は、設置した穴加工象牙質誘導デバイスが細胞移植時に用いたコラーゲンに長期間さらされ、象牙質誘導デバイス中のリン酸等の成分が流出し、これを核にして形成されたものと考えられた。

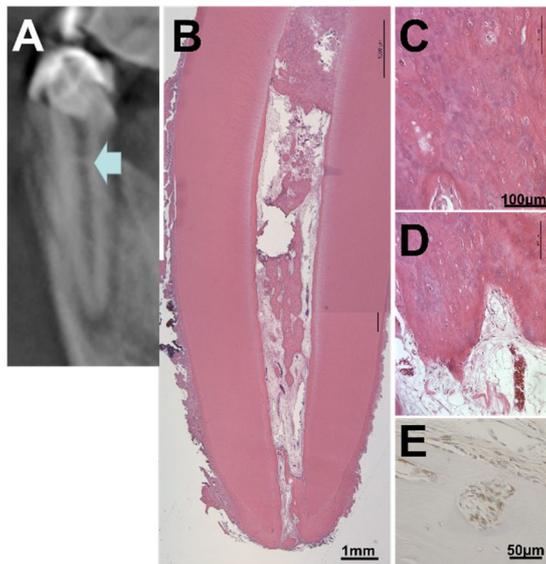


図9 穴加工象牙質誘導デバイスによる冠部象牙質再生誘導

- A. CBCTによる象牙質形成の確認
 B-D. 穴加工象牙質誘導デバイスと歯髄幹細胞移植による6か月後の歯髄・象牙質再生（ヘマトキシリン・エオジン染色）
 B. 全体像 C. 冠部象牙質 D. 再生歯髄中央部に形成された象牙質
 E. DSPP免疫染色（再生歯髄中央部）

今回、穴加工象牙質誘導デバイスを生活歯髄切断面上および歯髄再生モデルの移植細胞の上に適応することで、移植後3カ月および6

カ月で大量の被蓋象牙質を形成誘導することができた。これにより、穴加工象牙質誘導デバイスの適応は、セメントの劣化による歯冠部からの細菌の侵入に対して、再生象牙質が再生歯髄の感染を防ぐことで歯髄再生治療の成功率を上昇させることに有効である可能性が示唆された。直接覆髄や、間接覆髄においては水酸化カルシウム製剤が用いられているが、歯髄露出面下に壊死層が形成され、その下に脆弱で網目状の骨様象牙質さらに少量の細管象牙質が形成されるにすぎない。今回形成された被蓋象牙質は大量であるため、水酸化カルシウム製剤を適応するより機械的強度に優れ、漏洩や二次う蝕が防止できる可能性が示唆される。今後さらに、穴加工象牙質誘導デバイスにより形成誘導される被蓋象牙質の硬さ試験、引っ張り強さ試験、および漏洩試験等を行い、その有用性を検討する予定である。

参考文献

1. Nakashima M, Iohara K.: Recent Progress in Translation from Bench to a Pilot Clinical Study on Total Pulp Regeneration. J Endod. 2017 Sep;43(9S):S82-S86
2. Nakashima M, Iohara K., Murakami M, Nakamura H, Sato Y, Arijji Y, Matsushita K.: Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. Stem Cell Res Ther. 2017 Mar 9;8(1):61
3. Suehara M., Suzuki S., Nakagawa K. Evaluation of Wear and Subsequent Dye Penetration of Endodontic Temporary Restorative Materials :Dental Material J. 2006
4. Iohara K., Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Utunomiya S, Nakamura H, Matsushita K, Nakashima M.: A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. Stem Cells Transl Med. 2013 ; 2(10):818
5. Yavari HR, Samiei M, Shahi S, Aghazadeh M, Jafari F, Abdolrahimi M, Asgary S. Microleakage comparison of four dental materials as intra-orifice barriers in endodontically treated teeth. Iran Endod J. 2012 ;7(1):25-30.
6. Hosokawa Y, Hirao K, Yumoto H, Washio A, Nakanishi T, Takegawa D, Kitamura C, Matsuo T. Functional Roles of NOD1 in Odontoblasts on Dental Pulp Innate Immunity. Biomed Res Int. 2016 :9325436. doi: 10.1155/2016/9325436.
7. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, et al.: Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. J Endod. 2017 ;43(8):1332-1336.
8. Tomihata K, Ikada Y. In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. Biomaterials. 1997;18(7):567-75.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	中島 美砂子 (Nakashima Misako) (20207773)	国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・幹細胞再生医療研究部・部長 (83903)	

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