

平成21年5月29日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791408
 研究課題名（和文） 根尖孔外からの脈管・細胞分化誘導による象牙質・歯髄複合体再生療法の開発
 研究課題名（英文） Establishment of Dentin-pulp Complex Regeneration therapy from Periodontal Ligament Cells.
 研究代表者
 諸富 孝彦（MOROTOMI TAKAHIKO）
 九州歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：10347677

研究成果の概要：現在、う蝕（虫歯）や破折により歯の崩壊が大きくなると、抜髄処置（歯の神経を抜く）が行われる。抜髄後の歯は感覚機能が失われ、感染への抵抗力が低下する。そのため本研究では、歯髄再生を可能とするために必要とされる材料（スキャホールド-足場材）や薬剤の投与方法（ドラッグデリバリーシステム）について研究し、象牙質-歯髄複合体再生療法の実現に向け有用な材料及び治療方法についての多くの知見を得ることができた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質-歯髄複合体、再生療法、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）、ドラッグデリバリーシステム、スキャホールド

1. 研究開始当初の背景

齶蝕や破折による歯質の崩壊により歯髄組織に強い炎症が引き起こされると、抜髄法の適用となる。抜髄は歯科医療において頻度の高い処置であるが、抜髄処置を受けた歯は感覚機能が失われ、感染への抵抗力が著明に低下し、抜歯へと至る可能性が高まる。

2. 研究の目的

歯髄組織は周囲を硬組織に囲まれ、わずかな径の根尖孔でのみ外組織と交通するという極めて特殊な組織である。このため炎症は

重篤になりやすく、また除去後の歯髄組織が自然に再生することはない。よって歯の保存に重要な役割を果たす象牙質-歯髄複合体の再生療法を確立するために、必要となる知見を得ることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1)象牙芽細胞様の特徴を持つ細胞株の確立

本研究を遂行するにあたり、安定した基礎データを得るために象牙芽細胞様の特徴を備えた細胞株が不可欠である。これまでに

ラット由来歯髓細胞株は樹立されてはいるが、石灰化能等の象牙芽細胞としての機能が不十分であることが指摘されている。よって、新たにラット歯髓組織由来の象牙芽細胞様細胞株を樹立する。

(2) 歯髓細胞の各種刺激への反応

断髓や抜髓操作時には、残存歯髓組織や歯周組織に熱刺激が加わる。また組織再生初期の血管構築が不十分な段階では、末梢循環が低下し栄養状態の低下が起きる。このため、熱や低栄養といった刺激が象牙芽細胞様細胞に与える影響を検索する。

(3) 象牙質-歯髓複合体再生に適したサイトカインと投与方法の確立

塩基性線維芽細胞増殖因子 (bFGF/FGF-2) については高い血管誘導作用や細胞増殖能が報告されており、このサイトカインを用いた象牙質-歯髓複合体再生に最適な条件を検索する。

(4) 象牙質-歯髓複合体再生療法に適したスキャホルドの開発

再生療法にはこれまでコラーゲン線維がスキャホルド (足場) として多く用いられてきているが、これ以上に象牙質-歯髓複合体再生療法に適するスキャホルド材を開発する。

4. 研究成果

(1) ラット下顎切歯由来象牙芽細胞様細胞株 KN-3 の樹立

ラット下顎切歯より摘出した歯乳頭細胞を 80 週間にわたり培養し、不死化細胞をクローニングして象牙芽細胞様細胞株を樹立し報告した (Nomiyama K., et al.: J. Endod. 33: 1187-1191, 2007)。この中でも、特に高い石灰化能を示した細胞群 KN-3 細胞株を、in vitro の実験に供した。

(2) 歯髓細胞の各種刺激への反応

歯髓細胞に熱刺激を加えるとアポトーシスが引き起こされ、また低栄養状態にすることによってもアポトーシスが誘導された。さらに、低栄養条件下で熱刺激を加えた際には、熱刺激による影響が増大した。しかしながら、いずれにおいても生存細胞は再び増殖能を取り戻し、象牙芽細胞の持つ象牙質構成細胞外マトリックスの産生能や石灰化能を保持していることが確認され (図 1)、各学会学術大会にて報告した。

(3) 象牙質-歯髓複合体再生に適したサイトカインと投与方法の確立

①bFGF には強い血管誘導・形成能を有すること、分化機能を保持したままの未分化細胞

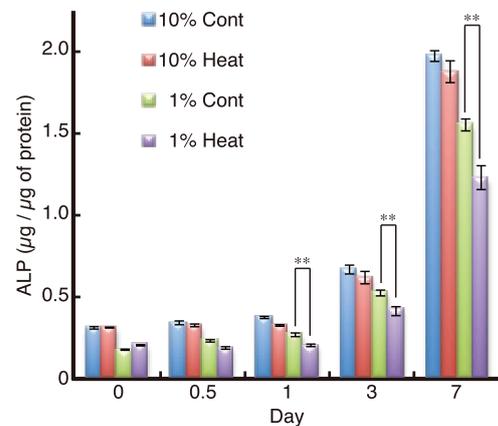


図 1 : アルカリフォスターゼ活性の変化

を増殖誘導することが多数報告されている。この bFGF を、ゼラチンハイドロゲル粒子を用いたドラッグデリバリーシステムにより断髓部に徐放することで、従来の断髓法のように髓腔内全体がデンティンブリッジとして骨様象牙質により満たされるのではなく、象牙質様石灰化組織と血管および線維芽細胞様の歯髓組織が混在する、象牙質-歯髓複合体を誘導することが確認され、報告した (Kikuchi N., et al.: J. Endod. 33: 1198-1202, 2007)。しかしながら、この方法では髓腔内の数カ所に象牙質-歯髓複合体様構造が点在し、歯髓組織の咬合面側にのみ象牙質が形成される、理想的な象牙質-歯髓複合体が形成されてはいなかった。

②歯髓組織の上層に象牙質が形成される、理想的な象牙質-歯髓複合体再生の条件を検索するため、bFGF の濃度に注目した。その結果、前報告の研究に用いた bFGF 濃度を低下させることで、術後 3 週間までに咬合面側に象牙質様硬組織が、またその下層には歯髓細胞が構築されることが確認され、(図 2) 報告した (Ishimatsu H. et al.: J. Endod. 2009. in press)。

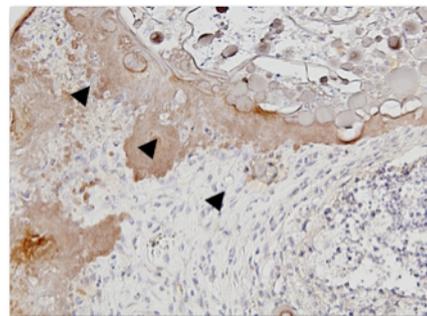


図 2 : 象牙質様構造 (▲) と下方の歯髓組織

以上の結果より、bFGF とゼラチンハイドロゲル粒子を用いたドラッグデリバリーシステムによる象牙質-歯髓複合体再生の可能性が示唆された。

(4) 象牙質-歯髓複合体再生療法に適したスキ

キャホールドの開発

現在ヒアルロン酸は、生体に存在する高分子の中で特に注目をされ、様々な分野でその有用性が報告されている。このヒアルロン酸を、これまで用いてきたコラーゲンスポンジよりもさらに有用な象牙質-歯髄複合体再生療法に用いるキャホールド材として適用可能であるか研究した。KN-3 細胞を用いた in vitro の実験により、ヒアルロン酸はコラーゲンスポンジと同等の細胞保持能力を有するが、細胞をより未分化な状態のまま維持していることが示唆された。また in vivo において、コラーゲンスポンジを用いたものと比較して炎症細胞の出現が少ないことが確認された。

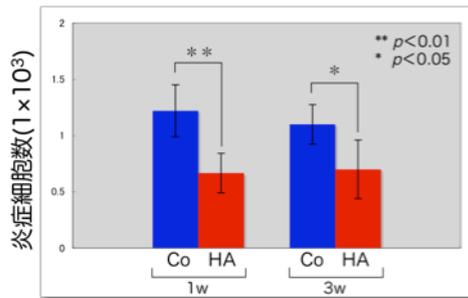


図3：炎症細胞数の変化 Co：コラーゲン、HA：ヒアルロン酸

以上から、ヒアルロン酸スポンジの象牙質-歯髄複合体再生療法用キャホールド材としての有用性を確認し、各学会学術大会において報告した。

これまでに述べたように、本研究結果によって象牙質-歯髄複合体再生療法確立に向けて有用な多くの知見を得ることができた。

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6件)

- ① Nomiyama K, Kitamura C, Tsujisawa T, Nagayoshi M, Morotomi T, Terashita M, Nishihara T: Effects of Lipopolysaccharide on Newly Established Rat Dental Pulp-derived Cell Line with Odontoblastic Properties. J. Endod. 33: 1187-1191, 2007.
- ② Kikuchi N, Kitamura C, Morotomi T, Inuyama Y, Ishimatsu H, Tabata Y, Nishihara T, Terashita M: Formation of

Dentin-like Particles in Dentin Defects above Exposed Pulp by Controlled Release of Fibroblast Growth Factor 2 from Gelatin Hydrogels. J. Endod. 33: 1198-1202, 2007.

- ③ 坂本英治, 諸富孝彦, 北村知昭, 椎葉俊司, 矢野淳也, 永吉雅人, 寺下正道, 仲西修, 風間富栄: 難治性口腔顔面痛への直線偏光近赤外線の効果についての検討. 日本レーザー治療学会雑誌. 6: 22-25 2007.
- ④ 永吉雅人, 北村知昭, 安保直樹, 矢野淳也, 諸富孝彦, 市丸美希, 尾川幸雄, 寺下正道: 臨床をシミュレートした環境下でのNi-Tiファイルによる根管形成に与える臨床経験の影響 第1報 湾曲の少ない根管における根管形成所要時間と根管壁の評価. 日歯内療誌. 29: 113-118, 2008.
- ⑤ 諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道: 象牙質-歯髄複合体の創傷治癒解明と再生療法確立. 九州歯会誌. 62: 115-118, 2008.
- ⑥ 吉田真理, 北村知昭, 藤本陽子, 諸富孝彦, 永吉雅人, 波多野圭紀, 柿木保明, 寺下正道: 歯科治療へのアロマセラピー応用が患者不安の改善に与える効果. アロマセラピー学雑誌. 9: 47-54, 2009.

〔学会発表〕(計24件)

- ① 諸富孝彦, 坂本英治, 北村知昭, 椎葉俊司, 矢野淳也, 永吉雅人, 仲西修, 寺下正道: 歯内治療で改善を認めない難治性歯痛患者への口腔顎顔面痛治療の検討. 第67回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 九州歯科学会抄録集: 21, 2007.
- ② 吉田真理, 藤本陽子, 北村知昭, 永吉雅人, 諸富孝彦, 波多野圭紀, 寺下正道: 歯科治療へのアロマセラピー応用と患者不安の変化に関する研究. 第67回九州歯科学会総会, 北九州(5月), 九州歯科学会抄録集: 30,

2007.

- ③有田正博, 陳 克恭, 芳賀健輔, 小城辰郎, 松木貴彦, 中村恵子, 波多野圭紀, 矢野淳也, 諸富孝彦, 笠井宏記, 永吉雅人. 統合型卒前臨床実習とポートフォリオ評価の導入. 第 67 回九州歯科学会総会, 北九州 (5 月), 九州歯科学会抄録集: 34, 2007.
- ④諸富孝彦, 坂本英治, 北村知昭, 椎葉俊司, 矢野淳也, 永吉雅人, 寺下正道: 歯内治療で改善しない難治性歯痛患者への口腔顔面痛治療の検討. 第 28 回日本歯内療法学会学術大会, 広島 (5 月), 日本歯内療法学会抄録集: 89, 2007.
- ⑤坂本英治, 諸富孝彦, 北村知昭, 椎葉俊司, 矢野淳也, 永吉雅人, 寺下正道, 仲西修: 難治性口腔顔面痛の鑑別と直線偏光近赤外線の効果についての検討. 第19回日本レーザー治療学会シンポジウム2: 歯科とLLLT療法, 東京(6.30-7.1), 2007.
- ⑥永吉雅人, 北村知昭, 諸富孝彦, 矢野淳也, 安保直樹, 市丸美希, 寺下正道: 第 29 回日本歯内療法学会学術大会, 千葉 (5 月), 日本歯内療法学会抄録集: , 2008.
- ⑦犬山喜夫, 北村知昭, 諸富孝彦, 永吉雅人, 西原達次, 寺下正道: 象牙質/歯髄複合体再生療法へのヒアルロン酸の応用. 第 68 回九州歯科学会総会, 北九州 (5 月), 九州歯科学会抄録集: 12, 2008.
- ⑧石松宏隆, 北村知昭, 諸富孝彦, 西原達次, 寺下正道: FGF-2 濃度の違いが象牙質/歯髄複合体再生へ与える影響. 第 68 回九州歯科学会総会, 北九州 (5 月), 九州歯科学会抄録集: 26, 2008.
- ⑨諸富孝彦, 北村知昭, 豊野 孝, 豊島邦昭, 西原達次, 寺下正道: ヒートストレスの象牙芽細胞様細胞株(KN-3)へ与える影響. 第 68 回九州歯科学会総会, 北九州 (5 月), 九州歯科学会抄録集: 33, 2008.

- ⑩永吉雅人, 北村知昭, 諸富孝彦, 矢野淳也, 寺下正道: 臨床をシミュレートした環境下での Ni-Ti ファイルによる根管形成の評価. 第 68 回九州歯科学会総会, 北九州 (5 月), 九州歯科学会抄録集: 36, 2008.
- ⑪石松宏隆, 諸富孝彦, 北村知昭, 田畑泰彦, 寺下正道: ゼラチン粒子から徐放される FGF-2 濃度が象牙質/歯髄複合体再生に与える影響. 第 128 回日本歯科保存学会, 新潟 (6 月), 日歯保存誌, 51 春季特別号: 48, 2008.
- ⑫諸富孝彦, 北村知昭, 豊野 孝, 母里公平, 寺下正道: 象牙芽細胞様細胞株(KN-3)へヒートストレスが与える影響. 第 128 回日本歯科保存学会, 新潟 (6 月), 日歯保存誌, 51 春季特別号: 87, 2008.
- ⑬犬山喜夫, 諸富孝彦, 永吉雅人, 北村知昭, 寺下正道: 象牙質/歯髄複合体再生にスキャホールドとして用いたヒアルロン酸の効果. 第 128 回日本歯科保存学会, 新潟 (6 月), 日歯保存誌, 51 春季特別号: 135, 2008.
- ⑭Ishimatsu H, Kitamura C, Inuyama Y, Morotomi T, Nishihara T, Tabata Y, Terashita M.: Effects of FGF-2 Concentration on Regenerated Dentin Structures. 86th General Session and exhibition of International Association for Dental Research, Toronto, Canada (July 2-5), 2008.
- ⑮Inuyama Y, Kitamura C, Ishimatsu H, Morotomi T, Nagayoshi M, Nishihara T, Terashita M.: Effects of Hyaluronic Acid on Rat Pulp Regeneration. 86th General Session and exhibition of International Association for Dental Research, Toronto, Canada (July 2-5), 2008.
- ⑯諸富孝彦: シンポジウム「医療安全を人間工学がサポートできるのか」. 人の問題: 人

は必ずミスをする。日本歯科人間工学会第24回研究発表大会, 北九州(8月), プログラム・抄録集: 10, 2008.

- ⑰吉田真理, 柿木保明, 北村知昭, 尾崎由衛, 諸富孝彦, 永吉雅人, 藤本陽子, 寺下正道. 日本歯科人間工学会第24回研究発表大会, 北九州(8月), プログラム・抄録集: 38, 2008.
- ⑱犬山喜夫, 北村知昭, 諸富孝彦, 永吉雅人, 寺下正道: ヒアルロン酸スポンジに対する歯髄組織の炎症応答. 第129回日本歯科保存学会, 富山(11月), 日歯保存誌, 51秋季特別号: 83, 2008.
- ⑲諸富孝彦, 北村知昭, 寺下正道: 象牙芽細胞様細胞の有する象牙質形成能への熱刺激の影響. 第129回日本歯科保存学会, 富山(11月), 日歯保存誌, 51秋季特別号: 84, 2008.
- ⑳石松宏隆, 北村知昭, 諸富孝彦, 田畑泰彦, 寺下正道: FGF-2濃度の違いが象牙質欠損部における硬組織誘導に与える影響. 第129回日本歯科保存学会, 富山(11月), 日歯保存誌, 51秋季特別号: 155, 2008.
- ㉑諸富孝彦, 北村知昭, 西原達次, 寺下正道: 熱刺激が象牙芽細胞様細胞に与える影響. 歯工学連携キックオフシンポジウム, 北九州(1月), 2009.
- ㉒永吉雅人, 北村知昭, 矢野淳也, 諸富孝彦, 市丸美希, 尾川幸雄, 寺下正道: 臨床をシミュレートした環境で行なった根管形成への臨床経験の影響. 歯工学連携キックオフシンポジウム, 北九州(1月), 2009.
- ㉓石松宏隆, 北村知昭, 諸富孝彦, 寺下正道: FGF-2濃度の違いが歯の再生に与える影響. 歯工学連携キックオフシンポジウム, 北九州(1月), 2009.
- ㉔犬山喜夫, 北村知昭, 諸富孝彦, 永吉雅人,

西原達次, 寺下正道: 歯の再生療法におけるヒアルロン酸スポンジの検討. 歯工学連携キックオフシンポジウム, 北九州(1月), 2009.

[図書] (計1件)

- ①寺下正道, 北村知昭, 諸富孝彦, 他(日本歯科保存学会): 保存修復学専門用語集, 医歯薬出版, 2009年3月.

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

諸富孝彦 (MOROTOMI TAKAHIKO)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号: 10347677

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし